

*Izabela ŁUCZAK, Ewa BULSKA*  
*Okręgowy Urząd Miar w Łodzi*  
*Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii*

## **PROBLEMY ZACHOWANIA SPÓJNOŚCI POMIAROWEJ CHROMATOGRAFU GAZOWEGO**

Techniki chromatograficzne, dzięki możliwości rozdzielania i identyfikacji składników często bardzo złożonych mieszanin, zdominowały współczesne laboratoria analityczne. Ważnym elementem zapewnienia jakości wyników jest wzorcowanie/kalibrowanie układów chromatograficznych, tak aby zastosowane wzorce chemiczne umożliwiły zapewnienie spójności pomiarowej. Poza tym należy pamiętać o tym, aby proces kalibrowania stanowił element procesu nadzoru nad wyposażeniem pomiarowym.

Thanks to the possibility of separation and identification of components of the frequently very complex mixtures makes the chromatographic techniques dominated modern method in analytical laboratories. An important element in ensuring the quality of the results is the calibration of chromatographic systems, so that the used chemical standards make possible the retention of measurement integrity. Moreover it must be kept in mind that the calibration process should be a part of supervision process over the measuring equipment.

### **1. ANALIZA JAKOŚCIOWA I ILOŚCIOWA W INSTRUMENTALNYCH TECHNIKACH ANALITYCZNYCH**

W powszechnym rozumieniu, proces kalibrowania oznacza powiązanie wartości sygnału analitycznego z zawartością danej substancji wzorcowej. Zakładając, że możliwe jest wykorzystanie kilku wzorców o różnej zawartości danej substancji, uzyskuje się zależność kalibracyjną, która charakteryzuje ilościowy zakres odpowiedzi detektora. Warto jednak pamiętać, że wyznaczanie zależności kalibracyjnej jest możliwe pod warunkiem zapewnienia selektywności odpowiedzi detektora, co oznacza konieczność ustalenia odpowiedzi detektora na obecność danej substancji, co oznacza konieczność ustalenia odpowiedzi detektora na obecność danej substancji, czyli pierwotne (jakościowe) wzorcowanie przyrządu pomiarowego.

Warto w tym miejscu podkreślić, że pierwotne wzorcowanie przyrządu pomiarowego względem jego cechy jest konieczne w każdej technice. W przypadku technik spektralnych jakościowe wzorcowanie przyrządu będzie oznaczać ustalenie długości fali, przy której sygnał analityczny jednoznacznie identyfikuje obecność danej substancji. W przypadku technik elektrochemicznych wzorcowanie przyrządu będzie oznaczać przykładowo ustalenie wartości potencjału dla reakcji utlenienia lub redukcji, charakterystycznego dla danej substancji. W końcu, w przypadku technik chromatograficznych wzorcowanie jakościowe przyrządu będzie oznaczać ustalenie czasu retencji jednoznacznie przypisanego obecności danej substancji [1].

Niezbędnym warunkiem uzyskania wiarygodnych wyników pomiarów, przy zapewnieniu ich spójności pomiarowej, jest w związku z tym kalibracja jakościowa i ilościowa układu pomiarowego. Instrumentalne techniki analityczne wymagają stosowania odpowiednich wzorców substancji chemicznych, tak aby możliwe było przypisanie odpowiadających im sygnałów analitycznych.

Jak wspomniano wyżej w przypadku technik chromatograficznych istotne jest określenie czasu retencji odpowiadającego miejscu danego sygnału na zarejestrowanym chromatogramie (kalibracja jakościowa) oraz intensywności tego sygnału w zależności od zawartości danej substancji wzorcowej (kalibracja ilościowa). Do tego celu służą chemiczne materiały odniesienia (wzorcowe substancje chemiczne), o znanym składzie i o znanej zawartości danej substancji. W przypadku certyfikowanych

materiałów odniesienia, zawartość danej substancji podana na certyfikacie powinna mieć przypisaną niepewność, poza tym konieczne jest odniesienie do wzorca wyższego rzędu (spójność pomiarowa).

