CZASOPISMO INŻYNIERII LĄDOWEJ, ŚRODOWISKA I ARCHITEKTURY JOURNAL OF CIVIL ENGINEERING, ENVIRONMENT AND ARCHITECTURE JCEEA, t. XXXII, z. 62 (3/1/15), lipiec-wrzesień 2015, s. 123-138

Ewa ILBA¹ Grzegorz P. KASPRZYK²

WYKORZYSTANIE PRZEDZIAŁU UFNOŚCI KRZYWEJ KALIBRACYJNEJ DO OSZACOWANIA GRANICY WYKRYWALNOŚCI I OZNACZALNOŚCI MIEDZI W METODZIE FAAS

W pracy wykorzystano nowe metody obliczeniowe wykorzystywane do wyznaczania wartości granic wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ), zalecane przez międzynarodowe organizacje normalizacyjne IUPAC i ACS, do oznaczenia śladowych ilości miedzi w metodzie FAAS. We wprowadzeniu przedstawiono podstawy teoretyczne standardowych metod statystycznych (SA1, SA2) wykorzystywanych do obliczania granic wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ), jak i nowe metody (ULA1, ULA2) wykorzystujące przedział ufności krzywej kalibracyjnej. W celu porównania metod wyznaczania LOD i LOQ w części eksperymentalnej przeprowadzono serie oznaczeń miedzi w metodzie płomieniowej atomowej spektrofotometrii absorpcyjnej w zakresie stężeń 0,0-1,0 mg/L. Obliczenia dla danych eksperymentalnych wykonane zgodnie z metodologią opisanych technik, pozwoliły na uzyskanie zbliżonych wartości granic oznaczalności i wykrywalności miedzi w metodzie FAAS na poziomie odpowiednio 30 µg/L (LOD) i 80-100 µg Cu/L (LOQ) dla wszystkich stosowanych metod. Wyniki uzyskane dla metod stosowanych w pracy są zgodne z danymi literaturowymi.

Słowa kluczowe: granica wykrywalności, LOD, granica oznaczalności , LOQ, płomieniowa spektrofotometria absorpcyjna, oznaczenie śladów miedzi, FAAS

1. Wprowadzenie

1.1. Granica wykrywalności i oznaczalności metody

Cechą charakterystyczną każdej ilościowej metody analitycznej są najmniejsze ilości substancji, które mogą być wykryte lub ilościowo oznaczone

¹ Ewa Ilba, Państwowa Wyższa Szkoła Wschodnioeuropejska, ul. Żołnierzy I Armii Wojska Polskiego 1E, 37-700 Przemyśl, tel. 16 735 51 73, ewailba@gmail.com

 ² Autor do korespondencji/corresponding author: Grzegorz P. Kasprzyk, Państwowa Wyższa Szkoła Wschodnioeuropejska, Instytut Inżynierii Środowiska, ul. Żołnierzy i Armii Wojska Polskiego 1E, 37-700 Przemyśl, tel. 16 735 51 73, kasprzyk.gp@gmail.com

z założonym poziomem ufności. Obie te wielkości określane są odpowiednio jako **granica wykrywalności** oraz **granica oznaczalności** danej procedury analitycznej. Wielkości te definiowane są następująco [1]:

Granica wykrywalności (ang. LOD - limit of detection) jest jako najmniejsze stężenie (lub ilość) substancji możliwe do wykrycia za pomocą danej metody analitycznej z określonym prawdopodobieństwem.

Granica oznaczalności (ang. LOQ - limit of quantification) jest jako najmniejsze stężenie (lub ilość) substancji możliwe do ilościowego oznaczenia za pomocą danej metody analitycznej z określonym prawdopodobieństwem. Zgodnie z definicja IUPAC [2,3] granica wykrywalności I OD w ujecju staty-

Zgodnie z definicją IUPAC [2,3] granica wykrywalności LOD w ujęciu statystycznym w domenie sygnałowej może być wyrażona równaniem:

$$y_D = \mu_b + k_D * \sigma_b \tag{1}$$

gdzie:

y_D – wartość sygnału analitycznego odpowiadającemu granicy wykrywalności metody,

 μ_b – wartość oczekiwana sygnału dla tła (ślepej próby),

 σ_b – odchylenie standardowe sygnału odpowiadającemu ślepej próbie.

Przyjmując założenie, że wartość sygnału analitycznego ma rozkład normalny dla dużej próby wartości μ b oraz σ_b mogą być przybliżone odpowiednio przez wartość średnią sygnału dla tła $\overline{y_b}$ oraz odchylenie standardowe próby s_b . Wówczas wyrażenie definiujące granicę oznaczalności (1) w domenie sygnałowej przyjmie postać:

$$y_D = \bar{y}_b + k_D * s_b \tag{2}$$

gdzie:

 y_D – wartość sygnału analitycznego odpowiadającemu granicy wykrywalności metody,

 \bar{y}_b – średnia wartość sygnału dla ślepej próby,

 s_b – odchylenie standardowe sygnału odpowiadającemu ślepej próbie,

 k_D - współczynnik dla LOD $k_D = 3$.

W sposób analogiczny można zdefiniować wartość sygnału dla granicy oznaczalności:

$$y_Q = \bar{y}_b + k_Q * s_b \tag{3}$$

gdzie:

 y_D – wartość sygnału analitycznego odpowiadającemu granicy oznaczalności metody,

 \bar{y}_b – średnia wartość sygnału dla ślepej próby,

 s_b – odchylenie standardowe sygnału odpowiadającemu ślepej próbie;

 k_0 - współczynnik dla LOQ $k_0 = 10$.

