Optimalizace ICP a vývoj analytické metody

Viktor Kanický
6. Kurs ICP 2011
Spektroskopická společnost Jana Marka Marci
Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity

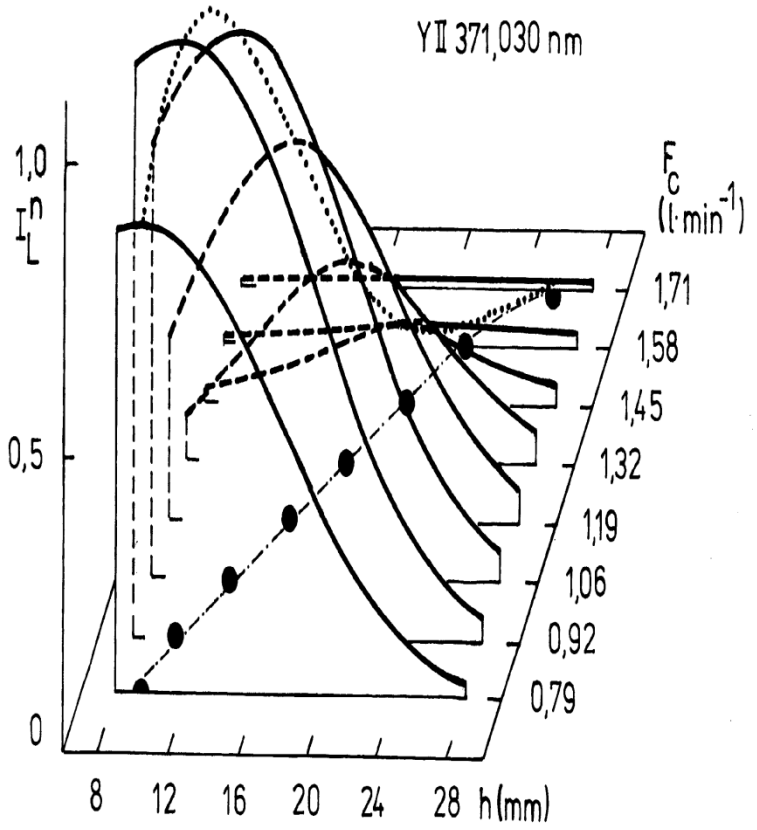
Analytické vlastnosti ICP-OES

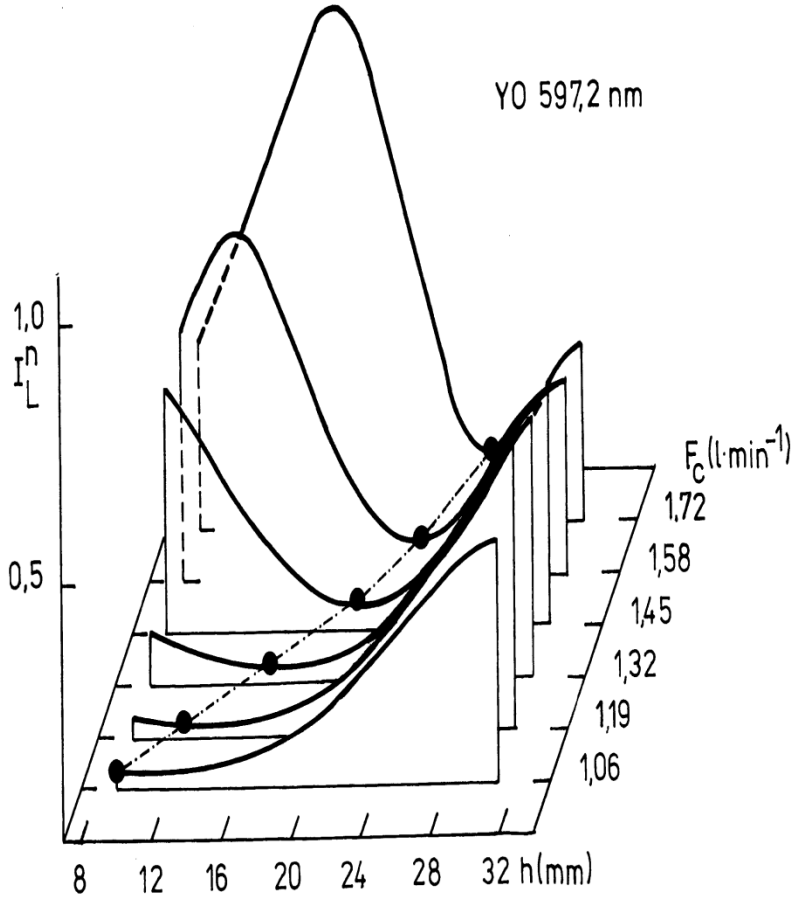
- Stanovení 73 prvků včetně P, S, Cl, Br, I
- Simultánní a rychlé sekvenční stanovení
- Vysoká selektivita (rozlišení spektrometru)
- Nízké meze detekce (0.1-10 ng/ml)
- Lineární dynamický rozsah 5-6 řádů
- Minimální interference osnovy (< ± 10 % rel.)
- Přesnost (0.5 - 2 % rel.)
- Správnost (~ 1 % rel.)
- Vnášení kapalných, plynných a pevných vzorků
- Běžné průtoky (ml/min) i mikrovzorky (μl/min)
- Rychlost stanovení 10^2 - 10^3 /hod.
- Automatizace provozu

Pracovní parametry zdroje ICP

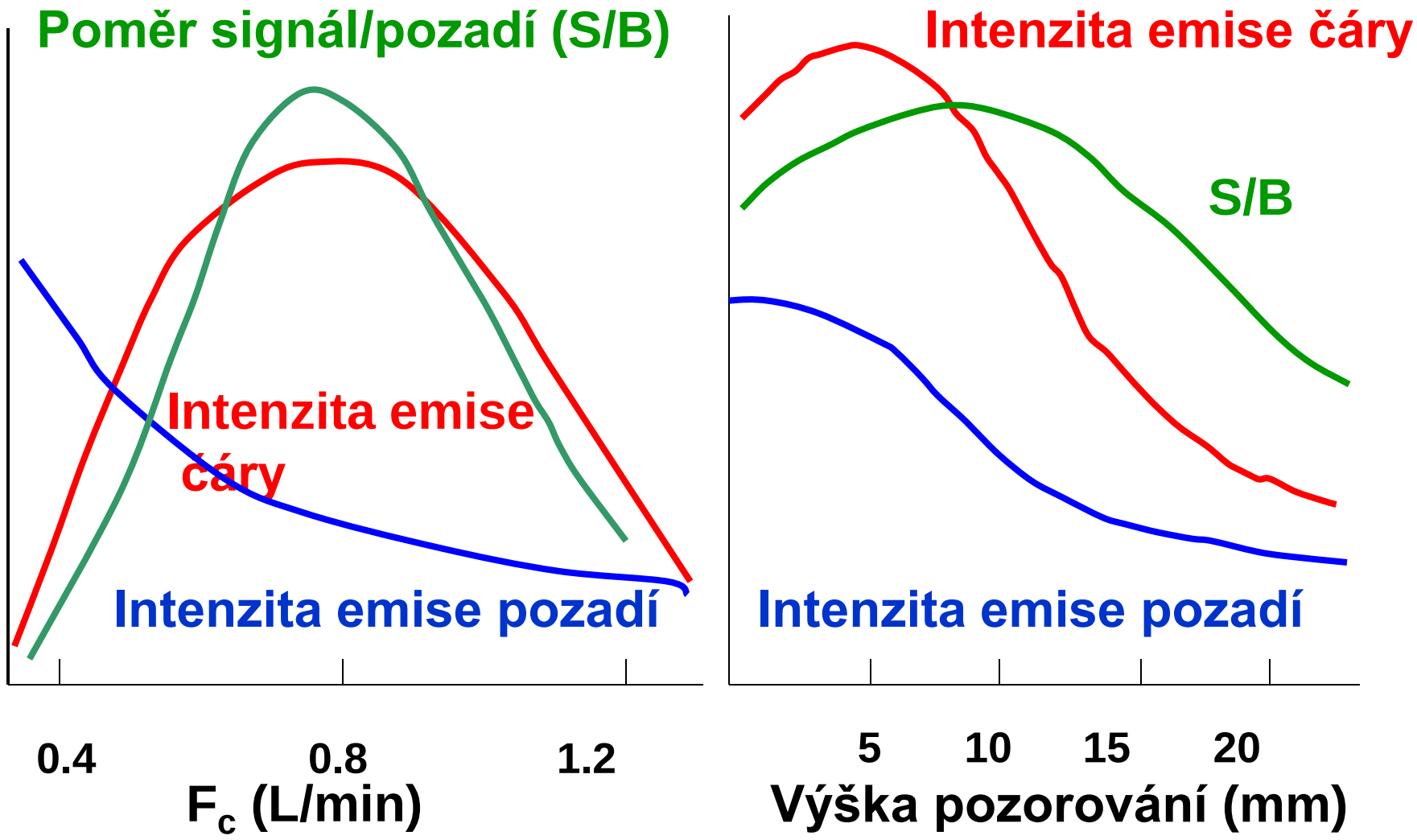
- Frekvence generátoru f
- Příkon do plazmatu P
- Průtoky plynů F:
  - vnější plazmový F_p
  - střední plazmový F_a
  - nosný aerosolu F_c
- Průtok roztoku vzorku v
- Výška pozorování h
- Integrační doba t_i

