

“Estratégias de quantificação da fração mássica de selenometionina por HPLC-ICP-MS”

M S Rocha, L Silva, R C Sena, T O Araújo, M D Almeida

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – Inmetro

mdalmeida@inmetro.gov.br

Resumo: Um método de quantificação de selenometionina em levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi investigado e aplicado em análises de rotina. A calibração pontual foi usada como método alternativo à curva de calibração. A linearidade da curva foi investigada pelo método dos mínimos quadrados, os resíduos apresentaram distribuição aleatória, considerados independentes, oriundos de uma população Normal, não houve outliers, a falta de ajuste não foi significativa e a regressão apresentou significância estatística. A incerteza-padrão associada à extração da amostra, à regressão da curva de calibração e à constante- k_A , foram as principais responsáveis pelo aumento da incerteza da determinação da fração mássica por HPLC-ICP-MS.

Abstract: A method to determine selenomethionine in yeast *Saccharomyces cerevisiae* was investigated to be applied in routine analyzes. One point calibration was used as alternative to calibration curve. The linear model of calibration curve was investigated and the residuals presented random distribution, considered to be independent, from a Normal population, there were no outliers and the lack of fit was not significant and the regression presented statistical significance. The standard uncertainty associated with sample extraction, regression of the calibration curve and the constant k_A were the main factors responsible for the increase in the uncertainty associated with the determination of mass fraction by HPLC-ICP-MS.

Palavras-chave: Selenometionina, calibração pontual e curva de calibração.

1. INTRODUÇÃO

A determinação da fração mássica de selenometionina (w_{SeMet}) em levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) foi realizada mediante o acoplamento da cromatografia líquida (HPLC) com o espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). O método foi otimizado e validado em trabalhos anteriores [1] para ser utilizado na certificação de um material de referência.

Geralmente, a quantificação em análises químicas é realizada com curva de calibração (função matemática que representa a relação entre as respostas instrumentais e as quantidades do mensurando).

O método dos mínimos quadrados (MMQ) é frequentemente utilizado para estimar o coeficiente angular (a) e o coeficiente linear (b), $y=ax+b$. Suposições estatísticas são essenciais: os erros no eixo x são negligenciáveis comparados aos erros no eixo y ; os resíduos da curva são normalmente distribuídos; os erros em

y possuem variância constante e os erros associados com as diferentes observações são independentes [2]. A avaliação da adequação da função matemática para a calibração usando regressão linear é importante para evitar erros na predição do mensurando [2, 3].

Sendo o método validado, a função matemática da curva de calibração linear e o sinal do branco da amostra nulo [4], a calibração pontual pode ser preferível em análises de rotina, simplificando etapas lentas e laboriosas de preparo das soluções, além de ser rápida, ser sensível e de minimizar o consumo de reagentes. Pode ser aconselhável e fornecer resultados mais exatos se a faixa de trabalho for estreita e se a resposta do detector for variável com o tempo.

Na calibração pontual, determina-se o valor da constante de sensibilidade (k_A), utilizando um único padrão, medido no mínimo em duplicata. A constante k_A expressa a relação entre o sinal instrumental (\bar{y}) e a quantidade do mensurando na solução padrão (x) [5]. A partir do valor encontrado para k_A , o valor do mensurando (w) na amostra é determinado. \bar{y} é a média do sinal instrumental do mensurando na amostra.

$$k_A = \frac{\bar{y}_{padr\tilde{a}o}}{x} \quad (1)$$

$$w = \frac{\bar{y}_{amostra}}{k_A} \quad (2)$$

2. OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi comparar os resultados da w_{SeMet} obtida por meio de curva de calibração e de calibração pontual, bem como avaliar as principais fontes de incerteza de medição de cada uma dessas estratégias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais, reagentes e equipamentos

- Protease XIV, lipase VII, acetonitrila, hidróxido de tetrabutilamônio, dihidrogenofosfato de amônio, metanol, Se-DL-metionina, MRC Selm-1, amostra de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. - Vórtex, agitador termostático, balança analítica, centrífuga, medidor de pH, estufa, banho ultrassônico, bomba peristáltica, válvula *Rheodyne*. HPLC Flexar, coluna C₁₈

Luna, coluna de guarda C₁₈, DRC II-ICP-MS, gás argônio pureza 99,9996 %, *software* Chromera® utilizado para monitorar o HPLC-ICP-MS e integrar os picos cromatográficos.