Zgodnie z równaniami (2) i (3) za granicę wykrywalności i oznaczalności metody analitycznej uznaje się stężenie analitu dla którego wartości sygnału analitycznego y_D , y_Q różnią się od sygnału zarejestrowanego dla próbki o stężeniu zerowym yb o wielokrotność odpowiednio k_D i k_Q odchylenia standardowego wyznaczonego dla tła.

W praktyce przyjmuje się wartości współczynnika $k_D=3$ dla granicy wykrywalności (LOD) oraz wartość $k_O=10$ dla granicy oznaczalności (LOQ).

$$y_{\rm D} = \bar{y}_{\rm b} + 3 * s_{\rm b} \tag{4}$$

$$\mathbf{y}_0 = \bar{\mathbf{y}}_b + 10 * \mathbf{s}_b \tag{5}$$

Przyjęcie wartości współczynnika $k_D=3$ dla granicy oznaczalności oznacza że istnieje niewielkie prawdopodobieństwo popełnienia błędu I rodzaju (0,135% prawdopodobieństwo ze wartość sygnału dla tła przekroczy wartość LOD). Jednocześnie wartość współczynnika $k_D=3$ oznacza że prawdopodobieństwo błędu II rodzaju (uznania rzeczywistego sygnału dla próbki o niezerowym stężeniu za sygnał dla tła) jest bardzo wysokie 100 $\beta=50\%$. Schematycznie zostało to przedstawione poniżej.



Rys. 1. Prawdopodobieństwo błędu I rodzaju dla granicy decyzji $k_D=3$ w domenie sygnałowej

Fig. 1. Probability of type I error for kd=3 decision limit in signal domain

Z tego powodu w literaturze [5-7] sugerowane są wyższe wartości współczynnika dla granicy wykrywalności w zakresie $k_D = 3-6$, ($k_D = 6$ odpowiada jednakowemu prawdopodobieństwu popełnienia błędu I i II rodzaju) oraz war-





Rys. 2. Granice różnych obszarów (wykrywalności i oznaczalności) w domenie sygnałowej Fig. 2. Boundaries of different regions in signal domain

1.2. Granica wykrywalności i oznaczalności w metodzie standardowej

W praktyce laboratoryjnej posługujemy się rzeczywistymi wartościami granic wykrywalności i oznaczalności wyrażonymi w jednostkach stężenia, nie zaś wartościach sygnału analitycznego. Rzeczywiste wartości granic wykrywalności i oznaczalności oblicza się z równań regresji odwrotnej.

W przypadku najczęściej wykorzystywanego w praktyce modelu liniowego, zależność miedzy wartościami LOD w domenie sygnałowej (y_{LOD}), a rzeczywistymi wartościami granicy wykrywalności wyrażonych w jednostkach stężenia c_{LOD} można przedstawić równaniem (6) oraz analogiczne dla granicy oznaczalności LOQ (c_{LOO}) równaniem (7)

$$y_{LOD} = y_D = b_0 + b_1 * c_{LOD}$$
(6)

oraz

$$y_{LOQ} = y_Q = b_0 + b_1 * c_{LOQ} \tag{7}$$

gdzie:

y_D, y_Q – wartość sygnału analitycznego odpowiadające granicy wykrywalności i oznaczalności metody,

b₀, b₁ - współczynniki modelu kalibracyjnego,

 c_{LOD} , c_{LOQ} - wartości stężeń analitu dla LOD i LOQ.

W niniejszej pracy przyjęto, że dla metody standardowej SA1 średnia wartość sygnału dla tła $\bar{y}_b = b_0$, jednocześnie wprowadzono uproszczony zapis wartości granic wykrywalności $c_{LOD} = LOD$ i oznaczalności $c_{LOQ} = LOQ$.

Korzystając wcześniejszych definicji LOD (4) i LOQ (5) oraz zapisu krzywych kalibracyjnych w postaci równań (6) i (7), odpowiednie wartości granic wykrywalności i oznaczalności w domenie stężeniowej można obliczyć korzystając z równań regresji odwrotnej:

$$LOD = \frac{y_{LOD} - b_0}{b_1} = \frac{3^* s_b}{b_1}$$
(8)

$$LOQ = \frac{y_{LOQ} - b_0}{b_1} = \frac{10^* s_b}{b_1}$$
(9)

Podsumowując klasyczna metoda obliczania granicy wykrywalności i oznaczalności (ang. SA – standard approach) oparta jest na następujących założeniach [8]:

(1) przyjmuje się, że rozkład statystyczny wyników dla ślepej próby jest rozkładem normalnym,

(2) obliczenia wykonuje się dla dużej próby $n_b>30$, co pozwala przyjąć założenia:

 $\overline{\mathbf{y}}_{\mathbf{b}} = \overline{\mu}_{\mathbf{b}} \text{ oraz } s_{b} = \sigma_{b},$

(3) przyjmuje się (metoda SA1) że średnia wartość sygnału dla tła $\bar{y}_{b} = b_{0}$,

(4) wszystkie punkty leżą dokładnie na krzywej kalibracyjnej, a parametry modelu kalibracyjnego b_1 i b_0 nie są obarczone błędem.

W praktyce laboratoryjnej powyższe warunki nie są spełnione ze względu na wykonywanie pomiarów dla małych serii pomiarowych, dlatego wartości liczbowe LOD i LOQ obliczone metoda klasyczną mogą być oszacowane niewłaściwie (zbyt mała próba). W kolejnym rozdziale opisana zostanie metoda oparta na przedziale ufności krzywej kalibracyjnej.

