



Na łamach poprzedniego numeru „Problemów Kryminalistyki” [1] zostały opisane metody oznaczania pierwiastków techniką ICP-OES ze szczególnym uwzględnieniem korekcji efektów matrycowych. We wcześniejszych publikacjach omówiono podstawy metody oraz badania wstępne [2, 3, 4]. W niniejszym opracowaniu autorzy przedstawiają zadania związane z walidacją przedstawianej wcześniej metody takimi jak: dokładność i precyzja metody, granica wykrywalności, granica oznaczalności, zakres prostoliniowy i roboczy krzywych kalibracyjnych, selektywność metody, szacowanie niepewności metody.

Dla przypomnienia należy dodać, że w badaniach wykorzystywany jest spektrometr ICP-OES Optima 3100XL firmy Perkin Elmer. Na podstawie przeprowadzonych dotychczas badań dalsze prace prowadzone będą w warunkach odpornych (ang. *robust*) pracy spektrometru, których parametry zamieszczono w tabeli 1.

Próbki ziela konopi przygotowywane są do badań na drodze mineralizacji na mokro z wykorzystaniem energii mikrofalowej w układzie zamkniętym za pomocą systemu Multiwave firmy Anton Paar (Perkin Elmer) z użyciem mieszaniny kwasu azotowego i wody utlenionej.

Walidacja metody

Każda nowo opracowana metoda analityczna powinna być poddana walidacji. Celem walidacji jest wyznaczenie i dokumentacja parametrów charakteryzujących daną metodę

analityczną. Należą do nich: dokładność, precyzja, selektywność, specyficzność, zakres prostoliniowości krzywych kalibracji oraz zakres roboczy, granica wykrywalności i oznaczalności. Należy podkreślić, że nie jest niezbędne wyznaczanie wszyst-

kich wymienionych parametrów. Na początku konieczne jest zastanowienie się, które parametry najlepiej opisują metodę. Oczywiście jest, że np. przy walidacji metody oznaczania wapnia w próbkach roślinnych metodą ICP-OES nie jest potrzebne wy-

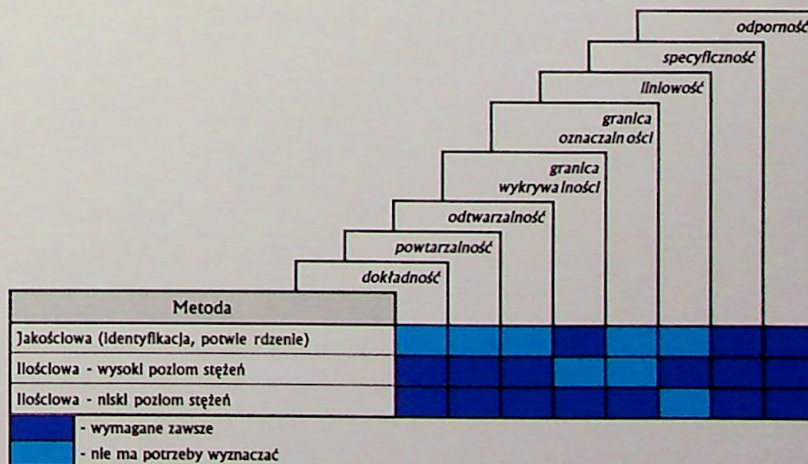
znaczanie granicy wykrywalności, gdyż zawartość tego pierwiastka w roślinach wynosi kilka procent w przeliczeniu na masę próbki. Ważne będzie wyznaczenie zakresu prostoliniowości krzywych kalibracji. Należy zatem zaplanować proces walidacji tak, by jak najmniejsza liczba wyznaczonych parametrów całkowicie charakteryzowała stworzoną

Warunki operacyjne pracy spektrometru

Spectrometer set-up parameters

Parametr	Warunki odporne
Przepływ gazu plazmowego [l/min]	15
Przepływ gazu pomocniczego [l/min]	0,5
Przepływ gazu przez rozpylacz [l/min]	0,5
Moc plazmy [W]	1450
Wysokość obserwacji plazmy [mm]	15
Przepływ próbki [ml/min]*	1,5
Czas opóźnienia [s]	60

* W metodzie wzorca wewnętrznego przepływ próbki wynosi 0,65 ml/min, a czas opóźnienia 90 s



Ryc. 1. Elementy walidacji wymagane przy określonych metodach analitycznych [5]
Fig. 1. Elements of validation required in certain analytical methods [5]

metodę. Parametry niezbędne do wyznaczenia w procesie walidacji metody jakościowej i ilościowej zamieszczono na rycinie 1.

Istnieje wiele dokumentów, publikacji i przewodników dotyczących walidacji i szacowania niepewności metod analitycznych, a najbardziej znaczące zostały opublikowane przez AOAC International, International Conference and Harmonization (ICH) i Eurachem [6, 7, 8, 9, 10, 11]. Ze względu na znaczną ilość publikacji związanych z zagadnieniem walidacji, jej parametry zostaną opisane w skrócie.

Dokładność

Celem pracy każdego analityka jest oznaczenie prawdziwego stężenia substancji. W rzeczywistości jednak możliwe jest tylko pewne przybliżenie tej wartości. Metodę analityczną uznaje się za dokładną, gdy wartość mierzona jest równa wartości prawdziwej. Istnieje wiele sposobów na sprawdzenie dokładności metody.

Najpowszechniej stosowaną jest analiza materiałów referencyjnych. Są to próbki o znanym stężeniu składników w niej zawartych. Ich analiza pozwala na określenie, jaki jest rozrzut wyników między wartościami certyfikowanymi a wyznaczonymi doświadczalnie. Jedynym mankamentem jest fakt, że dla wielu próbek nie są dostępne materiały referencyjne, np. próbki konopi z certyfikowanymi zawartościami pierwiastków. Dokładność zwykle wyraża się jako procentowy odzysk ($\%R_c$):

$$\%R_c = \frac{X_{exp} * 100}{X_{cert}} \quad (1),$$

gdzie:

X_{exp} – wartość wyznaczona doświadczalnie,

X_{cert} – wartość certyfikowana.

Wartość $\%R_c$ równa 100% świadczy o idealnej zgodności wyniku do-

świadczonego z wartością referencyjną.

Analiza kilku materiałów certyfikowanych o różnej zawartości składnika oznaczanego pozwala na oszacowanie dokładności metody na różnym poziomie stężeń. Realizuje się to poprzez wykreślenie zależności wartości certyfikowanej od wyznaczonej doświadczalnie. Otrzymany wykres powinien przedstawiać linię prostą. Idealną dokładność metody w całym badanym zakresie stężeń uzyskuje się przy współczynniku korelacji równym 1.

Innym sposobem wyznaczania dokładności jest porównanie wartości wyznaczonych nową opracowaną metodą analityczną i metodą sprawdzoną, która jest dokładniejsza, przez porównanie między sobą wyników.

Jak już zostało podkreślone w niniejszym artykule, na rynku nie są dostępne próbki konopi z certyfikowanymi zawartościami pierwiastków. Dlatego też do określenia dokładności metody wybrano cztery roślinne materiały certyfikowane. Ze

Tabela 2

Dokładność metody przedstawiona na podstawie wyników analizy materiałów certyfikowanych
Method accuracy presented on the basis of results of certified material analysis

