

Глава 4. Розробка методу та обґрунтування методу

Розробка методу

Оскільки УФ-видима спектроскопія у більшості випадків застосовується для однокомпонентного кількісного аналізу, головна увага в цьому розділі приділяється оптимізації таких методів. Розробка методу включає пошук довжини чи довжин хвиль, які дають найкращі результати для конкретного аналізу на конкретному приладі. Найкраще це описується такими параметрами, як акуратність, точність, чутливість, лінійність, інтервал (діапазон), селективність. Оскільки всі ці параметри не можуть бути оптимізовані одночасно, перед певним аналізом треба визначити необхідні параметр чи параметри і вимоги до них. До недавнього часу обладнання обмежувало вибір довжини хвилі (в основному через проблеми з відтворюванням довжини хвилі) і відповідних приладів. Ці обмеження усуваються при використанні сучасного обладнання.

Примітка. Розробка методу включає також застосування різних статистичних засобів, але це питання не розглядається в даному підручнику. Детальну інформацію можна одержати в роботах [12-15].

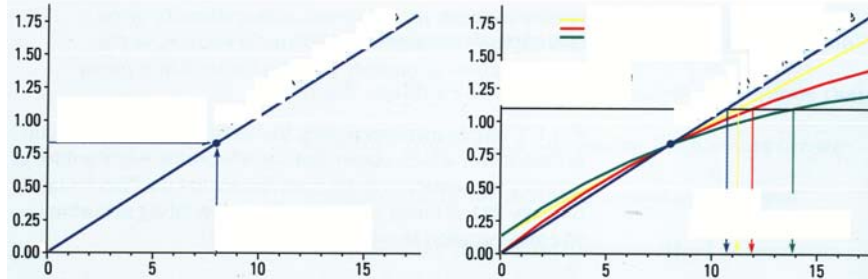
Лінійність

Лінійність – це здатність методу давати результати, які пропорційні (прямо чи через добре-визначену математичну трансформацію) концентрації аналіту в зразках у межах даного діапазону [16].

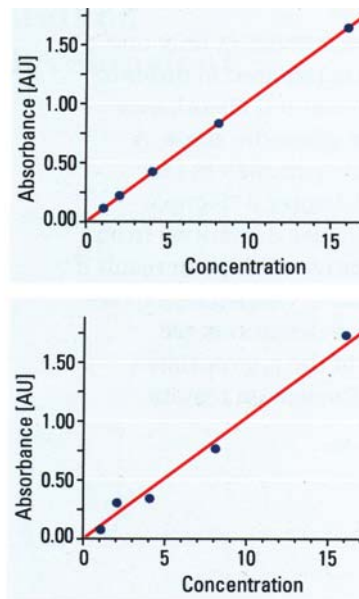
Для УФ-видимих вимірювань звичайна лінійна залежність – це закон Бера, який стверджує, що поглинання розчиненої речовини прямо пропорційне її концентрації (див. вище “Закон Бера”). Лінійна калібрувальна крива залежності поглинання від концентрації повинна мати вигляд:

$$A = kc$$

де A – поглинання, c – концентрація k – калібрувальний фактор (нахил (slope) калібрувальної кривої).



Теоретично, для калібрування в кількісному аналізі потрібне вимірювання поглинання лише одного стандарту відомої концентрації. Величина вимірюваного поглинання, поділена на концентрацію, дає нахил (кривизну). Багато інструментальних параметрів та параметрів зразка (див. гл.2. “Обладнання” та гл.3 “Пробопідготовка і вимірювання”) можуть спричиняти відхилення від закону Бера і давати значні кількісні помилки, якщо калібрувальна крива не досить точно охарактеризована (див.рис.56). Однак, оскільки ці відхилення залежать від довжини хвилі, вибір відповідної довжини хвилі може звести до мінімуму їх вплив на результати.

