



Ministério da
**Ciência, Tecnologia
e Inovação**



sid.inpe.br/mtc-m19/2012/01.20.16.17-NTC

PROTOCOLO DE DETERMINAÇÃO DE ÂNIOS INORGÂNICOS EM SOLUÇÕES AQUOSAS POR CROMATOGRAFIA IÔNICA

Maria Cristina Forti
Roberta Lee Maciviero Alcaide

URL do documento original:
<<http://urlib.net/8JMKD3MGP7W/3B86KQ5>>

INPE
São José dos Campos
2012

PUBLICADO POR:

Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE

Gabinete do Diretor (GB)

Serviço de Informação e Documentação (SID)

Caixa Postal 515 - CEP 12.245-970

São José dos Campos - SP - Brasil

Tel.:(012) 3208-6923/6921

Fax: (012) 3208-6919

E-mail: pubtc@sid.inpe.br

CONSELHO DE EDITORAÇÃO E PRESERVAÇÃO DA PRODUÇÃO INTELLECTUAL DO INPE (RE/DIR-204):**Presidente:**

Marciana Leite Ribeiro - Serviço de Informação e Documentação (SID)

Membros:

Dr. Antonio Fernando Bertachini de Almeida Prado - Coordenação Engenharia e Tecnologia Espacial (ETE)

Dr^a Inez Staciarini Batista - Coordenação Ciências Espaciais e Atmosféricas (CEA)

Dr. Gerald Jean Francis Banon - Coordenação Observação da Terra (OBT)

Dr. Germano de Souza Kienbaum - Centro de Tecnologias Especiais (CTE)

Dr. Manoel Alonso Gan - Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos (CPT)

Dr^a Maria do Carmo de Andrade Nono - Conselho de Pós-Graduação

Dr. Plínio Carlos Alvalá - Centro de Ciência do Sistema Terrestre (CST)

BIBLIOTECA DIGITAL:

Dr. Gerald Jean Francis Banon - Coordenação de Observação da Terra (OBT)

REVISÃO E NORMALIZAÇÃO DOCUMENTÁRIA:

Marciana Leite Ribeiro - Serviço de Informação e Documentação (SID)

Yolanda Ribeiro da Silva Souza - Serviço de Informação e Documentação (SID)

EDITORAÇÃO ELETRÔNICA:

Vivéca Sant´Ana Lemos - Serviço de Informação e Documentação (SID)



Ministério da
**Ciência, Tecnologia
e Inovação**



sid.inpe.br/mtc-m19/2012/01.20.16.17-NTC

PROTOCOLO DE DETERMINAÇÃO DE ÂNIOS INORGÂNICOS EM SOLUÇÕES AQUOSAS POR CROMATOGRÁFIA IÔNICA

Maria Cristina Forti
Roberta Lee Maciviero Alcaide

URL do documento original:
<<http://urlib.net/8JMKD3MGP7W/3B86KQ5>>

INPE
São José dos Campos
2012

RESUMO

A Coordenação de Ciência do Sistema Terrestre do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, visando a consolidação de uma linha de pesquisa em Biogeoquímica Ambiental, implantou, a partir de 2009, facilidades para análise e preparação de amostras ambientais e desenvolvimento de tecnologias afins, o Laboratório de Aerossóis, Soluções Aquosas e Tecnologias. Este laboratório foi implantado para dar suporte, prioritariamente, às pesquisas relacionadas aos temas: química da atmosfera, transferências de espécies químicas nas Interfaces de ecossistemas, estudos da qualidade de corpos de água interiores e costeiros e tecnologias ambientais, bem como deposição e emissão de espécies químicas em diferentes escalas geográficas e ambientes. Este documento tem por objetivo protocolar a determinação de ânions inorgânicos em soluções aquosas, oriundas das pesquisas ambientais desenvolvidas neste laboratório.

PROTOCOL FOR DETERMINATION OF INORGANIC ANIONS IN AQUEOUS SOLUTIONS BY ION CHROMATOGRAPHY

ABSTRACT

The Earth System Science Center at the National Institute for Space Research, aiming the consolidation of the Environmental Biogeochemistry research line, since 2009 is implementing laboratory facilities for environmental samples preparation and analysis and development of related technologies, the Laboratory of Aerosols, Aqueous Solutions and Technologies. This laboratory was deployed to support proprietarily the researches on themes related to: atmospheric chemistry, chemical species transfers though ecosystem interfaces, studies on continental and coastal water bodies quality, chemical species emission and deposition at different geographical scales as well as environmental technologies. This document aims to file the determination of inorganic anions in aqueous solutions, derived from environmental research carried out in this laboratory.

LISTA DE FIGURAS

	<u>Pág.</u>
Figura 5.1 – Cromatógrafo de ânions 850 Professional IC.....	9
Figura 5.2 – Pré-coluna de ânions Metrosep A Supp 4/5 Guard	10
Figura 5.3 – Coluna de separação de ânions Metrosep A Supp 5 100/4.0 m.....	11
Figura 5.4 – Supressor químico utilizado na análise de ânions.....	11
Figura 5.5 – Detector condutimétrico.	12
Figura 3.1 – Resultado da curva de calibração para o fluoreto, gerado pelo software Magic Net IC.....	20
Figura 3.2 – Resultado da curva de calibração para o cloreto, gerado pelo software Magic Net IC.....	20
Figura 3.3 - Resultado da curva de calibração para o nitrato, gerado pelo software Magic Net IC.....	21
Figura 3.4 - Resultado da curva de calibração para o sulfato, gerado pelo software Magic Net IC.....	21

LISTA DE TABELAS

	<u>Pág.</u>
Tabela 1.1 – Parâmetros cromatográficos para análise dos ânions em MP.	1
Tabela 1.2 – Tempos de retenção de cada analito.	2
Tabela 1.3 - Cálculo do desvio padrão e do Limite de Detecção ($\mu\text{mol.L}^{-1}$).....	3
Tabela 10.1 – Valores médios das concentrações ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) das injeções em triplicata de cada padrão.....	19

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
LAQUATEC	Laboratório de Aerossóis, Soluções Aquosas e Tecnologias
EPA	U. S. Environmental Protection Agency
IC	Ion Chromatography
MP	Material particulado
LDM	Limite de detecção do método
CAL	Padrão de calibração
DC	Duplicata de campo
DL	Duplicata de laboratório
BFL	Branco fortificado em laboratório
BRL	Branco reagente laboratorial
FLC	Faixa linear de calibração
MSDS	Material Safety Data Sheets
CMR	Concentração mínima reportável
AQ	Amostras de qualidade
SPE	Solução padrão estoque
MR	Material de referência
CQ	Controle de qualidade
LMR	Limite mínimo reportável

LISTA DE SÍMBOLOS

F^-	Íon fluoreto
Cl^-	Íon cloreto
NO_3^-	Íon nitrato
SO_4^{2-}	Íon sulfato
μL	Unidade de volume, microlitros
min	Unidade de tempo, minutos
mM	Unidade de concentração, micromolar
MPa	Unidade de pressão, megaPascal
$ml \cdot min^{-1}$	Unidade de fluxo, mililitros por minuto
$^{\circ}C$	Unidade de temperatura, graus Celcius
L	Unidade de volume, litros
mg	Unidade de massa, miligramas
$mg \cdot L^{-1}$	Unidade de concentração, miligramas por litro
t	Valor de t de Student
S	Desvio padrão
H_2SO_4	Ácido Sulfúrico
Na_2CO_3	Carbonato de sódio
$NaHCO_3$	Carbonato ácido de sódio
$NaCl$	Cloreto de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
$NaNO_3$	Nitrato de sódio
K_2SO_4	Sulfato de potássio

SUMÁRIO

	<u>Pág.</u>
1	CONSIDERAÇÕES GERAIS E APLICAÇÃO..... 1
2	RESUMO DO MÉTODO 4
3	DEFINIÇÕES 4
4	INTERFERÊNCIAS..... 6
5	SEGURANÇA 8
6	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS..... 9
7	REAGENTES E PADRÕES 13
8	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS, PRESERVAÇÃO E ESTOCAGEM 14
9	CONTROLE DE QUALIDADE 15
9.1.	DEMONSTRAÇÃO INICIAL DE DESEMPENHO 15
9.2.	AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO LABORATÓRIO 17
9.3.	AVALIAÇÃO DE QUALIDADE DE ANÁLISE DOS DADOS..... 17
10	CALIBRAÇÃO E PADRONIZAÇÃO 18
11	PROCEDIMENTO..... 22
12	ANÁLISE DOS DADOS E CÁLCULOS 24
13	DESEMPENHO DO MÉTODO..... 25
	REFERÊNCIAS 26
	ANEXO 1 – Aplicações para a coluna METROSEP A SUPP 5-100 11
	ANEXO 2 – Valor de t de <i>Student</i> para um nível de confiança de 99% e desvio padrão estimado com <u>$n - 1$</u> graus de liberdade 15

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS E APLICAÇÃO

O método descrito neste protocolo foi baseado em um método desenvolvido pela *U. S. Environmental Protection Agency* (EPA) para a determinação de íons inorgânicos em água potável por cromatografia de íons, o EPA 300.1 (HAUTMAN, 1997). Este método foi adaptado para atender às necessidades do Laboratório de Aerossóis, Soluções Aquosas e Tecnologias (LAQUATEC).

