

Ievgen T. VOLODARSKYI<sup>1</sup>, Larysa O. KOSHEVA<sup>2</sup>, Zygmunt WARSZA<sup>3</sup><sup>1</sup> NARODOWY UNIWERSYTET TECHNICZNY - POLITECHNIKA KIJOWSKA<sup>2</sup> NARODOWY UNIWERSYTET LOTNICTWA UKRAINY, Kijów<sup>3</sup> PRZEMYSŁOWY INSTYTUT AUTOMATYKI I POMIARÓW (PIAP) Warszawa**Metoda poprawy dokładności analizy chromatograficznym systemem pomiarowym z detekcją spektrometrem mas****Prof. dr Evgeniy T. VOLODARSKY**

Jest profesorem nauk technicznych w Katedrze Automatykacji Badań Eksperymentalnych Narodowego Technicznego Uniwersytetu Ukrainy - Politechniki Kijowskiej „KPI” w Kijowie. Jest przewodniczącym Podkomisji „Metrologia” w Państwowej Agencji Akredytacyjnej Ukrainy. Zainteresowania naukowe obejmują systemy oprogramowania pomiarowego do monitorowania i testowania. Jest autorem ponad 200 publikacji. Ma tytuł: Senior member of IEEE.



e-mail: vet\_1@voliacable.com

**Prof. dr Larysa A. KOSHEVA**

Jest profesorem nauk technicznych w Katedrze Biocybernetyki i Medycyny Lotniczej w Narodowym Uniwersytecie Lotnictwa w Kijowie, w Ukrainie. Zainteresowania naukowe obejmują metrologiczne wspomaganie pomiarów medycznych i biologicznych oraz statystyczne przetwarzanie danych. Jest autorem ponad 70 publikacji.



e-mail: arnis@ukrpost.net

**Doc. dr inż. Zygmunt Lech WARSZA**

Ukończył Miernictwo Elektryczne w Pol. Warszawskiej 1959, doktorat 1967, docent od 1970. Pracował w Instytucie Elektrotechniki i Pol. Warszawskiej. Następnie organizował i prowadził: Wydział Transportu Pol. Świętokrzyskiej, Ośrodek Aparatury Pomiarowej IMGW, Zakład Automatykacji i Techniki Pomiarowej IChP. Pracuje w Przemysłowym Instytucie Automatyki i Pomiarów (PIAP). Jest autorem około 130 publikacji, 2 monografii, kilkudziesięciu prac badawczych i konstrukcyjnych, 11 patentów oraz promotorem 2 doktorów.



e-mail: zlw@op.pl

**Streszczenie**

Omówiono zastosowanie strukturalno-algorytmicznych metod poprawy dokładności ilościowej analizy chemicznej chromatograficznych systemów pomiarowych z detekcją spektrometrem mas. Zaproponowano zwiększenie dokładności wyników przez wyeliminowanie wpływu niepewności w procesie przygotowania próbki. Dla bezpośrednio skalirowanego spektrometru mas pozwala to oszacować dyspersję i całkowitą niepewność wyniku analizy. Podano przykład liczbowy.

**Słowa kluczowe:** kalibracja, niepewność wyników analizy, chromatograf, spektrometr mas, przygotowanie próbki.

**Method of increasing accuracy of analysis by chromatographic-mass spectrometer measuring system****Abstract**

Features of the application of structural-algorithmic methods of increasing the accuracy of the results of quantitative chemical analysis with the use of chromatographic-mass-spectrometric measuring system are considered. Proposed is method of excluding the influence of the uncertainty of the sample preparation stage. It allows for the directly calibrated mass spectrometer to assess the output data dispersion and to determine the overall uncertainty analysis. Formulas for such analysis of uncertainty are presented. As illustration numerical example of uncertainty calculations is included and conclusions are formulated.

