

ΧΡΗΣΗ ΔΕΥΤΕΡΙΩΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΩΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΣΤΙΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ

N.ΜΑΡΑΓΚΟΥ¹, Ε.ΛΑΜΠΗ², Ν.ΘΩΜΑΪΔΗΣ¹

¹ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥΠΟΛΗ ΖΩΓΡΑΦΟΥ 157 71 ΑΘΗΝΑ

²Δ' ΧΗΜΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ, ΓΕΝΙΚΟ ΧΗΜΕΙΟ ΤΟΥ ΚΡΑΤΟΥΣ, ΤΣΟΧΑ 16, ΑΘΗΝΑ
e-mail: ntho@chem.uoa.gr

Περίληψη

Κατά την ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού της BPA στο γάλα με LC-ESI-MS διαπιστώθηκε αρχικά η αναγκαιότητα χρήσης εσωτερικού προτύπου για την αξιοπιστία της μεθόδου, καθώς οι μετρήσεις από μέρα σε μέρα που παρείχε το συζευγμένο σύστημα LC-MS δεν παρουσίαζαν ικανοποιητική επαναληψιμότητα. Η χρήση της δευτεριωμένης BPA-d₁₆ ως εσωτερικό πρότυπο βελτίωσε σημαντικά την πιστότητα και την ορθότητα της μεθόδου, με συνέπεια τον περιορισμό της αβεβαιότητας στο αποτέλεσμα της ανάλυσης.

Λέξεις-Κλειδιά: υγροχρωματογραφία – φασματομετρία μαζών, δευτεριωμένα εσωτερικά πρότυπα, αβεβαιότητα

1. Εισαγωγή

Η συζευγμένη τεχνική υγροχρωματογραφία - φασματομετρία μαζών παρουσιάζει μεταβολές στην ευαισθησία λόγω της οργανολογικής αστάθειας με αποτέλεσμα την περιορισμένη πιστότητα μεταξύ των μετρήσεων η οποία αυξάνει την αβεβαιότητα του τελικού αποτελέσματος. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος κατά την ποσοτικοποίηση των μετρήσεων χρησιμοποιείται η τεχνική του εσωτερικού προτύπου κατά την οποία στο δείγμα εισάγεται κατάλληλη ουσία κατά το στάδιο της δειγματοληψίας, ως εσωτερικό πρότυπο, το δείγμα αναλύεται και λαμβάνεται ο λόγος των σημάτων των δύο ουσιών. Το κάθε σήμα εξαρτάται από την ευαισθησία του ανιχνευτή στο παρακολουθούμενο ιόν και από τη συγκέντρωσή του. Ένας περιορισμός που αφορά την τεχνική αυτή, είναι η επίδραση της μήτρας του δείγματος κατά τον ιονισμό με την τεχνική της ηλεκτροδιάχυσης (ESI) και του χημικού ιονισμού σε ατμοσφαιρική πίεση (APCI), όπου προκαλείται καταστολή του σήματος και πιθανόν διαφοροποίηση του λόγου των σημάτων πραγματικού δείγματος σε σύγκριση με τον αντίστοιχο λόγο πρότυπου διαλύματος. Ο περιορισμός αυτός αντιμετωπίζεται επιτυχώς με τη χρήση κατάλληλων εσωτερικών προτύπων. Η φασματομετρία μαζών επιτρέπει τη χρήση ισοτοπικά επισημασμένων ενώσεων ως εσωτερικά πρότυπα. Μία κατηγορία που ευρέως χρησιμοποιείται είναι οι δευτεριωμένες ενώσεις, οι οποίες έχουν την ίδια χημική δομή με την προσδιοριζόμενη ουσία με τη διαφορά ότι έχει γίνει αντικατάσταση ορισμένων υδρογόνων με δευτέρια. Ένα από τα πλεονεκτήματα των δευτεριωμένων ενώσεων είναι ότι απουσιάζουν από το δείγμα με αποτέλεσμα να είναι επακριβώς γνωστή και σταθερή η συγκέντρωση τόσο στο πρότυπο διάλυμα όσο και στο πραγματικό δείγμα. Επίσης,

παρουσιάζουν παρόμοια χρωματογραφική συμπεριφορά με την προσδιοριζόμενη ουσία και παράλληλα διαφοροποιούνται στη μάζα, με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η ανίχνευσή τους με παρακολούθηση διαφορετικού λόγου m/z . Ακόμη, ιονίζονται στον ίδιο βαθμό και για το λόγο αυτό, το φασματόμετρο μαζών παρουσιάζει παρόμοια ευαισθησία στις δύο ουσίες. Επιπροσθέτως, οι απώλειες της επιθυμητής ουσίας και του δευτεριωμένου εσωτερικού προτύπου κατά την προετοιμασία του δείγματος είναι ίσες εξαιτίας της ομοιότητας των χημικών και φυσικών ιδιοτήτων τους, με αποτέλεσμα ο λόγος των σημάτων να παραμένει σταθερός. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να βελτιωθεί η ορθότητα της μεθόδου [1].

