

Zygmunt Burnus
Instytut Nafty i Gazu, Kraków

Problematyka walidacji metod badań w przemyśle naftowym na przykładzie benzyn silnikowych

Wprowadzenie

Walidacja metody badawczej to szereg działań obliczeniowych służących potwierdzeniu, że dana metoda jest odpowiednia i optymalna dla osiągnięcia zamierzonego przez analityka celu. Celem tym jest możliwość wykonywania dokładnych i precyzyjnych oznaczeń określonego analitu w próbce. Omawiane pojęcie obejmuje podstawowe testy statystyczne, związane z powtarzalnością metody, jak również z szacowaniem niepewności pomiaru. Pod hasłem walidacji można obecnie znaleźć wiele pozycji literaturowych. Mimo to, dla analityków pracu-

jących w laboratoriach proces walidacji jest wciąż działaniem niezwykle problematycznym, tym bardziej, że sposób jej wykonania jest coraz bardziej wnikliwie sprawdzany podczas audytów zewnętrznych przeprowadzanych przez audytorów krajowej jednostki certyfikującej – Polskiego Centrum Akredytacji. W niniejszej pracy zostaną przedstawione wskazówki dotyczące przeprowadzania walidacji metod oraz problematyka walidacji metod badawczych w laboratorium zajmującym się badaniem produktów naftowych, w szczególności benzyn silnikowych.

Znormalizowane metody badania jakości benzyn silnikowych

Obowiązujące w Polsce metody badania benzyn silnikowych stosowanych jako paliwo do pojazdów wyposażonych w silniki z zapłonem iskrowym (tablica 1) określone są zgodnie z *Rozporządzeniem Ministra Gospodarki z dnia 25 marca 2010 roku w sprawie metod badania jakości paliw ciekłych* [19].

Laboratoria badające paliwa do silników z zapłonem

iskrowym w ramach krajowego monitorowania jakości paliw są zobowiązane przez Ustawodawcę do wykonywania oznaczeń wymienionymi metodami. Istnieje również obowiązek posiadania certyfikatu Polskiego Centrum Akredytacji na wymienione metodyki, co wiąże się z koniecznością przeprowadzenia w laboratoriach walidacji tych metodyk.

Podstawowe zasady przeprowadzania walidacji

Przy wyborze już dostępnej metody badawczej lub przy opracowywaniu nowej metody należy kierować się nie tylko oceną jej precyzji, ale także kosztami wykonywania oznaczeń. Precyzja metody powinna być wystarczająca. Zbyt wysoka precyzja metody może być nieuzasadniona ze względów ekonomicznych.

Walidacja może się składać z wielu elementów, lecz nie muszą to być wszystkie dostępne narzędzia statystyczne. Zgodnie z definicją, należy dokonać wyboru elementów

walidacji tak, aby wykazać wystarczające sprawdzenie metody, przy zachowaniu zasady zdrowego rozsądku.

Do najważniejszych parametrów wyznaczanych podczas walidacji zaliczamy:

- powtarzalność,
- odtwarzalność,
- spójność pomiarową,
- dokładność,
- granicę wykrywalności,

Tablica 1. Obowiązujące znormalizowane metody badania benzyn silnikowych stosowanych jako paliwo do pojazdów wyposażonych w silniki z zapłonem iskrowym

Oznaczany parametr	Obowiązująca metoda znormalizowana
Badawcza liczba oktanowa – RON	PN-EN ISO 5164
Motorowa liczba oktanowa – MON	PN-EN ISO 5163
Zawartość ołowiu	PN-EN 237
Gęstość w temperaturze 15°C	PN-EN 12185
Zawartość siarki	PN-EN 20884 PN-EN 20846
Okres indukcyjny	PN-EN 7536
Zawartość żywic obecnych	PN-EN ISO 6246
Działanie korodujące na miedź	PN-EN ISO 2160
Wygląd	-
Zawartość węglowodorów typu olefinowego i aromatycznego	PN-EN 15553 PN-EN ISO 22854
Zawartość benzenu	PN-EN 238 PN-EN 12177 PN-EN 22854
Zawartość tlenu i tlenowych związków organicznych	PN-EN 13132 PN-EN 1601 PN-EN ISO 22854
Prężność par	PN-EN 13016-1
Skład frakcyjny	PN-EN ISO 3405
Indeks lotności (VLI) – metoda obliczeniowa	PN-EN 228 (do obliczeń – dane z oznaczeń według PN-EN 13016-1 oraz według PN-EN ISO 3405)

- granicę oznaczalności,
- zakres liniowy i roboczy,
- niepewność metody.

Poza tym, dla metody badawczej można wyznaczyć:

- współczynnik odzysku – sygnalizowany obecnie coraz częściej przez audytorów Polskiego Centrum Akredytacji. Należy pamiętać, że jego wyznaczenie jest uzasadnione jedynie w przypadku metod z zastosowaniem tzw. wzorcowania zewnętrznego, gdy badana próbka i materiał wzorcowy poddawane są osobno niezależnym badaniom. Natomiast w przypadku metod z użyciem tzw. wzorcowania wewnętrznego, w którym do badanej próbki dodaje się materiał wzorcowy – wzorec wewnętrzny, który służy do obliczenia wyniku końcowego, wyznaczenie współczynnika odzysku nie jest konieczne, ponieważ wszelkie straty analitu są niwelowane wielkością sygnału dla wzorca wewnętrznego; ten rodzaj wzorcowania jest najczęściej stosowany przy metodach wykorzystujących chromatografię gazową,
- porównanie wewnątrzlaboratoryjne metody – obowiązkowe w przypadku braku dostępnych badań międzylaboratoryjnych, może być również wykonywane jako dodatkowe sprawdzenie metody; polega ono na porównaniu wyniku uzyskanego dla badanej próbki z wynikiem uzyskanym inną metodą w tym samym laboratorium,
- stabilność metody – poprzez sprawdzenie, jak w dłuższym okresie czasu lub przy zmianie warunków środowiska ulegają zmianie parametry wzorcowania metody – w tym celu można zastosować karty kontrolne Shewharta,
- wpływ matrycy próbki – obecnie Polskie Centrum Akredytacji zaleca wykonanie walidacji metody badawczej dla każdego typu matrycy próbki osobno; jednak w przypadku wielu metod o niewielkim stopniu skomplikowania (np. pomiar lepkości, gęstości) bądź też w przypadku technik bardzo selektywnych (PN-EN 1601 [7]) możliwe jest wykazanie, że wartości precyzji są stałe nawet przy zmianie typu badanej próbki.