**Keywords:** calibration, uncertainty of analysis results, chromatograph, mass- spectrometer, sample preparation.

**1. Wprowadzenie**

Kontrola jakości żywności i leków, monitoring środowiska oraz kryminalistyczne i medyczne badania laboratoryjne wymagają analizy ilościowej wieloskładnikowych cieczy i gazów w celu identyfikacji i wyznaczenia stężeń ich składników. W tym celu stosuje się analizę chromatograficzną. Podstawowe informacje zawarte są w chromatogramie w postaci sekwencji pików chroma-

tograficznych. Chromatogram otrzymuje się po wprowadzeniu próbki, będącej mieszaniną wielu składników do długiej rurki kapilarnej stanowiącej kolumnę chromatograficzną. Czas docierania różnych składników do detektora na końcu kolumny zależy od wielu mechanizmów fizyko-chemicznych, w tym głównie od ich zdolności sorpcyjnych. Położenie pików na osi czasu służy identyfikacji składnika, a powierzchnia pików jest proporcjonalna do względnej zawartości danego składnika w próbce. Zarejestrowany chromatogram przetwarza się dalej tak, aby wyznaczyć powierzchnie określonych pików chromatograficznych proporcjonalne do stężeń odpowiednich substancji. Obecność w matrycy badanej próbki substancji o składzie chemicznym zbliżonym do badanego składnika, a także dokładność kolejnych działań przygotowujących próbkę wprowadzaną do kolumny są źródłem błędów pomiaru i wpływają na wiarygodność wyników analizy. Należy stosować specjalne postępowanie by zmniejszyć te wpływy, gdyż powodowanej nimi składowej niepewności pomiarów nie wyeliminuje się żadną ze statystycznych metod obliczeniowych [1, 4].

Spektrometr mas jest coraz powszechniej stosowanym detektorem w połączeniu z rozdzielaniem chromatograficznym. Połączenie chromatografii ze spektrometrią mas daje większe możliwości analityczne niż przy wielu innych detektorach, w tym niższe granice wykrywania i oceny ilościowej analitu. Taki zestaw jest bardzo użytecznym narzędziem do analizy chemicznej. Pozwala na stosowanie uproszczonej i skróconej procedury oczyszczania ekstraktów wyizolowanych z pierwotnej matrycy, co w konsekwencji zwiększa skuteczność wykrywania analizowanych substancji. Spektrometr mas w połączeniu z chromatografią zmniejsza wymagania dotyczące oczyszczania ekstraktów, a tym samym istotnie zwiększa szybkość i dokładność analizy [2, 5]. Dotąd nie rozwijano w pełni sposobu zmniejszenia wpływu przygotowania próbki na wynik analizy. Można to osiągnąć tworząc charakterystykę kalibracyjną dla całego systemu pomiarowego, a nie tylko dla samego zestawu chromatograficznego.

Przy tak postawionym zadaniu celem pracy jest rozpatrzenie i zbadanie możliwości zastosowania specjalnych metod postępowania nazywanych poniżej strukturalnymi, które zwiększają precyzję systemów pomiarowych do ilościowej analizy chemicznej metodą chromatograficzną z detekcją za pomocą spektrometru mas.

**2. Tworzenie charakterystyki kalibracyjnej**

Pomiary zestawem chromatografu ze spektrometrem mas należy poprzedzić kalibracją, tj. utworzyć skalę pomiarową, która uwzględni indywidualne cechy metrologiczne systemu analitycznego wynikające z jego konstrukcji. W tym celu do kolumny chromatograficznej podaje się roztwory wzorcowe o określonych stężeniach  $c_i$ , często nazywane krócej „wzorcami” (lub „standardami”). Następnie rejestruje się powierzchnie  $S_i$  odpowiadające tym stężeniom. Liczba roztworów wzorcowych stosowanych do

kalibracji zależy od zakresu pomiaru i charakterystyki spektrometru mas. W większości przypadków przy tworzeniu charakterystyki kalibracyjnej spektrometru mas zakłada się, że jest to funkcja liniowa  $S = S_0 + bc$ , której współczynniki  $\hat{S}_0$  i  $\hat{b}$  szacuje się metodą najmniejszych kwadratów. Znając wynik  $S_k$  uzyskany przy kalibracji, można określić stężenie  $c_k$  badanego analitu jako

