VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS FAKULTETAS
ANALIZINĖS IR APLINKOS CHEMIJOS KATEDRA

Andrius Choromanskis

Pagrindinių studijų programa Chemija – 4 kursas

NUSTATYMO RIBOS MATAVIMO BŪDŲ SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJOJE PALYGINIMAS

Bakalauro studijų baigiamasis darbas

Darbo vadovas: prof. habil. dr. A. Padarauskas

_____

(Vadovo mokslinis laipsnis, mokslo pedagoginis vardas, vardas, pavardė)

Įvertinimas:

_____

(Data, įvertinimas, parašas)

Vilnius, 2016

TURINYS

Įvadas 3

I. Literatūros apžvalga 4

1.1. Chromatografinių metodų validavimas 4

1.2. Nustatymo ribos matavimas skysčių chromatografijoje 8

1.2.1. S/N metodas 8

1.2.2. Linijinės regresijos metodas 9

1.2.3. Eurachem metodas 10

II. Eksperimento metodika 11

2.1. Aparatūra 11

2.2. Reagentai ir tirpalai 11

III. Rezultatai ir jų aptarimas 12

3.1. Analičių, mėginio ir chromatografijos sąlygų parinkimas 12

3.2. Instrumentinės nustatymo ribos matavimo būdų palyginimas 13

3.3. Metodo nustatymo ribos matavimo būdų palyginimas 18

IŠVADOS 24

SUMMARY 25

Literatūra 26

Įvadas

Nustatymo riba yra viena iš svarbiausių cheminės analizės metodo charakteristikų. Skysčių chromatografijoje (taip pat ir kai kuriuose kituose metoduose) šis parametras gali būti matuojamas tarptautinių organizacijų įteisintais bent keliais skirtingais būdais. Teoriškai, skirtingu būdu nustatytos nustatymo ribos statistiškai neturėtų skirtis. Deja, dažnai skirtingose laboratorijose konkrečių analičių nustatymui išmatuotos nustatymo ribos smarkiai skiriasi. Tai įneša sumaišties atliekant tarplaboratorinius tyrimus bei pritaikant mokslinėse publikacijose aprašytus metodus praktikoje. Todėl buvo įdomu praktiškai patikrinti, ar skiriasi tai pačiai analizinei sistemai skirtingais būdais įvertintos nustatymo ribos.

Darbo tikslas – pasirinktai analičių/mėginio sistemai skysčių chromatografijos metodu skirtingais būdais išmatuoti ir palyginti nustatymo ribas.

Darbo uždaviniai:

1. Išmatuoti instrumentines nustatymo ribas.
2. Išmatuoti metodo nustatymo ribas.
3. Palyginti skirtingais būdais išmatuotas nustatymo ribas bei įvertinti jų tinkamumą.

I. Literatūros apžvalga

1.1. Chromatografinių metodų validavimas

Validavimas ir kokybės užtikrinimas, tai terminai, kurie yra plačiai vartojami cheminėje analizėje. Vis dėlto dauguma analitikų nežino nei tikrosios šių terminų reikšmės, nei skirtumų ar ryšio tarp jų. Metodo validavimas reiškia tyrimą, kuriuo norima išsiaiškinti ar analizės metodo tikslas pasiektas, t.y. ar analizės rezultatai išmatuojami su tam tikra priimtina neapibrėžtimi [1].

Parametrai, kurie privalo būti vertinami validuojant metodą priklauso nuo metodo tikslo. ICH (International Conference on Harmonization) pagal analizės tikslus išskiria tris pagrindines analizės metodų grupes: identifikavimo testai, priemaišų (užterštumo) testai ir reali analizė. Identifikavimo testai patvirtina analitės buvimą mėginyje, palyginant mėginį su žinomom kontrolinėm medžiagom. Priemaišų testai yra naudojami patvirtinti priemaišų kilmę (ribinis priemaišų testas) arba tiksliai nustatyti (kiekybinis priemaišų testas) priemaišų kiekį. Realioji analizė taikoma pagrindinio komponento ar aktyvaus ingrediento nustatymui mėginyje, kaip pavyzdžiui, medikamentinio ingrediento nustatymas vaistuose. Skirtingai nei priemaišų testuose, realios analizės testuose, kur pagrindinio ieškomo komponento koncentracija turėtų būti didelė, vertinamų parametrų vertės yra kitos. Tas pats galioja ir kiekybinio priemaišų nustatymo testams lyginant su identifikaciniais ir ribiniais priemaišų testais (1.1 lentelė) **[**2-5**]**.

1.1 lentelė. Parametrai, kuriuos reikia įvertinti validuojant analizės metodus.

Metodo parametras	Identifikaciniai testai	Priemaišų testai		Reali analizė
		Ribiniai priemaišų testai	Kiekybiniai priemaišų testai	
Tikslumas	-[a]	-	+	+
Teisingumas	-	-[a]	+	+
Specifiškumas	+	+	+	+
Aptikimo riba	-[a]	+	-	-
Nustatymo riba	-[a]	-	+	-
Tiesiškumas	-[a]	-	+	+
Riba	-[a]	-[a]	+	+
Atsparumas	+	+	+	+

[a] - gali būti nustatomas

Tikslumas - dydis, kuris esant normaliomis sąlygomis parodo analizės rezultatų atsikartojamumo laipsnį bei išreiškiamas santykiniu standartiniu nuokrypiu (SSN, %) statistiškai reikšmingam mėginių skaičiui. Tikslumo kriterijus priklauso nuo analitės koncentracijos mėginyje ir svyruoja nuo 2% labai didelėms analitės koncentracijoms, iki 30% analitės pėdsakams. Remiantis ICH gairėmis [6], tikslumas turėtų būti vertinamas 3 skirtingomis pakopomis: pasikartojamumu, tarpiniu tikslumu ir atkuriamumu.

Pasikartojamumas - tomis pačiomis analizės sąlygomis (ta pati laboratorija, tas pats prietaisas ir operatorius) per trumpą laiko intervalą gautų analizės rezultatų tikslumas. Jis turi būti nustatytas mažiausiai iš 9 matavimų apimant visą analitės koncentracijų sritį (pavyzdžiui, 3 koncentracijos – 3 matavimai kiekvienai koncentracijai) arba mažiausiai 6 matavimai esant 100% tikslinės analitės koncentracijai. Remiantis FDA (Food and Drug administration) [7], chromatografo tikslumui ar mėginio injekcijų pasikartojamumui įvertinti, turėtų būti atlikta 10 vieno mėginio injekcijų.

Tarpinis tikslumas – toje pačioje laboratorijoje skirtingomis dienomis, skirtingų operatorių, skirtingais prietaisais ir pan. gautų rezultatų tikslumas. Nustatant tarpinį tikslumą turėtų būti sudarytas toks eksperimento planas, kad kiekvieno individualaus kintamojo įtaka (jei ji yra) būtų kontroliuojama. Tiriant priemaišas ir esant nustatymo ribai instrumento tikslumas turi būti $\leq 5\%$, o vidaus tyrimų $\leq 10\%$.

Atkuriamumas įvertinamas analizuojant tuos pačius mėginius skirtingose laboratorijose ir yra tarplaboratorinių kryžminių tyrimų dalis. Šio parametro paskirtis – įvertinti, ar tuo pačiu metodu skirtingose laboratorijose atliktų analizių rezultatai statistiškai nesiskiria. Pavyzdžiui, priemaišų metodams skirtingose laboratorijose gauti rezultatai laikomi statistiškai ekvivalentiškais, kai jų vidurkiai svyruoja per ±10% nuo vertės, kuri gauta pirminėje priemaišų tyrimų laboratorijoje.

Teisingumas yra išreiškiamas kaip skirtumas tarp išmatuotos analitės vidutinės koncentracijos ir tiksliai žinomos jos koncentracijos [8]. Jei analitės koncentracija nėra tiksliai žinoma, tuomet vietoje jos naudojama taip vadinama priimtinoji (angl. *accepted*) jos koncentracija. Teisingumas charakterizuoja išmatuotų rezultatų sisteminius nukrypimus nuo tikrosios vertės [9].

