

VALIDÁCIA METÓDY STANOVENIA KADMIA METÓDOU ETA-AAS

SOŇA FÁNDLYOVÁ^a, ONDREJ HEGEDŮS^{a,b}
a ALŽBETA HEGEDŮSOVÁ^a

^a Katedra chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Tr. A. Hlinku 1, 949 74 Nitra, ^b Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Nitre, Štefánikova 58, 949 63 Nitra, Slovenská republika
ahegedusova@ukf.sk, labodbor@zoznam.sk

Došlo 14.6.06, prijaté 30.11.06.

Kľúčové slová: stanovenie kadmia, ETA-AAS, validácia

Úvod

Akreditácia skúšobných laboratórií znamená preukázať zhodu s požiadavkami európskej normy EN ISO/IEC 17025:2005, ktorá bola v priebehu roka 2005 vydaná v Slovenskej republike vo forme národnej normy s identickým obsahom. Táto norma stanovuje všeobecné požiadavky na spôsobilosť vykonávať skúšky alebo kalibrácie vrátane vzorkovania. Popisuje požiadavky na skúšanie a kalibrácie, ktoré sa vykonávajú použitím normalizovaných metód, nenormalizovaných metód a metód vyvinutých laboratóriom. V technických požiadavkách normy sú popísané požiadavky na skúšobné a kalibračné metódy a validáciu metód. Podľa normy STN EN ISO/IEC 17025:2005 (cit.¹) validácia je potvrdenie preskúmaním a podaním objektívnych dôkazov, že požiadavky, ktoré sa kladú na uvažované špecifické použitie, sú splnené, a musí byť taká rozsiahla, koľko treba na splnenie požiadaviek daného použitia alebo oblasti používania. Citovaná norma striktné neurčuje rozsah a formu validácie, túto úlohu necháva na laboratória, ktoré metódy navrhujú, vyvíjajú, modifikujú, resp. používajú vo svojich špecifických podmienkach. Validácia má byť taká rozsiahla, aby výsledky skúšania validovanými metódami zodpovedali potrebám zákazníkov. Odporúčajú sa rôzne techniky alebo ich kombinácia:

- kalibrácia použitím referenčných etalónov alebo referenčných materiálov,
- porovnanie s výsledkami dosiahnutými inými metódami,
- medzilaboratórne porovnanie,
- systematické posúdenie faktorov ovplyvňujúcich vý-

sledok,

- posúdenie neistoty výsledkov založené na vedeckej znalosti teoretických základov metódy a na praktických skúsenostiach.

Validácia metódy v praxi znamená aj to, že výsledky analýz, získané počas validácie, sa musia podrobiť štatistickej analýze. Na hodnotenie nameraných dát v skúšobných laboratóriách už v súčasnej dobe existuje bohatá ponuka profesionálnych počítačových programov. Pre skúšobného užívateľa tieto komerčné programy dávajú širokú možnosť štatistického hodnotenia výsledkov. Pre skúšobné laboratória je často výhodné mať metódy, vytvorené pre konkrétne potreby laboratória, ktoré môžu využívať bez špeciálneho vzdelania v oblasti štatistiky.

Cieľom predloženej práce bolo stanoviť vybrané validačné charakteristiky analytickej metódy stanovenia kadmia metódou AAS v rastlinnom materiáli pomocou štatistickej metódy vytvorenej vo vlastných laboratóriách v programe Excel.

Experimentálna časť

Použité prístroje a zariadenia

- Na stanovenie kadmia sa použil atómový absorpčný spektrofotometer SpectrAA–200 fy. Varian, Austrália. Merania sa uskutočnili využitím techniky elektrotermickej atomizácie s deutériovou kompenzáciou pozhadia s modulom GTA-100,
- mineralizačný autokláv ZA-1.