Zawartość pierwiastka	INCT TL1		INCT MPH2		CTA VTL2		CTA OTL1	
	Certyfikat	Wartość otrzymana	Certyfikat	Wartość otrzymana	Certyfikat	Wartość otrzymana	Certyfikat	Wartość otrzymana
B [$\mu\text{g/g}$]	26*	29						
Ba [$\mu\text{g/g}$]	43,2 $\pm$ 3,9	42,7 $\pm$ 1,5	32,5 $\pm$ 2,5	31,8 $\pm$ 0,8	42,7 $\pm$ 6,6	38,3 $\pm$ 1,6	84,2 $\pm$ 11,5	80,9 $\pm$ 0,8
Ca [%]	0,582 $\pm$ 0,052	0,578 $\pm$ 0,034	1,08 $\pm$ 0,07	1,08 $\pm$ 0,04	3,60 $\pm$ 0,15	3,58 $\pm$ 0,15	3,17 $\pm$ 0,12	3,25 $\pm$ 0,05
Cu [$\mu\text{g/g}$]	20,4 $\pm$ 1,5	21,1 $\pm$ 0,9	7,77 $\pm$ 0,53	7,70 $\pm$ 0,35	18,2 $\pm$ 0,9	17,2 $\pm$ 0,7	14,1 $\pm$ 0,5	13,8 $\pm$ 0,2
Fe [$\mu\text{g/g}$]	432*	448 $\pm$ 15	460*	459 $\pm$ 19	1083 $\pm$ 33	1075 $\pm$ 51	989*	1004 $\pm$ 24
Mg [%]	0,224 $\pm$ 0,017	0,220 $\pm$ 0,009	0,292 $\pm$ 0,018	0,296 $\pm$ 0,010	0,510 $\pm$ 0,023	0,519 $\pm$ 0,014	0,447 $\pm$ 0,021	0,439 $\pm$ 0,064
Mn [$\mu\text{g/g}$]	1570 $\pm$ 110	1559 $\pm$ 54	191 $\pm$ 12	195 $\pm$ 3	79,7 $\pm$ 2,6	78,1 $\pm$ 2,5	412 $\pm$ 14	398 $\pm$ 7
Sr [$\mu\text{g/g}$]	20,8 $\pm$ 1,7	22,0 $\pm$ 1,2	37,6 $\pm$ 1,1	38,2 $\pm$ 1,1	110 $\pm$ 12	119 $\pm$ 5	201 $\pm$ 20	184 $\pm$ 4
Zn [$\mu\text{g/g}$]	34,7 $\pm$ 2,7	32,2 $\pm$ 1,4	33,5 $\pm$ 2,1	32,7 $\pm$ 1,4	43,3 $\pm$ 2,1	42,1 $\pm$ 1,9	49,9 $\pm$ 2,4	47,8 $\pm$ 0,8

* Wartość informacyjna

względnie na podobną matrycę próbek założono, że próbki te będą dobrze odzwierciedlać dokładność opracowywanej metody.

Dokładność metody wyznaczono na podstawie wyników analiz materiałów certyfikowanych w warunkach odtwarzalnych. Wyniki przedstawione w tabeli 2 to średnie z ośmiu pomiarów jednej próbki.

Metodę należy uznać za dokładną, gdyż wyniki analiz czterech materiałów certyfikowanych nie różnią się istotnie od wartości referencyjnych. Należy zwrócić uwagę, że zawartości (stężenia) pierwiastków w poszczególnych materiałach zmieniają się w szerokim zakresie, np. dla wapnia jest to zakres od 0,582% do 3,60%, dla strontu – od 20,8 mg/g do 201 mg/g. Metoda opracowana w szerokim zakresie stężeń każdego oznaczanego pierwiastka.

Precyzja

Na precyzję metody składają się dwa elementy: powtarzalność i odtwarzalność wyników pomiarów.

Powtarzalność – S_R – jest to precyzja metody wyznaczona w powtarzalnych warunkach. Obejmuje ona tę samą procedurę pomiaru, tego samego analytika, ten sam sprzęt pomiarowy o takich samych warunkach

operacyjnych, to samo laboratorium oraz powtarzanie badań w krótkim odstępie czasu.

Odtwarzalność – S_r – można oszacować w jednym laboratorium lub poprzez badania międzylaboratoryjne. Jest to precyzja oznaczeń danego składnika w zmiennych warunkach. Można zmieniać następujące warunki: metodę pomiarową, zasadę pomiaru, analytika, aparat, odczynniki, laboratorium i czas pomiaru.

Precyzję metody zwykle wyraża się przez odchylenie standardowe (**SD**) lub względne procentowe odchylenie standardowe (**%RSD**), nazywane coraz częściej współczynnikiem zmienności (ang. *coefficient of variation*) o skrócie **CV**. Wzory pozwalające wyznaczyć **SD** i **CV** wyglądają następująco:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2)$$

$$CV = \frac{SD \cdot 100}{\bar{x}} \quad (3)$$

gdzie:

x_i – wynik analityczny,

$\bar{x}$ – średnia z wyników analitycznych,

n – liczba wyników analitycznych.

Na powtarzalność metody składa się wiele elementów. Można wyznaczać np.:

- powtarzalność aparatu – odczytu wyników podczas analizy pojedynczej próbki,
- powtarzalność obejmującą precyzję mineralizacji próbki oraz aparatu podczas jej analizy,
- powtarzalność całej metody od pobrania próbki poprzez homogenizację, mineralizację do analizy.

Precyzja analizy w nowoczesnych aparatach analitycznych jest bardzo duża i zwykle nie ma znaczącego udziału w powtarzalności całej metody. Powtarzalność analizy metodą ICP-OES, którą zamieszczono w tabeli 3, określono na podstawie 8 powtórzeń analizy próbki CTA VTL2 (materiał certyfikowany – liście tytoniu z Wirginii). Powtarzalność wyrażono za pomocą współczynnika zmienności (**CV**).

Powtarzalność analizy dla większości pierwiastków, wyrażona jako CV, jest mniejsza od 1%. Tylko dla manganu i strontu wartości CV są większe i wynoszą odpowiednio 1,1% i 3,8%. Następnie wyznaczono CV na podstawie wyników analizy próbek materiału certyfikowanego CTA VTL2 przygotowanego w powtarzalnych warunkach. Wyniki przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 3

Powtarzalność analizy wykonywanej metodą ICP-OES
Repeatability of analysis performed by ICP-OES

Pierwiastek	Średnia zawartość	SD	CV
B [$\mu\text{g/g}$]	22	0,2	0,7
Ba [$\mu\text{g/g}$]	38,3	0,1	0,2
Ca [%]	3,58	0,03	0,9
Cu [$\mu\text{g/g}$]	17,2	0,1	0,5
Fe [$\mu\text{g/g}$]	1075	3	0,3
Mg [%]	0,517	0,01	1,1
Mn [$\mu\text{g/g}$]	78,1	0,2	0,3
Sr [$\mu\text{g/g}$]	119	5	3,8
Zn [$\mu\text{g/g}$]	42,1	0,1	0,3

Tabela 4

Powtarzalność wyrażona jako CV wyznaczona na podstawie analizy materiału certyfikowanego CTA VTL2
Repeatability expressed as CV determined as the result of analysis of CTA VTL2 certified material

Pierwiastek	Średnia zawartość	SD	CV
B [$\mu\text{g/g}$]	23	1	4,3
Ba [$\mu\text{g/g}$]	38,8	1,6	4,2
Ca [%]	3,60	0,15	4,3
Cu [$\mu\text{g/g}$]	17,3	0,7	3,8
Fe [$\mu\text{g/g}$]	1100	51	4,6
Mg [%]	0,512	0,014	2,6
Mn [$\mu\text{g/g}$]	78,6	2,5	3,1
Sr [$\mu\text{g/g}$]	112	5	4,3
Zn [$\mu\text{g/g}$]	42,5	1,9	4,5

Wszystkie wartości **CV** mieszczą się w granicach 2,6-4,6%.

Należy zauważyć, że materiał certyfikowany to próbka idealnie jednorodna. Z tego względu przy wyznaczaniu powtarzalności metody na podstawie jego analizy pomijane są takie etapy jak pobranie próbki i jej homogenizacja, które, jak można przypuszczać, mają istotny wkład w powtarzalność całej metody. Pobranie próbki reprezentatywnej rośliny konopi jest niezwykle trudnym etapem. Otóż do analizy trafiają zwykle bądź całe rośliny konopi, bądź próbki

przez jej ujednorodnienie i mineralizację aż do analizy. Wyznaczone wartości **CV** na podstawie wyników analizy próbki konopi zamieszczono w tabeli 5.

Jak wynika z danych zamieszczonych w tabeli 3, dla baru i manganu współczynniki zmienności wyniosły odpowiednio 6,2 i 5,9%. Dla pozostałych pierwiastków nie przekroczył on 5%.

