

Małgorzata Kania, Marek Janiga
Instytut Nafty i Gazu, Kraków

Elementy walidacji metody analitycznej oznaczania w mieszaninie gazowej związków węglowodorowych oraz N₂, O₂, CO i CO₂ za pomocą dwukanałowego, zaworowego chromatografu gazowego AGILENT 7890A

Wstęp

Przez wiele lat chromatografia była niedoceniana, gdyż nie znano możliwości i zakresu jej zastosowań. Kiedy odkryto, iż metoda ta doskonale nadaje się do rozdzielania wieloskładnikowych mieszanin lotnych i związków organicznych występujących w normalnych warunkach jako gazy, ciecze i ciała stałe, chromatografia gazowa na dobre zagościła w laboratoriach różnych gałęzi przemysłu. Ze względu na fakt, iż metoda ta daje możliwość uzyskania zarówno jakościowych, jak i ilościowych informacji o składnikach analizowanych mieszanin, dzięki rzadko spotykanej w technice efektywności rozdzielczej, jak również stosunkowo niskich kosztach eksploatacji, chromatograf gazowy jest uważany za najpopularniejszy przyrząd w laboratoriach analitycznych na całym świecie [13].

Dzięki kryteriom takim jak: wysoka czułość, niska granica detekcji, dobra selektywność, dobra precyzja i dokładność, krótki czas wykonywania analizy, szeroki zakres zastosowań, możliwość oznaczania kilku substancji jednocześnie, prosta procedura przygotowania próbek do analizy, niewielka objętość próbki pobieranej do analizy, nieskomplikowana obsługa urządzeń pomiarowych, możliwość automatyzacji pomiarów oraz niski koszt aparatury,

metoda chromatografii gazowej okazała się niezmiernie przydatna w przemyśle naftowym. Aby poprawić wszystkie te kryteria Zakład Geologii i Geochemii Instytutu Nafty i Gazu zdecydował się na zakup nowego chromatografu gazowego – z dwoma detektorami płomieniowo-jonizacyjnymi (FID-Front i FID-Back) oraz detektorem TCD, wyposażonym dodatkowo w rurkę katalizatora niklowego (tzw. metanizer), używaną z detektorem FID do analizy śladowej CO i CO₂.

W Zakładzie Geologii i Geochemii INiG dwukanałowy, zaworowy chromatograf gazowy AGILENT 7890A znalazł szereg różnorodnych zastosowań – do oznaczania w trakcie jednego cyklu analitycznego związków węglowodorowych (C₁, C₂, C₃, i-C₄, n-C₄, neo-C₅, i-C₅, n-C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀) oraz gazów takich jak: N₂, O₂, CO i CO₂ w wieloskładnikowych mieszaninach gazowych. Aparat ten okazał się niezmiernie przydatny zarówno do analiz małych ilości gazów, otrzymywanych w trakcie degazacji próbek rdzeniowych pobranych przez kopalnie miedzi, jak również w poszukiwaniu konwencjonalnych i niekonwencjonalnych złóż gazu ziemnego (w ostatnim czasie głównie typu *shale gas*).

Opis chromatografu gazowego AGILENT 7890A

Dwukanałowy, zaworowy chromatograf gazowy AGILENT 7890A składa się z dozownika, pieca, w którym znajdują się kolumny chromatograficzne, modułów prze-

plywu i ciśnienia, skrzynki zaworów, rurki katalizatora niklowego, dwóch detektorów FID (*front* i *back*) oraz detektora TCD. Sterowanie chromatografem może odbywać

się za pośrednictwem komputera i programu ChemStation ver. B.04.02 lub przez panel sterowania znajdujący się na jego frontowej ścianie [5].

W chromatografie Agilent zastosowano cztery typy elektronicznych regulatorów przepływu lub ciśnienia: moduły dozownika, moduły detektora, moduły regulacji ciśnienia (PCM) oraz pomocnicze regulatory ciśnienia (Aux EPC).

Dodatkowo chromatograf ten zawiera do czterech zaworów, umieszczonych w znajdującej się na górze pieca ogrzewanej skrzynce. Skrzynka zaworów jest dla nich najlepszą lokalizacją, ponieważ jest strefą stabilnej temperatury, izolowaną od pieca. Zawory mogą być używane do zmiany typowej ścieżki przepływu dozownik/kolumna/detektor w chromatografie: zawory próbkujące mogą zastępować dozowniki, zawory przełączające pozwalają wybierać kolumny, a zawory wielodrogowe – w połączeniu z zaworami próbkującymi – pozwalają wykonywać takie same funkcje w stosunku do strumienia próbek jak automatyczny podajnik próbek ciekłych (ALS).

Konfiguracja pieca pozwala ustawić maksymalną temperaturę, czas dochodzenia do równowagi, tryb chłodzenia oraz parametry kriogeniki. Istnieje możliwość zainsta-

lowania w piecu równocześnie kilku kolumn chromatograficznych, które należy odpowiednio skonfigurować, podając ich długość, średnicę i grubość warstwy fazy nieruchomej.

Należy również zdefiniować urządzenie sterujące ciśnieniem wlotowym (na końcu kolumny), urządzenie sterujące ciśnieniem na wylocie oraz to, które reguluje temperaturę kolumny. Na podstawie tych informacji przyrząd jest w stanie obliczyć przepływy gazów przez poszczególne kolumny.

Wyposażenie dodatkowe – Nickel Catalyst Tube, G2747A, używane jest do analizy śladowej CO i CO₂ z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym. Próbka gazowa jest oddzielana na kolumnie i przepuszczana z dodatkiem wodoru nad katalizatorem, który przemienia CO i CO₂ w metan (CH₄).

Dwukanałowy, zaworowy chromatograf gazowy AGILENT 7890A posiada zainstalowane dwa detektory płomieniowo-jonizacyjne (FID-Front i FID-Back) oraz ciepło-przewodnościowy detektor TCD. Ponieważ TCD nie powoduje rozkładu próbki podczas pracy, detektor ten może być połączony szeregowo z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym lub innym [2, 6].

Walidowana metodyka analityczna

Metodyka analityczna przeznaczona jest do oznaczania związków węglowodorowych (C₁, C₂, C₃, i-C₄, n-C₄, neo-C₅, i-C₅, n-C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀) oraz gazów takich jak: N₂, O₂, CO i CO₂ w mieszaninach gazowych za pomocą dwukanałowego, zaworowego chromatografu gazowego.

Aparatura

- Dwukanałowy, zaworowy chromatograf gazowy z dwoma detektorami płomieniowo-jonizacyjnymi (FID-Front i FID-Back) oraz detektorem TCD; AGILENT 7890 A, Serial No. CN10181125, z oprogramowaniem ChemStation ver. B.04.02.
- Kolumny kapilarne połączone z detektorem TCD i FID-Front: HP-PLOT/Q długość 15 m, średn. wew. 0,53 mm; HP-PLOT/Q długość 30 m, średn. wew. 0,53 mm; HP-MOLESIEVE 5A długość 30 m, średn. wew. 0,53 mm.
- Kolumna kapilarna połączona z detektorem FID-Back HP-PONA, długość 50 m, średn. wew. 0,200 mm.

