

Chemia Analityczna

Chromatografia

Tłumaczyła: inż. Karolina Hierasimczyk

Korekta:

dr hab. inż. Waldemar Wardencki, prof. nadzw. PG

prof. dr hab. inż. Jacek Namieśnik

Część VII

Analiza ilościowa.

Katedra Chemii Analitycznej

Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska
2002

SPIS TREŚCI

Wprowadzenie

I. Co to jest chromatografia?

- 1.1. Proces chromatograficzny
- 1.2. Podział metod chromatograficznych
- 1.3. Co to jest chromatografia gazowa?

II. Terminy i definicje

- 2.1. Czas retencji (t_R)
- 2.2. Współczynnik retencji (k)
- 2.3. Indeks retencji (I)
- 2.4. Współczynnik rozdzielenia
- 2.5. Teoretyczna liczba pól (N) lub sprawność kolumny
- 2.6. Rozdzielczość (R_S)
- 2.7. Stosunek faz (β)

III. Kolumny kapilarne do chromatografii gazowej

- 3.1. Fazy stacjonarne
 - 3.1.1. Polisiloksany
 - 3.1.2. Glikole polietylenowe

IV. Gazy nośne

V. Dozowniki

- 5.1. Dozowniki wykorzystujące odparowanie
- 5.2. Dyskryminacja związków dozowanych
- 5.3. Opłukiwanie membrany
- 5.4. Dozowanie na kolumnę typu „*Megabore*”
- 5.5. Dozowniki z dzieleniem strumienia gazu (*split*)
- 5.6. Dozownik bez podziału strumienia gazu

VI. Detektory w GC

- 6.1. Detektor ciepłno-przewodnościowy (TCD)
- 6.2. Detektor płomieniowo – jonizacyjny (FID)
- 6.3. Detektor wychwytu elektronów (ECD)
- 6.4. Detektor azotowo fosforowy (NPD)
- 6.5. Detektor płomieniowo – fotometryczny (FPD)
- 6.6. Detektor fotojonizacyjny (PID)
- 6.7. Spektrometr mas (MS)

VII. Analiza ilościowa.....VII/3

7. Analiza ilościowa

Termin „analiza ilościowa” ma różne znaczenie dla różnych analityków. Kiedyś, pojęcie to definiowano jako względną lub procentową powierzchnię indywidualnych pików na chromatogramie, których suma wynosiła 100%.

Analiza ilościowa była także definiowana jako metoda pozwalająca na stwierdzenie obecności substancji na pewnym progowym poziomie (1 – 10). W rzeczywistości, analiza ta pozwala określić dokładną ilość danego analitu w badanej próbce. Umożliwia oznaczenie stężenia w częściach na milion (ppm), mg/ml, molach lub innych jednostkach pozwalających określić ilość substancji (masy) w danej ilości oryginalnej próbki (lub objętości roztworu). Wiele metod chromatograficznych stosowanych w analizach farmaceutycznych wymaga określenia ilości analitu obecnego w gramach, w odniesieniu do wyjściowego składu ciała stałego, lub w objętości, wyjściowego roztworu ciekłego. Stężenie nie oznacza udziału procentowego lub powierzchni względnej; oznacza ono bezwzględną ilość lub masę w odniesieniu na jednostkę objętości analitu zawartego w matrycy próbki.

Analityk nie może zaakceptować metody, bez dokładnego i precyzyjnego oszacowania poziomu analitów obecnych w oryginalnej próbce. Przy określaniu ilości badanych analitów stosuje się dokładnie określone wzorce oznaczanych analitów. Immuno-analiza jako metoda alternatywna do oznaczania chromatograficznego, powinna także określać stężenie jako masę na jednostkę objętości roztworu. Istota chemii analitycznej polega na dokładnym i precyzyjnym oznaczeniu ilości składnika w analizowanej próbce.

