



Spectrometrie

SPECTROSCOPISCHE DETECTIE IN DE VLOEISTOFCHROMATOGRAFIE:

Deel IIb

H. LINGEMAN

VRIJE UNIVERSITEIT, VAKGROEP ANALYTISCHE CHEMIE,
DE BOELELAAN 1083, 1081 HV AMSTERDAM, TEL.: 20 444 7539

2.2 STANDAARDEN EN CALIBRATIEMOGELIJKHEIDEN

De meeste laboratoria werken met erkende standaarden die gecertificeerd zijn als overeenkomend met BS 5750 of ISO 9000. Farmaceutische laboratoria moeten opereren volgens de FDA (Food and Drug Administration) opgestelde 'Code of Federal register'. De GLP (Good Laboratory Practice) en GMP (Good Manufacturing Practice) richtlijnen moeten eveneens opgevolgd worden. Deze laatste richtlijnen bepalen dat alle instrumenten regelmatig gecalibreerd en gecontroleerd moeten worden.

Terwijl er duidelijke richtlijnen zijn om chromatografische systemen te testen met behulp van piek asymmetrie en piek efficiëntie metingen is er minder bekend over het calibreren van spectrometers. Er bestaat een 'American National Standard' (Standard Practice for Testing Fixed Wavelength Photometric Detectors Used in Liquid Chromatography E 685 -79) maar deze houdt zich met name bezig met het controleren van de ruis en de drift van het instrument en niet zozeer met de spectrometrische nauwkeurigheid en precisie. Waarschijnlijk is het beter om een UV detector niet als een conventionele spectrometer te beschouwen, omdat de traditionele standaarden hier moeilijk gebruikt kunnen worden (doorstroomcel versus cuvethouder met cuvetten). Bovendien kunnen een aantal LC detectoren geen spectra scannen en zijn ze uitgerust met een 'auto-zero' functie die iedere keer als de golflengte verandert wordt in werking treedt. De standaarden voor conventionele spectrometers geven dan ook niet meer dan een aardig startpunt om calibratie routines uit te voeren.

2.2.1 Wat moet er gecalibreerd worden?

Bij een conventionele spectrometer wordt de golflengte en de fotometrische nauwkeurigheid gecontroleerd. Aanvullende controles met betrekking op strooi-licht en resolutie worden vaak aanbevolen. Voor een LC detector zijn ook de ruis en drift belangrijke parameters omdat deze apparaten vaak worden gebruikt om een absorptiesignaal continu over een langere periode te volgen.

Literatuur: Standaarden die voor calibratiedoeleinden gebruikt kunnen worden zijn beschreven in:

C. Burgess and A. Knowles (Eds.), Standards in Absorption Spectrometry, Chapman and Hall, London, 1981.

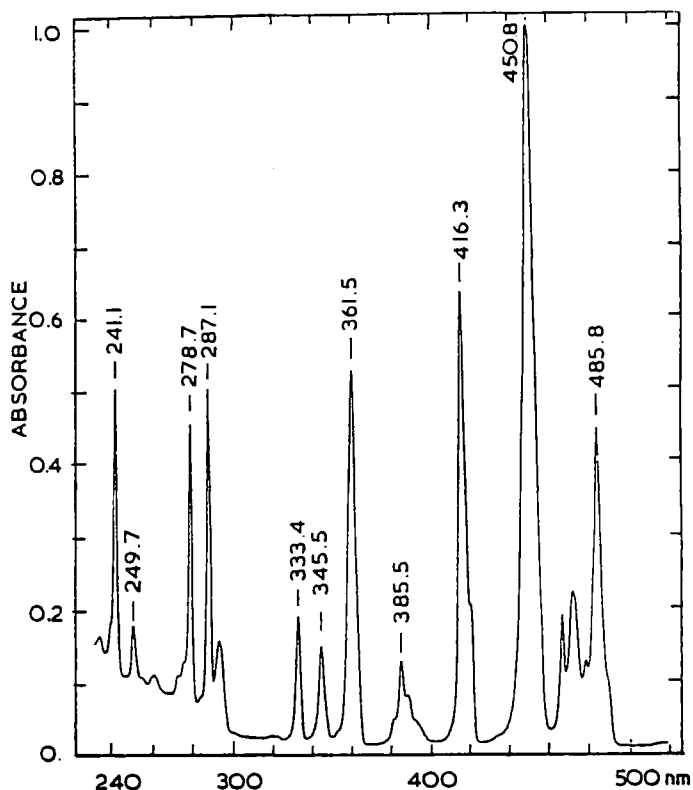
B.J. Clark, T. Frost and M.A. Russell (Eds.), UV Spectroscopy: Techniques, Instrumentation and Datahandling, Chapman and Hall, London, 1993.

