Ανάπτυξη μεθόδων υγρής χρωματογραφίας πολλαπλών αναλυτών (multi-analyte) με δύο ανιχνευτές (DAD, FLD), για έλεγχο συμμόρφωσης υλικών σε επαφή με τρόφιμα και πόσιμο νερό

Τ. Τογκαλίδου και Δ. Δανιήλ
Αν. Τσόχα 16, Αθήνα, Γενικό Χημείο του Κράτους, Β΄ Χ.Υ. Αθηνών, Εργαστήριο Υλικών σε Επαφή με Τρόφιμα
e-mail: t.togkalidou@gcsl.gr

Περίληψη

Ο Ευρωπαϊκός Κανονισμός (ΕΕ) αριθ.10/2011 για τον έλεγχο καταλληλότητας των πλαστικών υλικών και αντικειμένων που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα, περιλαμβάνει κατάλογο επιτρεπόμενων ουσιών, για τις οποίες ορίζονται περιορισμοί στη χρήση τόσο στην περιεκτικότητά τους στο υλικό ή/και στη μετανάστευση τους στα τρόφιμα. Ο κατάλογος αριθμεί περί τις 1000 ουσίες. Επιπλέον απαιτείται δυνατότητα προσδιορισμού εκατοντάδων ουσιών που προέρχονται από εκτυπωτικά μελάνια και συγκολλητικές ουσίες. Προκειμένου να επιτευχθεί η έκδοση ποιοτικών αποτελεσμάτων, επιζητούνται μέθοδοι πολλαπλών αναλυτών (multi-analyte) με υψηλή ικανότητα διαχωρισμού και ορίων ανίχνευσης, και ένταξη των προσδιορισμών σε ευέλικτο πεδίο διαπίστευσης προκειμένου να υπάρχει δυνατότητα δυναμικής ενσωμάτωσης νέων ουσιών.

Αναπτύσσονται με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης και δύο ανιχνευτές (συστοιχίας φωτοδιόδων, και φθορισμομετρικού), βαθμωτές μέθοδοι έκλουσης που καλύπτουν τον προσδιορισμό ουσιών σε μεγάλο εύρος μοριακών βαρών, και πολικότητας. Καταγράφεται το φάσμα των προτύπων ουσιών με τον ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων και αναπτύσσεται οικεία βιβλιοθήκη φασμάτων με δυνατότητα σύγκρισης και ταυτοποίησης φασμάτων άγνωστων ουσιών. Βελτιστοποιούνται για κάθε ουσία που μπορεί να φθορίζει οι παράμετροι διέγερσης και εκπομπής του φθορισμομετρικού ανιχνευτή προκειμένου να επιτυγχάνονται βέλτιστα όρια ανίχνευσης με χρήση της δυνατότητας λήψης τριδιάστατου φάσματος φθορισμού.

Στις προσδιοριζόμενες ουσίες περιλαμβάνονται πλαστικοποιητές (μεταξύ των οποίων οι φθαλικοί εστέρες), φαινολικές ουσίες των εποξειδικών επιχρισμάτων, αρχικά μονομερή πολυμερών υλικών (δισφαινόλη-α, δισφαινόλη-f, ακετοφαινόνη), αντιοξειδωτικά, φωτοεκκινητές εκτυπωτικών μελανιών. Οι προσδιορισμοί γίνονται σε προσομοιωτές τροφίμων. Χρησιμοποιείται και τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE), για τον εμπλουτισμό των αναλυτών (για προσδιορισμούς σε πόσιμο νερό) προκειμένου να επιτευχθούν χαμηλότερα όρια ανίχνευσης.

Λέξεις-Κλειδιά: HPLC-DAD, HPLC-FLD, δισφαινόλη-α, φωτοεκκινητές, φαινολικές ενώσεις, φθαλικοί εστέρες.

Abstract

Commission Regulation (EU) No. 10/2011 for the compliance evaluation of plastic materials and articles intended to come into contact with food, has incorporated a list of authorized substances. Restrictions on the authorized substances are imposed either to the residual content of the substance and/or to the specific migration of the substances to food and food simulants. The list of authorized substances to be controlled contains about 1000 substances. In addition the capability of analyzing hundreds of substances that are utilized in printing inks and adhesives is also necessary.

In order to achieve reporting of quality analytic results for this broad range of substances, multi-analyte methods are developed with high selectivity and low detection limits, and with the intention to be incorporated in a flexible scope accreditation scheme.

In the present study, methods are developed utilizing the technique of reverse phase high pressure liquid chromatography, with two detectors (diode array, and fluorescence), and gradient elution. The methods cover a broad range of substances with regards to molecular weights and polarity. The ultraviolet absorption spectra of the reference substances are recorded and in house spectral library is developed, with the ability of comparing and identifying unknown substances spectra.

For the substances that exhibit fluorescence, the excitation and emission wavelength are selected in order to achieve optimum limits of detections and selectivity by acquiring the three dimensional fluorescence spectra.

The substances that are analyzed include plasticizers (mainly phthalates), phenol substances of epoxy coatings, starting monomers of polymeric substances (bisphenol-a, bisphenol-f, acetophenone, phenol), antioxidants, photoinitiators of printing inks. The analysis is performed to food simulants. Solid phase extraction technique is also utilized for the enrichment of the analytes for compliance evaluation on materials in contact with drinking water in order to achieve lower detection limits

Keywords:HPLC-DAD, HPLC-FLD, bisphenol-a, photoinitiators, phenolic substances, phthalates.

1. Εισαγωγή – Νομοθετικό Πλαίσιο- Διαπίστευση

Οι έλεγχοι για την αξιολόγηση της συμμόρφωσης των υλικών σε επαφή με τρόφιμα, ορίζονται από το υφιστάμενο νομοθετικό πλαίσιο (Κοινοτική Νομοθεσία, και τις Εθνικές διατάξεις). Λαμβάνονται ωστόσο υπό όψιν συστάσεις Διεθνών Οργανισμών (όπως του Συμβουλίου της Ευρώπης), Εθνικές νομοθεσίες άλλων Κρατών Μελών, συστάσεις συνδέσμων βιομηχανιών για ορθές βιομηχανικές πρακτικές. Οι περιορισμοί κατά την αξιολόγηση των υλικών σε επαφή με τρόφιμα επιβάλλονται ως όρια στην ειδική μετανάστευση συγκεκριμένων ουσιών σε τρόφιμα ή προσομοιωτές τροφίμων, ή/και στην περιεκτικότητα συγκεκριμένης ουσίας του τελικού υλικού. Οι κατάλογοι των επιτρεπόμενων ουσιών αριθμούν εκατοντάδες χημικές ουσίες. Οι ουσίες εν δυνάμει αναμένεται να ανιχνεύονται σε κάθε εξεταζόμενο υλικό.

