

Denne artikel er den tredje i en serie på fire. Den sidste artikel kan læses i Dansk Kemi nr. 12.

Sampling III

- Laboratoriesampling for kemisk analyse

Her beskrives flere TOS-undersøgelser, der er udført i samarbejde med danske virksomheder inden for analyse- og processektorerne. Formålet var at gennemføre en komplet TOS-karakterisering af laboratorieprøveforberedelses- og -neddelingsprocedurer. Nogle typiske problemstillinger belyses

Af Kim H. Esbensen, Hans Henrik Friis Pedersen, Lars P. Houmøller, Lars Petersen, Casper Dahl, Anette Ørnskov, Julie Johnsen, Lotte Højbjerg, Anvendt Kemometri, Analytisk Kemi og Sampling Forskningsgruppe (ACACSRG), Institut for Kemi og Anvendt Ingeniørvidenskab, Ålborg Universitet Esbjerg (AUE).

I et afgangprojekt er der udført en TOS-analyse af en dansk procesvirksomheds primære samplingsforhold [1]. Samtidig blev der udført et mindre delstudie til at karakterisere sekundær/tertiær laboratoriesampling. Målet var en mulig fremtidig implementering af en facilitet til online NIR-karakterisering af mellemprodukter. Studiet blev udført af ACACSRG som et generelt generisk studie for potentielle NIR-applikationer i procesindustriens kontrollaboratorier. Eksemplet illustrerer betydningen af at gennemføre en grundlæggende heterogenitetsundersøgelse, der involverer alle trin i den totale analyseprocedure, herunder homogenisering og subsampling. I studiet blev fiskefileter karakteriseret mht. vand- og fedtindhold; overføringsværdien af studiets resultater er ikke begrænset til konsum- og fødevarerindustrien.

Homogenisering

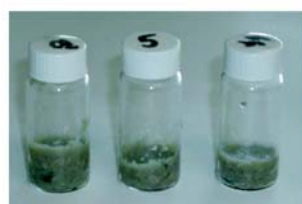
Primære prøver (korrekt udtagne, repræsentative prøver i TOS' forstand, se de to tidligere artikler i denne serie) ankommer til det analytiske kontrollaboratorium. De vejer i gennemsnit ca. 500 g og søges nu homogeniseret gennem intensiv farsering. NIR-analysen udføres vha. et NIR-reflektansudstyr, der anvender en analyseprøve på maksimalt 7,5 g. Det er derfor nødvendigt med en betydelig masseneddeling, hvilket her svarer til en samplingsrate på 1:75. NIR-spektre fås ved

bestråling gennem prøveglassets bund, figur 3, side 52. (Der er her principielt tale om en yderligere subsampling, idet de væsentligste bidrag til spektret kommer fra den nederste del af farsen i prøveglasset. Det er der ikke taget hensyn til i dette arbejde, idet denne fejlkilde er op til flere størrelsesordener mindre end fejlkilden fra laboratorieprøveudtagningen).