1.3. Zaawansowana metoda szacowania granica wykrywalności i oznaczalności oparta na przedziale ufności krzywej kalibracyjnej (ULA)

Standardowa metoda szacowania granic wykrywalności i oznaczalności wymaga zarejestrowania wielu powtórzeń dla ślepej próby, a ponadto nie uwzględnia niepewności związanej z konstruowaniem krzywej kalibracyjnej.

W codziennej praktyce laboratoryjnej ilość rejestrowanych pomiarów na podstawie których oblicza się granice LOD, LOQ i tworzy się krzywą kalibracyjną jest ograniczona. W rezultacie niespełnienie warunków dla metody standardowej może powodować niewłaściwe oszacowanie wartości granic oznaczalności.

Biorąc pod uwagę powyższe ograniczenia stosowanych metod międzynarodowe organizacja normalizacyjna IUPAC zaleca wykorzystanie metod opartych na przedziale ufności krzywej kalibracyjnej (ang. <u>Upper Limit Approach ULA</u>).

W zaproponowanej metodzie (ULA) granice wykrywalności i oznaczalności oszacowuje się na podstawie wartości górnej granicy przedziału ufności krzywej kalibracyjnej y_U w postaci równania:

$$y_U = \hat{y}(c_0) + t(v,\alpha)s \tag{10}$$

gdzie:

- y_U -odpowiada wartości górnego przedziału ufności krzywej kalibracyjnej w punkcie c_0 ,
- $\hat{y}(c_0)$ wartość sygnału analitycznego wyznaczona na podstawie modelu kalibracyjnego w punkcie c_0 ,

 $t(v, \alpha)$ - wartość z rozkładu t-Studenta dla przedziału ufności α =0,99,

u - liczba stopni swobody u = n - m,

- m liczba parametrów modelu kalibracyjnego,
- (ULA1 m=1, y= b_1 *c; ULA2 m=2, y= b_0 + b_1 *c),

s- odchylenie standardowe dla wszystkich punktów krzywej kalibracyjnej.

Wartość s wyznacza się ze wzorów (11) i (12):

$$s = s_{yx} \left[1 + \frac{1}{n} + (c_0 - \overline{c})^2 / \sum_{i=1}^n (c_i - \overline{c})^2 \right]$$
(11)

oraz:

$$s_{yx} = \left[\frac{\sum_{i=1}^{n} (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - m}\right]^{1/2} = \left[\frac{\sum_{i=1}^{n} (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}\right]^{1/2}$$
(12)

gdzie:

 s_{yx} - resztowe odchylenie standardowe dla krzywej kalibracyjnej (RSD),

 y_i - wartość sygnału, \hat{y}_i - wartość funkcji modelowej,

n- całkowita ilość pomiarów dla krzywej kalibracyjnej i tła,

m- liczba stopni swobody,

 \overline{c} - średnie stężenie dla krzywej kalibracyjnej,

 c_0 - stężenie dla analitu dla ślepej próby (tła).

Ponieważ wartość LOD i LOQ obliczana jest na podstawie sygnału uzyskanego dla tła a więc $c_0 = 0$ więc $\hat{y}(c_0) = b_0$ równanie (10) i (11) przyjmują postać:

$$y_U = b_0 + t(v,\alpha)s \tag{13}$$

$$s = s_{yx} \left[1 + \frac{1}{n} + \overline{c}^2 / \sum_{i=1}^n (c_i - \overline{c})^2 \right]$$
(14)

co odpowiada wartości dla górnej granicy przedziału ufności dla c₀:

$$y_U = b_0 + t(\nu, \alpha) s_{yx} \left[1 + \frac{1}{n} + \overline{c}^2 / \sum_{i=1}^n (c_i - \overline{c})^2 \right]^{1/2}$$
(15)

Ostatecznie wartości sygnałów analitycznych odpowiadającym granicom wykrywalności i oznaczalności (LOD i LOQ w domenie sygnałowej) oblicza się ze wzorów:

$$y_{LOD} = y_D = b_0 + t(\nu, \alpha) s_{yx} \left[1 + \frac{1}{n} + \overline{c}^2 / \sum_{i=1}^n (c_i - \overline{c})^2 \right]^{1/2}$$
(16)

$$y_{LOQ} = y_Q = b_0 + 3t(\nu, \alpha) s_{yx} \left[1 + \frac{1}{n} + \overline{c}^2 / \sum_{i=1}^n (c_i - \overline{c})^2 \right]^{1/2}$$
(17)

Korzystając z wcześniejszych równań krzywych kalibracyjnych w postaci równań (6) i (7) odpowiednie wartości granic wykrywalności i oznaczalności w domenie stężeniowej obliczamy ze wzorów zbliżonych do metody standardowej:

$$LOD = \frac{y_{LOD} - b_0}{b_1} = \frac{t(v, \alpha)s_{yx}}{b_1} * B(n) = \frac{k_D^{ULA2}s_{yx}}{b_1}$$
(18)

$$LOQ = \frac{y_{LOQ} - b_0}{b_1} = \frac{3t(\nu, \alpha)s_{yx}}{b_1} * B(n) = \frac{k_Q^{ULA2}s_{yx}}{b_1}$$
(19)

gdzie
$$B(n) = \left[1 + \frac{1}{n} + \overline{c}^2 / \sum_{i=1}^n (c_i - \overline{c})^2\right]^{1/2}$$
 (20)

$$k_D^{ULA2} = t(\nu, \alpha) * B(n) \qquad \qquad k_Q^{ULA2} = 3 * t(\nu, \alpha) * B(n)$$

