

Глава 5. Рутинні вимірювання

УФ-видима спектроскопія вважається routine (звичайною, усталеною) методикою і широко застосовується в різних лабораторіях. Однак ні розглянуті в попередніх главах міркування, ні найкраща розробка методу не гарантують хороших результатів. У цій главі розглядаються заходи для забезпечення акуратності і точності результатів на систематичній основі і, що, можливо, більш важливо, для виявлення помилкових результатів.

Контроль за роботою приладів

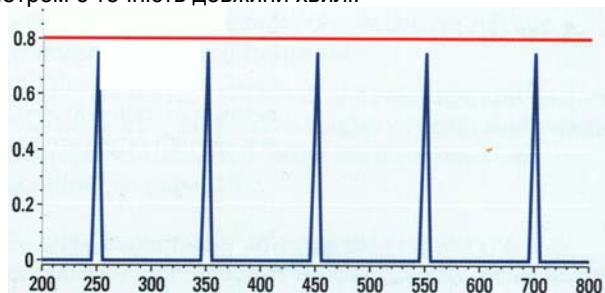
Останнім часом набувають все більшого значення вимоги до якості роботи приладів у різних галузях. Контроль за належною роботою УФ-видимих СФ є ключовим елементом цих вимог.

Дослідні параметри

Хоч і не існує чіткого визначення відносно того, які параметри слід дослідити для контролю роботи приладу, виготовлювачі та користувачі взагалі погоджуються з тим, що критерії, які будуть розглянуті нижче, заслуговують на увагу.

Акуратність і точність довжини хвилі.

Коли спектри вимірюються на різних приладах, точність довжини хвилі є найбільш важливим критерієм. Вона також відіграє роль у кількісному аналізі, коли використовуються коефіцієнти чи фактори екстинкції. Оскільки ці фактори залежать від довжини хвилі, вимірювання повинні проводитись точно при тій же довжині хвилі, при якій ці фактори були визначені спочатку (изначально). Але при порівнянні спектрів чи величин поглинання, виміряних на одному й тому ж приладі (як це буває у більшості кількісних аналізів, в яких вимірюється стандарт), критичним параметром є точність довжини хвилі.



Для визначення акуратності і точності довжини хвилі потрібен контрольний стандарт. В ідеалі, цей стандарт повинен мати дуже вузькі, чітко визначені піки при серії довжин хвиль у УФ та видимих діапазонах, як показано на рис.63. Такого ідеального стандарту не існує, хоч деякі стандарти наближаються до ідеалу. Для фактичних стандартів акуратності довжини хвилі (оскільки піки не ідеально симетричні) зміни ширини щілини приладу впливають на виміряне положення піків.

Фотометрична акуратність і точність.

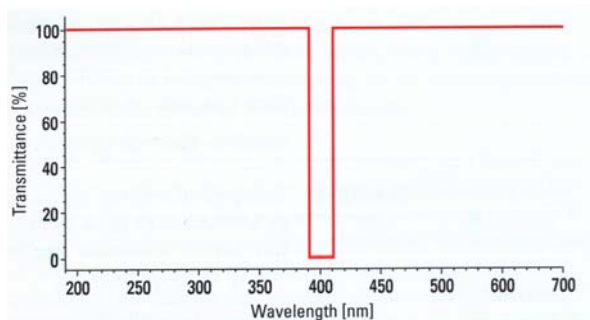
Фотометрична акуратність (ассигасу) – найбільш важливий критерій для кількісного аналізу, коли використовуються коефіцієнти або фактори екстинкції. Але для порівняльних вимірювань (як згадувалося вище) критичним параметром є фотометрична точність (precision).

Щоб виміряти фотометричну акуратність і точність, необхідний контрольний (еталонний) стандарт. В ідеалі, цей стандарт повинен мати постійне поглинання при всіх довжинах хвиль у всьому УФ і видимому діапазоні (див.рис.63), так щоб будь-які помилки в точності довжини хвилі не впливали на результати. На практиці такого стандарту не існує, хоч neutral density glass (скло нейтральної міцності ?) наближається до стандарту у видимому діапазоні довжин хвиль. Використовувані стандарти типово мають широкі піки і valleys (впадини; valley - долина).

