

OVĚŘOVÁNÍ ANALYTICKÉ VÝKONNOSTI UV-VIS SPEKTROMETRU THERMO SCIENTIFIC EVOLUTION 300/600

JANDERKA P.

Pragolab s. r. o., Brno, janderka@pragolab.cz

V CHEMAGAZÍNU 5/XIX (2009) jsme se věnovali skupině UV-VIS spektrometrů profilovaných speciálně pro biochemické a biotechnologické kontrolní, klinické i výzkumné laboratoře. UV-VIS spektrometrie nesporně patří k nejvzrálější a nejrozšířenější instrumentální a diagnostickým analytickým metodám. Zcela nesporně za to může i skutečnost, že energie řady významných změn elektronových energetických stavů atomů, iontů a molekul spadá do „okénka“ energií dostupných lidskému zraku, tj. – (s použitím jednoduché relace mezi energií a vlnovou délkou „ $E = h \cdot c / \lambda$ “) do oblasti vlnových délek cca 400–800 nm. Pomineme-li „příbuzné“ optické a spektroskopické metody (jako například AAS, optickou emisní ICP, refraktometrii, polarimetrii, cirkulární dichroismus, optickou rotační disperzi, elipsometrii aj.), kolorimetr, fotometr či spektrofotometr nesporně patří k nejzákladnější analytické instrumentaci téměř každé průmyslové, kontrolní, výzkumné, výukové nebo klinické laboratoře.

Formou vložené přílohy jsme již dříve nabídli jednoduchý přehled současné nabídky UV-VIS spektrometrů (spolu s fluorespektrometrem Quantech) od firmy Thermo Fisher Scientific. Ta navazuje na svou bohatou tradici za více než 60 let a více než 650 000 prodaných jednotek zahrnujících takové značky jako AMINCO DW-2000 a Spectronic™ 20 a rodiny spektrometrů Helios, Genesys a Evolution.

Pomineme-li finanční souvislosti investice a často i zvykové aspekty lokálních operátorů a rozhodujících osob, výběr UV-VIS spektrometru se – stejně jako i v případě jiných přístrojů – řídí primárně aplikacemi. Na druhé straně je často opomíjena ta stránka vlastností, které tvoří přidanou hodnotu spektrometru, jako jsou možnosti dalšího příslušenství, analytický výkon, možnost nebo nutnost spolupráce s PC (integrováný či volitelný software), integrace do laboratorního informačního systému, datová bezpečnost a možnost archivace dat a metod, možnosti verifikace klíčových vlastností spektrometru, jako ověření přesnosti a opakovatelnosti vlnové délky a spektrální šířky štěrbin, které mohou významně ovlivnit užitečnou hodnotu v dlouhodobějších souvislostech.

Obr. 1 – Evolution 300 s lokálním ovládním a dvěma termostatovanými karusely



V tomto článku se chceme dotknout některých souvisejících vlastností UV-VIS spektrometrů Thermo Scientific, se zaměřením na spektrometry Evolution 300 a 600, které jsou koncipovány jako nejvýkonnější a nejflexibilnější individuální i více-uživatelské spektrometry, určené zejména pro výzkum a kontrolu v oblasti „life science“, materiálové a farmaceutické.

Oba spektrometry jsou buď samostatně stojící s lokálním ovládním a s integrovanou programovou výbavou a s VGA displejem (13,5 cm x 10 cm), nebo je lze plně kontrolovat, sbírat a vyhodnocovat data prostřednictvím PC (s programy VISIONlite, VISIONpro, VISIONlife a speciálně pro materiálová měření programy VISIONlite ColorCalc a VISIONlite MaterialCalc). Šířce aplikačního záběru odpovídá i rozsah programového vybavení (lokálně i přes PC: Scan Application, Fixed, Quantitation, Kinetics, Multicomponent Analysis, Biological Tests –DNA, protein, buněčný růst, oligo „kalkulátor“) a integrovaného příslušenství. Přes téměř shodnou tvář a dvojpaprskovou koncepci s modifikovaným Ebertovým monochromátorem a se skokově proměnnou šířkou optické štěrbin se spektrometry liší optickým zdrojem. Evolution 300 je vybaven xenonovou pulzní výbojkou s třiletou zárukou. Evolution 600 je klasicky vybaven dvojicí „deuteriová a wolframová lampa“.

