

Metrologická a zkušební laboratoř VŠCHT



Institute of Chemical Technology, Prague
Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic, tel./fax +420 220 443 185
Metrological and Testing Laboratory
CMI associated laboratory, testing laboratory No. 1316.2
accredited by the Czech Accreditation Institute, signatory of MRA ILAC



Program rozvoje metrologie 2007

PRM VII/5/07

Metodiky měřicích postupů pro legální účely

Prof. Ing. Miloslav Suchánek, CSc., odpovědný řešitel

Prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc.
Doc. Ing. Vladimír Kocourek, CSc.
Doc. Ing. Oto Mestek, CSc.

listopad 2007

Obsah

Část 1.1 Metoda stanovení koncentrace Cu, Cd, Pb a Se v kalibračních roztocích. Plán nejistot	3
Část 1.2 Stanovení kovů v biotické matrici metodou ICP-MS. Stanovení Cu, Zn a Se v plné krvi. Plán nejistot	20
Část 1.3 Metoda měření koncentrace arsenu. Plán nejistot	24
Část 2 Metody stanovení polyaromatických uhlovodíků v biotické matrici. Odhad nejistot	35
Část 3 Stanovení vybraných pesticidů v obilí. Odhad nejistoty měření.....	45

Část 1.1
Metoda stanovení koncentrace Cu, Cd, Pb a Se v kalibračních roztocích
Plán nejistot

1 Úvod

Řada metod prvkové stopové analýzy patří z metrologického hlediska mezi relativní měřicí techniky, tedy metody založené na porovnání neznámého vzorku se sadou kalibračních vzorků o známém obsahu. Předpokládá se, že rozdíly ve složení, formě apod. mezi kalibrační sadou a jednotlivými vzorky mají zanedbatelný vliv na výsledek měření. Rutinní kalibrační procedura využívá v tomto případě roztoky připravené ředěním jednoprvkových základních roztoků (běžně nazývané standardní roztoky). Tyto roztoky si laboratoře mohou připravovat sami rozpouštěním čistých chemikálií, běžně jsou však komerčně dostupné roztoky řady výrobců a to v koncentracích obvykle 1 000 mg/l a 10 000 mg/l. Některé z nich mohou mít v závislosti na postupu přípravy i statut certifikovaného referenčního materiálu. Protože neexistují žádné národní etalony chemických sloučenin a prvků, standardní roztoky by měly být navázány na jednotku mol pomocí primárních metod měření nebo by měly být navázány na roztoky připravované obecně uznávanou metrologickou autoritou.

Cílem této části projektu je jednak ověření vybraných standardních roztoků kovů české provenience (roztoky Cu, Cd a Pb o koncentraci 1000 mg/l a roztok Se o koncentraci 10 000 mg/l; výrobce Analytika, spol. s r.o.). Jedná se o materiály, které mají statut Certifikovaného referenčního materiálu, přičemž však certifikační osvědčení je vydáno na přípravu těchto roztoků. Dalším cílem studie je i vzájemné porovnání vhodnosti různých metod ověření. Použity byly primární metody měření - gravimetrické stanovení a izotopové zředňování jednak s komerčně dostupným, jednak s vnitrolaboratorně připraveným izotopově obohaceným roztokem a navázání na metrologickou autoritu (NIST) pomocí atomové absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací. Tato metoda byla vybrána pro její vhodnou citlivost, která nevyžaduje přílišné ředění vzorků a umožňuje tak minimalizovat nejistoty měření. Dosažené nejistoty ověření byly porovnány s nejistotou koncentrace testovaných standardních roztoků odhadnutou během procesu jejich přípravy.

2 Experimentální část

2.1 Gravimetrické stanovení

2.1.1 Instrumentace

Elektronické váhy Mettler AB 204 (Švýcarsko).

2.1.2 Chemikálie a činidla

Ke gravimetrickému stanovení kovů byla použita tato organická srážedla: sylicylaldoxim, 8-hydroxychinolin (obě Fluka, Buchs, Switzerland) a kyselina chinaldinová (Aldrich, Milwaukee, WI). Selen se srážel pomocí síranu hydrazinia čistoty p.a. (Penta, Praha, ČR). Pomocné chemikálie NH_3 , octan sodný, kyselina octová, NaOH, HCl použité při gravimetrickém stanovení kovů a přípravě byly všechny čistoty p.a. (Penta, Praha, ČR)

2.1.3 Postupy [1]

Stanovení Cd

100 ml roztoku Cd se po kapkách zneutralizovalo 10 %-ním NaOH do prvního trvalého zákalu, který se rozpustil v několika kapkách koncentrované CH_3COOH . Cd se srážilo 10 ml 5 %-ního roztoku chinaldinanu sodného (5 g kyseliny chinaldinové v ca 50 ml vody se zneutralizuje 10 %-ním NaOH na fenolftalein roztok se doplní na 100 ml). Sraženina se odfiltrovala zváženým skleněným filtračním kelímkem G4 a promyla a

spláchla destilovanou vodou. Sraženina se vážila po vysušení při 120 °C. Poměr $M(\text{Cd})/M(\text{Cd}(\text{C}_{10}\text{H}_6\text{NO}_2)_2)$ má hodnotu 0,24612. Spojený filtrát a promývací voda (250 - 300 ml) byl okyselen 5 ml koncentrované HNO_3 a tímto roztokem byla vypláchnuta kádinka, ve které se sráželo. V roztoku byl zbytkový obsah Cd stanoven metodou plamenové AAS.

Stanovení Cu

50 ml roztoku Cu se po kapkách zneutralizovalo zředěným NH_3 (1 + 10) do prvního modrého zbarvení, přidalo se 0,5 g CH_3COONa a 0,5 ml koncentrované CH_3COOH . Cu se po kapkách srazilo 25 ml 1 %-ního roztoku salicylaldehydu v 5 %-ním ethanolu. Po sbalení se sraženina odfiltrovala zváženým skleněným filtračním kelímkem G4 a promyla a spláchla ledovou vodou. Sraženina se vážila po vysušení při 105 °C. Poměr $M(\text{Cu})/M(\text{Cu}(\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2\text{N})_2)$ má hodnotu 0,18924. Spojený filtrát a promývací voda (200 - 250 ml) byl okyselen 5 ml koncentrované HNO_3 a tímto roztokem byla vypláchnuta kádinka, ve které se sráželo. V roztoku byl zbytkový obsah Cu stanoven metodou ICP-MS.

Stanovení Pb

100 ml roztoku Pb se po kapkách zneutralizovalo 10 %-ním roztokem NaOH do prvního trvalého zákalu a okyselilo pěti kapkami koncentrované CH_3COOH . Po zahřátí k varu se Pb sráželo 100 ml horkého vodného roztoku 8-hydroxychinolinu (0,9 g látky v 500 ml vody). Pomocí roztoku NH_3 0,2 mol/l bylo upraveno pH roztoku na hodnotu asi 9. Po 14 hodinách stání se sraženina odfiltrovala zváženým skleněným filtračním kelímkem G4 a promyla a spláchla ledovou vodou. Sraženina se vážila po vysušení 105 °C. Poměr $M(\text{Pb})/M(\text{Pb}(\text{C}_9\text{H}_6\text{NO})_2)$ má hodnotu 0,41816. Spojený filtrát a promývací voda (300 - 350 ml) byl okyselen 5 ml koncentrované HNO_3 a tímto roztokem byla vypláchnuta kádinka, ve které se sráželo. V roztoku byl zbytkový obsah Cu stanoven metodou ICP-MS.

Stanovení selenu

20 ml roztoku selenu se naředilo destilovanou vodou na objem zhruba 50 ml, roztok byl zneutralizován zředěným roztokem amoniaku (1 + 9) do mírného zápachu amoniaku a potom byl okyselen 1 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové (1 + 9). Roztok se přivedl k varu a selen se vyredukoval přidávkou asi 1 g síranu hydrazinua. Červený selen byl zahřátím k varu převeden na šedý selen, který se odfiltroval zváženým skleněným filtračním kelímkem G4. Po promytí horkou vodou byly ze sraženiny odstraněny matečné louhy trojnásobným promytím 96 % ním ethanolu. Sraženina se vážila po vysušení 105 °C. Obsah zbytkového selenu ve filtrátu a promývacím roztoku byl stanoven metodou ICP-MS.

2.1.4 Výpočet koncentrace

Výslednou koncentraci daného prvku $\rho(\text{Me})$ lze vypočítat jako součet dvou příspěvků:

$$\rho(\text{Me}) = \rho_g(\text{Me}) + \Delta\rho(\text{Me}) \quad (1)$$

$\rho_g(\text{Me})$ je koncentrace získaná gravimetricky:

$$\rho_g(\text{Me}) = f \cdot m_s \cdot \frac{1000}{V_s} \quad (2)$$

kde f je gravimetrický faktor, V_s je pipetovaný objem analyzovaného roztoku a m_s je hmotnost sraženiny. Druhý příspěvek $\Delta\rho(\text{Me})$ je korekce na zbytkové množství kovu rozpuštěné ve filtrátu a promývací vodě:

$$\Delta\rho(\text{Me}) = \frac{V_f \cdot \rho_f(\text{Me})}{V_s} \quad (3)$$

V_f je objem filtrátu a promývacího roztoku, $\rho_f(\text{Me})$ je koncentrace prvku v tomto roztoku.

Stanovení každého prvku bylo provedeno čtyřikrát, získaná data jsou uvedena v tabulce 1.

Tabulka 1 Gravimetrické stanovení prvků v kalibračních roztocích

Prvek	Cd	Cu	Pb	Se
V_s [ml]	99,97	49,97	99,97	19,99
f	0,24612	0,18924	0,41816	1
$m_s - 1$ [g]	0,4049	0,2643	0,2381	0,1993
$m_s - 2$ [g]	0,4047	0,2641	0,2380	0,1995
$m_s - 3$ [g]	0,4047	0,2642	0,2379	0,1997
$m_s - 4$ [g]	0,4048	0,2643	0,2380	0,1998
$\rho_g(\text{Me}) - 1$ [mg/l]	996,9	1000,9	996,0	9972
$\rho_g(\text{Me}) - 2$ [mg/l]	996,4	1000,1	995,6	9982
$\rho_g(\text{Me}) - 3$ [mg/l]	996,4	1000,5	995,1	9992
$\rho_g(\text{Me}) - 4$ [mg/l]	996,6	1000,9	995,6	9997
$\bar{\rho}_g(\text{Me})$ [mg/l]	996,6	1000,6	995,6	9986
s [mg/l]	0,24	0,36	0,34	11
\bar{V}_f [ml]	245	190	330	185
$\rho_f(\text{Me})$ [mg/l]	2,1	0,037	1,6	0,45
$\Delta\rho(\text{Me})$ [mg/l]	5,1	0,11	5,4	4
$\rho(\text{Me})$ [mg/l]	1001,7	1000,7	1000,9	9990

Přesný objem pipet použitých k odměřování vzorku byl zjištěn gravimetrickou kalibrací, viz Tab. 2. Objem pipety byl získán vynásobením průměrné hmotnosti odpipetované destilované vody ($n=5$) koeficientem zahrnujícím jak hustotu vody, tak vztlak vzduchu [2]:

$$V = k \cdot m \quad (4)$$

Tabulka 2 Gravimetrická kalibrace pipet

Pipeta	20 ml	50 ml	100 ml
t [°C]	22	23	22
k	1,003329	1,00352	1,003329
$m - 1$ [g]	19,9141	49,7897	99,9339
$m - 2$ [g]	19,9180	49,7918	99,6809
$m - 3$ [g]	19,9165	49,7901	99,6095

$m - 4$	[g]	19,9258	49,7913	99,6068
$m - 5$	[g]	19,9202	49,7900	99,6423
\bar{m}	[g]	19,9189	49,7906	99,6347
s	[g]	0,0044	0,0009	0,0300
s/\sqrt{n}	[g]	0,0020	0,0004	0,0134
V	[ml]	19,95	49,97	99,97

2.1.5 Výpočet nejistoty koncentrace

Při vyhodnocování nejistot je výhodné zvlášť vyhodnotit nejistotu vlastního gravimetrického

stanovení $\rho_g(\text{Me})$ a nejistotu korekce $\Delta\rho(\text{Me})$. Při odhadu nejistoty $\rho_g(\text{Me})$ byla zvlášť vyhodnocena opakovatelnost a složky nejistoty v opakovatelnosti nezahnuté, viz Tab. 3.

Tabulka 3 Složky nejistoty parametru $\rho_g(\text{Me})$

Parametr	Význam	Složka nejistoty	Standardní nejistota	Způsob zjištění, poznámka
m_s	hmotnost sraženiny	kalibrace vah	$u_r(m_s)=5 \cdot 10^{-6}$	vážení kalibračního závaží 200 g poskytlo údaj 200,0010 g $u_r(m_s)=\Delta m/m$
		opakovatelnost		nejistota obsažena v opakovatelnosti stanovení
V_s	objem vzorku	kalibrace	20 ml $u_r(V_s)=1,0 \cdot 10^{-4}$ 50 ml $u_r(V_s)=8 \cdot 10^{-6}$ 100 ml $u_r(V_s)=1,3 \cdot 10^{-4}$	vypočteno z kalibračních dat: $u(V_s) = \frac{s(V_s)}{\sqrt{n}}$
		opakovatelnost		nejistota obsažena v opakovatelnosti stanovení
		temperace	zanedbatelná	analyzovaný roztok byl před pipetováním vytemperován na $20,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$
f	gravimetrický faktor		Cd: $u_r(f)=4,8 \cdot 10^{-5}$ Cu: $u_r(f)=3,2 \cdot 10^{-6}$ Pb: $u_r(f)=5,3 \cdot 10^{-4}$ Se: $u_r(f)=0$	nejistota vypočtena z nejistot molárních hmotností jednotlivých prvků [3]
opakovatelnost analýzy			Cd: $s(\rho_g(\text{Me}))=0,24 \text{ mg/l}$ Cu: $s(\rho_g(\text{Me}))=0,36 \text{ mg/l}$ Pb: $s(\rho_g(\text{Me}))=0,34 \text{ mg/l}$ Se: $s(\rho_g(\text{Me}))=11 \text{ mg/l}$	experimentálně opakovanou analýzou ($n=4$)

Kombinovaná nejistota parametru $\rho_g(\text{Me})$ se dá vypočítat podle vztahu:

$$u(\rho_g(\text{Me})) = \rho_g(\text{Me}) \cdot \sqrt{\frac{s_r^2(\rho_g(\text{Me}))}{n} + u_r^2(f) + u_r^2(m_s) + u_r^2(V_s)} \quad (5)$$

Nejistotu korekce $\Delta\rho(\text{Me})$ lze odhadnout pomocí následující úvahy: relativní nejistota odměřování objemů pomocí odměrného válce nepřevyšuje hodnotu 0,02; odhad relativní nejistoty stanovení koncentrace pomocí ICP-MS [4] je opět 0,02, Kombinací těchto složek lze proto relativní nejistotu odhadnout jako $u_r(\Delta\rho(\text{Me}))=0,03$.

