



MICHAŁ FABIŚ*

Michał Fabiś, Danuta Barałkiewicz

Metrologia krok-po-kroku

JEDNOCZESNE OZNACZANIE JONÓW CHLORKOWYCH, FLUORKOWYCH, SIARCZANOWYCH(VI), AZOTANOWYCH(V) W WODZIE DO PICIA METODĄ WYSOKO SPRAWNEJ CHROMATOGRAFII JONOWEJ



DANUTA BARAŁKIEWICZ*

*Wydział Chemii, Uniwersytet Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wraz ze wzrostem świadomości osób wydających decyzje na podstawie wyników analiz chemicznych, wzrastają także wymagania co do wiarygodności tych wyników.

Klient, zlecając badania do laboratorium analitycznego, chce mieć pewność, że wyniki czy ekspertyzy, za które przecież płaci często niemałe pieniądze, będą uznawane przez innych. Jeśli podjęta decyzja ma być właściwa, to konieczne jest zaufanie do wyniku analitycznego, czyli do jego jakości, dlatego tak duże znaczenie w chemii analitycznej ma metrologia.

Woda jest substancją niezbędną do życia człowieka, dlatego musi być dostępna w zadowalającej ilości dla wszystkich konsumentów, a producenci wody powinni podjąć wszelkie starania, aby uzyskać możliwie najlepszą jej jakość. Ponieważ woda jest specyficznym produktem spożywczym, właściwości, jakie powinna spełniać, zostały zebrane w odpowiednich dyrektywach i rozporządzeniach. W Polsce obowiązuje „Rozporządzenie ministra zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi”. Zostało w nim ujętych przeszło pięćdziesiąt parametrów fizyczno-chemicznych i mikrobiologicznych wraz z ich najwyższymi dopuszczalnymi stężeniami.

Rozporządzenie ministra zdrowia nie narzuca nam metody analitycznej, jaką należy zastosować przy oznaczeniu danego parametru, jednak mówi, że stosowana metoda musi co najmniej umożliwiać oznaczenie wartości dopuszczalnej z podaną w załączniku nr 9. „Charakterystyki metod badań”, poprawnością, precyzją i granicą wykrywalności, dlatego też sprawdzono, czy metoda chromatograficzna służąca do jednoczesnego oznaczania jonów chlorkowych, fluorkowych, siarczanowych(VI), azotanowych(V) w wodzie przeznaczonych do spożycia spełnia stawiane jej wymagania (tab. 1).

TABELA 1

| Wymagania, jakie powinna spełniać metoda analityczna służąca do oznaczania wybranych jonów w wodzie | | | | |
|---|--|------------------------------------|----------------------------------|---|
| Parametry | Najwyższe dopuszczalne stężenie w mg/L | Poprawność [% wartości parametrów] | Precyzja [% wartości parametrów] | Granica wykrywalności [% wartości parametrów] |
| Azotany | 50 | 10 | 10 | 10 |
| Chlorki | 250 | 10 | 10 | 10 |
| Fluorki | 1,5 | 10 | 10 | 10 |
| Siarczany | 250 | 10 | 10 | 10 |

Do oznaczania wyżej wymienionych anionów został użyty chromatograf jonowy ICS-2000 (Dionex USA) wyposażony w pompę tłokową, detektor konduktometryczny, tłumik jonowy ASRS ULTRA II 4 mm oraz podajnik próbek AS (fot.). Do rozdzielu użyto kolumnę analityczną AS18 (250×4 mm) oraz kolumnę ochronną AG18. W tym modelu została wykorzystana technika Reagent-Free, która zmienia w trybie „on-line” dejonizowaną wodę w wysokiej czystości eluent. Elucję prowadzono w systemie gradientowym, na co pozwala generator eluentu. Parametry pracy systemu zebrano w tabeli 2.

Walidację metody podzielono na kilka etapów, w których określono charakterystyczne dla procedury anali-

Analiza śladowa metali

łatwa do wykonania
z rzeczywistymi wartościami
w ppb na każdej etykietce kwasu



Kwasy BAKER INSTRA-ANALYZED®

Są szczególnie przydatne do spektrometrii atomowo-absorbcyjnej, emisyjnej i płomieniowej. Ocenę wyników analiz ułatwia fakt, że ponad 25 substancji zanieczyszczających znajduje się na poziomie ppb. Daje to gwarancję, że otrzymany sygnał pochodzi z próby, a nie z odczynnika.



