

УДК 543.544.5.068.7

СЛУЧАЙНАЯ ПОГРЕШНОСТЬ ИЗМЕРЕНИЯ ОПТИЧЕСКИХ ПЛОТНОСТЕЙ В ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ДИОДНО-МАТРИЧНЫМ ДЕТЕКТОРОМ

© 2010 М. Г. Левин, А. В. Мирный, Н. В. Овчаренко, И. В. Трутаев*

Для жидкостного хроматографа с диодно-матричным детектором в диапазоне длин волн 200 – 300 нм определена зависимость стандартного отклонения, характеризующего шум измеряемых оптических плотностей, от величины оптической плотности. Показано, что в этом диапазоне стандартное отклонение не зависит от длины волны, а зависимость стандартного отклонения от оптической плотности описывается двухпараметрическим уравнением. Найденная зависимость согласуется с зависимостями, предложенными в известной работе Н.П. Комаря и В.П. Самойлова, посвященной погрешностям в спектрофотометрии, и может быть использована для хемометрического моделирования.

Ключевые слова: ВЭЖХ с диодноматричным детектором, шум измерения, хемометрика.

Введение

Высокоэффективная хроматография в сочетании с использованием диодноматричного детектора (ВЭЖХ-ДМД) дает возможность получать двумерный сигнал, т.е. результатом работы ВЭЖХ-ДМД является матрица значений оптической плотности A размером $P \times M$, где P - количество строк, определяется количеством временных точек, в которых проводилось измерение спектра оптических плотностей, а M - число длин волн в указанном спектре. Использование двумерного сигнала дает возможность решать ряд задач, решение которых невозможно в случае использования одномерного сигнала, который получается при использовании ВЭЖХ в сочетании со спектрофотометрическим детектором, фиксирующим хроматограмму при одной длине волны. Среди задач, которые позволяет ВЭЖХ-ДМД можно выделить, например, следующие:

проверка спектральной чистоты пика [1, 2];

разделение абсолютных профилей концентраций чистых компонентов в случае перекрывающихся пиков при известных спектрах компонентов [3];

получение относительных профилей концентраций и спектров компонентов в случае перекрывающихся пиков при неизвестных спектрах компонентов [3,4].

Такого рода задачи обычно решаются средствами хемометрики [5], причем решение задачи требует знания погрешности определения элементов матрицы оптических плотностей [5]. Кроме того, хемометрические подходы зачастую предусматривают исследования на моделях, а корректное моделирование невозможно без знания этой погрешности. В известной нам литературе эта погрешность обычно задается как шум с постоянным относительным стандартным отклонением [4], либо как шум с постоянным стандартным отклонением [5]. В литературе отмечается, что при двумерном сигнале влияние погрешности сигнала на результат обычно существеннее, чем при векторном сигнале [6]. Следует отметить, что широко используемое, например, в фармации отношение сигнал/шум, также основано на предположении о том, что погрешность не зависит от величины оптической плотности [7]. Однако, известно, что в спектрофотометрии абсолютная и относительная погрешности определения оптической плотности зависят от величины оптической плотности достаточно сложно [8-10]. Простейшее уравнение, описывающее такую связь это уравнение, полученное еще в 1933 г в статье Туаймена – Лотиана [9]:

$$\frac{S_A}{A} = \frac{0.4343 \cdot 10^A \cdot S_T}{A}, \quad (1)$$

где A, S_A - оптическая плотность и её стандартное отклонение, соответственно;

* ОАО «Химфармзавод «Красная Звезда» Отдел развития; 61010, Украина, Харьков, ул. Гордиенковская, 1; e-mail для переписки: levin@mail.ru

S_T - стандартное отклонение пропускания, которое считается постоянным.

Так как при решении хемометрических задач не всегда используется относительное стандартное отклонение оптической плотности, то перепишем уравнение (1) для абсолютного стандартного отклонения:

$$S_A = 0.4343 \cdot 10^A \cdot S_T \quad (2)$$

Уравнение (1) предполагает наличие минимума относительного стандартного отклонения измерения оптической плотности при $A = 0.4343$ [8]. Фиксирование сигнала относящегося к пику или кластеру пиков начинается и заканчивается оптическими плотностями порядка 0.0001 (0.1 mAU), а оптические плотности в максимуме пика могут достигать 2 и более. Из уравнения (1) видно, что относительные стандартные отклонения в этом диапазоне могут меняться от $2.7183 S_T$ (при $A=0.4343$) до $4344 S_T$ (при $A=0.0001$), т.е. в 1600 раз. Из уравнения (2) видно, что абсолютные стандартные отклонения в этом диапазоне меняются от $0.4343 \cdot S_T$ (при $A=0.0001$) до $43.43 \cdot S_T$, т.е. в 100 раз. Поэтому предположения о постоянном относительном или постоянном абсолютном стандартном отклонении не являются оправданными. Кроме того, непонятно имеется ли значимая зависимость стандартного отклонения оптической плотности от длины волны, при которой она измеряется. Представляется возможным, что стандартные отклонения оптической плотности для спектрофотометрии и ВЭЖХ-ДМД могут несколько отличаться. Изложенное выше позволяет предположить необходимость более детального исследования спектрофотометрической погрешности (стандартного отклонения), которая содержится в значениях оптических плотностей, составляющих матрицу A , в частности её шумовой (т.е. короткопериодической) составляющей, что и составляет цель данной публикации.

