ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΚΤΗΝΑΤΡΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

Βασιλική Σχοινά[1], Παναγιώτα Γιαννικοπούλου[1], Ελένη Σταθουδάκη[1], Αγγελική Παναγιωτοπούλου[2], Χαράλαμπος Αλεξόπουλος[1] και Ηλίας Κακουλίδης[1]
[1]ΕΧΗΜ/ΓΧΚ-ΕΙΜ, Χημική Υπηρεσίας Μετρολογίας, Γενικό Χημείο του Κράτους, Αν.Τσόχα 16, 115 21 ΑΘΗΝΑ
[2]Εργ. Φασματοσκοπίας NMR, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, 15310-2 Αγία Παρασκευή Αττικής
e-mail: metrology@gcsl.gr

Περίληψη

Αντικείμενο εκτεταμένων ελέγχων στη χώρα μας, την Ευρωπαϊκή Ένωση, αλλά και σε ολόκληρο τον κόσμο αποτελεί η ενδεχόμενη παρουσία υπολειμμάτων κτηνιατρικών φαρμάκων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης με έμφαση στο κρέας και στο γάλα. Το Εργαστήριο Χημικής Μετρολογίας υποστηρίζει τις συγκεκριμένες αναλύσεις για τον προσδιορισμό μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων στο Εθνικό Πρόγραμμα Ελέγχου Καταλοίπων του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων, πραγματοποιώντας τους συγκεκριμένους προσδιορισμούς και συμμετέχει ως εργαστήριο αναφοράς σε διεργαστηριακές συγκρίσεις του Κοινοτικού Εργαστηρίου Αναφοράς. Παράλληλα, αξιοποιεί την εμπειρία του αυτή κατοχυρώνοντας ικανότητες διακρίβωσης και μέτρησης σε παγκόσμιο επίπεδο, συμμετέχοντας στη σύγκριση CCQM-K141 (υπολείμματα αντιβιοτικών σε κρέας), επιχειρώντας να τεκμηριώσει αντίστοιχες ικανότητες στη βάση δεδομένων του BIPM. Στην παρούσα επικοινωνία παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις πρόσφατες διεθνείς δραστηριότητες του εργαστηρίου.

Λέξεις-Κλειδιά: LC-MS/MS, τρόφιμα ζωικής προέλευσης, υπολείμματα κτηνιατρικών φαρμάκων, διεθνείς συγκρίσεις.

Abstract

The possible presence of veterinary drug residues in foodstuffs of animal origin, especially in meat and milk, is subject to official control that is conducted in the European Union countries, as well as worldwide. The Chemical Metrology Service of the General Chemical State Laboratory supports the pertinent control programme in Greece by performing analyses of meat and milk samples and thus is obliged to participate in Proficiency Testing schemes (PTs) organized by the European Reference Laboratory. In parallel, EXHM/GCSL-EIM participates in key comparisons organized by the OAWG (Organic Analysis Working Group) of the CCQM (Consultative Committee for the Amount of Substance) between the NMIs/DIs (National Metrology Institutes/Designated Institutes) in order to submit calibration and measurement capabilities for the database of BIPM. The laboratory's contributions in the recent interlaboratory comparisons are presented in this communication.

Keywords: LC-MS/MS, foodstuffs of animal origin, veterinary drug residues, international comparisons

1. Εισαγωγή

Σύμφωνα με την οδηγία 96/23/ΕΚ/1996, τα κτηνιατρικά φάρμακα κατατάσσονται σε δύο ομάδες Α και Β αναφορικά με το εάν επιτρέπεται ή όχι η χορήγησή τους σε ζώα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση. Τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ) ανήκουν στην κατηγορία Β2ε και τα αντιβιοτικά σουλφαμιδών και κινολονών στην κατηγορία Β1, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: ομάδα Α και ομάδα Β υπολειμμάτων κτηνιατρικών φαρμάκων
(Παράρτημα Ι της οδηγίας 96/23/ΕΚ/1996)