Bardzo istotną składową powtarzalności metody jest powtarzalność procesu kalibracji. By ją wyznaczyć, przygotowano trzy niezależne krzywe

W celu wyznaczenia odtwarzalności wyrażonej za pomocą **CV** analizie poddano również 8 próbek materiału certyfikowanego CTA VTL2. Probki były pobierane, mineralizowane i analizowane w różnych dniach analitycznych, w tych dniach przygotowywano również wzorce i wykonywano kalibrację. Następnie sprawdzano kalibrację za pomocą próbki kontrolnej o certyfikowanych zawartościach oznaczanych pierwiastków. Kalibrację akceptowano, gdy odchylenie od stężenia certyfikowanego nie przekraczało 5%. W przeciwnym

Tabela 5
CV wyznaczone na podstawie wyników analizy próbki konopi
CV determined basing on results of hemp sample analysis

Pierwiastek	Średnia zawartość	SD	CV
B [$\mu\text{g/g}$]	77	3	3,4
Ba [$\mu\text{g/g}$]	27,3	1,7	6,2
Ca [%]	3,94	0,14	3,5
Cu [$\mu\text{g/g}$]	21,4	0,2	1,0
Fe [$\mu\text{g/g}$]	900	43	4,8
Mg [%]	0,584	0,012	2,1
Mn [$\mu\text{g/g}$]	128	8	5,9
Sr [$\mu\text{g/g}$]	87	4	4,3
Zn [$\mu\text{g/g}$]	70,8	2,2	3,1

Tabela 6
Powtarzalność procesu kalibracji metody wyrażona jako CV
Repeatability of process of method calibration expressed as CV

Pierwiastek	Średnie nachylenie	SD	CV
B	77000	2000	2,6
Ba	152000	10000	0,7
Ca	95000	2000	2,1
Cu	153000	2000	1,3
Ca	97800	900	0,9
Fe	181000	6000	3,3
Mg	382000	5000	1,3
Mn	599000	1000	0,2
Sr	4870	10	0,2
Zn	131000	4000	3,1

konopi wstępnie rozdrobnione. W celu wykonania analiz porównawczych niezbędne jest opracowanie procedury poboru próbki, która umożliwiałaby wiarygodne porównywanie wyników uzyskanych dla różnych próbek. Zbadanie zawartości pierwiastków w poszczególnych częściach rośliny ułatwiło opracowanie procedury poboru próbek konopi.

W tym celu z próbki konopi pobrano 8 próbek analitycznych. Poddano je ujednorodnieniu w oddzielnych pojemnikach do homogenizacji młynka planetarnego. Następnie wykonano mineralizację i analizowano. Taki proces wyznaczania precyzji w warunkach powtarzalnych obejmuje wszystkie etapy postępowania analitycznego od pobrania próbki, po

kalibracyjne. Jedną z wielkości charakteryzujących krzywą kalibracji jest jej nachylenie. Porównano nachylenia trzech wyznaczonych krzywych. Uzyskane wyniki zamieszczono w tabeli 6.

Wyniki zamieszczone w tab. 4 wskazują, że kalibracja to proces charakteryzujący się dużą powtarzalnością. Dla większości pierwiastków wartości współczynnika zmienności nie przekraczały 2%.

Tabela 7
Odtwarzalność wyrażona jako CV wyznaczona na podstawie analizy materiału certyfikowanego
Reproducibility expressed as CV determined as the result of analysis of certified material

Pierwiastek	Średnia zawartość	SD	CV
B [$\mu\text{g/g}$]	20,5	1,2	5,6
Ba [$\mu\text{g/g}$]	31,8	0,8	2,5
Ca [%]	1,08	0,04	3,7
Cu [$\mu\text{g/g}$]	7,70	0,35	4,5
Fe [$\mu\text{g/g}$]	459	19	4,2
Mg [%]	0,296	0,010	3,3
Mn [$\mu\text{g/g}$]	195	3	1,3
Sr [$\mu\text{g/g}$]	38,2	1,1	2,8
Zn [$\mu\text{g/g}$]	32,7	1,4	4,2

razie przygotowywano nową krzywą kalibracji. Wyniki przedstawiono w tabeli 7.

Podobnie jak w przypadku powtarzalności, wyznaczono następnie odtwarzalność metody, poddając analizie próbkę konopi pobraną, homogenizowaną, mineralizowaną i analizowaną w różnych dniach analitycznych. Uzyskane wyniki zamieszczono w tabeli 8.

SD_b – odchylenie standardowe ślepej próby.

W drugim przypadku wyrażenie to przyjmuje postać:

$$GW = \frac{kc_0 RSD_b}{R_{a-b}} \quad (5),$$

gdzie:

k – stała,

Kolejnym sposobem wyznaczania granicy wykrywalności jest metoda wizualna. Polega ona na ocenie wizualnej sygnałów uzyskanych dla różnych stężeń oznaczanej substancji. Stężenia te powinny być tak dobrane, by obejmowały zakres niewykrywany i wykrywany przez aparat. Na podstawie oceny wizualnej wybieramy sygnał, który jest wyraźnie wy-

Tabela 8
Odtwarzalność wyznaczona na podstawie analizy próbki konopi

Reproducibility determined basing on analysis of hemp sample

Pierwiastek	Średnia zawartość	SD	CV
B [μg/g]	26	1	5,7
Ba [μg/g]	43,1	1,3	3,0
Ca [μg/g]	1,25	0,05	3,9
Cu [μg/g]	10,1	0,4	4,3
Fe [μg/g]	512	23	4,5
Mg [%]	0,273	0,011	4,0
Mn [μg/g]	205	4	2,0
Sr [μg/g]	58,1	2,0	3,5
Zn [μg/g]	50,8	2,4	4,8

Granica wykrywalności i oznaczalności

Granice wykrywalności, zgodnie z zaleceniem organizacji IUPAC, definiuje się jako najmniejsze stężenie, któremu odpowiada sygnał różniący się statystycznie (istotnie) od sygnału ślepej próby. Najczęściej stosowane są podejścia oparte albo na stosunku sygnału do szumu, albo na stosunku sygnału do tła i względnym odchyleniu standardowym tła. W pierwszym przypadku wyrażenie na granicę wykrywalności **GW** można przedstawić jako [12]:

$$GW = \frac{kc_0 SD_b}{y_a} \quad (4),$$

gdzie:

k – stała,

c_0 – stężenie odpowiadające sygnałowi analitu y_a ,

c_0 – stężenie odpowiadające sygnałowi analitu y_a ,

RSD_b – względne odchylenie standardowe ślepej próby,

R_{a-b} – stosunek sygnałów tła i analitu o stężeniu c_0 .

W kolejnej metodzie do wyznaczania granicy wykrywalności stosowany jest następujący wzór:

$$GW = X_{blank} + kSD_b \quad (6),$$

gdzie:

k – stała,

X_{blank} – wartość ślepej próby,

SD_b – odchylenie standardowe ślepej próby.

Należy zaznaczyć, że dla granicy wykrywalności wartość stałej k wynosi 3.

Tabela 9
Wartości granicy wykrywalności i oznaczalności metody wyznaczone na podstawie wyników analizy ślepych prób

Values of detection and determination limits obtained basing on results of analysis of blind samples

Pierwiastek	Średnie stężenie [mg/l]	SD [mg/l]	GW [mg/l]	GO [mg/l]
B	0,05	0,02	0,10	0,21
Ba	0,01	0,00	0,02	0,03
Ca	0,82	0,22	1,47	2,99
Cu	0,01	0,00	0,03	0,06
Fe	0,06	0,04	0,17	0,44
Mg	0,02	0,01	0,04	0,07
Mn	0,002	0,001	0,006	0,015
Sr	0,37	0,04	0,49	0,76
Zn	0,02	0,01	0,03	0,07

odrębniony z tła, a stężenie mu odpowiadające to granica wykrywalności.

Granica oznaczalności to najmniejsze stężenie, jakie można wykryć daną metodą z odpowiednią precyzją. By wyznaczyć granicę oznaczalności (**GO**), należy we wzorach 4+6 przyjąć wartość stałej $k=6$.

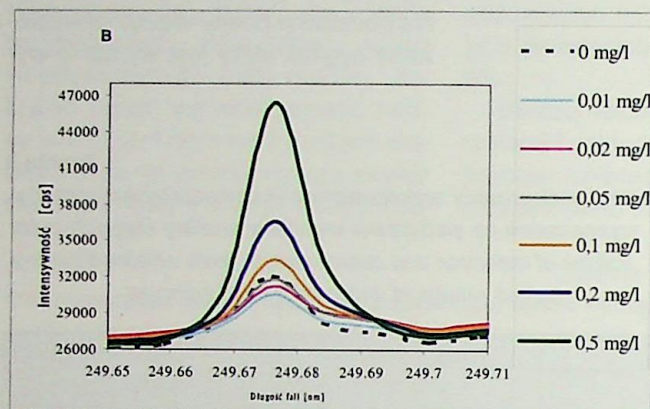
Istnieje wiele metod wyznaczania granicy wykrywalności i oznaczalności. W realizowanych badaniach postanowiono przedstawić wartości granicy wykrywalności i oznaczalności uzyskane różnymi metodami. Jako pierwszą wybrano wyznaczanie tych parametrów na podstawie analiz ślepej próby. Wyniki dla 10 ślepych prób uzyskano w warunkach odtwarzalnych. Na ich podstawie wyznaczono wartość granicy wykrywalności (**GW**) i oznaczalności (**GO**) według wzorów 4+6. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 9.