Tab. 4 shrnuje nejistoty obou složek koncentrace $\rho(\text{Me})$ včetně kombinované nejistoty, která byla vypočtena podle vztahu:

$$u_c(\rho(\text{Me})) = \sqrt{u^2(\rho_g(\text{Me})) + u^2(\Delta\rho(\text{Me}))} \quad (6)$$

Tabulka 4 Složky nejistoty a kombinovaná nejistota $\rho(\text{Me})$ [mg/l]

Prvek Parametr	Cd	Cu	Pb	Se
$\rho_g(\text{Me})$	0,19	0,18	0,57	5,6
$\Delta\rho_g(\text{Me})$	0,15	0,01	0,16	0,1
$\rho(\text{Me})$	0,3	0,2	0,6	6

2.2 Porovnání s jiným kalibračním roztokem metodou FAAS

2.2.1 Instrumentace

Atomový absorpční spektrometr Avanta (GBC, Dandenong, Victoria, Australia)
Elektronické váhy Mettler AB 204 (Švýcarsko).

2.2.2 Chemikálie a činidla

Jako porovnávací roztok byl použit certifikovaný referenční materiál SRM 3114 - Copper Standard Solution (NIST, Gaithersburg, USA) s deklarovaným hmotnostním zlomkem $9,992 \pm 0,015$ mg/g Cu. K okyselení roztoků byly použity kyselina dusičná (65%) čistoty Suprapur (Merck, Darmstadt, SRN). K přípravě a ředění všech roztoků byla použita destilovaná demineralizovaná voda (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2.3 Postupy

Gravimetrické ředění porovnávacího roztoku

Koncentrace porovnávacího roztoku SRM 3114 je příliš vysoká a před použitím musí z něho být gravimetrickým ředěním připraven pracovní roztok. Do předem zvážené 100 ml PE lahvičky se přidá cca 20 ml ředěné kyseliny dusičné (2 % v/v) a lahvička se znovu zváží. Do lahvičky se převede celý obsah 10 ml ampule s koncentrovaným roztokem a lahvička se znovu zváží. Poté se lahvička doplní ředěnou kyselinou dusičnou na objem cca 100 ml a znovu zváží. Hmotnostní zlomek Cu v tomto roztoku je přibližně 1 mg/g.

Příprava roztoků před měřením

Pracovní porovnávací roztok se ředí semigravimetrickým způsobem. Na miskou vah se postaví 100 ml odměrná baňka s cca 20 ml ředěné kyseliny dusičné (2 % v/v) a váhy se vynulují. Pipetou se přidá 1 ml pracovního porovnávacího roztoku a zaznamená se jeho hmotnost. Poté se odměrná baňka doplní po rysku ředěnou kyselinou dusičnou.

Roztok testovaného vzorku se ředí volumetricky za současné kalibrace pipety. Postupuje se tak, že se nejprve odpipetuje 1 ml destilované vody o známé teplotě do váženky a zváží se hmotnostní přírůstek, poté se do 100 ml odměrné baňky odpipetuje 1 ml testovaného roztoku a nakonec je ještě jednou odpipetuje a zváží 1 ml destilované vody. Odměrná baňka se doplní po rysku ředěnou kyselinou dusičnou.

Koncentrace Cu v obou roztocích by měla být přibližně 10 mg/l.

Měření metodou FAAS

Absorbance zředěného roztoku testovaného vzorku a zředěného porovnávacího roztoku se měří na atomovém absorpčním spektrometru za podmínek uvedených v Tab. 5.

Tabulka 5 Podmínky FAAS stanovení Cu na spektrometru GBC Avanta

Parametr	Hodnota
Vlnová délka	324,7 nm
Šířka spektrálního intervalu	0,5 nm
Žhavicí proud výbojky	3,0 mA
Korekce pozadí	D ₂ výbojka
Celková doba integrace signálu	15 s
Plamen	C ₂ H ₂ -vzduch, oxidační
Poloha hořáku	kolmo na optickou osu

2.2.4 Výpočet koncentrace

Příprava pracovního porovnávacího roztoku je popsána v Tab. 6. Výpočtem podle vztahu

$$w_p(\text{Cu}) = \frac{m_3 - m_2}{m_4 - m_1} \cdot w(\text{Cu})_z \quad (7)$$

se určil hmotnostní zlomek Cu v pracovním roztoku, který měl hodnotu 1,082 mg/g.

Tabulka 6 Příprava pracovního porovnávacího roztoku

Parametr	Význam	Hodnota
m_1	hmotnost prázdné lahvičky	17,9079 g
m_2	hmotnost lahvičky s přidavkem zředěné kyseliny dusičné	33,8314 g
m_3	hmotnost lahvičky po přidavku SRM 3114	44,2268 g
m_4	hmotnost lahvičky po doplnění	113,9588 g
$w_z(\text{Cu})$	hmotnostní zlomek Cu v SRM 3114	9,993 mg/g Cu

Koncentrace Cu v testovaném roztoku $\rho(\text{Cu})$ se vypočte podle vztahu:

$$\rho(\text{Cu}) = \frac{m \cdot V_1}{V_2 \cdot V_3} \cdot \frac{A_1}{A_2} \cdot w_p(\text{Cu}) \quad (8)$$

kde m je hmotnost odváženého pracovního porovnávacího roztoku, V_1 je objem odměrné baňky, do které byl odpipetován testovaný roztok, V_2 je objem odpipetovaného testovaného roztoku a V_3 je objem odměrné baňky, do které byl odvážen pracovní porovnávací roztok, A_1 je absorbance testovaného roztoku a A_2 je absorbance porovnávacího roztoku. Analýza byla provedena celkem čtyřikrát. Objemy V_1 a V_3 měly shodnou hodnotu 100 ml a objem V_2 měl hodnotu 1,000 ml, ostatní hodnoty a výsledky jsou uvedeny v Tab. 7.

Tabulka 7 Stanovení koncentrace Cu metodou FAAS

Analýza	m [g]	A_1	A_2	$\rho(\text{Cu})$ [mg/l]
1	1,0155	0,0709	0,0773	107,1
2	1,0126	0,0792	0,0758	999,5
3	1,0119	0,0685	0,0754	995,3
4	1,0126	0,0687	0,0750	1003,6
$\bar{\rho}(\text{Cu})$				1001,4
s				5,1

1 ml pipeta sloužící k odměřování testovaného roztoku (objem V_2) byla během přípravy kalibrována vážením pipetovaného objemu destilované vody, podrobnosti viz kap. 2.1.4. Výsledky kalibrace jsou uvedeny v Tab. 8.

Tabulka 8 Gravimetrická kalibrace 1 ml pipety

t	[°C]	22 °C
k		1,003329
$m - 1$	[g]	0,9972
$m - 2$	[g]	0,9982
$m - 3$	[g]	0,9967
$m - 4$	[g]	0,9963
$m - 5$	[g]	0,9961
$m - 6$	[g]	0,9955
\bar{m}	[g]	0,9967
s	[g]	0,00086
s/\sqrt{n}	[g]	0,00035
V	[ml]	1,0000

2.2.5 Výpočet nejistoty koncentrace

Nejistota hmotnostního zlomku Cu v pracovním porovnávacím roztoku se vypočte podle vztahu

$$u(w_p(\text{Cu})) = w_p \cdot \sqrt{\frac{u^2(w_z(\text{Cu}))}{w_z^2(\text{Cu})} + \frac{2 \cdot u^2(m)}{(m_3 - m_2)^2} + \frac{2 \cdot u^2(m)}{(m_4 - m_1)^2}} \quad (9)$$

Má-li standardní nejistota hmotnostní zlomku Cu v SRM 3114 hodnotu 0,0075 mg/g a odhadne-li se standardní nejistota vážení $u(m)=0,0001$ g, má standardní nejistota hmotnostního zlomku Cu v pracovním porovnávacím roztoku hodnotu $u(w_p)=0,0008$ mg/g.

Jednotlivé složky nejistoty koncentrace $\rho(\text{Cu})$ jsou uvedeny v Tab. 9

Tabulka 9 Složky nejistoty koncentrace $\rho(\text{Cu})$ stanovené metodou AAS

Parametr	Význam	Složka nejistoty	Standardní nejistota	Způsob zjištění, poznámka
m	hmotnost odváženého pracovního porovnávacího roztoku	kalibrace vah	$u_r(m)=5 \cdot 10^{-6}$ hodnota je zanedbatelná	kalibrační závaží 200 g poskytl údaj 200,0010 g $u_r(m)=\Delta m/m$
		opakovatelnost		nejistota obsažena v opakovatelnosti stanovení
$V_1; V_3$	objemy 100 ml odměrných baněk	kalibrace		nejistota obsažena v opakovatelnosti stanovení (pro každou analýzu se používá jiná baňka)
		opakovatelnost		nejistota obsažena v opakovatelnosti stanovení
		temperace	zanedbatelná	roztoky v obou baňkách mají shodnou teplotu, nejistoty se navzájem vykompenzují
V_2	objem 1 ml pipety	kalibrace	$u_r(V_2)=0,00035$	vypočteno z kalibračních dat: $u(V_2) = \frac{s(V_2)}{\sqrt{n}}$
		opakovatelnost		nejistota obsažena v opakovatelnosti stanovení
		temperace	zanedbatelná	analyzovaný roztok byl před pipetováním vytemperován na $20,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$
$w_p(\text{Cu})$	hmotnostní zlomek Cu v pracovním porovnávacím roztoku		$u(w_p(\text{Cu}))=0,0008 \text{ mg/g}$ Cu $u_r(w_p(\text{Cu}))=0,00074$	
$A_1; A_2$				nejistota obsažena v opakovatelnosti stanovení
opakovatelnost analýzy			$s=5,1 \text{ mg/l}$	experimentálně opakovanou analýzou ($n=4$)

Kombinovanou nejistotu koncentrace $\rho(\text{Cu})$ se dá vypočítat podle vztahu:

$$u(\rho(\text{Cu})) = \rho(\text{Cu}) \cdot \sqrt{\frac{s_r^2(\rho(\text{Cu}))}{n} + u_r^2(V_2) + u_r^2(w_p(\text{Cu}))} \quad (10)$$

a její hodnota je 2,65 mg/l Cu.

2.3 Stanovení metodou izotopového zředování

2.3.1 Instrumentace

Hmotnostním spektrometr s indukčně vázaným plazmatem Elan 6000 (Perkin – Elmer, Norwalk, CT, USA) vybavený Meinhardovým zamlžovačem, cyklonickou mlžnou komorou a peristaltickým čerpadlem Gilson 212 pro nasávání vzorku. Jedná se o hmotnostní spektrometr vybavený kvadrupólovým analyzátozem iontů.

Elektronické váhy Mettler AB 204 (Švýcarsko).

2.3.2 Chemikálie a činidla

K izotopově zředovací analýze Cu byl použit komerčně dostupný izotopově obohacený roztok Spike Solution Cu-65 firmy Merck obsahující 9,87 mg/kg ^{65}Cu . Tento roztok obsahuje 99,7074 % ^{65}Cu a 0,2926 % ^{63}Cu . Další izotopově obohacený roztok ^{65}Cu byl připraven rozpuštěním kovové mědi (ORNL, Oak Ridge, USA) obsahující 99,7 % ^{65}Cu a 0,3 % ^{63}Cu . K okyselení roztoků byly použity kyselina dusičná (65%) čistoty Suprapur (Merck, Darmstadt, SRN). K přípravě a ředění všech roztoků byla použita destilovaná demineralizovaná voda (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, USA).

2.3.3 Postupy

Příprava izotopově obohaceného roztoku ORNL

Měděný plíšek o hmotnosti cca 12 mg byl odmaštěn methanolem, očištěn ve zředěné kyselině chlorovodíkové (1:1), opláchnut redestilovanou vodou a osušen. Očištěný materiál byl zvážen v laboratořích ČMI a v 25 ml PP kádince rozpuštěn v 10 ml zředěné kyseliny dusičné (1:1). Pomocí redestilované vody se roztok převede do předem zvážené 125 ml PP lahvičky, doplní na objem cca 120 ml a lahvička s roztokem se znovu zváží. Hmotnostní zlomek Cu v tomto roztoku je přibližně 100 mg/kg.

Příprava roztoků před měřením

Izotopově obohacený roztok se do směsi přidává gravimetricky. Na misku vah se postaví odměrná baňka (100 ml v případě roztoku Merck, 200 ml v případě roztoku ORNL) s cca 20 ml ředěné kyseliny dusičné (2 % v/v) a váhy se vynulují. Pipetou se přidá izotopově obohacený roztok (12 ml pracovního roztoku Merck nebo 3 ml roztoku ORNL) a zaznamená se jeho hmotnost. Testovaný roztok se ředí volumetricky za současné kalibrace pipety (0,5 ml v případě analýzy s roztokem Merck, 1 ml v případě analýzy s roztokem ORNL). Postupuje se tak, že se nejprve odpipetuje destilovaná voda o známé teplotě do váženky a zváží se hmotnostní přírůstek, poté se do příslušné odměrné baňky odpipetuje příslušný objem testovaného roztoku a nakonec je ještě jednou odpipetuje a zváží destilovaná voda. Odměrná baňka se doplní po rysku ředěnou kyselinou dusičnou. Koncentrace mědi s přirozeným izotopovým složením je v obou případech 5 mg/l, koncentrace izotopově obohacené mědi je přibližně 1,5 mg/l.