Warunki pracy chromatografu

- Gaz nośny: argon,

- Prędkość przepływu:

Prędkość wzrostu [ml/min]	Przepływ [ml/min]	Czas [min]
-	3	9
50	6	0

- Program temperaturowy kolumny:

Prędkość [°C/min]	Temperatura [°C]	Czas [min]
-	35	15
15	100	1
20	260	3

- Temperatura katalizatora niklowego: 375°C,
- Temperatura skrzynki z zaworami: 120°C,
- Temperatura dozownika: 200°C,
- Podział strumienia – 20:1.

Ustawienia detektora FID-Front:

- Temperatura: 300°C,
- Gazy pomocnicze:
 - wodór, szybkość przepływu – 50 ml/min,

- powietrze, szybkość przepływu – 400 ml/min,
- makeup (azot), szybkość przepływu – 5 ml/min.

Ustawienia detektora FID-Back:

- Temperatura: 300°C,
- Gazy pomocnicze:
 - wodór, szybkość przepływu – 30 ml/min,
 - powietrze, szybkość przepływu – 400 ml/min,

- makeup (azot), szybkość przepływu – 25 ml/min.

Ustawienia detektora TCD:

- Temperatura: 200°C,
- Przepływ referencyjny: 15 ml/min,
- Ujemna polaryzacja,
- Gazy pomocnicze: makeup (azot), szybkość przepływu – 1 ml/min.

Kalibracja metody analitycznej

Etap kalibracji jest integralną i nieodzowną częścią każdej procedury analitycznej. Celem kalibracji jest minimalizacja błędów pomiarowych, czyli kontrola i zapewnienie odpowiedniej jakości uzyskiwanych wyników. Kalibracja odgrywa także istotną rolę na etapie opracowania nowych procedur analitycznych i sprawdzania ich zakresu stosowności, bowiem przed wprowadzeniem takich procedur do praktyki analitycznej konieczne jest ich sprawdzenie w laboratorium, w trakcie badań modelowych z wykorzystaniem odpowiednich próbek wzorcowych.

W materiałach IUPAC można znaleźć informacje na temat dwóch podejść do zagadnienia kalibracji. Wyróżnia się: kalibrację jakościową (identyfikacja i analiza jakościowa) oraz kalibrację ilościową (analiza ilościowa) [4].

Kalibracja jest definiowana w różny sposób. W jednym, szeroko rozpowszechnionym słowniku jest określana jako „oznaczanie, poprawianie lub cechowanie, skalowanie” [12] w innym z kolei jako „model próbujący przewidzieć wartość zmiennej niezależnej w przypadku, gdy tylko zmienna zależna jest znana” [1]. Ogólnie pod pojęciem „kalibracji analitycznej” rozumie się proces

polegający na przedstawieniu rzeczywistej (prawdziwej, teoretycznej) zależności sygnału analitycznego od stężenia analitu w postaci empirycznej (czyli tzw. wykresu kalibracyjnego), a następnie wykorzystaniu tego wykresu do wyznaczenia stężenia analitu w badanej próbce (czyli uzyskania tzw. wyniku analitycznego).

Kalibracja analityczna składa się z trzech etapów [8, 3]:

- 1) laboratoryjnego – sporządzanie roztworów wzorcowych,
- 2) pomiarowego – konstruowanie wykresu kalibracyjnego,
- 3) matematycznego – obliczenia wartości wyniku analitycznego.

Kalibracja pozwala na uniknięcie wielu błędów; zarówno w analizie jakościowej, jak i ilościowej. Jednak, gdy zostanie przeprowadzona w sposób nierzetelny, może doprowadzić do zafałszowania końcowego wyniku analizy [3].

Kalibrację walidowanej procedury analitycznej przeprowadzono w oparciu o krzywą wzorcową. W związku z tym wyznaczono zależność sygnału analitycznego (pola powierzchni piku) w funkcji stężenia oznaczanego składnika, dla serii gazowych mieszanin wzorcowych. Wyniki kalibracji zostały zaprezentowane w tablicy 1.

Tablica 1. Wyniki kalibracji oznaczanych składników przy wykorzystaniu detektorów: FID1 A, FID2 B oraz TCD

Nr	RT [min]	Detektor	Związek	Poziom	Stężenie [ppm]	Powierzchnia [pA*s]	RF
1	7,360	FID1 A	CO ₂	1	19,780	180,230	1,0975e-1
				2	8 190,000	45 189,000	1,8124e-1
2	8,595	FID2 B	Etan	1	995,600	119,630	8,322
				2	10 670,000	1 257,900	8,482
3	9,048	FID2 B	Propan	1	987,200	178,320	5,536
				2	9 990,000	1 776,800	5,622
4	9,764	FID2 B	i-Butan	1	2,204	5,4483e-1	4,046
5	10,358	FID2 B	n-Butan	1	975,500	241,110	4,046
				2	9 160,000	2 193,300	4,176
6	10,656	FID2 B	neo-Pentan	1	11,914	3,517	3,388
7	11,990	FID1 A	Etan	1	995,600	11 325,000	8,7909e-2
				2	10 670,000	121 360,000	8,7923e-2

cd. Tablica 1.

Nr	RT [min]	Detektor	Związek	Poziom	Stężenie [ppm]	Powierzchnia [pA*s]	RF
8	12,580	FID2 B	i-Pentan	1	9,724	2,870	3,388
9	13,758	FID2 B	n-Pentan	1	1 034,100	305,180	3,388
				2	5 320,000	1 537,000	3,461
10	14,600	TCD3 C	O ₂	1	5 000,000	324,110	15,427
				2	9 800,000	630,060	15,554
11	14,950	TCD3 C	N ₂	1	10 780,000	752,320	14,329
				2	60 000,000	3 011,700	19,922
				3	780 800,000	36 785,000	21,226
12	16,000	FID1 A	Metan	1	20,030	129,490	1,5469e-1
				2	11 350,000	63 023,000	1,8009e-1
				3	690 000,000	4,3591e6	1,5829e-1
13	17,922	FID1 A	CO	1	9 620,000	53 656,000	1,7929e-1
				2	95 200,000	522 250,000	1,8229e-1
14	19,226	FID2 B	n-Heksan	1	918,200	323,900	2,835
				2	5 430,000	1 877,700	2,892
15	23,560	FID2 B	n-Heptan	1	771,740	272,220	2,835
16	26,405	FID2 B	n-Oktan	1	786,490	277,420	2,835
17	28,317	FID2 B	n-Nonan	1	799,950	282,170	2,835
18	29,755	FID2 B	n-Dekan	1	1 609,700	567,810	2,835

gdzie: RT – czas retencji, RF – współczynnik odpowiedzi detektora

W analizowanym zakresie stężeń, dla poszczególnych składników w trakcie kalibracji walidowanej procedury analitycznej udowodniono liniową zależność sygnału

analitycznego (pola powierzchni pików) w funkcji stężenia oznaczanych związków, które wykonano dla serii gazowych mieszanin wzorcowych.

