

Strona czasopisma: <http://analit.agh.edu.pl/>

Szacowanie niepewności pomiarowej w woltamperometrii

Estimation of the measurement uncertainty in voltammetry

Paulina Mucha^[a], Wanda Sordoń^[a], Małgorzata Jakubowska^[a]

[a] AGH Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, Polska

ABSTRAKT: Według międzynarodowego słownika terminów metrologicznych, niepewność jest parametrem, który ściśle powiązany jest z ostatecznym wynikiem pomiaru i stanowi rozrzut względem wartości, jaka może być przyporządkowana konkretnej wielkości mierzonej. W pracy podjęto próbę ukazania strategii umożliwiającej wyznaczenie niepewności pomiaru woltamperometrycznego w oparciu o wyznaczenie niepewności stężenia wzorca kwasu ferulowego oraz kolejnych jego dodatków. Aby jeszcze dobitniej wykazać słuszność prowadzonych w pracy działań, dla uzyskanych wyników w programie MATLAB wykreślono krzywą kalibracyjną uwzględniającą typową niepewność prądową oraz krzywą ujmującą niepewność dla obu osi układu współrzędnych wraz z niepewnością dotowanego wzorca. Ponadto dla wybranych krzywych kalibracyjnych sprawdzono jak sposób odjęcia tła oraz rodzaj dopasowywanej linii bazowej wpływa na miarodajność krzywej kalibracyjnej.

ABSTRACT: According to the ISO Guide, uncertainty is a parameter closely linked to the final outcome of measurement and to scattering of value that can be assigned to particular measurand. In this master thesis the strategy enabling determination of the measurement uncertainty associated to voltammetric measurement on the basis of determination of uncertainty of concentration of ferulic acid and its further additions is discussed. To demonstrate the validity of operations, for the results obtained in MATLAB, the calibration curve representing typical uncertainty of the current curve was plotted, as well as the curve representing uncertainty of both axes of the coordinate system, along with uncertainty of ferulic acid standard. In addition to the selected calibration curves it was checked how background subtraction and the type of baseline matching affects the reliability of the calibration curve.

Słowa kluczowe: woltamperometria, niepewność pomiaru, krzywa kalibracyjna

1. Wstęp

W związku z nasilającym się w ostatnich latach "głodem informacyjnym" powstał nowy rodzaj rynku, na którym docelowym "produktem" są informacje. Szczególnym typem informacji są informacje analityczne dotyczące badanych obiektów, które otrzymywane są nie w wyniku badania całego przedmiotu, lecz w wyniku analizy pobranych próbek. W celu zaspokojenia ciągle narastającej potrzeby dotyczącej pozyskiwania coraz to rzetelniejszych informacji analitycznych, trwają intensywne działania, których celem jest opracowanie jeszcze lepszych rozwiązań metodycznych i aparaturowych, aby przeprowadzona analiza dawała możliwie najwięcej informacji o badanym obiekcie [1].

Jednym z fundamentalnych kierunków rozwoju w chemii analitycznej jest możliwość oznaczania niskich stężeń analitów w próbkach, w których matryca cechuje się dużą złożonością. To zagadnienie spędza sen z powiek analitykom oraz zwraca ich uwagę zarówno na kontrolę jak i zapewnienie jakości pozyskanych wyników (ang. *Quality Control/Quality Assurance- QC/QA*). Spośród elementów dotyczących systemów szacowania jakości można wyróżnić następujące procedury:

- kontrolę oraz ocenę precyzji uzyskiwanych wyników, poprzez systematyczną weryfikację próbek,
- weryfikację dokładności poprzez:

- badanie próbek wykonanych z certyfikowanych materiałów odniesienia,
- zestawianie otrzymywanych wyników z wynikami pochodzącymi od tej samej próbki,
- przeprowadzenie analizy materiału po uprzednim dodaniu wzorca,
 - wykonanie badań międzylaboratoryjnych (interkalibracja),
 - sporządzenie kart kontrolnych,
- stosowanie audytu [2].

Niepewność pomiaru u jest atrybutem, który pozwala na ustalenie granic przedziału, w którym z danym prawdopodobieństwem będzie znajdować się niewiadoma wartość rzeczywista mierzonego parametru. Przyjmuje się, że całkowita niepewność pomiaru posiada każdorazowo charakter losowy, a także że jej wielkość jest opisywana przez odchylenie standardowe σ albo też jego krotność $k \sigma$. Dla niepewności pomiaru możemy wyodrębnić następujące pojęcia:

- standardowa niepewność pomiaru

$$u = \sigma \quad (1)$$

- łączna standardowa niepewność pomiaru

$$u_l = \sqrt{\sum_{i=1}^n \sigma_i^2} = \sigma_l \quad (2)$$

- rozszerzona niepewność pomiaru

$$u_c = k_\alpha \cdot \sigma_l \quad (3)$$

gdzie współczynnik k_α stanowi wielkość dopasowaną w oparciu o wybrane prawdopodobieństwo dla sprecyzowanego rozkładu prawdopodobieństwa. Akceptuje się dla niektórych przypadków przyjęcie następujących wartości k_α : $k_\alpha=2$ lub też $k_\alpha=3$ z założeniem, że odpowiadają im prawdopodobieństwa $\alpha=0,95$ i $\alpha=0,99$. Stanowi to swego rodzaju uproszczenie zmniejszające jednocześnie dokładność w ocenie granicy dla poszukiwanego przedziału [3].