$$\hat{c}_k = (S - \hat{S}_0) / \hat{b} \quad (1)$$

### 3. Wpływ przygotowania próbki na niepewność wyniku badań

W badaniach analitycznych, przed bezpośrednim pomiarem stężenia analitu dokonuje się wydzielenia określonego składnika z matrycy, której skład bywa dość skomplikowany. Procedura ta zawiera wiele etapów, a procent ekstrakcji określonego składnika, zależy od czystości odczynników, dokładności dozowania, staranności wykonania zgodnie z metodyką sposobu oczyszczania, ekstrakcji itp. Te wszystkie czynności wprowadzają niepewność do wyników analizy. Aby móc oszacować tę niepewność należy skalibrować całą procedurę eksperymentalną łącznie z przygotowaniem próbki.

Przy wzorcowaniu systemu trzeba dysponować nie tylko zestawem roztworów wzorcowych o wartościach stężeń pokrywających zakres pomiarów, ale i specjalnie utworzonymi matrycami zwanymi „ślepa próbą” (ang. *blank sample of matrix*). Jest to matryca taka jak badana, ale nie zawierająca tego analitu, który zamierza się z niej wydzielić, by ustalić jego stężenie. Liczba tych pomocniczych matryc odpowiada liczbie punktów użytych do utworzenia krzywej kalibracji. Do matryc tych wprowadza się określone ilości roztworów wzorcowych. Powinno się mieć całkowitą pewność, że nie zawierają one badanego analitu. Jest to jedna z trudności występujących w ilościowej analizie chemicznej.

Inną trudnością jest konieczność zapewnienia w zadanym zakresie pomiarowym jednakowej niepewności dla wieloetapowego przygotowania próbki zarówno do kalibracji systemu pomiarowego, jak również i do analiz. Powinny więc być spełnione warunki odtwarzalności procesu przygotowania próbek.

Z rozważań tych wynika, że równoległe przygotowywanie próbek przy kalibracji (czyli procedura o strukturze wielotorowej), uniemożliwia w praktyce wyeliminowanie niepewności tego stadium procesu pomiarowego, a czasami nawet ją zwiększa.

### 4. Strukturalno-algorytmiczna metoda poprawy dokładności systemu pomiarowego

Według teorii inwariantności podanej przez B. N. Pietrowa, dla eliminacji oddziaływania wielkości wpływających potrzeba co najmniej dwu torów (różnych dróg) w systemie pomiarowym. Można to zrealizować nie tylko w przestrzeni, ale i poprzez rozdzielenie w czasie. Wówczas do pojedynczego toru doprowadza się na przemian wartość wzorcową  $x_0$  i wartość mierzoną  $x_k$  analizowanej wielkości (ten sposób wykonywania pomiarów znany jest w metrologii jako metoda podstawienia). Dla niewielkich zmian poziomów wielkości wpływających na wartości wielkości wzorcowej i mierzonej w czasie kolejnego ich podawania, nieidealne właściwości toru przetwarzania będą w praktyce identyczne. Zatem związek pomiędzy obu wartościami  $y'_0 = kx_0$  i  $y'_k = kx_k$  na wyjściu toru pozostaje taki sam jak na jego wejściu. Wówczas wartość mierzonej wielkości określa się ze stosunku  $y'_0$  i  $y'_k$  jako

$$x_k = x_0 (y'_k / y'_0) \quad (2)$$

Niedoskonałość charakterystyki toru nie będzie miała wpływu.

