ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΝΟΣ «ΕΥΕΛΙΚΤΟΥ» ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΓΙΑ ΠΟΛΥΠΛΟΚΕΣ ΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Δρ. Ευγενία Ν. Λαμπή, Δρ. Αλέξανδρος Λιούπης, Δρ Ιωάννης Ιεραπετρίτης
Γενικό Χημείο του Κράτους, Δ' Χ.Υ. Αθηνών, Τμήμα Δ'
e-mail: gxk-plastics@ath.forthnet.gr

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η ανάπτυξη ενός ευέλικτου μοντέλου για την ανάπτυξη, εκτέλεση, επέκταση και επικύρωση πολύπλοκων διαδικασιών ενόργανης ανάλυσης, επικεντρώνοντας στην ανάλυση ομάδων ουσιών σε ομάδες υποστρωμάτων, περιλαμβανομένων μιας ή περισσότερων τεχνικών. Η βασική φιλοσοφία της προσέγγισης εστιάζει στα σπάσιμο της συνολικής διεργασίας σε επιμέρους αυτόνομα και σαφώς οριοθετημένα στάδια (modules), πλήρως τεκμηριωμένα, τα οποία μπορούν να συνδυασθούν μεταξύ τους ώστε να προκύψει η απαιτούμενη αναλυτική διεργασία κατά περίπτωση. Η εφαρμογή ενός τέτοιου μοντέλου δίνει τη δυνατότητα στο εργαστήριο να επεκτείνει τη μετρητική του δραστηριότητα, χωρίς παρέκκλιση από την ικανοποίηση όλων των απαιτήσεων για αξιόπιστη, ιχνηλάσιμη και συγκρίσιμη μέτρηση. Επιπλέον, ένα εργαστήριο μπορεί να διαπιστευθεί για μια τέτοια προσέγγιση ευέλικτου πεδίου (13).

Τα αυτόνομα αυτά στάδια περιλαμβάνουν τη δειγματοληψία, την προετοιμασία του δείγματος, τις διαδικασίες και τις τεχνικές ενόργανης ανάλυσης αλλά και μαθηματικά μοντέλα για την επεξεργασία και εκτίμηση των αποτελεσμάτων, τις διαδικασίες και τις απαιτήσεις για την επίτευξη της ιχνηλασιμότητας, την εκτίμηση των πηγών της αβεβαιότητας κ.λ.π.

Ένα τέτοιο μοντέλο, για τον προσδιορισμό πτητικών ουσιών σε διάφορα υποστρώματα με αέρια χρωματογραφία υπερκείμενης αέριας φάσης και ανιχνευτές ιονισμού φλόγας και φασματοσκοπίας μάζας, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε με επιτυχία στο εργαστήριο Υλικών και Αντικειμένων σ' Επαφή με Τρόφιμα του Γ.Χ.Κ. και παρουσιάζεται στην παρούσα εργασία. Οι πτητικές ουσίες αφορούν όλο το φάσμα σημείων ζέσεως και πολικοτήτων και σε μίγματα διαφορετικής πτητικότητας. Τα υποστρώματα αφορούν σε όλες τις κατηγορίες προϊόντων και των τριών φάσεων, από βιομηχανικά προϊόντα (πλαστικά, χρώματα, βερνίκια, παιχνίδια, μίγματα αερίων) έως φάρμακα και τρόφιμα με ή όχι επίδραση υποστρώματος.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η βασικότερη εργασία των εργαστηρίων χημικής ανάλυσης είναι η παραγωγή αξιόπιστων και συγκρίσιμων αποτελεσμάτων με αδιάσπαστη μεταφορά πληροφορίας από, πολλές φορές πολύπλοκα, υποστρώματα, μέσω αλληλουχίας σταδίων στην τελική μέτρηση. Ο σχεδιασμός και η επικύρωση της αναλυτικής διεργασίας, ώστε να καλυφθούν ποικίλα υποστρώματα και αντιστοίχως αναλύτες, είναι πολλές φορές ιδιαίτερα απαιτητική σε ανθρώπινους και υλικούς πόρους. Επιπλέον, σημαντικός αριθμός υποστρωμάτων μπορεί να εξετασθεί όσον αφορά σε διαφορετικούς αναλύτες εφαρμόζοντας την ίδια κουλτούρα ανάλυσης, όπως, αέρια χρωματογραφία, υγρή χρωματογραφία κ.λ.π. Η ανάπτυξη και επικύρωση μιας ευέλικτης αναλυτικής διεργασίας δίνει τη δυνατότητα στα εργαστήρια να

αξιοποιήσουν συμπυκνωμένη διαδικασία, ώστε να μεταφέρουν έγκυρη πληροφορία στην τελική μέτρηση χωρίς να χρειάζεται κάθε φορά να εφαρμόσουν επιμέρους επικυρωμένες μεθόδους. Επιπλέον, με βάση τον ιστό της κεντρικής διεργασίας δίνεται η δυνατότητα για επέκταση σε νέα υποστρώματα και νέους αναλύτες.

Σε κάθε περίπτωση βέβαια, ο στόχος για αξιόπιστη μέτρηση πρέπει να διασφαλίζεται και οποιαδήποτε επέκταση του πεδίου εφαρμογής της διεργασίας πρέπει να επικυρώνεται και να αποδεικνύεται η ιχνηλασιμότητα των αποτελεσμάτων. Σημαντικό παράγοντα αποτελεί και η διαβιβασιμότητα (trackability) της πληροφορίας από την επίδραση διαφορετικών υποστρωμάτων. Μια τέτοια ευέλικτη προσέγγιση μπορεί να είναι σύμφωνη με τις απαιτήσεις του προτύπου ΕΛΟΤ EN ISO 17 025 για την τεχνική επάρκεια των εργαστηρίων.

2. ΕΥΕΛΙΚΤΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΚΑΙ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ

Στις περιπτώσεις στοιχειομετρικών αναλυτικών διαδικασιών μπορούν να προταθούν δύο μοντέλα ευέλικτης προσέγγισης.

