



*A kép illusztráció / Picture is for illustration only
Fotó/Photo: Tolokán Adrienn*

Ambrus Árpád¹, Kamirán Áron Hamow², Kötelesné Suszter Gabriella³,
Németh Anikó³, Solymosné Majzik Etelka²

Érkezett: 2016. augusztus – Elfogadva: 2016. december

Az analitikai standard oldatok pontossága és a névleges koncentrációjuk bizonytalansága

Kulcsszavak: standard, minőségbiztosítás, peszticid, kalibráció

1. Összefoglalás

Az analitikai standard oldatok pontossága a növényvédő szermaradék, de minden más kémiai szennyező mérési eredményét a vizsgálat utolsó lépésében döntően befolyásolja, és a minta komponenseinek meghatározása során a névlegestől eltérő aktuális koncentráció tekintetében folyamatosan szisztematikus hibát eredményez. A legtöbb, eredményeiért felelősséget érző laboratórium ezért különös figyelmet fordít a standard oldatok elkészítésére és tárolására, illetve az oldószer esetleges elpárologásából adódó veszteség pótlására a standard oldatokat tároló eszközök tömegének használat utáni és használat előtti mérése alapján. Tapasztalataink szerint azonban a gyakorlati munkában a szükségesnél sokkal kisebb figyelmet fordítanak az egyes hatóanyagok esetleges bomlásának ellenőrzésére, illetve nem a megfelelő statisztikai módszert alkalmazzák az ellenőrzési eredmények értékelésére. Cikkünkben bemutatjuk két, „jó analitikai gyakorlatot” alkalmazó laboratórium standard készítési módszereit, elemezzük az egyes lépések bizonytalanságát és javaslatot teszünk a legpontosabb standard oldatok elkészítési módjára.

2. Bevezetés

Az Európai Unió tagországi hatósági, illetve nemzeti referencia laboratóriumainak kötelező részt venni a releváns körméréseken (un. proficiency tests). A résztvevő laboratóriumok teljesítményének értékelésére alkalmazott szempontok alapján elért nem megfelelő eredmények okainak feltárára, az Európai Unió gyümölcsben és zöldségben előforduló szermaradékok vizsgálatát segítő referencia Laboratóriuma (European Union Reference Laboratory for Pesticide Residues in Fruit & Vegetables) körvizsgálatot szervezett (EU-RT-FV17). A tesztminta 11 ellenőrzött koncentrációjú növényvédőszer-hatóanyagot tartalmazott tiszta oldószerben (**1. táblázat**). A körvizsgálatba elsősorban a nem megfelelő eredményt jelentő laboratóriumokat vonták be, de minden érdeklődő laboratórium számára biztosították a részvételt (Carmen Ferrer Amate, Universidad De Almería-Edificio de Química, személyes közlemény). Vizsgálati eredményét 36 laboratórium közölte, de esetenként a standardkeverék nem minden komponensére. A vizsgálati eredmények hivatalos értékelése még nem

jelent meg, ezért csak a releváns részeredményeket közöljük az **1. táblázatban**.

Az eredmények azt tükrözik, hogy az unió hatósági és referencia laboratóriumai közül 17-23 vizsgáló szervezet a maximálisan elfogadható eltérésnél (<10%) [1] nagyobb hibával tudta meghatározni a tesztmintában lévő 11 hatóanyag koncentrációját. Ha a relatív különbségeket nézzük, akkor a helyzet még sokkal kritikussabb, mivel a $\leq -50\%$ relatív hibával mérő laboratóriumok a vizsgált minta tényleges szermaradék koncentrációjánál legalább kétszer magasabb szermaradékot fognak mérni és a tételt hibásan fogják nem megfelelőnek minősíteni. A $>+100\%$ relatív standard hiba esetén viszont a tényleges szermaradék koncentráció $\leq 50\%$ -át fogják mérni és jelenteni, mely a határértéket meghaladó szermaradékot tartalmazó tételek forgalomba kerülését teszi lehetővé. A fals „megfelelő” eredmény ennél fogva élelmiszerbiztonsági kockázatot is jelent.

A standard oldatok pontosságának fontosságára tekintettel megvizsgáltuk az európai körmérésekben (proficiency test) kiválóan és jól szereplő [2], két ma-

¹ Nyugalmazott tudományos főtanácsadó; Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal

² Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Növényvédőszer-maradék Analitikai Laboratórium Velence

³ WESSLING Hungary Kft.

gyar laboratórium részleteiben eltérő standard készítési módszereinek a pontosságát és az elkészült standard keverékek névleges koncentrációjának a bizonytalanságát. Jelen közleményünkben bemutatjuk a standard oldatok készítésének módozatait azok reprodukálhatóságát, az oldatok illetve sok-komponensű standard keverékek készítésénél alkalmazott eszközök hatását az elkészített oldatkomponensek koncentrációjának a pontosságára és a névleges koncentráció bizonytalanságára. A standard oldatok komponensei tényleges koncentrációja és a referencia standard oldat koncentrációja közti különbség meghatározására alkalmazható statisztikai módszert külön közleményben tesszük közzé [3].

3. Az analitikai standardok készítésére alkalmazott módszerek

A felhasznált eszközök használata a tesztek végző laboratóriumokban hasonló módon történik. Az eljárást csak az első alkalommal részletezzük. A laboratóriumok az eszközök tisztítására kidolgozott módszer hatékonyságát előzetesen ellenőrzik. Az analitikai standardokat ISO 9001 minősítésű előállítótól vásárolják, akik a standardok tisztaságát tételesen ellenőrzik és igazolják.

1. táblázat. A EU-RT-EV17 körvizsgálat összefoglaló eredménye

Table 1 Summary results of ring test EU-RT-EV17

	Bupirimate	Carbendazim	Diazinon	Difenoconazole	Diflubenzuron	Methoxyfenozide	Pendimethalin	Permethrin	Spinosad	Thiabendazol	Trifloxystrobin
Certified conc. mg/L	5.00	5.00	5.04	18.99	18.96	14.95	4.97	15.05	15.03	19.04	19.00
No. Lab	33	31	36	34	25	30	35	32	30	32	33
Accurate	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rel dif. % Min	-74.2	-86.6	-41.5	-43.7	-40.9	-51.5	-59.8	-54.1	-36.1	-32.5	-36.0
Rel dif. % Max	40.0	164.0	201.6	36.9	129.1	107.4	28.0	73.4	91.0	115.9	117.9
No \geq 10%	17	23	18	19	16	18	19	23	19	16	19

Megjegyzések:

No. Lab: A 36 résztvevő laboratórium közül a jelzett hatóanyagot vizsgálók száma

Accurate: A tesztmintában szereplő komponens koncentrációjával azonos értéket jelentő laborok száma

Rel dif. %: a relatív különbség = $100 \times (\text{jelentett koncentráció} - \text{tényleges koncentráció}) / \text{tényleges koncentráció}$

No \geq 10%: A standard oldatok elfogadható koncentráció eltérését (<10%) [1] meghaladó relatív különbségű eredményt jelentő laboratóriumok száma.

Notes:

No. Lab: Number of the 36 participating laboratories analyzing the indicated active ingredient

Accurate: Number of laboratories reporting a value identical to the concentration of the component in the test sample

Rel. dif. %: relative difference = $100 \times (\text{reported concentration} - \text{actual concentration}) / \text{actual concentration}$

No. \geq 10%: Number of laboratories reporting results with relative differences exceeding the acceptable concentration difference (<10%) [1] of standard solutions.

2. táblázat. Különböző koncentrációjú standard oldatok tipikus tárolási ideje
Table 2 Typical storage times of standard solutions of different concentrations

Koncentráció / Concentration	Tárolási idő / Storage time
200-1000 $\mu\text{g/ml}$	2 év / 2 years
10-200 $\mu\text{g/ml}$	1 vagy 0,5 ¹ év / 1 year or 0.51 year
1-10 $\mu\text{g/ml}$	6 hónap / 6 months
<1 $\mu\text{g/ml}$	1 hét / 1 week
Klórozott szénhidrogének esetében / For chlorinated hydrocarbons	
1-10 $\mu\text{g/ml}$	1 év / 1 year
<1 $\mu\text{g/ml}$	3 hónap / 3 months

Megjegyzés:

¹: bomlékony komponenst tartalmazó keverékeknél

Note:

1: for mixes containing components prone to decomposition

3.1. 'A' laboratórium

A mérőlombikok A-minősítésűek, a centrifugacsöveket az üvegtechnikus milliliterenként 0,1% pontossággal kalibrálta.