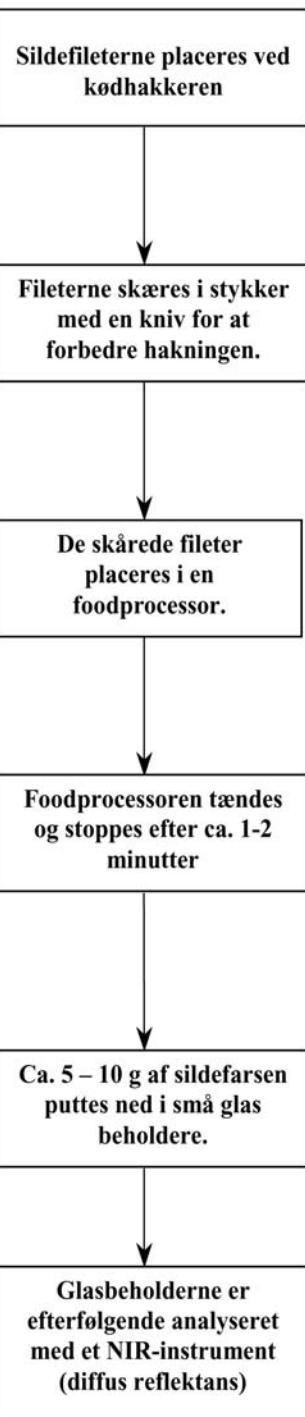
De primære prøver farseres på 1-2 minutter. Der anvendes en laboratorieudgave af en foodprocessor. Stopkriteriet for farsering er en erfaringsbaseret visuel bedømmelse af »partikelstørrelse« og »homogenitet« for alle prøver (bedømt af samme erfarne laboratorietekniker). Ud fra den totale farserede prøvemængde i foodprocessoren udtages en delmængde på ca. 1/75 (7,5 g), som overføres til analyseglasset. Udtagning foretages vha. en spatel e.l., idet det antages, at farseringen har givet en »tilfredsstillende homogenisering«.

Det er meget sjældent, at denne antagelse verificeres i dagligt rutinearbejde, hvilket derfor repræsenterer en totalt ukendt faktor i analysemetodens usikkerhedsbudget. Under normale omstændigheder vil den analytisk-kemiske evaluering af den totale analysefejl (TAE, figur 1 i første artikel) alene omfatte en reproducerbarheds- og repeterbarheds-evaluering af NIR-analysen mht. de 7,5 g.

Ifølge TOS skal evalueringen af TAE også omfatte samplingsfejl, både de fejl der stammer fra massenedelingen (1/75) ➔



Figur 1. Flow-sheet for samlet sampling + analysearbejdsgang ved NIR-analyse af fiskefars.



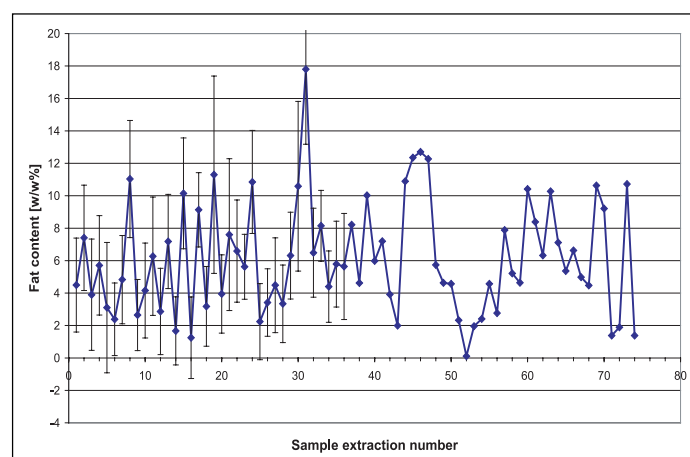
Figur 2. Blow-up af det kritiske arbejdsэлемент »homogenisering«. Undersøgelserne har påvist en markant forskel mellem formodet grad og virkelig grad af resulterende homogenitet.

fra foodprocessoren og fejl fra den videre reduktion ned til analysevolumen. Det er desværre et åbent spørgsmål, hvor ofte denne type fejlkilder inkluderes i dagens standardanalyseusikkerhedsbudgetter.

