



AFGELEIDE UV-SPECTROFOTOMETRIE IN EEN FARMACEUTISCH LABORATORIUM: EEN PRAKTISCH HULPMIDDEL

A.I. de Graaf,
Apotheek Haagse Ziekenhuizen
Escamplaan 900
2547 EX Den Haag.

Inleiding

De redactie heeft wel eens de kritiek ontvangen dat Extract vol staat met artikelen over bloedspiegelbepalingen, en dat de farmaceutische analyse onderbelicht blijft. Daarnaast was de kritiek dat kleine labs niet over alle apparatuur beschikken. Met de volgende reeks artikelen in dit nummer willen we aan deze labs tegemoet komen: immers, op ieder laboratorium staat wel een spectrofotometer. Nu de afgeleide spectrofotometrie zelfs in de Europese Farmacopee wordt beschreven en de eerste monografieën van geneesmiddelen waarin van deze techniek gebruik gemaakt wordt in de maak zijn, leek dit ons een goed moment om hier wat dieper op in te gaan. In dit artikel zal de theorie van afgeleide spectrofotometrie beschreven worden, terwijl in twee andere artikelen een toepassing in de farmaceutische analyse respectievelijk de toxicologie weergegeven wordt.

Wat is afgeleide spectrofotometrie?

Afgeleide spectrofotometrie is een bruikbare analytische methode om zowel kwalitatieve als kwantitatieve informatie te verkrijgen uit weinig karakteristieke spectra of spectra samengesteld uit overlappende pieken.

Bij het opnemen van een UV-spectrum wordt de absorptie (A) tegen de golflengte (λ) weergegeven. Het is mogelijk om door differentiatie de afgeleide van dit spectrum te bepalen. Bij de eerste afgeleide wordt dan $dA/d\lambda$ uitgezet tegen λ , de verandering van de absorptie met de golflengte. Bij de tweede afgeleide

wordt $d^2A/d\lambda^2$ uitgezet tegen λ , enzovoort.

Een afgeleide spectrum bevat geen wezenlijk nieuwe informatie in vergelijking met het directe spectrum. Informatie kan zelfs verloren gaan door toename van de signaal-ruis verhouding. Een afgeleide spectrum is meer een alternatieve weergave van het directe spectrum. De omzetting naar een afgeleide spectrum heeft als effect dat schouders en buigpunten worden weergegeven als pieken, kleine veranderingen worden zichtbaar gemaakt (de resolutie wordt vergroot).

Waarom afgeleide UV-spectrofotometrie?

In een aantal gevallen kan het zinvol zijn om afgeleide UV-spectrofotometrie toe te passen wanneer directe UV-meting niet mogelijk is:

- Bij stoffen met minder karakteristieke spectra: slecht ontwikkelde maxima of pieken met schouders.
- Bij multicomponent analyse: wanneer de golflengte maxima van de componenten dicht bij elkaar liggen waardoor de absorptiebanden elkaar overlappen.
- Bij matrix effecten. De te analyseren component is gemengd met een aantal andere bestanddelen (hulpstoffen) die in hetzelfde golflengte gebied absorberen.

Er zijn diverse voordelen verbonden aan afgeleide spectrofotometrie: kleine variaties in het signaal worden versterkt, waardoor spectrale veranderingen en kleinere pieken beter detecteerbaar zijn. De resolutie verbeterd, de pieken worden smaller. Hierdoor kan bij stoffen die uit meerdere componenten bestaan voor iedere component een kenmerkende piek worden verkregen. Hoge

achtergrondabsorptie die min of meer lineair afneemt met de golflengte wordt in het afgeleide spectrum geëlimineerd. Hierdoor vermindert de systematische fout veroorzaakt door matrix effecten. Het belangrijkste nadeel van afgeleide spectrofotometrie is vooral dat de signaal-ruis verhouding verkleint, met het toenemen van de orde verslechterd deze verhouding.