Měření metodou ID-MS

Intenzity obou izotopů Cu se zjišťují měřením spektrometrem ICP-MS za podmínek uvedených v Tab. 10. Proto, aby se předešlo mnohonásobnému ředění roztoku, měření probíhá v analogovém modu detektoru. Před měřením se musí některé parametry měření (hmotnostní kalibrace, dead time detektoru, napětí na iontové optice, průtok Ar zmlžovačem) nastavit tak, aby se izotopový poměr $^{63}\text{Cu}/^{65}\text{Cu}$ roztoku mědi s přirozeným obsahem (korekční roztok) co nejvíce blížil teoretické hodnotě 2,2436.

Tento roztok se proměřuje střídavě s roztoky vzorků pro určení korekce na hmotnostní diskriminaci. Korekční faktor na hmotnostní diskriminaci se vypočetl jako průměrná hodnota ze tří měření korekčního roztoku měřených před měřením vzorků, uprostřed série vzorků a po skončení měření vzorků. Jeho hodnota byla 0,9962.

Tabulka 10 Podmínky ID-MS stanovení Cu na spektrometru PE Elan 6000

Parametr	Hodnota
Příkon do plazmatu	1 000 W
Doba odečtu signálu (dwell time)	100 ms
Počet skanů na opakování (sweeps/replicate)	10
Počet opakování	30
Celkový integrační čas pro každý isotop	30 s
Měřené isotopy	⁶³ Cu, ⁶⁵ Cu
Způsob měření	Odečet na vrcholu píku
Napětí na iontové optice	5,5 V
AC Rod offset	- 10,5 V
Průtok vzorku	1,0 ml/min
Průtok Ar zmlžovačem	0,80 l/min
Dead time detektoru	35 ns

2.3.4 Výpočet koncentrace

Příprava izotopově obohaceného roztoku z preparátu ORNL je popsána v Tab. 11.

Tabulka 11 Příprava izotopově obohaceného roztoku ORNL

Parametr	Význam	Hodnota
m_1	hmotnost prázdné lahvičky	23,9754 g
$m(\text{Cu})$	hmotnost izotopově obohacené mědi	11,884 mg
m_2	hmotnost lahvičky po doplnění	145,4122 g

Hmotnostní zlomek Cu v tomto roztoku $w_{\text{ORNL}}(\text{Cu})$ se vypočetl podle vztahu:

$$w_{\text{ORNL}}(\text{Cu}) = \frac{m_2}{(m_3 - m_1) \cdot f_{\text{vztlak}}} \cdot \left(1 - w_{\text{nečistoty}} \right) \quad (11)$$

kde f_{vztlak} je korekční faktor na vztlak vzduchu a jeho hodnota je 1,00106. Obsah nečistot byl odhadnut tak, že byly sečteny hmotnostní zlomky stanovených nečistot (0,0001 pro Ca a 0,0001 pro Si) a k nim byl přičten odhad obsahu ostatních nečistot deklarovaných jako „méně než“, který se vypočetl jako součet všech horních limitů vydělený deseti. Tento odhad byl současně zahrnut do nejistoty hmotnostního zlomku Cu v preparátu. Celkový odhadnutý hmotnostní zlomek nečistot v preparátu je 0,0012. Hmotnostní zlomek mědi v roztoku měl hodnotu 97,64 mg/kg.

Koncentrace Cu v testovaném roztoku $\rho(\text{Cu})$ získaná metodou izotopového zředování se vypočte podle vztahu:

$$\rho(\text{Cu}) = \frac{w_{\text{IZO}}(\text{Cu}) \cdot m_{\text{IZO}} \cdot \left(A_{65\text{IZO}} - f \cdot A_{63\text{IZO}} \right)}{V \cdot \left(A_{63\text{N}} - f \cdot A_{65\text{N}} \right)} \cdot \frac{M_{\text{N}}}{M_{\text{IZO}}} \quad (12)$$

kde $w_{IZO}(\text{Cu})$ je hmotnostní zlomek Cu v použitém izotopově obohaceném roztoku (ředěný roztok Merck nebo roztok ORNL), m_{IZO} je hmotnost přídavku tohoto roztoku, V je pipetovaný objem vzorku, f je měřený izotopový poměr korigovaný na hmotnostní diskriminaci, M_N je molární hmotnost Cu s přírodním izotopovým složením, M_{IZO} je molární hmotnost Cu v izotopově obohaceném materiálu, veličiny A_{63} jsou zastoupení izotopu ^{63}Cu ve vzorku (index N) a v izotopově obohaceném materiálu (index IZO), a A_{65} jsou zastoupení izotopu ^{65}Cu (index N) a v izotopově obohaceném materiálu (index IZO). Hodnoty těchto parametrů jsou uvedeny v tabulce 12. Analýza byla provedena za použití obou izotopově obohacených roztoků Cu a celkem čtyřikrát s každým roztokem. Experimentální data a výsledky jsou uvedeny v Tab. 13 a 14.

Tabulka 12

Hodnoty parametrů potřebných pro výpočet koncentrace Cu stanovené metodou ID-MS

Parametr	Význam	Roztok Merck	Roztok ORNL
w_{IZO}	hmotnostní zlomek Cu v izotopově obohaceném roztoku	9,90 mg/kg	97,64 mg/kg
A_{65IZO}	izotopové zastoupení ^{65}Cu v izotopově obohaceném roztoku	0,997074	0,997
A_{63IZO}	izotopové zastoupení ^{63}Cu v izotopově obohaceném roztoku	0,002926	0,003
A_{65N}	izotopové zastoupení ^{65}Cu ve vzorku	0,3083	
A_{63N}	izotopové zastoupení ^{63}Cu ve vzorku	0,6917	
M_N	molární hmotnost Cu s přírodním izotopovým složením	63,546 g/mol	
M_{IZO}	molární hmotnost Cu v izotopově obohaceném materiálu	64,92194 g/mol	64,9218 g/mol

Tabulka 13 Stanovení koncentrace Cu metodou ID-MS za použití izotopově obohaceného roztoku Merck

Analýza	m_{IZO} [g]	f	$\rho(\text{Cu})$ [mg/l]
1	12,4327	1,2606	996,4
2	12,4292	1,2626	999,7
3	12,3934	1,2659	1002,7
4	12,4043	1,2658	1003,6
průměr			1000,6
s			3,3

Tabulka 14 Stanovení koncentrace Cu metodou ID-MS za použití izotopově obohaceného roztoku ORNL

Analýza	m_{IZO} [g]	f	$\rho(\text{Cu})$ [mg/l]
1	3,0502	1,1578	1004,2
2	3,0437	1,1573	1000,6
3	3,0476	1,1593	1005,4
4	3,0475	1,1560	999,5
průměr			1002,4
s			2,8

Pipety sloužící k odměřování testovaného roztoku (objem V) byla během přípravy roztoků kalibrovány vážením pipetovaného objemu destilované vody, podrobnosti viz kap. 2.1.4. Výsledky kalibrací jsou uvedeny v Tab. 15.

Tabulka 15 Gravimetrická kalibrace 0,5 ml a 1 ml pipety

Pipeta		0,5 ml	1 ml
t	[°C]	21,5 °C	21,5 °C
k		1,003179	
$m - 1$	[g]	0,4984	0,9979
$m - 2$	[g]	0,5001	0,9969
$m - 3$	[g]	0,4987	0,9965
$m - 4$	[g]	0,4983	0,9925
$m - 5$	[g]	0,4982	0,9941
m	[g]	0,49872	0,9956
s	[g]	0,00074	0,00222
s/\sqrt{n}	[g]	0,00033	0,00111
V	[ml]	0,5003	0,9987

2.2.5 Výpočet nejistoty koncentrace

Nejistota hmotnostního zlomku Cu v roztoku připraveném z preparátu ORNL se vypočte podle vztahu

$$u(w_{ORNL}(Cu)) = w_{ORNL}(Cu) \cdot \sqrt{\frac{u^2(m(Cu))}{m^2(Cu)} + \frac{2 \cdot u^2(m)}{(m_2 - m_1)^2}} \quad (13)$$

Má-li standardní nejistota hmotnosti izotopově obohacené Cu $u(m(Cu))$ hodnotu 0,01 mg [7] a odhadne-li se standardní nejistota vážení na analytických vahách $u(m)=0,0001$ g, má složka standardní nejistoty hmotnostního zlomku Cu v roztoku hodnotu spojená s vážením hodnotu 0,10 mg/kg. Další složka se nejistoty odpovídá nečistotě preparátu Cu. Má-li hmotnostní zlomek Cu v preparátu hodnotu $99,988 \pm 0,01$, pak standardní nejistota hmotnostního zlomku Cu v roztoku má hodnotu 0,05 mg/kg. Kombinací těchto dvou složek lze dojít ke konečné nejistotě $u(w_{ORNL}(Cu))=0,11$ mg/kg.

Složky nejistoty uplatňující se při odhadu koncentrace Cu v testovaném roztoku jsou uvedeny v tabulce 16.

Tabulka 16 Složky nejistoty koncentrace $\rho(\text{Cu})$ stanovené metodou ICP-MS

Parametr	Význam	Složka nejistoty	Standardní nejistota	Způsob zjištění, poznámka
w_{IZO}	hmotnostní zlomek Cu v izotopově obohaceném roztoku		0,08 mg/kg pro Merk 0,11 mg/kg pro ORNL	údaj výrobce (Merk) výpočet podle rovnice 13 a kombinace s nejistotou obsahu nečistot (ORNL)
m_{IZO}	hmotnost přídatku izotopově obohaceného roztoku	kalibrace vah	$u_r(m)=5 \cdot 10^{-6}$ hodnota je zanedbatelná	kalibrační závaží 200 g poskytló údaj 200,0010 g $u_r(m)=\Delta m/m$
		opakovatelnost		nejistota obsažena v opakovatelnosti stanovení
$A_{65\text{IZO}}$	izotopové zastoupení ^{65}Cu v izotopově obohaceném roztoku		0,000013 pro Merk 0,0001 pro ORNL	údaj výrobce
$A_{63\text{IZO}}$	izotopové zastoupení ^{63}Cu v izotopově obohaceném roztoku		0,000013 pro Merk 0,0001 pro ORNL	údaj výrobce
$A_{65\text{N}}$	izotopové zastoupení ^{65}Cu ve vzorku		0,00075	viz [5]
$A_{63\text{N}}$	izotopové zastoupení ^{63}Cu ve vzorku		0,00075	viz [5]
M_{N}	molární hmotnost Cu s přírodním izotopovým složením		0,002	viz [6]
M_{IZO}	molární hmotnost Cu v izotopově obohaceném materiálu		0,0002 g/mol pro Merk 0,00003 g/mol pro ORNL	údaj výrobce
f	naměřený izotopový poměr			nejistota obsažena v opakovatelnosti stanovení

Složky nejistoty neobsažené v opakovatelnosti byly spojeny pomocí počítačové simulace [8] do společné složky $u_{\text{non-rep}}(\rho(\text{Cu}))$. Kombinovaná nejistota koncentrace se pak vypočte kombinací této složky a opakovatelnosti podle vztahu:

$$u(\rho(\text{Cu})) = \sqrt{u_{\text{non-rep}}^2(\rho(\text{Cu})) + s^2(\rho(\text{Cu}))/n} \quad (14)$$

Výsledky výpočtů jsou v tabulce 17.

Tabulka 17 Výpočet nejistoty koncentrace Cu metodou ID-MS

Parametr	Roztok Merck	Roztok ORNL
$u_{\text{non-rep}}(\rho(\text{Cu}))$	8,2 mg/l	1,2 mg/l
$s(\rho(\text{Cu}))$	3,3 mg/l	2,8 mg/l
$u(\rho(\text{Cu}))$	8,4 mg/l	1,8 mg/l

3 Shrnutí a diskuse výsledků

Tabulka 18 a následně i obrázek 1 shrnují dosažené výsledky ověřování standardních roztoků a porovnávají dosažené nejistoty s deklarovaným rozmezím koncentrací standardním roztoků. protože koncentrace Se v testovaném standardním roztoku byla o řád vyšší, než koncentrace ostatních prvků, jsou pro zjednodušení vzájemného porovnání v obrázcích 1 a 2 vynášeny hodnoty koncentrace a nejistoty koncentrace selenu vydělené deseti.