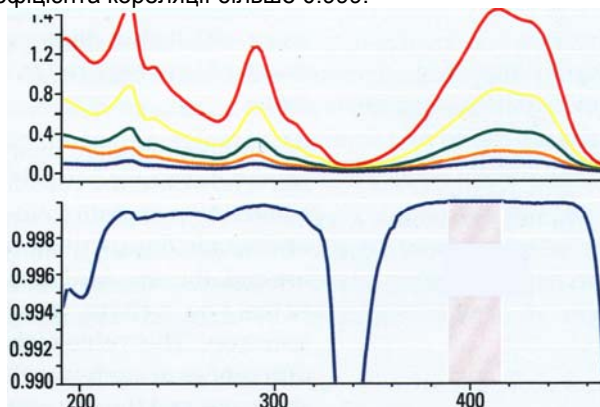


Для побудови калібрувальної кривої необхідне вимірювання спектрів не менше трьох стандартних розчинів аналіта. В ідеалі, всі виміряні стандартні величини повинні лежати на прямій, але практично ці величини завжди дещо розкидані (див.рис.57). Для найкращої побудови калібрувальної кривої і в подальшому для визначення типу кривої необхідно застосовувати статистичний метод. Найбільш часто використовуваним статистичним методом є лінійна регресія, яка відома також як метод найменших квадратів.

Для порівняння двох калібрувальних кривих необхідно визначити чи підходять стандарти до прямої лінії. Щоб визначити це, можна використати такі статистичні величини, як коефіцієнт кореляції, стандартна помилка регресії, а також невизначеність (невпевненість). Найбільш відомим (часто вживаним) є коефіцієнт кореляції. Ця величина знаходиться між $+1$ і -1 . Значення $+1$ вказує на чудову лінійну залежність між поглинанням і концентрацією з підвищенням A , значення -1 також вказує на хорошу лінійну залежність, але із зменшенням A (що може спостерігатися при використанні похідних даних). Значення 0 вказує на відсутність кореляції між поглинанням та концентрацією.

Для визначення найкращої довжини хвилі чи комбінації довжин хвиль вимірюються спектри серії чистих стандартів з широким діапазоном концентрацій. Для кожної довжини хвилі застосовується лінійна калібрувальна крива, а для оцінки лінійності – вибраний статистичний метод (засіб). Для найшвидшого розрахунку добре підходить графічна залежність лінійності (визначеної статистичним методом) від довжини хвилі.

На рис.58 зображені спектри стандартів чотирьох жовтих барвників і відповідний спектр коефіцієнта кореляції (?) для простої лінійної калібрувальної кривої. Найкраща калібрівка (у виразах лінійності) спостерігається в точці, в якій коефіцієнт кореляції наближається до одиниці. В цьому прикладі довжина хвилі максимуму поглинання (414 нм) не ідентична довжині хвилі (402 нм), яка дає найкращу лінійність. Типово, можна очікувати значень коефіцієнта кореляції більше 0.999.



Якщо індивідуальна довжина хвилі не дає бажаного ступеня лінійності, можна застосувати комбінацію довжин хвиль. Наприклад, застосування довжини хвилі внутрішнього стандарту для усунення помилок зсуву основної лінії у вимірах покращить результати.

Якщо бажаний ступінь лінійності не досягається при використанні простої лінійної калібрувальної кривої, можна застосувати інший тип калібрувальної кривої, щоб звести до мінімуму вплив нелінійності на результати. Типово, застосовуються такі рівняння :

(стор. 92)

І знову ж для оцінки відносної якості калібрувальних кривих застосовують коефіцієнт кореляції або інший статистичний засіб. Слід пам'ятати, що коли використовуються типи калібрувальних кривих з високими ступенями свободи, необхідно більше стандартів, щоб правильно охарактеризувати криву.

Закон Бера підходить також для багатокомпонентного аналізу. Але тут розрахункова модель включає закон адитивності для пояснення загального поглинання при кожній довжині хвилі. Проста лінійність, описана вище, не може бути використана. Замість цього можна використати стандартне відхилення залишку(?), щоб дізнатися як добре наша стандартна серія підходить (відповідає) до вимірюваного спектра. Ця величина є сумою квадратів різниць при кожній довжині хвилі між вимірним і розрахованим спектрами. Можна допустити, що якщо залишок дорівнює нулю, це означає (при умові повної відповідності стандартів вимірюваному спектру), що закон Бера і закон адитивності придатні (соблюдаються) для досліджуваної системи. Якщо стандартне відхилення залишку не дорівнює нулю, теоретична модель не відображає досліджувану систему, оскільки один із законів не дотримується або присутній додатковий компонент, для якого немає калібрувального стандарту. Однак, практично залишок ніколи не дорівнює нулю, і прийняте для аналізу значення слід визначати емпірично, застосовуючи аналітичні результати, що відповідають вимогам для акуратності і точності.