De wet van Lambert-Beer

In de UV-Vis spectrofotometrie geldt de wet van Lambert-Beer:

$$I/I_0 = e^{-c\ell\epsilon} \quad (1)$$

$$I = I_0 \cdot e^{-c\ell\epsilon} \quad (2)$$

met I = lichtintensiteit,
 I_0 = lichtintensiteit vóór doorgang van het licht door de cuvet,
 c = concentratie van het monster (mol/l),
 ℓ = cuvetlengte (cm),
 ϵ = molaire extinctiecoëfficiënt (l.mol/cm)

Bij een constante I_0 over het hele golflengte gebied wordt de eerste afgeleide:

$$dI/d\lambda = -I \cdot c \cdot \ell_0 \cdot [d\epsilon/d\lambda] \cdot e^{-c\ell\epsilon} \quad (3)$$

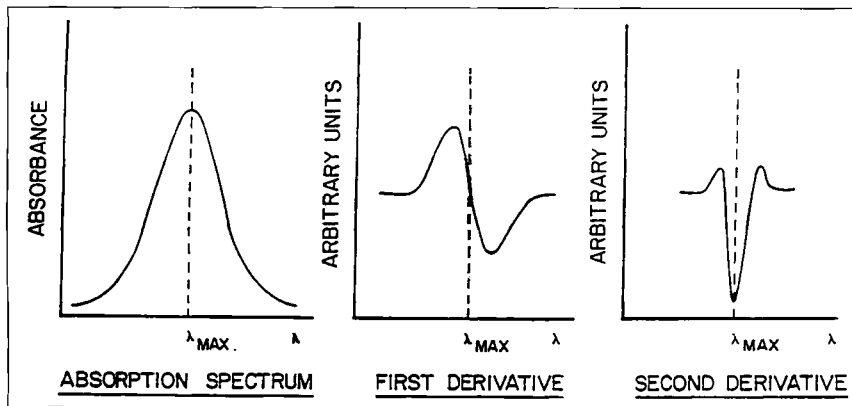
Wanneer deze vergelijking wordt gedeeld door vergelijking (2) geeft dit:

$$[dI/d\lambda]/I = -I \cdot c \cdot \ell \cdot [d\epsilon/d\lambda] \quad (4)$$

De eerste afgeleide is bij elke golflengte direct evenredig met de concentratie.

Voor de tweede afgeleide wordt gevonden:

$$[d^2I/d\lambda^2]/I_0 = c^2 \cdot \ell^2 \cdot [d\epsilon/d\lambda]^2 - c \cdot \ell \cdot [d^2\epsilon/d\lambda^2]$$



Figuur 1: eerste en tweede afgeleide van een Gauss-kromme.

De tweede afgeleide is (lineair) evenredig met de concentratie wanneer de eerste afgeleide gelijk aan nul is, bij het golflengte maximum in het directe spectrum.

Vorm en betekenis van afgeleide spectra

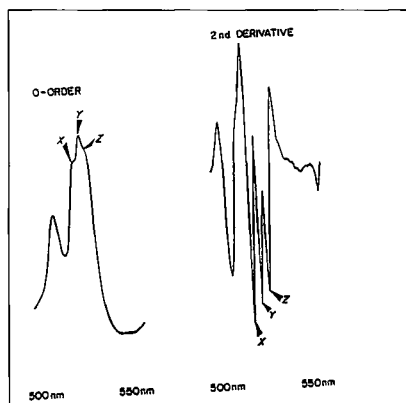
Figuur 1 is een schematische weergave van afgeleide spectra. Het eerste afgeleide spectrum is een plot van $dA/d\lambda$ tegen λ . Bij een golflengte maximum in het directe UV-spectrum ziet men bij de eerste afgeleide een maximum en een minimum, waarbij theoretisch het snijpunt met de λ -as overeenkomt met het maximum in het directe spectrum. Het eerste afgeleide spectrum is derhalve zeer geschikt om nauwkeurig het golflengte maximum te bepalen en wordt veelal toegepast bij identiteitsbepalingen.

Het tweede afgeleide spectrum is een plot van $d^2A/d\lambda^2$ tegen λ . Hier ziet men twee maxima met ertussen in een minimum, hetgeen overeenkomt met het maximum in het directe spectrum. Theoretisch zijn beide piekhoogtes evenredig met de concentratie, dit blijkt in de praktijk echter niet altijd op te gaan. De tweede afgeleide heeft meer toepassingen. De piekbreedte wordt verkleind, wat verhoging van de resolutie tot gevolg heeft. Een voorbeeld hiervan is te zien in figuur 2.

Hogere afgeleide spectrofotometrie wordt wel toegepast, maar heeft niet altijd toegevoegde waarde. De spectra zijn vaak erg complex, waardoor de interpretatie lastig is.

Voor het tweede afgeleide spectrum zijn vier meetmethoden mogelijk (zie figuur 3 op de volgende pagina):

- De tangensmethode: de afstand t tussen de lijn van twee naburige maxima of minima en de tussenliggende extreme wordt gemeten.
- De piek-pek methode: de afstand p tussen een maximum en een minimum is evenredig met de concentratie. Deze methode wordt vaak toegepast bij multi-component analyse.
- De piek-nul methode: de verticale afstand z van maximum tot nul wordt gemeten. Met name toegepast in geval van asymmetrische pieken.
- De piek-pek verhouding methode: van twee naburige pieken wordt $p_1: p_2$ bepaald.