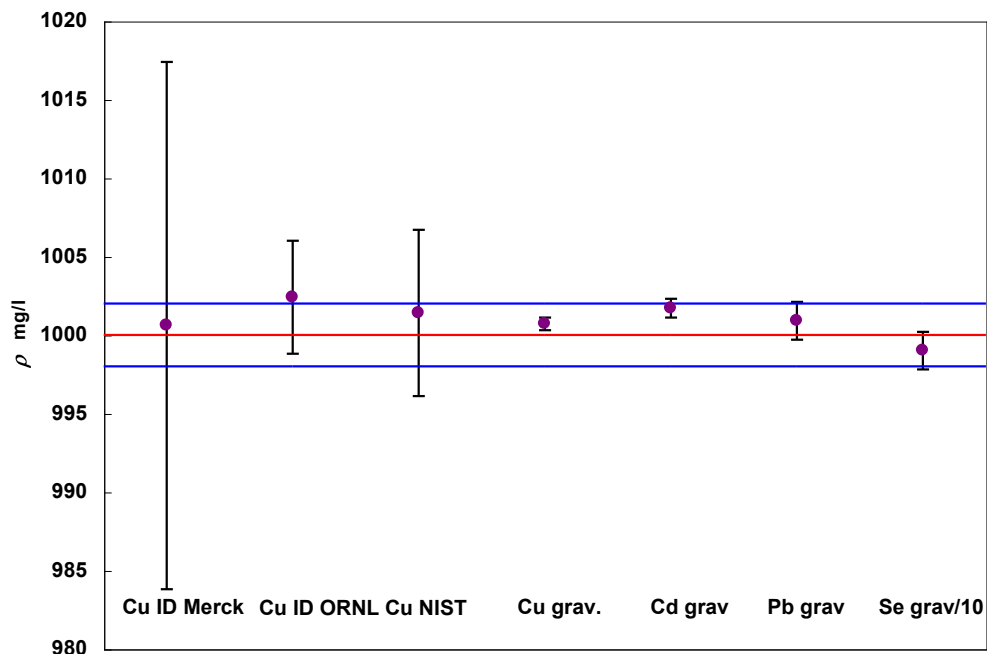
Tabulka 18 Souhrn dosažených výsledků, [mg/l]

Prvek	Cd	Cu	Pb	Se
Vzorek šarže	CZ90101N 0007	CZ90501N 0009	CZ90411N 0007	CZ905110N 0003
Deklarovaná koncentrace	1 000±2	1 000±2	1 000±2	10 000±20
Gravimetrická analýza	1 001,7±0,6	1 000,7±0,4	1 000,9±1,2	9 990±12
Srovnání s PR NIST		1 001,4±5,3		
ID – Merck		1 000,6±16,8		
ID – ORNL		1 002,4±3,6		

Nejdůležitějším závěrem je ta skutečnost, že ve všech případech byla ověřena správnost deklarované koncentrace standardních roztoků. Z porovnání také vyplývá, že v podmínkách běžné chemicko-analytické laboratoře se jako nejvhodnější k ověřování koncentrace standardních roztoků osvědčila gravimetrická analýza, vyžaduje však značnou zručnost a zkušenost v provádění analýz. Výsledky gravimetrických analýz vždy ležely v intervalu rozšířené nejistoty deklarované koncentrace a nejistoty gravimetrické analýzy byly vždy nižší než nejistota deklarované koncentrace. Z toho by mohlo vyplývat, že důsledným ověřováním koncentrace standardních roztoků by se mohla snížit nejistota jejich koncentrace. Není to však potřebné ani účelné, protože deklarovaná rozšířená nejistota koncentrace standardních roztoků ± 2 mg/l, tedy relativní rozšířená nejistota $\pm 0,20$ %, je zcela dostatečná pro účely běžných analýz. Navíc tato nejistota zahrnuje i vliv stárnutí roztoků. Zajímavé je i porovnání systematické a náhodné složky nejistoty v obrázku 2. V tomto obrázku složka standardní nejistoty odpovídající opakovatelnosti je již zohledňuje to, že výsledek analýzy byl získán jako průměr čtyř nezávislých opakování. Z obrázku vyplývá, že pouze v případě stanovení olova nabývá systematická složka nejistoty na významu. Je to způsobeno zvýšenou nejistotou gravimetrického faktoru v důsledku vyšší nejistoty přírodního izotopového složení olova.

Ověření standardních roztoků srovnáním s metrologickou autoritou je postup, který lze také aplikovat v běžné laboratoři. Kromě atomové absorpční spektrometrie lze použít i jiné robustní a nepříliš citlivé metody jako je např. optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Kromě vysoké ceny primárních roztoků NIST je však určitou nevýhodou poměrně vysoká dosažená hodnota nejistoty výsledků. Složku spojenou s opakovatelností výsledků lze samozřejmě dostatečně snížit vyšším počtem analýz, nezměněna zůstává však ale systematická složka nejistoty. Její hodnota je určena převážně nejistotou vlastní koncentrace primárního roztoku; relativní hodnota rozšířené nejistoty je zhruba $\pm 0,15$ %.

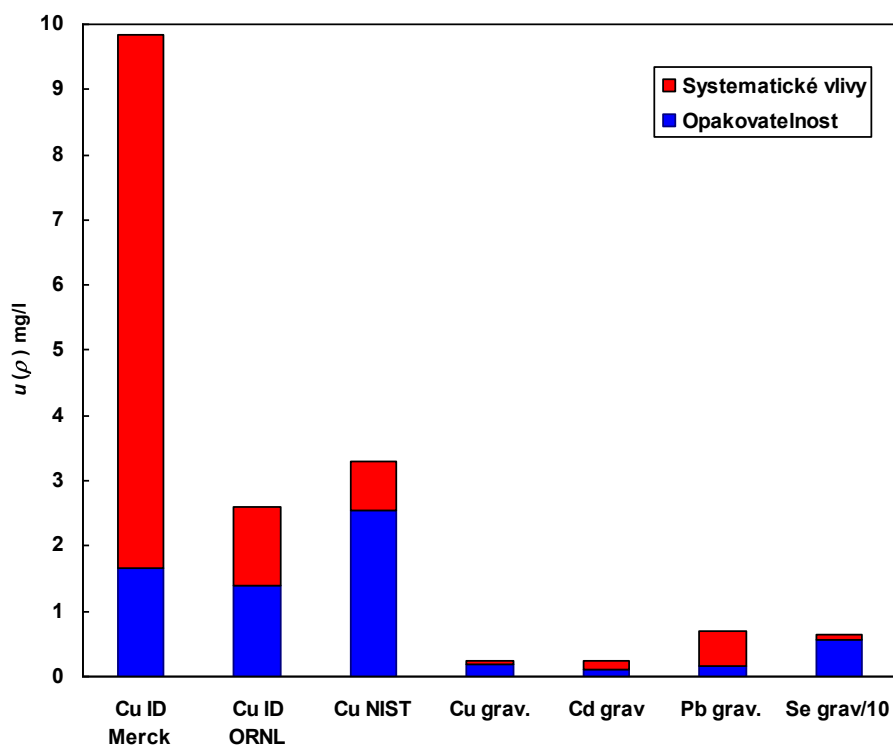
Izotopové zředování prováděné pomocí běžného hmotnostního spektrometru a za pomoci běžně dostupného izotopově obohaceného standardu se díky velmi vysoké hodnotě nejistoty ukázalo jako metoda nejméně vhodná pro účel ověřování koncentrace standardních roztoků.



Obrázek 1 Porovnání dosažených rozšířených nejistot s deklarovanými koncentracemi

Složka nejistoty spojená s opakovatelností je opět vyšší než v případě gravimetrických analýz. Její snížení současným zvýšením počtu analýz je za předpokladu zachování nízkého ředění vzorku dosti nákladné: výše popsaným postupem analýzy lze z jednoho 50 ml balení izotopově obohaceného roztoku obsahujícího cca 10 mg/kg Cu lze provést pouze čtyři nezávislé analýzy roztoku obsahujícího 1000 mg/l Cu. Počet analýz lze zvýšit vyšším ředěním vzorku, které však může vést k nechtěnému zvýšení nejistoty. Velkým nedostatkem je však vysoká nejistota obsahu Cu v izotopově obohaceném materiálu Merck (relativní rozšířená nejistota $\pm 1,6\%$). Certifikát doprovázející materiál bohužel nedokumentuje způsob odhadu této nejistoty, podle prvního pohledu se však zdá vysoce nadhodnocený.

Druhý izotopově obohacený roztok byl připraven přímo v laboratoři rozpuštěním izotopově obohacené kovové mědi ORNL. Izotopové složení tohoto preparátu je velice blízké roztoku Merck, který byl zřejmě připraven z mědi stejného původu. Koncentrace tohoto roztoku byla vypočtena z navážky a odhadnuté čistoty preparátu a nebyla již dále ověřována. Slabinou tohoto postupu je dosti spekulativní odhad obsahu nečistot a zanedbání možných chyb při manipulaci s roztokem během jeho přípravy, přednost je nutno dávat izotopově obohacenému roztoku, jehož koncentrace byla následně ověřena.



Obrázek 2 Porovnání náhodné a systematické složky standardních nejistot.

4 Literatura

- 1 Jílek Antonín, Kořa Jan: Vážková analýza a elektroanalýza, díl II, Technicko-vědecké vydavatelství, Praha 1951.
- 2 Sýkora Václav: Chemickoanalytické tabulky, SNTL, Praha 1976.
- 3 Mestek O., Suchánek M, Hrubý V.: Accred. Qual. Assur. 4, 307-312, 1999.
- 4 Mestek Oto, Komínková Jana: Nejistoty měření metodou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plasmatem, Sborník kurzu „Nejistoty a návaznost výsledků spektroskopických metod“ str. 83 - 96, pořádá Spektroskopická společnost J.M.Marci, 29.10.-1.11. 2001, Řež u Prahy.
- 5 Rosman K. J. R., Taylor P. D. P.: *Pure Appl. Chem.* 70, 217 (1998).
- 6 Coplen T. B.: *Pure Appl. Chem.* 73, 667 (2001).
- 7 Protokol o zkoušce č. 1053-PT-3365-07, Český metrologický institut, Praha 2007.
- 8 Mestek O., Suchánek M., Koplík R., Fingerová H., Čurdová E.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 364, 203 (1999).

Část 1.2

**Stanovení kovů v biotické matrici metodou ICP-MS
Stanovení Cu, Zn a Se v plné krvi
Plán nejistot**

1 Úvod

V této práci byl učiněn pokus propojit metrologii v chemii s rychle rozvíjejícím se oborem – metrologií v biologických vědách (biometrologie). Návaznost se v tomto oboru řídí normou ISO 17511. Demonstrace návaznosti pro některé analýzy se v této normě stejná, jaká se používá v chemických měřeních. Kovy ve složitých biotických maticích jsou příkladem takových analytů.

V této práci byla zvolena plná krev jako reprezentant složité biotické matrice. Výběr kovů byl konzultován s Ústavem klinické biochemie 1. LF UK. Je to i z toho důvodu, že Metrologická a zkušební laboratoř VŠCHT, která je přidruženou laboratoří ČMI, se snaží rozšířit pole své působnosti do perspektivních oblastí metrologie.

2 Instrumentace

Hmotnostním spektrometr s indukčně vázaným plazmatem Elan 6000 (Perkin – Elmer, Norwalk, CT, USA) vybavený Meinhardovým zamlžovačem, cyklonickou mlžnou komorou a peristaltickým čerpadlem Gilson 212 pro nasávání vzorku. Jedná se o hmotnostní spektrometr vybavený kvadrupólovým analyzátozem iontů.

Elektronické váhy Mettler AB 204 (Švýcarsko).

Hmotnostním spektrometr s indukčně vázaným plazmatem Elan 6000 (Perkin – Elmer, Norwalk, CT, USA) vybavený Meinhardovým zamlžovačem, cyklonickou mlžnou komorou a peristaltickým čerpadlem Gilson 212 pro nasávání vzorku. Jedná se o hmotnostní spektrometr vybavený kvadrupólovým analyzátozem iontů.

Elektronické váhy Mettler AB 204 (Švýcarsko).

3 Činidla a standardy

Standardní roztoky Cu, Se a Zn o koncentraci 1000 mg.L^{-1} (Merck, Darmstadt, SRN) byly použity k přípravě pracovních standardů obsahujících 20 mg.L^{-1} Cu, 5 mg.L^{-1} Se a 100 mg.L^{-1} Zn. Pracovní standardy sloužily k přípravě kalibračních standardů, obsahujících 40, 80 a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ Cu; 10, 20 a $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ Se; 200, 400 a $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ Zn. Kalibrační standardy i reagenční blanky byly spikovány roztokem, obsahujícího komponenty simulující plnou krev: 6 g NaCl, 3,3 g NaNO₃, 0,4 g KCl, 0,6 g Ca(NO₃)₂.4H₂O, 6,6 g cysteine.HCl.H₂O, 2,23 g FeCl₃.6H₂O, 0,07 g KBr. Roztok byl doplněn vodou na 100 mL. Roztok inditě soli (100 mg.L^{-1} , Analytika, Praha, ČR) byl použit jako interní standard. Pro stabilizaci krve byl použit Triton X-100 (Aldrich, Milwaukee, WI, USA).

4 Pracovní postup

Vzorky krve nebo plasmy byly zpracovány tímto postupem: 1 mL 1% Tritonu X-100 bylo pipetováno do 10 mL odměrné baňky, přidáno bylo 1 mL krve nebo plasmy, 7 mL vody a promícháno. Poté bylo přidáno 2 mL $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$ HNO₃ a 0,2 mL roztoku In(III) o koncentraci 5 mg.L^{-1} . Roztok byl doplněn vodou po značku. Roztok je stabilní minimálně 2 dny. Poté byla provedena ICP-MS analýza. Parametry byly následující:

Parametr	Hodnota
Příkon do plazmatu	1 000 W
Doba odečtu signálu (dwell time)	50 ms
Počet skanů na opakování (sweeps/replicate)	20
Počet opakování	5
Celkový integrační čas pro každý isotop	30 s
Měřené isotopy	⁶⁵ Cu, ⁷⁷ Se, ⁶⁶ Zn
Způsob měření	Odečet na vrcholu píku
Napětí na iontové optice	5,5 V
AC Rod offset	- 10,5 V
Průtok vzorku	1,0 ml/min
Průtoku Ar zmlžovačem	0,80 l/min
Dead time detektoru	35 ns

Všechny vzorky byly měřeny v duplikátech.

5 Odhad nejistoty měření

5.1 Náhodné vlivy

Tabulka I RSD faktorů ovlivňujících opakovatelnost měření kovů metodou ICP-MS

Faktor	RSD [%]	Postup při odhadu
Pipetování 1 mL vzorku	0.30	Opakované vážení pipetovaného vzorku
Pipetování 0.2 mL vzorku interního standardu	0.33	Repeated weighing of pipetted volume of water
Měření intensity ICP-MS signálu	2.0 - 3.0 pro Cu 3.0 - 4.0 pro Se 2.5 - 3.5 pro Zn	Opakované měření intensity signálu různých vzorků krve a plasmatu
Experimentální hodnota opakovatelnosti	1.7 - 2.0 for Cu 2.5 - 6.0 for Se 2.1 - 2.5 for Zn	According to equation (1)

Hlavním zdrojem nejistoty je opakované měření signálu. Tyto vlivy byly konstantní v celém použitém koncentračním rozsahu: (viz rozsah kalibračních roztoků).

