

Bachelorproef

Kwantitatieve bepaling van vitamine B8 in voedingssupplementen en zuigelingenmelk met behulp van HPLC

Methodeontwikkeling en validatie

FAVV - FLVVT
Leuvensesteenweg 17, 3080 Tervuren

Promotor Sophie De Volder

Jitske Cornelis

Departement GDT

Bachelor Biomedische Laboratoriumtechnologie

Afstudeerrichting Farmaceutische en Biologische Laboratoriumtechnologie

2020-2021

Bachelorproef

Kwantitatieve bepaling van vitamine B8 in voedingssupplementen en zuigelingenmelk met behulp van HPLC

Methodeontwikkeling en validatie

FAVV - FLVVT

Leuvensesteenweg 17, 3080 Tervuren

Promotor Sophie De Volder

Jitske Cornelis

Departement GDT

Bachelor Biomedische Laboratoriumtechnologie

Afstudeerrichting Farmaceutische en Biologische Laboratoriumtechnologie

2020-2021

Voorwoord

Ik ben zo dankbaar dat ik de kans krijg om verder op ontdekking te gaan en kennis te maken met de bedrijfswereld. Mijn dank gaat in het bijzonder uit naar het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen en het FLVVT. Zij gaven mij een geweldige kans in deze moeilijke tijd gezien de coronapandemie. De collega's en begeleiders hebben me goed ontvangen, waardoor ik me onmiddellijk thuis voelde en kon werken in een fantastische sfeer.

In het bijzonder wil ik graag Sophie De Volder bedanken. Zij was er altijd voor mij en stond me bij met raad en daad waar nodig. Naar mijn mening is ze de ideale promotor.

Ook wil ik zeer graag van de gelegenheid gebruik maken om mevrouw Jacobs te bedanken. Wanneer ik vragen had, kon ik altijd bij haar terecht. Ze heeft me enorm gesteund in de moeilijke zoektocht naar een stageplaats en bleef erin geloven. Ze stond altijd met al haar enthousiasme, steeds voor me klaar en daar kan ik haar niet dankbaar genoeg voor zijn.

Vervolgens wil ik graag de school bedanken voor de goede opleiding die ze ons daar bieden. Iedereen is hier altijd vriendelijk en paraat te helpen.

Tot slot wil ik graag nog mevrouw Mot bedanken om mee op zoek te gaan naar en het vinden van een goede stageplaats, wat in deze coronatijd zeker niet evident was.

Organigram

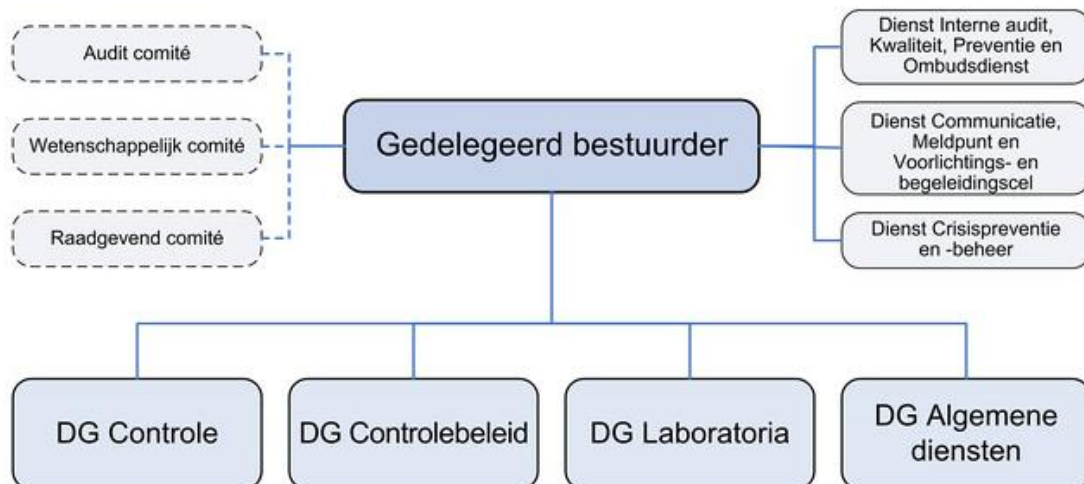
Het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen (FAVV) controleert de gehele voedselketen. Dit gaat van levensmiddelen tot diervoeders, meststoffen en gewasbescherming. Daarnaast staat het FAVV in voor de preventie en bestrijding van ziektes bij dieren en fysiosanitaire aspecten. Tot slot is het FAVV verantwoordelijk voor het opstellen van normen en regels waar bedrijven uit de voedingssector zich aan moeten houden alsook de controle ervan.

het FAVV werkt nauw samen met federale diensten en politie om al deze taken tot een goed einde te kunnen volbrengen. Ze kunnen hierbij ook rekenen op de hulp van externe laboratoria.

Aan het hoofd van het FAVV staat de *Gedelegeerd bestuurder* die zorgt voor de algemene coördinatie. Het Directoraat-generaal (DG) *Controle* implementeert de processen om de veiligheid van de voedselketen in alle stadia te bewaken. Het Directoraat-generaal *Controlebeleid* is verantwoordelijk voor de uitwerking van het beleid. Het Directoraat-generaal *Algemene diensten* heeft een ondersteunende rol in de gehele organisatie. Om de veiligheid en kwaliteit correct te bewaken moeten de controles ondersteund worden door analyses. Het Directoraat-generaal *Laboratoria* beschikt hiertoe over vijf geaccrediteerde laboratoria: FLVVG¹, FLVVM, FLVVT, FLVVGx en FLVVL. Deze laboratoria zijn onder andere geaccrediteerd voor het uitvoeren van de gevraagde analyses .

Het netwerk van laboratoria heeft twee kerntaken. Als eerste het afleveren van nauwkeurige resultaten, binnen een zo kort mogelijke tijd, aan een economisch verantwoorde prijs. Ten tweede wetenschappelijke ontwikkelingen in het analytische domein van de voedselveiligheid stimuleren en beheren.

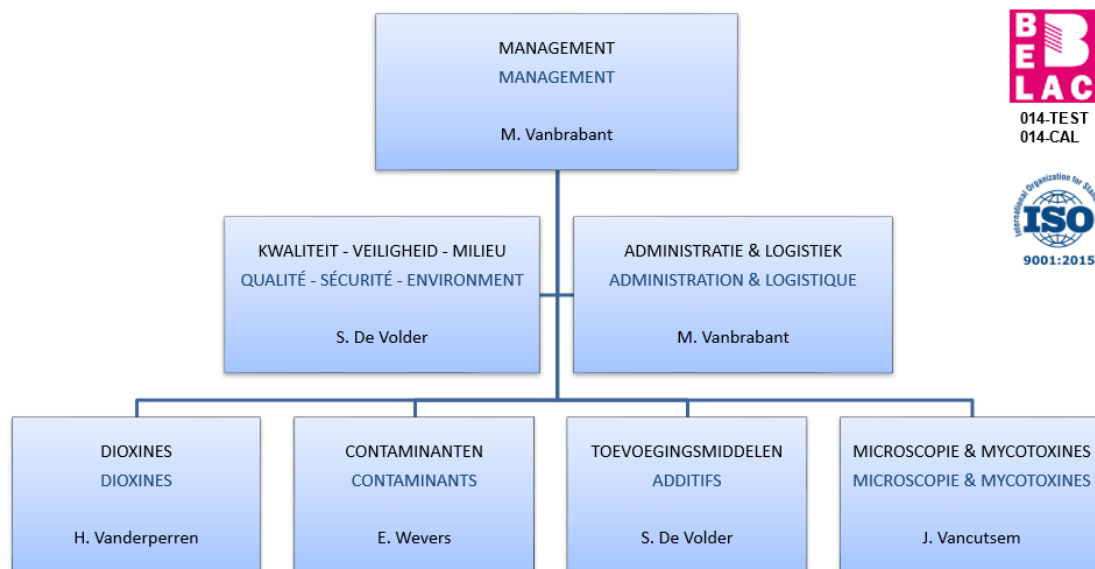
De vijf laboratoria werken volgens de ISO 17025 norm, wat een vereiste is om geaccrediteerd te kunnen worden.



Figuur 1: Organigram van het FAVV

¹ FLVV staat voor Federaal Laboratorium voor de Veiligheid van de Voedselketen; de laatste letter verwijst naar de locatie van het labo (G: Gentbrugge, M: Melle, T: Tervuren, Gx: Gembloux, L: Luik (Wandre))

De hoofdtaak van het FLVVT is het uitvoeren van analyses in opdracht van het FAVV en dit op stalen van allerlei aard, gaande van diervoeders tot levensmiddelen. Het FLVVT concentreert zich voornamelijk op de analyse van contaminanten (dioxines, PCBs, pesticiden), ongewenste stoffen (b.v. mycotoxines) en toevoegingsmiddelen (vitamines, antibiotica, coccidiostatica). De apparatuur en methoden zijn aangepast aan de nieuwste technologische ontwikkelingen en onder andere volgende analysetechnieken worden toegepast: gas- en vloeistofchromatografie, massaspectrometrie, spectrofotometrie, CALUX (dioxines), en turbidimetrie. De uitvoering van de analyses en de rapportering van de resultaten gebeurt in overeenstemming met de vereiste internationale kwaliteitsnormen. De meeste analyses zijn geaccrediteerd volgens de ISO 17025 norm.



Figuur 2: Organigram FLVVT

Onder de afdeling toevoegingsmiddelen vallen vitamines, antibiotica en coccidiostatica. De afdeling focust zich voornamelijk op stoffen die toegevoegd dienen te worden alvorens het product is afgewerkt. Ze hebben een gemeenschappelijke taak maar voeren verschillende analyses uit afhankelijk van de aard van stalen en de te onderzoeken component. Op de afdeling toevoegingsmiddelen worden kwantitatieve bepalingen van onder andere vitamine B8 uitgevoerd ter controle van de gehalten vermeld op het etiket van diverse producten.

Inhoudsopgave

Voorwoord	1
Organigram.....	2
Lijst van afkortingen	6
Abstract Nederlands.....	7
Abstract Engels.....	8
1. Inleiding	9
2. Literatuuronderzoek.....	10
2.1. Biotine	10
2.1.1. Structuur.....	10
2.1.2. Functie	10
2.1.3. Bronnen	11
2.1.4. Aanbevolen dagelijkse hoeveelheid.....	11
2.1.5. Risico's	11
2.1.6. Voedingssupplementen.....	12
2.2. Analysemethoden voor de bepaling van biotine	13
2.2.1. Microbiologische bepaling	13
2.2.2. HPLC methode	15
2.2.3. Hoe bindt avidine aan biotine?	16
2.3. Validatie binnen het FAVV.....	18
2.4. Accreditatie	18
3. Experimenten	19
3.1. Reagentia en materialen	19
3.2. Bereiding van standaardoplossingen	19
3.3. Staalvoorbereiding	20
3.4. Apparatuur	21
4. Resultaten en discussie	22
4.1. Ontwikkeling van de HPLC methode	22
4.1.1. Kolom.....	22
4.1.2. Mobiele fase	23
4.1.3. Temperatuur.....	25
4.1.4. Flowsnelheid.....	25
4.1.5. Injectievolume	27
4.1.6. Optimalisatie van de methode en resulterende HPLC condities	27

4.1.7.	Eigenlijke standaardreeks.....	30
4.2.	Validatie.....	33
4.2.1.	Werkgebied	33
4.2.2.	Lineariteit en matrixeffecten.....	33
4.2.3.	Kwantificatielimiet (LOQ) en detectielimiet (LOD).....	35
4.2.4.	Precisie	36
4.2.5.	Juistheid.....	38
4.2.6.	Specificiteit	38
4.2.7.	Selectiviteit	39
4.2.8.	Robuustheid	39
4.2.9.	Samenvatting.....	39
5.	Besluit	40
6.	Bibliografie.....	41
7.	Bijlagen	43

Lijst van afkortingen

FAVV= Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen

Vitamine B8= biotine

HPLC= high performance liquid chromatography

FLVV = Federaal Laboratorium voor Veiligheid Voedselketen

PCB = Polychloorbifenyyl

EDTA = Ethyleendiaminetetra-azijnzuur

BELAC = Belgische Accreditatie-instelling

PCRM = post-kolom reactie module

EN = Europese Normalisatie

RP = reversed phase

NP = normale phase

ADH = aanbevolen dagelijkse hoeveelheid

CEN = Europees Comité voor Standaardisatie

MO = micro-organisme

NIST = National Institute of Standards and Technology

SRM = Standard Reference Material

Samenvatting van

Kwantitatieve bepaling van vitamine B8 in voedingssupplementen en zuigelingenmelk met behulp van HPLC

Methodeontwikkeling en validatie

Naam: Cornelis Jitske

Naam (co)promotor: De Volder Sophie

Naam contactpersoon hogeschool: Jacobs Katrien

Achtergrond: In het FLVVT worden kwantitatieve bepalingen van vitamine B8 uitgevoerd ter controle van de gehalten vermeld op het etiket van diverse producten. Tot hiertoe werd er voor deze kwantitatieve bepaling gebruik gemaakt van microbiologische methoden, gebaseerd op groeibevordering. Dit brengt als nadeel met zich mee dat deze methode sterk afhankelijk is van allerlei verschillende factoren. Hierdoor werd gezocht naar een methode die niet zo afhankelijk is; namelijk een methode die gebruikt maakt van de HPLC techniek.