Obr. 2 – Evolution 300 se zařízením pro testování rozpustnosti tablet Sotax



V analytických a kontrolních laboratořích jsou či budou uplatňovány postupy a předpisy vyplývající z regulativů Good Manufacturing Practices (GMP), Good Laboratory Practices (GLP), předepsaných příslušnými úřady jako například European Medicines Agency (EMA) a normativy typu Pharmacopoeia či sekundárními institucemi jako je ISO (International Organization of Standardization). Cílem je zajistit konstantní definovanou kvalitu výrobků a procesů. Shodu s těmito regulativy obecně zajišťuje jejich včlenění do odpovídajícího typu testování analytického výkonu daných instrumentů v rámci standardních operačních postupů (SOP) v laboratoři.

V případě UV-VIS spektrometrů poskytuje Thermo Scientific rozsáhlý soubor prostředků napomáhajících laboratořím k dosažení a udržení kontrolního a regulačního systému vyhovujícího platným předpisům.

Prostředky pro automatické testování a verifikaci výkonu (Performance Verification – PV).

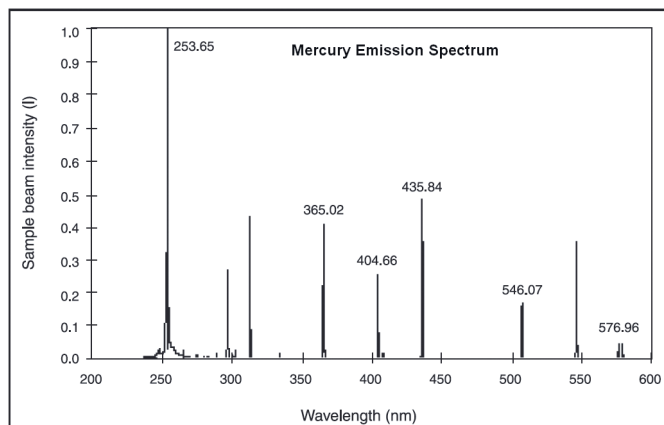
Testování PV u spektrometrů Evolution 300/600 je zjednodušené díky „chytrému“ kalibračnímu validačnímu karuselu (CVC). CVC

plně automatizuje testování PV použitím certifikovaných referenčních materiálů podle NIST (National Institute of Standards and Technology, USA) nebo NPL (National Physical Laboratory, UK). Kalibrované hodnoty standardů a specifikace přístrojů jsou ukládány v jednoduchých datových souborech odpovídajících sériovému číslu použitého CVC. Toto bezpečnostní opatření eliminuje přepsání a jiné zdroje lidských chyb, které mohou vstoupit do PV testovacího procesu. Pro provedení testu musí uživatel jen vybrat příslušný test v menu, odstartovat jej a po jeho ukončení se vrátit zpět do přístrojového menu. Plně automatizovaný testovací proces zajišťuje jeho opakovatelnost, šetří pracovní čas a redukuje pravděpodobnost chyb. Použití CVC plně automatizuje tato testování:

- přesnost vlnové délky s použitím roztoku holmiumoxidu v kyseliny chloristé,
- opakovatelnost vlnové délky přístroje vybaveného xenonovou lampou,
- fotometrickou přesnost s použitím optických filtrů (podle NIST nebo NPL),
- UV – fotometrická přesnost s použitím uzavřených standardních roztoků dichromanu draselného v roztoku kyseliny chloristé,
- „Stray light“,
- fotometrický šum,
- fotometrickou stabilitu,
- tvar základní linie.

Další testování PV spektrometru Evolution 300 může být uskutečněno pomocí příslušenství se rtuťovou lampou. Emisní linie rtuťové lampy jsou základním, primárním standardem, který nevyžaduje certifikaci a recalibraci (viz např. lit. 1). Rtuťová lampy pokrývá kompletní vlnový rozsah spektrometrů Evolution 300/600 od ultrafialové přes viditelnou až blízkou infračervenou oblast vlnových délek (254–810 nm).

Obr. 3 – Emisní spektrum rtuťové lampy měřeného spektrometrem Evolution 300



Podle doporučení United States Pharmacopoeia (USP) je to preferovaný standard pro testování přesnosti vlnové délky. V případě rtuťové lampy, která je volitelným příslušenstvím spektrometru Evolution 300, je možné ji použít pro automatické testování:

- přesnosti vlnové délky,
- opakovatelnosti vlnové délky,
- přesnosti spektrální šířky optické šterbiny (SBW).

Rtuťová lampy není jen užitečný nástroj ověřování a testování spektrometru (Performance Verification – PV), ale rovněž umožňuje v laboratoři realizovat kalibraci spektrometru Evolution 300 přesně tak, jak se to provádí ve výrobním podniku. Kalibrační metoda využívá osm rtuťových emisních atomových čar od vlnové délky 253,65 nm do 810 nm, viz Tab. 1. (pozn.: sedm čar u spektrometru Evolution 600).

Tato unikátní kalibrační křivka je použita pro každou nastavitelnou SBW spektrometru Genesis 300 (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0 nm). To

znamená, že kalibrace při každé SBW spektrometru je provedena a uložena nezávisle. Z fyzikálních faktorů ovlivňujících vlnovou délku jde zejména o vliv teploty. Spektrometry jsou obecně továrně kalibrované při laboratorní teplotě. Při její změně se nastavení vlnové délky může posunout o cca 0,2 nm na každých deset stupňů – měřeno od kalibrační teploty. V případě spektrometrů osazených klasickou rtuťovou a deuteriovou lampou, což je spojeno s větší emisí tepla, než je tomu u spektrometrů s xenonovou výbojkou, je třeba cca jednodílné temperace po zapnutí – před realizací PV testu. Samozřejmostí je provedení testu po každém zásahu do optické soustavy spektrometru a podobně po každém stěhování přístroje. PV test přesnosti vlnových délek je dostupný jak z lokálního menu spektrometru tak z programového vybavení u PC kontrolovaných přístrojů. Povolené tolerance jsou součástí technické specifikace individuálních spektrometrů. V případě spektrometru Evolution 600 je ke kalibraci použita navíc ještě deuteriová emisní spektrální čára 656,1 nm. V případě zjištění neshody specifikovaných a nalezených parametrů, je ve všeobecnosti nutná recalibrace, k čemuž však prakticky dochází jen jako následek servisní výměny některé z hlavních komponent optické soustavy.

Tab. 1 – Emisní linie rtuťové lampy použité pro kalibraci přesnosti vlnových délek v rámci PV testů spektrometru Evolution 300 a 600

Vlnová délka (Evolution 300) [nm]	Vlnová délka (Evolution 600) [nm]
253,65	253,65
296,73	296,73
404,66 (H-line)	404,66
435,84 (G-line)	435,84
546,07	546,07
760,95	760,95
871,68	871,68
1092,14	

Na český a slovenský trh přináší a zajišťuje veškeré servisní aktivity všech UV-VIS spektrometrů a fluorescenčních analyzátorů Quantech od Thermo Fisher Scientific výhradní český a slovenský distributor Pragolab s. r.o. Další informace lze nalézt na webových stránkách Thermo Scientific (www.thermo.com), resp. Pragolabu (www.pragolab.eu), kde je umístěn i e-shop spotřebního materiálu pro GC a HPLC a drobných laboratorních přístrojů, informace o akcích a aktuálních novinkách a nově i o aplikacích vyvinutých aplikačními týmy firmy Thermo Fisher Scientific.

Literatura

- [1] <http://physics.nist.gov/PhysRefData/Handbook/Tables/mercurytable3.htm>
- [2] N. K. Keppy, M. W. Allen, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA. *Application Note No. 51686: Performance Verification of the Evolution 300 UV-Visible Spectrophotometer in the Regulated Laboratory*. 2007.
- [3] M. W. Allen, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA. *Application Note No. 51171: Wavelength Accuracy – Measurement and Effect on Performance in UV-Visible Spectrophotometry*. 2007.
- [4] N. K. Keppy, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA. *Application Note No. 51777: Addressing Complex Sample Matrices with a Dual Cell Changer Configuration*. 2009.

Abstract:

VERIFYING ANALYTICAL PERFORMANCE OF THERMO SCIENTIFIC UV-VIS SPECTROPHOTOMETERS EVOLUTION 300/600

Summary: This article summarizes the conditions, parameters and techniques used for Performance verification of Thermo Scientific spectrophotometers with main focus on instruments Evolution 300/600.

Key words: UV-Vis spectrophotometry, life science, performance verification, calibration, validation