Η χρησιμότητα του δευτεριωμένου εσωτερικού προτύπου έχει αναφερθεί κατά τον προσδιορισμό μυκοτοξινών σε βρώμη με LC-APCI-MS [2]. Στην εργασία αυτή διαπιστώθηκε βελτίωση της ανθεκτικότητας (ή στιβαρότητα, robustness) και της επαναληψιμότητας της μεθόδου με τη χρήση του δευτεριωμένου εσωτερικού προτύπου T-2-d₃. Επίσης, κατά τον προσδιορισμό δισφαινόλης A (BPA) σε ιστό ψαριού με LC-APCI-MS, παρατηρήθηκε πως η χρήση δευτεριωμένου εσωτερικού προτύπου (BPA-d₁₆) βοήθησε στη διόρθωση των αλλαγών της απόκρισης του ανιχνευτή, καθώς η ευαισθησία του μειωνόταν κατά την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων [3].

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται τα αποτελέσματα εκτίμησης της αβεβαιότητας σε μετρήσεις με LC-ESI-MS με το δευτεριωμένο εσωτερικό πρότυπο και χωρίς αυτό. Η υδροχρωματογραφία - φασματομετρία μαζών χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό δισφαινόλης A (BPA) σε γάλα, όπου χρησιμοποιήθηκε δευτεριωμένη δισφαινόλη A (BPA-d₁₆) ως εσωτερικό πρότυπο. Με τη βοήθεια πειραμάτων ανάκτησης και αναπαραγωγιμότητας υπολογίστηκε η αβεβαιότητα σε συγκεντρώσεις 5, 50 και 500 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ με τη χρήση του εσωτερικού προτύπου και χωρίς αυτό.

2. Πειραματικό μέρος

2.1. Διαλύτες, πρότυπες ουσίες και υλικά

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις υδροχρωματογραφικές αναλύσεις είναι καθαρότητας HPLC και περιλαμβάνουν μεθανόλη και ακετονιτρίλιο καθαρότητας $\geq 99,9\%$ (LAB SCAN), και υπερκάθαρο νερό ειδικής αντίστασης 18,2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$. Χρησιμοποιήθηκε πρότυπη ουσία BPA, 2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)-propane, $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2$, καθαρότητας 97% (FLUKA) και πρότυπη ουσία δευτεριωμένης δισφαινόλης A (BPA-d₁₆), $\text{C}_{15}\text{D}_{16}\text{O}_2$, (Sigma Aldrich). Παρασκευάστηκαν πρότυπα πυκνά διαλύματα για κάθε μία από τις δύο ουσίες συγκέντρωσης περίπου 100 mg L^{-1} σε μεθανόλη. Κατά τις πειραματικές πορείες χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα υδατικά διαλύματα εργασίας δισφαινόλης A (5 – 700 $\mu\text{g L}^{-1}$), τα οποία παρασκευάστηκαν με κατάλληλη αραίωση των πυκνών διαλυμάτων με υπερκάθαρο νερό. Η συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου τόσο στα πρότυπα διαλύματα όσο και στα εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος ήταν 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Κατά την προκατεργασία του δείγματος εφαρμόστηκε εκχύλιση στερεάς φάσης με φυσίγγια πληρωμένα με δεκαοκτύλιο με καλυμμένες τις ελεύθερες σιλανολικές ομάδες (C18 endcapped ISOLUTE , 500 $\text{mg} / 3\text{cc}$). Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν γάλα πλήρες, υψηλής παστερίωσης με 3,5% λιπαρά και δεν περιείχε ανιχνεύσιμη ποσότητα BPA.

2.2. Προκατεργασία δείγματος

Σε υάλινο φιαλίδιο των 20 mL ζυγίζεται 1 g δείγματος, προστίθενται 10 μL πρότυπου διαλύματος BPA-d₁₆ συγκέντρωσης 10 mg L⁻¹, 8 mL υπερκάθαρου νερού και 1 mL μεθανόλης. Το φιαλίδιο σφραγίζεται και ανακινείται. Ακολουθεί εκχύλιση στερεάς φάσης με φυσίγγιο SPE C18, όπου η ενεργοποίηση του υλικού πραγματοποιείται με 5 mL MeOH και η εξισορρόπησή του με 5 mL H₂O. Το δείγμα φορτώνεται στο φυσίγγιο και ακολουθεί έκπλυση με 8 mL H₂O και 2 mL μίγματος MeOH-H₂O αναλογίας 40/60 v/v. Οι ουσίες εκκλύονται με διαβίβαση 3 mL μίγματος MeOH-H₂O αναλογίας 90/10 v/v. Συλλέγεται το κλάσμα έκλυσης, το οποίο εξατμίζεται μέχρι ξηρού με ρεύμα αζώτου και στη συνέχεια προστίθεται 1 mL νερού. Τέλος, το διάλυμα διηθείται με πλαστική σύριγγα που φέρει φίλτρο διαμέτρου 0,45 μm , και συλλέγεται σε υάλινο φιαλίδιο του δειγματολήπτη του LC-MS.