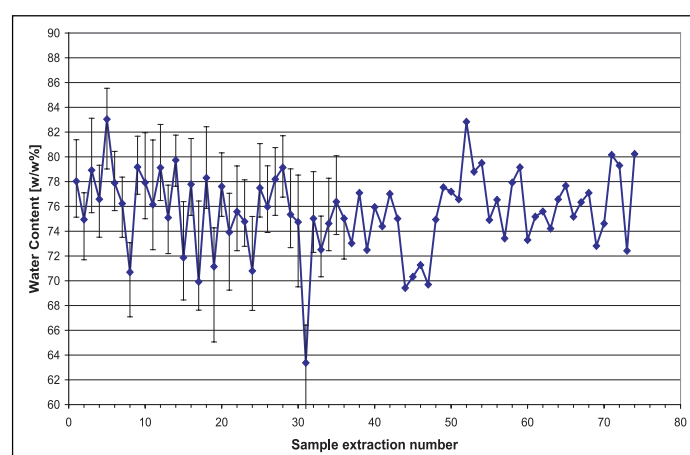
Heterogenitetskarakterisering

Der blev gennemført en fuldstændig TOS-analyse af prøve-massens repræsentativitet udtaget i forholdet 1/75 til hele foodprocessorens volumen, figur 2. Resultatet af analysen var overraskende - og meget illustrativt. Foodprocessoren blev underkastet en fuldstændig tømning med efterfølgende analyse af alle udtagne prøver, dvs. der blev udtaget en serie på 74 prøver.

Med reference til [4] var der forinden blevet udført en multivariat kalibrering af NIR-instrumentet, inklusive testsæt-validering [5]. For denne specielle heterogenitetsundersøgelse er kun kalibreringsmodellens relative prædiktioner interessante, idet alle prøverne prædikteres med samme model. Vi er primært interesserede i de 74 analyseværdiers indbyrdes relative spredning, idet de giver et kvantitativt indtryk af heterogeniteten i det færdigfarsede volumen. Analysens resultater præsenteres grafisk i figur 3 og 4.



Figur 3. Fedtbestemmelse for samtlige 74 replikater fra fuldstændig tømning af foodprocessor. Usikkerhedsgrænserne (kun indlagt for 50% af prøverne) stammer fra den uacceptable multivariate kalibreringsmodel.



Figur 4. Vandbestemmelse for samtlige 74 replikater fra fuldstændig tømning af foodprocessor. Usikkerhedsgrænserne (kun indlagt for 50% af prøverne) stammer fra den uacceptable multivariate kalibreringsmodel.

Markant inhomogenitet i »homogeniseret« laboratoriepulv

Figur 3 og 4 illustrerer, at homogeniseringsproceduren ikke giver det forventede resultat, men er karakteriseret ved en meget høj grad af manglende homogenitet. En fuldstændig homogenisering ville have givet en fælles stabil

koncentrationsværdi for alle målinger, dvs. en flad, vandretliggende forbindelseslinje mellem prøverne for hhv. vand- og fedtindhold.

De to prøvers inhomogenitet kan karakteriseres ved replikatmålingernes empiriske spredninger. TOS definerer variansen af de individuelle heterogenitetsbidrag for en sådan fuldstændig serie, $s^2(h_i)$, som et kvantitativt mål for sammensætningsmæssig heterogenitet (se artikel 4), men for det nuværende formål er det nok at beregne de to analytters CV, som er et udmærket mål for relativ spredning. $CV = \text{spredning/middelværdi (\%)}$. Vand: 2,3%, fedt: 71%. Især fedtbestemmelsen er interessant. Det afsløres klart, hvilken fundamental usikkerhed der kan ligge bag det, der dagligt opfattes som veletablerede homogeniserings-/prøveudtagningsrutiner i analyselaboratoriet.

Konsekvenserne af at bruge en (eller to) udtagne prøver på 7,5 g er katastrofale. Analyseresultaterne ligger endog meget langt uden for almindeligt acceptable rammer for reproducerbarhed (præcision). Hvad angår nøjagtighed er de maksimale absolutte forskelle på 20% for vand og 18% for fedt.

Brugen af kalibreringsprøver, der er udtaget efter en traditionel samplingsprocedure, fører altså meget let til fuldstændigt upålidelige prædiktioner. Som et eksempel er de relaterede usikkerhedsgrænser lagt ind på figur 3 og 4. De fundamentale prøvetagningsusikkerheder dukker også op som uacceptable prædiktionsusikkerheder i forbindelse med den nødvendige multivariate kalibrering af NIR-spektrene; se [4] for detaljer. Kun en TOS-verifikation af neddelingsproceduren sikrer en pålidelig beskrivelse af heterogeniteten.