Акуратність

Акуратність методу – це ступінь узгодженості між індивідуальним результатом, отриманим цим методом, і істинним, справжнім результатом [16]. (Для пояснення різниці між акуратністю і точністю див. Додаток А).

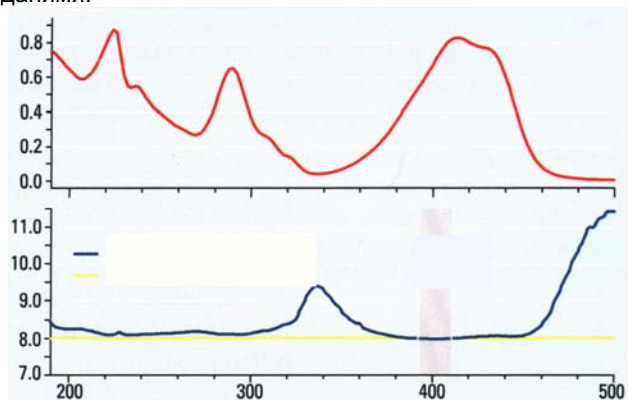
Щоб визначити, яка довжина чи довжини хвиль дають найкращу акуратність, вимірюють спектри серії стандартів і будують калібрувальні криві при всіх довжинах хвиль, як описано вище. Тоді потрібен зразок відомої концентрації. Цей зразок – ідеально той, для якого концентрація аналіта визначена іншою методикою. Однак, якщо такий зразок недоступний, готують синтетичний зразок, що вміщує відому вагу зразка. Вимірюють спектр зразка і проводять розрахунки при всіх довжинах хвилі у всьому вимірюваному діапазоні. Отримані кількісні результати при кожній довжині хвилі потім порівнюють з відомою величиною. Графічна залежність кількісних результатів від довжини хвилі забезпечує швидку оцінку.

На рис.59 наведені результати для зразка жовтого барвника. Хоч аналітична довжина хвилі при 414 нм вибрана із застосуванням традиційних методів, довжина чи довжини хвиль, які дають найкращу акуратність, знаходяться в області 400 нм.

Оскільки шум може впливати та акуратність індивідуального вимірювання, бажано проводити серію вимірювань і потім брати усереднене значення. Це зменшує внесок шуму в помилку акуратності методу.

Однак, у багатокомпонентному аналізі із спектральними діапазонами цією простою методикою неможливо віднайти оптимальний діапазон довжин хвиль.

Тут найкращий діапазон потрібно визначати методом дослідів і помилок і порівнянням розрахованих результатів із фактичними даними.

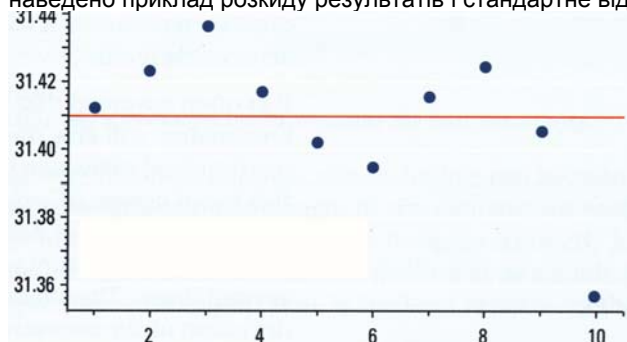


Точність

Точність методу – це ступінь узгодженості між індивідуальними результатами вимірювання, коли методика застосовується повторно для багатьох зразків [16].

Для визначення точності потрібна статистична величина. Найбільш вживаними для визначення точності або повторюваності серії значень є стандартне відхилення, процентне відносне стандартне відхилення (одержують діленням на середнє значення і множенням на 100) і довірчий інтервал.