Paprastai teisingumas yra išmatuojamas analizuojant sertifikuotas pamatines medžiagas (SPM), kuriose tiksliai žinoma analitės koncentracija. Deja, dažnai tiriamiems mėginiams tokių

SPM nėra. Tokiais atvejais teisingumas vertinamas standartinių priedų testu, kuomet į tiriamo mėginio matricą pridedamas tiksliai žinomas analitės kiekis ir, atlikus analizę, apskaičiuojama pridėtos analitės išgava. Išgava yra apskaičiuojama kaip procentinė nustatytos analitės dalis nuo pridėtos jos dalies. Kuo išgavos labiau nukrypusios nuo 100%, tuo smarkiau įtakojami ir mažiau teisingi analizės rezultatai [1,3,4,10,11].

Teisingumas taip pat gali būti įvertintas atlikus to paties mėginio analizę kitu, jau įteisintu analizės metodu, kurio tikslumas yra žinomas. Dviem metodais gauti rezultatai statistiškai palyginami ir taip įvertinamas validuojamo metodo teisingumas.

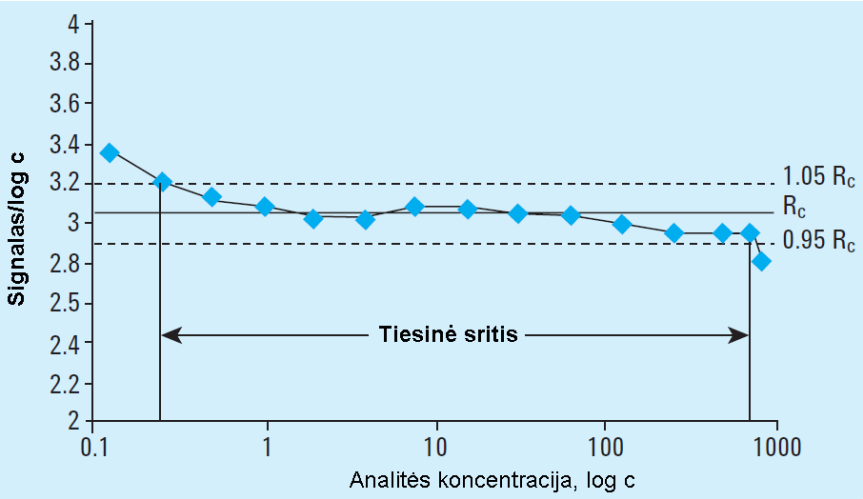
Specifiškumas yra metodo atrankumas analitei. Jis parodo pašalinių junginių (pvz., analitės izomerų, metabolitų, skilimo produktų, matricos komponentų, pridedamų reagentų ir pan.) įtaka analitės nustatymui. Metodo specifiškumo įvertintinimui reikia:

- pasirinkti su analite chemiškai susijusius (metabolitus, derivativus ir pan.) bei kitus galinčius būti mėginiuose junginius;
- analizuoti atitinkamą skaičių „tuščių“ mėginių ir patikrinti ar neatsiranda trukdžių (signalų, smailių ir pan.) regione, kuriame turi būti registruojama analitė;
- papildomai į „tuščius“ mėginius pridėti reikšmingus kiekius galinčių trukdyti analitės identifikavimui ir/ar kiekybiniam nustatymui junginių, išanalizuoti ir įvertinti, ar pašalinių junginių buvimas neįtakoja analitės identifikavimo bei kiekybinio nustatymo.

Tiesiškumas ir ribos. Tiesiškumas – analitės koncentracijų intervalas, kuriame galioja tiesinė priklausomybė tarp matuojamo signalo intensyvumo ir analitės koncentracijos. Įvertinant analizinio metodo tiesiškumą, vien tik apskaičiuoti regresijos lygtį nepakanka. Tam dar reikia apskaičiuoti liekamąsias vertes (angl. *residual values*), kurios parodo skirtumą tarp tikrosios y vertės ir kiekvienai x reikšmei iš regresijos kreivės nustatytos y vertės. Jei liekamosios vertės, apskaičiuotos iš paprastos tiesinės regresijos yra atsitiktiniu būdu (nesistemingai) pasiskirsčiusios apie regresijos liniją, tiesiškumas yra patvirtinamas. Priešingu atveju priklausomybė nėra tiesinė [1,12-14].

Alternatyvus būdas, patvirtinant teisiškumą pavaizduotas 1.1 pav. Grafiškai atidedama signalo ir analitės koncentracijos logaritmo santykio priklausomybė nuo analitės koncentracijos logaritmo. Gauta linija turėtų būti horizontali per visą linijinę sritį su teigiamu nuokrypiu esant

mažoms analitės koncentracijoms ir su neigiamu, esant didelėms. Tiesiškumo srities ribos – 5% nuokrypis nuo horizontalios linijos [3].



1.1 pav. Alternatyvus būdas tiesiškumui įvertinti.

Atliekant analizes kalibracinė kreivė turi būti matuojama kasdien. Būtina atkreipti dėmesį, kad tiesinė sritis gali kisti, keičiantis mėginio matricai. Įprastai matricos įtakos įvertinimui naudojamas standartinių priedų metodas. Sudaromos dvi kalibracinės: viena ruošiant analitės standartus mėginio matricoje, o kita – gryname tirpiklyje. Vienodi abiejų kalibracinių polinkiai (kreivės yra lygiagrečios) rodo, kad matricos įtaka nereikšminga [13,14].

Metodo **ribos** – analitės koncentracijų intervalas, kuriame analitės nustatymo charakteristikos (specifiškumas, tikslumas, teisingumas ir kt.) tenkina validavimo procedūrai keliamus reikalavimus.

Atsparumo įvertinimui Eurachem rekomenduoja metode įvesti sąmoningus pakeitimus, pavyzdžiui, skirtingos dienos, laborantai, reagentai, darbo priemonės, skirtingas mėginio paruošimas ar mėginio paruošimui naudojamos medžiagos. Kiekvienas pakeitimas turi būti atliktas atskirai ir kiekvieno pakeitimo poveikis įvertinamas tikslumu ir teisingumu [1,5,12]. Nagrinėjant įvairių faktorių poveikį, gali būti taikoma ir „faktorialinio dizaino“ metodika, kuri aprašyta von Holst ir kt. [15]. Apjungus pakeitimus metodo sąlygose ir atlikus seriją eksperimentų, galima nustatyti, kurie veiksniai turi didžiulę ar net kritinę įtaką analizės rezultatams.

ICH/USP (International Conference on Harmonization/United States Pharmacopeia) gairėse atsparumas nėra apibrėžtas atskirai, o yra išreikštas tomis pačiomis charakteristikomis kaip ir tikslumas: tai yra „atkuriamumo rezultatų laipsnis, gautas įvairiomis sąlygomis ir išreikštas santykiniu standartiniu nuokrypiu (SSN) %“ [3,5].

1.2. Nustatymo ribos matavimas skysčių chromatografijoje

Nustatymo riba - mažiausia analitės koncentracija, kuri dar gali būti kiekybiškai nustatyta reikiamu tikslumu.

Chromatografijoje (greičiausiai ir kituose metoduose) dar yra iškiriamos instrumentinė ir metodo nustatymo ribos. Instrumentinė nustatymo riba nustatoma ruošiant ir atitinkamai matuojant analičių standartinius tirpalus taip vadinamame “tuščiame” mėginyje, t.y. konkretaus mėginio matricoje, kurioje nėra analičių. Taigi, instrumentinė nustatymo riba neįvertina mėginio paruošimo analizei įtakos šiam parametrui. Tuo tarpu matuojant metodo nustatymo ribą su standartais atliekamos visos mėginio paruošimo analizei procedūros. Taigi, į metodo nustatymo ribos matavimo rezultatus savo indėlį įneša ne tik mėginio matrica, bet ir pati mėginio paruošimo procedūra.

Skysčių chromatografijoje tiek instrumentinė, tiek ir metodo nustatymo riba įprastai yra matuojama trim pagrindiniais būdais:

1) Signalo ir fono triukšmų santykio (S/N) metodu;
2) Linijinės regresijos metodu;
3) Eurachem metodu.