ΟΜΑΔΑ Α -Ουσίες με αναβολική δράση και μη επιτρεπόμενες ουσίες
ΟΜΑΔΑ Β - Κτηνιατρικά φάρμακα και επιβλαβείς ουσίες
Β1. Αντιβακτηριακές ουσίες συμπεριλαμβανόμενων των σουλφαμιδών και των κινολονών
Β2. Άλλα κτηνιατρικά φάρμακα
Β2ε. Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη (ΜΣΑΦ)

Για την προστασία της δημόσιας υγείας από φαρμακολογικά δραστικές ουσίες έχουν θεσπιστεί ανώτατα όρια καταλοίπων (ΑΟΚ) κτηνιατρικών φαρμάκων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης, τα οποία περιγράφονται στον Κανονισμό ΕΕ 37/2010 της Επιτροπής (Πίνακας 2). Τα ΜΣΑΦ και τα αντιβιοτικά σουλφαμιδών και κινολονών αποτελούν κατηγορίες ουσιών που καλύπτονται από τον Κανονισμό ΕΕ 37/2010 της Επιτροπής. Στην Οδηγία 7 του Δεκεμβρίου 2007 των κοινοτικών εργαστηρίων αναφοράς, για ορισμένα ΜΣΑΦ για τα οποία δεν έχει οριστεί ΑΟΚ, καθορίστηκαν συνιστώμενα όρια (RC), τα οποία αναφέρονται στον Πίνακα 2.

Το 2002 εκδόθηκε η απόφαση ΕΚ/657/2002 για εφαρμογή της οδηγίας 96/23/ΕΚ/1996 σχετικά με την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων προσδιορισμού υπολειμμάτων κτηνιατρικών φαρμάκων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Ύστερα από αίτημα του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, το Εργαστήριο Χημικής Μετρολογίας (ΕΧΗΜ) ανέπτυξε και επικύρωσε μεθόδους προσδιορισμού δώδεκα ΜΣΑΦ σε κρέας και δεκατριών ΜΣΑΦ σε γάλα (βλ. Πίνακες 2 & 3) που πληρούν τα κριτήρια επίδοσης της απόφασης ΕΚ/657/2002. Το εργαστήριο διαπιστεύτηκε για την εκτέλεση των μεθόδων το 2015 από το ΕΣΥΔ (αρ. πιστοποιητικού διαπίστευσης 142-4, κατά ΕΛΟΤ ΕΝ ISO/IEC 17025:2005) και εκτελεί τις συγκεκριμένες αναλύσεις για το Εθνικό Πρόγραμμα Ελέγχου Καταλοίπων του ΥπΑΑΤ ως διαπιστευμένο εργαστήριο επίσημου ελέγχου.

Προκειμένου οι εργαστηριακές μετρήσεις να καλύπτουν τις απαιτήσεις των Κανονισμών, θα πρέπει να είναι διεθνώς ισοδύναμες. Για το σκοπό αυτό η Συμβουλευτική Επιτροπή για την Ποσότητα της Ουσίας (Consultative Committee for the Amount of Substance, CCQM) και η Ομάδα Εργασίας στην Οργανική Ανάλυση (Organic Analysis Working Group, OAWG) διοργανώνουν διεργαστηριακές συγκρίσεις (KCs, key comparisons) μεταξύ των εθνικών μετρολογικών/ορισμένων ινστιτούτων (National Metrology Institutes/Designated Institutes, NMIs/DIs) για την ανάπτυξη πιστοποιημένων υλικών αναφοράς (CRMs) και μεθόδων αναφοράς. Με την επιτυχή συμμετοχή τους στις συγκρίσεις αυτές, τα ινστιτούτα τεκμηριώνουν ικανότητες διακρίβωσης και μέτρησης στη διεθνή βάση δεδομένων του BIPM.

