Journal of Siberian Federal University. Chemistry 3 (2010 3) 278-284
~ ~ ~

УДК 615.21.3.074:543

Метрологические характеристики методики хромато-масс-спектрометрического определения химических маркеров микроорганизмов

Е.Г. Струкова*,
А.А. Ефремов, С.В. Качин
Сибирский федеральный университет,
Россия 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79 [1]

Received 6.09.2010, received in revised form 13.09.2010, accepted 20.09.2010

На примере модельной смеси метиловых эфиров жирных кислот определены основные метрологические характеристики (линейная зависимость в диапазоне 1 – 200 мкг/мл, правильность, повторяемость, предел обнаружения 0,05 мкг/мл и предел количественного определения 0,08 – 0,1 мкг/мл методики хромато-масс-спектрометрического определения химических маркеров микроорганизмов.

Ключевые слова: методика, метрологические характеристики, метиловые эфиры жирных кислот, хромато-масс-спектрометрия.

Введение

Важным этапом разработки методик анализа является их валидация – оценка метрологических характеристик на соответствие предназначению. Согласно ГОСТ Р ИСО 5725-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений» в ходе валидации оцениваются следующие параметры: линейность, диапазон измерений, прецизионность (точность, воспроизводимость), предел определения, надежность.

В нормативных документах [1–4] достаточно полно приведены алгоритмы для аттестации методик в случае их широкого использования. Реализация этих алгоритмов весьма трудоемка и не всегда оправданна при проведении научных исследований. Зачастую бывает достаточно определить необходимый в каждом конкретном случае набор параметров [5].

На основании имеющейся методики определения химических маркеров микроорганизмов в биологических и экологических объектах был предложен способ оценки микробиоты слизистой оболочки полости рта методом масс-спектрометрии микробных маркеров (МСММ) [6]. Метрологические характеристики методики определения химических маркеров микроорганизмов ранее определены не были. При анализе многокомпонентных смесей часто возникает ситуация, когда провести градуировку и оценить метрологические характеристики по всем примесным компонентам не представляет-

* Corresponding author E-mail address: helena_ter@mail.ru
[1] © Siberian Federal University. All rights reserved

ся возможным, так как часть компонентов либо недоступна, либо не выпускается по нормативно-технической информации. В таких случаях для градуировки используют градуировочные коэффициенты; такая оценка возможна на основании установленного в результате исследований детального механизма детектирования корреляционных уравнений, связывающих структуру анализируемых веществ с выходным сигналом детектирующей системы [7].

Метрологические характеристики методики анализа химических маркеров микроорганизмов предложено оценить на примере модельной смеси метиловых эфиров жирных кислот. Так как при анализе методики определяются 57 химических маркеров (жирные кислоты, альдегиды, стерины, стеролы, оксикислоты), представляется целесообразным оценить метрологические характеристики на стандартных образцах соединений, встречающихся в реальных пробах.

Хорошо известно, что ошибка газохроматографического анализа с масс-селективным детектором по полному ионному току не превышает 3-5 %, использование режима мониторинга селективных ионов значительно снижает ошибку определения за счет уменьшения соотношения сигнал/шум, принятому в хроматографии. В данной работе оценивали ошибку при проведении хромато-масс-спектрометрического анализа определенных видов химических соединений в режиме сканирования селективных ионов.

Приборы и техника эксперимента

В работе использовали хромато-масс-спектрометр Agilent 7890A с квадрупольным масс-спектрометром Agilent 5975C в качестве детектора, 30-метровую кварцевую капиллярную колонку с неподвижной фазой HP-5ms (сополимер 5 %-дифенил-95 %-диметилсилоксана) с внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 μм.