Alvorlige konsekvenser for udokumenteret »homogenisering«

I det pågældende tilfælde peger resultaterne utvetydigt på nødvendigheden af at (videre)udvikle den anvendte »homogenisator« (foodprocessor). Den samme type foodprocessor bruges i øvrigt i mange kontrollaboratorier, hvor homogenisering er en nødvendig del af prøveforberedelsesproceduren.

Heterogenitetskarakterisering - helt nødvendig

De ressourcemæssige anstrengelser forbundet med en grundlæggende heterogenitetsundersøgelse anføres ofte som »urealistisk store« eller »unødvendige«, eller hele undersøgelsen afvises med henvisning til »velkendte erfaringer« eller »tradition«.

Den mest brugte afvisning er, at en evt. sampling-bias ikke har nogen praktisk konsekvens, idet den samme prøveudtagningsprocedure vil resultere i et »konstant sampling-bias«. Det er en myte, og der er ikke grundlag for at antage konstant sampling-bias. Samplingsteoriens to største teoretikere, og mest erfarne praktikere, har påvist, at denne antagelse er fuldstændig uberettiget [2,3]. Hertil kommer prisen - at man kompromitterer den aktuelle analytiske kalibrering pga. manglende dokumentation af repræsentativitet.

Forskellige systemer og materialer - samme heterogenitetskarakterisering

Undersøgelsen viser værdien af altid at gennemføre en grundlæggende heterogenitetsundersøgelse i laboratoriet (i øvrigt også af de primære/sekundære samplingstrin i analyseprocessen). Som påpeget i de to tidligere artikler spiller udgangsmaterialets natur, dvs. dets grundlæggende heterogenitet og gennemsnitlige kornstørrelse(r) m.v. en afgørende rolle for, hvilken prøvestørrelse der giver repræsentativitet (nøjagtighed og præcision). Det er vigtigt, at en sådan fundamental heterogenitetskarakterisering giver en objektiv fastlæggelse af den optimale prøvestørrelse (se næste artikel). Der findes en næsten uoverskuelig række af systemer og materialer, som

underkastes analyse inden for teknologi, videnskab og industri - både hvad angår materialesammensætning og optimal subsamplingstrategi. Men alligevel er kravet om og metoden for heterogenitetsbeskrivelse identisk. Der findes altid praktiske og enkle løsninger, selv inden for TOS' strenge krav. En »fuldstændig tømning« behøver ikke nødvendigvis at resultere i en uendelighed af analyser. Også her kan man foretage praktisk sampling, se f.eks. figur 6.

Heterogenitetskarakterisering af miljøprøver (jord)

Eksemplet stammer fra en aktuel evaluering af kemiske miljøanalyser. Analysemetoden kan f.eks. være ICP-OES, og analytterne kan være div. tungmetaller og ikke-flygtige PAH. Prøvematerialet udgøres af »repræsentative jordprøver«. Det store problem er feltprøvetagningen, jf. tidligere artikler, et problem der altid behændigt overlades til et rådgivende ingeniørfirma, som er villig til at påtage sig ansvaret.



