

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2006

Ročník X, číslo 1/ 2006

Brno 2006

Obsah

1. **Stanovení obsahu stimulátorů růstu v hnojivech – kyselina indolyloctová, kyselina indolylmásečná** 1

Lydie Dudíková a kol., Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Praha

2. **Citlivost a mez detekce při separaci v HPLC** 21

Michal Douša, Ecochem a.s., Praha

3. **Strategie výpočtů nejistot měření a návaznost měření na základě analýzy certifikovaného referenčního materiálu** 27

Michal Douša, Ecochem a.s., Praha
Jaroslava Petrová, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Praha

4. **Ověřovací (konfirmační) metody pro stanovení doplňkových látek metodou LC/MS-MS** 39

Michal Halama, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Praha

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Plné znění Bulletinů NRL (včetně grafů a obrázků) najdete i na našich webových stránkách v části věnované Národní referenční laboratoři (<http://www.ukzuz.cz>).

Stanovení obsahu stimulátorů růstu v hnojivech – kyselina indolyloctová, kyselina indolymáselná

Lydie Dudíková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Praha, Za opravnou 4,
150 06 Praha 5 – Motol,
lydie.dudikova@ukzuz.cz

Alena Breburdová, Danuše Nenáhlová, Iva Křivánková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Praha, Za opravnou 4,
150 06 Praha 5 – Motol

1 Úvod

Tato práce se věnuje stanovení kyseliny indolymáselné a kyseliny indolyloctové, které patří mezi nejčastější přírodní auxiny a používají se jako účinné látky ve stimulátorech růstu. Metody zkoušení těchto látek nejsou publikovány v příslušné Vyhlášce MZe ČR 475/2000 Sb. ze dne 13.12. 2000 o odběrech a chemických rozbořech vzorků hnojiv.

Cílem práce je navržené metody stanovení obsahu stimulátorů odzkoušet, optimalizovat podmínky stanovení stimulátorů růstu metodou HPLC a po ověření zahrnout do metod zkoušení a Standardních operačních postupů ÚKZÚZ.

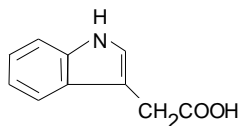
Testovaným přípravkem byl výrobek Rhizopon, který je určen pro stimulaci zakořeňování většiny rostlin a aplikuje se ve formě prášku nebo roztoku (vodorozpustné tablety).

2 Stanovení kyseliny 3-indolyloctové a 3-indolymáselné ve stimulátorech růstu metodou HPLC

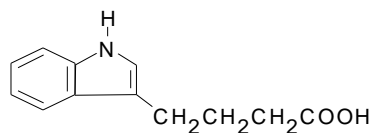
2.1 Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky pro stanovení obsahu kyseliny 3-indolyloctové a 3-indolymáselné kyseliny v hnojivech. Pro účely této metody se používá tato definice: obě kyseliny se používají jako účinné složky pro stimulatory růstu, používané v okrasném zahradnictví k vegetativnímu rozmnožování rostlin.

Chemicky se jedná o:



kyselina indolyloctová



kyselina indolylmásečná

kyselina 3-indolyloctová
(1H-Indole-3-acetic acid, $C_{10}H_9NO_2$),
 $M_r = 175,18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

kyselina 3-indolylmásečná
(1H-Indole-3-butyric acid, $C_{12}H_{13}NO_2$),
 $M_r = 203,23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

2.2 Princip

Obsah kyseliny 3-indolyloctové a 3-indolylmásečné se stanoví po extrakci 70 % methanolem, metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s UV detekcí při vlnové délce $\lambda = 265 \text{ nm}$.

2.3 Chemikálie

2.3.1 Kyselina 3-indolyloctová – standardní látka

2.3.2 Kyselina 3-indolylmásečná – standardní látka

2.3.3 Kyselina octová, 100 % roztok $c_{(CH_3COOH)} = 1 \text{ mol/l}$ (5,7 ml do 100 ml H_2O)

2.3.4 Methanol, HPLC grade

2.3.5 Mobilní fáze: 285 ml methanolu + 150 ml vody + 50 ml 1 M roztoku kyseliny octové.

Po vytemperování na laboratorní teplotu se upraví pH mobilní fáze pomocí 0,1 M roztoku NaOH na hodnotu 4,6.

2.3.6 Extrakční roztok methanol/voda = 70 : 30 (V/V)

2.3.7 Hydroxid sodný, roztok $c_{(NaOH)} = 0,1 \text{ mol/l}$ (0,4 g do 100 ml H_2O)

2.4 Přístroje a pomůcky

- 2.4.1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV detekcí
- 2.4.2 Rotační odparka
- 2.4.3 Laboratorní míchačka nebo třepačka
- 2.4.4 Membránový filtr 0,45 µm
- 2.4.5 Odstředivka

2.5 Pracovní postup

2.5.1 Extrakce

Do kónické baňky se odváží 1 g vzorku a přidá se 100 ml extrakčního roztoku (2.3.6). Míchá se na magnetické míchače (nebo se třepe na laboratorní třepače) 30 minut, poté se směs nechá sedimentovat a posléze se zfiltruje přes skládaný filtr. Čirý filtrát se odpaří na vakuové rotační odparce téměř k suchu. Odparek se pomocí 5 ml methanolu (2.3.4) převede do zkumavky a roztok se odstředí. Takto připravený vzorek se použije k nástřiku na chromatografickou kolonu. Doporučuje se přechistit před nástřikem na membránovém filtru 0,45 µm.

2.5.2 Kalibrace

Základní standardní roztok kyseliny 3-indolyloctové a 3-indolylmáselné (2.3.1 a 2.3.2): Do odměrné baňky na 10 ml se naváží asi 100 mg standardních látek s přesností na 0,1 mg a doplní se po značku methanolem (2.3.4).

1 ml tohoto základního roztoku obsahuje 10,0 mg kyseliny 3-indolyloctové; 10,0 mg kyseliny 3-indolylmáselné.

Z tohoto základního standardního roztoku připravíme pracovní standardní roztok 10-ti násobným zředěním. Do sady odměrných baněk o objemu 10 ml se postupně pipetuje (0,1; 0,2; 0,4) ml obou pracovních standardů, doplní se methanolem po značku a promíchá se. Takto připravená sada odpovídá koncentracím (10,0; 20,0; 40,0) µg/ml kyseliny 3-indolyloctové a kyseliny 3-indolylmáselné.

2.5.3 Chromatografické podmínky HPLC stanovení

Vlastní měření jak kalibračních roztoků, tak i extraktů zkušebních vzorků, se provádí za následujících separačních podmínek chromatografického systému:

Kolona:	Symmetry Shield RP8, 4 μm , (150 \times 3,9) mm, Waters, případně je možno použít i kolonu C18 jiného výrobce
Mobilní fáze:	2.3.5
Průtok:	0,6 ml/min
Teplota kolony:	25 $^{\circ}\text{C}$
UV detektor:	$\lambda = 265 \text{ nm}$
Objem nástřiku:	10 μl
Retenční čas:	kyselina 3-indolyloctová – 4,5 min kyselina 3-indolylmáselná – 7,8 min
Run time:	12 min pro uvedenou kolonu

2.6 Výpočet

Obsah jednotlivých kyselin (X) vyjádřený v mg/kg se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{c \cdot V \cdot R}{m_a}$$

c jsou koncentrace jednotlivých kyselin odečtených z kalibračního grafu v mg/l

V objem extrakčního činidla v ml

m_a hmotnost zkušební vzorku v g

R faktor ředění

2.7 Poznámka

Tato metodika je shodná s již ověřenou a validovanou metodou pro stanovení kyseliny nikotinové a α -naftyloctové. V podstatě je možno měřit současně čtyři kyseliny, které se přidávají jako stimulatory růstu. Při dodržení uvedených chromatografických podmínek mají jednotlivé kyseliny následující retenční čas:

Kyselina nikotinová	2,6 min
Kyselina 3-indolyloctová	4,5 min
Kyselina α -naftyloctová	7,0 min
Kyselina 3-indolylmáselná	7,8 min

3 Interpretace validačních parametrů

3.1 Optimalizace parametrů pro HPLC stanovení

3.1.1 Vliv vlnové délky

Jako první faktor, který byl ověřován, byl vliv vlnové délky na velikost a tvar stanovovaných píků. Pomocí spektrální analýzy se ukázalo, že obě stanovované látky mají maximum při stejné vlnové délce. Spektrum bylo skenováno v rozmezí $\lambda = (225 - 265)$ nm.

Při vlnové délce $\lambda = 225$ nm vykazovaly stanovované látky sice největší odezvu, ale zároveň se projevoval vliv mobilní fáze, což zhoršuje kvalitu nulové linie a šumu.

Jako optimální byla zvolena vlnová délka $\lambda = 265$ nm, při které byly odezvy obou komponent velmi dobré. (viz obrázek č. 1).

Na obrázku č. (2 – 3) je ukázána detailní informace o pících kyseliny indolyloctové a kyseliny indolylmáselné.

Kapacitní faktor, který charakterizuje použitý chromatografický systém vzhledem k jeho mrtvému objemu, má být podle FDA větší než 2.

Faktor chvostování, který charakterizuje stupeň chvostování píků v chromatografii, má být podle obecného požadavku menší než 2.

Počet teoretických pater, který charakterizuje separační schopnost použité chromatografické kolony, má mít hodnotu N větší než 2000.

Rozlišení, které charakterizuje stupeň separace sousedních píků v chromatografii, má mít podle FDA hodnotu R větší než 1,5.

Obě stanovované látky splňují tyto podmínky za dodržení chromatografických podmínek uvedených v odstavci 2.5.3

Parametr	Teorie	Indolyloctová kyselina	Indolylmáselná kyselina
Kapacitní faktor	> 2	3,159	7,280
Faktor chvostování	< 2	1,404	1,155
Počet teoretických pater	> 2000	2311	3559
Rozlišení	> 1,5	6,65	6,65

3.1.2 Vliv pH a složení mobilní fáze

Při tomto pokusu byl ověřován vliv pH a složení mobilní fáze na velikost a tvar píků.

Základní složení mobilní fáze bylo (2.3.6):

285 ml methanolu + 150 ml vody + 50 ml roztoku 1 M kyseliny octové. Po vytemperování na laboratorní teplotu se upraví pH mobilní fáze pomocí 0,1 M roztoku NaOH na hodnotu 4,6 (zk. 4). Při dalších zkouškách bylo pH této základní mobilní fáze upraveno na hodnotu pH = 4,0 (zk. 5) a pH = 5,2 (zk. 6). Výsledky jsou zobrazeny na obr.č. 4.

Jako optimální se ukázala hodnota pH = 4,6. Při vyšším pH se prodloužil čas analýzy víc než dvojnásobně a při nižším pH se snížila intenzita signálu.

Následovně byly použity 3 různé mobilní fáze o různém složení, ale stejném pH = 4,6:

1. mobilní fáze (zk.č. 4) - 285 ml methanolu + 150 ml vody + 50 ml roztoku 1 M kyseliny octové
 2. mobilní fáze (zk.č. 7) - 250 ml methanolu + 185 ml vody + 50 ml roztoku 1 M kyseliny octové
 3. mobilní fáze (zk.č. 8) - 320 ml methanolu + 115 ml vody + 50 ml roztoku 1 M kyseliny octové
- Výsledky jsou znázorněny na obr. č. 5.

Složení mobilní fáze neovlivňovalo ani velikost ani tvar píků, pouze se měnila doba analýzy. Byla tedy zvolena mobilní fáze č. 1, protože u mobilní fáze č. 2 byla sice kratší doba analýzy, ale při větších nečistotách by mohlo dojít k horší separaci jednotlivých píků. U mobilní fáze č. 3 se doba analýzy zbytečně prodloužila víc než dvojnásobně.

3.1.3 Vliv teploty

Při zachování základních podmínek: vlnová délka $\lambda = 265$ nm, nástřik 10 μ l, mobilní fáze č. 1, byly provedeny zkoušky č. (9 – 12), kdy se měnila pouze teplota na koloně v hodnotách (25; 30; 40; 50) °C. Vzhledem k tomu, že teplota příliš neovlivňovala výsledek analýzy, byla zvolena teplota 25 °C, viz obr. 6.

3.1.4 Výběr kolony

Zkoušky č. 4 a (13 – 16) byly provedeny za účelem zjištění optimální kolony.

Bylo použito 5 kolon od různých výrobců na bázi reverzní fáze:

1. Zorbax Eclipse XDB – C18, (4,6 × 150) mm, 5 μ m – firmy Agilent
2. Nova Pack C18, (3,9 × 150) mm, 5 μ m – firmy Waters
3. X-TerraTM RP18, (3,9 × 150) mm, 5 μ m – firmy Waters
4. Symmetry Shield RP8, (3,9 × 150) mm, 5 μ m – firmy Waters
5. Zorbax Eclipse XDB – C8, (4,6 × 150) mm, 5 μ m – firmy Agilent

Jako naprosto nevyhovující se prokázala kolona č. 2 Nova Pack C18 (viz obr.č. 7), na které nedochází k dobrému rozdělení obou látek, které je potřebné pro spolehlivou kvantifikaci výsledků. Zvoleným požadavkům na separaci nejlépe vyhovovala kolona č. 1 Zorbax Eclipse XDB – C18. Velmi podobné výsledky jsme získali i na koloně č.4 Symmetry Shield RP8, která byla použita pro validaci metody. Na obr.č. 8 je porovnání vhodné (Zorbax Eclipse XDB-C18) a nevhodné (Nova Pack C18) kolony.

3.2 Citlivost

Citlivost je podle IUPAC dána změnou signálu, vyvolanou změnou validované vlastnosti (tj. směrnici kalibrační přímky). V tabulce č. 1 jsou uvedeny naměřené hodnoty kalibrační přímky.

Tabulka č. 1

Kalibrační úroveň	Kyselina indolyloctová		Kyselina indolylmáselná	
	($\mu\text{g/ml}$)	plocha	($\mu\text{g/ml}$)	plocha
1	4,28	37,05	4,18	25,98
2	10,69	91,40	10,45	60,09
3	21,38	177,62	20,90	119,97
4	42,76	363,22	41,80	242,56
5	106,90	921,39	104,50	630,87
6	213,80	1885,24	209,00	1305,46

Citlivost analytické metody daná směrnici kalibrační přímky je pro jednotlivé analyty tato:

Pro kyselinu indolyloctovou je hodnota 8,823 (plocha/mg).

Pro kyselinu indolylmáselnou je hodnota 6,257 (plocha/mg).

3.3 Linearita

Linearita, podobně jako citlivost, byla určena z hodnot naměřených v kalibrační přímce uvedených v tabulce č. 1. Ke statistickému vyhodnocení linearity bylo použito QC testu. Vypočtené hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2

Parametr	Kyselina indolyloctová	Kyselina indolylmáselná
Vypočtený R	0,9999	0,9998
R k testování	0,9900	0,9900
Vypočtený QC	1,46	2,34
QC k testování	5,0	5,0

U obou látek byla na základě hodnot korelačního a QC koeficientu prokázána linearita metody.

3.4 Mez stanovitelnosti a mez detekce

Mez detekce je úroveň, nad kterou lze odezvu vzorku odlišit od odezvy slepého pokusu. Mez stanovitelnosti je úroveň, nad kterou lze věrohodně provést kvantitativní stanovení. Tyto hodnoty byly vypočteny programem EffiValidation z hodnot uvedených v tabulce č. 1. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3

	Kyselina indolyloctová (mg/kg)	Kyselina indolylmáselná (mg/kg)
Mez detekce	38,4	41,6
Mez stanovitelnosti	76,0	82,9
Rozsah	75 – 2000	80 – 2000

3.5 Opakovatelnost

Opakovatelnost charakterizuje rozptýlení validované vlastnosti kolem střední hodnoty, které způsobují náhodné chyby. Stanovení opakovatelnosti bylo provedeno na jednom vzorku hnojiva z desetinásobného měření. Naměřené hodnoty jsou v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4

Měření číslo	Kyselina indolyloctová (mg/kg)	Kyselina indolylmáselná (mg/kg)
1	4146,7	5135,3
2	4082,2	5072,0
3	3854,0	4865,7
4	4134,8	5126,4
5	3979,2	5012,5
6	3982,7	5049,3
7	4331,2	5270,7
8	4246,3	5268,6
9	4658,1	5365,1
10	4123,9	5211,7

Po vyhodnocení programem EffiValidation vyšly hodnoty opakovatelnosti pro:

Kyselinu indolyloctovou 5,34 % rel.

Kyselinu indolylmáselnou 2,90 % rel.

U obou analytů byla potvrzena hypotéza o normalitě dat.