Мазки слизистой полости рта пациентов отбирали на стерильные зонды, высушивали и подвергали метанолизу в растворе метанола в 1,2 н HCl при 80 °С в течение 45 мин. Для получения триметилсилильных эфиров оксикислот и стеролов сухой остаток обрабатывали N,O-бис(триметил-силил)-трифторацетамидом при 80 °С в течение 9 мин. В качестве внутреннего стандарта добавляли в охлажденную смесь 300 нг стандарта (дейтерометиловый эфир тридекановой кислоты), растворенного в гексане.

Экспериментально установлены условия хроматографического разделения: начальная температура 130 °С, выдержка при данной температуре 0,5 мин, нагрев со скоростью 7°/мин до 320 °С, выдержка при конечной температуре 6 мин. Газ-носитель гелий, поток 1,2 мл/мин в режиме без деления потока [8].

Анализ химических маркеров микроорганизмов проводится в диапазоне низких концентраций, так как концентрация химических маркеров микроорганизмов на фоне липидных компонентов человека невелика. В биологическом материале содержится много веществ, мешающих определению, поэтому хроматограммы записывали в режиме регистрации выделенных ионов (SIM) при периодическом сканировании до тридцати ионов в пяти интервалах времени. Сканируемые ионы определены типом определяемых соединений и их масс-фрагментацией при электронном ударе, жирные кислоты сканировали по характерному 87-му иону, альдегиды – по 75-му, оксикислоты по – 175-му и т.д. Для достоверности определения использовали под-

тверждающий ион и соотношение интенсивностей основного и подтверждающего ионов. Временные интервалы и определяемые ионы выбирали таким образом, чтобы селективно детектировать химические маркеры микроорганизмов. Количественный расчет осуществляли, используя метод внутреннего стандарта, в качестве внутреннего стандарта брали дейтерометиловый эфир тридекановой кислоты.

Для оценки метрологических характеристик методики определения микробных маркеров предложено применять стандартную модельную смесь метиловых эфиров (МЭ) жирных кислот (стеариновой, нанодекановой, арахиновой, генейкозановой, бегеновой) производства Sigma Algrich (99 %), гексан квалификации «осч» (Криохром).

Концентрации рассчитывали по градуировочным графикам стандартных образцов. Для построения графиков, расчета коэффициентов корреляций использовали программный пакет Chemstation, при вычислении статистических параметров руководствовались нормативными документами [1 – 4].

Результаты и их обсуждение

Оценка линейной зависимости

Подтверждением линейной зависимости между концентрацией определяемого соединения и площадью его хроматографического пика является близость по модулю к 1 коэффициентов корреляций соответствующих градуировочных графиков [7, 9]. В табл. 1 приведены уравнения регрессии и рассчитанные значения коэффициентов корреляций градуировочных графиков для определения химических маркеров в модельной смеси метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК). Как видно из табл. 1, значения коэффициентов корреляции весьма близки к 1. Линейная зависимость сохраняется в диапазоне концентраций определяемых соединений 1 – 200 мкг/мл.

Пределы обнаружения и количественного определения

Пределы обнаружения определяемых соединений, рассчитанные по 3s- критерию, составили 0,05 мкг/мл. Для оценки пределов количественного определения использовали общепринятую в хроматографии величину аналитического сигнала (S), превышающую среднее фоновое значение (N) в 10 раз. На рис. 1 в качестве примера приведен фрагмент хроматограммы МЭ генейкозановой кислоты при отношении S/N = 10, а в табл. 1 рассчитанные значения пределов количественного определения. Как видно из табл. 1, значения пределов количественного определения находятся в диапазоне содержаний 0,08 – 0,1 мкг/мл.

