ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΩΣΦΙΝΗΣ ΣΕ ΔΗΜΗΤΡΙΑΚΑ

Π. Τσιάντας, Α. Λαμπιδώνης, Γ. Μηλιάδης, Γ. Σειραγάκης
Food Allergens Laboratory, Κ. Βάρναλη 40, Νέα Ιωνία, Αθήνα.
E-mail: info@foodallergenslab.com

Περίληψη

Ο υποκαπνισμός είναι μια μέθοδος ελέγχου παρασίτων κατά τη διάρκεια της οποίας οι αποθηκευτικοί χώροι στους οποίους εφαρμόζεται είναι πλήρως γεμάτοι με αέρια παρασιτοκτόνα. Η φωσφίνη (PH_3) είναι αέριο υψηλής τοξικότητας, με χαρακτηριστική έντονη οσμή σκόρδου ή ψαριού σε αποσύνθεση, αισθητή στα 0,25 mg/kg (ppm), με μεγάλη αναφλεξιμότητα και αποτελεί ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα, αποδοτικά και δραστικά υποκαπνιστικά προϊόντα. Είναι μη εκλεκτικό γεωργικό φάρμακο με εγκεκριμένες χρήσεις σε απεντομώσεις και μυοκτονίες σε αποθηκευμένα σιτηρά, όσπρια, σταφίδες, καπνό, ξερά σύκα κ.α. Τα υπολείμματα της φωσφίνης παραμένουν στο τρόφιμο για αρκετούς μήνες και ο Ευρωπαϊκός Κανονισμός 149/2008 έχει ορίσει ανώτατα επιτρεπτά όρια φωσφίνης και φωσφιδίων στα διάφορα τρόφιμα από 0,01 ως 0,1 mg/kg. Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε ταχεία μέθοδος προσδιορισμού υπολειμμάτων φωσφίνης σε δημητριακά με αεριοχρωματογραφικό προσδιορισμό χρησιμοποιώντας ανιχνευτή NPD. Η επικύρωση της μεθόδου πραγματοποιείται με χρήση εμβολιασμένων με φωσφίνη δειγμάτων δημητριακών και ελέγχονται η ορθότητα, πιστότητα και το όριο ανίχνευσης (LOD) της μεθόδου, που βρέθηκε 0,01 mg/kg.

Λέξεις - κλειδιά: *φωσφίνη (PH_3), GC-NPD, επικύρωση, δημητριακά, υπολείμματα*

Abstract

Fumigation is a parasite control method, during which the storage areas to which it is applied are fully filled with gaseous pesticides. Phosphine (PH_3) is a highly toxic gas with a distinct intense odor of garlic or fish in decomposition, at 0.25 mg/kg (ppm), highly flammable, but it is one of the most widely used and effective fumigants. It is a non-selective pesticide with authorized uses for disinfestations in stored cereals, pulses, raisins, tobacco, dried figs and other. Residues of phosphine remain in the food for several months and in the European Regulation 149/2008 maximum levels of phosphine and phosphide in the various foods have been set between 0.01 and 0.1 mg/kg. In the present work, a rapid method for the determination of phosphine residues in cereals by gas chromatographic assay was developed using a NPD detector. The validation of the method was carried out by using phosphine spiked cereal samples and the trueness, the precision and the limit of detection (LOD) of the method, which was found 0.01 mg/kg, were evaluated.

Keywords: *phosphine (PH_3), GC-NPD, validation, cereals, residues*

1. Εισαγωγή

1.1 Υποκαπνισμός

Η γεωργική παραγωγή μπορεί να υποστεί σοβαρές απώλειες μετασυλλεκτικά από μύκητες, βακτήρια και έντομα που προκαλούν σοβαρές ζημιές κατά την αποθήκευση, μεταφορά και εμπορία των γεωργικών προϊόντων. Η αντιμετώπιση των παρασίτων των αποθηκευμένων γεωργικών προϊόντων μπορεί να γίνει είτε με εκλεκτικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα, που στοχεύουν στις επιμέρους κατηγορίες φυτοπαρασίτων σε συγκεκριμένες καλλιέργειες και προϊόντα, ή με ενώσεις με μικρή εκλεκτική τοξικότητα γνωστές και ως υποκαπνιστικά ή καπνογόνα (fumigants). Ο υποκαπνισμός είναι μια μέθοδος ελέγχου παρασίτων κατά τη διάρκεια της οποίας, οι προς απεντόμωση χώροι και αντικείμενα (κτίρια, σιλό, αποθήκες κ.α.) πληρώνονται με αέρια παρασιτοκτόνα με σκοπό την καταπολέμηση των παρασίτων που βρίσκονται μέσα σε αυτά. Στην περίπτωση των δημητριακών, η υγρασία του προϊόντος είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας για την αποτελεσματικότητα του υποκαπνισμού και για την επιτυχή διατήρηση του προϊόντος. Η υψηλή υγρασία του προϊόντος μειώνει την αποτελεσματικότητα του υποκαπνισμού, αλλά και αυξάνει τον κίνδυνο μείωσης της βλάστησης των σπόρων. Για τους λόγους αυτούς η υγρασία των σπόρων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 16% κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και της διαδικασίας υποκαπνισμού. Κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα υποκαπνιστικά για την καταπολέμηση παρασίτων αποθηκευμένων γεωργικών προϊόντων όπως το βρωμιούχο μεθύλιο, ο διθειούχος άνθρακας, η χλωροπικρίνη και η φωσφίνη. (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010)