Ειδικά, ο Ευρωπαϊκός Κανονισμός (ΕΕ) αριθ.10/2011 για τον έλεγχο καταλληλότητας των πλαστικών υλικών περιλαμβάνει κατάλογο επιτρεπόμενων ουσιών ο οποίος αριθμεί περί τις 1000 ουσίες. Στη νομοθεσία Ευρωπαϊκών κρατών (Swiss Federal Department of Home Affairs (FDHA), SR 817.023.21, Section 8b, 2005) επιβάλλονται περιορισμοί σε ουσίες των εκτυπωτικών μελανιών. Το Συμβούλιο της Ευρώπης έχει υιοθετήσει ψήφισμα για τους ελέγχους στο Χαρτί και Χαρτόνι που επίσης περιλαμβάνει περιορισμούς σε φθαλικούς εστέρες, φωτοεκκινητές, λευκαντικούς παράγοντες (Council of Europe Resolution, 2009). Προκύπτει λοιπόν στην περίπτωση των ελέγχων που διενεργούνται από διαπιστευμένα εργαστήρια, η αναγκαιότητα ανάπτυξης και εφαρμογής μεθόδων πολλαπλών αναλυτών (multi-analyte) με υψηλή ικανότητα διαχωρισμού. Επίσης, η υιοθέτηση σχήματος ευέλικτου πεδίου διαπίστευσης προκειμένου να υπάρχει δυνατότητα δυναμικής ενσωμάτωσης νέων ουσιών στους ελέγχους.

2. Μεθοδολογία

Αναπτύσσονται με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης και δύο ανιχνευτές (συστοιχίας διόδων, και φθορισμομετρικό), βαθμωτές μέθοδοι έκλουσης που καλύπτουν τον προσδιορισμό ουσιών σε μεγάλο εύρος μοριακών βαρών, και πολικότητας. Οι μέθοδοι με την τεχνική υγρής χρωματογραφίας είναι εξαιρετικά χρήσιμες καθότι είναι εφικτοί οι προσδιορισμοί των ουσιών ενδιαφέροντος σε υδατικά διαλύματα χωρίς να απαιτείται επιπλέον στάδιο εκχύλισης. Οι προσομοιωτές των υδατικών, γαλακτοκομικών, και όξινων τροφίμων είναι υδατικά διαλύματα με αιθανόλη, ή 3% οξικό οξύ και οι περιορισμοί που επιβάλλονται είναι στα όρια ειδικών μεταναστεύσεων στους προσομοιωτές αυτούς.

Επιλέγονται προγράμματα βαθμωτής έκλουσης μεγάλης διάρκειας προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητική διαχωριστική ικανότητα και εκλεκτικότητα για μεγάλο εύρος πολικοτήτων και μεγέθους των ουσιών ενδιαφέροντος. Σύντομα προγράμματα ισοκρατικής έκλουσης είναι κατάλληλα μόνο στις περιπτώσεις που αναμένεται το προς ανάλυση διάλυμα να περιέχει μικρό αριθμό ουσιών ενδιαφέροντος.

2.1 Χρωματογραφικό Σύστημα και Συνθήκες

Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης που χρησιμοποιείται είναι της εταιρίας Shimadzu με θερμοστατούμενη στήλη, αντλία υγρής χρωματογραφίας, κατάλληλη για βαθμωτή έκλουση, τύπου LC- 20AD, συνοδευόμενη από βαλβίδα ανάμιξης τεσσάρων διαλυτών, με αυτόματο δειγματολήπτη SIL-20A, και δύο ανιχνευτές Φθορισμομετρικό, RF-10AXL, και ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων SPD-M20A Prominence. Η χρωματογραφική στήλη είναι LiChroCart 250-4.6 (250mm-4.6mm i.d, Purospher STAR, RP-18εμέγεθος σωματιδίων 5μm με προστήλη 4 mm x 4 mm i.d.,Merck). Όλες οι πρότυπες ουσίες είναι υψηλής καθαρότητας >97%.

Επίσης χρησιμοποιείται ο φθορισμομετρικός ανιχνευτής (μέρος της διάταξης υγρής χρωματογραφίας) της εταιρίας Agilent 1100 Series Fluorescence Detector.

Έχουν σχεδιασθεί δυο προγράμματα χρωματογραφικής ανάλυσης. Το πρώτο πρόγραμμα προορίζεται για φαινολικές ουσίες των εποξειδικών επιχρισμάτων, αρχικά μονομερή πολυμερών υλικών (δισφαινόλη-α, δισφαινόλη-f, ακετοφαινόνη, φαινόλη). Το δεύτερο πρόγραμμα προορίζεται κυρίως για πλαστικοποιητές, αντιοξειδωτικά, φωτοεκκινητές.

2.2 Χρωματογραφικές συνθήκες ανάλυσης για φαινολικού τύπου ενώσεις (ουσιών των εποξειδικών επιχρισμάτων)

Το πρόγραμμα που προτείνεται στην παρούσα μελέτη αποτελεί τροποποίηση προτεινόμενων προγραμμάτων στις ερευνητικές εργασίες των Petersen et. al. 2003, Sunet al.2006, Poustka et al. 2007.

Οι χρωματογραφικές συνθήκες ακολουθούν πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης (gradient) με ακετονιτρίλιο και νερό [A– Ακετονιτριλίου, B– H_2O: 0-1min: 40% A, 1-7min: 40-50% A, 7-12min: 50-95% A, 12-14min: 95-40% A, 14-17min: 40% A], ροή κινητής φάσης: 1.2 ml/min, συνολικός όγκος έγχυσης δείγματος: 25 μl, ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων PDA με λάμπες δευτερίου και βολφραμίου και σάρωση μεταξύ 190nm και 800nm, φθορισμομετρικός ανιχνευτής FLD: μήκος κύματος διέγερσης:228 nm, μήκος κύματος εκπομπής: 315 nm

Με το παραπάνω πρόγραμμα καταγράφονται οι χρόνοι έκλουσης (για τον φθορισμομετρικό ανιχνευτή) στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1 Στοιχεία αναλυόμενων ουσιών και χρωματογραφικών τους χαρακτηριστικών (RT-χρόνοι έκλουσης) για τον φθορισμομετρικό ανιχνευτή