Chemikálie a reagenty

- kyselina dusičná, suprapur, Merck
- peroxid vodíka p.a. Merck s certifikátom
- použitý štandard na zostrojenie kalibračnej závislosti: Cadmium standard solution, koncentrácia 0,0015 mg l⁻¹, dodávateľ Merck. Pracovné roztoky sa pripravili riedením základného roztoku v 1% (v/v) roztoku HNO₃,
- použitý referenčný materiál na overenie správnosti metódy: Standard Reference Material N 1570a, Trace Elements in Spinach Leaves, NIST USA, dodávateľ Chemmea s.r.o. Bratislava, obsah Se je 2,89 ± 1,0 mg kg⁻¹
- deionizovaná voda

Podmienky merania

Pri použití elektrotermickej atomizácie sa na meranie použila katódová kadmiová výbojka, prúd na lampe 10 mA, vlnová dĺžka 228,8 nm, šírka štrbiny 1,0 nm,

* Soňa Fándlyová sa s touto prácou úspešne zúčastnila súťaže o cenu firmy Merck 2006 za najlepšiu študentskú vedeckú prácu v odbore analytická chémia.

s deutériovou kompenzáciou pozadia. Dávkovaný objem vzorky 10 μl . Použitý modifikátor: 1% H_3PO_4 v dávkovanom objeme 10 μl . Pre vyhodnotenie výsledkov sa použila metóda kalibračnej krivky.

Validácia metódy

Validácia sa uskutočnila štatistickou analýzou nameraných dát pre nasledovné parametre²: presnosť metódy – ako opakovateľnosť, vyjadrenú relatívnou smerodajnou odchýlkou; správnosť metódy – analýzou matricových referenčných materiálov (RM). Ako RM sa použil: Standard Reference Material N 1570a, Trace Elements in Spinach Leaves, USA; linearita metódy v oblasti očakávaných koncentrácií z kalibračnej závislosti podľa rovnomernosti nárastu relatívnej odozvy prístroja k príslušným koncentráciám; limitné hodnoty analytickej metódy – medza dôkazu (LOD), medza stanoviteľnosti (LOQ) zo zistenej kalibračnej závislosti $y = 77,1 \cdot x - 0,012$ metódou ULA (cit.³); neistota analytickej metódy, vyjadrená ako rozšírená kombinovaná neistota pomocou počítačového programu Metro2003, verzia: 3.02 (cit.⁴). Na pracovisku autorov boli vytvorené také výpočtové tabuľky v programe Excel, ktoré umožnia jednoznačné hodnotenie nameraných dát podľa konkrétnych požiadaviek laboratória na validáciu metódy⁵. Výpočtové tabuľky umožňujú výpočet a hodnotenie nameraných dát so slovným hodnotením plnenia požiadavky na jednotlivé validačné charakteristiky tak, aby dali jednoznačnú odpoveď užívateľovi o ďalšej nutnej činnosti. Postup jednotlivých krokov výpočtu sledovaných validačných charakteristík je popísaný v publikovanej literatúre autorov článku⁶.

Analýzovaný materiál

Na analýzy sa použili vzorky sušenej mrkvy. Vzorky mrkvy sa odoberali z výskumných políčok Výskumného ústavu zeleninárskeho v Nových Zámkoch, vo fáze zberu po aplikácii remediačnej techniky pomocou rôznych adsorbentov.

Spracovanie vzoriek

Vzorky konzumnej časti mrkvy po očistení sa zhomogenizovali a použili na mineralizáciu, resp. na prípravu sušiny.

Sušina sa pripravila sušením čerstvých homogenizovaných vzoriek v sušiarňi pri teplote 105 °C.

Mineralizácia vzoriek: 1 g návažku sušiny mrkvy po homogenizácii v tretej porcelánovej miske sa priamo navažovala do mineralizačných autoklávov typu ZA-1. K naváženým vzorkám sušiny sa pridal na zvlhčenie 1 ml deionizovanej vody. Ku vzorkám sa pridal 5 ml konc. HNO_3 a 2 ml H_2O_2 . Vzorky sa uzavreli do kovových plášťov mineralizačných autoklávov a mineralizovali sa v horkovzdušných sterilizátoroch v trvaní 120 min pri teplote 140 °C.

Úprava mineralizátov pre ETA-AAS: Po vychladnutí

mineralizačných autoklávov sa mineralizáty kvantitatívne preniesli do 25 ml odmerných baniek a doplnili deionizovanou vodou po rysku.