Πίνακας 2: Νομοθετικά όρια (ανώτατα – ΑΟΚ και συνιστώμενα – RC όρια καταλοίπων ΜΣΑΦ), όρια απόφασης (CC_α) και ικανότητα ανίχνευσης (CC_β) του ΕΧΗΜ

αναλύτης	υπόστρωμα	ΑΟΚ* (μg/kg)	RC** (μg/kg)	CC_α (μg/kg)	CC_β (μg/kg)
4-μεθυλαμινοαντιπυρίνη	κρέας	100	-	104,8	109,5
	γάλα	50	-	54,8	59,6
μελοξικάμη	κρέας	20	-	21,8	23,7
	γάλα	15	-	16,3	17,6
φλουνιξίνη	κρέας	20 50 (χοίροι)	-	23,7 56,7	27,4 63,5
	γάλα	-	-	1,29	1,75
5-υδροξυφλουνιξίνη	κρέας	-	-	-	-
	γάλα	40	-	46,6	53,2
καρπροφαίνη	κρέας	500	-	615,4	730,8
	γάλα	-	-	39,5	53,3
δικλοφενάκη	κρέας	5	-	6,4	7,7
	γάλα	0,100	-	0,120	0,148
τολφαιναμικό οξύ	κρέας	50	-	59,5	69,0
	γάλα	50	-	54,1	58,2
4-αμινοαντιπυρίνη	κρέας	-	-	13,7	19,3
	γάλα	-	-	28,6	38,65
οξυφαινυλβουταζόνη	κρέας	-	5	1,29	1,81
	γάλα	-	5	3,47	4,70
φαινυλβουταζόνη	κρέας	-	5	1,04	1,46
	γάλα	-	5	1,07	1,45
ναπροξένη	κρέας	-	5	3,16	4,43
	γάλα	-	10	1,60	2,17
κετοπροφαίνη	κρέας	-	-	0,70	0,98
	γάλα	-	-	0,76	1,03
μεφαιναμικό οξύ	κρέας	-	5	1,58	2,22
	γάλα	-	10	1,31	1,77

* ανώτατα επιτρεπόμενα όρια (Καν 37/2010) ** συνιστώμενα όρια RC (οδηγία 7 Δεκεμβρίου 2007 των κοινοτικών εργαστηρίων αναφοράς)

Ζητούμενο στην αναλυτική κοινότητα αποτελεί η εξασφάλιση της ισοδυναμίας των μετρήσεων μεταξύ των εργαστηρίων που δραστηριοποιούνται σε συγκεκριμένους αναλυτικούς προσδιορισμούς. Για το λόγο αυτό, το 2017 διοργανώθηκε από τη CIPM διεθνής σύγκριση μεταξύ των εργαστηρίων που παρέχουν υπηρεσίες μέτρησης πολικών αναλυτών σε τρόφιμα. Συγκεκριμένα, ανακοινώθηκε η διεξαγωγή της σύγκρισης CCQM-K141 με αναλύτες τα πολικά αντιβιοτικά ενροφλοξακίνη (EFX) και σουλφαδιαζίνη (SDZ) σε βόιο μυικό ιστό ως υπόστρωμα. Το δείγμα αυτό αποτελεί υποψήφιο πιστοποιημένο υλικό αναφοράς φαρμακευτικών υπολειμμάτων, το οποίο αναπτύσσεται από το Καναδικό Συμβούλιο Έρευνας (National Research Council Canada, NRC) και την Καναδική Αρχή Επιθεώρησης Τροφίμων (Canadian Food Inspection Agency, CFIA). Επίσης, το υπόστρωμα αυτό είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες και λίπος (ανήκει στην κατηγορία 4 της διατροφικής πυραμίδας του AOAC). Στους συμμετέχοντες διανεμήθηκαν τρία δείγματα 10 g λυοφιλιοποιημένου μυικού ιστού και ισοτοπικά επισημασμένα διαλύματα $^{13}C_6$ σουλφαδιαζίνης και άλατος του υδροϊωδίου της ενροφλοξακίνης-d_5 (για χρήση σε πειράματα ισοτοπικής αραίωσης-IDMS). Η προμήθεια βαθμονομητών με συγκεκριμένη καθαρότητα και μετρολογική ιχνηλασιμότητα ήταν ευθύνη των συμμετέχοντων. Ο

προσδιορισμός των δύο αναλυτών ζητήθηκε ως κλάσμα μάζας επί ξηρού (διόρθωση με την προσδιοριζόμενη περιεχόμενη υγρασία του δείγματος) και σε εύρος 500-5000 μg/kg για τη σουλφαδιαζίνη και σε εύρος 20-200 μg/kg για τη ενροφλοξακίνη.