Dla modelu kalibracyjnego y=b1*c (metody ULA1) odchylenie standardowe s z definicji danej wzorem (21) które dla tła ($c_0 = 0$) ulega dalszemu uproszczeniu.

$$s = s_{yx} \left[1 + \overline{c_0}^2 / \sum_{i=1}^n c_i^2 \right] = s_{yx}$$
(21)

Wartości sygnałów odpowiadające granicy wykrywalności i znaczności dla metody z jednym parametrem (ULA1) upraszczają się do zależności:

$$y_{LOD} = y_D = t(\nu, \alpha) s_{yx}$$
(22)

$$y_{LOQ} = y_Q = 3t(v,\alpha)s_{yx} \tag{23}$$

Biorąc pod uwagę jednoparametryczny model krzywej kalibracyjnej dla metody ULA1 w postaci :

$$y_{LOD} = y_D = b_1 * c_{LOD} \tag{24}$$

oraz

$$y_{LOQ} = y_Q = b_1 * c_{LOQ}$$
 (25)

Wartości odpowiednich granic wykrywalności i oznaczalności w jednostkach stężenia obliczane są ze wzorów:

$$LOD = \frac{y_{LOD}}{b_1} = \frac{t(v, \alpha)s_{yx}}{b_1} = \frac{k_D^{ULA1}s_{yx}}{b_1}$$
(26)

$$LOQ = \frac{y_{LOQ}}{b_1} = \frac{3t(\nu, \alpha)s_{yx}}{b_1} = \frac{k_Q^{ULA1}s_{yx}}{b_1}$$
(27)

Gdzie wartość s_{xy} dla modelu jedno parametrycznego (m=1) wyznacza się na podstawie równania (28):

$$s_{yx} = \left[\frac{\sum_{i=1}^{n} (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-1}\right]^{1/2}$$
(28)

Podobnie jak standardowa metoda szacowania granicy oznaczalności (SA), również nowa metoda górnej granicy przedziału ufności krzywej kalibracyjnej (ULA, ang. Upper Limit Approach), oparta jest na założeniach:

- 1. metoda wykorzystuje rozkład t-Studenta, a wartość $3\sigma_b$ zastępowana jest przez wartości $t(\nu, \alpha)s_b$ dla liczby stopni swobody ν i zadanego przedziału ufności w odróżnieniu od metody standardowej SA1, wykorzystanie rozkładu t-Studenta, pozwalana na obliczenia obu granic LOD i LOQ zarówno dla małej ilości pomiarów dla krzywej kalibracyjnej i tła n < 30 jak i dużych zbiorów danych kalibracyjnych,
- 2. metoda pozwala na wykorzystanie modelu liniowego z jednym y = b_1 *c (ULA1) lub dwoma parametrami y = $b_0 + b_1$ *c, (ULA2),
- 3. obliczenia uwzględniają niepewność związaną z oszacowaniem parametrów (b_0, b_1) krzywej kalibracyjnej s_{b0} i s_{b1} .
- 4. dla krzywej kalibracyjnej zbudowanej z równoodległych punktów $\Delta c = const$, oszacowanie wartości LOD i LOQ upraszcza się do prostej operacji matematycznej z wykorzystaniem parametrów k_D^{ULA} i k_Q^{ULA} zestawionych w tablicach 1 i 2.

Przedstawione w niniejszym rozdziale metody szacowania wartości LOD i LOQ dla metod opartych o górną granice przedziału ufności są nieco bardziej zaawansowane obliczeniowo. W metodach ULA1 i ULA2 (w przypadku zachowania warunku (4) przy konstruowaniu krzywej kalibracyjnej), obliczanie obu granic można znacznie uprościć korzystając ze stabelaryzowanych wartości $t(v, \alpha)$ oraz współczynników B(n).

Wyliczone współczynniki pozwalają łatwe obliczenie wartości LOD i LOQ w metodach ULA1 i ULA2.

W tym przypadku oszacowanie upraszcza się do prostej operacji matematycznej z wykorzystaniem parametrów k_D^{ULA} i k_Q^{ULA} zestawionych w tabelach 1 i 2 oraz danych modelu (parametr b₁) oraz odchylenia standardowego (s_{xy}) uzyskanych dla krzywej kalibracyjnej. Wartości współczynników k_D^{ULA1} , k_Q^{ULA1} oraz k_D^{ULA2} , k_Q^{ULA2} obliczone dla przedziału ufności 100(1- α)=99 % zestawiono w tablicach 1 i 2 (porównaj prace [9][10]).

W celu obliczenia rzeczywistych wartości granic oznaczalności i wykrywalności metali ciężkich przedstawionymi metodami SA i ULA, w części eksperymentalnej wykonano dwie serie pomiarowe dla śladowych ilości miedzi w metodzie płomieniowej spektrofotometrii absorpcyjnej (FAAS).