Doel: De ontwikkeling en validatie van een nieuwe methode voor de kwantitatieve bepaling van vitamine B8 in levensmiddelen, met als doel ze als routinemethode toe te passen in het FLVVT. De basis van deze nieuwe methode is de EN-norm 15607 waarbij na een enzymatische extractie de hoeveelheid vitamine B8 wordt gekwantificeerd met behulp van HPLC met fluorescentiedetectie na post-kolom derivatisatie. Dit moet toelaten om biotine eenduidig te bepalen zonder al te veel interferentie van andere aanwezig stoffen in de stalen.

Methode: Opzuivering van de stalen gebeurt door middel van het enzym papaïne. HPLC-FL na postkolom derivatisatie. Volgende HPLC condities werden als meest optimale bekomen: een LiChrospher® 100 RP-18 endcapped kolom, een fosfaatbuffer met pH 6 en methanol in een verhouding 80:20 als mobiele fase, Een loopsnelheid van 0,5 ml/min op de HPLC en 1 ml/min op de post-kolom, ten slotte een injectievolume van 30 µl.

Resultaten: Na optimalisatie van de HPLC condities met behulp van standaardwerkoplossingen, werd overgegaan tot het testen van dezelfde condities op extracten van standaardreferentiemateriaal en routinemonsters. Alvorens een methode als routinemethode kan toegepast worden in het FLVVT, moet er aangetoond worden dat de ontwikkelde methode geschikt is voor het beoogde gebruik. Volgende validatieparameters werden bepaald: werkgebied en lineariteit, precisie (herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid), juistheid, sensitiviteit, specificiteit en selectiviteit.

Conclusie: De onderzochte validatieparameters tonen aan dat de ontwikkelde methode enerzijds voldoet aan de criteria opgelegd door het FAVV en anderzijds aan de criteria vermeld in de EN-norm 15607. Een volgende stap is de implementatie van de methode in het laboratorium ter vervanging van de microbiologische methode. Zo kan men meer analytisch te werk gaan in verhouding tot de microbiologische methode en is men niet langer afhankelijk van organisme.

Summary of

Quantitative Determination of Vitamin B8 in Dietary Supplements and Infant Formulas Using HPLC Method Development and Validation

Name: Cornelis Jitske

Name promotor: De Volder Sophie

Name contact person university: Jacobs Katrien

Background: Quantitative determinations of vitamin B8 are carried out in the FLVVT to check the levels stated on the label of various products. Until now, microbiological methods based on growth promotion have been used for this quantitative determination. This has the disadvantage that this method is highly dependent on all kinds of different factors. This led to a search for a method that is not so dependent; namely a method that uses HPLC technique.

Goal: The development and validation of a new method for the quantitative determination of vitamin B8 in food, with the aim of applying it as a routine method in the FLVVT. The basis of this new method is the EN standard 15607 in which, after an enzymatic extraction, the amount of vitamin B8 is quantified using HPLC with fluorescence detection after post-column derivatization. This should allow unambiguous determination of biotin without too much interference from other substances present in the samples.

Method: The samples are purified by means of an enzyme papain. HPLC-FL after post column derivatization. The following HPLC conditions were obtained as the most optimal: A LiChrospher® 100 RP-18 endcapped column, a phosphate buffer pH 6 and methanol in a ratio 80:20 as mobile phase, A flow rate of 0.5 ml/min on the HPLC and 1 ml/min on the post column, finally an injection volume of 30µl.

Results: After optimization of the HPLC conditions using standard working solutions, the same conditions were tested on extracts of standard reference material and routine samples. Before a method can be applied as a routine method in the FLVVT, it must be demonstrated that the developed method is suitable for the intended use. The following validation parameters were determined: working area and linearity, precision (repeatability and reproducibility), correctness, sensitivity, specificity and selectivity.

Conclusion: The validation parameters examined show that the developed method meets the criteria imposed by the FLVVT on the one hand and the criteria stated in the EN standard 15607 on the other hand. The next step is the implementation of the method in the laboratory to replace the microbiological method. In this way one can work more analytically than with the microbiological method and one is not dependent on the organism.

1. Inleiding

In de afdeling Toevoegingsmiddelen van het Federaal Laboratorium voor de Veiligheid van de Voedselketen in Tervuren (FLVVT) wordt onder andere het gehalte aan vitamines in levensmiddelen bepaald, met als doel de op het etiket vermelde waarden te controleren. Ook wordt nagegaan of het etiket voldoet aan de geldende normen. Controle laat toe om fraude op te sporen, wat belangrijk is voor onder andere de gezondheid van de consumenten. Daarnaast is het noodzakelijk om een eerlijke concurrentie tussen bedrijven te garanderen.

Vitamines werden voorheen bepaald door middel van een microbiologische methode. Omwille van meerdere nadelen verbonden aan deze microbiologische methode, waaronder de afhankelijkheid van de groei van micro-organismen, tracht men over te schakelen op modernere analytische methoden, zoals een HPLC analyse. Deze overschakeling is reeds een feit voor de meeste wateroplosbare vitamines, en ook de vetoplosbare vitamines worden met behulp van een HPLC analyse bepaald. Vitamine B8 of biotine wordt echter nog steeds bepaald met een microbiologische methode.

Het doel van dit eindwerk is de implementatie van de Europese norm EN 15607. Deze norm beschrijft de bepaling van biotine met behulp van HPLC en post-kolom derivatisatie. Om deze methode te kunnen gebruiken voor de analyse van routinestalen dient deze eerst gevalideerd te worden. De validatie verloopt volgens de principes die gelden binnen het FAVV.

2. Literatuuronderzoek

2.1. Biotine

Vitamines zijn organische moleculen met een regulatorische functie. Ze moeten in lage hoeveelheden aanwezig zijn in het dieet van de mens, omdat zij deze niet zelf kunnen synthetiseren. Vitamines zijn dus essentieel en een tekort kan leiden tot specifieke ziektebeelden (Gropper S, 2020). Zo werd biotine initieel ontdekt bij een studie naar een syndroom met huidafwijkingen dat bij proefdieren tot stand kwam door ze te voeden met enorme hoeveelheden rauw eiwit. De huidverschijnselen bij deficiëntie hebben geleid tot de benaming vitamine H wat stond voor haut (De Henau).

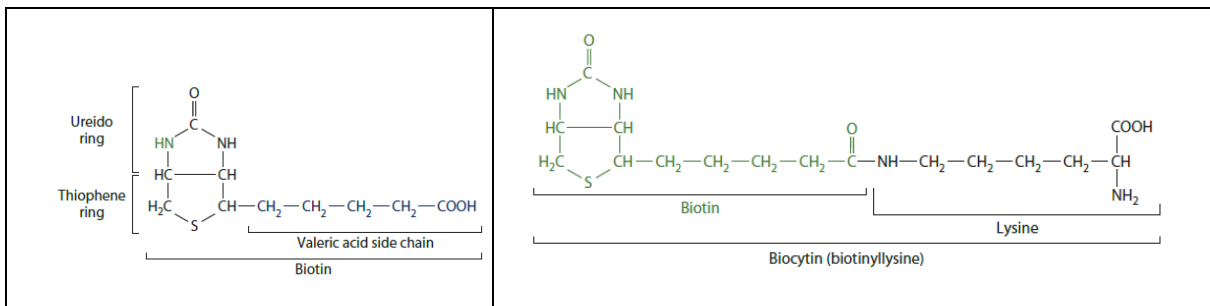
Vitamines worden ingedeeld in de wateroplosbare vitamines en de vetoplosbare vitamines. Tot de eerste groep behoren de B-vitamines en vitamine C. Zij worden via het bloed opgenomen en een teveel aan deze vitamines kan opnieuw worden uitgescheiden via de urine gezien hun wateroplosbaarheid. Ze worden niet in het lichaam opgeslagen (Gropper S, 2020).

Vitamine B8, ook biotine genoemd, behoort tot de familie van de B-vitamines.

2.1.1. Structuur

Figuur 3 toont de structuur van biotine: 2 vijftringen, een ureiding gebonden aan een tetrahydrothiofeenring, gekoppeld aan een valeriaanzuur-zijketen.

Door de aanwezigheid van de carboxylzure groep kan biotine binden aan de zijketen van L-lysine, ter vorming van biocytine.



Figuur 3: De linkse figuur toont de structuur van biotine (biotine, sd); wanneer de zure groep aan de zijketen van lysine wordt biocytine gevormd. (Gropper S, 2020)

2.1.2. Functie

Alle B-vitamines hebben een functie als co-enzym of als onderdeel ervan. Co-enzymen zijn noodzakelijk opdat een enzym zijn katalytische functie kan uitvoeren (Stipanuk M., 2013) in het menselijk lichaam. Biotine is, gebonden aan de zijketen van een lysineresidu, essentieel voor 5 carboxylasen. Dit zijn enzymen die een CO₂ groep overdragen op een substraat. Voorbeelden zijn het acetyl-CoAcarboxylase en pyruvaatcarboxylase (Schuit F., 2015). Deze carboxylasen spelen een belangrijke rol bij de synthese van vetzuren en bij de opbouw of afbraak van sacchariden en eiwitten. Door deze functie speelt vitamine B8 een essentiële rol bij de energievoorziening. Verder zijn deze enzymen belangrijk voor een vlotte werking van het zenuwstelsel en gezonde haren en huid.

2.1.3. Bronnen

Belangrijke natuurlijke bronnen van biotine zijn eieren, melk, pinda's en noten. Daarnaast is biotine ook aanwezig in gist en enkele groenten zoals spinazie en paddenstoelen. Biotine wordt niet alleen opgenomen maar wordt ook in het lichaam gesynthetiseerd door darmbacteriën. Het is nog niet duidelijk in hoeverre deze vorm beschikbaar is voor de mens (biotine, sd).

2.1.4. Aanbevolen dagelijkse hoeveelheid

De aanbevolen dagelijkse hoeveelheid (ADH) van vitamine B8 bedraagt tijdens het eerste levensjaar 15 µg/dag, 30 µg/dag voor adolescenten en 40 µg/dag op volwassen leeftijd (Tabel 1) (Voedingsaanbevelingen voor België, 2016).

Tabel 1: Adequate inname van biotine bij verschillende leeftijden, zwangerschap en borstvoeding (Voedingsaanbevelingen voor België, 2016)

Leeftijd	Geslacht	Biotine, µg/dag
0-6 maand	M/V	10
7-12 maand	M/V	15
1-3 jaar	M/V	20
4-6 jaar	M/V	25
7-10 jaar	M/V	30
11-14 jaar	M/V	30
15-18 jaar	M/V	35
Volwassenen (19-70 jaar)	M/V	40
70-plussers	M/V	40
Zwangerschap	V	45
Borstvoeding	V	60

2.1.5. Risico's

Het risico op toxiciteit door te hoge inname van biotine is zeer beperkt. Een teveel aan biotine of een hypervitaminose, zal worden uitgescheiden via de nieren. Zelfs een inname van 100 maal de aanbevolen hoeveelheid zal geen gevolgen hebben.

Wanneer te weinig vitamine B8 ingenomen wordt en een hypovitaminose kan ontstaan, heeft dit wel gevolgen. Symptomen van een tekort zijn onder andere een verminderde eetlust, ontwikkeling van huidafwijkingen, bloedarmoede of zelfs een depressie.

Een tekort aan vitamine B8 bij de mens is eerder zeldzaam, aangezien deze in veel voedingsmiddelen voorkomt. Een regelmatige inname van rauwe eieren kan wel voor een tekort zorgen. Het eiwit van eieren bevat namelijk het eiwit 'avidine', dat biotine bindt en hierdoor de opname van biotine belemmert. Avidine is gelukkig niet resistent tegen hitte waardoor in gekookte eieren geen actief avidine meer terug te vinden is.

Biotine daarentegen is wel stabiel bij hogere temperaturen. Dit is van groot belang zodat deze voldoende en ongehinderd kan worden opgenomen, ook in bereide voedingsmiddelen.

Verder treden tekorten op bij personen die gedurende lange tijd parenteraal gevoed worden. Tot slot kunnen deficiënties ook voorkomen bij patiënten die in behandeling zijn voor epilepsie, bij chronische hemolyse, alcoholisme of inflammatoire ziekte (vitamine b8, sd).

Gevolgen van deze deficiëntie zijn alopecia, droge dermatitis; neurologische symptomen zoals depressie en lethargie en tot slot hematologische afwijkingen, onder andere anemie en cholesterolverhoging. In sommige gevallen kan dit hersteld worden door biotine supplementen toe te voegen aan de voeding.

2.1.6. Voedingssupplementen

Vitamine B8 wordt niet alleen aangeleverd door natuurlijke bronnen, maar ook in voedingssupplementen en natuurlijke microbiota.