Розсіяне світло.

Розсіяне світло – це фактор, що найбільш сильно впливає на лінійну залежність між поглинанням і концентрацією при високому поглинанні. Він вносить систематичні помилки в низьке поглинання при зростаючих концентраціях. Розсіяне світло також має основний вплив на верхню границю (межу) лінійного динамічного діапазону при аналізі.

Для вимірювання розсіяного світла потрібний фільтр. В ідеалі цей фільтр повинен поглинати все світло тієї довжини хвилі, при якій буде проводитись вимірювання, і пропускати світло при інших довжинах хвиль (див.рис.64). Але на практиці такого фільтра не існує, а використовуються cut-off (зрізані?) фільтри, які пропускають все світло вище і нижче певної довжини хвилі і блокують все світло діапазону довжин хвиль.



Роздільна здатність

Resolution (розділення, розщеплення). Цей фактор є критичним при визначенні форми вимірених піків. Взагалі, інструментальне розділення повинне бути прибіл. в 10 разів кращим, ніж ширина смуги вимірюного піку. Якщо інструментальне розділення недостатнє, виміряне поглинання при максимумі довжини хвилі (wavelength maximum) буде занадто низьким. Таким чином фотометрична акуратність має систематичну помилку. Ця помилка грає ключову роль у тому випадку, коли абсолютна акуратність є суттєвою, але вона менш важлива для відносних вимірювань.

Виміряти розділення важко, і часто для зразка з вузькою смугою використовують емпіричні підходи, такі як вимірювання відносної висоти піків і впадин для зразка з вузькою смугою (див. далі "Розділення").

Шум.

Шум є важливим фактором, що впливає на точність вимірювання поглинання. Він особливо суттєвий при низьких поглинаннях, коли його враховують при визначенні границі чутливості (detection limit). Шум типово вимірюють при нульовому поглинанні, тобто у відсутності зразка у світловій доріжці.

Базова лінія

Baseline flatness. Виміряти шум при всіх довжинах хвиль практично неможливо. Але baseline flatness (рівність основної лінії: flat – плоский, рівний) вказує на відносний шум при всіх довжинах хвиль і виявляє довжини хвиль з інструментальними проблемами, пов'язаними, наприклад, із заміною фільтрів чи джерел світла. Baseline flatness, як правило, вимірюють при нульовому поглинанні.

Стабільність.

Стабільність впливає на акуратність вимірювань поглинання як функції часу. Дрейф у вимірюваннях поглинання вносить систематичні помилки у фотометричну акуратність. Стабільність вимірюють при нульовому поглинанні.

Лінійність.

Лінійність часто розглядають як важливий параметр при контролі за роботою приладів. Але лінійність дуже залежить від зразка, тому основною проблемою при цьому є той факт, що всі розглянуті вище параметри залежать від довжини хвилі, а у випадку розсіяного світла – від зразка. Оскільки практично неможливо виконати всі дослідження при всіх довжинах хвиль, слід вибрати декілька довжин хвиль, що становлять певний інтерес (необхідних для поставленої мети). Результати дослідів треба порівняти з абсолютними specifications (вимогами) для використовуваних методів.

Однак узгодженість із розглянутими критеріями не гарантує, що конкретний аналіз може бути виконаний з необхідною акуратністю і лінійністю. Оскільки багато параметрів залежать від зразка, бажана акуратність і лінійність може бути досягнута лише при застосуванні відповідної системи дослідження до самого зразка.

Стандарти

Детальне обговорення всіх стандартів та їх відносних переваг і недоліків не є метою даного підручника. Ці питання розглядаються в роботах [18, 19]. Але тут наводяться деякі відносні переваги трьох основних стандартів.

Емісійні стандарти.

