ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΚΡΙΒΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΩΝ UV/VIS

Ηλίας Κακουλίδης[1] και Ευγενία Λαμπή[2]
[1]Χ.Υ. Μετρολογίας, Γενικό Χημείο του Κράτους, Αν. Τσόχα 16, 11521 Αθήνα
[2]Β΄ Χ.Υ. Αθηνών, Γενικό Χημείο του Κράτους, Αν. Τσόχα 16, 11521 Αθήνα
e-mail: i.kakoulidis@gcsl.gr

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται ένα μοντέλο υπολογισμού αβεβαιοτήτων κατά τη διακρίβωση και τη χρήση φασματοφωτομέτρων UV/Vis. Για το σκοπό αυτό ακολουθείται η προσέγγιση που αναπτύσσεται στον οδηγό cg18 της EURAMET για τη διακρίβωση ζυγών. Σύμφωνα με το προτεινόμενο μοντέλο, η αβεβαιότητα διακρίνεται σε τρεις κύριες συνιστώσες που αποδίδονται στα χαρακτηριστικά των υλικών αναφοράς που χρησιμοποιούνται κατά τη διακρίβωση (ακρίβεια της τιμής αναφοράς, οπτική διαδρομή), την επίδοση και τα χαρακτηριστικά του εξοπλισμού (επαναληψιμότητα, γραμμικότητα, παράσιτη ακτινοβολία, διακριτική ικανότητα, εύρος δέσμης, ακρίβεια μήκους κύματος) και στις συνθήκες χρήσης του (θερμοκρασία). Αποτέλεσμα του μοντέλου είναι γραμμικές εξισώσεις που εκτιμούν την αβεβαιότητα της έντασης της απορρόφησης στα μήκη κύματος για τα οποία υπάρχουν διαθέσιμα υλικά αναφοράς, τόσο κατά τη διαδικασία διακρίβωσης όσο και σε κανονικές συνθήκες χρήσης του εξοπλισμού.

Λέξεις-Κλειδιά: διακρίβωση, φασματοφωτόμετρα, αβεβαιότητα.

Abstract

A model for the expression of uncertainty during the calibration and use of UV/Vis spectrophotometers is presented. In this respect, the approach employed in EURAMET cg18, the guide for the expression of uncertainty for non-automatic weighing machines, is followed. According to the proposed model, the uncertainty is divided in three main components that correspond to the characteristics of the reference materials used during calibration (the reference value and the optical path), those of the instrument under consideration (repeatability, linearity, resolution, stray light, bandwidth, wavelength accuracy), as well as measurement conditions (temperature). The results of the model are linear equations that estimate absorption uncertainty at wavelengths where reference materials are available, both for the calibration procedure, as well as for routine instrument use.

Keywords: calibration, UV/Vis spectrophotometers, uncertainty

1. Εισαγωγή

Η φασματοφωτομετρία υπεριώδους/ορατού είναι μια από τις αναλυτικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην εργαστηριακή ρουτίνα των χημικών εργαστηρίων για τον προσδιορισμό της ποσότητας της ουσίας σε ποικίλα υποστρώματα. Εύλογα, η αβεβαιότητα των σχετικών μετρήσεων έχει ως σημαντική συνιστώσα την αβεβαιότητα που προέρχεται από τα φασματοφωτόμετρα UV/Vis που χρησιμοποιούνται. Οι διαδικασίες που εφαρμόζονται για τη διακρίβωσή τους βασίζονται κατά κύριο λόγο σε πρότυπες μεθόδους ASTM (2009, 2013), ενώ υπάρχουν αρκετές οδηγίες για την πραγματοποίηση διάφορων δοκιμών επίδοσης (OIML 2004, EP 2014). Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να χρησιμοποιήσει έναν κοινά αποδεκτό τρόπο εργασίας για την έκφραση αβεβαιοτήτων, όπου θα συνδυάσει τις συσσωρευμένες πρακτικές με σκοπό την διαμόρφωση ενός πρότυπου που θα παρέχει την αβεβαιότητα των μετρήσεων απορρόφησης ως γραμμική συνάρτηση των ενδείξεων του οργάνου.

2. Μεθοδολογία

Ακολουθώντας τη λογική της Οδηγίας cg18/v4.0 της EURAMET (2015) για την έκφραση της αβεβαιότητας κατά τη διακρίβωση και τη χρήση ζυγών, θα επιχειρήσουμε να καταστρώσουμε ένα πρότυπο για τον υπολογισμό της αβεβαιότητας της έντασης της απορρόφησης φασματοφωτομέτρων UV/Vis που να ικανοποιεί τις απαιτήσεις της JCGM 100 (BIPM 2008), αναλύοντάς την σε τρεις κύριες συνιστώσες που αντιστοιχούν στα χαρακτηριστικά των υλικών αναφοράς (ακρίβεια της τιμής αναφοράς, οπτική διαδρομή), την επίδοση και τα χαρακτηριστικά του εξοπλισμού (επαναληψιμότητα, γραμμικότητα, παράσιτη ακτινοβολία, διακριτική ικανότητα, εύρος δέσμης, ακρίβεια μήκους κύματος) και στις συνθήκες χρήσης του (φύση της ουσίας, συγκέντρωση, θερμοκρασία). Αρχικά, θα διατυπώσουμε ένα ισοζύγιο αβεβαιοτήτων για την αβεβαιότητα του επιλεγόμενου μήκους κύματος στο οποίο πραγματοποιούνται οι μετρήσεις και στη συνέχεια θα το εντάξουμε σε ένα γραμμικό πρότυπο για την εκτίμηση της αβεβαιότητας της έντασης της απορρόφησης.