W niniejszej pracy zaproponowano strategię pozwalającą na wyznaczenie niepewności dla pomiaru woltamperometrycznego. Ponadto dla otrzymanych przy użyciu programu *MATLAB* wykreślono krzywe kalibracyjne i dokonano ich optymalizacji poprzez odjęcie tła i dopasowanie linii bazowej.

2. Niepewność stężenia roztworu wzorcowego kwasu ferulowego

Wyznaczenie złożonej niepewności standardowej stężenia roztworu wzorca ($u(c)$) związane jest ze zdefiniowaniem odpowiednio: niepewności dla objętości naczynia, w którym był wykonany roztwór kwasu ferulowego, niepewności wynikającej z etapu ważenia, niepewności czystości kwasu ferulowego, a także niepewności masy molowej kwasu. W dalszej części pracy przedstawiono podrozdział opisujący metodykę wraz z uzyskanymi wynikami umożliwiającymi wyliczenie niepewności dla stężenia roztworu kwasu ferulowego oraz podrozdział opisujący metodologię, na podstawie której obliczono niepewność stężenia roztworu kalibracyjnego po kilkukrotnym dodatku wzorca ($u(C_i)$).

2.1 Metodyka postępowania analitycznego pozwalająca na wyznaczenie stężenia roztworu wzorcowego kwasu ferulowego

W celu pozyskania wyników umożliwiających obliczenie niepewności wykonano serie pomiarów pozwalających na określenie powtarzalności podczas:

- 1) ważenia,
- 2) dopełniania do kreski,
- 3) pipetowania.

Ad. 1) W celu określenia powtarzalności ważenia dla wagi analitycznej wykonano serie pomiarów pustego naczynka wagowego (z pokrywką) oraz tego samego naczynka wagowego zawierającego około 0,0194g kwasu ferulowego. Podczas ważenia postępowano zgodnie z wytycznymi podanymi przez producenta wagi analitycznej. Ważenie pustego naczynka polegało na jego dziesięciokrotnym umieszczeniu na szalce wagi analitycznej (waga analityczna firmy RADWAG) i zanotowaniu wyświetlonej wartości. Wagę tarowano każdorazowo po zdjęciu naczynka z szalki. Podobnie postępowano podczas ważenia naczynka z kwasem ferulowym. W naczynku wagowym umieszczono około 0,0194g kwasu ferulowego, wagę wytarowano, a na jej szalce umieszczono wypełnione naczynko. Masę naczynka z kwasem zanotowano i wytarowano urządzenie. Czynność powtórzono dziesięciokrotnie.

Parametry związane z dokładnością wagi (d) oraz najmniejszą różnicą dla wskazań wagi (e) przedstawiają się następująco: $d=0,0001g$, $e=0,001g$.

Ad. 2) W celu określenia powtarzalności dopełnienia kolby miarowej do kreski wykonano ważenie pustej kolby miarowej o pojemności 10 ml (wraz z korkiem) oraz tej samej kolby miarowej dopełnionej wodą destylowaną do kreski (również pamiętano, aby kolba zamknięta była korkiem). Ważenie wykonywano przy użyciu wagi analitycznej firmy RADWAG. Przed rozpoczęciem czynności i po ich zakończeniu zanotowano temperaturę jaka panowała w laboratorium. Metodyka polegała na umieszczeniu pustej kolby miarowej na szalce wagi analitycznej i zanotowaniu wyświetlonej wartości. Czynność powtórzono dziesięciokrotnie. Wagę tarowano każdorazowo po zdjęciu kolby z szalki. Podobnie postępowano podczas ważenia kolby dopełnionej do kreski wodą destylowaną. Przed napełnieniem kolby wodą zmierzono temperaturę wody i zanotowano wartość. Następnie kolbę napełniono wodą destylowaną do kreski. Czynność ta polegała na umieszczeniu kolby miarowej na wysokości oczu i wypełnieniu jej w taki sposób, aby dolna część menisku znajdowała się na linii nakreślonej na kolbie. Kolejno wagę wytarowano, a na jej szalce umieszczono kolbę z wodą. Zanotowano masę naczynia z wodą, zdjęto kolbę z szalki, wagę wytarowano i wylano wodę z kolby. Czynność tę powtarzano dziesięciokrotnie.

Zanotowana temperatura wody: $24,7^{\circ}C$.

Temperatura panująca w laboratorium: $24,6^{\circ}C - 24,7^{\circ}C$

Ad. 3) W celu określenia powtarzalności pipetowania dla pipety o pojemności 10 μ l wykonano ważenie naczynka wagowego z 10 μ l wody destylowanej. Przed przystąpieniem do tego etapu badań zanotowano temperaturę panującą w laboratorium. Czynność powtórzono po zakończeniu pomiaru. Zanim umieszczono naczynko wagowe na szalce wagi analitycznej, wagę wytarowano, następnie umieszczono na jej szalce puste naczynko wagowe z pokrywką (to samo naczynko wagowe, które było używane podczas ważenia kwasu ferulowego). Odczytaną masę zanotowano. Kolejno zbadano temperaturę wody destylowanej (wartość również zanotowano), pobrano pipetą automatyczną 10 μ l wody destylowanej i umieszczono w naczynku wagowym. Całość przeniesiono na szalkę wagi i zanotowano wynik. Po zdjęciu naczynka z wodą nie tarowano wagi. Następnie pobrano kolejną porcję 10 μ l wody destylowanej i wiano do naczynka wagowego mając w nim już 10 μ l wody. Całość również umieszczono na szalce wagi i zanotowano wynik. Naczynko zdjęto z szalki i odmierzono pipetą kolejną porcję wody. Pipetowanie powtórzono dziesięciokrotnie.