3.6 Správnost

Správnost charakterizuje shodnost výsledků měření validované vlastnosti s deklarovanou referenční hodnotou. Správnost byla dále zjišťována testem výtěžnosti. K přesné navážce vzorku se zjištěným obsahem určované látky bylo postupně přidáváno stanovované množství čisté látky ve třech různých hladinách přídávku, a sice (40; 80; 120) % a zpětně vypočítaná výtěžnost. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 5 - 6.

Tabulka č. 5 – ověření výtěžnosti kyseliny indolyloctové

Úroveň	Předloženo (mg/kg)	Naměřeno (mg/kg)	Výtěžnost (%)	n	t-výpočet	t-kritické
1	6159,65	6151,91	99,87	3	0,13217	4,303
2	8158,65	8134,73	99,71	3	0,50828	4,303
3	10157,65	10104,33	99,48	3	1,70527	4,303

Tabulka č. 6 – ověření výtěžnosti kyseliny indolylmáselné

Úroveň	Předloženo (mg/kg)	Naměřeno (mg/kg)	Výtěžnost (%)	n	t-výpočet	t-kritické
1	7210,28	6998,46	97,06	3	3,95637	4,303
2	9264,28	8819,94	95,20	3	3,76626	4,303
3	11318,28	10889,67	96,21	3	3,09754	4,303

Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

4 Souhrnné výsledky validace

Validační parametr	Validační hodnota	
	Kyselina indolyloctová	Kyselina indolylmásečná
Opakovatelnost (% rel.)	5,34	2,90
Reprodukovatelnost* (% rel.)	10,68	5,80
Správnost	Správnost metody prokázána	
Linearita	Linearita metody prokázána	
Rozsah (mg/kg)	75 – 2000	80 – 2000
Mez detekce (mg/kg)	38,4	41,6
Mez stanovitelnosti (mg/kg)	76,0	82,9
Selektivita	Selektivita metody prokázána	
Citlivost (plocha/mg)	8,822	6,257
Nejistota (% rel.)	21	12

* vnitrolaboratorní odhad

5 Závěr

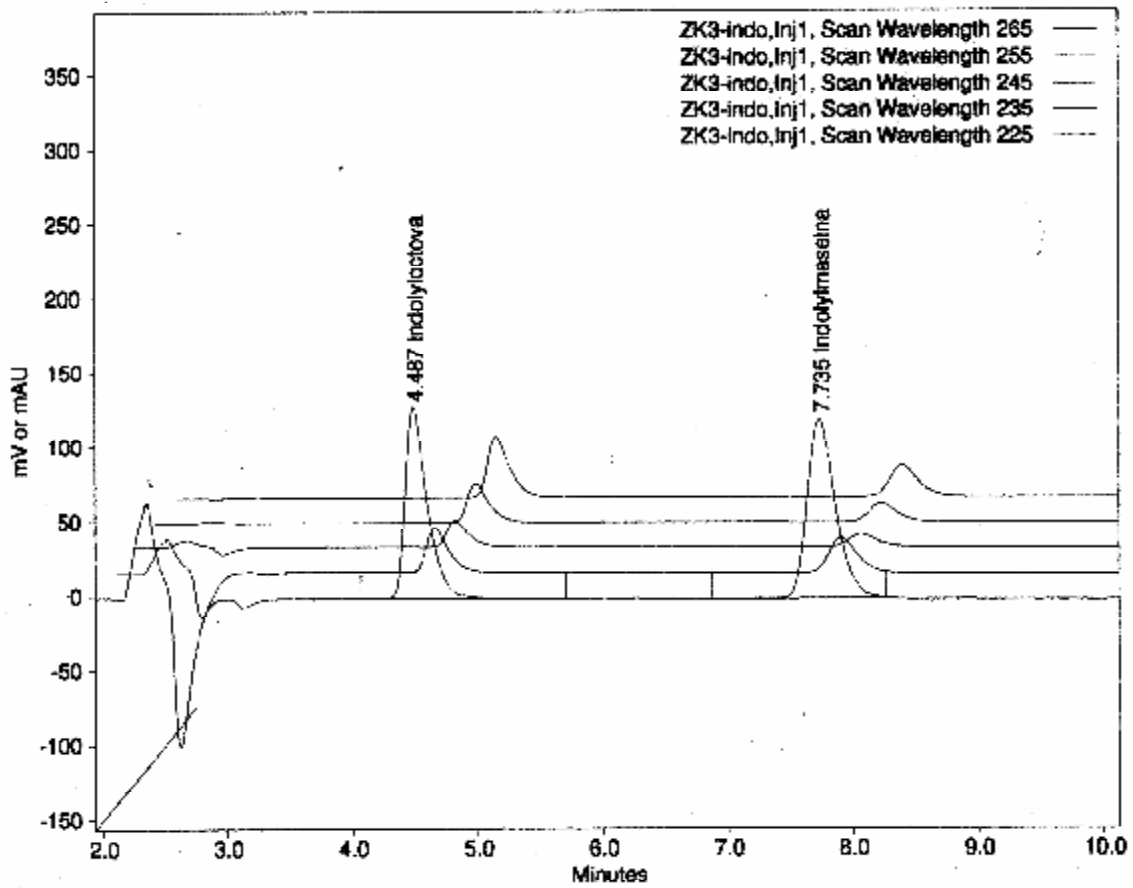
V rámci této práce byly stanoveny tyto validační parametry :

- a) opakovatelnost
- b) správnost
- c) selektivita
- d) linearita
- e) citlivost
- f) mez stanovitelnosti
- g) mez detekce
- h) nejistota

Zjištěné validační parametry prokázaly způsobilost ověřované metody k používání v rámci laboratorního odboru a její zahrnutí do Standardních operačních postupů ÚKZÚZ.

6 Literatura

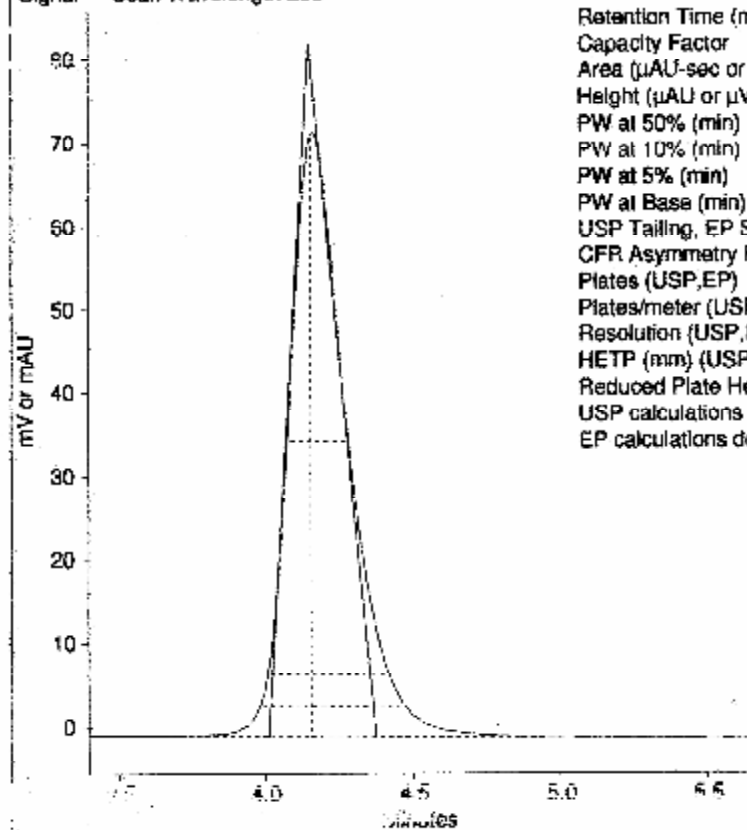
1. Dostál R.: Práce Morav. Přírod. Spol. 3: 83 – 209, **1926**
2. Dostál R: Rostlinné hormony a jejich praktické využití v zemědělství. ČAZ, Praha, **1940**
3. Procházka S, Šebánek J. a kol: Regulátory rostlinného růstu, Academia Praha, **1977**
4. Eckschläger K., Horsák I., Kodejš Z.: Vyhodnocování statistických výsledků a metod 38, SNTL Praha **1980**
5. Validace analytických metod, interní materiál, ÚKZÚZ, Brno **2000-03-01**
6. Centner V.: Uživatelská příručka EffiValidation 3.0, EffiChem, 1999-**2002**



Obr. 1 – Vliv vlnové délky

ZK9-Indo.RES - ZK9-Indo.In11

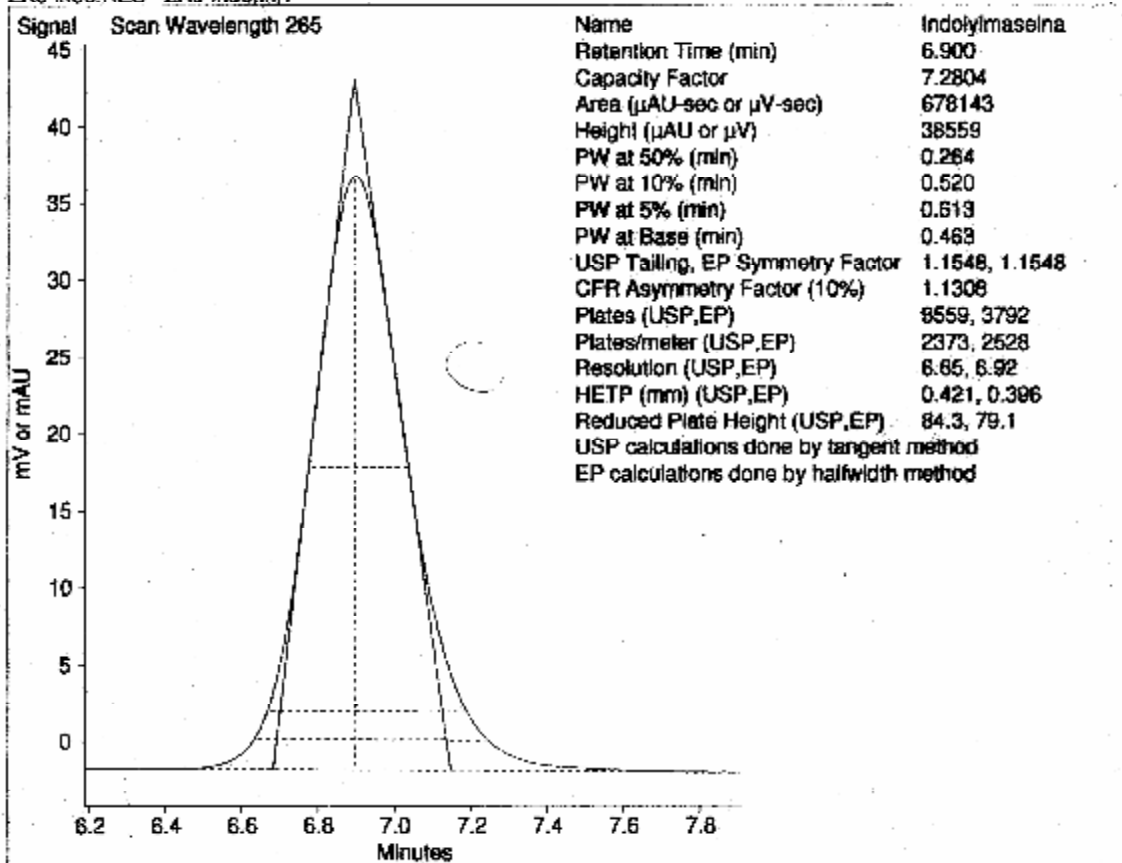
Signal Scan Wavelength 265



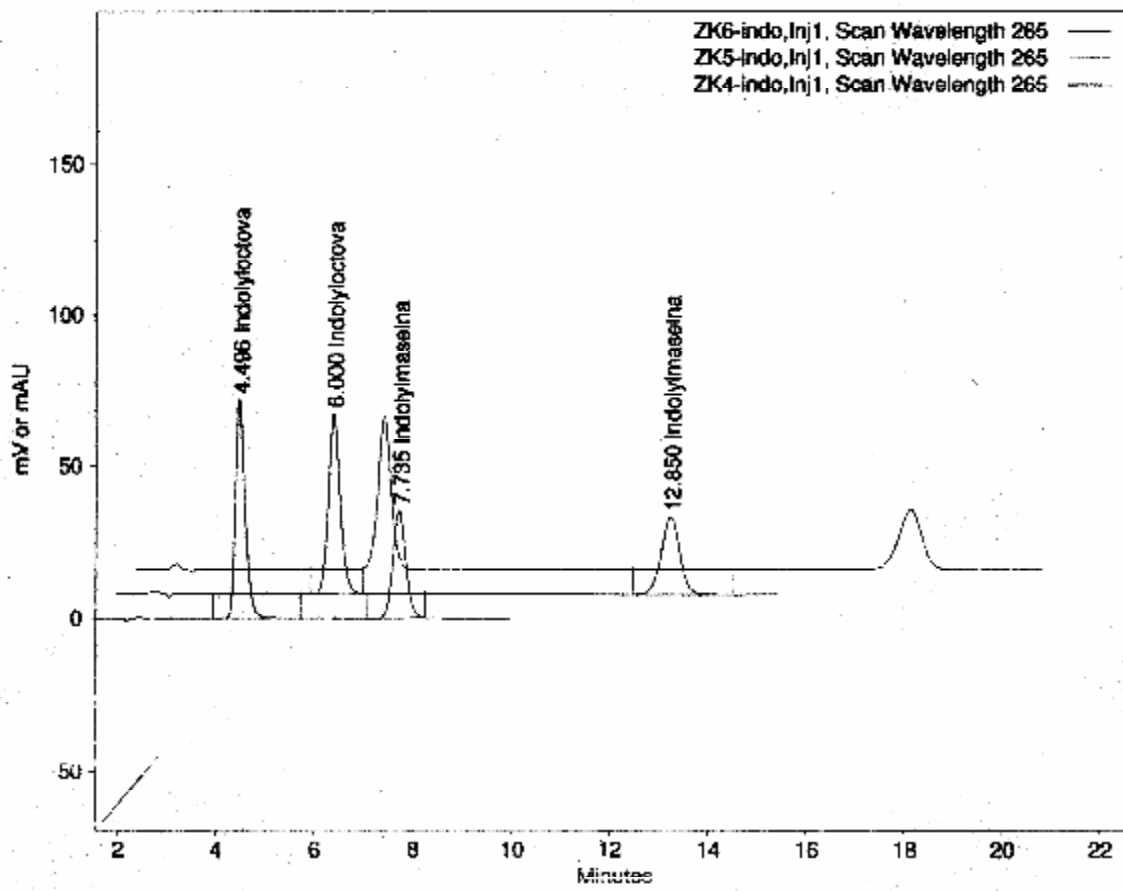
Name	Indolyloctova
Retention Time (min)	4.159
Capacity Factor	3.1591
Area (μ AU-sec or μ V-sec)	1002620
Height (μ AU or μ V)	70893
PW at 50% (min)	0.204
PW at 10% (min)	0.413
PW at 5% (min)	0.491
PW at Base (min)	0.362
USP Tailing, EP Symmetry Factor	1.4004, 1.4004
CFR Asymmetry Factor (10%)	1.3753
Plates (USP,EP)	2112, 2311
Plates/meter (USP,EP)	1408, 1540
Resolution (USP,EP)	6.65, 6.92
HETP (mm) (USP,EP)	0.71, 0.649
Reduced Plate Height (USP,EP)	142, 130
USP calculations done by tangent method	
EP calculations done by halfwidth method	