Α. **Ίδια αναλυτική τεχνική** (π.χ. GC, HPLC, Head Space GC, κ.λ.π.) για την ανάλυση ομάδων ουσιών σε ομάδες υποστρωμάτων. Στην περίπτωση αυτή στο σύστημα μπορεί να περιλαμβάνονται μια ή περισσότερες από μια συσκευές, αλλά ο βασικός ιστός της ανάλυσης αφορά σε μια κατηγορία τεχνικής και ενόργανης ανάλυσης. Θα μπορούσε να μπορούσε να χαρακτηρισθεί ως προσέγγιση τεχνικοκεντρική.
Β. **Παρόμοιες ομάδες αναλυτών σε ομαδοποιημένες κατηγορίες υποστρωμάτων ή περιορισμένα υποστρώματα** (π.χ. αναλύσεις φαρμάκων). Στην περίπτωση αυτή μπορεί να περιλαμβάνονται διαφορετικές αναλυτικές τεχνικές και διαφορετικές συσκευές ενόργανης ανάλυσης όπως υπέρυθρη φασματοσκοπία, φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους, υγρή χρωματογραφία κ.λ.π.. Μια τέτοια προσέγγιση μπορεί να χαρακτηρισθεί ως αναλυτοκεντρική.

Και στις δύο περιπτώσεις, η βασική φιλοσοφία της προσέγγισης που προτείνεται εστιάζει στα σπάσιμο της συνολικής διεργασίας σε επιμέρους αυτόνομα και σαφώς οριοθετημένα στάδια, πλήρως τεκμηριωμένα, τα οποία μπορούν να συνδυασθούν μεταξύ τους ώστε να προκύψει η απαιτούμενη αναλυτική διεργασία κατά περίπτωση. Τα επιμέρους στάδια στα οποία μπορεί να χωρισθεί μια αναλυτική διεργασία είναι:

1. Δειγματοληψία (εφόσον αυτό απαιτείται)
2. Προετοιμασία του δείγματος
3. Ενόργανη ανάλυση – Συσκευές και Όργανα
4. Αντιδραστήρια, Πρότυπα και Υλικά Αναφοράς
5. Εκτίμηση των αποτελεσμάτων
6. Ιχνηλασιμότητα
7. Έλεγχος ποιότητας
8. Εκτίμηση της αβεβαιότητας
9. Παρουσίαση των αποτελεσμάτων

Με γνώμονα τη διασφάλιση της έγκυρης ροής της πληροφορίας μέχρι την τελική ιχνηλάσιμη και συγκρίσιμη μέτρηση, τα βασικά σημεία που πρέπει να θεωρούνται και να ικανοποιούνται μπορούν να συνοψισθούν στις παρακάτω κατευθύνσεις.

α. Για καθένα από τα στάδια που εφαρμόζονται να τηρείται η απαιτούμενη τεκμηρίωση με όλες τις πληροφορίες για τις έγκυρες εκδόσεις της διεργασίας, τις σχετικές επιστημονικές πηγές κ.λ.π..
β. Πρέπει να υπάρχουν σαφώς καθορισμένες απαιτήσεις για τα προσόντα του προσωπικού που εμπλέκεται στα στάδια. Ο/η αναλυτής/τρια που παρακολουθεί τη διεργασία στο σύνολό της και λαμβάνει αποφάσεις σχετικά με τα αποτελέσματα, πρέπει να έχει αποδεδειγμένη εργαστηριακή εμπειρία και γνώση του αντικειμένου.
γ. Πρέπει να τηρείται αρχείο προσωπικού με διαρκή εκπαίδευση.
δ. Στην τεκμηρίωση της μεθόδου να υπάρχουν οδηγίες για την επιλογή των επιμέρους σταδίων κατά περίπτωση, ώστε να προκύψει η συνολική αναλυτική διεργασία.
ζ. Να υπάρχουν οδηγίες για την απαιτούμενη επικύρωση στις περιπτώσεις νέων ομάδων αναλυτών η/και υποστρωμάτων.
η. Να υπάρχουν οδηγίες για την εκτίμηση της αβεβαιότητας σε κάθε περίπτωση.

3. ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΣΤΑΔΙΑ – ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ

3.1. Δειγματοληψία.

Η ανάπτυξη, επικύρωση και εφαρμογή του σχεδίου δειγματοληψίας ως σχεδιασμένης διαδικασίας η οποία καθιστά δυνατή την επιλογή, λήψη και διαχωρισμό δειγμάτων από μια παρτίδα, με σκοπό την αποκόμιση της απαιτούμενης πληροφόρησης, ώστε να ληφθεί μια απόφαση σχετικά με την εξεταζόμενη παρτίδα, πρέπει να λαμβάνει υπόψη:

- Τον τύπο του ελέγχου (δια καταμετρήσεως ή δια μετρήσεως)
- Τις μετρήσεις που πρέπει να γίνουν για να εξασφαλισθεί η αντιπροσωπευτικότητα του εμπορεύματος ή της παρτίδας.
- Τον τρόπο με τον οποίο θα γίνει η λήψη του δείγματος.
- Τη μέθοδο δειγματοληψίας (τυχαία, κατά στρώματα κ.λ.π.).
- Το μέγεθος και τον αριθμό των μονάδων προϊόντος που σχηματίζουν το δείγμα και πρέπει να ληφθούν από την παρτίδα.
- Τις διαδικασίες για τη λήψη, χειρισμό και ταυτοποίηση των δειγμάτων.
- Τη σχέση μεταξύ των αποτελεσμάτων του ελέγχου και της απόφασης η οποία πρέπει να ληφθεί (αποδοχή ή απόρριψη).

Επίσης μπορεί να περιλαμβάνει στοιχεία όπως, η φύση του ελεγχόμενου χαρακτηριστικού (καταμετρούμενου ή μετρούμενου), η σημασία των αποδεκτών διακινδυνεύσεων, συναφών με τη βαρύτητα της μη συμμόρφωσης, το μέγεθος των παρτίδων, ο επαναληπτικός ή μη χαρακτήρας του ελέγχου και το κόστος του ελέγχου. Κατά την εκτίμηση της αβεβαιότητας η επίδραση της ομοιογένειας, της λήψης αντιπροσωπευτικού δείγματος και η επίδραση του σχεδίου δειγματοληψίας στη λήψη απόφασης πρέπει να λαμβάνονται υπόψη.

3.2 Προετοιμασία του δείγματος.