Zanotowana temperatura wody: $24,7^{\circ}C$

Temperatura panująca w laboratorium: 24,6 oC -24,7oC

Masa pustego naczynka (m_o): 7,8141g

Średnie wartości wyników dla działań związanych z ważeniem, dopełnieniem do kreski oraz pipetowaniem zebrano w **tabeli 1**.

Tabela 1. Zestawienie wartości średnich otrzymanych podczas pomiarów.

Ad. 1)	Wartość średnia masy pustego naczynka wagowego ± odchylenie standardowe $(\overline{m}_1 \pm S_{m_1})$ [g]	Wartość średnia masy naczynka wagowego z kwasem ferulowym ± odchylenie standardowe $(\overline{m}_2 \pm S_{m_2})$ [g]	Wartość średnia masy kwasu ferulowego ± odchylenie standardowe $(\overline{m}_w \pm S_{m_w})$ [g]
	7,8142±0,0001	7,8372±0,0001	0,0230±0,0001
Ad. 2)	Wartość średnia masy pustej kolby miarowej ± odchylenie standardowe $(\overline{m}_k \pm S_{k_1})$ [g]	Wartość średnia masy kolby miarowej z wodą ± odchylenie standardowe $(\overline{m}_{k+H_2O} \pm S_{k+H_2O})$ [g]	Wartość średnia dla masy wody ± odchylenie standardowe $(\overline{m}_{H_2O} \pm S_{H_2O})$ [g]
	16,3173±0,0001	26,35±0,01	10,03±0,01
Ad. 3)	Wartość średnia masy naczynka wagowego i wody ± odchylenie standardowe $(\overline{m}_n \pm S_{n_1})$ [g]	Wartość średnia masy wody ± odchylenie standardowe $(\overline{m}_{H_2O} \pm S_{H_2O})$ [g]	Wartość średnia dla masy wody i naczynka wagowego ± odchylenie standardowe $(\overline{m}_{n+H_2O} \pm S_{n+H_2O})$ [g]
	7,868±0,003	0,09800±0,00004	7,82390±0,00004

2.1 Wyznaczenie niepewności stężenia roztworu wzorcowego kwasu ferulowego oraz wyznaczenie niepewności jego dodatków

Jak już wcześniej wspomniano wyznaczenie niepewności stężenia roztworu wzorcowego oparte jest na określeniu szeregu niepewności pośrednich. Ostateczną wartość niepewności stężenia wzorca ($u(c)$) oblicza się ze wzoru:

$$u(c) = c \sqrt{\left(\frac{u(m_w)}{m_w}\right)^2 + \left(\frac{u(V_r)}{V_r}\right)^2 + \left(\frac{u(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{u(M)}{M}\right)^2} \quad (4)$$

gdzie:

c - stężenie roztworu wzorca, $u(m_w)$ - niepewność ważenia, m_w - średnia masa kwasu ferulowego
 $u(V_r)$ - niepewność objętości kolby miarowej, V_r - średnia objętość roztworu w kolbie, $u(p)$ - 0,01 (niepewność czystości wzorca podana przez producenta), p - 0,97 (czystości wzorca podana przez producenta), $u(M)$ - 0,01 (niepewność masy molowej kwasu ferulowego, podana na podstawie wartości generowanych przez kalkulator mas atomowych), M - 194,18 (masa molowa kwasu ferulowego podana przez producenta).

Poszczególne niepewności podano w **tabeli 2**.

Tabela 2. Wyniki pozwalające na określenie złożonej niepewności stężenia wzorca kwasu ferulowego.

Parametr	Wartość parametru wraz z niepewnością $x \pm u(x)$	Jednostka
Masa naważki	0,02300±0,00083	g
Objętość roztworu wzorcowego	0,010100±0,000023	dm ³
Czystość odczynnika	0,970±0,010	-----
Masa atomowa kwasu	194,180±0,010	g/mol
Stężenie kwasu	11,40±0,43	mmol/dm³

Prócz niepewności stężenia roztworu wzorcowego kwasu ferulowego podano również wartości niepewności analizowanego kwasu po ośmiokrotnym dodatku wzorca. Wyniki zebrano w **tabeli 3**.

Tabela 3. Zestawienie wyników dla wartości poszczególnych stężeń dodatków kwasu ferulowego oraz ich niepewności.

L.p.	Wartość stężenia dodatku (c_i) (mmol/dm ³)	Niepewność dla kolejnych dodatków $(u(c_i))$ (mmol/dm ³)
1	0,01000	0,00038
2	0,02000	0,00077
3	0,0300	0,0012
4	0,0400	0,0016
5	0,0500	0,0020
6	0,0600	0,0024
7	0,0700	0,0029
8	0,0800	0,0033

Jak widać z tabeli 3 przy każdorazowym dodatku wzorca obserwuje się zmianę wartości niepewności. Każdy dodatek wzorca powoduje przyrost niepewności dla wzorca, jednak przyrost tej niepewności nie jest liniowy i przyjmuje wartości w zakresie od 0,00038 do 0,0005 mmol/dm³.