Obr. 2 - Detailní popis píku kyseliny indolyloctové

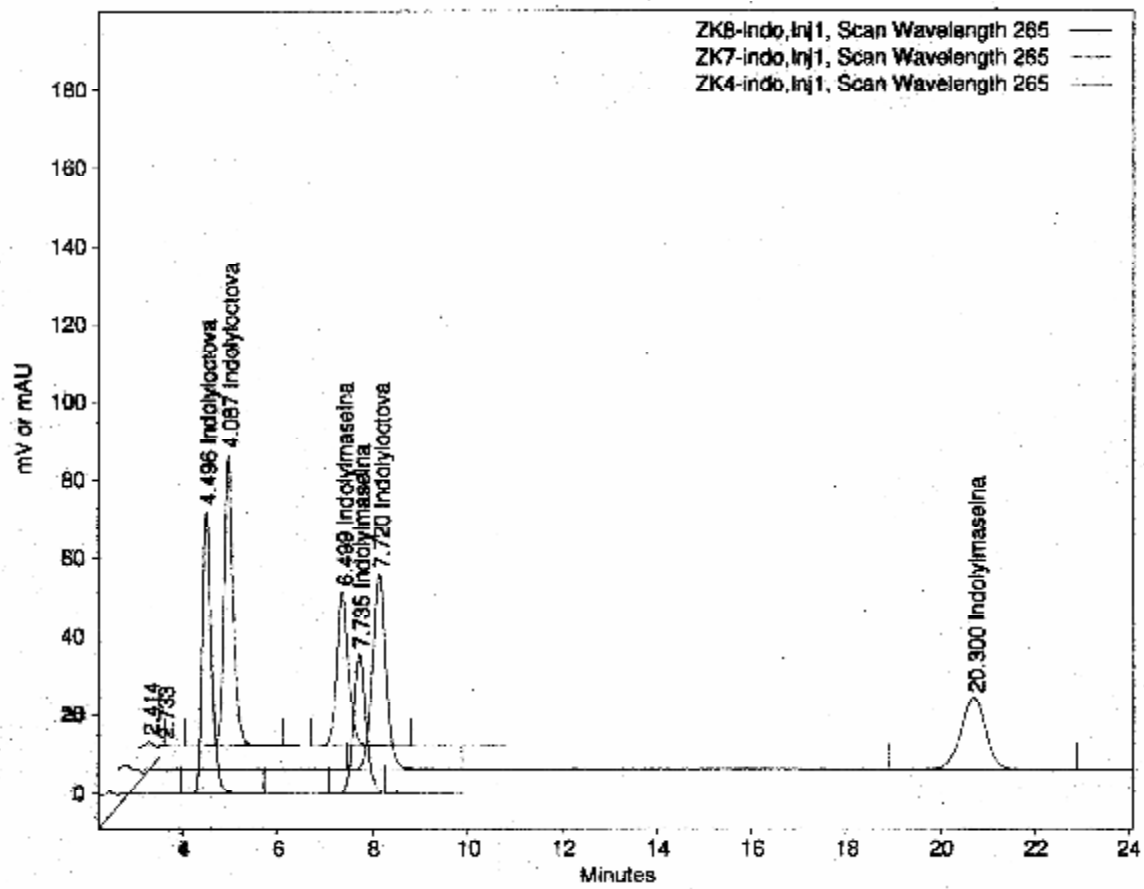
ZK9-indo.RES - ZK9-indo.In1



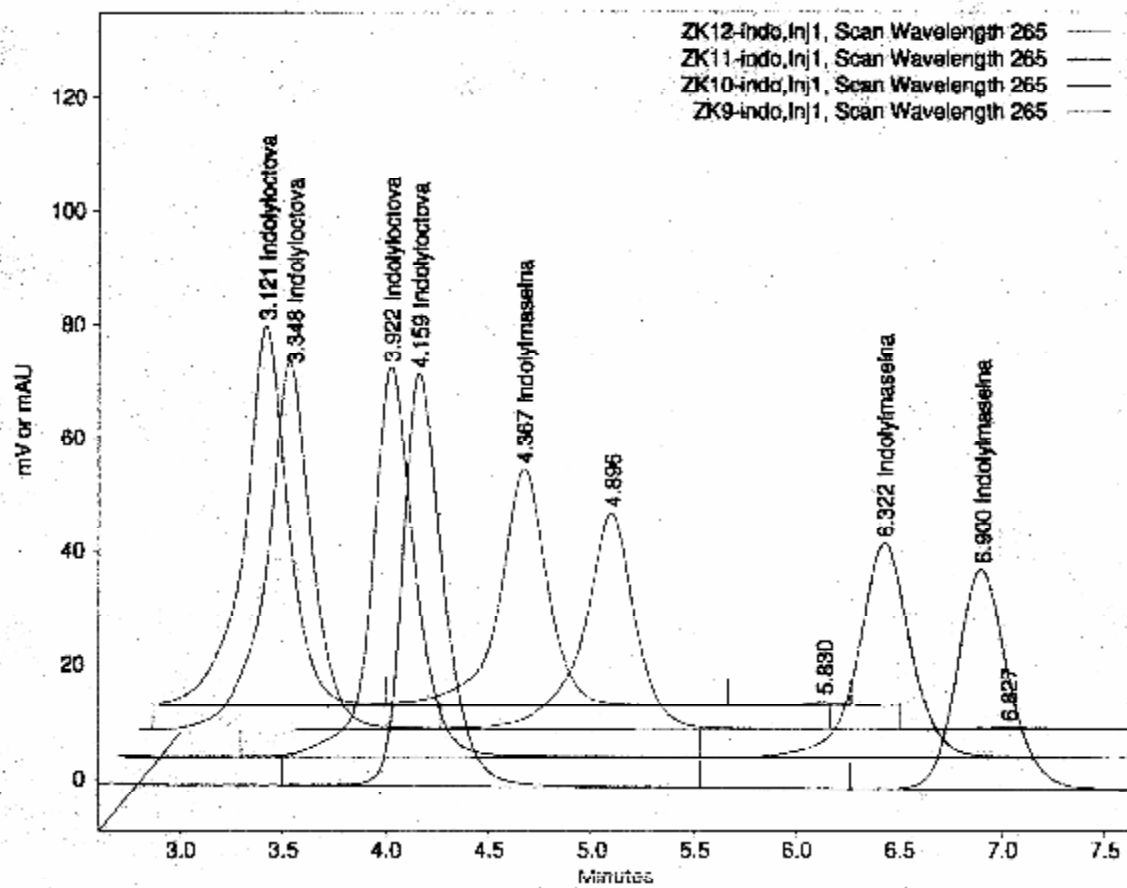
Obr. 3 – Detailní popis píku kyseliny indolyimáselné



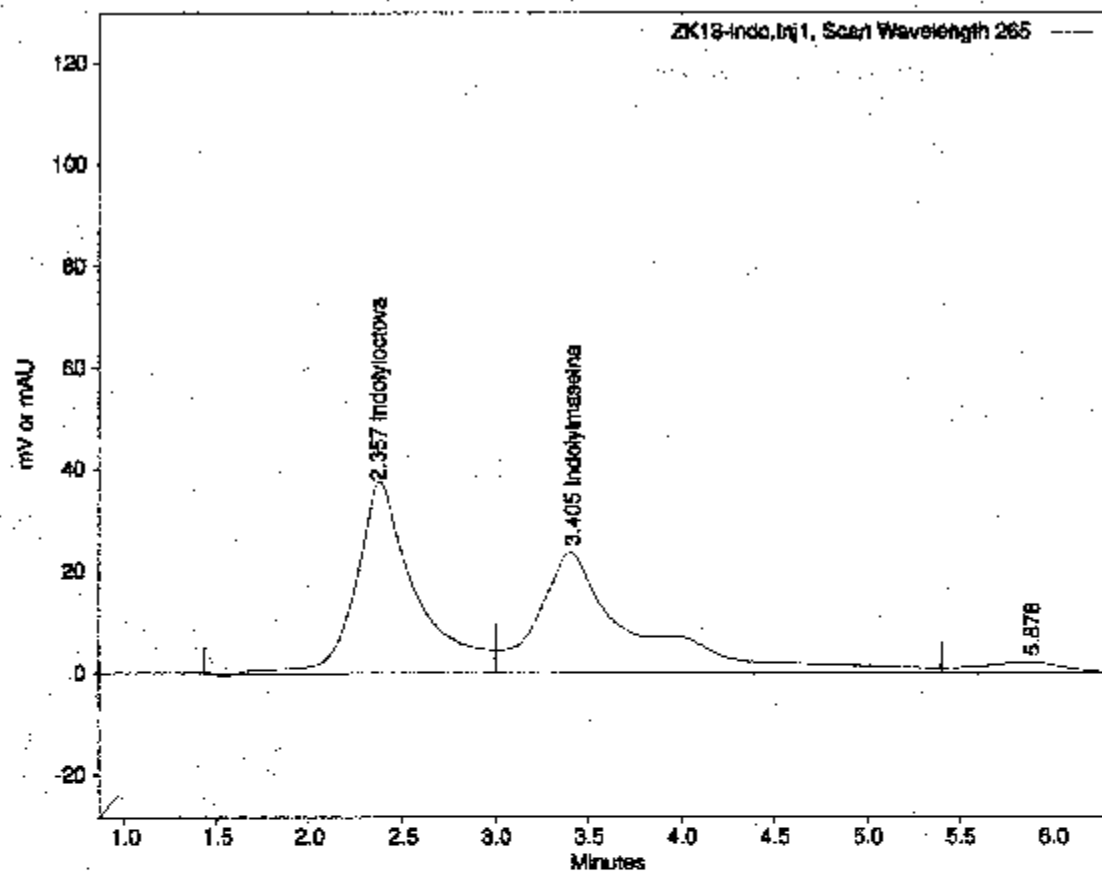
Obr. 4 - Vliv pH mobilní fáze



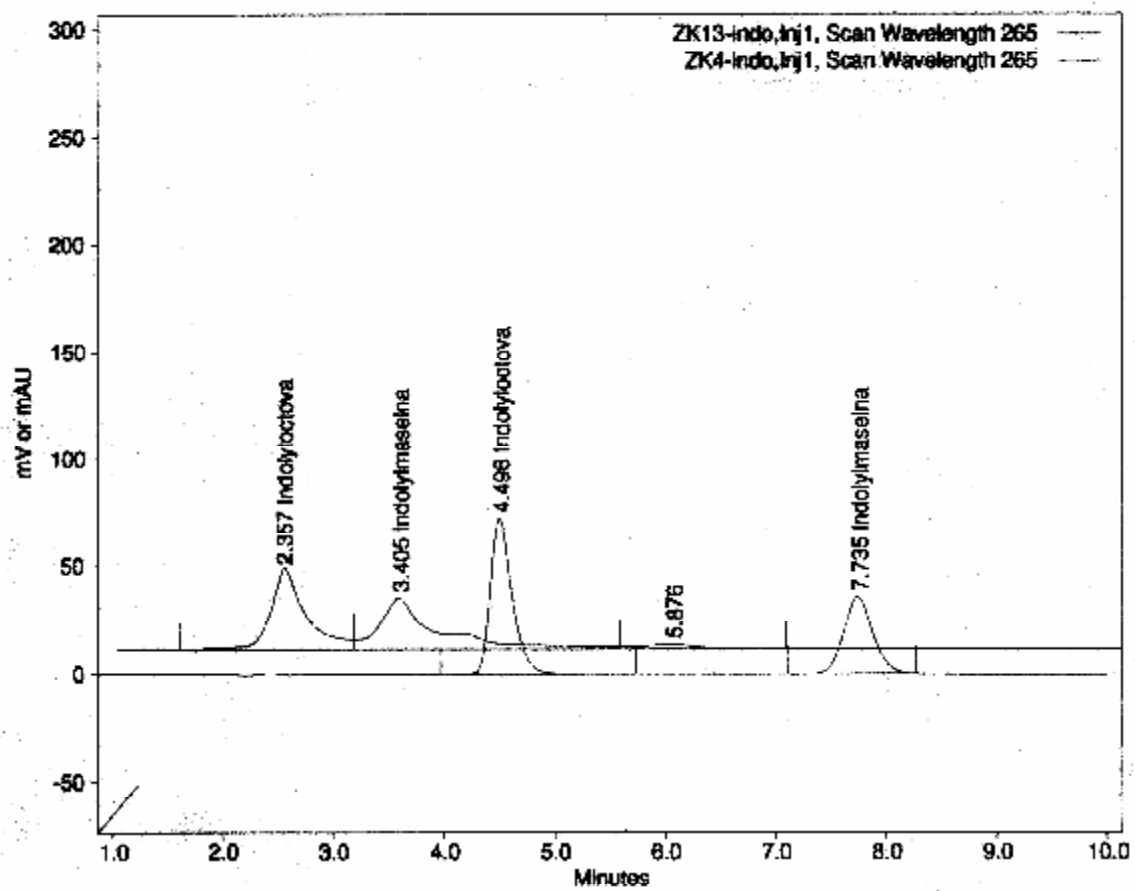
Obr. 5 - Vliv složení mobilní fáze



Obr. 6 - Vliv teploty kolony



Obr. 7 - Ukázka dělení na nevyhovující koloně



Obr. 8 - Porovnání výběru vhodné a nevhodné kolony

Citlivost a mez detekce při separaci v HPLC

Michal Douša

Ecochem a.s., Dolejškova 3, 182 00 Praha

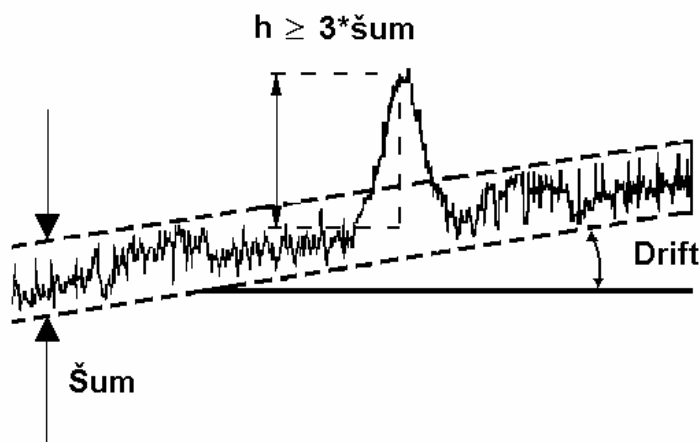
michal.dousa@ecochem.cz

1 Úvod

U separačních metod se používá k výpočtu meze detekce převážně velikost hodnoty signálu slepého pokusu. Podmínkou je, že je k dispozici chromatogram slepého pokusu a směrnice kalibrační přímky v kombinaci s následujícím postupem: z chromatogramu slepého pokusu se určí maximální kolísání základní linie - šum (h_{\max}) v oblasti dané 20-ti násobkem pološířky píku stanovovaného analytu. Pro odezvu meze detekce platí: $y_D = 3h_{\max}$ a pro koncentraci na mezi detekce:

$$x_D = \frac{y_D}{b_1} \quad (1)$$

Je nutné uvést, že směrnice kalibrační přímky b_1 musí být z koncentrační závislosti $y = b_1x$, kde y je výška chromatografického píku, nikoli plocha, jak je obvyklé. Rozborem rovnice (1) je tedy zřejmé, že snížením šumu základní linie h_{\max} (obr. 1) a zvýšením citlivosti b_1 můžeme snížit mez detekce. Jinak řečeno, čím vyšší je odstup signálu od šumu, tím nižší je mez detekce.



Obr. 1 Šum a drift základní linie

2 Vliv šumu základní linie

Šum základní linie je způsobený především použitou instrumentací (pumpy a parametry detektoru) a mobilní fází. Korekce šumu na základní linii je poměrně složitý problém a jeho příčinou může být kontaminace kolony, samotné mobilní fáze, in-line vstupního filtru mobilní fáze nebo in-line filtrů mobilní fáze v systému nebo cely detektoru. Další příčinou může být nedostatečně ekvilibrovaná kolona nebo netěsnost v systému. Korekce těchto jevů není předmětem tohoto příspěvku a je řešen jinde [1]. Za zmínku stojí ještě nevhodné použití různých aditiv a modifikátorů mobilní fáze. Je např. známo, že octanové a mravenčanové pufrů způsobují vyšší šum mobilní fáze (oproti např. fosfátovým pufrům) zejména při gradientové eluci.

3 Vliv detekce

Zvýšení citlivosti (a selektivity) metody HPLC můžeme dosáhnout změnou podmínek detekce nebo detekce vůbec. Nejjednodušší a klasický příklad je použití fluorescenční detekce namísto detekce UV-VIS, která je daleko méně citlivá a selektivní. V případě, že nemáme tuto možnost, pak druhou možností je optimalizace vlnové délky ze znalosti absorpční křivky dané látky v daném rozpouštědle. Mnohdy použití absorpčního maxima se nejeví jako ideální. Vhodnější je použití (je-li k dispozici) druhého či třetího absorpčního maxima posunutého zejména k vyšším vlnovým délkám, i když molární absorpční koeficient je nižší. Posunutí absorpčního maxima k vyšším vlnovým délkám má většinou za následek i snížení šumu na základní linii. Blíže je možné nalézt v publikaci [2].

4 Vliv retence solutu

Citlivost a mez detekce v kapalinové chromatografii kromě citlivosti a meze detekce vlastního detektoru závisí i na rozmytí eluční zóny, která je charakterizována šířkou chromatografického píku Y_v (v objemových jednotkách). Míra rozmytí eluční zóny je obecně mírou účinnosti systému. Proto předpokládejme, že náš chromatografický systém je dostatečně účinný. Co se bude dít s eluční zónou během chromatografického procesu a při průchodu zóny celou detektoru? Během separace dochází ke zředování solutu (v cele je koncentrace asi o dva

řády nižší koncentrace solutu než při nástřiku na kolonu) a k rozšiřování eluční zóny solutu. Zředění solutu Z při průchodu kolonou lze definovat jako poměr šířky elučního zóny (v objemových jednotkách) Y_V k původnímu objemu vzorku V_i

$$Z = \frac{Y_V}{V_i} \quad (2)$$

a toto je první limitující faktor ovlivňující koncentraci solutu v cele detektoru.