Τα υποστρώματα ομαδοποιούνται σε κατηγορίες με παρόμοια συμπεριφορά, παρεμποδίσεις, απαιτούμενες προεργασίες κ.λ.π. και εκτελείται επικύρωση του σταδίου προκατεργασίας σε ένα τουλάχιστον υπόστρωμα ανά ομάδα. Το εργαστήριο (περίπτωση Α) πρέπει να έχει διαδικασία για την απαιτούμενη επικύρωση της επέκτασης του αντικειμένου της μεθόδου σε νέες ομάδες υποστρωμάτων. Ένα μέρος της επικύρωσης αφορά στην επίδραση του υποστρώματος, στην ανάκτηση και την επαναληψιμότητα. Αυτό μπορεί να γίνει με εμβολιασμό του επιλεχθέντος υποστρώματος με ορισμένους από

την ομάδα των αναλυτών (π.χ. του πτητικότερου ή του βαρύτερου για περίπτωση χρωματογραφίας ή αυτού που διασπάται ευκολότερα). Τα δεδομένα επικύρωσης δεν χρειάζεται να είναι πρόσφατα αλλά μπορούν να συνδυάζουν και μελέτες που έχει κάνει το εργαστήριο στο παρελθόν, επιστημονική βιβλιογραφία κ.λ.π. η προετοιμασία του δείγματος μπορεί και αυτή να χωρισθεί σε μικρότερα στάδια π.χ σε περιπτώσεις που απαιτούνται διαφορετικές κατεργασίες ανά ομάδα υποστρωμάτων.

3.3 Ενόργανη ανάλυση – Συσκευές και Όργανα

Αναγκαία κρίνεται η πλήρης μονοσήμαντη ταυτοποίηση των συσκευών και οργάνων και των παρελκόμενων (π.χ. στηλών για τη χρωματογραφία) που χρησιμοποιούνται στην ευέλικτη διεργασία, ώστε να ελαχιστοποιούνται και οργανώνονται καλύτερα οι απαιτούμενοι έλεγχοι καταλληλότητας των συστημάτων ενόργανης ανάλυσης. Οι απαιτούμενοι έλεγχοι για την καταλληλότητα του συστήματος πριν την ανάλυση, οι οποίοι πρέπει να τηρούνται σε αρχεία. Επίσης αρχεία συντήρησης, διακριβώσεων και βαθμονομήσεων πρέπει να τηρούνται. Η διασφάλιση της ιχνηλασιμότητας μέσω διακριβώσεων και βαθμονομήσεων μπορεί να σχεδιασθεί ώστε να ικανοποιούνται οι απαιτήσεις στις χειρότερες περιπτώσεις.

3.4 Αντιδραστήρια, Πρότυπα και Υλικά Αναφοράς

Ειδικό πρωτόκολλο αναπτύσσεται σχετικά με τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια, τα κρίσιμα αντιδραστήρια, τα πρότυπα, τα εσωτερικά και εξωτερικά πρότυπα (απαιτήσεις καθαρότητας, πιστοποιητικά) και τα χρησιμοποιούμενα πιστοποιημένα υλικά αναφοράς. Πρέπει να προσδιορίζεται τι πρότυπα χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος μέτρησης σε κάθε περίπτωση (π.χ. σε Head Space GC θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί πρότυπο με πολύ χαμηλό σημείο ζέσεως για να ελεγχθεί η επικάλυψη από το διαλύτη και ενός άλλου με υψηλό σημείο ζέσεως για να ελεγχθεί ότι οι επιλεχθείσες συνθήκες είναι κατάλληλες ώστε να γίνει έκλουση και των βαρύτερων συστατικών). Τα εργαστήριο πρέπει να έχει τεκμηριώσει την επιλογή των προτύπων που χρησιμοποιεί για τον έλεγχο της καταλληλότητας του συστήματος. Εάν υπάρχουν διαθέσιμα πιστοποιημένα υλικά αναφοράς, το εργαστήριο πρέπει να έχει χρησιμοποιήσει σχετικά για την επικύρωση, όσον αφορά την ορθότητα της μεθόδου (trueness) και την επαναληψιμότητα (precision) ή για τη διακρίβωση υλικών εργασίας για τον εσωτερικό έλεγχο ποιότητας.

3.5 Εκτίμηση των αποτελεσμάτων

Σε ειδικό πρωτόκολλο προσδιορίζεται η διαδικασία για την εκτίμηση του τελικού αποτελέσματος - ελάχιστα τετράγωνα, αναλογικά από την πλησιέστερη συγκέντρωση του προτύπου, αναλογικά από πρότυπο με παρόμοια απόκριση – (π.χ. στην περίπτωση προσδιορισμού οργανικών ενώσεων με HPLC με ανιχνευτή απορρόφησης φωτός ή φθορισμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί πρότυπο το οποίο έχει παρόμοιο συντελεστή μοριακής απόσβεσης – αυτό τεκμηριώνεται βιβλιογραφικά ή από τη στερεοχημική δομή του μορίου ή και από συμμετοχή σε διεργαστηριακά σχήματα. Μπορεί να γίνεται προσδιορισμός αναλυτών με μικρές διαφορές σε χαρακτηριστικές ομάδες χωρίς τη χρήση όλων των προτύπων και εφόσον παρατηρείται παρόμοιμα συμπεριφορά όσον αφορά στη φυσική ιδιότητα που μετριέται (απορρόφηση, εκπομπή, προσρόφηση σε υποστρώματα κ.λ.π.). Στο ίδιο πρωτόκολλο μπορεί επίσης να προσδιορίζεται η μορφή με την οποία δίνεται το αποτέλεσμα της δοκιμής.

3.6 Ιχνηλασιμότητα

Πρέπει να τηρείται διαδικασία σχετικά με την επίτευξη της ιχνηλασιμότητας, εάν αυτό απαιτείται, πέραν των γενικών διαδικασιών που εφαρμόζονται στο εργαστήριο. Γενικώς τα εργαστήρια που εφαρμόζουν γενικές μεθόδους πρέπει να παρουσιάζουν μια αυστηρότερη πολιτική για την ιχνηλασιμότητα.

3.7 Έλεγχος ποιότητας

Ειδικό πρωτόκολλο για τον απαιτούμενο εσωτερικό έλεγχο ποιότητας με επιλογή αντιπροσωπευτικών υλικών εργασίας ή προτύπων, σχεδιάζεται. Στην περίπτωση Α πρέπει να υπάρχει τεκμηριωμένη διαδικασία για τον απαιτούμενο εσωτερικό έλεγχο όταν εξετάζονται νέες ομάδες αναλυτών.

3.8 Εκτίμηση της αβεβαιότητας

Περίπτωση Α. Εκτιμάται η συνδυασμένη αβεβαιότητα για την αναλυτική τεχνική η συνιστώσα της αβεβαιότητας ανά ομάδα αναλυτών ή υποστρωμάτων. Στην περίπτωση νέων υποστρωμάτων ή νέων αναλυτών, εφόσον εκτιμάται από το εργαστήριο μπορεί να δοθεί η αβεβαιότητα της γενικής διαδικασίας που αντιστοιχεί στην πλησιέστερη ομάδα υποστρωμάτων ή αναλυτών.