Żadna z organizacji zainteresowanych analizami ilościowymi (np. organizacja „The U.S. Pharmacopeia” (USP), „The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use” (ICH) oraz “Food and Drug Administration”) nie podaje wytycznych co do wyboru konkretnej metody analizy ilościowej. Zwykle analitycy muszą zastosować metodę prób i błędów aby wybrać najlepszą metodę dla poszczególnego analitu analizowanej próbki.

Nie ma konkretnych zasad, szybkich reguł i wytycznych w analizie ilościowej z wyjątkiem, aby końcowa wybrana metoda odznaczała się najlepszą możliwą dokładnością i precyzją, najlepszą powtarzalnością i wysokim stopniem pośredniej precyzji i powtarzalności w odniesieniu do różnych analityków, czasu wykonania i laboratoriów.

Wybrana metoda do ilościowego oznaczania powinna spełniać te cele w jak najkrótszym czasie, przy minimalnym nakładzie pracy i jak najmniejszej ilości próbki użytej do analizy, środków i czasu pracy aparatu. Generalnie, idealna analiza ilościowa będzie zależała od poszczególnych badanych próbek, ich liczby, złożoności, możliwości automatyzacji oraz dostępności próbki i wzorców.

CELE IDEALNEJ METODY ILOŚCIOWEJ

Idealna metoda ilościowa powinna posiadać następujące cechy i zalety:

1. Możliwość wykonania szybkiej analizy próbki przy minimalnym koszcie, pracy manualnej, i wymogów aparatowych;
2. Wysoka precyzja i dokładność;
3. Niepodatność na interferencje zanieczyszczeń pochodzących od matrycy próbki i odczynników analitycznych;
4. Eliminacja możliwości utraty próbki i analitu podczas pracy lub analizy;
5. Możliwość zastosowania w rutynowych pracach prowadzonych przez odpowiednio przygotowanych techników.

Ciągle pozostaje jednak istotne pytanie: którą z licznych metod ilościowych należy wybrać dla danej próbki? Odpowiedź często zależy od rodzaju próbki, tj. czy jest to prosta mieszanina z kilkoma pikami czy złożona z dużą ilością pików. Zazwyczaj, dla prostszych próbek (kilka analitów, prosta matryca) stosuje się prostsze metody ilościowe i wykresy kalibracji uzyskane dla wzorców zewnętrznych lub nawet kalibracyjne jednopunktowe.

Możliwość stosowania kalibracji jednopunktowej, kalibracji z zastosowaniem wzorców zewnętrznych dla wielu próbek zazwyczaj prowadzi do zmniejszenia kosztów, skrócenia czasu i pracochłonności a tym samym prowadzi do większej wydajności systemu. Jednakże analityk może zastosować kalibrację jednopunktową i kalibrację dla wzorców zewnętrznych tylko wtedy gdy stężenie wzorców, jest zbliżone do aktualnego stężenia nieznannej próbki w liniowym zakresie metody. Bardziej złożone próbki płynów biologicznych zawierające liczne anality, trudne do usunięcia składniki próbki o stężeniach na poziomie śladowym, wymagać będą znacznie bardziej skomplikowanych metod ilościowych takich jak metoda dodatku wzorca.