Tabela 1. Wartości współczynników $k_D\,i\,k_Q$ dla metody jednoparametrycznej ULA1 oraz parametry pomocnicze $C(n)\,i\,B(n)$

| | V | ULA1 model y=b ₁ c; t(v; α); v=n-1; α =0.99 | | | |
|----|---------|---|-------------------|--|--|
| n | v -n-1 | $t(y;0.99) - k^{ULA1}$ | k ^{ULA1} | | |
| 2 | v —II I | $t(v,0,0) = k_D$ | 05.462 | | |
| 2 | 1 | 31,821 | 95,463 | | |
| 3 | 2 | 6,965 | 20,895 | | |
| 4 | 3 | 4,541 | 13,623 | | |
| 5 | 4 | 3,747 | 11,241 | | |
| 6 | 5 | 3,365 | 10,095 | | |
| 7 | 6 | 3,143 | 9,429 | | |
| 8 | 7 | 2,998 | 8,994 | | |
| 9 | 8 | 2,897 | 8,691 | | |
| 10 | 9 | 2,821 | 8,463 | | |
| 11 | 10 | 2,764 | 8,292 | | |
| 12 | 11 | 2,718 | 8,154 | | |
| 13 | 12 | 2,681 | 8,043 | | |
| 14 | 13 | 2,65 | 7,95 | | |
| 15 | 14 | 2,624 | 7,872 | | |
| 16 | 15 | 2,602 | 7,806 | | |
| 17 | 16 | 2,583 | 7,749 | | |
| 18 | 17 | 2,567 | 7,701 | | |
| 19 | 18 | 2,552 | 7,656 | | |
| 20 | 19 | 2,539 | 7,617 | | |
| 21 | 20 | 2,528 | 7,584 | | |
| 22 | 21 | 2,518 | 7,554 | | |
| 23 | 22 | 2,508 | 7,524 | | |
| 24 | 23 | 2,5 | 7,5 | | |
| 25 | 24 | 2,492 | 7,476 | | |
| 26 | 25 | 2,485 | 7,455 | | |
| 27 | 26 | 2,479 | 7,437 | | |
| 28 | 27 | 2,473 | 7,419 | | |
| 29 | 28 | 2,467 | 7,401 | | |
| 30 | 29 | 2,457 | 7,371 | | |
| 32 | 31 | 2,449 | 7,347 | | |
| 34 | 33 | 2,441 | 7,323 | | |
| 36 | 35 | 2,435 | 7,305 | | |
| 38 | 37 | 2,429 | 7,287 | | |
| 40 | 39 | 2,326 | 6,978 | | |
| 00 | 8 | 2,326 | 6,978 | | |

Table 1. Values of k_D i k_Q coefficients for ULA1 method and some auxiliary parameters C(n) i B(n)

^{*)} n – liczba pomiarów dla tła i krzywej kalibracyjnej, v – liczba stopni swobody

Tabela 2. Wartości współczynników kD i kQ oraz parametry pomocnicze C(n) i B(n) dla metody ULA2

Table 2. Values of kD i kQ coefficients for ULA2 equidistant method and some auxiliary parameters $C(n) \ i \ B(n)$

| n | C(n) | B(n) | ULA2 model y= b_0+b_1c ; t(v; α); v=n-2; α =0,99 | | | | |
|----|---------|---------|---|-----------|--------------|--------------|--|
| | | | ν | t(v;0,99) | k_D^{ULA2} | k_Q^{ULA2} | |
| 3 | 0,5 | 1,35401 | 1 | 31,821 | 43,08595 | 129,2579 | |
| 4 | 0,45 | 1,30384 | 2 | 6,965 | 9,081246 | 27,24374 | |
| 5 | 0,4 | 1,26491 | 3 | 4,541 | 5,743956 | 17,23187 | |
| 6 | 0,35714 | 1,23443 | 4 | 3,747 | 4,625409 | 13,87623 | |
| 7 | 0,32143 | 1,21008 | 5 | 3,365 | 4,071919 | 12,21576 | |
| 8 | 0,29167 | 1,19024 | 6 | 3,143 | 3,740924 | 11,22277 | |
| 9 | 0,26667 | 1,17379 | 7 | 2,998 | 3,519022 | 10,55707 | |
| 10 | 0,24546 | 1,15994 | 8 | 2,897 | 3,360346 | 10,08104 | |
| 11 | 0,22727 | 1,14812 | 9 | 2,821 | 3,238847 | 9,71654 | |
| 12 | 0,21154 | 1,13792 | 10 | 2,764 | 3,145211 | 9,435633 | |
| 13 | 0,1978 | 1,12904 | 11 | 2,718 | 3,068731 | 9,206192 | |
| 14 | 0,18571 | 1,12122 | 12 | 2,681 | 3,005991 | 9,017972 | |
| 15 | 0,175 | 1,1143 | 13 | 2,65 | 2,952895 | 8,858685 | |
| 16 | 0,16544 | 1,10813 | 14 | 2,624 | 2,907733 | 8,723199 | |
| 17 | 0,15686 | 1,10258 | 15 | 2,602 | 2,868913 | 8,606739 | |
| 18 | 0,14912 | 1,09758 | 16 | 2,583 | 2,835049 | 8,505147 | |
| 19 | 0,14211 | 1,09304 | 17 | 2,567 | 2,805834 | 8,417501 | |
| 20 | 0,13571 | 1,08891 | 18 | 2,552 | 2,778898 | 8,336695 | |
| 21 | 0,12987 | 1,08512 | 19 | 2,539 | 2,75512 | 8,265359 | |
| 22 | 0,12451 | 1,08165 | 20 | 2,528 | 2,734411 | 8,203234 | |
| 23 | 0,11957 | 1,07844 | 21 | 2,518 | 2,715512 | 8,146536 | |
| 24 | 0,115 | 1,07548 | 22 | 2,508 | 2,697304 | 8,091912 | |
| 25 | 0,11077 | 1,07274 | 23 | 2,5 | 2,68185 | 8,04555 | |
| 26 | 0,10684 | 1,07019 | 24 | 2,492 | 2,666913 | 8,00074 | |
| 27 | 0,10317 | 1,06781 | 25 | 2,485 | 2,653508 | 7,960524 | |
| 28 | 0,09975 | 1,06558 | 26 | 2,479 | 2,641573 | 7,924718 | |
| 29 | 0,09655 | 1,0635 | 27 | 2,473 | 2,630036 | 7,890107 | |
| 30 | 0,09355 | 1,06155 | 28 | 2,467 | 2,618844 | 7,856532 | |
| 32 | 0,08807 | 1,058 | 30 | 2,457 | 2,599506 | 7,798518 | |
| 34 | 0,08319 | 1,0548 | 32 | 2,449 | 2,583205 | 7,749616 | |
| 36 | 0,07883 | 1,052 | 34 | 2,441 | 2,567932 | 7,703796 | |
| 38 | 0,0749 | 1,0494 | 36 | 2,435 | 2,555289 | 7,665867 | |
| 40 | 0,07134 | 1,0471 | 38 | 2,429 | 2,543406 | 7,630218 | |
| x | 0 | 1 | 8 | 2,326 | 2,326 | 6,978 | |
| | | | | - 1 / 0 | | | |

