



Ministério da  
**Ciência, Tecnologia  
e Inovação**



sid.inpe.br/mtc-m19/2014/01.17.13.42-NTC

## PROTOCOLO DE DETERMINAÇÃO DE CÁTIONS INORGÂNICOS EM SOLUÇÕES AQUOSAS POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE IONS

Roberta Lee Maciviero Alcaide  
Maria Cristina Forti

URL do documento original:

<<http://urlib.net/8JMKD3MGP7W/3FJFPGL>>

INPE  
São José dos Campos  
2014

## **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<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> 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:**

Maria Tereza Smith de Brito - Serviço de Informação e Documentação (SID)

André Luis Dias Fernandes - Serviço de Informação e Documentação (SID)



Ministério da  
**Ciência, Tecnologia  
e Inovação**



sid.inpe.br/mtc-m19/2014/01.17.13.42-NTC

## PROTOCOLO DE DETERMINAÇÃO DE CÁTIONS INORGÂNICOS EM SOLUÇÕES AQUOSAS POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE IONS

Roberta Lee Maciviero Alcaide  
Maria Cristina Forti

URL do documento original:

<<http://urlib.net/8JMKD3MGP7W/3FJFPGL>>

INPE  
São José dos Campos  
2014



Esta obra foi licenciada sob uma Licença Creative Commons Atribuição-NãoComercial 3.0 Não Adaptada.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported License.

## RESUMO

O Laboratório de Pesquisa em Biogeoquímica Ambiental (LAPBio) do CCST/INPE conta com uma infraestrutura laboratorial para realizar dosagens de espécies químicas em amostras ambientais bem como facilidades para coleta e preparo dessas amostras. Esse laboratório, denominado Laboratório de Aerossóis, Soluções Aquosas e Tecnologias (LAQUATEC) 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. Com o objetivo de documentar os diferentes protocolos analíticos foi produzido este documento com a meta de protocolar a determinação de cátions inorgânicos em soluções aquosas, oriundas das pesquisas ambientais desenvolvidas neste laboratório utilizando-se um cromatógrafo líquido de íons da marca Metrohm modelo 850 Professional IC usando-se a coluna de separação de cátions Metrosep C4 100/4.0 mm e detecção condutimétrica.



## **PROTOCOL FOR DETERMINATION OF INORGANIC CATIONS IN AQUEOUS SOLUTIONS BY ION CHROMATOGRAPHY**

### **ABSTRACT**

The CCST/INPE's Environmental Biogeochemistry Research Laboratory (LAPBio) account with a chemical laboratory infrastructure to determine chemical species in environmental samples as well as facilities for collection and preparation of these samples. This laboratory, named Laboratory of Aerosols, Aqueous Solutions and Technologies (LAQUATEC) was implemented to support, primarily, the research related to the topics: atmospheric chemistry, chemical species transfers at the ecosystem interfaces, water bodies' quality studies in coastal and inland zones, environmental technologies developments, as well as chemical species deposition and emission at different geographical scales and environments.

With the goal of documenting the different analytical protocol developed on this laboratory, this document was produced to describe the determination of inorganic cations in aqueous solutions from environmental samples. This protocol was prepared at LAQUATEC using a liquid ionic chromatograph from Metrohm model 850 Professional IC using for cations separation a column Metrosep C4 100/4.0 mm and conductimetric detection.





