

# ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΙΣΟΤΟΠΙΚΗΣ ΑΡΑΙΩΣΗΣ ΣΕ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ ΚΑΙ ΧΑΜΗΛΗΣ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Λαμπή Ε.<sup>(1)</sup>, Κακουλίδης Η.<sup>(1)</sup>, Αλεξόπουλος Χ.<sup>(1)</sup>, Γαρδίκης Ι.<sup>(2)</sup>

Γενικό Χημείο του Κράτους

(1) Ε'Χ.Υ. ΑΘΗΝΩΝ, ΕΧΗΜ-ΓΧΚ-ΕΙΜ

(2) Δ/ΝΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΣΟΧΑ 16, 11521 ΑΘΗΝΑ

e-mail: [elampi@chem.uoa.gr](mailto:elampi@chem.uoa.gr), [e.lampi@gcsl.gr](mailto:e.lampi@gcsl.gr)

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται οι αρχές των αναλυτικών τεχνικών που εφαρμόζονται στο Εθνικό Εργαστήριο Χημικής Μετρολογίας (ΕΧΗΜ/ΓΧΚ-ΕΙΜ) με επίκεντρο την ισοτοπική αραιώση. Δεδομένου του σκοπού του ΕΧΗΜ/ΓΧΚ-ΕΙΜ να θεμελιώσει το εθνικό οικοδόμημα που θα στεγάσει την ιχνηλασιμότητα στη χημική ανάλυση και θα υλοποιεί τη συσχέτιση της μετρούμενης ποσότητας της ουσίας «amount of substance» με το mole, η εφαρμογή πρωτεύουσών μεθόδων αναφοράς αποτελεί θεμελιώδη λίθο.

Η εφαρμογή και ανάπτυξη τέτοιων μεθόδων, όπως φασματομετρία μάζας σε συνδυασμό με αέρια και υγρή χρωματογραφία καθώς και στοιχειακή φασματομετρία, σε πεδία όπου απαιτείται υψηλή καθαρότητα, ακρίβεια και διαχείριση παρεμποδίσεων, με χρήση ισοτοπικής αραιώσης δίνει τη δυνατότητα παροχής λύσεων σε μετρήσεις που καλύπτουν όλα τα πεδία των εφαρμογών από τον προσδιορισμό ρυπαντών σε ποικίλα υποστρώματα, τον χαρακτηρισμό υλικών έως τον προσδιορισμό παραμέτρων σε βιολογικά υγρά.

Η φασματομετρία ισοτοπικής αραιώσης (IDMS) αποτελεί μεθοδολογία που εφαρμόζεται στο ΕΧΗΜ/ΓΧΚ-ΕΙΜ, με στόχο την επίτευξη ιχνηλασιμότητας και την απόδοση τιμών στο μετρούμενο με υψηλή ακρίβεια. Η IDMS βασίζεται στην προσθήκη γνωστής ποσότητας, εμπλουτισμένης σε ισότοπο στοιχείου (εμβολιασμά), στο υπό μέτρηση δείγμα. Μετά από εξισορρόπηση των εμβολιασθέντων ισotόπων με τα φυσικώς υπάρχοντα στο δείγμα, χρησιμοποιείται φασματομετρία μάζας για τον προσδιορισμό της διαφοροποιημένης αναλογίας ισotόπων. Η συγκέντρωση προσδιορίζεται απευθείας από τη μετρηθείσα αναλογία. Η IDMS συνδέεται και αντανακλά απευθείας στις ατομικές μάζες και επομένως στο mole. Ορισμένες εφαρμογές IDMS που παρουσιάζονται είναι ο προσδιορισμός μελαμίνης σε γάλα, φθαικών εστέρων σε ποικίλα υποστρώματα κ.λ.π.

*Λέξεις κλειδιά: Χημική Μετρολογία, Ιχνηλασιμότητα, Αβεβαιότητα, Πρωτεύοντα μίγματα Πρωτεύουσες μέθοδο, Ισοτοπική αραιώση*

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ΕΧΗΜ/ΓΧΚ-ΕΙΜ έχοντας σαν στόχους τη διασφάλιση της ιχνηλασιμότητας και εθνικής ακρίβειας σε τομείς που έχουν σχέση με την προώθηση εθνικών δράσεων, εθνικών προϊόντων,

Λαμπή Ε.<sup>(1)</sup>, Κακουλίδης Η.<sup>(1)</sup>, Αλεξόπουλος Χ.<sup>(1)</sup>, Γαρδίκης Ι.<sup>(2)</sup>

Γενικό Χημείο του Κράτους

Χρήση της Ισοτοπικής Αραιώσης σε Μετρήσεις Υψηλής Ακρίβειας και Χαμηλής Αβεβαιότητας, Εφαρμογές

4<sup>ο</sup> Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας

Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου

Αθήνα, 3-4 Φεβρουαρίου 2012

υποδομών και υπηρεσιών και την ανάπτυξη αξιόπιστων υποδομών για την προστασία του καταναλωτή και του περιβάλλοντος, εστιάζει στην ανάπτυξη μεθόδων, υψηλής ακρίβειας σε τομείς όπως η ανάλυση οργανικών πτητικών ουσιών, οργανικών μη πτητικών, αερίων μιγμάτων, στοιχειακή ανάλυση, και προσδιορισμός της ταυτότητας ουσιών.

Σε όλες τις τεχνικές η βασική μεθοδολογία που χρησιμοποιείται είναι η πρωτεύουσα μέθοδος αναφοράς της ισοτοπικής αραίωσης, η οποία μπορεί σε πολλές περιπτώσεις να παρέχει και απευθείας ιχνηλασιμότητα στο Mole.

Η ιδιαιτερότητα βέβαια της αναλυτικής χημείας είναι ότι αυτής καθεαυτής της μέτρησης προηγούνται σημαντικά βήματα επεξεργασίας του δείγματος ώστε να μεταφερθεί ο υπό εξέταση αναλύτης σε κατάσταση δυνατή να μετρηθεί από τον ενόργανο εξοπλισμό. Οι περιπτώσεις αντανάκλασης της χημικής μέτρησης σε φυσική οντότητα προσδιορισμένης σε ένα “artifact” και πλήρους «υπολογισιμότητας» είναι σπάνιες στη χημική ανάλυση. Αντίθετα, η συνήθης διαδικασία αφορά σε εμπειρικό προσδιορισμό της συνάρτησης της μέτρησης μέσω βαθμονόμησης. Οι πρωτεύουσες μέθοδοι και οι χρήσεις της ισοτοπικής αραίωσης δίνουν τη δυνατότητα να περιγραφεί το μετρούμενο με μια σχετικά «απόλυτη» συνάρτηση.