α/α	Όνομα ουσίας (αγγλικά)	Όνομα ουσίας	MB	CAS#	RT
1	Bisphenol-F bis (2,3dihydroxypropyl) ether (BFDGE.2H_2O)	Δις(2,3-δι-υδροξυπροπυλ) αιθέρας της δισφαινόλης-f	348,4	72406-26-9	3,1
					3,6
					4,2
2	Benzyl alcohol	Βενζυλική αλκοόλη	108,15	100-51-6	4,2
3	Bisphenol-A bis (2,3dihydroxypropyl) ether (BADGE.2H_2O)	Δις (2,3-δι-υδροξυπροπυλ) αιθέρας της δισφαινόλης-α	374,65	5581-32-8	4,1
4	Phenol	Φαινόλη	94,11	108-95-2	4,9
5	Bis(4-hydroxyphenyl)methane (bisphenol-f)	Δις(υδροξυφαινυλο) μεθανίου	200,23	620-92-8	6,3
6	Acetophenone	Ακετοφαινόνη	120,15	98-68-2	8,3
7	2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (bisphenol-a)	2,2-δις(4-υδροξυφαινυλο) προπάνιο (Δισφαινόλη-α)	228,3	80-05-7	9,4
8	Bisphenol-A (3-chloro-2-hydroxypropyl) (2,3 dihydroxypropyl) ether (BADGE.H_2O.HCl)	(3-χλωρο-2-υδροξυπροπυλ) αιθέρας,(2,3-δι-υδροξυπροπυλ) αιθέρας της δισφαινόλης-α	394,9	227947-06-0	10,6
9	Bisphenol-A (2,3dihydroxypropyl) glycidyl ether (BADGE.H_2O)	(2,3-δι-υδροξυπροπυλ)αιθέρας,(2,3-εποξυπροπυλ)αιθέρας, της δισφαινόλης-α	358,43	76002-91-0	10,9
10	Bisphenol-F bis (3-chloro-2-hydroxypropyl) ether(BFDGE.HCl)	Δις(3-χλωρο-2-υδροξυπροπυλ) αιθέρας της δισφαινόλης-f	385,29		13,8
					14,1
					14,4

α/α	Όνομα ουσίας (αγγλικά)	Όνομα ουσίας	MB	CAS#	RT
11	thymol	θυμόλη	150,22	89-83-8	14,1
12	Bisphenol-F diglycidyl ether (BFDGE)	Δις(2,3-εποξυπροπυλ) αιθέρας του Δις(υδροξυφαινυλο) μεθανίου	312,37	2095-03-6	14,4 14,6 14,9
13	Bisphenol-A bis (3-chloro-2-hydroxypropyl) ether (BADGE.2HCl)	Δις(3-χλωρο-2-υδροξυπροπυλ) αιθέρας της δισφαινόλης-α	411,34	4809-35-2	14,9
14	Bisphenol-A (3-chloro-2-hydroxypropyl) glycidyl ether (BADGE.HCl)	(3-χλωρο-2-υδροξυπροπυλ) αιθέρας,(2,3-εποξυπροπυλ) αιθέρας, της δισφαινόλης-α	376,88	13836-48-1	15,2
15	Bisphenol-A diglycidyl ether (BADGE)	διγλυκιδυλαιθέρας της δισφαινόλης-α	340,42	1675-54-3	15,5
16	Anethole	Ανηθόλη	148,2	4180-23-8	15,9
17	6 tertbutyl-2,4dimethylphenol	6 τερτβούτυλ 2,4διμέθυλφαινόλη	178,27	1879-09-9	16,3

Οι ουσίες με α/α 1, 10, 12 αποτελούνται από μίγματα ισομερών τους όρθο-όρθο, όρθο-πάρα, πάρα-πάρα, ως εκ τούτου δίνονται 3 χρόνοι έκλουσης για κάθε ένα από τα ισομερή.

Οι ουσίες με α/α 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 απαντώνται στην περίπτωση μεταλλικών συσκευασιών (κονσερβών, και καπακιών σε γυάλινα βάζα) καθώς προέρχονται από τα εποξειδικά επιχρίσματα που χρησιμοποιούνται για την προστασία των επιφανειών. Οι ουσίες με α/α 5,7,12,15, αποτελούν αρχικά μονομερή των εν λόγω επιχρισμάτων, ή προϊόντα υδρόλυσής τους (ουσίες 1, 3, 9), ή υδρο χλωρίωσής τους (ουσίες με α/α 8, 10, 13, 14) παρουσία χλωριούχου νατρίου σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον (Schaefer and Simat 2004). Στην ίδια κατηγορία ανήκουν και τα επιχρίσματα δύο συστατικών για δεξαμενές αποθήκευσης τροφίμων ή πόσιμου νερού. Στην περίπτωση αυτή συχνά πρέπει να προσδιορίζεται και η χημική ουσία βενζυλική αλκοόλη αφού αποτελεί βασικό συστατικό του σκληρυντή. Οι περιορισμοί στη μετανάστευση και στη χρήση των ουσιών αυτών στα υλικά σε επαφή με τρόφιμα καθορίζονται στον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1895/2005 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, ενώ στη Γερμανική Οδηγία "*Coating Guideline*" της Γερμανικής Αρχής, UBA, Environmental Protection Agency, ορίζονται οι περιορισμοί στη χρήση για τα υλικά σε επαφή με πόσιμο νερό.

Η φαινόλη στον τομέα των υλικών σε επαφή με τρόφιμα χρησιμοποιείται για την παραγωγή φαινολικών ρητινών, των επιχρισμάτων, των συγκολλητικών ουσιών, και των εκτυπωτικών μελανιών (EFSA, 2013). Η φαινόλη μπορεί επίσης να χρησιμοποιείται σαν παράγοντας τερματισμού αλυσιδωτής αντίδρασης στο μηχανισμό πολυμερισμού ελευθέρων ριζών, στην παραγωγή πλαστικών όπως το πολυβινυλοχλωρίδιο. Υπολείμματα μη αντιδρώσας φαινόλης μπορεί να υπάρχουν στα τελικά προϊόντα και να μεταναστεύουν στα τρόφιμα.

