

Elválasztási módszerek validálása

Oktatási segédanyag műszeres analitika gyakorlathoz

Összeállította: Gáspár Attila

Szükséges előismeret:

- kapilláris elektroforézis (pl. Műszeres analitika gyakorlat részeként), *vagy*
- nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (pl. Műszeres analitika gyakorlat részeként), *vagy*
- gázkromatográfia (pl. Műszeres analitika gyakorlat részeként)

Ezen a gyakorlaton az elválasztástechnikai módszerek validálási elveit tanulmányozzuk. Bár elsősorban a kapilláris elektroforézis (CE) módszerek validálásáról lesz szó, de mivel az itt szereplő fogalmak, módszerek, matematikai eljárások általánosan használtak más elválasztási módszerek esetén is, a különböző, modern kromatográfias módszerek (HPLC, SFC, GC stb.) validálása is hasonlóképpen történik.

Elválasztási módszerek validálása

Mint minden analitikai módszernél, így a kapilláris elektroforézisnél (CE) is a megfelelő minőségi és mennyiségi elemzésekhez el kell végezni az adott mérési módszer validálását. Egy módszer validálása az a tevékenység, amely rendszerezett vizsgálatok segítségével bizonyítja, hogy a módszer teljesítményjellemzői kielégítik az analitikai módszerrel szemben támasztott követelményeket. A validálási eljárás a módszer olyan teljesítőképességi adatainak meghatározását jelenti, mint a pontosság (precision), helyesség (accuracy), linearitás, kimutási határ vagy a szelektivitás. Rutinszerűen végzett elemzések esetén további adatokra van szükség a sorozatmérések naponkénti reprodukálhatóságáról (reproducibility), a zavartűréséről (ruggedness) és a minták stabilitásáról. Egy módszer validálásához hozzátartozik az elválasztott komponensek válaszfaktorainak meghatározása és a csúcstisztasági vizsgálatok elvégzése is.

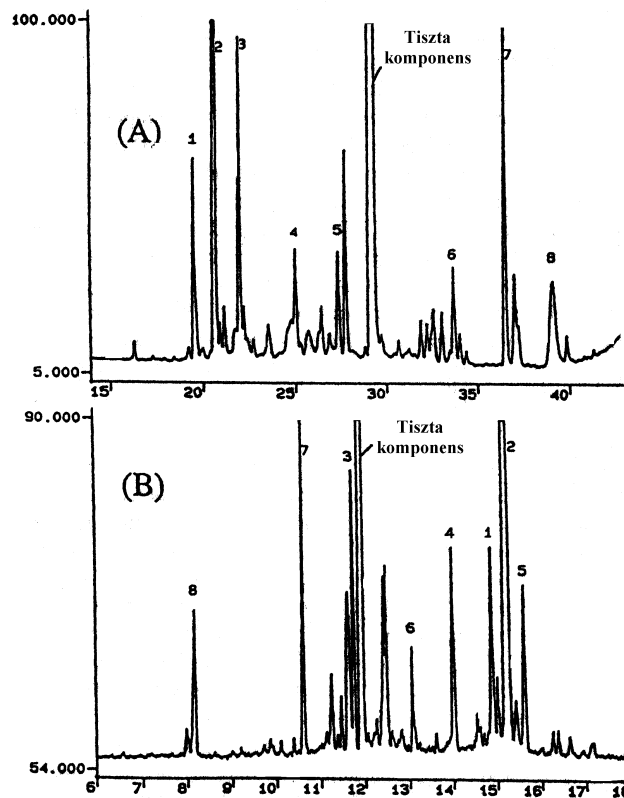
1. A validálás szempontjai (a mérési módszerek teljesítményjellemzői)

1.1. Szelektivitás

A szelektivitással azt adjuk meg, hogy az adott elválasztási módszer képes-e az összes lehetséges meghatározandó komponens elválasztására/felbontására zavaró alkotók jelenlétében. Azt a módszert, amely a meghatározandó komponens vagy komponensek egy csoportjára tökéletesen szelektív, *specifikusnak* nevezzük. A szelektivitás megadásának bonyolultsága nagyban függ a vizsgálat típusától. Ha például a módszert gyógyszerkomponensek szennyezőinek mennyiségi meghatározására akarjuk használni, akkor a megfelelő szelektivitás bemutatása egy meglehetősen terjedelmes tanulmánynak ígérkezik. Ilyenkor szükséges lenne az összes lehetséges szennyezőanyag egymástól, illetve a főkomponensektől való felbontásának megadása. E meghatározásoknál a vizsgálandó oldat a főkomponenst a várható koncentrációban, a jelenlevő szennyezőket pedig a lehetséges koncentráció-tartományokban tartalmazza. Ha például egy mintaoldat az adott főkomponenst (pl. gyógyszerhatóanyagot) 0.5 mg/mL koncentrációban tartalmazza és a szokásos szennyezési szint 0.1%, akkor a szennyező anyagból a vizsgálandó oldathoz annyit kell adni, hogy koncentrációja 0.5 µg/mL legyen. Ha az adott módszert stabilitási vizsgálatokhoz kívánják használni, akkor szándékosan elbomlasztott oldatokat kell vizsgálni. Ilyenkor az oldatokat savval, lúggal kezelik, magas hőmérsékletnek teszik ki vagy erős fény mellett tárolják. Ha a módszert például egy gyógyszervegyület tisztaságának megállapítására akarják használni, akkor nagyszámú lehetséges mellék- és köztitermék vizsgálata is szükséges.

Egy gyógyszervegyületet hőnek (70°C) és erős fénynek tettek ki néhány napig, majd az oldatokat nagyteljesítőképességű kromatográfias (HPLC) és CE módszerekkel elemezték, hogy megvizsgálhassák a módszerek szelektivitását. Az 1. ábrán e minták HPLC és CE módszerekkel történt elemzéseinek eredményét láthatjuk. Az egyes szennyezőanyagok csúcsainak eltérő sorrendisége világosan

jelzi a két módszerrel kapott eltérő szelektivitást. A szelektivitás megállapítása még nehezebb királis anyagok elválasztása során, amikor a fő komponens el kell választani a szennyező (másik) enantiomertől csakúgy, mint az összes többi lehetséges szennyezőtől.