Výsledky a diskusia

Rôzne zeleninové druhy predstavujú maticu, ktorú nie je možné priamo bez úpravy vzorky analyzovať a ktorá tzv. maticovým efektom významne môže ovplyvniť priebeh analýzy. Nakoľko sa jedná o stanovenie nízkych koncentrácií sledovanej látky, bolo treba použiť metódu s vysokou citlivosťou.

Moderné prístroje AAS sú vybavené technikou lineárnej kalibrácie s počiatkom v bode 0, ako aj s nenulovým úsekom, pričom sa pracuje v „normálnom kalibračnom móde“ s kalibráciou vo vodných roztokoch. Predpokladom použitia tejto techniky je, že metóda musí mať požadovanú výťažnosť a vplyv matrice na výsledok merania musí byť malý⁷.

Porovnaním kalibračných závislostí vodných roztokov a mineralizátov so štandardným prídavkom kadmia sa zistilo, že metóda ETA-AAS dávala len o málo odlišnú smernicu závislosti, čo poukazuje na malý vplyv matrice na výťažnosť stanovenia vzoriek zelenín.

Možnosť stanovenia reálnych koncentrácií Cd v analyzovaných vzorkách sa sledovala porovnaním výsledkov meraní slepých vzoriek s výsledkami meraní reálnych vzoriek. Merania sa vykonali sériami analýz slepých vzoriek a vzoriek mrkvy celým analytickým postupom vrátane mineralizácie technikou ETA-AAS. Absorbancia merania slepých vzoriek na AAS sa porovnávala s hodnotami absorbancie vzoriek mrkvy (tab. I). Z výsledkov meraní vyplýva jednoznačná a po analýze série

Tabuľka I

Porovnanie absorbancie merania slepých vzoriek a vzoriek mrkvy

| Vzorka | Absorbancia | |
|---------------------|--------------|---------|
| | slepé vzorky | mrkva |
| 1 | 0,0005 | 0,0020 |
| 2 | 0,0006 | 0,0021 |
| 3 | 0,0005 | 0,0023 |
| 4 | 0,0008 | 0,0022 |
| 5 | 0,0009 | 0,0021 |
| 6 | 0,0004 | 0,0019 |
| 7 | 0,0008 | 0,0020 |
| 8 | 0,0007 | 0,0021 |
| 9 | 0,0008 | 0,0021 |
| 10 | 0,0009 | 0,0021 |
| 11 | 0,0006 | 0,0023 |
| 12 | 0,0005 | 0,0020 |
| Smerodajná odchýlka | 0,00017 | 0,00011 |

Tabuľka II
Hodnotenie opakovateľnosti metódy stanovenia Cd v modelových vodných roztokoch

| Poradové číslo merania | Meraná hodnota [mg l ⁻¹] |
|------------------------|--------------------------------------|
| 1 | 0,2213 |
| 2 | 0,2310 |
| 3 | 0,2180 |
| 4 | 0,2223 |
| 5 | 0,2438 |
| 6 | 0,2298 |
| 7 | 0,2480 |
| 8 | 0,2448 |
| 9 | 0,2446 |
| 10 | 0,2338 |

| Parameter | Hodnota |
|---|------------------------------------|
| Aritmetický priemer, mg l ⁻¹ | \bar{x} 0,234 |
| Smerodajná odchýlka, mg l ⁻¹ | s 0,011 |
| Výberový variačný koeficient, % | $s_R = 100 \cdot s / \bar{x}$ 4,73 |

Tabuľka III
Hodnotenie správnosti metódy stanovenia Cd v referenčnom materiáli

| Poradové číslo merania | Referenčná hodnota [mg kg ⁻¹] | Stanovená hodnota [mg l ⁻¹] | Výťažnosť [%] |
|------------------------|---|---|---------------|
| 1 | | 2,90 | 100,3 |
| 2 | 2,89 | 2,70 | 93,4 |
| 3 | | 3,01 | 104,2 |

| Parameter | Hodnota |
|---|------------------------------------|
| Aritmetický priemer, mg l ⁻¹ | \bar{x} 99,31 |
| Smerodajná odchýlka, mg l ⁻¹ | s 0,157 |
| Výberový variačný koeficient, % | $s_R = 100 \cdot s / \bar{x}$ 5,48 |

vzoriek bezpečná rozlíšiteľnosť absorpcie slepých vzoriek od absorpcie vzoriek mrkvy. Znamená to, že metóda môže byť úspešne použitá aj na stanovenie nízkych koncentrácií Cd v mrkve.