Kolejną metodą wyznaczania **GW** i **GO** jest metoda wizualna. Jak

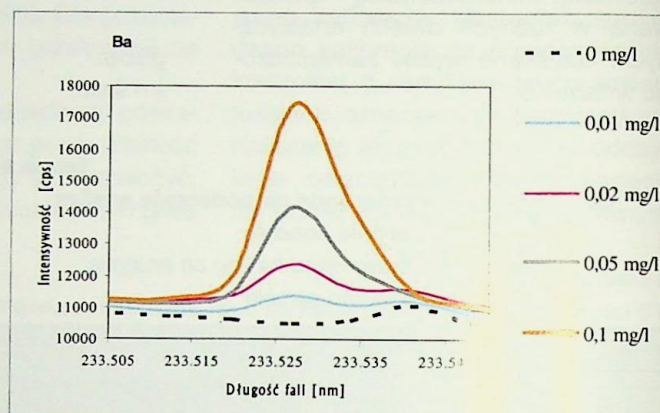
wspomniano, polega ona na zarejestrowaniu i analizie widm pierwiastków w próbkach wzorców o różnym stężeniu. Przygotowywana jest seria roztworów o wzrastającym stężeniu oznaczanego pierwiastka. Należy zaznaczyć, że stężenia wzorców powin-

ny być dobrane tak, by obejmowały poziom, którego aparat nie jest w stanie wykryć. W badaniach przygotowano serie wzorców pierwiastków o stężeniach: 0; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1 i 2 mg/l. Matrycą wszystkich wzorców jest 20-procentowy kwas

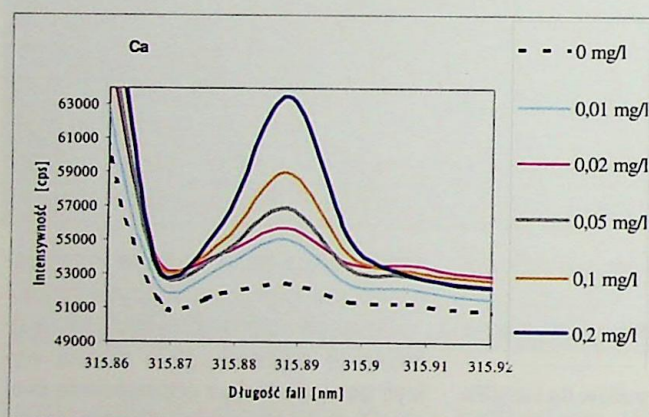
azotowy. Widma pierwiastków o wzrastającym stężeniu zamieszczono na rycinach 2÷10. Należy zaznaczyć, że zamieszczono widma tylko dla tych stężeń pierwiastków, które są niezbędne do wyodrębnienia granicy wykrywalności i oznaczalności.



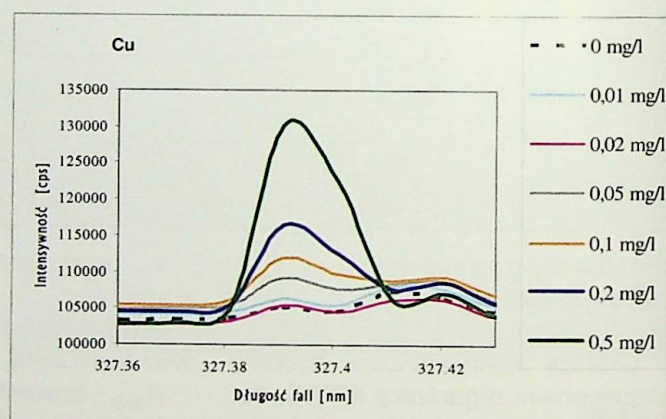
Ryc. 2. Widma uzyskane dla boru o różnych stężeniach
Fig. 2. Spectra of boron in various concentrations



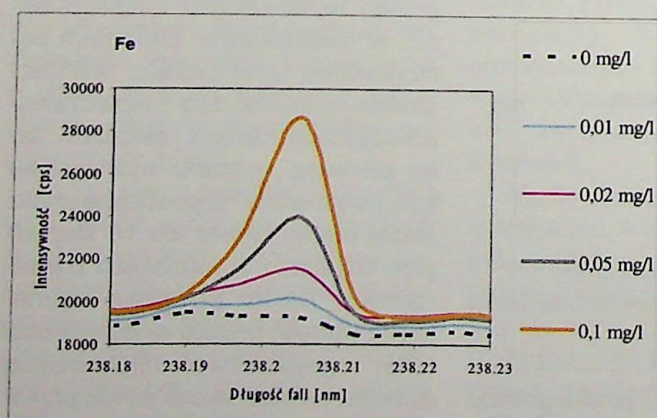
Ryc. 3. Widma uzyskane dla baru o różnych stężeniach
Fig. 3. Spectra of barium in various concentrations



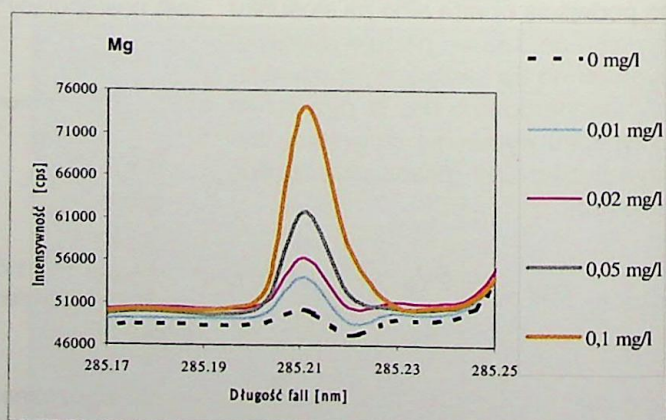
Ryc. 4. Widma uzyskane dla wapnia o różnych stężeniach
Fig. 4. Spectra of calcium in various concentrations



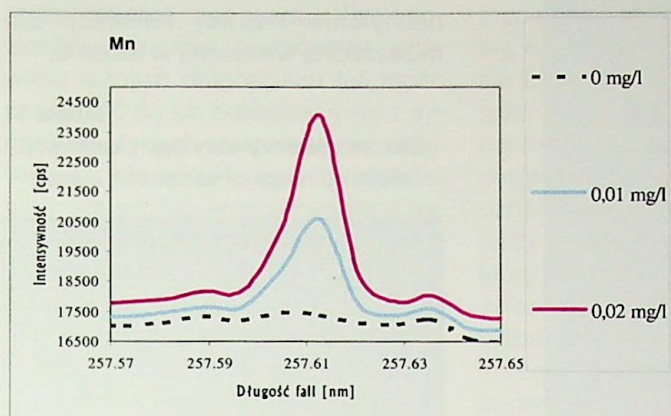
Ryc. 5. Widma uzyskane dla miedzi o różnych stężeniach
Fig. 5. Spectra of copper in various concentrations



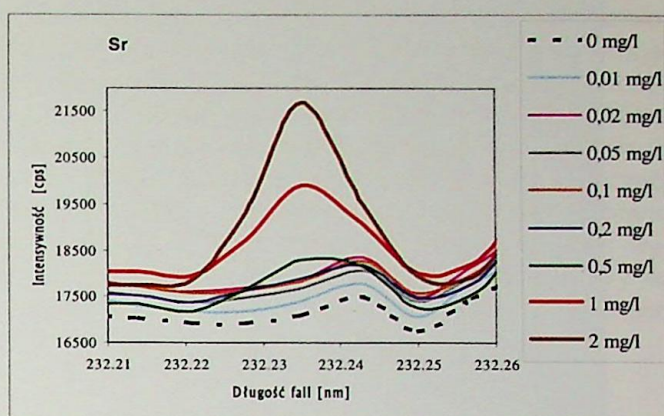
Ryc. 6. Widma uzyskane dla żelaza o różnych stężeniach
Fig. 6. Spectra of iron in various concentrations



