

ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΥΔΡΑΡΓΥΡΟΥ ΣΕ ΙΧΘΥΗΡΑ ΚΑΙ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΑΥΤΩΝ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Σκοπός της μεθόδου αυτής είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός του Hg σε δείγματα ζωικής προέλευσης, όπως ψάρια, μαλάκια και διάφορα αλιεύματα, όπως επίσης και προϊόντα αυτών.

Η μέθοδος είναι κατάλληλη για τον σκοπό που προορίζεται.

2. ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο υδράργυρος (Hg) προσδιορίζεται ποσοτικά με την τεχνική της φασματομετρίας ατομικής απορρόφησης παραγωγής υδριδίων σε συνεχή ροή (FI-MHS-AAS). Η τεχνική βασίζεται στην καταγραφή της απορρόφησης ακτινοβολίας 253,7 nm των ατόμων Hg, τα οποία παράγονται στην αέρια φάση μετά από αναγωγή από διάλυμα NaBH₄. Η χώνευση των δειγμάτων πραγματοποιείται με επίδραση νιτρικού οξέος σε οβίδες υψηλής πίεσης υπό την επίδραση πεδίου μικροκυμάτων.

3. ΟΔΗΓΙΕΣ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ

Η χρήση αντιδραστηρίων όπως πυκνά οξέα (HNO₃) ή πρότυπα διαλύματα τοξικών μετάλλων (Hg) απαιτούν χειρισμό τους σε ειδικό απαγωγό. Η φόρμα εργαστηρίου και τα γάντια είναι απαραίτητα κατά το χειρισμό, την προετοιμασία και την ανάλυση των δειγμάτων. Οι εργαζόμενοι πρέπει να ακολουθούν τους γενικούς κανόνες ασφάλειας των χημικών εργαστηρίων.

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Αποσταγμένο νερό υψηλής καθαρότητας (MilliQ grade, Millipore).

Νιτρικό οξύ υψηλής καθαρότητας (supra pur HNO₃).

Διάλυμα παρακαταθήκης Hg 1000 mg L⁻¹ φασματοσκοπικής καθαρότητας (διάλυμα Α).

Είναι εμπορικά διαθέσιμο. Πρέπει να συνοδεύεται από πιστοποιητικό ανάλυσης, στο οποίο να αναγράφεται η ημερομηνία λήξης.

Διάλυμα εργασίας Hg 1000 µg L⁻¹ (διάλυμα Β). 100 µL διαλύματος Α μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Προστίθεται 1 mL π. HNO₃ υψηλής καθαρότητας, 1 mL π. H₂SO₄ υψηλής καθαρότητας, 20µl διαλύματος KMnO₄ 5% w/v και αραιώνεται μέχρι τη χαραγή με αποσταγμένο νερό. Το διάλυμα αυτό είναι σταθερό για ένα (1) μήνα και πρέπει να αναγράφεται η ημερομηνία παρασκευής και λήξης του.

Πρότυπα διαλύματα Hg 0.5, 2.50, 5.00, 7.50, 10.0, 15.0 και 20.0 µg L⁻¹. Τα πρότυπα παρασκευάζονται από το διάλυμα Β σε ογκομετρικές φιάλες των 50 mL. Σε κάθε διάλυμα προστίθενται 5 mL π. HNO₃ υψηλής καθαρότητας, 10 µl διαλύματος KMnO₄ 5% w/v και στη συνέχεια 25, 125, 250, 375, 500, 750 και 1000 µL του διαλύματος Β και αραιώνονται μέχρι τη χαραγή με αποσταγμένο νερό. Τα διαλύματα αυτά παρασκευάζονται αυθημερόν.

Διάλυμα αναγωγικού NaBH₄ 0.2% w/v σε 0.05% NaOH w/v. Ζυγίζονται 2.00 g NaBH₄, προστίθενται 1.7 ml δ. NaOH 30% w/v, και διαλύονται σε 1000 mL αποσταγμένο νερό. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για μια αναλυτική ημέρα.

Διάλυμα μεταφοράς (carrier solution) HCl 10% v/v. 100 mL π. HCl μεταφέρονται σε ογκομετρική των 1000 mL και αραιώνονται με αποσταγμένο νερό μέχρι τη χαραγή.

5. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

5.1. Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ανοξείδωτο αιχμηρό μαχαίρι.

Συσκευή ομογενοποίησης του δείγματος με ανοξείδωτες λεπίδες.

Ανοξείδωτη σπάτουλα για τη ζύγιση του δείγματος.

Ζυγός ακριβείας 5 δεκαδικών ψηφίων.

Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέττες των 100, 200, 1000 και 5000 μl και τα αντίστοιχα ρύγχι.

Ογκομετρικές φιάλες 1000 ml, 100ml και 50 ml.

Φιαλίδια πλαστικά 30 mL.

Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες αυτόματου δειγματολήπτη 10 και 50 ml.