## LISTA DE FIGURAS

	<u>Pág.</u>
Figura 1.1 – Cromatograma obtido durante o desenvolvimento do método de determinação de cátions. ....	2
Figura 5.1 – Cromatógrafo de ânions 850 Professional IC (Metrohm, 2011). ....	9
Figura 5.2 – Pré-coluna de ânions Metrosep C4 Guard (Metrohm, 2001).....	10
Figura 5.3 – Coluna de separação de cátions Metrosep C4 100/4.0 mm (Metrohm, 2011).....	10
Figura 5.4 – Detector condutimétrico (Metrohm, 2011). ....	11
Figura 10.1 – Resultado da curva de calibração para o sódio, gerado pelo software Magic Net IC. ....	18
Figura 10.2 – Resultado da curva de calibração para o amônio, gerado pelo software Magic Net IC. ....	19
Figura 10.3 - Resultado da curva de calibração para o potássio, gerado pelo software Magic Net IC. ....	19
Figura 10.5 - Resultado da curva de calibração para o potássio, gerado pelo software Magic Net IC. ....	20
Figura 10.5 - Resultado da curva de calibração para o magnésio, gerado pelo software Magic Net IC. ....	20



## 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. ....	18



## 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

$Na^+$	Íon sódio
$NH_4^+$	Íon amônio
$K^+$	Íon potássio
$Ca^{2+}$	Íon cálcio
$Mg^{2+}$	Íon magnésio
$\mu L$	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 Celsius
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





## SUMÁRIO

	<u>Pág.</u>
1 CONSIDERAÇÕES GERAIS E APLICAÇÃO .....	1
2 RESUMO DO MÉTODO .....	3
3 DEFINIÇÕES .....	4
4 INTERFERÊNCIAS .....	6
5 SEGURANÇA .....	8
6 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	9
7 REAGENTES E PADRÕES .....	12
8 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS, PRESERVAÇÃO E ESTOCAGEM....	13
9 CONTROLE DE QUALIDADE.....	14
9.1. DEMONSTRAÇÃO INICIAL DE DESEMPENHO .....	14
9.2. AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO LABORATÓRIO.....	15
9.3. AVALIAÇÃO DE QUALIDADE DE ANÁLISE DOS DADOS .....	16
10 CALIBRAÇÃO E PADRONIZAÇÃO .....	16
11 PROCEDIMENTO.....	21
12 ANÁLISE DOS DADOS E CÁLCULOS.....	23
13 DESEMPENHO DO MÉTODO.....	24
REFERÊNCIAS.....	25
ANEXO 1 – Valor de t de Student para um nível de confiança de 99% e desvio padrão estimado com (n-1) graus de liberdade.....	27



## 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 cátions 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 cátions 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 300 µL;
Canal: Condutividade;
Tempo de análise: 16 minutos;
Integração: Automática;
Tipo de Coluna: Metrosep C 4 100/4.0
Composição do Eluente: 1,7 mM de ácido nítrico ; 0,7 mM de ácido dipicolínico
Fluxo: 0,900 ml.min <sup>-1</sup> ;
Pressão: 6,81 MPa;
Temperatura: 22 °C.

---

Para o desenvolvimento deste protocolo foi utilizado um volumes de injeção (ou *loop* de injeção) de 300 µl para determinação dos íons sódio ( $Na^+$ ), amônio ( $NH_4^+$ ), potássio ( $K^+$ ), cálcio ( $Ca^{2+}$ ) e magnésio ( $Mg^{2+}$ ) em extrato aquoso de MP. Este *loop* foi escolhido devido à expectativa de baixas concentrações destes analitos nas amostras. Na Figura 1.1 é mostrado um exemplo dos cromatogramas adquiridos por este método e na tabela 1.3 são apresentados os tempos de retenção, em minutos, de cada analito de interesse.