Για τη συμμετοχή του στη σύγκριση αυτή το ΕΧΗΜ/GCSL-EIM ανέπτυξε μία μέθοδο η οποία περιλάμβανε εκχύλιση, καθαρισμό του δείγματος και υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας σε ισοτοπική αραίωση LC-MS/MS (IDLC-MS/MS) ως αναλυτική τεχνική.

2. Μεθοδολογία

2.1. Αρχή μεθόδου προσδιορισμού ΜΣΑΦ σε κρέας και γάλα

Συγκεκριμένη ποσότητα δείγματος κρέατος ή γάλακτος εμβολιάζεται με πρότυπο διάλυμα επισημασμένων ΜΣΑΦ και ομογενοποιείται. Ο διαχωρισμός των ΜΣΑΦ επιτυγχάνεται σε διάταξη υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και η ανίχνευσή τους πραγματοποιείται με διαδοχική φασματομετρία μαζών σε λειτουργία παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (MRM) σε θετικό ιονισμό. Για τη χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιείται στήλη Thermo Hypersil Gold C18 HS (100 mm x 2,1 mm, 3 μm) με βαθμιδωτή έκλουση της κινητής φάσης (υδατικό διάλυμα οξικού αμμωνίου 6,5 mM και μεθανόλης) σε ροή 250 μL/min.

Πίνακας 3: Στοιχεία και συνθήκες ταυτοποίησης ΜΣΑΦ που εντάσσονται στο επίσημο πεδίο διαπίστευσης (ΕΠΕΔ) του ΕΧΗΜ

αναλύτες	RT (min)	M+ (m/z)	Q (m/z)	q (m/z)	δυναμικό εστίασης (V)	δυναμικό κρούσης (V)
αμινοαντιπυρίνη	12,6	204	56	159	52	21/13
καρπροφαίνη	17,3	274	228	193	85	18/32
δικλοφενάκη	17,2	296	214	215	87	31/18
φλουνιξίνη	17,0	297	279	264	95	23/34
5-υδροξυφλουνιξίνη	16,4	313	295	280	96	23/34
κετοπροφαίνη	15,3	255	209	77	105	14/41
4-μεθυλαμινοαντιπυρίνη	13,1	218	56	187	70	17/10
μεφαιναμικό οξύ	17,6	242	224	180	54	21/42
μελοξικάμη	15,0	352	115	141	84	19/22
ναπροξένη	15,2	231	185	170	73	14/26
οξυφαινυλβουταζόνη	14,2	325	160	204	67	20/16
φαινυλβουταζόνη	16,0	309	160	104	87	21/33
τολφαιναμικό οξύ	18,1	262	209	244	71	25/15
4-μεθυλαμινοαντιπυρίνη-d_3	13,1	221	56	187	70	17/10
φλουνιξίνη-d_3	17,0	300	282	112	95	23/34
κετοπροφαίνη-d_3	15,3	258	212	80	105	14/41
μελοξικάμη-d_3	14,9	355	115	141	84	19/22
φαινυλβουταζόνη-$^{13}C_{12}$	16,0	321	166	83	87	21/43
τολφαιναμικό οξύ-$^{13}C_6$	18,1	268	215	250	71	25/15

Τα ΜΣΑΦ ταυτοποιούνται με βάση το χρόνο κατακράτησής τους (RT), τη μετάπτωση των ψευδομοριακών ιόντων (M+) στα αντίστοιχα παράγωγά τους και το λόγο των σημάτων τους (ιόν ποσοτικοποίησης Q προς ιόν ταυτοποίησης q), ενώ ποσοτικοποιούνται με την τεχνική του εσωτερικού προτύπου (ισοτοπική αραίωση) από κατάλληλες καμπύλες αναφοράς. Οι μεταπτώσεις των ιόντων και οι αντίστοιχες συνθήκες λειτουργίας του φασματόμετρου περιγράφονται στον Πίνακα 3.