1.2 Φωσφίνη

Η φωσφίνη είναι από τα πλέον χρησιμοποιούμενα υποκαπνιστικά στα αποθηκευμένα γεωργικά προϊόντα. Είναι αέριο υψηλής τοξικότητας, με χαρακτηριστική έντονη οσμή και μεγάλη αναφλεξιμότητα. Είναι άχρωμο και βαρύτερο του αέρα. Ο κίνδυνος ανάφλεξης εξαλήφθηκε πλήρως με την παρασκευή εμπορικών σκευασμάτων που περιείχαν μίγμα φωσφορούχου αργιλίου και καρβαμιδικής αμμωνίας, τα οποία με την επίδραση της υγρασίας της ατμόσφαιρας διασπώνται προς φωσφίνη, ενώ η καρβαμιδική αμμωνία προς διοξείδιο του άνθρακα και αμμωνία που παρεμποδίζουν την ανάφλεξη της φωσφίνης. Η απεντόμωση γίνεται με την τοποθέτηση σκευασμάτων που παράγουν αέριο εντός της μάζας των γεωργικών προϊόντων. Η έκλυση φωσφίνης αρχίζει μια περίπου ώρα μετά την εφαρμογή του σκευάσματος και για αυτό δεν υπάρχει άμεσος κίνδυνος για το προσωπικό και ολοκληρώνεται 1-3 ημέρες αναλόγως της θερμοκρασίας και υγρασίας. Δρα σε όλα τα έντομα αποθηκών σε οποιοδήποτε στάδιο αναπτύξεως βρίσκονται, ακόμα και στα ωα των εντόμων. Τα υπολείμματα όμως της φωσφίνης παραμένουν στο τρόφιμο για αρκετούς μήνες. Στη νομοθεσία της ΕΕ, τα ανώτατα όρια υπολειμμάτων φωσφίνης και φωσφιδίων στα τρόφιμα κυμαίνονται από 10 έως 100 ppb (μg/kg), ανάλογα με το τρόφιμο.

1.3 Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού φωσφίνης

Αρχικά ο προσδιορισμός της φωσφίνης βασίστηκε σε χρωματομετρικές μεθόδους ανάλυσης. Οι τεχνικές αέριας χρωματογραφίας χρησιμοποιούνται από το 1964 με την ευαισθησία και την αποτελεσματικότητα να βελτιώνονται σημαντικά μέχρι σήμερα (Malone, 1971). Έτσι, έχει αποδειχθεί ότι η αέρια χρωματογραφία είναι η πιο ευαίσθητη αναλυτική μέθοδος προσδιορισμού φωσφίνης (Anastasiades et al., 2005). Ονομαστικά κάποιες από τις μεθόδους αέριας χρωματογραφίας που χρησιμοποιούνται είναι: μέθοδος αντίδρασης με νιτρικό άργυρο και ταυτόχρονη έκλουση με ICP-AES (inductively coupled plasma atomic emission spectrometry-επαγωγικά συζευγμένη φασματομετρία ατομικής εκπομπής πλάσματος), αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή αζώτου φωσφόρου (GC-NPD), αέρια χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS), αέρια χρωματογραφία με φωτομετρικό ανιχνευτή φλόγας (GC-FPD) (Fahrenholtza et. Al, 2010).

1.4 Αρχή της μεθόδου της παρούσας εργασίας

Στην παρούσα εργασία, η ανάλυση στηρίζεται στον αεριοχρωματογραφικό προσδιορισμό της φωσφίνης με ανιχνευτή αζώτου φωσφόρου (NPD). Στο δείγμα προστίθεται διάλυμα θειϊκού οξέος, απελευθερώνεται η φωσφίνη και πραγματοποιείται έκχυση αέριας φάσης στο αεριοχρωματογράφο.

1.5 Σκοπός εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη της μεθόδου της φωσφίνης καθώς και η επικύρωσή της σε δημητριακά με αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή αζώτου φωσφόρου (GC-NPD), καθώς και η παρουσίαση αποτελεσμάτων σε δείγματα δημητριακών.