Щоб визначити точність методу, готують серію із 10-20 зразків однакової концентрації. Потім ці зразки вимірюють і розраховують кількість аналіта. Стандартне відхилення результатів і є мірою точності. На рис.60 наведено приклад розкиду результатів і стандартне відхилення, яке можна очікувати для хорошого аналізу.



Якщо бажаний рівень точності не досягається, для покращення результатів застосовують згадувані вище методики зменшення шуму - усереднення довжини хвилі, усереднення часу, внутрішнє еталонування. Ці ж методики можна застосувати для багатокомпонентного аналізу.

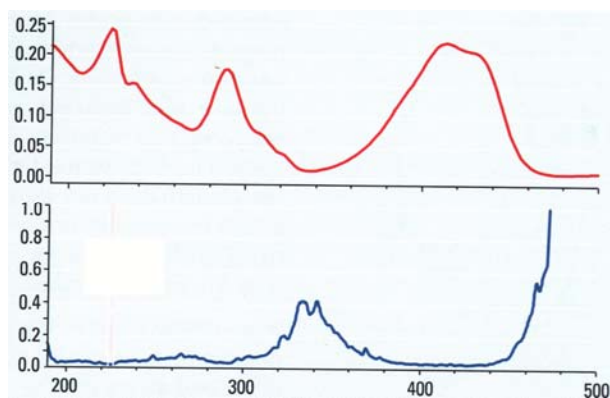
Чутливість

Чутливість характеризує відгук (response), отримуваний для даної кількості аналіта, і часто позначається двома аналітичними факторами – межа виявлення, детектування (limit of detection, LD) і межа визначення (limit of quantification, LQ) [16].

LD – це найнижча концентрація аналіта, яка може бути виявлена, але не обов'язково визначена в матрицях зразків. Взагалі, LD – це точка, при якій сигнал від аналіта при вимірюванні дорівнює трьом сигналам шуму. Результати вимірювання на деяких СФ мають стандартні відхилення, основані на шумі у вимірюваннях. LD приблизно втричі більша стандартного відхилення.

LQ – це найнижча концентрація аналіта, яка може бути визначена з прийнятною точністю і акуратністю у матрицях зразків. Щоб розрахувати LQ, необхідно визначити прийнятні межі точності і акуратності (які залежать від об'єктів аналізу). Для визначення прийнятних меж застосовують засоби, описані вище.

Часто припускають, що довжина хвилі з максимумом поглинання дає найкращу чутливість. Але це не зовсім так, оскільки інструментальний шум значно змінюється в залежності від довжини хвилі. Краще визначати довжину чи довжини хвиль оптимальної чутливості багаторазовим вимірюванням спектра зразка низької концентрації. Потім розраховують середнє і процентне відносне стандартне відхилення виміряних величин при кожній довжині хвилі. Довжина хвилі з найменшим процентним стандартним відхиленням і дасть найкращу чутливість. Рис.61 ілюструє цю методику для зразка жовтого барвника. Хоч довжини хвиль в області 400-450 нм і дають хорошу чутливість, найкраща чутливість спостерігається при 220 нм.



У багатокомпонентному аналізі ця методика може бути застосована для ідентифікації оптимальної довжини чи довжин хвиль для кожного компонента.

Ці довжини можна використати безпосередньо в простих паралельних рівняннях або як путівник для оптимального діапазону довжин хвиль у методі найменших квадратів.

Діапазон

Діапазон (range) – це інтервал між (і включаючи) верхнім і нижнім рівнями аналіта, які розраховані з необхідною точністю, акуратністю і лінійністю [16].

Діапазон визначають спочатку аналізуючи зразки, які містять змінні концентрації аналіта, а потім використовуючи описані вище засоби для розрахунку лінійності, точності та акуратності результатів.

Селективність

Селективність – це здатність методу акуратно і специфічно визначити кількісно аналіт чи аналіти в присутності інших сполук [16].