Eluční křivka má tvar Gaussova rozdělení, kdy maximální koncentrace složky bude právě při elučním objemu V_R . Znamená to, že výška píku bude záviset na látkovém množství solutu nastříknutém na kolonu a na směrodatné odchylce (s rostoucí směrodatnou odchylkou poroste šířka píku a klesá výšky píku). Čím bude eluční zóna širší (bude mít větší objem, vzorek bude více ředěný), tím menší bude koncentrace solutu v cele detektoru při průchodu maxima eluční zóny detektorem.

Pro šířku eluční zóny můžeme odvodit výraz:

$$Y_V = 4 \cdot \frac{V_R}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

přičemž eluční objem V_R se může vyjádřit vztahem $V_R = t_R \cdot F_m$ a objemová rychlost F_m jako $F_m = u \cdot p^2 \cdot e_T$, kde u je střední lineární rychlost, pro kterou platí $u = L/t_m$. Vyjádří-li se retenční čas pomocí kapacitního poměru k , pak dostaneme $t_R = t_M \cdot (1+k)$ a po dosazení do rovnice (3) dostaneme

$$Y_V = \frac{L \cdot p \cdot d_c^2 \cdot e_T \cdot (1+k)}{\sqrt{n}} \quad (4)$$

a odtud dosazením do (2) platí pro zředění solutu:

$$Z = \frac{L \cdot p \cdot d_c^2 \cdot e_T \cdot (1+k)}{V_i \cdot \sqrt{n}} \quad (5)$$

Z rovnice (5) vyplývá, že zředění vzorku se potlačí zvýšením účinnosti kolony (použití náplní s malým zrněním (e_T) a prací v blízkosti minima křivky závislosti výšky teoretického patra H na střední lineární rychlosti $H \sim u$), zmenšením rozměrů kolony, a to jak její délky (L), tak zejména průměru kolony (d_c). Zmenšení délky kolony je však na úkor *snížení* účinnosti kolony (n). Zředění vzorku lze potlačit prací v systému, kde má látka malou retenci (malý kapacitní poměr k) a zvětšením nástřiku vzorku V_i . Za vhodně zvolených chromatografických podmínek lze

dosáhnout toho, aby zředění analytu bylo minimální ($Z \leq 1$) a dochází tak k obohacení analytu přímo na chromatografické mikrokoloně.

Upravíme-li rovnici a zavedeme pojem redukované výšky teoretického patra h , pak dostaneme výraz:

$$Z = \frac{p \cdot d_c^2 (L h d_p)^{1/2} \cdot e_T \cdot (1+k)}{V_i \cdot \sqrt{n}} \quad (6)$$

kde d_p je velikost částecek náplně. Z této rovnice (6) je popis parametrů mající vliv na zředění solutu průkaznější. Zředění solutu se snižuje zejména se zmenšujícím se průměrem kolony d_c a porozitou náplně e_T a zvyšující se eluční silou mobilní fáze (k). Vliv délky kolony (L) a velikosti částecek d_p na zředění solutu není již tak patrný.

Ke zcela stejným závěrům lze dospět i jiným způsobem. Vyjdeme-li z teorie chromatografického patra, dospějeme k závěru, že má eluční křivka tvar Poissonova rozdělení, které při velkém počtu pater může být nahrazeno rozdělením Gaussovým. Lze odvodit základní rovnici pro koncentraci solutu c_{\max} v maximu eluční zóny:

$$c_{\max} = \frac{n_o}{s_V \cdot \sqrt{2p}} \quad (7)$$

kde n_o je látkové množství solutu naneseného na chromatografickou kolonu a s_V , je směrodatná odchylka v objemových jednotkách a vyjadřuje vlastně účinnost chromatografického procesu:

$$n = \frac{V_R^2}{s_V^2} \quad (8)$$

Úpravou (7) pak dostaneme

$$s_V = \frac{V_R}{\sqrt{n}} \quad (9)$$

Vyjádříme-li eluční objem V_R základní retenční rovnicí, dostaneme výraz

$$c_{\max} = c_0 \frac{V_i}{V_M} \sqrt{\frac{n}{2p}} \frac{1}{1+k} \quad (10)$$

kde c_0 je látková koncentrace solutu naneseného na chromatografickou kolonu v objemu naneseného vzorku V_i .

Z rovnice (10) je patrné, že se zmenšujícím se mrtvým objemem stoupá koncentrace v maximu eluční zóny. Pro mrtvý objem kolony lze napsat:

$$V_M = \frac{p}{4} L e_T d_c^2 \quad (11)$$

a dosazením (11) do rovnice (10) dostáváme:

$$c_{\max} = c_0 \frac{V_i}{L e_T d_c^2} \frac{2\sqrt{2n}}{p^{3/2}} \frac{1}{1+k} \quad (12)$$

Koncentrace solutu c_{\max} v maximu eluční zóny se zvyšuje s objemem nástřiku vzorku V_i , zkracující se délkou kolony (L) a snížením jejího vnitřního průměru d_c a zvyšující se eluční silou mobilní fáze (k). K těmto závěrům jsme došli už při rozboru rovnice (6).

Pro lepší představivost je vliv chromatografické kolony na citlivost a mez detekce přiblížen na praktickém příkladu. První aproximace, kterou musíme při této úvaze použít, je zachování účinnosti kolony n , což je předpoklad umělý, ale ne nedosažitelný. V tomto případě pak zkrácením délky kolony z 15 cm na 10 cm koncentrace solutu c_{\max} v maximu eluční zóny vzroste 1,5 krát. Zvýšíme-li eluční sílu mobilní fáze, vyjádřenou kapacitním poměrem k tak, že kapacitní poměr klesne o 50 %, vzroste koncentrace solutu c_{\max} 1,25 krát. V obou uvedených případech se ale změní (sníží) i účinnost systému (n) a zvýšení koncentrace solutu c_{\max} v maximu eluční zóny nebude tak výrazné. Za předpokladu, že účinnost kolony klesne z $n = 10\,000$ na $n = 6\,000$ (tj. 1,66 krát), klesne koncentrace solutu c_{\max} 1,30 krát. Protože však účinnost kolony roste s klesajícím průměrem náplně chromatografické kolony, lze účinnost kolony zachovat snížením průměru částec sorbentu (d_p) chromatografické kolony z obvyklé hodnoty 5 μm na 3 μm . Daleko lepších výsledků se dosáhne změnou vnitřního průměru kolony d_c , kdy účinnost systému (n) zůstane zachována. Zmenšením vnitřního průměru d_c z 3,9 na 2,1 mm stoupne koncentrace c_{\max} 3,44 krát.

5 Závěr

Z uvedeného rozboru je vidět, že k ovlivnění citlivosti a meze detekce při separaci v HPLC máme poměrně velké množství nástrojů, které nemusí být ani příliš finančně náročné. Optimalizací chromatografické separace pak můžeme zlepšit validační parametr, který se nazývá mez detekce.

6 Literatura

1. Douša M.: Problémy v HPLC, Bulletin 2000 Laboratorního odboru roč. IV., č. 2, str. 57, LO ÚKZÚZ Brno, **2000** (ISSN 1212-5466)
2. Douša M (red.): Problematika stanovení doplňkových látek v krmivech. Sborník přednášek Plzeň 23. – 24. 9. 1998. LO ÚKZÚZ Brno, **1999** (ISBN 80-86051-31-5)

Strategie výpočtů nejistot měření a návaznost měření na základě analýzy certifikovaného referenčního materiálu

Michal Douša

Ecochem a.s., Dolejškova 3, 182 00 Praha
michal.dousa@ecochem.cz

Jaroslava Petrová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno, Národní referenční laboratoř, Za Opravnou 4, 150 06 Praha 5
jaroslava.petrova@ukzuz.cz

1 Úvod

Nejistota měření je v současné době definována jako „parametr přidružený k výsledku měření, který charakterizuje míru rozptýlení hodnot, jež by mohly být důvodně přisuzovány měřené veličině“. Vyhodnocení nejistoty měření dle ISO tedy definičně zahrnuje všechny vlivy, ať již náhodné či nekorigovatelné systematické, které mohou mít na vztah výsledku ke skutečné hodnotě významný vliv. První přístupy, které rozpracovávaly strategii nejistot měření podle ISO, kladly hlavní důraz na vyhodnocování nejistot měření po jednotlivých krocích (složkách) postupem nazývaným „zdola nahoru“ budováním rozboru nejistot měření. Dosavadní zkušenosti z této oblasti však ukazují, že použití údajů z validačních studií, zejména analýzou certifikovaných referenčních materiálů, může být daleko efektivnějším postupem odhadu nejistot měření. Tento postup je nepoměrně časově i finančně méně náročný ve srovnání s hloubkovou studií. Analýza certifikovaného referenčního materiálu nabízí vhodná data pro odhad nejistoty měření, protože poskytuje informace o kombinovaném vlivu řady potenciálních zdrojů nejistoty měření a umožňuje doplnit bilanci nejistoty o příspěvek zahrnující vychýlení výsledků použitého analytického postupu. Tento postup je nazýván „shora dolů“. Je založen na sdružování jednotlivých složek nejistot měření do parametrů, které odpovídají celkové výkonnosti metody. Nedostatkem tohoto postupu je to, že nedokáže určit relativní poměr jednotlivých elementárních složek nejistoty měření a tudíž poskytnout informaci, jaké složky nejistoty měření mají největší příspěvek k celkové nejistotě měření.

Návaznost je vlastnost výsledku měření nebo hodnoty etalonu (standardu), kterou může být určen vztah k uvedeným referencím, zpravidla národním nebo mezinárodním etalonům (standardům), prostřednictvím nepřerušeno řetězce porovnávání, jejichž nejistoty jsou uvedeny. Návaznost je v chemické analýze koncepcí poměrně novou a její uplatnění naráží na specifickou chemickou analýzu, zejména při analýze reálných matric. Zde každá přeměna vzorku (rozpuštění, hydrolyza, separace) znamená faktické přerušeno řetězce porovnávání, jak vyplývá z definice návaznosti. Nejistota příslušející matričnímu vlivu zvyšuje vždy nejistotu návaznosti. V hierarchii referencí návaznosti je nejvýše postavena jednotka SI, v chemické analýze látkové množství (mol). Na něj lze vztahovat prostřednictvím věrohodně definovaných čistých látek s věrohodným odhadem nejistoty obsahu dané látky. Ne vždy ale typ stanovované složky (např. vláknina, škrob, dusíkaté látky), charakter analyzovaného vzorku a vlastnosti použité metody takové zajištění návaznosti umožní. V takovém případě je další použitelnou referencí matriční referenční materiál, což je postup nejvhodnější. Zde stojí za připomenutí několik základních skutečností týkajících se návaznosti:

- návaznost může vykazovat pouze hodnota, v žádném případě metoda, laboratoř, instrument,
- návaznost může nabývat pouze dvou hodnot: buď je nebo není,
- nejdůležitějším parametrem návaznosti je její nejistota. Je-li nejistota příliš velká, pak je hodnota nepoužitelná.

Cílem tohoto příspěvku je ukázat na praktických příkladech možnosti a způsob výpočtu nejistoty měření a prokázání návaznosti výsledků na referenční materiál při jeho analýze. V poměrně krátkém časovém období a při nízké finanční zátěži dostáváme data, která jsou použitelná pro zamýšlené výpočty a navíc jsou tato validační data použitelná pro výpočet správnosti a přesnosti metody.

2 Praktické aspekty vyhodnocení nejistoty s využitím certifikovaných referenčních materiálů

Vyhodnocení nejistoty s využitím certifikovaných referenčních materiálů by mělo uvažovat následující příspěvky:

- a) nejistota referenčního materiálu (u_{ref})
- b) opakovatelnost měření referenčního materiálu (u_R)
- c) nejistota výtěžnosti (u_{Re})

Pro kombinovanou nejistotu pak platí

$$u_C = \sqrt{u_R^2 + u_{ref}^2 + u_{Re}^2} \quad (2.1)$$

kde hodnoty u jsou standardní nejistoty.

2.1 Nejistota referenčního materiálu

Chyba certifikované hodnoty referenčního materiálu je nejčastěji vyjádřena na certifikátu směrodatnou odchylkou, intervalem spolehlivosti nebo nejnověji nejistotou referenčního materiálu. V případě, že je chyba vyjádřena nejistotou, pak se počítá přímo s touto nejistotou po převedení této nejistoty na standardní nejistotu. V případě, že je chyba vyjádřena bez dalších údajů ve formě $y = x \pm tol$, pak se musí tento údaj převést na směrodatnou odchylku tak, že se počítá s rovnoměrným rozdělením a pro výpočet směrodatné odchylky se použije

$$s = tol / \sqrt{3} = u_{ref} \quad (2.2)$$

kde tol je hodnota chyby.

V případě, že je chyba vyjádřena ve formě směrodatné odchylky, pak je nejistota hodnoty referenčního materiálu rovna uvedené směrodatné odchylce a platí $u_{ref} = s$.

Příklad č.1: Chyba referenčního materiálu je vyjádřena jako $(47,90 \pm 2,6)$ mg/kg s koeficientem rozšíření $k = 2$. Pak pro standardní nejistotu u_{ref} platí:

$$u_{ref} = 2,6 / 2 = 1,3$$

V případě, že by nebyl uveden koeficient rozšíření a platil by pouze údaj $(47,90 \pm 2,6)$ mg/kg, pak pro výpočet standardní nejistoty u_{ref} platí:

$$u_{ref} = 2,6 / \sqrt{3} = 2,28$$

2.2 Opakovatelnost měření referenčního materiálu

Opakovatelnost měření referenčního materiálu se vyjadřuje jako směrodatná odchylka stanovení s_x :

$$s_x = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n_A} (x' - x_i)^2} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^{n_A} (x' - x_i)^2} \quad (2.3)$$

Směrodatnou odchylku můžeme považovat za údaj o míře těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými [1] výsledky zkoušek za předem specifikovaných podmínek a pak se nazývá *přesnost metody*. K převedení na standardní nejistotu u_R platí:

$$u_R = \frac{s_x}{\sqrt{n}} \quad (2.4)$$

kde n je počet měření.

Příklad č. 2: Měřením referenčního materiálu v pěti opakováních ($n = 5$) byla získána hodnota 46,14 mg/kg se směrodatnou odchylkou stanovení $s_x = 1,47$ mg/kg.

Pak pro standardní nejistotu u_R platí:

$$u_R = \frac{1,47}{\sqrt{5}} = 0,66$$

2.3 Nejistota výtěžnosti

Těsnost shody zjištěné střední hodnoty referenčního materiálu x' s jeho hodnotou přijatou (certifikovanou) referenční hodnotou x_{ref} je definována jako správnost metody. Mezi střední hodnotou referenčního materiálu x' (průměrná hodnota z n paralelních měření) a přijatou (certifikovanou) hodnotou referenčního materiálu x_{ref} bude existovat vždy rozdíl, který lze vyjádřit odchylkou (*bias*) a :

$$a = x_{ref} - x' \quad (2.5)$$

Mezi zjištěnou střední hodnotou x' a hodnotou referenčního materiálu x_{ref} dále existuje vztah, který je definován poměrem naměřené hodnoty x' k přijaté referenční hodnotě x_{ref} a nazývá se výtěžnost (recovery) a můžeme je považovat za míru správnosti metody:

$$R_e = \frac{x'}{x_{ref}} \quad (2.6)$$

Hodnota výtěžnosti se vyjadřuje nejčastěji v procentech:

$$R_e(\%) = R_e \cdot 100 \quad (2.7)$$

Ke zjištění, zda mezi zjištěnou střední hodnotou x' , určenou z n paralelních stanovení, a přijatou referenční hodnotou x_{ref} existuje statisticky významný rozdíl, se testuje tento rozdíl Studentovým t -testem. Pro toto testování platí:

$$t = \frac{|x_{ref} - x'|}{s_x} \cdot \sqrt{n} \quad (2.8)$$

Jestliže platí:

$t \geq t(P = 0,95; f = n-1)$, pak rozdíl je statisticky významný a je prokázána soustavná chyba.

Výtěžnost by se měla započítávat do výsledku.

$t \leq t(P = 0,95; f = n-1)$, pak se liší naměřená hodnota x' pouze o náhodnou chybu.

Pro nejistotu výtěžnosti u_{Re} platí:

$$u_{Re} = |1 - R_e| \sqrt{\frac{1}{n} \left(\frac{s_x}{x'}\right)^2 + \left(\frac{u_{ref}}{x_{ref}}\right)^2} \quad (2.9)$$

kde všechny symboly mají obvyklé (již uvedené) významy.

V případě, že platí $|a| \geq u_{Re}$, pak se do celkové kombinované nejistoty u_c může zahrnout korekce na výtěžnost podle následujícího schématu:

- korekce na výtěžnost se nezahrne do výpočtu a pak se do celkové nejistoty počítá s odchylkou a ,
- korekce na výtěžnost se zahrne do výpočtu a pak se do celkové nejistoty počítá s nejistotou výtěžnosti u_R .