Деякі джерела емісії, такі як ртутні та дейтерієві дугові лампи, виявляють чіткі лінії при специфічних довжинах хвиль, які є ідеальними для визначення акуратності і точності довжини хвилі. Дійсно, в багатьох сучасних СФ дейтерієві лінії при 486.0 та 656.1 нм вмонтованого джерела використовуються для контролю та перевірки акуратності довжини хвилі. Але емісійні джерела потребують електричного живлення (енергії) і, якщо прилад відкалібрований самостійно з використанням вмонтованої дейтерієвої лампи, для контролю потрібно застосовувати інший стандарт. Крім того, емісійні джерела не є типовими зразками, вони не контролюють всю систему.

Тверді абсорбційні стандарти.

Тверді стандарти не потребують ніякої підготовки, прості у використанні, відносно нечутливі до температури, мають хорошу стабільність в часі. Але з твердими стандартами неможливо забезпечити гомогенність від одного стандарту до іншого або від одного матеріалу до іншого. Тому кожен стандарт повинен бути

відкалібрований індивідуально на еталонному СФ. Через те, що цей процес тривалий, тверді стандарти стають дорогими. Більше того, оскільки такі стандарти не є абсолютно стійкими, вони повинні регулярно перекалібровуватись. Нарешті, ці зразки треба тримати абсолютно чистими і не можна використовувати для проточних систем.

В таблиці 5 наведені деякі добре відомі тверді стандарти, їх застосування, переваги та недоліки.

Рідкі абсорбційні стандарти.

Рідкі (рідинні) стандарти звичайно є абсолютними фізичними стандартами. Іншими словами, якщо рідкі стандарти готуються з використанням відносно чистих матеріалів, вони по суті мають властивості абсорбційної здатності, максимумів піків та інші, необхідні для контролю акуратності. Оскільки калібрування розчинів непотрібне, рідкі стандарти можуть бути відносно недорогими. Крім того, процес використання розчину як стандарту дуже подібний до роботи із звичайним зразком.

Основний недолік рідких стандартів у тому, що їх треба використовувати свіжоприготовленими. А цей процес тривалий і потребує неабияких навичок і вміння аналітика. В деяких випадках ця проблема вирішується використанням стандартів, герметично запаєних в кюветах. Але оскільки кювета сама вносить певний вклад у поглинання, ці стандарти повинні калібруватися і перекалібровуватися індивідуально, що підвищує вартість роботи. Крім того, оскільки рідкі стандарти менш стійкі, ніж тверді стандарти, вони повинні перекалібровуватися набагато частіше.

Зараз доступні приготовлені розчини, запаєні в ампулах, для використання із звичайними кюветами; вони прості у використанні і недорогі [20].

В таблиці 6 наведені деякі найбільш відомі рідкі стандарти, їх застосування, переваги та недоліки.

Вимоги до експертного використання даних спектроскопії

У цьому розділі розглядаються деякі з більш важливих вимог, які необхідно виконувати при користуванні УФ-видимими СФ.

GLP/GMP . GLP та GMP вимоги до приладів зводяться до наступних:

Документальне підтвердження того, що система чи підсистема працює як і передбачалось у всіх робочих діапазонах [20].

Для спектроскопії наводиться таке правило:

Якщо необхідно, робочі параметри (наприклад, ...роздільна здатність, суміщення, акуратність довжини хвилі СФ та ін.) повинні періодично перевірятися [21].

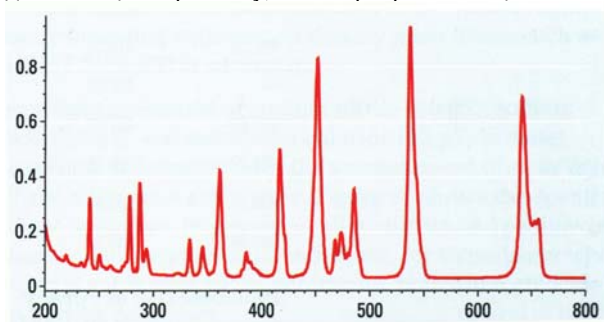
Вимоги до роботи з УФ-видимими спектрофотометрами, які застосовуються у фармацевтичних аналізах в Європі та в Сполучених Штатах, а також таблиці різних параметрів та стандартів див. стор.110-114.