2.2.2 Golflengte nauwkeurigheid

Bij een conventionele spectrometer kan de nauwkeurigheid van de golflengte gecontroleerd worden door het scannen van het spectrum van een verbinding waarvan de plaats van de absorptiemaxima precies bekend is. De standaard die hiervoor het meest wordt gebruikt is een 5% (m/v) oplossing van holmium perchloraat in perchloorzuur (Figuur 14). Het spectrum van deze verbinding bevat een aantal scherpe lijnen waarvan de golflengten nauwkeurig bekend zijn. Omdat niet alle LC detectoren spectra kunnen scannen moet hiervoor een andere methode worden toegepast.

Een benadering is door gebruik te maken van het feit dat de deuteriumlamp, die meestal in de detector aanwezig is, enkele scherpe lijnen heeft bij 656,3 nm, 486,1 nm en 379,9 nm. Indien de detector het mogelijk maakt om de energie van de deuteriumlamp te monitoren, kan de maximum emissie bij 656,3 nm worden gecontroleerd. De golflengte wordt dan gevarieerd totdat het energiemaximum wordt bereikt hetgeen dan op 656,3 nm moet liggen. Een afwijking van ± 1 nm voor het UV gebied en ± 3 nm voor het VIS gebied is nog acceptabel.

Figuur 14: Spectrum van holmium perchloraat.

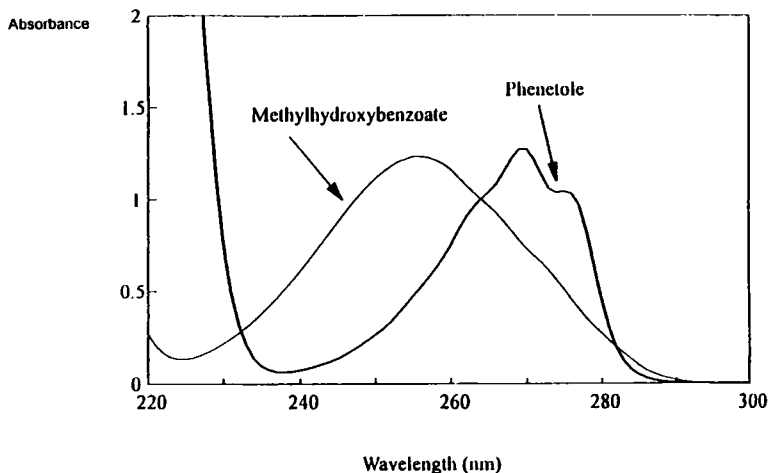


Attentie! Om dit te kunnen doen moet de spectrometer in de energiemode kunnen werken. Het is absoluut geen goede manier om het absorptiemaximum bij 656,3 nm vast te stellen, omdat absorptie alleen een maat is voor de verhouding van de energie van de lichtbundel voor en na de doorstroomcel.

Helaas beschikken de meeste UV detectoren niet over een energiemode. In dat geval zal er een andere techniek gebruikt moeten worden. Een mogelijkheid is om de doorstroomcel te vullen met een oplossing van holmium perchloraat en vervolgens het spectrum van de belangrijkste banden te scannen. Dit is echter nagenoeg onmogelijk bij apparaten die een automatische auto-zero functie hebben.