Eksperyment walidacyjny

Zgodnie z punktem 5.4 normy PN-EN ISO/IEC 17025 [11], laboratorium powinno stosować właściwe metody i procedury dla wszystkich pomiarów objętych zakresem swojej działalności. Dotyczy to: pobierania próbek, postępowania z obiektami poddawanych badaniom, ich przygotowania, przechowywania i transportowania, a tam, gdzie to właściwe – także oszacowania niepewności pomiaru. Dlatego właśnie w minionych latach zagadnienia związane z walidacją metod analitycznych stały się ważną częścią praktyki laboratoryjnej.

W punkcie 5.4.5.1 normy PN-EN ISO/IEC 170025 [11] podano pełną definicję walidacji, która brzmi: „Walidacja jest potwierdzeniem, przez zbadanie i przedstawienie obiektywnego dowodu, że zostały spełnione szczególne wymagania dotyczące konkretnie zamierzonego zastosowania”.

Laboratorium powinno prowadzić walidację metod nieznormalizowanych, metod zaprojektowanych/rozwi-

janych w laboratorium, metod znormalizowanych wykorzystywanych poza przewidzianym dla nich zakresem oraz metod znormalizowanych, które zostały rozszerzone lub zmodyfikowane tak, aby potwierdzić, że są one właściwe dla zamierzonego zastosowania. Walidacja powinna być na tyle obszerna, na ile jest to konieczne przy danym zastosowaniu lub obszarze zastosowania.

Do walidacji metodyk należy podchodzić zgodnie ze zdrowym rozsądkiem i dobrą praktyką laboratoryjną. Należy jednak pamiętać, że walidacja jest zawsze kompromisem pomiędzy kosztami, ryzykiem i możliwościami technicznymi. Istnieje wiele przypadków, dla których jej zakres (np. dokładność, granica wykrywalności, selektywność, liniowość, powtarzalność, odtwarzalność, odporność na czynniki zewnętrzne i wrażliwość na wzajemne wpływy wewnętrzne) może być podany tylko w sposób uproszczony [10].

Kryteria akceptacji i wiarygodności danych surowych

Tablica 2. Kryteria akceptacji

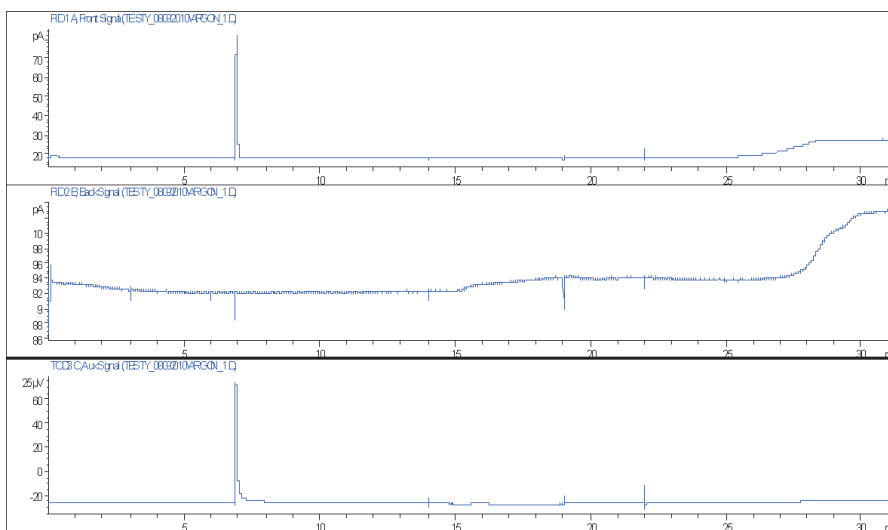
Parametr	Kryteria akceptacji
Specyficzność/selektywność	– Brak pików o czasach retencji odpowiadających czasom retencji oznaczanych składników na chromatogramie ślepej próby. – Piki odpowiadające analizowanym składnikom dobrze rozdzielone.
Wpływ matrycy próbki	– Rodzaj matrycy próbki nie może mieć istotnego wpływu na rozdział oznaczanych składników oraz zakłócać pomiaru.
Granica wykrywalności (LOD)	– Sygnał odpowiadający poziomowi wykrywalności metody powinien mieć minimum 3-krotnie wyższą wartość niż sygnał szumu ($S/N \geq 3$).
Granica oznaczalności (LOQ)	– Sygnał odpowiadający poziomowi oznaczalności metody powinien mieć minimum 10-krotnie wyższą wartość niż sygnał szumu ($S/N \geq 10$).
Liniowość	– Współczynnik korelacji $R \geq 0,999$
Dokładność	– Współczynnik zmienności CV pomiędzy kolejnymi próbkami na tym samym poziomie stężenia $\leq 5\%$. – Średni % odzysku dla każdego poziomu stężenia: $95 \div 105\%$.
Precyzja metody – powtarzalność	– Współczynnik zmienności CV $\leq 5\%$.
Precyzja pośrednia metody	– Współczynnik zmienności CV $\leq 5\%$. – Różnica pomiędzy średnimi wartościami otrzymanymi przez dwóch różnych analityków powinna być $\leq 5\%$.
Odporność	– Pomimo niewielkich zmian warunków analizy uzyskuje się zgodne i wiarygodne wyniki.

Specyficzność/selektywność

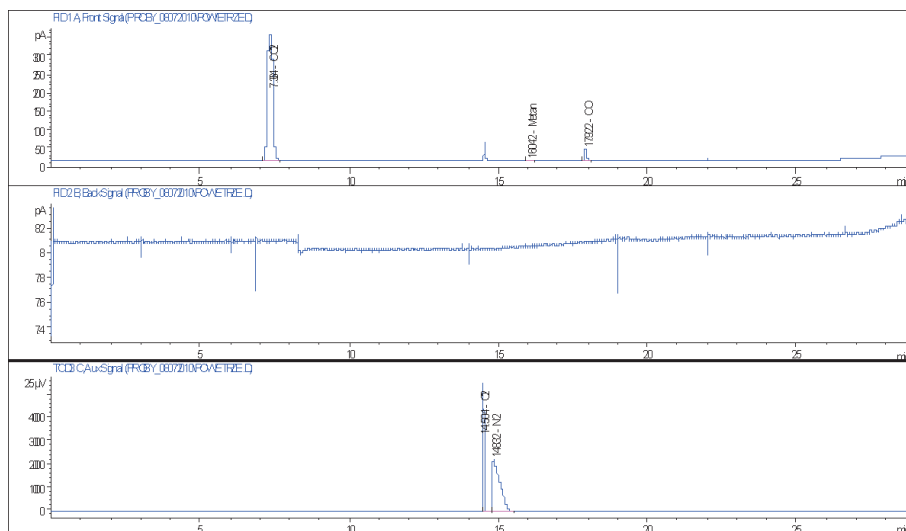
Selektywność (ang. *selectivity*) metody jest rozumiana jako zdolność do dawania sygnału analitycznego tylko dla pewnej grupy substancji, a niereagowania na obecność innych. Z kolei termin **specyficzność** (ang. *specifity*) identyfikuje metodę, w której jedynie analit jest źródłem niezakłóconego sygnału analitycznego, zaś interferencje nie występują. Selektywność i specyficzność są miarami, które określają niezawodność wyników pomiarów w obecności interferencji i rozważane są w kontekście analizy ilościowej i jakościowej [9].

