

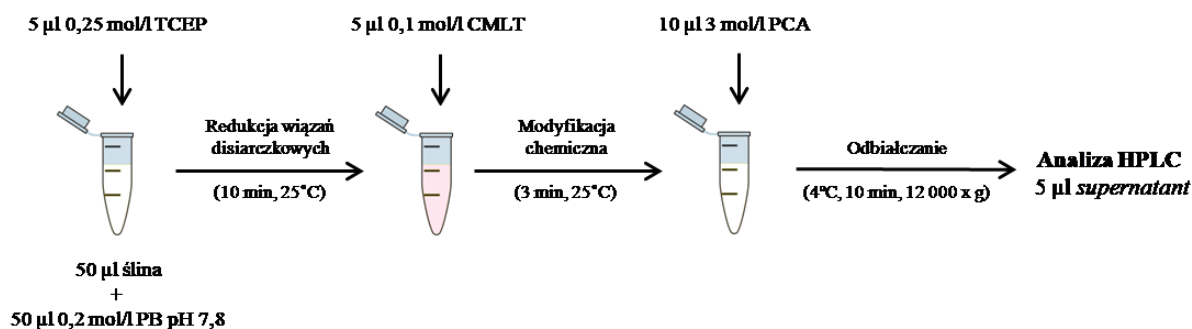
WALIDACJA CHROMATOGRAFICZNEJ METODY OZNACZANIA CYSTEINY W PRÓBKACH ŚLINY

Instrukcja do ćwiczeń opracowana w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

Walidacja metody analitycznej jest działaniem polegającym na eksperymentalnym udokumentowaniu przydatności danej procedury do rozwiązania określonego zadania analitycznego. Przeprowadzenie procesu walidacji jest jednym z podstawowych warunków zapewniających wysoką jakość uzyskiwanych wyników pomiarowych. Stąd też każda opracowana nowa procedura analityczna, a także ta zmodyfikowana, przed aplikacją do próbek rzeczywistych powinna zostać poddana walidacji obejmującej cały proces analityczny oraz wszystkie jego etapy. Proces walidacji, zgodnie z zaleceniami zarówno ICH (The International Conference on Harmonization), ISO 17025 jak i USP (The United States Pharmacopoeia), powinien obejmować przede wszystkim wyznaczenie/określenie parametrów procedury analitycznej, takich jak:

- liniowość,
- dokładność,
- precyzja,
- granica wykrywalności (LOD),
- granica oznaczalności (LOQ),
- selektywność (specyficzność).

Celem ćwiczenia jest opanowanie zagadnień teoretycznych dotyczących procesu walidacji metod analitycznych oraz praktyczne poznanie procesu walidacji na przykładzie walidacji metody oznaczania cysteiny w próbkach śliny techniką wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) z detekcją spektrofotometryczną (UV-Vis). Metoda ta oparta jest na redukcji wiązań disiarczkowych za pomocą *tris*(2-karboksyetylo)fosfiny (TCEP), konwersji analitów w pochodne z udziałem tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylolepidyniowego (CMLT) oraz odbiałczaniu próbki na drodze dodatku kwasu chlorowego(VII) (PCA) z następczym usunięciem wytrąconych białek poprzez wirowanie, przed końcową analizą chromatograficzną (Rysunek 1).



Rysunek 1. Schemat procedury przygotowania próbki śliny do analizy chromatograficznej na zawartość Cys.

Wykonanie ćwiczenia oraz opracowanie wyników

Opracowana nowa metoda analityczna została poddana walidacji według kryteriów stosowanych w przypadku analizy próbek biologicznych. Procedura ta obejmowała wyznaczenie (oszacowanie) sześciu najważniejszych parametrów podlegających procesowi walidacji. Etap ten poprzedziło określenie przeznaczenia metody analitycznej oraz jej cech charakterystycznych, w tym właściwości fizykochemicznych analitu, spodziewanego poziomu stężeń substancji oznaczanej oraz przeszkadzających, czy rodzaju matrycy. Analizę przeprowadzono w oparciu o aktualne źródła wiedzy.

▪ Liniowość

Zakres liniowość danej metody jest definiowany jako przedział zawartości analitu, dla którego sygnał wyjściowy urządzenia pomiarowego (Y) jest wprost proporcjonalny do stężenia oznaczanego składnika (C). Stąd też zależność $Y(C)$, określana mianem krzywej wzorcowej, powinna mieć w badanej próbce i określonym przedziale stężeń przebieg prostoliniowy. Przyjmuje się, że zakres liniowości powinien obejmować stężenia analitu w próbkach wzorcowych od 50% do 150% w odniesieniu do wartości oczekiwanej wyników analizy. Przy niskich stężeniach analitu w badanych próbkach, zakres liniowości ograniczony jest dolną granicą oznaczalności (LOQ).