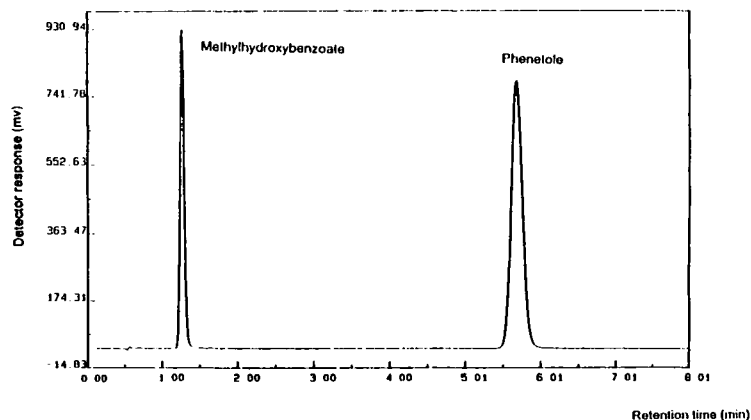
Een andere benadering die wel wordt toegepast is om een chromatogram van methylhydroxybenzoaat en fenetol op te nemen. Het spectrum van deze twee verbindingen is te zien in Figuur 15.

Fig. 15: Spectrum van methylhydroxybenzoaat en fenetol



Deze twee spectra snijden elkaar bij 264 nm. Een chromatogram van deze twee verbindingen wordt gegenereerd bij 264 nm. Een voorbeeld van een chromatogram met de hierbij horende condities is in Figuur 16 gegeven. De concentratie van beide verbindingen in het mengsel wordt zo gekozen dat de pieken in het chromatogram ongeveer even hoog zijn. Het feit dat de pieken van gelijke hoogte moeten zijn kan nu gebruikt worden om de golflengte te controleren.

Figuur 16: Chromatogram van methylhydroxybenzoaat en fenetol. Kolom, Spherisorb 5 ODS (100 x 4,6 mm I.D.); Eluens, methanol - water - fosforzuur (500/500/1, v/v); Detectie, 264 nm.



Dit omdat uit Figuur 16 kan worden afgelezen dat bij iedere golflengte, behalve 264 nm, de molaire absorpties van de twee verbindingen totaal verschillend zijn en de piekhoogte dus verschillend zal zijn.

Het chromatogram kan verder gebruikt worden om een aantal andere parameters te controleren zoals de reproduceerbaarheid van de injector. Injectie van dit mengsel maakt het dus mogelijk om het gehele chromatografisch systeem, inclusief de detector, te controleren.

2.2.3 Fotometrische nauwkeurigheid

De fotometrische nauwkeurigheid van een conventionele spectrometer wordt met behulp van vaste of vloeibare standaarden bepaald. In een LC detector kunnen alleen vloeibare standaarden worden gebruikt. De meest gebruikte standaard is een oplossing van kalium dichromaat in zwavelzuur. De absorptie hiervan is nauwkeurig bekend en terug te vinden in de Nederlandse en Engelse Farmacopee (Tabel XII).

Tabel XII: Absorptiegegevens van kaliumdichromaat

Golflengte (nm)	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$
235	124,5
257	144,0
313	48,6
350	106,6

Een kalium dichromaat standaard kan relatief eenvoudig worden gebruikt om LC detectoren te calibreren, maar er moet in de gaten worden gehouden dat de bandbreedte van detectoren vaak groter is dan van conventionele spectrometers met als gevolg dat de molaire absorpties (ϵ of $E_{1\text{cm}}^{1\%}$) niet in alle gevallen gebruikt mogen worden.

De volgende procedure kan worden toegepast. De golflengte wordt ingesteld op één van de waarden uit Tabel XII. De doorstroomcel wordt gevuld met een oplossing van 0,005 M zwavelzuur en de detector wordt op nul gezet. Vervolgens wordt de doorstroomcel gevuld met een oplossing van kalium dichromaat (60 mg.l⁻¹ in 0,005 M zwavelzuur) en de absorptie wordt gemeten. De berekende

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ waarde kan dan worden vergeleken met de getallen uit Tabel XII.

2.2.4 Strooilicht

Strooilicht is licht met een andere golflengte dan de gewenste golflengte. In LC is het gevolg van strooilicht een verminderde gevoeligheid en een beperkt lineair dynamisch bereik. Een meer uitgebreide bespreking van het fenomeen strooilicht is in paragraaf 2.4 te vinden.