Voedingssupplementen verrijkt met biotine zijn dus niet verrechtvaardigd tenzij bij ouderen, bij patiënten met chronische intestinale ziekten of bij ernstig chronisch alcoholisme.

Hoewel geen toxiciteit is aangetoond ook niet bij een verhoogde inname (EFSA, 2006), zijn hoge dosissen biotine die meer dan 3 maal de adequate inname overschrijden niet gerechtvaardigd. Ook in farmacologische formules is de dagelijkse dosis biotine beperkt tot 150 µg wat overeenkomt met 3 maal de adequate inname (BCFI, 2014; HGR, 2009 ; EFSA, 2014). Een dergelijke hoeveelheid - overeenkomend met 150 µg vitamine B8/dag - zou de bovengrens moeten vormen van wat aan voedingssupplementen wordt toegevoegd.

De Europese kaderrichtlijn 2002/46/EG voor voedingssupplementen legt de toegelaten chemische vormen van vitamines als additief vast (Richtlijn 2002/46/EG, 2002). Voor vitamine B8 mag D-biotine gebruikt worden in voedingssupplementen. Van biotine zijn acht stereo-isomeren bekend. Alleen D-biotine komt van nature in voeding voor en heeft vitamineactiviteit.

Om na te gaan of fabrikanten van levensmiddelen voldoen aan de bestaande richtlijnen worden op regelmatige basis controles uitgevoerd door de bevoegde instanties, waaronder het FAVV.

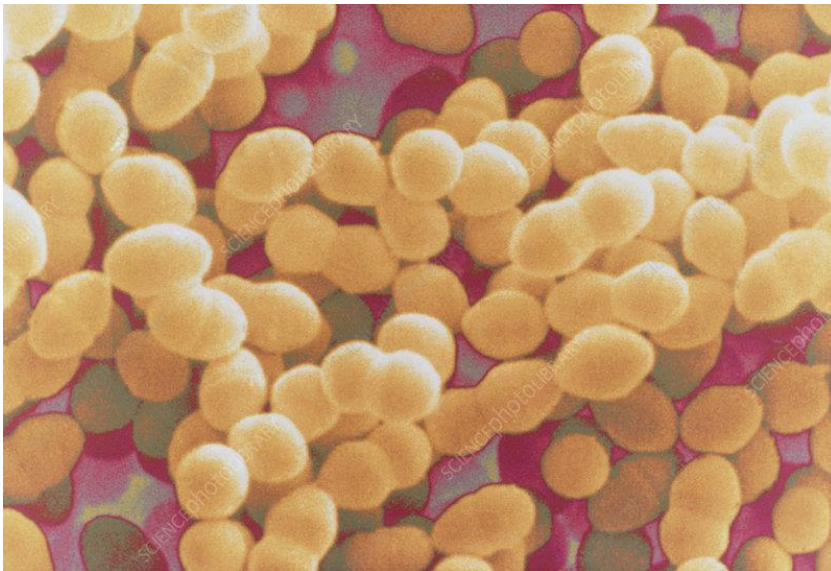
2.2. Analysemethoden voor de bepaling van biotine

2.2.1. Microbiologische bepaling

Momenteel maakt het FAVV gebruik van een microbiologische methode voor de kwantitatieve bepaling van vitamine B8. Deze methode steunt op het principe dat de groei van een specifiek micro-organisme evenredig is met de behoefte aan het vitamine, op voorwaarde dat alle andere voedingsstoffen aanwezig zijn (Nielsen, 2017).

Principe

Voor de bepaling van vitamine B8 wordt gebruik gemaakt van *Enterococcus faecalis*, een bolvormige bacterie die alleen of in korte ketens kan voorkomen zoals zichtbaar in Figuur 3. Hij is vooral terug te vinden in de menselijke darm, of meer algemeen, in de darmen van zoogdieren. Daarnaast komt hij ook in de bodem of water voor. Dit organisme maakt deel uit van de menselijke commensale microbiota (*Enterococcus-faecalis*, sd).



Figuur 4: *Enterococcus faecalis* (*Enterococcus-faecalis*, sd)

Het basisprincipe van deze microbiologische bepaling is dat bacteriën sneller zullen groeien wanneer er groeibevorderende factoren aanwezig zijn. Bij de kwantitatieve bepaling van vitamine B8 in een bepaald product wordt er in eerste instantie het te analyseren vitamine geëxtraheerd. Door gebruik te maken van een vloeibare voedingsbodem, geënt met bacteriën, waaraan dit extract van een bepaald vitamine is toegevoegd, kan de groeibevordering van de bacteriën worden gekwantificeerd door middel van turbiditeitsmetingen van de voedingsbodem. Om de specificiteit van een methode voor één bepaald vitamine te verzekeren wordt er een zeer specifieke bacteriestam als testorganisme gebruikt, waarvan de groei afhankelijk is van de aanwezige hoeveelheid biotine.

Om de groei van het testorganisme, dat afhankelijk is van de aanwezige hoeveelheid vitamine B8, te kunnen kwantificeren, wordt er gebruik gemaakt van een 'referentie-groecurve'. Hiertoe wordt een gekende hoeveelheid van vitamine B8 toegevoegd aan een hoeveelheid extractiesolvent. Deze oplossing zal gebruikt worden als referentie-oplossing. Vervolgens wordt er een verdunningsreeks bereid van zowel de referentie-oplossing als het monsterextract, waarna elke verdunning wordt toegevoegd aan een aliquot voedingsbodem. Vervolgens wordt geënt met *E. Faecalis* en overnacht geïncubeerd. Bij verdunning van het monsterextract wordt er een bepaalde beginconcentratie aan vitamine B8 in het monsterextract verondersteld, die in het ideale geval gelijk is aan de concentratie van de referentieoplossing. Zodra de proefbuizen met de referentieoplossing voldoende bacteriegroei vertonen, wordt de turbiditeit ervan gemeten met behulp van een monochromator. Een kwantitatief resultaat wordt tenslotte bekomen door het vergelijken van de monstercurve met de referentie-groecurve van de standaardoplossing.

Er dienen dus veel stappen ondernomen te worden die wat tijd in beslag nemen (FLVVT, 2009).

Voor- en nadelen

De groei van elk micro-organisme is afhankelijk van hoe goed de ideale groeicondities worden benaderd. Een correcte analyse is slechts mogelijk wanneer deze condities in stalen en standaarden gelijk zijn. Daarnaast kan contaminatie het eindresultaat beïnvloeden en moet aandacht besteed worden aan het vermijden hiervan. Daartegenover staat dat deze methode afhankelijk is van de groei van een micro-organisme.

Een tweede nadeel is dat deze methode veel tijd in beslag neemt aangezien de bacterie moet kunnen groeien. Er verlopen minstens twee dagen tussen de start van de analyse en het verkrijgen van het resultaat.

Een ander nadeel is dat de meting gebaseerd is op basis van turbidimetrie. De troebelheid van de oplossing is een maat voor de hoeveelheid micro-organisme welke op zijn beurt afhankelijk is van de concentratie aan biotine. Zo kan men een standaardreeks opstellen. Daarna wordt de troebelheid van de stalen vergeleken met deze van de standaardreeks. Deze methode is dus minder nauwkeurig en vandaar opteert men ervoor om een meer analytische methode te implementeren zodat men exacte waarden kan meten.

2.2.2. HPLC methode

Om tegemoet te komen aan de hoger beschreven nadelen van de microbiologische analyse, werd er een HPLC-methode ontwikkeld voor de bepaling van vitamine B8 in levensmiddelen.

In 2009 publiceerde het CEN een nieuwe methode voor de bepaling van D-biotine (EN 15607). Als er een officiële EN norm beschikbaar is moet deze zo goed als mogelijk gevolgd worden, dit geldt uiteraard ook bij vitamine B8. De methode maakt gebruik van een HPLC analyse gevolgd door een post-kolom derivatisatie. Deze verloopt een stuk sneller dan de huidige methode.

Principe van de analyse

De verschillende types vloeistofchromatografie kunnen ingedeeld worden in groepen volgens de aard van de gebruikte fasen of de mechanismen waarmee de componenten van elkaar worden gescheiden. Verdelingschromatografie is gebaseerd op het verschil in oplosbaarheid van een component in twee vloeistoffen die onderling niet mengbaar zijn. Op basis van de polariteit van de mobiele en de stationaire fase, kan men een onderscheid maken tussen normale fase chromatografie en omgekeerde fase chromatografie (HPLC separations modes, sd).

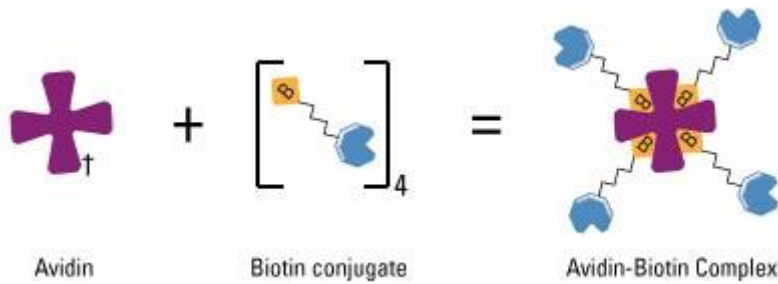
Bij normale fase chromatografie (Normal Phase Liquid Chromatography, NP-LC) is de stationaire fase (silica + polaire groepen) sterk polair terwijl de mobiele fase weinig polair is. Weinig polaire componenten hebben hier een grote affiniteit voor de mobiele fase en worden dus snel geëluëerd. Omgekeerd vertonen polaire componenten een grotere affiniteit voor de stationaire fase en worden ze daardoor traag geëluëerd. De minst polaire stoffen worden dus eerst geëluëerd.

Bij omgekeerde fase vloeistofchromatografie (Reversed Phase Liquid Chromatography, RP-LC) daarentegen wordt er een niet polaire stationaire fase (silica + apolaire groepen) gebruikt samen met een polaire mobiele fase. De volgorde van elutie bij RP-LC is omgekeerd aan deze bij NP-LC, wat wil zeggen dat de polaire opgeloste stoffen eerder elueren dan de minder polaire stoffen. De mobiele fase bestaat bij RP-LC voornamelijk uit water of een bufferoplossing eventueel gemengd met een 'modifier' zoals methanol waardoor de selectiviteit kan worden gereguleerd. RP-LC is uitermate geschikt voor de analyse van wateroplosbare vitamines en wordt daarom voor deze techniek gekozen.

Tijdens het chromatografisch proces zijn 3 factoren van belang voor de scheiding: retentie, selectiviteit en efficiëntie. Om de component te scheiden, moet er een bepaalde retentie zijn. De componenten moeten in verschillende mate vertraagd worden door de stationaire fase. Het begrip dat het verschil in retentie weergeeft, heet selectiviteit. De term efficiëntie van een scheiding heeft ondermeer betrekking op de breedte van de pieken. Dit is belangrijk omdat de mate van overlapping van twee naast elkaar liggende pieken hiervan afhankelijk is. Hoe hoger de efficiëntie, hoe sterker het scheidend vermogen van de kolom en dus hoe beter de pieken gescheiden zijn.

Wanneer de scheiding door middel van een HPLC heeft plaatsgevonden wordt het analiet naar de post-kolom module geleid. Dit zal ervoor zorgen dat alles wat uit de HPLC-kolom elueert samengebracht wordt met het reagens gekoppeld aan de post-kolom. Deze worden in een eerste t-stuk samengebracht en zo verder geloosd naar een coil die zich in de post-kolom bevindt. Dit zal de homogenisatie van beide vloeistoffen bevorderen zodat deze via naar de fluorescentiedetector kan worden geleid. De post-kolom derivatisatie maakt gebruik van een fluorescent gelabeld proteïne, namelijk avidine. Dit eiwit vormt een stabiel complex met biotine. Aangezien avidine fluorescent gelabeld is, zal er door de binding met biotine voor gezorgd worden dat er een fluorescent signaal wordt uitgezonden dat uiteindelijk gemeten kan worden met een fluorescentiedetector van de HPLC.

2.2.3. Hoe bindt avidine aan biotine?



Figuur 5: avidine-biotine binding (avidin-biotin-interaction, sd)

Het avidine-biotine complex is een binding met de sterkste niet-covalente binding tussen een ligand ofwel biotine en een proteïne ofwel avidine. Een niet-covalente binding duidt dus op het feit dat er geen elektronen worden uitgewisseld. Dit gebeurt snel en wanneer dit gebeurt, is dit complex resistent tegen een veranderende pH of temperatuur (avidin-biotin-interaction, sd).