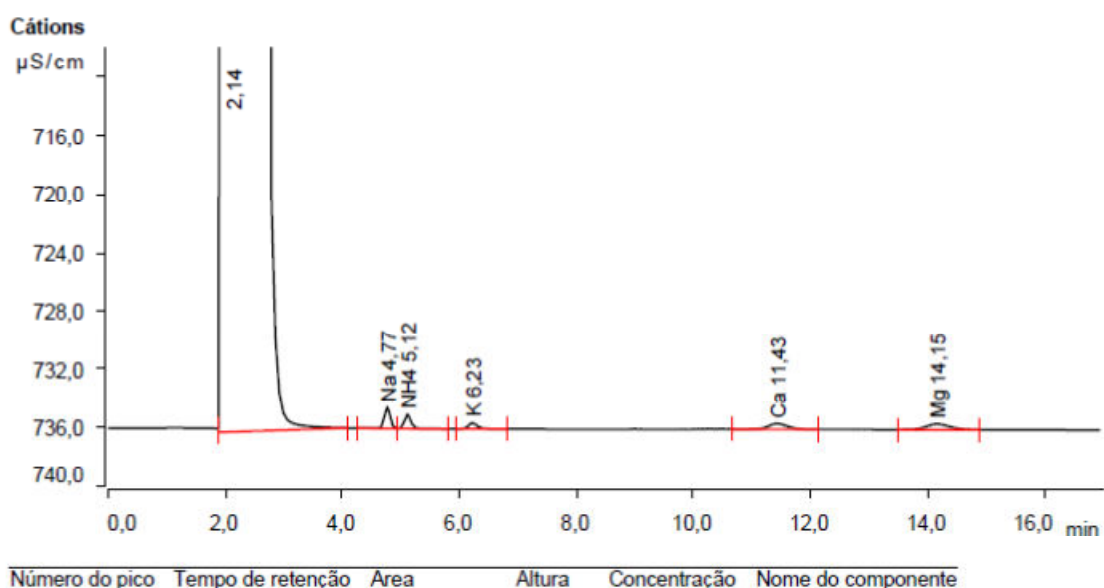


Figura 1.1 – Cromatograma obtido durante o desenvolvimento do método de determinação de cátions.

A Tabela 1.2 - Tempos de retenção (minutos) obtidos para cada analito.

Tabela 1.2 – Tempos de retenção de cada analito.

Número do Pico	Tempo de Retenção min	Nome do componente
1	4,773	Sódio
2	5,188	Amônio
3	6,228	Potássio
4	11,427	Cálcio
5	14,152	Magnésio

Um único limite de detecção do método (LDM) foi determinado para cada um dos analitos  $Na^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$   $Mg^{2+}$ , em extrato aquoso do MP, listado na Tabela 1.3. Os LDM's para matrizes diferentes desta dependem da natureza da amostra e da instrumentação específica empregada.

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

<b>Desvio Padrão e LDM (<math>\mu\text{mol.L}^{-1}</math>).</b>					
<b>Padrão</b>	<b>Sódio</b>	<b>Amônio</b>	<b>Potássio</b>	<b>Cálcio</b>	<b>Magnésio</b>
<b>1</b>	0,012	0,120	0,002	0,099	0,059
<b>2</b>	0,239	0,082	0,840	0,057	0,075
<b>3</b>	0,004	0,199	0,011	0,046	0,051
<b>LDM</b>	<b>0,017</b>	<b>1,384</b>	<b>0,076</b>	<b>0,317</b>	<b>0,356</b>

Os detalhes dos cálculos para este LDM estão descritos na seção 9 deste protocolo. 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, 300  $\mu\text{l}$ , é introduzido dentro do cromatógrafo de íons. Os cátions de interesse são separados e quantificados através da utilização de um sistema composto por uma coluna analítica, pré-coluna 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 de um padrão de checagem inicial de calibração e de 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 forem 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 do 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 utilizada 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 cátions, (preparação de padrões eluentes e amostras), armazenadas separadamente da vidraria de uso comum. 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 contém 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.

## 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 (FORTI e ALCAIDE, 2011a: <http://urlib.net/8JMKD3MGP7W/39QJ5PL>) e normas de procedimentos para separação, identificação, acondicionamento e tratamento de resíduos químicos (FORTI; ALCAIDE, 2011b: <http://urlib.net/8JMKD3MGP7W/39QJ6A2>). 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 Nítrico** – Quando utilizado na preparação de uma solução 1,7 mM deste ácido para ser utilizado como eluente para análise de cátions.