Validita metódy sa overila analýzou reálnych vzoriek.

Analýzou série vzoriek v podmienkach opakovateľnosti sa vypočítala opakovateľnosť metódy. Vypočítaný výberový variačný koeficient merania je 4,73 % (tab. II), čo je nižšia hodnota ako kladená požiadavka. Analýzou

referenčného materiálu sa dokázalo, že sledovaná metóda pracuje s veľmi dobrou výťažnosťou, pričom relatívny rozptyl výsledkov okolo správnej hodnoty je malý (tab. III).

Kadmium ako kontaminant, je prítomné v bežných vzorkách rastlinného materiálu v relatívne malom množstve, čo predurčuje na jeho stanovenie použiť metódu, ktorou je možné jeho nízke koncentrácie bezpečne stanoviť. Ako vyplýva z výsledkov analýzy v tab. IV, medza stanovenia je 0,27 µg l⁻¹, kým medza dôkazu je 0,090 µg l⁻¹, čo v prepočte na návažok vzorky v množstve 1 g pre medzu stanovenia je 6,8 µg kg⁻¹, pre medzu dôkazu 2,3 µg kg⁻¹. Tieto hodnoty dávajú istotu, že hodnoty kadmia, ktoré sa vyskytujú v stanovovaných vzorkách, sa môžu bezpečne stanovovať.

Tabuľka IV
Výpočet detekčných limitov stanovenia z kalibračnej závislosti

| <i>Hodnotenie posunu kalibračného vzťahu v kalibračnej závislosti^a</i> | |
|---|-----------------|
| m , l mg ⁻¹ | 77,01 |
| b | -0,012 |
| $H_0: b = 0$ | $H_1: b \neq 0$ |
| t_{vyp} | 5,5 |
| t_{krit} | 2,1 |

Výpočet medze dôkazu a medze stanovenia z kalibračnej závislosti^a

| | |
|-------------------------|--------|
| $k_{D(n-2; 0,05)}$ | 2,15 |
| s_y | 0,0035 |
| b_{max}^b | 0,021 |
| LOD, µg l ⁻¹ | 0,090 |
| LOQ, µg l ⁻¹ | 0,27 |

^a Absorbancia = $f(c)$, pričom c je koncentrácia [mg l⁻¹], podľa hodnotenia kalibračnej závislosti platí kalibračný model: $y = m \cdot x + b$; ^b najväčší dovolený posun regresnej priamky

Tabuľka V
Výpočet kombinovanej neistoty metódy

| Parameter | Hodnota |
|--|---------|
| Stanovovaná veličina | Cd |
| Stanovená hodnota, µg kg ⁻¹ | 16,0 |
| Kombinovaná štandardná neistota, µg kg ⁻¹ | 2,1 |
| Rozšírená štandardná neistota, µg kg ⁻¹ | ± 4,7 |
| Expanzný koeficient | 2,26 |
| Pravdepodobnosť | 95% |
| Počet stupňov voľnosti | 9 |

Tabuľka VI

Hodnotenie sledovaných validačných charakteristík metódy

| Validačné charakteristiky | Hodnota | | |
|---|-------------------------------------|-----------|---------|
| | požiadavka | namerané | plnenie |
| Medza detekcie, $\mu\text{g l}^{-1}$ | LOD < 0,1 | 0,090 | splnená |
| Medza stanovenia, $\mu\text{g l}^{-1}$ | LOQ < 0,30 | 0,27 | splnená |
| Horná hranica rozsahu merania, $\mu\text{g l}^{-1}$ | min. 1000 | 1300 | splnená |
| Opakovateľnosť metódy, % | $s_R < 10,0$ | 4,7 | splnená |
| Kalibračný graf : | | | |
| – linearita, % | $\Delta_{A \text{ rel}}^a \pm 20,0$ | 11,7–17,3 | splnená |
| – spoľahlivosť regresie, % | $s_{y \text{ rel}}^b < 10,00$ | 2,9 | splnená |
| Správnosť metódy, % | $100 \pm 10,0$ | 101,7 | splnená |
| Kombinovaná štandardná neistota, % | $u_c < 30,0$ | 29,3 | splnená |