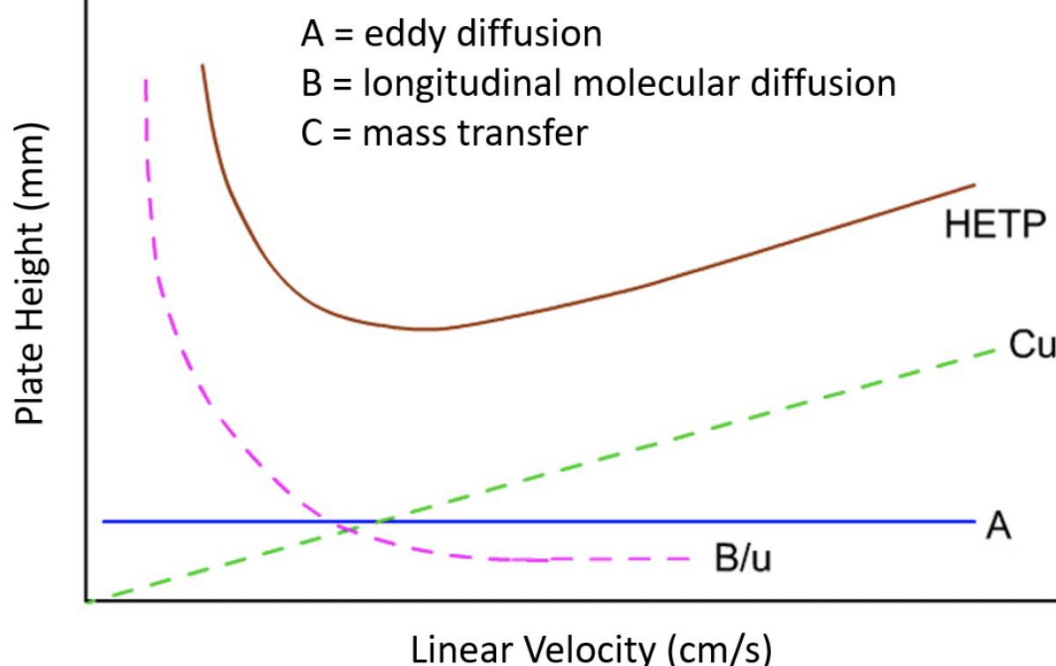
De biotine-avidine-interactie maakt gebruik van meerdere waterstof- en hydrofobe interacties, wat leidt tot een extreem hoge affiniteit (Jain & Cheng, 2016).

Avidine kan tot wel vier biotine complexen op hetzelfde moment binden omdat avidine vier identieke subeenheden heeft (Figuur 5). Hier zal altijd een label aan vastgehecht zijn, in dit geval gaat het hier over een fluorescente afgeleide namelijk het fluorescerende isothiocyanaat. Dit zal zorgen voor fluorescentie wanneer biotine hieraan bindt (Bratthauer, 2010).

Een goede HPLC analyse scheidt biotine van andere stoffen en wordt gekenmerkt door smalle, symmetrische pieken. Deze kunnen verkregen worden door rekening te houden met de van Deemter vergelijking.

Van Deemter Equation

$$\text{HETP} = A + \frac{B}{u} + Cu$$



Figuur 6: van Deemter vergelijking (De Smet, 2010)

Deze bestaat uit drie factoren namelijk eddy-diffusie, longitudinale diffusie en massatransfer (Figuur 6). Om te beginnen bij de eddy-diffusie waarover men spreekt als men het heeft over gepakte kolommen. Hier zullen namelijk de verschillende moleculen niet dezelfde weglengte afleggen en dus ook niet dezelfde tijd in de kolom spenderen. Dit wil niet zeggen dat ze een verschillende snelheid hebben integendeel, ze zullen even snel door de kolom bewegen maar leggen elk een verschillende afstand af. Door het feit dat bepaalde moleculen sneller de detector bereiken dan anderen zullen ze geen scherpe piek vormen maar een iets bredere. Bij longitudinale diffusie kijkt men naar het feit dat er diffusie kan optreden tussen zones met een hoge concentratie naar zones met een lage concentratie. Men kijkt hierbij alleen naar de diffusie volgens de as van de kolom (=longitudinale diffusie). Het is wel zo dat hoe groter de snelheid van de mobiele fase zal zijn hoe minder diffusie er kan optreden. Als laatste kijkt de van Deemter vergelijking naar massatransfer. Dit is de som van de massatransfer uit de mobiele fase (CM) en de massatransfer uit de stationaire fase (CS). Men ziet een scheiding bij chromatografie doordat er een evenwichtsverdeling plaatsvindt tussen de mobiele en stationaire fase. Deze verdeling duurt even terwijl de mobiele fase blijft verder lopen, blijft de stationaire fase stilstaan. Piekverbreding door massatransfer vergroot wanneer de loopsnelheid door de kolom hoger wordt gezien de mobiele fase dan sneller beweegt langsheen de stationaire fase.

Bovenstaande vermelde drie factoren zijn niet aanpasbaar, de enige factor uit de van Deemter vergelijking die beïnvloed kan worden is de flowsnelheid weergegeven als 'u' in de vergelijking. Vanzelfsprekend wordt deze factor dan ook geadapteerd aan de best mogelijke piek (De Smet, 2010).

2.3. Validatie binnen het FAVV

Validatie is een belangrijk onderdeel van het gehele proces om een nieuwe methode te kunnen implementeren binnen een laboratorium. Een methode dient gevalideerd te worden zodat meerdere parameters bekeken dienen te worden om zo aan te tonen dat de methode consistent goede resultaten kan afleveren.

Binnen het FAVV wordt er een onderscheid gemaakt tussen een directe en indirecte methode bij validatie. De desbetreffende norm volgt een indirecte methode: men zal hier niet onmiddellijk het resultaat kunnen aflezen maar met behulp van een standaardreeks en kalibratiecurve de concentratie afleiden. Bij een directe methode wordt het resultaat direct, zonder extra stappen bekomen (DG Laboratoria, 2020).

2.4. Accreditatie

Accreditatie is een belangrijke term voor een laboratorium (ISO-IEC-17025, sd). Dit wordt uitgereikt aan een laboratorium door een derde als deze de conformiteitseisen respecteren. Dit attest kan een laboratorium alleen bekomen door een grondige audit door de accreditatie-instelling. Het is het formele bewijs dat het laboratorium competent is in de specifieke opdrachten die beoordeeld werden. Zo kan men niet alleen de technische competenties bewijzen maar ook de onpartijdigheid en onafhankelijkheid. Deze worden dus niet beïnvloed door farmaceutica.

In België is er maar één accreditatie-instelling en dat is BELAC en is een deel van de verantwoordelijkheid van de Federale Overheidsdienst Economie. Alle accreditaties die BELAC verleend zijn erkend door de Belgische staat (accreditatie, 2019).

3. Experimenten

Hieronder wordt het protocol weergegeven dat bekomen werd na de methodeontwikkeling en optimalisatie van de HPLC condities.

3.1. Reagentia en materialen

- Methanol HPLC / CH₃OH (Avantor)
- Zwavelzuur / H₂SO₄ (Merck)
- Water (HPLC-kwaliteit) gezuiverd met behulp van een Milli-Q systeem (Merck Millipore)
- Citroenzuurmonohydraat / C₆H₈O₇*H₂O (Supelco)
- Dinatriumwaterstoffosfaat dihydraat / Na₂HPO₄*2H₂O (Merck)
- Glutathione / C₁₀H₁₇N₃O₆S (Supelco)
- EDTA dinatrium zout dihydraat / C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈*2H₂O (Merck)
- Dikaliumpwaterstoffosfaat / K₂HPO₄ (Merck)
- Kaliumdiwaterstoffosfaat / KH₂PO₄ (Merck)
- Papaiïne (PanReac)
- Avidine fluoresceïne isothiocyanaat 2-4 mol FITC/mol avidine (Sigma-Adrich)
- Referentiestandaard D-biotine (C₁₀H₁₆N₂O₃S); zuiverheid 99 % (Dr. Ehrenstorfer)
- Papierfilter: diameter 130 mm; 17-30 µm partikelgrootte (Avantor)
- Sproeifilter: 30/0,45 µm (Whatman)

3.2. Bereiding van standaardoplossingen

Een stockoplossing van D-biotine wordt bereid door 10,0 mg D-biotine, tot op 0,1 mg nauwkeurig, af te wegen, over te brengen in een maatkolf van 100 ml en aan te lengen met ultrapuur water. Het oplossen verloopt traag. De stockoplossing wordt 10 maal verdund tot de tussen-stockoplossing. Vanaf deze laatste worden 6 standaarden bereid van 100 ml, zoals aangegeven in Tabel 2. De concentraties van de standaardreeks liggen tussen 0,025 en 0,20 µg/ml.

Tabel 2: Overzicht van standaardreeks

Concentratie (µg/ml)	Volume tussenstockopl. (µl)
0,025	250
0,05	500
0,1	1000
0,15	1500
0,2	2000

Vooraleer de standaardoplossingen over te brengen in de autosampler, worden deze gefiltreerd door een 0,45 µm spuitfilter, om zo de achtergrondruis te minimaliseren.

3.3. Staalvoorbereiding

Gestandaardiseerd referentiemateriaal voor voedingssupplementen (SRM 3280) en zuigelingenmelk (SRM 1869) werd aangekocht bij het National Institute of Standards and Technology (NIST). Andere voedingssupplementen en zuigelingenmelk, gebruikt voor de controle van de toepasbaarheid van de methode voor routineanalyses, werden aangekocht in de lokale supermarkten.

Afhankelijk van de concentratie aan biotine in een staal, wordt een hoeveelheid staal afgewogen, zodat de concentratie binnen de vooraf bepaalde standaardreeks valt.

Aan het staal worden achtereenvolgens 300 µl glutathion-oplossing, 300 µl 1% EDTA-oplossing, 30 ml citraatbuffer (pH 5.7) en 3 ml papaïne-oplossing toegevoegd.

- De glutathion-oplossing wordt bereid door 30 mg glutathione op te lossen in 3 ml ultrapuur water.
- De EDTA-oplossing kan bereid worden door 0,1 g EDTA op te lossen in 10 ml ultrapuur water.
- Voor de citraatbuffer worden 0,462 g citroenzuurmonohydraat en 1,05 g Dinatriumwaterstoffosfaat dihydraat in 450 ml ultrapuur water opgelost. Het mengsel wordt op pH 5,7 gebracht met behulp van zwavelzuur (1 M). Het geheel wordt tot slot aangelengd tot 500 ml met ultrapuur water.
- Als laatste dient men een papaïne-oplossing met concentratie van 20 g/l te maken. Dit kan door 1 g papaine op te lossen in 50 ml citraatbuffer.

Deze oplossing wordt vervolgens overnacht geïncubeerd in een warmwaterbad op 37°C onder continu roeren. Eénmaal afgekoeld, wordt de oplossing overgebracht in een maatkolf van 50 ml en aangelengd met ultrapuur water.

Na homogenisatie wordt de oplossing gefilterd door een papierfilter met grootte 130 mm en een doorlaatbaarheid van 17 tot 30 µm partikelgrootte.

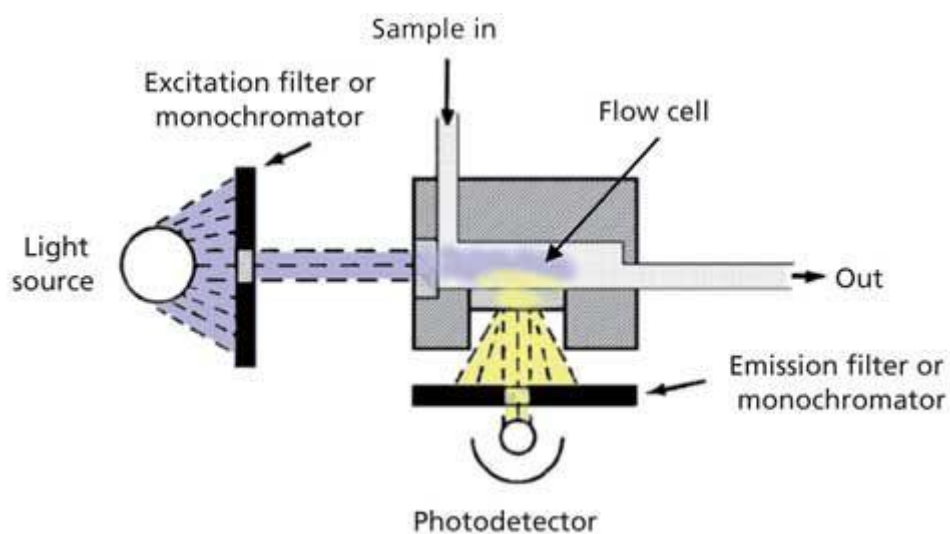
Voor injectie wordt de oplossing tot slot gefiltreerd m.b.v. een 0,45 µm spuitfilter.

Ook voor de post-kolom dient een reagens gemaakt te worden. Dit is een fosfaatbuffer pH 7 waarin gelabeld avidine zal opgelost worden. Deze buffer wordt gecreëerd door een 50/50 verhouding tussen kaliumdiwaterstoffosfaat en dikaliumwaterstoffosfaat.

3.4. Apparatuur

Het gebruikte chromatografisch systeem is een Alliance e2695 HPLC systeem (Waters) en bestaat uit een quaternaire pomp verbonden met een autosampler en een fluorescentiedetector 2475. Bijkomend is een post-kolom reactie module (PCRM) gekoppeld aan het HPLC systeem.