S.WITKO
Przedstawiciel Mallinckrodt Baker
92-332 Łódź, Al. Piłsudskiego 143
tel. (042) 676 34 35, fax (042) 676 34 43
www.witko.com.pl

tycznej parametry jakościowe i ilościowe oraz parametry opisujące wynik pomiaru, czyli spójność i niepewność.

A. PARAMETRY JAKOŚCIOWE

Selektywności. Ważnym elementem oceny metody chromatograficznej jest wyznaczenie zdolności rozdzielczej kolumny analitycznej ($R_{1,2}$) dla oznaczanych analitów w obecności sąsiadującego sygnału innego jonu. Parametr ten oblicza się za pomocą następującego wzoru:

$$R_{1,2} = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2} \quad 1$$

gdzie:

t_{R1} – czas retencji pierwszego piku [s],

t_{R2} – czas retencji drugiego piku [s],

W_1 – szerokość pierwszego piku [s],

W_2 – szerokość drugiego piku [s].

Uzyskane rozdzielczości dla oznaczanych anionów zebrano w tabeli 4.



Fot. Chromatograf jonowy ICS-2000 z podajnikiem próbek AS

B. PARAMETRY ILOŚCIOWE

Liniowość i zakres roboczy. Przy ustalaniu zakresu krzywej kalibracyjnej wzięto pod uwagę zakres stężeń analitów spotykany w próbkach rzeczywistych. W eksperymencie wykorzystano roztwory wzorcowe o stężeniach od 0,100 mg/L do 1,00 mg/L dla fluoroków (6 punktów), 1,00 mg/L – 300 mg/L dla chlorków i siarczanów (15 punktów) i 0,100 mg/L – 100 mg/L dla azotanów(V) (15 punktów).

Robocze roztwory kalibracyjne sporządzono z dostępnych handlowo roztworów wzorcowych:

■ wzorec wieloelementowy II, anionowy 1000 mg/L [Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-}], kod lab.: AZ₁;

■ wzorec wieloelementowy I, anionowy 1000 mg/L [F^- , Br^- , PO_4^{3-}], kod lab.: AY,

oraz wody dejonizowanej z systemu produkcji wody czystej Milli Q Gradient A10.

Chromatograf kalibrowano każdorazowo przed serią pomiarową, za każdym razem używając świeżo przygotowanych roztworów kalibracyjnych. Do wyznaczenia ogólnej charakterystyki krzywej kalibracyjnej wybrano 10 serii analitycznych wykonanych w trakcie walidacji, których wyniki uśredniono.

Ocenę liniowości wykonano na podstawie kombinacji dwóch metod. Pierwszą z nich, najprostszą, polegającą na graficznym przedstawieniu danych w postaci

TABELA 2

| Parametry pracy chromatografu jonowego służącego do oznaczania jonów chlorkowych, fluorkowych, siarczanowych(VI), azotanowych(V) w wodzie do spożycia | |
|---|---|
| Parametr | Wartość |
| Skład eluentu | 22 mM KOH 0–7 min 40 mM KOH 8–16 min |
| Szybkość przepływu eluentu | 1 mL/min |
| Objętość wprowadzanej próbki | 20 μL |
| Prąd tłumienia | 99 mA dla 40mM KOH |
| Temperatura pracy kolumny | 30°C |
| Ciśnienie na kolumnie | \approx 2400 psi |
| Czas analizy | 16 min |

krzywej kalibracyjnej i jej wizualnej ocenie. Widoczna jest wtedy każda nieliniowość, co pozwala na wstępne odrzucenie punktów skrajnych i modyfikację zakresu liniowości. Następnie dokonano charakterystyki liniowości przez obliczenie współczynnika korelacji liniowej r :

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad 2$$

gdzie:

x_i – stężenie i -tego składnika,

y_i – wartość sygnału dla i -tego składnika,

r – współczynnik zmienności metody (krzywej kalibracyjnej).

$$V_m = \frac{s_m}{\bar{x}} \times 100 \quad 3$$

gdzie:

\bar{x} – średnia wartość zakresu skali wzorców,

s_m – odchylenie standardowe metody obliczone ze wzoru:

$$s_m = \frac{s_y}{b} \quad 4$$

Przyjmuje się, że krzywa kalibrowania jest liniowa, jeśli współczynnik korelacji r jest większy niż 0,999, a metoda zapewnia wystarczającą precyzję, jeśli współczynnik zmienności metody V_m jest mniejszy niż 3%. Po określeniu zakresu liniowości krzywej kalibracyjnej wyznaczono funkcję regresji liniowej $y = a + bx$. Krzywe kalibracyjne poszczególnych anionów przedstawia rysunek.