Ως πρωτεύουσες μέθοδοι αναφοράς έχουν γίνει αποδεκτές η φασματομετρία ατομικής απορρόφησης, η φασματομετρία μάζας ισοτοπικής αραίωσης – Isotopic Dilution Mass Spectroscopy (IDMS), η κουλομετρία, η ογκομετρία, σταθμικές μέθοδοι και η φασματομετρία μάζας υψηλής ακρίβειας – High Accuracy Mass Spectroscopy (HAMAS), θερμιδομετρία (DSC) [E. Lampré, 2005].

Χρησιμοποιώντας τις πρωτεύουσες μεθόδους παρασκευάζονται πρωτεύοντα χημικά μίγματα με γνωστή «αληθή τιμή» του αναλύτη και αβεβαιότητα σε μονάδες mole, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπα «διακριβωτές» για τη διακρίβωση αναλυτικών διαδικασιών που βασίζονται σε αναλυτικές μεθόδους χαμηλότερης μετρολογικής ποιότητας και υψηλότερης αβεβαιότητας. Παραδείγματα τέτοιων πρωτευόντων μιγμάτων αποτελούν τα πρωτεύοντα ισοτοπικά μίγματα αερίων, ισοτοπικά υλικά αναφοράς, εμβολιασμένα ισοτοπικά υλικά αναφοράς, των οποίων οι τιμές και αβεβαιότητες εκτιμώνται με φασματομετρία ισοτοπικής αραίωσης και έχουν ιχνηλασιμότητα απευθείας στο mole [P. Bievre, 1996, A. Marchal, 1996, E. Lampré, 1998].

## **2. ΙΣΟΤΟΠΙΚΗ ΑΡΑΙΩΣΗ: ΑΡΧΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΤΕΥΞΗ ΜΙΚΡΗΣ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Η ισοτοπική αραίωση συνδυασμένη με διάφορες φασματομετρικές τεχνικές εφαρμόζεται στο EXHM/ΓΧΚ-ΕΙΜ, με στόχο τη δημιουργία μιας αξιόπιστης αλληλουχίας ιχνηλασιμότητας [I. Taverniers et al, 2004, M. Valcarcel et al, 1999, M. C. Walsh, Trends 1999, W. Richter, 1997, X. R. Pan, 1997, R. Watters, Jr. Et al, 1997, E. Lampré, 2010]. Η φασματομετρία μάζας σε συνδυασμό με ισοτοπική αραίωση (IDMS) βασίζεται στην προσθήκη γνωστής ποσότητας, εμπλουτισμένης σε ισότοπο στοιχείου (εμβολίασμα), στο υπό μέτρηση δείγμα. Μετά από εξισορρόπηση των εμβολιασθέντων ισotόπων με τα φυσικώς υπάρχοντα στο δείγμα, χρησιμοποιείται φασματομετρία μάζας για τον προσδιορισμό της διαφοροποιημένης αναλογίας ισotόπων. Η συγκέντρωση προσδιορίζεται απευθείας από τη μετρηθείσα αναλογία. Η IDMS συνδέεται και αντανάκλα απευθείας στις ατομικές μάζες και επομένως στο mole. Επομένως, ένα πρότυπο ισοτοπικής αραίωσης είναι το «τέλειο» εσωτερικό πρότυπο.

Λαμπή Ε.<sup>(1)</sup>, Κακουλίδης Η.<sup>(1)</sup>, Αλεξόπουλος Χ.<sup>(1)</sup>, Γαρδίκης Ι.<sup>(2)</sup>

Γενικό Χημείο του Κράτους

Χρήση της Ισοτοπικής Αραίωσης σε Μετρήσεις Υψηλής Ακρίβειας και Χαμηλής Αβεβαιότητας, Εφαρμογές

4<sup>ο</sup> Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας

Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου

Αθήνα, 3-4 Φεβρουαρίου 2012

Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής μπορούν να συνοψισθούν στα παρακάτω:

- α. Έχει πλήρως καθορισμένη ακρίβεια και επαναληψιμότητα και η αβεβαιότητα μπορεί να καθορισθεί με σαφήνεια.
- β. Εφόσον επιτευχθεί η ισοτοπική ισορροπία, δεν είναι απαραίτητη η μεγάλη ανάκτηση δεδομένου ότι η μέτρηση βασίζεται στην ισοτοπική αναλογία του αναλύτη και του ισοτόπου του (εμβολίασμα). Για τον ίδιο λόγο και οι χημικοί διαχωρισμοί δεν χρειάζεται να είναι ποσοτικοί.
- γ. Η ακρίβεια της μεθόδου αντανακλά και προσδιορίζεται από την ακρίβεια της μέτρησης της αναλογίας των ισοτόπων.
- δ. Οι μεταβολές του αναλύτη (π.χ. διάσπαση) κατά την προκατεργασία του δείγματος (συνήθως απαιτούμενη στην οργανική ανάλυση), αντισταθμίζονται από τη χρήση του ισοτοπικού αναλόγου του ως εσωτερικού προτύπου.
- ε. Η συμπεριφορά και η απόκριση του αναλύτη στα συστήματα μέτρησης είναι σχεδόν ταυτόσημη με αυτή του ισοτόπου του.
- στ. Η μεθοδολογία είναι λιγότερο χρονοβόρα, οδηγώντας σε μεγαλύτερη ακρίβεια και επαναληψιμότητα συγκρινόμενη με άλλες τεχνικές, όπως αυτή της σταθερής προσθήκης.

Υπάρχει ένας αριθμός κρίσιμων παραμέτρων που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά τη διαδικασία μιας IDMS τεχνικής, όπως η κατάλληλη προκατεργασία του δείγματος, η επιλογή του κατάλληλου ισοτοπικά εμπλουτισμένου προτύπου (στοιχειακή ανάλυση) ή επισημασμένου προτύπου (οργανική ανάλυση), οι διορθώσεις για το Blank, η βαθμονόμηση κ.λ.π.