5.2 Odhad kombinované nejistoty měření

Tabulka II Hlavní zdroje nejistoty měření

	RSu [%]		
	Cu	Se	Zn
Opakovatelnost	1.7 - 2.0	2.5 - 6.0	2.1 - 2.5
Systematické factory (interference)*	0.4	0.5	0.4
Slope of calibration line	0.7	0.7	0.7
Combined uncertainty	1.9 -2.2	2.6 - 6.1	2.2 - 2.6

* RSD se vztahuje k obvyklé koncentraci prvků v plasmatu:
1 000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Cu, 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Se, 1 000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Zn

Z tabulky je patrné, že při analýze složitě biotické matrice je dominantní složka nejistoty opakovatelnost měření ICP signálu. Ze zkušeností, které Metrologická a zkušební laboratoř má s tímto měřením, se dá toto tvrzení zobecnit na jakoukoli biotickou matrici.

V tomto případě jsme zvolili obtížnější postup: analýza vzorku bez předchozí přípravy. Pro případ vzorku, který je mineralizován, je situace jednodušší neboť měříme čisté roztoky kovových iontů.

Část 13

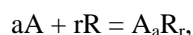
Metoda měření koncentrace arsenu Plán nejistot

Ověření obsahu As v oxidu arsenitém primární metodou měření Coulometrie

1 Úvod

Coulometrická titrace - coulometrie za konstantního proudu. Při této metodě se titrační činidlo generuje elektrolýzou základního elektrolytu konstantním proudem přímo v titrační nádobce - interní generace.

Reaguje-li stanovovaná látka A s titračním činidlem R dle rovnice:



pak množství stanovované látky vypočteme ze vztahu

$$n_A = I \cdot t \cdot a / z \cdot F \cdot r,$$

n_Alátkové množství stanovované látky

a, rkoeficienty stechiometrické reakce

Igenerační proud

tdoba generace

FFaradayova konstanta ($F = 96\,485,56 \text{ C/mol}$)

zpočet nábojů vyměňovaných při elektrodové reakci

2 Instrumentace

Coulometrický analyzátor, model CA 1, je přístroj, který využívá možnosti coulometrie za konstantního proudu v kombinaci s metodou elektrometrické indikace.

Přístroj se skládá ze skříně (elektronická část analyzátoru), elektrolytické nádoby a magnetického míchadla. K přístroji je připojen monitor a klávesnice.

V titrační nádobce jsou umístěny čtyři elektrody, dvě generační (pracovní a pomocná), dvě indikační, teploměr a přívod inertního plynu (dusík). Pracovní elektroda je velkoplošná platinová elektroda. Pomocná elektroda je též velkoplošná platinová elektroda oddělená od analyzovaného roztoku solným můstkem. Indikační elektrody jsou dvě velkoplošné platinové elektrody.

3 Činidla

sublimovaný As_2O_3 (ICP MS kontrola nečistot, neobsahuje sloučeniny Sb)

10%ní NaOH

3 M - H_2SO_4

0,1M - KI

Na_2CO_3

0,5M - Na_2SO_4

tři tlumivé roztoky NaOH - KH_2PO_4 (pH = 6 - 8)

4 Pracovní postup

1. Kalibrace odměrného nádobí:

- kalibrace 100 mL pipety (firma Hamilton)
- kalibrace odměrných baněk

2. Nastavení provozních parametrů na coulometrickém analyzátoru

Nastavení analyzátoru níže uvedené parametry:

Pracovní elektroda: Pt / pozitivní
Pomocná elektroda: Pt
Typ indikace: amperometrická
Indikační článek: Pt - Pt
Generační mód: konstantní
Způsob generace: kontinuální
Polarizační napětí: $U_{POL} = 150 \text{ mV}$
Generační proud, $I_g = 10,07 \text{ mA}$
Indikační proud, $I_{ref} = 50 \text{ }\mu\text{A}$
Počet vyměněných elektronů: 2
Molární hmotnost (As_2O_3): 197,84 g/mol
Faradayova konstanta: 96 484,6 C/mol
Počet otáček míchadla: 800 otáček za minutu

3. Příprava roztoku As(III) z As_2O_3

Do kádinky objemu 25 mL se diferenčně naváží 0,2506 g As_2O_3 (s přesností na 0,1 mg). Navážka se rozpustí v 2,5 mL 10%ního NaOH, okyselí se 2,5 mL 3M - H_2SO_4 . Roztok se kvantitativně převede do odměrné baňky objemu 25 mL a doplní destilovanou vodou po značku.

4. Příprava zásobního roztoku KI (0,1M)

Do kádinky objemu 800 mL se naváží 16,6 g KI a 0,53 g Na_2CO_3 . Navážka se rozpustí ve 400 mL destilované vody. Roztok se kvantitativně převede do odměrné baňky objemu 1000 mL a doplní destilovanou vodou po značku.

5. Příprava pomocného elektrolytu 0,5M - Na_2SO_4 (náplň elektrody)

Do kádinky objemu 250 mL se naváží 17,75 g Na_2SO_4 . Navážka se rozpustí ve 170 mL destilované vody. Roztok se kvantitativně převede do odměrné baňky objemu 250 mL a doplní destilovanou vodou po značku.

6. Tři tlumivé roztoky NaOH - KH_2PO_4 (pH = 6 - 8)

a) 0,1M - KH_2PO_4

Do kádinky objemu 600 mL se diferenčně naváží 13,6091g KH_2PO_4 . Navážka se rozpustí ve 400 mL destilované vody. Roztok se kvantitativně převede do odměrné baňky objemu 1 l a doplní destilovanou vodou po značku.

b) 0,1M - NaOH

Do kádinky objemu 400 mL se naváží 2 g NaOH. Navážka se rozpustí ve 300 mL destilované vody. Roztok se kvantitativně převede do odměrné baňky objemu 500 mL a doplní destilovanou vodou po značku.

c) tlumivý roztok NaOH - KH_2PO_4 pH = 6

28,2 mL 0,1M - NaOH a 250 mL 0,1M - KH_2PO_4 do odměrné baňky objemu 500 mL a doplní destilovanou vodou po značku.

d) tlumivý roztok NaOH - KH_2PO_4 pH = 7

147,7 mL 0,1M - NaOH a 250 mL 0,1M - KH_2PO_4 do odměrné baňky objemu 500 mL a doplní destilovanou vodou po značku.

e) tlumivý roztok NaOH - KH_2PO_4 pH = 8

234,25 mL 0,1M - NaOH a 250 mL 0,1M - KH_2PO_4 do odměrné baňky objemu 500 mL a doplní destilovanou vodou po značku.

7. Slepý pokus

Hodnota slepého pokusu je informací o obsahu reaktivních nečistot v použitých chemikáliích. Odpipetuje se 25 mL 0,1M - KI a 10 mL tlumivého roztoku o pH = 6 – 8 (základní elektrolyt) do titrační nádoby.

Tlumivý roztok pH = 7: 5 měření při různých polarizačních napětích $U_p = 100, 120, 140, 150, 160, 180, 200$ mV.

Tlumivý roztok pH = 6: 5 měření při polarizačním napětí $U_p = 150$ mV.

Tlumivý roztok pH = 8: 5 měření při polarizačním napětí $U_p = 150$ mV.

8. Vyhodnocování titračních křivek

Grafické vyhodnocování titrační křivky metodou nejmenších čtverců je součástí software přístroje. Vybrané úseky pro proložení se zjišťují manuálně, nejistota proložení byla určena 5x opakovaným proložením stejné titrační křivky.

9. Analýza vzorku – roztok As(III)

Ze vzorku (roztok vzniklý rozpuštěním sublimovaného As_2O_3) odměříme 100 mL a přidáme jej k základnímu elektrolytu (25 mL 0,1M - KI a 10 mL tlumivého roztoku o pH = 6 – 8). Provede se analýza a dále pokračujeme jako v bodě 8.

5 Zpracování naměřených dat

5.1 Kalibrace 100 μ L pipety (firma Hamilton)

teplota v laboratoři: 19 °C

hustota vody při teplotě 19 °C - $\rho = 0,998432 \text{ g.mL}^{-1}$ (odečet z analytických tabulek)

m [g]	m_K [g]	V [mL]	V [μ L]
0.0989	0.0990	0.09916	99.1602
0.0992	0.0993	0.09946	99.4610
0.1008	0.1009	0.10107	101.0652
0.1007	0.1008	0.10096	100.9650
0.1009	0.1010	0.10117	101.1655
0.1003	0.1004	0.10056	100.5639
0.1006	0.1007	0.10086	100.8647
0.0999	0.1000	0.10016	100.1629
0.1011	0.1012	0.10137	101.3660
0.1010	0.1011	0.10127	101.2657

$$m_{\text{průměr.}} = 0.1003 \text{ g}$$

$$s_m = 0.00076768 \text{ g}$$

$$m_{K\text{průměr.}} = 0.1004 \text{ g}$$

$$s_{mK} = 0.00076849 \text{ g}$$

$$V_{\text{průměr.}} = 0.1006 \text{ mL}$$

$$s_V = 0.0007697 \text{ mL}$$

$$V_{\text{průměr.}} = \mathbf{100.60} \text{ } \mu\text{L}$$

$$s_V = \mathbf{0.77} \text{ } \mu\text{L}$$

Vysvětlivky:

$m_{\text{průměr.}}$ aritmetický průměr hmotností vody [g]

s_m výběrová směrodatná odchylka hmotností vody [g]

$m_{K\text{průměr.}}$ aritmetický průměr hmotností vody zkorigovaných na vztlak vzduchu [g]

s_{mK}výběrová směrodatná odchylka hmotností vody zkorigovaných na vztlak vzduchu [g]

$V_{\text{průměr.}}$ aritmetický průměr objemů vody [mL]

s_V výběrová směrodatná odchylka objemů vody [mL]

mhmotnost vody [g]

m_Khmotnost vody zkorigovaná na vztlak vzduchu [g]

V**objem vody [mL]**

5.2 Kalibrace odměrné baňky 25 mL

teplota v laboratoři: 22,5 °C

hustota vody při teplotě 22,5 °C - $\rho = 0,997682 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (odečet z analytických tabulek)

m_B [g]	m_{B+VODA} [g]	m_{VODA} [g]	m_K [g]	V [ml]
17.7544	42.6706	24.9162	24.9426	25.0005
17.7416	42.6207	24.8791	24.9055	24.9633
17.7358	42.6750	24.9392	24.9656	25.0236
17.7604	42.6475	24.8871	24.9135	24.9713
17.7807	42.6642	24.8835	24.9099	24.9677

$$m_{\text{průměr.}} = 24.9010 \text{ G}$$

$$s_m = 0.02583287 \text{ G}$$

$$m_{K\text{průměr.}} = 24.9274 \text{ G}$$

$$s_{mK} = 0.02586025 \text{ G}$$

$$V_{\text{průměr.}} = \mathbf{24.98 \text{ mL}}$$

$$s_V = \mathbf{0.03 \text{ mL}}$$

Vysvětlivky:

$m_{\text{průměr.}}$ aritmetický průměr hmotností vody [g]

s_m výběrová směrodatná odchylka hmotností vody [g]

$m_{K\text{průměr.}}$ aritmetický průměr hmotností vody zkorigovaných na vztlak vzduchu [g]

s_{mK} výběrová směrodatná odchylka hmotností vody zkorigovaných na vztlak vzduchu [g]

$V_{\text{průměr.}}$ aritmetický průměr objemů vody [ml]

s_V výběrová směrodatná odchylka objemů vody [ml]

m hmotnost vody [g]

m_K hmotnost vody zkorigovaná na vztlak vzduchu [g]

V **objem vody [ml]**

m_{B+VODA} hmotnost odměrné baňky a vody [g]

m_B hmotnost odměrné baňky [g]

m_{VODA} hmotnost vody [g]

5.3 Slepý pokus

Měření byla 5x opakována v delším časovém období, každá titrační křivka byla 5x opakovaně vyhodnocena.

Výběrová směrodatná odchylka obsahuje tedy nejistotu vyhodnocení a nejistotu dlouhodobé reprodukovatelnosti.

pH	6,0	7,0	8,0
t [s]	8,03	8,78	8,96
s_t [s]	0,0018	0,0046	0,0027

5.4 Měření roztoku As(III) vzniklého rozpuštěním As₂O₃

Pro zjištění dlouhodobé reprodukovatelnosti měření byla měření 5x opakována v delším časovém období, každá titrační křivka byla 5x opakovaně vyhodnocena.

pH	6,0	7,0	8,0
t [s]	199,20	199,08	199,40
s _t [s]	0,26	0,10	0,10
RSD [%]	0,13	0,05	0,05

5.5 Vypočet hmotnostního zlomku a rozšířené nejistoty

Rovnice měření

$$w = \frac{I_g \cdot (t_{vzorek} - t_{slepý}) \cdot M \cdot 25}{4 \cdot F \cdot m_v \cdot V_a}$$

w hmotnostní zlomek As₂O₃

I_g velikost generačního proudu [A] (*I_g* = 10,07 mA)

t_{vzorek} čas odpovídající konci titrace vzorku[s]

t_{slepý} čas odpovídající konci titrace slepého vzorku [s]

M molární hmotnost As₂O₃ (*M* = 197,8414 g.mol⁻¹)

F Faradayova konstanta [96 485,56 C.mol⁻¹]

V_aobjem alikvoty (*V_a* = 100 ml)

m_v navážka sublimovaného As₂O₃

Kragtenův způsob odhadu nejistot

V následujících tabulkách jsou uvedeny úplná schémata výpočtu hodnot hmotnostních zlomků As₂O₃ a rozšířené nejistoty. V nejistotě objemových operací jsou zahrnuty příspěvky na tepelnou roztažnost vody.