Περίπτωση Β. Για κάθε κατηγορία υποστρωμάτων και αντίστοιχη ομάδα αναλυτών εκτιμάται η συνδυασμένη αβεβαιότητα, η οποία και δίνεται για όλους τους αναλύτες και τα υποστρώματα της ομάδας.

3.9 Παρουσίαση των αποτελεσμάτων

Ο τρόπος παρουσίασης των αποτελεσμάτων πρέπει να προβλέπεται σε ειδική τυποποιημένη διαδικασία.

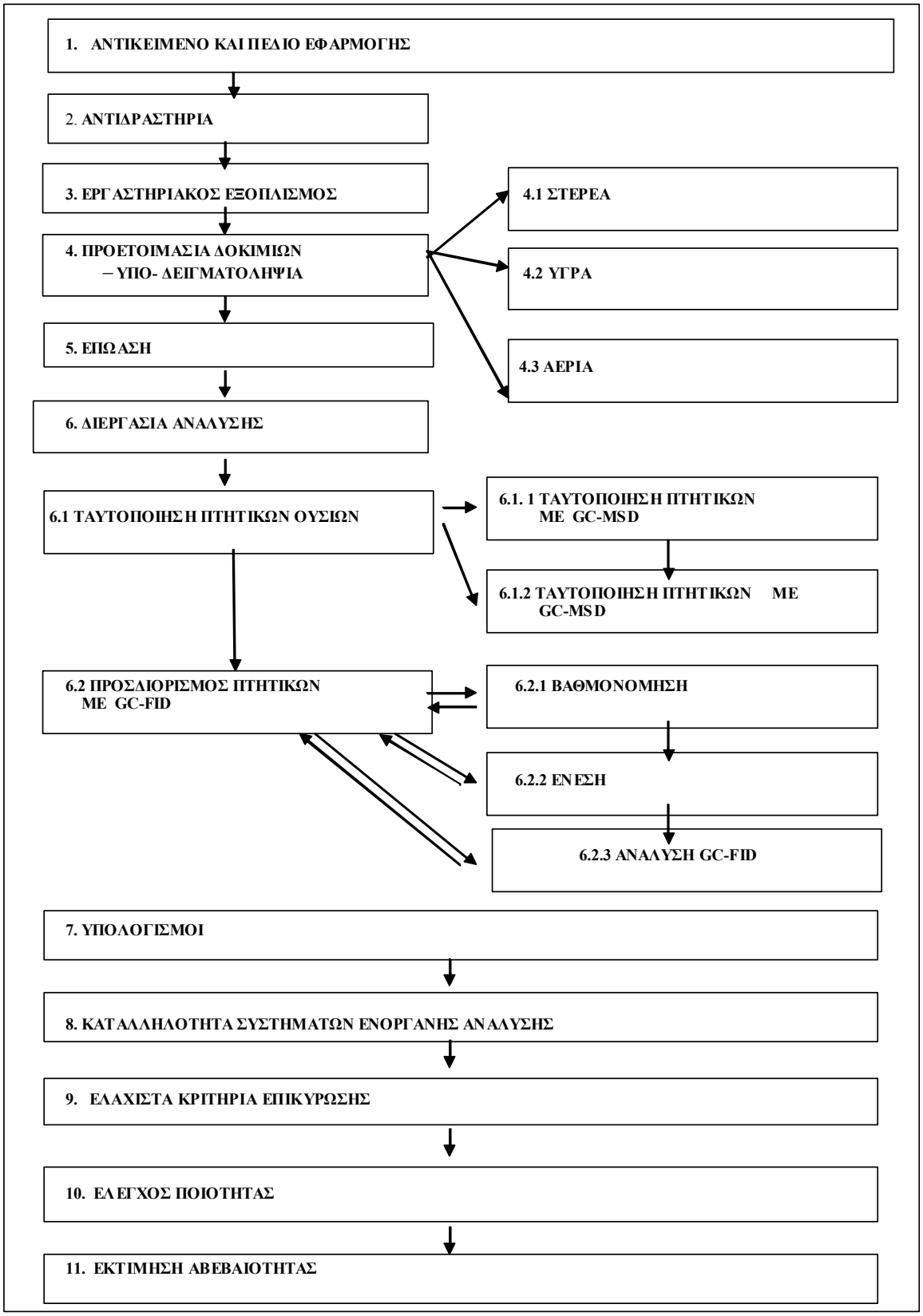
3.10 Επέκταση της ευέλικτης διεργασίας – Ελάχιστες απαιτήσεις επικύρωσης

Απαραίτητο ανεξάρτητο αποτελεί η διαδικασία που εφαρμόζεται για την επέκταση της διεργασίας σε νέους αναλύτες ή υποστρώματα. Καθορίζονται τα ελάχιστα κριτήρια για τις παραμέτρους που υποχρεωτικά θα εξετασθούν στα πλαίσια της επικύρωσης της επέκτασης, οι οποίες υποχρεωτικά θα περιλαμβάνουν πιστότητα, ορθότητα, όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού. Επιπλέον, μπορεί να απαιτείται έλεγχος της στιβαρότητας της μεθόδου, της επιλεκτικότητας, της εκλεκτικότητας κ.λ.π.

4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΗΣ ΑΕΡΙΑΣ ΦΑΣΗΣ

Ένα ευέλικτο μοντέλο σχεδιάσθηκε, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε για την ταυτοποίηση και προσδιορισμό πτητικών ουσιών σε διάφορα υποστρώματα, το οποίο να δίνει τη δυνατότητα διαρκούς επέκτασης του πεδίου της μεθόδου σε νέα υποστρώματα με εφαρμογή ορισμένων παραμέτρων ως προαπαιτούμενων για την επικύρωσή της. Το μοντέλο βασίσθηκε στο συνδυασμό διαφορετικών αναλυτικών διεργασιών (1, 2), ως ανεξάρτητων σταδίων, ώστε ανάλογα με το εξεταζόμενο υπόστρωμα και το ζητούμενο αναλύτη να μπορεί να εξαχθεί αξιόπιστο αποτέλεσμα αλλά και να επεκτείνεται το πεδίο

εφαρμογής της μεθόδου σε νέες κατηγορίες υποστρωμάτων και νέους αναλύτες (σχήμα 1) με αρχική εστίαση στα υλικά σ' επαφή με τρόφιμα (4, 5).