De chromatografische scheiding wordt uitgevoerd op kamertemperatuur met behulp van een LiChrospher® 100 RP-18 endcapped (250mm x 4mm x 5µm). De mobiele fase wordt isocratisch toegeleverd en bestaat uit een mengsel van 80 % fosfaatbuffer pH 6 (0,1M) en 20 % methanol (100% HPLC graad). Deze fosfaatbuffer kan bereid worden door 90 % kaliumdiwaterstoffosfaat (0,1 M) samen te voegen met 10 % dikaliumwaterstoffosfaat (0,1 M). De flowsnelheid bedraagt 0,5 ml/min en de looptijd wordt ingesteld op 13 minuten. Het injectievolume bedraagt 30 µl en de excitatie- en emissiegolflengte van de fluorescentiedetector worden ingesteld op respectievelijk 490 en 520 nm.



Figuur 7: Schema van de fluorescentiedetector (Dolan, 2016).

Zoals zichtbaar op Figuur 7 komt alles van de post-kolom in de flow cell van de fluorescentiedetector terecht waarin deze zal opgesplitst worden tussen de emissie en excitatie. Een Xenon lamp in dit geval zal uitgezonden worden op de inkomende stalen. In de fluorescentiedetector wordt de excitatiegolflengte en de emissie-golflengte ingesteld. Beide hebben verschillende golflengtes. Alleen de emissie zal gemeten worden. Bij excitatie zal een elektron naar een hogere schil migreren omdat door bestraling met in dit geval golflengte 490 nanometer er net voldoende energie wordt toegevoegd om dit te kunnen uitvoeren. Bij emissie wordt het atoom dan weer bestraald met 520 nm zodat het elektron zijn opgenomen energie weer afgeeft en terugvalt naar een lager energieniveau. Het is bij die emissie units die vrijkomen die gemeten zullen worden waardoor men een chromatogram bekomt.

4. Resultaten en discussie

4.1. Ontwikkeling van de HPLC methode

Elke HPLC analyse maakt gebruik van een mobiele en een stationaire fase. In dit geval zal de stationaire fase een LiChrospher® 100 RP-18 endcapped kolom zijn. Om het analiet naar de kolom te begeleiden is een mobiele fase nodig. Wanneer het analiet dan heeft kunnen interageren met de stationaire fase zal deze verder doorlopen naar de post-kolom reactie module. Hier zal het over een coil gemengd worden met avidine 2mg/ml opgelost in fosfaatbuffer pH 7 (0,1M). Na de reactie hierin zal er een fluorescent complex gevormd zijn tussen vitamine B8 en avidine dat waargenomen wordt in de fluorescentiedetector.

In de HPLC analyse elueert biotine na 11 minuten. Bijgevolg wordt de looptijd van één analyse ingesteld op 13 minuten.

De verschillende HPLC condities zullen onderzocht worden.

4.1.1. Kolom

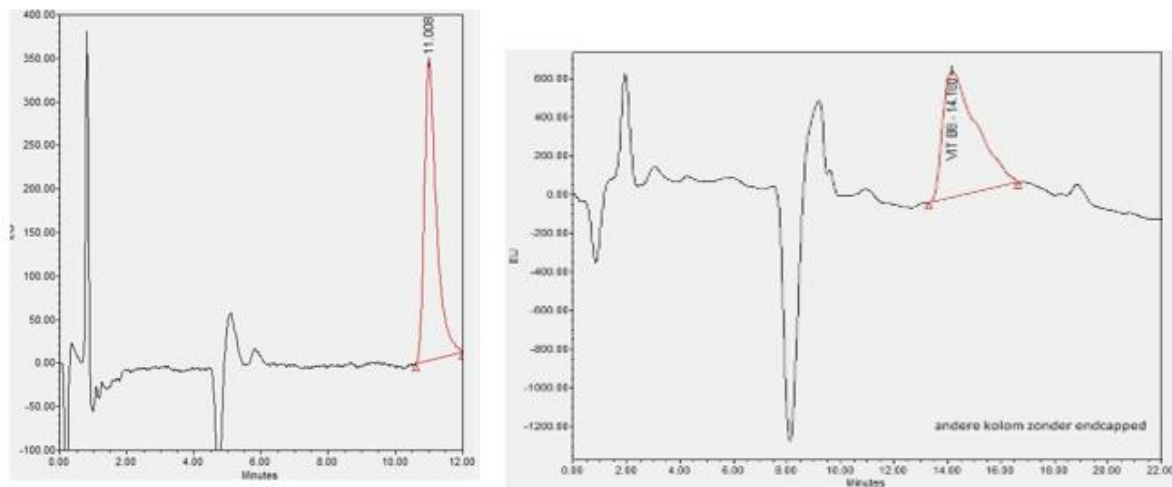
De keuze van een HPLC kolom bepaalt hoe efficiënt de scheiding zal zijn. Er werd gebruik gemaakt van een LiChrospher® 100 RP-18 endcapped kolom (Merck), zoals ook vermeld staat in de Europese norm. Deze LiChrospher® kolom bevat partikels die gebonden zijn aan een koolwaterstofketen met 18 C; Het is met andere woorden een apolaire kolom, en dient gecombineerd te worden met een meer polaire mobiele fase om een goede scheiding te verkrijgen. Het gaat hier dus om een reversed phase of omgekeerde fase kolom/ analyse (LiChrospher® 100 RP-18 endcapped (5 µm) LiChroCART® 250-4).

In een endcapped kolom zijn de resterende toegankelijke polaire silanolgroepen, die niet gebonden zijn aan een C18 keten, inactief gemaakt worden. Dit gebeurt door silylering met trimethylsilylgroepen. De 100 duidt op de kwaliteit van de kolom die MQ100 is. De RP staat voor reversed phase of in het nederlands omgekeerde fase.

Dan komt men bij de 18 die erop wijst dat er 18 koolstof atomen zijn gebonden aan de silica van de stationaire fase. Dit verklaart waarom de stationaire fase apolair is omdat C18 een lange koolwaterstofketen is. Ten slotte endcapped verwijst naar de vervanging van toegankelijke silanolgroepen in een gebonden stationaire fase door trimethylsilylgroepen. Kolommen met endcapping vertonen minder retentie voor acceptoren van waterstofbruggen, zoals geïoniseerde basen, en meer retentie voor geprotoneerde basen.

Om de invloed van het inactief maken van silanolgroepen door endcapping na te gaan werd de analyse uitgevoerd op 2 (LiChrospher® 100 RP-18 kolommen van 25 cm, de ene endcapped, de andere niet. Figuur 8 toont beide chromatogrammen. In beide gevallen verschijnt de biotinepiek na ongeveer 10 minuten. Wat opvalt is de sterke mate van tailing of staartvorming op de traditionele, niet-endcapped kolom. Tailing of staartvorming is het fenomeen waarbij die pieken van het chromatogram niet mooi symmetrisch zijn maar uitloopt. De staartvorming kan verklaard worden door het meer heterogene karakter van het oppervlak van de niet-endcapped kolom. De componenten in het stalen of standaarden kunnen zowel interageren met de polaire, zure silanol groepen als de apolaire C18 ketens.

Het resultaat valt binnen de te verwachten grenzen, mede gezien er al veel testingen voorafgegaan worden alvorens de Europese normen gepubliceerd kunnen worden. Dit ligt binnen de lijn van de verwachting



Figuur 8: Invloed van endcapping van de kolom op de analyse. Het linkse chromatogram werd verkregen na analyse op een endcapped C18-kolom, het rechtse chromatogram op een niet-endcapped C18-kolom. De retentietijd van de biotinepiek verschuift van 11,01

4.1.2. Mobiele fase

Om de pieken te optimaliseren zijn er verscheidene opties wat betreft de mobiele fase. De mobiele fase vervoert de componenten door de kolom, maar draagt ook bij tot de scheiding ervan. Volgens de EU norm moet de mobiele fase 80 % fosfaatbuffer pH 6 en 20 % methanol bevatten. De invloed van kleine variaties in de samenstelling van de mobiele fase werd onderzocht.

Het percentage methanol werd zowel met 10 % verlaagd als met 10 % verhoogd. De chromatogrammen in Figuur 9 tonen dat bij een 10 % lager methanolgehalte de retentietijd aanzienlijk verhoogd naar 17 minuten. Het omgekeerde vindt plaats bij een verhoging van het percentage aan methanol. De biotinepiek verschijnt hier na 11 minuten.

Daarnaast maakt tabel 3 duidelijk dat ook de piekoppervlakte van de pieken beïnvloed wordt.

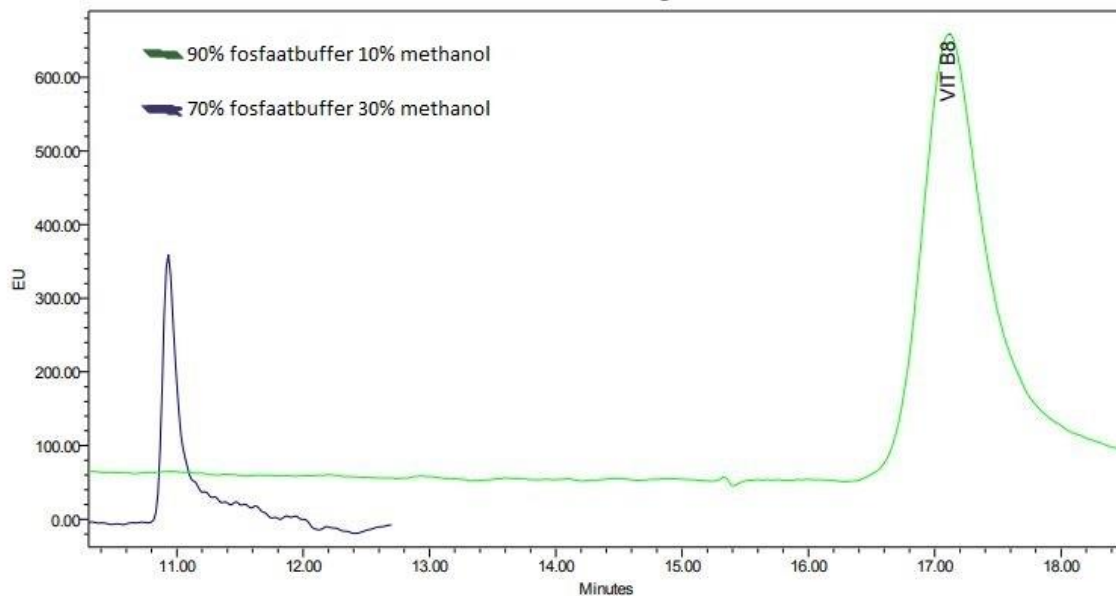
Tabel 3: Invloed van het methanolgehalte in de mobiele fase op de retentietijd van biotine en de oppervlakte van de biotinepiek.

% Methanol	Retentietijd	Piekoppervlakte
10	17 minuten	33077149
30	11 minuten	215469960

De invloed op de retentietijd is een gevolg van de eluïesterkte van de mobiele fase. Een sterker eluens heeft een samenstelling die dichter aanleunt bij deze van de stationaire fase en versnelt de elutie. Het omgekeerde geldt voor het zwakkere eluens.

Een snellere elutie betekent ook een snellere analyse en minder verbruik van mobiele fase. We zien echter dat ook de piekoppervlakte en piekhoogte lager liggen. Lagere concentraties zijn mogelijk dus moeilijker te bepalen zijn. Het chromatogram van de analyse met een hoger methanolgehalte toont ook een zekere tailing en instabiliteit van de biotinepiek.

Biotine zal sneller elueren als meer methanol zal worden toegevoegd omdat biotine meer oplosbaar is in methanol dan in water.

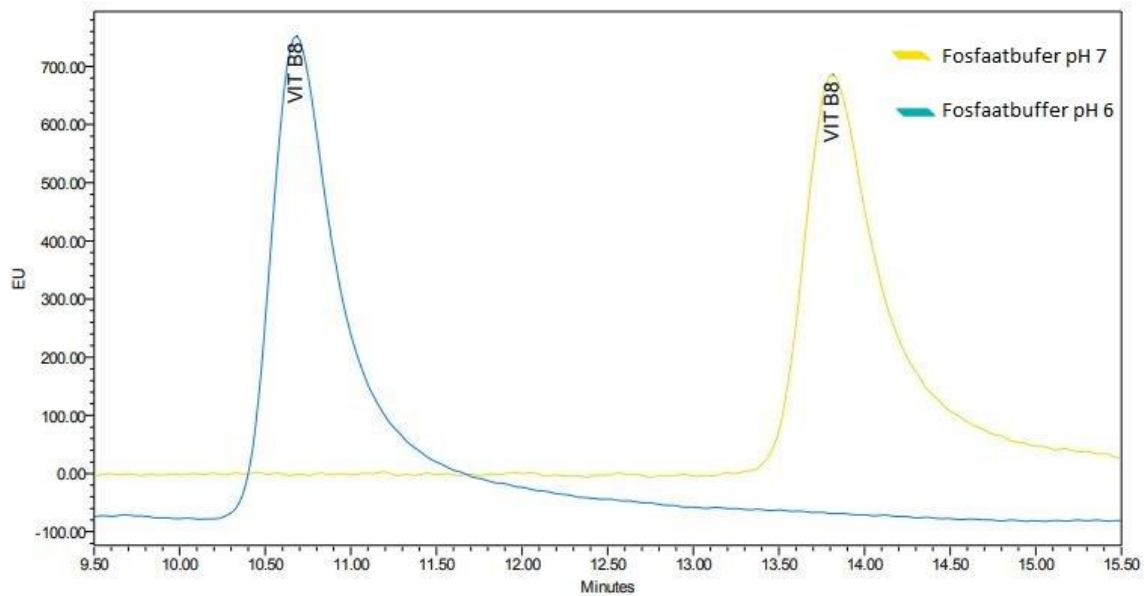


Figuur 9: Overlay met 10 % meer methanol (donkerblauw) en 10 % minder methanol (lichtblauw)

Er wordt beslist om de samenstelling vermeld in de norm te behouden. Bij een hoger methanol percentage in de mobiele fase elueert biotine sneller, maar de piekoppervlakte is beduidend kleiner. Ook de piekvorm is niet ideaal.