Os parâmetros relacionados à cromatografia iônica (*Ion Chromatography* – IC) descritos neste protocolo foram configurados para análise de ânions maiores em extrato aquoso de material particulado atmosférico (MP). Embora tenha sido desenvolvido para analisar este tipo de material, o objetivo deste protocolo é orientar os usuários do LAQUATEC a respeito da determinação de ânions inorgânicos, por cromatografia iônica, em soluções aquosas em geral (amostras aquosas, águas superficiais, águas subterrâneas e água potável). Os parâmetros utilizados para o desenvolvimento deste método estão apresentados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Parâmetros cromatográficos para análise dos ânions em MP.

Volume de injeção 110,67 μL ;
Canal: Condutividade;
Tempo de análise: 11 minutos;
Integração: Automática;
Tipo de Coluna: <i>Metrosep A Supp 5 100/4.0</i> ;
Supressor Químico - solução de ácido sulfúrico 100 mM (H_2SO_4 100 mM)
Composição do Eluente: 3,2 mM de Na_2CO_3 ; 1,0 mM de NaHCO_3
Fluxo: 0,700 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$;
Pressão: 5,18 MPa;
Temperatura: 25,5 $^\circ\text{C}$.

Para o desenvolvimento deste protocolo foi utilizado um volumes de injeção (ou *loop* de injeção) de 110,67 μl para determinação dos íons fluoreto (F^-), cloreto (Cl^-), nitrato (NO_3^-) e sulfato (SO_4^{2-}) em extrato aquoso de MP. Este *loop* foi escolhido devido à expectativa de baixas concentrações destes analitos nas amostras. A Figura 1.1 mostra um exemplo dos cromatogramas adquiridos por este método.

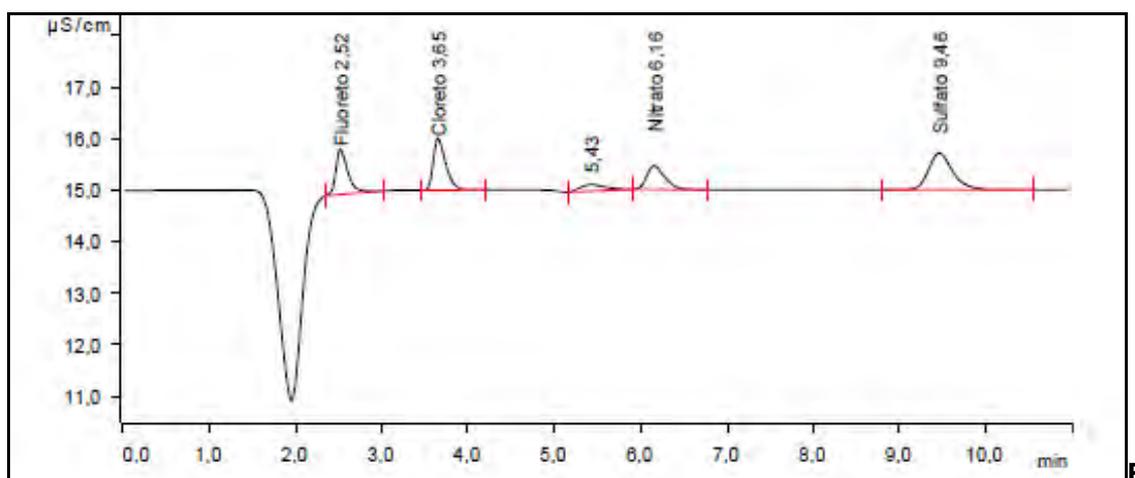


Figura 1.1 – Cromatograma obtido durante o desenvolvimento do método de determinação de ânions.

A Tabela 1.2 os tempos de retenção obtidos para cada analito.

Tabela 1.2 – Tempos de retenção de cada analito.

Número do Pico	Tempo de Retenção min	Nome do componente
1	2,552	Fluoreto
2	3,652	Cloreto
3	5,4228	-
4	6,157	Nitrato
5	9,460	Sulfato

Um único limite de detecção do método (LDM) foi determinado para cada um dos analitos F^- , Cl^- , NO_3^- e SO_4^{2-} , em extrato aquoso do MP, listado na

Tabela 1.3. Os LDM's para matrizes diferentes desta listada dependem da natureza da amostra e da instrumentação específica empregada.

Tabela 1.3 - Cálculo do desvio padrão e do Limite de Detecção ($\mu\text{mol.L}^{-1}$).

Desvio Padrão e LDM ($\mu\text{mol.L}^{-1}$).				
Padrão	Fluoreto	Cloreto	Nitrato	Sulfato
1	0	0	0	0
2	0,00551	0,0106	0,00200	0,00305
3	0,0408	0,0214	0,00700	0,00907
4	0,0260	0,00757	0,00100	0,00493
5	0,0196	0,00814	0,00173	0,00231
6	0,129	0,0185	0,145	0,0187
7	0,0284	0,00700	0,0155	0,00379
LDM	0,0384	0,0737	0,0139	0,0213

Os detalhes dos cálculos para este LDM estão descritos na seção 9 deste protocolo. Para atingir LDM's comparáveis a este, o sistema de cromatografia iônica deve utilizar detecção de condutividade suprimida, ou seja, com supressão química, devendo ser capaz de produzir uma linha de base com baixo ruído na condutividade de fundo. Devido ao sistema se supressão química, em todas as injeções de amostras e padrões aparecerá o pico 3, mostrado na Figura 1.1 e na Tabela 1.2, característico do cromatograma de uma análise usando supressão química.

É recomendado que este método seja utilizado somente sob supervisão de analistas experientes em cromatografia iônica e na interpretação dos resultados dos cromatogramas iônicos.

Os usuários deste método devem demonstrar habilidade para gerar resultados aceitáveis com este método, usando os procedimentos descritos na seção 9.

2 RESUMO DO MÉTODO

Um pequeno volume de amostra, 110,67 µl, é introduzido dentro do cromatógrafo de íons. Os ânions de interesse são separados e quantificados através da utilização de um sistema composto por uma coluna analítica, pré-coluna, supressor químico e detector de condutividade.

3 DEFINIÇÕES

ANÁLISE DO LOTE: um grupo de mais de dez amostras de campo. A análise do lote deve incluir os padrões de checagem e os brancos das amostras. A análise de lote deve incluir a análise um padrão de checagem inicial de calibração, um padrão de checagem final de calibração. A cada 10 amostras de campo, um padrão de checagem contínua de calibração deve ser analisado e também um branco fortificado em laboratório, para verificação da metodologia.

PADRÃO DE CALIBRAÇÃO (CAL): Uma solução preparada a partir de uma diluição de uma solução de padrão primário ou de soluções padrão estoque. As soluções CAL são utilizadas para a calibração da resposta do instrumento com relação à concentração do analito.

PADRÃO INICIAL DE CALIBRAÇÃO: uma série de soluções CAL utilizadas inicialmente para calibração do instrumento e desenvolvimento de curvas de calibração.

PADRÃO DE CHECAGEM CONTÍNUA DE CALIBRAÇÃO: Uma solução CAL, a qual é analisada a cada dez análises de amostras de campo, com a qual se verifica a curva de calibração anteriormente estabelecida e confirma a exatidão da quantificação dos analitos para as dez amostras de campo anteriores.