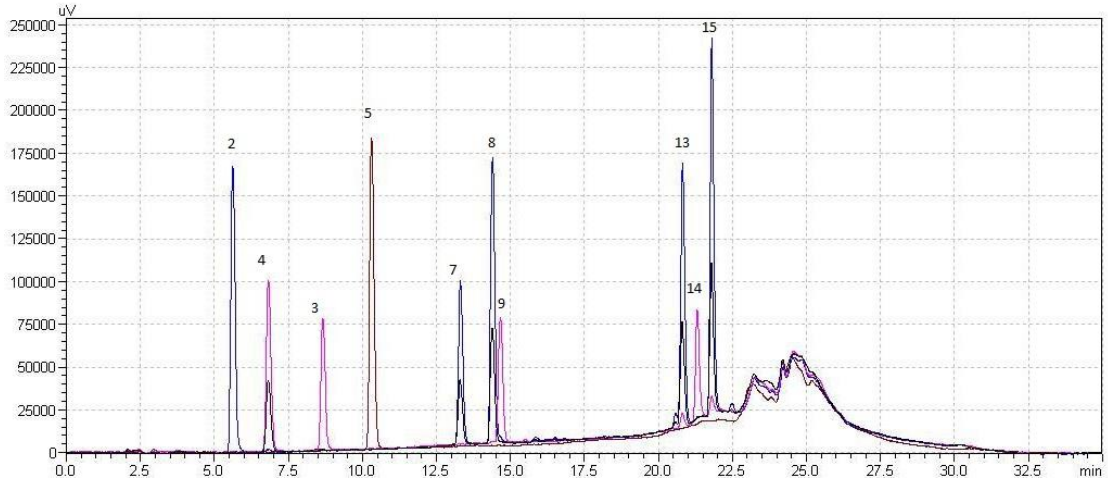
Οι ουσίες με α/α 11, 17 αποτελούν φαινολικές ουσίες που χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά σε τρόφιμα και μπορούν να προσδιορίζονται στην περίπτωση ανάλυσης τροφίμων.

Η ακετοφαινόνη χρησιμοποιείται για την παραγωγή ρητινών, συστατικών επιχρισμάτων και εκτυπωτικών μελανιών. Τροποποιημένες ρητίνες (ακετοφαινόνης) όπου υπάρχουν σταυροειδής συνδέσεις με διισοκυανικά ιόντα χρησιμοποιούνται επίσης σε επιχρίσματα, εκτυπωτικά μελάνια, και συγκολλητικές ουσίες.

Τοόριο ανίχνευσης για το φθορισμομετρικό ανιχνευτή για τις ουσίες με α/α 3, 8, 9, 13 του Πίνακα 1 είναι 2ppb (δηλαδή 0.05ng καθώς ο όγκος έγχυσης είναι 25μl), ενώ το όριο ανίχνευσης για την ουσία με α/α 7 είναι 4 ppb (0.1ng), και για τις ουσίες 14, 15 είναι 8 ppb (0.2ng).

Παρατηρείται συνέκλουση των ουσιών βενζυλικής αλκοόλης και BADGE.2H_2O. Προκειμένου να βελτιωθεί η διακριτική ικανότητα του συστήματος στις περιπτώσεις αναγκαιότητας προσδιορισμού βενζυλικής αλκοόλης (επιχρίσματα δύο συστατικών για δεξαμενές) επιλέγεται εναλλακτικό πρόγραμμα ως ακολούθως: [A– Ακετονιτριλίου, B– H_2O: 0-1min: 30% A, 1-9min: 30-50% A, 9-15min: 50-60% A, 15-20min: 60-95% A, 20-27min: 95-30% A, 27-35min:30%A], ροή κινητής φάσης: 1.2 ml/min, συνολικός όγκος έγχυσης δείγματος: 25 μl, θερμοκρασία στήλης 40°C.

Προκύπτει διαχωρισμός των ουσιών βενζυλικής αλκοόλη και BADGE.2H_2O, και νέο προφίλ χρόνων έκλουσης των προς προσδιορισμό ουσιών. Στο Σχήμα 1απεικονίζονται 3 χρωματογραφήματα μίγματος 10 ουσιών του πίνακα 1 για τον φθορισμομετρικό ανιχνευτή. Η κορυφή με το διακριτικό 2 αντιστοιχεί στην ουσία με α/α 2 του Πίνακα 1, η κορυφή 4 αντιστοιχεί στην ουσία με α/α 4 του Πίνακα 1 κ.ο.κ. Παρατηρείται μετατόπιση, όπως αναμενόταν, σε σχέση με τους χρόνους έκλουσης του Πίνακα 1. Η κορυφή 2 είναι για αναλυόμενη ποσότητα 125ng, η κορυφή 4 είναι για ποσότητα 0,5 και 1 ng, η κορυφή 3,9,14 για ποσότητα 1ng, η κορυφή 5 για ποσότητα 6ng, η κορυφή 5, 8, 13, 15 για ποσότητα 1 και 2.5ng,



Σχήμα 1: Χρωματογραφήματα φθορισμομετρικού ανιχνευτή για 10 ουσίες του Πίνακας 1

2.3 Χρωματογραφικές συνθήκες ανάλυσης για πλαστικοποιητές (φθαλικούς εστέρες), φωτοεκκινητές, αντιοξειδωτικά.

Το πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης που προτείνεται βασίζεται στην ερευνητική εργασία των Leibowitz et al. 1995. Δίνει καλό διαχωρισμό ευρέος φάσματος ουσιών πλαστικοποιητών,

αντιοξειδωτικών, φωτοεκκινητών, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους.

Οι χρωματογραφικές συνθήκες ακολουθούν πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης (gradient) με ακετονιτρίλιο και νερό [A–Ακετονιτριλίου,B– H_2O:0-3min:60%A, 3-5.5min: 60-65%A, 5.5-13min:65-100%A, 13-20min:100%A, 20-25min: 100-60% A, 25-32min: 60% A], ροή κινητής φάσης: 1.0ml/min, συνολικός όγκος έγχυσης δείγματος: 20 μl, ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων PDA με λάμπες δευτερίου και βολφραμίου και σάρωση μεταξύ 190nm και 800nm.