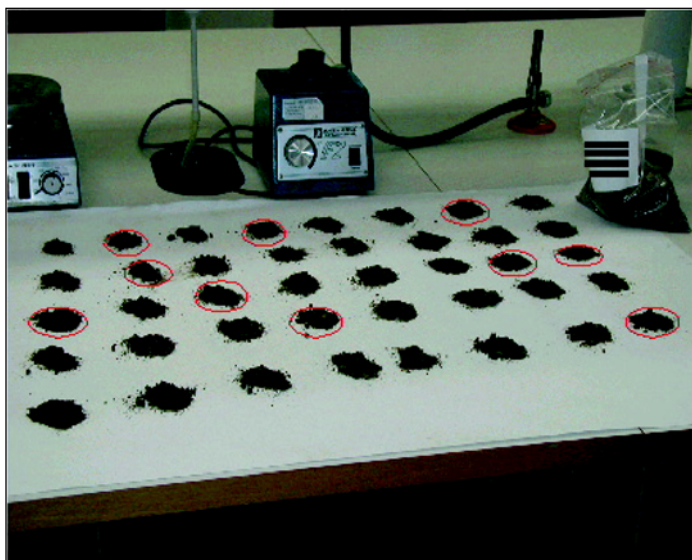
Figur 5. Status for miljøprøve ved ankomst til laboratoriet. Typisk vægt ved ankomst 1-2 kg; typisk analysevægt 7,5 g. Normalt foretages subprøvetagning ved udtagelse fra toppen af posen.

Det er ikke muligt at foretage den nødvendige masseneddeling korrekt - og dermed repræsentativt - uden at designe subprøveudtagningen herefter. Der skal anvendes spaltedeler eller lignende. Se figur 6.

Figur 5 illustrerer et af de mest kritiske elementer i prøvebehandlingsprocedurerne. Fra felten ankommer jordprø-

verne typisk i plastikposer med en vægt på 1-2 kg. Til ICP-OES-metoden skal der imidlertid kun bruges ca. 2 g, hvilket nødvendiggør en samplingsrate i laboratoriet på 1:100. Den foretages i dag vha. en ske, som rummer 1,5-2,5 g. Dagens procedurer foreskriver (for homogene prøver) udtagning fra et lettilgængeligt sted i posen. Heterogene prøver (visuel inspektion) udtages ved anvendelse af en antydning til sammensat prøvetagning, hvor del-prøver ganske vist søges udtaget fra forskellige områder i posen, men hvor graden af balanceret repræsentativitet ikke er underlagt systematisk konsistens eller kontrol. Mht. modtagelsesprocedurer og protokoller er de praktiske problemer oftest overladt til en modtagelses-laboratorietekniker e.l., hvor kendskab til TOS ikke indgår i oplæringsprogrammet. Det foreskrives f.eks. ikke, at posens indhold ikke må manipuleres mekanisk - hvilket er i direkte modstrid med TOS' krav om identisk sandsynlighed for alle potentielle prøveudtagninger.

Analyselaboratorier, der bruger denne type prøveforbehandlingsteknik, rapporterer jævnligt om alvorlige problemer med »konsistens af replikatresultater«. ACACSRG har interviewet flere laboratorier, uden at nogen ønskede at videreformidle konkrete tal for denne analysevarians eller at identificere sig. Fejlen ligger dog ikke hos de pågældende analyselaboratoriets analysekvalitet. Der er udelukkende tale om laboratorie-samlingsproblemer, der er enkle at korrigere.



Figur 6. Illustration af tilfældig udvælgelse fra alle potentielle subprøver. Ved en fuldstændig udtømning vil TOS' krav om tilfældig sampling med identisk sandsynlighed kunne overholdes uden problemer.

Figur 6 viser, hvordan man kan foretage en »fuldstændig tømning« af et mindre antal hovedtyper af prøvemateriale (for jordprøver kunne det f.eks. være lerjord, sandjord, humusholdig jord osv.). Der ses et stadium af en fuldstændig heterogenitetskarakterisering af sidstnævnte jordtype.

Fra en 2 kg feltprøve udtages 1000 prøver, svarende til et analysevolumen på 2 g. Herefter foretages en tilfældig udvælgelse af et mindre antal til den egentlige kemiske analyse. TOS har detaljerede forskrifter for, hvordan man bestemmer, hvilket antal der er nødvendigt - samtidig med at man udvikler en sekventiel heterogenitetskarakterisering. Når den fundamentale karakterisering er udført, kan man med sikkerhed foretage eventuelle mindre modifikationer.