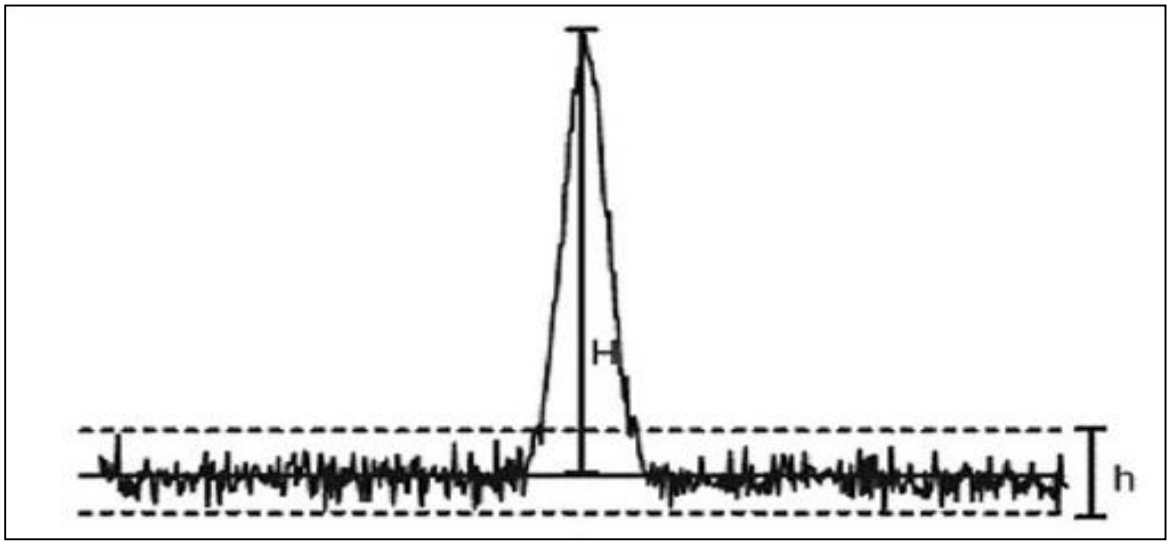
1.2.1. S/N metodas

Naudojant signalo ir triukšmo metodą nustatymo riba yra laikoma tokia analitės koncentracija, kurios signalo intensyvumas 10 kartų viršija fono triukšmų intensyvumą. Šis būdas dažniausiai naudojamas analizės metoduose, kurie patikimai registruoja fono triukšmų lygį [16]. Būtent tokiu metodu ir yra chromatografuojama.

Chromatografijoje ruošiama serija mažėjančios koncentracijos analitės standartinių tirpalų, gaunamos jų chromatogramos, kuriose išmatuojamas analitės smailės aukštis ir fono triukšmų aukštis. S/N santykis apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\frac{S}{N} = \frac{H}{h}$$

H – analitės smailės aukštis, atstumas nuo smailės viršūnės iki jos pagrindo; h - maksimalus fono triukšmų intensyvumas, išmatuotas iš abiejų smailės pusių atstumu, lygiu 20-iai smailės pločių pusėje jos aukščio (1.2 pav.). Pvz., jei smailės plotis pusėje jos aukščio yra lygus 5 sekundėms, fono triukšmai matuojami 50 s atstumu į kairę nuo smailės, ir 50 s atstumu į dešinę nuo smailės. Jei, pvz. dėl pašalinių junginių smailių, šiame intervale fono triukšmų neįmanoma registruoti, tuomet pasirenkamas atitinkamas intervalas kitoje chromatogramos srityje [17]. Šiuolaikiniuose chromatografuose S/N santykis matuojamas automatiškai. Operatoriui tereikia pasirinkti fono triukšmų matavimo sritį chromatogramoje.



1.2 pav. Signalo-triukšmų santykio įvertinimas chromatografijoje [18].

1.2.2. Linijinės regresijos metodas

Ruošiama serija analitės standartinių tirpalų mažų koncentracijų srityje (artimoje nustatymo ribai). Įprastai užtenka 4-5 kalibracinės taškų. Ruošiamos bent 5-ios tokių tirpalų serijos. Išmatuojamos jų chromatogramos ir sudaromos kalibracinės kreivės, kurios aprašomos tiesės lygtimi: $y = a + bx$. Be abejo, tiriamoje koncentracijų srityje signalo intensyvumas y turi būti

tiesiškai priklausomas nuo analitės koncentracijos x. Nustatymo riba apskaičiuojama pagal formulę [19]:

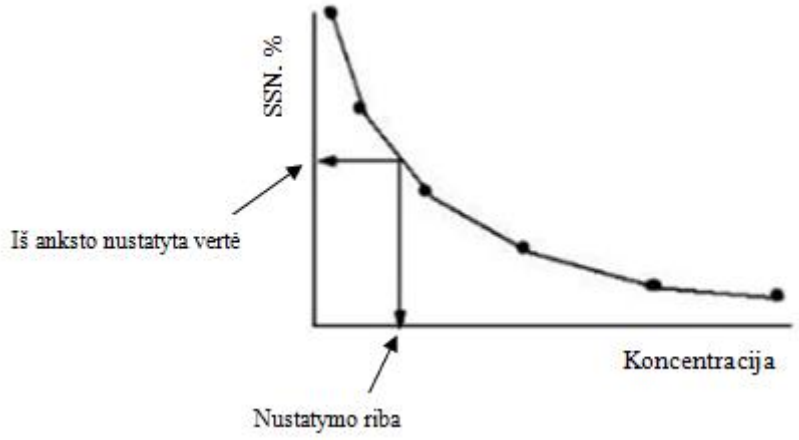
$$Nustatymo\ riba = \frac{10 \cdot S_a}{b}$$

S_a – kalibracinių kreivių atkirtų a standartinis nuokrypis; b – vidutinės kalibracinės kreivės polinkis.

Šis metodas yra universalus - gali būti taikomas visais įmanomais atvejais ir yra labiausiai tinkamas, kai analizei nedaro įtakos fono triukšmai.

1.2.3. Eurachem metodas

Eurachem siūlomame metode [16, 20] ruošiama serija analitės standartinių tirpalų su mažėjančia jos koncentracija (ne mažiau kaip po 5 kiekvienos koncentracijos tirpalus), tirpalai analizuojami ir kiekvienai koncentracijai apskaičiuojamas smailės plotų santykinis standartinis nuokrypis. Brėžiama santykinio standartinio nuokrypio (%) priklausomybė nuo analitės koncentracijos (1.3 pav.). Nustatymo riba laikoma ta analitės koncentracija, kuriai SSN vertė yra lygi duotam metodui nustatytai maksimaliai SSN vertei. Tačiau praktikoje, dėl didelio santykinių standartinių nuokrypių nepastovumo, nustatymo riba šiuo būdu yra nustatoma nelabai patikimai. Norint patikimai išmatuoti nustatymo ribą, reikia analizuoti didelį skaičių skirtingų analitės koncentracijų tirpalų.



1.3 pav. Santykinio standartinio nuokrypio (SSN) priklausomybė nuo analitės koncentracijos [21].

II. Eksperimento metodika

2.1. Aparatūra

Tyrimai buvo atliekami ultraefektyviosios skysčių chromatografijos (UPLC) sistema Waters Acquity UPLC (Waters, Milford MA), sukomplektuota iš aukšto slėgio 2 kanalų gradientinio siurblio su eliuento nudujinimu, automatinės mėginių įleidimo sistemos ir skenuojančio (200-500 nm) fotodiodinės matricos (PDA) detektoriaus.

Atskyrimai buvo atliekami atvirkščių fazių chromatografijos režime. Atskyrimui buvo naudojama Acquity UPLC BEH C18 (1,7 μm, 100 mm × 2,1 mm) kolonėlė (Waters). Judri fazė – 50:50 (v/v) H_2O/acetonitrilo tirpalas. Judrios fazės tekėjimo greitis – 0,25 mL/min. Tyrimų metu kolonėlė buvo termostatuojama 30±0,1°C tikslumu.

Duomenų vertinimas buvo atliekamas naudojantis kompiuterine chromatografijos duomenų apdorojimo programa HyStar (Bruker).

2.2. Reagentai ir tirpalai

Darbe naudotos tokios medžiagos:

Acetonitrilas (ACN), gradientinės HPLC grynumo (ROTH, Vokietija).

Metanolis, gradientinės HPLC grynumo (ROTH, Vokietija).

Etanolis, HPLC grynumo (Merk, Vokietija).