Při analýze certifikovaných referenčních materiálů a následných výpočtů platí následující akceptační kritéria:

- a) Počet paralelních opakování k určení směrodatné odchylky s_x pro danou koncentrační hladinu musí být minimálně šest a relativní směrodatná odchylka RSD_x musí být dostatečně malá pro každou koncentrační hladinu.
- b) Referenční materiály musejí pokrývat celý předpokládaný koncentrační obsah analytu a koncentrační hladina by měla odpovídat (50 – 200) % nominální koncentrace analytu ve vzorku; obvykle se volí minimálně tři koncentrační hladiny.
- c) V případě, že není k dispozici referenční materiál, může se použít referenční hodnota získaná jinou nezávislou metodou.

Příklad č. 3: Mezi certifikovanou hodnotou referenčního materiálu $x_{\text{ref}} = 47,90$ mg/kg a zjištěnou střední hodnotou $\bar{x} = 46,14$ mg/kg je odchylka:

$$a = 47,90 - 46,14 = 1,76$$

Pro nejistotu výtěžnosti u_{Re} platí ($n = 5$; $s_x = 1,47$; $u_{\text{RM}} = 1,3$ viz příklad č. 1 a 2):

$$R_e = \frac{4614}{4790} = 0,963$$

$$u_{\text{Re}} = 0,963 \sqrt{\frac{1}{5} \left(\frac{1,47}{4614} \right)^2 + \left(\frac{1,3}{4790} \right)^2} = 0,0295$$

Pro testování, zda je výtěžnost 100 %, platí:

$$t = \frac{1,76}{1,47} \cdot \sqrt{5} = 2,677$$

Protože $t_{\text{krit}} = 2,776$ a platí $2,677 \leq 2,776$ ($P = 0,95$; $f = n-1$) a pak zjištěná střední hodnota \bar{x} se liší pouze o náhodnou chybu a korekce na výtěžnost se nemusí započítávat do výsledku. Pak můžeme celkovou kombinovanou nejistotu vypočítat podle vztahu (2.1), ale namísto nejistoty výtěžnosti u_{Re} se však použije hodnota odchylky (bias) a :

$$u_c = \sqrt{(0,6\text{đ}^2 + (1,3)^2 + (1,7\text{đ}^2} = 2,28$$

V případě, že by se výtěžnost R_e započítávala do výsledku měření, pak se celková nejistota sníží a použije se čistý vztah (2.1):

$$u_c = \sqrt{(0,6\text{đ}^2 + (1,3)^2 + (0,029\text{đ}^2} = 2,13$$

Nevýhody tohoto postupu jsou následující: z jednoho CRM se získají pouze hodnoty nejistot pro omezené koncentrační hladiny a matrice, což má za následek vyšší náklady na validaci metody, protože se musejí nejistoty stanovit na více referenčních materiálech.

3 Návaznost měření na certifikovaný referenční materiál

Podmínkou k určení návaznosti měření je dostupnost referenčního materiálu s referenční hodnotou (x_{ref}) a deklarovanou nejistotou měření (u_{ref}) nebo směrodatnou odchylkou referenční hodnoty (s_{ref}). Při tomto postupu vyhodnocení musejí být dodržena následující kritéria:

- (A) opakovaně se analyzuje referenční materiál v počtu 6 až 8 opakování (!). Vyšší počet opakování nezajistí získání správnější ani přesnější hodnoty;
- (B) vypočte se směrodatná odchylka (s) a střední hodnota (\bar{x});
- (C) vypočtená střední hodnota (\bar{x}) se porovná s referenční hodnotou (x_{ref}), přičemž pro statistické vyhodnocení se používá několik přístupů:

- a) Porovnání intervalu referenční hodnoty x_{ref} a směrodatné odchylky referenční hodnoty (s_{ref}) se střední hodnotou (\bar{x}). Pokud platí nerovnost: $x_{\text{ref}} - 2s_{\text{ref}} \leq \bar{x} \leq x_{\text{ref}} + 2s_{\text{ref}}$ je návaznost výsledku na referenční materiál (pro danou matici a koncentrační úroveň) prokázána. Tuto nerovnost je možné nahradit intervalem spolehlivosti, ve kterém musí ležet střední hodnota \bar{x} . Nevýhodou tohoto vyhodnocení je, že nezahrnuje chybu střední hodnoty \bar{x} .
- b) Porovnání intervalu referenční hodnoty x_{ref} a směrodatné odchylky referenční hodnoty s_{ref} s intervalem střední hodnoty (\bar{x}) a opakovatelnosti měření referenčního materiálu vyjádřené jako směrodatná odchylka měření (s_x). Pokud dojde k průniku množin $x_{\text{ref}} \pm 2s_{\text{ref}} \cap \bar{x} \pm 2s_x$, je návaznost výsledku na referenční materiál (pro danou matici a koncentrační úroveň) prokázána.
- c) Výpočet E_n čísla (skóre), pro které platí:

$$E_n = \frac{|\bar{x} - x_{\text{ref}}|}{\sqrt{(u_c^2 + u_{\text{ref}}^2)}} \quad (3.1)$$

kde u_c je standardní nejistota získané hodnoty referenčního materiálu \bar{x} a u_{ref} je standardní nejistota referenční hodnoty referenčního materiálu x_{ref} . Pro podmínku návaznosti pak

můžeme psát: $0 < E_n < 2$ návaznost prokázána, $2 < E_n < 3$ podezřelé výsledky a v případě, že $E_n > 3$ návaznost nebyla prokázána.

Nevýhodou tohoto způsobu prokázání návaznosti měření je to, že je třeba použít tolik referenčních materiálů, aby se pokryl celý koncentrační rozsah a všechny matrice, na které se metoda používá.

Celá problematika výpočtu nejistot a návaznosti může být osvětlena na praktických příkladech níže. Získaná data jsou reálná data získaná při validaci analytických metod.

Příklad č. 4: Byl analyzován certifikovaný referenční materiál margarínu BCR122 na obsah retinolu a α -tokoferolu metodou HPLC. Certifikované hodnoty s chybou referenčního materiálu pro α -tokoferol a retinol jsou následující: retinol = $(7,3 \pm 1)$ mg/kg; α -tokoferol = (241 ± 12) mg/kg. Podle vztahu (2.2) pro standardní nejistotu retinolu platí $u_{\text{ref}} = 0,6$ mg/kg a pro standardní nejistotu α -tokoferolu platí $u_{\text{ref}} = 6,9$ mg/kg. Získaná a vypočtená data pro α -tokoferol a retinol jsou uvedena v tabulce:

Měření	α -tokoferol (mg/kg)	Retinol (mg/kg)
1	245,0	7,6
2	239,0	7,8
3	219,3	7,1
4	232,0	7,5
5	240,0	7,9
6	259,0	7,7
7	227,0	7,3
8	227,0	7,1
Střední hodnota \bar{x}	241,6	7,5
Směrodatná odchylka měření s_x	15,2	0,3
Standardní nejistota u_R (vztah 2.4)	3,6	0,1
Výtěžnost (R_e) (vztah 2.6)	1,002	1,027
Odchylka (bias) a (vztah 2.5)	0,6	0,2
Standardní nejistota výtěžnosti u_{R_e} (vztah 2.9)	0,003	0,008
Celková kombinovaná nejistota u_c (vztah 2.1)	7,8	0,6

Protože do výpočtu není brána do úvahy korekce na výtěžnost, pak se do celkové nejistoty počítá s odchylkou a .

Ze získaných nejistot lze pak prokázat návaznost získaných hodnot na hodnoty certifikovaného referenčního materiálu. Pro α -tokoferol platí:

$$E_n = \frac{|x' - x_{ref}|}{\sqrt{(u_c^2 + u_{ref}^2)}} = \frac{|241,6 - 241,0|}{\sqrt{(7,8^2 + 6,9^2)}} = 0,1$$

a pro retinol platí:

$$E_n = \frac{|x' - x_{ref}|}{\sqrt{(u_c^2 + u_{ref}^2)}} = \frac{|7,3 - 7,5|}{\sqrt{(0,6^2 + 0,6^2)}} = 0,2$$

a obě hodnoty z validační studie prokázaly návaznost na hodnoty certifikovaného referenčního materiálu.

Příklad č. 5: Byl analyzován certifikovaný referenční materiál BCR381 na obsah vápníku. Certifikovaná hodnota s chybou referenčního materiálu pro vápník je následující: certifikovaná hodnota vápníku 0,221 %, směrodatná odchylka 0,007 %. Protože je chyba obsahu vápníku vyjádřena ve formě směrodatné odchylky, pak je nejistota hodnoty referenčního materiálu rovna uvedené směrodatné odchylce a platí $u_{ref} = s = 0,007$ %.

Získaná a vypočtená data pro obsah vápníku jsou uvedena v tabulce:

Měření	Vápník (%)
1	0,244
2	0,231
3	0,245
4	0,240
Střední hodnota \bar{x}	0,240
Směrodatná odchylka měření s_x	0,006
Standardní nejistota u_R (vztah 2.4)	0,003
Výtěžnost (R_e) (vztah 2.6)	1,086
Odchylka (bias) a (vztah 2.5)	0,019
Standardní nejistota výtěžnosti u_{Re} (vztah 2.9)	0,003
Celková kombinovaná nejistota u_c (vztah 2.1)	0,020

Protože do výpočtu není brána do úvahy korekce na výtěžnost, pak se do celkové nejistoty počítá s odchylkou a .

Za povšimnutí stojí poměrně vysoká nejistota stanovení obsahu vápníku (0,020 %, což je 17,1 % rel.), která je dána vysokou hodnotou výtěžnosti (108,6 %).

Ze získaných nejistot lze pak prokázat návaznost hodnoty obsahu vápníku na referenční hodnotu.

Platí:

$$E_n = \frac{|x' - x_{ref}|}{\sqrt{(u_c^2 + u_{ref}^2)}} = \frac{|0,240 - 0,221|}{\sqrt{(0,020^2 + 0,007^2)}} = 0,9$$

a vypočtená hodnota E_n z validační studie prokázaly návaznost na hodnoty certifikovaného referenčního materiálu.

Příklad č. 6: Byl analyzován certifikovaný referenční materiál BCR380 na obsah tuku po hydrolýze. Certifikovaná hodnota s chybou referenčního materiálu pro tuk je následující: certifikovaná hodnota 26,87 %, směrodatná odchylka 0,40 %. Protože je chyba obsahu tuku vyjádřena ve formě směrodatné odchylky, pak je nejistota hodnoty referenčního materiálu rovna uvedené směrodatné odchylce a platí $u_{ref} = s = 0,40$ %.

Získaná a vypočtená data pro obsah tuku jsou uvedena v tabulce:

Měření	Tuk (%)
1	24,39
2	24,70
3	25,30
4	24,53
Střední hodnota \bar{x}	24,730
Směrodatná odchylka měření s_x	0,401
Standardní nejistota u_R (vztah 2.4)	0,200
Výtěžnost (R_e) (vztah 2.6)	0,92
Odchylka (bias) a (vztah 2.5)	2,140
Standardní nejistota výtěžnosti u_{Re} (vztah 2.9)	0,001
Celková kombinovaná nejistota u_c (vztah 2.1)	2,186

Protože je standardní nejistota výtěžnosti u_{Re} menší než odchylka a , byla použita při výpočtu nejistoty vzata do úvahy právě odchylka a . Ze získaných nejistot lze pak prokázat návaznost hodnoty na referenční hodnotu tuku certifikovaného referenčního materiálu. Platí:

$$E_n = \frac{|x' - x_{ref}|}{\sqrt{(u_c^2 + u_{ref}^2)}} = \frac{|24,73 - 26,87|}{\sqrt{(2,186^2 + 0,40^2)}} = 1,0$$

a vypočtená hodnota E_n z validační studie prokázaly návaznost na hodnoty certifikovaného referenčního materiálu.

Zde si je možné opět všimnout poměrně vysoké nejistoty stanovení obsahu tuku (2,186 %, což je 17,7 % rel.). Z tohoto důvodu byla také prokázána návaznost na CRM, protože nejistota u_{lab} » u_{ref} . Tuto nejistotu by šlo ještě snížit zvýšením výtěžnosti metody.

4 Návaznost interního referenčního materiálu na CRM

Použití certifikovaného referenčního materiálu v laboratorní praxi má dva významné limitující faktory. Prvním faktorem je vysoká cena a druhým faktorem je malé množství CRM, které se komerčně dodává. Proto má laboratoř snahu do svého systému řízení kvality zavádět interní referenční materiály (IRM), které jsou pro laboratoř dostupnější. Aby však použití interního referenčního materiálu mělo smysl, musí být tento materiál navázán na certifikovaný referenční materiál a získané hodnoty analytů IRM musejí mít přiřazenu svou nejistotu, která je správně vypočtena. Návaznost IRM má však své omezení. K návaznosti musí být použit CRM podobného složení a koncentrační úroveň analytů v CRM i IRM musí být srovnatelná. Nejvýhodnější postup je ten, že se v rámci validační studie vedle sebe analyzuje CRM i IRM. Strategie návaznosti a výpočet nejistot pak byla popsána již výše s tím, že do celkové kombinované nejistoty u_{IRM} se musí zahrnout i nejistota CRM u_{ref} (!):

$$u_{IRM} = \sqrt{u_{RM}^2 + u_{ref}^2} \quad (4.1)$$

kde u_{RM} je nejistota měření IRM získaného z validační studie. Jak vyplývá z definice návaznosti, která musí splňovat podmínku nepřerušenoho řetězce porovnávání, hodnotu nejistoty referenčního materiálu nelze v žádném případě vypustit.

5 Závěr

Použití certifikovaného referenčního materiálu ve validační studii přináší řadu výhod. Jeho analýzou získáme řadu validačních charakteristik v poměrně krátkém času a finanční náročnost se odvíjí od ceny referenčního materiálu, typů matric, které je nutno analyzovat a rozsahu koncentrací, které musejí být pokryty. Použití matričního certifikovaného referenčního materiálu umožňuje vyhodnotit či vyloučit systematickou chybu metody. Na druhé straně je referenční

materiál ve formě, která nevyžaduje další úpravy vzorku (dělení, homogenizace, mletí). Příspěvky nejistot těchto operací mohou být daleko vyšší než příspěvky nejistot, které získáme vlastní analýzou a proto je nutné tyto příspěvky posoudit odděleně. Proto je vhodné do celkové nejistoty začlenit příspěvek dlouhodobé opakovatelnosti, která se získá analýzou dvou paralelních opakování vzorků a postihuje právě nehomogenitu materiálu. Přes tyto omezení jsou obvykle informace z analýzy referenčního materiálu velmi hodnotným zdrojem údajů pro odhad nejistot.

6 Literatura

1. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement. ISO, Geneva 1993, **1995**
2. ČSN 01 0115 Mezinárodní slovník základních a všeobecných termínů v metrologii. ČSNI, Praha **1996**
3. Kvalimetrie 11. Stanovení nejistoty analytického měření. Editor M. Suchánek. EURACHEM-ČR, Praha **2001**. ISBN 80-901868-9-0
4. Kvalimetrie 14. Návaznost chemických měření. Pokyn EURACHEM/CITAC. Používání referenčních materiálů v chemické analýze. Editor M. Suchánek. EURACHEM-ČR, Praha **2004**. ISBN 80-86322-02-5

Ověřovací (konfirmační) metody pro stanovení doplňkových látek metodou LC/MS-MS

Michal Halama

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Praha, Za opravnou 4,
150 06 Praha 5 – Motol, michal.halama@ukzuz.cz

Úvod

Postup specifikuje podmínky pro stanovení monensinu, salinomycinu a narasinu v krmných směsích a premixech pro obsahy od 0,2 mg.kg⁻¹.

Monensin, salinomycin a narasin patří do skupiny polyetherických antibiotik produkovaných rodem *Streptomyces*. Jedná se o poměrně velké molekuly s molekulární hmotností 671; 751; 765 pro monensin, salinomycin, narasin. V jejich struktuře je obsažena karboxylová skupina na jednom konci a hydroxy- skupina na opačném konci, ochotně tvoří cyklické komplexy s kationty, zvláště se sodíkem a mají schopnost pronikat biologickou membránou. Polyetherová antibiotika se aplikují ve většině případech jako prevence ve formě krmiva. Do krmných směsí jsou přidávány ve formě sodných solí v obsazích (15 – 100) mg.kg⁻¹. Určitým omezením jejich klinického používání jsou jejich toxické vlastnosti a dále vznik bakteriálně rezistentních kmenů, ale i environmentální znečištění v podobě jejich reziduí v živočišných produktech při jejich nesprávném používání. Všechny tři se používají jako chemoterapeutika ve výkrmu kuřat, kuřic a krůt. Salinomycin a monensin jsou zároveň růstovými stimulanty prasat.