3.2. Determinação da SeMet

A determinação da w_{SeMet} foi realizada segundo as condições experimentais da tabela 1.

Tabela 1 - Condições operacionais utilizadas para a determinação de SeMet por HPLC-ICP-MS

HPLC	
Coluna analítica C18	150 mm x 2 mm x 3 μm
Fase móvel	TBAOH (0,05 mmol L ⁻¹); NH ₄ H ₂ PO ₄ (0,5 mmol L ⁻¹); ACN (1 %)
Modo de eluição	Isocrático, 0,20 mL min ⁻¹
V de injeção, T da coluna	10 μL, 35 °C
Interface	
Vazão do make-up; PI	1,3 mL min ⁻¹ , ¹⁰³ Rh; 0,5 μg kg ⁻¹
ICP-MS	
Potência de RF	1350 W
Lente iônica	6 V
Vazão do gás nebulizador	0,96 L min ⁻¹
Vazão do gás principal	15 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	1 L min ⁻¹
Modo de operação detector	Dual
Isótopo monitorado	⁸² Se
Aquisição de sinal	Área de pico

4. RESULTADOS

4.1. Determinação da w_{SeMet}

Um cromatograma típico obtido com as condições operacionais da tabela 1 pode ser observado na Figura 1

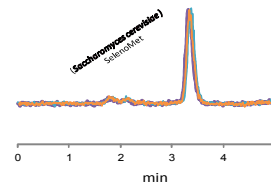


Figura 1 Amostra de levedura-HPLC-ICP-MS

A quantificação da w_{SeMet} foi realizada com curva de calibração e com calibração pontual. No primeiro caso, a faixa de calibração utilizada foi de 0,5 a 3,0 mg kg⁻¹ preparada com solução padrão de SeMet, sendo o sinal instrumental a razão entre as intensidades de ⁸²SeMet e o ¹⁰³Rh. A função linear e a adequação do modelo foram avaliadas mediante inspeção

visual do gráfico dos resíduos, *outliers* (Grubbs), normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk), homocedasticidade (Cochran), independência dos resíduos (Durbin-Watson), falta de ajuste e significância da regressão (ANOVA). No segundo caso, a calibração pontual foi utilizada como método alternativo de quantificação. Para tanto, com a área do pico $^{82}\text{SeMet}$ (Selm-1, usado como padrão de calibração) obteve-se k_A e com o valor de k_A foi determinada a w_{SeMet} . A incerteza de medição foi estimada pelo método clássico.

4.2. Curva de calibração

A Figura 2 apresenta o gráfico da curva de calibração, ($n=3$ para cada nível de w_{SeMet}).

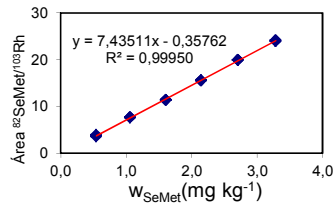


Figura 2. Curva de calibração usada na determinação da w_{SeMet}

A inspeção visual dos resíduos foi realizada para avaliar a qualidade da curva. Observa-se que os resíduos estão visualmente distribuídos de forma aleatória e dentro dos limites inferior e superior do gráfico ($\bar{e} \pm t.S_{\text{res}}$; $0,00 \pm 0,35$).