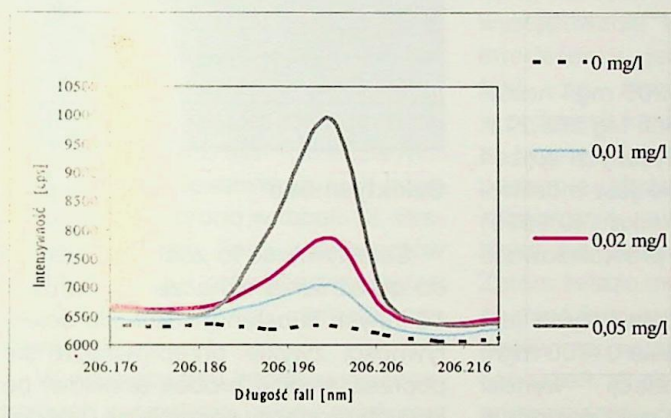
Ryc. 7. Widma uzyskane dla magnezu o różnych stężeniach
Fig. 7. Spectra of magnesium in various concentrations



Ryc. 8. Widma uzyskane dla manganu o różnych stężeniach
Fig. 8. Spectra of manganese in various concentrations



Ryc. 9. Widma uzyskane dla strontu o różnych stężeniach
Fig. 9. Spectra of strontium in various concentrations



Ryc. 10. Widma uzyskane dla cynku o różnych stężeniach
Fig. 10. Spectra of zinc in various concentrations

W tabeli 10 podano wartości granicy wykrywalności i oznaczalności wyznaczone na podstawie oceny wizualnej widm.

Zakres prostoliniowy i roboczy krzywych kalibracyjnych

Liniowość to niezwykle istotny parametr metody analitycznej. Określa ona zakres prostoliniowej zależności pomiędzy stężeniem oznaczanego składnika i uzyskanym sygnałem analitycznym. Ze względów praktycznych pożądane jest, by zakres prostoliniowości był jak największy. Umożliwia to oznaczanie małych i dużych stężeń składnika bez konieczności rozcieńczania próbki. Korelację pomiędzy stężeniem a sygnałem można opisać za pomocą współczynnika korelacji – r .

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (7)$$

gdzie:

x_i, y_i – współrzędne kolejnych punktów w analizowanym zbiorze,
 n – liczba punktów,
 $\bar{x}, \bar{y}$ – odpowiednio wartości średnie współrzędnych.

Zależność między y (zmienna zależna) a x (zmienna niezależna) będzie idealnie liniowa, gdy współczynnik korelacji wyniesie 1 albo –1.

Tabela 10

Wartości granicy wykrywalności i oznaczalności metody
wyznaczone na podstawie wizualnej oceny widm
Values of detection and determination limits obtained basing
on visual assessment of spectra

Pierwiastek	GW [mg/l]	GO [mg/l]
B	0,2	0,5
Ba	0,05	0,1
Ca	0,05	0,2
Cu	0,2	0,5
Fe	0,05	0,1
Mg	0,05	0,1
Mn	0,01	0,02
Sr	1	2
Zn	0,02	0,05

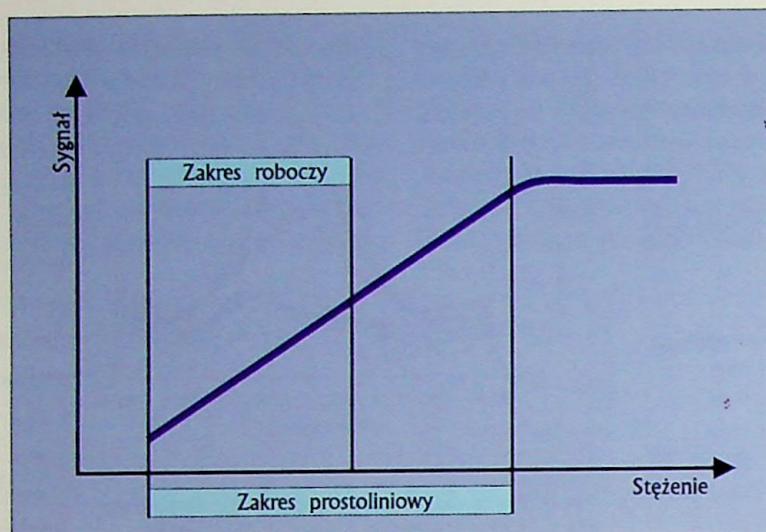
W analizie chemicznej oczekiwane są korelacje lepsze od 0,99.

By wyznaczyć zakres prostoliniowy metody, należy poddać analizie serię co najmniej pięciu roztworów analitu o różnym stężeniu, a następnie obliczyć współczynnik korelacji.

Zakres roboczy krzywej kalibracji to zakres stężeń, z którego korzysta się w danej metodzie analitycznej. Musi charakteryzować się dobrym współczynnikiem korelacji.

Różnicę między zakresem prostoliniowym a roboczym metody przedstawiono na rycinie 11.

Metoda ICP-OES ma duży zakres prostoliniowości krzywych kalibracyjnych, zwykle sięgający kilku rzędów



Ryc. 11. Zakres prostoliniowy i roboczy metody analitycznej
Fig. 11. Linear and working range of analytical method

wielkości. Jednak każda krzywa kalibracji odznacza się ograniczonym zakresem.

W przypadku analizy próbek konopi największe stężenia oznaczane są dla wapnia i magnezu – do odpowiednio 2100 mg/l i 1270 mg/l. Jedynie w przypadku tych dwóch pierwiastków jest uzasadnione wyznaczanie prostoliniowego zakresu krzywych kalibracji. W tym celu przygotowano i analizowano serie roztworów kalibracyjnych zawierających:

- dla wapnia 0, 100, 200, 400, 600, 700, 800, 900, 1000 mg/l,
- dla magnezu 0, 50, 100, 150, 175 i 200 mg/l.

Uzyskane wyniki zamieszczono na rycinach 12 i 13.

Powyżej stężenia 200 mg/l następuje przeładowanie linii Mg 285,213. Zatem oznaczanie wyższych stężeń za pomocą tej linii nie jest możliwe. Wartość współczynnika (0,9995) wskazuje na dużą prostoliniowość krzywej kalibracji.

W przypadku wapnia krzywa jest prostoliniowa w zakresie 0–700 mg/l. Współczynnik korelacji wynosi 0,9998. Powyżej 700 mg/l następuje przeładowanie linii wapnia, co uniemożliwia oznaczanie wyższych stężeń.

W tabeli 11 zamieszczono zakresy robocze krzywych kalibracji dla wszystkich oznaczanych pierwiastków. Czułość metody wyrażona jako

nachylenie krzywej kalibracji zamieszczono wcześniej w tabeli 6.

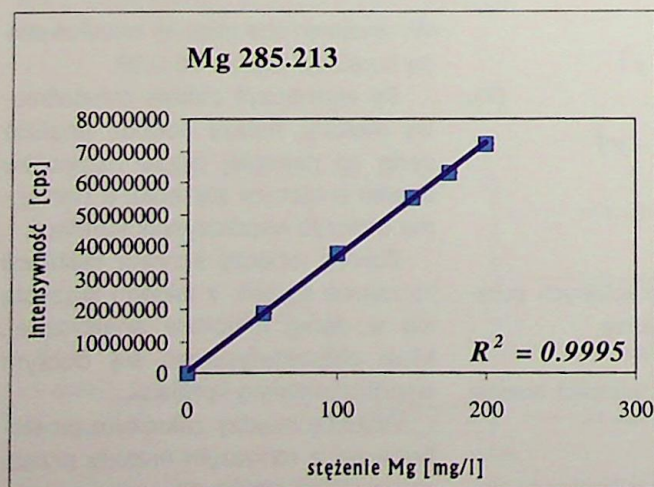
Tabela 11
Zakres roboczy krzywych kalibracji
Working range of calibration curves

Pierwiastek	Zakres roboczy [mg/l]
B	0 ÷ 10
Ba	0 ÷ 10
Ca	0 ÷ 500
Cu	0 ÷ 10
Fe	0 ÷ 100
Mg	0 ÷ 200
Mn	0 ÷ 10
Sr	0 ÷ 10
Zn	0 ÷ 10

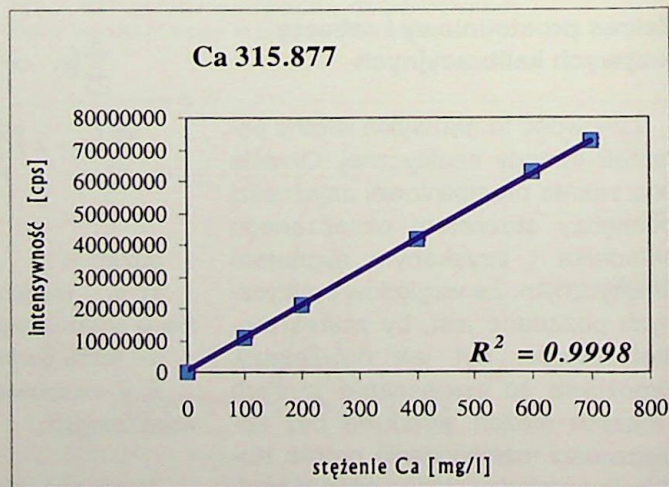
Selektywność

Selektywność to zdolność metody do odróżniania oznaczanego analitu od innych substancji. Badanie selektywności zwykle przeprowadza się poprzez analizę próbek analitów, do których dodano potencjalne interfe-renty, i obserwację uzyskiwanych sygnałów.