Sieros rūgštis (95-98%, Sigma-Aldrich).

Bidistiliuotas vanduo.

4-hidroksi-benzenkarboksi rūgšties etilo esteris (etilparabenas), (≥99% grynumo, Sigma-Aldrich).

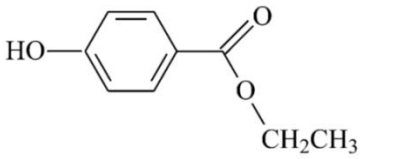
4-hidroksi-benzenkarboksi rūgšties propilo esteris (n-propilparabenas), (≥99% grynumo, Sigma-Aldrich).

Pirminis 0,500 g/L koncentracijos parabenų tirpalas buvo ruošiamas iš svėrinių tirpinant metanolyje. Mažesnių koncentracijų tirpalai buvo ruošiami skiedžiant pirminį tirpalą vandens/ACN (1:1 v/v) mišiniu.

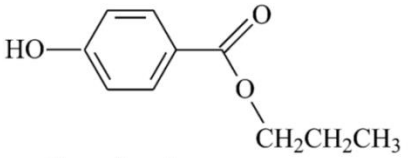
III. Rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Analičių, mėginio ir chromatografijos sąlygų parinkimas

Tyrimams pasirinkome du plačiai kosmetikoje konservantais naudojamus parabenus – etilparabeną ir n-propilparabeną. Jų struktūros pateiktos 3.1 pav. Tradiciškai šie junginiai nustatomi atvirkščių fazių chromatografijos metodu su UV detektavimu 250-270 nm bangos ilgių srityje. Pirmiausiai buvo parinktos sąlygos jų chromatografiniam atskyrimui. Ištyrėme judrios fazės sudėties (vandens ir acetonitrilo santykio) ir judrios fazės greičio įtaką parabenų atskyrimui. 3.2 pav. pateikta parabenų standartinio tirpalo chromatograma optimizuotomis sąlygomis.

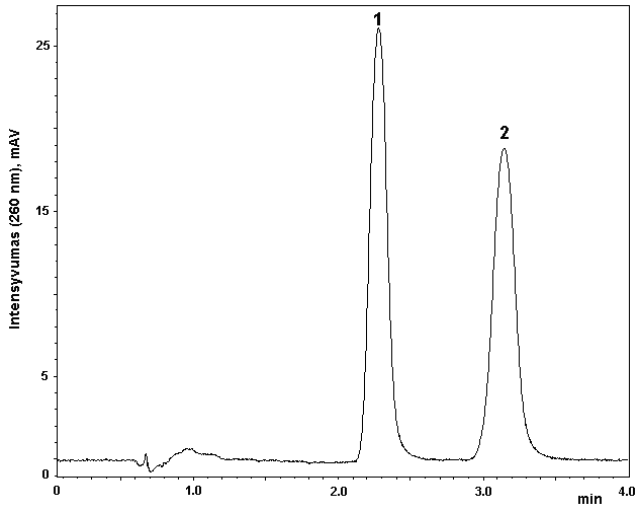


Etilparabenas



N-propilparabenas

3.1 pav. Darbe naudotų parabenų struktūros.



3.2 pav. Parabenų standartinio tirpalo (2,5 mg/L) chromatograma. 1 – etilparabenas; 2 – n-propilparabenas. Kolonėlė – BEH UPLC C18. Judri fazė: H_2O/ACN (50:50 v/v), 0,25 mL/min.

Mėginiu buvo pasirinktas natūralus drėkinantis kūno kremas be konservantų „100% Pure“. 3.3 pav. pateikta darbe naudota mėginio paruošimo analizei procedūra.



1,00 g kremo
(be arba su parabenų standarto priedu)

↓

1 mL 2M H_2SO_4 ir 50 mL EtOH/H_2O (10:1)

↓

1 min purtome

↓

5 min šildome 60 °C temperatūroje

↓

Ataušiname ir filtruojame

↓

HPLC-UV analizė

3.3 pav. Kremo mėginio paruošimo analizei procedūra.

3.2. Instrumentinės nustatymo ribos matavimo būdų palyginimas

Instrumentinė nustatymo riba matuojama ruošiant ir atitinkamai matuojant analičių standartinius tirpalus konkretaus mėginio matricoje, kurioje nėra analičių. Taigi, instrumentinė nustatymo riba neįvertina mėginio paruošimo analizei įtakos šiam parametrui.

Signalo triukšmų (S/N) santykio metodas. Kaip jau buvo minėta literatūros apžvalgoje, nustatymo riba šiuo metodu laikoma tokia analitės koncentracija, kuriai signalo ir fono triukšmų santykis lygus 10. Buvo ruošiami skirtingų koncentracijų parabenų standartiniai tirpalai kremo ekstrakte, analizuojami skysčių chromatografijos metodu ir matuojamas S/N santykis. Gauti rezultatai surašyti 3.1 lentelėje. Deja, paruošti tokios koncentracijos abiejų analičių tirpalus,

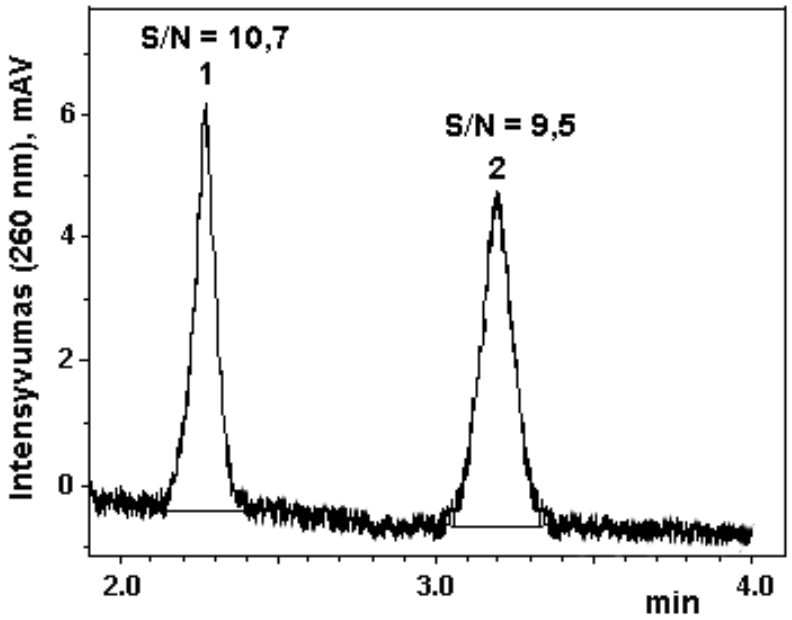
kurios tiksliai duotų S/N=10 yra gana sudėtinga. Todėl nustatymo ribos (t.y. parabenų koncentracijos, atitinkančios S/N=10) buvo gautos perskaičiavus iš S/N santykių, išmatuotų 0,50 mg/L parabenų koncentracijai. Jos pateiktos 3.2 lentelėje. Parabenų tirpalo su artimiausiomis nustatymo ribai koncentracijomis (0,5 mg/L) chromatograma pateikta 3.4 pav.

3.1 lentelė. S/N santykio priklausomybė nuo parabenų koncentracijos (n=5).