Για την επιτυχία της τεχνικής απαιτείται επίτευξη ισορροπίας μεταξύ των ισοτόπων στο υπόστρωμα και καλή γνώση της χημείας τους δεδομένου ότι διαφορές στις χημικές (π.χ. διαφορετική  $pK_a$ ) και φυσικές ιδιότητες (π.χ. διαλυτότητα) μπορεί να επηρεάσει την παραγωγή ιόντων, ιδιαίτερα στη φασματομετρική ανάλυση οργανικών ουσιών. Επίσης, οι ισοβαρικές και πολυατομικές επιδράσεις (οργανικό MS), η αλληλεπίδραση του σήματος του φυσικού αναλύτη με τον ισοτοπικό αθώς και η ισοτοπική διάκριση του μετρητικού συστήματος (νεκρός χρόνος ανιχνευτή, προκατάληψη μάζας) μπορούν να αποτελέσουν πηγές αβεβαιότητας.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στον εμπλουτισμό του δείγματος με την ισοτοπικά ιχνηθετημένη ανάλογη ουσία (εμβολίασμα) του αναλύτη, την εξισορρόπηση και τη μέτρηση της ισοτοπικής αναλογίας μαζών φασματομετρικά. Η IDMS συμπληρώνεται με ποικιλία φασματομέτρων μάζας και ποικίλους τρόπους ιονισμού. Η γενική εξίσωση για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα είναι:

$$C_x = \left( \frac{C_s W_{t_s}}{W_{t_x}} \right) \left( \frac{I_{1s} - R_m I_{2s}}{R_m I_{2x} - I_{1x}} \right) \quad (1)$$

Όπου:

$C_x$  = η συγκέντρωση του αγνώστου

$W_{t_s}$  = το βάρος του εμβολιάσματος που αναμιγνύεται με το δείγμα

$W_{t_x}$  = το βάρος του δείγματος

$I_{1s}$  = η ένταση του ισοτόπου  $I_1$  στο εμβολίασμα

$I_{2s}$  = η ένταση του ισοτόπου  $I_2$  στο εμβολίασμα

$I_{1x}$  = η ένταση του ισοτόπου  $I_1$  στο δείγμα

$I_{2x}$  = η ένταση του ισοτόπου  $I_2$  στο δείγμα

$R_m$  = η ατομική αναλογία  $I_1/I_2$  μετά την αραίωση

Λαμπή Ε.<sup>(1)</sup>, Κακουλίδης Η.<sup>(1)</sup>, Αλεξόπουλος Χ.<sup>(1)</sup>, Γαρδίκης Ι.<sup>(2)</sup>

Γενικό Χημείο του Κράτους

Χρήση της Ισοτοπικής Αραίωσης σε Μετρήσεις Υψηλής Ακρίβειας και Χαμηλής Αβεβαιότητας, Εφαρμογές

4<sup>ο</sup> Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας

Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου

Αθήνα, 3-4 Φεβρουαρίου 2012

Η γενική αυτή εξίσωση προκύπτει από την εξίσωση της αναλογίας μαζών:

$$R_m = \frac{C_X W_{t_X} I_{1X} + C_S W_{t_S} I_{1S}}{C_X W_{t_X} I_{2X} + C_S W_{t_S} I_{2S}} \quad (2)$$

Όπως είναι κατανοητό, ένας περιορισμός για την τεχνική είναι η διαθεσιμότητα του κατάλληλου εμβολιάσματος ή ιχνηθέτη, ο χρόνος ημιζωής και το είδος ακτινοβολίας που εκπέμπεται καθώς και η καθαρότητα. Υπάρχουν κατάλληλοι ιχνηθέτες για τα περισσότερα στοιχεία του περιοδικού πίνακα με εξαίρεση τα He, Li, B, N, O και Ne.

## 2.1. Στοιχειακή Ανάλυση: Φασματομετρία Μάζας Ισοτοπικής Αραιώσης Συνδυασμένη με Επαγωγικά Συζευγμένο Πλάσμα (ID – ICP-MS)

Εφαρμόζεται σε αναλύσεις προσδιορισμού στοιχείων βασιζόμενες στην ανίχνευση ατομικών ή ολιγοατομικών μονοστοιχειακών ή ολιγοστοιχειακών ιόντων. Η φασματομετρία μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα αργού συνδυασμένη με ισοτοπική αραιώση έχει αποδειχθεί ως εξαιρετικά ακριβής μέθοδος για τέτοιες αναλύσεις σε ποικίλα υποστρώματα [H. Hasegawa et al, 2006]. Η μερική απώλεια του αναλύτη μετά την εξισορρόπηση του εμβολιάσματος και του δείγματος δεν επηρεάζει την ακρίβεια του προσδιορισμού. Επίσης, ελάχιστες φυσικές και χημικές επιδράσεις επηρεάζουν την ακρίβεια του προσδιορισμού, δεδομένου ότι προκαλούν παρόμοια φαινόμενα στα ισότοπα του ίδιου στοιχείου. Τα τυπικά RSD που επιτυγχάνονται είναι της τάξεως των 0.25% και χαμηλότερα.

Σημεία που πρέπει να προσεχθούν είναι το στάδιο που θα γίνει ο εμπλουτισμός (όσο το δυνατόν στο αρχικό), η προσαρμογή της διάρκειας χώνευσης, για στερεά δείγματα δεδομένου ότι υπάρχει μια περίοδος κατά τη χώνευση όπου ο αναλύτης είναι σε διαφορετική μορφή από το προστεθειμένο εμπλουτισμένο ισότοπο, και η εξασφάλιση ότι ο αναλύτης και το ισότοπο βρίσκονται στην ίδια χημική μορφή.