2.1 Αβεβαιότητα του επιλεγόμενου μήκους κύματος

Η εξίσωση υπολογισμού της απόκλισης (E) του επιλεγόμενου μήκους κύματος (I) κατά τη διακρίβωση της κλίμακας του μήκους κύματος ενός φασματοφωτομέτρου UV/Vis από τις τιμές ενός διαθέσιμου υλικού αναφοράς (για κάθε πιστοποιημένη τιμή, λ_{ref}) δίνεται ως

$$E = I - \lambda_{ref} \tag{1}$$

Η τυπική διακύμανση της απόκλισης της επιλεγόμενης τιμής u_E^2 δίνεται από την εξίσωση

$$u_E^2 = u_I^2 + u_{\lambda_{ref}}^2 \tag{2}$$

όπου u_E η τυπική αβεβαιότητα της απόκλισης, u_I η τυπική αβεβαιότητα της επιλεγόμενης τιμής και $u_{\lambda_{ref}}$ η τυπική αβεβαιότητα των πιστοποιημένων τιμών.

Για κάθε επιλεγόμενο μήκος κύματος I μπορούμε να γράψουμε

$$I = \lambda + \delta I_{\lambda_{dig}} + \delta I_{\lambda_{rep}} \tag{3}$$

όπου λ το πραγματικό μήκος κύματος, $\delta I_{\lambda_{dig}}$ η διόρθωση λόγω στρογγυλοποίησης της ένδειξης του μήκους κύματος και $\delta I_{\lambda_{rep}}$ η διόρθωση λόγω της επαναληψιμότητας του εξοπλισμού. Η τυπική αβεβαιότητα που αποδίδεται στη στρογγυλοποίηση της ένδειξης του φασματοφωτομέτρου λόγω της διακριτικής ικανότητάς του d_I κατά την επιλογή του μήκους κύματος λ θεωρείται ότι ακολουθεί ορθογώνια κατανομή και υπολογίζεται ως

$$u_{\delta I_{\lambda_{dig}}} = \frac{d_I}{2\sqrt{3}} \quad (4)$$

Η τυπική αβεβαιότητα που οφείλεται στην επαναληψιμότητα του φασμαφωτομέτρου ισούται με την τυπική απόκλιση των ενδείξεων που λαμβάνονται από *n* επαναλαμβανόμενες σαρώσεις της UV/Vis περιοχής του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος στα μήκη κύματος που αντιστοιχούν στα μέγιστα απορρόφησης του υλικού αναφοράς

$$u_{\delta I_{\lambda_{rep}}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(I_i - \bar{I})^2}{n-1}} \quad (5)$$

όπου $\bar{I}$, η μέση τιμή των ενδείξεων από τις *n* μετρήσεις κατά τη διακρίβωση.

Τέλος, οι αβεβαιότητες του παράγοντα διόρθωσης για πιθανή ολίσθηση δ_{λ_D} και διακυμάνσεις στη συγκέντρωση δ_{λ_C} και τη θερμοκρασία δ_{λ_T}, θεωρούνται (και πρακτικά είναι) μηδενικές:

$$u_{\delta_{\lambda_D}} = u_{\delta_{\lambda_C}} = u_{\delta_{\lambda_T}} = 0 \quad (6)$$

2.2 Αβεβαιότητα της απορρόφησης

Η ένδειξη της απορρόφησης ενός φασματοφωτομέτρου UV/Vis για απορρόφηση *A* είναι

$$I = I_A - I_0 + \delta I_{digA} - \delta I_{dig0} + \delta I_{repA} + \delta I_{SB} + \delta I_{\lambda} + \delta I_{sl} \quad (7)$$

όπου I_A η πραγματική τιμή της απορρόφησης του δείγματος, I_0 η ένδειξη του οργάνου χωρίς δείγμα (ή για λευκό δείγμα), δI_{digA} η διόρθωση λόγω του σφάλματος στρογγυλοποίησης της ένδειξης κατά τη μέτρηση, δI_{dig0} η διόρθωση λόγω του σφάλματος στρογγυλοποίησης της ένδειξης χωρίς δείγμα (ή για λευκό δείγμα), δI_{rep} η διόρθωση λόγω της επαναληψιμότητας του φασματοφωτομέτρου, δI_{SB} ένας παράγοντας διόρθωσης λόγω αδυναμίας υλοποίησης πλήρως μονοχρωματικής ακτινοβολίας, δI_{λ} διόρθωση λόγω της ορθότητας επιλογής του μήκους κύματος, και δI_{sl} η διόρθωση λόγω της παράσιτης ακτινοβολίας.

Η τυπική αβεβαιότητα που οφείλεται στη στρογγυλοποίηση της ένδειξης λόγω της διακριτικής ικανότητας του φασματοφωτομέτρου d_i κατά τη μέτρηση δείγματος απορρόφησης *A* θεωρείται ότι ακολουθεί ορθογώνια κατανομή και υπολογίζεται ως

$$u_{\delta I_{digA}} = \frac{d_I}{2\sqrt{3}} \quad (8)$$

Το ίδιο ισχύει και για τη στρογγυλοποίηση της ένδειξης του οργάνου χωρίς δείγμα (ή για λευκό δείγμα)

$$u_{\delta I_{dig0}} = \frac{d_0}{2\sqrt{3}} \quad (9)$$

Η τυπική αβεβαιότητα που αποδίδεται στην επαναληψιμότητα του φασματοφωτομέτρου ισούται με την τυπική απόκλιση των ενδείξεων που λαμβάνονται από *n* επαναλαμβανόμενες μετρήσεις του οργάνου με δείγμα απορρόφησης *A* και εκτιμάται μέσω της δοκιμής επαναληψιμότητας από τη σχέση

$$u_{\delta I_{repA}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(I_i - \bar{I})^2}{n-1}} \quad (10)$$