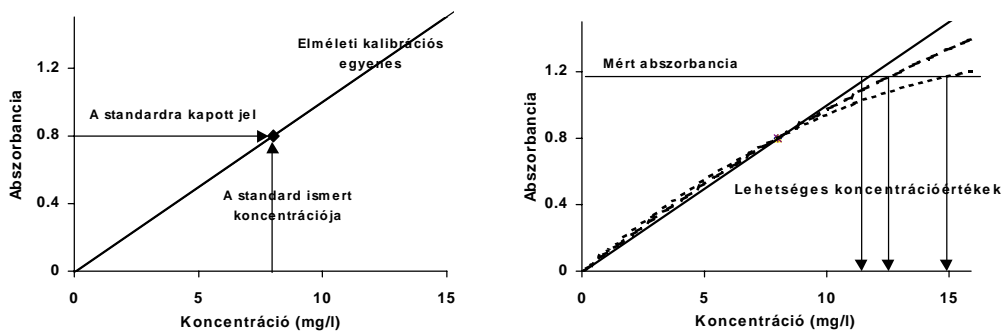
1. ábra

Egy elbomlasztott gyógyszervegyület oldatának elemzése A, HPLC és B, CE módszerekkel [1]. (Körülmények: A: C18 kolonna, metanolos gradiens elúció, pH= t foszfát pufferrel beállítva, 1 ml/min, 287 nm; B: bórsav-tricin-EDTA pufferelektrolit (pH=8.05), 33% acetonitril, 280 nm, 30 kV.

1.2 Linearitás

A kalibráló görbe linearitásán azt értjük, hogy a görbe adott tartományában, az ún. lineáris tartományban, adott megbízhatósággal egyenesnek tekinthető. A linearitást a méréstartományt lefedő koncentrációjú minták elemzésével határozzuk meg. Az eredményekből a legkisebb négyzetek módszerével kiszámítjuk a regressziós egyenest a komponens koncentrációja függvényében. Előnyös, ha a módszer az alkalmazni kívánt tartományban lineáris, de ez nem feltétlenül követelmény. A linearitás megállapítása az olyan mennyiségi meghatározásokhoz alapvető

fontosságú, ahol elvárt, hogy a detektor által szolgáltatott jel egyenesen arányos legyen a vizsgálandó oldat koncentrációjával. A CE és a HPLC elemzéseknél általában UV detektást alkalmaznak. A kalibrációs eljáráshoz elméletileg egyetlen ismert koncentrációjú standard mérése elegendő lenne, és a kapott abszorbanciát a koncentrációval osztva az egyenes meredekségét is megkaphatnánk, hiszen a Lambert-Beer törvény szerint a koncentráció és az abszorbancia között lineáris kapcsolat van. A valóságban azonban számos, a készülékhez vagy a mintához kapcsolódó paraméter e törvénytől való eltérést eredményez. A 2. ábrán egytagú kalibrációs görbe megrajzolásából származó, lehetséges hibákat mutatjuk be.



2. ábra

Kalibrációs görbe megrajzolásából származó hibák

Kalibrációs görbe készítéséhez legalább 3 standardot kell használni. Ideális esetben a standardokra kapott értékek egy egyenesre esnek, a gyakorlatban azonban ezek az értékek egy kicsit mindig szórnak.

A CE-nél a lineáris tartományt előnyösebb a csúcsterületek, és nem pedig a csúcsmagasság alapján számítani, mivel nagy koncentrációknál elkerülhetetlenül kiszélesednek a csúcsok. Egy gyógyászati termék főkomponens-vizsgálatához a linearitást (leggyakrabban 5 standard segítségével) a várt mintakonzentráció 50-150 %-os tartományára szokták meghatározni. Ez a tartomány általában lefedi a gyártási folyamatból kikerülő termékek lehetséges koncentrációit. Ha a módszer célja a szennyezők meghatározása, akkor a linearitást a várt koncentráció tartományban kell megadni.

1.3 Érzékenység

Az analitikai érzékenység (S) fogalmát a kalibráló görbe/egyenes meredekségével (azaz az analitikai válaszjelnek a koncentráció szerinti deriváltjaként, vagy az egységnyi koncentrációváltozásra ($c_2 - c_1$) eső jelváltozásként ($x_2 - x_1$)) definiálhatjuk:

$$S = \frac{x_2 - x_1}{c_2 - c_1}$$

(Meg kell jegyeznünk, hogy az érzékenység kifejezést (általánoságban) gyakran használjuk annak kifejezésére is, hogy egy módszerrel mennyire kis koncentrációkat/anyagmennyiséget tudunk meghatározni. Ebben az értelemben azonban az érzékenység inkább a kimutatási/meghatározási határral van kapcsolatban.)

1.4 Kimutatási határ és meghatározási határ

Ezek a paraméterek ugyanúgy fontosak a kis koncentrációjú minták elemzéséhez, mint a különböző szennyezők meghatározásához. Míg a kimutatási határt (LOD, limit of detection) az alapvonalzaj háromszorosának megfelelő magasságú jelet adó koncentrációként vagy a standard deviáció háromszorosaként definiálják, addig a meghatározási határ (LOQ, limit of quantification) azt a legkisebb koncentrációt jelenti, mely még megfelelő precizitással és helyességgel meghatározható. A meghatározási határ kiszámításához a precizitás és a helyesség elfogadható szintjét is kell megadni, melyek értéke az elemzés céljától függ. A precizitásnak többnyire 10 % RSD alatt kell lennie. A LOQ-t sokszor a standard deviáció tízszeresének veszik. Ezek alapján a kimutatási, illetve meghatározási határok:

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot s}{S} \text{ vagy } \text{LOQ} = \frac{10 \cdot s}{S}$$

ahol,

s az alapvonal (vakoldatok) szórása vagy standard deviációja (lásd később)

S az analitikai érzékenység

A LOD/LOQ érték függ az adott részecske UV-fény elnyelő sajátságától, az optikai úthosszától (ami CE-nél a kapilláris belső átmérőjének vehető) és az injektált minta mennyiségétől.