Certyfikowany materiał odniesienia I rzędu (ang. *primary*) to materiał o najwyższej wartości metrologicznej, którego wartości danej cechy określone zostały przy pomocy metody bezwzględnej (definitywnej). Został on ustalony lub powszechnie uznany jako charakteryzujący się najwyższą jakością metrologiczną. Materiał odniesienia II rzędu (ang. *secondary*) to taki, którego wartości danej cechy są ustalone przez porównanie z wzorcem pierwszego rzędu.

Najbardziej pożądaną sytuacją jest ta, w której wartości danej cechy dla certyfikowanego materiału odniesienia (z definicji) są powiązane z jednostkami miar układu SI, to uważa się, że jeżeli powiązanie z wzorcami państwowych jednostek miar jest niemożliwe do uzyskania lub nieracjonalne w konkretnym przypadku, to można zastosować uzgodnione wzorce (lub metody), jednoznacznie opisane i zaakceptowane przez wszystkie zainteresowane strony. Pojawia się pytanie czy każdy certyfikowany materiał odniesienia zachowuje spójność pomiarową zgodnie z podstawowymi wymaganiami metrologicznymi? Nie, ale w żadnym wypadku nie oznacza to, że powinniśmy zrezygnować z ich stosowania.

## 2. MATERIAŁY ODNIESIENIA JAKO WZORCE SUBSTANCJI CHEMICZNYCH

Chemiczne materiały odniesienia są stosowane w analizie instrumentalnej jako wzorce substancji chemicznej i pełnią rolę wzorców miar, podobnie jak odważnik, przymiar czy opornik wzorcowy, w pomiarach fizycznych. Certyfikowane materiały odniesienia uznawane są za najlepsze źródło spójności pomiarowej i są niezmiernie przydatne w procesie walidacji procedur pomiarowych.

Przyjmuje się następujące kryteria, jakie powinna spełniać substancja, która może być uznana jako materiał odniesienia (ang. *Reference Material* - RM) [2]:

- RM powinien być trwały a odtwarzana przez niego wartość danej cechy powinna być stabilna w możliwym do zaakceptowania okresie, w możliwych do zrealizowania warunkach przechowywania, transportu i użytkowania,
- RM powinien być dostatecznie jednorodny, tak aby wartość danej cechy, zmierzona dla jednej części partii materiału odnosiła się do dowolnej innej części partii w możliwych do przyjęcia granicach niepewności, w przypadku niejednorodności dużej partii, może stać się konieczne certyfikowanie każdej próbki z partii,
- wartość danej właściwości RM powinna być ustalona z precyzją i dokładnością wystarczającą do przewidywanego zastosowania materiału odniesienia,
- wszelkie informacje na temat RM powinny być opisane w sposób jednoznaczny, zgodny z wymaganiami przewodnika ISO nr 31.

## 3. MATERIAŁY ODNIESIENIA STOSOWANE W CHROMATOGRAFII GAZOWEJ

Materiały odniesienia przeznaczone do pomiarów w układach wykorzystujących chromatografię gazową muszą charakteryzować się przede wszystkim wysoką czystością, a zawartość głównego składnika powinna być znana z przypisaną jej niepewnością.

W Pracowni Wzorców Chemicznych Okręgowego Urzędu Miar w Łodzi produkowane są między innymi wzorce następujących substancji: n-heksanu, benzenu, toluenu, o-ksylenu, izooktanolu. Są to substancje stosunkowo lotne, które są często wykorzystywane do kalibrowania chromatografów gazowych wyposażonych w detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID). W trakcie procesu certyfikacji wzorców wykonywana jest analiza ilościowa w odniesieniu do substancji przeznaczonej do roli wzorca, co pozwala na przygotowanie świadectwa materiału odniesienia zawierającego informację o jego czystości wraz z przypisaną niepewnością pomiaru. Stanowisko do analizy chromatograficznej składa się z chromatografu gazowego serii Agilent 6890N firmy Perlan Technologies z detektorem płomie-

niowo-jonizacyjnym FID. Chromatograf wyposażony jest w kolumnę kapilarną oraz automatyczny dozownik próbek. Chromatograf jest zintegrowany z komputerem wyposażonym w program ChemStation, umożliwiający kontrolowanie procesu chromatograficznego, wykonanie niezbędnych obliczeń i przedstawienie ich w postaci raportu.