Cílem této práce byl převod stávající HPLC metody na hmotnostní detektor, dále zjednodušení přípravy vzorku a příprava multielementární metody pro kontrolu kontaminací vzorků krmiv.

1 Převod HPLC metody

Pro převod metody byla použita metoda stanovení monensinu salinomycinu a narasinu SOP č. 18 (1).

1.1 Chromatografické podmínky

Protože přímý převod uvedené metody není vzhledem k použití fosfátového pufru v mobilní fázi při použití MS detekce vhodný, neboť se jedná o netěkavou sloučeninu, která způsobuje zanášení iontového zdroje hmotnostního spektrometru, byl fosfátový pufr nahrazen přídatkem 0,1 % kyseliny mravenčí v mobilní fázi methanol/voda (85 : 15). Použitá kolona (Symmetry C18, 50 mm × 2,1 mm) byla vybrána s ohledem na optimální průtok mobilní fáze při ionizaci elektrosprejem a díky dobré separaci všech látek oproti koloně Xterra RP18, na které docházelo k chvostování píků. Na uvedené koloně je možno separovat monensin (2,74 min), lasalocid (3,23 min), salinomycin (4,08 min) a narasin (5,68 min) za následujících podmínek.

Kolona: RP C-18 Symmetry Shield C18 5 μm , 50 mm × 2,1 mm (Waters)

Teplota kolony: 30 °C

Mobilní fáze: methanol/voda (85/15 v/v) + 0,1% kyselina mravenčí

Průtok mobilní fáze: 0,3 ml.min⁻¹

Objem nástřiku: 2 μl

1.2 Podmínky MS

Polyetherické ionophory obsahují ve své molekule na jednom konci karboxylovou skupinu, na druhém konci hydroxy skupinu, díky čemuž snadno při ionizaci odštěpují molekulu CO₂ nebo H₂O. Proto dochází ke snadné ionizaci v kladném módu elektrospreje, která je podporována v kyselém prostředí. V záporném módu je ionizace podstatně méně účinná, proto byl pro ionizaci zvolen kladný mód ionizace elektrospreje. Ionizace pomocí chemické ionizace (APCI) za atmosférického tlaku, popsané Schlüsener a kol (2) pro salinomycin a další antibiotika je možná, ale podstatně méně intenzivní ve srovnání s elektrosprejem. Optimalizace podmínek ionizace elektrospreje byla prováděna pomocí infuze roztoku standardů jednotlivých ionophorů (0,1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) do proudu mobilní fáze o stejném průtoku, který se používá při spojení HPLC/MS, aby bylo možno nalézt optimální napětí na kapiláře (capillary voltage) a napětí na vstupu do hmotnostního analyzátoru (cone voltage) tak, aby intenzita iontů $[\text{M}+\text{Na}]^+$ byla maximální. Teplota iontového zdroje (source temperature), teplota desolvačního plynu (desolvation temperature) průtok desolvačního plynu (desolvation gas flow), průtok plynu na vstupu do iontového zdroje (cone gas flow) a tlak kolizního plynu (argon) v kolizní cele (CID gas) byly nastaveny dle doporučených hodnot v manuálu přístroje s ohledem na průtok mobilní fáze. Dále

byla optimalizována poloha ionizační kapiláry i celého iontového zdroje vzhledem ke vstupu do iontového zdroje. Nalezené optimální podmínky jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č.1: Nalezené optimální podmínky

Ionizační mód	ESI+
Capillary voltage	3,15 kV
Cone voltage	35 V
Source temperature	120 °C
Desolvation temperature	300 °C
Desolvation gas flow	500 l.h ⁻¹
Cone gas flow	50 l.h ⁻¹
CID gas	argon, p = 2,5 mbar

Pro identifikaci IMPA byl použit MRM (multiple reaction monitoring) mód, sledováním dvou produktových iontů pocházejících z jednoho prekurzorového iontu, čímž je splněna podmínka European Union Commission Decision 2002/657/EC (3) k identifikaci analytu pomocí MS/MS. Při optimalizaci MS/MS parametrů byla nastavena taková hodnota kolizní energie, při které byla intenzita daného dceřiného iontu maximální. Nastavení MRM parametrů jsou uvedeny v tabulce č. 2. Ukázky MS a MS² spekter jednotlivých látek jsou uvedeny v obr. 3, u hledaných iontů je uvedena hodnota poměru m/z.

Tabulka č.2: MRM parametry pro analýzu salinomycinu, monensinu a narasinu

	Prekurzorový iont (m/z)	Produktový iont (m/z)	Kolizní energie (eV)
Salinomycin	773,5	431,2	60
		265,2	65
Monensin	693,4	461,2	60
		479,2	65
Narasin	787,5	431,2	60
		531,2	65

1.3 Kalibrace

K vyhodnocení obsahu jednotlivých ionoforů byla použita externí kalibrace v rozsahu (0,04 – 2) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Protože pro tuto skupinu látek není znám žádný stabilní a snadno dostupný interní standard, bylo zkoušeno ke vzorkům přidávat standard lasalocidu, což se neosvědčilo z důvodu různé odezvy signálu lasalocidu v různých matricích vzorků krmiv.

1.4 Interpretace validačních parametrů

Pro validaci metody byly použity vzorky krmiv a premixů uvedených v tabulce č. 3.

Tabulka č.3: Krmiva a premixy použité pro validaci metody

	Krmná směs	Premix
Monensin	Obila BR2 AM kompletní krmná směs pro brojlerová kuřata, Obila a.s.	Minerální doplňkové krmivo pro skot TURMIX, Tekro s.r.o.
Narasin	Kompletní krmná směs pro výkrm brojlerů BR1, Primagra a.s.	Aminovitan BR2+, premix pro brojlerů, Biofaktory Praha s.r.o.
Salinomycin	Gilpa trinkets complete, kompletní krmivo pro dospělé psy, Petra Conway	Aminovitan P1, premix pro předvýkrm prasat (18 – 35) kg, Biofaktory Praha s.r.o.

1.4.1 Opakovatelnost

Opakovatelnost charakterizuje rozptýlení validované vlastnosti kolem střední hodnoty, které způsobují náhodné chyby. Stanovení opakovatelnosti bylo provedeno z devíti stejných navážek jednoho vzorku krmiva pro každou stanovovanou látku.

Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Tabulka č.4: Opakovatelnosti, nalezený obsah v mg.kg⁻¹ pro jednotlivé analyty

Úroveň		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Monensin	PX	1827,7	2112,5	2171,4	1934,5	2347,9	2280,3	2190,9	2099,1	2400,0
	KS	122,68	115,62	114,37	113,45	105,30	111,79	106,90	108,04	109,52
Narasin	PX	16412,8	16230,7	17062,5	16900,8	18036,2	18425,5	18582,0	15890,9	16709,4
	KS	42,60	43,73	37,59	41,89	41,25	40,06	43,60	40,67	41,76
Salinomycin	PX	10416,7	9286,1	10238,6	9048,8	10586,7	10096,3	10249,7	9958,1	10390,1
	KS	34,54	34,46	32,29	33,54	33,48	34,09	33,58	34,29	32,52

V tabulce č. 4 uvedená data neprokázala při použití Cochranova, Dixonova a Grubsova testu přítomnost odlehlých bodů, statistické parametry opakovatelnosti vypočítané pomocí programu Effi validation 3.0 jsou uvedeny v tabulce č. 4.a.

Tabulka č.4.a: Statistické parametry

		Průměr	Opakovatelnost	Rel. opakovatelnost	n
Monensin	PX	2151,6	185,4	8,62	9
	KS	111,96	5,34	4,77	9
Narasin	PX	17087	939,3	5,50	9
	KS	41,46	1,90	4,58	9
Salinomycin	PX	10030	525,2	5,24	9
	KS	33,71	0,79	2,35	9

1.4.2 Správnost

Správnost charakterizuje shodnost výsledků měření validované vlastnosti s deklarovanou referenční hodnotou. Správnost byla dále zjišťována testem výtěžnosti, kdy k přesně známé navážce vzorku se zjištěným obsahem určované látky byl přidán čistý standard stanovované látky v množství odpovídajícímu (40; 80; 120) % obsahu analytu v původním vzorku. Z naměřených dat byla zpětně vypočtena výtěžnost celé metody. t – test prokázal normální rozdělení dat uvedených v tabulce č. 5 (premixy), č. 7 (krmné směsi) a nebyla prokázána přítomnost odlehlých bodů při použití Cochranova, Dixonova a Grubsova testu. Statistické parametry vypočítané

pomocí programu Effi validation 3.0 jsou uvedeny v tabulce č. 6 pro premixy a pro krmné směsi v tabulce č. 8.

Tabulka č.5: Naměřené hodnoty pro správnost v premixech

Analyt	Hladina	Předloženo (mg.kg ⁻¹)	Nalezeno (mg.kg ⁻¹)		
Monensin	1	2946,5	2910,5	2757,3	2727,2
	2	3741,3	3781,9	3464,2	3403,9
	3	4536,2	4541,6	4472,9	4390,3
Narasin	1	22766	21899	22999	24257
	2	28663	28488	30649	29888
	3	34019	35953	39426	33991
Salinomycin	1	14006	15456	12360	14298
	2	17982	17480	18241	18809
	3	21958	23108	19961	23288

Tabulka č.6: Statistické parametry pro správnost v premixech

Tabulka č.6.a: Monensin

Hladina	Předloženo (mg.kg ⁻¹)	Nalezeno (mg.kg ⁻¹)	Výtěžnost (%)	Přesnost (mg.kg ⁻¹)	n	t – vyp.	t – krit.	Hypotéza
1	2946,5	2798,3	94,97	98,3	3	2,6108	4,303	Přijata
2	3741,3	3550	94,89	203,1	3	1,632	4,303	Přijata
3	4536,2	4468,3	98,5	75,76	3	1,553	4,303	Přijata

Tabulka č.6.b: Narasin

Hladina	Předloženo (mg.kg ⁻¹)	Nalezeno (mg.kg ⁻¹)	Výtěžnost (%)	Přesnost (mg.kg ⁻¹)	n	t – vyp.	t – krit.	Hypotéza
1	22766	23052	101,3	1180	3	0,4194	4,303	Přijata
2	28663	29675	103,5	1096	3	1,599	4,303	Přijata
3	34019	36457	107,17	2752	3	1,534	4,303	Přijata

Tabulka č.6.c: Salinomycin

Hladina	Předloženo (mg.kg ⁻¹)	Nalezeno (mg.kg ⁻¹)	Výtěžnost (%)	Přesnost (mg.kg ⁻¹)	n	t – vyp.	t – krit.	Hypotéza
1	14006	14038	100,2	1564	3	0,03543	4,303	Přijata
2	17982	18176	101,1	666,8	3	0,5056	4,303	Přijata
3	21958	22119	100,7	1871	3	0,1491	4,303	Přijata

Tabulka č.7: Naměřené hodnoty pro správnost v krmných směsích

Analyt	Hladina	Předloženo (mg.kg ⁻¹)	Nalezeno (mg.kg ⁻¹)		
Monensin	1	160,15	161,96	173,22	168,25
	2	208,33	217,44	220,22	205,11
	3	256,51	241,41	245,57	264,69
Narasin	1	62,30	62,17	61,26	59,33
	2	83,14	79,47	83,35	80,68
	3	103,98	109,24	103,22	107,05
Salinomycin	1	50,07	51,78	50,36	52,65
	2	66,43	69,07	67,21	71,06
	3	82,78	78,59	81,56	81,7

Tabulka č.8: Statistické parametry pro správnost krmných směsí

Tabulka č.8.a: Monensin

Hladina	Předloženo (mg.kg ⁻¹)	Nalezeno (mg.kg ⁻¹)	Výtěžnost (%)	Přesnost (mg.kg ⁻¹)	n	t – vyp.	t – krit.	Hypotéza
1	160,15	167,81	104,78	5,643	3	2,351	4,303	Přijata
2	208,33	214,257	102,84	8,042	3	1,276	4,303	Přijata
3	256,51	250,557	97,68	12,42	3	0,8305	4,303	Přijata

Tabulka č.8.b: Narasin

Hladina	Předloženo (mg.kg ⁻¹)	Nalezeno (mg.kg ⁻¹)	Výtěžnost (%)	Přesnost (mg.kg ⁻¹)	n	t – vyp.	t – krit.	Hypotéza
1	62,3	60,92	97,79	1,450	3	1,648	4,303	Přijata
2	83,14	81,17	97,63	1,985	3	1,722	4,303	Přijata
3	103,98	106,5	102,43	3,047	3	1,434	4,303	Přijata

Tabulka č.8.c: Salinomycin

Hladina	Předloženo (mg.kg ⁻¹)	Nalezeno (mg.kg ⁻¹)	Výtěžnost (%)	Přesnost (mg.kg ⁻¹)	n	t – vyp.	t – krit.	Hypotéza
1	50,07	51,6	103,1	1,156	3	2,287	4,303	Přijata
2	66,43	69,11	104,0	1,925	3	2,414	4,303	Přijata
3	82,78	80,62	97,39	1,756	3	2,133	4,303	Přijata

1.4.3 Linearita

Linearita určuje míru lineární závislosti mezi koncentrací a plochou píku, která je určena velikostí korelačního koeficientu a Quality Control (QC) koeficientu. Naměřené hodnoty jednotlivých kalibračních křivek jsou uvedeny v tabulce č. 9, statistické parametry vypočítané pomocí programu Effi validation 3.0 jsou uvedeny v tabulce č. 10. Test normality prokázal normální rozdělení naměřených hodnot. Grafická závislost je uvedena v obr. č. 1.

Tabulka č.9: Linearita kalibrační křivky

		1	2	3	4	5	6
Monensin	mg.l ⁻¹	1,926	0,963	0,385	0,193	0,096	0,039
	plocha	22830	11497	4766,4	2529,6	1236,6	591,2
Narasin	mg.l ⁻¹	2,07	1,035	0,414	0,207	0,103	0,041
	plocha	45351,2	22764,6	9404,8	4876,4	2612	1089
Salinomycin	mg.l ⁻¹	1,925	0,962	0,385	0,193	0,096	0,038
	plocha	54152,8	27977,2	11420,4	5704,4	3110,6	1994,5

Tabulka č.10: Statistické parametry linearity

	Vypočtený korelační koeficient	Testovaný korelační koeficient	Vypočtený QC	Testovaný QC	Hypotéza
Monensin	1	0,99	0,81187	5	Přijata
Narasin	1	0,99	0,55408	5	Přijata
Salinomycin	1	0,99	1,84906	5	Přijata

1.4.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce je nejmenší koncentrace analytu, nad kterou lze spolehlivě provést kvalitativní stanovení. Mez stanovitelnosti je nejmenší koncentrace analytu, nad kterou lze spolehlivě provést kvantitativní stanovení. Vypočítané meze detekce a meze stanovitelnosti z kalibrační křivky jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka č.11: Mez detekce a mez stanovitelnosti

	Mez detekce (mg.kg ⁻¹)	Mez stanovitelnosti (mg.kg ⁻¹)
Monensin	0,0177	0,03187
Narasin	0,0129	0,02331
Salinomycin	0,0408	0,07353

1.5 Závěr

Z naměřených hodnot vyplývá, že převod stávající metody uvedené v SOP. č. 18 na HPLC-MS/MS je možný s minimálními modifikacemi. Vzhledem k vyšší ceně stanovení oproti UV detekci je vhodné používat MS detekci hlavně u stanovení nízkých koncentrací kontaminací, kdy je třeba i jednoznačně identifikovat daný analyt, což při použití UV detektoru s diodovým polem nebývá zcela dostatečné.

2 Zjednodušená metoda

2.1 Příprava vzorku

Po úspěšném převodu stávající metody jsme zkoušeli zjednodušit a zkrátit přípravu vzorku a zároveň zvýšit počet analytů, které by bylo možné současně stanovit v krmivech, podobně jako je popsáno v jiných maticích (vejce, maso) (4,5). Byla zkoušena metoda přípravy vzorku krmiv, která je založena na postupu popsaném Canavan et al. (6) pro stanovení nicarbazinu v krmivech. Do kónické baňky o objemu 250 ml se zábrusem bylo naváženo 20 g vzorku krmiva a přidáno 100 ml extrakčního roztoku methanol/voda (90 : 10). Poté byla baňka uzavřena a třepána na laboratorní třepačce po dobu 30 minut při 150 kmitech za minutu. 10 ml extraktu bylo převedeno do centrifugační baňky a odstředěno po dobu 10 minut při 1500 g. 1 ml tohoto roztoku byl 10 × naředěn vodným methanolem (methanol/voda, 75 : 25), přefiltrován přes membránový filtr Milipore 0,45 μm a převeden do vialky. Výsledky správnosti a opakovatelnosti získané při použití této metody na blank vzorku krmiva s přidavkem jednotlivých standardů odpovídajících obsahu analytu (0,6; 6; 20) $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ jsou uvedeny v tabulkách č. 16 a 17, výsledky správnosti a opakovatelnosti na blank vzorku krmiva s přidavky odpovídající obsahu analytu (0,2; 0,5; 2) $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ jsou uvedeny v tabulkách č. 18 a 19.