Metoda ICP-OES nie odznacza się niestety dobrą selektywnością ani specyficznością. Możliwość jednoczesnego oznaczania zdecydowanej większości pierwiastków układu okresowego jest dużą zaletą, lecz



Ryc. 12. Zakres prostoliniowy krzywej kalibracji wyznaczonej dla magnezu
Fig. 12. Rectilinear range of calibration curve for magnesium



Ryc. 13. Zakres prostoliniowy krzywej kalibracji wyznaczonej dla wapnia
Fig. 13. Rectilinear range of calibration curve for calcium

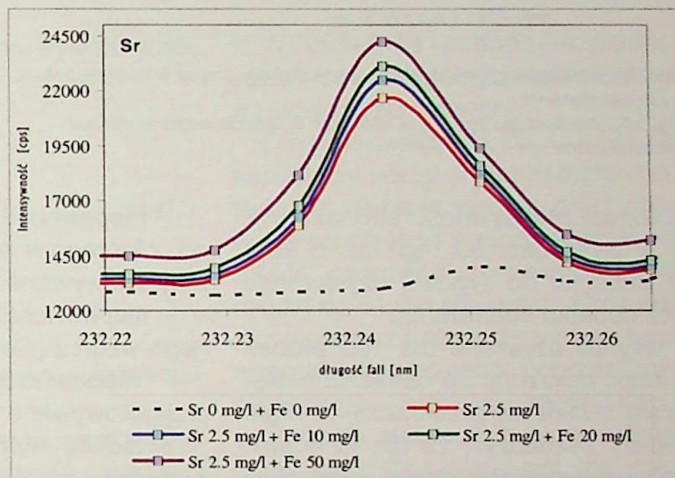
może również być wadą. Występowanie sygnałów pierwiastka przy wielu różnych długościach fali może prowadzić do ich nakładania się z sygnałami innych pierwiastków. Największe błędy związane z nakładaniem się sygnałów obserwowane są, gdy obok siebie występują silne linie pierwiastka oznaczanego i interferenta. Emitowanie wielu fal daje możliwość prostej eliminacji interferencji spektralnych poprzez wybranie innej – nieobarczonej interferencjami linii analitycznej. Jednak często takie linie są mniej czułe i wykrycie stężeń śladowych za ich pomocą jest utrudnione.

W trakcie walidacji metody oznaczania pierwiastków w próbkach konopi stwierdzono, jakie potencjalne interferencje emitują sygnały w pobliżu linii analitycznych oznaczanych pierwiastków. Zestawienie tych informacji zamieszczono w tabeli 12. Brano pod uwagę linie interferentów znajdujące się w odległości mniejszej niż 0,005 nm od linii oznaczanego pierwiastka.

W wyznaczaniu interferencji spektralnych największą uwagę zwrócono na linię strontu. Spektrometr, za po-

mocą którego wykonywano analizy, wyposażony jest w detektor w zakresie UV. W tym zakresie stront emituje tylko jedną falę o stosunkowo małej czułości. Interferencja spektralna mogłaby uniemożliwić dokładne oznaczanie tego pierwiastka w próbkach konopi. Jedynym pierwiastkiem, który mógłby zakłócać sygnał Sr, jest żelazo. Linia $Fe_{232,233}$ jest bardzo słaba, lecz ze względu na idealne nałożenie z linią Sr postanowiono sprawdzić jej wpływ. Dodatkowym czynnikiem przemawiającym za sprawdzeniem występowania tej interferencji jest fakt, że stront w próbkach konopi występuje na poziomie stężeń kilkakrotnie niższym od żelaza. Zatem żelazo może mieć faktyczny wpływ na wyniki oznaczeń. W celu sprawdzenia, czy tak jest w istocie,

przygotowano serię czterech roztworów wzorcowych oraz ślepą próbę. W każdym roztworze stężenie strontu było stałe i wynosiło 2,5 mg/l. Stężenie żelaza wynosiło odpowiednio 0, 10, 20 i 50 mg/l. Należy zaznaczyć, że stężenia strontu i żelaza dobrano tak, by odzwierciedlały poziom występujący w próbkach konopi. Wyniki analizy przedstawiono na rycinach 14, 15 oraz w tabeli 13.



Ryc. 14. Widma uzyskane dla strontu w matrycy żelaza o różnym stężeniu
Fig. 14. Spectra of strontium in ferrous matrix in various concentrations

Potencjalne interferenty [13]
Possible interferences

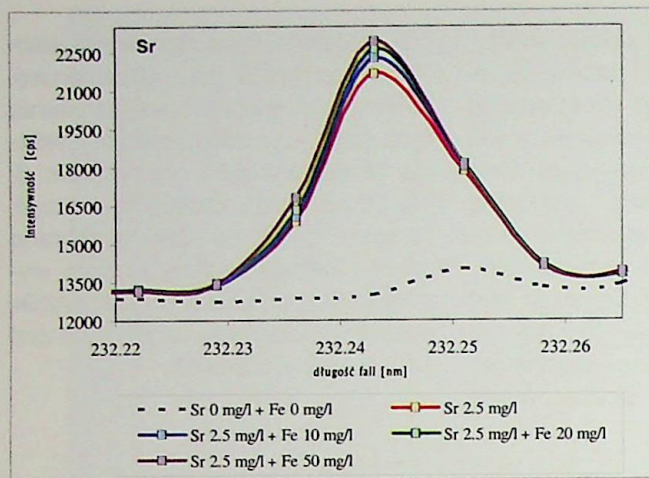
Pierwiastek	Długość fali [nm]	Potencjalny interferent/długość fali [nm]
B	249,677	Tc 249,677; Sn 249,677; Hg 249,678; Cr 249,681
Ba	233,527	Nb 233,531; V 233,533
Be	234,861	Mo 234,858; Ta 234,859; Zr 234,859
Be	313,107	Th 313,107; Zr 313,111
Ca	315,887	Ce 315,888
Cu	327,393	Nb 327,389; U 327,390; Th 327,392; Ce 327,393; Co 327,393; Ta 327,396; Mo 327,396; Ce 327,396; Sb 327,397
Fe	238,204	V 238,203; Hg 238,206
Mg	285,213	U 285,209; W 285,210; Ce 285,212; Mo 285,213;
Mn	257,610	Ru 257,609; Co 257,610; Zr 257,610
Sr	232,235	Fe 232,233
Zn	206,200	Nb 206,297; In 206,200; V 206,200
Y	371,029	Ce 371,025; W 371,029; U 371,031

Tabela 12

Analiza widm zamieszczonych na rycinie 14 wskazuje, że obecność żelaza powoduje przede wszystkim wzrost poziomu tła, który jest proporcjonalny do stężenia żelaza w próbce. Na podstawie tych widm trudno określić, czy występują interferencje spektralne, czyli czy następuje wzrost intensywności sygnału strontu w obecności coraz większych stężeń żelaza.

Na rycinie 15 zamieszczono widma takie same jak na rycinie 14, lecz z przesuniętym poziomem tła. Występowanie tła na podobnym poziomie ułatwia interpretację wizualną widm. Okazuje się, że wysokość sygnału Sr rośnie wraz ze wzrostem zawartości żelaza w próbce. Świadczy to o występowaniu interferencji spektralnych.