DUPLICATAS DE CAMPO (DC): duas amostras separadas, coletadas ao mesmo tempo e em lugar e condições idênticas e tratados exatamente da

mesma maneira ao longo dos procedimentos do campo e laboratorial. Análises de duplicatas de campo indicam uma precisão associada a coleta, preservação e armazenamento das amostras, bem como com os procedimentos laboratoriais.

DUPLICATA DE LABORATÓRIO (DL): Duas alíquotas de amostra, tomada em laboratório a partir de um recipiente único contendo a amostra e analisada separadamente por procedimentos idênticos. As análises de DL1 e DL2 indicam a precisão associada especificamente com os procedimentos laboratoriais, removendo quaisquer variáveis associadas atribuídas aos procedimentos de coleta, preservação, armazenamento das amostras.

BRANCO REAGENTE LABORATORIAL (BRL): Uma alíquota de água reagente ou matriz em branco que são tratadas exatamente como as amostras, incluído a exposição à vidraria, equipamentos, solventes e reagentes que são usados com outras amostras. O BRL é usado para determinar se os analitos do método ou outros interferentes estão presentes no ambiente laboratorial, reagentes ou equipamentos.

FAIXA LINEAR DE CALIBRAÇÃO (FLC): a faixa de concentração a qual a resposta do instrumento é linear.

FICHAS DE SEGURANÇA (MATERIAL SAFETY DATA SHEETS – MSDS): Informações escritas pelos fornecedores com respeito à toxicidade de uma substância química, riscos a saúde, propriedades físicas e os dados de reatividade, incluindo as precauções sobre armazenamento, derramamento e manuseamento da substância.

LIMITE DE DETECÇÃO DO MÉTODO (LDM): é a concentração mínima , maior que zero, a qual o analito pode ser identificado e quantificado com 99% de confiança.

CONCENTRAÇÃO MÍNIMA REPORTÁVEL (CMR): é a concentração mínima que pode ser reportada para um ânion em uma amostra. Esta concentração não pode ser menor que a concentração que o mais baixo padrão de calibração e somente deve ser usado se os critérios de controle de qualidade aceitável para este padrão forme atendidas.

AMOSTRAS DE QUALIDADE (AQ): uma solução contendo os analitos do método, com concentração conhecida, que é usada para fortificar uma alíquota de RBL ou a matriz da amostra. A AQ é obtida a partir de uma fonte externa ao laboratório, geralmente a partir de materiais de referência certificado (MRC) e diferente da fonte de padrões de calibração. Esta amostra é utilizada para verificar o desempenho do laboratório com materiais de teste preparados externamente.

SOLUÇÃO PADRÃO ESTOQUE (SPE): Uma solução contendo um ou mais analitos do método, preparada em laboratório, utilizando materiais de referência (MR) analisados ou comprado de uma fonte confiável.

4 INTERFERÊNCIAS

As interferências podem ser divididas em três categorias:

- Coeluição cromatografia direta, onde a resposta de um analito é observada com um tempo de retenção muito próximo ao analito de interesse;
- Coeluição dependente de concentração, que é observada quando a resposta da concentração é mais elevada do que as concentrações típicas, com sobreposição de picos vizinhos na janela de retenção;
- Deslocamento de caráter iônico, onde os tempos de retenção podem mudar significativamente devido a influência de matrizes de alta força iônica (ocasionado por alto conteúdo de minerais ou dureza) sobrecarregando os

sites de troca da coluna e reduzindo significativamente os tempos de retenção dos analitos.

Uma coeluição direta pode ser resolvida pela troca da coluna analítica, força do eluente, modificando o eluente com solventes orgânicos (se compatível com a coluna de cromatografia iônica), mudando o sistema de detecção, ou remoção seletiva da interferência com pré-tratamento. A diluição da amostra terá pouco ou quase nenhum efeito. O analista deve verificar que estas mudanças não devem afetar negativamente o desempenho, repetindo todos os critérios de controle de Qualidade (CQ) da Seção 9.

A diluição da amostra pode resolver algumas das dificuldades se a interferência é resultado de qualquer coeluição dependente da concentração ou de deslocamento iônico, mas deve ser esclarecido de que a diluição da amostra não deverá alterar o limite de mínimo reportável (LMR) por uma proporção equivalente ao da diluição. Portanto, uma análise cuidadosa dos objetivos do projeto deve ser dada antes da realização de tal diluição. Uma alternativa para a diluição da amostra seria a diluição do eluente, que será detalhada posteriormente.

Interferências no método podem ser ocasionadas por contaminantes na água utilizadas na preparação de soluções, nos reagentes, na vidraria ou em outros equipamentos utilizados na preparação das amostras, o que pode ocasionar elevação da linha de base dos cromatogramas de íons. Estas interferências podem levar a um resultado falso para os analitos de interesse, assim como reduzir o tempo de retenção, como consequência do ruído de base mais elevado.

O LAQUATEC é equipado com vidrarias específicas para a análise de ânions, (preparação de padrões eluentes e amostras), armazenadas separadamente da vidraria. Esta separação deve-se ao processo de limpeza das vidrarias, ou seja, estas vidrarias não podem ser lavadas com qualquer tipo de detergente

ou ácido. O processo de limpeza é feito somente com água tipo1, lavando-as cinco vezes o seu volume.

Todas as amostras que contêm partículas maiores que 0,45 microns e soluções reagentes que contenham partículas maiores que 0,20 microns devem ser filtradas para prevenção de danos na coluna e no sistema de fluxo do equipamento.

Qualquer ânion que é fracamente retido pela coluna pode eluir na mesma janela de tempo de retenção do fluoreto é potencialmente um interferente.

5 SEGURANÇA

A toxicidade e a carcinogenicidade de cada reagente utilizado neste método não foi totalmente estabelecida. Cada reagente químico deve ser considerado como um risco em potencial para a saúde e a exposição ao mesmo deve ser tão baixa quanto possível. Os procedimentos a serem realizados devem ser os mesmos àqueles já conhecidos para reagente químicos extremamente perigosos.

O LAQUATEC dispõe de documentos que auxiliam os usuários com relação a segurança e boas práticas laboratoriais, como o *Protocolo de segurança do laboratório de aerossóis, soluções aquosas e tecnologias – LAQUATEC* e o *Normas de procedimentos para separação, identificação, acondicionamento e tratamento de resíduos químicos do Laboratório de Aerossóis, soluções aquosas e tecnologias - LAQUATEC* (FORTI; ALCAIDE, 2011). Estes documentos estão disponíveis para os usuários na Biblioteca Digital do INPE. Além disso, é responsabilidade do usuário fazer um levantamento de todo material reagente a ser utilizado durante as análises e suas fichas de segurança ou MSDS.

Os seguintes materiais têm potencial altamente tóxico ou perigoso, e, portanto devem ser consultadas as MSDS:

•**Ácido Sulfúrico** – Quando utilizado na preparação de uma solução 100 mM deste ácido para ser utilizado na supressão química do equipamento 850 Professional IC.

6 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Cromatógrafo de íons – Sistema analítico completo com o cromatógrafo de íons e todos os acessórios necessários, incluindo seringas, colunas analíticas e detector de condutividade. No LAQUATEC está disponível o equipamento 850 Professional IC, da marca Metrohm, Figura 5.1. Os detalhes de funcionamento e operação deste equipamento estão descritos no documento *Manual de procedimentos de cromatografia iônica do laboratório de aerossóis, soluções aquosas e tecnologias – LAQUATEC* (FORTI; ALCAIDE, 2011), disponível na Biblioteca Digital do INPE.



Figura 5.1 – Cromatógrafo de ânions 850 Professional IC (Metrohm, 2011).

Pré-coluna de ânions - Metrosep A Supp 4/5 Guard (Metrohm), Figura 5.2. Esta coluna funciona como uma proteção para a coluna de separação contra contaminação de amostras ou eluente. Esta pré-coluna aumenta o tempo de vida útil da coluna de separação e praticamente não influencia do desempenho da coluna de separação. Se omitida do sistema, os tempos de retenção ficam menores.



Figura 5.2 – Pré-coluna de ânions Metrosep A Supp 4/5 Guard (Metrohm, 2001).