Tabulka I Měření při pH 6
Hmotnostní zlomek As₂O₃

Vstupní data

pH=6	hodnota	u	I _g Rsu	10.07	F	96 485.56						
t _{vzorek}	199.20	0.26	0.13%			199.46	199.20	199.20	199.20	199.20	199.20	
t _{slepý}	8.03	0.0018	0.02%			8.03	8.03	8.03	8.03	8.03	8.03	
M	197.8414	0.00051	0.00%			197.84	197.84	197.84	197.84	197.84	197.84	
V	24.98	0.034	0.14%			24.98	24.98	24.98	25.01	24.98	24.98	
V _a	0.1006	0.00077	0.77%			0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	
m _v	0.2452	0.0001	0.04%			0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	
w	0.999351	0.007841	0.78%			1.00071	0.9993416	0.999354	1.000711	0.99176	0.998944	
						0.001359	-9.41E-06	2.58E-06	0.00136	-0.00759	-0.00041	
w	99.94%	0.78% 1,56%	k=2			1.847E-06	8.854E-11	6.64E-12	1.85E-06	5.76E-05	1.66E-07	6.149E-05
				index		3.0%	0.0%	0.0%	3.0%	93.7%	0.3%	

Tabulka II Měření při pH 7

Hmotnostní zlomek As₂O₃

Vstupní data

pH=7	hodnota	U	I _g Rsu	10.07	F	96 485.56					
t _{vzorek}	199.08	0.1	0.05%	199.18	199.08	199.08	199.08	199.08	199.08	199.08	199.08
t _{slepý}	8.78	0.0046	0.05%	8.78	8.78	8.78	8.78	8.78	8.78	8.78	8.78
M	197.8414	0.00051	0.00%	197.84	197.84	197.84	197.84	197.84	197.84	197.84	197.84
V	24.98	0.034	0.14%	24.98	24.98	24.98	25.01	24.98	24.98	24.98	24.98
V _a	0.1006	0.00077	0.77%	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
m _v	0.2452	0.0001	0.04%	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
w	0.994803	0.007705	0.77%	0.995326	0.994779	0.994806	0.996157	0.987247	0.994398	0.994398	0.994398
w	99.48%	0.77% 1,54% k=2		0.000523	-2.4E-05	2.56E-06	0.001354	-0.00756	-0.00041	-0.00041	-0.00041
				2.733E-07	5.782E-10	6.58E-12	1.83E-06	5.71E-05	1.64E-07	5.937E-05	5.937E-05
index				0.5%	0.0%	0.0%	3.1%	96.2%	0.3%	0.3%	0.3%

Tabulka III Měření při pH 8

Hmotnostní zlomek As₂O₃

Vstupní data

pH=8	hodnota	U	I _g Rsu	10.07	F	96 485.56						
t _{vzorek}	199.40	0.1	0.05%			199.50	199.40	199.40	199.40	199.40	199.40	
t _{slepý}	8.96	0.0046	0.05%			8.96	8.96	8.96	8.96	8.96	8.96	
M	197.8414	0.00051	0.00%			197.84	197.84	197.84	197.84	197.84	197.84	
V	24.98	0.034	0.14%			24.98	24.98	24.98	25.01	24.98	24.98	
V _a	0.1006	0.00077	0.77%			0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	
m _v	0.2452	0.0001	0.04%			0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	
w	0.995535	0.007711	0.77%			0.996058	0.9955109	0.995537	0.99689	0.987973	0.995129	
						0.000523	-2.4E-05	2.57E-06	0.001355	-0.00756	-0.00041	
w	99.55%	0.77% 1,54%				2.733E-07	5.782E-10	6.59E-12	1.84E-06	5.72E-05	1.65E-07	5.946E-05
			k=2									
				index		0.5%	0.0%	0.0%	3.1%	96.2%	0.3%	

6 Zhodnocení

Coulometrická titrace se ukázala být vhodnou primární metodou pro stanovení As v oxidu arsenitém i v roztocích, které se připravují jako roztoky kalibrační. As_2O_3 je jedna z mála substancí, která se dá připravit v čistém stavu a slouží tedy jako primární standard (PRM). Rozšířená nejistota výsledku je vyhovující. Největším příspěvkem k nejistě jsou objemové operace, hlavně pipetování alikvotního podílu. Pokud bychom použily váhy s vyšší třídou přesnosti a navažovali oxid arsenitý přímo do titrační nádoby, snížila by se nejistota podstatným způsobem.

Výsledek měření je závislý na pH, což svědčí o tom, že výtěžek elektrodové reakce je závislý na podmínkách měření.

Část 2
Metody stanovení polyaromatických uhlovodíků v biotické matrici
Odhad nejistot

1 Úvod

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) představují jednu z nejdůležitějších skupin environmentálních polutantů, které mají karcinogenní a mutagenní účinky. Dostávají se i do potravního řetězce a jsou tedy i předmětem testování shody potravinových výrobků s legislativními limity a specifikacemi.

Pro stanovení správnosti a rozšířené nejistoty výsledků často chybí bohužel relevantní certifikované referenční materiály. Cílem této práce je odhad nejistoty výsledků stanovení PAU ve složité biotické matici – olivovém oleji. Tato studie musí předcházet snahám o přípravu a certifikaci českého referenčního materiálu.

Při analýze komplexní matrice a izolaci cílových analytů jsou PAU spoluizolovány s dalšími složkami matrice (v případě olivového oleje jsou to hlavně lipidy). Tyto složky by negativně ovlivňovaly identifikaci a kvantifikaci PAU a proto musí být před konečným získáním instrumentálních signálů odstraněny. Efektivním způsobem je použití gelové permeační chromatografie (GPC) jako čistícího stupně, který předchází HPLC stanovení, případně dočištění na sloupci silikagelu, které předchází GC stanovení.

2 Princip metody měření

PAU byly extrahovány z vhodně upravené matrice olivového oleje do organického rozpouštědla. Separace PAU od případných koextraktů se provádí pomocí gelové permeační chromatografie (GPC), popřípadě dočištěním na sloupci silikagelu. PAU se stanoví pomocí reverzní vysokoúčinné kapalínové chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC/FLD) a plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC/MS). Analyty jsou identifikovány a kvantifikovány na základě porovnání s příslušnými standardy metodou vnějšího standardu; pro eliminaci případných matriční efektů, ztrát analytů během analytického procesu apod. lze alternativně využít metodu izotopového zředování.

3 Experimentální část

Přehled stanovovaných analytů je uveden v tabulce I

Tabulka I Přehled stanovovaných analytů

Phe	Phenanthren	CAS: 000085-01-800
Ant	Anthracen	CAS: 000120-12-700
Flt	Fluoranthen	CAS: 000206-44-000
Pyr	Pyren	CAS: 000129-00-000
B[c]Fln	Benzo[c]fluoren	CAS: 00000205-12-9
B[a]A	Benzo[a]anthracen	CAS: 000056-55-300
Chr	Chrysen	CAS: 000218-01-900
CP[c,d]P	Cyklopenta[c,d]pyren	CAS: 00027208-37-3
5-MeChr	5-Methylchrysen	CAS: 00003697-24-3
B[b]F	Benzo[b]fluoranthen	CAS: 000205-99-200
B[k]F	Benzo[k]fluoranthen	CAS: 000207-08-900
B[j]F	Benzo[j]fluoranthen	CAS: 00000205-82-3
B[a]P	Benzo[a]pyren	CAS: 000050-32-800
DB[a,h]A	Dibenzo[a,h]anthracen	CAS: 000053-70-300

I[1,2,3- <i>cd</i>]P	Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyren	CAS: 00000193-39-5
B[<i>g,h,i</i>]P	Benzo[<i>g,h,i</i>]perylene	CAS: 000191-24-200
DB[<i>a,l</i>]P	Dibenzo[<i>a,l</i>]pyren	CAS: 00000191-30-0
DB[<i>a,e</i>]P	Dibenzo[<i>a,e</i>]pyren	CAS: 00000192-65-4
DB[<i>a,i</i>]P	Dibenzo[<i>a,i</i>]pyren	CAS: 00000189-55-9
DB[<i>a,h</i>]P	Dibenzo[<i>a,h</i>]pyren	CAS: 00000189-64-0

3.1 Postup měření

Olej/tuk je nutné před navažováním vytemperovat na laboratorní teplotu, případně zahřátím rozpustit v sušárně (zpravidla do 40 °C) a zhomogenizovat promícháním.

Z homogenního vzorku oleje/kapalného tuku se naváží cca 2 - 3 g (s přesností na 0,001 g) do odměrné baňky o objemu 10 ml a doplní chloroformem. Takto připravené chloroformové roztoky mohou být přímo aplikovány na kolonu GPC.

Frakční separace polycyklických aromatických uhlovodíků od koextrahovaných látek (lipidů, pigmentů) se provádí pomocí gelové permeační chromatografie (GPC) využívající jako stacionární fázi gel Bio-Beads S-X3. Extrakt je rozpuštěn v takovém množství chloroformu (obvykle 10 ml) a je volen takový objem nástřiku, aby množství koextraktů nepřesáhlo kapacitní možnosti kolony.

Jímaná frakce, která odpovídá eluci sledovaných analytů, je v rozmezí 15,5 - 30 ml. Tato frakce se odpaří na rotační vakuové odparce právě do sucha nebo do poslední kapky; případný zbytek rozpouštědla se opatrně odfouká jemným proudem dusíku. Odparek se rozpustí v acetonitrilu, převede do hnědé vialky acetonitrem a analyzuje metodou HPLC/FLD popřípadě GC/MS.

V případě analýzy pomocí GC/MS se dále provádí frakční separace PAU od zbytkových interferujících látek se provádí pomocí sloupcové adsorpční chromatografie na silikagelu. Na předmytou kolonu se převede vzorek rozpuštěný v 1 ml hexanu. Eluce PAU se provádí směsí hexan-dichlormethan (75:25, v/v). Následuje odpaření na rotační vakuové odparce. Odparek se rozpustí v toluenu, převede se do hnědé vialky a analyzuje metodou GC/MS.

Stanovení PAU se provádí pomocí reverzní vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (eluce gradientová: acetonitril-voda) a plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí v režimu ionizace nárazem elektronů (GC-MS/EI). Identifikace jednotlivých analytů se provádí porovnáním retenčních časů s příslušnými standardy PAU. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na metodě vnějšího standardu (externí kalibrace) porovnáním odezвовých charakteristik analytů (na základě ploch nebo výšek píků) s příslušnými standardy PAU pomocí kalibrační závislosti sestavené pro každý z detekovaných analytů. V případě GC/MS je kvantitativní vyhodnocení je založeno také na metodě isotopového zředování, tam kde je k dispozici příslušný isotop. Kalibrace je prováděna nejméně na třech koncentračních hladinách.

Schéma experimentálního postupu je ukázáno na následujícím obrázku:

HPLC / FLD

Úprava vzorku promícháním

Navážení vzorku do odměrné baňky

Doplnění odměrné baňky
po rysku chloroformem

Přečištění vzorku na GPC

Odpaření na RVO

Převedení odparku do přesného
objemu rozpouštědla

Identifikace / kvantifikace

GC/MS

Úprava vzorku promícháním

Navážení vzorku do odměrné baňky +
přídavek ¹³C PAU

Doplnění odměrné baňky
po rysku chloroformem

Přečištění vzorku na GPC

Odpaření na RVO

Převedení odparku do přesného
objemu rozpouštědla

Přečištění vzorku na silikagelu

Odpaření na RVO

Převedení odparku do přesného objemu
rozpouštědla

Identifikace / kvantifikace

3.2 Referenční materiály

1. Polycyclic aromatic hydrocarbons in coconut oil (refined coconut oil - spiked with 6 PAH), CRM 458 (Community Bureau of Reference BCR, IRMM, Belgie) - certifikován pro vybrané PAU

Naformátováno: Odrážky a číslování

	<i>certifikovaná hodnota</i>	<i>standardní nejistota</i>
PAU	<i>(µg/kg)</i>	<i>(µg/kg)</i>
Pyr	9,4	1,5
Chr	4,9	0,4
B[k]F	1,87	0,18
B[a]P	0,93	0,09
B[ghi]P	0,97	0,07
I[1,2,3-cd]P	1,00	0,07

2. Polycyclic aromatic hydrocarbons in coconut oil (refined coconut oil - PAH free), CRM 459 (Community Bureau of Reference BCR, IRMM, Belgie)

3. Roztoky PAU v acetonitrilu – SRM 1647d

SRM 1647d Priority pollutant PAHs in acetonitrile

Koncentrace (µg/ml) při 23°C +/- 2°C

naphthalen	Naph	20.130	+/-	0.32
acenaphthylen	Acy	15.490		0.29
acenaphthen	Ace	20.770		0.48
fluoren	Fln	4.750		0.06
phenanthren	Phe	3.420		0.06
anthracen	Ant	0.790		0.02
fluoranthen	Flt	7.640		0.1
pyren	Pyr	8.470		0.11
benz[<i>a</i>]anthracen	BaA	4.090		0.04
chrysen	Chr	3.670		0.04
benzo[<i>b</i>]fluoranthen	BbF	4.170		0.05
benzo[<i>k</i>]fluoranthen	BkF	4.720		0.07
benzo[<i>a</i>]pyren	BaP	4.910		0.08
dibenz[<i>a,h</i>]anthracen	DBahA	3.540		0.22
benzo[<i>ghi</i>]perylene	BghiP	3.680		0.13
indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyren	IcdP	4.280		0.09

4. Vnitřní referenční materiál olivový olej navázaný na NIST 1647d

IRM olivový olej

		X-3s	X+3s
	<i>střední hodnota ng/g</i>	<i>dolní mez</i>	<i>horní mez</i>
<i>Phe</i>	20.65	13.48	27.82
<i>Ant</i>	1.67	0.89	2.45
<i>Flt</i>	35.89	28.97	42.8
<i>Pyr</i>	48.23	40.63	55.84
<i>BaA</i>	39.69	32.07	47.31
<i>Chr</i>	102.39	83.41	121.38
<i>BbF</i>	34.97	25.2	44.75
<i>BkF</i>	11.00	6.75	15.24
<i>BaP</i>	30.73	26.59	34.87
<i>DBahA</i>	3.52	1.9	5.13
<i>BghiP</i>	34.31	25.27	43.35
<i>IcdP</i>	23.5	18.88	28.11

Pracovní standardní roztoky a kalibrační standardy byly získávány ředěním uvedených referenčních materiálů

5. Certifikovaný směsný standardní roztok PAU v toluenu o koncentraci každého PAU (Naph, Ace, Acy, Fln, Phe, Ant, Flt, Pyr, B[a]A, Chr, B[b]F, B[k]F, B[a]P, DB[a,h]A, B[g,h,i]P, I[1,2,3-c,d]P) 10 µg/mL: **PAH Mix 9** (Dr. Ehrenstorfer, Německo) a individuální standardní roztoky B[c]Fln, CP[c,d]P, 5-MeChr, B[j]F, DB[a,l]P, DB[a,e]P, DB[a,i]P, DB[a,h]P o koncentraci každé látky 10 µg/mL (Dr. Ehrenstorfer, Německo)

Směsné pracovní roztoky PAU v toluenu se připravují ze standardů PAH Mix 9 v toluenu a ze standardů jednotlivých PAU v cyklohexanu a v isooktanu naředěním do toluenu.