• **Ácido dipicolínico**: Quando utilizado na preparação de uma solução 1,7 mM deste ácido para ser utilizado como eluente para análise de cátions.

## 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, 2011c), disponível na Biblioteca Digital do INPE.



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

**Pré-coluna de cátions** - Metrosep C4 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 C4 Guard (Metrohm, 2001).

**Coluna de separação de cátions** - Metrosep C4 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 cátions Metrosep C4 100/4.0 mm (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 5.4.



Figura 5.4 – 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 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 utilizada 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 deve ser mínima. Utiliza-se a água do tipo 1 no momento em que é produzida, ela não pode ser estocada, pois além de incorporar sais do ambiente, diminuindo sua resistividade pode também ocorrer a contaminação bacteriana (BREDA, 2001)

**Solução eluente:** a concentração desta solução eluente é 1,7 mM de ácido nítrico e 0,7 mM de ácido dipicolínico. Esta solução é preparada a partir de 237 µL de ácido nítrico (PA) e 234 mg de ácido dipicolínico (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<sup>-1</sup>:** Soluções padrão estoque, podem ser compradas como soluções certificadas ou preparadas a partir de reagentes grau ACS, sais de sódio ou potássio.

**Observação:** Estabilidade dos padrões: Os padrões estoque para estes cátions são estáveis por até 6 meses, quando estocados em geladeira 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 policarbonato, 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  $\mu\text{m}$  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 enxaguá-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 cátions para este método é estabelecido como armazenamento em geladeira (resfriamento a 4 °C) por até um mês. Para um período maior, 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 replicadas 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 três replicatas, o valor de  $t$  de *Student* é  $t=4,541$ . A tabela com estes valores estão no Anexo 1 (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 do valor de desvio padrão das três replicatas do menor nível de concentração (Padrão 1).

## 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 devam 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 sódio esperada está dentro de um intervalo de  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  à  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ , duas ordens de magnitude permitirá padrões de calibração mínimo e máximo de  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  à  $20 \text{ mg.L}^{-1}$ , 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 a curva que se entenda através de 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 sódio novamente, mas neste caso o a faixa se estende entre  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  à  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  ou uma única ordem de magnitude). O terceiro padrão de calibração é requerido, mais ou menos no meio desta faixa. Para a faixa entre  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  a  $20 \text{ mg.L}^{-1}$ , 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.

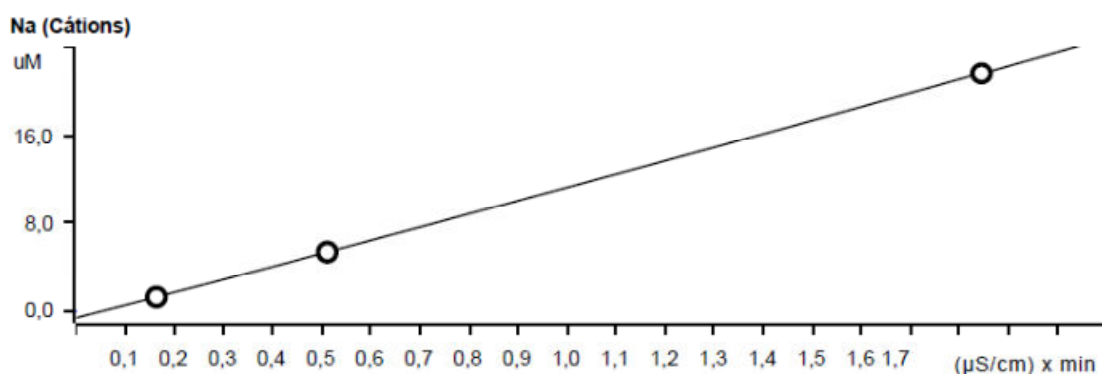
Na Tabela 10.1 são apresentados os valores médios das concentrações (injeções em triplicata) utilizados para a confecção da curva de calibração utilizada para este método.