3. Metodyka postępowania podczas pomiaru woltamperometrycznego

W celu oszacowania niepewności wykonano badanie roztworu kwasu ferulowego. Analiza roztworu kwasu ferulowego prowadzona była przy wykorzystaniu woltamperometrii impulsowej różnicowej (DP). Układ jakim posługiwano się w trakcie pomiaru zbudowany był z trzech elektrod pomiarowych:

- o elektrody pracującej, którą była elektroda dyskowa z węgla szklitego (GCE, ang. *glassy carbon electrode*) o powierzchni 0,1 cm²,
- o elektrody odniesienia, którą była elektroda chlorosrebrowa $Ag | AgCl | 3M KCl$ z podwójnym kluczem elektrolitycznym wypełnionym roztworem KNO_3 o stężeniu 2,5 mol/dm³,
- o elektrody pomocniczej, którą była elektroda platynowa o powierzchni około 2 cm².

Parametry pomiaru przedstawiały się następująco: $E_p = -100$, $E_k = 100$, $E_s = 1$, $t_p = 20$, $t_w = 20$, $t_d = 1$.

Cały pomiar prowadzony był przy użyciu wielofunkcyjnego analizatora elektrochemicznego M 161 ze statywem elektrodowym M 164 (*mtm anko*) dla standardowego trójelektrodowego układu. Analizowany składnik dotowany był do kwarcowego naczynia pomiarowego. Objętości naczynka pomiarowego wynosiła 5 ml.

W trakcie prowadzenia analizy użyto również drobnego sprzętu laboratoryjnego:

- o wagi analitycznej firmy RADWAG,
- o pipety automatycznej o pojemności 10 μl firmy LABOPETTE,
- o pipety automatycznej o pojemności 5 ml firmy EPPENDORF,
- o kolby miarowej o pojemności 10 ml,
- o oraz naczynka wagowego.

Natomiast podczas analizy wykorzystywano następujące odczynniki:

- o kwas ferulowy o czystości $97\pm 1\%$ firmy ALDRICH,
- o kwas H_3PO_4 o stężeniu $0,2 \text{ mol/dm}^3$ firmy ALDRICH.

Podczas pomiaru korzystano z tego samego sprzętu laboratoryjnego, który posłużyła do wyznaczenia niepewności stężenia roztworu kwasu ferulowego.

W oparciu o otrzymany woltamperogram określono maksima poszczególnych dodatków wzorca oraz odchylenie od wartości maksymalnych dla danego dodatku 5 μl roztworu wzorca kwasu ferulowego. Wyniki będące wartościami średnimi z czterech powtórzeń zestawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Tabela przedstawiająca wartości maksimum pików poszczególnych dodatków wzorca kwasu ferulowego oraz odchylen od intensywności.

L.p.	Maksimum dla pików prądu $y_i [\mu\text{A}]$	Niepewności od odchylen dla wartości maksymalnych $u(y_i) [\mu\text{A}]$
1	0,8901	0,0904
2	1,3015	0,0584
3	1,6339	0,0342
4	1,9298	0,0226
5	2,228	0,0244
6	2,5295	0,016
7	2,7595	0,0171
8	3,009	0,0348

4. Optymalizacja procedury kalibracyjnej

W oparciu o pozyskane wyniki dla stężeń dodatku wzorca, wyliczonych niepewności dla dodatków jak i wartości maksimum pików prądu wraz z odchyleniami od tych wartości, w oparciu o funkcje jakimi dysponuje program *MATLAB* wykreślono dwa rodzaje krzywych kalibracyjnych:

- o krzywą typową, uwzględniającą niepewność pomiaru prądu (linia czarna),
- o oraz krzywą uwzględniającą niepewność na obu osiach oraz niepewność dotowanego wzorca (linia czerwona),

egzemplifikując ich wzajemne korelacje.

Sprawdzono jak na postać, dopasowanie krzywej kalibracyjnej oraz przeliczaną ilość składnika, wpływa ilość punktów znajdujących się na krzywej. Porównanie to wykonano w oparciu o sześć, pięć, cztery oraz trzy punkty znajdujące się na krzywej kalibracyjnej. Obliczono granicę wykrywalności metody.

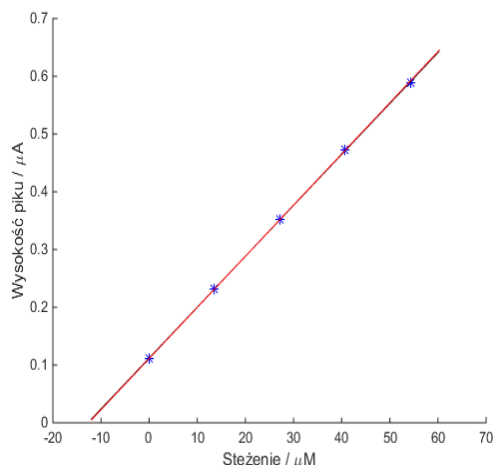
Parametry typowe dla danej krzywej generowane w trakcie jej kreślenia przedstawiają się następująco:

- o wartość współczynnika nachylenia prostej (a),
- o wartość współczynnika przecięcia prostej z osią y (b)
- o wartość odchylenia standardowego dla współczynnika nachylenia prostej (S_a),
- o wartość odchylenia standardowego dla współczynnika przecięcia prostej z osią y (S_b),
- o wartość wyniku – stężenie analitu w próbce (w),
- o wartość odchylenia standardowego dla wyniku (S_w),

- o wartość współczynnika korelacji liniowej (r).

Wyniki przedstawiają się następująco. Zauważono, że najlepszą wzajemną zgodność obu typów krzywych kalibracyjnych obserwuje się w przypadku, gdy układ kalibracyjny utworzony jest dla 6 oraz 5 punktów pomiarowych. Przykładowy wykres zamieszczono na rysunku 1.