2.3. Ανάλυση με LC-ESI-MS

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε υγροχρωματογραφικό σύστημα συζευγμένο με φασματόμετρο μαζών (Thermo Finnigan), το οποίο αποτελείται από αντλία (Spectra System P 4000) με δυνατότητα βαθμιδωτής έκλυσης τεσσάρων διαλυτών, των οποίων η απαέρωση πραγματοποιείται με κενό, βρόχο εισαγωγής δείγματος 20 μL και αυτόματο δειγματολήπτη 100 θέσεων (Spectra System AS 3000). Ο υγροχρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιείται με στήλη αντίστροφης φάσης (LiChrospher 100-RP18) διαμέτρου 4 mm, μήκους 250 mm και διαμέτρου σωματιδίων πλήρωσης 5 μm . Η χρησιμοποιούμενη προστήλη είναι επίσης αντίστροφης φάσης C18, μήκους 1 cm (APEX ODS 5U). Το φασματόμετρο μαζών (Surveyor MSQ) αποτελείται από θερμαινόμενη πηγή ιονισμού με ηλεκτροδιάχυση (ESI), όπου πραγματοποιείται διαβίβαση αερίου αζώτου ομόκεντρα προς τον τριχοειδή σωλήνα, και τετραπολικό αναλυτή μαζών, ο οποίος λαμβάνει φάσματα μαζών στην περιοχή m/z 60-2000 Da/e και διαθέτει γραμμικότητα για εύρος m/z από 172,9 έως 1971 Da/e. Η καταγραφή και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με το λογισμικό πρόγραμμα Xcalibur (Thermo Finnigan).

Η ανάλυση με το σύστημα LC-ESI-MS περιλαμβάνει κινητή φάση αποτελούμενη από μεθανόλη/νερό (70/30 v/v) και ροή 0,9 mL min⁻¹, δυναμικό κώνου 70 V, θερμοκρασία πηγής 500 °C και δυναμικό τριχοειδούς 3,5 KV. Σε κάθε ένεση δείγματος λαμβάνεται το Full Scan φάσμα σε περιοχή μαζών m/z 100-300, και για την ποσοτικοποίηση λαμβάνονται το χρωματογράφημα SIM με m/z 227 για την παρακολούθηση της BPA και το χρωματογράφημα SIM με m/z 241 για την παρακολούθηση του εσωτερικού προτύπου, BPA-d₁₆.

2.4. Επικύρωση και εκτίμηση αβεβαιότητας μεθόδου

Κατά την επικύρωση της μεθόδου προσδιορισμού της BPA σε γάλα με LC-MS προσδιορίστηκαν η γραμμικότητα της καμπύλης αναφοράς και η γραμμικότητα καμπύλης από εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος, το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, η ορθότητα και η πιστότητα της μεθόδου, η αβεβαιότητα και τέλος αξιολογήθηκε η καταλληλότητα του συστήματος.

Ως αβεβαιότητα ορίζεται μία παράμετρος που συνδέεται με το αποτέλεσμα μιας μέτρησης, η οποία χαρακτηρίζει τη διασπορά των τιμών που λογικά μπορούν να αποδοθούν στο προσδιοριζόμενο συστατικό.

Κατά τη μέτρηση της συγκέντρωσης μιας ουσίας σε ένα δείγμα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη πως το ευρισκόμενο αποτέλεσμα είναι μόνο μία εκτίμηση της αληθούς τιμής. Το αποτέλεσμα της μέτρησης αποκλίνει από την πραγματική τιμή εξαιτίας των

συστηματικών σφαλμάτων (σταθερών ή αναλογικών) και των τυχαίων σφαλμάτων που υπάρχουν. Η αβεβαιότητα, επομένως, είναι ένα εύρος στο οποίο βρίσκεται με αξιοπιστία σε ένα επίπεδο εμπιστοσύνης μία μέτρηση.