Προσοχή: Όλα τα φιαλίδια και οι ογκομετρικές φιάλες που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν κατά την παρασκευή και τη μέτρηση πρότυπων διαλυμάτων και διαλυμάτων των χωνευμένων δειγμάτων φυλάγονται σε διάλυμα νιτρικού οξέος 20% (v/v). Εκπλένονται με αποσταγμένο νερό επιμελώς και τα μεν φιαλίδια του δειγματολήπτη και τα πλαστικά φιαλίδια αποθήκευσης του δείγματος ξηραίνονται στους 80°C, οι δε ογκομετρικές φιάλες χρησιμοποιούνται ως έχουν.

5.2. Αναλυτικά όργανα

Φασματόμετρο ατομικής απορρόφησης. Perkin–Elmer 4110ZL με συσκευή παραγωγή ατμών υδραργύρου με εισαγωγή δείγματος σε ροή FIAS-400. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με αυτόματο δειγματολήπτη της Perkin–Elmer, AS-90. Ως πηγή ακτινοβολίας χρησιμοποιείται λυχνία Hg άνευ ηλεκτροδίου της Perkin–Elmer (EDL, System 2). Οι οργανολογικές παράμετροι συνοψίζονται στον Πίνακα 1. Το πρόγραμμα του FIAS 400 παρουσιάζεται στον Πίνακα 2. Το όλο σύστημα ελέγχεται από H/Y κάτω από το πρόγραμμα της Perkin-Elmer AA WinLab Version 2.5. Το πρόγραμμα που «τρέχουμε» βρίσκεται τον υποκατάλογο “Programs – SE 4110” με το όνομα “AA WinLab Analyst”. Οι παράμετροι της μεθόδου βρίσκονται στο αρχείο “Hgnew”, το οποίο «φορτώνουμε» για την έναρξη της λειτουργίας του οργάνου.

Πίνακας 1. Οργανολογικές παράμετροι προσδιορισμού Hg σε ψάρια, μαλάκια και διάφορα αλιεύματα.

Μήκος Κύματος	253.7 nm
Σχισμή Μονοχρωμάτορα	0.7 nm
Λυχνία	Hg EDL, System 2
Ρεύμα λυχνίας	185 mA
Αυτόματος δειγματολήπτης	AS-90
Όγκος δείγματος	500 µL

Πίνακας 2. Πρόγραμμα FIAS 400 (εισαγωγής δείγματος σε ροή) για τον προσδιορισμό Hg.

Step #	Time (s)	Pump 1 speed	Pump 2 speed	Valve position	Read step
Prefill	20	100	120	Fill	
1	15	100	120	Fill	
2	30	0	120	Inject	x

Φούρνος μικροκυμάτων για χώνευση δειγμάτων. Χρησιμοποιείται το σύστημα της CEM Mars 5 με δοχεία χώνευσης από PFA, τύπου HP-500. Ο έλεγχος της πίεσης και της θερμοκρασίας γίνεται στο δοχείο ελέγχου με κατάλληλο αισθητήρα πίεσης και θερμοκρασίας. Χωνεύεται πάντοτε άρτιος αριθμός δειγμάτων και όχι πάνω από ~~πενή~~ δεκατέσσερα δείγματα τη φορά. Το πρόγραμμα χώνευσης που εφαρμόζεται για δείγματα ψαριών και μαλακίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Η μέθοδος χώνευσης που περιέχει τις παραμέτρους του Πίνακα 3, τον αριθμό των δειγμάτων που χωνεύονται και τις ποσότητες του δείγματος και του οξέος, βρίσκεται στο “User directory” κάτω από την ονομασία “FISH – HP500”.

Πίνακας 3. Πρόγραμμα χώνευσης δειγμάτων ψαριών σε φούρνο μικροκυμάτων CEM Mars 5 (με έλεγχο της θερμοκρασίας)

Στάδιο	Ισχύς (W)	Χρόνος ανόδου (min)	Πίεση ελέγχου (psi)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος παραμονής (min)
1	600 (100%)	25:00	190	200	10:00

6. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

6.1. Πορεία προετοιμασίας δείγματος

Αντιπροσωπευτικά τμήματα από όλα τα βρώσιμα σημεία της σάρκας του δείγματος τεμαχίζονται, αφαιρούνται τα ινώδη τμήματα και ο λιπώδης ιστός και ομογενοποιούνται στη συσκευή ομογενοποίησης. Περίπου 100 g του ομογενοποιημένου υλικού μεταφέρονται σε πλαστικό δοχείο (~~πετρί~~). Ποσότητα περίπου 0.5 g από το ομογενοποιημένο υλικό ζυγίζεται επακριβώς στα δοχεία χωνεύσεως HP-500. Το υπόλοιπο ομογενοποιημένο υλικό διατηρείται περίπου στους -25°C. Στο ζυγισθέν δείγμα προσθέτονται 10 mL π. HNO₃ υψηλής καθαρότητας και