Sposób wyznaczenia parametru

W celu znalezienia zakresu liniowości krzywej wzorcowej sporządzono 3 serie roztworów wzorcowych na 8 poziomach stężeń analitu w badanej próbce. Krzywe kalibracyjne wykonano w zakresie stężeń obejmującym oczekiwaną zawartość Cys w próbkach śliny. Próbkę przygotowano zgodnie z procedurą (Rysunek 1) i poddano analizie

chromatograficznej. Na podstawie uzyskanych wyników wykreślono zależność $Y(C)$. Równanie krzywej kalibracyjnej wyznaczono metodą najmniejszych kwadratów.

Kryterium akceptacji

Zakres liniowości wskazań detektora procedury wyznaczono przyjmując jako kryterium a) wartość współczynnika korelacji (R) minimum na poziomie 0,999 b) wartość odzysku analitu mieszczącą się w zakresie od 85% do 115%.

▪ **Dokładność**

Dokładność jest określana jako stopień zgodności wyników uzyskanych z zastosowaniem danej metody analitycznej z wartością rzeczywistą (oczekiwaną) mierzonej wielkości. Jednym ze sposobów określenia dokładności metody jest wyznaczenie odzysku znanej ilości analitu dodanego do matrycy zawierającej bądź niezawierającej substancji oznaczanej. Sposób ten jest szczególnie pożądanym w przypadku metod analizy próbek biologicznych, gdzie procedurze przygotowania próbki do analizy towarzyszy oddzielenie analitu od pozostałych składników próbki bądź/i zateżenie.

Sposób wyznaczenia parametru

W celu wyznaczenia dokładności metody przygotowano próbki śliny oraz śliny doszczepionej znaną ilością analitu, tak aby stężenie cysteiny zawierało się w pobliżu dolnej, środkowej i górnej granicy badanego zakresu. Próbki przygotowano zgodnie z opracowaną procedurą (Rysunek 1) i poddano analizie chromatograficznej. Dokładność metody oszacowano na podstawie wyników 9 równoległych oznaczeń dla trzech różnych poziomów stężeń analitu (po 3 oznaczenia na każdym poziomie zawartości oznaczanego składnika w próbce) wyznaczając odzysk analitu:

$$\text{Odzysk [\%]} = \frac{(C_2 - C_0)}{C_1} \times 100\%$$

gdzie: C_0 - stężenie oznaczanej substancji w próbce niewzbogaconej (zawartość endogenna),

C_1 - stężenie oznaczanej substancji dodane do próbki (zawartość oczekiwana),

C_2 - stężenie oznaczanej substancji w próbce wzbogaconej.

Kryterium akceptacji

Metoda może zostać uznana za dokładną, jeżeli odzysk analitu mieści się w zakresie od 85% do 115%.

▪ Precyzja

Precyzja metody jest określana jako rozrzut wyników uzyskiwanych podczas wielokrotnych powtórzeń analizy określonego składnika daną metodą, w tej samej próbce. Innymi słowy precyzja charakteryzuje rozrzut uzyskanych wyników oznaczeń analitu na danym poziomie stężeń wokół wartości średniej. Najlepszą miarą precyzji oznaczeń jest odchylenie standardowe (SD) / względne odchylenie standardowe (RSD) / wartość współczynnika zmienności (CV%), przy czym precyzja oznaczeń jest tym większa, im mniejszy rozrzut wyników (wartość SD / RSD / CV%).

Sposób wyznaczenia parametru

W celu sprawdzenia precyzji metody, dokonano analizy statystycznej wyników oznaczenia cysteiny w próbkach śliny doszczepionej znaną ilością analitu (po 3 oznaczenia na 3 poziomach stężeń analitu w próbce, zawierających się w zakresie liniowości w pobliżu jego dolnej, środkowej i górnej granicy. Następnie korzystając z poniższych zależności, dla otrzymanej serii wyników, obliczono wartość współczynnika zmienności.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{sr})^2}{n - 1}}$$

$$RSD = \frac{SD}{x_{sr}}$$

$$CV\% = RSD \cdot 100\%$$

gdzie: n – liczba powtarzanych oznaczeń (n < 30)

x_i – wartość wyniku z pojedynczego oznaczenia

x_{sr} – wartość średnia

Kryterium akceptacji

Przyjmuje się, że opracowana metoda spełnia wymogi gdy wartość współczynnika zmienności nie przekracza 15%.

▪ Granica wykrywalności (LOD) i granica oznaczalności (LOQ)

Granica wykrywalności (LOD) jest definiowana jako najmniejsze stężenie lub ilość oznaczanego składnika w badanej próbce, którą można wykryć daną metodą z określonym prawdopodobieństwem. **Granica oznaczalności (LOQ)** odpowiada najmniejszemu stężeniu lub ilości oznaczanego składnika w badanej próbce, które można precyzyjnie oznaczyć ilościowo stosując daną metodykę. Często LOQ odpowiada punktowi znajdującemu się w dolnym, prostoliniowym zakresie krzywej kalibracyjnej.