^a Maximálna dovolená odchýlka od priemernej relatívnej odozvy; ^b relatívna reziduálna smerodajná odchýlka

Táto skutočnosť sa dokázala aj porovnaním absorbancií sledovaných slepých vzoriek a vzoriek mineralizátov mrkvy, ktoré sú uvedené v tab. I.

Výpočet kombinovanej štandardnej neistoty metódy vyžaduje odhaliť všetky zdroje neistoty počas celého analytického procesu. Použitý výpočtový program na základe výpočtového vzorca stanovovaného analytu zostrojil Ishikawov diagram, pomocou ktorého sú jednotlivé neistoty priradované k výsledku stanovenia. Výsledkom výpočtu je kombinovaná štandardná neistota, ktorú uvádza tab. V.

Všetky vypočítané a jednotlivo hodnotené validačné charakteristiky sa premietli do súhrnnej tabuľky v programe Excel, v ktorej sa na základe výsledkov hodnotenia jednotlivých validačných charakteristík hodnotila validácia ako celok⁵. Z dosiahnutých výsledkov validácie (tab. VI) vyplýva, že metódu možno úspešne používať na analýzu sledovaných vzoriek.

Záver

Výpočtom sledované validačné charakteristiky stanovenia kadmia metódou ETA-AAS, počítané vo výpočtových tabuľkách v programe Excel dokazujú, že metóda sa vyznačuje s požadovanou hodnotou opakovateľnosti a správnosti, linearita merania je zabezpečená v celom rozsahu kalibrácie. Po vypočítaní detekčných limitov metódy je zrejme, že obsah kadmia, ktorý sa vyskytuje v stanovovaných vzorkách rastlinného pôvodu, sa môže bezpečne stanovovať. Vypočítaná kombinovaná neistota merania v sledovanom koncentračnom rozsahu zodpovedá požiadavkám kladeným na metódu.

LITERATÚRA

1. STN EN ISO/IEC 17025:2005: *Všeobecné požiadavky na spôsobilosť skúšobných a kalibračných laboratórií*. SÚTN Bratislava 2005.
2. STN ISO 3534-1: *Štatistika. Slovník a značky – Časť 1: Pravdepodobnosť a všeobecné štatistické termíny* (júl 1999).
3. Mocák J.: *Lab. Diagnostika* 3, 43 (1998).
4. Baričič P., Mackov M.: *Metro2003 (Verzia: 2.30). Laboratórny softvér pre Windows*. Chemmea s.r.o., Bratislava 2003.
5. Hegedús O.: *Chemické analýzy pri zabezpečovaní ochrany zdravia obyvateľstva, Donovaly, 2 – 3. október 2002*, Zborník abstraktov (OCHA, ŠZÚ Banská Bystrica), str. 14.
6. Hegedús O., Hegedúsová A., Gašparik J., Ivičičová A.: *Chem. Listy* 99, 518 (2005).
7. Borošová D.: *Konferencia Chemické analýzy pri zabezpečovaní ochrany zdravia obyvateľstva. Donovaly, 2. – 3. októbra 2002*, Zborník, str.37. Štátny zdravotný ústav v Banskej Bystrici, Banská Bystrica 2002.

S. Fándlyová^a, O. Hegedús^{a,b}, and A. Hegedúsová^a
^a Department of Chemistry, Constantine the Philosopher University in Nitra, ^b Regional Authority of Public Health, Nitra, Slovak Republic): **Validation of ETA-AAS Method of Cadmium Determination**

An ETA (electrothermal atomization)-AAS method of Cd determination in plants was validated by determining its accuracy (under repeatability conditions), trueness, calibration curve and linearity, limit of detection, limit of determination and combined standard uncertainty. The results showed that the method is suitable for the determination of low cadmium contents in vegetables.