1.5 Helyességi/visszanyerési vizsgálat

Ez a vizsgálat azért szükséges, hogy megmutassuk, az adott módszer a vizsgált minta összes komponensének pontos mennyiségi meghatározását lehetővé teszi. Egy módszer annál helyesebb, minél kisebb a várható érték és a valódi érték különbsége. Ha a mintában oldékonysági problémák lépnek föl, vagy ha egyes részecskék a minta mátrixanyagával reakcióba/kölcsönhatásba lépnek, akkor a visszanyerés alacsony mértékű, a kapott eredmények nem pontosak. A visszanyerési vizsgálatok során az anyag (főkomponens vagy szennyező) ismert mennyiségét adjuk a vizsgálandó mintához, majd az adott módszerrel meghatározzuk a hozzáadott anyag koncentrációját. A hozzáadott anyag így meghatározott koncentrációját összehasonlítjuk az ismert valódi koncentrációval (a visszanyerési vizsgálat eredményét százalékos alakban adjuk meg). A számításoknál természetesen figyelembe kell venni, hogy a hozzáadott anyagból már eleve tartalmazhat valamennyit a meghatározandó minta. Ha például 0.1 mg szennyező anyagot adunk egy olyan oldat 100 mL térfogatához, mely 10 mg

főkomponenst tartalmaz 0.1%-nyi szennyezés mellett, és a mérés után a szennyezés mértékét 1.1%-nak találjuk, akkor a visszanyerés megfelelő. Az 1. táblázat két gyógyszervegyület vérplazmában történő visszanyerési kísérleteinek eredményeit foglalja össze.

1. táblázat
Desactyldiltiazem és diltiazem visszanyerési adatai vérszérumban [2]

<i>Desactyldiltiazem</i>				
Hozzáadott mennyiség (ng/ml)	5	10	50	250
CE eredmény (ng/ml)	4.87	10.1	50.7	252.9
<i>Diltiazem</i>				
Hozzáadott mennyiség (ng/ml)	5	10	50	250
CE eredmény (ng/ml)	4.77	10.4	47.2	250.8

A helyességet egy (standard) elfogadott módszer vagy több eljárás eredményeivel történő összehasonlítás és/vagy laboratóriumok közötti körvizsgálat segítségével is meghatározhatjuk.

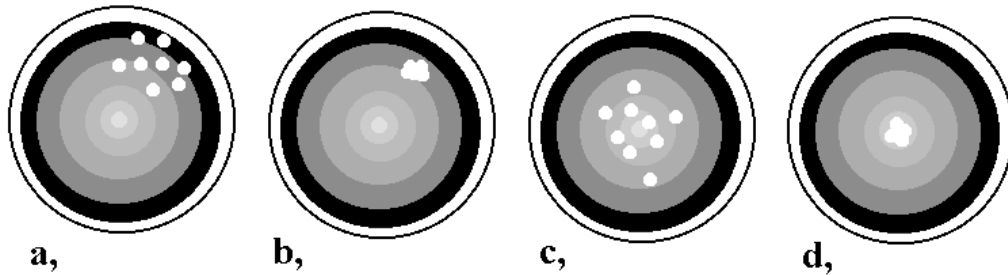
1.6 Precizitás

Ugyanazon mintaoldat injektálásának és elemzésének többszöri megismétlésével lehet igazolni, hogy a CE készülék megfelelően, precízen működik. Ha a hőmérséklet és a feszültség szabályozása megfelelően történik, akkor azonos migrációs időket kell kapnunk. Ha az injektáló egység megfelelően működik, akkor a csúcsterületek nagysága csak kis mértékben ingadozhat, melynek mértéke nagyban függ az elemzés jellegétől. Kis koncentrációk elemzésekor a csúcsterületek szórása 5-20% RSD, míg a főkomponensek elemzésekor 0.5-2% RSD körül szokott lenni. A megfelelő precizitás (kis szórás) elérése érdekében alkalmazhatunk belső standardot, vagy használjunk nagyobb mintakonzentrációt. E vizsgálatokhoz az injektálásokat többnyire 6-10-szer ismétlik meg.

Egy módszer hosszú időtartamú teljesítőképességét is meg kell vizsgálni, ha a módszert nagyszámú minta nagyon sokszor történő elemzésére kívánjuk használni. A desacteyldiltiazem és a diltiazem vérszérumban való elemzését 600-szor ismételték meg 3 hónap leforgása alatt. A hosszú időtartamú elemzések során meghatározási hibák származhatnak a minta párolgása, illetve a minta és/vagy a puffer összetételének megváltozása következtében. A mintaoldat párolgásától származó hiba leginkább belső standard használatával minimalizálható. A puffer összetételének (pH-jának) állandóságát úgy biztosíthatjuk, ha nagy koncentrációjú puffereket használunk, vagy bizonyos időközönként friss pufferoldatokat használunk (a pufferek cseréjét sok CE készülék automatikusan elvégzi).

A helyesség és a pontosság fogalmak közötti különbségek jobb megértését segítik elő a 3. ábrán bemutatott céllövészeti eredmények. Az a, esetben a lövések nem

helyesek és ráadásul még szórnak is. A b, esetben a lövések ugyan nem szórnak, de nem helyesek: a lövész jól lő, de a lövések következetesen, egy bizonyos irányba eltérnek. c, esetben a lövések helyesek, de szórnak: a lövések átlaga ugyan éppen a cél közepében van, az egyes lövések azonban jelentősen szórnak. d, esetben a lövések egyaránt helyesek és nem szórnak (precízek).



3. ábra

Példák a helyesség (accuracy) és a precizitás (precision) értelmezéséhez

1.7 A módszer reprodukálhatósága

A módszer reprodukálhatóságával azt tudjuk szemléltetni, hogy az adott módszer sikeresen alkalmazható különböző alkalmakkor és különböző körülmények között. Az elemzéseket különböző szakemberekkel különböző készülékeken eltérő kapillárisokkal és más-más laboratóriumokban végeztetik el. A puffer-, minta- és standardoldatokat különböző személyekkel készítetik el. Ezen vizsgálatok elsődleges célja annak demonstrálása, hogy a módszer átvihető a laboratóriumok és a meghatározást végző személyek között és hogy a módszer sikeres alkalmazása nem kíván speciális körülményeket (szakembert, készüléket stb.).