Για παράδειγμα, για ένα στοιχείο το οποίο βρίσκεται υπό τη μορφή δύο ισotόπων, η μέτρηση κλειδί βρίσκεται στον προσδιορισμό της αναλογίας των αφθονιών (abundances) των δύο ισotόπων. Αυτή η αναλογία αφθονιών, η οποία είναι ισοδύναμη με την αναλογία των ποσοτήτων της ουσίας σε μια δοθείσα ποσότητα ουσίας, μετράται με το φασματοφωτόμετρο στο αυθεντικό δείγμα (1), στο εμβολίασμα (2) και στο μίγμα τους, μετά την ίδια προκατεργασία. Η εξίσωση της μέτρησης δίνεται από τη σχέση:

$$n_a = \frac{(R_s - R_m)(1 + R_a)}{(R_m - R_a)(1 + R_s)} \cdot n_s \quad (3)$$

Όπου,  $n_a$  και  $n_s$  οι ποσότητες της ουσίας του αναλύτη και του εμβολιάσματος, και  $R_a$ ,  $R_s$  και  $R_m$ , οι αναλογίες των ισοτοπικών αφθονιών στο δείγμα, το εμβολίασμα και το μίγμα αυτών αντιστοίχως. Στην περίπτωση ενός πολυϊσοτοπικού στοιχείου η επέκταση σε πολλαπλά ισότοπα από την εξίσωση (3) είναι αναλογική.

Οι βασικές πηγές αβεβαιότητας προέρχονται από:

- Διόρθωση νεκρού χρόνου για τους μετρητές των ιόντων, συνήθως ανιχνευτές ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές.

Λαμπή Ε.<sup>(1)</sup>, Κακουλίδης Η.<sup>(1)</sup>, Αλεξόπουλος Χ.<sup>(1)</sup>, Γαρδίκης Ι.<sup>(2)</sup>

Γενικό Χημείο του Κράτους

Χρήση της Ισοτοπικής Αραιώσης σε Μετρήσεις Υψηλής Ακρίβειας και Χαμηλής Αβεβαιότητας, Εφαρμογές

4<sup>ο</sup> Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας

Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου

Αθήνα, 3-4 Φεβρουαρίου 2012

- Σταθερότητα του ρεύματος του ιόντος.
- Απώλειες των ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστών σε υψηλές ταχύτητες κτύπων. Η αβεβαιότητα αυτή ελαχιστοποιείται θέτοντας όριο στον αριθμό κτύπων ανά δευτερόλεπτο, συνήθως 250 000 με 300 000 κτύποι το δευτερόλεπτο ή λιγότεροι για μετρήσεις μεγάλης ακρίβειας.
- Στατιστικά από την καταμέτρηση των ιόντων.
- Προκατάληψη για τη μάζα των φασματοφωτομέτρων, η οποία σχετίζεται με την αναλογία των ισωτόπων και είναι αντιστρόφως ανάλογη των μετρούμενων μαζών.
- Αλληλεπιδράσεις από την παρουσία άλλων ιόντων στο περιβάλλον του εργαστηρίου.

## 2.2. Μοριακή Ανάλυση: Φασματομετρία Μάζας Ισοτοπικής Αραίωσης Συνδυασμένη με Αέρια και Υγρή Χρωματογραφία (ID – GC –MS, ID – LC – MS)

Η ισοτοπική αραίωση στην αέρια και την υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιείται την τελευταία τριακονταετία σαν μεθοδολογία μεγάλης ακρίβειας για τον προσδιορισμό των οργανικών ουσιών. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη διατάραξη της φυσικής ισορροπίας ισωτόπων μιας ουσίας με την προσθήκη ενός σταθερού ισοτοπικά επισημασμένου αναλόγου του υπό μέτρηση αναλύτη, το οποίο χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο. Ιστορικά, η πρώτη διαδικασία εισήχθη από τους Schoenheimer, Rittenberg και τους συνεργάτες τους στο Columbia University, στις αρχές του 1940, και βασίζεται στην εξίσωση:

$$\frac{x}{y} = \frac{C_0}{C} - 1 \quad (4)$$

Όπου  $x/y$  είναι η αναλογία mole στο δείγμα προς το εσωτερικό πρότυπο και  $C$  και  $C_0$  η εκατοστιαία αναλογία των ατόμων στο μίγμα και στο καθαρό επισημασμένο υλικό, αντίστοιχα.

Έτσι η IDMS αποτέλεσε πρωτεύουσα μέθοδο αναφοράς για τον προσδιορισμό οργανικών ενώσεων [H. Hasegawa et al, 2006, G. Dube et al, 1998]. Πολλές προσεγγίσεις έχουν χρησιμοποιηθεί, με πλέον εξελιγμένη την ακόλουθη, η οποία λαμβάνει υπόψη ότι, στην πράξη, η παρουσία μη επισημασμένης ουσίας στο εσωτερικό πρότυπο και φυσικού ισωτόπου στον υπό εξέταση αναλύτη προκαλεί πηγή αβεβαιότητας λόγω αλληλεπίδρασης μεταξύ της κορυφής που αντιστοιχεί στον αναλύτη P και στο εσωτερικό πρότυπο Q και επομένως πρέπει να ληφθεί υπόψη στην εκτίμηση της ποσότητας του αναλύτη. Για παράδειγμα, στην περίπτωση ύπαρξης δύο ισωτόπων της ουσίας, όπου στο φυσικό δείγμα και στο επισημασμένο υπάρχει σε δύο ισοτοπικές μορφές, τα P και Q μπορούν να συσχετισθούν με τις καθαρές περιοχές μέτρησης,  $p$  και  $q$ , οι οποίες είναι ελεύθερες αλληλεπιδράσεων, ως εξής:

$$P=p+aq \quad (5)$$

$$Q=q+\beta p \quad (6)$$

Όπου το  $a$  αναπαριστά την αναλογία συνεισφοράς του ισωτόπου του εσωτερικού προτύπου στο  $m/z$  για τον αναλύτη και το  $\beta$  αναπαριστά την αναλογία συνεισφοράς του ισωτόπου του αναλύτη στο  $m/z$  για το εσωτερικό πρότυπο. Η λύση των εξισώσεων οδηγεί στην ισοτοπική αναλογία:

Λαμπή Ε.<sup>(1)</sup>, Κακουλίδης Η.<sup>(1)</sup>, Αλεξόπουλος Χ.<sup>(1)</sup>, Γαρδίκης Ι.<sup>(2)</sup>

Γενικό Χημείο του Κράτους

Χρήση της Ισοτοπικής Αραίωσης σε Μετρήσεις Υψηλής Ακρίβειας και Χαμηλής Αβεβαιότητας, Εφαρμογές

4<sup>ο</sup> Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας

Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου

Αθήνα, 3-4 Φεβρουαρίου 2012

$$R = \frac{p}{q} = \frac{P - \alpha Q}{Q - \beta P} \quad (6)$$

Η επιλογή του ισοτοπικά επισημασμένου αναλόγου έχει πολλά πλεονεκτήματα, όπως παρόμοια χημεία κατανομής φάσεων μεταξύ στατικής και φέρουσας φάσης, στη χρωματογραφική στήλη – τα δύο ανάλογα έχουν τον ίδιο σχεδόν χρόνο ανάλυσης, παρόμοια κινητική στο ηλεκτροστατικό πεδίο κ.λ.π.