Koncentracija, mg/L	S/N santykis		S/N santykio SSN, %	
	Etilparabenas	N-propilparabenas	Etilparabenas	N-propilparabenas
0,10	2,3	1,9	26,2	24,7
0,20	4,8	3,6	17,3	16,1
0,50	**10,7**	**9,5**	12,8	11,6
1,00	22,5	21,8	7,0	8,2

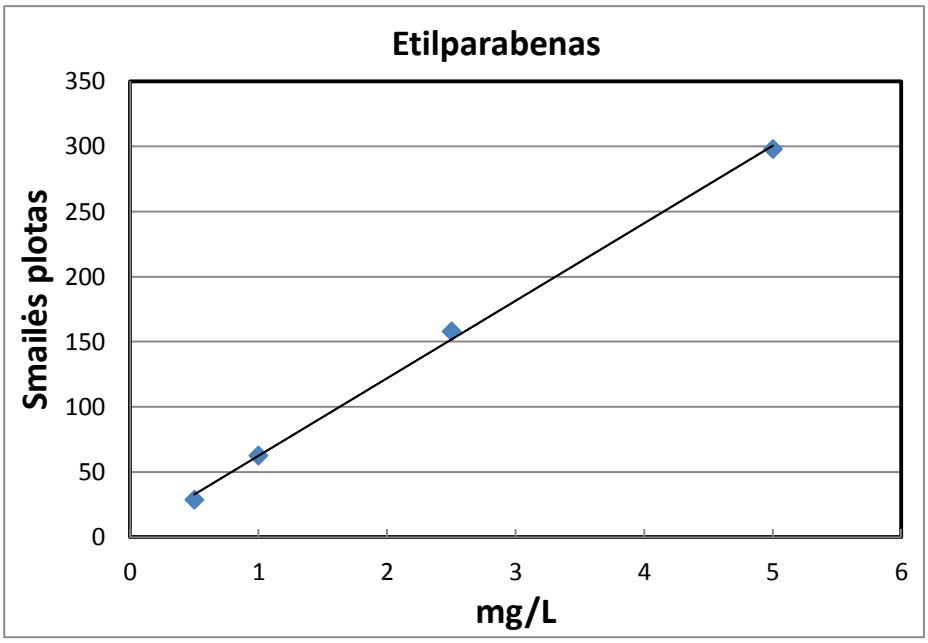
3.2 lentelė. S/N santykio būdu išmatuotos instrumentinės nustatymo ribos (n=5)

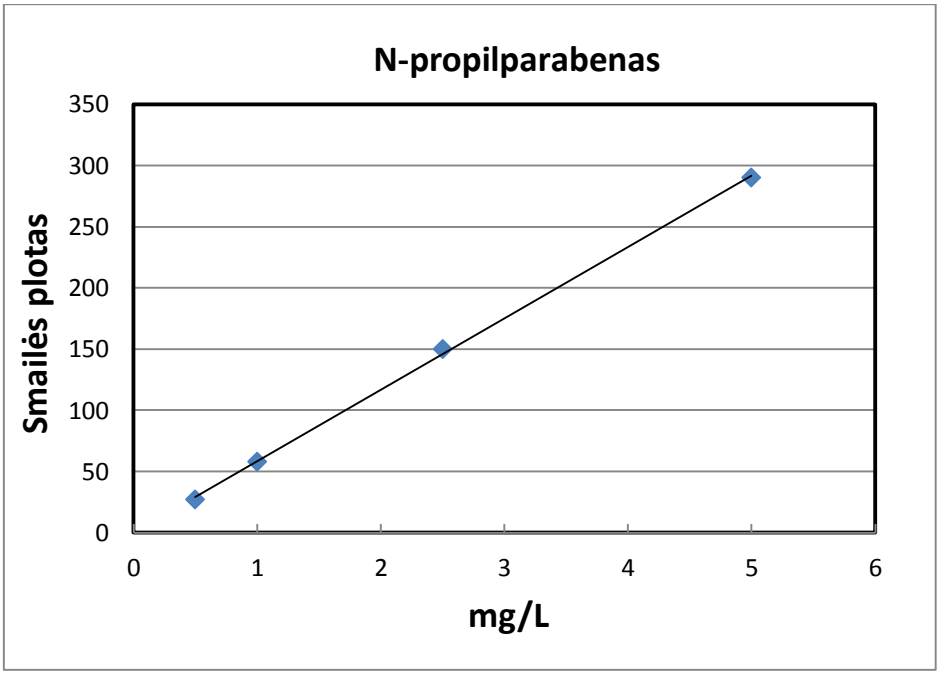
Etilparabenas	N-propilparabenas
0,47 mg/L	0,53 mg/L



3.4 pav. Parabenų standartinio tirpalo (0,5 mg/L) chromatograma. 1 – etilparabenas; 2 – n-propilparabenas.

Linijinės regresijos metodas. Buvo ruošiami keturi mažų koncentracijų parabenų standartiniai tirpalai (po 5 tirpalus kiekvienai koncentracijai) kremo ekstrakte, analizuojami ir abiem analitėms brėžiamos kalibracinės kreivės (3.5 pav.). 3.3 lentelėje surašyti kalibracinių parametrai. 3.4 lentelėje pateiktos kalibracinių atkirtos, jų standartiniai nuokrypiai ir apskaičiuotos nustatymo ribos.





3.5 pav. Parabenų kalibracinės kreivės (n=5).

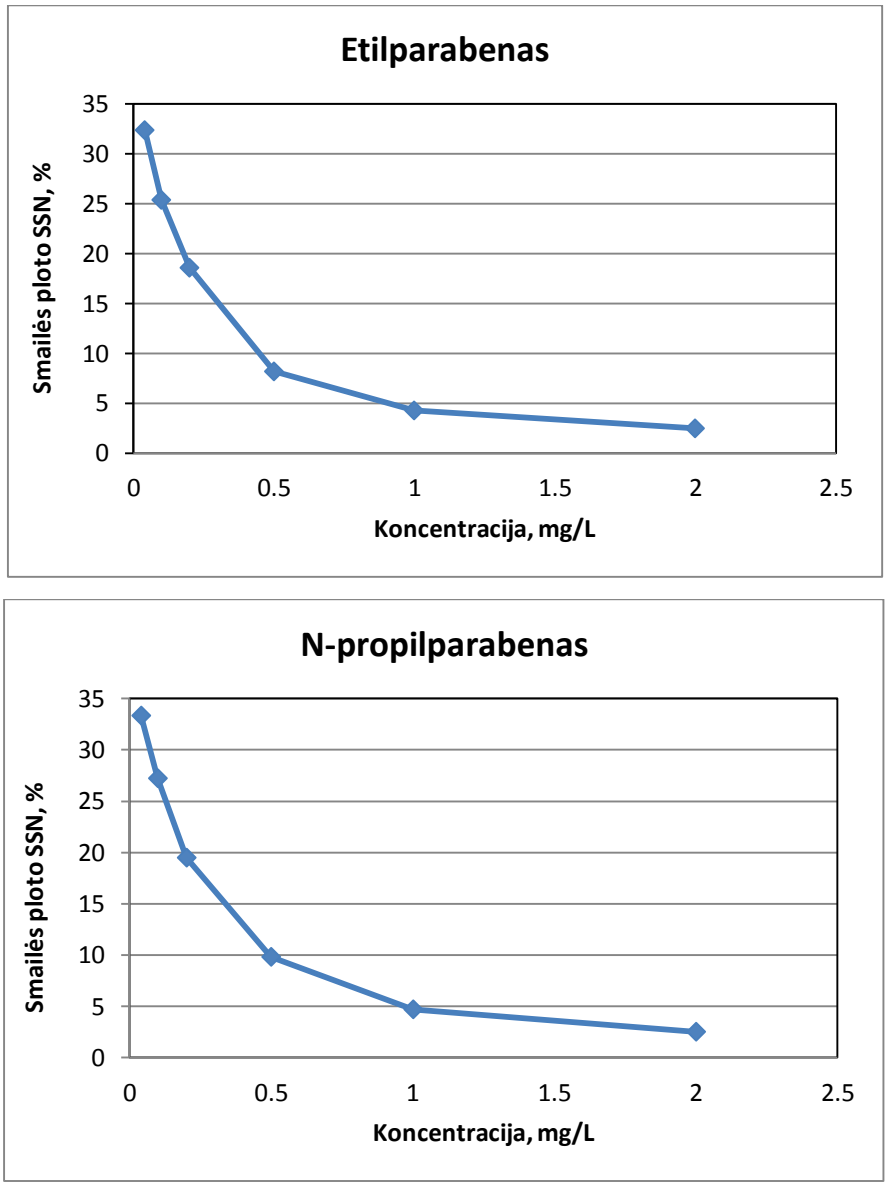
3.3 lentelė. Kalibracinių kreivių parametrai (n=5).