Таблица 1. Уравнения регрессии, значения коэффициентов корреляций градуировочных графиков и пределы количественного определения химических маркеров в модельной смеси МЭЖК (n = 10, при доверительной вероятности P = 0,95), x – концентрация, y – площадь хроматографического пика

Определяемое соединение	Уравнение регрессии	Коэффициент корреляции	Предел количественного определения, мкг/мл
МЭ стеариновой кислоты	$y=1{,}80\cdot10^5x$	0,995	0,08
МЭ нанодекановой кислоты	$y=2{,}42\cdot10^5x$	0,995	0,08
МЭ арахиновой кислоты	$y=2{,}59\cdot10^5x$	0,994	0,08
МЭ генейкозановой кислоты	$y=2{,}61\cdot10^5x$	0,994	0,08
МЭ бегеновой кислоты	$y=2{,}40\cdot10^5x$	0,994	0,1

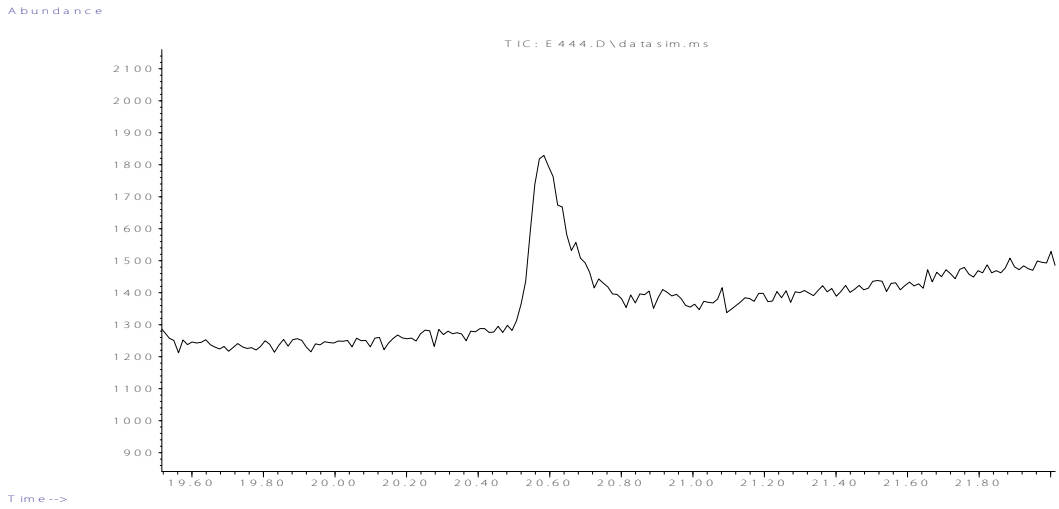

Рис. 1. Фрагмент хроматограммы МЭ генейкозановой кислоты при отношении S/N = 10, m/z=87

Таблица 2. Оценка правильности методики хромато-масс-спектрометрического определения химических маркеров в МЭЖК (число измерений для каждой концентрации n = 5, при доверительной вероятности P = 0,95, $t_{P,f}$=2,78, δ – доверительный интервал)

Определяемое соединение	Содержание (x), мкг/мл		S_r, среднеквадратичное отклонение
	Введено	Найдено x ± δ	
МЭ стеариновой кислоты	5,0 20,0	5,0±0,2 20,0±0,1	0,16 0,08
МЭ нанодекановой кислоты	5,0 20,0	5,1±0,2 20,0±0,1	0,16 0,08
МЭ арахиновой кислоты	5,0 20,0	5,0±0,3 20,1±0,3	0,24 0,24
МЭ генейкозановой кислоты	5,0 20,0	5,0±0,3 20,0±0,2	0,24 0,16
МЭ бегеновой кислоты	5,0 20,0	5,0±0,2 20,2±0,1	0,16 0,08

Оценка правильности

Контроль правильности методики осуществляли методом введено-найдено (табл. 2). В холостую пробу (стерильный вискозный зонд) вводили известное количество определяемых компонентов МЭЖК и далее проводили операции по методике [8]. Выбор концентрационного диапазона определяемых соединений (5 – 20 мкг/мл) был сделан на основании экспериментальных данных о содержании химических маркеров в ротовой полости человека [8].