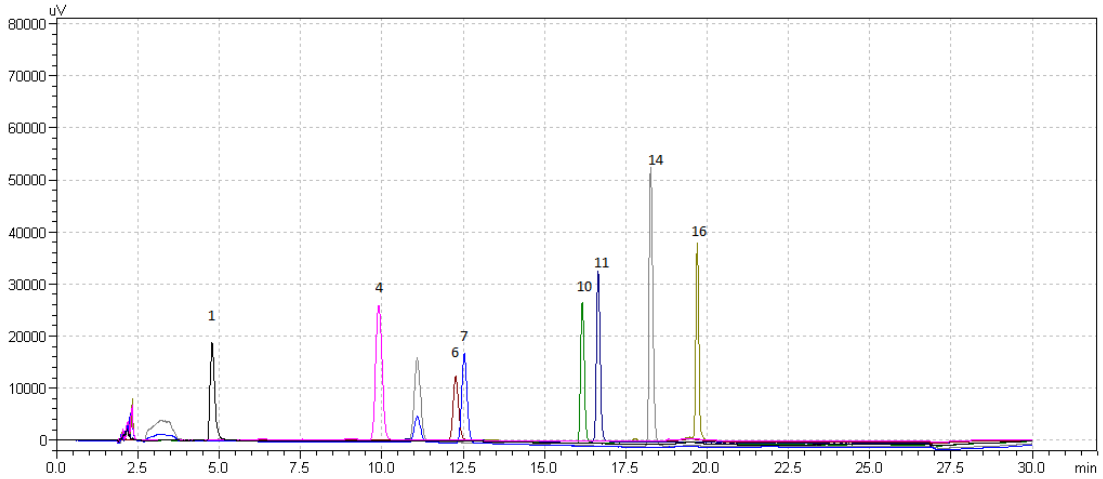
Πίνακας 2 Στοιχεία ουσιών και χρωματογραφικών χαρακτηριστικών (χρόνοι έκλουσης (RT) και τοπικό μέγιστο φάσματος απορρόφησης στο υπεριώδες)

α/α	ΟΝΟΜΑ ΟΥΣΙΑΣ (Αγγλικά)	**ΟΝΟΜΑ ΟΥΣΙΑΣ (Ελληνικά)**	**MB**	**Cas number**	**RT**	**λ (nm)**
1	4-hydroxybenzophenone	4-ύδροξυβενζοφαινόνη	198,22	1137-42-4	4,8	291
2	Dimethylphthalate	Φθαλικός διμεθυλεστέρας	194,18	131-11-3	5,0	280
3	Diethylphthalate	Φθαλικός διαιθυλεστέρας	222,24	84-66-2	7,6	280
4	Ethyl p-dimethyl aminobenzoaete (EDAB)	αιθυλεστέρας του 4-(διμέθυλάμινο) βενζοϊκού οξέος	193,24	10287-53-3	9,9	311
5	Benzophenone	Βενζοφαινόνη	182,22	119-61-9	10,2	252
6	2methyl-4´(methylthio)-2-morpholino propiophenone	2αιθυλ-2μεθυλθείο-μορφολινο propiophenone	279,40	71868-10-5	12,3	305
7	4-methylbenzophenone	4μεθυλβενζοφαινόνη	196,24	134-84-9	12,5	259
8	Benzyl butylphthalate	Φθαλικός βενζυλ βουτυλεστέρας	312,36	85-68-7	15,4	280
9	Dibutylphthalate	Φθαλικός διβουτυλεστέρας	278,34	84-74-2	16,1	280
10	4-Phenyl benzophenone	4φαίνυλ βενζοφαινόνη	258,31	2128-93-0	16,2	289
11	4,4´-bis(diethylamino)-benzophenone	44διαιθυλαμινο βενζοφαινόνη	324,46	90-93-7	16,6	367
12	1,4-diphenyl-1,3-butadiene	1,4-Διφαίνυλο-1,3βουταδιένιο	206,28	886-65-7	17,5	328
13	2,6-di-tert-butyl-p-cresol (BHT)	2,6-δι-τριτ. βουτυλο-π-κρεσόλη	220,35	128-37-0	18,2	280
14	9H-thioxanthen-9-one, 2-(1-methylethyl)-(ITX)	ισοπρόπ-9Η-θειοξανθέν-9-όνη	254,35	5495-84-1	18,3	257

15	2,2´-methylenebis(6-tert-butyl-4-methylphenol)	2,2'-Μεθυλενοδις (4-μεθυλο-6- τριτ. Βουτυλο φαινόλη)	340,50	119-47-1	18,3	280
16	2-ethylhexyl-4-dimethylaminobenzoate (EHDAB)	(2αίθυλέξυλεστερας του 4διμεθυλ άμινο βενζοϊκού οξέος)	277,40	21245-02-3	19,7	307
17	2,2´-methylenebis(6-tert-butyl-4-ethylphenol)	2,2'-Μεθυλενο-δις(4-αιθυλο-6- τριτ. Βουτυλο φαινόλη)	368,55	88-24-4	19,8	280
18	2,6diisopropylnaphthalene	2,6 διισο πρόπυλ ναφθαλένιο	212,33	24157-81-1	20,3	280
19	oxybenzone (chimassorb 90)	2υδρόξυ-4μεθόξυ-βενζοφαινόνη	228,24	131-57-7	21,8	289
20	Diethylhexylphthalate	Φθαλικός δις (2αιθυλεξυλ) εστέρας	390,56	117-81-7	23,7	280
21	Dinoctylphthalate	Φθαλικός δις (ν-οκτυλ) εστέρας.	390,56	117-84-0	24,8	280

Οι ουσίες του Πίνακα 2 με αύξοντα αριθμό (α/α) 1,5,6,7,10,11,14,19 είναι φωτοεκκινητές. Πρόκειται δηλαδή για ουσίες που απορροφούν υπεριώδη ακτινοβολία δημιουργώντας ελεύθερες ρίζες ή κατιόντα ενεργοποιώντας τον μηχανισμό σκλήρυνσης εκτυπωτικών μελανιών. Οι ουσίες με α/α 4, και 16 θεωρούνται συνεργατικές των φωτοεκκινητών ουσίες στον μηχανισμό σκλήρηνσης με υπεριώδη ακτινοβολία. Ειδικότερα οι ουσίες με α/α 1, 5, 7, 11,19 χρησιμοποιούνται και ως σταθεροποιητές στα πολυμερή έναντι της γήρανσης που προκαλεί η έκθεση σε ορατή ή υπεριώδη ακτινοβολία. Οι ουσίες με α/α 2,3,8,9, 20,21 είναι φθαλικοί εστέρες που συνήθως χρησιμοποιούνται ως πλαστικοποιητές ή τεχνικά βοηθήματα. Η ουσία με α/α 12 ανήκει στους φθορίζοντες λευκαντικούς παράγοντες που αποτρέπουν την αποχρωμάτιση ή το κιτρίνισμα των πολυμερών. Οι ουσίες με α/α 13, 15, 17 είναι αντιοξειδωτικές ουσίες που παρέχουν σταθεροποίηση των πολυμερών έναντι πηγών θέρμανσης. Η ουσία με α/α 18 απαντάται ως επιμολυντής σε συσκευασίες από χαρτί και χαρτόνι που προέρχονται από ανακύκλωση.