Granica wykrywalności, granica oznaczalności, czułość

Parametry te zostały wyznaczone na podstawie wielokrotnych pomiarów dla próbki ślepej z dodatkiem wzorca. Pomiar wykonywane były w każdej serii analitycznej. Uzyskano 20 wyników dla każdego oznaczanego jonu, które poddano dalszej analizie statystycznej. Granicę wykrywalności (L_D) wyrażono wzorem:

$$L_D = \bar{x}_{blank} + 3\delta_{blank} \quad 5$$

gdzie:

\bar{x}_{blank} – średnie stężenie próbki ślepej,

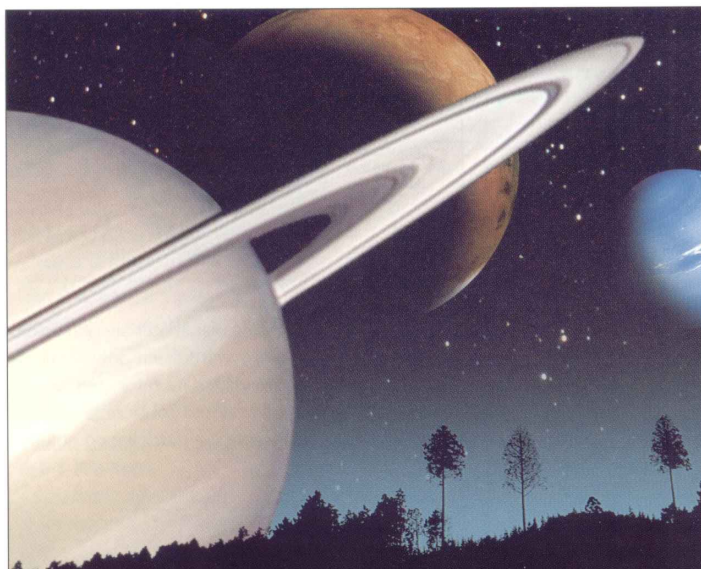
δ_{blank} – odchylenie standardowe próbki ślepej.

Granice oznaczalności (LOQ), wyrażono wzorem:

$$L_{oQ} = \bar{x}_{blank} + 10\delta_{blank} \quad 6$$

Precyzja

Procedura wyznaczenia miar precyzji obejmowała wykonanie wielokrotnych, powtarzanych pomiarów obiektów badań (materiałów odniesienia, próbek rzeczywistych). Pomiar były wykonywane w warunkach powtarzalności i odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej. Schemat postępowania obejmował wykonanie serii 20 niezależnych od siebie (dwa powtórzenia) badań próbek rzeczywistych (powtarzalność) i materiałów odniesienia (powtarzalność i odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna). Sposób ten pozwolił na wyznaczenie miar precyzji zarówno w warunkach powtarzalności, jak i odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej. W trakcie eksperymentu wykorzystano certyfikowane materiały odniesienia i próbki rzeczywiste obejmujące zawartością badanych jonów całą krzywą



Nowa era w detekcji HPLC

Prosty w obsłudze i przewyższający dotąd znane detektory HPLC!