2.2 Διαδικασία προσδιορισμού ΜΣΑΦ σε κρέας και γάλα

Σε ποσότητα ομογενοποιημένου δείγματος κρέατος πραγματοποιείται εμβολιασμός με συγκεκριμένη ποσότητα επισημασμένων εσωτερικών προτύπων και εξισορρόπησή του για 30 min. Προστίθενται 10 mL ακετονιτριλίου. Το μείγμα εκχυλίζεται σε ομογενοποιητή για 1 min και φυγοκεντρείται για 10 min (4500 rpm) στους 0 °C. Ακολουθεί διήθηση του εκχυλίσματος από φίλτρο 0,45 μm και ανάλυση στο LC/MS-MS.

Σε ποσότητα δείγματος γάλακτος πραγματοποιείται εμβολιασμός με συγκεκριμένη ποσότητα επισημασμένων εσωτερικών προτύπων και εξισορρόπησή του για 30 min. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 10 mL ακετονιτριλίου, το μείγμα ανακινείται σε τάρακτρο για 10 min και φυγοκεντρείται για 10 min στις 4500 rpm στους 0 °C. Η υπερκείμενη φάση διοχετεύεται σε νέο περιέκτη που περιέχει 1 g οξικού αμμωνίου. Ανακινείται για 10 min σε τάρακτρο και φυγοκεντρείται για 5 min στις 4500 rpm στους 0 °C. Ακολουθεί ξήρανση υπό κενό 5 mL της υπερκείμενης φάσης, ανασύσταση σε 1 mL μεθανόλη, διήθηση από φίλτρο 0,45 μm και ανάλυση στο LC-MS/MS.

Για την ποσοτικοποίηση των ΜΣΑΦ χρησιμοποιείται εξωτερική καμπύλη βαθμονόμησης, πέντε τουλάχιστον σημείων, με πρότυπα διαλύματα μήτρας σε συγκεντρώσεις που καλύπτουν την περιοχή συγκεντρώσεων μεταξύ 0 - 2 ΑΟΚ (ή RC). Τα πρότυπα διαλύματα μήτρας υποβάλλονται στην ίδια επεξεργασία με το υπό εξέταση δείγμα.

2.3. Επικύρωση μεθόδων προσδιορισμού ΜΣΑΦ σε κρέας και γάλα

Η επικύρωση των μεθόδων προσδιορισμού ΜΣΑΦ σε κρέας και γάλα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις απατήσεις της απόφασης ΕΚ/657/2002 (Παράρτημα Ι, παράγραφο 3).

Για την ποσοτικοποίηση των ΜΣΑΦ, κατασκευάστηκαν καμπύλες βαθμονόμησης με πρότυπα διαλύματα των ΜΣΑΦ σε ακετονιτρίλιο και σε εμβολιασμένα τυφλά δείγματα κρέατος ή γάλακτος. Πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της ανάκτησης, της επαναληψιμότητας και της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας των μεθόδων ανάλυσης σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης (μg/kg) των ΜΣΑΦ: 0,5x, 1,0x και 1,5xΑΟΚ για τα ΜΣΑΦ στα οποία έχει θεσπιστεί ΑΟΚ και σε συγκεντρώσεις 2,5/5,0/7,5 μg/kg για ΜΣΑΦ για τα οποία δεν έχει θεσπιστεί ΑΟΚ. Από τα δεδομένα επικύρωσης υπολογίστηκε για κάθε ένωση το όριο απόφασης CC_α και η ικανότητα ανίχνευσης CC_β, βάση της απόφασης ΕΚ/657/2002, τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

2.3 Προσδιορισμός αντιβιοτικών σε κρέας

Πραγματοποιείται ανασύσταση μέρους του δείγματος με νερό, εμβολιασμός του με συγκεκριμένη ποσότητα επισημασμένων εσωτερικών προτύπων και εξισορρόπησή του για 30 min. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του δείγματος με μίγμα 75:25

(ακετονιτρίλιο- 5% μυρμηκικό οξύ 25%): (0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH 8) και ισχυρή ανάδευση σε ομογενοποιητή, ακολουθούμενη από επίδραση υπερήχων για 30 min. Επίσης εξετάστηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις εκχύλισης, είτε παρουσία πρωτεολυτικού ενζύμου είτε παρουσία πίεσης (pressurized liquid extraction). Το εκχύλισμα υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση, καθαρισμό με dSPE προσροφητές, διήθηση από φίλτρα 0,22 μm και ανάλυση με LC-MS/MS.