Mniejsza liczba punktów na krzywej sprawia, że wartość stężenia, jaką można odczytać z układu oraz wartości generowane przez system całkowicie różnią się między sobą.

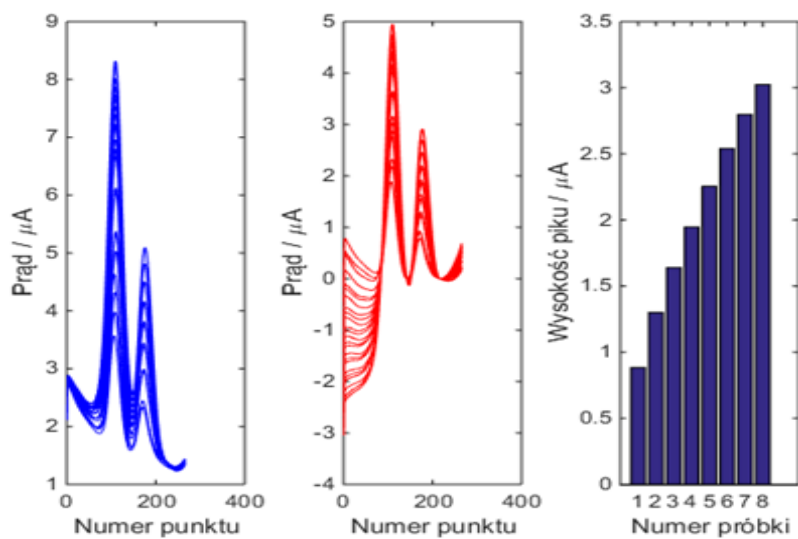


Rys.1 Krzywa kalibracyjna otrzymana dla 5 punktów pomiarowych.

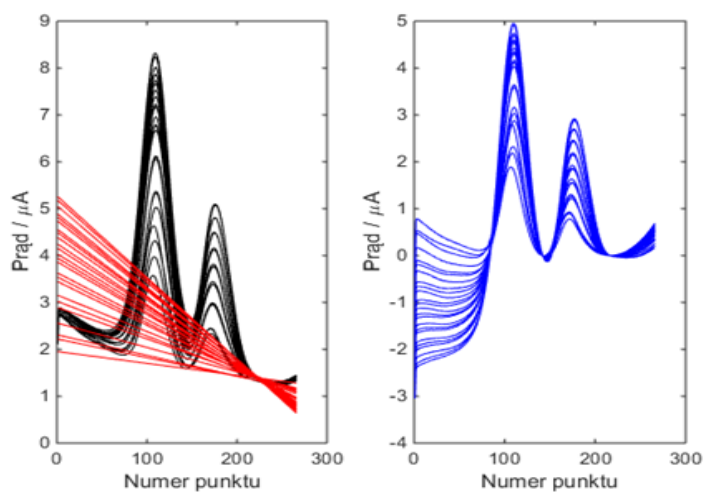
Kolejny etap dotyczył operacji odjęcia tła i dopasowania wielomianowej linii bazowej. Przykładowy wynik działania procedury odjęcia tła i dopasowania linii bazowej wielomianem pierwszego stopnia przedstawiono na rys. 2.

Tabela 5. Tabela zawierająca wartości obliczone dla poszczególnych parametrów (w kolejności: krzywa typowa, krzywa uwzględniająca niepewność dla obu osi).

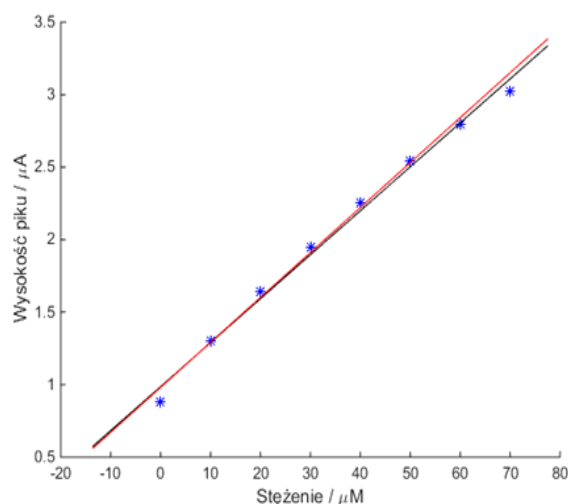
a [($\mu\text{A}\cdot\text{dm}^3$)/ μM]	b [μA]	S_a [($\mu\text{A}\cdot\text{dm}^3$)/ μM]	S_b [μA]	w [$\mu\text{M}/\text{dm}^3$]	S_w [$\mu\text{M}/\text{dm}^3$]	r	Granica wykrywalności [$\mu\text{M}/\text{dm}^3$]
0,0059	0,074	0,0010	0,018	11,60	0,21	0,9999	0,5
0,0060	0,075	0,0011	0,022	11,55	0,094	0,9999	0,6



Rys.2 Wykresy ilustrujące odpowiednio woltamperogram eksperymentalny, woltamperogram po odjęciu tła oraz przyrost wartości prądu po odjęciu tła.



Rys.3 Woltamperogram ilustrujący dopasowanie wielomianu pierwszego stopnia oraz wygląd woltamperogramu po odjęciu tła.



Rys. 4 Krzywa kalibracyjna powstała po dopasowaniu wielomianu pierwszego stopnia oraz odjęciu tła .