Экспериментальная часть

Приборы и материалы

Жидкостный хроматограф фирмы AGILENT. Основные характеристики прибора представлены в таблице:

№ пп		Agilent 1200 3D LC System
1	Насос	G 1311A
2	Инжектор (автосамплер)	G 1329A
3	Детектор (спектрофотометрический диодно-матричный)	G 1315D
4	Термостат колонки	G 1316A
5	Дегазатор	G 1322A

Компоненты подвижных фаз:

вода: дистиллированная вода с последующей подготовкой при помощи системы очистки воды EASYPure II RF/UV;

ацетонитрил: Lab-Scan, HPLC Grade, (кат. №C02C11X);

метилэтилкетон (МЕК) : puriss. p.a., Fluka (кат. №04380).

Приготовление подвижных фаз. Подвижные фазы готовились по следующей схеме: в мерные колбу вместимостью 100 мл вносили по 20.0 мл ацетонитрила и при помощи мерной пипетки такой объем МЕК, чтобы получать значения объемной доли 0, 0.25, 0.5, 1, 2 и 5 % (v/v) (т.е. 0, 0.25, 0.5, 1, 2 и 5 мл), после чего объем раствора в каждой колбе доводился до метки водой и перемешивался.

Схема эксперимента: эксперимент выполнялся с фиксацией полного спектра в УФ области спектра от 200 до 400 нм с интервалом 2 нм, через каждые 0.402 сек, прокачивание подвижных фаз проводилось со скоростью 1 мл/мин.

Сначала прокачивалась подвижная фаза с нулевым содержанием МЕК до получения стабильного сигнала при 270 нм в течение 5-10 мин, затем насос выключался и сигнал фиксировался при 270 нм в течение 5-10 мин, затем прокачивалась подвижная фаза, содержащая 2 % МЕК, и после достижения стабильных значений оптической плотности при 270 нм сигнал фиксировался.

сировался 5-10 мин, после чего насос выключался и сигнал фиксировался 5-10 мин, далее аналогичным образом прокачивали фазу, содержащую 1 % МЕК, затем 0.5 % МЕК и, наконец, 0.25 % МЕК. Отдельно прокачивалась подвижная фаза, содержащая 5 % МЕК, в этом случае этап «без давления» отсутствовал. При прокачивании всех подвижных фаз среднее давление составляло около 43 Bar. Зависимость сигнала от времени для одной из длин волн – 250 нм, представлена на рис. 1.

Математическая обработка результатов проводилась с использованием Excel 2007 и Origin 6.1.

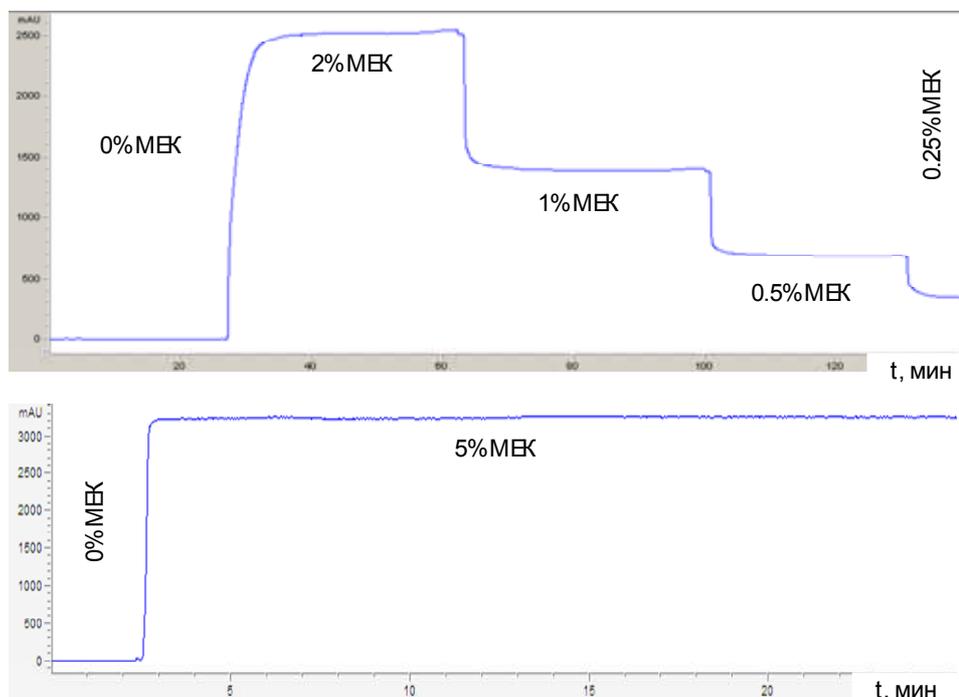


Рис. 1. Общий вид сигнала при 250 нм, условия получения в тексте.