όπου $\bar{I}$, η μέση τιμή των ενδείξεων από τις *n* μετρήσεις του φασματοφωτομέτρου.
Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να αναφερθούμε στην αδυναμία υλοποίησης πραγματικά μονοχρωματικής ακτινοβολίας, για την οποία ισχύει ο νόμος *Lambert-Beer*. Στην πράξη, η ποιότητα της μέτρησης της απορροφούμενης ακτινοβολίας αποτελεί συνάρτηση του λόγου του εύρους δέσμης (*spectral bandpass*) προς το εύρος απορρόφησης. Όταν ο λόγος αυτός είναι μικρότερος του 0,3 (όπως συμβαίνει στην περίπτωση της διακρίβωσης και στις περισσότερες περιπτώσεις της καθημερινής πρακτικής, όπου οι δέσμες απορρόφησης των υλικών αναφοράς είναι ευρείες), η συνεισφορά είναι αμελητέα [O'Harver, 1991]. Όμως, σε περιπτώσεις συγκρίσιμου εύρους δέσμης και εύρους απορρόφησης είναι εξαιρετικά σημαντική (π.χ. για εύρος δέσμης 5 nm και εύρος απορρόφησης 20 nm, η απομείωση είναι της τάξης του 3%). Πραγματοποιείται σχετικός έλεγχος με την εφαρμογή του O'Harver και στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαφορά στην απορρόφηση μεγαλύτερη από 10^{-5}, η διαφορά αυτή (ΔA_{SB}) προστίθεται ως προκατάληψη (*bias*) στον υπολογισμό της συνδυασμένης τυπικής αβεβαιότητας ($u_{SB} = \Delta A_{SB}$).

Η συνεισφορά της διόρθωσης για την ορθότητα του μήκους κύματος (δI_λ) στην αβεβαιότητα της απορρόφησης μπορεί να εκτιμηθεί, εκφράζοντας την απορρόφηση του πρότυπου δείγματος ως συνάρτηση του μήκους κύματος, προσομοιώνοντας το φάσμα του με ένα πολυώνυμο της μορφής $A = f_{(\lambda)}$: $f_{(\lambda)} = m_n\lambda^n + m_{n-1}\lambda^{n-1} + \cdots + m_1\lambda + m_o$.

Εφαρμόζοντας το νόμο διάδοσης των αβεβαιοτήτων, λαμβάνουμε την αβεβαιότητα που οφείλεται στην ορθότητα του μήκους κύματος:

$$u_{A,\lambda}^2 = [n\, m_n\lambda^{n-1} + (n-1)m_{n-1}\lambda^{n-2} + \cdots + m_1]^2 u_\lambda^2 \qquad (11)$$

Η συνεισφορά της παράσιτης ακτινοβολίας στην αβεβαιότητα της απορρόφησης μπορεί επίσης να εκτιμηθεί από τις προδιαγραφές του φασματοφωτομέτρου, εφόσον προηγηθεί επιτυχής δοκιμή επίδοσης από το εργαστήριο σε συγκεκριμένα μήκη κύματος που ορίζονται από τα διεθνή πρότυπα ASTM. Συνήθως, η παράσιτη ακτινοβολία δίνεται ως μέγιστο ποσοστό (*r*) της % διαπερατότητας (*T*). Στην περίπτωση που η παράσιτη ακτινοβολία δεν απορροφάται από το δείγμα, έχει αποδειχτεί ότι η μετρούμενη απορρόφηση μειώνεται κατά (Burnett, 1972):

$$\Delta A_{sl,max} = -\log(1 - r\ + 10^A \times r) \qquad (12)$$

Θεωρώντας την παράγοντα προκατάληψης, η αντίστοιχη αβεβαιότητα δίνεται ως:

$$u_{sl} = \frac{\log(1 - r\ + 10^A \times r)}{\sqrt{3}} \qquad (13)$$

Η τιμή της απορρόφησης του υλικού αναφοράς μπορεί με τη σειρά της να αναλυθεί σε επιμέρους συνιστώσες:

$$A_{ref} = A_{true} + \delta A_v + +\delta A_D + \delta A_{op} + \delta A_C + \delta A_T \qquad (14)$$

όπου A_{true}, η αληθής τιμή της απορρόφησης του δείγματος αναφοράς, δA_v η διόρθωση λόγω της απόκλισής της από την αληθή τιμή, δA_D, η διόρθωση λόγω πιθανής ολίσθησης από την τελευταία διακρίβωση, δA_{op}, η διόρθωση λόγω διαφορών της οπτικής διαδρομής, δA_C, η διόρθωση λόγω της συγκέντρωσης, και δA_T, η διόρθωση λόγω θερμοκρασίας

Η τυπική αβεβαιότητα της απορρόφησης των δειγμάτων αναφοράς που χρησιμοποιούνται στη διακρίβωση της απορρόφησης αναφέρεται στο πιστοποιητικό διακρίβωσής τους. Ακόμη, η αβεβαιότητα $u_{\delta_{A_D}}$ του παράγοντα διόρθωσης για πιθανή ολίσθηση της τιμής αναφοράς μπορεί να εκτιμηθεί από τα διαχρονικά δεδομένα των διακριβώσεων των υλικών αναφοράς.