Parametras	**Etilparabenas**	**N-propilparabenas**
Polinkis *b*	58,507	58,374
Atkirta *a*	1,623	2,789
R^2	0,9998	0,9995

3.4 lentelė. Linijinės regresijos metodu išmatuotos instrumentinės nustatymo ribos (n=5)

Eilės Nr.	Etilparabenas			N-propilparabenas		
	Atkirta *a*	Atkirtos SN	Nustatymo riba mg/L	Atkirta *a*	Atkirtos SN	Nustatymo riba mg/L
1	2,9499	0,724	**0,12**	2,7813	0,816	**0,14**
2	2,3903			2,3889		
3	1,2428			1,4961		
4	1,5155			1,1640		
5	1,4824			0,8659		

Eurachem metodas. Eurachem siūlo efektyviojoje skysčių chromatografijoje instrumentine nustatymo riba laikyti koncentraciją, kuriai nustatomos medžiagos smailių plotų santykinis standartinis nuokrypis (SSN) neviršija 5%. Buvo ruošiama serija skirtingos koncentracijos parabenų standartų (po 5 tirpalus kiekvienai koncentracijai) kremo ekstrakto matricoje, tirpalai analizuojami, išmatuojami parabenų smailių plotai ir skaičiuojamas jų SSN. 3.6 pav. pateiktos smailių ploto SSN priklausomybės nuo parabenų koncentracijos, o 3.5 lentelėje iš paveiksle pateiktų priklausomybių apskaičiuotos parabenų nustatymo ribos.



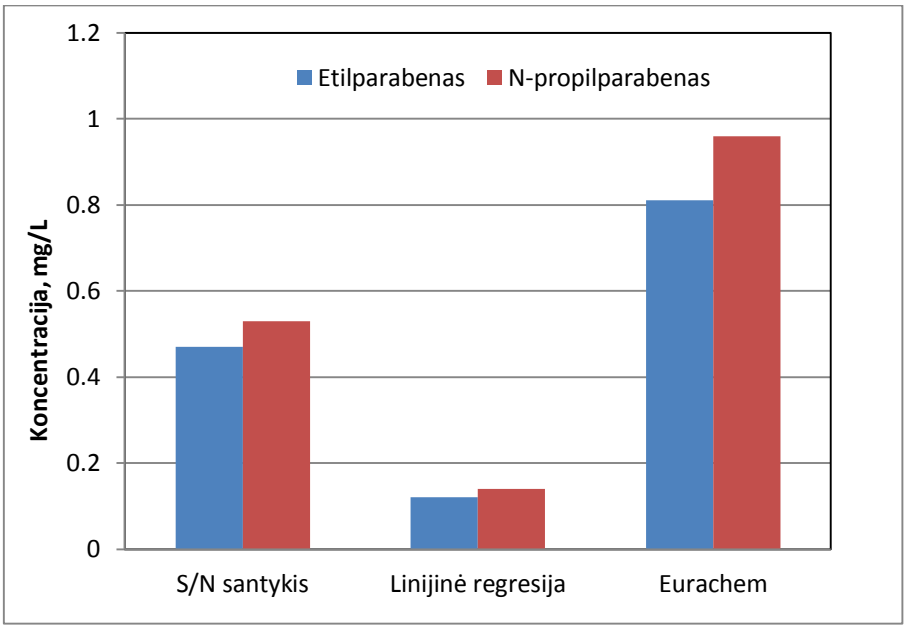
3.6 pav. Smailių ploto SSN priklausomybė nuo parabeno koncentracijos (n=5).

3.5 lentelė. Eurachem būdu išmatuotos nustatymo ribos (n=5)

Etilparabenas	N-propilparabenas
0,81 mg/L	0,96 mg/L

3.7 pav. palygintos skirtingais būdais išmatuotos instrumentinės nustatymo ribos. Matome, kad skirtingais metodais išmatuotos nustatymo ribos smarkiai (iki ~8 kartų) skiriasi. Akivaizdu, kad mažiausiai patikima linijinės regresijos metodu išmatuota nustatymo riba, kadangi

analizuojant tokių koncentracijų standartinį parabenų tirpalą registruojamos parabenų smailės vos ižiūrimos ir patikimai nesuintegruojamos.

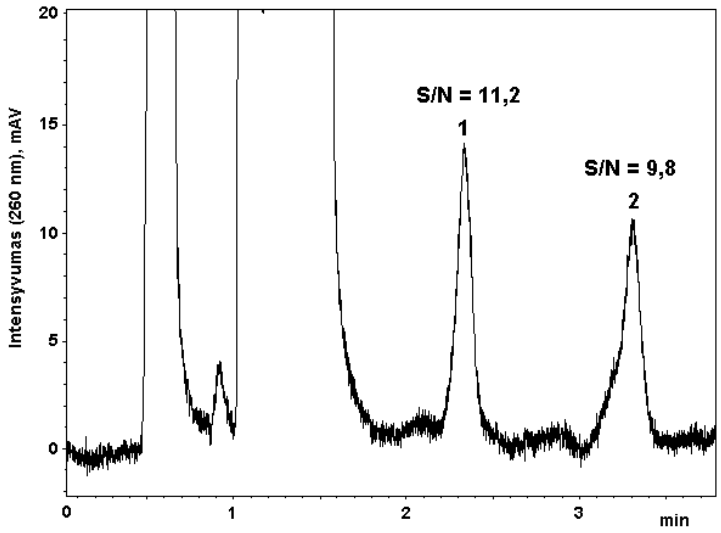


3.7 pav. Skirtingais būdais išmatuotų instrumentinių nustatymo ribų palyginimas.

3.3. Metodo nustatymo ribos matavimo būdų palyginimas

Vertinant metodo nustatymo ribas buvo atliekami 3.2 skyriuje aprašyti eksperimentai. Tačiau šiuo atveju parabenų standartai buvo dedami ne į jau paruoštą kremo mėginio ekstraktą, bet į kremo mėginį prieš ekstrakcijos procedūrą. Taigi, į metodo nustatymo ribų matavimo rezultatus savo indėlį įneša ne tik mėginio matrica, bet ir pati mėginio paruošimo procedūra.

Signalo triukšmų (S/N) santykio metodas. Parabenų tirpalo su artimiausiomis nustatymo ribai koncentracijomis (1,0 mg/L) chromatograma pateikta 3.8 pav. Gauti rezultatai surašyti 3.6 lentelėje, o apskaičiuotos metodo nustatymo ribos – 3.7 lentelėje. Metodo nustatymo ribos yra maždaug dvigubai didesnės nei analogišku būdu išmatuotos instrumentinės nustatymo ribos. Tai logiška, kadangi šiuo atveju papildomą indėlį į matavimo rezultatus įneša ir ekstrakcijos procedūra.



3.8 pav. Parabenų standarto (1,0 mg/L) kremo ekstrakte chromatograma. 1 – etilparabenas; 2 – n-propilparabenas.

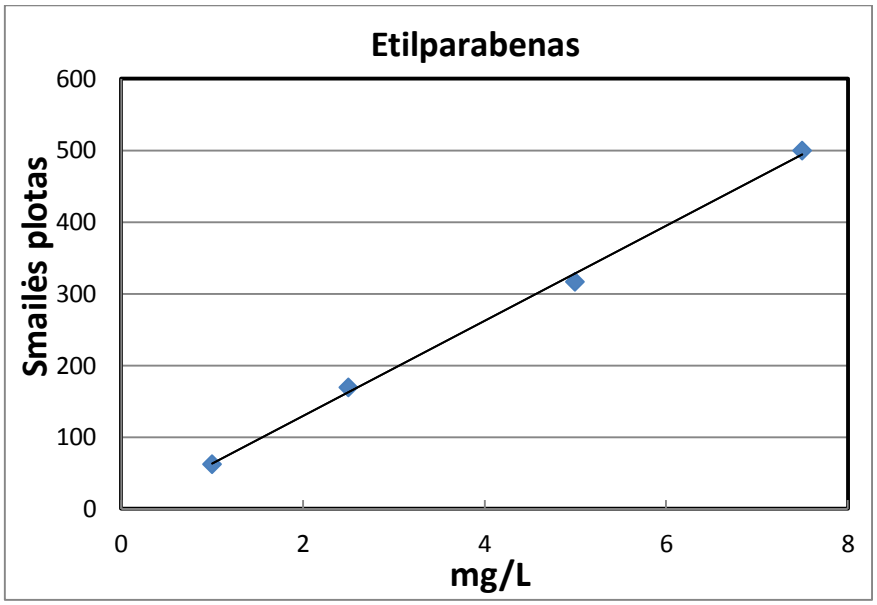
3.6 lentelė. S/N santykio ir jo SSN priklausomybė nuo koncentracijos (n=5).