Vliv výšky pozorování a průtoku nosného plynu na emisi „tvrdé“ čáry a molekulového pásu

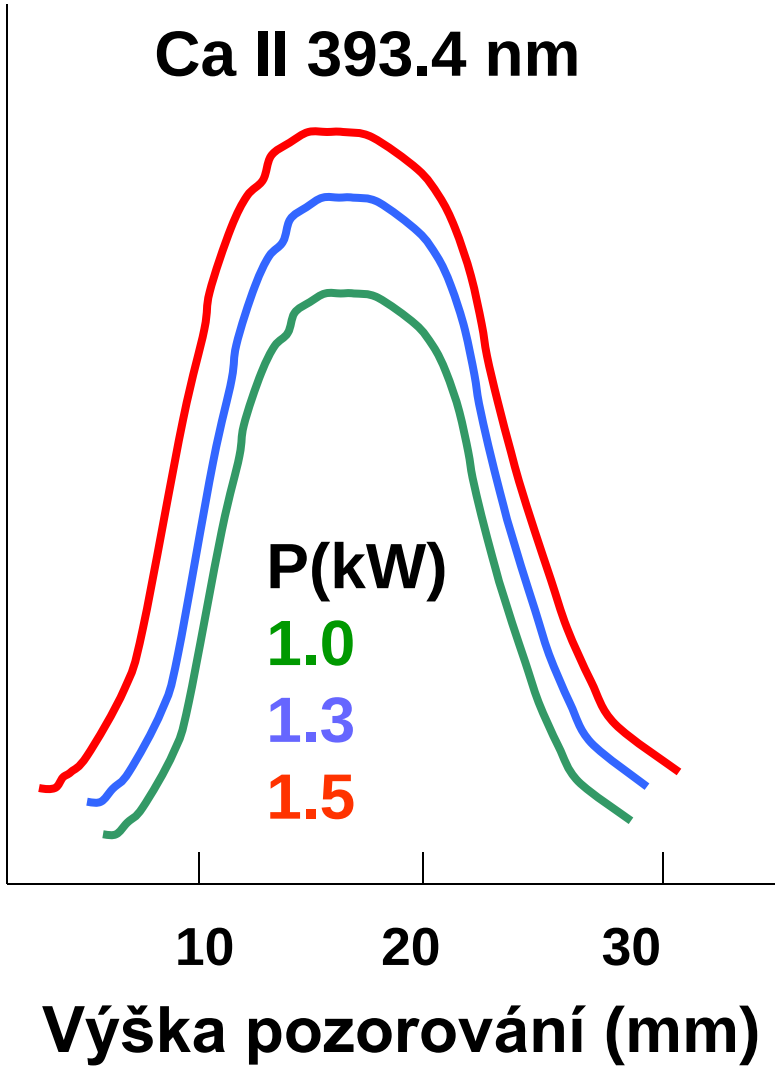


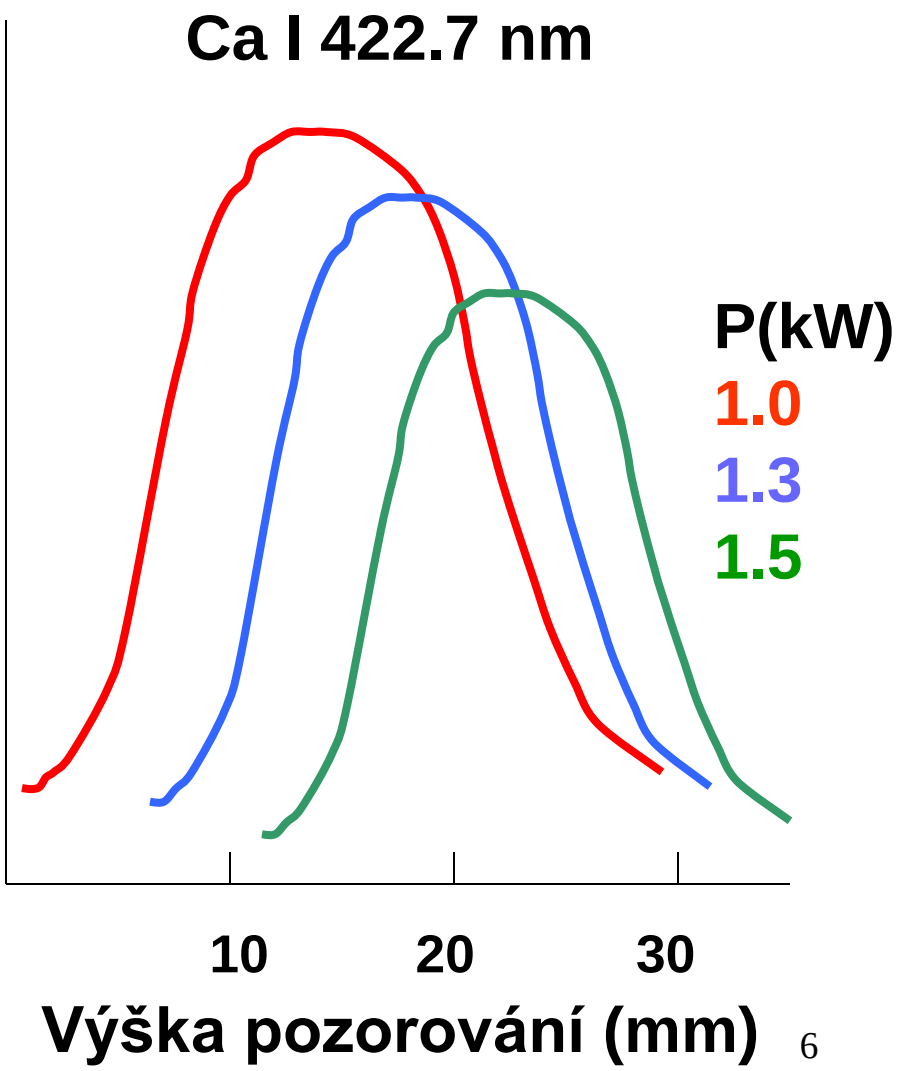


Vliv průtoku nosného plynu a výšky pozorování na emisi čáry a pozadí a jejich poměr