το μίγμα αφήνεται για 30 min, ώστε να προχωρήσει η αντίδραση οξείδωσης και να εμφανιστούν οι πρώτοι ατμοί των οξειδίων του αζώτου. Στη συνέχεια τα δοχεία σφραγίζονται και τοποθετούνται στο φούρνο μικροκυμάτων σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εφαρμόζεται το πρόγραμμα που παρουσιάζεται στον Πίνακα 3. Μετά το πρόγραμμα χώνευσης, τα δείγματα αφήνονται να ψυχθούν και όταν η πίεση είναι μικρότερη των 50 psi και η θερμοκρασία μικρότερη των 40°C (σύμφωνα με τις ενδείξεις του αισθητήρα πίεσης και θερμοκρασίας του φούρνου μικροκυμάτων), τότε τα δοχεία χώνευσης ανοίγονται αργά και με πολύ προσοχή σε απαγωγό, απομακρύνονται οι ατμοί οξειδίων του αζώτου σε ρεύμα αζώτου και το περιεχόμενο τους μεταφέρεται σε ογκομετρικές φιάλες των 20 mL. Το κάθε δοχείο εκπλένεται με μικρές ποσότητες αποσταγμένου νερού, οι οποίες προσθέτονται στην ογκομετρική φιάλη. Συμπληρώνεται η κάθε φιάλη μέχρι τη χαραγή με αποσταγμένο νερό. Στη συνέχεια το περιεχόμενο των ογκομετρικών μεταφέρεται στα αντίστοιχα πλαστικά φιαλίδια των 30 mL, όπου φυλάσσονται μέχρι τον προσδιορισμό.

6.2 Πορεία προσδιορισμού

Πριν την έναρξη του προσδιορισμού ελέγχεται το τυφλό διάλυμα (Peak height μικρότερο από 0,0010) και η ευαισθησία με το πρότυπο των 5.0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Αν δεν υπάρξουν αποκλίσεις, πραγματοποιείται βαθμονόμηση.

Η καμπύλη βαθμονόμησης του Hg πραγματοποιείται με υδατικά πρότυπα διαλύματα 0.50-20.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (γραμμική περιοχή απόκρισης οργάνου). Αυτή κατασκευάζεται με τη βοήθεια του αυτόματου δειγματολήπτη, εφαρμόζοντας την αντίστοιχη επιλογή του λογισμικού AA WinLab και εφαρμόζεται το πρόγραμμα θερμοκρασίας του Πίνακα 2. Στη συνέχεια μετρείται, το δείγμα ελέγχου. Αν το δείγμα ελέγχου είναι στα προβλεπόμενα όρια, τότε συνεχίζουμε με την μέτρηση των δειγμάτων. Σε περίπτωση που κάποια δείγματα υπερβαίνουν τα 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ τότε τα δείγματα αυτά αραιώνονται κατάλληλα με αποσταγμένο νερό και στην συνέχεια μετρούνται.

7. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων γίνεται με βάση τον ακόλουθο τύπο:

$$[\text{Hg}] (\mu\text{g/g}) = C_{\text{Hg}} (\mu\text{g/L}) \times V_{\delta} (\text{L}) / m_{\delta} (\text{g})$$

όπου m_{δ} η μάζα του δείγματος, V_{δ} ο όγκος του χωνευμένου δείγματος (συνήθως 20 mL ή 0,02 L) και C_{Hg} η προσδιοριζόμενη συγκέντρωση Hg ($\mu\text{g/L}$) στο τελικό διάλυμα του χωνευμένου δείγματος. Το τελικό αποτέλεσμα δίνεται σε $\mu\text{g/g}$ ή mg/Kg (ppm).

Ο αριθμός των σημαντικών ψηφίων που εκφράζονται τα τελικά αποτελέσματα καθορίζονται από την διευρυμένη αβεβαιότητα της μεθόδου, όπως φαίνεται σε κάθε μέθοδο, πχ για τα βαρέα μέταλλα αν η περιεκτικότητα του υδραργύρου σε ένα δείγμα, που προκύπτει μετά από πράξεις είναι 0,37896..... mg/kg και η σχετική διευρυμένη αβεβαιότητα είναι 5,2 %, τότε η απόλυτη αβεβαιότητα του αποτελέσματος είναι 0,018 mg/kg , οπότε το τελικό αποτέλεσμα που θα δοθεί για το συγκεκριμένο δείγμα είναι 0,379 mg/kg .

8. ΑΠΟΒΟΛΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Τα χωνευμένα δείγματα, όπως και τα πρότυπα διαλύματα του Hg αποβάλλονται σε κενά δοχεία διαλυτών που χρησιμοποιούνται ως δοχεία αποβλήτων.

9. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Ο έλεγχος ποιότητας πραγματοποιείται με χρήση πρότυπων υλικών αναφοράς και δειγμάτων ελέγχου. Σε κάθε αναλυτική σειρά συμπεριλαμβάνεται ένα δείγμα ελέγχου, το οποίο χρησιμοποιείται για την κατασκευή των διαγραμμάτων ελέγχου. Πρότυπα υλικά αναφοράς χρησιμοποιούνται τουλάχιστον μια φορά το χρόνο ή όποτε κρίνει ο αναλυτής ότι είναι απαραίτητο (πχ σε διεργαστηριακές συγκρίσεις ή όποτε παρουσιαστεί κάποιο πρόβλημα στη μέθοδο, το οποίο θα πρέπει να διερευνηθεί). Όλες οι πληροφορίες σχετικά με τα πιστοποιημένα υλικά αναφοράς, το πότε χρησιμοποιούνται και για ποιο λόγο, φαίνονται στο έντυπο EN_16_01. Τα διαθέσιμα υλικά αναφοράς, τα οποία καλύπτουν μια ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων Hg, είναι:

- ▶ CRM 422 – Cod muscle ($0,559 \pm 0,016$ $\mu\text{g/g}$)
- ▶ CRM 278R – Mussel tissue ($0,196 \pm 0,009$ $\mu\text{g/g}$)
- ▶ DORM 2 – Dogfish muscle ($4,64 \pm 0,26$ $\mu\text{g/g}$)

Τα υλικά αναφοράς τα οποία χρησιμοποιούνται για τα βαρέα μέταλλα φυλάσσονται αν απαιτείται, είτε στο ψυγείο Γ, είτε στο παρασκευαστήριο των Βαρέων Μετάλλων σε επισημασμένο χώρο.

Το δείγμα ελέγχου είναι ομογενοποιημένος, σταθερός στο χρόνο εδώδιμος μυϊκός ιστός καρχαριοειδούς.

10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ▶ Perkin-Elmer Corp., Flow Injection Mercury/Hydride Analyses, Recommended Analytical Conditions and General Information, Release 4,0, 1994, Germany.
- ▶ B. Welz and B. Sperling “Atomic Absorption Spectrometry” 3rd edition, J. Wiley & Sons, Weinheim, 1999.
- ▶ S. Haswell “Atomic Absorption Spectrometry: Theory, Design and Applications”, Elsevier, Amsterdam, 1991.

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Καμπύλη Βαθμονόμησης Οργάνου- Γραμμικότητα

Όργανο: Φασματόμετρο Ατομικής Απορρόφησης, Perkin-Elmer 4110 ZL με σύστημα FIAS-400

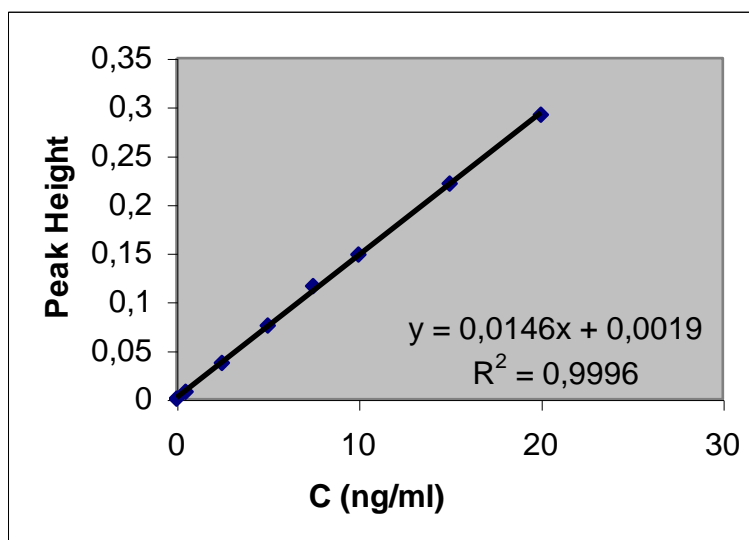
Αριθμός οργάνου: AAS-01

A/A προτύπου διαλύματος	Συγκέντρωση προτύπου ([Hg], µg/l)	Απόκριση Οργάνου (ύψος κορυφής, Ai)	Απόκριση/ ποσότητα
1	Blank	0,0007	-
2	0,50	0,0075	0,01500
3	2,50	0,0374	0,01496
4	5,00	0,0754	0,01508
5	7,50	0,1159	0,01545
6	10,0	0,1486	0,1486
7	15,0	0,2212	0,01475
8	20,0	0,2917	0,01458

Εξίσωση παλινδρόμησης καμπύλης βαθμονόμησης:

$$A_i = (0,01460 \pm 0,00012) \times C_i + 0,00186 \pm 0,00122$$

$$R = 0,99979 \cong 0,9998$$



Έλεγχος Διελύσεως Καμπύλης Βαθμονόμησης από Μηδέν:

$$t_{\text{πειρ}} = \text{τομή} / S_{\text{τομής}} = 0,00186 / 0,00122 = 1,524 < t_{\text{θεωρ}} = 2,447$$

[(v = 8-2), 95%]

Πιστότητα (precision)

Η πιστότητα υπολογίζεται με πειράματα επαναληψιμότητας και πειράματα ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας.

Επαναληψιμότητα

Πραγματοποιήθηκαν 6 επαναληπτικές αναλύσεις σε 6 επίπεδα συγκεντρώσεων.