Egy kálium meghatározására szolgáló módszer validálásakor 10 kalibráló oldatsort készítettek el és elemeztek (injektáltak) kétszer egymás után. A kiszámolt válaszfaktorok szórása 0.8% RSD-nak adódott. Ezután 10 mintaoldatot készítettek és elemeztek, ekkor az eredmények szórása 0.65% RSD volt. Az eredményeket a 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat
A mintaelőkészítés precizitása [3]

A minta sorszáma	m%/% K		Átlag
	1. injektálás	2. injektálás	
1.	5.69	5.71	5.70
2.	5.74	5.73	5.74
3.	5.80	5.78	5.79
4.	5.73	5.73	5.73
5.	5.72	5.72	5.72
6.	5.66	5.67	5.67
7.	5.74	5.75	5.75
8.	5.71	5.79	5.75
9.	5.70	5.72	5.71
10.	5.77	5.76	5.77
Átlag			5.73 (0.65% RSD)

1.8 A módszer zavartűrése

Ez a vizsgálat annak igazolására irányul, hogy az adott módszer hogy viseli a kisebb változásokat a működés körülményeiben. A zavartűrési vizsgálat így a módszer használatának validált rugalmasságát jelenti. Ha különböző laboratóriumok ugyanazt a módszert alkalmazzák, akkor elkerülhetetlenül jelentkeznek olyan apró eltérések, amelyeknek esetleg számottevő hatásuk lehet a módszer teljesítményére. A zavartűrési vizsgálat eredményeiből az egyes működési paraméterekre küszöbértékek állapíthatók meg. A módszer zavartűrésének tanulmányozásakor az előzetesen optimált és megadott működési paramétereken való kis mértékű, szándékos változtatásoknak az elválasztásra gyakorolt hatását vizsgáljuk. Például, ha két anyag jól elválasztható pH=7.1 és 55 mM foszfátpuffer alkalmazásakor, vajon elválnak-e a csúcsok 60 mM-os 6.9-es pH-jú puffer alkalmazásakor is? A zavartűrési jellemzők hiányában, a módszertől való legkisebb eltérés esetén is tudományos igényességgel kell igazolni a módszer alkalmazásának helyességét. Ha például egy zavartűrési vizsgálat azt mutatja, hogy a puffer 45-55 mM koncentráció-tartományban való használatakor a módszer sikeresen alkalmazható, akkor a meghatározást végző személynek nem szükséges hosszú időt eltöltenie a puffer pontos bemérésével annak oldatának készítésekor.

A zavartűrési vizsgálatokat hagyományosan úgy végzik, hogy az egyes működési paramétereket külön-külön, előre meghatározott tartományokon belül értékelik ki. Egy másik megközelítésnél a zavartűrési vizsgálatokat statisztikai alapon végzik, a különböző paraméterek megváltoztatásának hatását egyidejűleg követik nyomon. Ilyenkor úgy végeznek el egy bizonyos hosszúságú sorozatelemzést, hogy az egyes működési paramétereket véletlenszerűen változtatják meg a vizsgált tartományon belül. A működési feltételek összes kombinációjára kiszámolják a módszer teljesítőképességi adatait (felbontást, érzékenységet, csúcshatékonytságot, stb.). Ezeket az adatokat statisztikusan feldolgozva, a konfidenciaintervallumokat megadva, megállapíthatók a küszöbértékek az egyes működési paraméterekre.

A zavartűrést először általában a módszerfejlesztő laboratórium vizsgálja meg, még az előtt, hogy más laboratóriumok közreműködésére sor kerülne.

1.9 Keresztvalidálás

Keresztvalidáláskor egy mérési módszerrel (pl. CE-vel) kapott precizitás és helyességi adatokat hasonlítjuk össze egy másik módszerrel (pl. HPLC) kapott adatokkal.

1.10 Oldatstabilitás

Kísérleteket szükséges végezni annak megállapítására, hogy a minta-, standard- és reagensoldatok meddig tarthatók el. Az eltarthatóság megszabja a tárolás körülményeit (pl.: eltartható 10 napig, óvjuk fénytől, tároljuk hűtőszekrényben, üvegedényben, stb.). Az eltarthatóság meghatározása alapvető fontosságú annak igazolásához, hogy a minta, a pufferelektrolit vagy a standard nem bomlik el, míg az elemzés meg nem történik.

CE-nél a pufferoldatokból felhasznált mennyiség kicsi és ezen oldatok eltarthatósága is sokszor legalább 3 hónap. Az eltarthatósági adatokat úgy kapják, hogy egy frissen készített pufferoldatot adott hosszúságú ideig tárolnak az előírt tárolási körülmények mellett, majd egy mintaoldatot a tárolt és egy frissen készített puffer segítségével elemeznek meg. Ha nincs lényeges eltérés a kapott eredmények között, akkor a régi puffer még használható. Hasonlóképpen kell eljárni a minta- és a kalibráló oldatok esetén is. A 4. ábrán bemutatott elektroferogramok cefuroxim antibiotikum oldatbeli stabilitását szemléltetik.

2. Válaszfaktorok

Egy minta minden egyes mennyiségileg meghatározandó komponenséhez válaszfaktort (R_f) kell megállapítani, mellyel az adott komponens pontosan meghatározható. (Az egyes komponensek eltérő UV-elnyelő sajátságai miatt a csúcsterület-százalékos összetétel nem ad pontos képet az minta összetételéről.)