Usando uma coluna para análise de cátions, Metrosep C4 100/4.0 mm (Metrohm), injetar  $300 \mu\text{L}$  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 10.5 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 ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )				
	Sódio	Amônio	Potássio	Cálcio	Magnésio
1	21,626	26,398	12,721	12,336	21,073
2	1,968	6,432	4,622	3,057	5,102
3	1,312	1,807	0,780	0,805	1,315



Função .....  $Q = -173,040 + 3451,93 \times A + 87,3357 \times A^2$   
 Desvio padrão relativo ..... 0,000000 %  
 Coeficiente de correlação ..... 1,000000

Tipo de amostra	Índice	Conc.	Volume	Área	Identificação	Data	Utilizado
Padrão 5	1	1,315	300,42	0,164	P5 cátions 12/07/12	2012-07-12 10:55:26 UTC-3	utilizado
Padrão 1	1	21,610	300,42	1,845	P1 cátions 12/07/12	2012-07-12 12:29:30 UTC-3	utilizado
Padrão 3	1	5,382	300,42	0,512	P3. CATIONS 16/07/12	2012-07-16 10:58:47 UTC-3	utilizado

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

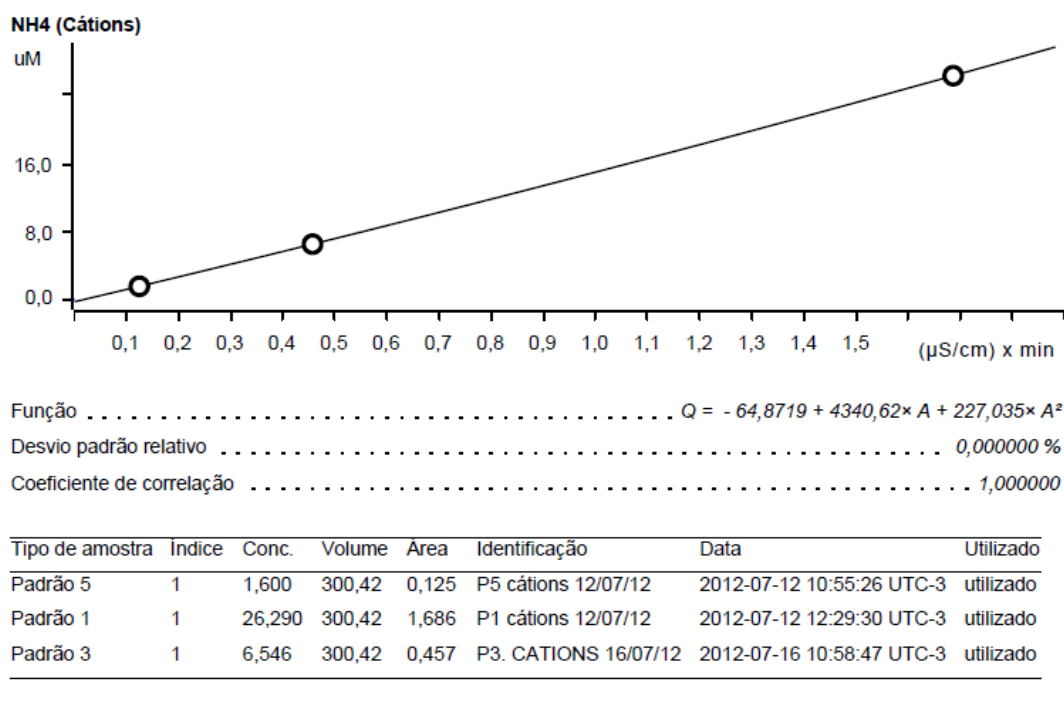


Figura 10.2 – Resultado da curva de calibração para o amônio, gerado pelo *software Magic Net IC*.