Zastosowany detektor płomieniowo-jonizacyjny jest jednym z najczęściej stosowanych w chromatografii gazowej. Jego działanie polega na jonizacji wprowadzanych do płomienia substancji i rejestracji zmian potencjału. Podczas pracy chromatografu, gdy przez detektor przepływa jedynie gaz nośny, też ulegający jonizacji, ustala się stały potencjał między płomieniem, a elektrodą. W momencie, gdy do detektora dotrze oznaczana substancja, która również zostaje zjonizowana, mierzony potencjał zmieni się (rośnie), co zostanie zarejestrowane jako sygnał pomiarowy.

Chromatogramy przyjmują zwykle kształt serii ostrych pików, których wysokość odpowiada stężeniu wychodzącej z kolumny substancji, a pole powierzchni danego pików odpowiada stężeniu danej substancji w badanej próbce.

W analizie ilościowej wykorzystuje się liniową zależność między sygnałem detektora (powierzchnią pików), a stężeniem substancji badanej w gazie nośnym, czy rozpuszczalniku eluacyjnym. Najczęściej stosowanym sposobem wykonania pomiarów ilościowych jest technika normalizacji wewnętrznej. W tym przypadku zakłada się, że powierzchnia każdego pików jest proporcjonalna do ilości odpowiadającego mu składnika.

Analiza jakościowa przy wytwarzaniu wzorców substancji dla chromatografii gazowej mogłaby dotyczyć identyfikacji pików na podstawie ich czasów retencji odpowiadających poszczególnym składnikom próbki. Wówczas w świadectwie materiału odniesienia dodatkowo możliwe byłoby dodanie wartości czasu retencji substancji wzorcowej, pod warunkiem prowadzenia procesu rozdzielania chromatografowanego w jednakowych warunkach.

Należy jednak zaznaczyć, że jednym z problemów w badaniach jakościowych jest potwierdzenie lub wykluczenie obecności określonej substancji na podstawie czasu retencji, który może być różny dla różnych układów chromatograficznych. Konsekwencją tego jest to, że nawet jeśli na chromatogramie pojawi się pik o czasie retencji takim jaki został podany na świadectwie materiału odniesienia, to nie może to być potraktowane jako jednoznaczne potwierdzenie obecności substancji wzorcowej. Wiele związków należących do różnych klas substancji chemicznych może być wymywana z kolumny w identycznym lub bardzo zbliżonym czasie retencji.

#### **4. WYTWARZANIE MATERIAŁÓW ODNIESIENIA DO CHROMATOGRAFII GAZOWEJ**

Przy wyborze substancji, która może pełnić rolę substancji wzorcowej dla układów pomiarowych wykorzystujących rozdzielanie chromatograficzne w Pracowni Wzorców Chemicznych (PWCh) uwzględnia się następujące właściwości fizykochemiczne cieczy:

- czystość, obojętność chemiczną, możliwie niską higroskopijność,
- stabilność odtwarzanych wielkości.

Warto przy tym podkreślić, że do przygotowywania wzorców do chromatografii gazowej stosuje się substancje chemiczne zawierające minimum 99,5 % (m/m) głównego składnika w próbce. W tym celu substancje wyjściowe, przeznaczone do celu wytworzenia substancji wzorcowej oczyszcza się metodą rektyfikacji kolumnowej. W PWCh substancje przeznaczone na wzorce chromatograficzne, o przewidywanym zastosowaniu do wzorcowania przeznaczone do wzorcowania chromatografu gazowego są oczyszczane na kolumnie rektyfikacyjnej o zdolności rozdzielczej powyżej 15 pólk teoretycznych. Frakcję przeznaczoną na wzorec zbiera się w ściśle określonej temperaturze pod ciśnieniem 1013 hPa. Następnie analiza chromatograficzna przeprowadzana jest w następujących warunkach:

- kolumna kapilarna HP-50+ o wymiarach 30,0 m x 320  $\mu$ m, grubość filmu fazy stacjonarnej 0,25  $\mu$ m
- temperatura kolumny 50 °C/0,5 min., przyrost 50 °C/1 min. do 200 °C
- temperatura dozownika 250 °C

- temperatura detektora 250 °C
- przepływ gazu nośnego (argon) 30 cm<sup>3</sup>/min.