Przy przeprowadzaniu ilościowej analizy chemicznej nie można tej zależności zastosować bezpośrednio, ponieważ stadia procedury przygotowywania próbek trwają jakiś czas przy przechodzeniu z jednego stanu do drugiego. Nie można więc bez specjalnego

dotatkowego sposobu stosować jeden tor z podziałem w dziedzinie czasu. System ilościowej analizy chemicznej z wykorzystaniem chromatografii ze spektrometrią mas (GC/MS) stwarza możliwość rozdzielania analitu wzorcowego i mierzzonego, jeżeli ich składy różnią się według jakiejś (ale nie głównej) cechy. Jeśli ten problem rozwiązywać bezpośrednio dobierając wzorzec o innych właściwościach, to nie będzie spełniona zasada inwariantności. Uniknie się tego, gdy do badanej matrycy wprowadzi się jako dodatek oznakowany izotopem taki roztwór, który z definicji ma takie same właściwości jak analizowany analit, ale różni się od niego masą atomową. Wskutek różniących się czasów retencji położenia ich pików na chromatogramie są inne. Można więc wyznaczyć oddzielnie stężenia badanego analitu i znakowanego o izotopem dodatku wprowadzonego do matrycy. Z (2) wynika, że w tym przypadku nie występuje wpływ niepewności wprowadzanej w fazach przygotowania próbki, takich jak oczyszczanie, odparowanie, ekstrakcja itp., ponieważ zarówno analit jak i „wzorzec” będą jednocześnie podlegać tej samej fazie przygotowań. Dzięki temu podejściu wystarczy wykalibrować już nie cały proces analizy, a tylko sam zestaw instrumentalny, gdyż niepewność wprowadzana przy przygotowywaniu próbki praktycznie nie wpływa na wyniki pomiarów.

### 5. Wyznaczenie koncentracji analitu

Jak już podano we wstępie, stężenie substancji na wejściu systemu jest proporcjonalne do powierzchni  $S$  pików zapisanego w chromatogramie. W prowadzonej w taki sposób analizie stężenie  $c_k$  mierzzonego składnika będzie proporcjonalne do stężenia  $c_i$  wprowadzonego do matrycy roztworu wzorcowego oznaczonego izotopowo i do stosunku powierzchni pików  $S_k/S$  chromatogramu. Wówczas dla liniowej charakterystyki spektrometru mas i przy niewystępowaniu jej addytywnego przesunięcia

$$c_k = c_u \cdot S_k / S_u \quad (3)$$

Tak więc przez określenie stosunku powierzchni pików chromatogramu przy znanym stężeniu wzorca można znaleźć poszukiwane stężenie analitu  $c_k$ , ale w idealnej sytuacji, gdy charakterystyka nie jest przesunięta. W rzeczywistości wyrażenie (3) przyjmuje postać

$$\frac{S_{ki}}{S_{ui}} = \frac{S_0 + bc_{ki}}{S_0 + bc_{ui}} \quad (4)$$

gdzie:  $i \in (1, N)$  - liczba punktów kalibracji w zakresie pomiarowym,  $c_{ki}$  i  $c_{ui}$  - znane stężenia badanego analitu i jego izotopowego prototypu w  $i$ -tym roztworze wzorcowym.

Addytywne przesunięcie charakterystyki przetwarzania spektrometru mas (MS) wnosi wkład w niepewność wyniku analizy, różny dla różnych stężeń  $c_{ki}$  i  $c_{ui}$ . Ponadto, ten sam stosunek powierzchni pików  $S_k/S$  można uzyskać dla różnych stosunków  $c_{ki}/c_{ui}$ , co daje dodatkową niepewność wyniku analizy. Aby osiągnąć jednoznaczność kalibracji i uniknąć zależności wyniku od stężenia oznakowanego izotopowo roztworu standardowego, należy przeprowadzać kalibrację dla stałej wartości  $c_{ui}$ , tj. dysponować zestawem roztworów wzorcowych o stałym stężeniu izotopowo oznaczonego składnika i stężeniach badanego analitu tworzących szereg o wartościach  $c_{ki}$ , obejmujących zadany zakres wartości mierzonych w matrycy. Wówczas ze zmiany stosunku

$$A_{ki} = \frac{S_{ki}(S_0 + bc_{ui})}{S_{ui}(S_0 + bc_{ki})} = \frac{S_{ki}c_{ui} \left( \frac{S_0}{c_{ui}} + b \right)}{S_{ui}c_{ki} \left( \frac{S_0}{c_{ki}} + b \right)} \quad (5)$$

można wyznaczyć rzeczywistą charakterystykę spektrometru masowego, w zależności od  $c_{ki}$ .