Η ανάλυση υγρής χρωματογραφίας/διαδοχικής φασματομετρίας μάζας πραγματοποιήθηκε στο φασματόμετρο TSQ Quantum Ultra AM της Thermo με θερμαινόμενη πηγή ηλεκτροδιάχυσης σε θετικό ιονισμό και παρακολούθηση πολλαπλής αντίδρασης ιόντων (multiple reaction monitoring). Για τη χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε στήλη Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 mm x 4.6 mm, 5 μm) με βαθμιδωτή έκλουση μίγματος: 0,1% μυρμηκικού οξέος: ακετονιτριλίου με 0,1 % μυρμηκικό οξύ και ροή 400 μL/min.

Για τη βαθμονόμηση χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα μήτρας σε ένα σημείο σε ακριβή αντιστοίχηση (matrix matched at exact matching). Για το σκοπό αυτό (λευκό δείγμα βόϊου κρέατος) εμβολιάστηκε με ποσότητα των αναλυτών αντίστοιχη με την αναμενόμενη του άγνωστου δείγματος και με ποσότητα εσωτερικών πρότυπων ίδια με εκείνη που προστέθηκε στο δείγμα και στη συνέχεια υποβλήθηκε στην ίδια επεξεργασία. Οι οργανικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα αναφοράς χαρακτηρίστηκαν για την καθαρότητά τους με qNMR έναντι του πιστοποιημένου υλικού αναφοράς NIST SRM 350b, ώστε να εξασφαλιστεί η ιχνηλασιμότητα των μετρήσεων. Η ορθότητα της μεθόδου επιβεβαιώθηκε με επιτυχή ανάλυση του δείγματος FAPAS 02281 για τον προσδιορισμό της σουλφαδιαζίνης σε λυοφιλιωμένο ήπαρ χοίρου. Ο προσδιορισμός των ουσιών έγινε με βάση τον χρόνο κατακράτησης τους και την αναλογία των παράγωγων ψευδομοριακών τους ιόντων. Οι μεταπτώσεις των ιόντων και οι αντίστοιχες συνθήκες περιγράφονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Στοιχεία και συνθήκες ταυτοποίησης της ενροφλοξακίνης, της σουλφαδιαζίνης και των επισημασμένων αναλόγων τους

αναλύτες	RT (min)	M (m/z)	Q (m/z)	q (m/z)	δυναμικό εστίασης (V)	δυναμικό κρούσης (V)
EFX	13.33	360	316	245, 204	106	18/26
SFZ	12.56	251	156	108, 92	87	15/22/26
EFX-d_5	13.30	365	321		106	18
SFZ-$^{13}C_6$	12.57	257	162		87	15

3. Συμπεράσματα

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της διαδικασίας επικύρωσης για τον προσδιορισμό των ΜΣΑΦ σύμφωνα με τις απαιτήσεις της κοινοτικής νομοθεσίας, δηλαδή τα όρια απόφασης και η ικανότητα ανίχνευσης των ΜΣΑΦ, που εντάσσονται στο ΕΠΕΔ του ΕΧΗΜ. Η διαδικασία επικύρωσης των προσδιορισμών θεωρείται επιτυχής. Στη βάση των αποτελεσμάτων αυτών και σε συμφωνία με τις απαιτήσεις της σχετικής νομοθεσίας, τέθηκαν οι παράμετροι του σχήματος ελέγχου ποιότητας που εφαρμόζεται. Συγκεκριμένα, ο εσωτερικός έλεγχος ποιότητας της μεθόδου προσδιορισμού ΜΣΑΦ πραγματοποιείται σε δύο εμβολιασμένα δείγματα κρέατος ή γάλακτος γνωστής συγκέντρωσης ΜΣΑΦ: σε συμμορφούμενο δείγμα σε επίπεδο 100% CCα, και σε μη συμμορφούμενο δείγμα στο