A.1: 1 mg/ml koncentrációjú törzsoldat

A mélyhűtőben <-20 °C hőmérsékleten tartott analitikai standardot aktivált szilikagél felett exikatorban szobahőfokra melegítjük, tisztaságának figyelembe vételével naponta kalibrált Mettler AX 205-DR típusú analitikai mérlegen 25 mg-ot mérünk ki 0,01 mg pontossággal 25 ml-es főzőpohárba. A bemért standardot 5 ml acetonnal, vagy más megfelelő oldószerben, oldjuk és 25 ml-es A-kategóriájú mérőlombikba (V_{25}) öntjük. A főzőpoharat 3x5 ml acetonnal átmoszuk és a mérőlombikba öntjük és ha szükséges a tökéletes oldódást ultrahangos fürdőbe helyezéssel biztosítjuk.

A mérőlombikot Pasteur pipettával jelre töltjük, felcímkézzük, megmérjük és a standard naplóban feljegyezzük a kész törzsoldat kódját, tömegét, a felhasznált szilárd standard azonosítóját, tisztaságát, bemért tömegét, a kész törzsoldat koncentrációját, a felhasznált oldószert és a kész törzsoldat végtérfogatát és tömegét, a készítés és lejárat dátumát és a készítő munkatárs rövidített aláírását, szignóját. További felhasználásig az oldatot 7°C alatti hőmérsékleten hűtőben tároljuk.

A 2. táblázatban foglaltuk össze a szokásos tárolási időket, megjegyezve, hogy tapasztalataink alapján a bomlékonyabb komponenseket ennél rövidebb idővel tároljuk.

A.2. 10 µg/ml maximum 100 komponensű standard keverék készítése acetonnal

A hűtőből elővett törzsoldatok tömegét ellenőrizzük, miután hőmérsékletük elérte a szobahőmérsékletet. Amennyiben a párolgásból adódóan tömegeltérés tapasztalható, abban az esetben az utoljára naplóban feljegyzett tömegre állítjuk vissza a törzsoldatot acetonnal. Az 1 mg/ml koncentrációjú törzsoldatokból 500 µl-es Hamilton-fecskendővel (H_{500}) 250 µl-t V_{25} lombikba visszük át. A fecskendőt használat előtt legalább 3-5-ször, a bemérést követően 5-7-szer acetonnal átmoszuk. A törzsoldatok bemérése után a lombikot Pasteur pipettával jelre töltjük, összerázzuk, címkével látjuk el, és a tömegét megmérjük, feljegyezzük.

A.3 10 µg/ml-es néhány komponensű standard oldatok

Eseti vizsgálathoz szükséges standard keveréket az A.2 eljárással készítjük, de a törzsol-

datból a H_{250} fecskendővel 100 µl-t mérünk be egy 10 ml-es csavaros tetejű kalibrált centrifugacsőbe (T_{10}).

A.4 20 µg/ml \leq 50 komponensű standard oldat készítése

A hűtőből kivett egyes törzsoldatokból (A.1) szobahőmérsékletű tömegük ellenőrzése után 1000 µl-es Hamilton fecskendővel (H_{1000}) 1ml-t 50ml-es mérőlombikba (V_{50}) mérünk. A standardok kimérése után a lombik térfogatát Pasteur pipettával jelre állítjuk, összerázzuk felcímkézzük, tömegét lemérjük, feljegyezzük. A 20 µg/ml koncentrációjú, ún. sub-mixekből készítjük a több száz komponensű standard oldatot.

A.5 5 µg/ml 350 komponensű standard oldat készítése

Az A.4 eljárás szerint készített 7 db sub-mixből H_{1000} fecskendővel 1000-1000 µl-t 8 ml-es kalibrált csavaros tetejű centrifuga csőbe (T_8) mérünk. Gyenge levegőárammal <1 ml térfogatra koncentrálnak, majd a 7x1000 µl bemérést megismételjük. Az oldat térfogatát Pasteur pipettával jelre állítjuk. Az így készített standard keverék névleges koncentrációja 5 µg/ml. Ezt a standardkeveréket három hónapig használjuk például a 0,1 mg/kg szintű visszanyerési vizsgálatokhoz.

A.6 1 µg/ml: A 10 µg/ml-es oldatból H_{1000} fecskendővel 1000 µl-t 10 ml-es centrifugacsőben jelig töltünk.

Kalibrációs sorok készítése oldószerváltással 1 µg/ml acetonos oldatból

A.7 0,1 µg/ml: H_{250} fecskendővel 200 µl-t 10 ml-es centrifugacsőbe viszünk, gyenge levegőárammal lefújuk, vagy hagyjuk elpárologni, majd folyadékkromatográfiás eluenssel 2 ml jelig töltjük.

A.8 0,05 µg/ml: H_{250} -es fecskendővel 100 µl-t veszünk ki és A7-hez hasonlóan 2 ml majd folyadékkromatográfiás eluenssel váltjuk.

A.9 0,01 µg/ml: 25 ml-es Hamilton fecskendővel (H_{25}) 20 µl-t kiveszünk és 2 ml folyadékkromatográfiás eluenssel váltjuk.

A.10 0,005 µg/ml: H_{25} -ös fecskendővel 20 µl-t kiveszünk és 4 ml folyadékkromatográfiás eluenssel váltjuk.

Kalibrációs sorok készítése oldószerváltás nélkül 10 µg/ml acetonos oldatból

- A.11** 0,1 µg/ml: a 10 µg/ml standard oldatból H_{25} -tel 20 µl-t kiveszünk és folyadékkromatográfiás eluenssel azonnal a 2 ml-es jelig töltjük.
- A.12** 0,05 µg/ml: a 10 µg/ml standard oldatból H_{25} -tel 10 µl-t kiveszünk és folyadékkromatográfiás eluenssel azonnal a 2 ml-es jelig töltjük.
- A.13** 0,01 µg/ml: az 1 µg/ml standard oldatból H_{25} -tel 20 µl-t kiveszünk és folyadékkromatográfiás eluenssel azonnal a 2 ml-es jelig töltjük.
- A.14** 0,005 µg/ml: az 1 µg/ml standard oldatból H_{25} -tel 10 µl-t kiveszünk és folyadékkromatográfiás eluenssel azonnal a 2 ml-es jelig töltjük.

Megjegyzések:

- 10-µl-nél kisebb térfogatú oldatot nem ajánlott kivenni. Ha más koncentrációkat szeretnénk készíteni, a használandó Hamilton fecskendőt a kimérendő térfogatnak megfelelően választjuk ki.
- Ha oldószerváltás nélkül más koncentrációra van szükségünk, akkor ügyelnünk kell arra, hogy legfeljebb 50 µl acetont maradjon lefújás nélkül a 2 ml térfogatú folyadékkromatográfiás eluensben (a folyadékkromatográfiás eluens legfeljebb 2,5%-nyi acetont tartalmazzon).
- A kalibrációs pontok száma: szűrővizsgálatoknál ≥ 3 ; mennyiségi konfirmálásnál, validálásnál ≥ 5 legyen.

3.2. 'B' laboratórium

Általános gyakorlat:

Az exszikkátorban aktív szilikagél felett szobahőmérsékletűre melegedett analitikai standardot $A \pm 0,04$ pontosságú mérőlombikokba mérjük, amiket előzőleg mosunk, acetonnal átöblítünk, szárítószekrényben szárítunk, majd exszikkátorban 2 napig tárolunk. A pontosan bemérendő tömeget ($\pm 0,01$ mg) az anyag tisztaságának figyelembe vételével határozzuk meg, majd naponta kalibrált analitikai mérlegen bemérjük. A méréseknél, szilárd standard esetében, egyszer használható műanyag spatulát, folyékony anyag esetében automata pipettát alkalmazunk.

A standardot a megfelelő oldószerezrel mérőlombikban feloldjuk (acetont, metanol, hexán stb.), majd ultrahangos fürdőbe helyezve biztosítjuk a tökéletes oldódást, ezt követően pedig az oldat szintjét pipettával jelre állítjuk. Az elkészített standard oldat azonosítására egy nyomtatványt készítünk, amelyben az anyag neve, laboratóriumi azonosító kódja, a bemért tömeg, az oldat kód-száma, a komponensek koncentrációja, az alkalmazott oldószerez, készítési-lejárat dátum, valamint az oldat készítőjének a neve szerepel. Az oldatot teflon bélésű csavaros tetejű barna üvegben tároljuk. A standard oldatra vonatkozó információkkal ellátott címkét helyezünk rá, és megmérjük a teljes tömegét, amit a standard nyilvántartásba bejegyzünk. A referencia standardokat mélyhűtőben $< -20^\circ\text{C}$ hőmérsékleten, a standard oldatokat $\leq 7^\circ\text{C}$ hőfokon hűtőszekrényben tároljuk.