Вибір стандартів залежить від аналізу, який буде проводитись з використанням приладу, та від поставленої мети. Так, наприклад, якщо метою є вимірювання світлопоглинання в УФ-області (як у більшості фармацевтичних аналізів), фотометричну акуратність слід перевіряти не у видимому, а в УФ-діапазоні, переважно при декількох довжинах хвилі. Аналогічно, акуратність довжини хвилі слід перевіряти не лише при дейтерієвій лінії 656.1 нм, оскільки вона не є надійним індикатором акуратності довжини хвилі у УФ-області.

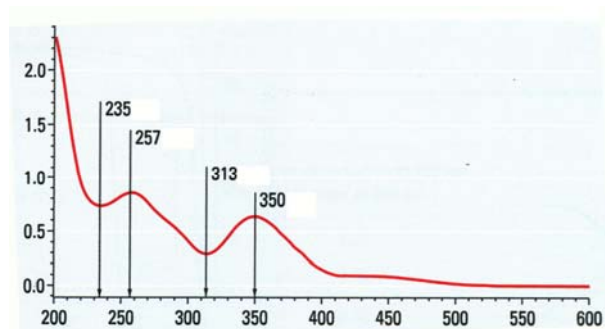
Рекомендації

Хоч і не існує чітко визначеної серії стандартів для контролю за роботою СФ, пропонуються деякі тести для тих аналітиків, хто аналізує головним чином рідкі зразки і кому слід дотримуватись загальних правил і вимог.

Акуратність довжини хвилі: розчин перхлорату гольмію (40 г/л оксиду гольмію в 10 об.% хлорної кислоти). На рис.65 наведений спектр цього розчину, виміряний на СФ НР 8453, а в табл.9 подані стандартні величини для піків цього розчину, взяті з розробок Національного Інституту Стандартів і Технології (NIST - США).

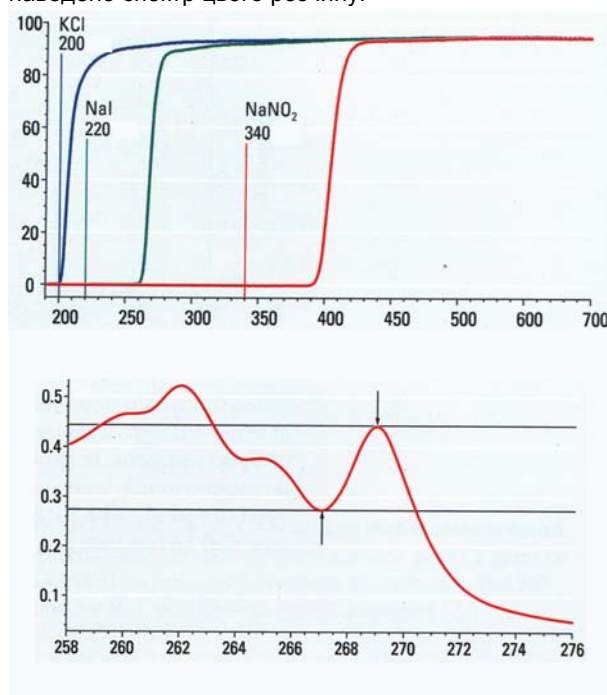


Фотометрична акуратність: розчин біхромату калію (прибл.60 мг/л в 0.01N сірчаній кислоті). На рис.66 наведений спектр цього розчину, а величини для цього стандарту – на стор.112. Якщо вимірювання проводяться у видимій області, бажане додаткове тестування із скляними фільтрами NIST SRM 930.



Розсіяне світло: розчини нітриту натрію (50 г/л), йодиду натрію (10 г/л) та хлориду калію (12 г/л) у воді. Ці три розчини дозволяють проводити вимірювання розсіяного світла при трьох різних довжинах хвиль. На рис.67 наведені спектри цих розчинів. Взагалі рекомендуються перші два розчини, але для європейських стандартів необхідним може виявитись і хлорид калію.