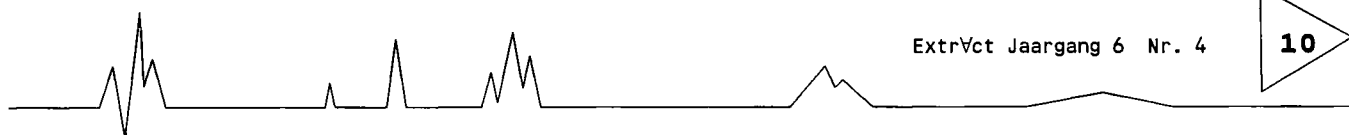
Literatuur: Het fenomeen strooilicht wordt uitgebreid besproken in: C. Burgess and A. Knowles (eds.), *Standards in Absorption Spectrometry*, Chapman and Hall, London, 1984.

Strooilicht wordt meestal bepaald met behulp van filters met een scherpe 'cut-off' waarde. Deze benadering kan ook gebruikt worden bij LC detectoren. Er zijn een aantal oplossingen van anorganische zouten die gebruikt kunnen worden om strooilicht te meten (Tabel XIII). Een verzadigde waterige oplossing van lithium carbonaat heeft een scherpe cut-off bij ca. 225 nm en een waterige oplossing (10 g.l⁻¹) heeft een scherpe 'cut-off' bij 260 nm.

Het experiment wordt op de volgende manier uitgevoerd. De detectorcel wordt gevuld met water en op 0 gezet. De cel wordt vervolgens gevuld met een oplossing van het geschikte 'cut-off' filter en de absorptie wordt gemeten. Indien er een overmaat aan strooilicht aanwezig is, zal de absorptie verminderen en wordt strooilicht gemeten. In het algemeen zullen strooilichtfilters een absorptie van > 2 geven.

Tabel XIII: Cut-off filters voor strooilichtmetingen

Zoutoplossing	Golflengtegebied (nm)
Li ₂ CO ₃ (verzadigd)	ca. 225
KCl (12 g/l)	175 - 200
NaBr (10 g/l)	195 - 223
NaI (10 g/l)	210 - 259
Aceton	250 - 320
NaNO ₂ (50 g/l)	300 - 385

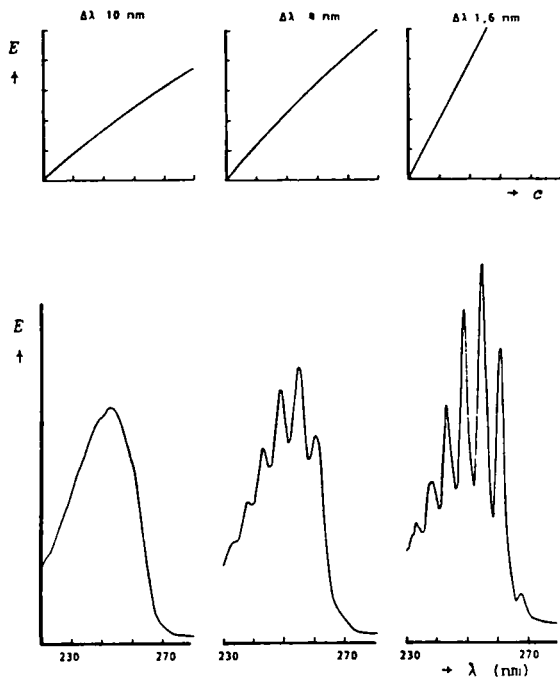


2.2.5 Lineariteit

Een kalium dichromaatoplossing kan ook gebruikt worden om de lineariteit van een detector te controleren. Met behulp van oplossingen met verschillende concentraties wordt een calibratiecurve gemaakt waarin de absorptie wordt uitgezet tegen de concentratie. De curve moet lineair zijn tot een extinctie van 1.5 of meer. Strooilicht is boven deze waarde, afhankelijk van de gebruikte optiek, de beperkende factor.

De spectrale spleetbreedte van een spectrometer heeft invloed op de vorm van de absorptieband en op de lineariteit van de calibratiecurve. Deze parameters kunnen worden gecontroleerd aan de hand van het spectrum van benzeen(-damp) (Figuur 17).

Figuur 17: Invloed van de spectrale spleetbreedte op de vorm van de absorptieband (benzeen) en op de lineariteit van de ijklijn.