Powtarzalność metody

Powtarzalność metody to maksymalna różnica między dwoma niezależnymi wynikami oznaczeń na tym samym materiale badawczym, tą samą metodą, wykonywanymi przez tego samego wykonawcę, w tym samym laboratorium, w krótkich odstępach czasu. Wyznaczana jest zwykle dla 95% poziomu ufności, stąd w 5% przypadków powtarzalność może być wyższa od maksymalnej (1 próbek na 20).

Jest to jeden z pierwszych i najbardziej podstawowych parametrów wyznaczanych podczas procesu walidacji. Obecne wymagania Polskiego Centrum Akredytacji nakładają na analityka obowiązek sprawdzenia powtarzalności w całym zakresie metody. W tym celu wykonuje się oznaczenia dla próbek rzeczywistych w zakresie pomiarowym: dolnym, środkowym i górnym. Do celów statystycznych zalecane jest wykonanie dla każdej próbki po 20 oznaczeń. Jeżeli nie jest dostępna taka liczba wyników lub jest to nieuzasadnione ekonomicznie, wówczas do obliczeń sta-

tystycznych wystarczy już po pięć oznaczeń dla każdej próbki.

Powtarzalność (r) wyznacza się najczęściej według normy ASTM E 691 [1].

Należy zastosować wzór:

$$r = 2,8 \cdot s \quad (1)$$

gdzie: s – odchylenie standardowe wyznaczone dla kolejnych oznaczeń jednej próbki.

Jeżeli oznaczenie wykonuje się zgodnie z procedurą opisaną w metodyce znormalizowanej, to należy porównać powtarzalność wyznaczoną z obliczoną według wzoru podanego w normie.

Etap wyznaczania powtarzalności metody należy podsumować, oceniając czy powtarzalność wyznaczona według wzoru (1) mieści się w granicach powtarzalności określonej w normie na metodę poddawaną walidacji.

Problematyka wyznaczania powtarzalności metod badania benzyn silnikowych

Metodyki opisane w normach dotyczących oznaczania gęstości w temperaturze 15°C metodą oscylacyjną z U-rurką w pełni zautomatyzowaną, według PN-EN 12185 [11], zawartości żywic obecnych według PN-EN ISO 6246 [17] oraz prężności par metodą automatyczną, według PN-EN 13016-1 [5], cechują się niewielkim stopniem skomplikowania i krótkim czasem wykonania oznaczenia. Stąd, w przypadku wyznaczania powtarzalności, wskazane jest wykonanie około 10÷20 oznaczeń dla każdej z badanych próbek w zakresie pomiarowym. W przypadku oznaczenia składu frakcyjnego według PN-EN ISO 3405 [14] sytuacja przedstawia się nieco inaczej. Mimo zastosowania zautomatyzowanego układu do oznaczania składu frakcyjnego, liczba wyników uzyskiwanych podczas pojedynczej analizy jest na tyle duża, że pięć oznaczeń dla próbki wystarcza do obliczenia powtarzalności.

W przypadku wyznaczania powtarzalności metodyk badawczych oznaczania liczb oktanowych motorowej i badawczej benzyny silnikowej, według norm PN-EN ISO 5163 [15] oraz PN-EN ISO 5164 [16], należy stwierdzić, że wyróżniają się one na tle pozostałych metod. Celem wymienionych metod jest wyznaczenie parametrów użytkowych paliwa w warunkach rzeczywistej pracy silnika. Stosuje się silniki badawcze z zapłonem iskrowym wyposażone w oprzyrządowanie do pomiaru natężenia stuku. Stosowana

aparatura wykazuje bardzo duży stopień skomplikowania, nakładając na analityka konieczność jednoczesnego monitorowania wielu parametrów pracy silnika. Z uwagi na koszty aparatury zaleca się ograniczenie liczby oznaczeń przy sprawdzaniu powtarzalności metodyki (do pięciu oznaczeń), podobnie jak w przypadku składu frakcyjnego.

Metodyka oznaczania działania korodującego na miedź według PN-EN ISO 2160 [13] jest metodą jakościową. Z uwagi na uzyskiwanie wyników liczbowych, odczytywanych tylko ze skali barwnej korozji i brak możliwości uzyskania wyników pośrednich, obliczanie w tym przypadku jakiegokolwiek wartości precyzji nie jest możliwe. Można wykonać powtórzenia po 5÷7 oznaczeń dla różnych próbek benzyn, celem potwierdzenia, że metodyka nie wykazuje zmienności.

Oznaczanie okresu indukcyjnego według PN-EN 7536 [18], który stanowi symulację laboratoryjną odporności paliwa na długotrwałe przechowywanie, można również potraktować jako metodykę jakościową, ze względu na brak dostępności na rynku benzyn silnikowych o okresie indukcyjnym innym niż „powyżej 360 minut” i uzyskiwanie zawsze tego samego wyniku dla badanych próbek. Z tego powodu nie ma możliwości wykonania walidacji dla omawianej metodyki. Wygląd również zaliczamy do metod jakościowych; w tym przypadku nie podano metodyki oznaczania.