Таким образом, весь временной интервал данного эксперимента можно разбить на 11 диапазонов: 1) 0 % МЕК, 43 Bar; 2) 0 % МЕК, 0 Bar; 3) 2 % МЕК, 43 Bar; 4) 2 % МЕК, 0 Bar; 5) 1 % МЕК, 43 Bar; 6) 1 % МЕК, 0 Bar; 7) 0.5 % МЕК, 43 Bar; 8) 0.5 % МЕК, 0 Bar; 9) 0.25 % МЕК, 43 Bar; 10) 0.25 % МЕК, 0 Bar и 11) 5 %и МЕК 43Bar.

Результаты и их обработка

Как выяснилось, сигналы при всех длинах волн имеют некоторый дрейф, типичный дрейф сигнала в диапазоне представлен на рис. 2.

Как видно, профиль сигнала в полном диапазоне имеет достаточно сложную форму, поэтому в конце каждого диапазона выбиралась гладкая область (2 мин), содержащая 301 временную точку, в которой сигнал описывали полиномами возрастающей степени: 0 (просто вычислялось стандартное отклонение от среднего), 1, 2, 3, 4, 5 и т.д.. Оказалось, что по критерию Фишера степени выше четырех не дают статистически значимого улучшения описания экспериментальных данных, поэтому все гладкие области описывались полиномом четвертой степени. В качестве меры шума в данной работе использовано остаточное стандартное отклонение точек данных от описывающего полинома четвертой степени, которое вычисляется по формуле:

$$S_A = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^Q (A_i^E - A_i^C)^2}{Q - (4 + 1)}}, \quad (3)$$

где Q - число точек данных в области; A_i^E - экспериментальное значение оптической плотности для данной точки i ; A_i^C - значение полиномиальной функции в данной точке, 4 - степень полинома.

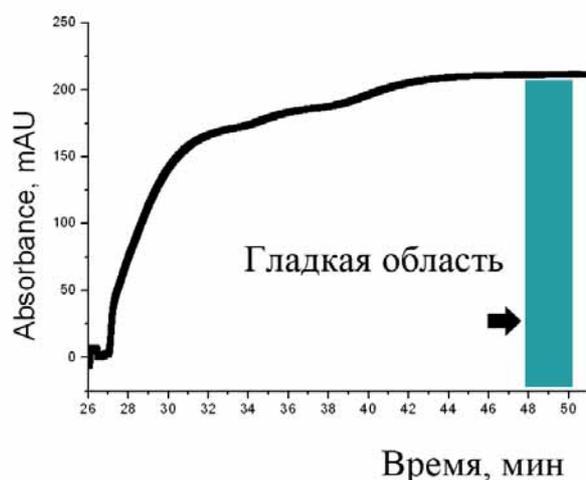


Рис. 2. Фрагмент зависимости сигнала от времени при содержании МЕК в подвижной фазе 2 % (v/v), давление 43 Bar (220 нм)

Из всех компонентов подвижных фаз, значительным собственным поглощением в области длин волн УФ спектра выше 200 нм обладает только метилэтилкетон: см рис. 3. Как видно из рис. 3, оптические плотности в достаточно широком диапазоне могут быть получены для подвижных фаз с метилэтилкетоном только от 200 нм до 300 нм.

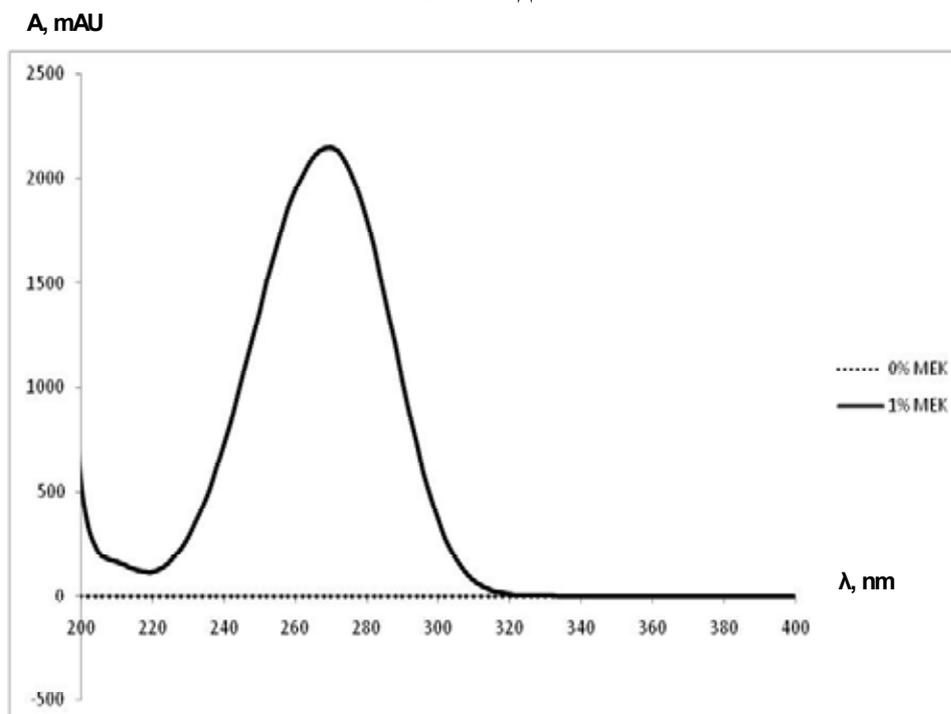


Рис. 3. УФ-спектры подвижных фаз содержащих 0 и 1% МЕК.