Στο Σχήμα 2 απεικονίζονται χρωματογραφήματα 8 ουσιών του πίνακα 1 για τον ανιχνευτή υπεριώδους απορρόφησης, όπου η κορυφή με το χαρακτηριστικό 1 αντιστοιχεί στην ουσία με α/α 1 του Πίνακα 2, η κορυφή 4 αντιστοιχεί στην ουσία με α/α 4 του Πίνακα 2 και για απορρόφηση σε μήκος κύματος του τοπικού μεγίστου που δίνεται στον πίνακα. Για όλες τις κορυφές η αναλυόμενη ποσότητα είναι 40ng.

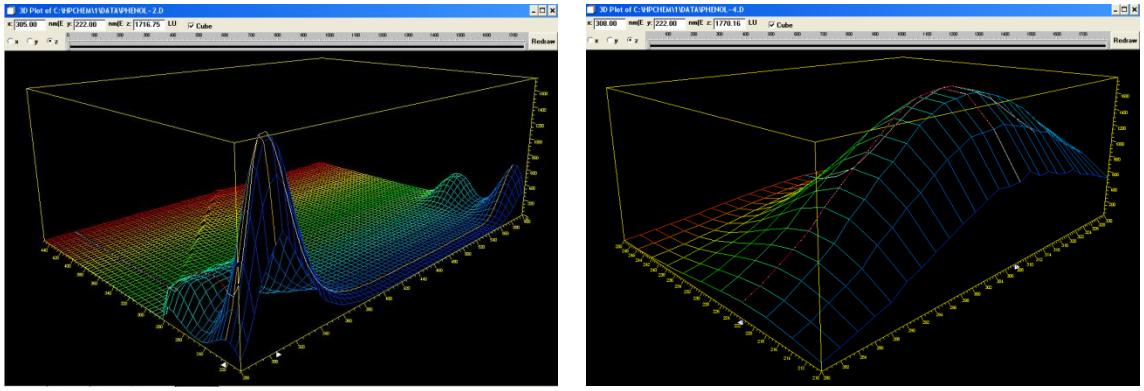


Σχήμα 2: Χρωματογράφημα απορρόφησης στο υπεριώδες για 8 ουσίες του Πίνακα 2

2.4 Βελτιστοποίηση του μήκους κύματος εκπομπής και διέγερσης για τις ενώσεις που μπορεί να φθορίζουν

Με τον φθορισμομετρικό ανιχνευτή της εταιρίας Agilent 1100 series υπάρχει η δυνατότητα σάρωσης φθορισμού που αποδίδει όλες τις φασματικές πληροφορίες σε ένα γράφημα. Συγκεκριμένα η ένταση φθορισμού απεικονίζεται έναντι του φασματικού μήκους κύματος διέγερσης και εκπομπής. Έτσι προκύπτουν τα τοπικά μέγιστα του μεγέθους του φθορισμού με το αντίστοιχο μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής. Εμβολιάζονται στον ανιχνευτή του αναλυτικού οργάνου, χωρίς παρεμβολή της χρωματογραφικής στήλης, διαλύματα των ουσιών ενδιαφέροντος σε ακετονιτρίλιο και λαμβάνεται η ένταση φθορισμού. Επιλέγεται ο συνδυασμός του μήκους κύματος εκπομπής και διέγερσης λαμβάνοντας υπό όψιν τις άλλες ουσίες που μπορεί να αναλυθούν αλλά και το σήμα υποβάθρου στο συνδυασμό αυτό. Έτσι επιτυγχάνονται βέλτιστα όρια ανίχνευσης καθώς και υψηλή εκλεκτικότητα.

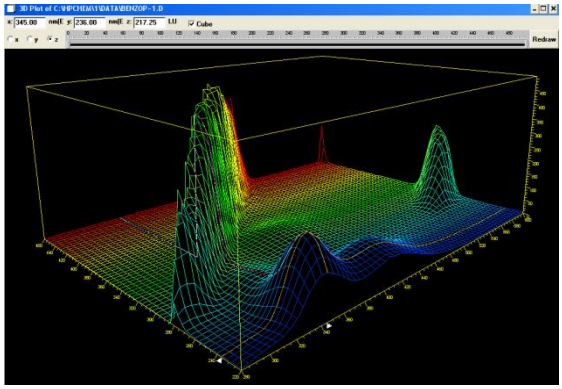
Έτσι λοιπόν αναφέρονται δύο παραδείγματα βελτίωσης της απόκρισης του συστήματος για την φαινόλη κατά το χρωματογραφικό πρόγραμμα των εποξειδικών παραγώγων και για την ισοπρόπ-9Η-θειοξανθέν-9-όνη κατά τον χρωματογραφικό προσδιορισμό φωτοεκκινητών-πλαστικοποιητών-αντιοξειδωτικών.



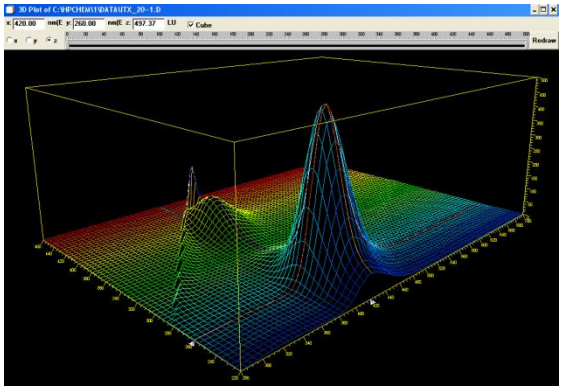
Σχήμα 3:Φάσμα φθορισμού για τη φαινόλη με το φθορισμομετρικό ανιχνευτή Agilent 1100 Series

Στο Σχήμα 3απεικονίζεται το φάσμα φθορισμού και αποτυπώνεται η βελτίωση της έντασης φθορισμού όπου από συνδυασμό μήκος κύματος διέγερσης 218nm και εκπομπής 315nm (που αρχικά χρησιμοποιούνταν και όπου η ένταση του φθορισμού διαλύματος φαινόλης 24ppm σε ακετονιτρίλιο είναι 1597), προκύπτει βελτιωμένος συνδυασμός μήκους κύματος διέγερσης, 222nm, και εκπομπής, 308nm,όπου η ένταση του φθορισμού είναι 1770.15.

Στο Σχήμα 4 απεικονίζονται τα τριδιάστατα φάσματα φθορισμού για τις ουσίες βενζοφαινόνη και ισοπρόπ-9Η-θειοξανθέν-9-όνη στα οποία διακρίνονται τα τοπικά μέγιστα τους. Συγκεκριμένα για τη βενζοφαινόνη τοπικό μέγιστο βρίσκεται για συνδυασμό μήκους κύματος διέγερσης, 236nm, εκπομπής, 335nm, όπου για διάλυμα της ουσίας 20 ppm σε ακετονιτρίλιο, η ισχύς του σήματος είναι 217,25 ενώ για την ισοπρόπ-9Η-θειοξανθέν-9-όνη το τοπικό μέγιστο βρίσκεται σε συνδυασμό μήκους κύματος διέγερσης 260nm, εκπομπής,420nm, για διάλυμα της ουσίας 20 ppm σε ακετονιτρίλιο, η ισχύς του σήματος είναι 497,37.