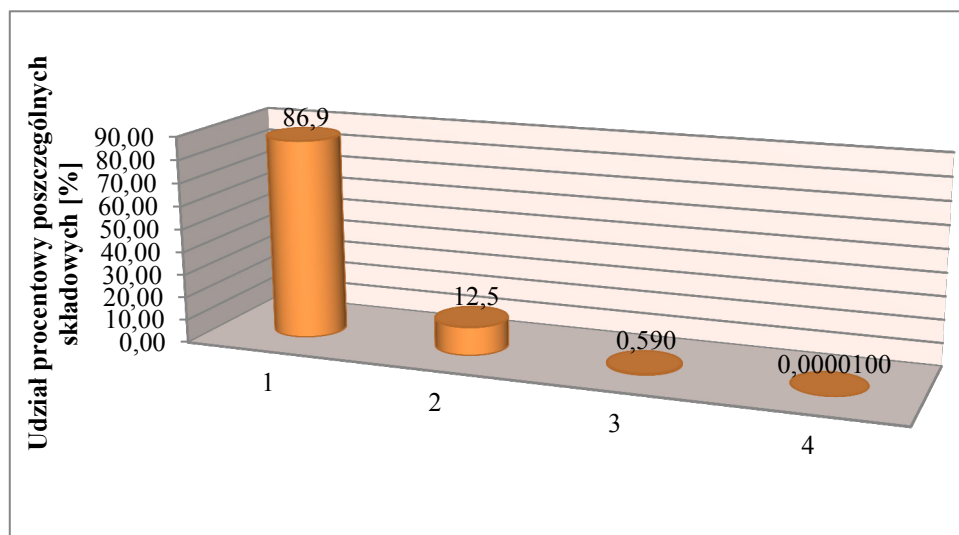
Tabela 6. Tabela zawierająca wartości obliczone dla poszczególnych parametrów (w kolejności: krzywa typowa, krzywa uwzględniająca niepewność dla obu osi).

a [($\mu\text{A}\cdot\text{dm}^3$)/ μM]	b [μA]	Sa [($\mu\text{A}\cdot\text{dm}^3$)/ μM]	Sb [μA]	w [$\mu\text{M}/\text{dm}^3$]	Sw [$\mu\text{M}/\text{dm}^3$]	r	Granica wykrywalności [$\mu\text{M}/\text{dm}^3$]
0,0047	0,068	0,0010	0,024	14,509	0,043	0,9990	0,7
0,0046	0,067	0,0010	0,031	14,641	0,042	0,9990	0,7

Analizując wyniki otrzymane po odjęciu tła można zauważyć, że wraz ze zmianą dopasowania linii bazowej sposób ułożenia punktów na krzywej, jak i położenie typowej krzywej kalibracyjnej, uwzględniającej niepewność prądu, jak i krzywej uwzględniającej niepewność pomiarową obu osi, zmieniają się. Najlepszą liniowość obserwuje się dla wielomianu pierwszego stopnia ($r=0,9990$). Dodatkowo można zauważyć, że oba rodzaje generowanych krzywych praktycznie pokrywają się. Wartość stężenia kwasu ferulowego, jaką możemy odczytać na podstawie przecięcia się krzywej typowej oraz krzywej uwzględniającej niepewność pomiaru, względem osi X wynosi około $14 \mu\text{M}/\text{dm}^3$. Wartość stężenia w próbce, obliczonego w przypadku krzywej typowej to $14,509 \pm 0,043 \mu\text{M}/\text{dm}^3$ oraz krzywej uwzględniającej niepewność obu osi to $14,641 \pm 0,042 \mu\text{M}/\text{dm}^3$.

5. Podsumowanie i wnioski

Nadrzędnym celem niniejszej pracy było wyznaczenie niepewności stężenia dla roztworu wzorca kwasu ferulowego oraz oznaczenie stężenia w próbce laboratoryjnej badanej metodą woltamperometryczną. Jak pokazano w pracy całkowita niepewność stężenia jest składową wielu czynników, generujących ostatecznie konkretną wartość niepewności. Aby kompleksowo zilustrować, jaki jest udział w całkowitej niepewności poszczególne niepewności, wykonano wykres pokazany na rysunku 5. Na schemacie wysokości dla każdego słupka odpowiadają iloczynowi wskaźnika wrażliwości (czyli pochodnej stężenia wykonanej dla konkretnej zmiennej) i niepewności standardowej w przypadku poszczególnych składowych.



Rys. 5 Wykres ilustrujący udział niepewności niezbędnych do oszacowania niepewności stężenia wzorca; 1-wpływ sporządzania roztworu w kolbie miarowej, 2-wpływ naważki kwasu ferulowego, 3-udział czystości kwasu ferulowego, 4-udział masy molowej.

Największy udział w całkowitej niepewności stężenia stanowił etap związany ze sporządzeniem roztworu wzorca w kolbie miarowej (wynosi on aż 86,9% całkowitej wartości niepewności dla stężenia wzorca). Nieco mniejszym, jednak równie znaczącym czynnikiem determinującym ogólną wartość niepewności złożonej jest etap naważenia wzorca, determinujący 12,5% całkowitej wartości niepewności stężenia. Zanedbywalny natomiast jest wpływ niepewności masy cząsteczkowej kwasu ferulowego.