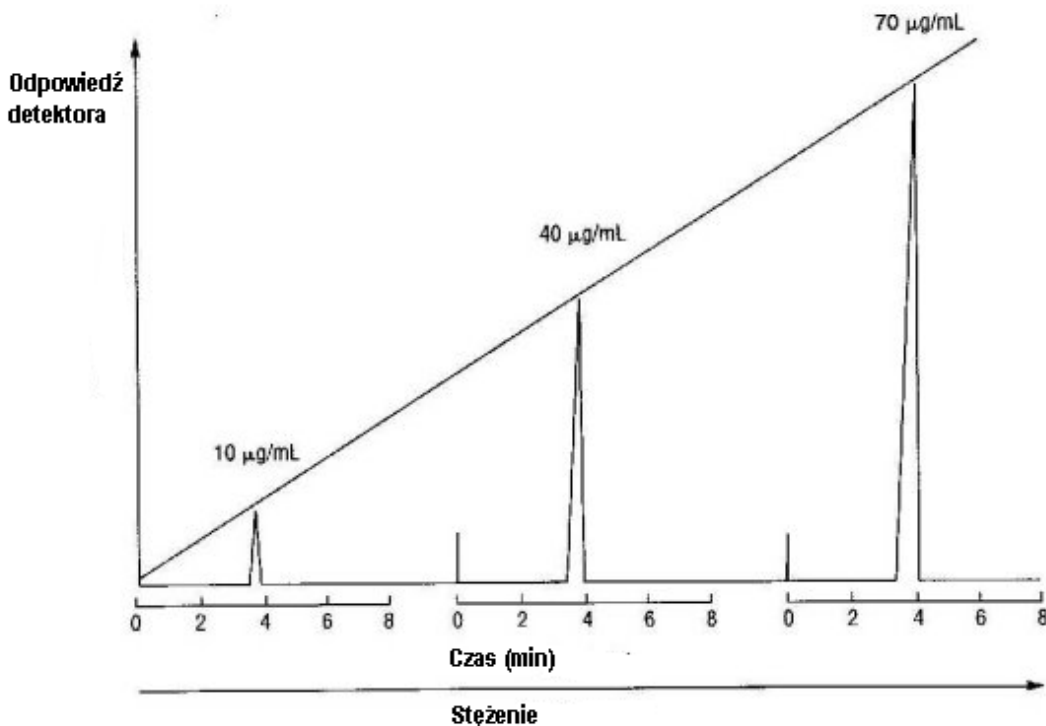
Oczywiście, analitycy nie mogą stosować technik ilościowych dopóki nie stwierdzą, że pik pochodzący z określonej metody jest pojedynczym pikiem i że pochodzi z poprawnie przeprowadzonej analizy. W przypadku HPLC, udowodnienie tego wymagać będzie wyszukanych układów-fotodiod lub detekcji przy zastosowaniu spektrometru mas (MS) po separacji metodą HPLC. Określenie jednoznaczności pików wymaga pomiaru widma UV i MS dla każdego z analizowanych pików i zastosowania oprogramowania komputerowego w celu nałożenia na siebie i porównania właściwości spektralnych (po znormalizowaniu lub zastosowaniu wyszukanych algorytmów oprogramowania).

Obecnie, oprogramowanie umożliwia rutynowe przeprowadzenie takiego zadania podczas obróbki danych, interpretacji jednorodności pików („czystości”). W takim oprogramowaniu stosuje się zarówno układ-fotodiod jak i dane MS. Zapewnienie jednoznaczności w odniesieniu tożsamości przy wykorzystaniu obu metod widmowych przed analizą ilościową jest zalecanym podejściem.

Innym stałym elementem oprogramowania jest zastosowanie plików w bibliotekach, które mogą być wykorzystane przy dopasowaniu w celu potwierdzenia spodziewanej lub domniemanej struktury analizowanego pików. Nie ma sensu przeprowadzania analizy ilościowej bez znajomości tożsamości i jednorodności, bo mogłoby to doprowadzić do otrzymania niepoprawnych wyników.

Metoda wzorca zewnętrznego (kalibracji zewnętrznej)

W metodzie wzorca zewnętrznego, analityk musi sporządzić wykres kalibracyjny (rysunek 1) wykorzystując znane stężenia pojedynczych wzorców, najlepiej w rozpuszczalniku zastosowanym w aktualnej próbce. Pomiar należy wykonać dla co najmniej pięciu stężeń, dla każdego trzy razy ($n=3$), i, najlepiej jeżeli każde ze stężeń będzie przygotowane oddzielnie a nie przez rozcieńczenie pojedynczego roztworu o wysokim stężeniu. Takie podejście ujawni błąd, który może powstać podczas przygotowania wszystkich roztworów wzorcowych, nie zaś błąd spowodowany błędami w rozcieńczeniu.



