

Referentsmaterjalid

Tavalabori jaoks üks olulisemaid vahendeid:

- Valideerimiseks
- Kvaliteedikontrolliks
- Jälgitavuse saavutamiseks

20.11.2014

1

Referentsmaterjalide jaotus

1. Staatuse järgi:

- Referentsmaterjal (RM)
- Sertifitseeritud referentsmaterjal (CRM)

- **Referentsmaterjal (RM)** (*reference material*) on **homogeenne** materjal, mille üks või mitu omadust on piisavalt usaldusväärset teada, et seda kasutada kalibreerimisel, meetodikate valideerimisel või teistele materjalidele väärtuste omistamisel
- RMI võib valmistada iga labor: **LRM**
 - nt kalibreerimislahuste või pH puuvrite valmistamine

20.11.2014

2

Referentsmaterjalid: näited

- Vesi, milles on määratud erinevate elementide sisaldused
- Piimapulber teadaoleva valgusisaldusega
- Puhas nikkel
- Laboris valmistatud Na ja K standardlahused
- Teras legeerivate elementide usaldusväärset teadaolevate sisaldustega
- Teras teadaoleva elastsusmooduliga

20.11.2014

3

Referentsmaterjalide jaotus

1. Staatuse järgi:

- Referentsmaterjal (RM)
- Sertifitseeritud referentsmaterjal (CRM)

- **Sertifitseeritud referentsmaterjal (CRM)** (*certified reference material*) on referentsmaterjal, mis rahuldab järgmisi tingimusi:
 - omab **sertifikaati**
 - mille üks või mitu sertifitseeritud omadust on mõõdetud **jälgitavalt** esitatud ühikuni
 - omavad **määramatuse hinnangut**, mis on esitatud koos katteteguriga

20.11.2014

4

Referentsmaterjalide jaotus

2. Koostise järgi

- **Puhtad ained**
- **Lahused**
 - üks analüüt
 - mitu analüüti
 - analüüt ja segaja
- **Süntetilised segud**
- **Maatriksreferentsmaterjalid** (*matrix reference materials, MRM, CMRM*)
 - naturaalsed
 - sertifitseeritud
 - rikastatud

20.11.2014

5

Referentsmaterjalide jaotus

3. Referentsväärtuse tüübi järgi (kaks võimalust)

- Referentsväärtus on **meetodikast sõltumatu**
- Referentsväärtus on **meetodikapõhine**
- siin on suur erinevus, millele ei pöörata sageli tähelepanu!

20.11.2014

6

Metoodikast sõltumatu referentsväärtus

- Näiteks:
 - kogu boori sisaldus mullas
 - kogu plii sisaldus jõe sedimendis
- Sisuliselt mullas leiduvate kõigi boori aatomite **kogumassi** suhe mulla üldmassi
- Samuti jõe settemassis leiduvate plii aatomite **kogumassi** suhe sette üldmassi

20.11.2014

7

Metoodikast sõltumatu referentsväärtus

- pole oluline, mis meetoodikaga määrata
- kõikide meetoodikate tulemused on võrreldavad

20.11.2014

8

Meetoodikast sõltuv referentsväärtus

- Nimetatakse ka operatsionaalselt defineeritud nn “teatud tingimustel” referentsväärtus
- Näiteks
 - taimedele omastatava boori hulk mullas
 - vees lahustuva (ekstraheeritava) plii hulk settes
- Osa boori ja plii aatomite massist, mis, mis teatud tingimustel lahustuvad suhe maatriksi üldmassi

20.11.2014

9

Meetoodikast sõltuv referentsväärtus

Oluline:

- need “teatud tingimused” (enamasti meetoodika) peavad olema spetsifitseeritud ja kasutamisel täidetud
- ainult siis saab korrekseid tulemusi
- Väärtusi saab omavahel võrrelda vaid siis, kui on kasutatud sama meetoodikat

20.11.2014

10

Meetoodikast sõltuv referentsväärtus : NÄIDE!

Metoodika on spetsifitseeritud!

LGC6139(RM) Metals in River clay sediment (metallid jõe settes)

The extractable metal content refers to metals soluble in hot Aqua Regia (kuningvesi) using method ISO11466 (1995). The total metals were determined using at least two of the following procedures: chemical dissolution techniques, X-ray fluorescence and neutron activation analysis.

Ref. values: Total Metals – Al 5.7%, Ba 584mg/kg, Ca 4.2%, Cr 126mg/kg, Cu 96mg/kg, Fe 3.2%, K 1.8%, Mg 1.2%, Mn 0.11%, Na 0.58%, Ni 44mg/kg, Pb 176mg/kg, Rb 108mg/kg, Si 27.4%, Sr 154mg/kg, Ti 0.36%, Zn 530mg/kg, Zr 240mg/kg

Extractable Metals – As 27mg/kg, Cd 2.3mg/kg, Cr 80mg/kg, Cu 92mg/kg, Hg 1.2mg/kg, Ni 38mg/kg, Pb 160mg/kg, Se 0.59mg/kg, Zn 513mg/kg

20.11.2014

11

Sertifitseeritud referentsmaterjalide valmistamine

- Peavad olema tagatud järgmised tingimused:
 - kõrgelt **homogeniseeritud** ja garanteeritud **stabiilsus**
 - täpne ja kindlustatud jälgitavusega **referentsväärtus** koos **määramatusega**
- Sageli on tingimuste täitmine raske
- Vajalik on kõrge kompetentsus, hea tehnika ja piisava aja olemasolu

Production of certified reference materials:

ISO Guide 31 Content of Certificates of Reference Materials, ISO, 2000

ISO Guide 34 Quality system requirements for Reference Material Producers, ISO, 2000

ISO Guide 35 Certification of Reference Materials, ISO, 1999

12

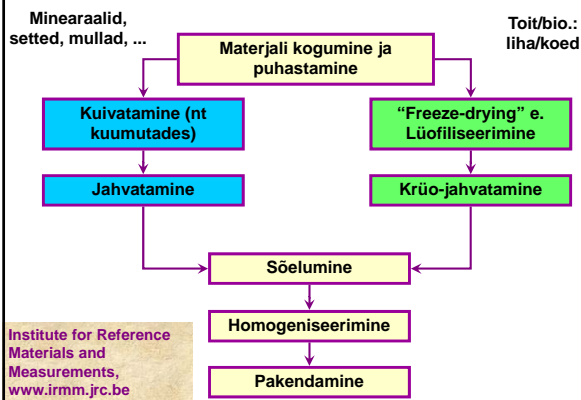
Kaks valmistamise moodust

- **Formuleerimine („kokkusegamine“)**
 - Vaid lihtsad maatriksid
 - Referentsväärtused saab saada ainete koguste mõõtmistest
 - Väga usaldusväärne
- **Kasutades loomulikku materjali**
 - Ükskõik, milline maatriks
 - Referentsväärtuste saamiseks tuleb mõõta

Sertifitseeritud maatriks-referentsmaterjalide (CMRM) valmistamine

- Vaatleme eeskätt sertifitseeritud maatriksreferentsmaterjalide CMRM valmistamist
 - See on keerulisim
- Aspektid:
 - CMRM valmistamine on mõttekas eeskätt siis, kui valmistada **korraga suur kogus**
 - Ja ka selliselt on see majanduslikult halvasti ära tasuv tegevus
 - Sama partii CMRM-i tuleb valmistada **ühekorraga**
 - Seega, tuleb töötada suurte ainekogustega
 - Tõenäoliselt mitte kunagi ei ole võimalik saada enam samasugust CMRM-i

CMRM valmistamine



CRM Referentsväärtus (tugiväärtus)

- Võimalused:
 - **Täpne valmistamine (nn formuleerimine)**
 - **Mõõtmine**
 - Maatriksreferentsmaterjalidega on enamasti vaid see võimalik
- Mõõtmised tuleks teha, kui võimalik
 - Erinevates laborites
 - Kasutades erinevaid meetodeid
- Vahel vajalik aja möödudes resertifitseerimine

Referentsväärtuse määramatus

- Referentsväärtuse määravad:
 - Formuleerimise korral valmistaja
 - Mõõtmise korral kõrgetasemelised ekspertlaborid
- Määramatus peab vastama “kasutaja lauale jõudvale” materjalile
 - peab arvestama **analüüsi (või formuleerimise) määramatust**
 - peab arvestama **proovide vahelist varieeruvust**
 - peab arvestama **ajalist stabiilsust**
- Referentsmaterjali kasutatakse paljude aastate jooksul, seetõttu on ajaline stabiilsus väga tähtis

Referentsväärtuse määramatus: Formuleerimine

Määramatus leitakse järgmiselt:

$$U_{\text{ref}} = k \cdot \sqrt{u_{\text{formul}}^2 + u_{\text{var}}^2 + u_{\text{stab}}^2}$$

- u_{formul} on formuleerimisest tulenev määramatuse komponent
 - Kaalumine, mahu mõõtmine, ...
- u_{var} on proovidevahelisest varieeruvusest tulenev määramatuse komponent
- u_{stab} on proovi võimalikust ebastabiilsusest tingitud määramatuse komponent
- k on kattetegur

Referentsväärtuse määramatus: Mõõtmise

Määramatus leitakse järgmiselt:

$$U_{\text{ref}} = k \cdot \sqrt{u_{\text{anal}}^2 + u_{\text{var}}^2 + u_{\text{stab}}^2}$$

- u_{anal} on analüüsist tulenev määramatuse komponent
- u_{var} on proovidevahelisest varieeruvusest tulenev määramatuse komponent
- u_{stab} on proovi võimalikust ebastabiilsusest tingitud määramatuse komponent
- k on kattetegur

20.11.2014

19

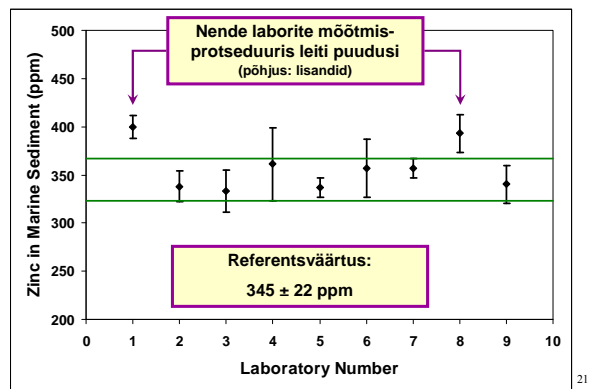
Referentsväärtuse määramatus

- Määramatuse komponendi u_{anal} leidmine on mitme labori korral mõnevõrra komplitseeritud, sest:
 - Laborite tulemused alati erinevad mõnevõrra
 - Kasutatakse erinevaid meetodeid, mis annavad erinevate määramatustega tulemused
- Statistiliste kriteeriumite järgi laboreid üldiselt välja ei jäeta
 - alati püütakse leida hälbimise põhjus

20.11.2014

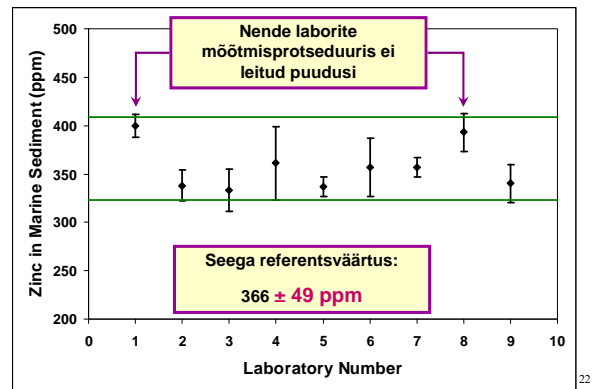
20

Juhtum 1



21

Juhtum 2



22

Referentsmaterjalide valimine laboris

Eesmärk on leida **parim CMRM**, mis sarnaneks meie uuritava proovile!

- Tähelepanu peab pöörama:
 - Sama analüüt, sama mõõtesuurus
 - St. kogusisaldus vs ekstraheeritava sisaldus
 - Sama maatriks
 - Lähedane analüüdi kontsentratsioon
 - Erinevus mitte üle 2-3 korra
 - Sama eeskirj proovi ettevalmistamiseks (kui see on spetsifitseeritud)
 - Mõistlik määramatus
- Enamasti ei ole võimalik leida ideaalset CMRM-i

20.11.2014

23

Maatriksitüübid: taimsed saadused

Table 2: Matrix groups and typical commodities

Matrix group	Examples for commodities
dry commodities (high protein/high starch content)	barley, rice, rye, wheat, dry legume vegetables
commodities with high water content	apples, bananas, cabbage, cherries, lettuce, peaches, peppers, tomatoes
commodities with high oil content	avocados, linseed, nuts, olives, rape seed
commodities with high acid content	grapefruits, grapes, lemons, oranges

Important Note: This list of commodities is not a comprehensive list of commodities/matrices. Applicants may consult regulatory authorities for advice on the use of other commodities.

Table 3: Examples of matrices which are difficult to analyse

Matrix group	Examples for Commodities
no group	coffee beans, cocoa beans, herbal infusions, hops, spices, tea, tobacco

Allikas: EC DGHCPC „Guidance document on pesticide residue analytical methods“ SANCO/825/00 rev. 8.1 16/11/2010

24

Tüüpilised vead CRM-i valimisel

- **Maatriksi mitesobivus**
 - muld vs sediment
 - heitvesi vs joogivesi
 - kala vs kana
- **Kontsentratsiooni mitesobivus**
 - Erinevus ei tohiks olla üle 2-3 korra (parem kui veel vähem)

Hea checklist:

Péter Fodor, *Proper Use of Reference Materials*, Project Trap-NAS, 2002

25

Tüüpilised vead CRM-i valimisel

- **Erinev proovi ettevalmistus**
 - Näiteks üldsisaldus sisaldus (*total content*) vs lahustuv osa (*soluble content*)
- **Kasutatakse CRM-i indikatiivseid väärtusi kui sertifitseeritud väärtusi**
 - Indikatiivsed väärtused on antud kasutajale lihtsalt infoks proovis sisalduvate teiste komponentide kohta

A good checklist:

Péter Fodor, *Proper Use of Reference Materials*, Project Trap-NAS, 2002

26

Säilitamine

- Maakera atmosfäär:
 - Niiske
 - Oksüdeeriv
 - Happeline
 - Sisaldab mikroorganisme

20.11.2014

27

Säilitamine

- Järgi täpselt sertifikaadis esitatud tingimusi:
 - **Temperatuur (võimalused):**
 - ruumitemperatuuril
 - külmikus (0 .. +4 °C)
 - sügavkülmikus (-18 °C)
 - “deep freezer”-is (-80 °C)
 - **Kas hoida pimedas?**
 - Eriti oluline orgaaniliste analüütide korral
 - **Keskkonna niiskus?**
 - Mõned referentsmaterjalid on väga hügrokoopseid

20.11.2014

28

Säilitamine

- Säilimine sõltub hoidmistingimustest
- Säilivus on määratud tootja poolt kindlaksmääratud hoidmistingimustel
- Säilivus on tavaliselt avamata pudeli kohta
- Põhireeglid:
 - Anorgaanilised analüüdid: pika elueaga
 - Iseäranis: elemendid
 - Orgaanilised analüüdid: lühikese elueaga

20.11.2014

29

Avamine

- **Loe hoolikalt instruksiooni!**
- Mõnikord on vajalik täita järgmised tingimused:
 - **Sega hoolikalt** enne avamist
 - Kui on säilitatud külmas, siis tuleb enne avamist **soojendada toatemperatuurini**
 - Ava kontrollitud **niiskustingimustel**

20.11.2014

30

Proovi võtmine

- Proovi võtmisel jälgi:
 - **Lubatud proovi miinimaalne kogus** (eriti tahkete materjalide korral)
 - Kas kogu pudeli sisu tuleb ühe korraga ära kasutada?
- Väldi saastumist!
 - Eriti oluline levinud elementide jälgede analüüsil (Si, Fe, Ca, jt.)
 - Kasuta sobivaid töövahendeid: **metall-lusikat ei tohiks kasutada metallide jälgede analüüsil!**
 - Kunagi ei panda kasutamata CRM-i proovi tagasi pudelisse!
 - Pärast proovi võtmisel sulge pudel võimalikult kiiresti!

20.11.2014

31

Niiskuse sisalduse korrigeerimine

- Mõnikord on vajalik niiskuse sisalduse korrigeerimine eraldi arvesse võtta. Näiteks:

Proov võta otse pudelist ja kasuta sellisena nagu ta on. Referentsväärtus on aga antud kuiva materjali kohta!

Niiskuse korrigeerimine tehakse eraldi 1g prooviga.

CRM BCR 700 EXTRACTABLE TRACE ELEMENTS IN ORGANIC-RICH SOIL

... The sample must be used as it is from the bottle. The correction to dry mass should be made on a separate portion of 1 g which should be dried in an oven at $(105 \pm 2) ^\circ\text{C}$ for 2-3 h until constant mass is attained. ...

20.11.2014

32

Lahustamine/Ekstraheerimine

- Tundub triviaalne, kuid vead on sagedased!
- Metallide lahustamine peab olema täielik ja peab vältima saastumist
 - Mõned metallid lahustuvad halvasti happesegudes: Ti, Zr, Cr, ...
 - Sobilikud anumad analüüsil:
 - HF kasutamisel vältida klaasanumaid!
 - Klaasanumaid ei tohi kasutada Si, Na, Ca jälgede analüüsil!
- Orgaaniliste ühendite analüüs
 - Väldi ühendi lagunemist ja lendumist!
 - **Ekstraheerimine peab olema tehtud samamoodi, kui reaalse proovide korral!**

20.11.2014

33

Sertifitseeritud referentsmaterjali sertifikaat

- **Peab ideaalis sisaldama järgmist informatsiooni:**
 - Selgelt defineeritud mõõtesuurust ja ühikut
 - Määramatus on esitatud katteteguriga
 - Materjali kogus pudelis (ampullis jt)
 - Kinnitatud jälgitavus
 - Instruksioon hoidmiseks ja kasutamisel
 - hoidmistemperatuur
 - teised keskkonnatingimused (nt valgustus, niiskus)
 - miinimum proovi kogus analüüsiks
 - kuidas avada (segada? inert gaasi keskkonnas?)
 - vajadusel täpne proovi ettevalmistamise kirjeldus?
 - materjali nn eluiga kord avatuna ja avamata kujul
 - Informatsioon tootja(te) ja referentsväärtuse omistajate kohta

20.11.2014

34

Referentsmaterjalide kasutamine

- **RM:**
 - Kalibreerimiseks
 - Meetoodika igapäevaseks kontrolliks
 - Kontrollkaartide koostamiseks
- **CRM:**
 - Kalibreerimiseks (puhtad ained, segud ja lahused)
 - Saagise (*Recovery*) määramiseks (CMRM)
 - Meetodika arendamisejärgseks kontrolliks (valideerimise viimaseks etapiks) (CMRM)

20.11.2014

35

Kalibreerimine

- Kalibreerimiseks kasutatakse reeglina puhta aine või lahuse referentsmaterjale
- Põhimõtteliselt pole keelatud ka maatriksreferentsmaterjalid, aga need on enamasti liiga kallid
- **Kalibreerimine on üks fundamentaalseid tegevusi jälgitavuse saavutamisel:**
 - Jälgitavus antakse edasi referentsmaterjalilt uuritavale lahusele

Jälgitavuse ja referentsmaterjalide suhetest:

Traceability in Chemical Measurement. Eurachem/CITAC, 2003. (saadaval tasuta: <http://www.eurachem.org/>)

20.11.2014

36

Saagise määramine

- Saagis R (*recovery*) näitab seda, millise osa proovis olevast analüüdi kogusest on metoodika võimeline ära mõõtma

$$R = \frac{C_{\text{korrigeerimata}}}{C_{\text{tegelik}}}$$

- Saagise väärtused alla 1 on tingitud sellest, et mitmesugustel põhjustel jääb osa analüüti määramata

20.11.2014

37

CRM kasutamine saagise määramiseks

- CRM abil saagise määramisel on C_{tegelik} rollis analüüdi sisaldus CRM-is
- Saagise väärtuse arvutamine on lihtne:

$$R = \frac{C_{\text{korrigeerimata}}}{C_{\text{CRM}}}$$

- **Selline saagise määramine on adekvaatne vaid siis, kui CRM maatriks vastab proovi maatriksile!**

20.11.2014

38

Saagise kasutamise kaks võimalust

- Korrigeerime saagisega
- Ei korrigeri saagisega ja saagise erinevuse ühest võtame üheks määramatuse allikaks ja kasvatame selle arvelt määramatust

20.11.2014

39

Saagisega korrigeerimine

- Korrigeerimine:

$$C_{\text{korrigeeritud}} = \frac{C_{\text{korrigeerimata}}}{R}$$

20.11.2014

40

Millal korrigeerida?

- Peavad olema täidetud neli tingimust:
 - R on 1-st piisavalt erinev
 - Põhjus, miks R erineb 1-st on leitav
 - R on piisavalt usaldusväärselt määratav **kõnealuse analüüt-maatriks kombinatsiooni jaoks**
 - Tulemuse liitstandardmääramatus alaneb
 - Kui ei korrigeri, siis saagise erinevus 1-st tuleb määramatuses kajastada
- Täiendav argument: seadusandlus

B. Magnusson, S. L. R. Ellison *Anal Bioanal Chem* (2008) 390:201–213

41

Saagise määramatuse leidmine

- Etappide kaupa:
 - Mudel oli üleelmisel slaidil
 - Määramatuse allikad:
 - CRM väärtuse määramatus
 - Labori tulemuse pikaajalise korratavuse meetodi komponent ja proovi ettevalmistamise komponent
 - CRM ja proovide maatriksite ebaklapp
- Modifitseeritud mudel:

$$R = \frac{C_{\text{korrigeerimata}}}{C_{\text{CRM}}} \cdot f_{\text{ebaklapp}}$$

20.11.2014

42

Saagise määramatuse leidmine

- Saame:

$$\frac{u(R)}{R} = \sqrt{\left(\frac{u(C_{CRM})}{C_{CRM}}\right)^2 + \left(\frac{s_R(C_{korrigeerimata})}{C_{korrigeerimata}}\right)^2 - \left(\frac{s_R(C_{korrigeerimata,1})}{C_{korrigeerimata,1}}\right)^2 + \left(\frac{u(f_{ehaklapp})}{f_{ehaklapp}}\right)^2}$$

20.11.2014

43

Metoodikate kontrollimine

- Enamasti valideerimise viimane etapp
- CRM-ide abil hinnatakse meetodka tõesust
- Nii CRM referentsväärtustel kui ka analüüsitulemustel on määramatused, kuidas võrrelda?
- Lihtsaim kriteerium: **zeta arv**

Metoodika kontrolliks tuleb kasutada erinevat CRM-i, sellest, mis oli kasutusel
- kalibreerimiseks või
- korrigeeriva saagise määramiseks!

20.11.2014

44

zeta arv

- Kas kaks tulemust langevad kokku?

$$zeta = \frac{X_{lab} - X_{ref}}{\sqrt{u_{c,lab}^2 + u_{c,ref}^2}}$$

- X_{lab} on labori tulemus
- X_{ref} on referentsväärtus
- $u_{c,lab}$ on labori tulemuse liitstandardmääramatus
- $u_{c,ref}$ on referentsväärtuse liitstandardmääramatus

20.11.2014

45

zeta arvude interpreteerimine

- Labori tulemuste headuse hindamine:

zeta väärtus	Tulemus	Vajalikud laboripoolsed meetmed
$ zeta \leq 2$	Rahuldav	-
$2 < zeta < 3$	Küsitav	Ennetavad meetmed
$ zeta \geq 3$	Mitterahuldav	Korrigeerivad meetmed

20.11.2014

46

CRM kasutamine metoodikate kontrolliks

- Referentsmaterjalide puhul on korrektne anda koos referentsväärtusega ka määramatus:

Substance	BCR-184 Bovine muscle	BCR-185R Bovine liver	BCR-186 Pig kidney
As	µg/kg (150)	33.0 ± 2.9	63 ± 9
Cd	µg/kg 13 ± 2	544 ± 17	2710 ± 150
Cl	g/kg (2.0)		(9.4)
Cr	µg/kg (76-153) ¹⁾		(58-142) ¹⁾
Cu	mg/kg 2.36 ± 0.06	277 ± 5	31.9 ± 0.4
Fe	mg/kg 79 ± 2		299 ± 10
Hg	µg/kg 2.6 ± 0.6		1970 ± 40
I	µg/kg (40)		(145)
K	g/kg (16.6)		(12.6)
Mg	mg/kg (1020)		(820)
Mn	mg/kg 334 ± 28	11.07 ± 0.29	8.5 ± 0.3
Na	g/kg (2.0)		(7.1)
Ni	µg/kg (270)		(420)
P	g/kg (8.3)		(12.2)
Pb	µg/kg 239 ± 11	172 ± 9	306 ± 11
Se	µg/kg 183 ± 12	1 680 ± 140	10300 ± 500
Zn	mg/kg 166 ± 3	138.6 ± 2.1	178 ± 3

Values in brackets are not certified.

Availability: BCR-184, -185R and -186 are provided in units of 15 g as lyophilized powders, in screw-capped glass bottles.

1) Range of results observed.

BCR Reference materials Catalogue

20.11.2014

47

Tulemuse kokkulangevuse hindamine

- Näide:
 - CRM BCR 185R
 - Info sertifikaadilt: $X_{CRM}(Cd) = 544 \mu\text{g/kg}$, $U_{CRM}(Cd) = 17 \mu\text{g/kg}$ ($k = 2$)
 - Laboris saadi: $X_{lab} = 510 \mu\text{g/kg}$, $u_{lab} = 25 \mu\text{g/kg}$
 - Võrrandi järgi saame: **zeta = -1.29**
 - Järeldus: Tulemus on vastuvõetav

20.11.2014

48

Kui on lahknevus, siis mis võib olla selle põhjus?

- Põhmõtteliselt kaks varianti:
 - Viga on analüüsis
 - Määramatus on alahinnatud

20.11.2014

49

Täiendav info

- **COMAR andmebaas:**
<http://www.comar.bam.de/>
 - Kõigi olulisemate CRM tootjate ühendatud andmebaas

20.11.2014

50