Określenie specyficzności oraz selektywności walidowanej metodyki odbyło się już w trakcie optymalizacji warunków oznaczania analitów, gdzie dobór parametrów nastąpił w taki sposób, aby rozdział poszczególnych składników był jak najlepszy, a wpływ czynników przeszkadzających – jak najmniejszy. Przykładowe chromatogramy gazowych mieszanin wzorcowych i próbek rzeczywistych w różnych rodzajach matryc zaprezentowano na rysunkach 1-6.

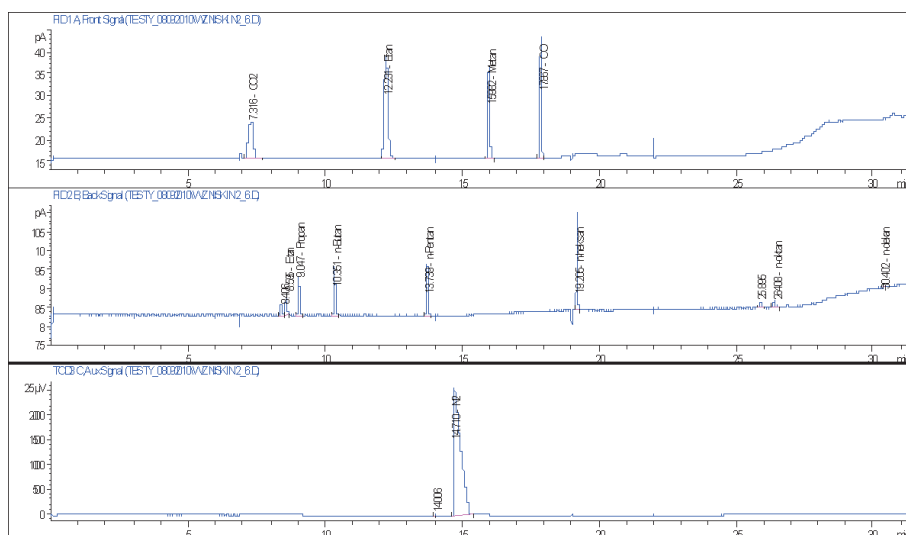
Kryteria akceptacji dla testu specyficzności/selektywności zostały spełnione. W trakcie walidacji udowodniono również, iż rodzaj matrycy próbki nie ma istotnego wpływu na rozdział analizowanych składników i nie stanowi czynnika zakłócającego pomiar, zatem próbki, których głównym składnikiem jest hel, azot, powietrze czy metan mogą być analizowane przy użyciu opisanej metodyki.



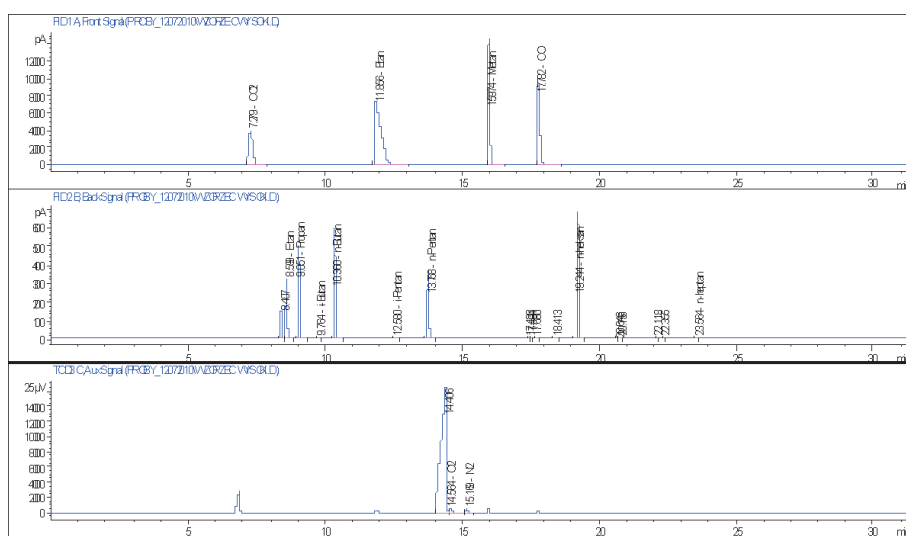
Rys. 1. Przykładowy chromatogram ślepej próby (gaz nośny)



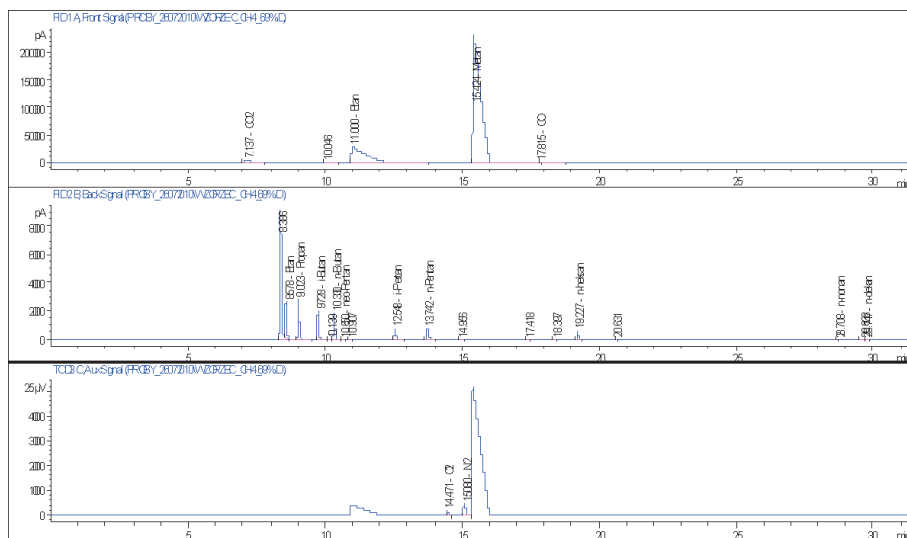
Rys. 2. Przykładowy chromatogram powietrza