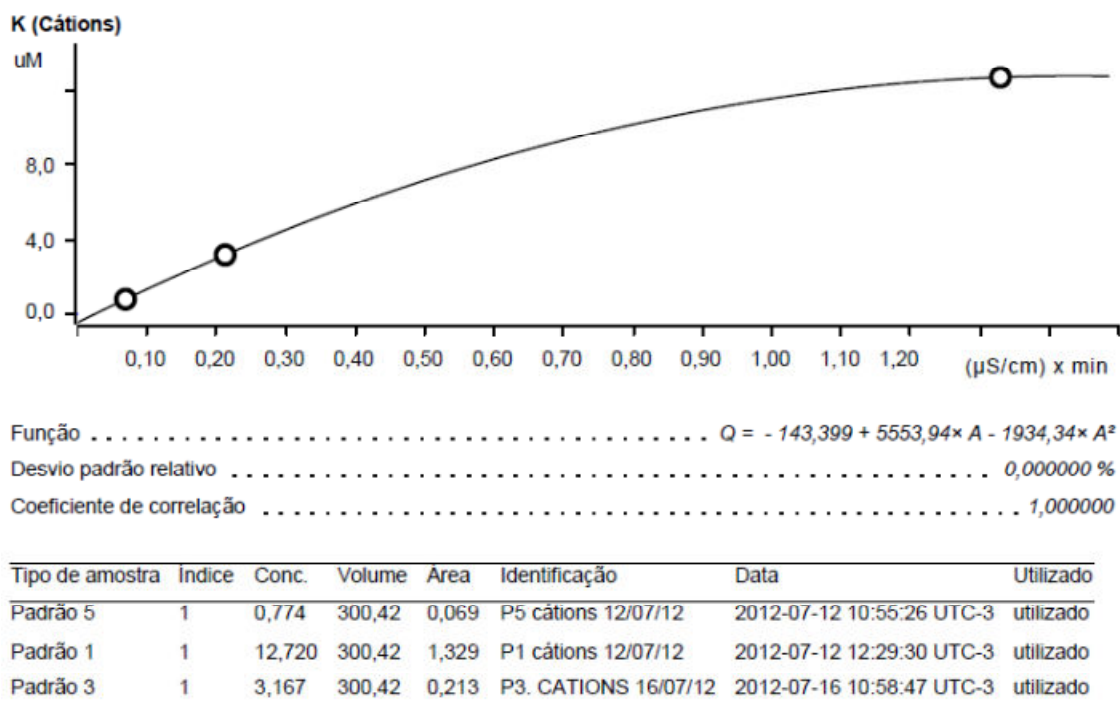
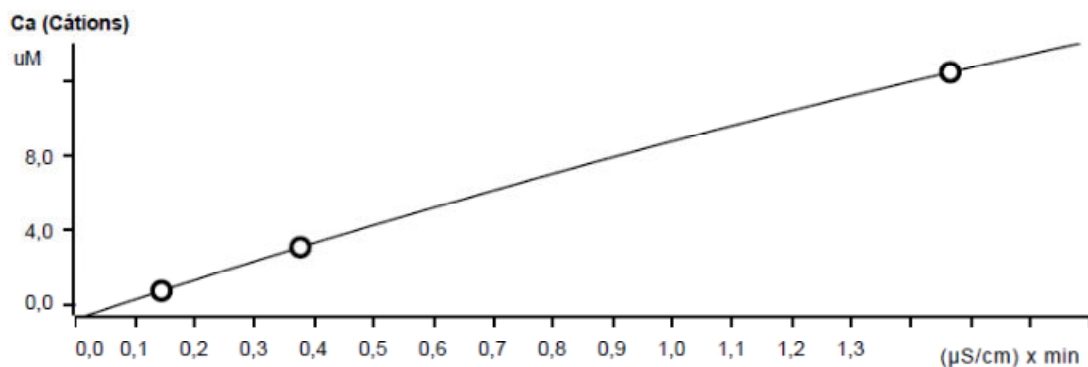