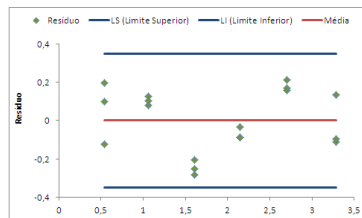


Figura 3. Resíduos da curva de calibração obtidos na determinação da w_{SeMet}

A presença de *outliers* foi avaliada pelo teste de Grubbs para um único valor. Os valores obtidos para $G_{\text{calculado}}$ são menores que o valor de G_{tabelado} (1,155; $n=3$) indicando que não existe *outlier* nos dados experimentais da curva e, portanto, nenhum dado foi removido.

Tabela 2. Teste de Grubbs para um valor outlier para cada nível de w_{SeMet} .

Nível	1	2	3	4	5	6
G_{min}	1,102	0,967	0,928	0,597	0,729	0,636
G_{max}	0,850	1,030	1,059	1,154	1,140	1,153

A normalidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. O valor de $W_{\text{calculado}}$ (0,920) $>$ W_{tabelado} (0,897) indicando que os resíduos da curva de calibração são oriundos de uma população Normal.

A homocedasticidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Cochran. O valor de $C_{\text{calculado}}$ (0,5411) $<$ C_{tabelado} , (0,6161; $n=3$, $p=6$), portanto não houve diferença significativa entre as variâncias das respostas ao longo da faixa de fração mássica.

O teste de Durbin-Watson foi utilizado para avaliar a independência dos resíduos, os valores de d (d_L e d_U), bem como o valor calculado ($d_{\text{calculado}}$) encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores de d

$d_{\text{calculado}}$	1,44
d_L ($n=18$; $k=1$) 2,5%	1,03
d_U ($n=18$; $k=1$) 2,5%	1,26

O valor de $d_{\text{calculado}} > d_U$ ao mesmo tempo que $(4-d_{\text{calculado}}) > d_U$, então não existe evidência estatística de correlação positiva ou negativa e os resíduos podem ser considerados independentes.

A significância da regressão e a falta de ajuste (ANOVA), também foram avaliadas, tabela 4.

Tabela 4. Avaliação do ajuste do modelo linear

Significância da falta de ajuste	Significância da regressão
$MQ_{\text{FAJ}}/MQ_{\text{EP}}$ 2,919	$MQ_{\text{reg}}/MQ_{\text{res}}$ 31900
F_{tabelado_1} 3,259	F_{tabelado_2} 4,494

Como pode ser observado $MQ_{\text{FAJ}}/MQ_{\text{EP}} < F_{\text{tabelado}_1}$ e $MQ_{\text{reg}}/MQ_{\text{res}} > F_{\text{tabelado}_2}$ então a falta de ajuste não é significativa ao mesmo tempo que a regressão possui significância estatística.

Com base nos resultados obtidos, o modelo linear se ajusta adequadamente aos dados experimentais, a w_{SeMet} obtida com curva de calibração foi de 3075 mg kg^{-1} .

4.3. Calibração pontual

Uma vez que a curva de calibração foi validada e o modelo linear adequado, a calibração pontual foi investigada como método para caracterização por transferência de valor de

um MRC para um candidato a MRC estreitamente relacionado.

Na calibração pontual a resposta instrumental do mensurando no padrão deve ser próxima à resposta instrumental do mensurando na amostra. Assumir k_A como constante ao longo da faixa de calibração, pode resultar em erros no valor do mensurando, superestimar a incerteza de medição e, conseqüentemente, prejudicar a qualidade do resultado analítico [5]. A tabela 5 apresenta os valores usados na calibração pontual.