Metody oznaczania zawartości ołowiu wg normy PN-EN 237 [9], siarki według PN-EN 20846 [12], benzenu według PN-EN 238 [10], tlenu i tlenowych związków organicznych według PN-EN 1601 [7] – są metodami instrumentalnymi, wykorzystującymi najnowocześniejszą aparaturę o dużym stopniu skomplikowania i krótkim czasie oznaczenia. Są to kolejno: spektrometr absorpcji atomowej AAS, analizator siarki z fluorescencją UV, spektrometr podczerwieni IR oraz chromatograf gazowy z kolumną kapilarną i systemem detekcji selektywnym względem tlenu. W przypadku takich metod warto skupić się na obszernym wykonaniu walidacji z uwagi na łatwość pozyskania danych do obliczeń, jak również ich różnorodność, a także liczbę zmiennych mogących mieć wpływ na zmianę parametrów pracy aparatury. Do wyznaczenia powtarzalności należy

wykonać co najmniej 7 oznaczeń; w przypadku możliwości wykonania większej liczby oznaczeń należy wykonać maksymalnie 20 pomiarów.

Zawartość węglowodorów typu olefinowego i aromatycznego według normy PN-EN 15553 [6] (znanej jako metoda FIA) oznacza się, wykorzystując technikę chromatografii elucyjnej, z zastosowaniem tzw. żelu barwionego. Z uwagi na wysokie koszty odczynników, a w szczególności specjalnego żelu krzemionkowego oraz żelu barwionego, liczba 5 oznaczeń dla każdej z próbek jest wystarczająca.

W przypadku metody obliczeniowej – indeksu lotności (VLI) według normy PN-EN 228 [8] można wyznaczyć, w razie potrzeby, wartość powtarzalności na podstawie dostępnych wyników z metodyk, według PN-EN 13016-1 [5] oraz PN-EN ISO 3405 [14].

Odtwarzalność metody

Odtwarzalność metody to maksymalna różnica między dwoma niezależnymi wynikami oznaczeń na tym samym materiale badawczym, tą samą metodą, wykonywanymi przez różnych wykonawców, w różnych laboratoriach, w dłuższym odstępie czasu. Wyznaczana jest zwykle dla 95% poziomu ufności, stąd w 5% przypadków odtwarzalność może być wyższa od maksymalnej (1 przypadek na 20).

Odtwarzalność metody sprawdza się poprzez uczestnictwo zwykle raz w roku (lub w cyklu akredytacji) w badaniach międzylaboratoryjnych: międzynarodowych lub krajowych – mogą to być badania typu ILC (ang. *Interlaboratory comparisons* – porównania międzylaboratoryjne) lub PT (ang. *Proficiency testing* – badania biegłości).

Wyniki uzyskane przez laboratorium należy porównać z wynikami średnimi z badania międzylaboratoryjnego;

podaje się również odtwarzalność normową dla danej metody.

W przypadku większości metod badania benzyn silnikowych wymienionych w tablicy 1 dostępne są międzynarodowe badania okrężne. Doświadczenia na tym polu w Instytucie Nafty i Gazu wskazują, że jednostką gwarantującą prawidłowe i obiektywne wykonanie międzynarodowego badania okrężnego jest Institute for Interlaboratory Studies w Holandii, który corocznie organizuje badania benzyn silnikowych w pełnym zakresie parametrów jakościowych.

Dodatkowo, dla metody PN-EN ISO 5163 [15] oraz PN-EN ISO 5164 [16] są dostępne międzynarodowe badania okrężne organizowane corocznie przez Energy Institute w Wielkiej Brytanii, dające również możliwość regularnego sprawdzania wymienionych metod w sposób obiektywny.

Spójność pomiarowa

Spójność pomiarowa oznacza zgodność pomiędzy stosowanymi substancjami odniesienia. W Europie stosuje się system metrologiczny dla podstawowych wielkości fizycznych. W przypadku wzorca kilograma przechowywanego we Francji w Sevres mamy do czynienia z wzorcem odniesienia najwyższego rzędu – tzw. etalonem podstawowym. Na jego podstawie tworzy się etalon odniesienia, który służy do porównywania z wzorcami pierwszego rzędu, będących w posiadaniu krajowych instytucji metrologicznych (w Polsce jest to Główny Urząd Miar), które z kolei są odpowiedzialne za za-

pewnienie wzorców niższych rzędów dla okręgowych urzędów miar; jest to tzw. łańcuch porównań. W laboratorium najlepszym sposobem zapewnienia spójności pomiarowej jest zastosowanie certyfikowanych materiałów odniesienia (CRM – ang. *Certified Reference Material*). W dokumencie walidacyjnym załącza się certyfikaty posiadanych substancji wzorcowych lub wskazuje miejsce ich przechowywania.

W tablicy 2 podano wzorce odniesienia stosowane w znormalizowanych metodykach badania właściwości jakościowych benzyn silnikowych.

Tablica 2. Wzorce odniesienia stosowane w metodach ilościowych badania benzyn silnikowych

Oznaczany parametr	Zastosowany materiał wzorcowy
Badawcza liczba oktanowa – RON	Wzorce sporządzane z czystych odczynników, m.in.: n-heptan, izooktan i toluen
Motorowa liczba oktanowa – MON	
Zawartość ołowiu	Wzorzec certyfikowany ołowiu w benzynie
Gęstość w temperaturze 15°C	Materiały wzorcowe na bazie toluenu i n-heksanu
Zawartość siarki	Wzorzec certyfikowany w izooktanie lub toluenie, możliwość wykonania własnych wzorców z dostępnych związków siarki
Okres indukcyjny	Próbka z badań okrężnych
Zawartość żywic obecnych	Próbka z badań okrężnych
Działanie korodujące na miedź	Dostępna jedynie skala barwna korozji
Zawartość węglowodorów typu olefinowego i aromatycznego	Próbka z badań okrężnych
Zawartość benzenu	Próbka z badań okrężnych/wzorcowy roztwór benzenu
Zawartość tlenu i tlenowych związków organicznych	Wzorcowy roztwór tlenowych związków organicznych w benzynie bazowej/próbka z badań okrężnych
Prężność par	Czyste wzorcowe węglowodory wymienione w normie
Skład frakcyjny	Dostępne CRM są bardzo drogie i krótkiej trwałości, stosuje się toluen i cetan wysokiej czystości

Dokładność metody

Celem sprawdzenia dokładności metody wykonuje się od 7 do 20 analiz dla próbki wzorcowej o znanej zawartości badanej substancji, najlepiej certyfikowanego materiału odniesienia. Przeprowadza się test istotności poprzez porównanie wartości średniej z oznaczeń i wartości oczekiwanej przy poziomie ufności 95%. Wartość statystyki t oblicza się według wzoru:

$$t_{obl} = |\tau - x| \cdot \frac{\sqrt{n}}{s} \quad (2)$$

gdzie:

n – liczba oznaczeń,

s – odchylenie standardowe,

τ – wartość oczekiwana,

x – wartość średnia z oznaczeń.