Sposób wyznaczenia parametru

W celu wyznaczenia LOD i LOQ przygotowano serię roztworów o dokładnie znanym, malejącym stężeniu analitu w próbce, w której matrycę biologiczną (ślinę) zastąpiono 0,9% roztworem chlorku sodu przygotowanym w 0,01 mol/l buforze fosforanowym o pH 7,4. Roztwory poddano analizie w opracowanych warunkach rozdzielania chromatograficznego. LOD oszacowano na podstawie zarejestrowanych chromatogramów, przyjmując jako kryterium trzykrotną wartość stosunku sygnału analitycznego do średniego poziomu szumów (S/N), wyznaczonego w pobliżu czasu retencji analitu:

$$\text{LOD} = 3 \times \frac{S}{N}$$

W przypadku LOQ przyjęto, iż jej wartość stanowi trzykrotność wyznaczonej wartości granicy wykrywalności:

$$\text{LOQ} = 3 \times \text{LOD}$$

Kryterium akceptacji

Opracowaną metodę można uznać za przydatną do oznaczania składnika w badanej próbce, wówczas gdy zawartość analitu jest równa lub wyższa od wyznaczonej granicy oznaczalności.

▪ **Selektywność (specyficzność)**

Selektywność (specyficzność) jest definiowana jako możliwość jednoznacznego oznaczenia występowania (zawartości) analitu w obecności innych, często niepożądanych, składników próbki rzeczywistej w danych warunkach pomiarowych. Innymi słowy określenie selektywności metody związane jest z oceną czy obecność oraz wielkość zarejestrowanego sygnału analitycznego wynika wyłącznie z występowania analitu w badanej matrycy bądź jest efektem obecności innych substancji o podobnych właściwościach fizykochemicznych. Określenie stopnia selektywności metody nie należy do zadań łatwych, gdyż wymaga rozpoznania czynników przeszkadzających i nieprzeszkadzających w analizowanej próbce oraz zbadania wpływu każdego z nich na sygnał analityczny.

Sposób wyznaczenia parametru

Ślina jest złożonym materiałem biologicznym, w skład której wchodzi ponad 99% wody oraz inne substancje o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych. Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy, w ślinie obok Cys występują inne, spokrewnione z nią w szlaku metabolicznym siarki niskocząsteczkowe tiole, takie jak homocysteina (Hcy), glutation (Glu),

γ -glutamyl-cysteina (γ -Glu-Cys) i cysteinyl-glicyna (Cys-Gly). Związki te w zadanych warunkach prowadzenia reakcji derywatywacji CMLT ulegają przekształceniu w pochodne, absorbujące światło przy zastosowanej długości fali promieniowania 355 nm. Co istotne, CMLT charakteryzuje się wysoką reaktywnością w środowisku wodnym jedynie w stosunku do grupy –SH, co pozwala na selektywne przeprowadzenie aminokwasów tiolowych w pochodne.

W celu określenia selektywności metody przygotowano ślepą próbkę, próbkę wodnego roztworu standardów Hcy, Glu, γ -Glu-Cys, Cys-Gly i Cys o stężeniu 1 nmol/ml, próbkę śliny oraz próbkę śliny doszczepioną znaną ilością wspomnianych aminokwasów tiolowych. Próby przygotowano zgodnie z opisaną powyżej procedurą (Rysunek 1). Oceny selektywności metody dokonano na podstawie interpretacji wyników (zarejestrowanych chromatogramów) uzyskanych w trakcie analizy chromatograficznej, przeprowadzonej w zoptymalizowanych warunkach rozdzielania chromatograficznego, zarówno próbek roztworów wzorcowych jak i próbek biologicznych zawierających substancje przeszkadzające. Dodatkowo w celu sprawdzenia czy metoda jest selektywna sprawdzono jej dokładność i precyzję dla otrzymanej serii pomiarowej (patrz Precyzja i Dokładność).

Kryterium akceptacji

Metoda jest uznawana za selektywną, jeżeli a) obecność innych substancji w próbce nie wpływa na dokładność i precyzję oznaczania składnika głównego b) w złożonej mieszaninie sygnał analityczny generowany jest tylko przez analit.

Zadanie do samodzielnego wykonania

Korzystając z danych zestawionych w tabelach, chromatogramów, przekazanych przez prowadzącego ćwiczenie, oraz informacji zawartych w powyższym opisie wyznacz parametry charakteryzujące metodę oznaczania Cys w próbkach śliny techniką HPLC-UV-Vis. Następnie przeprowadź analizę uzyskanych w tym zakresie wyników i określ czy opracowana procedura spełnia stawiane jej wymagania związane z zamierzonym zastosowaniem w analizie próbek biologicznych. Uzasadnij swój wybór.

Proponowana literatura

1. E. Bulska, Metrologia chemiczna, sztuka prowadzenia pomiarów, Wydawnictwo Malamut, Warszawa, 2012.
2. P. Konieczka, J. Namieśnik, B. Zygmunt, Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych, Wydawnictwo PWN, Warszawa, 2013.
3. W. Szczepaniak, Metody instrumentalne w analizie chemicznej, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2015.
4. J. Miller, J. Miller, Statystyka i chemometria w chemii analitycznej, Wydawnictwo PWN, Warszawa, 2016.