Een mobiele fase met 10 % methanol en 90 % fosfaatbuffer verlengt de analyse onnodig.

Vervolgens werd nagegaan of de pH van de fosfaatbuffer in de mobiele fase verhoogd kan worden tot 7. De norm maakt gebruik van twee verschillende fosfaatbuffers: één met pH 6 in de mobiele fase en één met pH 7 voor het reagens van het post-kolom reagens om avidine in op te lossen. Figuur 10 maakt duidelijk dat een verhoging van de pH van de buffer in de mobiele fase resulteert in een verhoging van de retentietijd met 3 minuten; de piekvorm is ongewijzigd (Figuur 10). Er wordt geopteerd voor de snelste elutie en zijn er dus twee verschillende fosfaatbuffers nodig.



Figuur 10: Overlay biotinepiek die elueert na 10,5 minuten bij fosfaatbuffer pH 6 (blauw) en na 14 minuten bij fosfaatbuffer pH 7 (geel)

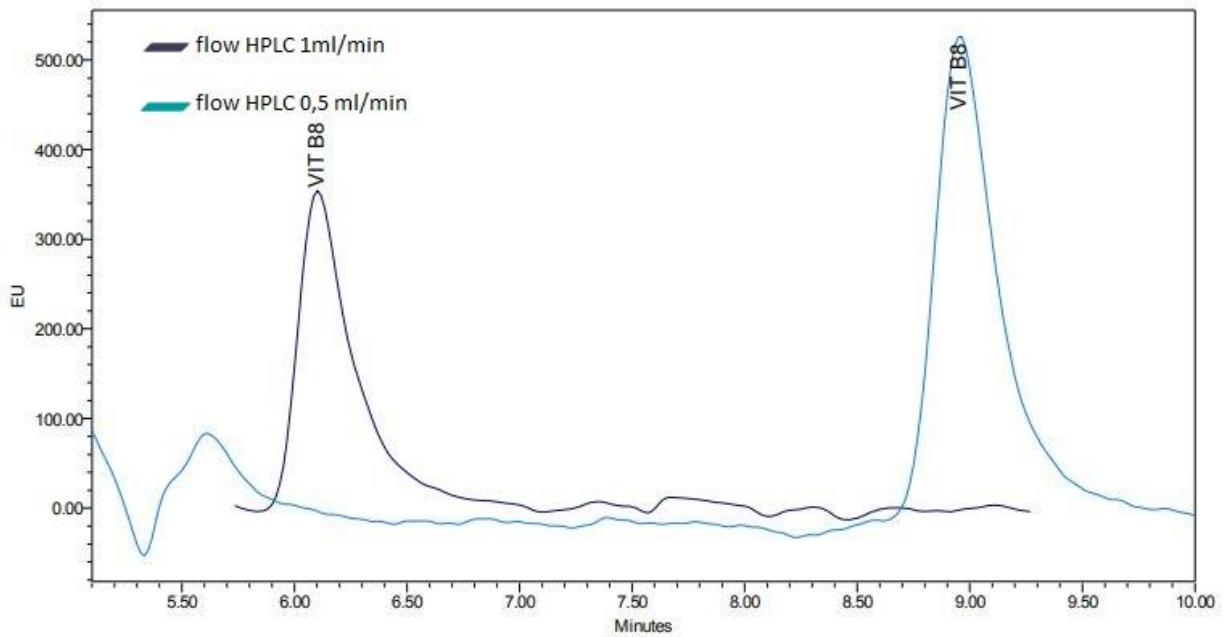
4.1.3. Temperatuur

In de norm wordt de temperatuur niet vermeld. De analyses werden daarom uitgevoerd bij kamertemperatuur. Een verhoging van de kolomtemperatuur van 25 °C tot 37 °C had geen invloed op de analyse. Ook de temperatuur van de sample manager werd ingesteld op 25 °C en 37 °C. Er kan dan nog één temperatuur worden ingesteld en dat is op de coil van de post-kolom. Ook hier een maal op 25 °C en een maal op 37 °C, maar ook dit had geen invloed. Deze aanpassing werd dan ook niet weerhouden.

4.1.4. Flowsnelheid

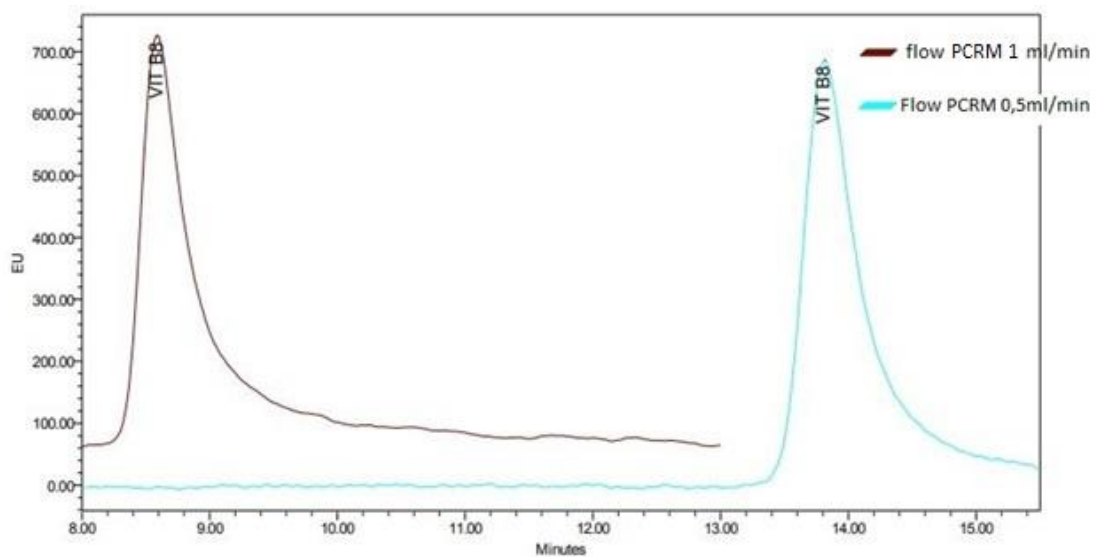
Wanneer de flowsnelheid verhoogt, loopt de loopvloeistof sneller doorheen de kolom en is er minder interactie met de stationaire fase. Componenten zullen sneller elueren. De flowsnelheid werd verhoogd van 0,5 ml/min naar 1 ml/min en beide chromatogrammen worden weergegeven in Figuur 11. In het chromatogram bij een flow van 1 ml/min verschijnt de biotinepiek na 6,1 minuten. Wanneer gewerkt wordt met een flowsnelheid van 0,5 ml/min verschijnt de biotinepiek na 9,1 minuten. De piekvorm is in beide gevallen gelijkaardig, maar bij een flowsnelheid van 1 ml/min komt, omwille van een kortere retentietijd, de chromatogrampiek in de buurt van de puls afkomstig van de fosfaatbuffer.

Bij een flowsnelheid van 0,5 ml/min is de biotinepiek ruim voldoende gescheiden van de puls. Verdere analyses zullen bijgevolg uitgevoerd worden bij een flowsnelheid van 0,5 ml/min.



Figuur 11: Overlay biotinepiek bij een flowsnelheid van de HPLC van 1 ml/min (donkerblauw) en 0,5 ml/min (lichtblauw), met respectievelijke retentietijden van 6,1 min en 9,1 min

Ook de flowsnelheid van de post-kolom module kan geoptimaliseerd worden. Volgens de Europese norm bedraagt de flowsnelheid 1 ml/min. Een hogere flow is niet mogelijk gezien de post-kolom reactie module de hoge druk die daarbij gegenereerd wordt niet aankan. De invloed van het verlagen van de flowsnelheid tot de flowsnelheid van de mobiele fase, werd nagegaan. Zoals blijkt uit de chromatogrammen van Figuur 12 wordt in beide gevallen een bruikbare chromatogrampiek bekomen. Er wordt in dit geval gekozen voor een kortere retentietijd en bijgevolg wordt er verder gewerkt met een flowsnelheid van 1 ml/min door de post-kolom reactie module.

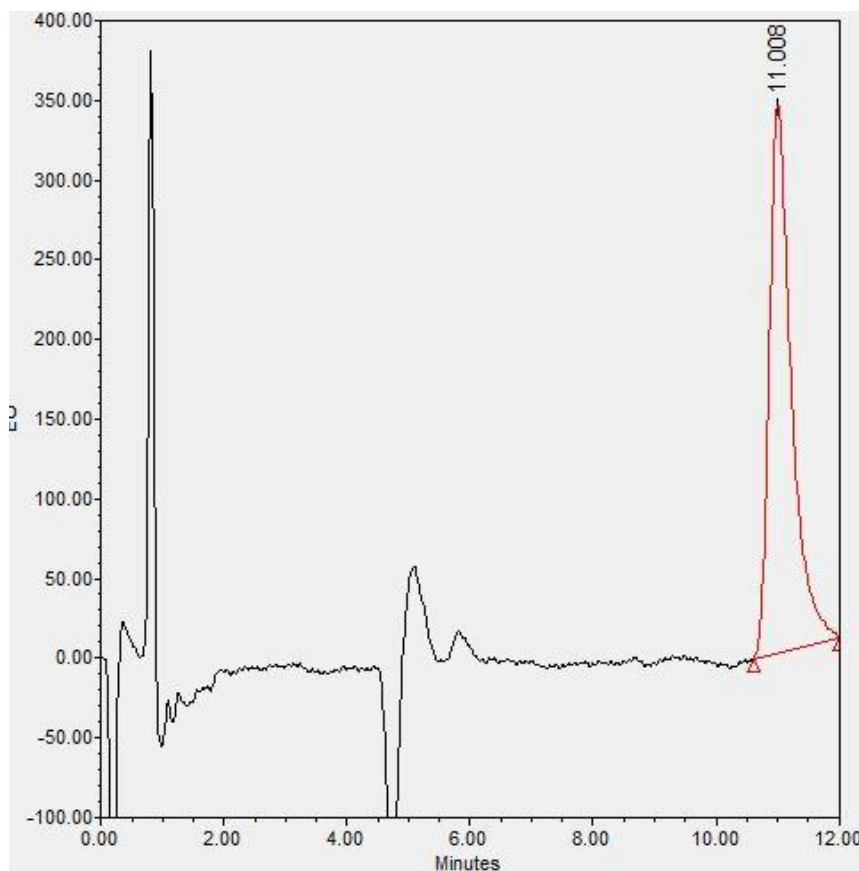


Figuur 12: Overlay bij een flowsnelheid in de post-kolom reactie module van 1 ml/min (bordeaux) en 0,5 ml/min (lichtblauw)

4.1.5. Injectievolumen

In de norm wordt een injectievolumen van 30 µl toegepast. Deze blijft behouden in de uiteindelijke methode. Wanneer meer geïnjecteerd wordt zal niet alleen de piekoppervlakte verhogen, maar ook de peiktailing toenemen. Dat laatste is niet gewenst. Omgekeerd is ook het verlagen van het injectievolumen geen goed idee. De laagste concentratie in de standaardreeks is 0,025 µg/ml en deze ligt al vrij kort tegen de kwantificatielimiet. Als men dan nog minder zal injecteren kan de concentratie niet bepaald worden. Hierdoor wordt het staal onbruikbaar.

4.1.6. Optimalisatie van de methode en resulterende HPLC condities



Figuur 13: Chromatogram 0,2 µg/ml volgens de EN 15607 norm

De pieken met een concentratie van meer dan 0,15 µg/ml vertonen tailing (Figuur 13). De elutie neemt zo ook meer tijd in beslag dan wenselijk. Dit is er omdat de moleculen niet samen de detector bereiken. Er werd getracht om deze weg te werken, dit door de flowsnelheid evenals de buffersamenstelling van de mobiele fase aan te passen. Gaande van 70:30 fosfaatbuffer (pH 6)/methanol tot 90/10 maar er was geen verandering zichtbaar. Ook werd de fosfaatbuffer van het post-kolom reagens gebruikt bij de HPLC, pH 7 in plaats van pH 6. Ook dit bracht geen verbetering met zich mee. Tenslotte werd ook acetonitrile toegevoegd aan de mobiele fase zodat deze bestaat uit 80 % fosfaatbuffer, 18 % methanol en 2 % acetonitrile. Ook dit bracht geen optimaler resultaat met zich mee.