Dane zestawione w tabeli 13 pozwalają na oszacowanie wielkości tej interferencji. Okazuje się, że stężenie żelaza w wysokości 10 mg/l powodu-



Ryc. 15. Wystandaryzowane widma uzyskane dla strontu w matrycy żelaza o różnym stężeniu

Fig. 15. Standardised spectra of strontium in ferrous matrix in various concentrations

je wzrost intensywności strontu o 8%, a w wysokości 50 mg/l aż o 22% w stosunku do sygnału uzyskanego bez dodatku interferenta.

Wyniki uzyskane dla 105 próbek konopi wskazują, że oznaczane stężenie żelaza nie przekracza 40 mg/l. Należy zaznaczyć, że dla 72% próbek oznaczone stężenie tego pierwiastka nie przekraczało 10 mg/l, a tylko w 5% próbek wyniosło więcej niż 20 mg/l. Te informacje wskazują, że efekt interferencyjny dla strontu jest istotny dla 28% badanych próbek.

Szacowanie niepewności metody

Na niepewność metody oznaczania pierwiastków w próbce konopi techniką ICP-OES wpływa wiele czynników.

Niepewność wynikająca z procesu przygotowania próbki obejmuje następujące składniki:

- niepewność wyznaczania masy próbki (niepewność wagi analitycznej),
- niepewność kolby, w której przygotowywana jest próbka.

Niepewność wyznaczania kalibracji i oznaczania pierwiastka w próbce konopi obejmuje cztery rodzaje składników:

- składniki niepewności związane z przygotowywaniem roztworów wzorcowych,

- niepewność wzorca wyjściowego, z którego w wyniku rozcieńczenia przygotowuje się wzorce robocze,
 - niepewność objętości pipetowanego wzorca (niepewność pipety),
 - niepewność kolb, w których przygotowuje się wzorce robocze.
- Składniki niepewności związane z analizą wzorców roboczych metodą ICP-OES:

- niepewność wyznaczenia intensywności sygnału dla pierwiastków we wzorcach roboczych,
- składniki niepewności związane z analizą próbki konopi,
- niepewność wyznaczenia intensywności sygnału dla pierwiastków w próbce konopi,
- niepewność wyznaczenia intensywności sygnału dla pierwiastków w ślepej próbce.

Składniki niepewności należy pogrupować w zależności od tego, jakim typom szacowania niepewności podlegają (A czy B).

W tym przypadku typ A szacowania niepewności obejmuje składniki, które zostały wyznaczone doświadczalnie, tj. intensywności pierwiastków dla próbki, intensywności pierwiastków dla ślepej próbki i intensywności pierwiastków dla wzorców. Dla tych składników niepewność standardowa (U) jest równa odchyleniu standardowemu.

Składniki podlegające typowi B szacowania niepewności to: objętość kolb, w których przygotowywano prób-

kę i wzorce robocze, objętość pipetowanego wzorca oraz masa próbki.

Prostokątnemu rozkładowi prawdopodobieństwa, dla którego niepewność standardowa jest równa

$$U = \frac{Sd}{\sqrt{3}}$$

podlegają objętości kolb, w których przygotowywano próbkę i wzorce robocze, a także objętość pipetowanego wzorca. Natomiast masa próbki, czyli niepewność wagi, będzie podlegać trójkątnemu rozkładowi prawdopodobieństwa, dla którego

$$U = \frac{Sd}{\sqrt{6}}$$

Aby opracować model szacowania niepewności, należy również znać model matematyczny, według którego spektrometr oblicza stężenie analitu na podstawie zmierzonej intensywności sygnału.

Równanie krzywej wzorcowej można przedstawić następująco:

$$y = ax + b \quad (8),$$

gdzie:

y – intensywność sygnału analitycznego,

x – stężenie,

a – nachylenie krzywej,

b – punkt przecięcia krzywej z osią y .

Wartość a obliczana jest ze wzoru 9.

Wartość b obliczana jest ze wzoru 10:

Tabela 13
Intensywności emisji uzyskane dla strontu w obecności matrycy żelaza o różnym stężeniu

Emission intensities obtained for strontium in presence of ferrous matrix

Stężenie Sr [mg/l]	Stężenie Fe [mg/l]	Intensywność dla Sr [cps]	Intensywność względna dla Sr [%]
2,5	0	10537	100
2,5	10	11330	108
2,5	20	12037	114
2,5	50	12805	122

$$a = \frac{(x_1 - \bar{x})(y_1 - \bar{y}) + (x_2 - \bar{x})(y_2 - \bar{y}) + (x_3 - \bar{x})(y_3 - \bar{y}) + (x_4 - \bar{x})(y_4 - \bar{y})}{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + (x_3 - \bar{x})^2 + (x_4 - \bar{x})^2} \quad (9)$$

gdzie:

x_i – wartość stężenia wzorca,

y_i – wartość sygnału analitycznego.

rozcieńczanie z odpowiedniego wzorca wyjściowego. Stężenie wzorca

matycznego (wzór 13). Ponieważ to jeszcze bardziej komplikuje model matematyczny, zrezygnowano z wstawiania tego wzoru w tym miejscu pracy. Pełny model matematyczny jest uwzględniony w skrócie Microsoft Excel, który był wykorzystywany w obliczeniach.

$$b = \frac{y_1 + y_2 + y_3 + y_4}{4} - \frac{(x_1 - \bar{x})(y_1 - \bar{y}) + (x_2 - \bar{x})(y_2 - \bar{y}) + (x_3 - \bar{x})(y_3 - \bar{y}) + (x_4 - \bar{x})(y_4 - \bar{y})}{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + (x_3 - \bar{x})^2 + (x_4 - \bar{x})^2} * \frac{x_1 + x_2 + x_3 + x_4}{4} \quad (10)$$

Stężenie nieznaną próbkę w mg/l obliczane jest z zależności 11.

$$x_o = \frac{(y_{ox} - y_{osp}) - b}{a} \quad (11),$$

gdzie:

x_o – wartość stężenia [mg/l],

y_{ox} – wartość średnia sygnału analitycznego dla nieznaną próbkę [mg/l],

y_{osp} – wartość średnia sygnału analitycznego dla ślepej próby [mg/l].

Stężenie analitu wyrażone w mg/l przekształcane jest na mg/kg według wzoru (12) z uwzględnieniem masy próbki oraz objętości kolby, w której ją przygotowano:

$$C = \frac{x_o * V_p}{m} \quad (12),$$

gdzie:

C – wartość stężenia [mg/kg],

x_o – wartość stężenia [mg/l],

V_p – objętość kolby, w której przygotowano próbkę [ml],

m – masa próbki [g].

Po połączeniu tych wzorów 8–12 otrzymujemy model matematyczny opisany wzorem 13.

Jednak należy dodatkowo uwzględnić fakt, że wzorce kalibracyjne zostały przygotowane przez

ca do kalibracji można wyrazić wzorem 14.

$$x_i = \frac{C_{wz} * V_i}{V_k} \quad (14),$$

gdzie:

C_{wz} – stężenie wzorca wyjściowego [mg/l],

V_i – objętość odpipetowanego wzorca [ml],

V_k – objętość kolby, w której przygotowano wzorec [ml].

Tą zależność należy wstawić w miejsce x_1, x_2, x_3 do modelu mate-

W tabeli 14 podano względny udział poszczególnych elementów w niepewności złożonej.

Dla pierwiastków B, Ba, Cu, Sr i Zn największy udział w niepewności metody ma stężenie wzorca głównego. Niepewność tego wzorca stanowi od 39,9% całkowitej niepewności dla miedzi do 61,0% dla cynku. Otóż jest to związane z faktem, że roztwór tego wzorca przygotowano poprzez rozcieńczenie wzorca wyjściowego o stężeniu każdego z pierwiastków 1000 mg/l. Oczywiście jest, że wraz z rozcieńczaniem próbki (wzorca) rośnie niepewność metody. By zmniejszyć zatem niepewność oznaczania tych pierwiastków, należy zastosować roztwór wzorca o stężeniu 100 mg/l.