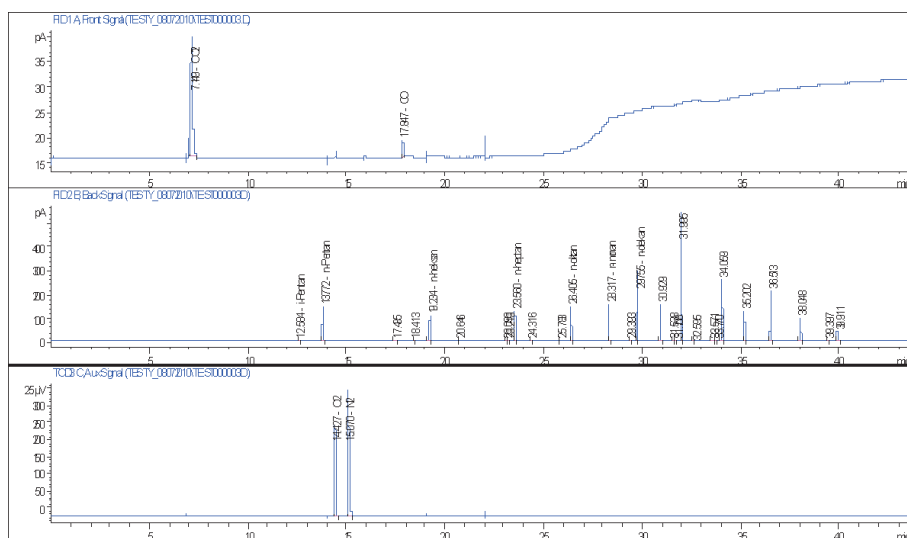
Rys. 3. Przykładowy chromatogram gazowej mieszaniny wzorcowej, której matrycę stanowi azot firmy Air Liquide Polska, Serial No. 9275651001



Rys. 4. Przykładowy chromatogram gazowej mieszaniny wzorcowej, której matrycę stanowi hel firmy Air Liquide Polska, Serial No. 9267619001



Rys. 5. Przykładowy chromatogram gazowej mieszaniny wzorcowej, której matrycę stanowi metan firmy Agilent Technologies, Serial No. 006102D



Rys. 6. Przykładowy chromatogram roztworu wzorcowego węglowodorów n-Pentan–n-Oktadekan firmy Ultra Scientific Inc., Serial No. CB-2605Z

Granica wykrywalności oraz granica oznaczalności

Granica wykrywalności i granica oznaczalności to parametry, które odgrywają bardzo ważną rolę w ilościowych badaniach chromatograficznych. Choć znaczenie tych pojęć oraz ich zrozumienie nie budzi wątpliwości, to jednak samo wyznaczenie ich wartości bardzo często bywa problematyczne. Wynikać to może z kilku powodów, do których należy zaliczyć przede wszystkim:

- mnogość definicji opisujących pojęcia granicy wykrywalności i granicy oznaczalności,
- trudności natury praktycznej uniemożliwiającej wyznaczenie w sposób jednoznaczny podstawowego parametru determinującego granicę wykrywalności, tj. wielkość poziomu szumów danego urządzenia pomiarowego.

Dlatego, w celu lepszego zrozumienia i ujednolicenia wiedzy dotyczącej możliwości wyznaczenia granicy wykrywalności, warto zapoznać się z podstawowymi definicjami odnoszącymi się do tego zagadnienia.

Stosunek sygnału do szumu (*S/N – Signal to Noise Ratio*) – to wielkość bezwymiarowa, wyznaczana jako stosunek sygnału analitycznego do średniego poziomu szumów dla określonej próbki. Parametr ten może służyć do określania wpływu poziomu szumu na względny błąd pomiaru. Może on być obliczony w różny sposób, lecz najbardziej praktyczne jest przedstawienie go jako stosunku średniej arytmetycznej serii pomiarów dla próbek ślepych (bądź zawierających analit na bardzo niskim poziomie) do wartości odchylenia standardowego uzyskanego dla tej serii pomiarów.

Tablica 3. Teoretyczna granica wykrywalności (LOD) i granica oznaczalności (LOQ)

Analizowany składnik	Detektor	LOD [ppm]	LOQ [ppm]
CO ₂	FID1 A	0,34	1,12
CO	FID1 A	0,10	0,32
Metan	FID1 A	0,13	0,43
Etan	FID1 A	0,12	0,40
Propan	FID2 B	1,79	5,97
i-Butan	FID2 B	1,35	4,50
n-Butan	FID2 B	1,35	4,50
neo-Pentan	FID2 B	1,28	4,26
i-Pentan	FID2 B	1,28	4,26
n-Pentan	FID2 B	1,28	4,26
suma C6	FID2 B	0,67	2,23
suma C7	FID2 B	0,67	2,23
suma C8	FID2 B	0,67	2,23
suma C9	FID2 B	0,67	2,23
suma C10	FID2 B	0,67	2,23
O ₂	TCD	4,16	13,85
N ₂	TCD	14,44	48,12

Granica wykrywalności (LOD – *Limit of Detection*) to najmniejsza ilość lub najmniejsze stężenie substancji (pierwiastka, jonu, związku) możliwe do wykrycia za pomocą danej procedury analitycznej, z określonym prawdopodobieństwem. Pojęcie „granicy wykrywalności” jest ściśle związane z określoną procedurą analityczną, ponieważ wartość liczbową granicy wykrywalności zależy nie tylko od poziomu zawartości oznaczanego składnika, ale również od obecności innych składników występujących w analizowanej próbce. Wartość granicy wykrywalności jest związana również z poziomem szumów stosowanego urządzenia pomiarowego – przyjmuje się, że odpowiada ona trzykrotnemu poziomowi szumów.

Granica oznaczalności (LOQ – *Limit of Quantification*) to najmniejsza ilość lub najmniejsze stężenie substancji możliwe do ilościowego oznaczenia daną procedurą analityczną, z założoną dokładnością i precyzją. Wartość LOQ jest zawsze wielokrotnością wyznaczonej wartości LOD.

Granica wykrywalności stosowanego instrumentu pomiarowego (IDL – *Instrumental Detection Limit*) to najmniejsza zawartość oznaczanego analitu, jaka może zostać wykryta (bez ilościowego jej oznaczenia) za pomocą danego urządzenia pomiarowego. Wartość ta jest z reguły mniejsza niż granica wykrywalności procedury analitycznej i wyznacza się ją na podstawie oznaczania zawartości analitu w sporządzonych roztworach wzorcowych (lub

tw. ślepych prób), bez poddawania tych roztworów pełnej procedurze analitycznej.

Granica wykrywalności procedury analitycznej (MDL – *Method Detection Limit*) to najmniejsza zawartość analitu, jaka może zostać wykryta przy zastosowaniu danej procedury analitycznej. Na wartość tak wyznaczonej granicy wykrywalności mają wpływ wszystkie etapy procedury analitycznej, zatem wartość MDL jest zawsze większa od odpowiedniej (stosowanej w ramach tej procedury) wartości IDL [7].

W trakcie walidacji procedury analitycznej na podstawie oznaczeń ślepej próby oszacowano podstawowy poziom szumów, a następnie określono teoretyczną granicę wykrywalności (LOD), na poziomie stężenia odpowiadającego sygnałowi o wartości trzykrotnie większej od poziomu szumów ($S/N \geq 3$). Do oznaczeń wykorzystano gazowe mieszaniny wzorcowe na niskim poziomie stężeń poszczególnych składników, a także możliwości oprogramowania ChemStation ver. B.04.02. W analogiczny sposób została wyznaczona teoretyczna granica oznaczalności (LOQ), na poziomie stężenia odpowiadającego sygnałowi o wartości 10-krotnie większej od poziomu szumów ($S/N \geq 10$).