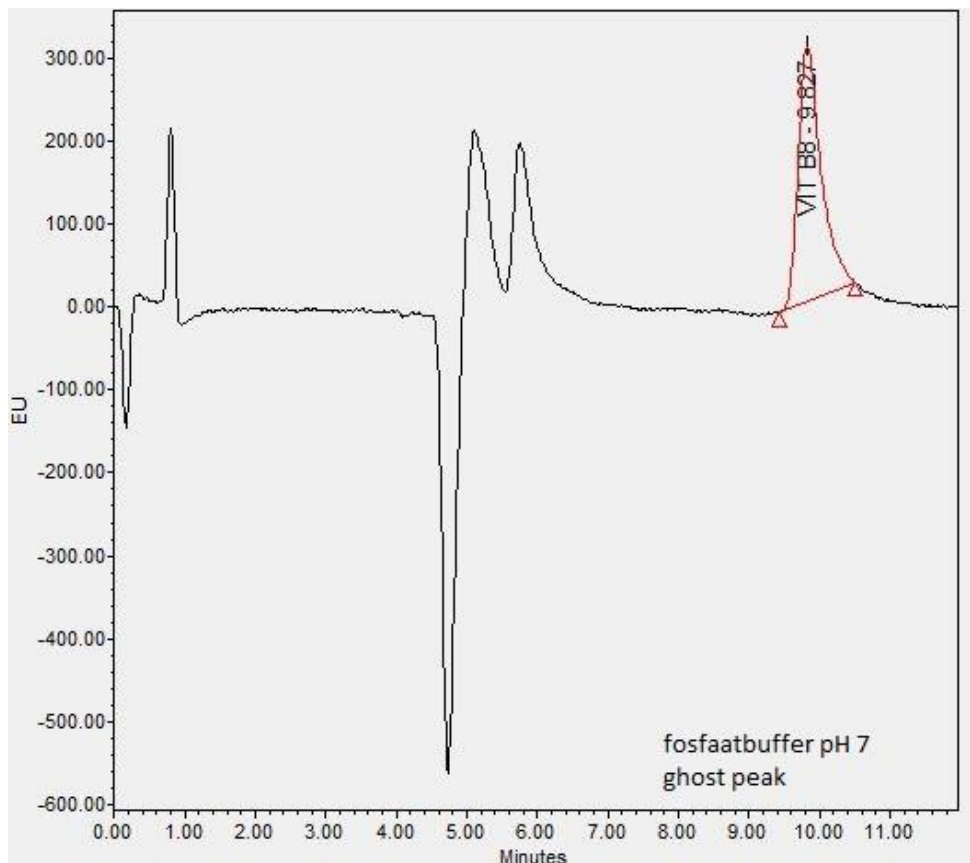
Een tweede minpunt van de analyse is het verschijnen van 2 pulsen of 'ghost' pieken. In het chromatogram van Figuur 13 zijn deze zichtbaar na 0,5 minuten en na 5 minuten. Deze ontstaan door de mobiele fase. Wanneer een blanco staal of gewoon water geïnjecteerd wordt, blijven deze pieken zichtbaar.

Wanneer de pH van de fosfaatbuffer van de mobiele fase verhoogd wordt van 6 naar 7, beïnvloedt dat de manier dat de ghost pieken die zichtbaar zijn (Figuur 14). Dit doet vermoeden dat de fosfaatbuffer hier iets mee te maken heeft. De buffer voor de mobiele fase en deze voor het post-kolom reagens worden los van elkaar bereid uit dezelfde twee basiscomponenten. De verhouding van beide bepaalt de pH.

Spookpieken of ghost pieken kunnen meerdere oorzaken hebben. Een ghost piek kan ook ontstaan doordat het gebruikte glaswerk gecontamineerd zal zijn, dit is ook niet waarschijnlijk omdat al het glaswerk grondig wordt gekuist en voor gebruikt eerst wordt gespoeld met ultrapuur water om zeker geen opstoppingen in het toestel te creëren. Om te eindigen met de oorzaak die hier het meest waarschijnlijk is. De mobiele fase en meer specifiek de fosfaatbuffer zal deze ghost pieken creëren (Zhang, Sadikin, Redkar, & Inloes, 2011). Dit omdat als men geen of minder fosfaatbuffer toevoegt deze pieken ook minder worden. Om dan meer in detail te kijken is de samenstelling van beide buffer qua componenten hetzelfde, alleen zal de verhouding anders zijn. Bij pH 6 zal men 90 % KH_2PO_4 nodig hebben en 10 % K_2HPO_4 en voor een pH 7 te bekomen is de verhouding 50/50%. Men kan dus besluiten dat wanneer de hoeveelheid dikaliumwaterstoffosfaat toeneemt of wanneer de hoeveelheid kaliumdiwaterstoffosfaat afneemt dat de puls in grootte afneemt.

Dit kan verklaard worden doordat elk verschil tussen de mobiele fase en het staal tot een piek leidt. De pulsen waarbij de pieken zelf negatief zijn wil zeggen dat hier de fluorescentie minder is dan de mobiele fase.

De piek is negatief, wat overeenkomt met het feit dat de fosfaatbuffer het excitatielicht absorbeert. Wanneer men alleen water zal injecteren is deze negatieve piek en ghost piek zichtbaar. De verstrooiing vindt plaats door de aanwezigheid van de fosfaatbuffer.



Figuur 14: Chromatogram van de analyse van een biotiny standaard m.b.v. een mobiele fase met samenstelling fosfaatbuffer pH 7: methanol 80:20. De biotiny piek verschijnt na 10 minuten; daarnaast zijn 2 spookpieken zichtbaar na 1, 5 en 6 minuten

De analyse werd ook uitgevoerd op een analoge kolom die niet endcapped was. De tailing van de piek nam hier echter alleen maar toe.

Ook varieerde men qua temperatuur voor zowel de stalen als de kolom als de post-kolom coil van 25 tot 37°C. Dit had geen invloed. In de norm wordt de temperatuur ook niet vermeld en daarom werd reeds vermoed dat deze geen invloed zou hebben. Om zeker te zijn werd dezelfde temperatuur ook ingesteld voor de post-kolom coil maar ook hier geen relevante invloed te weerhouden.

Bij een verdubbeling van de flow van de HPLC volgde de biotiny piek onmiddellijk na de puls. Biotiny interageert dan onvoldoende met de stationaire fase wat tot een minder goede scheiding leidt. Een duidelijke verbetering van de staartvorming van de piek werd niet waargenomen. De flow van de post-kolom werd niet verhoogd gezien dit niet mogelijk is omdat dit anders een te hoge druk zou creëren. Deze kon wel verlaagd worden en om alles onderzocht te hebben werd dit ook zo uitgevoerd. Dit bracht geen verandering teweeg aan de piek, alleen aan de retentietijd die met een redelijke maat toeneemt. Dit bracht geen voordeel te weeg aan de gebruikte methode en bijgevolg dus niet aangepast.

Als laatste werd het injectievolume verlaagd. Dit had een positief effect op de staartvorming of tailing van de biotiny piek. De tailing is dus een gevolg van een iets te hoge concentratie biotiny. Hierdoor werd beslist om de concentraties van de standaardreeks te verlagen zodat de verkregen pieken een lagere concentratie hebben en dus ook beduidend minder tailing.

Tailing kan ook ontstaan door dode volumes (Hinshaw, 2015). Dit is een veelvoorkomend feit bij tubing en meer specifiek veel tubing. In de gebruikte opstelling is er sprake van zeer veel tubing omdat het eluaat na de kolom niet direct naar de detector stroomt zoals in de meeste gevallen omdat er eerst een post-kolom derivatisatie moet plaatsvinden. Het eluaat loopt dus eerst nog naar en door de post-kolom coil om vervolgens terug naar de detector te lopen. Deze tubing is nog langer dan van de kolom naar de post-kolom omdat de fluorescentiedetector helemaal bovenaan de opstelling staat. Dit zal waarschijnlijk ook bijdragen aan de tailing maar hier kan men jammer genoeg niets veranderen omdat dit hele verloop noodzakelijk is om de post-kolom te betrekken en deze kan absoluut niet ingekort worden.

Overzicht HPLC condities

Uit bovenstaande experimenten werden volgende HPLC condities als meest optimale bekomen:

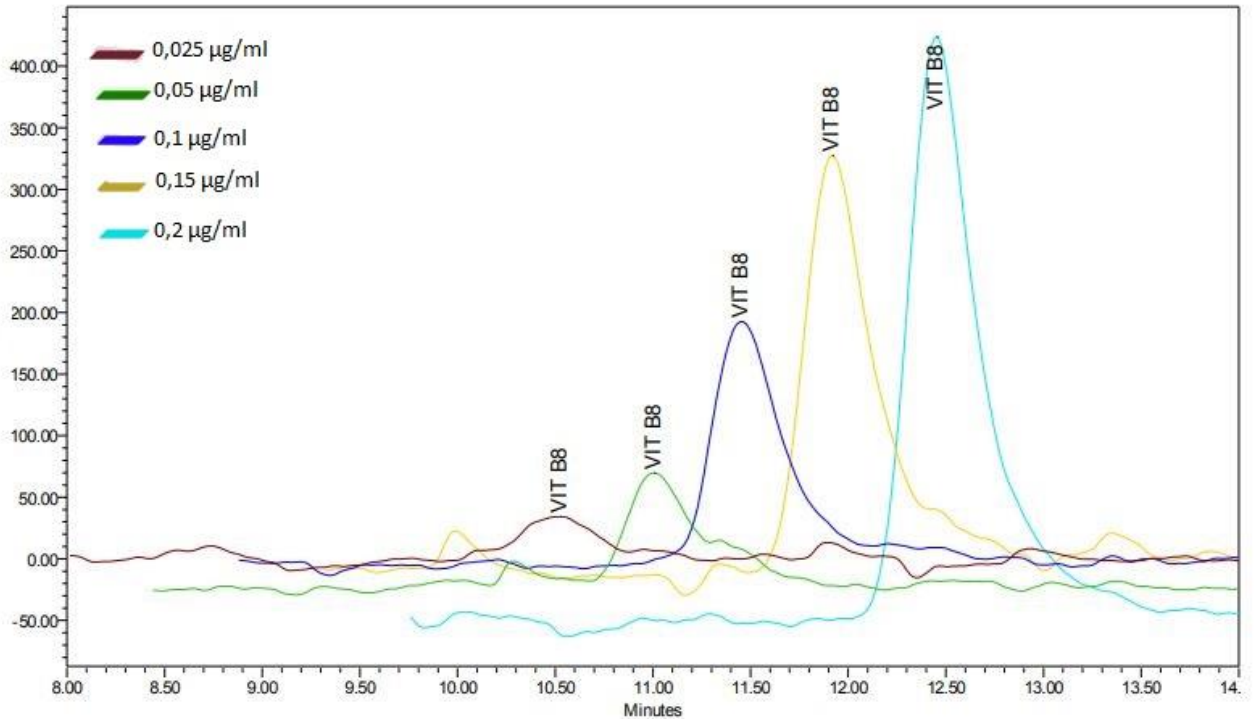
- HPLC-kolom: LiChrospher® 100 RP-18 endcapped (250 mm x 5 mm x 5 µm)
- Mobiele fase: 80 % fosfaatbuffer pH 6 en 20 % methanol
- Injectievolume: 30 µl
- Flowsnelheid: HPLC: 0,5 ml/min (HPLC) ; 1 ml/min (PCRM)
- Fluorescentiedetector: excitatie 490 nm ; emissie 520 nm
- Post-kolom reagens: 2 mg/ml avidine in fosfaatbuffer pH 7

4.1.7. Eigenlijke standaardreeks

Resultaten

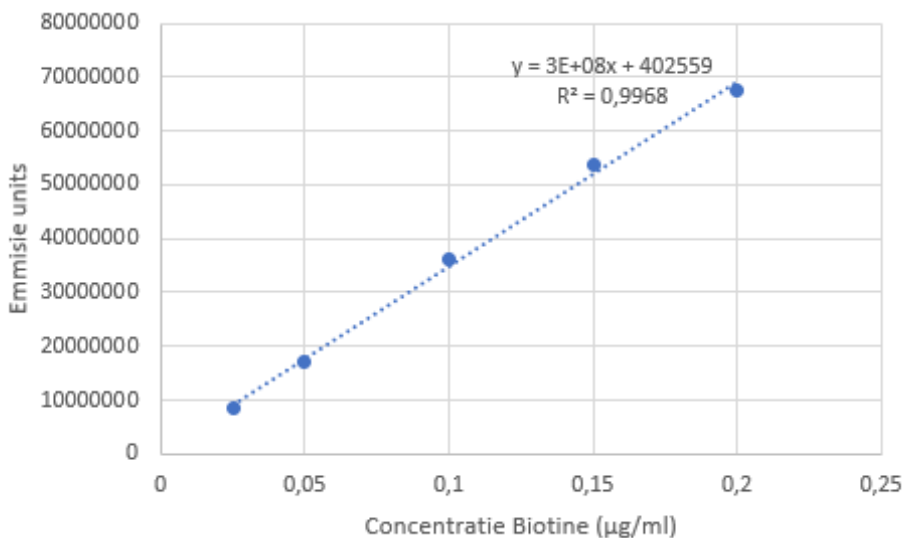
De geoptimaliseerde methode werd toegepast op een reeks standaarden en een staal.