Τα τυχαία σφάλματα προσδιορίζονται με πειράματα επαναληψιμότητας, ενώ τα συστηματικά σφάλματα μπορούν να προσδιοριστούν, είτε με ανάλυση πρότυπων υλικών αναφοράς που προσομοιάζουν το δείγμα (CRMs), ή με σύγκριση της εξεταζόμενης μεθόδου με μία πρότυπη μέθοδο, ή τέλος με πειράματα ανακτήσεων. Η αβεβαιότητα του αποτελέσματος μίας μέτρησης μπορεί να περιλαμβάνει και άλλα συστατικά, όπως είναι ο υπολογισμός της συγκέντρωσης από καμπύλη αναφοράς, οι μετρήσεις όγκου και μάζας, η αβεβαιότητα της πιστοποιημένης τιμής των υλικών αναφοράς, η καθαρότητα των χρησιμοποιούμενων πρότυπων ουσιών και η διακύμανση της δειγματοληψίας.

Κάθε μία συνιστώσα της αβεβαιότητας εκφράζεται ως τυπική απόκλιση και αναφέρεται ως τυπική αβεβαιότητα (u). Η συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα (u_c) προκύπτει από το συνδυασμό των τυπικών αβεβαιοτήτων, και δίνεται ως η τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων των τυπικών αβεβαιοτήτων κάθε συνιστώσας, σύμφωνα με το νόμο διάδοσης των σφαλμάτων. Η διευρυμένη αβεβαιότητα (U) εκφράζει ένα μεγαλύτερο διάστημα από τη συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα, στο οποίο η τιμή του μετρούμενου μεγέθους έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να βρεθεί. Στις χημικές μετρήσεις και για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, η διευρυμένη αβεβαιότητα υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας τη συνδυασμένη αβεβαιότητα με ένα συντελεστή κάλυψης ίσο με 2.

Για τη μέθοδο προσδιορισμού της BPA στο γάλα έγινε αρχικά ταυτοποίηση των πηγών αβεβαιότητας. Οι πηγές αυτές περιλάμβαναν : α) τα τυχαία σφάλματα, β) τα συστηματικά σφάλματα, γ) την αβεβαιότητα από τη χρήση της καμπύλης αναφοράς, δ) την αβεβαιότητα από τη μέτρηση της μάζας, ε) την αβεβαιότητα από τη μέτρηση του όγκου και στ) την αβεβαιότητα από την καθαρότητα της πρότυπης ουσίας. Ποσοτικοποιήθηκε η τυπική αβεβαιότητα κάθε πηγής και προσδιορίστηκε η συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα, σύμφωνα με τις οδηγίες εκτίμησης αβεβαιότητας στις χημικές μετρήσεις [4]. Η αβεβαιότητα εκτιμήθηκε για τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, 5, 50 και 500 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ με χρήση εσωτερικού προτύπου και χωρίς αυτό. Εξετάστηκε η επίδραση της χρήσης του εσωτερικού προτύπου στην αβεβαιότητα των μετρήσεων με LC-MS.

2.5. Έλεγχος σταθερότητας συστήματος LC-MS

Από 44 αναλύσεις πρότυπου υδατικού διαλύματος BPA 98 $\mu\text{g L}^{-1}$ με συγκέντρωση εσωτερικού προτύπου 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε διάρκεια δύο μηνών, προσδιορίστηκαν η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση και η εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση της μετρούμενης συγκέντρωσης. Ακόμη προσδιορίστηκαν οι μέσες τιμές, οι τυπικές αποκλίσεις και οι εκατοστιαίες σχετικές τυπικές αποκλίσεις για τα εμβαδά κορυφής της BPA και της BPA- d_{16} και τους αντίστοιχους λόγους τους (F). Τέλος υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές, οι τυπικές αποκλίσεις και οι εκατοστιαίες σχετικές τυπικές αποκλίσεις για τους χρόνους ανάλυσης κάθε ουσίας, όπως και του αντίστοιχου λόγου τους.

Συγκρίθηκαν οι τιμές %RSD των εμβαδών κορυφής της BPA και της BPA- d_{16} με την αντίστοιχη τιμή του λόγου των εμβαδών τους, F , για τον έλεγχο της σταθερότητας τόσο των επιμέρους εμβαδών των κορυφών, όσο και του λόγου τους, F . Τέλος, συγκρίθηκαν οι χρόνοι ανάλυσης των ουσιών με το λόγο τους, δηλαδή με το σχετικό χρόνο ανάλυσης.

3. Αποτελέσματα

3.1. Προσδιορισμός αβεβαιότητας

Η περιεκτικότητα της δισφαινόλης A, [BPA], σε $\mu\text{g Kg}^{-1}$ στο δείγμα υπολογίζεται από τη σχέση 3.1:

$$[BPA] = \frac{C \times V}{m} \quad (3.1)$$

όπου,

C: η συγκέντρωση στο τελικό διάλυμα ($\mu\text{g L}^{-1}$), προσδιοριζόμενη με χρήση καμπύλης αναφοράς. (Κατά την επικύρωση έγινε σύγκριση της καμπύλης αναφοράς πρότυπων υδατικών διαλυμάτων και καμπύλης από εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος με BPA και BPA-d₁₆. Αποδείχθηκε πως δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους και για το λόγο αυτό για την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε η πρώτη).