Coluna de separação de ânions - Metrosep A Supp 5 100/4.0 mm (Metrohm), Figura 5.3. Esta coluna foi escolhida para o desenvolvimento deste método, pois se trata de uma coluna para utilização de supressão química, diminuindo o tempo de corrida. No Anexo 1 estão descritos alguns cromatogramas e aplicações que podem ser conseguidas através da utilização desta coluna, bem como a descrição dos parâmetros necessários para tais aplicações.



Figura 5.3 – Coluna de separação de ânions Metrosep A Supp 5 100/4.0 m (Metrohm, 2011)

Supressor químico para análise de ânions - os dados apresentados neste método foram gerados usando um supressor químico, Figura 5.4. Este supressor é utilizado para análise de ânions, reduzindo a condutividade do eluente através de troca catiônica.



Figura 5.4 – Supressor químico utilizado na análise de ânions (Metrohm, 2011).

Detector de condutividade - Dispositivo capaz de registrar a passagem, em fluxo, de um composto presente no eluente, neste caso se trata de um o detector condutimétrico, Figura 5.5.



Figura 5.5 – Detector condutimétrico (Metrohm, 2011).

Software: O software Magic Net 2.0 é utilizado para a geração de todos os dados cromatográficos.

Materiais laboratoriais - Balança analítica: usada para pesar os reagentes para preparação do eluente e de soluções padrão; Seringas plásticas de 10 ml: usada para a filtragem e injeção das amostras; Porta filtros: de 25 mm de diâmetro: para a pré-filtragem das amostras; Membranas filtrantes: de acetato ou éster de celulose, 25 mm de diâmetro e 0,45 microns de tamanho de poro, para a pré-filtragem das amostras; Frascos: de polietileno de alta densidade (HDPE – *high density polyethylene*), opacos, de 30 ml, 125 ml e 250 ml, para estocagem das amostras e soluções de padrões de calibração; Vidrarias em geral: como béqueres, balões volumétricos de fundo chato, bastão de vidro, etc., utilizados na preparação de soluções.

7 REAGENTES E PADRÕES

Água reagente: utilizada na para preparação de eluentes, diluição de amostras e padrões, e lavar vidraria para a cromatografia de íons é necessário o uso de água de alta pureza. A água do tipo 1 pode ser considerada como “ideal”, ou seja, a água com a melhor qualidade possível de ser obtida com a tecnologia disponível atualmente para tratamento e purificação de água. Este tipo de água é utilizado em análises que requerem o mínimo de interferência e máximos de precisão e exatidão, preparações de soluções padrão e processos onde a presença de microrganismos de vê ser mínima. A água do tipo 1 deve ser utilizada no momento em que é produzida, não deve ser estocada, pois a sua resistividade diminui e também pode ocorrer a contaminação bacteriana (BREDA, 2001)

Solução eluente: a concentração desta solução eluente é 3,2 mM de Na_2CO_3 e 1,0 mM de $NaHCO_3$. Esta solução é preparada a partir de 678 mg de Na_2CO_3 (PA) e 168 mg de $NaHCO_3$ (PA) para 2 L de água reagente. Após o preparo, esta solução é colocada no ultrassom para a remoção de possíveis bolhas maiores contidas na solução. Não é necessário fazer a purga desta solução, pois o equipamento 850 Professional IC é equipado com um degaseificador, responsável pela purga do eluente.

Soluções padrão estoque, 1000 mg.L⁻¹: Soluções padrão estoque, podem se compradas como soluções certificadas ou preparadas a partir de reagentes grau ACS, sais de sódio ou potássio:

• **Cloreto (Cl^-) 1000 mg.L⁻¹:** Dissolver 0,1649 g de Cloreto de sódio ($NaCl$) em água reagente e diluir para 100 ml em balão volumétrico.

• **Fluoreto (F^-) 1000 mg.L⁻¹:** Dissolver 0,2210 g de Fluoreto de sódio (NaF) em água reagente e diluir para 100 ml em balão volumétrico.

• **Nitrato (NO_3^-) 1000 mg.L⁻¹**: Dissolver 0,6068 g de Nitrato de sódio ($NaNO_3$) em água reagente e diluir para 100 ml em balão volumétrico.

• **Sulfato (SO_4^{2-}) 1000 mg.L⁻¹**: Dissolver 0,1814 g de Sulfato de Potássio (K_2SO_4) em água reagente e diluir para 100 ml em balão volumétrico.

Observação: Estabilidade dos padrões: Os padrões estoque para estes ânions são estáveis por até 6 meses, quando estocados em geladeira, resfriamento a 4 °C. As diluições de trabalho destes padrões devem ser preparadas mensalmente.

8 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS, PRESERVAÇÃO E ESTOCAGEM

As amostras de campo de material particulado deverão ser primeiramente solubilizadas. O processo de solubilização é feito da seguinte maneira:

• As membranas de polycarbonato, contendo o material particulado coletado, devem ser transferidas para recipientes plásticos de polietileno de alta densidade.

• A estes frascos são adicionado aproximadamente 30 ml de água reagente. Esta adição é feita com ajuda de uma balança analítica. Depois desta adição, os frascos são encaminhados para um banho de ultrassom, onde ficará por 30 minutos.

• Após a retirada do ultrassom, as amostras devem ser filtradas antes de serem injetadas no cromatógrafo. O processo de filtração é feito com o auxílio de seringas descartáveis de 10 ml, porta filtros de 25 mm de diâmetro, membranas de acetato ou éster de celulose (25 mm de diâmetro e 0,45 µm de diâmetro de poro), frascos de polietileno de alta densidade limpos, pinça para membranas e luvas de procedimentos laboratoriais (para evitar a contaminação da amostra).

Primeiramente a seringa e o porta filtro são lavados cinco vezes com água reagente. Em seguida, a membrana de acetato de celulose é colocada no porta filtros e lavada com água reagente. Depois desta lavagem, um pouco da amostra é passada por esta membrana, somente o suficiente para rinsá-la. Por fim, todo o volume da amostra é filtrado e transferido para frascos de polietileno de alta densidade. A cada amostra todo este procedimento deve ser repetido. Os frascos são então rotulados, identificados à lápis com seus respectivos códigos, e as etiquetas são cobertas com plástico adesivo, para que não sejam danificadas durante a estocagem.

- A preservação destas amostras para a análise de ânions para este método é estabelecido como armazenamento em geladeira (resfriamento a 4 °C) por até um mês. Após este período, as amostras devem ser congeladas.

9 CONTROLE DE QUALIDADE

Cada laboratório utiliza o seu método para formalizar seu programa de controle qualidade (CQ). Os parâmetros deste programa de qualidade consistem e uma verificação do desempenho do laboratório e análise subsequente em cada lote do Branco Reagente de Laboratório, Branco Fortificado em Laboratório, Padrão de Checagem de desempenho do Instrumento e padrões de checagem de calibração. Esta seção detalha os requisitos para cada um destes parâmetros de controle de qualidade. É necessário que o laboratório mantenha os registros de desempenho que definem a qualidade dos dados gerados.

9.1. DEMONSTRAÇÃO INICIAL DE DESEMPENHO

A demonstração inicial de desempenho é utilizada para caracterizar o desempenho do instrumento (determinação da exatidão através da análise do Sistema de Controle de Qualidade).

Sistema de Controle de Qualidade (SCQ) – Ao iniciar a utilização deste método, uma base trimestral, ou quando necessário para atender às necessidades da qualidade dos dados gerados, verificar os padrões de calibração e desempenho aceitável do instrumento com a preparação e análise de um SCQ. Se as concentrações determinadas não estão dentro de $\pm 15\%$ dos valores declarados, o desempenho de determinado passo do método é inaceitável. A origem do problema deve ser identificada e corrigida antes de prosseguir com o início das determinações de Limite de detecção do Método (LDM) ou continuar com as análises.