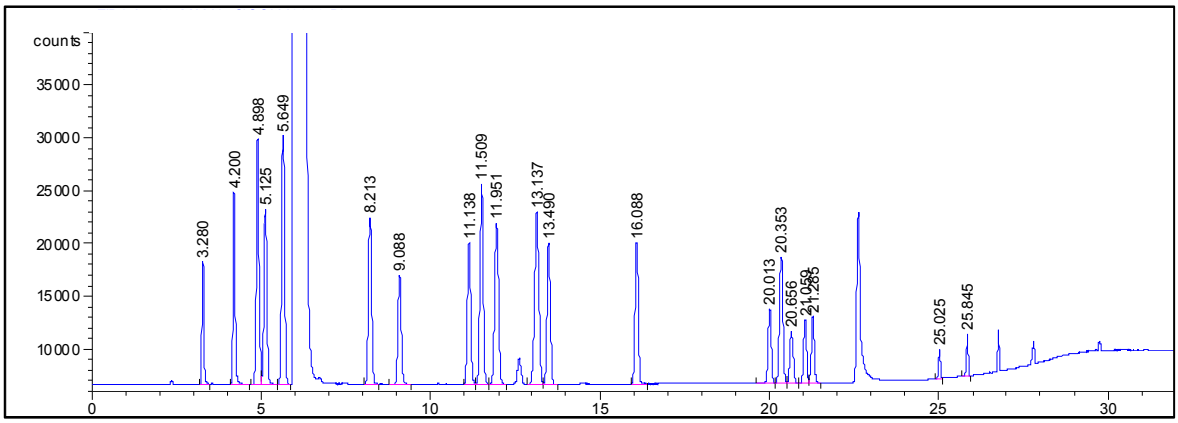
Σχήμα 1. Ευέλικτη αναλυτική διεργασία βασισμένα σε συνδυασμό ανεξάρτητων σταδίων για προσδιορισμό πτητικών με τεχνική Head Space.

Η ανάπτυξη κάθε επιμέρους σταδίου σε βάθος απαιτείται ώστε να διασφαλισθεί η πιθανότητα παρέκκλισης. Για παράδειγμα, στον χειρισμό του υποστρώματος, πέραν της φυσικής κατάστασής του σημαντικό ρόλο παίζει η χημική του μορφή, ως παράγων που επιδρά σημαντικά στο τελικό αποτέλεσμα, λόγω αλληλεπίδρασης με τον αναλύτη. Επίσης, ειδική δειγματοληψία μπορεί να απαιτείται, όπως στην περίπτωση αερίων δειγμάτων. Ο διαθέσιμος υπερκείμενος όγκος είναι επίσης κρίσιμος παράγων για την αξιοπιστία και τα όρια προσδιορισμού. Συνεπώς η ποσότητα του δείγματος που θα επιλεγεί πρέπει να συνδυασθεί με το διαθέσιμο ελεύθερο υπερκείμενο χώρο.

Παρακάτω θα αναφερθούν ορισμένα από τα κρίσιμα σημεία κατά την ανάπτυξη της τεχνικής τα οποία πρέπει λήφθηκαν υπόψη και εξετάζονται απαραίτητα σε κάθε εφαρμογή αλλά και επέκταση του πεδίου εφαρμογής.

4.1 Ταυτοποίηση με GC-FID και GC-MSD

Για μεν την περίπτωση της ταυτοποίησης με GC-FID, τίθενται κριτήρια για τους χρόνους ανάσχεσης. Τον έλεγχο καταλληλότητας της στήλης, την απόκριση του ανιχνευτή, τις συνθήκες φούρνου, τη συμπίεση και τον κατάλληλο έλεγχο ποιότητας, ώστε να εξασφαλίζονται όλες οι περιοχές σημείων ζέσεως από τους πολύ πτητικούς έως τους βαρείς αναλύτες. Στο σχήμα 2 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα των χημικών ουσιών ακεταλδεύδης, αιθανόλης, ακετόνης, ισοπροπανόλης, n πεντανίου, μεθυλο αιθυλο κετόνης, οξικού αιθυλεστέρα, n βουτανόλης, βενζολίου, κυκλοεξανίου, ισοοκτανίου, n επτανίου, τολουολίου, αιθυλοβενζολίου, m-, p- ξυλολίου, κυκλοεξανόνης, στυρενίου, o-ξυλολίου, βενζυλικής αλκοόλης και βουτυλοβενζολίου, κατά αύξουσα σειρά χρόνου έκλουσης, που καλύπτουν μεγάλο διάστημα σημείων ζέσεως από 20 ^{o}C έως 205 ^{o}C, χρησιμοποιώντας στήλη DB1



Σχήμα 2. Αεριοχρωματογράφημα μίγματος χημικών ουσιών με σημεία ζέσεως 20 ^{o}C - 205 ^{o}C με τεχνική Head Space.

Κατά την ταυτοποίηση με GC-MSD, τίθενται ελάχιστα κριτήρια για ασφαλή ταυτοποίηση των υπό εξέταση αναλυτών σχετικά με τα απαιτούμενα διαγνωστικά ιόντα *m/z*, την αναλογία μεταξύ τους, τη διαθεσιμότητα του μοριακού ιόντος κ.λ.π. Επίσης τίθενται κριτήρια για τις παραμέτρους του φασματογράφου μάζας, τρόπο και περιοχή σάρωσης, τις απαιτήσεις tuning (αναλογίες ιόντων, δυναμικό πεδίου, ισχύς σήματος κ.λ.π.). Τέλος επιλέγεται μίγμα ελέγχου ποιότητας που να καλύπτει διαφορετικά σημεία ζέσεως και χαρακτηριστικές ομάδες.

4.2 Ποσοτικός Προσδιορισμός με GC-FID

Προβλέπονται τρεις περιπτώσεις ποσοτικοποίησης με εσωτερικό πρότυπο, εξωτερικό πρότυπο και μέθοδο σταθερής προσθήκης. Η ποσότητα του δείγματος ανάλογα με τη φυσική του κατάσταση και τη χημική μορφή, ο χρόνος και η θερμοκρασία επώασης για την επίτευξη ισορροπίας μεταξύ των φάσεων και η χρωματογραφική στήλη, πρέπει σε κάθε περίπτωση να εξετάζονται (6). Στην περίπτωση μεγάλου αριθμού πτητικών ουσιών, η συμπίεση στην απόκριση των βαρύτερων από τα ελαφρότερα πρέπει επίσης να εξετάζεται με τη χρήση προτύπων μιγμάτων παρόμοιας σύνθεσης με το υπό εξέταση υπόστρωμα. Η μέθοδος εξωτερικού προτύπου εφαρμόζεται εφόσον επιτευχθούν οι συνθήκες ώστε να εξασφαλίζεται γραμμική σχέση μεταξύ των λογαρίθμων των επιφανειών απόκρισης ανά αναλύτη και του αντίστοιχου κύκλου σε μια σειρά διαδοχικών αναλύσεων από το ίδιο δείγμα.