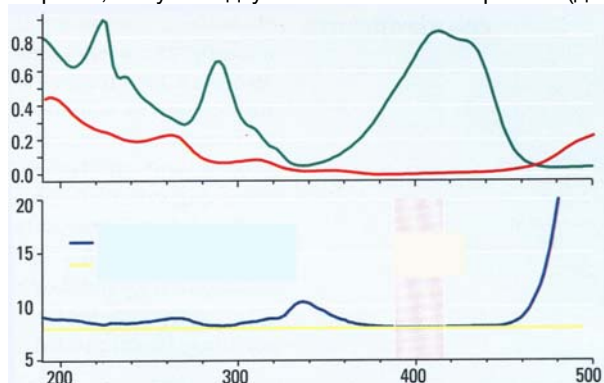
Присутність будь-якої іншої сполуки, яка поглинає при довжині хвилі визначення аналіта, призводить до кількісної помилки. Ці інші сполуки можуть бути відомими сторонніми домішками чи продуктами розпаду в матриці зразка.

Якщо тип інтерферента відомий, можна розглянути спектри аналіта і інтерферента, щоб вибрати довжину хвилі, при якій аналіт має значне поглинання, а інтерферент, навпаки, - незначне. Якщо вибір довжини хвилі недостатньо зменшує вплив інтерферента, можна застосувати відповідну методику корекції, наприклад, довжину хвилі ізопоглинання (див. вище "Ізопоглинання").

Якщо ідентичність і/чи спектри можливих інтерферентів невідомі, емпіричний підхід, майже ідентичний описаному вище, може бути використаний для визначення довжини чи довжин хвиль, що дають найкращу акуратність. У цьому випадку зразки для аналізу повинні містити інтерферент.

Якщо концентрація аналіта у зразку відома, довжина хвилі, яка дає результат, найближчий до відомої величини, і дасть найкращу селективність. Якщо ж концентрація аналіта невідома, довжина хвилі, що дає найнижчу концентрацію, звичайно дає найкращу селективність (домішки завжди збільшують поглинання, викликаючи завищені високі результати).

У прикладі на рис.62 зразок жовтого барвника забруднили червоним барвником. Графік залежності концентрації від довжини хвилі показує, що довжини хвилі в області 360-420 нм дають найкращу селективність. Варто звернути увагу, що через наявність забруднювача інтервал помилки акуратності значно ширший, ніж у випадку чистого жовтого барвника (див.рис.59).



Систематична похибка

Ruggedness (рус. грубость, неточность, шероховатость) – це ступінь відтворюваності результатів, отримуваних при аналізі одних і тих же зразків при варіюванні нормальних умов аналізу [16].

На метод не повинні впливати зміни в часі чи місці. Відтворюваність методу повинна бути встановлена в різних умовах, наприклад, з різними партіями реагентів, при різних температурах аналізу та ін.

Ruggedness аналітичного методу визначається аналізом підзразків (?) гомогенного зразка в різних лабораторіях і на різних приладах. Ці дослідження повинні проводитись різними аналітиками в дослідних і навколишніх умовах, які можуть змінюватись, але які підпадають під точно визначені параметри методу.

Ступінь відтворюваності результатів потім розраховують як функцію змінних величин досліду. Це значення можна порівняти з точністю методу в нормальних умовах, щоб одержати міру його ruggedness.

Інструментальні вимоги

При розробці аналітичного методу для оцінки всіх можливих виборів важливими, якщо не суттєвими, є повні спектральні дані. Відтворюваність довжини хвилі приладу повинна бути відмінною, щоб не обмежувати вибір довжини чи довжин хвиль. СФ, який автоматично вимірює багаторазові спектри і розраховує середнє і стандартне відхилення для кожного поглинання, також значно покращує продуктивність. Нарешті, instrumental software (матеріал, з якого виготовлено прилад ?) , повинен давати можливість видавати велику кількість даних і використовувати статистичні засоби. Розрахунки вручну чи перенесення спектрофотометричних даних на інші прилади серйозно обмежує продуктивність.

Обґрунтування методу

Аналітичний метод, розроблений для застосування в певних умовах, повинен бути обґрунтованим. Обґрунтування методу – це процес визначення придатності характеристик методу для поставленої мети. Обґрунтування методу подібне до розробки методу в тому, що включає вивчення специфічності, лінійності, правильності чи відновлення, чутливості, точності чи відтворюваності. Але метод обґрунтування повинен триматися окремо від методу розробки і підбору. Тоді як метод розробки включає вибір(підбір) специфічних параметрів і умов, метод обґрунтування використовується для підтвердження того, що характеристики методу відповідають поставленій меті.