*) $C(n) = \overline{c}^2 / \sum_{i=1}^n (c_i - \overline{c})^2$; $B(n) = [1 + 1/n + C(n)]^{1/2}$

2. Część eksperymentalna

2.1. Materiały i zastosowana aparatura badawcza

Aparatura

badań wykorzystano dwuwiązkowy spektrofotometr AAS SensAA firmy GBC Scientific Equipment z korekcją tła (lampa deuterowa), lampą wielopierwiastkową z 6 katodami wnękowymi do oznaczeń Cu/Zn/Co/Pb/Cr. Oznaczenia przeprowadzono metodą płomieniową (FAAS) na spektrometrze wyposażonym w standardowy nebulizer, tytanowy palnik o długości szczeliny 100 mm i płomień o składzie acetylen – powietrze.

Parametry metody

- Prąd lampy: 3 mA,
- długość fali: 324 nm,
- szerokość szczeliny: 0,5 nm,
- korekcja tła: włączona,
- tryb pomiaru: wysokość piku,
- ilość powtórzeń: pomiaru: wynik jako średnia arytmetyczna z 3 pomiarów,
- liczba powtórzeń dla pojedynczego punktu krzywej kalibracyjnej: 10,
- rodzaj kalibracji: liniowa metodą najmniejszych kwadratów,
- czas próbkowania: 3s.

Ustawienie pozycji palnika, lampy, parametry metody i płomienia zostały zoptymalizowane dla uzyskania maksymalnej wartości absorbancji zalecanej przez producenta aparatury dla wzorca miedzi o stężeniu 5 ppm i pozostawały stałe dla przez cały czas analizy dla obu serii pomiarowych.

Odczynniki

Do analizy wykorzystano odczynniki analityczne posiadające certyfikat materiału referencyjnego z NIST w tym wzorzec miedzi czystości spektralnej - roztwór podstawowy o stężeniu 1000 mg Cu^{2+}/L . Do przygotowania rozcieńczeń jako roztwory dodatkowe wykorzystano spektralnie czysty stężony HNO₃ (Supra Pure) i wodę dejonizowaną do oznaczeń ASA.

2.2. Zastosowana metodologia badawcza

Przygotowanie wzorców kalibracyjnych

W celu wykonania pomiarów dla krzywej kalibracyjnej przygotowano serię roztworów wzorcowych o stężeniach: 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg Cu/dm³. Wzorce kalibracyjne przygotowano przez rozcieńczanie wzorca podstawowego miedzi 1 g/ dm³. Jako roztwór podstawowy do pomiarów tła zastosowano 1% roztwór spektralnie czystego HNO₃ w wodzie dejonizowanej, który wykorzystany został do rozcieńczeń. Oznaczenia wykonano w szkle laboratoryjnym przygotowanym do oznaczeń śladów miedzi przemytym roztworem spektralnie czystego HNO₃ [10,11].

Opis procedury analitycznej

W celu oszacowania granic oznaczalności i wykrywalności miedzi w metodzie FAAS wykonano dwie serie pomiarowe dla roztworu podstawowego 1% HNO₃ spektralnie czystego oraz serie kalibracyjne dla roztworów wzorcowych w zakresie stężeń 0,2 - 1,0 mg Cu/dm³.

Dla oszacowania wartości LOD i LOQ dla metody standardowej wykonano serię pomiarów dla czystego 1% HNO₃ rejestrując $n_b=52$ wartości absorbancji dla próby zerowej (tła). Pomiary dla krzywej kalibracyjnej wykonano dla serii pięciu roztworów wzorców o wzrastających stężeniach: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/dm3 . Zbiór danych kalibracyjnych składał się z dziesięciu powtórzeń dla każdego punktu kalibracyjnego. Dla całej serii pomiarowej wykonano łącznie $n_b+n_k=52+5*9=97$ pomiarów.

Dla oszacowania wartości LOD i LOQ dla metody zaawansowanej (ULA – Upper limit approach) wykonano serię pomiarową dla tła oraz dla serii pięciu roztworów wzorców o wzrastających stężeniach: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/ dm³. Liczba powtórzeń była jednakowa dla roztworu podstawowego 1% HNO₃ (pomiary tła) (n_b=10) jak i dla każdego z punktów na krzywej kalibracyjnej. Dla całej serii pomiarowej wykonano łącznie n_b+n_k=9+5*9=54 pomiary.