Как видно из табл. 2, полученные результаты не выходят за границы установленных диапазонов x ± δ.

Оценка повторяемости

Повторяемость (сходимость) анализа – прецизионность анализа в условиях повторяемости [1, 10]. Условия повторяемости – это условия, при которых результаты повторных анализов одной и той же пробы получены по одной и той же методике в одинаковых условиях и одним исполнителем. В качестве по-

Таблица 3. Повторяемость метиловых эфиров жирных кислот, среднеквадратичное отклонение повторяемости (S_r), дисперсия (σ_r), предел повторяемости (r(n)) (количество измерений n=10, $t_{P,f}$=2,26), Е- относительная ошибка

Определяемое соединение	x среднее	r(10)	σ_r	S_r	± δ	E, %
Стеариновая кислота МЭ	10,1	0,0306	0,0068	0,08	0,18	1,86
Нанодекановая кислота МЭ	10,0	0,0712	0,0158	0,12	0,27	2,83
Арахиновая кислота МЭ	10,1	0,0886	0,0197	0,14	0,32	3,14
Генейкозановая кислота МЭ	10,1	0,0548	0,0122	0,11	0,25	2,46
Бегеновая кислота МЭ	10,1	0,0477	0,0106	0,10	0,23	2,30

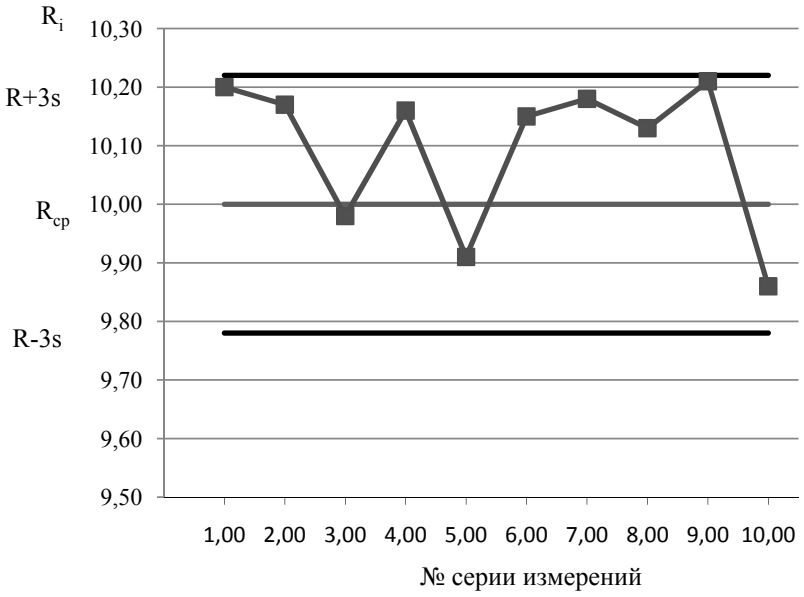

Рис. 2. Оценка сходимости результатов методики хромато-масс-спектрометрического определения МЭ стеариновой кислоты (число измерений n=10, при доверительной вероятности P=0,95)

казателя повторяемости выступает случайная погрешность результатов анализа, полученных в условиях повторяемости, т.е. разность между результатом каждого определения и среднего значения для генеральной совокупности измерений, полученных в оговоренных условиях.

Систематическая погрешность может быть выявлена и оценена одним из следующих методов: 1) применением стандартных образцов состава; 2) использованием приема удвоения в сочетании с методом добавок; 3) сравнением результатов измерений состава анализируемой пробы, полученной по двум методикам, одна из которых метрологически аттестована [7]. В данной работе использован подход с анализом стандартных образцов.

Для оценки повторяемости пробу МЭЖК с известным содержанием компонентов (10 мкг/мл) делили на 10 частей и проводили хроматографическое определение выбранных соединений в соответствии с методикой [8].