### 3. Παραδείγματα εφαρμογής ισοτοπικής αραίωσης

Για τους προσδιορισμούς αναλυτών με τεχνικές ισοτοπικής αραίωσης χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω εξοπλισμός του EXHM.

Για πτητικές οργανικές ουσίες, συσκευή αέριας χρωματογραφίας εν σειρά με παγίδα ιόντων και διαδοχικούς φασματογράφους μάζας (GC-MS<sup>n</sup>) για πτητικές οργανικές ουσίες. Η συσκευή του αέριου χρωματογράφου διαθέτει λειτουργία MS/MS καθώς και πολλαπλών ιονισμών (Tandem Mass Spectrometry) MS<sup>n</sup> με n>3. Τα επιτυγχανόμενα επίπεδα ανίχνευσης είναι της τάξεως των 10 pg σε EI με λόγο σήματος προς θόρυβο τουλάχιστον 25:1, 100pg σε CI+ με λόγο σήματος προς θόρυβο τουλάχιστον 10:1 και 1 pg σε CI- με λόγο σήματος προς θόρυβο τουλάχιστον 50:1 σε λειτουργία σάρωσης (SCAN) και όχι SIM.

Για μη πτητικές οργανικές ουσίες, συσκευή υγρής χρωματογραφίας σε σειρά με διαδοχικούς φασματογράφους μάζας διπλού τετραπόλου. Ο υψηλός διαχωρισμός επιτυγχάνεται με αντλία υψηλής απόδοσης για επίτευξη εξαιρετικά χαμηλών ροών με εύρος ροής από 0.001 – 2 ml/min και δυνατότητα βήματος ανά 0.001ml. Ο όγκος υστέρησης (delay volume) της αντλίας δεν υπερβαίνει τα 200 μl. Η υψηλή ακρίβεια των μετρήσεων επιτυγχάνεται με ανιχνευτή φασματογράφο μάζας εξαιρετικής ακρίβειας μάζας περιοχής μαζών m/z 30 έως 1500, σταθερότητας μάζας: ± 0.05 Da σε 24 ώρες και ακρίβειας μέτρησης μάζας τουλάχιστον ± 5 ppm.

Παραδείγματα αποτελούν ο προσδιορισμός ρυπαντών σε τρόφιμα, όπως φθαλικών εστέρων σε αλκοολούχα ποτά και φυτικά έλαια με αέρια χρωματογραφία και μελαμίνης σε γάλα με υγρή χρωματογραφία. Σημαντική παράμετρος, κάθε φορά είναι, η διεργασία που πρέπει να ακολουθηθεί κατά τη φάση προκατεργασίας του δείγματος και το στάδιο στο οποίο θα προστεθεί το ισοτοπικά επισημασμένο πρότυπο. Ειδική περίπτωση αποτελεί όταν χρειάζεται παραγωγοποίηση.

Στην περίπτωση προσδιορισμού φθαλικών εστέρων σε τρόφιμα είναι δυνατή η επίτευξη πολύ χαμηλού σημείου ανίχνευσης και καλής αβεβαιότητας. Προβλήματα που δεν σχετίζονται με την τεχνική είναι η επιβάρυνση του περιβάλλοντος και των υλικών κατεργασίας (π.χ. διαλύτες) από φθαλικούς εστέρες. Επίσης, η επιλογή της ισοτοπικής αραίωσης δίνει τη δυνατότητα για τον αξιόπιστο φθαλικών εστέρων σε πολύπλοκα υποστρώματα με ουσίες που δίνουν παρόμοια θραύσματα μοριακών ιόντων, όπως π.χ. τα λικέρ, τα έλαια κ.λ.π. Με τις καθαρές συνθήκες του EXHM έχει επιτευχθεί ο προσδιορισμός φθαλικών εστέρων σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε σύνθετα υποστρώματα, όπως το λικέρ τεντούρα με όρια ανίχνευσης μικρότερα από 10 ppb και αυτό λόγω της επιβάρυνσης του περιβάλλοντος σε DEHP και λιγότερο σε DBP. Στο σχήμα 1 δίνονται τα χρωματογραφήματα των δι-αιθυλεξυλ- (DEHP) και διβούτυλ (DBP) φθαλικών εστέρων με

Λαμπή Ε.<sup>(1)</sup>, Κακουλίδης Η.<sup>(1)</sup>, Αλεξόπουλος Χ.<sup>(1)</sup>, Γαρδίκης Ι.<sup>(2)</sup>