Uzyskaną wartość należy porównać z wartością odczytaną z tablic rozkładu t-Studenta na poziomie ufności 95% dla wybranej liczby oznaczeń.

W przypadku omawianych metod badania benzyn silnikowych, sposób postępowania będzie identyczny w przypadku każdej z poszczególnych metod. Warunkiem wykonania tego testu jest posiadanie CRM-u lub możliwości sporządzenia roztworu wzorcowego danego analitu bądź też niezmiennej w czasie, pod względem badanej cechy, próbki z badań okrężnych. Wszystkie omawiane metody badania benzyn silnikowych spełniają ten warunek, z wyłączeniem metod oznaczania okresu indukcyjnego według PN-EN 7536 [18], zawartości żywic obecnych według PN-EN ISO 6246 [17], działania korodującego na miedź według PN-EN ISO 2160 [13] i wyglądu.

Granica wykrywalności i oznaczalności

Granica wykrywalności metody badawczej to najmniejsza zawartość substancji, którą można wykryć daną metodą, mając przy tym pewność statystyczną, że dana substancja jest obecna w próbce. Wartość granicy wykrywalności to wartość próby ślepej powiększona o trzy odchylenia standardowe średniej przy oznaczaniu ślepej próby.

Granica oznaczalności danej metody badawczej to najmniejsza zawartość substancji, którą można oznaczyć

ilościowo daną metodą z wystarczającą pewnością statystyczną. Wartość granicy oznaczalności wyraża się jako wartość próby ślepej powiększonej o sześć odchylen standardowych średniej przy oznaczaniu ślepej próby.

Wyznaczenie granicy wykrywalności jest możliwe jedynie w przypadku metod oznaczania ołowiu, siarki, żywic obecnych, benzenu oraz tlenu i tlenowych związków organicznych, gdyż tylko w ich przypadku możemy wykonać oznaczenie próby ślepej.

Przy oznaczaniu próby ślepej należy zwrócić uwagę na wykonanie wszystkich etapów analizy dokładnie w taki sam sposób jak przy oznaczaniu dla próbki, lecz w tym przypadku warunkiem jest brak dodatku analitu. W przypadku metod chromatograficznych, tak jak przy oznaczaniu tlenu i tlenowych związków organicz-

nych, granicę wykrywalności można wyznaczyć również rozcieńczając roztwór analitu do momentu zaniku obecności pików chromatograficznych na chromatogramie. Stosunek sygnału do szumu w tym przypadku najlepiej ilustruje granicę wykrywalności, gdy przyjmuje on wartość równą 3.

Zakres roboczy i liniowy

Zakres roboczy i liniowy metody ustala się najczęściej zgodnie z zakresem podanym w procedurze znormalizowanej. W przypadku nowo opracowywanej procedury, gdy jest taka możliwość, wykreśla się krzywą korelacji liniowej. Gdy kwadrat współczynnika korelacji r przyjmuje wartość $r^2 = 0,995$, wskazuje to na liniowość zależności sygnału od stężenia. W takim przypadku możliwe jest określenie zakresu roboczego i liniowego w przedziale wartości stężeń roztworów wzorcowych użytych do sporządzenia krzywej korelacji liniowej.

Zakres metod, zarówno w przypadku liczby oktanowej motorowej jak i badawczej, najczęściej zawęża się w laboratoriach badawczych do przedziału wartości $40 \div 100$, z uwagi na fakt, że w tym przedziale mieszczą się wyniki uzyskiwane dla większości dostępnych paliw, a w praktyce MON przyjmuje wartości od 80 do 90, a LOM od 95 do 99. Pojęcie zakresu liniowego zależności sygnału od stężenia tutaj nie obowiązuje – podobnie jak w przypadku metod oznaczania gęstości w 15°C , okresu indukcyjnego, żywic obecnych, działania korodującego na miedź, wyglądu, zawartości węglowodorów typu olefinowego i aromatycznego, prężności par, składu frakcyjnego i indeksu lotności. Wymienione metodyki nie dają możliwości wykreślenia krzywej korelacji liniowej, ponieważ na zależność sygnału od poziomu mierzonej cechy ma wpływ wiele innych zmiennych. W przypadku metody oznaczania zawartości tlenu i tlenowych związków organicznych występuje wprawdzie zależność liniowa sygnału od stężenia analitu, stosuje się jednak stałe współczynniki wzorcowania, bez wykreślenia krzywej korelacji liniowej.

W przypadku metod oznaczania zawartości ołowiu, siarki i benzenu mamy jedynie do czynienia ze sporządzaniem roztworów wzorcowych analitu i określaniem zależności odpowiedzi aparatury od stężenia badanej substancji. Minimalna liczba wyznaczonych punktów krzywej wynosi przeważnie 5. W każdym punkcie krzywej wykonuje się po $2 \div 3$ oznaczenia.