- Wysoka czułość
- Szeroki dynamiczny zakres pomiarowy
- Odpowiedź detektora niezależna od struktury oznaczanych związków
- Kompatybilność z każdym systemem HPLC
- Pierwszy od 20 lat, naprawdę uniwersalny detektor do HPLC
- Idealny w analizie cukrów, peptydów, przemyśle farmaceutycznym i chemicznym

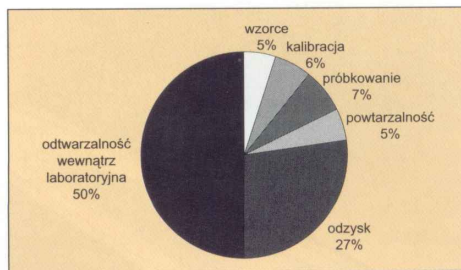
The Corona™ Charged Aerosol Detector

esa
MAGELLAN BIOSCIENCES



POLYGEN

Polygen sp. z o.o.
tel.: 032 2388195
polygen@polygen.com.pl



Rys. Szacunkowy udział składowych w budżecie niepewności

kalibracyjną (tab. 4). Analizując materiały odniesienia oraz próbki rzeczywiste w warunkach powtarzalności oraz odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej, wyznaczono miary precyzji dla zakresu roboczego metody. Precyzję określa odchylenie standardowe od pojedynczego wyniku:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad 7$$

Powszechnie wykorzystywaną w laboratorium miarą precyzji jest współczynnik zmienności (CV), wyrażany wzorem:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% \quad 8$$

Odzysk

Ocena odzysku została wykonana na próbkach rzeczywistych. Zbadano stężenia analitu w szeregu próbek rzeczywistych i wzbogaconych (stężenia dodawanych analitów mieściły się w zakresie roboczym metody analitycznej) za pomocą walidowanej metody pomiarowej i obliczono wartości odzysku według wzoru:

$$R_i = \frac{C_d - C_p}{C_{wz}} \quad 9$$

gdzie:

- R_i – odzysk,
- C_d – zawartość analitu w próbce wzbogaconej,
- C_p – zawartość analitu w próbce,
- C_{wz} – zawartość dodanego analitu.

Wyznaczono także wartość średniego odzysku dla próbek wzbogaconych, według poniższego wzoru:

$$R = \frac{\sum R_i}{n} \quad 10$$

Końcowym etapem wyznaczenia współczynnika odzysku było przeprowadzenie statystycznej analizy na istotność współczynnika odzysku, według:

$$t_R = \frac{|R-1|}{u(R)} \quad 11$$

gdzie:

$$u(R) = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad 12$$

gdzie:

s – odchylenie standardowe odzysku.

Test na istotność współczynnika odzysku dowiódł, że $t_R < t_{kryt.}$ ($P = 95\%$, $f = n-1$), co oznacza, że wpływ matrycy jest pomijalny, jednak niepewność standardową oszacowanego odzysku uwzględniono w procedurze szacowania niepewności metody. Gdyby zaistniała sytuacja odwrotna ($t_R > t_{kryt.}$), współczynnik R powinien zostać uwzględniony przy obliczaniu wyniku oznaczenia.

C. OSZACOWANIE NIEPEWNOŚCI POMIARU

Niepewność wyniku

W celu przygotowania budżetu niepewności zidentyfikowano źródła niepewności mające wpływ na wyniki oznaczania wymienionych anionów, przygotowanie roztworów kalibracyjnych, kalibracją, precyzją, odzyskiem i pobieraniem próbek (rys.). Wartość niepewności oszacowano dla stężeń analitów obejmujących cały zakres roboczy metody.

Całkowitą niepewność standardową obliczano według poniższego wzoru, uwzględniając wymienione wyżej składowe budżetu niepewności:

$$u_c = \sqrt{u_1^2(X_1) + u_2^2(X_2) + \dots + u_n^2(X_n)} \quad 13$$

gdzie:

- u_c – całkowita niepewność standardowa,
 - $u_n^2(X_n)$ – składowe niepewności standardowej.
- Następnie obliczono niepewność rozszerzoną U , mnożąc całkowitą niepewność standardową przez współczynnik rozszerzenia k .

$$U = k \cdot u_c \quad 14$$

gdzie:

- U – niepewność rozszerzona,
- u_c – całkowita niepewność standardowa,
- k – współczynnik rozszerzenia (przyjęto $k = 2$).