A 2 mg/ml koncentrációjú törzsoldatokat a legtöbb esetben acetonnal készítjük el (az ismert standardok oldhatóságát figyelembe véve), ezzel elkerülve az oldószerváltásokat. Esetenként a megfelelő mennyiségű belső standard mennyiségét is hozzákeverjük, illetve a hangyasavas acetonitril helyett „mátrix match-es” kalibráció esetén előre elkészített vak mátrix oldatot használunk.

A fecskendőket használat után 10-15 alkalommal átmoszuk acetonnal, majd kiszárítjuk az ismételt felhasználáshoz.

B.1 2 mg/ml koncentrációjú törzsoldat

Vegyünk példának egy 99,8% tisztaságú analitikai szilárd standardot, amelyből 50,10 mg-t mérünk be egy 25 ml-es mérőlombikba (V_{25B}), acetonnal felöntjük, majd ultrahangos kádiban teljesen feloldjuk. Ezután az elkészített oldatot a lombikban jelre állítjuk.

B.2 20 µg/ml koncentrációjú ≤ 50 komponensű standard oldat

A B.1 pont szerint elkészített törzsoldatokat a hűtőből elővesszük, 2 órára aktív szilikagél felett exszikkátorban szobahőmérsékletűre melegítjük. H_{100} fecskendővel kiveszünk 100 µl-t, amit egy előre erre a célra elmosott 10 ml-es mérőlombikba ($\pm 0,04$ pontosságú, V_{10B}) fecskendezünk, amibe előzőleg 1 ml acetont töl-

3. táblázat. Az analitikai mérlegek jellemző paraméterei és a mérés bizonytalansága
Table 3 Characteristic parameters of analytical balances and the uncertainty of the measurement

Típus Type	Mérés-tartomány Measurement range	Felbontás Resolution	Reprodukálhatóság Reproducibility	Linearitás Linearity
AX205DR	81/220 g	0,01/0,1 mg	<60 g: 0,04 mg	$\pm 0,08$ mg ¹
XS205DU	81/220 g	0,01/0,1 mg	0,02/0,05 mg	$\pm 0,02$ mg

¹500 mg-os tartományon belül.

¹In the 500 mg range.

tünk. Minden törzsoldatból a koncentrációjának megfelelő térfogatot mérünk a lombikba, majd a lombik tartalmát vortexelve homogenizáljuk és pipettával jelre állítjuk. Az elkészített standard keveréket sötét üvegben mélyhűtőben $\leq -20^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten tároljuk és fél évig használjuk fel.

B.3 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációjú több száz komponensű standard oldat

A B.2 eljárás szerint készített 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oldatokat exsikkátorban szobahőmérsékletűre melegítjük. 500-500 μl -t H_{500} fecskendővel V_{10B} mérőlombikba mérünk, homogenizáljuk, acetonnal jelre töltjük és felcímkézett barna üvegben mélyhűtőben maximum 3 hónapig tartva használjuk fel.

Kalibrációs sorok készítése standard keverékekkel

Kiindulásnak az 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ acetonos mixet használjuk:

- B.4** 0,001 $\mu\text{g}/\text{ml}$: H_{10} fecskendővel kiveszünk 5 μl -t és 5ml hangyasavas acetonitrilrel csavaros kalibrált kémcsőben (T_{5B}) 5ml-es jelre töltünk.
- B.5** 0,002 $\mu\text{g}/\text{ml}$: H_{10} fecskendővel kiveszünk 10 μl -t és hangyasavas acetonitrilrel T_{5B} kémcsőben 5 ml jelre töltünk.
- B.6** 0,005 $\mu\text{g}/\text{ml}$: H_{10} fecskendővel kiveszünk 10 μl -t és hangyasavas acetonitrilrel T_{2B} -ben 2 ml-es jelre töltünk.
- B.7** 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$: H_{10} fecskendővel kiveszünk 10 μl -t és hangyasavas acetonitrilrel T_{2B} -ben 1 ml-es jelre töltünk.
- B.8** 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$: H_{100} fecskendővel kiveszünk 100 μl -t és hangyasavas acetonitrilrel, T_{2B} -ben 1 ml-es jelre töltünk.

4. A standard oldatok készítéséhez alkalmazott kalibrált eszközök névleges pontossága

A laboratóriumok a standard oldatok készítéséhez kalibrált üvegedényeket és 0.01 mg pontosságú analitikai mérlegeket használnak. Az alkalmazott eszközök jellemző paramétereit a 3. 4. és 5. táblázatok tartalmazzák.

Analitikai standardok esetében a tényleges hatóanyagtartalom a megadott intervallumon belül bármelyik értéket felveheti. Ennek megfelelően egyenletes valószínűségű (rectangular) eloszlást tételeztünk fel, és a megadott tisztasági intervallumból a szórást gyök 3-as osztással számítjuk [4]. Ha az analitikai standard specifikációja szerint a tisztasága $99,8 \pm 0,5\%$, akkor a mérési eredmény bizonytalanságának a számításához a szórás (s) 1 mg standard bemérésre vonatkoztatva:

$s = 1 * 0,98 * 0,005 / \sqrt{3} = 2,829E-3$ mg, ami $2,829E-3$ relatív szórásnak (CV) felel meg.

A táblázatokban és a szövegben az 'E' a 10-es alapú hatványra utal: pl. a $2,829E-3 = 2,829 \times 10^{-3}$

A korábbi tapasztalatok alapján a kalibrált üvegeszközök specifikált tűréshatárát, háromszögű eloszlást feltételezve, gyök 6-tal osztva kapjuk meg a szórást. A CV-t pedig a névleges térfogat figyelembevételével számítjuk [4].

A mérlegek reprodukálhatóságát, ami a felbontás és a linearitás kombinációjából adódik, a gyártó által megadott adatok felhasználásával a szórást, normál eloszlást feltételezve 1,96-os osztással, a relatív bizonytalanságot pedig a bemért mennyiség figyelembevételével számítottuk. Például, ha a reprodukálhatóság $\pm 0,04$ mg, akkor 25 mg standard bemérésének relatív bizonytalansága (CV) $8,16E-4$. A relatív bizonytalanságot ismételtetési és laboratóriumon



belüli reprodukálhatósági körülmények között végrehajtott mérések esetén a nemzetközi gyakorlatnak megfelelően, rendre, CV_r és CV_R jelöljük.

$$CV_{Rfill} = \sqrt{CV_{Rexp}^2 - CV_{RT}^2}$$

A **4. táblázatban** feltüntettük a gyártó pontossági specifikációjából számított relatív bizonytalanságot a bemért térfogatra vonatkozóan (CV_{RT}), a reprodukálhatósági mérések eredményéből számolt relatív bizonytalanságot (CV_{Exp}), ami tartalmazza a jelre töltés bizonytalanságát is (CV_{fill}). A CV_{fill} -t a CV_{RT} és CV_{Exp} értékekből számítottuk:

5. Az analitikai standard oldatok készítésének reprodukálhatósága

A bemérések pontosságát a felhasznált eszközök gyártási pontossága, amit a specifikált tolerancia (**4. táblázat**) valamint a bemérést végző analitikus gyakorlata, illetve személyi adottságai (látás, kéz ügyesség, koncentráció képesség) határozzák meg.

4. táblázat. A térfogatmérő eszközök specifikált toleranciája és a nominális térfogat bizonytalansága
Table 4 Specified tolerance of volume measuring equipment and the coefficient of variation of the nominal volume

Eszközök ¹ Equipment ¹	Rövid jel Abbreviation	T	CV_{RT} ⁵	CV_{RExp}	CV_{Rfill}
Mérőlombikok / Volumetric flasks					
25 ml ^A	V ₂₅	±0.03 ml	4.899E-4	7.32E-3	7.30E-3
50 ml ^A	V ₅₀	±0.05 ml	4.082E-4	8.61E-4	7.59E-4
10 ml ^B	V _{10B}	±0.04 ml	1.633E-3	2.87E-3	2.37E-3
25 ml ^B	V _{25B}	±0.04 ml	6.532E-4	NA	
Centrifugacsövek/kémcsövek / Centrifuge tubes/test tubes					
2 ml ^B	T ₂	±0.002 ml	4.082E-4	1.68E-2	1.68E-2
2 ml ^B	T _{2B}	±0.04 ml	8.16E-3	1.61E-2	1.39E-2
1 ml ^B	T _{2B}	±0.04 ml	1.63E-2	3.02E-2	2.54E-2
5 ml ^B	T _{5B}	±0.04 ml	3.27E-3	3.00E-3	$CV_{RExp} < CV_{RT}$
8 ml ^B	T ₈	±0.008 ml	4.182E-4	2.40E-3	2.36E-3
Hamilton fecskendők ⁴ / Hamilton syringes ⁴					
10 µl	H ₁₀	± 1E-4 µl	4.08E-3	1.16E-2	1.16E-2
5 µl	H ₁₀	± 0.5E-4 µl	4.08E-3	1.13E-2	1.05E-2
10 µl	H ₂₅	± 1E-4 µl	4.08E-3	7.31E-3	6.06E-3
20 µl	H ₂₅	± 2E-4 µl	4.08E-3	7.07E-3	5.77E-3
100 µl	H ₁₀₀	± 1.0E-2 µl	4.08E-3	3.14E-3	$CV_{RExp} < CV_{RT}$
200 µl	H ₂₅₀	± 2.0E-4 µl	4.08E-3	4.39E-3	1.61E-3
500 µl	H ₅₀₀	± 5.0E-2 µl	4.08E-3	3.10E-3	$CV_{RExp} < CV_{RT}$
250 µl	H ₅₀₀	± 2.5E-2 µl	4.08E-3	2.71E-3	$CV_{RExp} < CV_{RT}$
100 µl	H ₅₀₀	± 1.0E-2 µl	4.08E-3	5.45E-3	3.61E-3
1000 µl	H ₁₀₀₀	± 0.01 µl	4.08E-3	1.64E-3	$CV_{RExp} < CV_{RT}$