Διακριτό στάδιο αποτελεί η διαδικασία υπολογισμών ανάλογα με την τεχνική ποσοτικού προσδιορισμού που χρησιμοποιήθηκε και τον τρόπο έκφρασης των αποτελεσμάτων σε ποσότητα ή επιφάνεια ή όγκο υποστρώματος (3).

4.3 Επέκταση Πεδίου Εφαρμογής - Ελάχιστα Κριτήρια Επικύρωσης

Ο στόχος της εκπονηθείσας διεργασίας είναι να δίνεται η δυνατότητα για διαρκή επέκταση του πεδίου εφαρμογής της μεθόδου, τόσο σε νέα υποστρώματα όσο και σε νέους αναλύτες. Στην περίπτωση αυτή ελάχιστα ποιοτικά κριτήρια πρέπει να ικανοποιούνται και τα οποία αποδεικνύονται με επικύρωση όσον αφορά στις παρακάτω ιδιότητες.

1. Στιβαρότητα (Robustness). Η στιβαρότητα της μεθόδου για νέα υποστρώματα και αναλύτες είναι αναγκαίο να εξετάζεται. Μελέτες πραγματοποιούνται όσον αφορά στην επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου κατά το στάδιο της επώασης των δειγμάτων, ώστε να επιτευχθεί ισορροπία φάσεων, πριν την ενόργανη ανάλυση. Ως παράδειγμα αναφέρεται επέκταση του πεδίου εφαρμογής της μεθόδου όσον αφορά τον προσδιορισμό των διαλυτών Μεθανόλη, Αιθανόλη, Ακετόνη και Διχλωρομεθάνιο (DCM), σε υπόστρωμα από δραστική φαρμακευτική ουσία.

Α. *Επίδραση **χρόνου επώασης** αναλυτών.*
Σε κάθε φιαλίδιο τοποθετήθηκαν 16 μg από κάθε αναλύτη και 20 μg εσωτερικού προτύπου σε τελικό όγκο αραίωσης 30μl με διαλύτη DMA. Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις μετά από τους ακόλουθους χρόνους επώασης στους 100°C (λεπτά):
2, 43, 84, 125, 166, 207, 617 και 945 λεπτά. Ο λόγος επιφανειών των κορυφών αναλυτών - εσωτερικού προτύπου εμφανίζεται σταθερός μετά από επώαση 84 λεπτών.

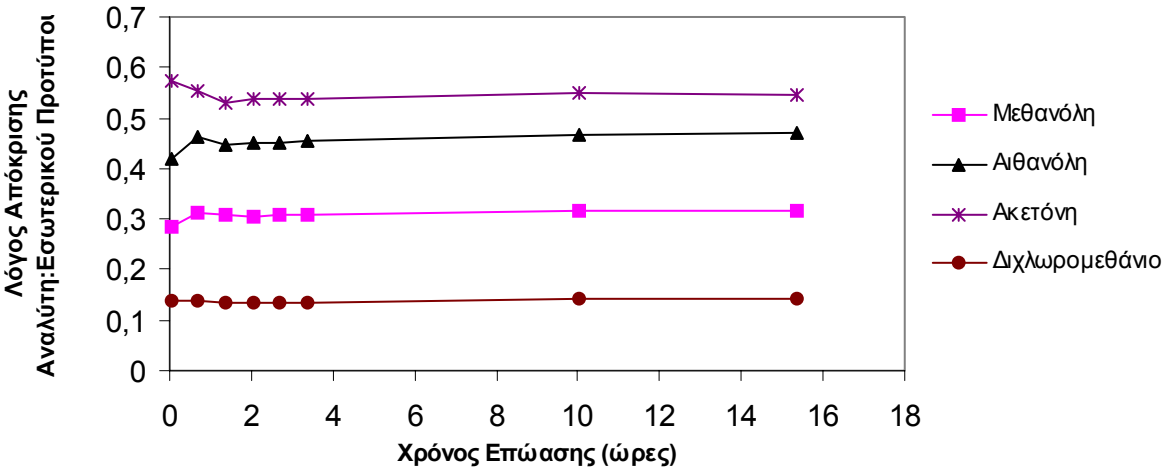
Β. *Επίδραση **θερμοκρασίας επώασης** αναλυτών.*
Σε κάθε φιαλίδιο τοποθετήθηκαν 16 μg από κάθε αναλύτη και 20 μg εσωτερικού προτύπου σε τελικό όγκο αραίωσης 30μl με διαλύτη DMA. Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις μετά από επώαση των δειγμάτων στις ακόλουθες θερμοκρασίες:
80, 90, 100, 110 και 120 ^{o}C. Επιλέχθηκε θερμοκρασία επώασης 100 ^{o}C (αντιστοιχεί σε 96.5% έως 100% των μέγιστων αποκρίσεων διαλυτών)

Γ. ***Χρόνοι έκλουσης των διαλυτών** υπό προσδιορισμό.*

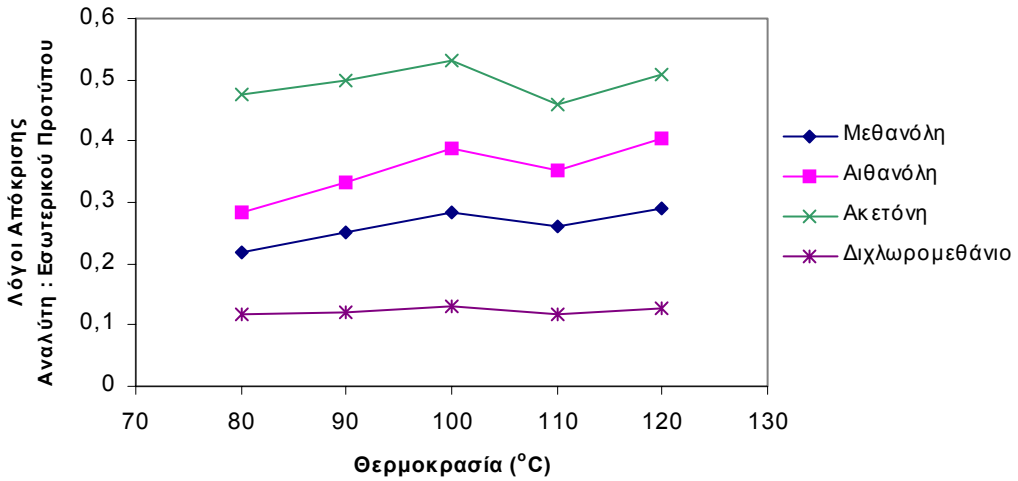
Σε κάθε φιαλίδιο τοποθετήθηκαν 16 μg αναλύτη (σε τελικό όγκο αραίωσης 30μl με διαλύτη DMA). Βρέθηκε η ακόλουθη *σειρά έκλουσης*:

1. Μεθανόλη: 3,597 λεπτά
2. Αιθανόλη: 4,516 λεπτά
3. Ακετόνη: 5,194 λεπτά
4. Διχλωρομεθάνιο (DCM): 6,449 λεπτά
5. Ισοοκτάνιο (εσωτερικό πρότυπο): 12,746 λεπτά
6. DMA (διαλύτης αραίωσης) ~ 18 λεπτά

Στα σχήματα 3 και 4 παρουσιάζονται διαγράμματα από την μελέτη σε μίγματα πτητικών ουσίων (Μεθανόλη, Αιθανόλη, Ακετόνη, Διχλωρομεθάνιο), της επίδρασης του χρόνου επώασης και της θερμοκρασίας επώασης στον αεριοχρωματογραφικό προσδιορισμό.



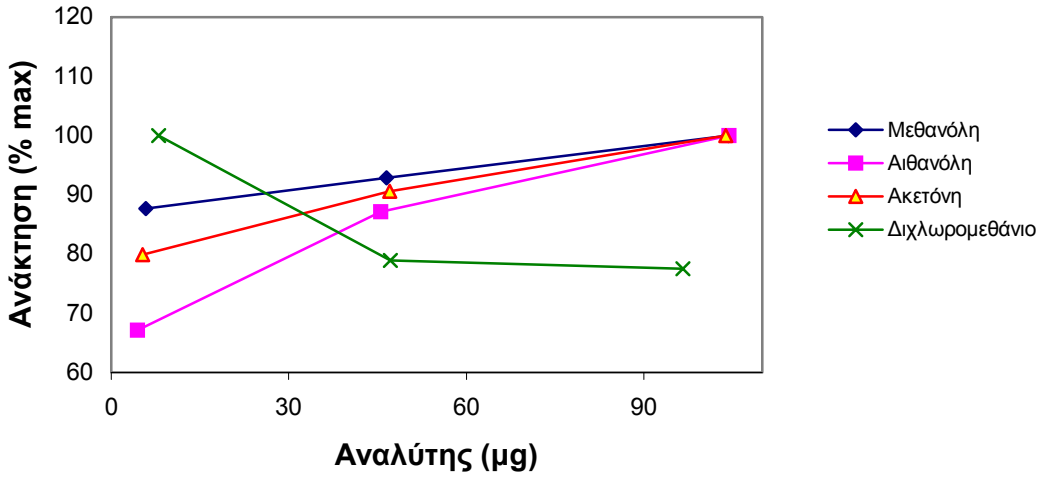
Σχήμα 3. Επίδραση του χρόνου επώασης μίγματος αναλυτών στην αεριοχρωματογραφική ανάλυση πτητικών συστατικών. Οι λόγοι απόκρισης παραμένουν ουσιαστικά σταθεροί μετά από επώαση 80 λεπτών. Θερμοκρασία επώασης μίγματος,100 ^{o}C.



Σχήμα 4

Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης μίγματος αναλυτών στην αεριοχρωματογραφική ανάλυση. Χρόνος επώασης μίγματος, 80 λεπτά.

Σημαντική παράμετρο, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί η μελέτη της συμπίεσης που προκαλείται από τα ελαφρύτερα συστατικά στην απόκριση των βαρύτερων, όταν βρίσκονται σε μίγμα και συναρτήσει του διαθέσιμου υπερκείμενου χώρου. Στο σχήμα 5 παρουσιάζεται η μελέτη επίδρασης της συμπίεσης στην ανάκτηση αναλυτών διαφορετικής πτητικότητας μετά από επώαση υπό σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας, χρόνου επώασης και υπερκείμενου χώρου.



Σχήμα 5._Φαινόμενο συμπίεσης σε μίγμα πτητικών ουσιών από τα ελαφρύτερα συστατικά (π.χ. Μεθανόλη) προς τα βαρύτερα (Διχλωρομεθάνιο).

2. Γραμμικότητα (Linearity). Ο έλεγχος της γραμμικής απόκρισης του ανιχνευτή FID πραγματοποιείται σε διάφορες περιοχές συγκεντρώσεων.

3. Πιστότητα (επαναληψιμότητα – αναπαραγωγιμότητα, Repeatability – Reproducibility). Λόγω απουσίας υλικών αναφοράς, η μελέτη πιστότητας της μεθόδου πραγματοποιείται με εμβολιασμούς των υπό εξέταση υποστρωμάτων με πρότυπα, σε συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας.

4. Ορθότητα (Trueness). Η ορθότητα ελέγχεται υπό μορφή ανάκτησης των εμβολιασμένων δειγμάτων.

5. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού (LOD, LOQ). Συνήθως προσδιορίζονται εκτιμώντας την τυπική απόκλιση σε τρία τουλάχιστον διαφορετικά, πολύ χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων.

4.4 Ιχνηλασιμότητα - Εκτίμηση της αβεβαιότητας

Η διασφάλιση της αξιοπιστίας και συγκρισιμότητας των αποτελεσμάτων – και απουσία πιστοποιημένων υλικών αναφοράς – απαιτεί τη χρήση προτύπων των αναλυτών υψηλής καθαρότητας, διακρίβωση συσκευών ζύγισης και ογκομετρικού εξοπλισμού και αυστηρές διαδικασίες παρασκευής των προτύπων και προετοιμασίας των υπο-δειγμάτων (7,8). Σε κάθε νέα επέκταση του πεδίου εφαρμογής είναι απαραίτητη η εκτίμηση της αβεβαιότητας,

αξιολογώντας τις επιμέρους πηγές από την αναπαραγωγιμότητα, την προσέγγιση γραμμικότητας, τις ζυγίσεις, τη δειγματοληψία, τις μετρήσεις όγκων, την καθαρότητα των προτύπων κ.λ.π. (9, 11, 12)

5. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Η προσέγγιση εφαρμόσθηκε στο εργαστήριο, με επιτυχία, σε ευρεία κλίμακα υποστρωμάτων και αναλυτών όπως φαίνεται στους πίνακες 1 και 2.

Πίνακας 1. Υποστρώματα στα οποία εφαρμόσθηκε η τεχνική Head Space ευέλικτου πεδίου.