110% CCα. Τα δείγματα ελέγχου ποιότητας αναλύονται σύμφωνα με τη συνιστώμενη σειρά ανάλυσης δειγμάτων από την Οδηγία 657/2002, σε κάθε παρτίδα εξεταζόμενων δειγμάτων. Περιοδικά, αναλύονται και τα υλικά αναφοράς που είναι διαθέσιμα από το κοινοτικό εργαστήριο αναφοράς για την επιβεβαίωση της ορθότητας των μεθόδων.

Παράλληλα, η ορθότητά τους εξετάζεται με τη συμμετοχή του εργαστηρίου στα διαθέσιμα σχήματα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας. Αρχικά, επιβεβαιώθηκαν με την επιτυχή συμμετοχή του εργαστηρίου το Νοέμβριο του 2015 στη διεργαστηριακή δοκιμή NSAI1015, που διοργανώθηκε από το κοινοτικό εργαστήριο αναφοράς BVL (Γερμανία). Τα αποτελέσματά της αναφέρονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Αποτελέσματα (μg/kg) και τελική αξιολόγηση (z και z_u-scores*) του ΕΧΗΜ από τη συμμετοχή του στη διεργαστηριακή δοκιμή NSAI1015.

Κωδικός δείγματος	P140460		P140486A		P140486B	
αποτέλεσμα	τιμή	**score**	τιμή	**score**	τιμή	**score**
φλουνιξίνη	11,11	-0,7				
5-υδροξυφλουνιξίνη	42,90	-0,2				
4-μεθυλαμιναντιπυρίνη			28,70	-1,3	27,40	-1,2
φορμυλαμινοαντιπυρίνη			32,30	-0,8	36,70	-0,7
αμινοαντιπυρίνη			3,71	-0,3*	2,75	-0,8*

Πρόσφατα, το ΕΧΗΜ συμμετείχε στη διεργαστηριακή δοκιμή NSAI0917 (Οκτώβριος 2017), που διοργανώθηκε από το κοινοτικό εργαστήριο αναφοράς BVL για τον προσδιορισμό ΜΣΑΦ σε λυοφιλιωμένο γάλα. Η αρχική αξιολόγηση του εργαστηρίου παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Αποτελέσματα και αρχική αξιολόγηση (z και z_u-scores*) του ΕΧΗΜ από τη συμμετοχή του στη διεργαστηριακή δοκιμή NSAI0917

Δείγμα	P0214		P0025		P0024		P0214		P0097	
αποτέλεσμα	μg/kg	**z**	μg/kg	**z**	μg/kg	**z**	μg/kg	**z**	μg/kg	**z**
δικλο φενάκη	0,181	0,1	0,794	0,0	0,431	0,1				
5-υδροξυ φλουνιξίνη							70,75	1,2		
4-μεθυλαμινο αντιπυρίνη	55,55	-0.2	31,00	-0,1	65.25	-0,3				
φλουνιξίνη	10,09	0,1*								
ιμπου προφένη					31,80	0.8*			10,45	1.0*
φαινυλ βουταζόνη					1,190	0,0*			1,95	-0,9*

Στο πλαίσιο του πρωτοκόλλου συνεργασίας 2014-2015 του Γενικού Χημείου του Κράτους με τη Γενική Διεύθυνση Κτηνιατρικής του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, αναλύθηκαν 225 δείγματα, ενώ για το αντίστοιχο πρωτόκολλο για τη

διετία 2016-2017 αναλύθηκαν 132 δείγματα ως προς την ενδεχόμενη παρουσία ΜΣΑΦ. Μέχρι σήμερα έχουν προκύψει δύο δείγματα γάλακτος τα οποία περιείχαν δικλοφενάκη σε συγκέντρωση μεγαλύτερη του CC_{α}. Το αποτέλεσμα της πρώτης εξέτασης επιβεβαιώθηκε από την κατ' έφεση εξέταση των δειγμάτων και στις δύο περιπτώσεις.