Типичная зависимость оптической плотности от концентрации МЕК в подвижной фазе представлена на рис.4.

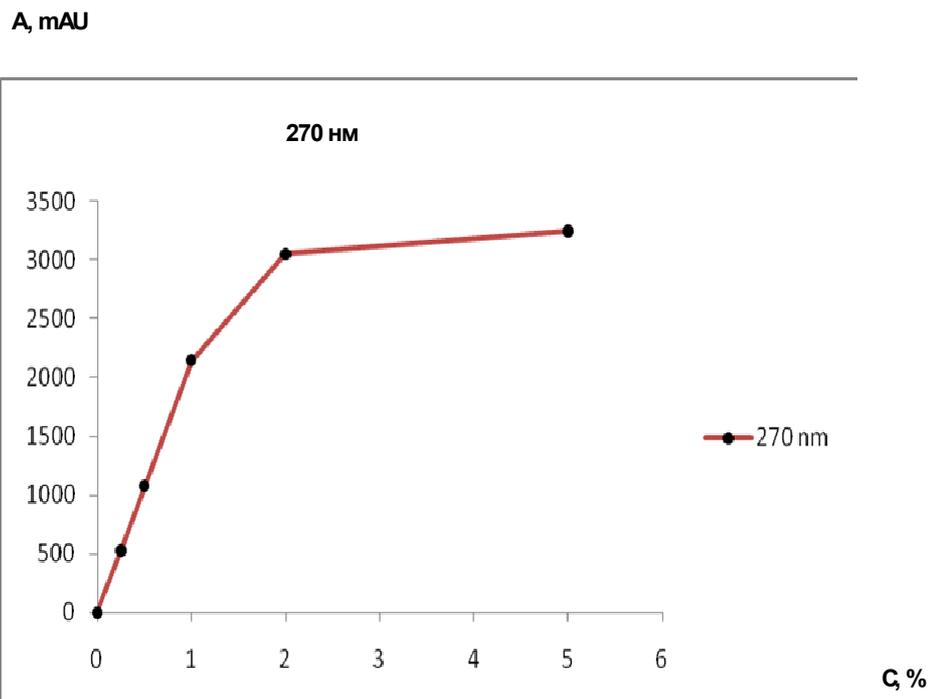


Рис. 4. Зависимость оптических плотностей при 270 нм от объемной доли МЕК в подвижных фазах

Как видно, после оптической плотности примерно 2200 mAU имеет место существенное отклонение от прямой пропорциональности оптической плотности от концентрации, поэтому пики с такими оптическими плотностями желательно не использовать для всевозможных количественных определений.

Более детальное представление типичной гладкой области дано на рисунках 5а и 5б.

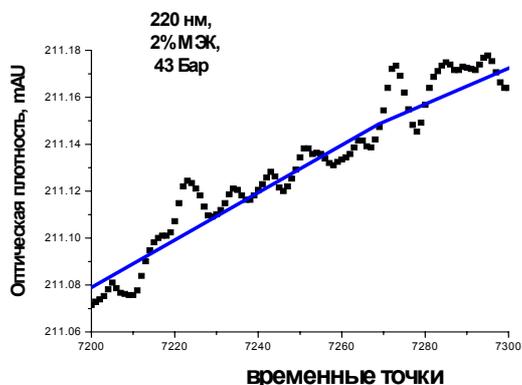
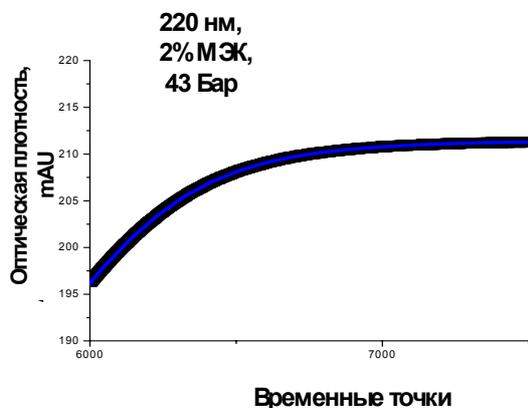


Рис. 5а. Типичный вид сигнала и график описывающего его полинома (крупный масштаб)

Рис. 5б. Типичный вид сигнала и график описывающего его полинома (мелкий масштаб)

Для каждой длины волны в интервале 200-300 нм всех гладких областей рассчитывались средние значения оптической плотности. Все результаты для подвижных фаз, содержащих МЕК, группировались в единый пул (199 точек). В некоторых случаях при очень малых оптических плотностях такие средние значения оказывались отрицательными и в таком случае отбрасывались, кроме того, отбрасывались все результаты, средние значения для которых превышали 2200 mAU. Оставшиеся результаты группировались в единый пул. Зависимость остаточного стандартного отклонения от оптической плотности для единого пула результатов представлена на рис. 6.