A/A επανάληψης	1° δείγμα (ng/g)	2° δείγμα (ng/g)	3° δείγμα (ng/g)	4° δείγμα (ng/g)	5° δείγμα (ng/g)	6° δείγμα (ng/g)
1	120,3	245,1	454,5	668,7	919,6	1332
2	121,8	242,7	471,0	711,1	946,9	1255
3	114,8	241,3	467,0	753,0	901,7	1426
4	110,1	242,2	496,8	723,8	949,2	1355
5	119,6	241,4	480,6	720,7	955,8	1404
6	108,0	247,7	475,6	705,6	996,5	1389
Μέσος όρος	115,8	243,4	474,2	713,8	944,9	1360
Τυπική απόκλιση	5,7	2,5	14,2	27,5	32,6	61,6
Σχετική τυπική απόκλιση %	5.0	1.0	3.0	3,9	3,4	4,5

Οι επιτευχθείσες τιμές %RSD 1-5% είναι ικανοποιητικές για την περιοχή συγκεντρώσεων 100-1300 ng/g ή 0,1-1,3 ppm.

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

Πραγματοποιήθηκαν 6 επαναληπτικές αναλύσεις σε 2 επίπεδα συγκεντρώσεων, τρεις φορές με διαφορετικούς αναλυτές και διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων.

Αναλυτής 1		
A/A επανάληψης	1 ^ο δείγμα (ng/g)	2 ^ο δείγμα (ng/g)
1	495,6	1013,5
2	512,0	1015,6
3	511,6	1008,9
4	527,2	1019,9
5	509,3	1014,6
6	523,7	1020,2
Αναλυτής 2		
A/A επανάληψης	1 ^ο δείγμα (ng/g)	2 ^ο δείγμα (ng/g)
1	500,9	997,5
2	502,9	1027,8
3	507,4	987,8
4	513	886,1
5	501,9	967,2
6	509,6	1008,3
Αναλυτής 3		
A/A επανάληψης	1 ^ο δείγμα (ng/g)	2 ^ο δείγμα (ng/g)
1	478,3	994,4
2	514,8	1012,2
3	511,0	1027,2
4	508,3	1022,5
5	517,1	1022,0
6	522,7	1028,1
Μεγάλη μέση τιμή	509,3	1004,1
Τυπική Απόκλιση	11,2	33,4
%RSD	2,2	3,3

Οι επιτευχθείσες τιμές %RSD ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας 2,2 και 3,3% είναι ικανοποιητικές για την περιοχή συγκεντρώσεων 500-1000 ng/g ή 0,5-1 ppm.

Ορθότητα

Η ορθότητα εξακριβώθηκε μέσω πιστοποιημένου υλικού αναφοράς (CRM) και πειραμάτων ανάκτησης.

Υλικό αναφοράς

Αναλύθηκαν 6 υποδείγματα του υλικού αναφοράς σύμφωνα με τις οδηγίες δοκιμής για την μέθοδο:

CRM 278R (196±9 ng/g)	
A/A	Αποτέλεσμα
1	218
2	119 (απορρίφθηκε)
3	144
4	217
5	211
6	222
Μέσος όρος:	202
Τυπική απόκλιση:	33
Σχετική τυπική απόκλιση (%):	16

Έλεγχος στατιστικά σημαντικής διαφοράς:

$$t_{\text{πειρ}} = \frac{|\mu - \bar{x}| \sqrt{N}}{s} = \frac{|196 - 202| \sqrt{5}}{33} = 0,406 < t_{\text{θεωρ}} = 2,776 \quad (v = 5-1, 95\%),$$

δεν υπάρχει σημαντική διαφορά.

Σφάλμα: $[(202-196)/196] \times 100 = 3,1\%$

Η ορθότητα της μεθόδου είναι αποδεκτή.

Έλεγχος Ορθότητας με Πειράματα Ανακτήσεως

Οι ανακτήσεις προσδιορίστηκαν με 6 εμβολιασμούς σε 6 διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων, σε δείγμα γνωστής συγκέντρωσης υδραργύρου (8,12 ng/g).

1 ^ο δείγμα			2 ^ο δείγμα		
Προστέθηκαν (ng)	Βρέθηκαν (ng)	% Ανάκτηση	Προστέθηκαν (ng)	Βρέθηκαν (ng)	% Ανάκτηση
50	51,5	103	125	121,0	96,8
50	51,6	103	125	120,6	96,5
50	51,0	102	125	121,0	96,8
50	53,9	108	125	120,4	96,3
50	50,4	100,8	125	120,5	96,4
50	51,0	102	125	120,3	96,2
	% μέση ανάκτηση	103		% μέση ανάκτηση	96,5

3 ^ο δείγμα			4 ^ο δείγμα		
Προστέθηκαν (ng)	Βρέθηκαν (ng)	% Ανάκτηση	Προστέθηκαν (ng)	Βρέθηκαν (ng)	% Ανάκτηση
250	240,6	96,2	375	362,8	96,7
250	240,8	96,3	375	361,07	96,3
250	246,5	98,6	375	360,7	96,2
250	242,2	96,9	375	362,8	96,7
250	243,7	97,5	375	357,9	95,4
250	244,4	97,8	375	357,2	95,3
	% μέση ανάκτηση	97,2		% μέση ανάκτηση	96,1

5 ^ο δείγμα			6 ^ο δείγμα		
Προστέθηκαν (ng)	Βρέθηκαν (ng)	% Ανάκτηση	Προστέθηκαν (ng)	Βρέθηκαν (ng)	% Ανάκτηση
500	478,81	95,8	750	685,9	91,5
500	478,4	95,7	750	678,1	90,4
500	471,4	94,3	750	690	92,0
500	481,05	96,2	750	710,2	94,7
500	473,9	94,8	750	689,3	91,9
500	475,8	95,2	750	695,2	92,7
	% μέση ανάκτηση	95,3		% μέση ανάκτηση	92,2

Οι ευρεθείσες ανακτήσεις 92,2-103% είναι ικανοποιητικές για τα επίπεδα των 50 – 700 ng.