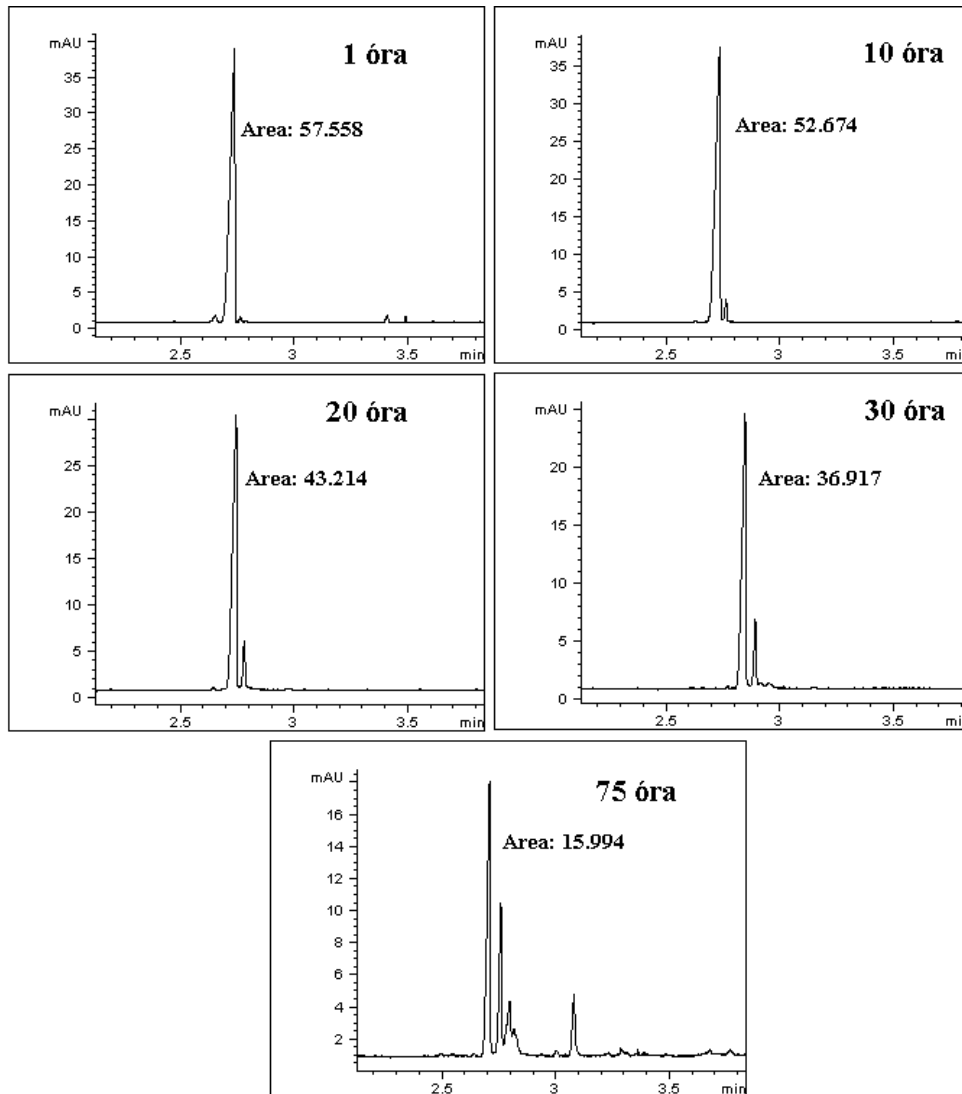
$$R_{f_i} = \frac{c_i}{A_i}$$

ahol

c_i az i -edik komponens koncentrációja

A_i az i -edik komponens jelterülete

CE-nél az adatkezelés eltér a HPLC-nél szokásostól, mivel CE-nél az elváló csúcsok különböző sebességekkel haladnak keresztül a detektorablakon. Emiatt csak úgy tudjuk összehasonlítani az elemzés során elválasztott csúcsokat, ha azok területét elosztjuk a megfelelő migrációs idővel.



4. ábra

Cefuroxim antibiotikum oldatbeli stabilitásának vizsgálata CE módszerrel (puffer: 20 mM foszfát, pH:9.2, 25 kV, 270 nm)

Általában, ha egy szennyezőre kapott válaszfaktor (Rf) 80-120%-a a főkomponens válaszfaktorának, akkor a válaszfaktorok egyenlőnek vehetők, és a főkomponens válaszfaktora használható a szennyező anyag mennyiségének kiszámításához. A válaszfaktorok nagyobb eltérése esetén a szennyezőkhöz is külön válaszfaktort kell használni.

A HPLC-vel nyert válaszfaktorok nem vihetők át közvetlenül a CE-vel kapott csúcsokra és viszont, mivel a részecskék ionos formája eltérhet a két módszer esetén, már pedig a töltés kis változása is jelentősen megváltoztathatja a részecske UV elnyelését, és ezzel együtt a válaszfaktort.

3. Csúcstisztasági vizsgálat

Az elektroforetikus elemzéseknél (mint ahogy más elválasztási módszereknél is) az egyik legfontosabb kérdés mindig az, hogy vajon a kapott csúcs egy vagy több komponensnek felel-e meg. A minőségi elemzéseknél a rejtett szennyeződések meghamisítják az eredményt, illetve ha egy csúcsban egy komponens rejtve marad, akkor lényeges információk vesznek el.

A csúcstisztasági vizsgálatoknál tehát azt kell megállapítanunk, hogy az adott csúcs tiszta-e, vagy esetleg szennyeződést tartalmaz. Ennek megállapítása a csúcs elúciója során kapott spektrumok összehasonlítása alapján történik. Általában csúcsonként 3 spektrumot használnak a tisztaság megállapításához. Két spektrumot a csúcs két inflexiós pontjánál, egy spektrumot a csúcs tetőpontján (maximumán) szoktak felvenni. (Ha azonban szükség van rá, akkor a tisztaságvizsgálat több pontban is, akár a csúcs összes pontjában felvett spektrum alapján is történhet.)

Ha ez a három spektrum nem egyforma, akkor a csúcs spektrális szennyeződést tartalmaz, melyet egy vagy több komponens okoz, vagy esetleg háttérabszorpció eredménye. Meg kell még jegyeznünk, hogy ha a spektrumok megegyeznek, attól a csúcsok még tartalmazhatnak szennyeződést. Ez leginkább akkor fordulhat elő, ha a szennyező komponens fényelnyelése kicsi a főkomponens elnyeléséhez képest, vagy a szennyezők és a főkomponens spektrumai közel azonosak. A háttérabszorpció a pufferrendszer megváltoztatásával csökkenthető.