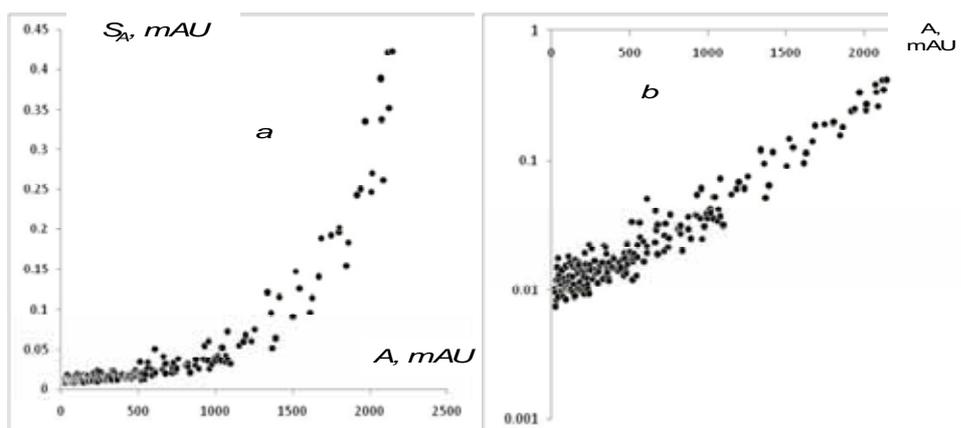


Рис. 6. Зависимость остаточного стандартного отклонения от оптической плотности для единого пула данных (давление 43 Bar) (по ординате: *a* – линейная, *b* – логарифмическая шкала)

Как видно из рисунка 6, данные составляют достаточно гомогенную совокупность, поэтому логично описать эту совокупность уравнением (2) используя метод наименьших квадратов. Так как в ВЭЖХ-ДМД оптические плотности даются в mAU, т.е. в тысячных долях оптической плотности, то представляется целесообразным использовать модификацию уравнения (2) позволяющую работать с величинами оптических плотностей и стандартных отклонений выраженных в mAU:

$$S_A = 1000 * (0.4343 \cdot 10^{\frac{A}{1000}} \cdot S_T) \quad (4)$$

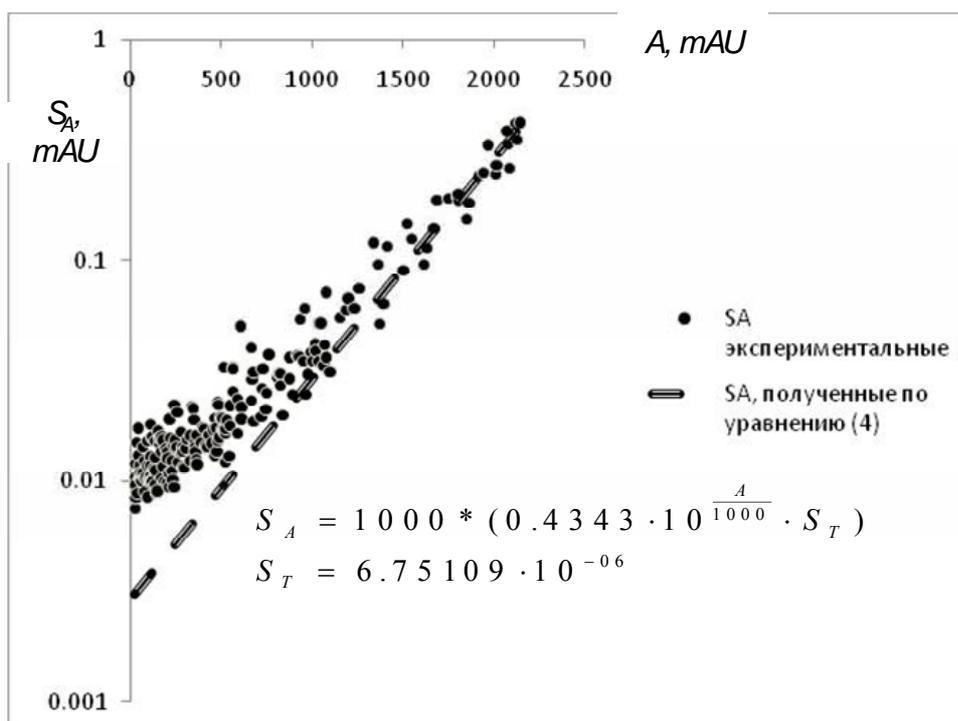


Рис. 7. Зависимость остаточного стандартного отклонения от оптической плотности для единого пула данных (давление 43 Bar) и её описание посредством уравнения (4).