Wyniki zapisano na dysku twardym przyrządu w celu dalszego przetworzenia za pomocą oprogramowania statystycznego.

2.3. Obliczenia wartości granic wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) dla metody standardowej SA i metod wykorzystujących przedział ufności dla modelu kalibracyjnego

W metodzie płomieniowej spektrofotometrii absorpcyjnej (FAAS) w szerokim zakresie dopuszczalnym przez metodę dla miedzi 0,1 ppm-10 ppm zależność kalibracyjna zwykle przyjmuje postać nieliniową A= $1/(b_0+b_1*c)$. Testy statystyczne przeprowadzone dla krzywej kalibracyjnej wyznaczanej w ograniczonym zakresie stężeń pierwiastka (0,0-1,0 mg/L) wykazują, że adekwatnym modelem jest funkcja liniowa w postaci: A= b_0+b_1*c .

Obliczenia dla metody standardowej SA1 opierały się na wynikach otrzymanych dla pierwszej serii pomiarowej. Po obliczeniu wartości średniej sygnału analitycznego dla tła \bar{y}_b oraz odchylenia standardowego próby zerowej s_b , dokonano korekcji wartości wszystkich punktów pomiarowych w zbiorze danych o wartość \bar{y}_b .

W wyniku analiza dla pierwszej serii pomiarowej otrzymano model liniowy w postaci:

| Model krzywej kalibracyjnej SA1 | A=0,08569 *c |
|---------------------------------|---------------|
| Współczynnik determinacji | $R^2 = 0,999$ |

Krzywa kalibracyjna dla modelu SA1 oraz dane wykorzystane do obliczeń zostały graficznie przedstawione na rycinie 3.



Rys. 3. Wykres dla modelu kalibracyjnego Abs= b_1 *c (metoda SA1) Fig. 3. Series of experimental points for SA1 method and Abs= b_1 *c calibration curve for this method

Parametr krzywej kalibracyjnej b_1 oraz wartość odchylenia standardowego dla ślepej próby s_b pozwoliły oszacować wartości LOD i LOQ dla metody standardowej SA1. Wyniki obliczeń zestawiono w tablicy 3.

Obliczenia dla metody ULA1 i ULA2 zostały przeprowadzone dla drugiego mniej licznego zbioru danych składającego się z 9 powtórzeń pomiarów dla 6 punktów kalibracyjnych (pomiary dla tła włączono zbioru jako dane kalibracyjne). Podobnie jak w metodzie standardowej wykonano analizę regresji liniowej metodą najmniejszych kwadratów korzystając z prostego modelu A=b1*c w przypadku metody ULA1 oraz pełnego modelu kalibracyjnego z dwoma parametrami A=b0+b1*c dla metody ULA2.

Wyniki analizy serii pomiarowej dla obu metod przedstawiają równania:

| Model krzywej kalibracyjnej ULA1 | A = 0,08636*c | $R^2 = 0,9996$ |
|----------------------------------|-----------------------|----------------|
| Model krzywej kalibracyjnej ULA2 | A = 0,0862*c + 0,0003 | $R^2 = 0,9996$ |

Krzywa kalibracyjna dla modelu ULA1 i ULA2 oraz dane wykorzystane do obliczeń zostały graficznie przedstawione na rysunku 4.



Rys. 4. Wykresy dla modelu kalibracyjnego (metoda ULA) Fig. 4. Series of experimental points for ULA methods and calibration curves for these methods

Parametry modelu oraz wartości odchylenia standardowego dla krzywych kalibracyjnych s_{xy} dla obu metod oraz obliczone wartości LOD i LOQ zestawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Porównanie obliczonych wartości granic wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) miedzi w metodzie FAAS dla procedury metody standardowej SA i metod wykorzystujących przedział ufności dla modelu kalibracyjnego y=b1c (ULA1) oraz modelu y=b0+b1c (ULA2)

Table 3. Determination of copper by FAAS method - comparison of results of the LOD and LOQ values obtained for standard (SA1) and upper limit ULA1 and ULA2 approaches

| Metoda standardowa SA1, y=b ₁ *c | | Metoda górnej granicy przedziału ufności krzywej kalibracyjnej | | | |
|--|------------|---|----------|-----------------------|--------|
| | | ULA1, $y=b_1*c$ | | ULA2, $y=b_0+b_1*c$ | |
| n _b | 52 | n _b | 9 | n _b | 9 |
| n _k | 45 | n _k | 45 | n _k | 45 |
| n _t | 97 | n _t | 54 | n _t | 54 |
| <u></u> y _b | | $v = n_t - 1$ | 53 | $v = n_t - 2$ | 52 |
| s _b | 0,00084 | S _{xy} | 0,000995 | S _{xv} | 0,0011 |
| 3 s _b | 0,0025 | t(v,0.99) | — | t(v,0.99) | 2,34 |
| 10 s _b | 0,0084 | B(n) | | B(n) | 1,0 |
| b ₀ | _ | b ₀ | | b ₀ | 0,0003 |
| b ₁ | 0,08569 | b ₁ | 0,08636 | b ₁ | 0,0862 |
| | | | | | |
| LOD= | 0,029 mg/L | LOD= | 0,027 | LOD= | 0,031 |
| LOQ= | 0,097 mg/L | LOQ= | 0,081 | LOQ= | 0,092 |