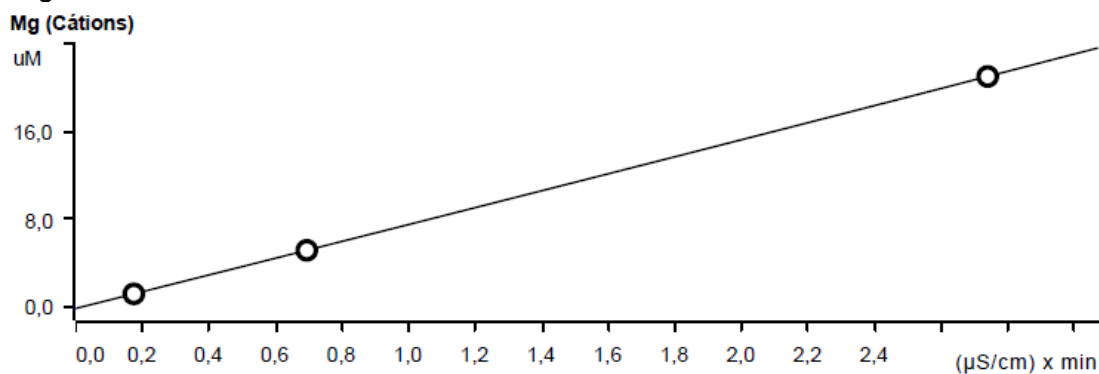
Figura 10.3 - Resultado da curva de calibração para o potássio, gerado pelo *software Magic Net IC*.



Função .....  $Q = -227,816 + 3206,79 \times A - 337,952 \times A^2$   
 Desvio padrão relativo ..... 0,000000 %  
 Coeficiente de correlação ..... 1,000000

Tipo de amostra	Índice	Conc.	Volume	Área	Identificação	Data	Utilizado
Padrão 5	1	0,759	300,42	0,144	P5 cátions 12/07/12	2012-07-12 10:55:26 UTC-3	utilizado
Padrão 1	1	12,470	300,42	1,466	P1 cátions 12/07/12	2012-07-12 12:29:30 UTC-3	utilizado
Padrão 3	1	3,106	300,42	0,377	P3. CATIONS 16/07/12	2012-07-16 10:58:47 UTC-3	utilizado

Figura 10.5 - Resultado da curva de calibração para o potássio, gerado pelo software Magic Net IC.



Função .....  $Q = -12,1095 + 2273,45 \times A + 12,2024 \times A^2$   
 Desvio padrão relativo ..... 0,000000 %  
 Coeficiente de correlação ..... 1,000000

Tipo de amostra	Índice	Conc.	Volume	Área	Identificação	Data	Utilizado
Padrão 5	1	1,277	300,42	0,174	P5 cátions 12/07/12	2012-07-12 10:55:26 UTC-3	utilizado
Padrão 1	1	20,990	300,42	2,739	P1 cátions 12/07/12	2012-07-12 12:29:30 UTC-3	utilizado
Padrão 3	1	5,227	300,42	0,693	P3. CATIONS 16/07/12	2012-07-16 10:58:47 UTC-3	utilizado

Figura 10.5 - Resultado da curva de calibração para o magnésio, 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 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**

- Na Tabela 1.1 apresenta-se um resumo das condições de operação recomendadas para o cromatógrafo de íons para a análise de extrato aquoso de MP. Na Tabela 1.2 são apresentados 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 na faixa mais concentrada.

Para as análises ambientais realizadas no LAQUATEC, geralmente as concentrações dos analitos das amostras são reportadas em micromolar ( $\mu\text{M}$ ).

### **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, 2011d), 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.igmm.unicamp.br/canal\\_cientifico/lqes\\_responde/%C!GUA%20GRAU%20REAGENTE.PGF](http://lqes.igmm.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. 2011a.
- 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. 2011b.
- 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. 2011c.
- 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. 2011d.

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 – 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\*

$\nu$	$\alpha$									
	.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
$\infty$	.253	.674	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	2.807	3.090	3.291

$\nu$  = 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.