Uwzględniając, że  $S_{ki}c_u = S_u c_{ki}$  wyrażenie (5) przyjmuje postać:

$$A_{ki} = \left( \frac{S_0}{c_u} + b \right) / \left( \frac{S_0}{c_{ki}} + b \right) \quad (5a)$$

Odchylenie rzeczywistej wartości współczynnika  $A_{ki}$  od jedności uwzględnia się poprzez wprowadzenie mnożnika korygującego uzyskany wynik bieżący. Wykonując kalibrację dla każdego  $i$ -tego punktu zakresu pomiarowego, wyznacza się zbiór wartości współczynników poprawkowych

$$A_{gr i} = \frac{S_h}{S_{ki}} \cdot \frac{c_{ki}}{c_h} \quad (6)$$

W ogólnym przypadku różnią się one od jedności.

Za pomocą metody najmniejszych kwadratów [3], [6] znajduje się współczynniki równania regresji

$$\hat{A}_{gr i} = \hat{a} + \hat{d} c_{ki} \quad (7)$$

Ich wartości minimalizują sumę kwadratów odchyłeń współczynników kalibracji obliczonych dla danych doświadczalnych według (6) i znalezionych z (7) dla  $i$ -tych stężeń składnika (tj. punktów zakresu pomiarowego, dla których wykonano te eksperymenty).

## 6. Kontrola poprawności charakterystyk kalibracyjnych

Zgodność wyznaczonych zależności z danymi doświadczalnymi można ocenić na podstawie wariancji końcowej [3, 6].

$$s_{ad}^2 = \frac{1}{N-2} \sum_{i=1}^N \left( \hat{A}_{gr i} - A_{gr i} \right)^2 \quad (8)$$

gdzie:  $\hat{A}_{gr i}$  i  $A_{gr i}$  - wartości stężeń, obliczone odpowiednio z równania regresji i znalezione na podstawie danych doświadczalnych w  $i$ -tym punkcie;  $i \in (1, N)$ .

Z teorii statystyki matematycznej wynika, że w ramach jednego eksperymentu dla każdego stosunku koncentracji  $c_{ki}/c_u$ , jak to ma miejsce w rozpatrywanym przypadku, na podstawie  $s_{ad}^2$  można sprawdzić hipotezę statystyczną  $H_0$ : czy linia pozioma

$\bar{A} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N A_{gr i}$  odpowiada danym doświadczalnym, a rozrzut

wartości względem niej zależy tylko od wpływu zmiennych losowych. Przy alternatywnej hipotezie  $H_1$ : danym eksperymentalnym odpowiada prosta pochylona. Hipotezę tę sprawdza się za pomocą kryterium Fishera szacując wartość zdefiniowaną jako

$$F = \frac{s^2(A)}{s_{ad}^2} \quad (9)$$

Ocenę wariancji dla rozrzutu określonych doświadczalnie wartości  $A_{gr i}$  w stosunku do wartości średniej  $\bar{A}$  oblicza się jako

$$s^2(A) = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N \left( A_{gr i} - \bar{A} \right)^2 \quad (10)$$

Oszacowaną wartość współczynnika Fischera  $F$  porównuje się z krytyczną wartością  $F_{kr}$  dla wybranego poziomu istotności statystycznej  $\alpha$  oraz liczby stopni swobody licznika ( $N-1$ ) i mianownika ( $N-2$ ). Jeśli  $F > F_{kr}$ , to na podstawie dostępnych danych można twierdzić, że zależność liniowa z prawdopodobieństwem  $(1-\alpha)$  odpowiada danym doświadczalnym. Wskazuje to na zmianę charakterystyki spektrometru mas w funkcji mierzonego stężenia.

Przy jednokrotnym tylko wykonywaniu pomiarów nie możliwe jest otrzymanie innego wniosku.