Όριο ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε με 10 επαναληπτικές αναλύσεις δείγματος που περιείχε πολύ μικρή ποσότητα αναλύτη (1,75 ng/g). Το όριο ανίχνευσης ορίζεται ως 3 φορές η τυπική απόκλιση της συγκέντρωσης του δείγματος($LOD= 3 \times SD$).

A/A	Συγκέντρωση δείγματος (ng/g)
1	2,48
2	1,58
3	1,48
4	2,08
5	1,33
6	1,92
7	1,42
8	1,71
9	2,17
10	1,32
Μέσος όρος (ng/g)	1,75
Τυπική απόκλιση	0,397
Όριο ανίχνευσης (ng/g)	1,19

Το όριο ανίχνευσης 1,2 ng/g και το όριο ποσοτικοποίησης (10 x SD) 4 ng/g είναι ικανοποιητικά και καθιστούν τη μέθοδο κατάλληλη για τον σκοπό που αναπτύχθηκε.

12. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΔΙΕΥΡΥΜΕΝΗΣ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΜΑ_06

A. Υπολογισμός σχετικής τυπικής αβεβαιότητας τύπου A.

Υπολογίζεται από τα στοιχεία επικύρωσης της μεθόδου (ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, από την χρήση πιστοποιημένων υλικών αναφοράς και τέλος από τα πειράματα ανακτήσεων) στα μέγιστα επιτρεπόμενα όρια για τον υδράργυρο στα ιχθυηρά, που είναι για ορισμένα είδη τα 500 ng/g και για κάποια άλλα τα 1000 ng/g.

A1. Από τα πειράματα της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας λαμβάνονται τα εξής αποτελέσματα:

- Για περιεκτικότητα 509 ng/g, η σχετική τυπική αβεβαιότητα είναι:
 $11/509=0,0216$.
- Για περιεκτικότητα 1004 ng/g, η σχετική τυπική αβεβαιότητα είναι:
 $33/1004=0,0329$.

Αυτή χρησιμοποιείται ως έχει στον υπολογισμό της σχετικής τυπικής αβεβαιότητας τύπου A.

A2. Αβεβαιότητα από πειράματα ανακτήσεων.

Από τα πειράματα ανακτήσεων η αβεβαιότητα υπολογίζεται ως εξής:

- στα 500ng/g : $u_{\text{bias}} = \frac{Sr}{\sqrt{n}} = \frac{0,00928}{\sqrt{6}} = 0,00379$
- στα 1000 ng/g: $u_{\text{bias}} = 0,00287$

Οπότε η σχετική τυπική αβεβαιότητα τύπου A είναι:

- 500 ng/g: $RU_A = \sqrt{0,0216^2 + 0,00379^2} = 0,0219$
- 1000 ng/g: $RU_A = \sqrt{0,0329^2 + 0,00287^2} = 0,0330$

B. Υπολογισμός σχετικής τυπικής αβεβαιότητας τύπου B

B1. Υπολογισμός αβεβαιότητας σε μετρήσεις μάζας.

Από το πιστοποιητικό διακρίβωσης ζυγού η αβεβαιότητα στα 500,0 mg είναι:

$$U_{0,500g} = 0,0001 + 0,0000196 \cdot 0,500 = 0,0001098g,$$

Οπότε $u_m = \frac{0,0001098}{\sqrt{3}} = 0,0000633$ g και επειδή πραγματοποιούνται δύο ζυγίσεις, μια

με το απόβαρο και μια με το δείγμα, θα είναι $um = \sqrt{2 \times 0,0000633^2} = 0,000894g$.

Οπότε η σχετική τυπική αβεβαιότητα στα 500,0 mg είναι: $0,000894/0,500 = 0,00179$.

B2. Αβεβαιότητα των ογκομετρικών φιαλών.

Η αβεβαιότητα των ογκομετρικών φιαλών υπολογίζεται συνδιάζοντας την αβεβαιότητα από την ανοχή που δίνει ο κατασκευαστής στο πιστοποιητικό διακρίβωσης, την αβεβαιότητα από την διακύμανση κατά το γέμισμα μέχρι την χαραγή και τέλος την αβεβαιότητα που προέρχεται από την επίδραση της θερμικής διαστολής.