A: grade: ISO szabványnak megfelelő intervallum / A: class A, range according to the ISO standard

Rövid jel: az eszköz jelölése a szövegben / Abbreviation: abbreviation for the equipment in the text

T: a gyártó által specifikált pontossági intervallum / T: accuracy range specified by the manufacturer

CV_{RT} : A „T” értéknek megfelelő relatív bizonytalanság jelre töltés esetén / CV_{RT} : coefficient of variation corresponding to the value „T” when filling to the mark

CV_{RExp} : a 10 ismételt reprodukálhatósági mérés relatív bizonytalansága / CV_{RExp} : coefficient of variation of 10 repeated reproducibility measurements

CV_{Rfill} : a jelre töltés bizonytalansága / CV_{Rfill} : coefficient of variation of filling to the mark

1: A bemért térfogatra vonatkozó adatok / 1: Data for the volume measured.

2: A Laborex eszközök garantált pontossága ±0.04 ml / 2: The guaranteed accuracy of Laborex equipment is ±0.04 ml.

3: 0.1% pontosságú pipettoral egyedileg kalibrálva / 3: Individually calibrated using a pipettor of 0.1% accuracy.

4: Hamilton fecskendők: gyártó által garantált pontosság ±1% / 4: Hamilton syringes: accuracy guaranteed by the manufacturer is ±1%.

5: A kimért térfogatra vonatkozik / 5: It refers to the measured volume

Az ismételhetőségi és reprodukálhatósági vizsgálatokat azok a munkatársak végezték, akik a standardokat rendszeresen készítik. A mérések a **2. táblázatban** feltüntetett típusú, naponta kalibrált Mettler mérlegekkel 0,01 mg pontossággal történtek. Az ismételhetőség meghatározása azonos eszköz 10-szer ismételt használatával történt. A méréseket 24-25°C hőmérsékleten végeztük.

5.1. Ismételhetőség meghatározása

Tömegmérés:

A mérleget a mérés előtt nulláztuk, a mérendő tiszta száraz edényt a mérlegre helyeztük, és 5 tizedes pontossággal feljegyeztük a tömegét. Az edényt minden mérés után levettük a mérlegről, a mérleget nullázzuk, majd az edényt fogóval visszahelyeztük a mérleg serpenyőjére és tömegét ismételtelen megmértük. Az eljárást 10-szer egymás után megismételtük és feljegyezzük a mérlegszoba hőmérsékletét.

Térfogatmérés:

A tesztelendő tiszta és exszikkátorban szárított eszköz nettó súlyát megmértük, majd desztillált vízzel Pasteur pipetta segítségével pontosan jelig töltöttük, az edény tömegét ismételtelen megmértük, a mérési eredményeket Excel munkafüzetben rögzítettük. A bemért víz tömegét a súlykülönbségekből számítottuk.

A bemért víz egy részét pipettával kivettük ügyelve arra, hogy a mérőlombik vagy a tesztcső fala ne legyen vizes, majd az edényt ismételtelen jelig töltöttük és megmértük a tömegét.

5.2. Reprodukálhatóság (CV_R) meghatározása

A térfogatmérés reprodukálhatóságának meghatározására a laboratórium kalibrált mérőlombikjai, osztott centrifugacsövei vagy kémcsövei közül 10-10 darabot 24-25°C hőmérsékletű desztillált vízzel jelig töltöttünk, és a bemért víz mennyiségét 0,01 mg pontossággal megmértük. A felhasznált térfogatmérő eszközök tényleges átlagos térfogatát a 10 ismétlésben a jelre töltésre felhasznált desztillált víz átlagos tömegéből és sűrűségéből számítottuk. Az átlagosnak tekintett 24,5°C hőmérsékletű desztillált víz sűrűségét 0.9971749 g/ml értékkel számítottuk [5].

Az elkövetett hiba gyakorlatilag jelentéktelen, mivel a desztillált víz sűrűsége 24°C és 25°C-on, rendre, 0,9972994 g/ml és 0,9970480 g/ml. A 25 ml-es mérőlombik jelre töltésekor kapott átlagos tömegből számított térfogat 24,89410 ml illetve 24,88844 ml, ami 0,025%-os különbséget jelent.

Az eredményeket a **6. táblázatban** foglaltuk össze. A táblázatban az egyes eszközöket a standard oldatok készítésénél feltüntetett kóddal jelöltük. Tekintve, hogy a munkánk eredményeként számoljuk az elkészült standard oldatok komponenseinek névleges koncentrációjának a kombinált bizonytalanságát, valamint a súlymérésen alapuló koncentrációkat, a táblázatban a számítások elvégzéséhez szükséges adatokat összesítettük. A számításokhoz felhasznált mérési sorozatokat a 6. táblázatban * jelzi.

6. Az elkészített analitikai standard oldatok pontossága és a névleges koncentrációjuk bizonytalansága

Az alábbiakban az ismert tisztaságú standard bemért mennyiségét milligrammban, a térfogatokat milliliterben adjuk meg. Az egyszerűség kedvéért a számításban 100%-os tisztaságot tételezünk fel, mert a standard bemérésénél a százalékos tisztaságot egyszerűen figyelembe lehet venni. Ha például a bemérendő analitikai standard 98% tisztaságú, akkor a 25 mg névleges tömeg helyett ~25,51 g-ot mérünk be.

Megjegyezzük, hogy nem szükséges a célzott tömeget pontosan (0,00001g) bemérni, mert az nagy idővesztéssel, anyagvesztéssel és a tiszta standard esetleges szennyeződésével járhat, ugyanis az elkészített standard oldatok névleges koncentrációját a ténylegesen pontosan bemért ($\pm 0,00001g$) tömeg figyelembevételével egyszerűen számítani lehet.

Az elkészített standard oldatok súlymérésen alapuló koncentrációjának minimum, átlagos és maximális értékét, a legnagyobb bizonytalanságot eredményező, 10 ismételt mérés megfelelő adataiból számítottuk. Az eredményeket a **7. táblázatban** foglaltuk össze. A számítás menetét az 'A' laboratóriumban alkalmazott módszerek alapján mutatjuk be.

5. táblázat. Az analitikai standardokból és a bemérésükből származó bizonytalanság
Table 5 Coefficient of variation due to analytical standards and their measurements

Analitikai standard tisztasága ¹ / Purity of analytical standard ¹	Specifikáció Specification	CV_R
P \pm 0.2%	P=1 \pm 0.002	1.132E-3
P \pm 0.5%	P=1 \pm 0.005	2.829E-3
Tömeg mérés bizonytalansága / Coefficient of variation of mass measurement		
AX205DR 25 mg bemérésekor / AX205DR, when measuring 25 mg	± 0.04 mg	8.16E-4
XS205DU 50 mg bemérésekor / XS205DU, when measuring 50 mg	± 0.05 mg	5.10E-4

¹: gyártó specifikációjától függően a standard tisztasága $\pm 0,2\%$ vagy $\pm 0,5\%$ tűréshatáron belül van

¹: Depending on the specification of the manufacturer, the tolerance limits for standard purity are $\pm 0.2\%$ or $\pm 0.5\%$.

6. táblázat. A standard oldatok készítésekor alkalmazott műveletek ismételhetősége és reprodukálhatósága tömegmérés alapján.
Table 6. Repeatabilities and reproducibilities of the operations used when preparing standard solutions, based on mass measurements.