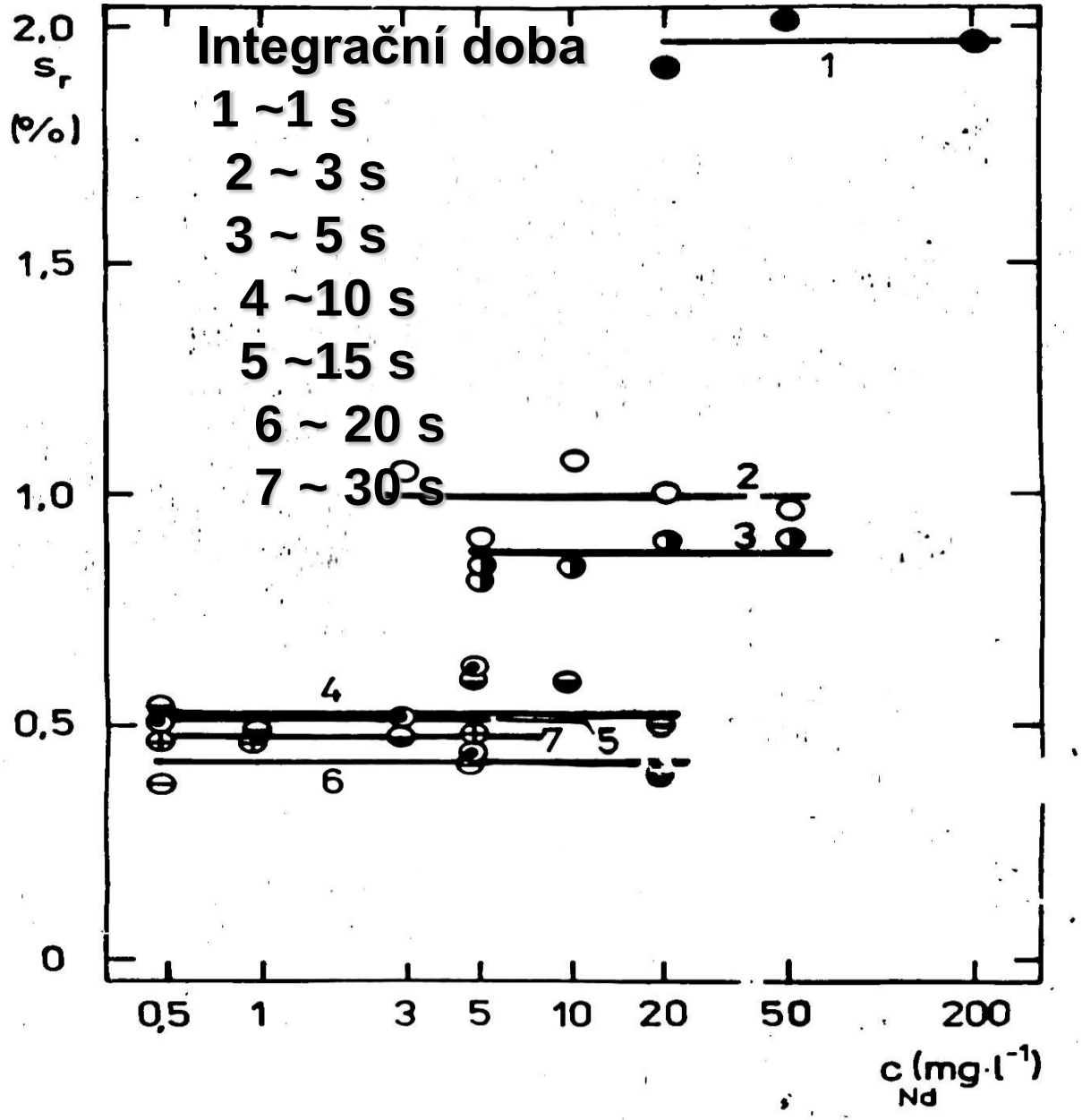


Vliv příkonu a výšky pozorování na emisi atomové a iontové čáry





Vliv integrační doby na RSD emise



Závislost relativní směrodatné odchylky s_r celkové intenzity emise I_{L+B} čáry Nd II 430,358 nm na koncentraci Nd pro různé délky integračních časů

Analytické parametry

Mez detekce

- Mez detekce je důležitý parametr, který umožňuje charakterizaci metody a srovnání různých analytických technik.
- Mez detekce je definována jako nejmenší možná koncentrace c_L , kterou lze s předem stanovenou pravděpodobností odlišit od náhodných fluktuací pozadí.
- Ve spektroskopii neměříme přímo koncentraci, ale signál. Vztah mezi signálem a koncentrací je určen kalibrací.
- Za předpokladu, že fluktuace pozadí mají Gaussovské rozdělení, je šum vyjádřen jako standardní odchylka rozdělení σ.

Analytické parametry

Mez detekce

Mezi detekce odpovídá nejmenší hrubý signál X_L, který lze statisticky odlišit od spektrálního pozadí

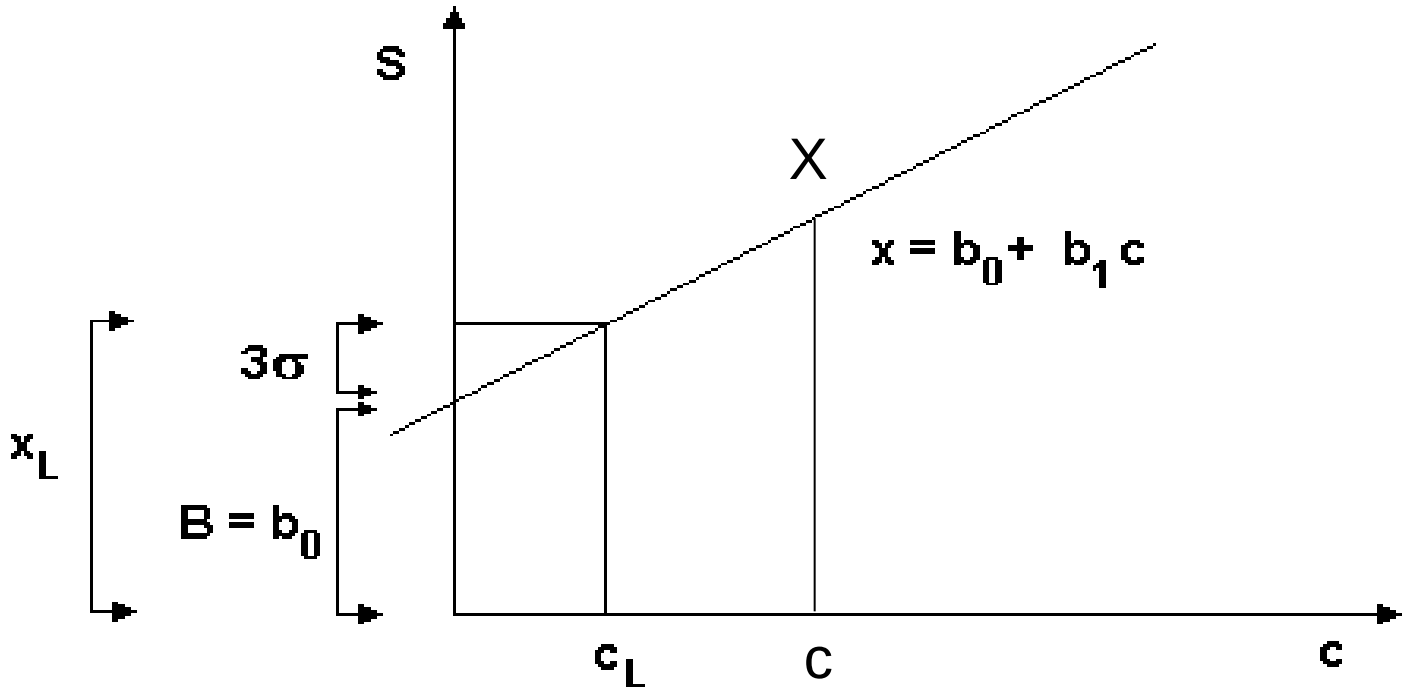
$$X_L = B + ks_B$$

kde B je průměrná hodnota měření pozadí, s_B je odhad standardní odchylky měření pozadí B a k je konstanta závislá na hladině spolehlivosti. IUPAC doporučuje k = 3
Čistý signál S_L odpovídající mezi detekce c_L je vyjádřen jako:

$$S_L = X_L - B = ks_B$$

Hrubý signál je lineárně vázán na koncentraci c

Analytické parametry



$X = b_0 + b_1 \,.\, c$

$X_L = B + ks_B = b_0 + b_1.c_L$

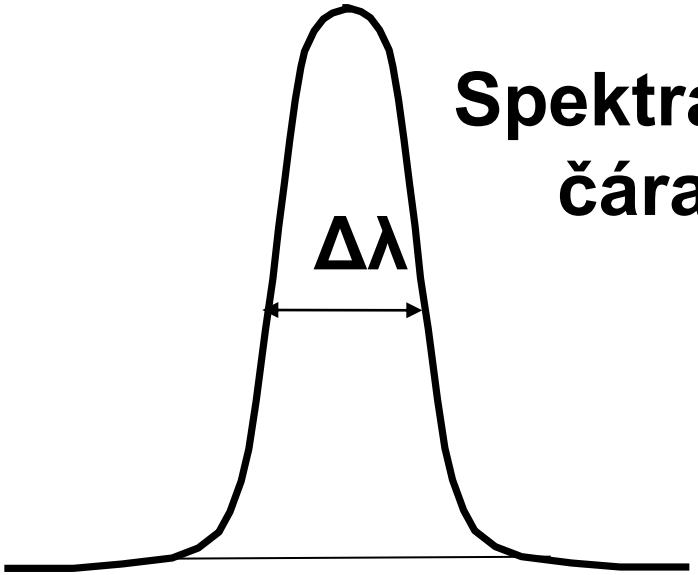
$c_L = k.s_B/b_1$

$b_1 = (X\text{-}B)/c = S/c$

$c_L = k\, s_B.\, c\, /S$

$c_L = k.c.RSD_b/SBR$

Koncentrace ekvivalentní pozadí a mez detekce



RSD_L

I_L $S = I_L/c_A$

RSD_B

$B\ (= I_B)$

Pozadí

$BEC = 1/(S/B)$

$c_L = 3RSD_B \times BEC$

Nulová linie

Optimalizační kritéria

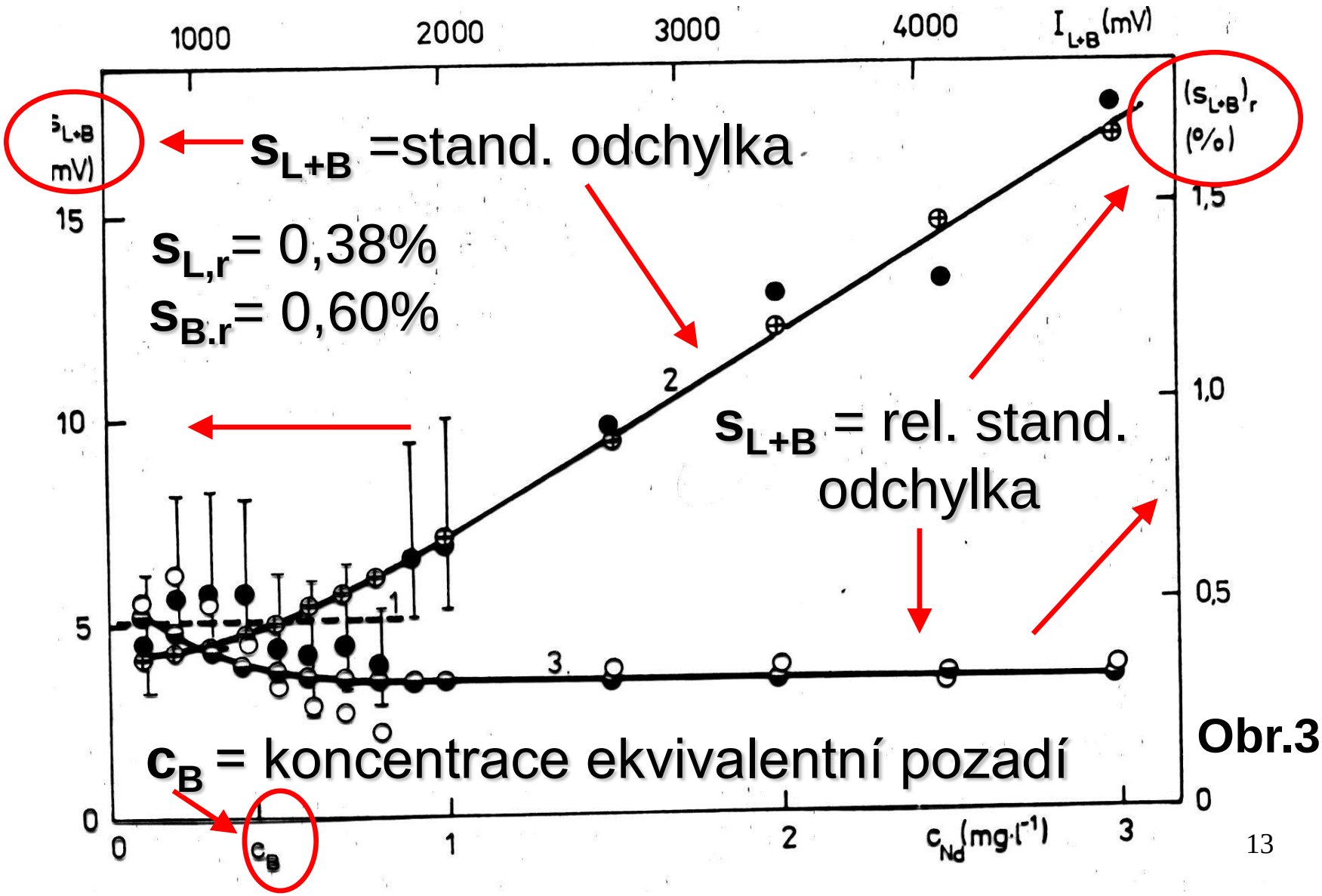
- Signál S při jednotkové koncentrací = citlivost
- Poměr signálu k pozadí S/B, SBR
- Poměr signálu k šumu S/N, SNR
- Relativní standardní odchylka pozadí RSD_B

- Přesnost (opakovatelnost) $RSD_S = (S/N)^{-1}$
- Mez detekce c_L

$$c_L = \frac{3s_B}{S} \times \frac{B}{B} = 3\frac{s_B}{B} \times \frac{B}{S} = 3 \times RSD_B \times \frac{1}{SBR}$$

$$RSD_B = \frac{s_B}{B} \qquad \frac{B}{S} = \frac{1}{SBR}$$

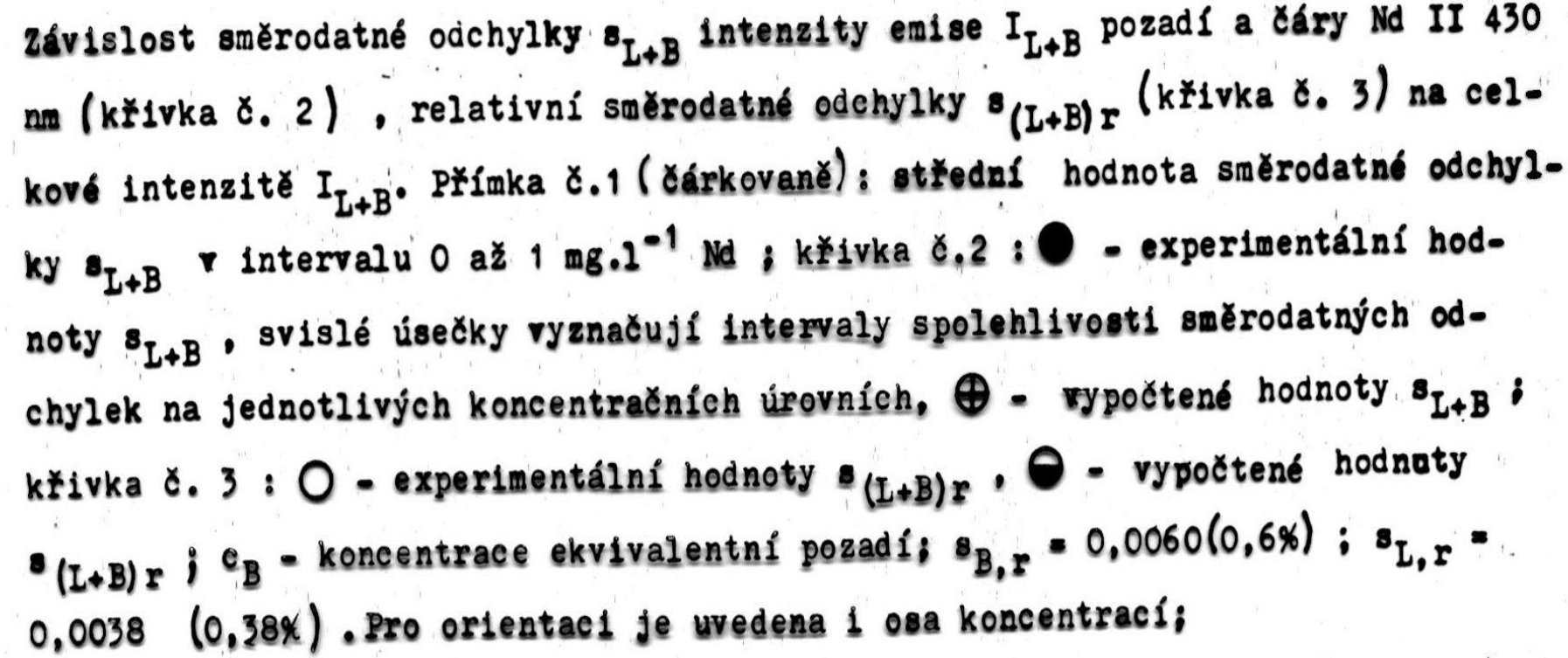
Závislost standardní odchylky celkové intenzity čáry a pozadí s_{L+B} a relativní $(s_{L+B})_r$ na koncentraci analytu.



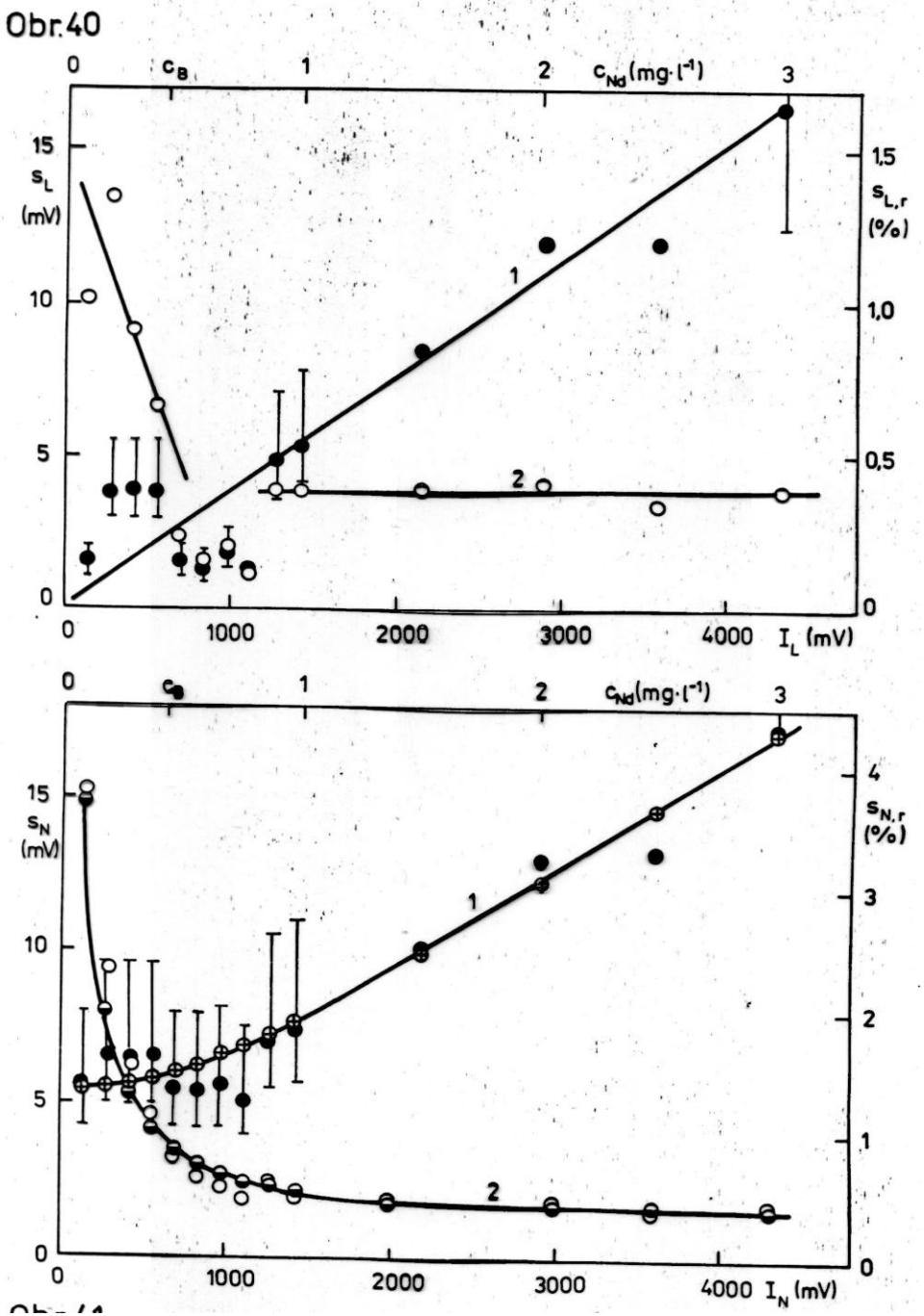
Obr.39

Závislost směrodatné s_{L+B} a relativní směrodatné odchylky $(s_{L+B})_r$ intenzity celkové emise čáry a pozadí I_{L+B} na koncentraci

Obr.39



Závislost směrodatné odchylky s_{L+B} intenzity emise I_{L+B} pozadí a čáry Nd II 430 nm (křivka č. 2), relativní směrodatné odchylky $s_{(L+B)r}$ (křivka č. 3) na celkové intenzitě I_{L+B}. Přímka č.1 (čárkovaně): střední hodnota směrodatné odchylky s_{L+B} v intervalu 0 až 1 $mg.l^{-1}$ Nd ; křivka č.2 : ● - experimentální hodnoty s_{L+B}, svislé úsečky vyznačují intervaly spolehlivosti směrodatných odchylek na jednotlivých koncentračních úrovních, ⊕ - vypočtené hodnoty s_{L+B} ; křivka č. 3 : ○ - experimentální hodnoty $s_{(L+B)r}$, ⊖ - vypočtené hodnoty $s_{(L+B)r}$; c_B - koncentrace ekvivalentní pozadí; $s_{B,r}$ = 0,0060(0,6%) ; $s_{L,r}$ = 0,0038 (0,38%). Pro orientaci je uvedena i osa koncentrací;



$$I_{L+B} = I_L + I_B$$
$$s_{L+B}^2 = s_L^2 + s_B^2$$

Závislost standardní a relativní standardní odchylky čisté intenzity emise čáry I_L a korigovaní intenzity emise čáry I_N na koncentraci

$$I_N = I_{L+B} - I_B$$
$$s_N^2 = s_{L+B}^2 + s_B^2 = s_L^2 + 2s_B^2$$

Závislost standardní a relativní standardní odchylky čisté intenzity emise čáry I_L a korigovaní intenzity emise čáry I_N na koncentraci

Obr.40 následující strana

Závislost směrodatné odchylky s_L intenzity emise I_L čáry Nd II 430,3 nm (křivka č. 1) a relativní směrodatné odchylky $s_{L,r}$ (křivka č. 2) na intenzitě emise čáry I_L. Křivka č. 1 : ● experimentální hodnoty s_L, svislé úsečky vyznačují intervaly spolehlivosti směrodatných odchylek na jednotlivých koncentračních úrovních; křivka č. 2 ○ - experimentální hodnoty $s_{L,r}$; $s_{L,r}$ = 0,0038; pro orientaci je uvedena i osa koncentrací.

Obr.41

Závislost směrodatné odchylky s_N intenzity emise I_N čáry Nd II 430,3 nm (křivka č. 1) a relativní směrodatné odchylky $s_{N,r}$ (křivka 2) na intenzitě emise I_N při korekci na pozadí. Pro orientaci je uvedena osa koncentrace. Křivka č. 1 : ● - experimentální hodnoty s_N , svislé úsečky vyznačují intervaly spolehlivosti směrodatných odchylek na jednotlivých koncentračních úrovních , ⊕ - vypočtené hodnoty s_N ; křivka č. 3 : ○ - experimentální hodnoty $s_{N,r}$, ⊖ - vypočtené hodnoty $s_{N,r}$; c_B - koncentrace ekvivalentní pozadí.

Analytické parametry

Vliv rozlišení na mez detekce

Efektivní šířka spektrální čáry ovlivňuje:

- Intenzitu emise čáry
- Intenzitu spojitého záření pozadí

→ **SBR**, **RSD_b**

- Poměr signál/pozadí je nepřímo úměrný efektivní šířce spektrální čáry $\Delta\lambda_{eff}$, poněvadž intenzita emise čáry roste lineárně s šířkou štěrbiny, kdežto intenzita emise pozadí vzrůstá s druhou mocninou šířky štěrbiny.

- Efektivní šířka čáry $\Delta\lambda_{eff}$ zahrnuje příspěvek fyzikální šířky, $\Delta\lambda_L$ a instrumentální šířky čáry $\Delta\lambda_{ins}$

$$\Delta\lambda_{eff} = (\Delta\lambda_L^2 + \Delta\lambda_{ins}^2)^{1/2}$$

Nespektrální interference

- Přes veškeré pozitivní vlastnosti, kterými se budicí zdroj ICP odlišuje od řady dalších, v něm existují *nespektrální interference* (interference osnovy vzorku) Nespektrální interference se často vyjadřuje jako poměr

$$X = \frac{I_L^M}{I_L}$$

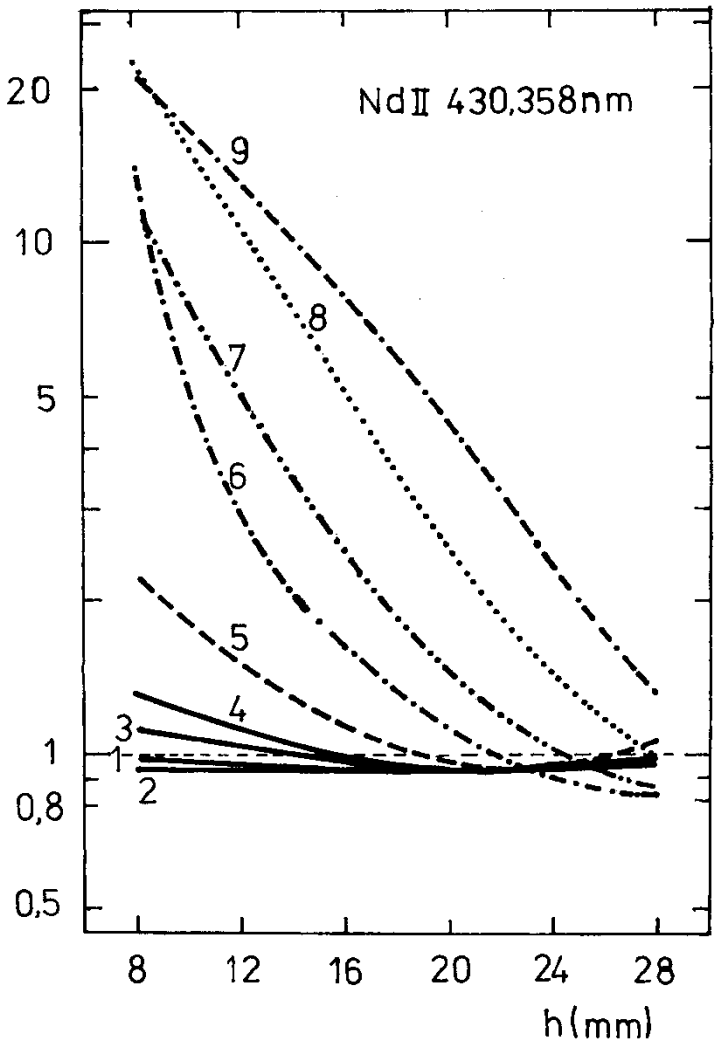
- kde I_L je čistá, tj. na pozadí korigovaná intenzita čáry analytu naměřená s čistým roztokem a $I_L{}^M$ je čistá intenzita naměřená za přítomnosti interferentu o určité koncentraci. Běžné je také vyjádření rozdílu (zvýšení, snížení) v %:

$$X = \left(\frac{I_L^M}{I_L} - 1 \right) \times 100$$

Nespektrální interference

- Podle místa vzniku:
  - Zmlžovací systém,
  - Plazmová hlavice.
- Podle interferentu:
  - Snadno ionizovatelné prvky
  - Kyseliny, rozpouštědla
- Podle mechanismu:
  - Excitační
  - Ionizační
  - Zmlžovací a transportní (povrch. napětí, viskozita, hustota, elektrostatický náboj, změna rozdělení obsahu látek v závislosti na velikosti částic, frakcionace)