2. Μεθοδολογία

2.1 Αντιδραστήρια και υλικά

Ως πρότυπο παρακαταθήκης φωσφίνης, χρησιμοποιήθηκε αέριο μίγμα φωσφίνης από την εταιρία Linde συγκέντρωσης 10,12 ppm (v/v) σε άζωτο, με περιεχόμενο 0,3 m^3. Τα πρότυπα διαλύματα εργασίας παρασκευάζονται σε υπόστρωμα, δεδομένου ότι από τη βιβλιογραφία προκύπτει πως υπάρχει σημαντική επίδραση του υποστρώματος στη μέτρηση.

2.2 Διαδικασία εκχύλισης

Ζυγίζεται 1±0,01g ομογενοποιημένου δείγματος σε φιαλίδιο headspace των 20 mL. Προστίθενται 5 mL H_2O και αναδεύεται ελαφρά. Αμέσως μετά προστίθενται 5 mL διαλύμα 10% H_2SO_4, άμεσα πωματίζεται και σφραγίζεται. Αναδεύεται έντονα επί 1 min. Στη συνέχει, τοποθετείται σε θερμοστατούμενο χώρο (υδατόλουτρο ή ειδική πλακέτα θέρμανσης) στους 80^oC επί 10 min με περιοδική ανάδευση. Αφήνεται να έλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Εγχύεται η αέρια φάση στο GC το αργότερο εντός 5 ωρών.

2.3 Αεριοχρωματογραφία

Η στήλη είναι τύπου DB5-MS, 50 m, 0,32 mm, 1 μm. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται He με ροή 1,5 mL/min και επιλογή constant flow. Ο ανιχνευτής NPD είναι ρυθμισμένος στους 250^{o}C. Το H_2 έχει ροή 3 mL/min ενώ ο συνθετικός αέρας 60 mL/min.

2.4 Τρόπος εμβολιασμού δειγμάτων

Για την μελέτη ορθότητας και πιστότητας της μεθόδου έγινε εμβολιασμός μάρτυρα δημητριακού (σιμιγδάλι) σε δύο επίπεδα (0,01 και 0,1 μg/kg αντίστοιχα).

3. Συμπεράσματα

3.1 Γραμμικότητα

Μελετήθηκε η γραμμικότητα σε 5 επίπεδα συγκεντρώσεων: 0,5 – 1 – 2,5 – 5 – 10 ppm (v/v), που αντιστοιχούν σε 0,703 – 1,41 – 3,52 – 7,03 – 14,07 ng/mL. Η γραμμή αναφοράς μορφοποιείται με την μέτρηση του εμβαδού της κορυφής (A) σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις δείγματος Έγινε προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων, με το πρόγραμμα EXCEL, στην εξίσωση $A = (a \pm t_{0.99,\,4}\times S_a) + (b \pm t_{0.99,\,4}\times S_b)\times C$, όπου:

A η επιφάνεια των χρωματογραφικών κορυφών

C η συγκέντρωση του αναλύτη

a η τεταγμένη επί την αρχή και sb η τυπική της απόκλιση

b η κλίση της ευθείας και sa η τυπική της απόκλιση

$t_{0.99,\,4}$ η τιμή $t_{\theta\varepsilon\omega\rho}$ από τους πίνακες Student για N-2=4 βαθμούς ελευθερίας

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι στατιστικές παράμετροι της γραμμής αναφοράς από τις οποίες προκύπτει ότι η συσχέτιση είναι γραμμική, αφού ο συντελεστής συσχέτισης r έχει τιμή > 0,98 και η γραμμή διέρχεται από την αρχή των αξόνων δεδομένου ότι το άθροισμα ($\alpha\pm t_{st}$ x s_α) περιλαμβάνει το μηδέν.

Πίνακας 1: Στατιστικές παράμετροι της γραμμής αναφοράς

Κλίση της ευθείας	b	18.68
Τεταγμένη επί την αρχή	a	17.31
Τυπική απόκλιση της κλίσης	S_b	2.16
Τυπική απόκλιση της a	S_a	11.11
Συντελεστής συσχέτισης	r	0.9806
Παράμετρος	$S_{y/x}$	16.76
Βαθμοί ελευθερίας (για N-2)	dof	3
Θεωρητική τιμή t_{st}	t_{st}	3.18
Παράμετρος $S_u = S_{y/x} / b$	s_u	0.897

3.2 Ορθότητα και πιστότητα της μεθόδου

Αποδεκτές τιμές ορθότητας καθορίζονται, βάσει της SANTE (11813/2017), ανακτήσεις στην περιοχή 70-120%. Ωστόσο μπορούν να γίνουν αποδεκτές μικρότερες τιμές ανάκτησης, εφόσον έχουν ικανοποιητικά στοιχεία πιστότητας. Η πιστότητα εκφράζεται με τις τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης των μετρήσεων, και γενικά είναι αποδεκτή όταν έχει τιμές ≤ 20%. Τα αποτελέσματα, παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των αναλυτών και κατ' επέκταση για τον υπολογισμό της ανάκτησης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της απ' ευθείας σύγκρισης με πρότυπο διάλυμα, σύμφωνα με τις απαιτήσεις του SANTE document για υπολείμματα φυτοφαρμάκων.