Přehled koncentrací naředěných standardů je uveden v sešitě „zaver 2“.

3.3 Kalibrace a nejistota kalibrace

HPLC

V příloženém excelovském sešitu „zaver 2“ jsou vedeny kompletní výsledky sledování dlouhodobé stability kalibrace. 9x opakovaná kalibrace v průběhu 3 měsíců byla zpracována lineární regresí LINREGSU. Směrodatná odchylka závisle proměnné veličiny, s_y , ukazuje dlouhodobou reprodukovatelnost metody měření. Analýzy vzorků byly vyhodnocovány pomocí kalibrace, která časově odpovídala danému vzorku měření. Při tom byl použit firemní software. Vzhledem k tomu, že firemní software není schopen odhadnout nejistotu predikované hodnoty, musí být proveden odhad pomocí externí kalibrační křivky. Příklad takového výpočtu je rovněž uveden v sešitě „zaver 2“.

V následujícím přehledu jsou uvedeny výsledky kalibrací pro jednotlivé studované analýsy. RSD je vztažena průměrnou hodnotou signálu kalibrační přímky.

Tabulka I Přehled nejistot kalibrací

Sloučenina	s_y	RSD
NAPH	19.58	9.6%
ACE	31.31	10.5%
FLN	11.81	9.4%
PHE	13.58	10.4%
ANT	14.79	12.2%
FLT	12.18	10.4%
PYR	17.03	9.7%
BaA	17.65	10.9%
CHR	10.28	9.1%
BbF	11.85	10.8%
BkF	16.97	9.1%
BaP	21.27	14.3%
DBahA	13.56	10.4%
BghiP	4.57	11.5%
IcdP	2.35	11.4%

Z přehledu je patrné, že nejistota odpovídající kalibraci (zahrnuje nejistotu lineárního modelu a dlouhodobou reprodukovatelnost) je pro všechny studované sloučeniny prakticky stejná a pohybuje se kolem 10%.

V následující tabulce je uveden příklad výpočtu nejistoty predikované hodnoty pro všechny studované sloučeniny. Pro demonstraci byl použit jeden vzorek olivového oleje. V tabulce II

jsou pro porovnání uvedeny výsledky, které poskytl firemní software. Z tabulky vyplývá, že nejistota kalibrace, která zahrnuje pouze nejistotu kalibračního modelu, se pro většinu látek pohybuje v hodnotách do 10%. Pokud dostáváme hodnoty RSD vyšší, je to způsobeno tím, že signál odpovídající vzorku se pohybuje na počátku kalibrační přímky. Potvrzuje se tedy známe pravidlo, že nejpřesnější hodnoty (s nejnižší nejistotou) jsou predikovány v blízkosti středu kalibrační přímky. Důležitý je i poznatek, že při validaci metody musíme počítat nejistoty kalibrace i predikce externím způsobem Nelze se spolehnout na firemní software.

Tabulka II Analýza vzorku a nejistota

	*c, mg/mL	c, mg/mL	u	Rsu
Naph	2.33	2.20	1.30	59.1%
Ace	0.30	0.18	0.77	427.8%
Fln	1.36	1.38	0.14	10.1%
Phe	24.97	24.98	0.23	0.9%
Ant	1.23	1.24	0.03	2.4%
Flt	8.51	8.48	0.43	5.1%
Pyr	7.97	11.02	0.43	3.9%
BaA	2.47	2.47	0.20	8.1%
Chr	3.28	3.28	0.04	1.2%
BbF	1.88	1.88	0.31	16.5%
BkF	1.20	1.21	0.09	7.4%
BaP	0.75	0.70	0.11	15.7%
DBahA	0.27	0.24	0.21	87.5%
BghiP	1.13	1.13	0.23	20.4%
IcdP	1.33	1.38	0.21	15.2%

* hodnoty poskytnuté firemním software

GC/MS

Kalibrace GC/MS metody má jiný charakter než v případě HPLC. Nemůžeme najednou zpracovávat všechny dlouhodobě získané kalibrační křivky, protože velikosti signálů jsou nesouměřitelné. V sešitu „zaver 2“ jsou uvedeny 3 kalibrační křivky získané v průběhu tří měsíců. V následující tabulce III je ukázán příklad zpracování jedné z kalibrací s uvedením některých statistických parametrů.

Tabulka III Přehled nejistot kalibrace

Kalibrace 1

Sloučenina	s_y	RSD
------------	-------	-----

Phe+Ant	332.19	1.4%
Flt	525.55	1.4%
Pyr	325.31	0.9%
BcF	843.06	2.2%
BaA	2163.37	3.8%
Chr	1263.21	2.4%
CPcdP	1884.03	3.8%
5-MeChr	1211.66	3.3%
BbF+BfF	13598.88	1.3%
BjF	2058.75	4.3%
BaP	1517.20	4.0%
DBahA	1613.74	5.5%
IcdP	735.21	2.5%
BghiP	1392.21	4.8%
DBaIP	590.84	3.4%
DBaeP	1040.21	5.7%
DBaiP	276.32	4.5%
DBahP	901.56	6.8%

Zpracování obou zbylých kalibrací lineární regresi (LINREGSU) poskytlo prakticky shodné výsledky. Z nich vyplývá, že nejistota kalibračního modelu pro GC/MS je menší než pro HPLC a pohybuje se do 7%.

Tabulka IV Analýza vzorku a nejistota

	*c, mg/mL	c, mg/mL	u	Rsu
Phe+Ant	30.33	62.80	0.40	0.6%
Flt	17.68	17.00	0.20	1.2%
Pyr	16.49	17.18	0.15	0.9%
BcF	2.21	2.14	0.40	18.7%
BaA	5.21	4.73	0.70	14.8%
Chr	6.75	6.36	0.45	7.1%
CPcdP	3.11	2.89	0.69	23.9%
5-MeChr	1.53	1.52	0.63	41.4%
BbF+BkF	2.85	5.91	0.50	8.5%
BjF	1.94	1.84	0.81	44.0%
BaP	2.58	2.40	0.62	25.8%
DBahA	0.58	0.68	0.84	123.5%
IcdP	2.14	2.07	0.38	18.4%
BghiP	2.35	2.17	0.74	34.1%
DBaIP	3.19	2.97	0.62	20.9%
DBaeP	2.56	2.31	1.03	44.6%
DBaiP	9.1	7.90	1.03	13.0%
DBahP	3.27	2.80	1.22	43.6%

* hodnoty poskytnuté firemním software

3.4 Krátkodobá opakovatelnost

HPLC

V tabulce V je uveden přehled výsledků opakovatelnosti. Úplné výsledky jsou v sešitu „zaver 2“. Z výsledků je patrné, že krátkodobá opakovatelnost se pohybuje v rozmezí od 2 do 4%.

GC

V tabulce VI je uveden přehled výsledků opakovatelnosti. Úplné výsledky jsou v sešitu „zaver 2“. Výsledky ukazují, že krátkodobá opakovatelnost je horší než v případě HPLC.

Tabulka V HPLC opakovatelnost

Sloučenina	průměr	s	RSD průměru
Phe	46.405	1.425447	3.1%
Ant	3.625	0.117395	3.2%
Flt	16.074	0.383608	2.4%
Pyr	15.985	0.404894	2.5%
BaA	5.056	0.127076	2.5%
Chr	6.309	0.17252	2.7%
BbF	3.199	0.061816	1.9%
BkF	2.234	0.050882	2.3%
BaP	2.520	0.087269	3.5%
DBahA	0.474	0.011308	2.4%
BghiP	2.030	0.043874	2.2%
IcdP	2.789	0.11875	4.3%

Tabulka VI GC opakovatelnost

Sloučenina	průměr	s	RSD průměru
Phe+Ant	69.22	4.31	6.2%
Flt	14.14	2.18	15.4%
Pyr	15.11	1.94	12.8%
BcF	2.22	0.27	12.3%
BaA	5.07	0.21	4.1%
Chr	6.77	0.29	4.3%
CPcdP	2.93	0.47	15.9%
5-MeChr	1.41	0.20	14.1%
BbF+BkF	4.41	0.20	4.6%
BJF	1.60	0.15	9.6%
BaP	2.57	0.11	4.2%
DBahA	0.43	0.02	3.7%
IcdP	2.45	0.06	2.4%
BghiP	2.30	0.05	2.2%
DBalP	3.09	0.32	10.5%
DBaeP	2.56	0.24	9.5%
DBaiP	2.92	0.03	1.0%
DBahP	3.04	0.26	8.4%

3.5 Výtěžnost, nejistota výtěžnosti

HPLC

Výtěžnost byla zjišťována na CRM BCR 458. Výsledky testování jsou uvedeny v sešitě „zaver 2“. Z výsledků vyplývají následující skutečnosti:

1. Výtěžnost se neliší od hodnoty 1, metoda není zatížena systematickou chybou
2. Nejistota výtěžnosti se pohybuje kolem 10%
3. Hlavní složkou nejistoty je nejistota CRM, nelze ji tedy žádným způsobem snížit

GC

Výtěžnost byla zjišťována spikováním čistých sloučenin do vzorku oleje. Výsledky jsou uvedeny v sešitě „zaver 2“. Výsledky nejsou uspokojivé, výtěžnosti se pohybují hluboko pod 100% a rovněž variabilita výsledků jednotlivých spiků je vysoká.

4 Shrnutí

Byly porovnány metrologické charakteristiky dvou metod pro stanovení PAU v olivovém oleji. Bylo nade vše pochybnost potvrzeno, že metoda HPLC/FLD poskytuje spolehlivější výsledky.

Rozbor nejistot metody HPLC potvrdil, že model měření PAU s použitím externí kalibrace se musí vyjadřovat rovnicí:

$$c_{PAU} = \frac{(y_{PAU} - b_0)}{b_1} \cdot f_{rec} \cdot f_{opak} ,$$

ve kterém y_{PAU} je signál odpovídající PAU ve vzorku, b_0 a b_1 jsou úsek a směrnice kalibrační přímky, f_{rec} je faktor výtěžnosti ($=1/R$), f_{opak} je faktor krátkodobé opakovatelnosti. Výtěžnost a krátkodobá opakovatelnost se určuje při validaci metody.

Pro rutinní analýzu se může používat firemní software, pokud ale musíme znát nejistotu měření, není použití firemního software možné. Nejistota predikované hodnoty silně závisí na rozdílu hodnoty signálu vzorku a středu kalibrační závislosti. Z tohoto důvodu doporučujeme používat pro analýzy pro legální účely (nutná znalost nejistoty výsledku) jinou kalibrační metodu, např. tzv. metodu „bracketing kalibrace“.

Část 3
Stanovení vybraných pesticidů v obilí
Odhad nejistoty měření

1 Úvod

Pesticidy představují, stejně jako polycyklické aromatické uhlovodíky, skupinu významných polutantů, které se dostávají do potravního řetězce.

Pro stanovení správnosti stanovení a nejistoty výsledku chybí certifikované referenční materiály, návaznost je tedy demonstrována na čisté látky. Dalším problémem je i to, že postupně dochází k jejich rozkladu, takže jsme schopni určovat pouze aktuální kontaminaci.

Cílem této práce je odhadnout nejistotu výsledku stanovení vybraných pesticidů v obilí. Je to důležité hlavně z hlediska případného testování shody vůči limitům maximální kontaminace.

2 Princip metody měření

Pesticidy jsou extrahovány z vhodně upravených matric do organického rozpouštědla. Separace pesticidů od případných koextraktů se provádí pomocí gelové permeační chromatografie (GPC). Pesticidy se stanoví pomocí plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC/MS). Analyty jsou identifikovány a kvantifikovány na základě porovnání s příslušnými standardy metodou vnějšího standardu.

3 Experimentální část

Přehled stanovovaných analytů je uveden v tabulce I

Tabulka I Stanovované pesticidy

Bendiocarb	CAS: 22781-23-3	M: 223,23 g/mol
Chlorpyrifos	CAS: 5598-13-0	M: 322,5 g/mol
Pirimiphos methyl	CAS: 52918-63-5	M: 505,2 g/mol
Deltamethrin	CAS: 29232-93-7	M: 305,3 g/mol

3.1 Metodika a materiál k ošetření obilí

Míchačka:

Výrobce KOVO Bělá n/Rad., otáčky bubnu 25 otáček za minutu.

Obilí:

Pšenice ozimá pěstovaná na pozemcích VÚRV, v.v.i., sklizeň 2007.

Vlhkost obilí: před aplikací 19.10.07– 12,7%

po doschnutí v laboratoři 22.10.07 – 14,5%

Vlhkost obilí byla měřena vlhkoměrem obilovin (typ. HG 2, výrobce družstvo ZNAK Brno).

Přípravky:

Přípravek	Úč. látka	Registrant	Dávka
K-obiol EC 25	deltamethrin 25 g	Bayer CropScience GmbH.	20 ml/t
Reldan 40 EC	chlorpyrifos-metyl 400 g	Dow AgroSciences s.r.o.	11 ml/t
Actellic 50 EC	pirimiphos-methyl 500 g	Syngenta Limited	8 ml/t
Ficam 80 WP	bendiocarb 800 g	Bayer CropScience GmbH.	6,25 g/t

Vlastní pokus:

Do bubnu míchačky bylo naváženo 15 kg pšenice ozimé (váhy-výrobce: OHAUS Corporation, model:ADVENTURER PRO, Typ: AV4101DM). Do plastového ručního rozprašovače bylo připraveno 0,5 litru postřikové jichy (destilovaná voda + přípravky) o koncentraci uvedené v tabulce přípravků. Tekuté přípravky byly dávkovány ruční pipetou (výrobce: Socorex, typ: Acura 825) a pevné přípravky váženy na laboratorních vahách (výrobce: Mettler, typ: AE 240-S). Poté byly aplikována postřiková jicha do obilí ručním rozprašovačem do bubnu míchačky. Aplikace jichy trvala 4,5 minuty (do vyprázdnění ručního rozprašovače), poté se ještě 1,5 minuty obilí v bubnu míchačky promíchávalo. Následně bylo obilí naváženo po 1 kg do plastových sáčků, které byly otevřeny za laboratorních podmínek, tak aby se z obilí odpařila přebytečná voda a nedošlo k zapaření. Sáčky byly otevřeny v laboratorních podmínkách od 19.10.07 do 22.10.07. Teplotu a vlhkost v laboratoři jsme zaznamenali digitálním teploměrem a vlhkoměrem (Tinytalk).