W przypadku konieczności oceny prawidłowości doboru zakresu roboczego i liniowego metody wykonuje się test jednorodności wariancji F Snedecora. Wyznacza się wariancje dla skrajnych punktów krzywej wzorcowej s^2_1 i s^2_n :

$$F_{\text{eksp}} = \frac{s_n^2}{s_1^2} \quad (3)$$

i porównuje się z wartością tablicową rozkładu F Snedecora F_{kryt} ($P = 0,99, f = n - 1$). Gdy następująca nierówność jest prawdziwa $F_{\text{eksp}} \leq F_{\text{kryt}}$, oznacza to, że wariancje są jednorodne, a zakres roboczy i liniowy metody jest prawidłowo dobrany [4].

W przypadku podejrzenia współczynników korelacji liniowej o brak istotności statystycznej wykonuje się test istotności współczynników korelacji liniowej, wyrażonej wzorem

$$Y = ax + b \quad (4)$$

gdzie:

a – współczynnik nachylenia krzywej wzorcowej,

b – współczynnik przesunięcia krzywej wzorcowej.

Współczynnik nachylenia a zawsze wykazuje istotność przy współczynniku korelacji $r^2 \geq 0,995$, testowanie go jest zatem bezzasadne. Dla współczynnika przesunięcia b warto wykonać test istotności, gdyż jego stosowanie może być zbędne nawet przy współczynniku korelacji $r^2 = 0,9999$.

Celem wykonania testu istotności współczynnika przesunięcia b oblicza się wartość statystyki:

$$t_{b,\text{eksp}} = b/s_b \quad (5)$$

gdzie: s_b – odchylenie standardowe współczynnika b ,

a następnie porównuje się wartość obliczoną $t_{b,\text{eksp}}$ z wartością tablicową t_{kryt} rozkładu t-Studenta ($P = 0,95, f = n - 2$). Gdy $t_{b,\text{eksp}} < t_{\text{kryt}}$, wówczas współczynnik przesunięcia nie wykazuje istotności i można go pominąć.

Szacowanie niepewności metody badawczej

Szacowanie niepewności metody to ostatni bardzo ważny etap walidacji – szczególnie istotny ze względu na uzyskanie oceny wszystkich czynników mających wpływ na końcowy wynik oznaczenia. Jest to cecha wyników uzyskiwanych daną metodą w danym laboratorium, wyrażona jako szerokość przedziału, w którym z określonym prawdopodobieństwem P znajdzie się prawidłowy wynik oznaczenia (zwykle $P = 95\%$).

Wyróżniamy następujące typy szacowania niepewności:

- typ A – ocena poprzez statystyczną analizę wyników serii badań (ten typ jest preferowany przez PCA) – omówiony w niniejszej pracy;
- typ B – ocena za pomocą innych dostępnych informacji:
 - wcześniejszych wyników badań,

- doświadczenia i znajomości metody,
- danych od producenta aparatury badawczej,
- danych z wzorcowania lub z certyfikatów,
- wartości referencyjnych z literatury.

Na procedurę określenia niepewności pomiaru składają się następujące czynności:

- przeanalizowanie dokładności wszystkich kolejnych pomiarów wraz z wartościami wielkości mierzonych i zapisanie ich do dalszych obliczeń,
- obliczenie niepewności standardowych na podstawie podanych dokładności przyrządów pomiarowych,
- obliczenie niepewności względnych,
- określenie równania pomiaru,
- obliczenie niepewności złożonej.

Określenie niepewności związanej z dokładnością przyrządów pomiarowych

Celem określenia niepewności związanej z dokładnością przyrządów pomiarowych każdorazowo dzieli się wartość dokładności najczęściej przez $\sqrt{3}$ (w przypadku przyrządu pomiarowego o wykazanej zwiększonej dokładności możemy podzielić ją przez $\sqrt{6}$).

Sposób obliczenia podają poniższe przykłady:

- waga analityczna o dokładności 0,0001 g, $u(m) = 0,0001/\sqrt{3} = 0,000057$ g,
- pipeta o pojemności $V_1 = 5$ ml, o dokładności 0,015 ml, $u(V_1) = 0,015/\sqrt{3} = 0,00866$ ml,
- kolba pomiarowa o pojemności $V_2 = 25$ ml, o dokładności 0,025 ml, $u(V_2) = 0,025/\sqrt{3} = 0,0144$ ml.

Określenie niepewności związanej z dokładnością wyznaczenia czystości substancji wzorcowych, gdy nie są znane, podano na przykładzie dwóch substancji wzorcowych:

- wzorec o czystości deklarowanej $P_1 = 99,5\%$, o dokładności 0,5%, $u(P_1) = 0,5/\sqrt{3} = 0,289\%$ (m/m),
- wzorec o czystości deklarowanej $P_2 = 99,0\%$, o dokładności 1,0%, $u(P_2) = 1,0/\sqrt{3} = 0,577\%$ (m/m).

Jeżeli producent materiału wzorcowego nie podaje odchylenia standardowego lub niepewności dla wartości deklarowanej, wartość dokładności wzorca stanowi różnica pomiędzy wartością równą 100 a wartością czystości deklarowanej.

Niepewność związana z powtarzalnością oznaczeń

Niepewność standardową związaną z powtarzalnością wykonywanych oznaczeń wyznacza się na podstawie wyników rzeczywistych z określenia powtarzalności.

Gdy nie stwierdzono zależności liniowej powtarzalności od stężenia analitu, do obliczeń stosuje się najwyż-

szą, nieodbiegającą wartość odchylenia standardowego powtarzalności s_r .

Stanowi ono niepewność standardową związaną z powtarzalnością oznaczeń $u(r)$:

$$s_r = u(r) \quad (6)$$

Niepewność względna

W celu uzyskania niepewności względnych obliczone wcześniej niepewności standardowe należy podzielić każdorazowo przez wartość wielkości mierzonej.

Przykładowo, ważąc 1 g substancji na wadze z dokładnością 0,0001 g, o niepewności standardowej $u(m) = 0,000057$ g, niepewność względną $u_w(m)$ wyrażoną w % obliczamy w sposób następujący:

$$u_w(m) = (u(m)/m) \cdot 100 = (0,000057/1) \cdot 100 = 0,0057\%$$

Uzyskana procentowa niepewność względna daje pogląd na wielkość wpływu dokładności na wynik pomiaru; jak pokazano na powyższym przykładzie procesu ważenia, wpływ ten jest bardzo mały.