V: ο όγκος του τελικού διαλύματος μετά την εκχύλιση στερεάς φάσης (1 mL)

m: η μάζα του δείγματος που αναλύθηκε (1 g)

Η συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα για περιεκτικότητα δισφαινόλης A, [BPA], σε ένα δείγμα, δίνεται από τη σχέση 3.2:

$$\frac{u_c([BPA])}{[BPA]} = \sqrt{RSD_{\text{ΜΕΘΟΔΟΥ}}^2 + RSD_{\text{bias}}^2 + \left(\frac{u(C)}{C}\right)^2 + \left(\frac{u(m)}{m}\right)^2 + \left(\frac{u(V)}{V}\right)^2 + \left(\frac{u(P)}{P}\right)^2} \quad (3.2)$$

Ακολουθεί περιγραφή κάθε συνιστώσας της συνδυασμένης σχετικής τυπικής αβεβαιότητας:

α) Πιστότητα

Το $RSD_{\text{ΜΕΘΟΔΟΥ}}$ είναι η σχετική τυπική απόκλιση της προσδιοριζόμενης συγκέντρωσης εμβολιασμένου δείγματος με BPA, από τα πειράματα της αναπαραγωγιμότητας και εκφράζει τη συμφωνία μεταξύ ανεξάρτητων αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από τη μέθοδο.

β) Ορθότητα

Αρχικά προσδιορίζεται η τυπική απόκλιση της μέσης τιμής της ανάκτησης ($SD_{\bar{R}}$), από τα πειράματα της αναπαραγωγιμότητας, από τη σχέση $SD_{\bar{R}} = \frac{SD_R}{\sqrt{n}}$, όπου n το πλήθος των προσδιοριζόμενων ανακτήσεων το οποίο είναι ίσο με έξι και για τα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων. Το RSD_{bias} υπολογίζεται από τη σχέση, $RSD_{\text{bias}} = \frac{SD_{\bar{R}}}{\bar{R}}$, όπου \bar{R} η μέση τιμή της ανάκτησης, και εκφράζει την εγγύτητα μεταξύ της μέσης τιμής και της “αληθούς” τιμής.

γ) Αβεβαιότητα από τη χρήση της καμπύλης αναφοράς, $u(C)$

Το $\frac{u(C)}{C}$ αφορά την αβεβαιότητα που προκύπτει από τη χρήση της καμπύλης αναφοράς για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της BPA σε ένα δείγμα. Η τυπική αβεβαιότητα $u(C)$ δίνεται από τη σχέση 3.3:

$$u(C) = \frac{S_{y/x}}{b} \left\{ \frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_o - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{1/2} \quad (3.3)$$

όπου :

b: η κλίση της καμπύλης αναφοράς

n: ο αριθμός των προτύπων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς

m: ο αριθμός των επαναλήψεων κατά τη μέτρηση του άγνωστου δείγματος

y_o : ο μέσος όρος των αποκρίσεων αυτών των επαναλήψεων

\bar{y} : ο μέσος όρος των αποκρίσεων των προτύπων διαλυμάτων

x_i : η συγκέντρωση κάθε πρότυπου διαλύματος

\bar{x} : ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων των προτύπων διαλυμάτων, και

$S_{y/x}$: η τυπική απόκλιση των υπολοίπων που προκύπτουν από την γραμμική συσχέτιση και δίνεται από τη σχέση 3.4:

$$S_{y/x} = \left\{ \frac{\sum_i (y_i - \hat{y})^2}{n - 2} \right\}^{1/2} \quad (3.4)$$

ο όρος \hat{y} είναι η προβλεπόμενη τιμή y από την εξίσωση παλινδρόμησης για τις συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων. Για τον υπολογισμό της σχετικής τυπικής αβεβαιότητας διαιρείται η τυπική αβεβαιότητα $u(C)$ με τη συγκέντρωση C της BPA στο δείγμα που υπολογίστηκε με την εξίσωση παλινδρόμησης.

δ) *Αβεβαιότητα από τη μέτρηση μάζας, $u(m)$*

Ο όρος $\frac{u(m)}{m}$ είναι η σχετική τυπική αβεβαιότητα της μέτρησης της μάζας με αναλυτικό ζυγό. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μεθόδου ζυγίζεται αρχικά 1 g δείγματος με αναλυτικό ζυγό δύο δεκαδικών ψηφίων. Το πιστοποιητικό διακρίβωσης του ζυγού αναφέρει πως η αβεβαιότητα της μέτρησης είναι : $u(m) = \pm (0,01g + 8,5 \times 10^{-6} m)$.