Η αβεβαιότητα σε ογκομετρική φιάλη τύπου A των 20 ml (με πιστοποιημένο όγκο στους 20°C, $V_{20}=19,958$ ml) υπολογίζεται ως εξής:

- Αβεβαιότητα στον διακριβωμένο όγκο: Ο κατασκευαστής ορίζει στο πιστοποιητικό ότι η απόκλιση είναι $\pm 0,04$ ml. Οπότε η αβεβαιότητα είναι:

$$u_1(V) = \frac{0,04}{\sqrt{3}} = 0,023 \text{ ml}$$

- Αβεβαιότητα από επαναληψιμότητα: κατά την εκτέλεση 10 κύκλων γέμισμα-ζύγιση, η τυπική απόκλιση του όγκου βρέθηκε $u_2(V)=0,0862$ ml.
- Η θερμοκρασία του εργαστηρίου είναι 23° C. Η μεταβολή του ονομαστικού όγκου των 20 ml λόγω της θερμικής διαστολής είναι: $\Delta V = V_{20} \times \alpha_w \times \Delta T$. Ο συντελεστής θερμικής διαστολής του νερού είναι, $\alpha_w = 1,806 \cdot 10^{-4}$, η διαφορά θερμοκρασίας είναι $\Delta T = 3^\circ\text{C}$ και ο πιστοποιημένος όγκος στους 20°C είναι $V_{20} = 19,958$ ml. Οπότε

$$u_3 = \frac{19,958 \times 1,806 \times 10^{-4} \times 3}{\sqrt{3}} = 0,00624 \text{ ml}$$

Οπότε η συνολική τυπική αβεβαιότητα στον όγκο των 20 ml είναι:

$$U(V) = \sqrt{u_1(V)^2 + u_2(V)^2 + u_3(V)^2} = 0,0894 \text{ ml}$$

Η αβεβαιότητα σε ογκομετρική φιάλη τύπου A των 50 ml (με πιστοποιημένο όγκο στους 20°C, $V_{20}=49,990$ ml) υπολογίζεται ως εξής:

- Αβεβαιότητα στον διακριβωμένο όγκο: Ο κατασκευαστής ορίζει στο πιστοποιητικό ότι η απόκλιση είναι $\pm 0,06$ ml. Οπότε η αβεβαιότητα είναι:

$$u_1(V) = \frac{0,06}{\sqrt{3}} = 0,035 \text{ ml}$$

- Αβεβαιότητα από επαναληψιμότητα: κατά την εκτέλεση 10 κύκλων γέμισμα-ζύγιση, η τυπική απόκλιση του όγκου βρέθηκε $u_2(V)=0,0862$ ml.
- Η θερμοκρασία του εργαστηρίου είναι 23° C. Η μεταβολή του ονομαστικού όγκου των 50 ml λόγω της θερμικής διαστολής είναι: $\Delta V = V_{20} \times \alpha_w \times \Delta T$. Ο συντελεστής θερμικής διαστολής του νερού είναι, $\alpha_w = 1,806 \cdot 10^{-4}$, η διαφορά θερμοκρασίας είναι $\Delta T = 3^\circ\text{C}$ και ο πιστοποιημένος όγκος στους 20°C είναι $V_{20} = 49,990$ ml. Οπότε

$$u_3 = \frac{49,990 \times 1,806 \times 10^{-4} \times 3}{\sqrt{3}} = 0,016 \text{ ml}$$

Οπότε η συνολική τυπική αβεβαιότητα στον όγκο των 50 ml είναι:

$$U(V) = \sqrt{u_1(V)^2 + u_2(V)^2 + u_3(V)^2} = 0,0944 \text{ ml}$$

Η αβεβαιότητα σε ογκομετρική φιάλη τύπου A των 100 ml (με πιστοποιημένο όγκο στους 20°C, $V_{20}=99,978$ ml) υπολογίζεται ως εξής:

- Αβεβαιότητα στον διακριβωμένο όγκο: Ο κατασκευαστής ορίζει στο πιστοποιητικό ότι η απόκλιση είναι $\pm 0,100\text{ml}$. Οπότε η αβεβαιότητα είναι:

$$u_1(V) = \frac{0,100}{\sqrt{3}} = 0,058 \text{ ml}$$
- Αβεβαιότητα από επαναληψιμότητα: κατά την εκτέλεση 10 κύκλων γέμισης-ζύγισης, η τυπική απόκλιση του όγκου βρέθηκε $u_2(V) = 0,08248 \text{ ml}$.
- Η θερμοκρασία του εργαστηρίου είναι 23°C . Η μεταβολή του ονομαστικού όγκου των 100 ml λόγω της θερμικής διαστολής είναι: $\Delta V = V_{20} \times \alpha_w \times \Delta T$. Ο συντελεστής θερμικής διαστολής του νερού είναι, $\alpha_w = 1,806 \cdot 10^{-4}$, η διαφορά θερμοκρασίας είναι $\Delta T = 3^\circ \text{C}$ και ο πιστοποιημένος όγκος στους 20°C είναι $V_{20} = 99,978 \text{ ml}$. Οπότε

$$U_3 = \frac{99,978 \times 1,806 \times 10^{-4} \times 3}{\sqrt{3}} = 0,0313 \text{ ml}$$

Οπότε η συνολική τυπική αβεβαιότητα στον όγκο των 100 ml είναι:

$$U(V) = \sqrt{u_1(V)^2 + u_2(V)^2 + u_3(V)^2} = 0,106 \text{ ml}$$

Οπότε η σχετική τυπική αβεβαιότητα στα 20 ml : $\frac{0,0894}{20} = 0,00447$

Η σχετική τυπική αβεβαιότητα στα 50 ml : $\frac{0,0944}{50} = 0,00189$

Η σχετική τυπική αβεβαιότητα στα 100 ml : $\frac{0,106}{100} = 0,00106$.