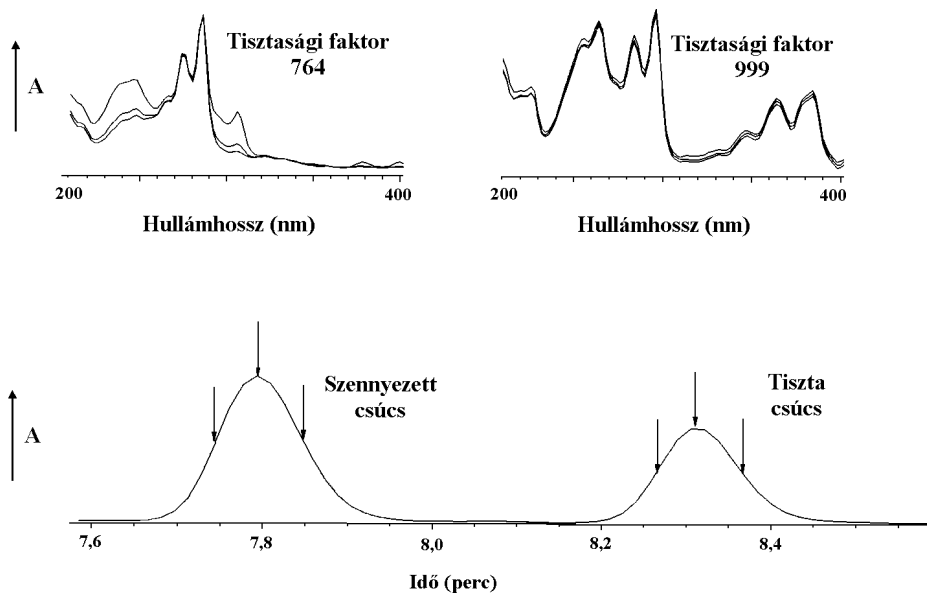
A csúcstisztasági diagram a három spektrumot normalizált és egymással fedésbe hozott formában tartalmazza. A tisztasági faktor a spektrumalakzatok hasonlóságának mértéke. A csúcstisztaság megállapítása a spektrumok vizuális összehasonlítása alapján meglehetősen hosszadalmas eljárás lenne, ráadásul automatizált üzemmódnál nem alkalmazható. A spektrumok automatizált összehasonlítása különféle statisztikai módszerekkel történhet. A legtöbb elektroferogram kiértékelő programnál egyetlen parancs kiadásával matematikai módszerekkel történik két spektrum összehasonlítása, a program kiszámolja a spektrumok hasonlósági fokát, azaz a tisztasági faktort is, amely a következőképpen adható meg:

$$\text{tisztaságifaktor} = \frac{10^3 \cdot \left[\sum x \cdot y - \left(\frac{\sum x \cdot \sum y}{n} \right) \right]^2}{\left[\sum x^2 - \left(\frac{\sum x \cdot \sum x}{n} \right) \right] \cdot \left[\sum y^2 - \left(\frac{\sum y \cdot \sum y}{n} \right) \right]}$$

Az x és y a két spektrumon az azonos hullámhosszon mért abszorbancia értékek, n az adatpontok száma. A 0 tisztasági faktor azt jelzi, hogy egyáltalán nincs hasonlóság a két spektrum között, míg az 1000-es érték a teljes azonosságról árulkodik. Általában ha a tisztasági faktor 990-nél nagyobb, akkor szinte bizonyosra vehetjük a csúcs szennyeződéstől való mentességét, míg 900 és 990 közötti értékek esetén az eredményeket óvatosan kell kezelni. A 900 alatti értékek a spektrumok egyértelmű különbözőségét jelzik.

A csúcstisztasági vizsgálatok csak alapvonal-alapvonal (BB) csúcsokra végezhetőek el. Ha a csúcsok nem az alapvonalról indulnak, akkor a csúcstisztaság megállapítása komplikáltabb, mert mindegyik csúcs a szomszédját is tartalmazza kis mértékű szennyeződésként. Egy csúcs tisztaságának megítéléséhez többfajta módszert is használhatunk, melyek közül a két leggyakoribb

- a spektrumok normalizálása,
- két vagy több hullámhosszon kapott abszorbancia értékek arányának ábrázolása az idő függvényében.



5. ábra

A csúcsok tisztaságának ellenőrzése egymásra vetített spektrumok segítségével

Kiegészítés a mérési eredmények eloszlásának statisztikai jellemzéséhez

A valódi érték és a mérési eredmény közötti kapcsolat megvilágítására vezették be a mérési hiba fogalmát. Az analitikai kémiai mérések során fellépő mérési hiba kétféle - az ún. módszeres (szisztematikus) és az ún. véletlen - hiba összegeződéseként adódik. A *véletlen hibák* a mérések korlátozott pontosságából erednek. A véletlen hiba mértéke a mérések többszöri ismétlésével csökkenhet. A *módszeres hiba* a mérési hiba egy állandó arányú része (állandó hiba). Ez a hiba nem csökkenthető a mérések többszöri ismétlésével. A módszeres hiba megállapításához standardokat kell elemezni, így módon a későbbi elemzések korrigálhatók.

Tegyük fel, hogy egy mérési sor eredményeit (pl. párhuzamos spektrofotometriás méréseket, lásd 3. táblázat) csak véletlen hiba terhel, és ábrázoljuk a mérési adatoknak 12 előre meghatározott intervallumra eső gyakoriságát (lásd 4. táblázat). A párhuzamos mérési eredmények grafikus eloszlási diagramjának megrajzolásával információt nyerhetünk a mérési eredmények eloszlásáról (lásd 6. ábra).