Επομένως η σχετική τυπική αβεβαιότητα της μέτρησης 1 g είναι ίση με $\frac{u(m)}{m} = 0,01001$.

ε) *Αβεβαιότητα από τη μέτρηση όγκου, $u(V)$*

Η σχετική τυπική αβεβαιότητα του όγκου εκφράζεται με τον όρο $\frac{u(V)}{V}$. Κατά τον προσδιορισμό της δισφαινόλης A σε γάλα, μετά την απομάκρυνση του διαλύτη έκλυσης της εκχύλισης στερεάς φάσης, προστίθεται 1 mL νερού με σιφόνιο του 1 mL και λαμβάνεται το τελικό διάλυμα το οποίο μετράται με υδροχρωματογραφία-φασματομετρία μαζών. Η αβεβαιότητα $u(V)$ συνίσταται από την αβεβαιότητα της βαθμονόμησης του σκεύους και από την αβεβαιότητα που προέρχεται από την επίδραση της θερμικής διαστολής. Η αβεβαιότητα της βαθμονόμησης του σκεύους παρέχεται από τον κατασκευαστή ως εύρος a ίσο με $\pm 0,01$ mL, και τελικά εκφράζεται ως $u_1(V) = \frac{a}{\sqrt{3}}$, θεωρώντας πως ισχύει η τετραγωνική κατανομή. Θεωρώντας πάλι πως ισχύει η

τετραγωνική κατανομή η αβεβαιότητα λόγω θερμικής διαστολής εκφράζεται με τη σχέση 3.5 :

$$u_2(V) = \frac{\Delta V}{\sqrt{3}} \quad (3.5)$$

$$\text{με } \Delta V = V_{20} \times a_w \times \Delta T \quad (3.6)$$

όπου,

ΔV : η μεταβολή του ονομαστικού όγκου του 1 mL

V_{20} : ο πιστοποιημένος όγκος στους 20 °C, 1 mL

a_w : ο συντελεστής θερμικής διαστολής του νερού, $2,1 \times 10^{-4} / ^\circ\text{C}$

ΔT : η διαφορά της θερμοκρασίας του εργαστηρίου από τους 20 °C, 5°C

Τελικά η σχετική τυπική αβεβαιότητα του όγκου εκφράζεται από τη σχέση 3.7.

$$\frac{u(V)}{V} = \sqrt{\left(\frac{u_1(V)}{V}\right)^2 + \left(\frac{u_2(V)}{V}\right)^2} \quad (3.7)$$

και είναι ίση με $\frac{u(V)}{V} = 0,00581$.

στ) *Αβεβαιότητα από την καθαρότητα της πρότυπης ουσίας, $u(P)$*

Η καθαρότητα της πρότυπης στερεής ουσίας της δισφαινόλης Α δίνεται ίση με 97%, επομένως υπάρχει ένα εύρος ανοχής 3% ή 0,03. Εφαρμόζοντας τετραγωνική κατανομή, η αβεβαιότητα που προκύπτει είναι $u(P) = \frac{0,03}{\sqrt{3}}$, και η σχετική τυπική αβεβαιότητα είναι

$$\frac{u(P)}{P} = 0,01786.$$

Στους πίνακες 3.1 και 3.2 παρουσιάζονται για κάθε εξεταζόμενο επίπεδο συγκέντρωσης, οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις κάθε πηγής αβεβαιότητας, η συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα, $\frac{u_c([BPA])}{[BPA]}$, βάσει τη σχέσης 3.2, η διευρυμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα για στάθμη εμπιστοσύνης 95% (RU), η οποία προκύπτει με διπλασιασμό της συνδυασμένη σχετικής τυπικής αβεβαιότητας για παράγοντα κάλυψης $k=2$ σε στάθμη εμπιστοσύνης 95%. Ακόμη παρουσιάζονται η εκατοστιαία διευρυμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα (%RU), η διευρυμένη τυπική αβεβαιότητα (U), η οποία προκύπτει με πολλαπλασιασμό της διευρυμένης σχετικής τυπικής αβεβαιότητας με τη συγκέντρωση που αποτελεί το αποτέλεσμα της ανάλυσης ($RU \times [BPA]$), και τέλος η έκφραση του αποτελέσματος της συγκέντρωσης της BPA στο γάλα με το εύρος της αβεβαιότητας που το συνοδεύει. Για την παραγωγή των δεδομένων του πίνακα 3.1 η ποσοτικοποίηση της BPA έγινε με την τεχνική εσωτερικού προτύπου, ενώ για τα δεδομένα του πίνακα 3.2 χρησιμοποιήθηκε ως αναλυτική παράμετρος το εμβαδό της κορυφής της ουσίας.