Eszköz Equipment	Mért tárgy Object measured	Mért tömeg [g] / Measured mass [g]			Ismételhetőség Repeatability CV _r	Reprodukálhatóság Reproducibility CV _R
		Min	Átlag Average	Max		
Tömegmérés / Mass measurement						
AX205DR	0.025 g ¹	0.02485	0.02504	0.02514		3.913E-03
	V ₂₅ (üres) / (empty)	22.88572	22.85577	22.88585	1.808E-6	
	T _{10A} (üres) / (empty)	23.17721	23.17744	23.17765	7.616E-6	
XS205DU	~50 mg ¹	0.04992	0.05000	0.05016		2.5451E-2
	V _{25B}	21.87202	21.872023	21.87203	1.0097E-8	
	T _{10B}	5.26156	5.26157	5.26158	1.49378E-7	
Térfogatmérés 'A' laboratórium / Volume measurement, laboratory 'A'						
H ₁₀₀₀	1000 µl ^a	1.00896	1.011305	1.01359		1.3289E-3
	1000 µl ^{a*}	1.00616	1.009013	1.001109		1.6403E-3
	1000 µl ^{a1}	1.00633	1.00883	1.01734		1.9211E-3
H ₅₀₀ *	250 µl ^a	0.25132	0.252146	0.25347		2.7128E-3
H ₂₅₀ *	100 µl ^a	0.10289	0.103559	0.10448		5.4498E-3
H ₂₅₀	100 µl	0.10065	0.101048	0.10194		3.5966E-3
H ₂₅₀ *	200 µl	0.20071	0.201655	0.20373		4.3870E-3
H ₂₅ *	10 µl	0.00981	0.010703	0.01388		1.0675E-1
H ₂₅	10 µl	0.00967	0.009771	0.00992		7.3080E-3
H ₂₅	20 µl	0.20071	0.201655	0.20373		4.387E-3
H ₂₅ *	20 µl	0.01956	0.019733	0.02003		7.0667E-3
V ₂₅ *	25 µl jelre ^b to the mark ^b	24.86175	24.96213	25.47811		7.320E-3
V ₅₀ *	50 µl jelre ^b to the mark ^b	49.73000	49.78170	49.84881		8.6148E-4
T ₁₀	10 µl jelre ^b to the mark ^b	9.90038	9.94585	9.98136		2.346E-3
T ₁₀ *	2 µl jelre ^b to the mark ^b	1.93346	1.98738	2.05567		1.684E-2
T ₁₀	2 µl jelre ^b to the mark ^b	1.96405	1.99446	2.05103		1.316E-2
T ₁₀ *	4 µl jelre ^b to the mark ^b	3.94755	3.98235	4.05248		7.549E-3
T ₈ *	8 µl jelre ^b to the mark ^b	7.94166	7.96199	7.98609		2.398E-3
Térfogatmérés 'B' laboratórium / Volume measurement, laboratory 'B'						
V _{25B} *	25 µl jelre ^c to the mark ^c	24.91319	24.91322	24.91324	2.4078E-8	6.532E-4 ^d
V _{10B} *	10 µl jelre ^b to the mark ^b	9.9319	9.9772	10.01874		2.8745E-3
V _{10B}	10 µl jelre ^b to the mark ^b	9.6691	9.8635	10.0101		1.2795E-2

Eszköz <i>Equipment</i>	Mért tárgy <i>Object measured</i>	Mért tömeg [g] / <i>Measured mass [g]</i>			Ismételhetőség <i>Repeatability</i> CV _r	Reprodukálhatóság <i>Reproducibility</i> CV _R
		Min	Átlag <i>Average</i>	Max		
H ₁₀₀ *	100 µl	0.09954	0.09998	0.1006		3.1393E-3
H ₅₀₀ *	500 µl	0.49632	0.49960	0.501		3.0980E-3
H ₁₀ *	5 µl	0.00482	0.004955	0.00502		1.1347E-2
H ₁₀ *	10 µl	9.890E-3	9.952E-3	1.001E-2		3.9857E-3
H ₁₀	10 µl	9.89E-3	9.967E-3	0.01001		3.2785E-3
T _{10B} *	10 µl jelre ^c <i>to the mark^c</i>	10.03616	10.03622	10.03629	4.2586E-7	1.633E-3 ^d
T _{5B}	5 µl jelre ^b <i>to the mark^b</i>	4.9608	4.98735	5.00244		2.56057E-3
T _{5B} *	5 µl jelre ^b <i>to the mark^b</i>	4.9542	4.9752	5.00245		3.0E-3
T _{2B} *	2 µl jelre ^b <i>to the mark^b</i>	1.9914	2.0337	2.09787		1.6087E-2
T _{2B} *	1 µl jelre ^b <i>to the mark^b</i>	0.9824	1.0180	1.0898		3.0173E-2

Magyarázat:

1: 25 mg konyhasó bemérése „ahogy sikerül” nem törekedve az egészen pontos bemérésre

^a: 10-szeres ismétléssel

^{a1}: 70-szeres ismétléssel 7-szer 10 db centrifugacsőbe

^b: 10 különböző lombikba, centrifugacsőbe desztillált víz bemérése jelre töltéssel

^c: 1 db térfogatmérő eszköz 10-szer jelre töltése

^d: A 25 ml-es lombik ±0,04 ml specifikációjából (**4. táblázat**) és az egy lombik ismételt jelre töltésének relatív bizonytalanságából (Cv_r) számítva (a közelítés megengedhető, mert a CV_r közel két nagyságrenddel kisebb, mint a mérőlombik specifikációjából számolt bizonytalanság)

Note:

1: weighing 25 mg of table salt „as well as can be”, not striving for very accurate weighing

^a: 10 repetitions

^{a1}: 70 repetitions, 7 times in 10 centrifuge tubes

^b: weighing of distilled water into 10 different flasks or centrifuge tubes, with filling to the mark

^c: filling 1 volume measurement equipment to the mark 10 times

^d: calculated from the ±0.04 ml specification of the 25 ml flask (Table 4) and from the coefficient of variation (Cv_r) of the repeated filling to the mark of the same flask (this approximation is permissible, because Cv_r is nearly two orders of magnitude smaller than the uncertainty calculated from the specification of the volumetric flask)



A kép illusztráció / Picture is for illustration only
Fotó/Photo: Tolokán Adrienn

6.1. Az 'A' laboratórium standard készítési mód-szere

Az alkalmazott eljárásokat a 2.1. pontban ismertettük, ahol feltüntettük a bemérésekhez alkalmazott eszközöket jelölő szimbólumokat.

$$A1: 1 \text{ mg/ml törzsoldat: } C_{A1} = \frac{m \cdot p}{V_{25}} = \frac{25 \cdot 1}{25} = \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

A törzsoldat relatív bizonytalansága CV_{A1} :

$$C_{A1} = \sqrt{CV_{w25}^2 + CV_P^2 + CV_{v25}^2}$$

Ahol, m = az ismert tisztaságú standard bemért mennyisége milligrammban; p = a standard tisztasága tömeghányadban kifejezve; V_{25} a 25 ml-es mérőlombikot jelöli. A 25 mg beméréseinek relatív bizonytalansága $CV_{w25} = 8,163E-4$; a standard tisztaságának relatív bizonytalansága 25 mg bemérés esetén $2,829E-3$; a 25 ml-es mérőlombik jelig töltése $CV_{v25} = 7,32E-3$

$$CV_{A1} = (0,0008163^2 + 0,002829^2 + 0,00732^2)^{1/2} = 0,00789 = 0,789\%$$

Tényleges (min-max) koncentráció: 1,004372 mg/ml (0,9840-1,00842 mg/ml).

A2: 10 µg/ml hígítás:

$$C_{A2} = C_{A1} * \frac{0,25H_{500}}{25V_{25}} = 0,01C_{A1}$$

$$C_{A1} = \sqrt{CV_{w25}^2 + CV_P^2 + CV_{V25}^2 + CV_{H0,25}^2 + CV_{V25}^2}$$

$$C_{A2} = \sqrt{CV_{A1}^2 + CV_{H0,25}^2 + CV_{V25}^2}$$

A3: 10 µg/ml hígítás:

$$C_{A3} = C_{A1} * \frac{0,1H_{250}}{10T_{10}} = 0,01C_{A1}$$

$$C_{A2} = \sqrt{CV_{A1}^2 + CV_{H00}^2 + CV_{T10}^2}$$

A4: 20 µg/ml sub-mix:

$$C_{A4} = C_{A1} * \frac{1H_{1000}}{50V_{50}} = C_{A1} * 0,02$$

$$CV_{A4} = \sqrt{CV_{A1}^2 + CV_{H1000}^2 + CV_{V50}^2}$$

A számított koncentráció egy-egy komponensre vonatkozik, és a beméréstől függően változik. A CV_{A4} minden komponensre vonatkozik.