Stosowanie stałej wartości  $c_h$  przy kalibracji względnej pozwala na statystyczną estymację powtarzalności wyników. Rzeczywiście, ponieważ przy kalibracji charakterystyki spektrometru mas było stałe stężenie  $c_h$  oznaczonego izotopowo roztworu wzorcowego, to i pola odpowiadających mu pików  $S_{hi}$  też powinny być jednakowe. W praktyce tego nie obserwuje się. W spektrometrze mas pojawiają się różnice w powierzchni pików chromatograficznych  $S_{hi}$  dla różnych punktów krzywej kalibracyjnej przy takim samym stężeniu „wzorca”. Ich przyczyną są zmiany losowe oddziałujących wielkości w tym szumów. Można to oszacować jako

$$\hat{s}^2(S_{hi}) = \frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n \left( S_{hi j} - \bar{S}_{hi} \right)^2 \quad (11)$$

gdzie:  $\bar{S}_{hi} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n S_{hi j}$  - średnia wartość powierzchni pików na

chromatogramie przy prowadzeniu eksperymentów w  $i$ -tym punkcie charakterystyki kalibracyjnej;  $\hat{s}^2(S_{hi})$  - oszacowanie wariancji wyników  $n$ -krotnych obserwacji w  $i$ -tym punkcie.

Na podstawie wartości  $\hat{s}^2(S_{hi})$  oblicza się współczynnik

$$F_1 = \frac{s_{ad}^2}{\sum_{i=1}^N k_i \hat{s}^2(S_{hi}) / N} \quad (12)$$

gdzie:  $k_i$  - współczynnik uwzględniający różnice skal składników.

Współczynnik  $F_1$  stanowi podstawę do przetestowania hipotezy  $H_0$ : czy zależność liniowa odpowiada danym doświadczalnym. W tym przypadku  $F_1$  porównuje się z wartością krytyczną  $F_{kr1}$  dla wybranego znaczenia istotności statystycznej  $\alpha$  oraz liczby stopni swobody licznika ( $N-2$ ) i mianownika  $N(N-1)$ . Hipotezę  $H_0$  można zaakceptować jeżeli  $F_1 < F_{kr1}$ . Pozwala to poprawić statystyczną wiarygodność wyników.

Obliczone oszacowanie wariancji  $\sum_{i=1}^N k_i \hat{s}^2(S_{hi}) / N$  dla średniej

wyników spektrometru mas charakteryzuje ich powtarzalność [7]. Standardowe odchylenie tej wariancji wraz z niepewnością procesu przygotowania izotopowo oznaczonego roztworu wzorcowego i niepewnością poboru objętości analizowanej matrycy, określaną z danych technicznych producenta jako niepewność typu B [7], umożliwiając oszacowane niepewności rozszerzonej wyniku pojedynczej analizy. Przy tradycyjnym podejściu nie jest to możliwe.

Źródła niepewności współczynnika korekcyjnego  $\hat{A}_{gr}$  w tworzeniu charakterystyki kalibracji, a zatem i niepewności uzyskiwanych wyników są następujące:

- niedokładność określenia współczynnika  $\hat{a}$ ;
- niedokładność określenia współczynnika  $\hat{d}$ ;
- błąd w określaniu powierzchni pików odpowiadającego roztworowi badanemu i roztworowi oznaczonemu izotopowo.

Niepewność standardowa poziomu podstawowego:

$$u(\hat{a}) = s_{ad} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{\bar{c}_k}{\sum_{i=1}^N (c_{ki} - \bar{c}_k)^2}} \quad (13)$$

gdzie:  $\bar{c}_k = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N c_{ki}$  średnie stężenie roztworów standardowych.

Niepewność standardowa współczynnika korekcyjnego  $\hat{d}$ , uwzględniająca jego zmianę wraz z mierzonym stężeniem, wynosi

$$u(\hat{d}) = s_{ad} \frac{1}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (c_{ki} - \bar{c}_k)^2}} \quad (14)$$

Zaś łączna, tzw. złożona niepewność standardowa wynosi:

$$u_c(\hat{A}_{gr}) = \sqrt{u^2(\hat{a}) + u^2(\hat{d})c_k^2} \quad (15)$$

Ponieważ wartość  $\hat{a}$  jest bliska jedności, więc w pomiarach małych stężeń drugi człon w powyższej niepewności standardowej można pominąć. Natomiast rola tego członu staje się istotna w pomiarach dużych stężeń. W stosunku do niego błąd określenia powierzchni pików chromatogramu jest wielkością drugiego rzędu, gdyż w spektrometrze masowym używa się 24-bitowych przetworników analogowo-cyfrowych.