Większą niepewność względną uzyskamy dla pomia-

rów objętości – przykładowo, przy odmierzaniu 5 ml substancji pipetą o dokładności 0,015 ml, o niepewności standardowej $u(V) = 0,00866$ ml, niepewność względna $u_w(V)$ wyrażona w % wynosi:

$$u_w(V) = (u(V)/V) \cdot 100 = (0,00866/5) \cdot 100 = 0,173\%$$

Uzyskana procentowa niepewność względna odmierzania pipetą ma znacznie większy wpływ na wynik końcowy niż proces ważenia.

Niepewność oznaczania parametrów jakościowych benzyn silnikowych

Wzory obliczeniowe w metodach oznaczania liczb oktanowych motorowej i badawczej według PN-EN ISO 5164 [16] oraz PN-EN ISO 5163 [15] pozwalają na łatwe zidentyfikowanie podstawowych niepewności cząstkowych. Jednak, z uwagi na bardzo dużą liczbę zmiennych, identyfikacja wszystkich źródeł niepewności mogłaby być procesem zbyt pracochłonnym. Ingerencja w jakiegokolwiek parametry silnika mogłaby negatywnie wpłynąć na jego pracę, stąd w przypadku tych metod wskazane jest przestrzeganie procedury badania i analiza jedynie powtarzalności oznaczeń do celów niepewności metodyk.

W przypadku oznaczania zawartości ołowiu według PN-EN 237 [9] do niepewności cząstkowych metody można zaliczyć niepewności związane z pomiarami masy i objętości podczas przygotowania roztworów wzorcowych i próbek, a także czystość materiałów wzorcowych. Duża wartość szumu rejestrowanego przy długości fali 217 nm, stosowanej w tej technice przy wykrywaniu ołowiu, oraz zastosowanie toluenu/izooktanu, w celu symulowania obecności benzyny w roztworach wzorcowych, mogą mieć wpływ na końcowy wynik oznaczenia, powyższe czynniki zawierają się jednak w wyznaczonej powtarzalności oznaczenia.

Obecnie stosowana aparatura do oznaczaniu gęstości w 15°C według PN-EN 12185 [11] pozwala na uzyskanie powtarzalności oznaczeń o rząd wielkości lepszej niż podana w normie. Aparatura jest w pełni automatyczna, nie poddaje się jej wzorcowaniu, a jedynie sprawdzeniu w jednej temperaturze przy użyciu certyfikowanego materiału odniesienia poprzez porównanie z wartością tablicową. Jako źródła niepewności można wymienić zatem jedynie powtarzalność oznaczeń oraz niepewność zastosowanego materiału wzorcowego CRM.

Oznaczenie zawartości siarki według PN-EN 20846 [12] metodą fluorescencji w UV jest metodyką nowoczesną i w pełni zautomatyzowaną, stąd niewiele jest również źródeł niepewności metody. Do najważniejszych czynni-

W przypadku niepewności związanej z powtarzalnością oznaczeń $u(r)$, dla uzyskania niepewności względnej $u_w(r)$ należy podzielić niepewność przez wartość średnią wielkości, dla której została ona wyznaczona.

Celem upewnienia się, czy zidentyfikowaliśmy wszystkie niepewności standardowe, należy sprawdzić tzw. równanie pomiaru dla metody. Stanowi ono wzór obliczeniowy podany w opisie metody, z którego obliczany jest wynik końcowy oznaczenia.

ków można zaliczyć: dokładność wagi podczas ważenia próbki, dokładność mikrostrzykawki podczas odmierzania próbki, niepewność zastosowanych materiałów wzorcowych oraz powtarzalność oznaczeń.

W przypadku metody oznaczania okresu indukcyjnego, odzwierciedlającego odporność benzyny silnikowej na długotrwałe przechowywanie, a także metod oznaczania działania korodującego na miedź oraz wyglądu, nie ma możliwości oszacowania niepewności pomiaru.

W metodzie oznaczania zawartości benzenu według normy PN-EN 238 [10] zastosowano prostą procedurę przygotowania próbek i szybką technikę instrumentalną – spektrometrię w podczerwieni – co umożliwia uzyskanie wielu wyników badań w krótkim czasie do celów wyznaczenia powtarzalności i pozostałych parametrów walidacyjnych. Do czynników mających wpływ na wynik końcowy oznaczenia można zaliczyć: czystość materiałów wzorcowych, pomiary objętości podczas przygotowania próbki do badań, jak również roztworów wzorcowych do sporządzenia krzywej wzorcowej. Niepewności wyznaczenia parametrów krzywej wzorcowej, jeżeli są dostępne, należy włączyć do niepewności złożonej. Odchylenia standardowe współczynnika kierunkowego i przesunięcia krzywej wzorcowej stanowią niepewności standardowe. Można również wziąć pod uwagę niepewności naczyń pomiarowych związane ze zmiennością temperatury zgodnie z podanym poniżej wzorem, przy założeniu, że przeciętna zmienność temperatury w laboratorium wynosi $21 \pm 4^\circ\text{C}$.

$$u(t) = \frac{T \cdot w \cdot V}{\sqrt{3}} \quad (7)$$

gdzie:

T – zmienność temperatury (4°C),

w – współczynnik rozszerzalności objętościowej (dla cieczy organicznej: $1,0 \cdot 10^{-4}$),

V – objętość naczynia pomiarowego.