Для сопоставления разностей параллельных результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, рассчитывали предел повторяемости r_n для n результатов параллельных определений, регламентируемых

методикой анализа. Для n=10 использовали следующую формулу расчета:

$$r(10) = 4{,}5 \cdot \sigma_r.$$

Как видно из табл. 3, относительная ошибка определения МЭЖК не превышает 4 %, рассчитан предел повторяемости для определяемых соединений.

Для контроля сходимости использовали карты размахов, построенные в координатах номер серии измерений (№) – размах выборки (R_i), представляющий разность между максимальным и минимальным результатами измерения в данной серии, s – стандартное отклонение средних значений [11, 12].

На рис. 2 в качестве примера приведены результаты измерений в 10 сериях МЭ стеариновой кислоты. Как видно из рис. 2, выход результатов измерений не распространяется за пределы R ± 3s, что дает основание говорить о сходимости результатов повторных анализов с принятой доверительной вероятностью.

Аналогичные данные получены для других соединений.

В результате работы определены метрологические характеристики методики определения химических маркеров микроорганизмов (жирных кислот, альдегидов, стеринов) на примере модельной смеси МЭ жирных кислот: линейная зависимость, правильность, повторяемость, предел обнаружения и предел количественного определения.

Список литературы

1. ГОСТ Р ИСО 5725-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений». – М.: Госстандарт России, 2002.

2. РМГ 61-2003 «ГСИ. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки» / ИПК Изд-во стандартов, 2004.

3. ГОСТ Р 52361-2005 «Контроль объекта аналитический. Термины и определения» / ИПК Изд-во стандартов, 2005.

4. РМГ 76 – 2004 Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа.

5. Дворкин В.И. Метрология в научных исследованиях по аналитической химии // Материалы конференции «Аналитическая химия – новые методы и возможности». – М., 2010. – С. 96 – 97.

6. Осипов Г.А., Демина А.М. Хромато-масс-спектрометрическое обнаружение микроорганизмов в анаэробных инфекционных процессах // Вестник РАМН. – 1996. – Т.13, №2. – С. 52 – 59.

7. Сакодынский К. И. Аналитическая хроматография / К.И. Сакодынский, В. В. Бражников, С. А. Вольский, В. Ю. Зельвенский, Э. С. Ганкина, В. Д. Шатц. – М.: Химия, 1993. – 464 с.

8. Струкова Е.Г., Ефремов А.А., Гонтова А.А., Осипов Г.А., Сарматова Н.И. Определение микроэкологического статуса и диагностика инфекций организма человека с использованием метода хромато-масс-спектрометрии // Журнал Сибирского федерального университета. Химия. – 2009. – Т. 2. № 4. – С. 351 – 358.

9. Дерффель К. Статистика в аналитической химии. М.: Мир, 1994. 267 с.

10. Вершинин В.И., Перцев Н.В. Планирование и математическая обработка результатов химического эксперимента: учеб. пособие. – Омск: Изд-во ОмГУ, 2005. – 216 с.

11. Марьянов Б.М. Избранные главы хемометрики: учеб. пособие для хим. фак. вузов. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2004. – 166 с.

12. Дворкин В. И. Метрология и обеспечение качества количественного химического анализа. – М.: Химия, 2001. – 263 с.

Metrological Characteristics of the Method of Gas Chromatography-Mass Spectrometric Determination of Chemical Markers of Microorganisms

Elena G. Strukova,
Alexsandr A. Efremov and Sergey V. Kachin
Siberian Federal University
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041 Russia

On the example of a model mixture of methyl esters of fatty acids identified major metrological characteristics (linear dependence in the range 1 – 200 μg / ml, accuracy, repeatability, detection limit of 0.05 μg / ml and the limit of quantification of 0,08 – 0,1 μg / ml technique gas chromatography-mass spectrometric determination of chemical markers of microorganisms.

Keywords: method, metrological characteristics, fatty acid methyl esters, gas chromatography-mass spectrometry.