3. táblázat

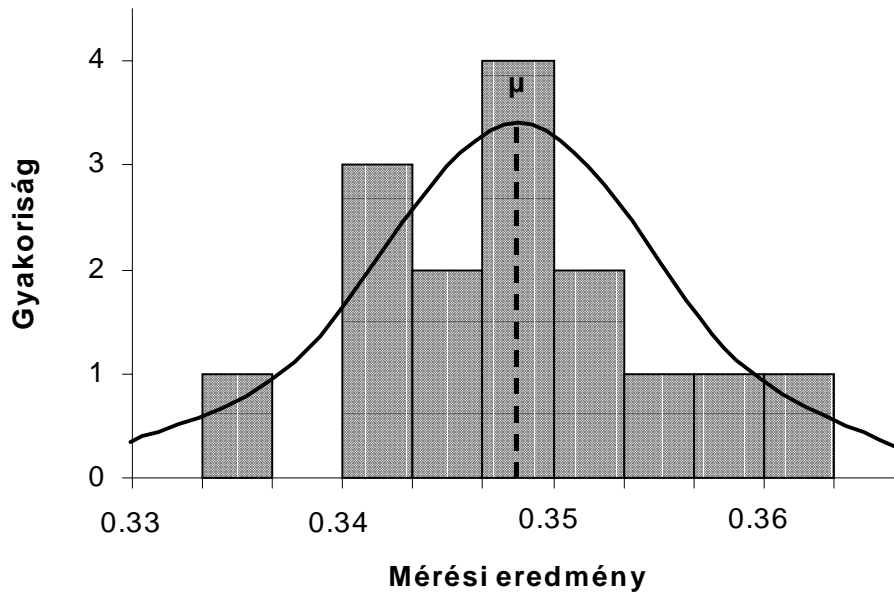
Egy mintaoldat 15 ismétléssel kapott eredményei (abszorbancia értékek) spektrofotometriás meghatározás során

Mérés	Érték	Mérés	Érték
1.	0,3410	9.	0,3430
2.	0,3350	10.	0,3420
3.	0,3470	11.	0,3560
4.	0,3590	12.	0,3500
5.	0,3530	13.	0,3630
6.	0,3460	14.	0,3530
7.	0,3470	15.	0,3480
8.	0,3460		

4. táblázat

Mérési eredmények eloszlási gyakorisága (mérési adatokat lásd a 3. táblázatban)

Tartomány	Gyakoriság	Relatív gyakoriság (%)
0,3300-0,3333	0	0
0,3333-0,3367	1	6,67
0,3367-0,3400	0	0
0,3400-0,3433	3	20,00
0,3433-0,3467	2	13,33
0,3467-0,3500	4	26,67
0,3500-0,3533	2	13,33
0,3533-0,3567	1	6,67
0,3567-0,3600	1	6,67
0,3600-0,3633	1	6,67
0,3633-0,3667	0	0
0,3667-0,3700	0	0



6. ábra

A 3. táblázatban szereplő mérési adatok eloszlási diagramja és az elméleti Gauss-féle eloszlást reprezentáló görbe

Ha a mérések számát a végtelenségig növeljük, az intervallumok nagyságát pedig ezzel párhuzamosan csökkentjük, akkor egy harang alakú eloszlási görbét kapunk, amelyet Gauss- vagy normális eloszlású görbének neveznek. A Gauss-féle eloszlás matematikailag a következőképpen fejezhető ki:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

ahol

$f(x)$ a normális eloszlás eloszlásfüggvénye

σ a mérések standard deviációja

μ a mérések átlaga

x az adott mérési eredmény (változó)

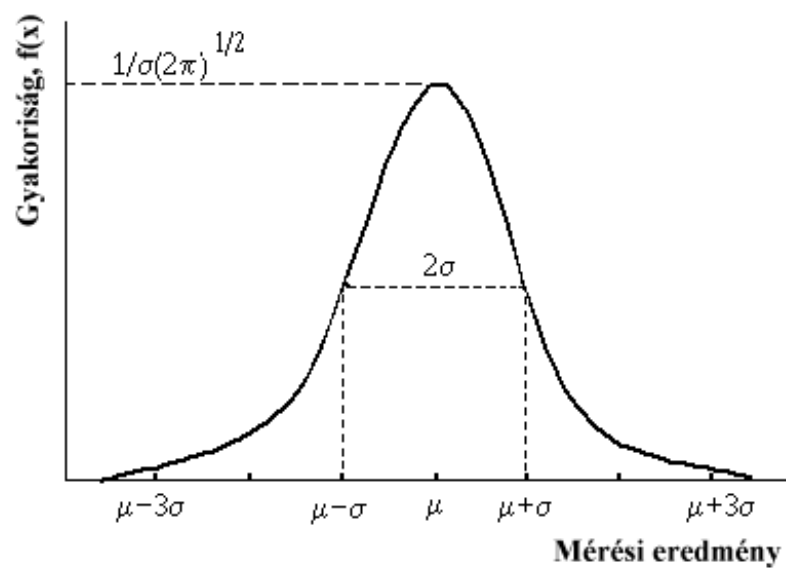
A mérési adatok szóródását az átlag érték körül a standard deviáció (σ) és annak négyzete a variancia (σ^2) írja le (7. ábra). Mivel azonban a valóságban csak véges számú méréseket tudunk elvégezni, az átlagot és a standard deviációt meg kell becsülnünk. A becsült paramétereket tartalmazó Gauss-féle eloszlás így módon a következőképpen alakul:

$$f(x) = \frac{1}{s\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\bar{x})^2}{2s^2}}$$

ahol

s a standard deviáció becült (legvalószínűbb) értéke

\bar{x} az átlag becült (legvalószínűbb) értéke



7. ábra

A Gauss-féle eloszlás valószínűségi sűrűségfüggvénye (μ : az átlag, σ : a standard deviáció)

A mérés legvalószínűbb értékéül az n mérési adat \bar{x} számtani közepét fogadjuk el:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

A standard deviáció becsléséhez pedig az alábbi egyenletet használhatjuk:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