Βενζοφαινόνη



Ισοπρόπ-9Η-θειοξανθέν-9-όνη

Σχήμα 4:Φάσμα φθορισμού για τη βενζοφαινόνη και ισοπρόπ-9Η-θειοξανθέν-9-όνη με το φθορισμομετρικό ανιχνευτή Agilent 1100 Series

2.5 Βελτίωση των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης με τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης.

Προκειμένου για την αξιολόγηση των υλικών σε επαφή με πόσιμο νερό απαιτούνται πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης για τις ουσίες των εποξειδικών επιχρισμάτων. Τα όρια ειδικής μετανάστευσης για τις ουσίες των επιχρισμάτων, σύμφωνα με τις συστάσεις της Γερμανικής Αρχής, UBA, Environmental Protection Agency, για τον έλεγχο των υλικών σε επαφή με πόσιμο νερό βρίσκονται αρκετά χαμηλότερα από τα όρια για τα υλικά σε επαφή με τρόφιμα. Και ενώ η χρωματογραφική διάταξη έχει πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης που είναι κατάλληλα για τους ελέγχους των υλικών σε επαφή με τρόφιμα το ίδιο δεν ισχύει στην περίπτωση των υλικών σε επαφή με πόσιμο νερό.

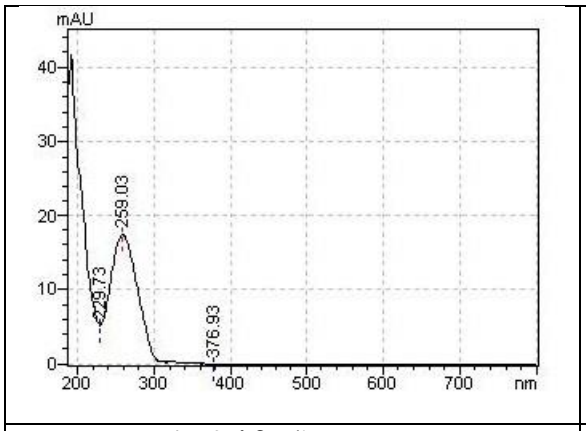
Έτσι λοιπόν χρησιμοποιείται τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (Solid phase extraction) οπότε και πετυχαίνεται συμπύκνωση των ουσιών ενδιαφέροντος και συνεπώς βελτίωση και των ορίων ανίχνευσης της μεθόδου. Στην συγκεκριμένη περίπτωση των εποξυφαινολικών ουσιών των επιχρισμάτων κατάλληλος τύπος φυσιγγίων για εκχύλιση στερεάς φάσης είναι τα φυσίγγια SPE με πληρωτικό υλικό C18 (Isolute C18, 500 mg, 3 mL, τύπου(EC)) τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με 5mL ακετονιτριλίου με ρυθμό 2ml/min. Φορτώνεται στο φυσίγγιο

ποσότητα 100ml του προς προσδιορισμό δείγματος με ρυθμό 6ml/min. Μετά την εκχύλιση, ακολουθεί έκπλυση του φυσιγγίου με 5 mL νερού και έκλουση των ενώσεων με 5 mL ακετονιτριλίου με ρυθμό 2ml/min. Το έκλουσμα ακετονιτριλίου μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 5ml.

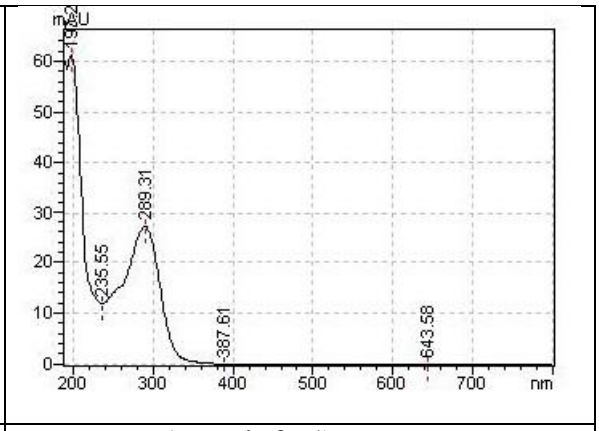
Προκειμένου να βρεθεί η ανάκτηση της συγκεκριμένης διαδικασίας κατεργάζονται με την παραπάνω διαδικασία διαλύματα μίγματος προτύπων ουσιών. Για τις ουσίες δισφαινόλη α, δισφαινόλη –f, BFDGE, BFDGE.H_2O, BADGE, BADGE.2HCl, BADGE η ανάκτηση για πρότυπα διαλύματος μίγματος ουσιών 0,004mg/L είναι μεταξύ 75 και 104%. Άρα επιτυγχάνεται βελτίωση των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Προσπάθεια για φόρτωση 500ml διαλύματος των ουσιών δεν έδωσε ικανοποιητικές ανάκτησης για τη δισφαινόλη-α.