A5: 5 µg/ml 350 komponensű egyesített mix:

$$C_{A5} = C_{A4} * \frac{1H_{1000} + 1H_{1000}}{V_{T8}} = C_{A4} * 0,25$$

$$C_{2 \times 1 \text{ ml}} = \frac{\sqrt{2 \times SD_{H1000}}}{2}$$

Az 1000 µl bemérés szórását a 7×10 -szer megismételt mérés átlagos varianciájának a négyzetgyökéből számítottuk: $SD_{\text{ave}} = 2,0021E-3$. Tekintve, hogy egy

A4-es sub-mixből 2×1 ml-t mértünk be, a CV értékét, 1 ml standard oldatra vonatkoztatva, a számított szórásból 2-vel osztva kapjuk: $CV_{2 \times 1 \text{ ml}} = 1,4157E-3$

$$CV_{A5} = \sqrt{CV_{A4}^2 + CV_{2 \times H1000}^2 + CV_{T8}^2}$$

6.1.1. Kalibrációs sorok készítése oldószerváltással

A bepárlásból adódó bizonytalanságot a bemért kis tömegek aránytalanul nagy mérési bizonytalansága miatt nem vettük figyelembe. A pontos eredmény érdekében a lefúvatást csak igen gyenge levegőárammal szabad elvégezni.

A6: 1 µg/ml hígítás:

$$C_{A6} = C_{A3} * \frac{1H_{1000}}{10T_{10}} = 0,1C_{A3}$$

$$CV_{A6} = \sqrt{CV_{A3}^2 + CV_{H1000}^2 + CV_{T10}^2}$$

A7: 0,1 µg/ml:

$$C_{A7} = C_{A6} * \frac{0,2H_{250}}{2T_{10}} = 0,1C_{A6}$$

$$CV_{A7} = \sqrt{CV_{A6}^2 + CV_{H200}^2 + CV_{T2}^2}$$

A8: 0,05 µg/ml:

$$C_{A8} = C_{A6} * \frac{0,1H_{250}}{2T_{10}} = 0,05C_{A6}$$

$$CV_{A8} = \sqrt{CV_{A6}^2 + CV_{H100}^2 + CV_{T10,2}^2}$$

A9: 0,01 µg/ml:

$$C_{A9} = C_{A6} * \frac{0,02H_{25}}{2T_{10}} = 0,01C_{A6}$$

$$CV_H = \sqrt{CV_{A6}^2 + CV_{H20}^2 + CV_{T10,2}^2}$$

A10: 0,005 µg/ml:

$$C_{A10} = C_{A6} * \frac{0,02H_{25}}{4T_{10}} = 0,005C_{A6}$$

$$CV_1 = \sqrt{CV_{A6}^2 + CV_{H20}^2 + CV_{T10,4}^2}$$

6.1.2. Kalibrációs sorok készítése oldószerváltás nélkül

A11: 0,1 µg/ml:

$$C_{A11} = C_{A2} * \frac{0,02H_{25}}{2T_{10}} = 0,01C_{A2}$$

$$CV_{A11} = \sqrt{CV_{A2}^2 + CV_{H20}^2 + CV_{T10,2}^2}$$

A12: 0,05 µg/ml:

$$C_{A12} = C_{A2} * \frac{0,01H_{25}}{2T_{10}} = C_{A2} * 0,005$$

$$CV_{A12} = \sqrt{CV_{A2}^2 + CV_{H20}^2 + CV_{T10\ 2}^2}$$

A13: 0,01 µg/ml:

$$C_{13} = C_{A6} * \frac{0.02H_{25}}{2T_{10}} = 0.01C_{A6}$$

$$CV_{A13} = CV_{A9} = \sqrt{CV_{A6}^2 + CV_{H20}^2 + CV_{T10\ 2}^2}$$

A14: 0,005 µg/ml:

$$C_{A14} = C_{A6} * \frac{0.01H_{25}}{2T_{10}} = 0.005C_{A6}$$

$$CV_{A14} = \sqrt{CV_{A6}^2 + CV_{H100}^2 + CV_{T10\ 2}^2}$$

A14 standard oldat koncentráció számítása részleteiben

$$C_{A14} = \frac{25_w * I_p * 0.1H_{250} * I_{H1000} * 0.01H_{25}}{25_{v25} * 10_{T10} * 10_{T10} * 2_{T10}}$$

6.2. 'B' laboratórium analitikai standard készítési eljárásai

Az alkalmazott eljárásokat a **2.2 pontban** ismertettük. A standard oldatok tényleges koncentrációjának, valamint annak relatív bizonytalanságának számítása az **5.1. pontban** ismertetett eljárással történt. Az analitikai standard tisztaságának bizonytalansága az 'A' laboratóriumnál alkalmazottal azonosan $CV_p = 2,829E-3$. Az 50 mg bemérésének relatív bizonytalansága (**5. táblázat**) $5,10E-4$.

B1: 2 mg/ml törzsoldat $C_{B1} = \frac{m * p}{V_{25}} = \frac{50 * 1}{25} = \frac{2mg}{ml}$

$CV_{B1}:$ $CV_{B1} = \sqrt{CV_{w50}^2 + CV_P^2 + CV_{V25}^2}$

B2: 20 µg/ml $C_{B2} = C_{B1} \frac{0.1H_{100}}{10V_{10B}}$

B3: 1 µg/ml $C_{B3} = C_{B2} \frac{0.5H_{500}}{10V_{10B}}$

B4: 0,001 µg/ml $C_{B5} = C_{B3} \frac{0.005H_{10}}{5T_{5B}}$

B5: 0,002 µg/ml $C_{B6} = C_{B3} \frac{0.01H_{10}}{5T_{5B}}$

B6: 0,005 µg/ml $C_{B7} = C_{B3} \frac{0.01H_{10}}{2T_{5B}}$

B7: 0,01 µg/ml $C_{B8} = C_{B3} \frac{0.01H_{10}}{1T_{2B}}$

B8: 0,1 µg/ml $C_{B10} = C_{B3} \frac{0.1H_{100}}{1T_{2B}}$

B6 0,005 µg/ml: $C_{B6} = \frac{50 * 1_p * 0.1H_{10} * 0.5H_{500} * 0.01H_{10}}{25_{v25B} * 10_{v10} * 10_{v10} * 5_{TB}}$

7. Az eredmények értékelése

A mérésekhez alkalmazott eszközök alkalmazásakor a specifikációjukból számított relatív bizonytalanságokat a **3. és 4. táblázatokban** tüntettük fel.

A 10 ismétlésben súlymérésen alapuló reprodukálhatósági vizsgálatok eredményét a **7. táblázatban** foglaltuk össze. A minimális és maximális koncentráció számítása:

$$C_{min} = \frac{m_{min}}{v_{max}} \text{ illetve } C_{max} = \frac{m_{max}}{v_{min}}$$

képletekkel történt. Ahol az m_{min} és m_{max} illetve v_{min} és v_{max} a 10 ismétlés során mért minimális és maximális tömeget illetve a desztillált víz sűrűségével számított [m_{xp}] térfogatot jelöli.

A célzott koncentráció bizonytalanságát az alkalmazott eszközök reprodukálhatósági mérési eredményeiből számított CV_R értékekkel számítottuk az **6.1. szakaszban** közölt képletek alapján.

A C_{max} és C_{min} valamint a célzott névleges koncentráció, C_0 , relatív különbségének [D] számítását:

$$\Delta_{C_{imax}} = \frac{C_{imax} - C_{io}}{C_{io}} \text{ illetve } \Delta_{C_{imin}} = \frac{C_{imin} - C_{io}}{C_{io}}$$

az átlagos koncentráció és a célzott koncentráció relatív különbségének számítását

$$\bar{\Delta}_{Ci} = \frac{C_{io} - \bar{C}_i}{\bar{C}_{io}}$$

képletek alapján végeztük, ahol 'i' a különböző névleges koncentrációkat jelöli.

Az átlagos mért koncentrációk és a célzott koncentrációk relatív különbsége (Δ_{Ci}) az A laboratóriumban általában negatív eltérést mutatott $\approx 10\%$. A B laboratóriumban az eltérés pozitív irányú ($< 4,1\%$) volt. Az eredmények megbízhatósága szempontjából fontosabb információt ad a 10 ismételt mérésből kapott legkisebb és legmagasabb koncentrációk és a névleges koncentrációk relatív különbsége (Δ_{Ci}), amely az alacsony koncentrációjú kalibrációra használt oldatok esetén mindkét laboratóriumban kis mértékben meghaladta a 10%-ot. Ekkora eltérés a standard oldatok pontosságában nem fogadható el, és indokoltá teszi a standard oldatok készítését tömegmérés alapján, mivel az ilyen esetben az elkészített oldat koncentrációja sokkal pontosabban ismert.