Tak znaczący udział niepewności objętości może wynikać z faktu, że jej wartość jest składową odpowiednio niepewności kalibracji kolby, niepewności wynikającej z poprawki temperaturowej oraz niepewności związanej z powtarzalnością dopełniania kolby do kreski. Podczas każdorazowego dopełnienia kolby miarowej do kreski chcemy, aby objętość roztworu wypełniającego naczynie była taka sama. Na podstawie otrzymanych wyników widzimy jednak, że jest inaczej. Czynność dopełniania kolby miarowej do kreski wymaga umieszczenia kolby miarowej na poziomie oczu i wypełnieniu naczynia wodą tak, aby dolna część menisku znajdowała się na wysokości naniesionej na kolbę linii. Ponadto specyfikacja podawana przez producenta kolby miarowej używanej do sporządzenia roztworu w temperaturze 20°C to $\pm 0,025\text{ml}$ (podczas, gdy zmienność temperatury w laboratorium wynosiła od 24,6°C do 24,7°C). Błąd paralaksy jaki towarzyszy czynności dopełnienia kolby do kreski oraz zmiana temperatury otoczenia, a tym samym zmiana temperatury wody, jak i samej gęstości wody sprawiają, że ilość dozowanego płynu do naczynia nie będzie nigdy taka sama. Niepewność generowana podczas etapu naważenia również dość znacząco ingeruje w wartość złożonej niepewności stężenia roztworu wzorca. Jak można zauważyć udział tej niepewności jest o wiele mniejszy niż udział niepewności objętości. Może to być spowodowane faktem, że sam etap naważenia materiału wykonywano na elektronicznej wadze analitycznej, dla której wartość masy naważki generowana jest automatycznie (otrzymywany wynik obarczony jest jedynie minimalnym błędem urządzenia, którego wartość podawana jest przez producenta). Toteż powtarzalność odczytu masy jest znacznie większa od samej powtarzalności dopełniania kolby miarowej do kreski (czynności, która całkowicie uzależniona jest od zdolności manualnych laboranta). Ponadto wyznaczenia masy naważki kwasu ferulowego, służącej do obliczeń polegało na odjęciu masy naczynka wagowego zawierającego kwas ferulowy od masy pustego naczynka wagowego. Niepewność stanowią składowe: niepewność czułości wagi, rozdzielczość wagi oraz powtarzalność naważeń. Przedstawione źródła niepewności jednakowo oddziałują na niepewność masy pustego

naczynka wagowego, jak i naczynka wagowego z kwasem ferulowym. Zatem wynik odczytywany z urządzenia jest kombinacją wyliczonych wyżej czynników.

Dla otrzymanego stężenia molowego oraz wartości niepewności obliczono również niepewność względną. Na podstawie tego wyniku można powiedzieć, że udział niepewności stężenia dla całkowitej wartości stężenia molowego wynosi 3,77%. Rola niepewności stężenia jest stosunkowo duża zważywszy, że stężenie molowe sporządzanego roztworu było niewielkie. Tak znacząca wartość tego parametru może być spowodowana chociażby zbyt niską czystością wykorzystywanego wzorca oraz małą objętością sporządzanego roztworu. Ze względu na dość spory koszt samego wzorca, roztwór wykonano w kolbie o objętości 10 ml. Sporządzenie roztworu o tym samym stężeniu w naczyniu o większej objętości, zwiększyłoby ilość zużytego odczynnika, jednak mogłoby zmniejszyć udział niepewności objętości względem całkowitej wartości niepewności stężenia wzorca.

Na podstawie otrzymanych wyników można sądzić, że w przypadku krzywych kalibracyjnych utworzonych z sześciu punktów pomiarowych, zarówno krzywa typowa uwzględniająca niepewność prądu jak i krzywa uwzględniająca niepewność obu osi, idealnie pokrywają się. Liniowa zależność między dwoma zmiennymi charakteryzowana jest przez wartość współczynnika korelacji liniowej, który dla sześciu punktów wynosi $r=0,9999$ (rysunek 1, tabela 5.). Mniej idealną, ale dobrą zgodność obu typów krzywych, obserwuje się w przypadku krzywej kalibracyjnej utworzonej z pięciu punktów kalibracyjnych ($r=0,9998$). Na podstawie wygenerowanych krzywych oraz odczytanych z nich informacji liczbowych można wnioskować, że zmiana liczby punktów branych do utworzenia krzywej kalibracyjnej wpływa na wartość otrzymywanych wyników stężenia kwasu ferulowego w próbce, bez względu na to, czy będzie to krzywa typowa, czy uwzględniająca niepewność obu osi. Jeśli chodzi o pozostałe wygenerowane krzywe kalibracyjne odpowiednio dla czterech ($r=0,9980$) oraz trzech ($r=0,9975$) punktów pomiarowych, to brak jest ich idealnej zgodności oraz obserwuje się znaczną rozbieżność w odczytywanych wynikach.

Podsumowując tę część doświadczalną pracy można powiedzieć, że bezpośrednie wartości wyników otrzymane z przeprowadzonego pomiaru są zaledwie wskazaniem używanych przyrządów i determinują relacje poszczególnych zmiennych deterministycznych i losowych podczas prowadzonej analizy. Toteż ostateczny wynik wykonanego badania powinien być prezentowany wraz z jego niepewnością. Wynik bez uwzględnionej niepewności w rezultacie nie jest miarodajny. Niepewność powstająca dla danego pomiaru jest jedną z części wyniku badania konkretnego czynnika chemicznego i ukazuje w jakim zakresie (z określonym prawdopodobieństwem) może znajdować się "rzeczywista" wartość wyniku pomiaru. Można obliczyć budżet niepewności dla wykonanego pomiaru określonego parametru chemicznego, biorąc pod uwagę wszystkie zasadnicze składowe, które można zaprezentować jako wartości względnej niepewności standardowej, wyrażanej w procentach. W trakcie określania budżetu niepewności nie jest uwzględniana zmienność stężenia analitu w próbce w czasie. Wartość niepewności względnej mieszcząca się w przedziale od 0,1% do 10% jest wartością typową dla badań wykonywanych w laboratoriach analitycznych. Niepewność o wartości kilkudziesięciu procent budzi wątpliwości i zmusza do refleksji nad tym, czy pomiar może być wykonywany w sposób bardziej precyzyjny, wykorzystując w tym celu inne przyrządy pomiarowe lub inną metodykę. W przypadku uzyskania wartości niepewności mniejszych od setnej części procenta również powinno budzić w refleksję, gdyż takie wartości uzyskiwane są przez najlepsze laboratoria naukowe.