Γενικό Χημείο του Κράτους

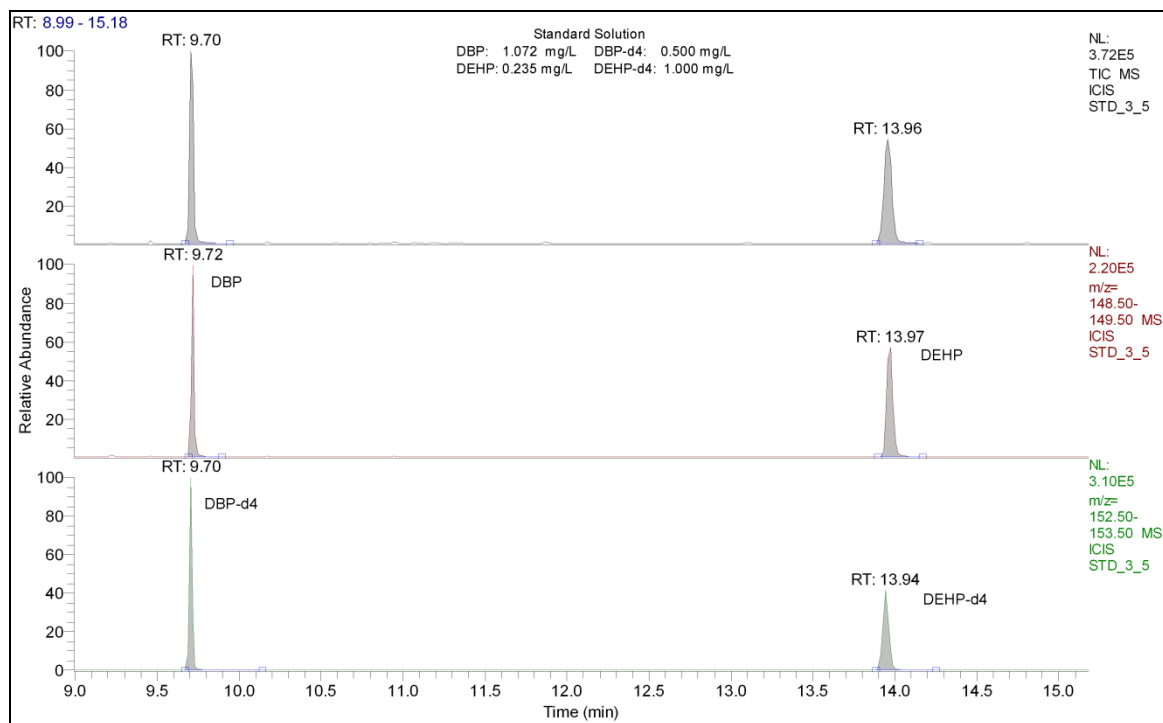
Χρήση της Ισοτοπικής Αραίωσης σε Μετρήσεις Υψηλής Ακρίβειας και Χαμηλής Αβεβαιότητας, Εφαρμογές

4<sup>ο</sup> Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας

Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου

Αθήνα, 3-4 Φεβρουαρίου 2012

επιλεγμένο ιόν  $m/z=149$ , και τα  $d4$  δευτεριωμένα ισοτοπικά παράγωγα με επιλεγμένο ιόν  $m/z=153$ .



Σχήμα 1: Χρωματογραφήματα των δι-αιθυλεξυλ- (DEHP) και διβούτυλ (DBP) φθαλικών εστέρων και των  $d4$  δευτεριωμένων ισοτοπικών παραγώγων τους, με ολική σάρωση ιόντων, με επιλεγμένο το ιόν  $m/z=149$ , και με επιλεγμένο το ιόν  $m/z=153$ , κατά σειρά.

Ο χρόνος ανάσχεσης του επισημασμένου προτύπου επιβεβαιώνει και την έκλυση του αναλύτη δεδομένου ότι στο λικέρ εκλύονται και άλλες ουσίες, κυρίως αρώματα τα οποία δίνουν σημαντικές κορυφές που αντιστοιχούν σε  $m/z=149$ .

Η μελαμίνη (1,3,5-τριαζινο-2,4,6-τριαμίνη,  $C_3H_6N_6$ ), όσον αφορά στην ρύπανση τροφίμων, αποτελούσε χημική παράμετρο που εξετάζόταν για μετανάστευση από υλικά συσκευασίας. Το πρόβλημα προέκυψε όταν διαπιστώθηκε η νοθεία του γάλακτος, με αντίκτυπο στη ζωή βρεφών, σχετικά με την απομόνωση και ανάκτησή της από το γάλα. Στην περίπτωση του προσδιορισμού μελαμίνης σε σκόνη γάλακτος, γίνεται εμβολιασμός με το επισημασμένο  $^{13}C_3$  πρότυπο πριν την οποιαδήποτε κατεργασία για τον έλεγχο της ανάκτησης και μετά την ανασύσταση με το επισημασμένο πρότυπο  $^{13}C_3 \ ^{15}N_3$  για τον προσδιορισμό. Ακολουθεί προσδιορισμός με τεχνική LC-MS/MS. Τα επίπεδα προσδιορισμού με ιδιαίτερη ακρίβεια που επιτυγχάνονται είναι όριο ανίχνευσης μικρότερο του 0.3  $\mu g/Kg$  και διευρυμένη αβεβαιότητα στο επίπεδο των 0.436  $\mu g/kg$  ίση με 8.67%. Στον τύπο 7 φαίνεται ο τρόπος προσδιορισμού της μελαμίνης στη σκόνη γάλακτος:

$$C_{MEL} = \frac{1 - H_S}{m_s} \times \frac{V_{ext}}{V_{cl}} \times V_{rec} \times \frac{C_{RS, sp}}{C_{RS, cal}} \times \frac{A_{MEL}}{A_{IS}} C_{IS} \quad (7)$$

Λαμπή Ε.<sup>(1)</sup>, Κακουλίδης Η.<sup>(1)</sup>, Αλεξόπουλος Χ.<sup>(1)</sup>, Γαρδίκης Ι.<sup>(2)</sup>

Γενικό Χημείο του Κράτους

Χρήση της Ισοτοπικής Αραίωσης σε Μετρήσεις Υψηλής Ακρίβειας και Χαμηλής Αβεβαιότητας, Εφαρμογές