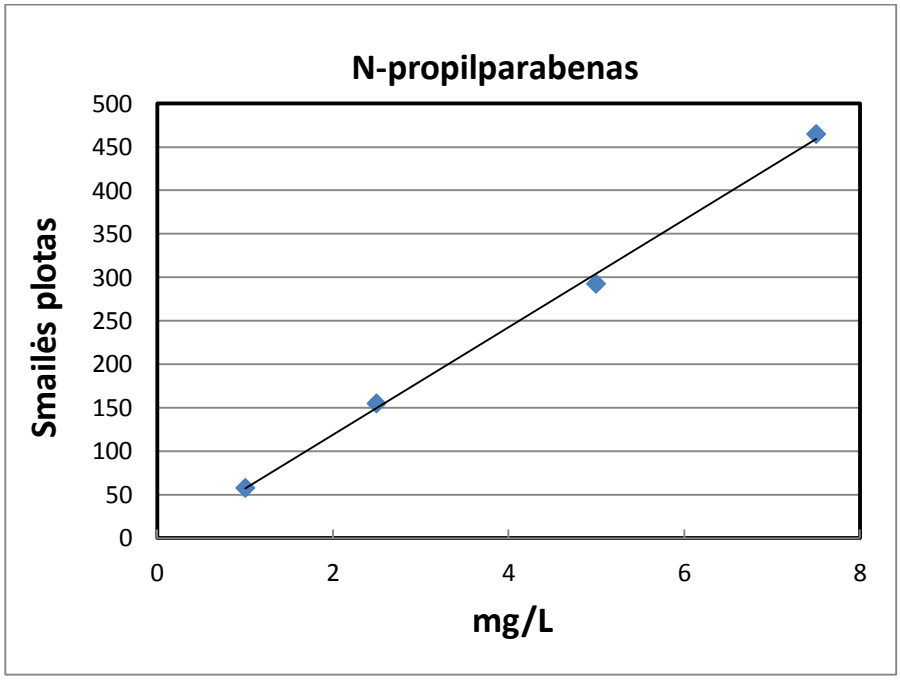
Koncentracija, mg/L	S/N santykis		S/N santykio SSN, %	
	Etilparabenas	N-propilparabenas	Etilparabenas	N-propilparabenas
0,25	2,4	2,2	32,7	30,2
0,50	5,5	4,7	18,0	21,4
1,00	11,2	9,8	13,5	12,7
1,50	16,4	14,5	8,4	7,8
2,00	22,8	20,4	7,2	8,9

3.7 lentelė. S/N santykio būdu išmatuotos metodo nustatymo ribos (n=5)

Etilparabenas	N-propilparabenas
0,89 mg/L	1,02 mg/L

Linijinės regresijos metodas. Gauti rezultatai susiteminti 3.9 pav. bei 3.8 ir 3.9 lentelėse. Matome, kad linijinės regresijos būdu išmatuotos metodo nustatymo ribos yra artimos analogišku būdu nustatytoms instrumentinėms nustatymo riboms.





3.9 pav. Parabenų kalibracinės kreivės, išmatuotos mėginio matricoje (n=5).

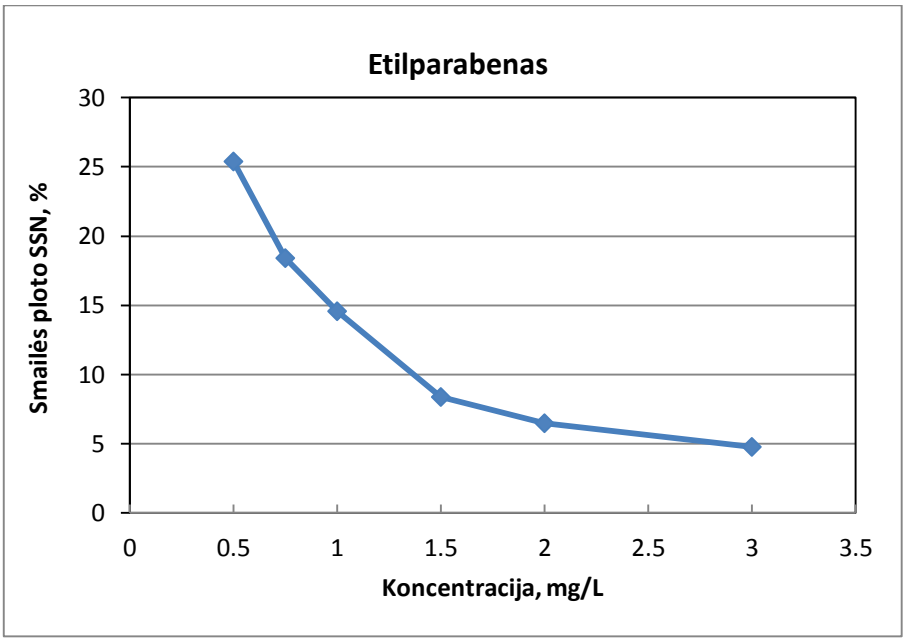
3.8 lentelė. Kalibracinių kreivių parametrai (n=5).

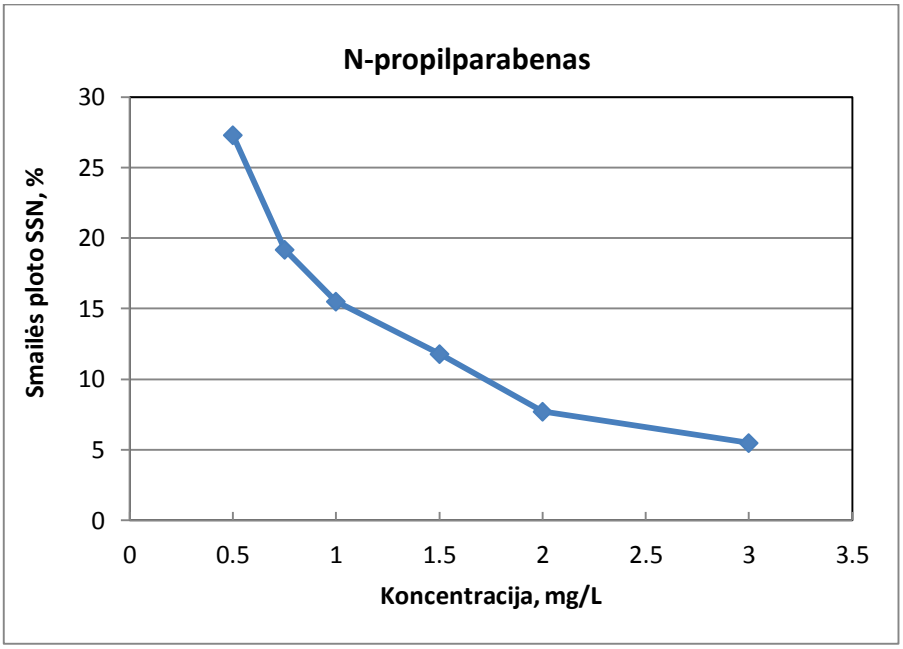
Parametras	**Etilparabenas**	**N-propilparabenas**
Polinkis *b*	56,429	51,804
Atkirta *a*	3,714	4,434
R^2	0,9981	0,9979

3.9 lentelė. Metodo nustatymo ribos išmatuotos kalibracinės kreivės metodu (n=5).