Η διόρθωση λόγω της οπτικής διαδρομής του δείγματος μπορεί να επιμεριστεί σε τρεις συνιστώσες: (α) στην τιμή που δηλώνεται από τον παρασκευαστή του υλικού αναφοράς, (β) στην επιμήκυνσή της λόγω φαινομένων ανάκλασης από ατελή ευθυγράμμιση του δοκιμίου ή/και της φωτεινής δέσμης, και (γ) λόγω φαινομένων ανάκλασης/διάθλασης.Η αβεβαιότητα της οπτικής διαδρομής υπολογίζεται από την τιμή που δίνεται από τον κατασκευαστή των κυψελίδων μέτρησης για την ανοχή τους, ενώ στην περίπτωση που μετρούνται οπτικά φίλτρα, θεωρείται ίση με το μηδέν καθώς είναι ήδη ενσωματωμένη στην αβεβαιότητα της τιμής του υλικού αναφοράς. Η αβεβαιότητα που αποδίδεται στη διόρθωση αυτή θεωρείται ότι ακολουθεί τετραγωνική κατανομή και δίνεται από την εξίσωση

$$u_{\delta A_{op,man}} = \frac{\left|\Delta A_{op,mnf}\right|}{\sqrt{3}} \tag{15}$$

Ακόμη, φαινόμενη επιμήκυνση της οπτικής διαδρομής (δ) προκύπτει από ενδεχομένως ατελή ευθυγράμμιση της δέσμης ενέργειας στην κυψελίδα ή της κυψελίδας στον υποδοχέα της και δίνεται από τον τύπο (Burnett, 19720:

$$\delta_{A_{op,refl}} = \ell_0 \frac{\pi^2 \vartheta^2}{64800\, n^2} \tag{16}$$

όπου ℓ_0, η οπτική διαδρομή, ϑ η γωνία πρόσπτωσης της δέσμης (σε μοίρες) και n, ο δείκτης διάθλασης του διαλύτη. Άρα, η μέγιστη πιθανή τιμή της είναι

$$\delta_{A_{op,refl,max}} = \ell_0 \frac{\pi^2 \vartheta_{max}^2}{64800\, n^2} \tag{17}$$

και θεωρώντας τετραγωνική κατανομή

$$u_{A_{op,ref}} = \ell_0 \frac{\pi^2 \vartheta_{max}^2}{64800\, \sqrt{3}\ n^2} \tag{18}$$

Ανάλογο θέμα προκύπτει και από διαδοχικές ανακλάσεις της φωτεινής δέσμης στη διεπιφάνεια του δείγματος με τον αέρα λόγω διαφορών στους δείκτες διάθλασης των δύο μέσων. Η οπτική διαδρομή αυξάνεται κατά τον παράγοντα που δίνεται από τη σχέση (Goldring et al., 1953):

$$\delta_{A_{op,diff}} = 0{,}4343\ \ell_0 \frac{1 - 10^{-2A}}{A} \times \left(\frac{f_1 f_2}{1 - f_1}\right) \tag{19}$$

όπου f_1, f_2 τα κλάσματα της εισερχόμενης και της εξερχόμενης δέσμης που ανακλώνται και δίνονται από τη σχέση του *Fresnel* για το ανακλώμενο κλάσμα της ακτινοβολίας

$$f = \left(\frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2}\right)^2 \tag{20}$$

στην οποία με n_1, n_2 δίνονται οι δείκτες διάθλασης των μέσων, του αέρα (n = 1) και του γυαλιού (n = 1,5) στην περίπτωσή μας. Θεωρώντας την ως όρο προκατάληψης, η αβεβαιότητα της οπτικής διαδρομής που οφείλεται σε φαινόμενα ανάκλασης/διάθλασης, γίνεται:

$$u_{A_{op,diff}} = \ell_0 \frac{0{,}000724}{A} (1 - 10^{-2A}) \tag{21}$$

Ακόμη, η αβεβαιότητα της συγκέντρωσης των υλικών αναφοράς προφανώς συμμετέχει στο ισοζύγιο αβεβαιοτήτων μόνο στην περίπτωση που πρόκειται για διαλύματα που παρασκευάζονται στο εργαστήριο. Σε έτοιμα υγρά φίλτρα, η αβεβαιότητά της έχει

συνυπολογιστεί στην αβεβαιότητα της τιμής αναφοράς του πιστοποιημένου υλικού. Η αβεβαιότητα της συγκέντρωσης των διαλυμάτων αναφοράς υπολογίζεται από τις επιμέρους αβεβαιότητες των συγκεντρώσεων των συστατικών τους.

Τέλος, η συνεισφορά της θερμοκρασίας κατά τη διακρίβωση μπορεί να διακριθεί σε εκείνη που επηρεάζει τη συγκέντρωση του προς μέτρηση διαλύματος λόγω μεταβολής του όγκου του στην κυψελίδα μέτρησης, αλλά και εξαιτίας της μεταβολής της μοριακής απορροφητικότητας της διαλυμένης ουσίας (στην περίπτωση διαλυμάτων, όπως τα φίλτρα διχρωμικού καλίου). Η συνεισφορά της θερμοκρασίας στη μεταβολή της μοριακής απορροφητικότητας του διχρωμικού καλίου δίνεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$\delta_{A_T} = \epsilon^{T_o} \frac{b}{100}(T - T_o) \tag{22}$$