Figuur 2: verbetering van de resolutie in het tweede afgeleide spectrum (Applications Data Sheet, Perkin-Elmer).

De meest geschikte meetmethode moet empirisch bepaald worden. De invloed van de interfererende componenten dient in het afgeleide spectrum vrijwel gelijk aan nul te zijn.

Parameter selectie

Bij het toepassen van afgeleide spectrofotometrie moet men een aantal parameters in ogenschouw nemen, zoals spleetbreedte, scansnelheid en differentiatiestapgrootte.

Spleetbreedte:

Door het bepalen van de tweede afgeleide verbeterd de resolutie, maar wezenlijk nieuwe informatie wordt niet verkregen. De informatie moet al in het originele spectrum aanwezig zijn, derhalve dient de spleetbreedte tijdens het opnemen van het directe spectrum geoptimaliseerd te zijn. Bij een zo klein mogelijke spleetbreedte wordt een optimale resolutie verkregen.

Scansnelheid:

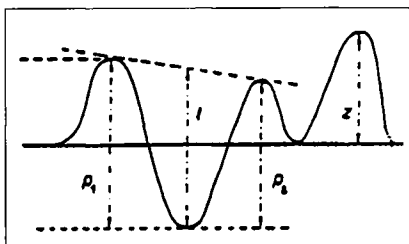
Een hogere scansnelheid geeft een sneller veranderend absorptie signaal. Dit geeft een hogere amplitude in het afgeleide spectrum. Er gaat echter ook informatie verloren en het golflengte maximum kan opschuiven.

Differentiatiestapgrootte ($d\lambda$):

De grootte van $d\lambda$ heeft twee effecten op de vervorming van het afgeleide signaal: te weten afname van de amplitude en resolutie met de toename van $d\lambda$. De stapgrootte moet echter niet te klein worden omdat er dan teveel ruis ontstaat.

Ruis en signaal-ruis verhouding:

Resolutie en ruisonderdrukking zijn twee strijdige begrippen, die van geval tot geval geoptimaliseerd moeten worden. Over het algemeen wordt een vooruitgang in scheidend vermogen betaald met een achteruitgang van signaal-ruis verhouding. Bij hogere afgeleiden wordt de ruis vaak zo hoog dat de reproduceerbaarheid verloren gaat. Dit kan ondervangen worden door het spec-



Figuur 3: verschillende meetmethoden van afgeleide spectra.

trum meerdere malen op te nemen, hierdoor weet men of men met toevallige fouten te maken heeft. De tweede afgeleide is een goed compromis tussen een goede resolutie en een redelijke signaal-ruis verhouding.

Toepassingen:

Op een aantal (mij bekende) labs wordt de afgeleide spectrometrie frequent toegepast: bij het Wetenschappelijk Instituut Nederlandse Apothekers (WINAP) staat de bepaling van morfinezetpillen met deze techniek wat betreft frequentie op de eerste plaats, gevolgd door amfetamine 5 mg tabletten. In de Apotheek Haagse Ziekenhuizen (AHZ) wordt deze techniek ook toegepast voor de morfinezetpillen, naast de bepaling van paraquat in serum t.b.v. de toxicologie (hetgeen verderop in dit blad is beschreven). Uit de Ziekenhuisapotheek Midden-Brabant (Tilburg) in dit nummer de bepalingsmethode van morfinezetpillen, die ook daar regelmatig wordt toegepast.

Literatuur:

- European Pharmacopeia 2001, 3rd edition, supplement, 2.2.25, p. 9 en 10.
- Graaf de A.I.; 'Tweede afgeleide spectrofotometrie in de farmaceutische analyse', LNA mei 1990.
- Weda M.; 'Analyse van farmaceutische preparaten m.b.v. 2e-afgeleide-UV-spectrofotometrie'; Pharm. Weekblad, jaargang 131, nr. 38, 1996, p. 1078-1081.
- Swarte J.H.; 'Analyse van farmaceutische preparaten m.b.v. 2e-afgeleide-UV-spectrofotometrie (II)'; Pharm. Weekblad, jaargang 131, nr. 43, 1996, p. 1247.
- Weda M.; 'Analyse van farmaceutische preparaten m.b.v. 2e-afgeleide-UV-spectrofotometrie (III)'; Pharm. Weekblad, jaargang 131, nr. 43, 1996, p. 1248.