Naarmate de spectrale spleetbreedte groter is gaat meer detail verloren. De spleetbreedte moet zodanig worden ingesteld dat bij verdere verkleining ervan de extinctie niet meer verandert.

2.2.6 Ruis en drift

Een LC detector moet een stabiel signaal geven dat vrij is van extreme ruis en drift. Ruis en drift kunnen op de volgende manier worden onderverdeeld:

- Drift is het continu op- of aflopen van de basislijn. Het gevolg is dat kleine pieken niet meer zichtbaar zijn en dat automatische piekintegratie bemoeilijkt wordt;
- Laag-frequente ruis is de maximum respons van de detector voor alle random variaties van het detectorsignaal met frequenties van 6 - 60 cycli per uur. Het is het soort ruis dat gemakkelijk verward kan worden met laat eluerende pieken;
- Hoog-frequente ruis is de maximum respons van de detector voor alle random variaties van het detectorsignaal met frequenties groter dan 1 cyclus per minuut.

Beide parameters kunnen relatief eenvoudig worden gemeten door de detector gedurende een bepaalde tijd, op de maximale gevoeligheid, zonder te injecteren, aan te laten staan en het signaal op een recorder te registreren. Om het geheel zinvol uit te voeren moet het systeem in evenwicht zijn en moet de mobiele fase zo weinig mogelijk absorptie vertonen.

Literatuur: In onderstaande referentie wordt aanbevolen om methanol te gebruiken als eluens en verder worden er details gegeven om zowel de laag als hoog frequente ruis en drift te meten: *Standard Practice for Testing Fixed Wavelength Photometric Detectors Used in Liquid Chromatography E685 -79.*

2.2.7 Wanneer moet er gecalibreerd worden?

Op deze vraag is geen eenvoudig antwoord te geven. In het algemeen kan gezegd worden dat nieuwe instrumenten en instrumenten die zijn verplaatst gecalibreerd moeten worden en dat er op vaste tijdstippen zoals iedere maand of ieder jaar (afhankelijk van het gebruik) gecalibreerd moet worden. Zodra een instrument regelmatig wordt gecontroleerd en goed bevonden kan de periode tussen twee controles worden verlengd. Ieder laboratorium zal echter een eigen calibratie-

schema moeten opstellen afhankelijk van de eigen voorschriften, werklast, apparatuurgebruik, enz.

2.3 KWANTITATIEVE BEPALINGEN

Doel van een kwantitatieve analyse is de concentratie van een verbinding, vaak in aanwezigheid van andere componenten, nauwkeurig te bepalen. Uit de Wet van Lambert-Beer volgt dat hiervoor een nauwkeurige meting van E in de doorstroomcel voldoende kan zijn. De weglengte van de doorstroomcel is echter meestal een onbekende factor hetgeen betekent dat in LC relatieve metingen ten opzichte van een standaard uitgevoerd moeten worden.

Men begint een kwantitatieve bepaling met de controle van de te gebruiken reagentia en oplosmiddelen. Het eenvoudigste is om een blancobepaling te verrichten, dat is het uitvoeren van een LC-bepaling zonder dat de te onderzoeken verbinding wordt geïnjecteerd. De extinctie van een dergelijke blanco mag niet hoger zijn dan 0,4 en moet liefst lager zijn dan 0,2 (zie ook paragraaf 2.4). Indien bijvoorbeeld een derivatiseringsreactie wordt uitgevoerd moet ook worden gecontroleerd of er bij deze reactie geen andere producten, dan het derivaat, ontstaan die een te hoge achtergrondabsorptie geven. Vervolgens moet worden gecontroleerd of de calibratiecurve in het gebied waar gemeten gaat worden wel een rechte is. Er moeten minimaal drie verdunningen worden geïnjecteerd in het geval de curve een rechte is en meer punten indien de curve een kromme blijkt te zijn. Om gegevens over de herhaalbaarheid en/of reproduceerbaarheid te verkrijgen moeten injecties 5 - 8 maal worden herhaald. Er moet worden vastgesteld dat onder de meetomstandigheden wordt voldaan aan de voorwaarden waarvoor de Wet van Lambert-Beer is afgeleid (geen onderlinge beïnvloeding, monochromatische straling, enz.).