Limite de detecção do Método (LDM) – LDM's devem ser estabelecidos para todos os analitos, com a utilização de água reagente (branco) fortificado em concentrações de três à cinco vezes o limite de detecção do instrumento estimado. Para determinar os valores de limite de detecção, pegar sete alíquotas replicatas do branco fortificado e processá-las pelo método analítico como um todo, em um período de três dias separados. Realizar todos os cálculos definidos no método e reportar as concentrações em valores de unidade apropriados. Calcular o MDL através da Equação 9.1:

$$LDM = (t) \times (S) \quad (9.1)$$

Onde:

t = Valor de t de *Student* para um nível de confiança de 99% e desvio padrão estimado com $n - 1$ graus de liberdade (por exemplo, para sete replicatas, o valor de t de *Student* é $t = 3,14$). A tabela com estes valores estão no Anexo 2 (Montgomery, 2001).

S = Desvio padrão das análises das replicatas do branco

Na Tabela 3 são mostrados os valores dos desvios padrão para cada analito e para cada faixa de concentração, bem como a média dos desvios padrão para cada analito e o cálculo do LDM. Como não são detectados valores significativos de concentração dos analitos no branco, os cálculos para o LDM foram feitos a partir dos valores obtidos a partir do valor de desvio padrão das três replicatas do menor nível de concentração (Padrão 2).

9.2. AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO LABORATÓRIO

Branco reagente laboratorial (BRL) – O laboratório deve analisar pelo menos um BRL a cada análise de lote. Os dados produzidos nesta análise são utilizados para avaliar a contaminação do ambiente laboratorial. Valores que excedem o limite de detecção do método (LDM) indicam que o laboratório ou o reagente poderão estar contaminados, e ações corretivas devem ser tomadas antes de continuar a análise.

9.3. AVALIAÇÃO DE QUALIDADE DE ANÁLISE DOS DADOS

Quando materiais de referência estão disponíveis, estes devem ser analisados para fornecer dados de desempenho adicionais. A análise de materiais de referência é uma ferramenta valiosa para demonstrar a capacidade de execução do método aceitavelmente.

Como existe um avanço muito rápido com relação aos recursos utilizados em processos de cromatografia, é permitido ao analista fazer algumas opções, como uso de diferentes colunas, volumes de injeção, e/ou eluentes, para melhorar as separações ou diminuir os gastos com medições. Cada vez que houver algum tipo de modificação no método pelo analista, o mesmo deve garantir que as condições analíticas estabelecidas anteriormente devem

continuar sendo seguidas, independentemente da mudança de configuração no método.

Sempre que possível, é recomendado que o laboratório adote medidas de controle de qualidade adicionais às descritas neste método.

10 CALIBRAÇÃO E PADRONIZAÇÃO

Primeiramente é necessário estabelecer os parâmetros do cromatógrafo de íons equivalentes aos indicados estabelecidos para gerar os dados da Tabela 1.2.

Estimativa da Faixa Linear de Calibração (FLC): A FLC deverá cobrir uma faixa de concentração esperada na análise das amostras de campos e não deve se estender mais que duas ordens de magnitude de concentração (por exemplo, se a quantidade de nitrato esperada está dentro de um range de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ à 10 mg.L^{-1} , duas ordens de magnitude permitirá padrões de calibração mínimo e máximo de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ à 20 mg.L^{-1} , respectivamente). A recomendação de duas ordens de magnitude é feita, pois acima deste é muito difícil manter a linearidade ao longo de todo o intervalo de calibração.

Se posteriormente é desejado uma faixa de concentração maior, então duas curvas de calibração devem ser preparadas.

Para cada curva de calibração, um mínimo de três padrões de calibração é necessário para uma curva que se entende por uma única ordem de magnitude, e um mínimo de cinco padrões de calibração são requeridos se a curva cobre duas ordens de magnitude (por exemplo, usando o nitrato novamente, mas neste caso a faixa se estende entre $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ à 10 mg.L^{-1} ou uma única ordem de magnitude. O terceiro padrão de calibração é requerido, mais ou menos no meio desta faixa. Para a faixa entre $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ à 20 mg.L^{-1} , com duas ordens de magnitude, cinco padrões de calibração

deverão ser empregados, os limites superior e inferior da faixa de concentração e mais três padrões proporcionalmente divididos entre os limites superior e inferior).

Preparar os padrões de calibração cuidadosamente, adicionando volumes de um ou mais padrões de estocagem a um balão volumétrico e diluir para o volume desejado com água reagente.

Na Tabela 10.1 estão os valores médios das concentrações (injeções em triplicata) utilizados para a confecção da curva de calibração utilizada para este método.

Usando uma coluna para análise de ânions, Metrosep A Supp 5 100/4.0 mm (Metrohm), injetar 110,67 μL de cada padrão de calibração. O software Magic Net irá tabular áreas dos picos de cada analito (resposta das injeções) contra as respectivas concentrações. Estes resultados são utilizados para preparar a curva de calibração, utilizando o ajuste linear dos mínimos quadrados, para cada analito. As curvas de calibração são aceitáveis desde que a correlação seja a mais próxima possível de um e o desvio padrão deve ser inferior 5 %. Nas Figuras 10.1 à 10.4 são mostradas as curvas de calibração geradas pelo software Magic Net para cada analito.

Tabela 10.1 – Valores médios das concentrações ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) das injeções em triplicata de cada padrão.

Padrões	Concentração Média ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)			
	Fluoreto	Cloreto	Nitrato	Sulfato
1	0	0	0	0
2	1,09	1,45	0,584	0,756
3	2,72	3,40	1,77	1,62
4	5,31	5,92	3,52	3,49
5	10,4	10,8	6,28	6,04
6	20,8	21,3	12,5	11,9
7	52,7	56,9	32,4	31,4

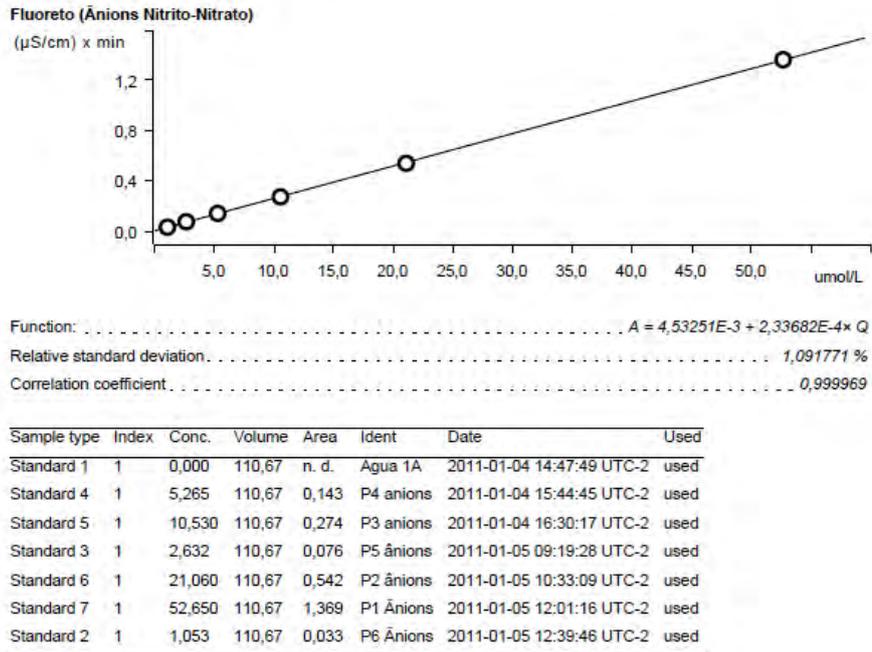


Figura 10.1 – Resultado da curva de calibração para o fluoreto, gerado pelo *software Magic Net IC*.