Πίνακας 3.1 Δεδομένα αβεβαιότητας με χρήση εσωτερικού προτύπου

| Επίπεδο συγκέντρωσης BPA στο γάλα ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) | 5 | 50 | 500 |
|--|-------------|-----------|------------|
| $\frac{u(C)}{C}$ | 0,21541 | 0,11500 | 0,01170 |
| RSD _{ΜΕΘΟΔΟΥ} | 0,17600 | 0,05798 | 0,05237 |
| RSD _{bias} | 0,07185 | 0,02367 | 0,02138 |
| $\frac{u(V)}{V}$ | 0,00581 | 0,00581 | 0,00581 |
| $\frac{u(m)}{m}$ | 0,01001 | 0,01001 | 0,01001 |
| $\frac{u(P)}{P}$ | 0,01786 | 0,01786 | 0,01786 |
| $\frac{u_c([BPA])}{[BPA]}$ | 0,28809 | 0,13266 | 0,06156 |
| RU (Σ.Ε 95%) | 0,57617 | 0,26533 | 0,12312 |
| % RU | 57 | 27 | 12 |
| U | 2,8 | 13 | 62 |
| $([BPA] \pm U) \mu\text{g Kg}^{-1}$ | (5,0 ± 2,8) | (50 ± 13) | (500 ± 62) |

Πίνακας 3.2 Δεδομένα αβεβαιότητας χωρίς τη χρήση εσωτερικού προτύπου

| Επίπεδο συγκέντρωσης BPA στο γάλα ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) | 5 | 50 | 500 |
|---|-----------------|---------------|-----------------|
| $\frac{u(C)}{C}$ | 0,46794 | 0,21245 | 0,02312 |
| RSD _{ΜΕΘΟΔΟΥ} | 0,16730 | 0,52107 | 0,61559 |
| RSD _{bias} | 0,21539 | 0,18783 | 0,17087 |
| $\frac{u(V)}{V}$ | 0,00581 | 0,00581 | 0,00581 |
| $\frac{u(m)}{m}$ | 0,01001 | 0,01001 | 0,01001 |
| $\frac{u(P)}{P}$ | 0,01786 | 0,01786 | 0,01786 |
| $\frac{u_c([BPA])}{[BPA]}$ | 0,54204 | 0,59362 | 0,63964 |
| RU (Σ.Ε 95%) | 1,08408 | 1,18724 | 1,27928 |
| % RU | 108 | 119 | 128 |
| U | 5,4 | 59 | 640 |
| $([BPA] \pm U) \mu\text{g Kg}^{-1}$ | $(5,0 \pm 5,4)$ | (50 ± 59) | (500 ± 640) |

Από τους πίνακες 3.1 και 3.2 παρατηρείται πως οι συνιστώσες που συνεισφέρουν περισσότερο στην αβεβαιότητα του αποτελέσματος μιας μέτρησης είναι ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης από την καμπύλη αναφοράς ($\frac{u(C)}{C}$), η διακύμανση των τυχαίων σφαλμάτων (RSD_{ΜΕΘΟΔΟΥ}) και τα συστηματικά σφάλματα της μεθόδου (RSD_{bias}). Αντιθέτως η συνεισφορά της καθαρότητας του προτύπου και οι μετρήσεις του όγκου και της μάζας είναι πιο περιορισμένες.

Συγκρίνοντας τις εκατοστιαίες διευρυμένες σχετικές τυπικές αβεβαιότητες (% RU) των δύο παραπάνω πινάκων, για κάθε ένα επίπεδο συγκέντρωσης, καθίσταται εμφανές πως η αβεβαιότητα του αποτελέσματος βελτιώνεται σημαντικά με τη χρήση του εσωτερικού προτύπου. Με τη χρήση του δευτεριωμένου εσωτερικού προτύπου αντιμετωπίζεται η οργανολογική αστάθεια του οργάνου της υδροχρωματογραφίας-φασματομετρίας, καθώς και η ορθότητα της μεθόδου, όσον αφορά τις απώλειες της ουσίας κατά την

προκατεργασία του δείγματος. Οι απώλειες της ουσίας και του δευτεριωμένου εσωτερικού προτύπου κατά την προετοιμασία του δείγματος είναι σχεδόν ίδιες, καθώς οι δύο ουσίες παρουσιάζουν ομοιότητα στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, με αποτέλεσμα οι σχετικές ανακτήσεις που λαμβάνονται βάσει του λόγου των εμβαδών των κορυφών να βρίσκονται κοντά στο 100%.