Eilės Nr.	Etilparabenas			N-propilparabenas		
	Atkirta *a*	Atkirtos SN	Nustatymo riba mg/L	Atkirta *a*	Atkirtos SN	Nustatymo riba mg/L
1	3,214	0,920	**0,16**	5,655	0,898	**0,17**
2	4,355			4,942		
3	4,885			4,315		
4	3,540			3,884		
5	2,563			3,355		

Eurachem metodas. Maksimali leistina bendra parabenų koncentracija kosmetikos produktuose skirtingose valstybėse skiriasi ir įprastai svyruoja nuo 0,1 iki 1,0% (mas.). ES nustatyta maksimali leistina bendra parabenų koncentracija yra 0,8% (mas.), o atskiro parabeno koncentracija neturi viršyti 0,4% (mas.). Tai atitinka 8 g/kg ir 4 g/kg koncentracijas. Tokių koncentracijų nustatymui ES direktyvoje numatyta, kad analizės rezultatų SSN neturi viršyti 10%. Būtent šį kriterijų ir pasirinkome metodo nustatymo ribos matavimui trečiuoju būdu. Į penkias porcijas kremo buvo pridedamas atitinkamas parabenų kiekis, atliekama ekstrakcija, ekstraktas analizuojamas, išmatuojami parabenų smailių plotai ir apskaičiuojamas jų SSN (%). Šis tyrimas buvo atliktas su 6 skirtingomis parabenų koncentracijomis intervale 0,5-3,0 mg/L. Tyrimo rezultatai tiriamiems parabenams pateikti 3.10 pav., o 3.10 lentelėje - išmatuotos metodo aptikimo ribos. Matome, kad šiuo būdu išmatuotos metodo nustatymo ribos yra apie 1,7 karto didesnės nei analogišku būdu nustatytos instrumentinės nustatymo ribos.



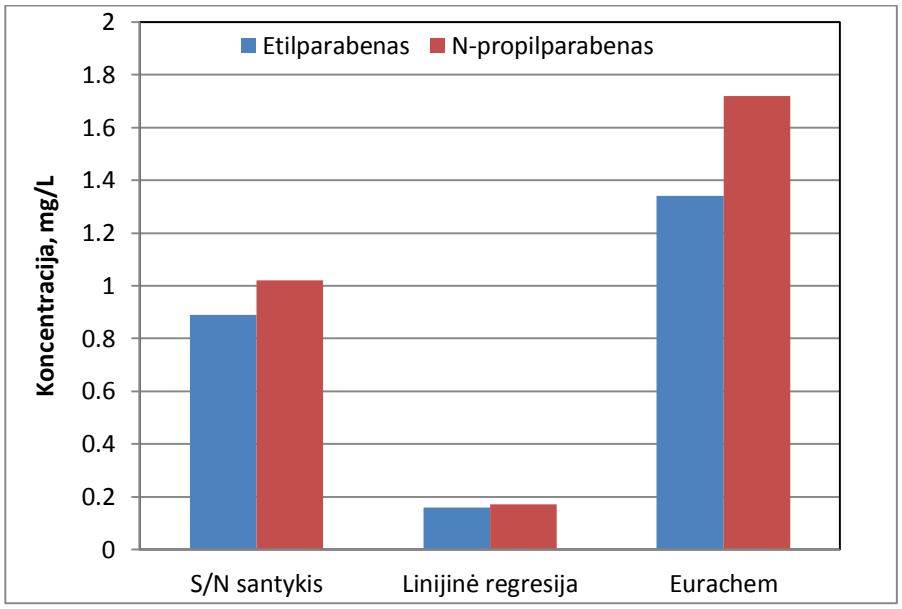


3.10 pav. Smailių ploto SSN priklausomybė nuo parabeno koncentracijos (n=5).

3.10 lentelė. Eurachem būdu išmatuotos metodo nustatymo ribos (n=5)

Etilparabenas	N-propilparabenas
1,34 mg/L	1,72 mg/L

3.11. pav. palygintos skirtingais būdais išmatuotos metodo nustatymo ribos. Matome, kad skirtingais metodais išmatuotos nustatymo ribos skiriasi analogiškai (~8 kartais) kaip ir skyrėsi instrumentinės nustatymo ribos 3.7. pav.



3.11 pav. Skirtingais būdais išmatuotų metodo nustatymo ribų palyginimas.

IŠVADOS

1. Skirtingais būdais išmatuotos parabenų nustatymo ribos reikšmingai (iki 10 kartų) skiriasi. Mažiausios nustatymo ribos (0,12-0,17 mg/L) gautos linijinės regresijos metodu, didžiausios (0,81-1,72 mg/L) – Eurachem metodu.

2. S/N ir Eurachem metodais išmatuotos metodo nustatymo ribos yra beveik 2 kartus didesnės nei tuo pačiu būdu išmatuotos instrumentinės nustatymo ribos. Tuo tarpu linijinės regresijos būdu nustatytos instrumentinė ir metodo nustatymo ribos skiriasi nežymiai. Be to, šiuo būdu išmatuotos nustatymo ribos yra nerealiai mažos, todėl šis būdas mažiausiai tinkamas.

3. Aprašant metodo validavimo procedūrą bei atliekant tarplaboratorinius tyrimus būtina aiškiai apibrėžti nustatymo ribos matavimo būdą.

COMPARISON OF THE APPROACHES TO ESTIMATE LIMIT OF QUANTIFICATION IN LIQUID CHROMATOGRAPHY

Andrius Choromanskis

GRADUATION THESIS CARRIED OUT IN DEPARTMENT OF ANALYTICAL AND ENVIRONMENTAL CHEMISTRY OF VILNIUS UNIVERSITY

Research adviser: prof. A. Padarauskas

SUMMARY

Limit of quantification (LOQ) is perhaps the most important performance characteristic in analytical method validation. In the present work three methods based on the signal-to-noise ratio, linear regression and Eurachem guidelines were compared to estimate the limits of quantification for two parabens using high performance liquid chromatography. Both, instrumental and method LOQs were estimated and compared. The results indicated that the measured LOQs were not equal and varied by a factor of 10 for the different techniques. The lowest LOQ values (0.12-0.17 mg/L) were obtained by linear regression method, the highest (0.81-1.72 mg/L) – based on Eurachem guidelines. It is therefore important to have clearly described procedure for measuring the LOQ during validation to allow interlaboratory comparison. In our opinion, the best approach was a methodology based on signal-to noise ratio.

Literatūra

1. M. Thompson, S. Ellison, R. Wood, Pure App. Chem. 74 (2002) 835;

2. ICH-Q2A, Guideline for Industry: Text on Validation of Analytical Procedures, 1995;

3. L. Huber (Ed.), Validation and Qualification in Analytical Laboratories, Interpharm Press, East Englewood, CO, USA, 1998;

4. ICH/Q2B, Guidance for Industry: Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996;

5. Waters Corporation. Validation Guidelines: Terminology and Definitions;

6. International Conference on Harmonization (ICH), Q2A: Text on Validation of Analytical procedures, US FDA Federal Register, Vol. 60, March 1995, p. 11260;

7. Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and Research, US Food and Drug Administration, 1994;

8. J. Fleming, B. Neidhar, H. Albus, W.Wegscheider, Accred. Qual. Assur. 1 (1996) 135;

9. I.S. Krull, M. Swartz, Anal. Lett. 32 (1999) 352;

10. J. Fleming, H. Albus, B. Neidhart, W. Wegscheider, Accred. Qual. Asssur. 1 (1996) 191;

11. M. Thompson, S.L.R. Ellison, A. Fajgelj, P.Willets, R. Wood, Pure Appl. Chem. 71 (1999) 337;

12. Eurachem guide: The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics, LGC, Teddington, Middlesex, UK, 1998;

13. CX/MAS 01/4, Codex Alimentarius Commision, Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling, Criteria for evaluating acceptable methods of analysis for Codex purposes, Agenda Item 4a of the 23rd Session, Budapest, Hungary, 26 February – 2 March, 2001;

14. CX/MAS 02/4, Codex Alimentarius Commision, Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling (FAO/WHO), proposed draft guidelines for evaluating acceptable methods of analysis, Agenda item 4a of the 24th Session, Budapest, Hungary, 18-22 November 2002 + CX/MAS 02/4 - Add. 2 Dispute situations;

15. C. von Holst, A. Müller, E. Björklund, E. Anklam, Eur. Food Res. Technol. 213 (2001) 154;

16. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures: Text and Methodology. ICH – Q2B, Geneva 1996;

17. European Pharmacopoeia, European Directorate for the Quality of Medicines, Strasbourg 2007;
18. A. Shrivastava, VB. Gupta, Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. Chron Young Sci 2 (2011) 21-25;
19. M. Thompson, S. Ellison, R. Wood, Harmonized guidelines for single laboratory, Validation of methods of Analysis, Pure App. Chem. 74 (2002) 835-855;
20. Analytical Procedures and Methods Validation: Chemistry, Manufacturing, and Controls, Federal Register (Notices), 65 (2006) 776-777;
21. Prieiga per internetą:
http://www.labcompliance.com/tutorial/methods/default.aspx