Typowa krzywa wzorcowa (kalibracyjna) w metodzie wzorca zewnętrznego dla trzech poziomów stężeń dozowanych wzorców.

Dodatkowe dane powinny obejmować precyzję pomiaru każdego punktu, równanie uzyskanej prostej, wartość odciętej (idealnie „zero”) i wielkość zakresu liniowego. Należy określić współczynniki korelacji linii, wartość współczynnika liniowości lub wariancji (r^2) i liniowości (r). Krzywe wzorcowe nie muszą zawierać danych co do granicy detekcji i zakresu strefy nieliniowości, natomiast powinny obejmować spodziewany i aktualny zakres stężenia dla rzeczywistych próbek. W celu uzyskania stężenia składników w nieznannej próbce należy zastosować następujące równania:

$$RF = [std] / R_{std} \quad (1)$$

$$[x] = RF \times R_x \quad (2)$$

W równaniach tych RF oznacza współczynnik odpowiedzi, [std] tężenie wzorca, R_{std} to odpowiedź wzorcowa, [x] reprezentuje nieznanne stężenie a R_x odpowiedź składnika o nieznanym stężeniu. Stężenie może być określone w jakiegokolwiek z często stosowanych form, jak na przykład jako stężenie molowe, normalne, i w ppm. Odpowiedź wzorcowa odnosi się do wysokości piku i powierzchni znanej ilości wzorcowego analitu, którego wartość jest w idealnym przypadku zbliżona do aktualnego stężenia w próbce. Odpowiedź składnika o nieznanym stężeniu (R_x) podaje się jako wysokość piku lub jego powierzchnia. Stosowanie krzywej kalibracyjnej lub kalibracji jednopunktowej może być problematyczne jeżeli skład próbki zmieni się po przeprowadzeniu paru analiz

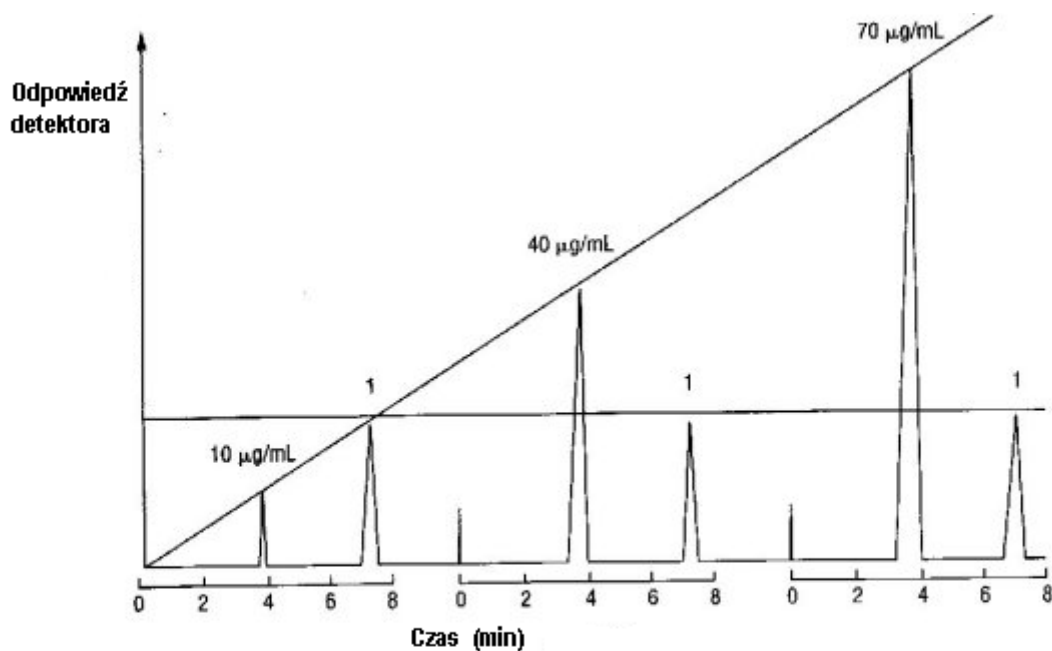
W idealnych warunkach, wykres wzorcowy powinien przebiegać przez początek układu współrzędnych (wartość odciętej 0), ale nie zawsze tak jest. Jeżeli wartość odciętej jest znacznie większa od wartości 0, może to sugerować obecność związków przeszkadzających lub koelujących pochodzących od tła ślepej próby. Istnieje także możliwość przeprowadzenia dokładnej analizy ilościowej gdy krzywa kalibracyjna nie przechodzi przez zero, ponieważ przyczyny wystąpienia nie-zerowej wartości y mogą również tkwić w próbce. Jeżeli wartość odciętej y jest ujemna, sugeruje to pewną stratę próbki podczas przygotowania roztworu do zadozowania. Problem ten powinien być uwzględniony ponieważ błąd taki może nie wystąpić w wypadku badanych próbek. Taki rodzaj krzywej wzorcowej nie zapewnia dokładnej analizy ilościowej dla próbki rzeczywistej.