W przypadku oznaczania składu frakcyjnego według normy PN-EN ISO 3405 [14], do czynników mających wpływ na wynik oznaczenia można zaliczyć: odmierzanie próbki cylindrem pomiarowym o określonej dokładności, odmierzanie pozostałości po destylacji, czystość zastosowanych materiałów wzorcowych (toluenu i n-heksadekanu) oraz powtarzalność oznaczeń. Należy podkreślić, że szacowanie niepewności wszystkich parametrów uzyskiwanych podczas oznaczania składu frakcyjnego jest procesem niezwykle pracochłonnym. Wskazany jest wybór do oszacowania niepewności tylko tych parametrów destylacji, dla których podanie niepewności jest niezbędne.

Z uwagi na dużą prostotę metodyki oznaczania zawartości żywic obecnych w benzynie silnikowej według normy PN-EN ISO 6246 [17], polegającej jedynie na odparowaniu określonej ilości próbki w odpowiednich warunkach i zważeniu pozostałości, do składowych niepewności złożonej wyniku końcowego (poza powtarzalnością) zaliczamy wyłącznie niepewność odmierzania próbki i ważenia zlewki do odparowania. W celu ograniczenia niepewności wyniku końcowego należy zwrócić uwagę na czystość naczyń zastosowanych do odparowania.

W przypadku metody oznaczania prężności par według normy PN-EN 13016-1 [5], przy zastosowaniu aparatu automatycznego do pomiaru prężności par mini-Reid, zasadniczy wpływ na niepewność uzyskiwanych wyników ma powtarzalność oznaczeń oraz niepewność związana z dokładnością strzykawki przy wprowadzaniu próbki do aparatu. Znacznie mniejszą składową niepewności złożonej metody jest niepewność związana ze zmiennością temperatury przy zastosowaniu tej strzykawki.

Metoda oznaczania zawartości węglowodorów typu olefinowego i aromatycznego wg normy PN-EN 15553 [6] jest stosowana od wielu lat. Obecne wydanie normy jest kontynuacją poprzednich edycji: PN-C-04100, PN-76/C-04100. Przez kilkadziesiąt lat metodyka nie sprawiała problemów i dalej pracuje w sposób niezawodny. Jest ceniona przez analityków i klientów laboratoriów mimo dostępności alternatywnej metody badania przy użyciu najnowszych rozwiązań techniki chromatografii gazowej, według normy PN-EN 22854. Metodyka opisana w normie PN-EN 15553 ma przewagę nad nowoczesnymi rozwiązaniami dzięki swojej prostocie, która zapewnia między innymi odporność metody na zmianę matrycy próbki w szerokim zakresie i na czynniki zewnętrzne, co zapewnia bardzo dużą stabilność metody w czasie. Została ona potwierdzona poprzez 10-letnie uczestnictwo Instytutu w międzynarodowych badaniach okrężnych benzyn silnikowych dla tej metody, z uzyskiwaniem każdo-

razowo wyników zadowalających, plasujących się blisko wartości średniej badania.

Do czynników mających wpływ na niepewność wyniku końcowego oznaczenia według PN-EN 15553 należy zaliczyć dokładność strzykawki stosowanej do dozowania próbki na kolumnę wypełnioną żelem krzemionkowym z pasmem żelu barwionego i stopień upakowania kolumny; należy dążyć do zminimalizowania wolnych przestrzeni pomiędzy drobinami żelu poprzez długotrwałe ubijanie go, najlepiej przy użyciu wibratora elektrycznego. Dokładność przyrządu do odczytu stref węglowodorów w metodzie według PN-EN 15553 nie ma wpływu na niepewność wyniku końcowego z uwagi na fakt, że długość strefy oznaczanej grupy węglowodorów dzieli się każdorazowo przez całkowitą długość stref i błąd pomiaru ulega zniwelowaniu. Można jedynie poddać sprawdzeniu jednorodność odcinków przyrządu pomiarowego na całej długości. Ostatnim składnikiem niepewności złożonej jest, tak jak w przypadku innych metod, powtarzalność metody.

W metodyce oznaczania tlenowych związków organicznych i tlenu związanego organicznie, opisanej w normie PN-EN 1601 [7], stosuje się chromatograf gazowy z systemem detekcji selektywnym względem tlenu. W normie zastosowano metodę wzorca wewnętrznego, dodawanego z dużą dokładnością każdorazowo do badanej próbki przed oznaczeniem. Wyznacza się współczynniki wzorcowania dla wszystkich oznaczanych tlenowych związków organicznych względem zastosowanego wzorca wewnętrznego, przy użyciu mieszanin wagowych wzorcowych, tlenowych związków organicznych w benzynie bazowej, wolnej od tlenowych związków organicznych. Do czynników mających wpływ na niepewność wyniku oznaczenia według PN-EN 1601 zaliczamy niepewności związane z ważeniem próbki, wzorca wewnętrznego, ważeniem materiałów wzorcowych i benzyny bazowej podczas wzorcowania, a ostatecznie – niepewność związaną z powtarzalnością oznaczeń.

Duża liczba czynników składowych niepewności złożonej powoduje, że staje się konieczne usystematyzowanie grup niepewności standardowych. Wzory obliczeniowe umożliwiające zsumowanie niepewności związanych z pomiarami masy m , objętości V i czystości wzorców P , są następujące:

$$u_w(m) = \sum_i^n \frac{u(m_i)}{m_i} \quad (8)$$

$$u_w(V) = \sum_i^n \frac{u(V_i)}{V_i} \quad (9)$$

$$u_w(P) = \sum_i^n \frac{u(P_i)}{P_i} \quad (10)$$

Mając wszystkie zidentyfikowane niepewności standardowe, stanowiące niepewności cząstkowe, po sprawdzeniu równania pomiaru, będącego wzorem obliczeniowym wartości wyniku oznaczenia w metodzie, określa się wzór na niepewność złożoną dla wartości mierzonej C :

$$u(C) = C \sqrt{\sum_i^n \frac{u^2(m_i)}{m_i^2} + \sum_i^n \frac{u^2(V_i)}{V_i^2} + \sum_i^n \frac{u^2(P_i)}{P_i^2} + u_w^2(r)} \quad (11)$$