^{*)} objaśnienie: $n_b - ilość pomiarów dla ślepej próby, <math>n_t$ - całkowita ilość pomiarów dla tła (n_b) oraz pomiarów dla wzorców (n_k) wykorzystywanych do obliczeń, \bar{y}_b - średnia z wyników dla tła (SA1), s_b - odchylenie standardowe wyników pomiaru sygnału analitycznego dla tła, s_{xy} - odchylenie standardowe dla wszystkich punktów pomiarowych dla danych kalibracyjnych, ν - liczba stopni swobody, t(ν ,0.99) - Wartości krytyczne z rozkładu t-Studenta dla poziomu ufności 0,99 (tablica 1), B(n) - współczynnik obliczeniowy dla metody ULA2, b_0 , b_1 - parametry krzywej kalibracyjnej $y=b_0+b_1*C$

3. Podsumowanie i dyskusja wyników

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki oszacowania granic wykrywalności i oznaczalności miedzi w metodzie FAAS dla nowych metod statystycznych wykorzystujących przedział ufności krzywej kalibracyjnej zalecanych przez organizacje normalizacyjne IUPAC i ACS. Uzyskane wyniki porównano z obliczeniami dla standardowej metody szacowania LOD i LOQ. Z porównania wyników zestawionych w tablicy 3, uzyskiwanych dla różnych metodologii wynika, że we wszystkich metodach uzyskuje się zbliżone wyniki granicy wykrywalności LOD na poziomie 30 µg/L oraz granicy oznaczalności LOQ w zakresie 80-100 µg/L.

Należy również zaznaczyć , że nowe metody ULA1 i ULA2 są znacznie wygodniejsze do zastosowania w rutynowej praktyce laboratoryjnej, ponieważ pozwalają uzyskać zbliżone wartości LOD i LOQ dla znacznie mniejszej liczby punktów pomiarowych, niż w metodzie standardowej. Wyniki obliczeń przeprowadzonych metodą SA dla mniej licznego zbioru danych wykazały wyraźnie zaniżone wartości LOD i LOQ na poziomie odpowiednio 12,4 µg/L i 24,7 µg/L w stosunku do wartości rzeczywistych.

Literatura

- [1] Mc Naught A.D, Wilkinson A.: IUPAC Compendium of Chemical Technology Blackwell Science 1997.
- [2] IUPAC, ANALYTICAL CHEMISTRY DIVISION: Nomenclature, symbol, units and their usage in spectrochemical analysis. II. Data interpretation. Spectrochim. Acta, 33 B, 1978, s. 241-246.
- [3] Currie L. A.: Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. IUPAC Recommendations 1995. Pure Appl.Chem., 67, 1995, s. 1699-1723.
- [4] ACS Committee of Environmental Improvement: Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry. Anal. Chem., 52, 1980, s. 2242-2249.
- [5] Massart D.L., Vandeginste B.G.M., Deming S.N., Micotte Y., Kaufman L.: Chemometrics: a Textbook. Elsevier, Amsterdam, 1988, s. 86-91; s. 113-114.
- [6] Kaiser H.: Quantitation in Elemental Analysis, Anal. Chem., 42, 2, s. 24A-38A.
- [7] Kaiser H.: Quantitation in Elemental Analysis (Part II), Anal. Chem., 42, 4, s. 26A-58A.
- [8] Mocak J., Bond A. M., Mitchell S., Schollary G.: A Statistical Overview of Standard (IUPAC and ACS) and New Procedures for Determining the Limits of Detection and Quantification: Application to Voltammetric and Stripping Techniques. Pure Appl. Chem., 69, 1997, s. 297-328.
- [9] Mocak J., Varga S., Polak P., Gergely S., Izak J.: Calibration Some newer chemometrical aspects in instrumental analysis. Wissenschaftliche Zeitsch., 32, 1990, s. 43-49.

- [10] Polska Norma PN-Z-04106-3:2002, Ochrona czystości powietrza. Badania zawartości miedzi i jej związków. Oznaczanie dymów i pyłów miedzi i jej związków na stanowiskach pracy metodą płomieniową absorpcyjnej spektrometrii atomowej.
- [11] Polska Norma PN-79/Z-04106/02, Ochrona czystości powietrza. Badania zawartości miedzi i jej związków. Oznaczanie miedzi i jej związków na stanowiskach pracy metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej.

APPLICATION OF UPPER CONFIDECE BAND OF A CALIBRATION CURVE FOR ESTIMATION OF LIMIT OF DETECTION AND QUANTIFICATION OF COPPER IN FAAS METHOD

Summary

In this paper new procedures for estimation of limit of detection and quantification recommended by IUPAC and ACS have been applied for determination of copper in FAAS method. In introduction, the theoretical background for standard statistical methods for LOD and LOQ calculation as well as new methods based on upper limit approach has been described. In order to compare presented procedures for calculation of limit of detection and quantification a series of FAAS experimental data for copper in range of 0-1 ppm have been recorded and analyzed. Presented calculations for experimental data according to both presented procedures gave similar results on level of 30 μ g Cu/L (LOD) and 80-100 μ g Cu/L (LOQ). Experimental results obtained are similar to levels reported in AAS literature.

Keywords: limit of detection, LOD, limit of quantification, LOQ, flame atomic absorption spectrometry, trace determination of copper

Przesłano do redakcji: 30.05.2015r. Przyjęto do druku:30.10.2015r.

DOI: 10.7862/rb.2015.100