Τα αποτελέσματα των προσδιορισμών των δύο αντιβιοτικών (ενροφλοξακίνη – EFX και σουλφαδιαζίνη – SDZ) παρουσιάζονται στον Πίνακα 7. Η αρχική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της σύγκρισης CCQM-K141 δείχνει ότι τα αποτελέσματα του ΕΧΗΜ είναι πολύ ικανοποιητικά.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα συμμετοχής του ΕΧΗΜ στη διεργαστηριακή δοκιμή CCQM 141

Αναλύτης	κλάσμα μάζας (μg/kg)	τυπική αβεβαιότητα (μg/kg)	συντελεστής κάλυψης (k)	διευρυμένη αβεβαιότητα U (μg/kg)
ενροφλοξακίνη	62,56	2,17	2,31	6,35
σουλφαδιαζίνη	2324,6	57,8	2,20	127,2

Από τα μέχρι τώρα αποτελέσματα του επισήμου ελέγχου και σε σύνολο 357 αναλυθέντων δειγμάτων κρέατος και γάλακτος ως προς ΜΣΑΦ έχουν βρεθεί μόνο δύο μη συμμορφούμενα δείγματα γάλακτος.

Το ΕΧΗΜ έχει να παρουσιάσει ικανοποιητικά αποτελέσματα από τη συμμετοχή του σε δύο διεργαστηριακές δοκιμές, που έχει διοργανώσει το κοινοτικό εργαστήριο αναφοράς BVL, για τον προσδιορισμό σε γάλα ΜΣΑΦ, που βρίσκονται εντός και εκτός του ΕΠΕΔ του. Προγραμματίζεται η επέκταση των μεθόδων προσδιορισμού ΜΣΑΦ σε περισσότερους αναλύτες (όπως την ιμπουπροφένης και του σαλικυλικού οξέος).

Τέλος, τα ικανοποιητικά αποτελέσματα του εργαστηρίου στη διεργαστηριακή σύγκριση CCQM-K141 είναι δυνατό να αποτελέσουν βάση για την παρασκευή πιστοποιημένων υλικών αναφοράς που να ιχνηλατούν τις μετρήσεις των εργαστηρίων στο διεθνές σύστημα μονάδων (SI). Αντίστοιχα υλικά απουσιάζουν αυτή τη στιγμή από τη διεθνή αγορά και κατά συνέπεια αναμένεται να προσελκύσουν το ενδιαφέρον αρκετών αναλυτικών εργαστηρίων που δραστηριοποιούνται στο συγκεκριμένο αντικείμενο.

4. Βιβλιογραφία

Απόφαση ΕΚ 657, 'Επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων', 2002

ΚΑΝ ΕΚ 37, 'Φαρμακολογικά δραστικές ουσίες και MRL σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης', 2010

'CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plans', CRL guidance paper, 7 December 2007

Robert C et al., 'Rapid multi-residue and multi-class qualitative screening for veterinary drugs in foods of animal origin by UHPLC-MS/MS', Food Additives & Contaminants, Part A, 30:3, 443, 2012

Martins M.T et al, 'Determination of quinolones and fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides in bovine, swine and poultry liver using LC-MS/MS', Food Additives & Contaminants: Part A, Vol 32, No. 3, 333-341, 2015

Bittencourt M.S et al, 'High-throughput method for antibiotic residue analysis in meat using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a novel minimum separation procedure', Food Additives & Contaminants, Vol 29, No. 4, 508-516, 2012

Zhao L., and Stevens J., 'Determination of Quinolone Antibiotics in Bovine Liver using Agilent Bond ELut QuECheRS Kits by LC/MS/MS', Agilent Technologies Application Note, 2012

BIPM, JCGM 100, Evaluation of measurement data-Guide to the expression of uncertainty in measurement, 1st edition, 2008

.