A méréssel készített standard oldatok relatív bizonytalansága az alacsony koncentrációjú standard oldatoknál tipikusan 2-3% körül alakult, ami elsődlegesen a jelre töltés bizonytalanságából (CV_{Rfill}) adódik (**4. táblázat**). A 2-3% relatív bizonytalanság határesetnek tekinthető, ugyanis a lineáris regresszió, amit a kalibrációs egyenesek számításánál a szoftverek alkalmaznak, akkor ad helyes eredményt, ha a kalibráló oldatok bizonytalansága elhanyagolható ($< 0,3$) a

kapott jelek relatív ismételtetőségéhez viszonyítva. Összehasonlításként, rutin alkalmazási körülmények között az 'A' laboratórium LC/MS-MS méréseinek a vizsgálatosorozat (batch) elején és végén mért jelekből számolva egy 10 napos intervallumban az átlagos jel reprodukálhatóság 1,8% volt.

Az egyes lépések varianciájának százalékos hozzájárulást az elkészített oldat bizonytalanságához az A.14 (0,005 µg/ml) és a B.6 (0,005 µg/ml) kalibráló oldatok példáján az **1 és 2. ábrák** szemléltetik.

Az A.14 és B.6 standard oldat készítési eljárás teljes varianciája 4,34E-4 és 6,96E-5.

Az **1. ábra** mutatja, hogy az A.14 standard oldat készítés utolsó lépésében a 10 ml-es osztott centrifugacső 2 ml jelre töltése a legbizonytalanabb lépés és közel 64%-kal járul hozzá a standard oldat teljes bizonytalanságához. E lépés nagyobb pontosságot

biztosító eszköz alkalmazásával javíthatja a kombinált bizonytalanságot.

A B6-os kalibráló oldat lépéseinek a hozzájárulása a kombinált bizonytalansághoz egyenletesebb. Valamivel jobb eredmény a 10ml oldat kimérése ismételtetőségének a javításával érhető el.

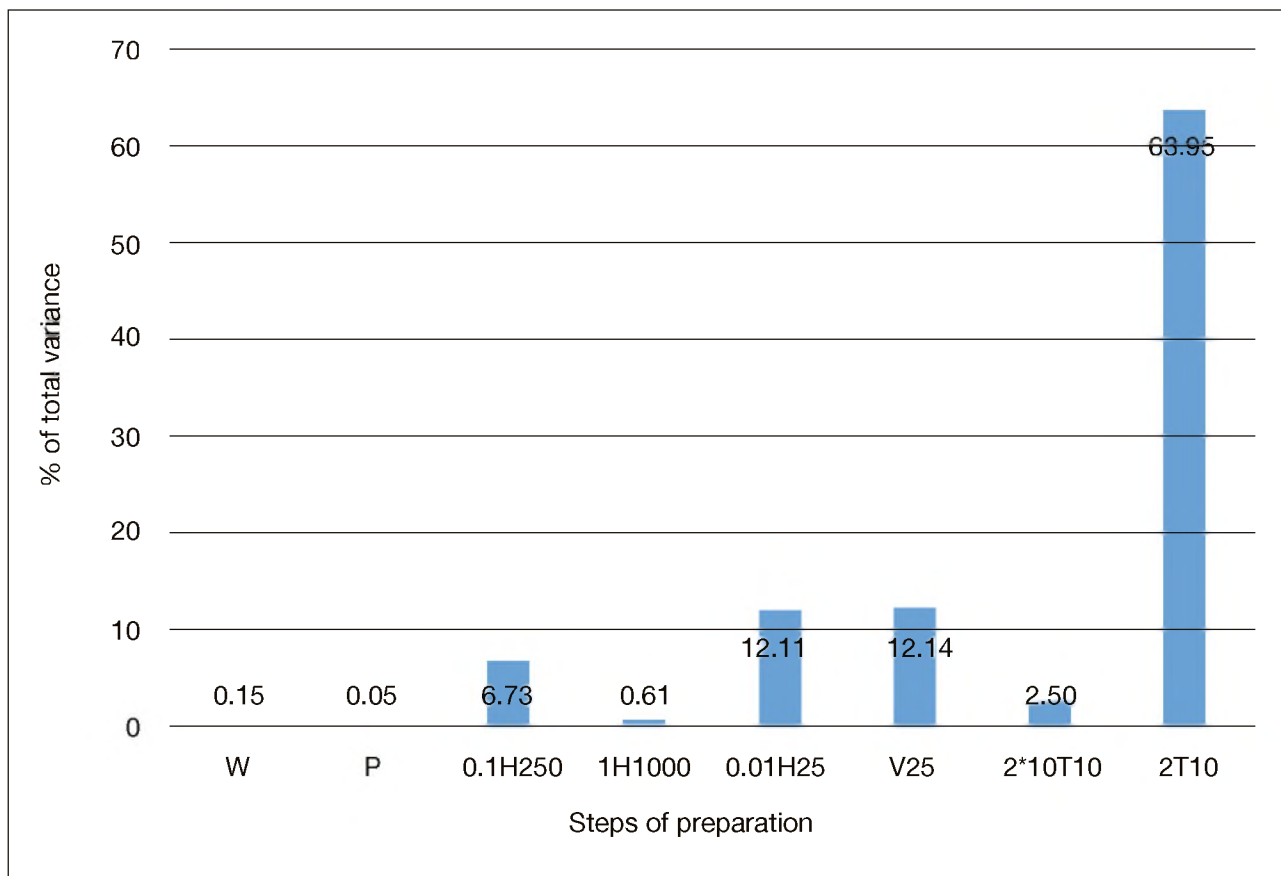
A mérőeszközök térfogatának specifikációjából adódó bizonytalansági értékek közelítőleg fele vagy kisebb volt a jelre töltés bizonytalanság értékeinek, s ennek megfelelően csak kis mértékben járultak hozzá az elkészített standard koncentrációjának a bizonytalanságához. Néhány esetben azonban a CV_{RT} nagyobb volt, mint a CV_{Exp} , következésképpen az eszköz kalibrációjának a pontatlansága a bizonytalanság fő forrása. Ha a standard oldatok készítése tömegmérés alapján történik, akkor ez a bizonytalansági forrás kiküszöbölődik.

7. táblázat. A célzott és tényleges standard koncentrációk 10 ismételt mérés alapján¹
Table 7. Target and actual standard concentrations based on 10 repeat measurements¹