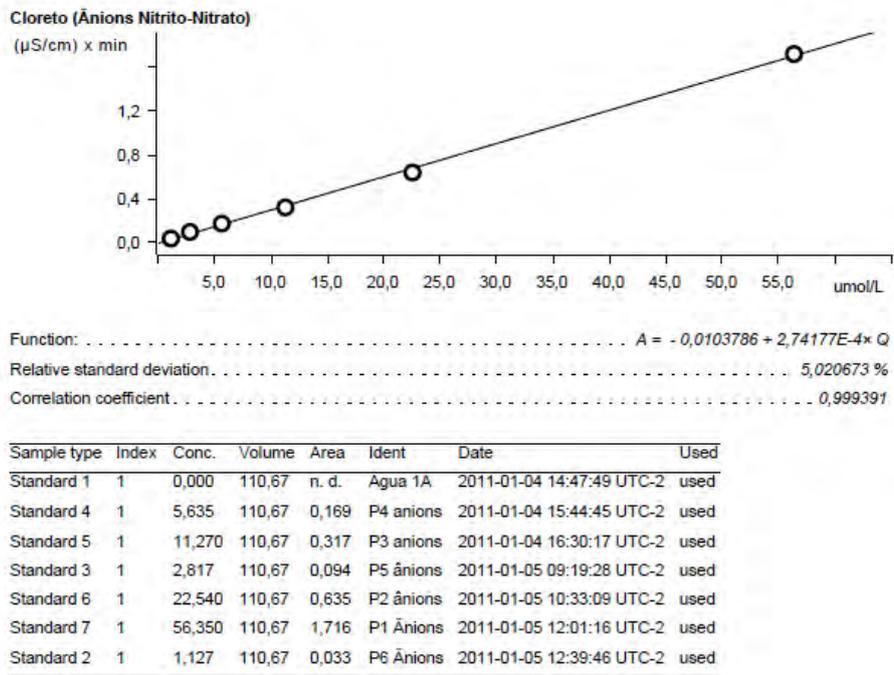


Figura 10.2 – Resultado da curva de calibração para o cloreto, gerado pelo *software Magic Net IC*.

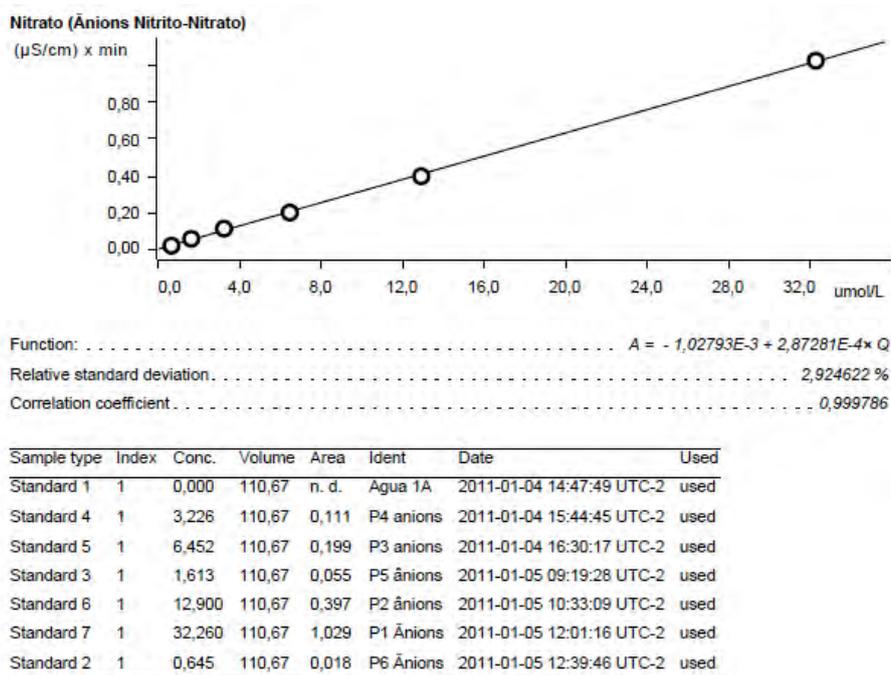


Figura 10.3 - Resultado da curva de calibração para o nitrato, gerado pelo software Magic Net IC.

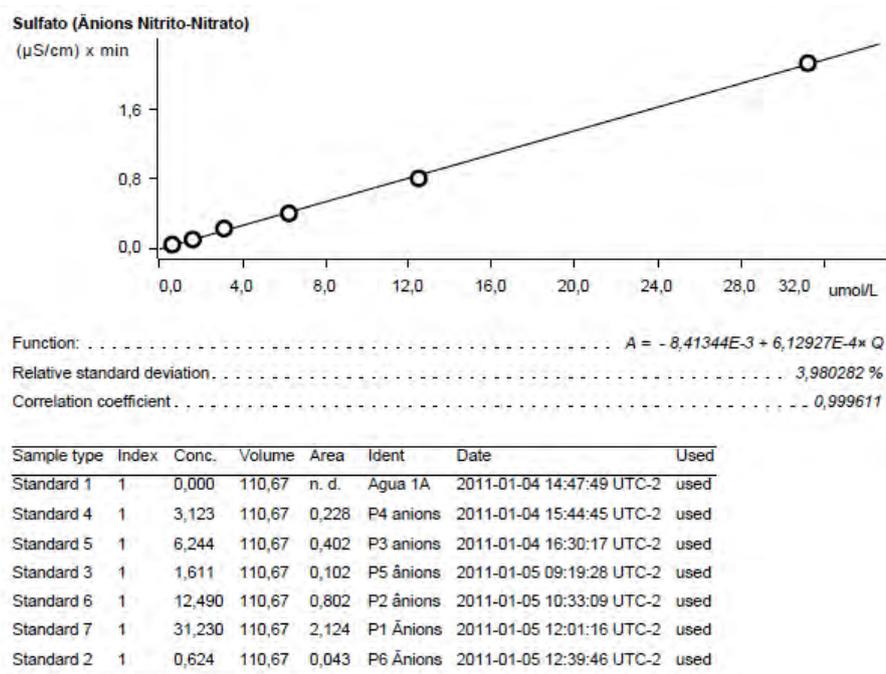


Figura 10.4 - Resultado da curva de calibração para o sulfato, gerado pelo software Magic Net IC.

Uma vez estabelecida a curva de calibração, a mesma deve ser verificada antes da realização de qualquer análise de amostras. Esta verificação é feita através da utilização dos padrões de checagem inicial da curva de calibração, diariamente ou sempre que o eluente for preparado.

Um padrão de checagem contínua deve ser analisado após a cada dez amostras analisadas e no final da batelada deve-se analisar um padrão de checagem final. Se durante a análise destes padrões existirem respostas diferentes em $\pm 5\%$, ou tempo de retenção diferentes em $\pm 5\%$ do esperado para algum dos analitos, os testes deverão ser repetidos, usando padrões novos de calibração. Se os resultados ainda estiverem fora deste critério, a análise das amostras deve ser parada. Todas as amostras, analisadas após a análise do último padrão de checagem considerado aceitável, devem ser analisadas novamente.

11 PROCEDIMENTO

- A Tabela 1.1 apresenta um resumo das condições de operação recomendadas para o cromatógrafo de íons para a análise de extrato aquoso de MP. Na Tabela 1.2 estão os tempos de retenção que podem ser adquiridos por este método.
- Checar o sistema de calibração diariamente e, se necessário, recalibrar o método.
- Preparação da amostra
- Se as amostras estão refrigeradas, providenciar para que as mesmas estejam em temperatura ambiente antes da injeção no IC. Geralmente basta deixar a amostra sem refrigeração por cerca de uma hora.

- As amostras devem ser filtradas por um filtro de 0,45 µm de poro, livre de contaminação iônica (por exemplo, a membrana de acetato de celulose), para o frasco onde será feita a análise.
- Quando a injeção é feita manualmente, homogeneizar a solução e colocar o capilar de injeção do IC dentro do frasco contendo a amostra. Verificar se o capilar está submerso, para evitar a entrada de ar durante a injeção. Colocar a seringa de 10 ml no orifício para a realização da injeção e puxar cerca de 2 ml durante o processo de injeção.
- Para lavar o sistema de injeção, entre as injeções das amostras, retirar o capilar da amostra e puxar o êmbolo da seringa para puxar o ar. Em seguida, introduzir o capilar de injeção na água pura e puxar novamente o êmbolo da seringa (cerca de 2 ml). Por fim, retirar novamente o capilar da água e puxar o êmbolo da seringa para entrada de ar.
- Durante a injeção de amostras e padrões, o software MagicNet irá tabular as áreas dos picos contra as concentrações de cada analito. Durante este processo também são gravados os tempos de retenção. Usar sempre o mesmo volume de injeção (loop de injeção) para as amostras e os padrões.
- O tamanho da janela do tempo de retenção usada para fazer a identificação deverá ser baseado em medições dos tempos de retenção atualizados dos padrões de cada analito. Geralmente três vezes o desvio padrão do tempo de retenção pode ser usado para calcular o tamanho da janela do tempo de retenção sugerida para cada analito. Entretanto, a experiência do analista deve pesar muito na interpretação dos cromatogramas.
- Se a resposta da análise da amostra exceder a faixa de calibração, a amostra poderá ser diluída com uma quantidade apropriada de água reagente e a análise pode ser realizada. Se esta diluição não for possível, então uma nova curva de calibração deverá ser feita com três padrões de concentração maior, mudando a faixa de calibração.