Praktisk procedure i laboratoriet som overholder TOS-krav

Man ønsker at bestemme, hvilket minimum antal prøver der modsvarer en på forhånd given præcision og nøjagtighed. TOS

har detaljerede forskrifter for, hvordan man kan gå fra en *a priori* øvre grænse for acceptabel repræsentativitet (udtrykt som øvre grænse for nøjagtighed og præcision) til den modsvarende optimale prøvestørrelse, som er (tvingende) nødvendig, se artikel 4.

Heterogenitetskarakterisering - kun en gang for alle

Når man har gennemført en korrekt karakterisering, har man information til at designe en korrekt og repræsentativ rutineprocedure for laboratoriesubprøvetagning. Det er kun nødvendigt med en korrekt masseneddeling (f.eks. gennem spaltede-ler), idet man nu med sikkerhed ved, hvilket prøvevolumen der er optimalt. Det koster næsten ingenting at indføre sådanne rutineprocedurer i det daglige laboratoriearbejde, men gevinsten er enorm.

For et professionelt analyselaboratorium burde en engangskaracterisering af den/de mest almindelige prøvemidler under ingen omstændigheder kunne afvises pga. økonomi eller ressourcer. Der er kun behov for et meget lille antal analyser pr. prøvetype for hver hovedtype prøvemateriale. Det drejer sig om mindre end 100 analyser. Antallet må ses i lyset af det antal prøver, som dagligt udføres i laboratoriet. Man kan altså enkelt reducere/eliminere den/de grundlæggende samplingsfejl (10-100 gange større end den kemiske analysefejl, jf. første artikel) til et operationelt minimum ved én gang at gennemføre den beskrevne procedure. Omkostningerne vil selv under de dyreste økonomiske analyseforhold højst svare til en brøkdel af en uges analysearbejde, meget ofte betydeligt mindre.

Hvilket analyselaboratorium bliver det første kommercielle i Danmark, som opnår den meget betydelige komparative fordel, det vil være at kunne akkreditere sig som nedenstående?

»Laboratoriesamlingsfejl er eliminerede - der anvendes korrekt og repræsentativ prøvetagning på alle trin i analyseprocessen«.

E-mail-adresse:

Kim H. Esbensen: kes@auc.auc.dk

Referencer:

1. Vejledning i håndtering af forurenet jord på Sjælland. Udgivet af Fredriksberg kommune, Frederiksborg Amt, Københavns kommune, Københavns amt, Roskilde amt, Storstrøms amt & Vestsjællands amt, 2001. ISBN 87-90723-17-1
2. P. Gy. Sampling for Analytical Purposes. Wiley. ISBN 0-471-97956-2
3. F. Pitard. Pierre Gy's Sampling Theory and Sampling Practice (2.nd Ed.) CRC. ISBN 0-8493-8917-8
4. H. H. F. Pedersen. »Studies of structurally correct sampling at ESSI Konsumfisk using Gy's sampling theory (TOS)«. 10. sem. afgang-projekt, Ålborg Universitet Esbjerg, sommer 2002.
5. K. H. Esbensen. Multivariate Data Analysis - in practice. An introduction to multivariate data analysis and experimental design. 5.Ed. CAMO Publ. ISBN 82-993330-2-4
6. P. Smith. A primer for Sampling Solids, Liquids and Gases. Based on the seven sampling errors of Pierre Gy. ASA SIAM. ISBN 0-89871-473-7
7. P. Gy. The future of analysis: To check the sampling errors is the only way to improve the overall analytical reliability. Analysis (1995), vol. 23, 497-500
8. P. Gy. Introduction to the theory of sampling I. Heterogeneity of a population of uncorrelation units. TrAC, vol.14, no.2, 67-76
9. P. Gy. Sampling of heterogeneous and dynamical systems. Theories of heterogeneity, sampling and homogenizing. Data handling in science and technology, vol. 10. Elsevier. ISBN 0-444-89601-5