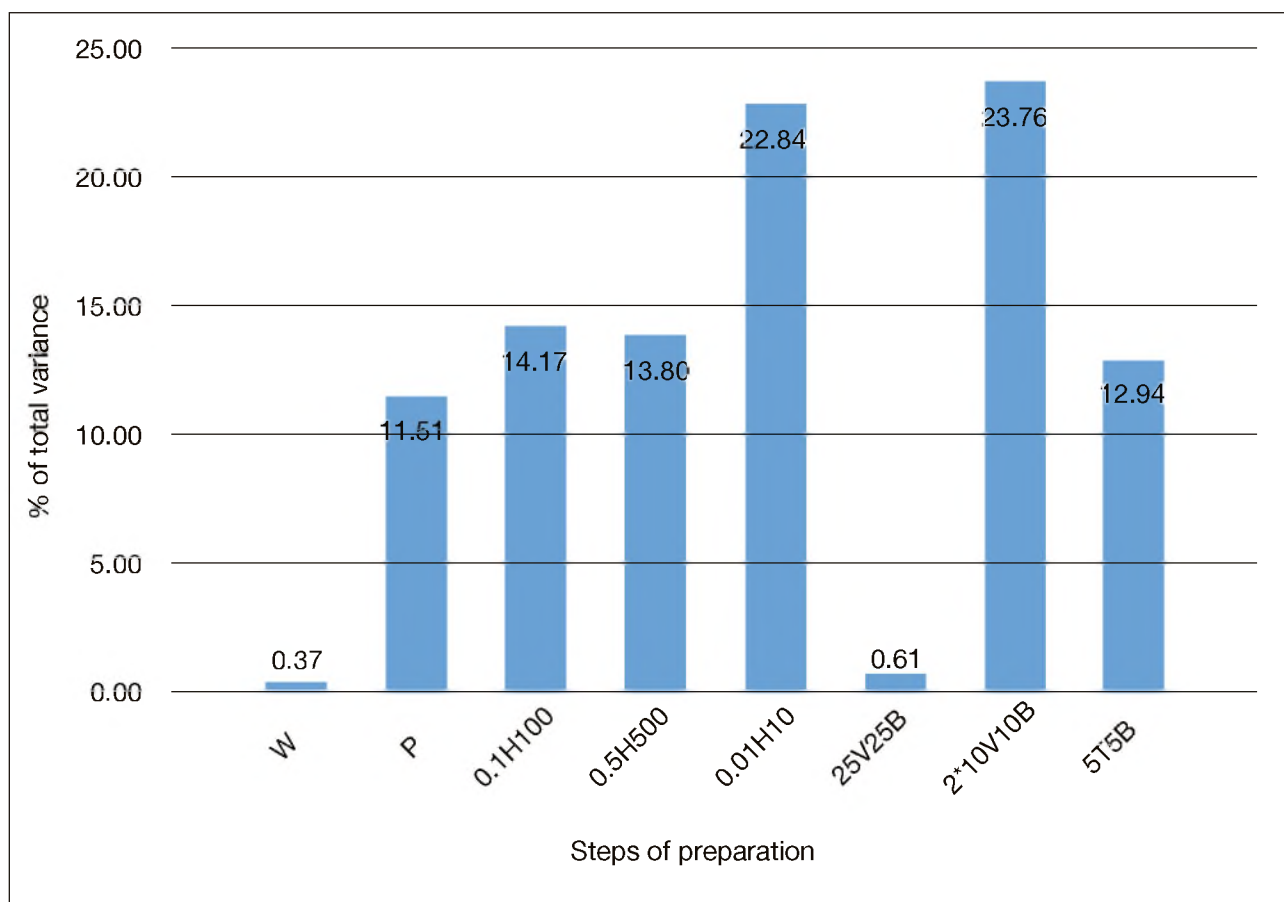
Standard kód Standard code	C_0 [mg/ml]	CV_R	Tényleges koncentráció [mg/ml] Actual concentration [mg/ml]			$\bar{\Delta}_{Ci}$ %	$\Delta_{Ci_{min}}$ %	$\Delta_{Ci_{max}}$ %
			C_{min}	Átlag	C_{max}			
A1	1	0.0079	0.9840	1.0044	1.0084	-0.44	-1.60	0.84
A2	0.01	0.0111	0.0097	0.0101	0.0103	-1.45	-2.93	2.81
A3	0.01	0.0099	0.0101	0.0104	0.0106	-4.28	1.44	6.42
A4	0.02	0.0081	0.0199	0.0204	0.0206	-1.77	-0.69	2.77
A5	0.005	0.0086	0.0050	0.0052	0.0053	-3.16	0.11	5.32
A6	0.001	0.0103	0.0010	0.0011	0.0011	-5.80	2.25	7.61
A7	1E-4	0.0202	9.98E-5	1.07E-4	1.13E-4	-7.35	-0.16	13.4
A8	5E-5	0.0204	5.12E-5	5.51E-5	5.82E-5	-10.26	2.36	16.3
A9	1E-6	0.0209	9.73E-6	1.05E-5	1.11E-5	-5.05	-2.71	11.5
A10	5E-6	0.0146	4.94E-6	5.24E-6	5.46E-6	-4.85	-1.29	9.20
A11	1E-4	0.0206	9.24E-5	1.00E-4	1.07E-4	-0.73	-7.64	6.51
A12	5E-5	0.0214	4.57E-5	4.99E-5	5.27E-5	0.24	-8.68	5.50
A13	1E-5	0.0209	9.73E-6	1.05E-5	1.11E-5	-5.05	-2.71	11.5
A14	5E-6	0.0210	4.81E-6	5.20E-6	5.52E-6	-4.03	-3.80	10.4
B1	2	0.0029	2.0013	2.0013	2.0013	-0.06	0.06	0.06
B2	0.02	0.0052	0.0199	0.0199	0.0203	0.32	-0.58	1.36
B3	0.001	0.0067	9.85E-4	9.98E-4	1.02E-3	0.17	-1.50	2.25
B4	1E-6	0.0135	9.49E-7	9.94E-7	1.03E-6	0.57	-5.09	3.61
B5	2E-6	0.0137	1.89E-6	1.99E-6	2.06E-5	4.13	-2.63	3.30
B6	5E-6	0.0209	4.50E-6	4.87E-6	5.12E-5	2.51	-7.13	2.80
B7	1E-5	0.0330	8.67E-6	9.73E-6	1.04E-4	2.66	-10.6	4.19
B8	1E-4	0.0310	9.00E-5	9.80E-5	1.05E-4	1.95	-10.0	4.71

¹A táblázat áttekinthetősége érdekében a kerekített értékek kerültek feltüntetésre, de a számítások az eredeti értékekkel történtek.

¹For easier overview of the table, rounded values are shown, but calculations were performed using the original values.



1. ábra. Az A14 standard oldat lépéseinek a hozzájárulása a 0,005 µg/ml koncentráció bizonytalanságához
 Figure 1 Contributions of the preparation steps of standard solution A14 to the uncertainty of the concentration of 0.005 µg/ml



2. ábra. A B6 standard oldat lépéseinek a hozzájárulása a 0,005 µg/ml koncentráció bizonytalanságához
 Figure 2 Contributions of the preparation steps of standard solution B6 to the uncertainty of the concentration of 0.005 µg/ml

A referencia anyagok tisztaságának bizonytalansága csak a törzsoldat koncentrációjának a bizonytalanságához járul hozzá. A 0,01 mg pontosságú mérés bizonytalansága nagyságrenddel alacsonyabb, mint a beméréshez használt mérőlombikoké, ezért a több lépcsőben készített hígítások pontosságát és bizonytalanságát gyakorlatilag nem befolyásolja.

Hangsúlyoznunk kell, hogy 0,1 mg pontosságú mérleg a standard oldatok 2. fejezetben ismertetett készítéséhez nem használható.

8. Javaslatok

Eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy a standard oldatokat sokkal pontosabban lehet 0,01 mg pontosságú tömegméréssel elkészíteni az utolsó lépésig, ahol az addig g/g-ban kifejezett koncentrációkat g/ml egységben kell kifejezni, mivel a kromatográfias rendszerekbe a standard oldatok és minták ml-nyi mennyiségét injektáljuk.

Pontosabb mérleg használata indokolatlan, mert a 0,01 mg pontosságú mérések gyakorlatilag nem befolyásolják az elkészített standard oldatok pontosságát és a névleges koncentráció bizonytalanságát.

A standard oldatokat lehetőleg minél kevesebb lépésben kell elkészíteni és a végső térfogatot 'A' kategóriájú, vagy egyedileg kalibrált mérőlombikban állítsuk be.

A leggondosabb munka mellett is előfordulhatnak mérési hibák, amelyek ismeretlen mértékben módosítják a standard oldat tényleges koncentrációját. Az esetleges mérési hiba hatásának kiküszöbölésére célszerű a törzsoldatot és a további hígításokra használt közbülső standard oldatot (pl. A6, B3) egymástól független beméréssel 2 párhuzamosan elkészíteni. Ha a belőlük készített 0,002 µg/ml vagy 0,005 µg/ml oldat detektált jelének különbsége kisebb, mint a laboratórium minőségbiztosítási kézikönyvében meghatározott érték (pl. 5%), akkor a két oldatot egyesítjük, és az átlagos névleges koncentrációjával számolva használjuk a további hígítások elkészítéséhez. Ha a különbség nagyobb, akkor szükséges egy harmadik oldat elkészítése. A három eredményből a két kisebb eltérést mutatót egyesítjük és az így kapott oldatokat használjuk a további mérésekhez.

A fentiek alapján készített új standard oldatokat lehet felhasználni a korábban készített oldatok komponensei stabilitásának az ellenőrzésére. A DG SANTE előírásának megfelelően a régi standard akkor használható, ha az új és a régi oldat koncentrációjának eltérése <10%.

9. Köszönetnyilvánítás

A szerzők nagyra értékelik Csatai Dávid, Mező-Preszser Orsolya, Radicsné Oros Judit, Szabó Fruzsina és Varga András munkatársaink lelkiismeretes és pontos munkáját.

10. Irodalom

- [1] DG SANTE (2015): Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11945/2015 http://ec.europa.eu/food/plant/docs/plant_pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945_en.pdf (Hozzáférés: 2016. 09. 23.)
- [2] Ambrus Á, Vásárhelyi A. (2016): Növényvédőszer-maradékok vizsgálata Magyarországon 1967-2016, Pesticide residue analysis in Hungary between 1967-2016, Élelmiszervizsgálati Közlemények LXII. 1. 919-942.
- [3] Ambrus Á, Gregory Noonan G, Németh A, Kötelesné-Susztér G, Anastassiades M, Hamow K.Á, Solymosné M.E. 2017. A növényvédőszer-maradékok mennyiségi meghatározására alkalmazott analitikai sztenderd oldatok pontosságának ellenőrzése, Testing the accuracy of analytical standard solutions used for quantitative determination of pesticide residues, J. AOAC International, Accepted for publication
- [4] Ellison S.L.R, Williams A. eds. (2012): EURACHEM/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement 3rd ed. Available from www.Eurachem.org
- [5] Lide D, R. (ed) (2007-2008): CRC Handbook of Chemistry and Physics 88th ed., Boca Raton