## 7. Przykład

Jako przykład rozpatrzy się kalibrację chromatografu w pięciu punktach zakresu pracy dokonywaną poprzez wprowadzenie 2 ml substancji wzorcowych CS<sub>1</sub> - CS<sub>5</sub> przedstawionych w tabeli 1.

Tab. 1. Stężenia składników w roztworze kalibracyjnym [ng/ml]

Tab. 1. Concentration of components in the calibration solution [ng/ml]

Składniki:	CS <sub>1</sub>	CS <sub>2</sub>	CS <sub>3</sub>	CS <sub>4</sub>	CS <sub>5</sub>
analizowane	0,5	2	10	40	200
izotopowo oznaczone	100	100	100	100	100

Oszacowania współczynników  $\hat{a}$  i  $\hat{d}$  regresji liniowej metodą najmniejszych kwadratów wyznacza się jako

$$\hat{a} = \hat{A}_{gr} - \hat{d}\bar{c}_k; \quad \hat{d} = \frac{\sum_{i=1}^5 (c_{ik} - \bar{c}_k) \cdot A_{gr i}}{\sum_{i=1}^5 (c_{ik} - \bar{c}_k)^2},$$

gdzie -  $\bar{c}_k = \frac{1}{5} \sum_{i=1}^5 c_{ik}$  średnia wartość badanego składnika w roztworach wzorcowych CS<sub>1</sub> - CS<sub>5</sub>.

Stąd:

$$\bar{c}_k = \frac{0,5 + 2 + 10 + 40 + 200}{5} = 50,5; \quad \hat{d} = \frac{7,77}{28953} = 0,00027;$$

$$\bar{A}_{gr} = \frac{1}{5} \sum_{i=1}^5 A_{gr i} = 1,1895; \quad \hat{a} = 1,1895 - 0,00027 \cdot 50,5 = 1,1759.$$

Wartości  $A_{gr i}$  obliczone według (7) podano w tabeli 2.

Tab. 2.

Roztwory standardowe	CS <sub>1</sub>	CS <sub>2</sub>	CS <sub>3</sub>	CS <sub>4</sub>	CS <sub>5</sub>
$A_{gr i}$	1,2296	1,2296	1,2296	1,2296	1,2296

Równanie regresji dla jednakowego współczynnika korekcyjnego  $\hat{A}_{gr}$  w dowolnym punkcie zakresu roboczego jest następujące  $\hat{A}_{gr} = 1,1759 + 0,00027c_k$ .

Aby oszacować  $s_{ad}^2$  na podstawie tego równania obliczono punkty kalibracyjne dla wzorców CS<sub>1</sub> - CS<sub>5</sub> podane w tabeli 3.

Tab. 3.

Roztwory standardowe	$A_{gr i}$	$\hat{A}_{gr i}$	$ A_{gr i} - \hat{A}_{gr i} $	$(A_{gr i} - \hat{A}_{gr i})^2$
CS <sub>1</sub>	1,2296	1,1760	0,0536	0,00287
CS <sub>2</sub>	1,1346	1,1764	0,0418	0,00175
CS <sub>3</sub>	1,1917	1,1786	0,0131	0,00017
CS <sub>4</sub>	1,1565	1,1867	0,0302	0,00091
CS <sub>5</sub>	1,2353	1,2309	0,0044	0,00002

$$\text{Wariancja: } s_{ad}^2 = \frac{1}{5-2} \cdot 0,00572 = 0,00191$$

Niepewności standardowe współczynników regresji wg (13) i (14)

$$u^2(\hat{a}) = 0,00191 \left( \frac{1}{5} + \frac{(50,5)^2}{28953} \right) = 0,00055$$

$$u^2(\hat{d}) = 0,00191 \left( \frac{1}{28953} \right) = 6,6 \cdot 10^{-8}.$$

Złożona niepewność standardowa kalibracji wg (13), (14) i (15)

$$u_c(\hat{A}_{gr}) = \sqrt{5,5 \cdot 10^{-4} + 6,6 \cdot 10^{-8} c_k^2}$$

Z niej wynika, że dla dolnej wartości zakresu ( $c_k=0,5$ ng/ml), drugi składnik można pominąć i  $u_c(\hat{A}_{gr}) = 2,34 \cdot 10^{-2}$ .