2.6 Δυναμική Βιβλιοθήκη προτύπων ουσιών του συστήματος

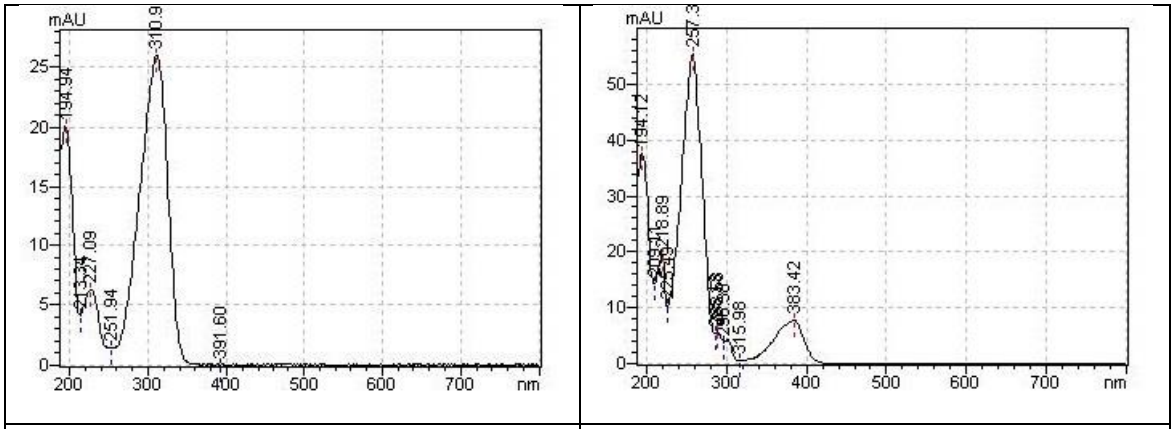
Αναπτύσσεται οικεία βιβλιοθήκη πρότυπων ουσιών στο σύστημα της υγρής χρωματογραφίας, χρησιμοποιώντας το λογισμικό του οργάνου. Στη βιβλιοθήκη αποθηκεύονται τα φάσματα ουσιών που έχουν αναλυθεί κατά τη διαδικασία ανάπτυξης της μεθόδου. Από τα ληφθέντα φάσματα αφαιρείται το φάσμα υποβάθρου και αποθηκεύεται με ένδειξη του χρωματογραφικού προγράμματος ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε. Τα φάσματα άγνωστων ουσιών που ανιχνεύονται κατά την ανάλυση δείγματος συγκρίνονται με τα φάσματα που είναι αποθηκευμένα στη βιβλιοθήκη και προκύπτει ένα αριθμητικό μέτρο της ταύτισης των δύο φασμάτων. Έτσι ο βαθμός ταύτισης του φάσματος της άγνωστης ουσίας με την πρότυπη ουσία που υπάρχει αποθηκευμένη στη βιβλιοθήκη, καθώς και άλλα στοιχεία όπως ο χρόνος έκλουσης της ουσίας, και ο λόγος του σήματος των δύο ανιχνευτών οδηγούν στην ασφαλή ταυτοποίηση της ουσίας. Απαιτούνται πρότυπες ουσίες υψηλής καθαρότητας προκειμένου να δίνουν αντιπροσωπευτικά φάσματα της ουσίας.



4μέθυλβενζοφαινόνη



4φαίνυλοβενζοφαινόνη



αιθυλεστέρας του 4-(διμέθυλάμινο)βενζοϊκού οξέος	ισοπρόπ-9Η-θειοξανθέν--9-όνη

Σχήμα 5: Φάσματα απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας για τέσσερις φωτοεκκινητές σε συγκέντρωση 2mg/L και για όγκο έγχυσης 25μl (ποσότητα 50ng).

3. Συμπεράσματα

Οι μέθοδοι χρωματογραφικής ανάλυσης που αναπτύχθηκαν στην παρούσα εργασία επιδεικνύουν υψηλή εκλεκτικότητα καθώς επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μιγμάτων πολυάριθμων οργανικών ενώσεων με μεγάλο εύρος μοριακών βαρών και πολικοτήτων που απαντώνται στα υλικά σε επαφή με τρόφιμα και πόσιμο νερό. Ο συνδυασμός των δύο ανιχνευτών, κάνει εφικτή την εισαγωγή αυξημένων κριτηρίων για την ασφαλή ταυτοποίηση των ουσιών. Ο φθορισμομετρικός ανιχνευτής μπορεί να βελτιώσει την εκλεκτικότητα του συστήματος. Βελτιώνει επίσης τα όρια ανίχνευσης ειδικά για ενώσεις που φθορίζουν (όπως οι φαινολικού τύπου ενώσεις). Παράλληλα προτείνεται μεθοδολογία για προσδιορισμό άλλων ενώσεων και ένταξη στο πεδίο διαπίστευσης.

4. Βιβλιογραφία:

Ευρωπαϊκή Επιτροπή, "*Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 10/2011 της Επιτροπής της 14ης Ιανουαρίου 2011 για τα πλαστικά υλικά και αντικείμενα που προορίζονται να έρθουν σε επαφή με τρόφιμα*", ΕΕ L 12 της 15.1.2011, σ. 1 έως 89, Βρυξέλλες.

Ευρωπαϊκή Επιτροπή, "*Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1895/2005 της Επιτροπής, της 18ης Νοεμβρίου 2005, για περιορισμό της χρήσης ορισμένων εποξεικών παραγώγων σε υλικά και αντικείμενα που προορίζονται να έλθουν σε επαφή με τρόφιμα",* ΕΕ L 302 της 19.11.2005, σ. 28 έως 32. Β.

Agilent, Agilent 1100 Series Fluorescence Detector, Reference Manual, Edition 05/2004, pp. 42-45, Germany.

Council of Europe Resolution, "*RESAP (2002) 1 on Paper and Board Materials and Articles intended to come into contact with foodstuffs*", Version 4, 12-2-2009.

European Food Safety Authority (EFSA),"*Scientific Opinion on the toxicological evaluation of phenol",* EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF), EFSA Journal 2013;11(4):3189, Parma, Italy.

Leibowitz J.N., Sarmiento R., Dugar S.M., Ethridge M.W., *"Determination of six common phthalate plasticizers in grain neutral spirits and vodka",* Journal of AOAC International, 78(3), pp. 730-735, 1995.

Petersen H., Schaefer A., Buckow C.A., Simat T.J., Steinhart H., *"Determination of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) and its derivatives in food: identification and quantification by internal standard",* European Food Research Technology, 216,pp. 355-364, 2003.

Poustka J., Dunovska L., Hajslova J., Holadova K., Poustkova I., *"Determination and Occurrence of bisphenol a, bisphenol a diglycidyl ether, and bisphenol f diclycidyl ether including their derivatives, in canned foodstuffs from the Czech Retail Market",* Czech Journal of Food Science, Vol. 25, No.4:221-229, 2007.

Sun C., Leong L.P., Barlow P.J., Chan S.H., Boodworth B.C., *"Single laboratory validation of a method for the determination of bisphenol-a, bisphenol a diglycidyl ether and its derivatives in canned food by reversed-phase liquid chromatography",* Journal of Chromatography A, 1129, p.p. 145-148, 2006.

Schaefer A. and Simat T. J., "*Migration from can coatings: Part. 3. Synthesis, identification and quantification of migrating epoxy-based substances below 1000Da",* Food Additives and Contaminants, Vol. 21 No.4, pp. 390-405, April 2004.

Swiss Federal Department of Home Affairs (FDHA), *"Ordinance on Materials and Articles in Contact with Food SR 817.023.21 of 23 November 2005"*,23rd November 2005.

UBA, Environmental Protection Agency, *"Guideline for Sanitary Assessment of Organic Coatings in Contact with Drinking Water (Coating Guideline)",* 10 November 2010, Germany.