4<sup>ο</sup> Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας

Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου

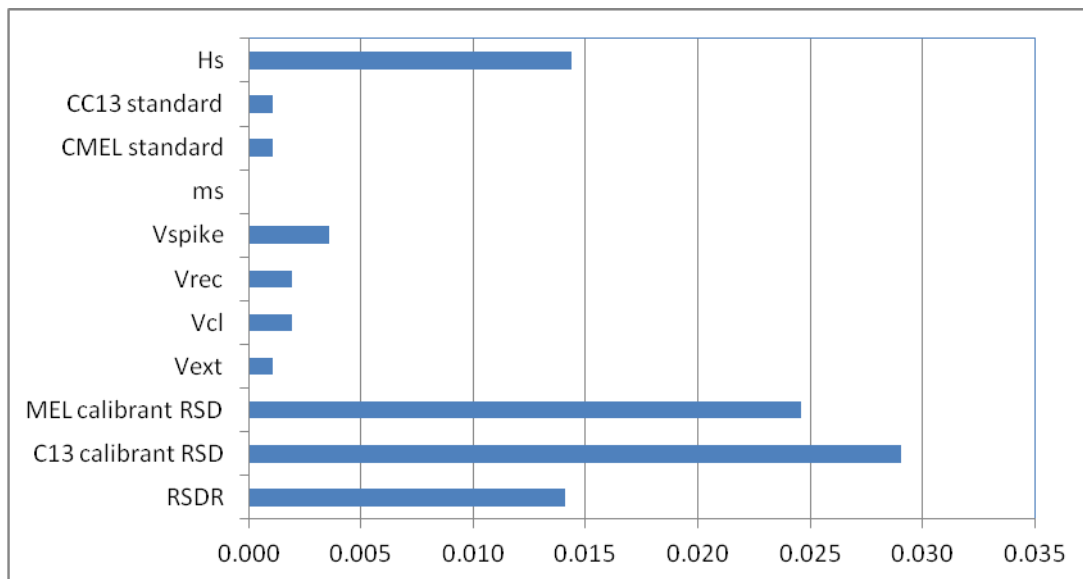
Αθήνα, 3-4 Φεβρουαρίου 2012

$$\text{και: } C_{RS, \text{cal}} = \frac{A_{RS}}{A_{IS}} C_{IS}$$

όπου:

- $C_{MEL}$  : η συγκέντρωση της μελαμίνης στο δείγμα (mg/Kg)
- $H_s$  : Η υγρασία του δείγματος (%)
- $M_s$  : η μάζα του δείγματος, g
- $V_{ext}$  : ο όγκος του διαλύματος εκχύλισης, ml
- $V_{cl}$  : ο όγκος του εκχυλίσματος μετά το clean-up, ml
- $V_{rec}$  : ο όγκος του διαλύματος ανασύστασης, ml
- $C_{RS,sp}$  : η συγκέντρωση του προτύπου ανάκτησης που εμβολιάστηκε (μg/Kg)
- $CRS_{cal}$  : η συγκέντρωση του προτύπου ανάκτησης που υπολογίστηκε (μg/Kg)
- $A_{MEL}$  : το εμβαδόν της κορυφής της μελαμίνης
- $A_{RS}$  : το εμβαδόν της κορυφής του προτύπου ανάκτησης
- $A_{IS}$  : το εμβαδόν της κορυφής της προτύπου προσδιορισμού
- $C_{IS}$  : η συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου προσδιορισμού (μg/L)

και στο σχήμα 2 δίνεται φαίνεται η συνεισφορά των πηγών αβεβαιότητας στο επίπεδο των 0.436 μg/kg.



Σχήμα 2. Συνεισφορά σχετικών τυπικών αβεβαιοτήτων στο επίπεδο των 0.436 μg/kg.

Στο σχήμα 3 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα της μελαμίνης σε θετικό ιονισμό  $MH^+$  από σκόνη γάλακτος σε επιλεγμένο ιόν  $m/z=127$  του προτύπου ανάκτησης  $^{13}C_3$  σε επιλεγμένο ιόν  $m/z=1360$  και του προτύπου προσδιορισμού  $^{13}C_3^{15}N_3$  σε επιλεγμένο ιόν  $m/z=133$ .

Λαμπή Ε.<sup>(1)</sup>, Κακουλίδης Η.<sup>(1)</sup>, Αλεξόπουλος Χ.<sup>(1)</sup>, Γαρδίκης Ι.<sup>(2)</sup>

Γενικό Χημείο του Κράτους

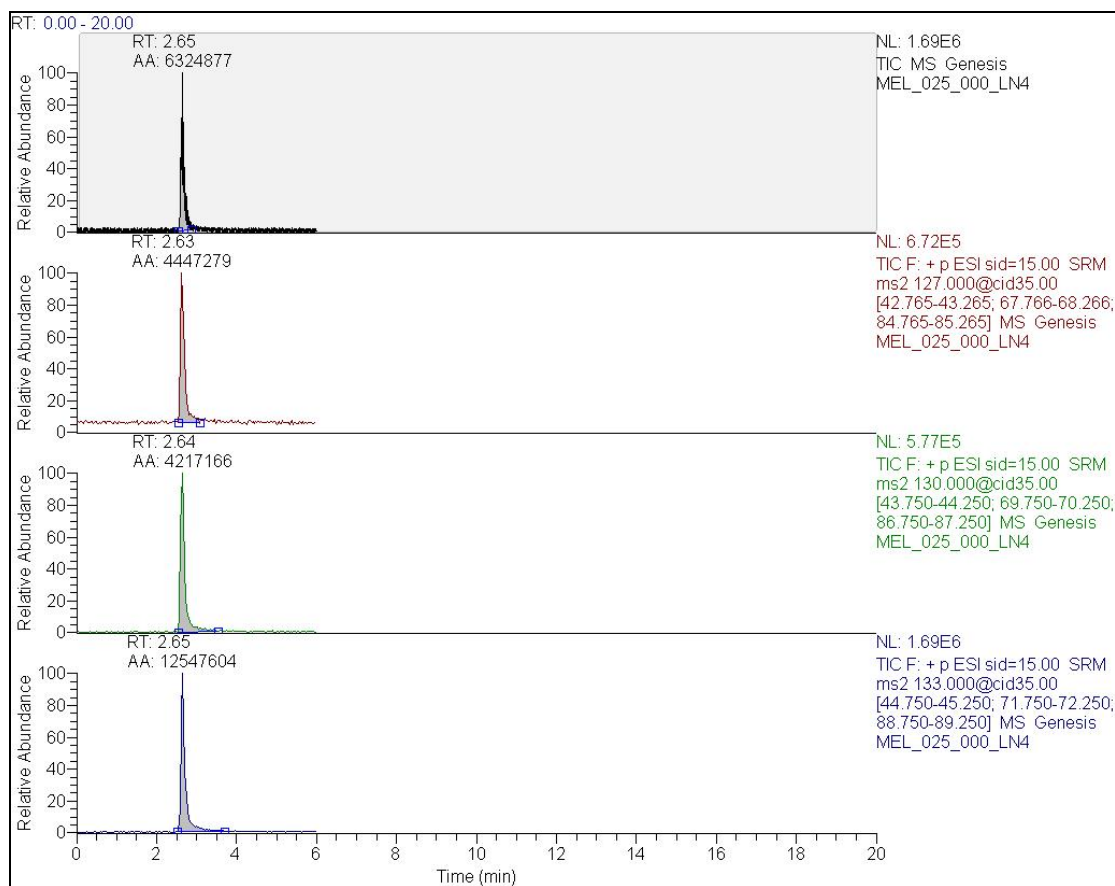
Χρήση της Ισοτοπικής Αραίωσης σε Μετρήσεις Υψηλής Ακρίβειας και Χαμηλής Αβεβαιότητας, Εφαρμογές