- Quando existir uma coeluição dos picos (ou seja, se dois analitos saírem no mesmo tempo de retenção e os picos ficarem sobrepostos), o eluente pode ser diluído. Esta diluição irá separar os picos, mas o tempo total de análise também será aumentado. O analista deverá se certificar que esta diluição não irá afetar negativamente o desempenho e a qualidade da análise.

- A diluição do eluente irá reduzir a resposta global de um ânion, devido à ampliação da banda cromatográfica. Isto pode afetar negativamente os limites de detecção do método.

12 ANÁLISE DOS DADOS E CÁLCULOS

Com o auxílio do software Magic Net, preparar a curva de calibração para cada analito, plotando a resposta do instrumento, área do pico, contra a concentração de cada padrão.

Depois da curva de calibração estabelecida, o cálculo da concentração de analitos das amostras injetadas será automaticamente feita por comparação da curva da amostra com a curva de calibração.

Reportar somente os valores que se situam entre o menor e o maior padrão de calibração. Caso existam amostras com respostas de concentração do analito superiores ao padrão mais concentrado, diluir a amostra ou fazer uma nova curva de calibração de faixa mais concentrada.

Para as análises ambientais realizadas no LAQUATEC, geralmente as concentrações dos analitos das amostras são reportadas em micromolar (μM).

13 DESEMPENHO DO MÉTODO

Na Tabela 1.1 são apresentadas as condições padrão, na Tabela 1.2 são apresentados os tempos de retenção e na Tabela 1.3 os limites de detecção do método (LDM) determinados para cada analito incluídos no método. Os LDM's foram determinados a partir das análises feitas em soluções padrões secundárias, feitas a partir das diluições do padrão primário, com água reagente, de cada analito.

Na Tabela 1.3 também são apresentados os desvios padrão de cada analito incluso no método, para as condições padrão identificada na Tabela 1.

Para mais detalhes sobre validação de método analíticos, o LAQUATEC possui o documento *Validação de métodos Analíticos - LAQUATEC* (FORTI; ALCAIDE, 2011), disponível na biblioteca digital do INPE

REFERÊNCIAS

- BREDA E. M. **Água grau reagente para laboratório e outros fins especiais.** Campinas: UNICAMP, 2001. 29 p. Disponível em: <http://lqes.iqm.unicamp.br/canal_cientifico/lqes_responde/%C!GUA%20GRAU%20REAGENTE.PGF>. Acesso em: 29 ago. 2011.
- FORTI, M. C.; ALCAIDE, R. L. M. **Manual de procedimentos de cromatografia iônica do laboratório de aerossóis, soluções aquosas e tecnologias - LAQUATEC.** São José dos Campos: INPE, 2011. v. 1, 52 p. (sid.inpe.br/mtc-m19/2011/06.03.13.41-MAN). Disponível em: <<http://urlib.net/8JMKD3MGP7W/39QJ77E>>. Acesso em: 26 ago. 2011.
- FORTI, M. C.; ALCAIDE, R. L. M. **Normas de procedimentos para separação, identificação, acondicionamento e tratamento de resíduos químicos Laboratório de Aerossóis, soluções aquosas e tecnologias - LAQUATEC.** São José dos Campos: INPE, 2011. v. 1, 53 p. (sid.inpe.br/mtc-m19/2011/06.03.13.30-MAN). Disponível em: <<http://urlib.net/8JMKD3MGP7W/39QJ6A2>>. Acesso em: 26 ago. 2011.
- FORTI, M. C.; ALCAIDE, R. L. M. **Protocolo de segurança do laboratório de aerossóis, soluções aquosas e tecnologias - LAQUATEC.** São José dos Campos: INPE, 2011. v. 1, 37 p. (sid.inpe.br/mtc-m19/2011/06.03.13.24-MAN). Disponível em: <<http://urlib.net/8JMKD3MGP7W/39QJ5PL>>. Acesso em: 26 ago. 2011.
- FORTI, M. C.; ALCAIDE, R. L. M. **Validação de métodos analíticos do laboratório de aerossóis, soluções aquosas e tecnologias - LAQUATEC.** São José dos Campos: INPE, 2011. v. 1, 52 p. (sid.inpe.br/mtc-m19/2011/06.03.13.48-NTC). Disponível em: <<http://urlib.net/8JMKD3MGP7W/39QJ7P2>>. Acesso em: 26 ago. 2011.

HAUTMAN, D. P. and MUNCH, D.J. METHOD 300.1 - **Determination of inorganic anions in drinking water by ion chromatography**. National Exposure Research Laboratory; Office of Research and Development; U. S. Environmental Protection Agency. Cincinnati, OHIO 45268; 1997.

METROHM AG. **850 Professional IC: Cation – 2.850.1010**, Manual. Switzerland. 94p.

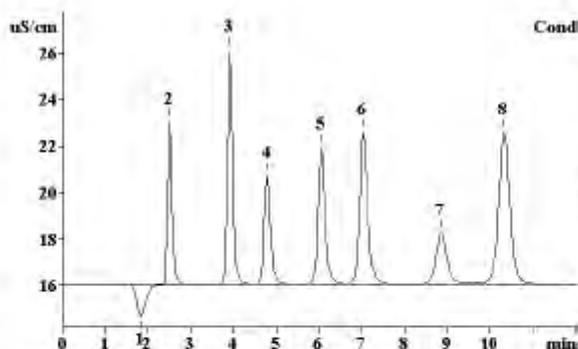
METROHM AG. **6.1006.510 Metrosep A Supp 5 - 100. 04 p.** Disponível em: <<http://www.metrohm.com/com/Produkte2/IC/ColumnsAnionswChemSupp.html?prdtName=61006510&prdtLang=en-US&prdtType=Columns>>. Acesso em: 30 ago. 2011.

METROHM AG. **6.1006.500 Metrosep A Supp4/5 Guard/4,0. 04 p.** Disponível em: <<http://www.metrohm.com/com/Produkte2/IC/ColumnsGuard.html?prdtName=61006500&prdtLang=en-US&prdtType=Columns>>. Acesso em: 30 ago. 2011.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiment**. Arizona State University. 5 th ed. John Wiley & Sons, Inc. United States of America, 2001.

ANEXO 1 – Aplicações para a coluna METROSEP A SUPP 5-100

Applications

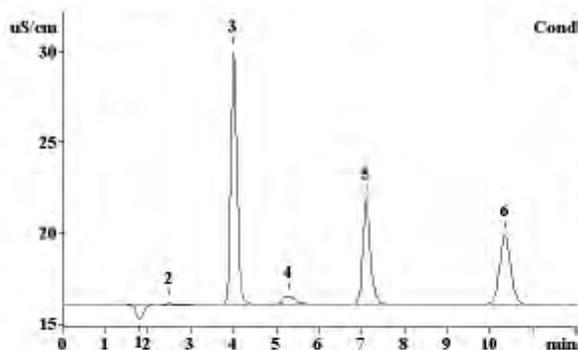


Cond Sample:
7 Standard ions

Eluent Composition:
1.0 mmol/L Sodium hydrogen carbonate
3.2 mmol/L sodium carbonate

Special:

Nr.	Ion	Conc. (mg/L)
1	Injection peak	
2	Fluoride	2.0
3	Chloride	5.0
4	Nitrite	5.0
5	Bromide	10.0
6	Nitrate	10.0
7	Phosphate	10.0
8	Sulfate	10.0

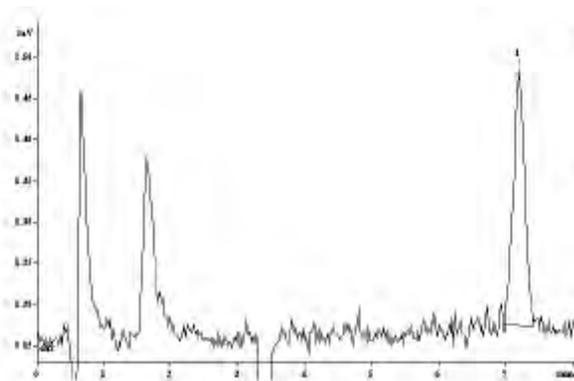


Cond Sample:
Tap water

Eluent Composition:
1.0 mmol/L Sodium hydrogen carbonate
3.2 mmol/L sodium carbonate