De meetprocedure bestaat uit een aantal stappen. Allereerst moet de extinctie van een blanco worden gemeten (zie boven) en vervolgens moet de blanco, al dan niet met behulp van de auto-zero, worden ingesteld. Vervolgens moet gecontroleerd worden of de spleetbreedte niet te groot of te klein is. Hierna worden de standaarden geïnjecteerd. Door metin-

gen aan weerszijden van de opgegeven golflengte stelt men vast of de meting inderdaad in het absorptiemaximum plaatsvindt. In het absorptiemaximum verandert de extinctie namelijk het sterkst met de concentratie terwijl de invloed van de spectrale spleetbreedte het kleinst is (zie ook paragraaf 2.4). Ten slotte kunnen de calibratie en de onbekende monsters worden gemeten. Na de meting worden een aantal blanco injecties uitgevoerd om het hele systeem weer schoon te spoelen.

Als meer dan één absorberende verbinding aanwezig is, bijvoorbeeld indien de chromatografische resolutie niet voldoende is, en er is geen golflengte waarbij alleen de te bepalen component absorbeert, dan is het toch mogelijk om de concentratie van de aanwezige componenten te bepalen met behulp van een meerpuntsmeting. Er moet in dit geval wel een DAD of een detector die minimaal twee golflengten simultaan kan meten worden gebruikt. Er worden extinctiemetingen uitgevoerd bij zoveel golflengten als er absorberende stoffen aanwezig zijn. Voor een mengsel van twee stoffen A en B verloopt de analyse als volgt. De extinctie van het mengsel wordt gemeten bij twee golflengten λ_1 en λ_2 . Hiervoor geldt:

$$E_1 = \epsilon(\lambda_1, A) \cdot c(A) + \epsilon(\lambda_1, B) \cdot c(B) \quad (9)$$

$$E_2 = \epsilon(\lambda_2, A) \cdot c(A) + \epsilon(\lambda_2, B) \cdot c(B) \quad (10)$$

Als λ_1 en λ_2 zo worden gekozen dat $\epsilon(\lambda_1, A) \neq \epsilon(\lambda_1, B)$ en $\epsilon(\lambda_2, A) \neq \epsilon(\lambda_2, B)$, kunnen uit deze Vergelijkingen c(A) en c(B) worden opgelost. De samenstelling van een twee-componentenmengsel kan veelal met voldoende hoge nauwkeurigheid worden vastgesteld. Bij aanwezigheid van meer componenten neemt de onnauwkeurigheid snel toe omdat steeds meer extincties moeten worden bepaald en de fout in elke extinctiemeting bijdraagt aan de fout in de berekende concentratie.

2.3.1 Detectiegrenzen

De laagste concentratie die met behulp van UV kan worden gemeten met conventionele UV-spectroscopie kan worden berekend met behulp van vergelijking 11:

$$c = 0,2 / \epsilon \cdot l \quad (11)$$

Wordt voor ϵ een waarde van 10.000, en 1 cm voor l genomen, dan ligt deze concentratie bij 2×10^{-5} g/l. Voor LC-UV bepalingen gaat deze vergelijking niet op en kan een schatting van de laagste concentratie die gemeten kan worden gemaakt worden met behulp van vergelijking 12:

$$Q = V_r \cdot E / E_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot 10^{-2} \cdot \sqrt{2\pi} / N \quad (12)$$

Met bovenstaande formule kan het verband tussen de geïnjecteerde hoeveelheid van een verbinding (Q in g) en de bij het piekmaximum gevonden extinctie (E) worden berekend uitgaande van een optische weglengte van 1 cm. V_r is het retentievolumen (ml), $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ de specifieke extinctie van de verbinding in het betreffende eluens en bij de gebruikte golflengte en N het schotelgetal van de gebruikte kolom. Stel dat het retentievolumen van de verbinding 6 ml is, het schotelgetal van de kolom 2.000 en de gemeten extinctie 0,1 dan moet een hoeveelheid van $3,4 \times 10^{-4} / E_{1\text{cm}}^{1\%}$ g worden geïnjecteerd om een piek met de gewenste extinctie te verkrijgen. Bij een injectievolumen van 10 μ l betekent dit dat een oplossing van $3.400 / E_{1\text{cm}}^{1\%}$ mg/100 ml moet worden gebruikt.