Роздільна здатність: розчин толуолу в гексані (0,02 об.%) для європейських стандартів. На рис.68 наведено спектр цього розчину.



Роздільну здатність розраховують по співвідношенню поглинання максимуму при прибіл.269 нм і мінімуму при 266 нм (див. табл.10).

Самотестування приладу

Повна перевірка роботи приладу (калібровка) займає багато часу і звичайно проводиться через певні інтервали. Ці інтервали визначаються виходячи із стабільності приладу. Для того, щоб була можливість виявити будь-які відхилення в роботі приладу між цими інтервалами, прилад повинен бути забезпечений засобами для самоконтролю, який може проводитись щоденно.

Це контроль електронних і оптичних пристроїв СФ, правильності довжини хвилі з однією чи двома лініями від дейтерієвої лампи та ін.

Відповідність системи

Відповідність (придатність) системи необхідна для оцінки компонентів аналітичної системи з тим, щоб підтвердити, що робота цієї системи відповідає стандартам, необхідним для методу. Відповідність системи не слід змішувати з методом обґрунтованості. Тоді як метод обґрунтованості використовується лише в кінці розробки методу, тести по відповідності системи проводяться на даній системі періодично для визначення її адекватності чи ефективності.

Вимоги до відповідності системи добре визначені для хроматографічних систем, але не для систем УФ-видимої спектроскопії. На практиці, аналітики виробляють свою власну стратегію відносно відповідності (придатності) системи для УФ-видимих приладів.

Два приклади:

А. Вимірювання та калібрування з використанням одного стандарту з концентрацією, що дорівнює 100% очікуваної концентрації компонента. Потім вимірювання і розрахунок цього стандарту і стандарту, розбавленого вдвічі. Обидва результати повинні співпадати з точно визначеним процентом відомої концентрації. Повторне вимірювання стандарту підтверджує акуратність початкового вимірювання.

В. Спочатку вимірювання стандарту, потім серії розбавлень стандарту і розрахунок коефіцієнта екстинкції (поглинання, поділене на концентрацію) для кожної концентрації. Величини коефіцієнтів екстинкції не повинні відрізнятися більш ніж на визначену процентну концентрацію.

Належне управління

Не дивлячись на всі методи і засоби контролю за роботою приладів, правильні і точні результати у значній мірі залишаються залежними від людського фактора. Хоч цей фактор ніколи не може бути усунутий, все ж певні заходи можна вжити для зменшення такого впливу.

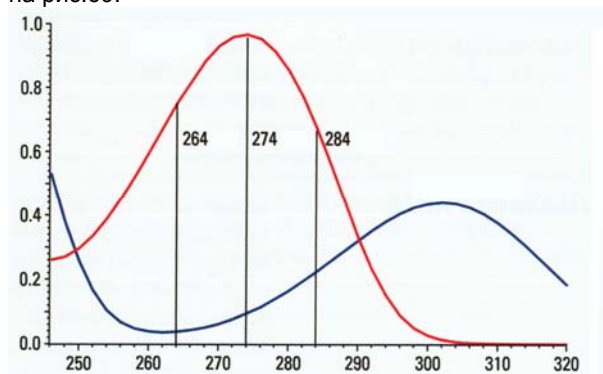
Сучасні СФ постійно контролюються мікропроцесором чи комп'ютером і повинні забезпечувати електронне зберігання параметрів методу. В ідеалі, всі необхідні параметри повинні зберігатися в одному файлі під відповідним іменем. Це дасть можливість позбутися потенціальної помилки.

Хоч СФ можуть зберігати і автоматично видавати більшість параметрів методу, деякі методики (наприклад, пов'язані з обробкою кювет) повинен виконувати аналітик, що може внести значні помилки. Аналітики повинні мати належну підготовку і всі стадії роботи чітко записувати в робочі журнали.