Special:

Nr.	Ion	Conc. (mg/L)
1	Injection peak	
2	Fluoride	0.058
3	Chloride	11.79
5	System peak	
6	Nitrate	11.97
8	Sulfate	7.38

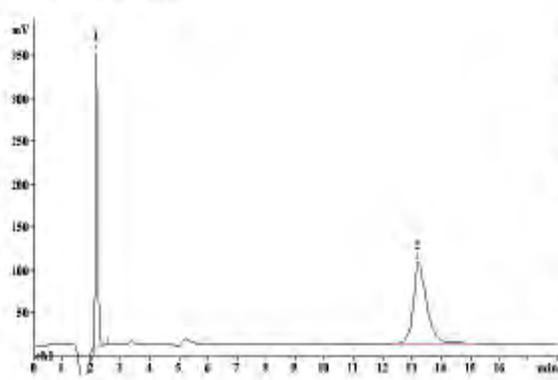


Sample:
Standard solution

Eluent Composition:
1.0 mmol/L Sodium hydrogen carbonate
3.2 mmol/L sodium carbonate

Special:
Photometric detection after post column reaction

Nr.	Ion	Conc. (mg/L)
1	Chromate	0.0001

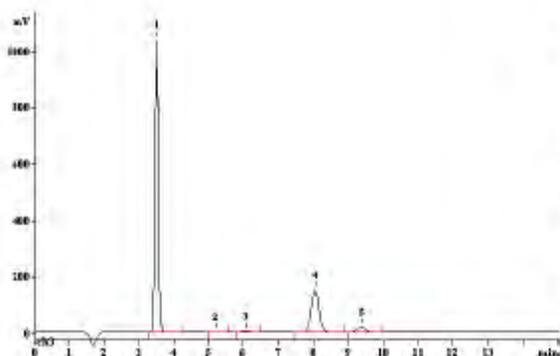


Sample:
2 Standard ions

Eluent Composition:
1.0 mmol/L Sodium hydrogen carbonate
3.2 mmol/L sodium carbonate

Special:

Nr.	Ion	Conc. (mg/L)
1	Iodate	10.0
2	Iodide	10.0

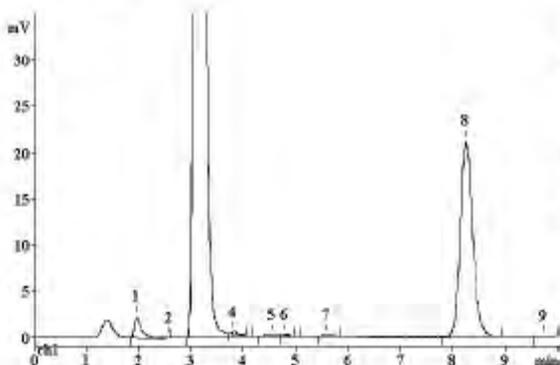


Sample:
Milk (3.8 % fat)

Eluent Composition:
1.0 mmol/L Sodium hydrogen carbonate
3.2 mmol/L sodium carbonate

Special:
Inline Dialysis

Nr.	Ion	Conc. (mg/L)
1	Chloride	1232.2
2	Bromide	n.q.
3	Nitrate	31.27
5	Phosphate	1637.2
8	Sulfate	107.4

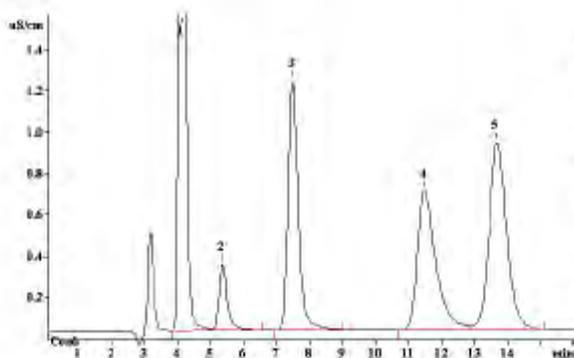


Sample:
Waste water

Eluent Composition:
1.0 mmol/L Sodium hydrogen carbonate
3.2 mmol/L sodium carbonate

Special:

Nr.	Ion	Conc. (mg/L)
1	Fluoride	5.38
2	n.d.	
3	Chloride	5411.9
4	Nitrite	0.57
5	n.d.	
6	Bromide	0.19
7	Nitrate	1.95
8	Sulfate	813.8
9	n.d.	

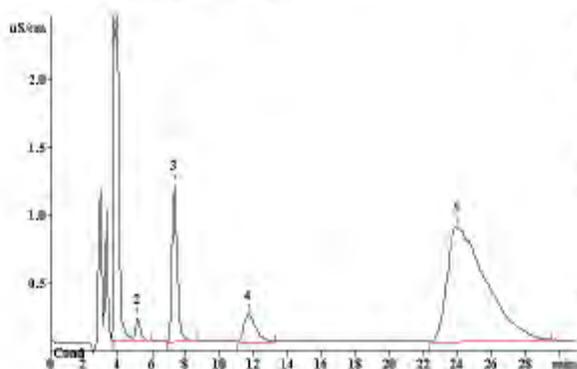


Sample:
5 Standard ions

Eluent Composition:
40 mmol/L Sodium hydroxide

Special:

Nr. Ion	Conc. (mg/L)
1 Sulfate	5.0
2 Phosphate	1.0
3 Citrate	5.0
4 Pyrophosphate	5.0
5 Trimetaphosphate	5.0



Sample:
Washing powder extract

Eluent Composition:
40 mmol/L Sodium hydroxide

Special:

Nr. Ion	Conc. (mg/L)
1 Sulfate	12.78
2 Phosphate	0.58
3 Citrate	4.43
4 Pyrophosphate	2.57
5 Trimetaphosphate	39.68

ANEXO 2 – Valor de *t* de Student para um nível de confiança de 99% e desvio padrão estimado com $n - 1$ graus de liberdade

II. Percentage Points of the *t* Distribution*

ν	α									
	.40	.25	.10	.05	.025	.01	.005	.0025	.001	.0005
1	.325	1.000	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	127.32	318.31	636.62
2	.289	.816	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	14.089	23.326	31.598
3	.277	.765	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	7.453	10.213	12.924
4	.271	.741	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	.267	.727	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	4.773	5.893	6.869
6	.265	.727	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	.263	.711	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.019	4.785	5.408
8	.262	.706	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
9	.261	.703	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	.260	.700	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587
11	.260	.697	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	3.497	4.025	4.437
12	.259	.695	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.428	3.930	4.318
13	.259	.694	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.372	3.852	4.221
14	.258	.692	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.326	3.787	4.140
15	.258	.691	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.286	3.733	4.073
16	.258	.690	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.252	3.686	4.015
17	.257	.689	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.222	3.646	3.965
18	.257	.688	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.197	3.610	3.922
19	.257	.688	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.174	3.579	3.883
20	.257	.687	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.153	3.552	3.850
21	.257	.686	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.135	3.527	3.819
22	.256	.686	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.119	3.505	3.792
23	.256	.685	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.104	3.485	3.767
24	.256	.685	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.091	3.467	3.745
25	.256	.684	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.078	3.450	3.725
26	.256	.684	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.067	3.435	3.707
27	.256	.684	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.057	3.421	3.690
28	.256	.683	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.047	3.408	3.674
29	.256	.683	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.038	3.396	3.659
30	.256	.683	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.030	3.385	3.646
40	.255	.681	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	2.971	3.307	3.551
60	.254	.679	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	2.915	3.232	3.460
120	.254	.677	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	2.860	3.160	3.373
∞	.253	.674	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	2.807	3.090	3.291

ν = degrees of freedom.

* Adapted with permission from *Biometrika Tables for Statisticians*, Vol. 1, 3rd edition, by E. S. Pearson and H. O. Hartley, Cambridge University Press, Cambridge, 1966.