Aplikované množství pesticidů je v následující tabulce:

	aplikované množství pesticidu v mg/kg (teoreticky spočtené)
<i>Bendiocarb</i>	5
<i>Chlorpyrifos methyl</i>	4,4
<i>Pirimiphos methyl</i>	4
<i>Deltamethrin</i>	0,5

3.2 Postup měření

Obilí je nutné před navažováním homogenizovat mletím a promícháním.

Ze zhomogenizovaného obilí se naváží cca 12,5 g (s přesností na 0,001 g) do 250 ml Erlenmayerovy baňky a přidá se 100 ml ethylacetátu. Vzorek se extrahuje 20 minut na třepačce při 120 otáčkách/min. Poté se extrakt zfiltruje přes fritu s vloženým filtračním papírem a asi 20 g vrstvou přezíhaného síranu sodného tak, že pevný podíl zůstane v Erlenmayerově baňce a extrakce se opakuje dalšími 50 ml ethylacetátu (10 min). Extrakt se opět zfiltruje, Erlenmayerova baňka a filtr se promyjí 2 x 25 ml ethylacetátu. Filtrát se odpaří na rotační vakuové odparce při tlaku 220 mbar a teplotě max 40°C na objem asi 10 – 15 ml. Odparek se kvantitativně převede do 25 ml odměrného válce, doplní po rysku ethylacetátem a převede do 50ml odměrné baňky kde se doplní po rysku cyklohexanem. Výsledný obsah matrice ve vzorku je 0,25 g/ml Takto připravené chloroformové roztoky mohou být přímo aplikovány na kolonu GPC.

Frakční separace pesticidů od koextrahovaných látek se provádí pomocí gelové permeační chromatografie (GPC) využívající jako stacionární fázi PL gel. Extrakt je rozpuštěn v takovém množství směsi cyklohexan:ethylacetátu (1:1, v/v) a je volen takový objem nástřiku, aby množství koextraktů nepřesáhlo kapacitní možnosti kolony.

Jímaná frakce, která odpovídá eluci sledovaných analytů, je v rozmezí 14,5 - 31 ml. Tato frakce se odpaří na rotační vakuové odparce právě do sucha nebo do poslední kapky; případný zbytek rozpouštědla se opatrně odfouká jemným proudem dusíku. Odparek se rozpustí v toluenu, převede do vialky a analyzuje metodou GC/MS.

Stanovení pesticidů se provádí pomocí plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí v režimu ionizace nárazem elektronů (GC-MS/EI) na přístroji HP 5973. V následující tabulce II jsou uvedeny ionty jednotlivých pesticidů snímaných v SIM programu GC/MS (analyty jsou řazeny podle pořadí eluce z kolony).

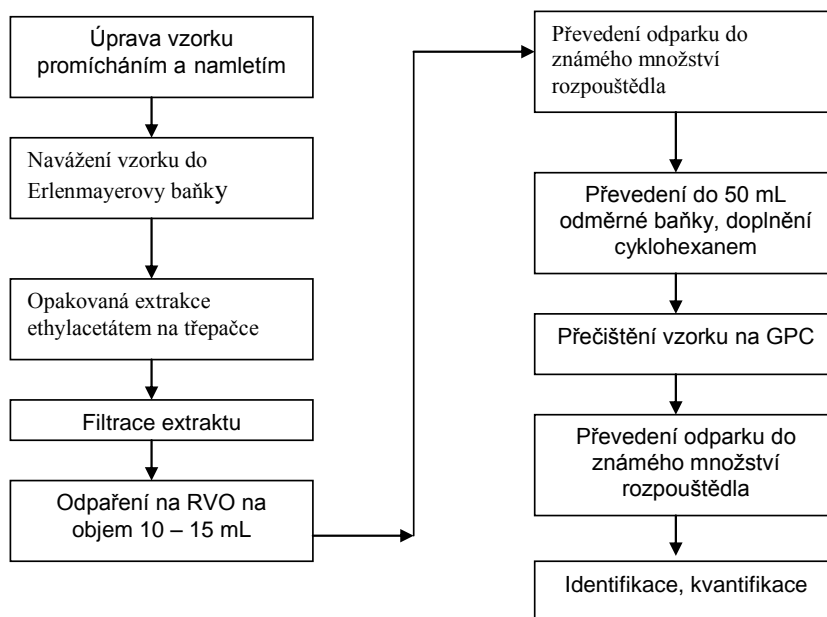
Tabulka II Ionty jednotlivých pesticidů

	<i>r.t.</i>	<i>m/z</i>		
bendiocarb	13,240	151	166	223
chlorpyrifos methyl	14,563	125	286	288
pirimiphos methyl	14,719	276	290	305
deltamethrin	27,985	181	209	253

Identifikace a kvantifikace jednotlivých analytů je založena na metodě vnějšího standardu (externí kalibrace) porovnáním odezvových charakteristik analytů (na základě ploch píků) s příslušnými standardy pesticidů pomocí kalibrační závislosti sestrojené pro každý z detekovaných analytů.

Kalibrace je prováděna nejméně na třech koncentračních hladinách. V případě velkých sérií vzorků je řada kalibračních roztoků analyzována vždy po nástřiku 10 – 15 reálných vzorků.

Schéma experimentálního postupu je ukázán na následujícím obrázku



3.3 Referenční materiály

Pracovní roztoky pesticidů v toluenu se připravují ze standardů jednotlivých pesticidů naředěním do toluenu. Koncentrace pesticidů v jednotlivých pracovních roztocích jsou uvedeny v excelovském souboru „zaver 3“.

Příprava zásobních roztoků standardů

Zásobní standardní roztoky pesticidů v toluenu byly získávány naředěním původních pracovních roztoků pesticidů. Pro ředění byly používány mikrostříkačky Hamilton o objemu 100, 250, 500, 1000 μL .

Zásobní směsné standardní roztoky pesticidů v toluenu byly skladovány v mrazícím boxu při $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$.

V tabulce II jsou uvedeny výchozí čisté látky a jejich producenti

Tabulka III Přehled referenčních látek

pesticid	výrobce	Assay (%)	+/- (%)	K_{ow} log P
Bendiocarb	Riedel –de Haën	99,5	0,5	1,72
Chlorpyrifos methyl	Dr. Ehrenstorfer	98,0	0,5	4,24
Pyrimiphos methyl	Dr. Ehrenstorfer	99,0	0,5	4,2
Deltamethrin	Dr. Ehrenstorfer	99,0	0,5	4,6

3.4 Kalibrace a nejistota kalibrace

V příloženém excelovském sešitu „zaver 3“ jsou uvedeny kompletní výsledky kalibrací. Byly zpracovány jako jednotlivé kalibrace (tříkrát opakované), jednak jako „průměrná“ kalibrace. Použita byla excelovská lineární regrese LINREGSU a sešit KALIBR, které tvoří přílohy celé zprávy. Směrodatná odchylka závisle proměnné veličiny, s_y , ukazuje v tomto případě krátkodobou opakovatelnost metody měření. Analýzy vzorků byly vyhodnocovány pomocí kalibrace, která časově odpovídala danému vzorku měření.

V tabulce IV uvádíme přehled výsledků, získaných ze zpracování souhrnní kalibrační přímkou. Směrodatná odchylka je rovněž uváděna jako relativní hodnota, vztažená na střed kalibrace

Tabulka IV Statistické parametry krátkodobé opakovatelnosti

pesticid	s_v [□g/g]	RSD
bendiocarb	12190	3,56%
chlorpyrifos methyl	3215	1,12%
pirimiphos methyl	2300	1,02%
deltamethrin	303	3,89%

Z tabulky je patrné, že relativní směrodatná odchylka závisle proměnné, RSD, nepřesahuje 5%. Znamená to, že krátkodobá opakovatelnost není významnou složkou nejistoty měření.

3.5 Predikce obsahu pesticidů

Koncentrace pesticidů v měřeném roztoku byla vypočtena z trojbodové (*kalibrace 1*) nebo čtyřbodové (*kalibrace 2*) kalibrace (viz sešit „zaver 3“. Hodnoty nejistot obsahu jednotlivých pesticidů jsou uvedeny v tabulce V. Koncentrace se dají snadno přepočítat na obsahy pesticidů v navážce vzorku.

Tabulka V Predikce obsahu pesticidů

Kalibrace 1

Pesticid	vz1			vz2			vz3		
	c [μg/mL]	u	Rsu	c [μg/mL]	u	Rsu	c [μg/mL]	u	Rsu
bendiocarb	0,33	0,13	39,4%	0,39	0,13	33,3%	0,43	0,13	30,2%
chlorpyrifos methyl	0,72	0,07	9,7%	0,82	0,07	8,5%	0,92	0,07	7,6%
pirimiphos methyl	0,84	0,06	7,1%	0,8	0,06	7,5%	1,06	0,06	5,7%
deltamethrin	0,08	0,05	62,5%	0,09	0,05	55,6%	0,11	0,05	45,5%

	vz1	vz2	vz3
Pesticid	□g/g	□g/g	□g/g
bendiocarb	0,66	0,78	0,86
chlorpyrifos methyl	1,45	1,65	1,84
pirimiphos methyl	1,68	1,61	2,11
deltamethrin	0,15	0,19	0,22

Kalibrace 2

Pesticid	vz1			vz2			vz3		
	c [$\mu\text{g/mL}$]	u	R_{su}	c [$\mu\text{g/mL}$]	u	R_{su}	c [$\mu\text{g/mL}$]	u	R_{su}
bendiocarb	0,31	0,08	25,8%	0,39	0,08	20,5%	0,42	0,08	19,0%
chlorpyrifos methyl	0,71	0,02	2,8%	0,89	0,02	2,2%	0,93	0,02	2,2%
pirimiphos methyl	0,84	0,02	2,4%	1,03	0,02	1,9%	1,07	0,02	1,9%
deltamethrin	0,08	0,01	12,5%	0,12	0,01	8,3%	0,11	0,01	9,1%

Pesticid	vz1 $\mu\text{g/g}$	vz2 $\mu\text{g/g}$	vz3 $\mu\text{g/g}$
bendiocarb	0,63	0,77	0,84
chlorpyrifos methyl	1,41	1,77	1,86
pirimiphos methyl	1,67	2,06	2,14
deltamethrin	0,15	0,22	0,22

Z tabulky plynou dva závěry:

1. Obsahy pesticidů se neliší za použití trojbodové a čtyřbodové kalibrace
2. Nejistota predikované hodnoty je silně závislá na tom, v jaké oblasti kalibrace se pohybuje signál vzorku. Je to jasně vidět i z toho, že čtyřbodová kalibrace vznikla rozšířením tříbodové směrem k nižším hodnotám koncentrace.

3.5 Výtěžnost

Výtěžnost byla ověřována spikováním „blankového“ obilí, tedy obilí, kde se nepředpokládá přítomnost sledovaných pesticidů. Výtěžnost byla sledována na dvou koncentračních hladinách. Úplné výsledky jsou uvedeny v sešitě „zaver 3“. Následující tabulka udává přehled získaných výsledků

Tabulka VI Výtěžnost metody stanovení pesticidů

Pesticid	R	std	RSD
bendiocarb	1,10	0,05	4,8%
chlorpyrifos methyl	0,85	0,07	8,5%
pyrimiphos methyl	0,86	0,07	8,3%
deltamethrin	0,64	0,09	13,8%

Z výsledků měření a výpočtu výtěžnosti a nejistoty výtěžnosti vyplývá, že v rozpočtu nejistot hraje nejistota výtěžnosti dominantní roli. Pro výpočet obsahu pesticidů se musí používat následující rovnice měření:

$$c_{pest} = \frac{(y_{pest} - b_0)}{b_1} \cdot \frac{1}{R}$$

ve kterém y_{pest} je signál odpovídající pesticidu ve vzorku, b_0 a b_1 jsou úsek a směrnice kalibrační přímky, R je výtěžnost.

4 Shrnutí

Stanovení pesticidů metodou GC/MS se ukázalo být překvapivě spolehlivé, tj. s relativně nízkou nejistotou. Byla demonstrována návaznost k čistým substancím, ovšem pouze za předpokladu, že pro výpočet obsahu pesticidu bude použita korekce na výtěžnost. Nejistota výtěžnosti se pohybuje v rozmezí do 10%. Lze tedy tuto metodu použít pro certifikaci referenčního materiálu. Bylo rovněž srovnáno použití dvou kalibračních technik: externí kalibrace a bracketing kalibrace. Podrobné výsledky jsou uvedeny v sešitě „zaver 3“. Výsledky nejsou korigovány na výtěžnost. V tabulce VII je uvedeno srovnání obou metodik.

Tabulka VII Srovnání kalibračních metodik

Pesticid	bracketing			externí kalibrace		
	c[μg/mL]	c [μg/g]	Rsu	c[μg/mL]	c [μg/g]	Rsu
bendiocarb	0.473	0.95	19.4%	0.374	0.75	6.3%
chlorpyrifos methyl	1.011	2.02	0.5%	0.842	1.68	0.7%
pirimiphos methyl	1.014	2.03	0.6%	0.981	1.96	0.5%
deltamethrin	0.629	1.26	22.2%	0.101	0.20	3.2%

Z tabulky vyplývá, že nejistota predikce je silně závislá na koncentraci a zřejmě i na homogenitě vzorku. V tabulce jsou zpracovány všechny vzorky najednou, takže vysoké hodnoty nejistot v případě bracketing kalibrace jsou dány nehomogenitou. Bracketing kalibrace je velice citlivá na nejistotu signálu vzorku.