Значение S_T вычислялось методом наименьших квадратов. На рисунке 7 представлена совокупность экспериментальных данных и её описание уравнением (4). Как видно из рисунка 7, уравнение (2) при малых оптических плотностях дает заниженные значения остаточного стандартного отклонения, что позволяет предположить наличие небольшой составляющей остаточ-

ного стандартного отклонения, которое не зависит от оптической плотности, т.е. некоторой константы в уравнении (2), что позволяет предположить уравнение следующего вида:

$$S_A = 1000 * (0.4343 \cdot 10^{\frac{A}{1000}} \cdot S_T + \alpha) \quad (5)$$

Значение S_T и α вычислялось методом наименьших квадратов. На рис. 8 представлена совокупность экспериментальных данных и её описание уравнениями (4) и (5).

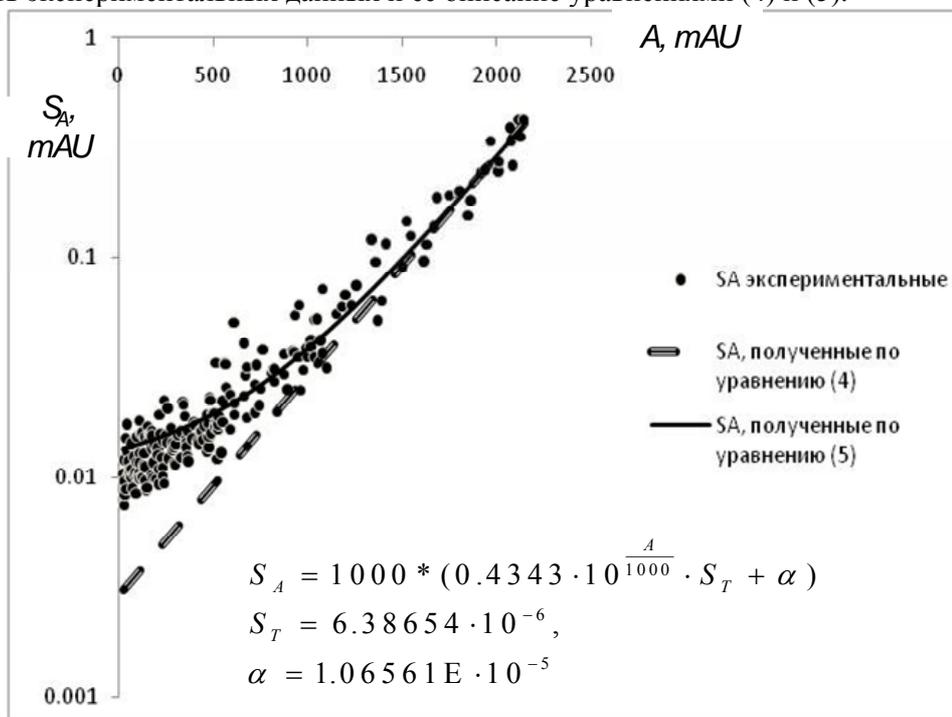


Рис. 8. Зависимость остаточного стандартного отклонения от оптической плотности для единого пула данных (давление 43 Bar) и её описание посредством уравнений (4) и (5).

Как видно из рис. 8, введение константы улучшает описание экспериментальных результатов (стандартные отклонения составляют 0.0176 и 0.0147, соответственно, т.е. отличие значимо, так как отношение квадратов стандартных отклонений 1.43 больше критического значения коэффициента Фишера $F(0.05, 197, 196) = 1.265$).

Так как природа константы α не ясна, то было высказано предположение о том, что наличие этой константы связано с работой насоса хроматографа, поэтому были проведены исследования шума оптических плотностей для диапазонов, где насос был выключен. Полученные результаты были аналогичны описанному выше (см. рис. 9).

Т.е. предположение о том, что наличие константы α обусловлено работой насоса, не нашло подтверждения. Рассмотрим более детально зависимость относительной погрешности от величины оптической плотности. Для относительной погрешности (%) уравнения (4) и (5) прибредают вид:

$$\frac{S_A}{A}, \% = \frac{1000 * (0.4343 \cdot 10^{\frac{A}{1000}} \cdot S_T) \cdot 100}{A} \quad (6)$$

$$\frac{S_A}{A}, \% = \frac{1000 * (0.4343 \cdot 10^{\frac{A}{1000}} \cdot S_T + \alpha)}{A}, \% \quad (7)$$

Для уравнений (6) и (7) входящие в них параметры S_T , α были определены посредством метода наименьших квадратов. Они составили для уравнения (6) $S_T = 1.116 \cdot 10^{-5}$; и для уравнения (7) $S_T = 6.68 \cdot 10^{-6}$ и $\alpha = 7.76 \cdot 10^{-6}$.