Tabela 5- Valores usados na calibração pontual

	MRC Selm-1	Amostra
Razão cps ($^{82}\text{Se}/^{103}\text{Rh}$)	16,93653	17,99394
Massa (g)	0,25419	0,25677
Massa Se no MRC (mg)	0,81086	?
MRC: Selm-1 (w: mg kg ⁻¹)	3190	-

Os valores de k_A e de w_{SeMet} foram determinados, segundo equações 1 e 2:

$$k_A = \frac{16,93653 \text{ cps}}{0,81086 \text{ mg}} = 20,88712 \frac{\text{cps}}{\text{mg}}$$

$$w = \frac{17,99394 \text{ cps}}{20,8869 \frac{\text{cps}}{\text{mg}}} \times 1000 \frac{\text{g}}{\text{kg}} = 3355 \frac{\text{mg}}{\text{kg}}$$

4.4. Comparação entre as estratégias de calibração

Os valores da w_{SeMet} usando curva de calibração e calibração pontual encontram-se na tabela 6.

Tabela 6. w_{SeMet} e incerteza expandida obtidas para curva de calibração e calibração pontual

	Curva externa	Calibração pontual
w_{SeMet} (mg kg ⁻¹)	3075	3355
Incerteza expandida $U_{w(\text{SeMet})}$ - (mg kg ⁻¹)	168	276

A Equação 3 [6] avaliou a concordância entre os resultados, conforme descritos abaixo:

$$|x_{\text{ref}} - x_{\text{med}}| \leq k \cdot \sqrt{u_{\text{ref}}^2 + u_{\text{med}}^2} \quad (3)$$

$$|3075 - 3355| \leq k \cdot \sqrt{168^2 + 276^2} \rightarrow 280 \text{ mg kg}^{-1} < 323 \text{ mg kg}^{-1}$$

Como $280 \text{ mg kg}^{-1} < 323 \text{ mg kg}^{-1}$, houve concordância estatística entre os resultados.

Dessa forma, a calibração pontual pode ser utilizada para quantificar a w_{SeMet} em amostras de levedura, tornando a rotina de medição mais simples e rápida.

As principais fontes de incerteza foram estimadas: repetibilidade do procedimento de determinação da umidade e da extração da amostra, repetibilidade instrumental, a incerteza da balança, curva de calibração u_{CO} e coeficiente de sensibilidade k_A , sendo a repetibilidade instrumental [$u_{\text{repe}}(\text{curva de calibração})=0,66\%$; $u_{\text{repe}}(\text{calibração pontual})=0,0243\%$] e a quantificação da amostra $u_{CO}=0,66\%$; $u_{kA}=0,0243\%$, as fontes que mais contribuíram no processo de medição da w_{SeMet} .

5. CONCLUSÕES

O método desenvolvido para a determinação da w_{SeMet} por HPLC-ICP-MS foi otimizado e validado, os testes estatísticos utilizados para a avaliação da adequação do modelo matemático utilizado para construir a curva de calibração demonstraram que o ajuste linear utilizando o método dos mínimos quadrados pôde ser utilizado na faixa de 0,5 mg kg⁻¹ a 3,0 mg kg⁻¹. A calibração pontual poderá ser utilizada na determinação da w_{SeMet} quando a curva de calibração for linear na faixa de medição utilizada.

A incerteza de medição foi estimada pelo método clássico e as maiores contribuições para a incerteza foi a repetibilidade instrumental e a determinação da w_{SeMet} na solução analítica.

6. REFERÊNCIAS

- [1] Silva L, Souza J R, Sánchez M L F, Araújo T O e Rocha M S 2013 *Brazilian Journal of Analytical Chemistry*, **12** 499.
- [2] Pimentel M. F, Neto, B. B, 1996 *Química Nova*, **19** 268
- [3] Banfai, B, Kemeny, S. 2012 *Journal of Chemometrics*, **26** 117
- [4] Rodrigues, L C, González, M G B, Vinas, M S, Casado, A G, Sáez A M G *Journal of chromatography A* 1158 (2007) 33-46
- [5] Standardizing Analytical Methods ACS 1980 Anal. Chem **52** 2242
- [6] Eurachem/CITAC Guide; 1998 Working Group