Liniowość

Liniowość (ang. *linearity*) określa przedział zakresu pomiarowego procedury analitycznej, w którym sygnał wyjściowy jest proporcjonalny do oznaczanego stężenia analitu, lub parametr metody zapewniający zdolność do uzyskiwania wyników proporcjonalnych do stężenia analitu [10].

Dla większości metod analitycznych stosuje się model zależności prostoliniowej, aby wykazać, że pojedynczy punkt krzywej kalibracyjnej zapewnia wystarczającą dokładność w przyjętym zakresie stężeń lub spodziewanych zawartości. Liniowość metody nie jest warunkiem koniecznym. Dla metod analitycznych, które nie są liniowe, należy wykazać inną zależność matematyczną spełniającą kryteria funkcji kalibracyjnej.

W celu sprawdzenia liniowości walidowanej metody dla poszczególnych składników wykonano po trzy pomiary gazowych mieszanin wzorcowych, dla różnych poziomów stężeń, a następnie wyznaczono zależności pola powierzchni pików w funkcji stężenia, jak również współczynnika odpowiedzi detektora dla oznaczanego związku, w funkcji jego stężenia. Wyniki testu liniowości zaprezentowano w tablicy 4.

Kryteria akceptacji dla testu liniowości zostały spełnione. W analizowanym zakresie stężeń dla poszczególnych składników udowodniono satysfakcjonującą liniowość walidowanej metodyki: współczynnik korelacji $\geq 0,999$.

Tablica 4. Wyniki testu liniowości

Analizowany składnik	Stężenie składnika w mieszaninie wzorcowej [ppm]	Powierzchnia piku [pA*s] pomiar 1	Powierzchnia piku [pA*s] pomiar 2	Powierzchnia piku [pA*s] pomiar 3	Średnia powierzchnia piku [pA*s]	Współczynnik zmienności [%]
CO ₂	19,71	106,22	106,18	106,32	106,24	0,07
	8 190,00	44 124,90	44 234,40	43 814,90	44 058,07	0,49
	10 000,00	52 852,40	52 954,50	52 654,10	52 820,33	0,29
	Statystyczna ewaluacja wyników liniowości					
	Równanie prostej		$y = 5,3117x + 86,505$			
	Współczynnik korelacji <i>R</i>		0,9998			
CO	19,71	109,61	109,68	109,35	109,55	0,16
	9 620,00	53 965,90	54 143,40	53 675,00	53 928,10	0,44
	95 200,00	526 119,00	530 797,00	531 261,00	529 392,33	0,54
	Statystyczna ewaluacja wyników liniowości					
	Równanie prostej		$y = 5,5588x + 213,98$			
	Współczynnik korelacji <i>R</i>		1,0000			
Metan	19,96	111,40	111,94	111,50	111,61	0,26
	989,30	5 668,62	5 738,56	5 730,10	5 712,43	0,67
	11 350,00	63 348,60	63 482,40	62 981,00	63 270,67	0,41
	690 000,00	4 343 500,00	4 351 720,00	4 335 500,00	4 343 573,33	0,19
	999 950,00	6 566 220,00	6 519 950,00	6 521 830,00	6 536 000,00	0,40
	Statystyczna ewaluacja wyników liniowości					
	Równanie prostej		$y = 6,4757x - 15001$			
Współczynnik korelacji <i>R</i>		0,9997				
Etan	20,06	220,86	222,54	221,48	221,63	0,38
	995,60	11 217,50	11 475,70	11 466,60	11 386,60	1,29
	10 670,00	119 786,00	120 016,00	119 092,00	119 631,33	0,40
	90 000,00	981 666,00	983 406,00	979 729,00	981 600,33	0,19
	Statystyczna ewaluacja wyników liniowości					
	Równanie prostej		$y = 10,896x + 1222,5$			
	Współczynnik korelacji <i>R</i>		1,0000			
Propan	20,01	3,50	3,52	3,51	3,51	0,28
	987,20	177,91	181,65	181,49	180,35	1,17
	9 990,00	1 779,27	1 779,29	1 767,03	1 775,20	0,40
	60 000,00	10 679,10	10 700,90	10 727,30	10 702,43	0,23
	Statystyczna ewaluacja wyników liniowości					
	Równanie prostej		$y = 0,1784x - 0,5094$			
	Współczynnik korelacji <i>R</i>		1,0000			
n-Butan	20,42	4,78	4,80	4,77	4,78	0,32
	975,50	240,38	245,78	245,91	244,02	1,29
	9 160,00	2 184,16	2 182,06	2 170,53	2 178,92	0,34
	30 000,00	7 171,29	7 184,98	7 181,86	7 179,38	0,10
	Statystyczna ewaluacja wyników liniowości					
	Równanie prostej		$y = 0,2392x + 0,757$			
	Współczynnik korelacji <i>R</i>		1,0000			

cd. Tablica 4.

Analizowany składnik	Stężenie składnika w mieszaninie wzorcowej [ppm]	Powierzchnia piku [pA*s] pomiar 1	Powierzchnia piku [pA*s] pomiar 2	Powierzchnia piku [pA*s] pomiar 3	Średnia powierzchniowa piku [pA*s]	Współczynnik zmienności [%]	
n-Pentan	20,00	5,74	5,80	5,81	5,78	0,65	
	1 034,10	302,79	310,59	311,31	308,23	1,53	
	5 320,00	1 529,09	1 524,14	1 521,52	1 524,92	0,25	
	10 000,00	2 984,87	2 985,64	2 947,37	2 972,63	0,74	
	Statystyczna ewaluacja wyników liniowości						
	Równanie prostej		$y = 0,2961x - 9,2878$				
	Współczynnik korelacji R		0,9997				
n-Heksan	20,24	7,15	7,27	7,18	7,20	0,87	
	918,20	315,94	326,89	329,31	324,05	2,20	
	5 000,00	1 753,55	1 741,95	1 632,97	1 709,49	3,89	
	5 430,00	1 881,10	1 865,71	1 876,84	1 874,55	0,42	
	Statystyczna ewaluacja wyników liniowości						
	Równanie prostej		$y = 0,343x + 3,8449$				
	Współczynnik korelacji R		0,9994				
O ₂	5 000,00	326,57	328,58	335,49	330,21	1,42	
	9 800,00	640,42	643,76	642,22	642,13	0,26	
	Statystyczna ewaluacja wyników liniowości						
	Równanie prostej		$y = 0,065x + 5,2967$				
	Współczynnik korelacji R		0,9998				
N ₂	10 780,00	508,39	522,01	509,02	513,14	1,50	
	60 000,00	2 785,72	2 791,10	2 787,71	2 788,18	0,10	
	999 840,00	46 942,50	47 179,60	47 028,00	47 050,03	0,26	
	Statystyczna ewaluacja wyników liniowości						
	Równanie prostej		$y = 0,0471x - 14,656$				
	Współczynnik korelacji R		1,0000				

Dokładność

Dokładność (ang. *accuracy*) określa stopień zgodności między uzyskanym wynikiem pojedynczego pomiaru a wartością oczekiwaną/rzeczywistą, wiążący się z błędami systematycznymi i błędami przypadkowymi popełnianymi w trakcie prowadzenia pomiarów. Można ją również ustalić przez porównanie z wynikami uznanej metody albo w drodze międzylaboratoryjnych badań porównawczych [10].