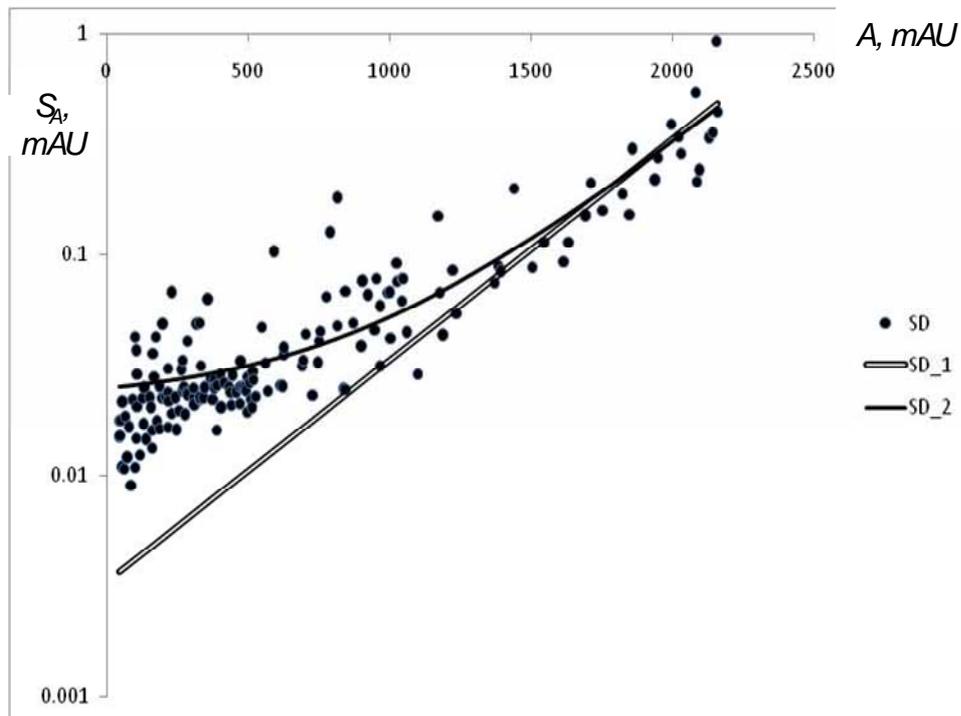


Рис. 9. Зависимость остаточного стандартного отклонения от оптической плотности для единого пула данных (давление 0 Bar) и её описание посредством уравнений (4) и (5).

Введение константы α и в этом случае улучшает описание экспериментальных результатов (остаточные стандартные отклонения составляют 0.0059 и 0.024, соответственно, отношение их квадратов составляет 6.13, что намного больше критического значения коэффициента Фишера $F(0.05, 197, 196) = 1.265$). На рис. 10 представлены экспериментальные значения относительной погрешности и их описание посредством уравнений (6) и (7).

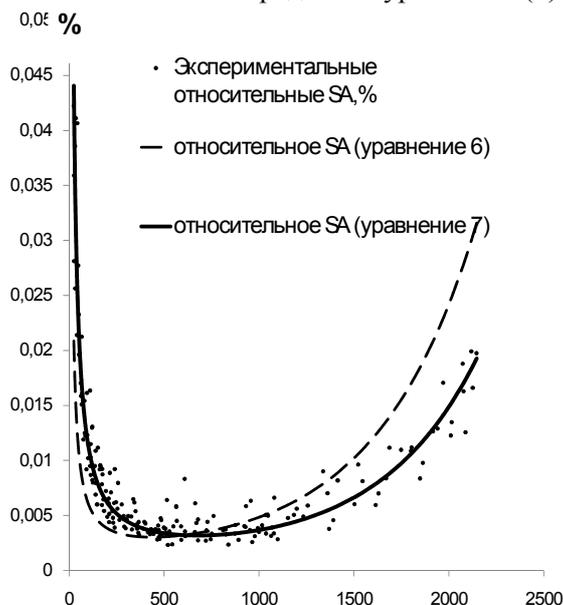


Рис. 10. Зависимость относительного остаточного стандартного отклонения от оптической плотности для единого пула данных (давление 43 Bar) и её описание посредством уравнений (6) и (7).

График на рис. 10 имеет все особенности, которые выявлены и объяснены в известной статье Н.П.Комаря и В.П.Самойлова [10] для классической спектрофотометрии, в частности, минимум относительной погрешности лежит при значении оптической плотности большем, чем 434.3 mAU и область, в которой относительная погрешность превышает минимальную не более чем в 2 раза, шире чем, та область, которую прогнозирует уравнение 1.

Так как в нашей работе мы использовали МЕК, УФ-спектр которого фактически заканчивается после 300 нм, то не представлялась возможность прямого определения зависимости стандартных отклонений от величины оптической плотности при длинах волн более 300 нм. Но, как представляется, разумно предположить, что функциональный вид связи стандартного отклонения измерения оптической плотности от самой оптической плотности сохраняется и в этом диапазоне, т.е. справедливо уравнение (5). При этом допущении математические ожидания стандартных отклонений для оптических плотностей близких к 0 при любой длине волны можно выразить как

$$S_A(0, \lambda) = 1000 * \left[0.4343 \cdot 10^{\frac{0}{1000}} \cdot S_T(\lambda) + \alpha(\lambda) \right] = 1000 * [0.4343 S_T(\lambda) + \alpha(\lambda)] \quad (8)$$

Как было показано выше, в диапазоне 200 – 300 нм $S_T(\lambda)$ и $\alpha(\lambda)$ можно считать не зависящими от длины волны. Если же не только функциональный вид, но и значения параметров $S_T(\lambda)$ и $\alpha(\lambda)$ для диапазона 300–400 нм остаются такими же как и для диапазона 200–300 нм, то средние стандартные отклонения для близких к нулю оптических плотностей этих диапазонов должны быть статистически неразличимы. Среднее стандартное отклонение для малых оптических плотностей, измеренных для подвижной фазы 0% МЕК для диапазона 200–300 нм составило 0.0098 mAU со стандартным отклонением 0.002 mAU, а для диапазона 302 – 400 нм соответствующие величины составили 0.0106 и 0.002, что явно указывает на то, что статистически значимое отличие отсутствует.