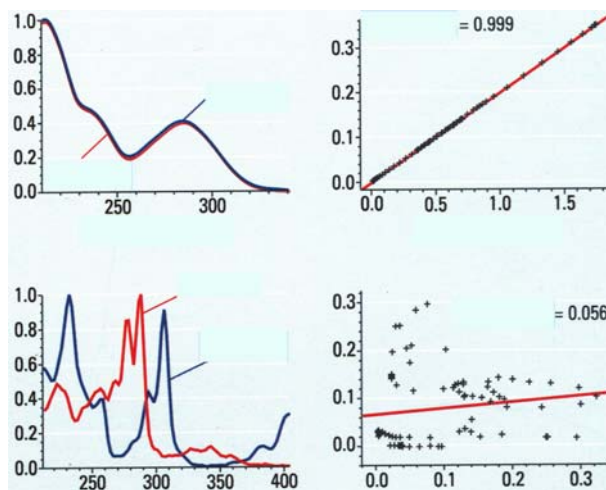
Паралельні дані

Помилки чи не зовсім точні результати можуть спостерігатися незважаючи на відмінні прилади, хорошу методику і вміння аналітика. Наприклад, зразок може бути забрудненим. Тоді як некоректний результат сам по собі не обов'язково є проблематичним, намагання визначити, що цей результат справді невірний, стикається з серйозними труднощами. Більшість аналітичних результатів, одержаних з використанням УФ-видимої спектроскопії, базуються на одному вимірюванні при одній довжині хвилі. Але при одній такій точці фактично немає можливості визначити чи результат є очікуваним, хоч типовий результат відомий і справжній результат значно відрізняється від відомої величини. Паралельні дані і багаторазові вимірювання при одній чи (переважно) багатьох довжинах хвиль допоможуть впевнитися, що результат є правильним. Ці дані можуть бути використані також для знаходження причини неточного результату.

Confirmation wavelengths. Простий шлях для перевірки кількісних аналітичних результатів – через confirmation analysis (confirmation – підтвердження). В цьому аналізі поглинання при одній чи більше довжинах хвиль в доповнення до аналітичної довжини хвилі вимірюється і на стандартах, і на невідомих зразках. Оцінка проводиться при всіх виміряних довжинах хвиль. Якщо зразок чистий, результати при аналітичній довжині хвилі і при confirmation довжинах будуть ідентичними. Якщо зразок забруднений, цілком вірогідно, що забруднювач дає поглинання при всіх довжинах хвиль, і результати будуть відрізнятися. Приклад наведено на рис.69.



Повні спектри. Для оптимальних результатів треба мати повні спектри зразка, що аналізується. Спектри зразка можна накласти (порівняти) на стандартні спектри, щоб побачити різницю, чи використати математичні методи, щоб одержати match factor (коефіцієнт відповідності ?), який вказує на схожість зразків із стандартами. Цей коефіцієнт одержують, будуючи графічну залежність величин поглинання при кожній довжині хвилі зразка відносно стандарту. Якщо спектри ідентичні, точки будуть знаходитись на прямій. Нахил цієї лінії - є відношення концентрації зразка до стандарту. Якщо спектри не ідентичні, точки не будуть лежати на прямій, а будуть розкидані. На рис.70 зображені подібні і неподібні спектри. В обох випадках лінійна регресія може бути використана для найкращої прямої і може бути розрахований коефіцієнт кореляції. Коефіцієнт кореляції - це міра подібності спектрів зразка і спектрів стандарту. Якщо спектри ідеально подібні, коефіцієнт кореляції дорівнює 1, при повній несхожості спектрів він наближається до 0.



При використанні повних спектрів вся аналітична інформація доступна для переоцінки результатів і для визначення причини некоректного результату.

Статистика. Одне вимірювання не має високого ступеня правильності результату. Всі вимірювання включають деяку міру помилки і випадкове відхилення за рахунок шуму. Хоч помилки можна виявити, використовуючи згадані вище методики, шум також може давати суттєві помилки. Точність результатів завжди слід визначати шляхом проведення багаторазових вимірювань з наступним розрахунком середнього значення і стандартного відхилення цього значення. Стандартне відхилення є індикатором надійності вимірювання. Постійний контроль за змінами стандартного відхилення результатів може бути корисним для вирішення багатьох проблем у вимірюванні.