Metoda wzorca wewnętrznego (kalibracji wewnętrznej)

W metodzie wzorca wewnętrznego, analitycy stosują związki które przypominają badane anality w jak największym stopniu i dodają je do próbki przed jej obróbką lub przygotowaniem do analizy. Wzorzec wewnętrzny powinien charakteryzować się właściwościami chemicznymi, chromatograficznymi i widmami, zbliżonymi do właściwości analitu, a ponadto wzorzec powinien być oddzielony od badanego analitu. Wzorzec wewnętrzny powinien charakteryzować się znaną chemiczną strukturą, być dostępny o wysokiej czystości.

Idealny standard wewnętrzny jest np. izotopem analitu, który będzie koeluował z analitem ale będzie można go rozdzielić metodą MS lub alternatywną metodą taką jak detekcja radiometryczna. Ponieważ układ detekcji przy zastosowaniu UV, fotodiod, jest najczęściej stosowany w HPLC, izotopy nie wystarczają. Dlatego też, użytkownik musi wybrać odpowiedni analit, którego struktura różni się nieznacznie ale jest podobna do właściwości chromatograficznych i związanych ze zwrotem.

We metodzie wzorca wewnętrznego kształt i symetria pików powinny być zbliżone do tych parametrów, które charakteryzują analit. Stężenie wzorca dodanego do próbki powinno być zbliżone do stężenia analitu. Jeżeli analityk planuje przeprowadzenie pomiarów wysokości pików analitu, powinien zastosować takie same dane w odniesieniu do wzorca wewnętrznego. Rysunek 2 ilustruje typowy wykres kalibracyjny dla metody wzorca wewnętrznego, który został uzyskany przy utrzymaniu stałego stężenia wzorca wewnętrznego i różnych stężeń analitu. Należy wybrać przynajmniej pięć różnych stężeń, a nie trzy tak jak przedstawiono na rysunku 2. Metoda obliczeń różni się od metody wzorca zewnętrznego w następujący sposób:



Typowy wykres wzorcowy w metodzie wzorca wewnętrznego dla trzech stężeń wzorcowych analitów stałego stężenia wzorca wewnętrznego, pochodzące z trzykrotnego dozowania metodą HPLC. Pik 1 reprezentuje wzorec wewnętrzny.

$$RF = (R_{Is} / R_{Std}) [std] \quad (3)$$

$$[x] = RF \times (R_x / R_{Is}) \quad (4)$$

W powyższym równaniu, R_{Is} jest odpowiedzią wzorca wewnętrznego a R_{Std} oznacza odpowiedź wzorca analitu. Należy zastosować takie samo stężenie wzorca wewnętrznego jak przy kreśleniu krzywej kalibracji wzorca wewnętrznego. Odpowiedź może być wyrażona wysokością lub powierzchnią pików, tak długo aż parametry te stosowane są we wszystkich obliczeniach. Wysokości pików i powierzchnie dla podobnych wzorców wewnętrznych i stężeń analitu powinny być podobne, tak jak ich czasy retencji.