Άρα, η αντίστοιχη αβεβαιότητα δίνεται από την εξίσωση

$$u_{A_T} = \epsilon^{T_o} \ell C_o \frac{b}{100} u_T \tag{23}$$

Αντίστοιχα, η αβεβαιότητα που οφείλεται στη μεταβολή της συγκέντρωσης του διχρωμικού καλίου, εφαρμόζεται προφανώς μόνο στην περίπτωση υγρών φίλτρων και αποδίδεται σε μεταβολές του όγκου του διαλύματος αναφοράς στην κυψελίδα μέτρησης. Θεωρώντας ότι το δείγμα όγκου V_o στην κυψελίδα μέτρησης ακολουθεί το νόμο κυβικής διαστολής με συντελεστή κυβικής διαστολής β και εφαρμόζοντας την εξίσωση Lambert-Beer, καταλήγουμε στην ακόλουθη σχέση:

$$A = \frac{\epsilon^{T_o}\, \ell C_o}{1 + \beta(T - T_o)} \tag{24}$$

και αντίστοιχη αβεβαιότητα:

$$u_{A_T} = \epsilon^{T_o} \ell C_o \frac{\beta}{[\beta(T - T_o) + 1]^2}\, u_T \tag{25}$$

2.3 Αβεβαιότητα απορρόφησης κατά τη χρήση

Για να προσεγγίσουμε την απόκλιση της απορρόφησης (E) ως γραμμική συνάρτηση της ένδειξης του φασματοφωτομέτρου (R), χρησιμοποιούμε τα αποτελέσματα της διαδικασίας διακρίβωσης και πραγματοποιούμε γραμμική παρεμβολή χωρίς σταθερό όρο:

$$E_{appr} = a\, R \tag{26}$$

Ακόμα, η διακύμανση της απόκλισης της ένδειξης της έντασης της απορρόφησης του φασματοφωτομέτρου μπορεί να εκφραστεί ως γραμμική συνάρτηση της ένδειξής του, (R)

$$u_E^2 \;\; = a^2 + \beta^2 R^2 \tag{27}$$

Μια προσέγγιση της διακύμανσης της απόκλισης δίνεται ως:

$$u_{E_{appr}}^2 = a^2 u_I^2 + u_a^2 R^2 \tag{28}$$

Οι όροι a και u_a μπορούν να υπολογιστούν με γραμμική παλινδρόμηση, ενώ η διακύμανση της ένδειξης (u_I^2) υπολογίζεται για τη μικρότερη απορρόφηση. Για $R \approx 0$ και $R = A_{max}$ μπορούμε να υπολογίσουμε τα $U_{E_{appr}}^o$ και $U_{E_{appr}}^{max}$:

$$u_{E_{appr}}^{o\;\;2} = a^2 u_I^2 \quad \Rightarrow \; U_{E_{appr}}^o = k\, a\, u_I \tag{29}$$

$$u_{E_{appr}}^{max\ 2} = a^2 u_I^2 + u_a^2 A_{max}^2 \ \Rightarrow\ U_{E_{appr}}^{max} = k\sqrt{a^2 u_I^2 + u_a^2 A_{max}^2} \tag{30}$$

Υπό την παραδοχή ότι ο σταθερός όρος της γραμμικής σχέσης είναι πολύ μικρός σε σχέση με την κλίση (u_a^2) και για $k = 2$, μπορούμε να γράψουμε την προσεγγιστική σχέση:

$$U_{E_{appr}} \cong 2\, u_a\, R \tag{31}$$

Για να εκφράσουμε τη διευρυμένη αβεβαιότητα της απόκλισης της ένδειξης του φασματοφωτομέτρου ως γραμμική συνάρτηση της ένδειξης στην περιοχή μέτρησης (0 – A_{max}), γράφουμε:

$$U_{E_{appr}} = U_{E_{appr}}^{o} + \frac{U_{E_{appr}}^{max} - U_{E_{appr}}^{o}}{A_{max}} R \tag{32}$$

και αντικαθιστώντας από τις εξισώσεις (31) και (32), έχουμε:

$$U_{E_{appr}} = k\, a\, u_I + \frac{k\sqrt{a^2 u_I^2 + u_a^2 A_{max}^2} - k\, a\, u_I}{A_{max}} R \tag{33}$$

Κατόπιν, προσδιορίζουμε τους αποτελεσματικούς βαθμούς ελευθερίας χρησιμοποιώντας την εξίσωση Welch-Satterthwaite και στη συνέχεια υπολογίζουμε το συντελεστή κάλυψης (k) για επίπεδο εμπιστοσύνης 95% και ν_{eff} βαθμούς ελευθερίας.

Η συνολική διακύμανση της ένδειξης του φασματοφωτομέτρου κατά τη χρήση του για κάθε μήκος κύματος δίνεται ως

$$u_{R_A}^2 = a_w^2 + \beta_w^2\, R^2 \tag{34}$$

όπου

$$a_w^2 = u_{\delta R_{rep}}^2 + u_{\delta R_{dig0}}^2 + u_{\delta R_{digA}}^2 + u_{\delta R_{flat}}^2 \tag{35}$$

Οι τρεις πρώτες συνιστώσες υπολογίζονται όπως πριν. Ο όρος $u_{\delta R_{flat}}^2$ εκτιμάται από την προδιαγαφή που αναφέρει ο κατασκευαστής για τη σταθερότητα της γραμμής βάσης του οργάνου (*baseline flatness*), ή από σχετική δοκιμή κατά τη διακρίβωση:

$$u_{\delta R_{flat}}^2 = \frac{A_{flat}^2}{3} \tag{36}$$

Ακόμη,

$$\beta_w^2 = \widehat{w}_{E_{appr}}^2 + \widehat{w}_{R_\lambda}^2 + \widehat{w}_{R_{sl}}^2 + \widehat{w}_{\delta R_{op}}^2 + \widehat{w}_{\delta R_C}^2 + \widehat{w}_{\delta R_{temp}}^2 + \widehat{w}_{\delta R_{zero}}^2 + \widehat{w}_{\delta R_{stb}}^2 \tag{37}$$