D. SPÓJNOŚĆ POMIAROWA

Poprawność

Wyznaczenie poprawności polegało na wykonaniu pomiarów dla certyfikowanych materiałów odniesienia i laboratoryjnych materiałów odniesienia (tab. 3) w warunkach odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej oraz obliczeniu średniej ogólnej według:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad 15$$

gdzie:

\bar{x} – średnia wartość oznaczenia,

x_i – pojedynczy wynik,

n – liczba pomiarów

i obliczeniu obciążenia metody:

$$\Delta = \bar{x} - \mu \quad 16$$

gdzie:

μ – jest przyjętą wartością odniesienia oraz ocenie statystycznej istotności obciążenia

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{S_{\bar{x}}} \quad 17$$

gdzie:

$S_{\bar{x}}$ – to odchylenie standardowe średnie

$$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}} \quad 18$$

Ponieważ nie stwierdzono, by wartość statystyki t była większa niż wartość krytyczna wynikająca z rozkładu t -Studenta (dla $P = 95\%$ i $f = n-1$), przyjęto, że obciążenie jest statystycznie nieistotne (tab. 4). Certyfikowany materiał odniesienia jest materiałem, w którym każdej wartości jest przypisana niepewność na określonym poziomie ufności. Sposób produkcji i certyfikacji materiałów CRM sprawia, że są one drogie i występują w niewielkich seriach, dlatego też nie powinno się ich używać w rutynowych analizach. Do celów rutynowych można używać laboratoryjnych materiałów odniesienia, których cechy zostały powiązane z określonymi certyfikowanymi materiałami odniesienia za pośrednictwem nieprzerwanego łańcucha porównań.

| Certyfikowane i laboratoryjne materiały odniesienia wykorzystane podczas oceny statystycznej metody | | | | |
|---|-----------------------|-----------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| Nazwa i charakterystyka stosowanego materiału odniesienia | Zawartość jonu [mg/L] | | | |
| | F ⁻ | Cl ⁻ | NO ₃ ⁻ | SO ₄ ²⁻ |
| HAMILTON 20 lot:206 (CRM) | 0,42 ± 0,08 | 64,7 ± 4,5 | 2,45 ± 0,21 jako NNO ₃ | 45,8 ± 3,2 |
| QCI-51 Lot:010287 (QCM) - materiał do kontroli jakości | 1,60 ± 0,108 | 40,3 ± 2,54 | 20,0 ± 1,43 jako NNO ₃ | 47,8 ± 2,71 |
| Laboratoryjny materiał odniesienia przygotowany na podstawie wzorca wieloelementowego I, 1000 mg/L [F ⁻ , Br ⁻ , PO ₄ ³⁻] i wzorca wieloelementowego II, 1000 mg/L [Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻] | 0,50 ± 0,10 | 50,0 ± 4,5 | 50,0 ± 6,0 | 50,0 ± 2,5 |
| WLW-2; SUW Mosina - woda surowa (filtry zbiorcze) laboratoryjny materiał odniesienia | 0,187 ± 0,037 | 42,2 ± 3,8 | 16,9 ± 1,9 | 103,8 ± 5,9 |
| Porównanie międzylaboratoryjne D#326 G:1A | - | 154 ± 3 | - | 216 ± 8 |

TABELA 3

Porównania międzylaboratoryjne

Kolejnym etapem sprawdzenia metody pomiarowej było uczestnictwo w porównaniach międzylaboratoryjnych organizowanych między innymi przez Politechnikę Krakowską i LGC Promochem (Aquacheck

BRUKER

Bruker Polska Sp. z o.o.

Aparatura naukowa i badawcza...

**Aplicacje
Sprzedaż
Serwis**

- kontrola jakości
- badania i rozwój
- life science
- kontrola procesów

Odwiedź nas na stronie internetowej www.bruker.pl lub zadzwoń (61) 868 90 08

NMR/EPR/MS/X-RAY/FT-IR/RAMAN

think forward

334, 326). Wyniki z tych porównań są zadowalające, to znaczy $|Z| < 2$ (tab. 4).

E. POBIERANIE PRÓBEK

Ważnym fragmentem procedury analitycznej jest pobieranie próbek, które w wielu przypadkach może

Dodatkowo w celu oceny wpływu pobierania próbek na wynik pomiaru wykonano badania:

■ terenowych próbek ślepych, które umożliwiają identyfikację błędów związanych z zanieczyszczeniem pojemników do pobierania i z procesem pobierania próbek,