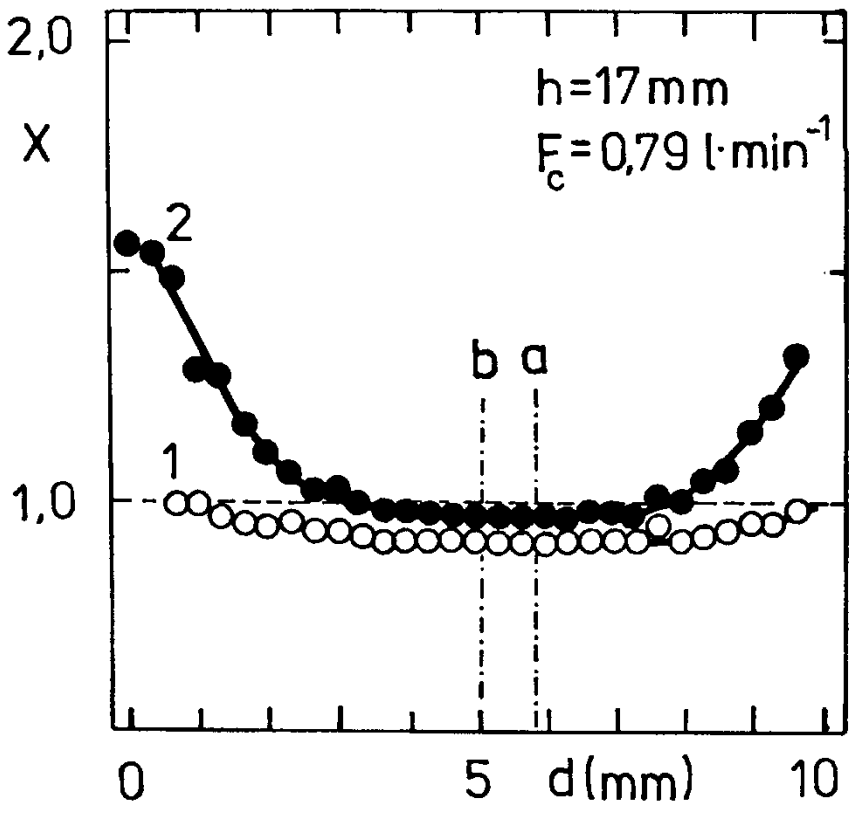
Nespektrální interference



Axiální rozdělení nespektrální interference – vliv průtoku nosného plynu

Axiální rozdělení nespektrální interference (matrix efektu) X na čáře Nd II 430,358 nm v přítomnosti 0,1 mol/l $NaNO_3$ v závislosti na průtoku nosného plynu *Fc*; křivka č. – *Fc* (l/min): 1 - 0,79; 2 –0,92; 3 – 1,06; 4 – 1,19; 5 – 1,32; 6 – 1,45; 7 – 1,58; 8 – 1,72; 9 – 1,85; *P* = 1,1 kW, průtoky plynů (l/min Ar) *Fc* = 1,06; *Fa* = 0,43; *Fp* =18,3; 16 mg/l Nd v 1,4 mol/l HNO_3

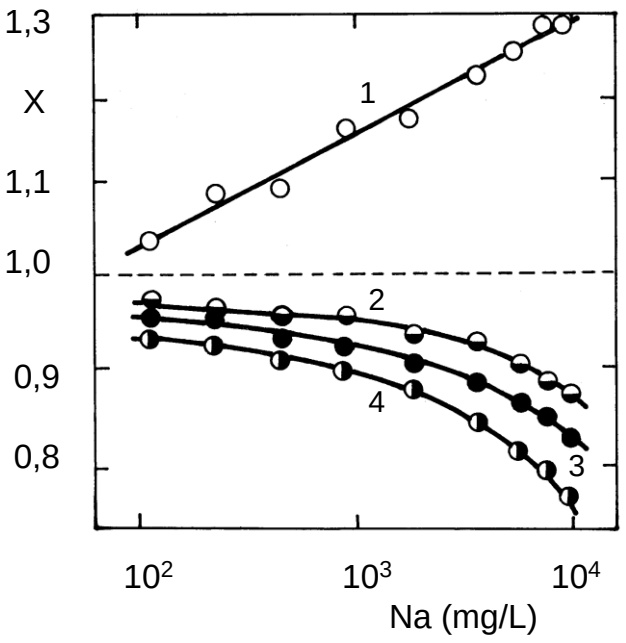
Nespektrální interference



Radiální rozdělení nespektrální interference

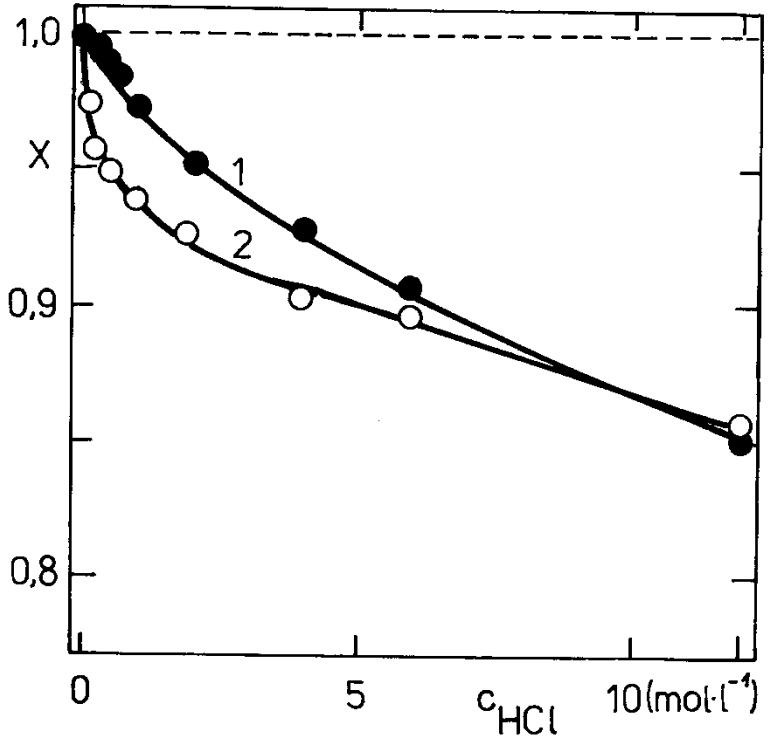
Laterální rozdělení nespektrální interference (matrix efektu) X na čarách Y II 371,030 nm (1) a Y I 410,238 nm (2); Polohy maxim laterálních rozdělení emise čar Y II – *a*, Y I – *b* (rozdělení zde nejsou uvedena); *P* = 1,1 kW; *Fc* = 1,06; *Fa* = 0,43; *Fp* =18,3; 0,1 mol/l NaNO3 v 1,4 mol/l HNO3

Nespektrální interference



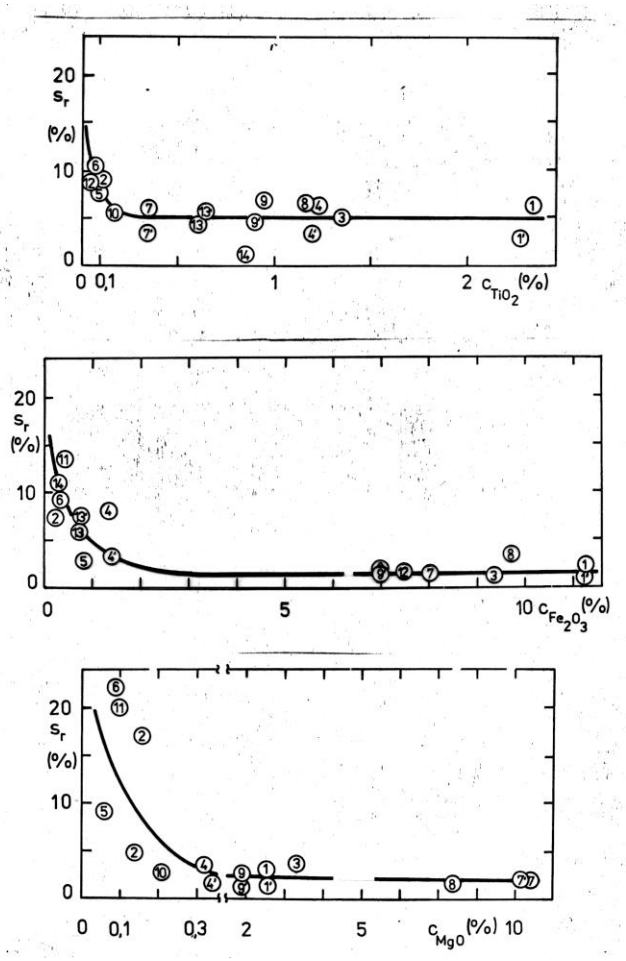
Axiální rozdělení nespektrální interference (matrix efektu) X na čáře Nd II 430,358 nm v16 mg/l Nd v 1,4 mol/l HNO3 závislosti na koncentraci Na (100 – 10000 mg/l Na) pro různé výšky pozorování; křivka č. – h (mm): 1 – 8; 2 – 16; 3 – 20; 4 – 24; *P* = 1,1 kW; *Fc* = 1,06; *Fa* = 0,43; *Fp* =18,3; ; měřítko na obou osách je logaritmické

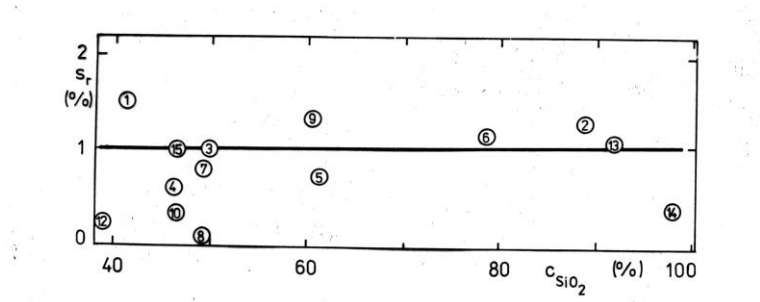
Nespektrální interference

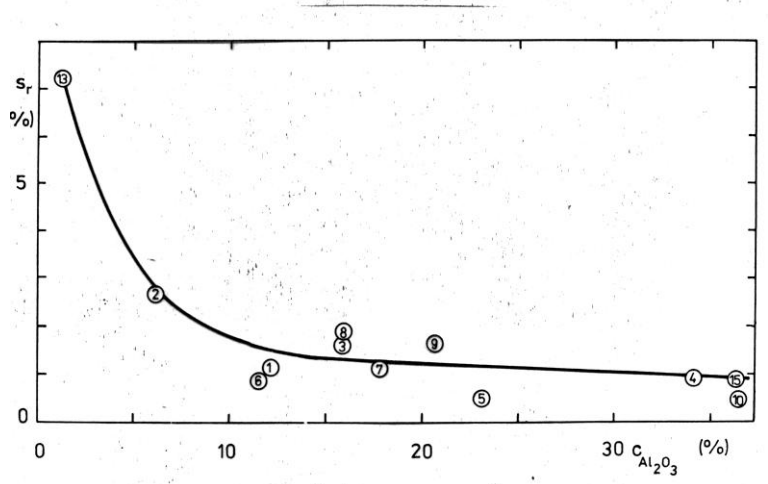


- Závislost nespektrální interference (matrix efektu) X na koncentraci kyseliny chlorovodíkové pro Nd II 430,358 nm; 16 mg/l Nd; podmínky: křivka č. 1: *h* = 16 mm, *Fc* = 1,06 l/min, křivka č. 2: *h* = 20 mm, *Fc* = 1,45 l/min; *P* = 1,1 kW; *Fa* = 0,43 a *Fp* =18,3 l/min Ar

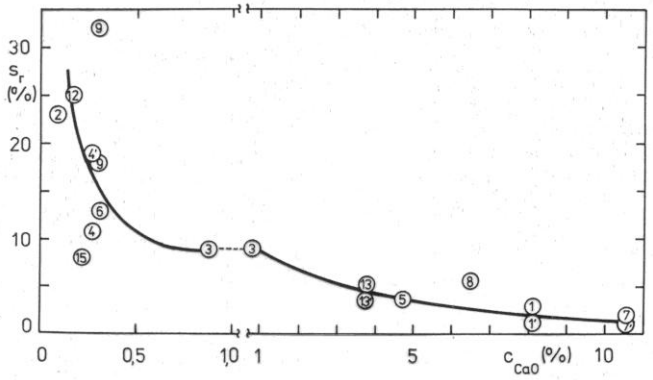
RSD: dlouhodobá opakovatelnost, reálné vzorky silikátů

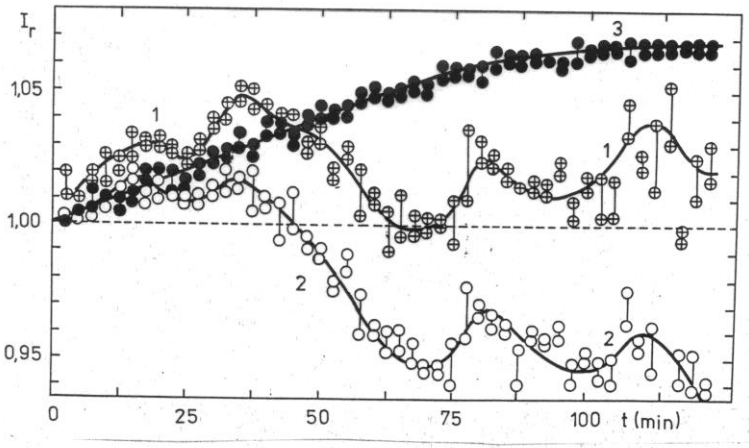


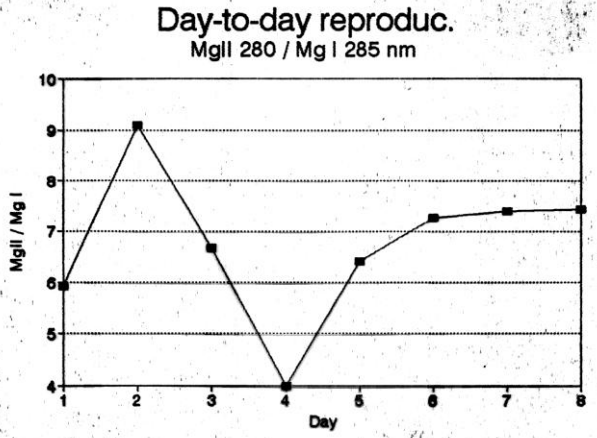


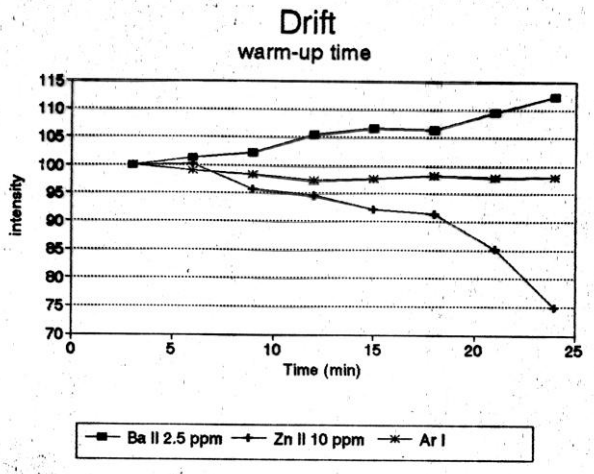


RSD: dlouhodobá opakovatelnost, reálné vzorky silikátů, drift přístroje, diagnostika









Přesnost a správnost

- Podmínky měření
  - Maximální citlivost (směrnice kalibrační přímky)
  - Maximální poměr signál/šum
  - Minimální matriční efekt
- Vlivné parametry
  - Průtok nosného plynu
  - Příkon do plazmatu
  - Výška pozorování

Přesnost a správnost

- Hlavní složka vzorku (SiO_2 , Fe)
  - Normalizace – korekce na sumu (100 %)
  - Celkový rozptyl součtu všech výsledků $(\sigma_c)^2$ = součet rozptylů jednotlivých výsledků
  - rozdíl součtu výsledků od 100 % lze brát jako statisticky významný na dané hladině významnosti jen tehdy, leží-li vně intervalu

$$100 - \frac{3\sigma_c}{\sqrt{n_A}} \leq \sum_{j=1}^{m} x_j \leq 100 + \frac{3\sigma_c}{\sqrt{n_A}}$$

Přesnost a správnost

- Použití porovnávacího prvku:
  - zlepšení přesnosti měření (kompenzace šumu vyšších frekvencí)
  - zlepšení správnosti měření (kompenzace driftu (nízkofrekvenčního šumu)
  - zlepšení správnosti měření kompenzací vlivu matrice (nespektrální interference)

Přesnost a správnost

- Podmínky správné funkce porovnávacího prvku
  1. signály analytu a porovnávacího prvku musí korelovat v závislosti na malé změně pracovních podmínek ICP zdroje (simulace driftu), přičemž korelační koeficient musí být blízký jedničce;
  2. poměr relativních směrodatných odchylek $b=\sigma_{P,r}/\sigma_{A,r}$ signálů I_P a I_A porovnávacího prvku a analytu musí být blízký jedničce;
  3. pokud není hodnota pozadí zanedbatelná vzhledem k signálům I_P a I_A, je nutno provést před výpočtem poměru I_A/I_P korekci pozadí;
  4. šum detekčního systému musí být zanedbatelnývůči šumu zdroje ICP. Zlepšení R_P dosažené použitím porovnávacího prvku je definováno vztahem

Přesnost a správnost

$$R_P = \frac{\sigma_{A,r}}{\sigma_{(A/P),r}}$$

kde $\sigma_{A,r}$ a $\sigma_{(A/P),r}$ jsou relativní směrodatná odchylka signálu analytu I_A a relativní směrodatná odchylka podílu $I_{(A/P)} = I_A/I_P$. Je-li splněna podmínka *1)* a současně $b=\sigma_{P,r}/\sigma_{A,r} \neq 1$, lze vypočítat R_P podle vztahu

$$R_P = \left| \frac{b}{b-1} \right|$$

Přesnost a správnost

Pro platnost podmínky *2)* a r <1 je zlepšení přesnosti dáno vztahem

$$R_P = \frac{1}{\sqrt{2(1-r)}}$$

Přesnost a správnost

Porovnávací prvek musí splňovat následující podmínky:

a) přirozený obsah porovnávacího prvku ve vzorcích musí být nižší než jeho mez detekce metody ICP-AES;

b) preparát porovnávacího prvku musí být dostatečně čistý, aby jeho přídavek nezvyšoval slepý pokus pro analyty;

c) spektrum porovnávacího prvku nesmí obsahovat příliš mnoho spektrálních čar, aby nedocházelo ke spektrálnímu rušení čar analytů;

d) porovnávací čára prvku musí být přiměřeně citlivá, aby koncentrace vnitřního standardu mohla být co nejnižší;

e) porovnávací prvek musí být v roztoku stálý, tj. nesmí těkat, tvořit nerozpustné hydrolytické produkty nebo tvořit sraženiny s ionty analytů či se složkami osnovy vzorku.

Analytické spektrální čáry, korekce interferencí

Výběr analytických čar pro stanovení v konkrétní osnově vzorku se provádí

i) s ohledem na obsah stanovované složky;

ii) s uvážením možných spektrálních interferencí.

Spektrální interference lze klasifikovat takto:

i) přímá koincidence spektrálních čar nerozlišitelná ve spektrálním přístroji;

ii) překryv čar závislý na propouštěném spektrálním intervalu spektrometru;

iii) překryv křídlem rozšířené čáry;

iv) interference vyvolaná strukturním pozadím;

v) rozptýlené záření.

Většina prvků má alespoň jednu citlivou analytickou čáru, která není spektrálně rušena.

Korekce spektrálních interferencí

- Korekce spektrální interference je obvykle kombinací korekce pozadí a korekce překryvu čarou. Při korekci pomocí korekčních faktorů se od nekorigované koncentrace *j*-tého analytu c_{xj} vypočtené z kalibrační přímky odečítá zdánlivá koncentrace analytu vyjádřená jako součin korekčního faktoru a_{ij} a koncentrace c_i *i*-tého rušícího prvku, stanovené na jeho analytické čáře. Pro *n* interferentů se vypočte korigovaná koncentrace *j*-tého analytu c_j podle vztahu

$$c_j = c_{xj} - \sum_{i=1}^{n} c_i a_{ij}$$

Vývoj metody

1. Na základě známého složení typu vzorku se zvolí vhodné spektrální čáry. Kritériem jsou požadované meze detekce, citlivost čar a případné spektrální interference.
2. Pro očekávané koncentrace a koncentrační poměry jednotlivých složek se měřením jednoprvkových roztoků interferentů ověří předpokládané spektrální interference a zvolí se body pro korekci pozadí.

Vývoj metody

3. Optimalizují se parametry ICP: příkon do plazmatu, průtok nosného plynu, rychlost čerpání roztoku do zmlžovače v případě radiálního ICP výška pozorování, v případě axiálního ICP centrování kanálu vůči optické ose. Optimalizace se provede s čistými roztoky s cílem dosáhnout obvykle maximálního poměru signál/pozadí a minimálního poměru signál/šum. Čistým roztokem se rozumí roztok obsahující analyt v prostředí pouze zředěné kyseliny (k zabránění hydrolýze) a odpovídající slepý roztok. Měření se provádí s vypnutou korekcí pozadí, aby se neztratily informace o změnách pozadí, měřeného on-peak při zmlžování slepého roztoku.

Vývoj metody

4. Za optimalizovaných podmínek se ověří vliv kyselin a tavidel používaných k rozkladu vzorku na směrnice kalibračních závislostí. Změří se velikost matriční interference (obvykle deprese signálu ve srovnání s čistými roztoky) a závislost této nespektrální interference na koncentraci tavidel a kyselin v přiměřeném rozmezí. Vyhodnotí se kompenzace matričního efektu porovnávacími prvky. Vyvodí se závěry pro přípravu kalibračních roztoků z hlediska obsahu tavidel a kyselin, zejména rozmezí obsahů těchto reagencií, při nichž není pozorována změna analytických signálů.

Vývoj metody

5. Jestliže byly zjištěny podle bodu 2 spektrální interference, které nelze korigovat měřením a odečtem pozadí, změří se hodnoty korekčních faktorů v přítomnosti tavidel a kyselin používaných k rozkladu. Korekční faktory takto zjištěné mají obvykle mírně odlišné hodnoty ve srovnání s hodnotami naměřenými s čistými roztoky. Určí se meze detekce v přítomnosti matrice.

Vývoj metody

6. Řízenou změnou parametrů ICP v definovaném malém rozmezí (průtoky, příkon, výška pozorování) se změří trendy signálů jednotlivých analytů v úplné matrici (včetně tavidla a kyselin) a zjistí se, zda jsou tyto trendy kompenzovány porovnávacími prvky. Tyto trendy lze pak předpokládat v případě driftu přístroje.
7. Vyhodnotí se kompenzace skutečného driftu porovnávacím prvkem v průběhu měření modelového nebo vybraného sériového vzorku v delším časovém úseku. Zvolí se optimální porovnávací prvek. Odhadne se nutný časový interval mezi provedením kalibrací (rekalibrací).

Vývoj metody

8. Zjistí se opakovatelnost měření a shodnost s certifikovanými hodnotami referenčních materiálů případně modelových vzorků, pokud nejsou referenční materiály k dispozici.

Věrohodnost lineární regrese

- **Lineární regresní model -metoda nejmenších čtverců, předpoklady:**
  - regresní parametry mohou nabývat libovolných (smysluplných) hodnot
  - regresní model je lineární v parametrech
  - matice nenáhodných (nastavovaných) hodnot nezávislých (vysvětlujících) proměnných neobsahuje 2 sloupcové kolineární vektory
  - náhodné chyby mají nulovou střední hodnotu
  - náhodné chyby mají konstantní a konečný rozptyl (homoskedasticita)
  - náhodné chyby jsou vzájemně nekorelované (cov = 0)
  - chyby mají normální rozdělení

Lineární regrese

- Celkový součet čtverců = regresní součet čtverců + reziduální součet čtverců
  - Konstrukce intervalů spolehlivosti a testování významnosti parametrů přímky (F-test: významnost koeficientu determinace, t-test: významnost regresních parametrů)
  - Test multikolinearity mezi sloupci matice- vysoké hodnoty korelačních koeficientů mezi nezávisle proměnným
  - Test složených hypotéz
  - Test vhodnosti (správnosti) lineárního modelu, střední kvadratická chyba predikce, Akaikovo informační kritérium

Regresní diagnostika

- Regresní triplet: data, model, metoda odhadu.
- Regresní diagnostika: identifikace
  - kvality dat pro navržený model
  - kvality modelu pro daná data
  - splnění základních předpokladů MNČ (7)
- Regresní diagnostika:
  - identifikace vlivných bodů
  - identifikace multikolinearity
- Regresní diagnostika:
  - ověření předpokladů užitých k odhadu parametrů
  - statistická analýza parametrů (kritika modelu)
  - identifikace vlivných bodů (kritika dat)

Regresní diagnostika

- Exploratorní analýza dat umožňuje před vlastní regresní analýzou identifikovat:
  - nevhodnost dat (malé rozmezí, přítomnost vybočujících bodů)
  - nesprávnost navrženého modelu (skryté proměnné)
  - multikolinearitu
  - nenormalitu v případě, kdy jsou vysvětlující proměnné (nezávisle proměnné) náhodné veličiny.
- Posouzení kvality dat: výskyt vlivných bodů - 3 skupiny
  - hrubé chyby = vybočující pozorování
  - body s vysokým vlivem (golden points) - rozšiřují predikční schopnosti modelu, speciálně vybrané, přesně změřené body
  - zdánlivě vlivné body = důsledek nesprávně navrženého regresního modelu

Regresní diagnostika

- Vlivné body:
  - vybočující pozorování (outliers) - výrazná odchylka na ose y
  - extrémy (high leverage points) - liší se v hodnotách na ose x od ostatních bodů

Nástroje:

- statistická analýza reziduí
- analýza prvků projekční matice
- grafy identifikace vlivných bodů

- Posouzení kvality navrženého regresního modelu:

Nástroje:

- parciální regresní grafy
- parciální reziduální grafy
- znaménkový test vhodnosti modelu

Regresní diagnostika

- Posouzení kvality navrženého regresního modelu:

Diagnostika:

- heteroskedsticity (nekonstantnosti rozptylu)
- autokorelace (časové řady, chyby jsou vzájemně korelované)
- nenormalita chyb

Kalibrační přímka - přesnost kalibrace:

- **Kritická úroveň y_c** - horní mez 100(1-alfa)% -ního intervalu spolehlivosti predikce signálu z kalibračního modelu pro koncentraci rovnou nule = slepý pokus
- **Limita detekce y_D** - odpovídá hodnotě koncentrace, pro kterou je dolní mez 100(1-alfa)% -ního intervalu spolehlivosti predikce signálu z kalibračního modelu rovna y_c
- **Limita stanovení y_s** - je nejmenší hodnota signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce z kalibračního modelu dostatečně malá a rovna číslu C, např. 0,1.

Diagnostika spektrometru ICP-AES

QUID