Niepewność rozszerzona jest ostatnim etapem przeprowadzania walidacji. Przykładowo, gdy niepewność złożona oznaczenia wyniosła:

$$u(C) = C \cdot 0,06$$

niepewność rozszerzona, przy użyciu współczynnika rozszerzenia $k = 2$ dla poziomu ufności $P = 95\%$ wynosi:

$$U(C) = C \cdot 2 \cdot 0,06 = C \cdot 0,12$$

Finalizując szacowanie niepewności pomiaru, należy również podać sposób określania wyników dla wartości mierzonej C oraz zaznaczyć, że jest to niepewność rozszerzona $U(C)$:

$$C \pm C \cdot U(C)$$

W przypadku uzyskanej wartości niepewności złożonej, przy dostępnej wartości odtwarzalności normatywnej

R_{norm} należy sprawdzić, czy uzyskana wartość niepewności mieści się w niepewności $U_{R_{norm}}$ wyznaczonej na podstawie odchylenia standardowego odtwarzalności, według wzoru:

$$U_{R_{norm}} = \frac{R_{norm}}{2} \cdot 2,8 \quad (12)$$

Gdy uzyskana wartość oszacowanej niepewności rozszerzonej $U(C)$ jest niższa od wartości niepewności $U_{R_{norm}}$ obliczonej na podstawie odtwarzalności normatywnej i jest do niej zbliżona, świadczy to o prawidłowym oszacowaniu niepewności rozszerzonej $U(C)$ dla metody badawczej. W przypadku, gdy uzyskana wartość niepewności rozszerzonej jest znacznie niższa (rzędu wielkości) od wartości obliczonej na podstawie odtwarzalności metodyki, należy przeanalizować proces precyzowania niepewności cząstkowych, ponieważ prawdopodobnie pominięto ważny składnik niepewności złożonej i stąd nastąpiło jej niedoszacowanie. W przypadku, gdy uzyskana wartość niepewności rozszerzonej znacznie przekracza wartość niepewności obliczonej na podstawie odtwarzalności metodyki, należy sprawdzić obliczenia niepewności cząstkowych. W tym przypadku najprawdopodobniej została przeszacowana jedna z niepewności cząstkowych, co spowodowało przeszacowanie wartości niepewności złożonej.

Literatura

- [1] ASTM E 691 *Standard Practice for Conducting an Interlaboratory Study to Determine the Precision of a Test Method*.
- [2] Dokument EPA QA/G-9 *Practical Methods for Data Analysis, Guidance for Data Quality Assessment*, USA, EPA 2000.
- [3] EURACHEM/CITAC GUIDE CG 4 *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, Second Edition 2000.
- [4] Hyk W.: *Walidacja metody badawczej*. Materiały szkoleniowe. Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii, 2004.
- [5] PN-EN 13016-1:2009 *Ciekłe przetwory naftowe – Prężność par – Część 1: Oznaczanie prężności par nasyconych powietrzem (ASVP) i obliczanie równoważnika prężności par suchych (DVPE)*.
- [6] PN-EN 15553:2009 *Przetwory naftowe i materiały podobne – Oznaczanie zawartości grup węglodorów – Metoda adsorpcyjna ze wskaźnikiem fluoroscencyjnym*.
- [7] PN-EN 1601:2001 *Ciekłe przetwory naftowe – Benzyna bezolowiowa – Oznaczanie tlenowych związków organicznych i całkowitej zawartości organicznie związanego tlenu metodą chromatografii gazowej (O-FID)*.
- [8] PN-EN 228:2009 *Paliwa do pojazdów samochodowych – Benzyna bezolowiowa – Wymagania i metody badań*.
- [9] PN-EN 237:2007 *Ciekłe przetwory naftowe – Benzyna – Oznaczanie małych zawartości ołowiu metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej*.
- [10] PN-EN 238:2000/A1:2008 *Ciekłe przetwory naftowe – Benzyna – Oznaczanie zawartości benzenu metodą spektrometrii w podczerwieni*.
- [11] PN-EN ISO 12185:2002 *Ropa naftowa i przetwory naftowe – Oznaczanie gęstości – Metoda oscylacyjna z U-rurką*.
- [12] PN-EN ISO 20846:2012 *Przetwory naftowe – Oznaczanie zawartości siarki w paliwach do pojazdów samochodowych – Metoda fluorescencji w nadfiolecie*.
- [13] PN-EN ISO 2160:2004 *Przetwory naftowe – Korodujące działanie na miedz – Badanie na płycie miedzianej*.
- [14] PN-EN ISO 3405:2012 *Przetwory naftowe – Oznaczanie składu frakcyjnego metodą destylacji pod ciśnieniem atmosferycznym*.
- [15] PN-EN ISO 5163:2007 *Przetwory naftowe – Oznaczanie odporności benzyny samochodowej i benzyny lotniczej na spalanie stukowe – Metoda motorowa*.
- [16] PN-EN ISO 5164:2007 *Przetwory naftowe – Oznaczanie odporności benzyny samochodowej na spalanie stukowe – Metoda badawcza*.
- [17] PN-EN ISO 6246:2001 *Przetwory naftowe – Oznaczanie zawartości żywic w lekkich i średnich destylatach paliwowych – Metoda odparowania w strumieniu*.
- [18] PN-EN ISO 7536:2011 *Przetwory naftowe – Oznaczanie odporności benzyn na utlenianie – Metoda okresu indukcyjnego*.
- [19] *Rozporządzenie Ministra Gospodarki z dnia 25.03.2010 roku w sprawie metod badania jakości paliw ciekłych (Dz.U. z 2010 roku nr 55, poz. 332)*.



Mgr inż. Zygmunt BURNUS – absolwent Wydziału Chemicznego Politechniki Krakowskiej. Asystent w Zakładzie Analiz Pionu Technologii Nafty Instytutu Nafty i Gazu w Krakowie. Specjalność: analityka produktów naftowych z wykorzystaniem chromatografii gazowej.