Ocena stopnia czystości zebranej frakcji polega na dokładnym ustaleniu zawartości głównego składnika we wzorcu. W tym celu wykonuje się serię co najmniej 8 pomiarów i wyniki poddaje się ocenie statystycznej.

Procedura wytwarzania wzorców chromatograficznych jest poddana procesowi walidacji, co pozwala na potwierdzenie spełnienia wysokich kryteriów założonych przez laboratorium. W celu oceny wiarygodności wyników potwierdzających identyfikację i czystość substancji wzorcowej stosowane są wzorce o najwyższej jakości metrologicznej, dostarczane przez renomowanych producentów.

Czystość badanej substancji w % (m/m) jest obliczana poprzez całkowanie pola powierzchni pików składnika głównego oraz pików zanieczyszczeń.

Do wzorcowania chromatografu gazowego zastosowano pięć certyfikowanych materiałów odniesienia, które zestawiono w tabeli 1 wraz z odpowiadającymi im czasami retencji.

Tabela 1

Lista wzorców produkowanych w Pracowni Wzorców Chemicznych

Lp.	Wzorce	Stężenie, %	Czas retencji, s
1.	n-Heksan	99,81 ± 0,01	2,049
2.	Benzen	99,88 ± 0,02	2,468
3.	Toluen	99,80 ± 0,01	2,893
4.	o-Ksylene	99,67 ± 0,01	3,546
5.	Izooktanol	99,89 ± 0,01	4,084

Kalibrację wykonuje się według instrukcji wzorcowania. Instrukcja ta zawiera konfigurację i specyfikację sprzętu, warunki, w których powinien znajdować się układ pomiarowy, opis programu ChemStation, czynności oraz procedury weryfikacji, interpretacji, opracowania oraz zestawienia wyników.

Wstępne opracowanie wyników obejmuje: korekcję sygnału wyjściowego (korekcję linii zerowej), wyznaczenie szczególnego parametru sygnału (np. powierzchni pików), filtrację sygnału w celu usunięcia zakłóceń, weryfikację kompletności zapisów o aparaturze, warunkach, wynikach itp. oraz weryfikację wyników i usunięcie wyników obciążonych błędami grubymi [3].

## 5. PODSUMOWANIE

Jakość przetwarzanych danych pomiarowych ma zasadniczy wpływ na uzyskanie wiarygodnych wyników. Istotne jest więc właściwe zaplanowanie doświadczenia w celu zminimalizowania liczby pomiarów koniecznych do uzyskania informacji o mierzonym obiekcie, co w analityce pozwala na ekonomizację czasu i środków.

Metoda zastosowana podczas próby wzorcowania wybranego modelu chromatografu gazowego zostanie jeszcze przetestowana na innych, zbliżonych parametrowo układach chromatograficznych.

Za czynnik wpływający na pomiar można uznać m.in. skład fazy stacjonarnej, temperaturę, przepływ, ciśnienie, stabilność przepływu, skład fazy ruchomej oraz czynniki wynikające z budowy i właściwości zastosowanego detektora takie jak czułość, selektywność, poziom szumów oraz dryft. Przedstawiona powyżej metoda wzorcowania chromatografów gazowych wymaga jeszcze dalszych badań.

## LITERATURA

1. Bulska E., Metrologia chemiczna, Wydawnictwo Malamut, Warszawa 2013.
2. Certyfikacja Materiałów Odniesienia – Zasady ogólne i analiza statystyczna. Przewodnik ISO/IEC Nr 35, PKN, Warszawa 1997.
3. Piotrowski J., Kostyrko K., Wzorcowanie aparatury pomiarowej, PWN, Warszawa 2012.