Dla górnej wartości zakresu  $c_k=200$ ng/ml otrzymuje się

$$u^2(\hat{d}) = 6,6 \cdot 10^{-8} \cdot 4 \cdot 10^4 = 26,4 \cdot 10^{-4}$$

Udział drugiego składnika jest znacznie większy. Ostatecznie

$$u_c(\hat{A}_{gr}) = \sqrt{5,5 \cdot 10^{-4} + 26,4 \cdot 10^{-2}} = 5,65 \cdot 10^{-2} = 5,65\%$$

Zmniejszenie niepewności dla pomiarów w szerokim zakresie (0,5\_200) ng/ml wymaga zastosowania większej liczby punktów wzorcowych (wartości stężeń) do tworzenia krzywej kalibracji.

## 8. Wnioski i posumowanie

Wprowadzenie do analizowanej matrycy oznaczonego izotopowo roztworu wzorcowego o takich samych właściwościach fizykochemicznych jak składnik badany eliminuje wpływ niepewności powstającej w stadium przygotowania próbki na dokładność otrzymywanego wyniku. Dzięki temu wystarczy wykonywać kalibrację tylko samego spektrometru mas.

Wykonanie kalibracji w wartościach względnych przy ustalonym stężeniu roztworu wzorcowego umożliwi ocenę powtarzalności i wyznaczenie rozszerzonej niepewności wyniku analizy.

Rozpatrzono specyfikę zastosowania metod strukturalno-algoritmicznych do zwiększenia dokładności wyników ilościowej analizy chemicznej przeprowadzanej za pomocą chromatograficznego systemu pomiarowego z detekcją spektrometrem mas. Metody te pozwalają:

- wyeliminować niepewności w stadium przygotowania próbki,
- bezpośrednio wyznaczać krzywą kalibracji spektrometru mas,
- oszacować wariancję powtarzalności,
- określić całkowitą niepewność wyników analizy.

Podobne do przedstawionego kompleksowego sposobu opisu i poprawy niepewności analizy chromatograficznym systemem pomiarowym można opracować też i dla eksperymentalnych procedur pomiarowych innymi systemami pomiarowymi.

## 9. Literatura

- [1] <http://www.purchon.com/chemistry/chromatography.htm>
- [2] IUPAC Recommendations 1993, Pure & Appl. Chem., Vol. 65, No. 4, pp.819-872, 1993.
- [3] Freund John E., Walpole Ronald E.: Mathematical Statistics 4th Ed. Prentice-Hall, Inc., NJ 1987.
- [4] Fatkudinova S.R., Solopchenko G.N.: Primieneniye cifrovyykh modeley realnykh chromatogram dlya ocenki pogreshnosti rezultatov khimicheskogo analiza. Zhurnal analiticheskoi khimii, 1998, t.53, nr 11, s. 1158 - 1165, (ros.), wer. ang.: Journal of Analytical Chemistry, Springer).
- [5] Chmil V.D.: Sowremiennyye problemy toksikologii (ros.). 2002, no 2, p. 56-62.
- [6] Volodarsky E.T., Kosheva L.O.: Statisticheskaya obrabotka danykh. (Nauz. Posibnik) - K.:HAY, 2008, p. 3008.
- [7] Guide to the expression of uncertainty in measurement. ISO/IEC Guide 98:1995, 2nd ed., revised JCGM-100-2008.

otrzymano / received: 29.03.2011

przyjęto do druku / accepted: 04.05.2011

artykuł recenzowany