4<sup>ο</sup> Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας

Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου

Αθήνα, 3-4 Φεβρουαρίου 2012





Σχήμα 3: Χρωματογραφήματα της μελαμίνης και των επισημασμένων παραγώγων της, προτύπου ανάκτησης  $^{13}\text{C}_3$  και του προτύπου προσδιορισμού  $^{13}\text{C}_3\ ^{15}\text{N}_3$  με ολική σάρωση ιόντων, με επιλεγμένο το ιόν  $m/z=127$ , και με επιλεγμένο το ιόν  $m/z=130$  και με επιλεγμένο ιόν  $m/z=133$ , κατά σειρά.

#### 4. ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Η χρήση της ισοτοπικής αραίωσης σε συνδυασμό με φασματομετρικές τεχνικές χρωματογραφίας και στοιχειακής ανάλυσης έχει πλεονεκτήματα όχι μόνο την επίτευξη μεθόδων υψηλής ακρίβειας αλλά και αξιόπιστων αποτελεσμάτων σε περιπτώσεις που οι άλλες τεχνικές της αναλυτικής χημείας αδυνατούν να δώσουν αξιόπιστα αποτελέσματα. Η εφαρμογή της βρίσκει ευρύτατη χρήση σε προσδιορισμούς ρυπαντών τροφίμων ή περιβαλλοντικών ρυπαντών. Επιπλέον δίνει τη δυνατότητα για στο ΕΧΗΜ/ΓΧΚ-ΕΙΜ να αναπτύξει την εθνική υποδομή ιχνηλασιμότητας στη χημική ανάλυση. Η επιλογή των μεθοδολογιών βασίζεται στην ικανοποίηση των για υψηλή ευαισθησία, χαμηλότατα επίπεδα μέτρησης με ταυτόχρονη υψηλή ακρίβεια και χαμηλές αβεβαιότητες, όπως προδιαγράφονται στις απαιτήσεις που τίθενται από τα ευρωπαϊκά και διεθνή όργανα και φορείς για τη χημική μετρολογία. Κριτήριο επίσης αποτελεί αν αυτή η μεθοδολογία αντανακλά σε πρωτεύουσα μέθοδο αναφοράς.

#### 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Δαμπή Ε.<sup>(1)</sup>, Κακουλίδης Η.<sup>(1)</sup>, Αλεξόπουλος Χ.<sup>(1)</sup>, Γαρδίκης Ι.<sup>(2)</sup>

Γενικό Χημείο του Κράτους

Χρήση της Ισοτοπικής Αραίωσης σε Μετρήσεις Υψηλής Ακρίβειας και Χαμηλής Αβεβαιότητας, Εφαρμογές

4<sup>ο</sup> Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας

Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου

Αθήνα, 3-4 Φεβρουαρίου 2012

1. Ε. Λαμπή, «Αβεβαιότητα στις Χημικές Μετρήσεις», Χημικά Χρονικά, Γενική Έκδοση 10-11/1998, σελ. 309-315.
2. Ε. Λαμπή, «Εθνικό Εργαστήριο Χημικής Μετρολογίας, Δράσεις Κλειδιά», 3<sup>ο</sup> Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας, 5-6 Φεβρουαρίου 2010, Κύπρος.
3. P. Bievre, “Traceability of amount of substance measurements: from ignoring to realizing”, Workshop on traceability of measurements equipment and standards in testing and calibration laboratories, Paris, 1996.
4. Juris Meija, Zoltán Mester, *Analytica Chimica Acta* 607, 115–125, 2008.
5. E. Lampi “Traceability and Uncertainty in Chemical Analysis” 1<sup>st</sup> Hellenic Symposium on Metrology, Minutes p. 246-261, 11-12 Nov. 2005, Athens.
6. Alain Marchal, “Traceability and Calibration in Analytical Chemistry and Materials Testing”, Workshop on traceability of measurements equipment and standards in testing and calibration laboratories, Paris, 1996.
7. X. R. Pan, *Metrologia*, 34, 35-39, 1997.
8. W. Richter, *Accreditation Quality Assurance*, 2, 354-369, 1997.
9. I. Taverniers, E. Van Bockstaele, M. De Loose, *Trends in Analytical Chemistry*, 23, No 7, 2004.
10. M. Valcarcel, A Rios, *Trends in Analytical Chemistry*, 18, Nos 9+10, 1999.
11. M. C. Walsh, *Trends in Analytical Chemistry*, 18, Nos 9+10, 1999.
12. R. Watters, Jr., K Eberhardt, E. Beary, and J. Fassett, *Metrologia*, 34, 87-96, 1997.
13. H. Hasegawa, Y. Shinohara, T. Hashimoto, R. Matsuda and Y. Hayashi, *J. of Chromatography A*, 1136, Issue 2, 226-230, 2006
14. G. Dube, A. Henrion, R. Ohlendorf and W. Richter, *Rapid communications in mass spectrometry*, 12, 28-32, 1998.

Λαμπή Ε.<sup>(1)</sup>, Κακουλίδης Η.<sup>(1)</sup>, Αλεξόπουλος Χ.<sup>(1)</sup>, Γαρδίκης Ι.<sup>(2)</sup>

Γενικό Χημείο του Κράτους

Χρήση της Ισοτοπικής Αραίωσης σε Μετρήσεις Υψηλής Ακρίβειας και Χαμηλής Αβεβαιότητας, Εφαρμογές

4<sup>ο</sup> Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας

Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου

Αθήνα, 3-4 Φεβρουαρίου 2012