όπου $\widehat{w}_{E_{appr}}^2$ η σχετική τυπική αβεβαιότητα της γραμμικής προσέγγισης της απόκλισης της ένδειξης που διέρχεται από την αρχή των αξόνων και υπολογίζεται ως:

$$\widehat{w}_{E_{appr}} = \frac{U_{E_{appr}}}{2\, R} \tag{38}$$

Ο όρος $\widehat{w}_{\delta R_\lambda}^2$ που δίνει τη σχετική συνεισφορά της ορθότητας του μήκους κύματος υπολογίζεται με τη βοήθεια της εξ. 11 και δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

$$\widehat{w}_{\delta R_\lambda} = \frac{u_{\delta A_\lambda}}{A_{max}} \tag{39}$$

Ο όρος $\widehat{w}_{\delta R_{sl}}^2$ που δίνει τη γραμμική σχέση της αβεβαιότητας ως προς την παράσιτη ακτινοβολία δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

$$\widehat{w}_{\delta R_{sl}} = \frac{0{,}00039}{\sqrt{3}\,A_{max}} \tag{40}$$

ενώ ο όρος $\widehat{w}_{\delta R_{op}}$ που αποδίδει τη μέγιστη σχετική συνεισφορά των μεταβολών στην οπτική διαδρομή είναι:

$$\widehat{w}_{\delta R_{op}} = \frac{1}{A_{max}}\left(\frac{\left|\Delta A_{op,mnf}\right| + 0{,}00044}{\sqrt{3}} + 0{,}000297\right) \tag{41}$$

Ακόμη, στην καθημερινή πρακτική, οι μετρήσεις της απορρόφησης πραγματοποιούνται επί διαλυμάτων που παρασκευάζονται στο εργαστήριο, συνήθως με ζύγιση στερεού μάζας *m* και διάλυσή του σε ογκομετρική φιάλη όγκου *V*. Η σχετική αβεβαιότητα της συγκέντρωσης υπολογίζεται ως:

$$\widehat{w}_{\delta R_C} = \frac{\epsilon\,\ell}{A_{max}}\sqrt{\left(\frac{u_m}{V}\right)^2 + \left(-\frac{m}{(V)^2}u_V\right)^2} \tag{42}$$

Ο όρος $\widehat{w}^2_{\delta R_{temp}}$ εκτιμάται από τη μέγιστη θερμοκρασιακή μεταβολή στο εργαστήριο (*ΔT*). Θεωρώντας ορθογώνια κατανομή, έχουμε:

$$\widehat{w}_{\delta R_{temp}} = \ell C_o \frac{\epsilon^{T_o}\frac{b}{100} + \epsilon\,\frac{\beta}{1+\beta\Delta T}}{\sqrt{3}\,A_{max}}\Delta T \tag{43}$$

Ακόμη, ο όρος $\widehat{w}^2_{\delta R_{zr}}$ αποδίδει τη σχετική αβεβαιότητα που υπεισέρχεται στο ισοζύγιο λόγω της χρήσης λευκών δειγμάτων (των οποίων η απορρόφηση δεν υπερβαίνει τα 0,100 AU) κατά τη μέτρηση και υπολογίζεται από την κλίση (λ^E) στο πρώτο σημείο διακρίβωσης:

$$\lambda_1^E = \frac{\Delta E_{cal}}{\Delta I} = \frac{E_1 - E_0}{I_1 - I_0} \tag{44}$$

Ο παράγοντας $\widehat{w}_{\delta R_{zr}}$ δίνεται από τη σχέση:

$$\widehat{w}_{\delta R_{zr}} = \frac{\lambda_1^E}{2\sqrt{3}} \tag{45}$$

Τέλος, ο παράγοντας $\widehat{w}_{\delta R_{stb}}$ αποδίδει τη συνεισφορά της ολίσθησης που υπεισέρχεται στο ισοζύγιο λόγω της χρονικής σταθερότητας του οργάνου. Θεωρώντας ότι οι μετρήσεις δεν διαρκούν περισσότερο από μία ώρα, δίνεται από τη σχέση:

$$\widehat{w}_{\delta R_{stb}} = \frac{\Delta A_{drift}}{2\sqrt{3}A_{max}} \tag{46}$$

όπου ΔA_{drift}, η μέγιστη ωριαία ολίσθηση του φασματοφωτομέτρου, όπως προδιαγράφεται από τον κατασκευαστή του.

Κατά συνέπεια, η συνολική διακύμανση της ένδειξης της μετρούμενης απορρόφησης κατά τη χρήση του φασματοφωτομέτρου είναι:

$$\begin{aligned} u_R^2 &= u^2_{\delta R_{rep}} + 2u^2_{\delta R_{dig}} + u^2_{\delta R_{flat}} \\ &+ \left(\widehat{w}^2_{E_{appr}} + \widehat{w}^2_{\delta R_\lambda} + \widehat{w}^2_{\delta R_{sl}} + \widehat{w}^2_{\delta R_{op}} + \widehat{w}^2_{\delta R_C} + \widehat{w}^2_{\delta R_{temp}} + \widehat{w}^2_{\delta R_{zr}} + \widehat{w}^2_{\delta R_{stb}}\right) R^2 \end{aligned} \tag{47}$$

και η διευρυμένη αβεβαιότητά της δίνεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$U_R = 2a_w + \left(|a| + \frac{U_{max} - 2a_w}{A_{max}}\right) R \qquad (48)$$

όπου U_{max} η διευρυμένη αβεβαιότητα για μέγιστη απορρόφηση και a η κλίση της ευθείας της συνάρτησης προσέγγισης της απόκλισης ως προς την ένδειξη του φασματοφωτομέτρου, που διέρχεται από την αρχή των αξόνων (εξίσωση 26).

3. Συμπεράσματα – Πρόταση

Πλέον, έχουμε στη διάθεσή μας όλα τα δεδομένα που χρειάζονται για την κατάστρωση ενός αναλυτικού ισοζυγίου αβεβαιοτήτων, χρησιμοποιώντας τα χαρακτηριστικά των υλικών αναφοράς, του υπό διακρίβωση εξοπλισμού και των συνθηκών που επικρατούν. Στον Πίνακα 1 παρατίθεται ένα ενδεικτικό ισοζύγιο αβεβαιοτήτων ενός φασματοφωτομέτρου UV/Vis που χρησιμοποιείται στα 235 nm.

Πίνακας 1: Ισοζύγιο αβεβαιοτήτων κατά τη διακρίβωση και τη χρήση φασματοφωτομέτρου UV/Vis.

ΙΣΟΖΥΓΙΟ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΩΝ

κατά τη διακρίβωση						
R (mAU)	0,0000	0,2460	0,4930	0,7420	0,9925	1,2450
E (mAU)	0,00000	0,80000	0,84000	3,28000	1,30000	1,60000
$s(\delta I_{rep})$ (mAU)	0,11738	0,11738	0,11738	0,11738	0,11738	0,11738
$u(\delta I_{dge})$ (mAU)	0,02887	0,02887	0,02887	0,02887	0,02887	0,02887
$u(\delta I_{dgc})$ (mAU)	0,02887	0,02887	0,02887	0,02887	0,02887	0,02887
u(I) (mAU)	0,1243	0,1243	0,1243	0,1243	0,1243	0,1243
m_N (AU)	0,0000	0,2452	0,4922	0,7387	0,9925	1,2434
$u(\delta A\varepsilon)$ (mAU)	0,0000	0,1984	0,3975	0,5983	0,8003	1,0039
$u(\delta Awl)$ (mAU)	0,0000	0,0691	0,1384	0,2084	0,2787	0,3496
$u(\delta Asl)$ (mAU)	0,0000	0,0191	0,0529	0,1133	0,2213	0,4154
$u(\delta AC)$ (mAU)	0,0000	0,0846	0,1696	0,2553	0,3414	0,4283
$u(\delta Aop_1)$ (cm)	0,0000	0,0479	0,0959	0,1443	0,1931	0,2422
$u(\delta A_{ref})$ (mAU)	0,0000	0,2322	0,4669	0,7073	0,9597	1,2428
u(E) (mAU)	0,1243	0,2634	0,4831	0,7181	0,9677	1,2490
ν_{eff}	6,3	127	1435	7004	23095	64106
k	2,52	2,02	2,00	2,00	2,00	2,00
U(E) (mAU)	0,3127	0,5321	0,9671	1,4364	1,9354	2,4981

κατά τη χρήση						
R(AU)	0,0000	0,2460	0,4930	0,7420	0,9925	1,2450
E (mAU)	0,000	0,800	0,840	3,280	1,300	1,600
E_{appr} (mAU)	2,384E-03 x R					
$u(E_{appr})$ (mAU)	4,460E-04 x R					
$s(\delta R_{rep})$ (mAU)	0,1174					
$u(\delta R_{dge})$ (mAU)	0,0289					
$u(\delta R_{dgc})$ (mAU)	0,0289					
$\hat{w}(\delta R_{ref})$	0,2309					
$\hat{w}(\delta R_{zab})$	1,391E-04					
$\hat{w}(\delta R_{temp})$	1,475E-04					
$\hat{w}(\delta Straylight)$	3,907E-04					
$\hat{w}(\delta op)$	2,20E-03					
$\hat{w}(\delta R_{zero})$	9,39E-04					
$\hat{w}(\delta Rwl)$	2,24E-04					
α_w^2	6,88E-02					
β_w^2	6,144E-06					
u(R) (mAU)	0,2623	0,6638	1,2498	1,8578	2,4741	3,0971
ν_{eff}	224,3	3876,5	4993,7	4922,2	4865,2	4833,3
k	2,01	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
U(R) (mAU)	0,5275	1,3280	2,5003	3,7166	4,9494	6,1959

Προσέγγιση σφάλματος ένδειξης φωτόμετρου κατά τη διακρίβωσή του :

E_{appr} = 0,0024 R (mAU)

$u^2(E_{appr})$ = 8,8E-08 $(mAU)^2$ 1,99E-07 $[R(mAU)]^2$

$U(E_{appr}) \approx$ 0,0009 R(mAU)

Αβεβαιότητα υπολογισμού σφάλματος ένδειξης φωτομέτρου κατά τη

$U(E_{appr})$ (mAU) 5,93E-04 + 0,422 [R(AU)]

Διευρυμένη αβεβαιότητα ζύγισης μετά από διόρθωση της ένδειξης

$U^2(R)$ = 0,2751 $(mAU)^2$ + 2,46E-05 R^2

U(R) (lin) = 0,5245 mAU + 4,56E-03 R

Διευρυμένη αβεβαιότητα της ένδειξης χωρίς διόρθωση

U(R) = 0,5245 mAU + 6,940 R (AU)