Tabela 14

Względny udział poszczególnych elementów metody w niepewności złożonej
Relative contribution of individual method components in complex uncertainty

Element metody	B	Ba	Ca	Cu	Fe	Mg	Mn	Sr	Zn
Intensywność próbki [cps]	26,2	23,7	16,3	14,57	0,2	18,8	1,8	30,6	17,8
Intensywność ślepej próbki [cps]	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Intensywność wzorca 1 [cps]	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	3,2	<0,1
Intensywność wzorca 2 [cps]	0,9	0,4	<0,1	2,42	<0,1	0,5	0,11	<0,1	0,1
Intensywność wzorca 3 [cps]	5,6	4,5	0,7	10,4	3,6	1,6	2,13	6,9	7,1
Intensywność wzorca 4 [cps]	0,03	0,5	7,2	2,3	4,0	6,2	5,3	1,2	0,7
Objętość próbki [ml]	0,3	0,3	1,3	0,20	2,6	1,0	1,50	0,2	0,3
Masa próbki [g]	<0,1	<0,1	0,2	<0,1	0,2	0,1	0,1	<0,1	<0,1
Stężenie wzorca głównego [mg/l]	55,0	58,3	0,2	39,9	0,4	0,4	0,2	49,1	61,0
Objętość wzorca 1 [ml]	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Objętość wzorca 2 [ml]	3,6	3,5	<0,1	9,7	15,2	<0,1	0,1	1,7	3,7
Objętość wzorca 3 [ml]	7,3	7,5	2,3	16,6	37,8	11,0	28,1	4,1	8,0
Objętość wzorca 4 [ml]	0,7	1,0	70,4	3,6	33,4	59,5	59,1	2,7	1,0
Objętość roztworu wzorca [ml]	0,3	0,3	1,3	0,2	2,6	1,0	1,5	0,2	0,3

$$C \left[\frac{mg}{kg} \right] = \frac{V_p * \left((y_{ox} - y_{osp}) - \frac{y_1 + y_2 + y_3 + y_4}{4} - \frac{(x_1 - \bar{x})(y_1 - \bar{y}) + (x_2 - \bar{x})(y_2 - \bar{y}) + (x_3 - \bar{x})(y_3 - \bar{y}) + (x_4 - \bar{x})(y_4 - \bar{y})}{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + (x_3 - \bar{x})^2 + (x_4 - \bar{x})^2} * \frac{x_1 + x_2 + x_3 + x_4}{4} \right)}{m * \frac{(x_1 - \bar{x})(y_1 - \bar{y}) + (x_2 - \bar{x})(y_2 - \bar{y}) + (x_3 - \bar{x})(y_3 - \bar{y}) + (x_4 - \bar{x})(y_4 - \bar{y})}{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + (x_3 - \bar{x})^2 + (x_4 - \bar{x})^2}} \quad (13)$$

Dla pozostałych pierwiastków głównym elementem determinującym niepewność metody jest dozowanie objętości roztworu wzorca głównego, czyli by zmniejszyć niepewność metody, należy kupić pipety o większej precyzji dozowania objętości.

W tabeli 15 podano względne procentowe wartości niepewności złożonej (U) metody oznaczania każdego pierwiastka. Zamieszczono w niej również wartość stężenia, gdyż ważny jest poziom stężenia, dla którego wyznaczono niepewność. Podana wartość U_r to wartość względna niepewności rozszerzonej. Obliczono ją, mnożąc wartość U przez 2. Niepewność rozszerzona oddaje pełniej wartość niepewności metody. Jest to spowodowane tym, że przy szacowaniu niepewności często nie można przewidzieć i określić wszystkich czynników, które na nią wpływają.

Jak można się było spodziewać, największą względną niepewność

Podsumowanie

W opublikowanych już artykułach związanych z opracowywaniem metody profilowania konopi na podstawie składu pierwiastkowego przedstawiono badania wstępne związane z analizą materiału roślinnego, stabilnością stosowanych roztworów, efektami matrycowymi i walidacją metody. Doprowadziły one do opracowania wiarygodnej i pewnej metody wyznaczania składu pierwiastkowego konopi. Na podstawie wykonanej pracy określone zostały zasady i parametry mineralizacji konopi oraz warunki analizy techniką ICP-OES.

Wyniki opisanych etapów pracy autorzy wykorzystali w następnych badaniach związanych już z właściwym, bezpośrednim badaniem ziela konopi pod kątem rozkładu pierwiastków w roślinie (korzeniach, łodygach, liściach, kwiatostanach oraz nasionach). Ponadto przeprowadzono

analizy próbek konopi włóknistych pobranych z plantacji usytuowanych w różnych rejonach Polski, a także próbek konopi „narkotycznych”, które były jednocześnie przedmiotem badań w ekspertyzach opracowywanych w CLK KGP. Otrzymane wyniki zostały poddane zaawansowanej analizie statystycznej w celu oceny możliwości grupowania próbek konopi.

Opracowana metoda jest również wykorzystywana w bieżącej pracy

Wydziału Chemii CLK KGP przy bezpośrednim porównywaniu konopi do wodowych (użytkownik) i porównawczych (hurtownik) pod kątem ich wspólnego pochodzenia. Wyniki z tych etapów pracy autorzy przedstawiają w następnym numerze „Problemy Kryminalistyki”.

BIBLIOGRAFIA

1. M. Kuras, M. Wachowicz: Profilowanie konopi na podstawie składu pierwiastkowego – cz. I (efekty matrycowe), „Problemy Kryminalistyki” 2006, nr 252, s. 21–30.
2. M. Kuras, praca magisterska „Analiza elementarna wybranych narkotyków oraz półproduktu i produktu syntezy siarczany 4-etoksyamfetaminy”, Wydział Chemii UW, Warszawa 2002.
3. M. Wachowicz, M. Kuras: Wstęp do profilowania konopi na podstawie składu pierwiastkowego, „Problemy Kryminalistyki” 2003, nr 240, s. 10–19.
4. M. Wachowicz, M. Kuras: Mineralizacja mikrofalowa jako jedna z technik przygotowania próbek do badań porównawczych, „Problemy Kryminalistyki” 2002, nr 238, s. 8–22.
5. P. van Zoonen, A. Hoogerbrugge, S.M. Gort, H.J. van de Vel, H.A. van't Klooster: Some practical examples of method validation in the analytical laboratory, „Trends in Analytical Chemistry”, 18 (1999), s. 584–593.
6. Eurachem/CITAC Guide: Quantifying uncertainty in analytical measurement, Second edition, 2000.
7. B.N. Taylor, C.E. Kuyatt: Guidelines for evaluating and expressing the uncertainty of NIST measurement results, „NIST Technical Note” 1297, 1994 Edition.
8. M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood: Harmonized guidelines for single – laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report), „Pure Appl. Chem.”, vol. 74, nr 5 (2002), s. 835–855.
9. Eurachem/CITAC Guide: Traceability in chemical measurement, a guide to achieving comparable results in chemical measurement, 2003.
10. Analytical Methods Committee: Uncertainty of measurement: implications of its use in analytical science, „Analyst” 1995, vol. 120, s. 2303–2308.
11. R.J.N. Bettencourt da Silva, M. Filomena, G.F.C. Camões, J. Seabra e Barros: Validation and quality control schemes based on the expression of results with uncertainty, „Analytica Chimica Acta” 1999, 393, s. 167–175.
12. W. Hyk, Z. Stojek: Analiza statystyczna w laboratorium analitycznym, Komitet Chemii Analitycznej PAN, Warszawa 2000.
13. ICP WinLab Bonus Pack, Perkin Elmer.

Tabela 15
Wartości niepewności standardowej (U) i rozszerzonej (U_r) metody oznaczania pierwiastków techniką ICP OES
Values of standard (U) and extended (U_r) uncertainty for element determination method by ICP OES

Pierwiastek	Stężenie [mg/kg]	U [%]	U_r [%]
B	29,6	5,5	11,0
Ba	31,4	5,3	10,6
Ca	11428	2,5	5,1
Cu	7,27	6,4	12,9
Fe	423	2,8	5,6
Mg	2952	2,8	5,6
Mn	184	2,9	5,8
Sr	39,1	5,8	11,6
Zn	31,4	5,2	10,4

metody uzyskano dla pierwiastków, które oznaczano na poziomie śladowym, tj. B, Ba, Cu, Sr i Zn, i mieściła się ona w zakresie 10,4–12,9%. Dla pierwiastków, których stężenia pierwiastków w próbkach konopi są znacznie wyższe, niepewność rozszerzona wynosi od 5,1% dla wapnia do 5,8% dla manganu.