B3. Αβεβαιότητα των διαλυμάτων εργασίας

- Το πρότυπο διάλυμα εργασίας που χρησιμοποιείται είναι συγκέντρωσης $1000 \pm 3 \text{ mg/l}$

$$\text{Οπότε } u_{\text{stock}} = \frac{3}{\sqrt{3}} = 1,732 \text{ ml}$$

- Η αβεβαιότητα της πιπέτας στα $0,100 \text{ ml}$ μόνο από πειράματα επαναληψιμότητας βρέθηκε $u_{\text{pip}} = 0,244 \text{ ml}$.
- Η αβεβαιότητα της ογκομετρικής φιάλης των 100 ml βρέθηκε από το B2 ότι είναι $U_v = 0,106 \text{ ml}$.

Οπότε η σχετική τυπική αβεβαιότητα για το διάλυμα εργασίας των 1000 ng/ml είναι:

$$\sqrt{\left(\frac{1,732}{1000}\right)^2 + \left(\frac{0,244}{100}\right)^2 + \left(\frac{0,106}{100}\right)^2} = 0,00242$$

Με παρόμοιο τρόπο υπολογίζεται η αβεβαιότητα των διαλυμάτων $0,5$ - $2,5$ - $5,0$ - $7,5$ - $10,0$ - $15,0$ - $20,0 \text{ ng/ml}$, χρησιμοποιώντας την σχετική τυπική αβεβαιότητα του προτύπου των 1000 ng/ml που βρέθηκε $0,00242$, την σχετική τυπική αβεβαιότητα της ογκομετρικής φιάλης των 50 ml που έχει υπολογιστεί παραπάνω και είναι $0,00189$ και τις σχετικές τυπικές αβεβαιότητες των πιπετών στους όγκους των $0,025$ - $0,125$ - $0,250$ - $0,375$ - 500 - 750 - $1,000 \text{ ml}$ που βρέθηκαν από πειράματα επαναληψιμότητας και είναι αντίστοιχα: $0,00342$ - $0,00206$ - $0,00091$ - $0,0015$ - $0,00061$ - $0,000496$ - $0,000747$.

Οπότε η σχετική τυπική αβεβαιότητα των διαλυμάτων εργασίας είναι:

Std 1 ($0,5 \text{ ng/ml}$): $0,00457$

Std 2 ($2,5 \text{ ng/ml}$): $0,00361$

Std 3 ($5,0 \text{ ng/ml}$): $0,00318$

Std 4(7,5 ng/ml):0,00339

Std 5 (10,0ng/ml):0,00310

Std 6 (15,0 ng/ml):0,00310

Std 7 (20,0 ng/ml):0,00313

Επομένως η σχετική τυπική αβεβαιότητα τύπου B (RU_B) είναι:

$$RU_B = \sqrt{RU_m^2 + RU_{std1}^2 + RU_{std2}^2 + RU_{std3}^2 + RU_{std4}^2 + RU_{std5}^2 + RU_{std6}^2 + RU_{std7}^2} \\ = 0,00937$$

Γ. Υπολογισμός συνδιασμένης τυπικής αβεβαιότητας.

Η σχετική συνδιασμένη τυπική αβεβαιότητα είναι:

$$RU_c = \sqrt{RU_A^2 + RU_B^2}$$

➤ Για συγκέντρωση 500ng/g(MRL₁): $RU_c = \sqrt{0,0219^2 + 0,00937^2} = 0,0238$

➤ Για συγκέντρωση 1000ng/g(MRL₂): $RU_c = \sqrt{0,0330^2 + 0,00937^2} = 0,0343$

Δ. Υπολογισμός διευρυμένης τυπικής αβεβαιότητας

Για επίπεδο εμπιστοσύνης περίπου 95% η διευρυμένη αβεβαιότητα υπολογίζεται ως εξής: $RU = 2 \times RU_c$

➤ Για συγκέντρωση **500ng/g(MRL₁)**: $RU = 2 \times RU_c = 0,0476$ ή **4,8%**

➤ Για συγκέντρωση **1000ng/g(MRL₂)**: $RU = 2 \times RU_c = 0,0686$ ή **6,9%**

Παρατήρηση: Η αβεβαιότητα της καμπύλης βαθμονόμησης δεν συμπεριελήφθηκε στον υπολογισμό της αβεβαιότητας γιατί η διακύμανση της απορρόφησης μεταξύ ημερών και στην ίδια μέρα συμπεριελήφθηκε στον υπολογισμό της αβεβαιότητας από την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα.