

Witold ILEWICZ
Politechnika Śląska

PORÓWNANIE WYNIKÓW WZORCOWANIA CHROMATOGRAFU GAZOWEGO DLA METOD REGRESJI LINIOWEJ ZWYKŁEJ I WAŻONEJ

Streszczenie. W ramach pracy przeprowadzono wzorcowanie chromatografu gazowego Varian CP3800 z detektorem FID metodą wzorca wewnętrznego w zakresie 2% - 9,6% objętościowego stężenia etanolu w celu oznaczania stężenia etanolu w alkoholowych napojach spożywczych. Z uzyskanych danych kalibracyjnych estymowano parametry liniowego równania przetwarzania dwoma metodami: nieważoną i ważoną. Dla obu metod estymacji wyznaczono niepewność pomiarową w postaci 95% przedziałów ufności. Omówiono rezultaty dla zastosowanych metod z punktu widzenia dokładności szacowania parametrów regresji liniowej i niepewności pomiarowej po kalibracji.

COMPARISON OF GAS CHROMATOGRAPH CALIBRATION RESULTS FOR STANDARD AND WEIGHTED LINEAR REGRESSION METHODS

Summary. In this work, a Varian CP3800 gas chromatograph with FID detector was calibrated in the range of 2% - 9.6% ethanol concentration by volume using the internal standard method for the determination of ethanol concentration in alcoholic beverages. From the calibration data obtained, the parameters of the linear processing equation were estimated using two methods: unweighted and weighted. For both estimation methods, measurement uncertainties were determined in the form of 95% confidence intervals. The results for the methods used are discussed from the point of view of the accuracy of estimating the parameters of the regression line and the measurement uncertainty after calibration.

1. Wprowadzenie

Chromatografia gazowa jest jedną z podstawowych technik analitycznych służących do określania z wysoką dokładnością stężeń składników mieszanin chemicznych. Czasowy przebieg sygnału wyjściowego detektora chromatograficznego nazywa się chromatogramem. Każdemu składnikowi mieszaniny na chromatogramie odpowiada pojedynczy pik chromatograficzny, przypominający funkcję gaussowską. W analizie ilościowej wykorzystuje się proporcjonalność powierzchni pików na chromatogramie do stężenia substancji. Detektory FID (*ang. Flame Ionisation Detector*) charakteryzują się bardzo wysoką liniowością, stąd ich charakterystyki kalibracyjne

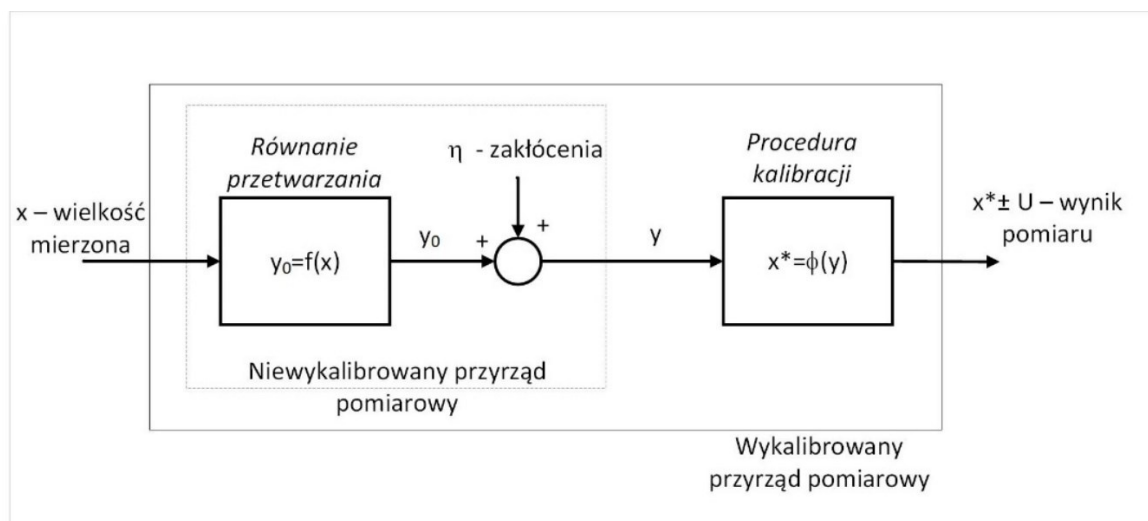
najczęściej modeluje się funkcją liniową. Do estymacji parametrów tej funkcji oraz wyznaczania wyniku pomiaru stosuje się metody szczegółowo opisywane w klasycznych podręcznikach [2, 3, 5]. Analiza wariantów postępowania w zależności od liczby danych kalibracyjnych, spełnienia założeń odnośnie rozkładów prawdopodobieństwa błędów [4], wyboru regresora ($y(x)$ lub $x(y)$), dobór wag w regresji ważonej, itd., jest cały czas przedmiotem badań [1, 4, 6]. W przypadku kalibracji powstaje problem tak zwanej odwrotnej regresji, gdy na podstawie odpowiedzi y prognozuje się wartość zmiennej objaśniającej, a wyrażenia na niepewność prognozy są bardziej skomplikowane niż w regresji prostej [4, 7]. Jednocześnie formuły stosowane do wyznaczenia niepewności mają charakter przybliżony, mimo pozornej prostoty problemu [7].

Kalibracja chromatograficzna jest procesem kosztownym, zwłaszcza w sensie czasowym. Uzyskanie pojedynczego wyniku pomiaru to czas rzędu od kilku do kilkudziesięciu minut, problem stanowi także przygotowanie wzorców mieszanin chemicznych o odpowiedniej dokładności stężeń. Z tego powodu liczba danych kalibracyjnych w chromatografii na ogół jest niewielka, wymusza potrzebę wysoce starannego przetwarzania danych kalibracyjnych w celu osiągnięcia wysokiej dokładności pomiaru.

2. Kalibracja chromatografu gazowego metodą wzorca wewnętrznego

2.1. Ujęcie matematyczne procedury kalibracji

Ogólny schemat modelu matematycznego przyrządu pomiarowego i procedury kalibracji w ujęciu metrologicznym przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Schemat modelu matematycznego przyrządu i procedury kalibracji.

Przyrząd pomiarowy pracujący w warunkach odniesienia modeluje się jako układ o jednym wejściu (x – wielkość mierzona) i jednym wyjściu y_0 , który jest odpowiedzią niezakłóconą przyrządu w stanie ustalonym. W węźle sumacyjnym do y_0 dodają się zakłócenia. Wyjściem niewykalibrowanego przyrządu pomiarowego (odpowiedzią) jest obserwowana wielkość fizyczna y . Działanie przyrządu jest opisane przez równanie

przetwarzania $y_0=f(x)$. Wykalibrowany przyrząd pomiarowy uzyskuje się, nadając wskazaniom y miarę wielkości mierzonej poprzez procedurę kalibracji $\phi(y)$, na wyjściu której otrzymuje się wskazanie w jednostkach miary x^* wraz z niepewnością rozszerzoną tego wskazania U . Procedura kalibracji $\phi(y)$ jest funkcją odwrotną do $f(x)$. W celu określenia procedury kalibracji należy określić postać funkcji $f(x)$ oraz estymować jej parametry. Na koniec wyznaczyć funkcję odwrotną do $f(x)$ oraz podać procedurę określania niepewności rozszerzonej U .

W przypadku chromatografu gazowego kalibrowanego metodą wzorca wewnętrznego w celu pomiaru stężenia etanolu, gdy jako wzorzec wewnętrzny zastosowano butanol, wielkością wejściową (zmienną objaśniającą) x jest stosunek c_{et}/c_{but} stężeń składnika oznaczanego (etanolu) i składnika wzorcowego innego niż składnik oznaczany (butanol) dodanego do próbki badanej tak, że jego stężenie jest dokładnie znane. Oba składniki (oznaczany i wzorcowy) powinny dawać rozdzielone piki na chromatogramie, tak aby można wyznaczyć ich powierzchnie. Wielkością wyjściową (odpowiedzią) y niewyworcowanego chromatografu jest stosunek A_{et}/A_{but} powierzchni piku etanolu do powierzchni piku butanolu. W przypadku detektora FID, charakteryzującego się wysoką liniowością odpowiedzi, z bardzo dobrym przybliżeniem działanie chromatografu opisuje liniowe równanie przetwarzania. Relacja między odpowiedzią y , a wejściem x jest w takim przypadku następująca:

$$y = b_0 + b_1 \cdot x + \eta, \quad (1)$$

gdzie b_0 i b_1 są współczynnikami równania przetwarzania, których wartości należy estymować. Na podstawie estymatorów \hat{b}_0 i \hat{b}_1 wyznacza się procedurę kalibracji jako

$$x^* = \frac{y - \hat{b}_0}{\hat{b}_1}. \quad (2)$$

Estymacji parametrów równania przetwarzania dokonuje się na podstawie zbioru wyników osobnego eksperymentu kalibracyjnego $\{x_i, y_i\}$, $i=1..n$, gdzie na wejście chromatografu wprowadza się wzorcowe mieszaniny etanolu i butanolu x_i i dla każdej takiej mieszaniny wyznacza odpowiedź chromatografu y_i . Najczęściej, w typowych przypadkach dla chromatografii przygotowuje się 5 różnych wzorców x i każdy z nich powtarza się 3-krotnie, co daje $n=15$.

2.2. Kalibracja chromatografu i niepewność rozszerzona metodą regresji zwykłej

W praktycznie każdym przypadku wartości współczynników zależności $y(x)$ estymuje się, minimalizując sumę kwadratów odchylenia wartości y_i od modelu $b_0+b_1 \cdot x_i$. Metoda ta jest równoważna z metodą największej wiarygodności, gdy zakłócenia η mają rozkład normalny i spełnione są pewne klasyczne założenia o parametrach tego rozkładu oraz o niezależności zrealizowanych wyników pomiarów, a błędy występują wyłącznie w osi y [2, 3, 5]. Estymatory współczynników mają postać:

$$\hat{b}_1 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2}, \quad \hat{b}_0 = \bar{y} - \hat{b}_1 \cdot \bar{x}. \quad (3)$$

Na podstawie estymatorów (3) można szacować nieznanne stężenia etanolu w badanych próbkach. Niech x_0 oznacza nieznanne stężenie etanolu w badanej próbce, którą q -krotnie poddano analizie chromatograficznej i uzyskano zbiór odpowiedzi chromatografu $\{y_{0i}\}$,

$i=1..q$. Niech y_q będzie wartością średnią tego zbioru. Wtedy wynik pomiaru stężenia etanolu w próbce x_0 szacuje się jako [3, 5]:

$$x_0^*(y_q) = \frac{y_q - \hat{b}_0}{\hat{b}_1} \pm t_{1-\frac{\alpha}{2}, n-2} \cdot \frac{s_e}{\hat{b}_1} \left(\frac{1}{q} + \frac{1}{n} + \frac{(y_q - \bar{y})^2}{\hat{b}_1^2 \sum (x_i - \bar{x})^2} \right)^{\frac{1}{2}}. \quad (4)$$

Drugi składnik prawej strony równania (4) to tak zwany odwrócony przedział ufności (*ang. inverse confidence limit*), bo rozważając prostą regresji $y(x)$ szacujemy przedział ufności dla wartości w osi x (w tym przypadku oś stężeń etanolu w badanych próbkach). Składnik ten stanowi niepewność rozszerzoną U wyniku pomiaru, przy poziomie ufności $1-\alpha$, t jest wartością zmiennej z rozkładu t -Studenta dla $n-2$ stopni swobody, $s_e^2 = \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}$. Przy spełnieniu założeń metody przedział ufności $x_0^* \pm U$ obejmuje nieznaną wartość mierzoną x_0 z prawdopodobieństwem $1-\alpha$.

2.3. Kalibracja chromatografu i niepewność rozszerzona metodą regresji ważonej

W przypadku regresji ważonej w procedurze estymacji parametrów równania przetwarzania uwzględnia się dodatkowo wagi, jakie można przypisać poszczególnym pomiarom kalibracyjnym. Jako wartości wag w_i przyjmuje się odwrotności wariancji pomiarów kalibracyjnych y_i . Odpowiednio wzory do estymacji współczynników równania przetwarzania mają postać:

$$\hat{b}_1 = \frac{\sum w_i (x_i - \bar{x}_w)(y_i - \bar{y}_w)}{\sum w_i (x_i - \bar{x}_w)^2}, \quad \hat{b}_0 = \bar{y}_w - \hat{b}_1 \cdot \bar{x}_w, \quad \bar{x}_w = \frac{\sum w_i \cdot x_i}{\sum w_i}, \quad \bar{y}_w = \frac{\sum w_i \cdot y_i}{\sum w_i}. \quad (5)$$

Wzór na wynik pomiaru nieznanego stężenia etanolu w próbce x_0 na podstawie q pomiarów chromatograficznych wyraża się wzorem [3, 5]:

$$x_0^*(y_q) = \frac{y_q - \hat{b}_0}{\hat{b}_1} \pm t_{1-\frac{\alpha}{2}, n-2} \cdot \frac{s_{ew}}{\hat{b}_1} \left(\frac{1}{w_0 q} + \frac{1}{\sum w_i} + \frac{(y_q - \bar{y}_w)^2}{\hat{b}_1^2 \sum w_i (x_i - \bar{x}_w)^2} \right)^{\frac{1}{2}}. \quad (6)$$

We wzorze (6) drugi składnik prawej strony ma identyczną interpretację, jak w (4). Waga w_0 to waga przypisana q pomiarom $\{y_{0i}\}$ tej samej nieznannej wartości x_0 , równa odwrotności wariancji tej serii pomiarowej, a $s_{ew}^2 = \frac{\sum w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}$.

3. Eksperyment kalibracyjny na stanowisku chromatografu gazowego

Kalibrowanym przyrządem pomiarowym był chromatograf gazowy Varian CP3800 z detektorem FID i autosamplerem. Kalibracji dokonano w celu pomiaru zawartości etanolu w zakresie 1,92% v/v do 9,6% v/v. Jako wzorzec wewnętrzny zastosowano butanol. W chromatografii zainstalowano kolumnę kapilarną CP-Sil 5CB, zapewniającą pełny rozdział chromatograficzny etanolu i butanolu. W celu przeprowadzenia kalibracji przygotowano pięć próbek wzorcowych o stężeniach objętościowych etanolu wynoszących odpowiednio 1,92%, 3,84%, 5,76%, 7,68%,

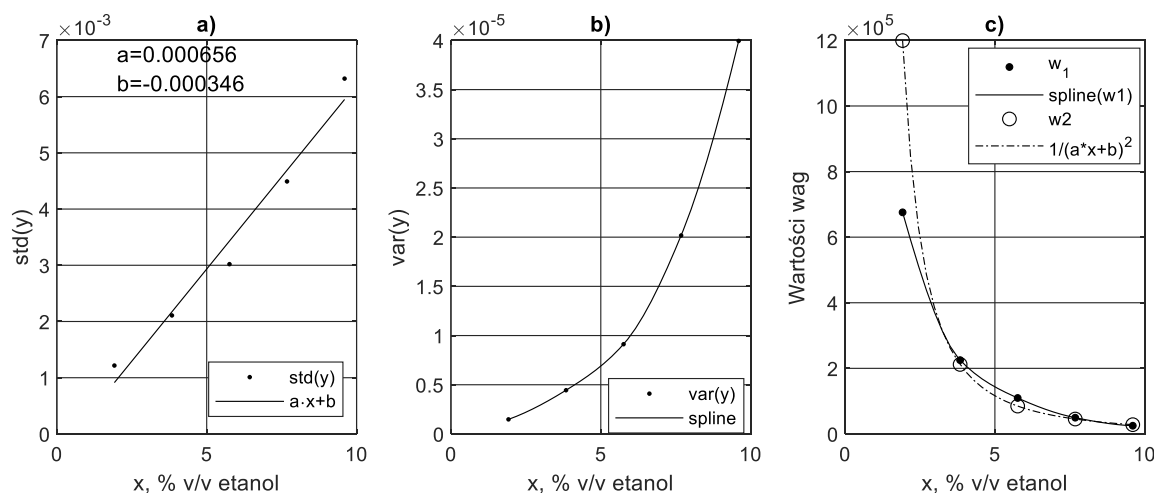
9,60%, z butanolem jako wzorcem wewnętrznym, o stałym stężeniu objętościowym 9,60% w każdej próbce wzorcowej. Każdą próbkę wzorcową chromatografowano trzykrotnie, objętości nastrzyku wynosiły 2 μ l. Łącznie wykonano trzy serie pomiarowe po pięć pomiarów każda. Odczytu wyników (wyznaczenie powierzchni pików i ich stosunków) dokonano za pomocą oprogramowania Star Workstation do sterowania chromatografem uruchomionym na komputerze PC. Wyniki pomiarów kalibracyjnych przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Wyniki pomiarów kalibracyjnych: x – stężenie objętościowe etanolu w próbkach wzorcowych; y – stosunek powierzchni pików etanolu do pików butanolu; $\text{var}(y)$ – wariancja y ; w_1, w_2 – wagi w regresji ważonej

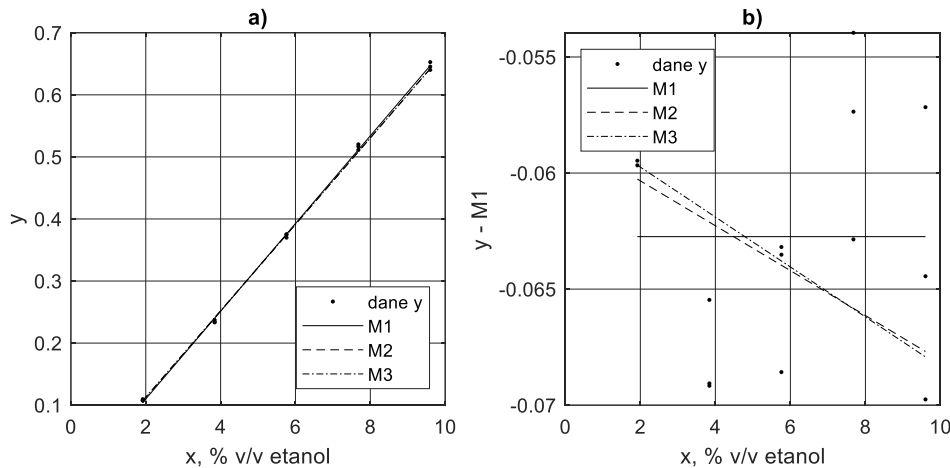
x , % v/v	$y=A_{et}/A_{but}$			$\text{var}(y)$ ·10 ⁻⁶	$w_1 = \frac{1}{\text{var}(y)}$ ·10 ⁵	$w_2 = \frac{1}{(ax+b)^2}$ ·10 ⁵
	seria 1	seria 2	seria 3			
1,92	0,1074	0,1096	0,1076	1,48	6,77	11,9
3,84	0,2336	0,2337	0,2373	4,44	2,25	2,12
5,76	0,3699	0,3749	0,3753	9,12	1,10	0,85
7,68	0,5202	0,5113	0,5168	20,1	0,496	0,46
9,6	0,6454	0,6527	0,6401	39,9	0,250	0,28

Dwie ostatnie kolumny tabeli 1 przedstawiają wagi dla regresji ważonej. Wagi w_1 obliczono jako odwrotności wariancji trzech wyników y dla poszczególnych wzorców. Wagi w_2 obliczono jako odwrotności kwadratu wartości liniowej aproksymacji odchylenia standardowego y pokazanej na rysunku 2a). Taki sposób wyznaczenia wag można uzasadnić często przyjmowanym dla pomiarów chromatograficznych założeniem o proporcjonalności odchylenia standardowego zakłóceń do wartości mierzonej. Wykres wartości wag w zależności od x przedstawiono na rysunku 2c). Wykres wariancji danych y wraz z interpolacją danych splajnem pokazano na rysunku 2b).



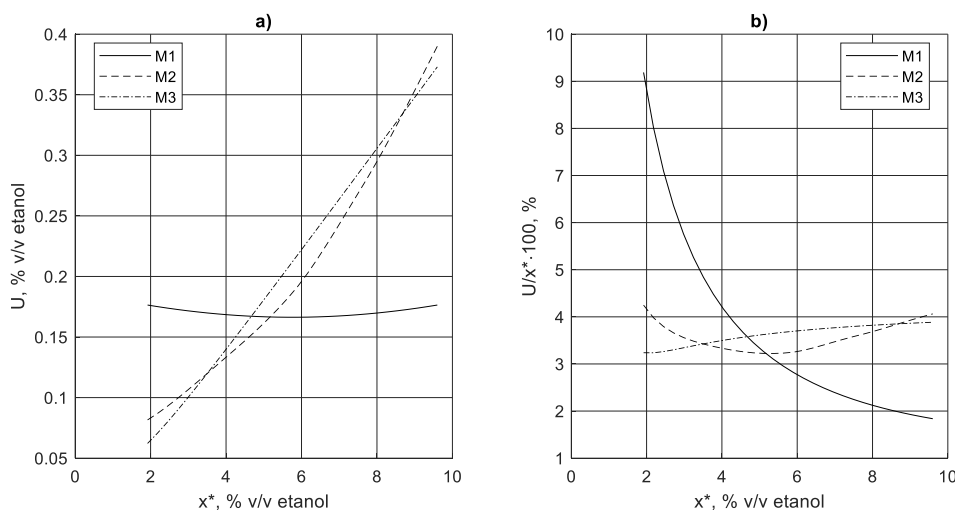
Rys. 2. Wykresy odchylenia standardowego (a) i wariancji (b) odpowiedzi y oraz wagi dla procedur regresji ważonej (c) wg tabeli 1.

Na podstawie pomiarów kalibracyjnych wyznaczono estymatory parametrów liniowego równania przetwarzania trzema metodami: M1 – regresja liniowa zwykła wg wzoru (3), M2 – regresja liniowa ważona z wagami w_1 (tab. 1), M3 – regresja liniowa z wagami w_2 (tab. 2), obie wg wzoru (5). Przebiegi prostych regresji pokazano na rysunku 3, wykres a). Wykres b) na rysunku 3 powstał przez odjęcie od danych z rys. 3a) prostej M1 – uwydatnia on różnice przebiegów prostych M1, M2 i M3. Wartości współczynników prostych regresji pokazano w tabeli 2.



Rys. 3. Dane kalibracyjne i proste wyznaczone metodami M1, M2 i M3 (a) oraz dane z wykresu (a) po odjęciu prostej wyznaczonej metodą M1 (b).

Charakterystyki dokładnościowe wyznaczenia stężenia etanolu dla metod kalibracji M1, M2 i M3 pokazano na rysunku 4. Przy wyznaczaniu tych charakterystyk przyjęto wartości $q=1$ z wzorów (4) i (6), wagę w_0 z wzoru (6) wyznaczono w metodzie M2 na podstawie wykresu b) z rysunku 2 (analogicznie do w_1 z tabeli 1). Wagę w_0 w metodzie M3 wyznaczono na podstawie aproksymacji liniowej odchylenia standardowego z wykresu a) na rysunku 2 (analogicznie do w_2 z tabeli 1).



Rys. 4. Niepewność rozszerzona U wartości x^* pomiaru stężenia etanolu po kalibracji chromatografu metodami M1, M2 i M3: rozszerzona niepewność bezwzględna (a); rozszerzona niepewność względna (b). Poziom ufności 95%.

Uzyskane wyniki kalibracji zastosowano do pomiaru zawartości etanolu w trzech próbkach alkoholi spożywczych: piwa o zawartości etanolu 3,6% v/v ($q=3$ powtórzenia pomiaru), piwa o zawartości etanolu 4,9% v/v ($q=4$ powtórzenia pomiaru), rumu o zawartości etanolu 40% ($q=3$ powtórzenia pomiaru). Zawartości etanolu spisano z etykiet butelek. Przed pomiarem rum rozcieńczono w stosunku 1:5. W tabeli 2 pokazano wyniki obliczeń stężenia etanolu w rumie i ich niepewności pomnożone przez 5.

Tabela 2

Wyniki estymacji parametrów równania przetwarzania dla metod M1, M2 i M3 oraz wyniki pomiarów stężenia etanolu dla trzech alkoholi spożywczych.

Metoda regresji	\hat{b}_1	\hat{b}_0	piwo 3,6% v/v	piwo 4.9% v/v	rum 40% v/v
M1 – zwykła	0,0707	-0,0314	3,55±0,11	4,77±0,10	39,27±0,53
M2 – ważona, w_1	0,0697	-0,0270	3,54±0,07	4,77±0,10	39,51±0,91
M3 – ważona, w_2	0,0696	-0,0262	3,53±0,07	4,77±0,11	39,51±0,95

4. Dyskusja wyników i podsumowanie

Liniowa funkcja opisująca działanie przyrządu pomiarowego stanowi najprostszy możliwy przypadek, mimo to obliczenia, zwłaszcza dotyczące niepewności wyniku pomiaru, są stosunkowo skomplikowane.

Wzory (3) i (5) opisują sposób obliczania parametrów liniowej charakterystyki przyrządu metodą najmniejszych kwadratów na podstawie wyników eksperymentu kalibracyjnego. W przypadku metody ważonej, obok danych pomiarowych należy jeszcze ustalić wartości wag przypisywanych poszczególnym pomiarom. Wagi te powinny być równe odwrotności wariancji wyników poszczególnych pomiarów. Przy tym wynik estymacji parametrów prostej wg wzoru (5) nie zależy od wartości bezwzględnych wag, a tylko od ich wzajemnych proporcji. Dlatego, na przykład, mając wiedzę, że odchylenie standardowe losowych zakłóceń pomiarów jest proporcjonalne do wielkości mierzonej, można przyjąć wagi jako odwrotności kwadratów zmierzonych wartości, bez potrzeby wykonywania dużej liczby pomiarów w celu wyznaczenia rozkładu odchylenia standardowego zakłóceń.

Charakterystyki wyznaczone metodami M1, M2 i M3 są bardzo zbliżone, co widać na rysunku 3a) – na wykresie proste praktycznie się pokrywają. Pewne różnice widoczne są w wartościach parametrów prostych pokazanych w tabeli 2, jednak nie są one istotne. Ma to odzwierciedlenie w zmierzonych wartościach zawartości etanolu w alkoholach spożywczych, pokazanych w tabeli 2. Wyniki pomiarów dla metod M1, M2 i M3 są praktycznie jednakowe.