3.2. Έλεγχος σταθερότητας συστήματος LC-MS

Στον πίνακα 3.3 παρουσιάζονται τα στατιστικά στοιχεία -μέση τιμή, τυπική απόκλιση (SD) και εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση (%RSD)- του εμβαδού κορυφής της BPA (AREA BPA), του εμβαδού κορυφής του εσωτερικού προτύπου (AREA BPA-d₁₆) και του λόγου των εμβαδών κορυφής των δύο ουσιών (F), από τα αποτελέσματα 44 αναλύσεων πρότυπου υδατικού διαλύματος BPA 98 µg L⁻¹ με συγκέντρωση εσωτερικού προτύπου 100 µg L⁻¹, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε διάρκεια δύο μηνών. Επίσης δίνονται τα αντίστοιχα στατιστικά στοιχεία για τη μετρούμενη συγκέντρωση, C (µg L⁻¹), υπολογισμένη με βάση το F. Τέλος, παρουσιάζονται τα ίδια στατιστικά στοιχεία του χρόνου ανάλυσης της BPA, t_R(BPA), του χρόνου ανάλυσης του εσωτερικού προτύπου, t_R(BPA-d₁₆), και του σχετικού χρόνου ανάλυσης της BPA, t_R(BPA)/t_R(BPA-d₁₆).

Πίνακας 3.3 Έλεγχος σταθερότητας συστήματος LC-MS με χρήση πρότυπου υδατικού διαλύματος συγκέντρωσης 98 µg L⁻¹

| | AREA BPA | AREA BPA-d ₁₆ | F | C (µg L ⁻¹) | t _R (min) (BPA) | t _R (min) (BPA-d ₁₆) | t _R (BPA)/t _R (BPA-d ₁₆) |
|------------------------------|----------|--------------------------|-------|-------------------------|----------------------------|---|--|
| Μέση τιμή (n = 44) | 852989 | 1227243 | 0,692 | 94,0 | 5,16 | 5,02 | 1,029 |
| SD | 354189 | 501682 | 0,033 | 4,6 | 0,17 | 0,16 | 0,002 |
| % RSD | 41,5 | 40,9 | 4,8 | 4,9 | 3,3 | 3,2 | 0,2 |

Συγκρίνοντας τις τιμές %RSD του F με εκείνες των εμβαδών κορυφής, AREA BPA και AREA BPA-d₁₆, διαπιστώνεται η σημαντική βελτίωση στην αναπαραγωγικότητα του λαμβανομένου αναλυτικού σήματος με τη χρήση του εσωτερικού προτύπου. Από τα αποτελέσματα αυτά είναι προφανές πως το σύστημα είναι κατάλληλο μόνο με τη χρήση εσωτερικού προτύπου και χαρακτηρίζεται από αναπαραγωγικότητα της τάξης του 5%.

Η αναπαραγωγικότητα των χρόνων ανάλυσης της BPA και της BPA-d₁₆ για το διάστημα των δύο μηνών είναι 3,3 %. Το %RSD όμως της σχετικής ανάλυσης της BPA, ο λόγος t_R(BPA)/t_R(BPA-d₁₆), είναι σημαντικά μικρότερο (0,2 %), γεγονός που δίνει τη δυνατότητα χρήσης αυτού του μεγέθους ως επιπλέον στοιχείο επιβεβαίωσης της παρουσίας της BPA σε ένα άγνωστο δείγμα, εκτός από το φάσμα Full Scan.

4. Συμπεράσματα

Η μέθοδος περιλαμβάνει ποσοτικοποίηση με την τεχνική του εσωτερικού προτύπου. Διαπιστώθηκε ότι το δευτεριωμένο εσωτερικό πρότυπο, το οποίο προσομοιάζει σε μεγάλο βαθμό την προσδιοριζόμενη ουσία και παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά με αυτή σε όλα τα βήματα της ανάλυσης, είναι απαραίτητο για την αξιοπιστία της μεθόδου. Με τη χρήση του εσωτερικού προτύπου αντιμετωπίστηκε η οργανολογική αστάθεια του φασματομέτρου μαζών και βελτιώθηκε σημαντικά η ορθότητα και η αναπαραγωγικότητα

της μεθόδου, παρέχοντας τις παρακάτω εκατοστιαίες σχετικές ανακτήσεις με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις, (%R \pm SD_{%R}):

- 5 $\mu\text{g Kg}^{-1}$: 97 ± 17
- 50 $\mu\text{g Kg}^{-1}$: 97 ± 6
- 500 $\mu\text{g Kg}^{-1}$: 104 ± 5

5. Βιβλιογραφία

1. Ardrey, E.R., Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An introduction, John Wiley & Sons, Sussex, 2003.
2. Razzazi-Fazeli E., Rabus, B., Cecon, B., and Böhm, J., J. Chromatogr. A, 2002, **968**, 129-142.
3. Pedersen, S.N., and Lindholst, C., J. Chromatogr. A, 1999, **864**, 17-24.
4. Θωμαΐδης Ν., Σημειώσεις “Εκτίμηση Αβεβαιότητας στις Χημικές Μετρήσεις”, Διαπανεπιστημιακό πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών, Χημική Ανάλυση-Έλεγχος Ποιότητας, 2004.