Πίνακας 2: Μέση % ανάκτηση (% Rec), σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) και σήμα προς θόρυβος (Σ/Θ) για 2 επίπεδα συγκεντρώσεων 0,01 και 0,1 mg /kg (N=6).

α/α	0,01mg/kg	0,1mg/kg	Σ/Θ σε 0,01mg/kg
	%Rec	%Rec	
1	84.9	105.2	48
2	75.9	104.6	69
3	84.9	109.9	73
4	76.6	107.8	83
5	77.4	105.9	58
6	75.9	109.3	67
Μέση τιμή	79.3	107.1	
s	4.40	2.21	
%RSD	5.55	2.06	

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι τόσο η ορθότητα της μεθόδου, εκφρασμένη ως ανάκτηση, όσο και η πιστότητα, εκφρασμένη ως σχετική τυπική απόκλιση, έχουν τιμές αποδεκτές βάσει των απαιτήσεων της οδηγίας SANTE, ενώ ο λόγος Σήμα προς Θόρυβο στο επίπεδο 0,01mg/kg έχει σε όλες τις περιπτώσεις τιμή μεγαλύτερη του 10.

3.3 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Όριο ποσοτικοποίησης (LOD) είναι η μικρότερη συγκέντρωση εμβολιασμού του αναλύτη στο δείγμα για την οποία προκύπτουν αποδεκτές τιμές ορθότητας και πιστότητας. Από τον Πίνακα 4 φαίνονται οι τιμές Σ/Θ στο επίπεδο συγκέντρωσης 0,01 mg/kg του εμβολιασμένου δείγματος, από τις οποίες προκύπτει ότι είναι μεγαλύτερο από 10 σε όλες τις περιπτώσεις, δηλαδή το επίπεδο αυτό είναι το όριο ποσοτικοποίησης. Δεδομένης της σχέσης που συνδέει τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης 3 x LOQ = 10 x LOD προκύπτει ότι το όριο ανίχνευσης είναι LOD=0,003 mg/kg.

3.4 Αποτελέσματα δειγμάτων

Σε 100 περίπου δείγματα δημητριακών που αναλύθηκαν για προσδιορισμό υπολειμμάτων φωσφίνης, 4 δείγματα βρέθηκαν με ανιχνεύσιμη συγκέντρωση φωσφίνης, με εύρος συγκεντρώσεων από 15 έως 40 μg/kg (ppb). Η διατροφική αξία των δημητριακών είναι αποδεδειγμένη από την αρχαιότητα, ωστόσο η διασφάλιση της

ποιότητάς τους από ουσίες που μπορεί να έχουν σημαντικές συνέπειες στην υγεία των καταναλωτών, όπως η φωσφίνη είναι απαίτηση της σύγχρονης εποχής. Ένα από τα μέτρα διασφάλισης της ποιότητας είναι και ο συνεχής εργαστηριακός έλεγχος υπολειμμάτων φωσφίνης από εργαστήρια που χρησιμοποιούν εξειδικευμένες, αξιόπιστες και διαπιστευμένες μεθόδους. Η FOOD ALLERGENS LABS με εξειδικευμένο επιστημονικό προσωπικό, τα πλέον σύγχρονα αναλυτικά όργανα και με διαπιστευμένες μεθόδους, συμβάλλει αποφασιστικά στον τομέα αυτό.

4. Βιβλιογραφία

4.1 Ελληνική

Ζιώγας Β.Ν. και Μαρκόγλου Α.Ν. Γεωργική Φαρμακολογία, 2010, Αθήνα

4.2 Διεθνής

Commission of the European Union, Doc No SANTE Document 11813/2017. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed.

Fahrenholtza S., Hühnerfussb H., Baurc X. and Budnika L., "Determination of phosphine and other fumigants in air samples by thermal desorption and 2D heart-cutting gas chromatography with synchronous SIM/Scan mass spectrometry and flame photometric detection", J. Chromatogr. A 1217, p.p. 8298–8307, 2010.

Malone B., "Analysis of Fumigants, Phosphine. In Residue Reviews", F.A. Gunther (Ed.). Springer-Verlag, Volume 38, pp. 45-48, 1971, New York.

Michelangelo A., "Analysis of Phospine in Dried Foodstuffs via Headspace-GC-MSD". News Analytic, www.analytic-news.com, 2005.