Metody M1 oraz M2 i M3 dają istotnie różne wyniki przy wyznaczaniu niepewności rozszerzonej U wyników pomiarów. Niepewność tę szacowano w jako przedział ufności wartości predykowanej stężenia etanolu x_0^* wg wzoru (6). Przedział ten ma postać $\pm t \cdot s_0$, gdzie wartość t to zmienna z rozkładu t -Studenta o $n-2$ stopniach swobody, zależna od przyjętego poziomu ufności, a s_0 jest odchyleniem standardowym x_0^* . Jak widać, zarówno w przypadku ważonym i nieważonym, s_0 zależy od wielu parametrów takich jak: liczba danych kalibracyjnych n , liczba pomiarów q , sposób rozłożenia pomiarów kalibracyjnych wzdłuż zakresu pomiarowego. Sposób doboru tych parametrów w konkretnym przypadku może stanowić podstawę minimalizacji s_0 , a więc

minimalizacji niepewności pomiaru. Na rysunku 4 pokazano przebiegi niepewności rozszerzonej dla konkretnych wyników kalibracji. Dla zwykłej regresji liniowej wykorzystanej w metodzie M1 wartość niepewności bezwzględnej (rys. 4a) jest najmniejsza w środku zakresu pomiarowego i rośnie w niewielkim stopniu w kierunku jego krańców. Niepewność bezwzględna jest zbliżona do wartości 0.17% v/v etanolu w całym zakresie pomiarowym, a błąd względny maleje (rys. 4b). Obie metody ważone M2 i M3, różniące się szczegółami sposobu wyznaczenia wag, dają bardzo podobne rezultaty – niepewność rośnie monotonicznie wraz z wartością mierzoną, a niepewność względna pomiaru utrzymuje się stale na poziomie poniżej 4% wewnątrz zakresu pomiarowego. Wszystkie trzy testowane metody kalibracji mają podobną niepewność w środku zakresu pomiarowego.

W praktyce do wyznaczania niepewności pomiarów chromatograficznych w wiarygodny sposób nadają się jedynie metody ważone, gdyż oczywiste jest, że niepewność pomiaru rośnie wraz ze wzrostem wartości zmierzonej, co widoczne jest na rysunkach 2a) i 2b). Metoda zwykła regresji, nie wymagająca wyznaczenia wag, może służyć wyłącznie do wstępnego oszacowania wartości parametrów równania przetwarzania i wartości wyniku pomiaru.

Praca została zrealizowana przy wsparciu finansowym Politechniki Śląskiej w ramach dotacji na utrzymanie i rozwój potencjału badawczego w roku 2024: 02/050/BK_24/0038.

LITERATURA

1. Carroll R.J., Ruppert D.: Prediction and Tolerance Intervals With Transformation and/or Weighting. *Technometrics*, 33, 197-210, 1991.
2. Draper N.R., Smith H.: *Applied Regression Analysis*. John Wiley & Sons, 1998. ISBN 0-471-17082-8
3. Massart D.L., Vandeginste B.G.M, et. al: *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*. Elsevier Science B.V., 2003, ISBN: 0-444-89724-0.
4. Parker P.A., Vinning G.G., Wilson S.R., Szarka J.: The Prediction Properties of Classical and Inverse Regression for the Simple Linear Calibration Problem. *Journal of Quality Technology*, Vol. 42(4), 2010, p. 333-347.
5. Piotrowski J., Kostyrko K.: *Wzorcowanie aparatury pomiarowej*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2000.
6. Sayago A., Boccio M., Asuero A.: Fitting Straight Lines with Replicated Observations by Linear Regression: The Least Squares. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 34:1, 39-50, DOI: 10.1080/10408340490273744.
7. Thompson M.: Uncertainties in concentrations estimated from calibration experiments. *Analytical Methods Committee No 22*, March 2006.