A standard deviáció mellett a mérési pontok szórásának jellemzésére gyakran használják a relatív standard deviációt (s_r):

$$s_r (\%) = \frac{s}{\bar{x}} 100$$

A standard hibán az n mérés átlagának átlagos hibáját értjük:

$$s_x = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Az analitikus célja a valódi érték minél jobb becslése. Azt már megállapítottuk, hogy ha nem lép fel módszeres hiba, akkor a mintaátlaggal becsüljük a valódi értéket. Azt is tudjuk már, hogyha normális eloszlásúnak tekinthető a mérési eredményünk, akkor a mintaátlaggal történő becslés "jó" becslés lesz. Kihasználva azonban azt a feltételezést, hogy az eredmény eloszlása normális, ennél többet is tehetünk, meg tudunk adni egy intervallumot (megbízhatósági- vagy konfidenciaintervallumot) az átlag érték körül, amelyben adott valószínűséggel ($1-\alpha$) ott lesz a keresett valódi érték. A konfidenciaintervallum kiszámításához a Student-eloszlás t -értéke a mérések száma ($n-1$) és a valószínűségi szint ($1-\alpha$) alapján meghatározható, vagy táblázatokból kikereshető. Az átlagra vonatkozó konfidencia-intervallum:

$$\Delta x = \frac{t_{(1-\alpha; n-1)} \cdot s}{\sqrt{n}}$$

Vagyis, ha a mérési eredményekről feltételezhető, hogy normális eloszlású, továbbá, hogy nem terheli módszeres hiba, akkor statisztikai szempontból a párhuzamos mérések eredményeként egy

$$\bar{x} \pm \Delta x$$

intervallumot kell megadni, és azt állíthatjuk, hogy $1-\alpha$ valószínűséggel ezen intervallumban helyezkedik el a keresett valódi érték (az intervallum megadásakor fel kell tüntetni α és n értékét is).

Hivatkozott és felhasznált irodalom:

- [1] J.Bullock: Capillary Electrophoresis purity method for the novel metal chelator TMT-NCS, J.Pharm.Biomed.Anal. 14 (1996) 845-854.
- [2] C.Coors, H.G.Schulz, F.Stache: Development and validation of bioanalytical method for the quantitation of diltiazem and desacetyldiltiazem in plasma by capillary zone electrophoresis, J.Chromatogr. A, 717 (1995) 235-243.
- [3] K.D.Altria, T.Wood, R.Kitscha, R.A.McIntosh: Validation of a capillary electrophoresis method for the determination of potassium counter-ion levels in an acidic drug salt, J.Pharm.Biomed.Analysis, 13 (1995) 33-38.
- [4] K.D.Altria: Analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis, Vieweg, Wiesbaden, 1998.
- [5] O.Matthias: Statistics and computer application in analytical chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, 1999
- [1] Dombi A. és tsai.: Javaslat az analitikai kémiában használatos minőségbiztosítási fogalmak nevezéktanához, Magy. Kém. Folyóirat, 1995, 5, 213-215

Feladatok

1. feladat

Rajzolja meg a kalibrációs diagramokat a táblázatban szereplő adatok (mind a csúcsterület, mind a csúcsmagasság értékek) alapján.

Önállóan vagy a gyakorlatvezető segítségével MS Excel programmal is ábrázolja a kalibrációs pontokat, illesszenek a pontokra egyenest/görbét, adja meg a korrelációs együttható értékét és az egyenes/görbe egyenletét. A megfelelő diagram és egyenlet alapján számolja ki az A, B és C jelű minta koncentrációját ($t_A=28.956$; $t_B=53,485$; $t_C=86,667$).

Koncentráció (mg/L)	2	5	10	25	50
Csúcsterület	5,870	14,237	41,716	102,756	193,107
Csúcsmagasság	64,698	136,053	367,266	811,463	1403,31

2. feladat

Az előző méréshez kapcsolódóan megadjuk vakoldat 15 párhuzamos mérésével kapott csúcsterületértékeket. Számolja ki a mérések átlagát, a standard deviációt, az analitikai érzékenységet, a kimutatási határt és a meghatározási határt.

Mérési adatok (csúcsterület)		
0.643	0.658	0.659
0.698	0.640	0.664
0.643	0.646	0.646
0.671	0.676	0.631
0.685	0.685	0.673

3. feladat

Adja meg az 1. táblázatában szereplő vizsgálat helyességi/visszanyerési eredményeit (százalékos értékekben).

4. feladat

Egy minta kromatográfiás elemzéséhez 15 ismételt mérést végeztek, az adott komponensre kapott abszorbancia értékeket a 3. táblázat tartalmazza. Adja meg a mérések átlagát, szórását (standard deviációt), szórásnégyzetet (varianciát), a relatív standard deviációt, a standard hibát és a konfidencia-intervallumot (a Student-féle eloszlás t értéke 95%-os valószínűség ($\alpha=0.05$) és 14 szabadsági fok ($f=n-1$) esetén 2.145).

5. feladat

Egy minta 9 ismételt elemzésekor kapott elektroferogramját mutatjuk be a 7. ábrán. Az ábráról leolvashatók egyik komponens (ceftriaxon) migrációs idői és csúcsterületei. Adja meg a komponens migrációs idejének és csúcsterületének relatív standard deviációját.

6. feladat

3 különböző cefalosporin antibiotikum (migrációs idejük sorrendjében: ceftazidim, cefotaxim és cefuroxim) CE elválasztásához a puffer optimális foszfátkoncentrációját 40 mM-nak találtuk. A 8. ábrán bemutatott elektroferogramok alapján vizsgálja meg, milyen hatással van a puffer koncentrációjának nagysága a kapott csúcsok nagyságára (csúcsterületére) és a komponensek migrációs idejére. A százalékos eltéréseket ábrázolja grafikusán is egy komponens esetén.

7. feladat

A 4. ábrán bemutatott elektroferogramok alapján szemléltesse grafikusán a vizsgált komponens stabilitását (ábrázolja a főkomponensre kapott csúcsterületeket az oldatkészítéstől eltelt idő függvényében.) A komponens hány százaléka bomlott el 2 nap elteltével?

8. feladat

Számolja ki három antibiotikum (ceftazidim, cefotaxim és cefuroxim) válaszfaktorát optimált körülmények között végzett elemzésekre (40 mM foszfát puffer). Használja a 8. ábrán megtalálható adatokat!

9. feladat

Értelmezze egy csúcstisztasági vizsgálatnak a 9. ábrán bemutatott diagramjait és eredményeit.