Η τυπική αβεβαιότητα των τιμών των μηκών κύματος του διάλυματος οξειδίου του ολμίου που χρησιμοποιείται κατά κόρον ως υλικό αναφοράς στη διακρίβωση δίνεται στη διεθνή βιβλιογραφία για κάθε μία από τις κορυφές απορρόφησης του φάσματός του (Travis et al., 2005), ενώ για άλλα υλικά αναγράφεται στο πιστοποιητικό τους και υπολογίζεται από τη σχέση U/k, όπου k ο αναφερόμενος συντελεστής κάλυψης. Το ίδιο ισχύει για τις τιμές αναφοράς των απορροφήσεων σε διάφορα μήκη κύματος, όπου διαλύματα διχρωμικού καλίου είναι τα υλικά επιλογής (NIST, 1977).

Ως αβεβαιότητα του μήκους κύματος (u_λ), ο χρήστης μπορεί να χρησιμοποιήσει είτε την εκτίμηση που διαμορφώνεται ακολουθώντας την πορεία που περιγράφεται στην ενότητα 2.1, είτε την ακρίβεια επιλογής του μήκους κύματος ($\Delta\lambda$), όπως αυτή δηλώνεται στις προδιαγραφές του εξοπλισμού, θεωρώντας ότι ακολουθεί τετραγωνική κατανομή

Σε ό,τι αφορά στην αβεβαιότητα που μπορεί να αποδοθεί στην οπτική διαδρομή του φασματοφωτομέτρου, θεωρούμε ότι χρησιμοποιούνται κυψελίδες χαλαζία, με ανοχή καλύτερη από 0,05%, ότι η γωνία τοποθέτησής τους στο φωτόμετρο δεν μπορεί να είναι χειρότερη από 3° και άρα η οπτική διαδρομή δεν μεταβάλλεται περισσότερο από 0,00044 AU για A = 1 AU. Ακόμη, θα θεωρήσουμε ότι το φασματοφωτόμετρο πληροί τις απαιτήσεις λειτουργίας της ευρωπαϊκής φαρμακοποιίας και κατά συνέπεια δεν παρατηρούνται αποκλίσεις που οφείλονται στην αδυναμία υλοποίησης μονοχρωματικής ακτινοβολίας, ενώ η μέγιστη διαφορά απορρόφησης που οφείλεται σε παράσιτη ακτινοβολία για A = 1 AU θα είναι 0,00039 AU. Επίσης, τα φαινόμενα ανάκλασης και διάθλασης στην κυψελίδα μέτρησης δεν θα αποφέρουν διαφορές μεγαλύτερες από 0,00072 AU. Τέλος, η χρήση αφορά υδατικά διαλύματα σταθερής μοριακής απορροφητικότητας ($\Delta\epsilon^{T}$ < 0,1%).

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, έχουμε τη δυνατότητα να καταρτήσουμε ένα ολοκληρωμένο ισοζύγιο αβεβαιοτήτων, που μας επιτρέπει να εκτιμήσουμε την αβεβαιότητα της απορρόφησης ως συνάρτηση της ένδειξης ενός φασματοφωτομέτρου UV/Vis, ενώ στο αντίστοιχο πιστοποιητικό διακρίβωσης δίνεται μια έκφραση της απόκλισης των μετρήσεων του φασματοφωτομέτρου ως γραμμική συνάρτηση της ένδειξής του για την περιοχή μέτρησης 0 – 1,5 AU.

4. Βιβλιογραφία

ASTM E275: "*Standard practice for describing and measuring performance of ultraviolet and visible spectrophotometers*". ASTM Standards; Vol. 03.06, , ASTM: Πενσιλβάνια, 2013.

ASTM E925: "*Standard practice for monitoring the calibration of ultraviolet-visible spectrophotometers whose spectral slit width does not exceed 2 nm*". ASTM Standards; Vol. 03.06, 2009 ASTM: Πενσιλβάνια, 2013.

BIPM, IEC, IFCC, ILAC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML: "*Evaluation of Measurement Data - Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*"., JCGM 100, BIPM: Παρίσι

Burnett R.W., "*Accurate measurement of molar absorptivities*". J. Res. Natl. Bur. Stds, 76A(5), p483, 1972, Ουάσινγκτον

EP-European Pharmacopoeia: "2.2.25. Absorption spectrophotometry, ultraviolet and visible", ed 8.0, EDQM, 2014, Στρασβούργο.

EURAMET, "*Guidelines on the calibration of non-automatic weighing instruments*". V4.0, 2015, Μπραουνσβάιχ.

Goldring L.S, Hawes R.C., Hare G.H., Beckman O.A., Stickney M.E., "*Anomalies in extinction coefficient measurements*". Anal. Chem., 25(6), p843, 1953, Ουάσινγκτον.

NIST: "*Certification and use of acidic potassium dichromate solutions as an ultraviolet absorbance standard – SRM 935*". 1977, USGPO: Ουάσινγκτον.

O'Harver T.C., "*Effect of the source/absorber width ratio on the signal-to-noise ratio of dispersive absorption spectrometry*". Anal. Chem., 63, p164, 1991, Ουάσινγκτον

OIML, "*Spectrophotometers for medical laboratories*", 135, BIML: Παρίσι 2004.

Travis J.C., Acosta J.C., Andor G., Bastie, J. et al., "*Intrinsic wavelength standard absorption bands in holmium oxide solution for uv/visible molecular absorption spectrophotometry*". J. Phys. Chem. Ref. Data, 34(1), p41, Μέλβιλ, 2005.