ВЫВОДЫ

Для прибора Agilent 1200 3D LC System, на котором проведено данное исследование, можно сделать следующие выводы:

1. Короткопериодический шум диодноматричного детектора характеризуется стандартным отклонением, которое в диапазоне 200-300 нм можно считать не зависящим от длины волны. Можно также предположить, что данный вывод справедлив и для диапазона 300-400 нм.
2. Зависимость стандартного отклонения короткопериодического шума от оптической плотности описывается уравнением (5), которое является модификаций уравнения, полученного Туайменом и Лотианом. В диапазоне оптических плотностей 0-2000 mAU стандартное отклонение шума изменяется в диапазоне от 0.01 до 1 mAU. Зависимость относительного стандартного отклонения короткопериодического шума детектора имеет такой же вид, как зависимость относительного стандартного отклонения результата анализа, полученная и объясненная Н.П. Комарем и В.П. Самойловым для классической спектрофотометрии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Garrido Frenich, A., Torres-Lapasió, J.R., de Braekeleer, K., Massart, D.L., Martínez Vidal, J.L., Martínez Galera, M., Application of several modified peak purity assays to real complex multicomponent mixtures by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A*, 1999. 855(2), pp. 487-499.
2. Shtal M. Peak purity analysis in HPLC and CE using diode-array technology. 2007. www.agilent.com/chem.
3. Liang, Y., Kvalheim, O.M. and Manne, R., White, grey and black multicomponent systems. a classification of mixture problems and methods for their quantitative analysis. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 1993. 18(3), pp. 235-250.

4. Hu, Y., Shen, W., Yao, W. and Massart, D.L. Using singular value ratio for resolving peaks in HPLC-DAD data sets. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 2005. 77(1-2 spec. iss.), pp. 97-103.
5. Practical guide to chemometrics. second edition, edited by Paul Gemperline, CRS, 2006. p.520. смотри стр. 95.
6. Lorber, A. Error propagation and figures of merit for quantification by solving matrix equations. *Analytical chemistry*, 1986. 58(6), pp. 1167-1172.
7. *European Pharmacopoeia. method 2.2.46. Separation techniques*
8. Берштейн И.Я, Каминский Ю.Л. Спектрофотометрический анализ в органической химии. Л., «Химия», 1975. Смотри стр. 17.
9. Твуман F., Lothian G.F. Proc. Phys. Soc., 1933, 41(5), pp. 643-662.
10. Комарь Н.П., Самойлов В.П. Влияние погрешностей за счет предварительной настройки прибора и отсчета пропускания на результаты спектрофотометрического измерения // Журн. анал. хим. – 1967. Т. 22, № 9. С. 1285-1296.

Поступила в редакцию 12 августа 2010 г.

М. Г. Левин, А. В. Мирный, Н. В. Овчаренко, И. В. Трутаев. Випадкова похибка вимірювання оптичних густин у високоефективній рідинній хроматографії з діодноматричним детектором.

Для рідинного хроматографа з діодноматричним детектором у діапазоні довжин хвиль 200-300 нм визначено залежність стандартного відхилення, яке характеризує шум вимірювань оптичних густин, від величини оптичної густини. Показано, що у цьому діапазоні стандартне відхилення не залежить від довжини хвилі, а залежність стандартного відхилення від оптичної густини описується двопараметричним рівнянням. Знайдена залежність погоджується з залежностями, що були запропоновані у відомій статті М.П.Комаря та В.П.Самойлова, присвяченій похибкам у спектрофотометрії, та може бути використана для хемометричного моделювання.

Ключові слова: ВЕРХ з діодноматричним детектором, шум вимірювання, хемометрика.

M. Levin, A. Mirniy, N. Ovcharenko, I. Trutaev. Random error of absorbances determination in HPLC-DAD.

Dependence of the standard deviation of absorbance characterizing the noise on the absorbance itself has been established in the 200-300 nm range for HPLC-DAD equipment. In this range the standard deviation is shown to be independent on the wavelength and the established dependence is a two-parameter equation. This dependence is in a good agreement with relationships that were suggested in the well known paper of N.P.Komar and V.P.Samoilov on errors in spectrophotometric determinations. It can be used for modeling in chemometrics.

Key words: HPLC-DAD, noise of determination, chemometrics.

Kharkov University Bulletin. 2010. № 932. Chemical Series. Issue 19(42).