Niet de laagste concentratie die gemeten kan worden, maar de bepalingsgrens en de detectiegrens zijn belangrijk.

De bepalingsgrens (Limit of quantitation - LOQ) en de detectiegrens (Limit of detection - LOD) worden volgens de IUPAC definitie gerelateerd aan de standaard deviatie van de blanco (S_b) en de helling van de calibratiecurve (m) zoals weergegeven in vergelijking 13:

$$\text{LOD} = 3 \times S_b / m \quad (13)$$

Bij chromatografische bepalingen is het moeilijk om een blancowaarde te verkrijgen en moet S_b met behulp van een andere methode worden bepaald. Dit kan door S_b te definiëren als een vijfde van de piek-piek ruis (N_{pp}) gemeten over de laatste 20 'meetpunten':

$$S_b = N_{pp} / 5 \quad (14)$$

De ruis wordt bepaald door een chromato-

gram op te nemen zonder te injecteren en de gevoeligheid wordt bepaald door een calibratiecurve op te nemen.

Het bepalen van m en S_b kan op de volgende manier gebeuren:

- Neem een chromatogram op, op de meest gevoelige stand van de detector, en bepaal hieruit S_b en N_{pp} met behulp van Vergelijking 14;
- Neem een calibratiecurve op waarin het piekoppervlak wordt uitgezet tegen de concentratie en bepaal uit de helling van deze curve m .

De bepalingsgrens kan op soortgelijke wijze worden bepaald:

$$\text{LOQ} = 10 \times S_b / m \quad (15)$$

Na het berekenen van de LOD en LOQ moet gecontroleerd worden of de gevonden waarden wel realistisch zijn. Dit kan gebeuren door een stamoplossing van de te analyseren verbinding te verdunnen tot het concentratieniveau van de LOD en deze oplossing vervolgens te chromatograferen. Hetzelfde kan gedaan worden bij het controleren van de LOQ. Belangrijk is hierbij dat een tot op het LOQ niveau verdunde oplossing minimaal zes maal wordt geïnjecteerd en dat de variatie coefficient (CV) wordt berekend. Als vuistregel wordt vaak aangehouden dat op het LOQ niveau de CV niet groter mag zijn dan 20%.

Literatuur: Een uitgebreide discussie omtrent methoden om bepalings- en detectiegrenzen te bepalen kan gevonden worden in:

J.E. Knoll, *Estimation of the Limit of Detection in Chromatography*, *J. Chromatogr. Sci.*, 23 (1985) 422.

J.P. Foley and J.G. Dorsey, *Clarification of the Limit of Detection in Chromatography*, *Chromatographia*, 18 (1984) 503.

2.3.2 Kwaliteitsaspecten

Tenslotte zullen enkele kwaliteitsaspecten worden besproken. Ieder laboratorium zal echter voor zich moeten uitmaken welke kwaliteitsstandaarden er gehanteerd zullen gaan worden. In de meeste laboratoria gelden de volgende regels met betrekking tot LC:



- Alle instrumenten moeten logboeken hebben en er moeten SOP's aanwezig zijn met hierin een uitgebreide omschrijving hoe deze gebruikt dienen te worden;
- Alle instrumenten moeten gecalibreerd zijn volgens schriftelijk vastgelegde procedures en de resultaten moeten hiervan worden vastgelegd;
- Alle reagentia moeten gelabeld worden op het moment dat ze binnenkomen en er moet worden aangegeven wanneer ze geopend worden;
- Alle eluenscontainers moeten duidelijk vermelden wat de inhoud is, de datum waarop het eluens bereid is en tot wanneer het gebruikt mag worden. Op het laboratorium moeten centraal de batchnummers worden bijgehouden van de gebruikte reagentia;
- Het eluens dat uit de detector komt moet verzameld worden in goed gelabelde afvalvaten en zeker niet in lege 'Winchesters';
- Al het onderhoud aan de apparatuur moet nauwkeurig worden bijgehouden.