W celu sprawdzenia dokładności metodyki dla poszczególnych składników wykonano po trzy pomiary gazowych mieszanin wzorcowych, na różnych poziomach stężeń, a następnie określono zgodność wyników uzyskanych dzięki zastosowaniu walidowanej metodyki analitycznej z wynikami rzeczywistymi. Wyniki testu dokładności zaprezentowano w tablicy 5.

Kryteria akceptacji dla testu dokładności walidowanej metodyki zostały spełnione. W analizowanym zakresie

stężeń dla poszczególnych składników otrzymano satysfakcjonujące wyniki: współczynnik zmienności pomiędzy kolejnymi pomiarami na tym samym poziomie stężenia nie przekroczył 5%, natomiast średni procent odzysku dla każdego poziomu stężenia mieścił się w zakresie 95÷105%.

Precyzja oraz precyzja pośrednia metody – wyniki zbiorcze

W celu sprawdzenia precyzji (powtarzalności) metodyki dla poszczególnych składników wykonano sześć niezależnych pomiarów tej samej serii próby, badanej przez danego analityka, a następnie na podstawie wartości odchylenia standardowego określono rozrzut uzyskanych wyników wokół wartości średniej.

Analogiczne oznaczenia przy użyciu tej samej serii próbki gazu wykonano w innym dniu przez innego analityka, w celu skontrolowania precyzji pośredniej walidowanej metodyki.

Tablica 5. Wyniki testu dokładności

Analizowany składnik	Stężenie teoretyczne [ppm]	Stężenie oznaczone [ppm] pomiar 1	Stężenie oznaczone [ppm] pomiar 2	Stężenie oznaczone [ppm] pomiar 3	Śr. odzysk [%]	CV [%]
CO ₂	19,71	19,25	19,24	19,27	97,7	0,08
	8 190,00	7 997,15	8 017,01	7 940,97	97,5	0,49
	10 000,00	9 578,91	9 597,43	9 542,97	95,7	0,29
CO	19,71	19,98	19,99	19,93	101,3	0,16
	9 620,00	9 835,71	9 868,05	9 782,68	102,2	0,44
	95 200,00	95 889,20	96 741,90	96 826,50	101,4	0,54
Metan	19,96	20,11	20,21	20,13	101,0	0,26
	989,30	1 023,02	1 035,64	1 034,11	104,2	0,67
	11 350,00	11 408,50	11 432,50	11 342,40	100,4	0,41
	690 000,00	687 807,00	688 966,00	686 677,00	99,7	0,17
	999 950,00	987 069,00	981 105,00	981 347,00	98,3	0,34
Etan	20,06	19,42	19,57	19,47	97,1	0,39
	995,60	986,28	1 008,98	1 008,18	100,6	1,29
	10 670,00	10 532,00	10 552,20	10 471,00	98,6	0,40
	90 000,00	86 311,20	86 464,20	86 140,90	95,9	0,19
Propan	20,01	19,66	19,77	19,71	98,5	0,28
	987,20	1 000,13	1 021,15	1 020,28	102,7	1,17
	9 990,00	10 002,40	10 002,50	9 933,56	99,9	0,40
	60 000,00	60 033,90	60 156,20	60 304,90	100,3	0,23
n-Butan	20,42	19,95	20,04	19,93	97,8	0,29
	975,50	1 003,56	1 026,11	1 026,66	104,4	1,29
	9 160,00	9 118,52	9 109,75	9 061,64	99,3	0,34
	30 000,00	29 939,00	29 996,20	29 983,30	99,9	0,10
n-Pentan	20,00	19,86	20,05	20,08	100,0	0,60
	1 034,10	1 047,22	1 074,19	1 076,68	103,1	1,53
	5 320,00	5 288,49	5 271,36	5 262,29	99,1	0,25
	10 000,00	10 323,40	10 326,10	10 193,70	102,8	0,74
n-Heksan	20,24	20,67	21,00	20,76	102,8	0,82
	918,20	913,12	944,79	951,78	102,0	2,20
	5 000,00	5 068,14	5 034,62	4 719,63	98,8	3,89
	5 430,00	5 436,80	5 392,31	5 424,47	99,8	0,42
O ₂	5 000,00	5 077,02	5 102,12	5 209,33	102,6	1,37
	9 800,00	9 944,17	9 995,99	9 972,06	101,7	0,26
N ₂	10 780,00	10 786,10	11 075,00	10 799,50	101,0	1,50
	60 000,00	59 102,00	59 216,10	59 144,10	98,6	0,10
	999 840,00	995 934,00	1 000 960,00	997 748,00	99,8	0,25

Kryteria akceptacji dla precyzji i precyzji pośredniej metody zostały spełnione. Współczynniki zmienności dla poszczególnych składników oraz różnica pomiędzy średnimi wartościami dla sześciu niezależnych pomiarów, wykonanych przez dwóch analityków nie przekroczyła 5%, co świadczy o satysfakcjonującej powtarzalności.

Rozrzut wyników oceniony na podstawie współczynnika zmienności dla precyzji pośredniej okazał się zdecydowanie mniejszy niż dla precyzji metody. Może to być związane z przepłukiwaniem petli dozującej gazem nośnym po każdym pomiarze, zastosowanym przez drugiego analityka.

Tablica 6. Porównanie testów precyzji i precyzji pośredniej walidowanej metodyki

Analizowany składnik	Pierwszy analytyk		Drugi analytyk		Różnica pomiędzy śr. stężeniami [%]
	CV [%]	Śr. stężenie [ppm]	CV [%]	Śr. stężenie [ppm]	
CO ₂	0,69	872,31	0,14	873,70	0,08
Metan	0,41	912 681,67	0,14	913 026,83	0,02
Etan	0,45	9 979,74	0,12	9 987,87	0,04
Propan	0,41	5 272,03	0,32	5 258,57	0,13
i-Butan	0,41	4 802,99	0,35	4 790,89	0,13
n-Butan	0,58	2 037,60	0,40	2 032,26	0,13
neo-Pentan	0,55	85,69	0,45	85,52	0,09
i-Pentan	1,06	3 017,49	0,60	3 010,24	0,12
n-Pentan	1,53	677,17	0,73	675,10	0,15
suma C6	2,67	1 343,36	1,19	1 339,01	0,16
suma C7	4,22	710,41	1,74	705,02	0,38
suma C8	3,33	849,75	2,40	822,02	1,66
suma C9	4,05	236,98	3,73	227,30	2,08
suma C10	4,96	68,18	4,14	64,66	2,66
O ₂	0,93	756,34	0,28	743,73	0,84
N ₂	0,28	50 332,72	0,15	50 254,38	0,08

Odporność (wrażliwość) metody

Ocena odporności metody została wykonana na etapie opracowywania procedury analitycznej, w celu ustalenia odpowiednich kryteriów sprawności układu chromatogra-

ficznego. Badanie to polegało na przeprowadzeniu pomiarów przy niewielkiej, celowej zmianie warunków wykonywania analizy, podczas której udowodniono, że stosując walidowaną metodę uzyskuje się zgodne i wiarygodne wyniki.