Tato metoda byla zkoušena s modifikacemi – přečištění extraktu přes SPE kolonky, odpaření extraktu pod proudem dusíku, které však nepřinesly očekávané snížení vlivu matrice na ionizaci analytu a tím i na stanovený obsah analytu ve vzorcích krmiv.

2.2 Chromatografické podmínky

Chromatografické podmínky byly shodné s podmínkami uvedenými při převodu metody. Dále bylo testováno použití gradientové separace z důvodu otestování a omezení vlivu tzv. „echo píku“, které se můžou u krátkých izokratických analýz vzorků v komplikovanějších maticích vyskytovat. Gradient 1 (tabulka č. 12) byl vytvářen s požadavkem na zachování rychlé analýzy mícháním mobilních fází A a B.

A – methanol/voda (25 : 75 v/v) + 0,1% kyselina mravenčí

B – methanol + 0,1% kyselina mravenčí

Průtok mobilní fáze byl zachován stejný jako při izokratických separacích 0,3 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Tabulka č.12: gradient 1.

T (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
3	0	100
6	0	100
6,5	100	0

Čas na ekvilibrování kolony na počáteční podmínky byl 3,5 minuty; celková doba analýzy 10 minut; retenční časy jednotlivých analytů jsou uvedeny v tabulce č. 14. Vzhledem k poměrně velké strmosti gradientu a velikosti zpoždění gradientu (0,315 ml) vzhledem k průtoku docházelo k eluci látek v rozmezí 6. a 7. minuty. Rozdělení látek nesplňuje požadavky kladené na HPLC-UV metody, ale při použití selektivního hmotnostního detektoru, který umožňuje rozdělení jednotlivých koelujících látek není nedokonalé rozdělení tak kritickým parametrem, jako při použití UV detektoru.

Protože při současném sledování většího množství dceřiných fragmentů pomocí MRM přechodů dochází při koeluci látek k prodloužení doby, která je nutná pro získání alespoň minimálního počtu bodů pro správnou integraci píku a nebo při zkrácení doby sledování každého MRM přechodu k celkovému snížení citlivosti metody. Z těchto důvodů byl použitý gradient 2 (tabulka č. 13), který umožňuje lepší separaci látek, i když u maduramycinu a salinomycinu stále dochází ke koeluci, tak je možné současně sledovat nižší počet analytů současně a tím dosáhnout vyšší citlivosti metody.

Tabulka č.13: gradient 2

T (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
2	25	75
10	0	100
12	0	100
12,5	100	0

Čas na ekvilibrování kolony na počáteční podmínky byl 3,5 minuty, celková doba analýzy 16 minut, retenční časy jednotlivých analytů jsou uvedeny v tabulce č. 14, ukázka

rekonstruovaného chromatogramu pro jednotlivé látky separované gradientem 1 je uvedena na obr. 2.

Tabulka č.14: Retenční časy ionophorů

	Gradient 1	Gradient 2
	t (min)	t (min)
Halofuginon	3,29	3,26
Semduramycin	6,21	8,17
Monensin	6,45	8,85
Maduramycin	6,64	9,66
Salinomycin	6,73	9,73
Narasin	6,94	10,42

2.3 MS podmínky

Nastavení podmínek na hmotnostním spektrometru bylo shodné s podmínkami uvedenými při převodu metody v tabulce č. 1, pouze došlo k rozšíření počtu sledovaných látek. Na obr. 3 jsou uvedeny MS a MS² spektra s vyznačením všech důležitých iontů.

Tabulka č.15:

	Prekurzorový iont (m/z)	Produktový iont (m/z)	Kolizní energie (eV)
Salinomycin	773,5	431,2	60
		265,2	65
Monensin	693,4	461,2	60
		479,2	65
Narasin	787,5	431,2	60
		531,2	65
Semduramycin	895,4	833,4	40
		705,5	65
Maduramycin	939,8	877,5	50
		719,5	70
Halofuginon	416	100,3	35
		120	35

2.4 Kalibrace

Protože se použití externí kalibrace příliš neosvědčilo, a protože pro tuto skupinu látek není znám vhodný a dostupný interní standard, byly obsahy jednotlivých složek počítány pomocí standardního přídatku standardu v množství přibližně odpovídajícím předpokládanému obsahu stanovované látky.

2.5 Interpretace validačních parametrů

2.5.1 Validace salinomycinu, monensinu, narasinu pomocí zjednodušené přípravy

Validace metody byla provedena na vzorku krmiva –ČOS kompletní krmná směs pro selata nad 8 kg živé hmotnosti (zemědělské zásobování a nákup Děčín). Toto krmivo neobsahuje žádný z uvedených ionoforů, a proto bylo použito jako blank, ke kterému byly přidány přídatky čistých standardů salinomycinu, monensinu, narasinu v množství odpovídajícímu (0,6; 6; 20) mg.kg⁻¹. Vzorky byly připraveny podle výše uvedeného postupu extrakcí v extrakčním roztoku

methanol/voda (90 : 10), odstředěny, naředěny na koncentraci vhodnou pro nástřik do MS a analyzovány pomocí HPLC-MS/MS sledováním vybraných produktových iontů. Pomocí programu Effi validation 3.0 byla vyhodnocena správnost (tabulka č. 16) a opakovatelnost měření (tabulka č. 17).

Tabulka č.16: Správnost metody

Tabulka č.16.a: Salinomycin

Hladina	Předloženo (mg.kg ⁻¹)	Nalezeno (mg.kg ⁻¹)	Výtěžnost (%)	Přesnost (mg.kg ⁻¹)	n	t – vyp.	t – krit.	Hypotéza
1	0,65274	0,565429	86,62	0,022953	6	9,317	2,571	Zamítnuta
2	6,5274	6,37899	97,73	0,5423	6	0,6703	2,571	Přijata
3	21,758	30,13317	138,49	6,422	6	3,194	2,571	Zamítnuta

Tabulka č.16.b: Monensin

Hladina	Předloženo (mg. kg ⁻¹)	Nalezeno (mg. kg ⁻¹)	Výtěžnost (%)	Přesnost (mg. kg ⁻¹)	n	t – vyp.	t – krit.	Hypotéza
1	0,645	0,6696	103,81	0,8518	6	0,07066	2,571	Přijata
2	6,451	5,913	91,66	0,5668	6	2,325	2,571	Přijata
3	21,504	26,06	121,21	4,4205	6	2,527	2,571	Přijata

Tabulka č.16.c: Narasin

Hladina	Předloženo (mg. kg ⁻¹)	Nalezeno (mg. kg ⁻¹)	Výtěžnost (%)	Přesnost (mg. kg ⁻¹)	n	t – vyp.	t – krit.	Hypotéza
1	0,621	0,640346	103,1153	0,83784	6	0,056559	2,571	Přijata
2	6,21	5,861625	94,39009	0,567134	6	1,504657	2,571	Přijata
3	20,7	25,0213	120,8758	4,423324	6	2,392992	2,571	Přijata

Tabulka č.17: Opakovatelnost měření jednotlivých ionophorů

	Hladina	Průměr (mg. kg⁻¹)	Opakovatelnost (mg. kg⁻¹)	Rel. opakovatelnost (%)	n
Salinomycin	1	0,669575	0,851878	127,2267	6
	2	5,912954	0,566826	9,586179	6
	3	26,06502	4,420587	16,95984	6
Monensin	1	0,323095	0,082202	25,44207	5
	2	5,912954	0,566826	9,586179	6
	3	26,06502	4,420587	16,95984	6
Narasin	1	0,640333	0,83794	130,8599	6
	2	5,861667	0,567098	9,674691	6
	3	25,02117	4,423302	17,67824	6

2.5.2 Validace zjednodušené přípravy pro 6 látek

Validace metody pro více látek byla provedena na vzorku krmiva pro testování homogenity lasalocidu. Toto krmivo obsahující mouku, vápenec a lasalocid a bylo vybráno z důvodu ověření možnosti stanovení kontaminací ionophorů v přítomnosti jiné látky. Uvedené krmivo neobsahuje žádný ze stanovovaných ionophorů, a proto bylo použito jako blank, ke kterému byly přidány přísady čistých standardů salinomycinu, monensinu, narasinu v množství odpovídajícímu (0,2; 0,6; 2) mg.kg⁻¹. Vzorky byly připraveny podle výše uvedeného postupu extrakcí v extrakčním roztoku methanol/voda (90 : 10), odstředěny, naředěny na koncentraci vhodnou pro nástřik do MS a analyzovány pomocí HPLC-MS/MS sledováním vybraných produktových iontů. Pomocí programu Effi validation 3.0 byla vyhodnocena správnost (tabulka č. 19) a opakovatelnost měření (tabulka č. 18).

Tabulka č.18: Opakovatelnost

	Hladina	Průměr (mg.kg ⁻¹)	Opakovatelnost (mg.kg ⁻¹)	Rel. opakovatelnost (%)	n
Salinomycin	1	0,2647	0,1679	63,42	6
	2	1,308	0,368	28,15	6
	3	4,923	0,679	13,79	6
Monensin	1	0,1188	0,09414	79,22	6
	2	0,4138	0,08740	21,12	6
	3	2,883	0,31311	10,86	6
Narasin	1	-0,001804	0,0003581	19,85	6
	2	1,03004	0,09385	9,112	6
	3	6,4316	0,3181	4,946	6
Semduramycin	1	0,3820	0,03792	9,926	6
	2	0,76458	0,06348	8,302	6
	3	2,298	0,1939	8,436	6
Maduramycin	1	0,1374	0,04686	34,11	6
	2	0,8685	0,1497	17,24	6
	3	4,090	0,09550	2,335	6
Halofuginon	1	-0,08165	0,01392	17,04	6
	2	0,1414	0,01709	12,09	6
	3	1,192	0,04497	3,773	6

Tabulka č.19: Správnost

Tabulka č.19.a: Salinomycin

Hladina	Předloženo (mg.kg ⁻¹)	Nalezeno (mg.kg ⁻¹)	Výtěžnost (%)	Přesnost (mg.kg ⁻¹)	n	t – vyp.	t – krit.	Hypotéza
1	0,21758	0,264726	121,67	0,1679	6	0,688	2,571	Přijata
2	0,54395	1,3085	240,5484	0,3683	6	5,084	2,571	Zamítnuta
3	2,1758	4,923	226,271	0,6791	6	9,9104	2,571	Zamítnuta

Tabulka č.19.b: Monensin

Hladina	Předloženo (mg.kg ⁻¹)	Nalezeno (mg.kg ⁻¹)	Výtěžnost (%)	Přesnost (mg.kg ⁻¹)	n	t – vyp.	t – krit.	Hypotéza
1	0,21504	0,1188	55,265	0,09415	6	2,5027	2,571	Přijata
2	0,5376	0,4138	76,976	0,08740	6	3,7470	2,571	Zamítnuta
3	2,1504	2,8832	134,078	0,31311	6	6,1923	2,571	Zamítnuta

Tabulka č.19.c: Narasin

Hladina	Předloženo (mg.kg ⁻¹)	Nalezeno (mg.kg ⁻¹)	Výtěžnost (%)	Přesnost (mg.kg ⁻¹)	n	t – vyp.	t – krit.	Hypotéza
1	0,207	-0,001804	-0,8715	0,0003581	6	1428,161	2,571	Zamítnuta
2	0,5175	1,03004	199,04	0,09385	6	14,4487	2,571	Zamítnuta
3	2,07	6,4316	310,70	0,31809	6	33,586	2,571	Zamítnuta

Tabulka č.19.d: Semduramycin

Hladina	Předloženo (mg.kg ⁻¹)	Nalezeno (mg.kg ⁻¹)	Výtěžnost (%)	Přesnost (mg.kg ⁻¹)	n	t – vyp.	t – krit.	Hypotéza
1	0,198	0,3820	192,95	0,03792	6	12,839	2,571	Zamítnuta
2	0,495	0,7646	154,46	0,06347	6	11,236	2,571	Zamítnuta
3	1,98	2,2981	116,07	0,1938	6	4,342	2,571	Zamítnuta

Tabulka č.19.e: Maduramycin

Hladina	Předloženo (mg.kg ⁻¹)	Nalezeno (mg.kg ⁻¹)	Výtěžnost (%)	Přesnost (mg.kg ⁻¹)	n	t – vyp.	t – krit.	Hypotéza
1	0,1878	0,1373	73,15	0,04685	6	2,8466	2,571	Zamítnuta
2	0,4695	0,8684	184,99	0,14976	6	7,0484	2,571	Zamítnuta
3	3,559	4,0900	114,91	0,09550	6	13,608	2,571	Zamítnuta

Tabulka č.19.f: Halofuginon

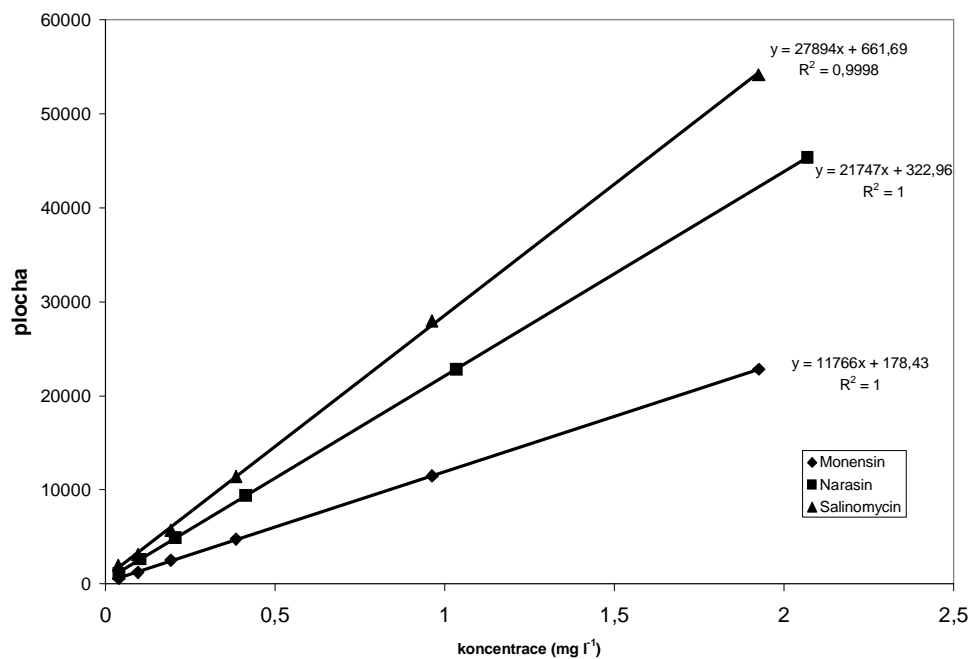
Hladina	Předloženo (mg.kg ⁻¹)	Nalezeno (mg.kg ⁻¹)	Výtěžnost (%)	Přesnost (mg.kg ⁻¹)	n	t – vyp.	t – krit.	Hypotéza
1	0,198	-0,08165	-41,24	0,01392	6	53,16	2,571	Zamítnuta
2	0,495	0,1414	28,56	0,01709	6	54,75	2,571	Zamítnuta
3	1,98	1,1920	60,20	0,044974	6	46,35	2,571	Zamítnuta

2.6 Závěr

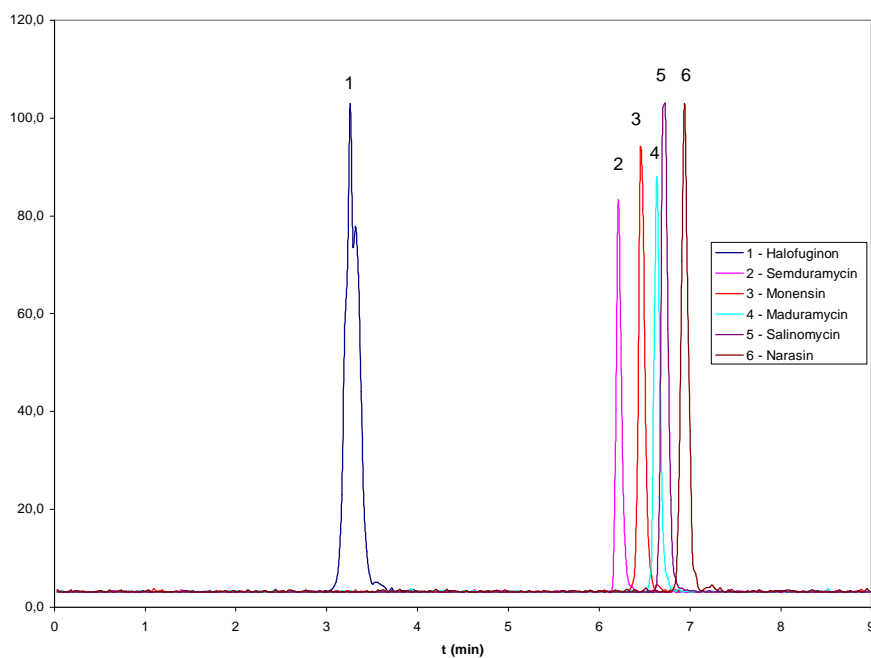
Z výsledků získaných při validaci zjednodušené přípravy vzorku vyplývá, že jí je možno použít pro identifikaci jednotlivých analytů, ale vzhledem k poměrně složité matici ve vzorcích krmiv dochází k silným matričním vlivům při ionizaci na elektrospreji, které se vzhledem k různému složení liší u každého druhu krmiva čímž je kvantifikace látek obtížnější.