Podejście wykorzystujące wzorec wewnętrzny automatycznie poprawia problem identyczności wielkości próbki, więc analitycy nie muszą określać tego czynnika w oddzielnych eksperymentach. Takie cechy metody wzorca wewnętrznego wykluczają dalszą potrzebę pomiaru wielkości próbki lub zapewniają integralność dla każdej z próbek, tak długo aż stosunek wzorec wewnętrzny-substancja oznaczona pozostaje stały między próbkami. Jednakże, użytkownicy muszą wykazać stałość tego stosunku, a nie przyjmować, że jest on stały.

Błędy związane z utratą próbki podczas jej przechowywania lub dozowania bardzo małych ilości także zostają skompensowane metodą wzorca wewnętrznego. Jednakże, „nieczysty” pik analitu spowoduje niewłaściwy poziom ilości analitu w tej czy jakiegokolwiek innej metodzie

ilościowej, dopóki zanieczyszczenia nie zostaną rozdzielone w detektorze od prawdziwego piksu analitu. Należy pamiętać, że techniki rozcieńczania izotopowego, które często są stosowane w metodzie MS, są odmianą metody standardu wewnętrznego. W rozcieńczeniu izotopowym wzorzec wewnętrzny jest idealnym wzorcem izotopu takiego jak deuter, tryt lub radio-izotopy.

KRZYWE KALIBRACJI

Analiza ilościowa wymaga krzywych kalibracji, które są liniowe, przechodzą przez punkt zerowy i charakteryzują się punktami o małym rozrzucie (lub o wysokim współczynniku korelacji). Otrzymanie tak idealnego wykresu kalibracyjnego nie zawsze jest w praktyce możliwe, ponieważ każda metoda podatna jest na liczne błędy. Możliwe są następujące przyczyny błędów od przebiegu idealnego:

Nie wystarczająca ilość punktów: dwa punkty nie umożliwiają otrzymania krzywej kalibracji. Minimalna ilość to trzy punkty, a pięć punktów stanowi przyjętą zasadę. Duże rozproszenie: wielokrotne wykreślenie krzywej kalibracyjnej od początku umożliwia określenie rodzaju błędów, przypadkowych i systematycznych. Błędy przypadkowe dają odmienne i różniące się punkty, błędy systematyczne pojawiają się w tych samych lub podobnych miejscach. W każdym przypadku, błędy powinny być wyeliminowane.

Krzywa nieliniowa: jeżeli nie można uzyskać prostoliniowego przebiegu i związanych z tym błędów przypadkowych i pomimo szczegółowego sprawdzenia metody, najlepszym wyjściem z sytuacji będzie zastosowanie mniej korzystnej krzywej, chociaż zawsze należy podjąć kroki w celu jej udoskonalenia.

Nieodpowiednie rozmieszczenie punktów: Punkty kalibracyjne muszą być rozmieszczone równomiernie wzdłuż zakresu osi x. W przeciwnym razie dużym błędem mogą być obciążone zakresy bez punktów.

Niekompletna krzywa kalibracji: w takim wypadku wykreślona krzywa nie pokrywa zakresu stężeń w następujących próbkach rzeczywistych. Nigdy niedopuszczalna jest ekstrapolacja krzywej kalibracyjnej do zakresu, który nie był badany.

Krzywa kalibracji z błędem systematycznym-proporcjonalnym: nachylenie krzywej jest za wysokie (jak na wykresie) lub za niskie. Taki błąd trudno rozpoznać, ale wpływa on na dokładność! Powód odchylenia może być błahy, np. błąd rozcieńczenia, lub bardzo niespodziewany i trudny do wytłumaczenia.

Krzywa kalibracji z systematycznym-stalym błędem: ta krzywa nie przechodzi przez punkt wyjściowy ale jest zbyt wysoko (jak na wykresie) lub zbyt nisko. Ważne są tu te same zalecenia, które dotyczyły krzywej nieliniowej.