W dalszej części pracy podjęto próbę wyznaczenia wartości stężenia analitu (wzorca) znajdującego się w próbce tj. $12,5 \mu\text{M}/\text{dm}^3$. W tym celu w programie *MATLAB* wykreślono krzywe kalibracyjne na podstawie:

- wartości stężeń dodatków wzorca kwasu ferulowego dotowanego podczas pomiaru wykonanego przy użyciu woltamperometrii impulsowej różnicowej,
- wartości niepewności stężeń poszczególnych dodatków,
- wartości maksimum intensywności pików poszczególnych dodatków,

- o wartości niepewności dla poszczególnych intensywności (tabela 4).

W pierwszej kolejności sprawdzono jak liczba punktów pomiarowych na krzywej kalibracyjnej wpływa na wartość odczytywanego z nich stężenia kwasu ferulowego znajdującego się w próbce. Pomiar woltamperometryczny wykonano dla ośmiu dodatków (po cztery powtórzenia), jednak ze względu na brak liniowego przyrostu intensywności prądu dla ostatniego dodatku, krzywe utworzono dla sześciu, pięciu, czterech oraz trzech punktów pomiarowych. Głównym założeniem dla metody dodatku wzorca jest fakt, że sygnał analityczny liniowo wzrasta wraz ze wzrostem wartości stężeniu analitu. Wartość stężenia oznaczanego składnika odpowiada wartości punktu odczytanego dla miejsca przecięcia prostej z osią odciętych. Liczba punktów, jaką należy przyjąć w trakcie sporządzania krzywej kalibracyjnej metodą dodatku wzorca, to pięć. W przypadku sześciu oraz pięciu punktów obserwuje się praktycznie liniowe ułożenie punktów kalibracyjnych. Liniowa zależność pomiędzy dwoma zmiennymi badana jest przez wartość współczynnika korelacji liniowej. Podczas analizy chemicznej ważnym jest, aby wartość tego współczynnika była wyższa od 0,995. Dla krzywych zbudowanych z sześciu oraz pięciu punktów kalibracyjnych wartości współczynnika korelacji wynoszą odpowiednio 0,9998 oraz 0,9997, natomiast granice wykrywalności metody LOD są mniejsze niż $1 \mu\text{M}/\text{dm}^3$. Odczytane wartości stężenia wzorca odpowiednio dla sześciu punktów kalibracyjnych wynoszą:

- o w przypadku krzywej typowej, uwzględniającej wartość niepewności pomiaru prądu: $12,558 \pm 0,023 \mu\text{M}/\text{dm}^3$ [LOD= $0,5 \mu\text{M}/\text{dm}^3$],
- o w przypadku krzywej uwzględniającej wartość niepewności prądu jak i stężenia wzorca: $12,552 \pm 0,029 \mu\text{M}/\text{dm}^3$ [LOD= $0,6 \mu\text{M}/\text{dm}^3$].

Natomiast wartości stężeń wzorca odczytane dla pięciu punktów kalibracyjnych wynoszą:

- o w przypadku krzywej typowej, uwzględniającej wartość niepewności pomiaru prądu: $12,427 \pm 0,036 \mu\text{M}/\text{dm}^3$ [LOD= $0,7 \mu\text{M}/\text{dm}^3$],
- o w przypadku krzywej uwzględniającej wartość niepewności prądu jak i stężenia wzorca: $12,436 \pm 0,037 \mu\text{M}/\text{dm}^3$ [LOD= $0,8 \mu\text{M}/\text{dm}^3$].

W pracy sprawdzono również jak odjęcie tła oraz dopasowanie linii bazowej do woltamperogramu wpływa na postać krzywej kalibracyjnej utworzonej dla metody dodatku wzorca. Wykazano, że nie tylko liczba punktów na krzywej kalibracyjnej, lecz również sposób obróbki danych, które później służą wykreśleniu krzywych wpływa znacząco na ostateczną wartość stężenia kwasu ferulowego. Odjęcie tła znacznie zmienia wartość odczytywanego stężenia, zwiększając jednocześnie wartość granicy wykrywalności metody. Zabieg dopasowywania tła oraz dopasowywania linii bazowej nie jest więc korzystny podczas wykonywania krzywej kalibracyjnej metodą dodatku wzorca dla pomiaru prowadzonego przy użyciu woltamperometrii impulsowej różnicowej.

Literatura

- [1] J. Namieśnik, P. Konieczka, B. Zygmunt, Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych, Wydawnictwo WNT, Warszawa 2007.
- [2] P. Konieczka, J. Namieśnik, B. Zygmunt, E. Bulska, A. Świtaj-Zawadzka, A. Naganowska, E. Kremer, M. Rompa, Ocena i kontrola jakości wyników analitycznych, Wyd. Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego (CEEAM), Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk 2004.
- [3] D. Turzeniecka, Ocena i niepewność wyników pomiarów, Wydawnictwo Politechniki Poznańskiej, Poznań 1997.