Podsumowanie

Ze względu na fakt, iż do tej pory badania ilościowe składu gazów ziemnych i kopalnianych w Instytucie Nafty i Gazu prowadzone były przy wykorzystaniu kilku aparatów chromatograficznych oraz detektorów w różnych cyklach analitycznych, zakup nowego dwukanałowego, zaworowego chromatografu gazowego okazał się nieunikniony. Dzięki możliwości zainstalowania kilku kolumn w piecu chromatograficznym tegoż aparatu, a także dzięki umiejętnemu operowaniu położeniem poszczególnych zaworów, AGILENT 7890A doskonale sprawdza się do oznaczania kilku substancji jednocześnie – co przede wszystkim przyspiesza czas wykonywanych analiz oraz zdecydowanie obniża koszty eksploatacji tego urządzenia.

Zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej, każda jednostka badawcza powinna stosować właściwe metody i procedury dla wszystkich pomiarów objętych zakresem swojej działalności. Dotyczy to zarówno pobierania próbek, postępowania z obiektami poddawanych badaniom, ich przygotowania, przechowywania, transportu, same-

go pomiaru, a także interpretacji danych analitycznych. Właśnie dlatego opracowanie i zwalidowanie metodyki analitycznej oznaczania związków węglowodorowych (C₁, C₂, C₃, i-C₄, n-C₄, neo-C₅, i-C₅, n-C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀) oraz gazów takich jak: N₂, O₂, CO i CO₂ w mieszaninach gazowych za pomocą dwukanałowego, zaworowego chromatografu gazowego było koniecznością.

W trakcie eksperymentu walidacyjnego udowodniono, iż opisana metodyka spełnia założone kryteria akceptacji odnośnie: selektywności/specyficzności, granicy wykrywalności i oznaczalności, liniowości, dokładności, precyzji oraz precyzji pośredniej, a także odporności (wrażliwości) i zakresu pomiarowego. Rodzaj matrycy próbki nie ma istotnego wpływu na rozdział analizowanych składników i nie stanowi czynnika zakłócającego pomiar, zatem próbki, których głównym składnikiem jest hel, azot, powietrze czy metan mogą być analizowane przy użyciu opracowanej procedury. Opisana w niniejszym artykule metodyka została wdrożona zgodnie z zasadami dobrej praktyki

laboratoryjnej i jest stosowana do oznaczania związków węglowodorowych (C_1 , C_2 , C_3 , $i-C_4$, $n-C_4$, $neo-C_5$, $i-C_5$,

$n-C_5$, C_6 , C_7 , C_8 , C_9 , C_{10}) oraz gazów takich jak: N_2 , O_2 , CO i CO_2 w mieszaninach gazowych.

Artykuł nadesłano do Redakcji 27.05.2011 r. Przyjęto do druku 6.09.2011 r.

Recenzent: dr inż. Andrzej Froński, prof. INiG

Literatura

- [1] Bonate P.L.: *LC-GC*, 10, 310, 1991.
- [2] Chromatograf gazowy AGILENT 7890A – podręcznik zaawansowanego użytkownika.
- [3] Cuadros-Rodríguez L., Gamiz-Gracia L., Almada-Lopez E., Laso-Sanchez J.: *Trends Anal. Chem.*, 20, 195, 2001.
- [4] Guidelines for Calibration In Analytical Chemistry, Part 1: *Fundamentals and Single Component Calibration*. IUPAC Recommendation. *Pure. Appl. Chem.*, 70, 993, 1998.
- [5] Instrukcja obsługi i sprawdzania IO-5/SG-1.
- [6] Instrukcja stanowiskowa IS-5/SG-1.
- [7] Konieczka P.: *Walidacja metod analitycznych*. Kurs HPLC, poziom zaawansowany, Gdańsk 2006.
- [8] Kościelniak P.: *Calibration Methods – Nomenclature and Classification. New Horizons and Challenges In Environmental Analysis and Monitoring*. Red. Namieśnik J., Chrzanowski W., Zmijewska P., WIB, Gdańsk 2003.
- [9] Kubiak W., Gołaś J.: *Instrumentalne metody analizy chemicznej*. Wydawnictwo Naukowe AKAPIT, Kraków 2005.
- [10] Michalski R., Mytych J.: *Akredytacja laboratoriów badawczych według normy PN-EN ISO/IEC 17025*. Wydawnictwo Elamed, Kraków 2008.
- [11] PN-EN ISO/IEC 170025: *Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów pomiarowych i badawczych*.
- [12] Webster's Seventh New Collegiate Dictionary, G. & C. Merriam Co., Springfield, MA, 1970.
- [13] Witkiewicz Z., Hetper J.: *Chromatografia gazowa*. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2001.



Mgr Małgorzata KANIA – ukończyła Wydział Chemii UJ o specjalizacji nowoczesna synteza i fizykochemia organiczna oraz Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH w Krakowie, ze specjalizacją: analityka i kontrola jakości. Asystent w Zakładzie Geologii i Geochemii INiG w Krakowie. Specjalizuje się w analizach chromatograficznych, a także w rozwoju i walidacji metod analitycznych.



Mgr inż. Marek JANIGA – absolwent wydziału Geologii, Geochemii i Ochrony Środowiska Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. Asystent w Laboratorium Nafty i Gazu, w Zakładzie Geologii i Geochemii Instytutu Nafty i Gazu w Krakowie.

ZAKŁAD GEOLOGII I GEOCHEMII

- analiza systemów naftowych (badania skał macierzystych, modelowanie generacji, ekspulsji i migracji węglowodorów, analiza dróg migracji, analiza parametrów zbiornikowych pułapek złożowych);
- badania prospekcyjne (trendy przestrzennego rozwoju parametrów zbiornikowych i filtracyjnych, analiza macierzystości, ranking stref zbiornikowych);
- konstrukcja statycznych modeli geologiczno-złożowych 3D;
- analiza procesów diagenetycznych i ich wpływu na parametry zbiornikowe skał;
- genetyczna korelacja płynów złożowych ze skałami macierzystymi;
- obliczanie zasobów złóż węglowodorów z analizą niepewności;
- modele przepływu płynów złożowych w skałach zbiornikowych;
- badania ekshalacji gazu;
- badania złóż typu *tight/shale gas*;
- specjalistyczne analizy: przestrzeni porowej, petrograficzne, geochemiczne RSO, płynów złożowych, analizy biomarkerów, analizy chromatograficzne, analiza GC/MS oraz GC/MS/MS;
- interpretacja danych geofizyki wiertniczej.

Kierownik: dr inż. Grzegorz Leśniak

Adres: ul. Lubicz 25A, 31-503 Kraków

Telefon: 12 421-00-33 w. 262

Faks: 12 430-38-85

E-mail: grzegorz.lesniak@inig.pl