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ		
Υλικά σε επαφή με τρόφιμα,	*όπως*	Φιάλες (PET, PC, PVC) Φύλλα (PE, PP, PET, PS, PA, Χαρτί) Πλαστικά σκεύη και είδη οικιακής χρήσεως (PE, PP, PET, PC, Πολυαμίδιο, Σιλικόνη)
Είδη βρεφικής και παιδικής φροντίδας	*όπως*	Μπιμπερό, πιπίλες (PC, PET, Σιλικόνη, Καουτσούκ), Πλαστικά παιχνίδια
Επιχρίσματα δεξαμενών νερού και εξαρτήματα συστημάτων παροχής νερού,	*όπως*	Ρητίνες (Εποξειδικές, Ακρυλικές), Πλαστικά παρευρύσματα και σωλήνες (πολυολεφίνες, Συνθετικό καουτσούκ)
Τρόφιμα,	*όπως*	Φρούτα, δημητριακά, Αλκοολύχα ποτά, νερό
Βιομηχανικά προιόντα,	*όπως*	Χρώματα, Βερνίκια, σπρέυ
Φάρμακα		

Πολλά από τα υποστρώματα και τους αναλύτες αφορούν και σε διαδικασίες επέκτασης του πεδίου.

Πίνακας 2. Αναλύτες στους οποίους εφαρμόσθηκε η τεχνική Head Space ευέλικτου πεδίου.

ΑΝΑΛΥΤΕΣ		
Αρχικά μονομερή και ολιγομερή, παραπροϊόντα πολυμερισμού, πρόσθετα και προϊόντα διάσπασης πολυμερών και προσθέτων	*όπως*	Αλκάνια, Αλκένια, Στυρένιο, Κυκλοσιλοξάνια, Ακεταλδεύδη, τολουόλιο, αιθυλοβενζόλιο, Βενζαλδεύδη, BHT, Φαινόλη, Χλωροβενζόλιο, Βενζυλική αλκοόλη
Διαλύτες	*όπως*	Μεθανόλη, Αιθανόλη, Ακετόνη, Εξάνιο, Οξικός Αιθυλεστέρας, Ακετονιτρίλιο, Κυκλοεξάνιο, Κυκλοεξανόνη, Τολουόλιο, Ξυλόλιο
Πτητικά συστατικά φυσικών προϊόντων και τροφίμων	*όπως*	Αλδεύδες, Αλκόολες, εστέρες αλειφατικών οξέων, Πινένια, Ανιθόλη
Προωθητικά	*όπως*	Ισοβουτάνιο, Βουτάνιο, 2- Μεθυλο - Βουτάνιο, Πεντάνιο, Διφθοροχλωρομεθάνιο

6. ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Ο βασικός στόχος για την ανάπτυξη μιας σύνθετης διεργασίας για τον προσδιορισμό αναλυτών σε ποικίλα υποστρώματα, βασισμένης σε εφαρμογή συγκεκριμένων τεχνικών, εστιάζει στη δημιουργία ενός ευέλικτου μοντέλου, το οποίο όμως θα είναι ταυτόχρονα εξαιρετικά αυστηρό, ώστε να διασφαλίζει την επίτευξη αξιόπιστων και ιχνηλάσιμων αποτελεσμάτων με επιπρόσθετη κάλυψη των απαιτήσεων για ιχνηλασιμότητα των μετρήσεων. Τέτοιες ευέλικτες προσεγγίσεις μπορούν να εφαρμοσθούν σε προσδιορισμούς ρυπαντών, πολύ-υπολειμματικές μεθόδους, μεθόδους προσδιορισμού προσθέτων στα τρόφιμα και άλλες.

Επιπλέον, μια επιπρόσθετη αξία μιας τέτοιας διεργασίας, είναι η δυνατότητα να διαπιστευθεί σύμφωνα με το πρότυπο ΕΛΟΤ EN/ISO 17 025, ως ευέλικτου πεδίου, δίνοντας στο εργαστήριο που την εφαρμόζει να επεκτείνει διαρκώς το πεδίο εφαρμογής της μεθόδου, εντάσσοντάς το αυτόματα στο πεδίο διαπίστευσης, χωρίς προηγούμενη αξιολόγηση από το φορέα διαπίστευσης. Για το λόγο αυτό απαιτείται υψηλή τεχνική επάρκεια του προσωπικού του εργαστηρίου και αυστηρές διαδικασίες για την επίτευξη αξιοπιστίας και ιχνηλασιμότητας των αποτελεσμάτων. Η προσέγγιση που παρουσιάσθηκε αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε με επιτυχία στο Εργαστήριο Υλικών και Αντικειμένων σ' Επαφή με Τρόφιμα της Δ' Χ.Υ. Αθηνών, του Γενικού Χημείου του Κράτους και διαπιστεύθηκε από τον UKAS. Στόχος της μετρολογίας δεν είναι άλλος από το να εξασφαλίσει ότι οι μετρήσεις είναι αυτό που σκοπεύουν να είναι.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ΕΛΟΤ EN 13628-1:2003, Determination of residual solvents in flexible packaging.
2. ΕΛΟΤ EN 13628-2:2003, Determination of residual solvents in flexible packaging by static head Space Chromatography.
3. METHOD OM2, General Chemical State Laboratory, D' Division of Athens, Section D': Determination of the overall migration from plastics into aqueous food simulants by total immersion.
4. Ben Van Lierop, Laurence Castle, Alexandre Feigenbaum & Achim Boenke (1998), Spectra for the identification of additives in food packaging, Kluwer Academic Publishers.
5. Feigenbaum A, Scholler D, Bouquant J, Brigot G, Ferrier D, Franz R, Lillemark L, Riquet AM, Petersen JH, van Lierop B & Yagoubi N (2002). Safety and quality of food contact materials. Part1: Evaluation of analytical strategies to introduce migration testing into good manufacturing practice. *Food Additives and Contaminants* **19**, 184-201.
6. Kolb, B (1999). Headspace Sampling with Capillary Columns. *Journal of Chromatography A* **842**, 163-205
7. EURACHEM / CITAC Guide, Traceability in Chemical Analysis, June 2002.
8. ISO 5725, "Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results", First edition, 1994-12-15.
9. Ε. Λαμπή, «Αβεβαιότητα στις Χημικές Μετρήσεις», Χημικά Χρονικά, Γενική Έκδοση 10-11/1998, σελ. 309-315.
10. CITAC / EURACHEM GUIDE, "Guide to Quality in Analytical Chemistry", Edition 2002.
11. EURACHEM / CITAC, "Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement", Second Edition, 2000.
12. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, ISO, 1st Edition, 1993
13. UKAS Guidance on the Implementation and Management of Flexible Scopes of Accreditation within Laboratories, LAB 39 (DRAFT 39), 2003.