TABELA 4

| Parametry charakteryzujące metodę oznaczania fluorków, chlorków, azotanów(V) i siarczanów(VI) w wodzie techniką chromatografii jonowej z detekcją konduktometryczną | | | | |
|---|------------------------|---------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Cechy metody | Wyniki | | | |
| | F ⁻ | Cl ⁻ | NO ₃ ⁻ | SO ₄ ²⁻ |
| Granica wykrywalności (3s), mg/L | 0,010 | 0,358 | 0,082 | 0,307 |
| Granica oznaczalności (10s), mg/L | 0,027 | 0,914 | 0,189 | 0,534 |
| Współczynnik korelacji krzywej kalibracyjnej | 0,9999 | 0,9999 | 0,9999 | 0,9999 |
| Współczynnik zmienności metody, % | 0,33 | 0,39 | 1,2 | 0,6 |
| Zakres roboczy, mg/L | 0,10 - 1,0 | 1,0 - 200 | 0,10 - 100 | 1,0 - 200 |
| Powtarzalność, % | 5,4 | 0,42 | 0,41 | 0,37 |
| Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna, % | 6,5 | 1,3 | 1,3 | 1,6 |
| Poprawność: certyfikowany materiał odniesienia HAMILTON 20, % | 0,42 (0,42 mg/l) | 0,86 (65,3 mg/l) | 1,25 (2,42 mg/l) | 1,93 (47,3 mg/l) |
| Odzysk próbek fortyfikowanych, % | 99,3% | 99,8% | 98,7% | 99,9% |
| Zdolność rozdzielcza kolumny AS18 | 2,0 | 2,3 | 2,5 | 2,0 |
| Porównanie międzylaboratoryjne - Politechnika Krakowska (marzec 2007), Z<2 | 1,1 | 0 | 0,36 | 0,53 |
| Niepewność rozszerzona, mg/L (względna niepewność rozszerzona) | 0,386 ± 0,066 (20%) | 65,3 ± 6,1 (9%) | 10,6 ± 1,2 (12%) | 47,4 ± 2,6 (5%) |
| | 0,181 ± 0,031 (20%) | 154 ± 15 (9%) | 91 ± 11 (12%) | 103,8 ± 5,5 (5%) |

mieć duży, bo dochodzący do 80% wpływ na wynik samego pomiaru, dlatego jednym z elementów opisywanej metody jest pobieranie próbek przez pracowników laboratorium i określenie jego wpływu na wynik.

Źródłami błędów związanymi z pobieraniem próbek są między innymi kontaminacja, nietrwałość próbki oraz niewłaściwe jej utrwalenie, niewłaściwe pobieranie próbki, transportowanie próbki. W celu określenia możliwych błędów związanych z pobieraniem próbek posłużono się eksperymentem dwuczynnikowym pełnym. Pobierano dwie próbki pierwotne, z których każda po przywiezieniu do laboratorium dzielona była na dwie próbki laboratoryjne. W każdej z nich wykonywano oznaczenia analitów za pomocą walidowanej procedury badawczej. Ocena wpływu pobierania próbek na wynik obejmowała:

- precyzję (odchylenie standardowe powtarzalności oraz odchylenie standardowe związane z pobieraniem próbek, test istotności tych odchyleń – test F),
- poprawność (obciążenie – ocena systematycznych różnic i ich istotności – testy t-Studenta).

■ próbek z dodatkiem analitu, które pozwalają na identyfikację błędów związanych z zachowaniem się analitu (nietrwałością próbki, stratami analitu poprzez jego rozkład, ulatnianie, zjawiska sorpcji lub czynniki biologiczne).

Dane z pomiarów uzyskane w trakcie oceny wpływu pobierania próbek na wynik analizy wskazują jednoznacznie, że pobieranie próbek, o ile przeprowadzone jest prawidłowo, nie wnosi statystycznie istotnego błędu do wyniku pomiaru.

Końcowym etapem pracy chemika analityka jest informacja, którą powinna charakteryzować „jakość”. Aby tak się stało, analityk musi być świadom źródeł błędów i nie lekceważyć żadnego, nawet pozornie nieistotnego etapu postępowania analitycznego. Powinien dążyć do minimalizowania ich wpływu, dlatego nie bez znaczenia w tej pracy jest wykorzystywanie odpowiednich metod matematycznych do oceny wyniku i jego interpretacji. Efektem pracy wykonanej zgodnie z zasadami jakości powinien być dobrze opisany przez niepewność wynik uzyskany za pomocą dobrze charakteryzowanych metod analitycznych. ■