3 Literatura

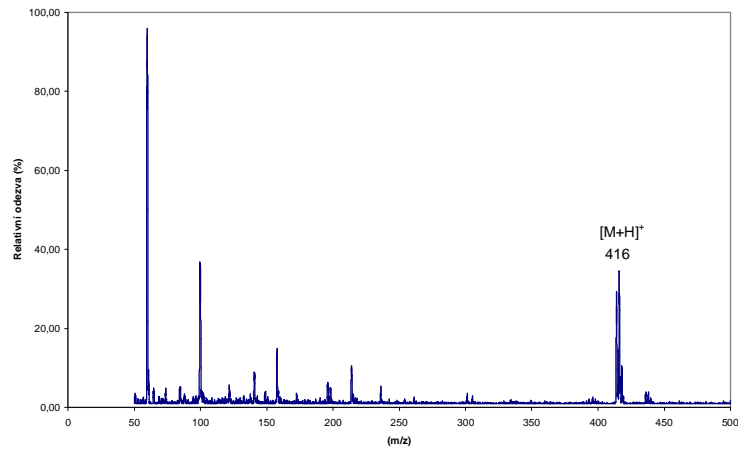
1. SOP č.18
2. Michael P. Schlüsener, Michael Spiteller and Kai Bester, Determination of antibiotics from soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of chromatography A*, **2003** 1003, 21 – 28
3. European Union Commission Decision 2002/657/EC, Off. J. Eur. Commun. **2002** L221
4. Dharmendr K. Matabudul a,b, Brian Conway a, Ian Lumley a, Sam Sumar b, Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section, The simultaneous determination of the ionophore antibiotics in animal tissues and eggs by tandem electrospray LC–MS–MS, *Chemistry* **2001** 75, 345 – 354
5. M. Dubois, G. Pierret and Ph. Delahaut, Efficient and sensitive detection of residues of nine coccidiostats in egg and muscle by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, **2004** 813, 181 – 189
6. Andrew Cannavan, Glyn Ball and D. Glenn Kennedy, Determination of nicarbazine in feeds using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, *Analyst*, **1999** 124, 1431 – 1434



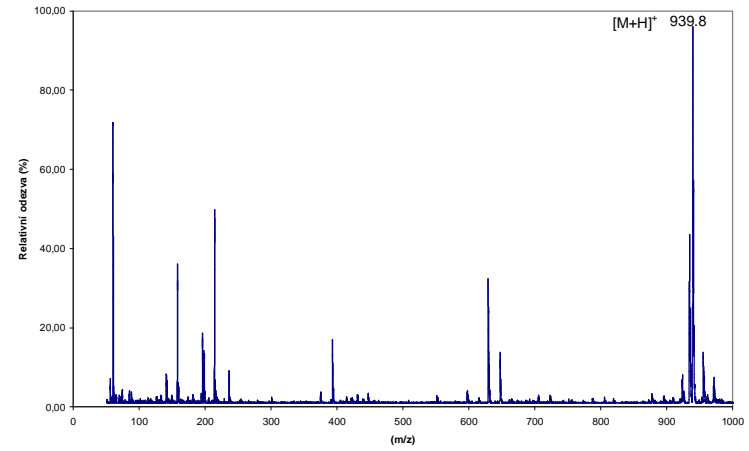
Obr. 1: Kalibrační křivky salinomycinu, monensinu, narasinu měřené za izokratických podmínek



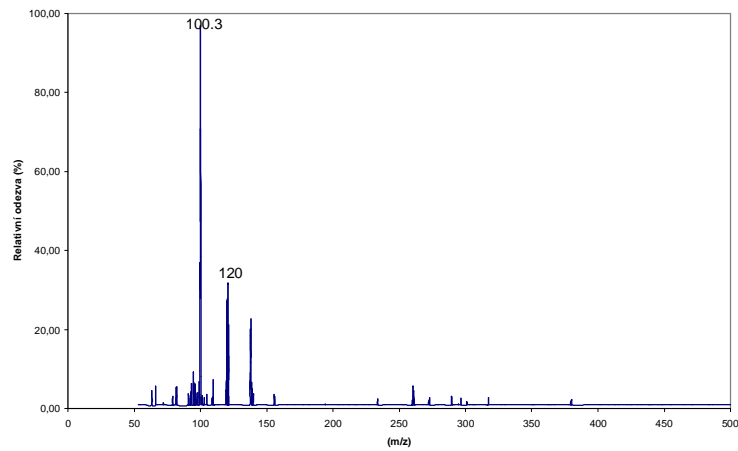
Obr. 2: Rekonstruovaný chromatogram separace halofuginonu, semduramycinu, monensinu, maduramycinu, salinomycinu a narasinu při použití gradientu 1 (tabulka 12).



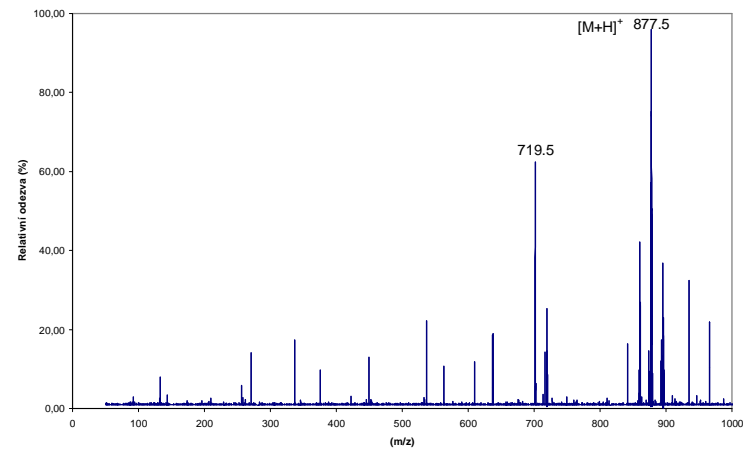
Obr. 3.a: Halofuginon MS spektrum



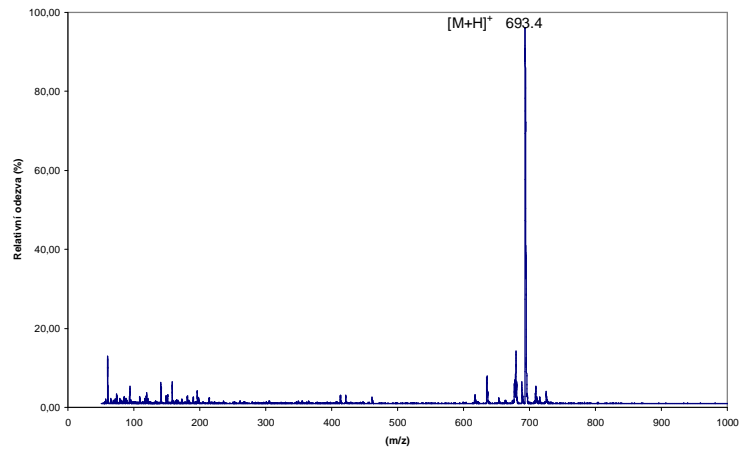
Obr. 3.b: Maduramycin MS spektrum



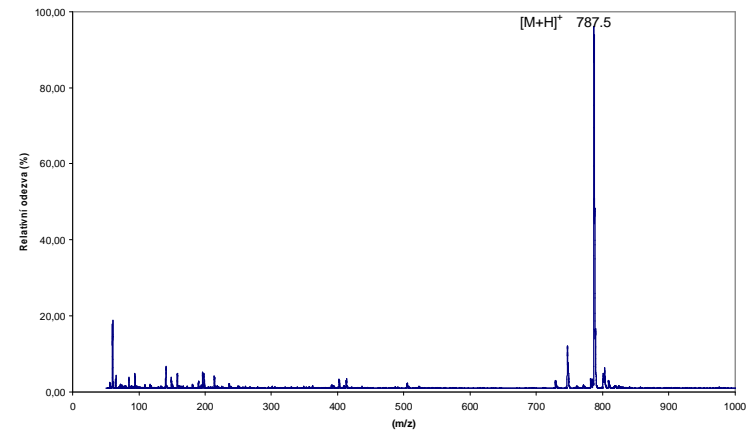
Obr. 3.c: Halofuginon MS/MS spektrum



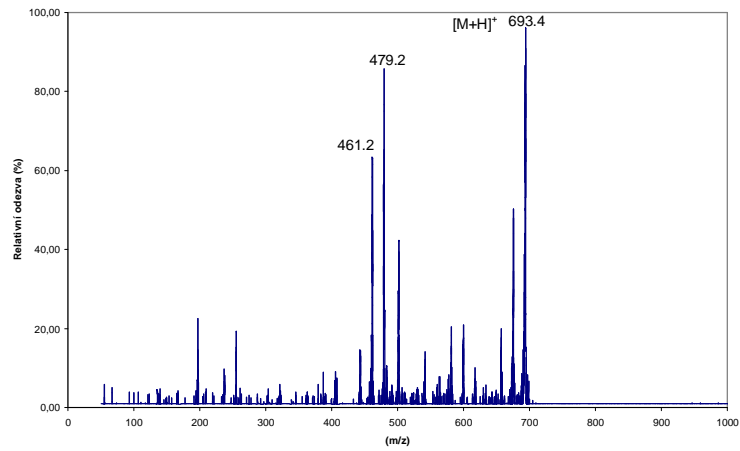
Obr. 3.d: Maduramycin MS/MS spektrum



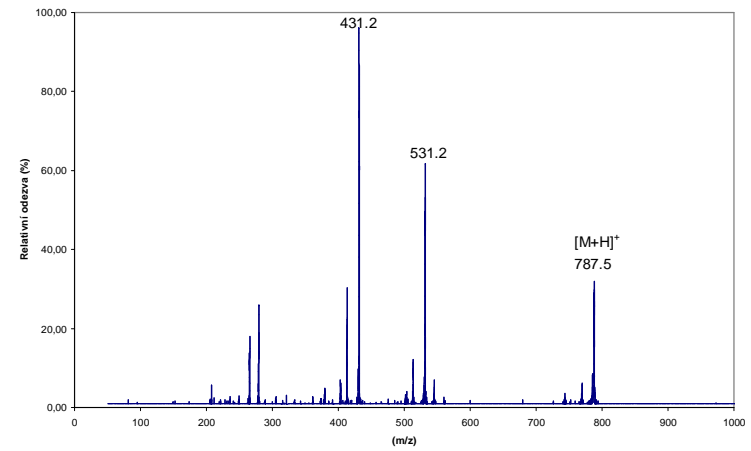
Obr. 3.e: Monensin MS spektrum



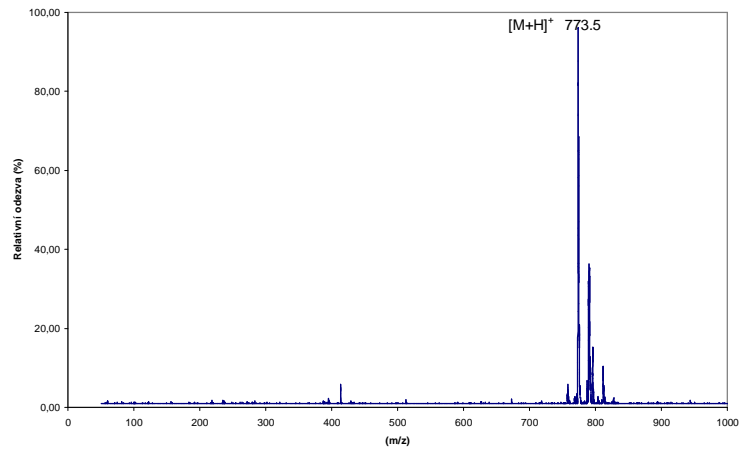
Obr. 3.f: Narasin MS spektrum



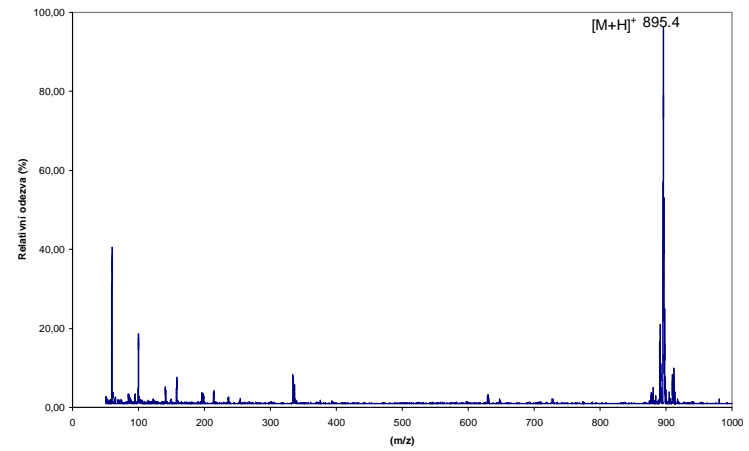
Obr. 3.g: Monensin MS/MS spektrum



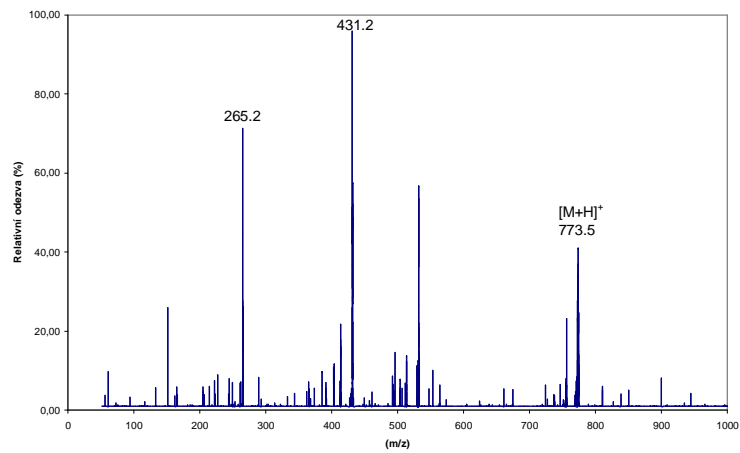
Obr. 3.h: Narasin MS/MS spektrum



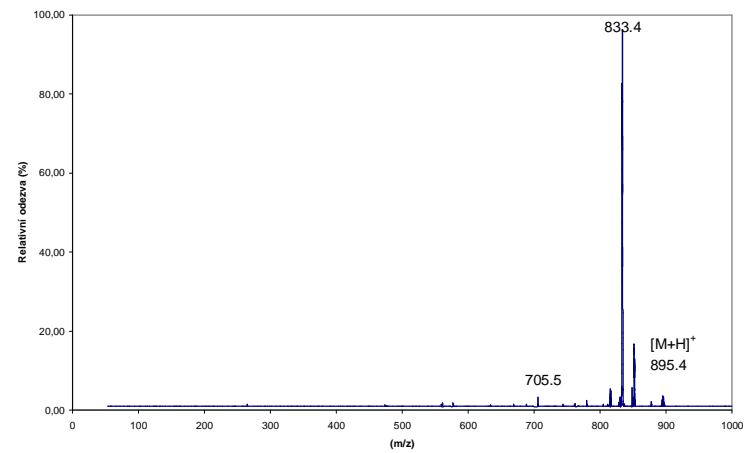
Obr. 3.i: Salinomycin MS spektrum



Obr. 3.j: Semduramycin MS spektrum



Obr. 3.k: Salinomycin MS/MS spektrum



Obr. 3.l: Semduramycin MS/MS spektrum

Bulletin Národní referenční laboratoře X 2006/ 1

Ročník: X, č. 1
Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2006
Odpovědný redaktor: RNDr. Jiří Zbíral, Ph.D.
Technická spolupráce: Ing. Iva Strížová
Náklad: 140 výtisků
Počet stran: 61
Tisk: ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, tel.: 543 548 111
e-mail: ukzuz@ukzuz.cz

Texty neprošly jazykovou úpravou

ISSN 1212- 5466