He concentratiegebied van de standaarden werd gekozen op basis van stalen die de afgelopen jaren dienden geanalyseerd te worden. De standaardreeks werd geïmplementeerd gaande van 0,025 tot 0,2 µg/ml. Volgend resultaat werd bekomen als men alle vijf chromatogrammen naast elkaar zou leggen (Figuur 15).



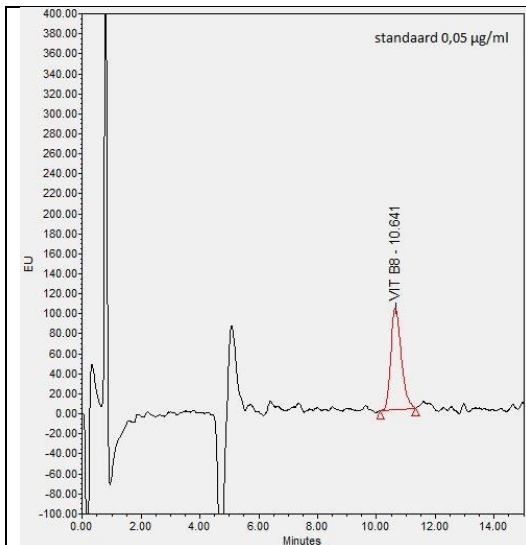
Figuur 15: Overlay standaardreeks beginnende met de laagste concentratie aan biotine: 0,025 µg/ml (bordeaux), 0,05 µg/ml (groen), 0,1 µg/ml (blauw), 0,15 µg/ml (geel) om te eindigen bij 0,2 µg/ml (lichtblauw).

Aan de hand van de vijf bekomen pieken kan zo een kalibratiecurve worden opgesteld. Dit is een rechte waarbij de piekoppervlakte worden uitgezet op de y-as ten opzichte van de biotine concentratie op de x-as. De R^2 van de curve bedraagt 0,9968 en benadert dus de ideale waarde '1' (Figuur 16). Dat wil zeggen dat de verschillende meetwaarden mooi op één lijn liggen en dat er geen significant verschil is tussen de punten en de rechte. De rechte laat toe om de concentratie in de stalen te bepalen (aan de hand van de piekoppervlakte).

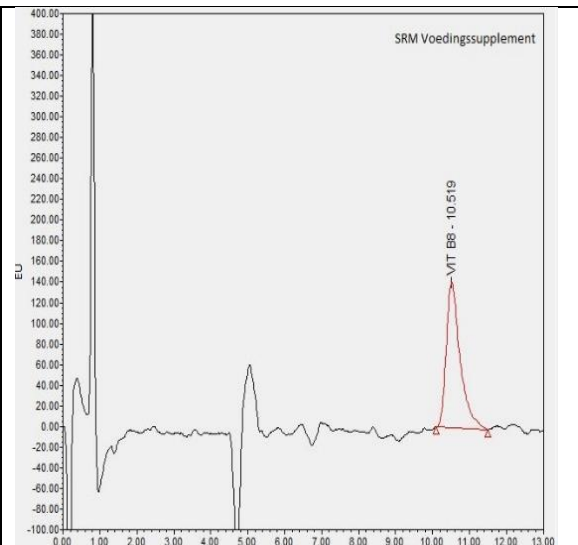


Figuur 16: Kalibratiecurve met op de X-as de concentratie biotine (µg/ml) en op de y-as emissie units

Figuur 17 geeft het totaalbeeld van het chromatogram van de standaard met concentratie 0,05 µg/ml en vergelijkt dit met een chromatogram van een staal (Figuur 18), meer bepaald een SRM voedingssupplement (voedingssupplement – Standard Reference Material – 23,4 µg/ml). Het SRM controlestaal wordt gebruikt voor de validatie van methoden; het werkelijke gehalte aan vitamine B8 is hier gekend.



Figuur 17: Chromatogram 0,05 µg/ml standaard



Figuur 18: Chromatogram controle (SRM) voedingssupplement 23,4 µg/ml

De analyse van het voedingssupplement toont dat de methode specifiek is. Er is namelijk slechts één piek zichtbaar en ook de achtergrondruis is minimaal. Dat maakt deze methode zeer geschikt voor de bepaling van biotine in voedingssupplementen en zuigelingenmelk.

Vooraleer een methode als routinemethode kan toegepast worden in het FLVVT, moet er worden aangetoond dat de ontwikkelde methode geschikt is voor het beoogde gebruik. Hiervoor moet een methodevalidatie uitgevoerd worden volgens een interne procedure (DG Laboratoria, 2020).

4.2. Validatie

Bij het valideren van een analysemethode stelt men zich tot doel het beoogde toepassingsgebied en werkgebied van de methode te specificeren en informatie te bekomen over de meetonzekerheid van de analyseresultaten, zodat kan worden vastgesteld of de methode beantwoordt aan de vooropgestelde analytische doelstelling. Voor de validatie van kwantitatieve methoden die ontwikkeld worden door de laboratoria van het FAVV worden volgende validatieparameters bepaald: werkgebied en lineariteit, gevoeligheid, precisie (herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid), juistheid, specificiteit, selectiviteit en robuustheid.

4.2.1. Werkgebied

Het werkgebied van een analysemethode wordt gedefinieerd als het interval tussen de kleinste en grootste concentratie van de te bepalen component waarvoor de analysemethode gevalideerd is, met andere woorden waarbinnen de prestatiekenmerken aan vastgelegde eisen voldoen.

Bij een optimaal werkgebied kunnen courante concentraties probleemloos worden gemeten en liggen kritische concentraties niet helemaal aan de uitersten van het werkgebied (ISO, 2006).

Voor de ontwikkelde methode werd het werkgebied gekozen in functie van de meest voorkomende doseringsgehalten van vitamine B8 in zuigelingenmelk en voedingssupplementen en dit gebied ligt tussen 0,025 µg/ml tot 0,2 µg/ml.

4.2.2. Lineariteit en matrixeffecten

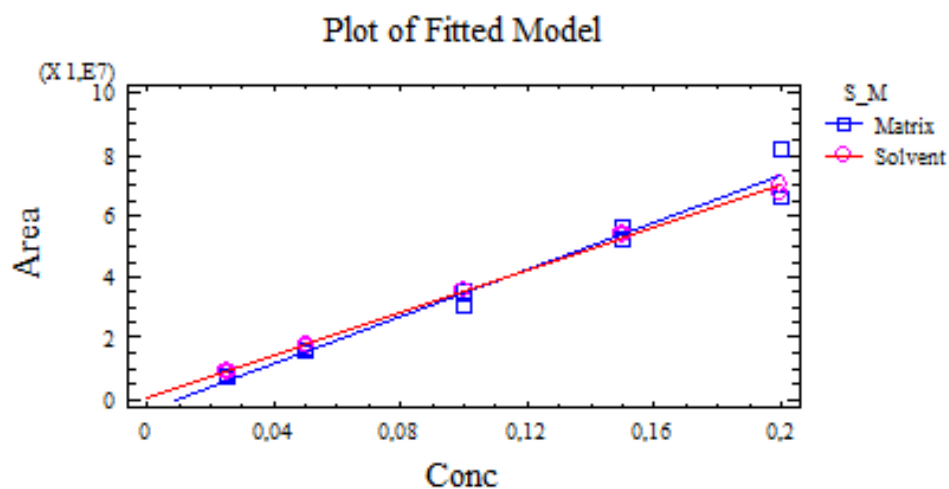
De lineariteit van een analysemethode kan gedefinieerd worden als de mogelijkheid om binnen een gegeven interval meetresultaten te verkrijgen welke rechtstreeks evenredig zijn met de concentratie van de te meten component in het te analyseren staal. Hiervoor werd een standaardcurve opgesteld bestaande uit vijf verschillende kalibratiepunten (0,025 µg/ml; 0,05 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,15 µg/ml; 0,2 µg/ml). De bekomen chromatogrammen worden weergegeven in Figuur 15. De geschiktheid van het lineair model voor de ijklijn werd vervolgens nagegaan aan de hand van het statistisch verwerkingsprogramma Statgraphics ('Lack-of-fit test'). Hierdoor kon worden aangetoond dat er een sterk lineair verband is tussen de gemeten piekoppervlakte en de concentratie van de te meten component.

Om na te gaan of de aanwezigheid van een matrix (in dit geval een voedingssupplement) een invloed heeft op het rendement van de extractieprocedure, wordt onderzocht of er een significant verschil bestaat tussen een ijklijn in solvent en een ijklijn in matrix. Deze ijklijn in matrix wordt opgesteld door hoeveelheden standaardstockoplossing toe te voegen aan een staal dat geen vitamine B8 bevat, zodat uiteindelijk dezelfde concentraties bekomen worden als die van de ijklijn in solvent. Deze gedopeerde stalen doorlopen vervolgens de extractieprocedure. Deze ijklijn in matrix wordt vergeleken met een ijklijn in solvent, die de extractieprocedure niet doorlopen heeft.

Tabel 4: Overzicht gegevens voor lineariteit na te gaan aan de hand van curve's in matrix en solvent

	Concentratie biotine (µg/ml)	Piekoppervlakte in solvent	Piekoppervlakte in matrix
Curve 1 4 mei 2021	0,2	70191788	67689098
	0,15	54283325	53799972
	0,1	36150083	36013366
	0,05	18384338	16941313
	0,025	7038792	8455489
Curve 2 2 juni 2021	0,2	65886229	76616334
	0,15	51381527	56213855
	0,1	31389951	35335056
	0,05	16356881	15433696
	0,025	6909782	8036850

Met behulp van het programma Statgraphics werd aangetoond dat er ook voor de ijklijn in matrix een sterk lineair verband is tussen beide variabelen en dat er geen significant verschil bestaat tussen beide ijklijnen ('Comparison of regression Lines'; Figuur 19). Bijgevolg werd gedurende de verdere validatie gebruik gemaakt van een ijklijn in solvent.

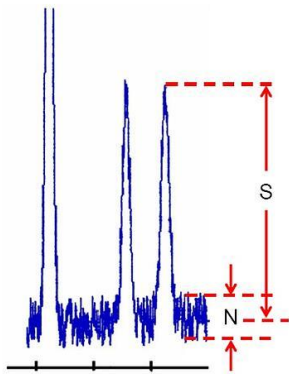


Figuur 19: Vergelijking van de regressie lijnen van een ijklijn in solvent (roos) en een ijklijn in matrix (blauw). Dit werd behaald door Statgraphics

4.2.3. Kwantificatielimiet (LOQ) en detectielimiet (LOD)

De kwantificatielimiet of Limit of Quantification (LOQ) wordt gedefinieerd als de laagste concentratie van een component in het monster die met een bepaalde precisie en juistheid met de analysemethode gekwantificeerd kan worden, met andere woorden waarvan de meetwaarde nog met een bepaalde (on)zekerheid kan worden vastgesteld. In tegenstelling tot de detectielimiet is de kwantificatielimiet een kwantitatief criterium. De LOQ wordt gelijkgesteld aan de concentratie van een component in een monster welke resulteert in een signaal/ruisverhouding van 6.

De detectielimiet of Limit of Detection (LOD) daarentegen is de laagste concentratie van de component in het monster die met een bepaalde statistische waarschijnlijkheid met de analysemethode aangetoond kan worden, met andere woorden waarvan de aanwezigheid nog met een bepaalde (on)zekerheid kan worden vastgesteld. Het is bijgevolg een kwalitatief criterium. De LOD wordt gelijkgesteld aan de concentratie van een component in een monster welke resulteert in een signaal/ruisverhouding van 3 (Separation Science HPLC Solutions).



Figuur 20: Signaal-ruis verhouding (Separation Science HPLC Solutions)

De LOQ en LOD worden dus bepaald op basis van de signaal/ruisverhouding (S/N) zoals weergegeven in Figuur 20. Hiervoor werd aan 6 monsters die geen vitamine B8 bevatten een hoeveelheid standaardstockoplossing toegevoegd om een uiteindelijke concentratie van $0,025 \mu\text{g/ml}$ te bekomen in het extract. Na analyse bedroeg de signaal/ruisverhouding gemiddeld 9,289 voor het gespikete voedingssupplement en 8,639 voor de gespikete zuigelingenmelk.

Hieruit kan berekend worden dat het gehalte aan vitamine B8 in een staal, dat zou leiden tot een $S/N = 6$ bedraagt $0,018 \mu\text{g/ml}$. Bijgevolg wordt de LOQ geschat op $0,018 \mu\text{g/ml}$. Het gehalte aan vitamine B8 in een staal, dat zou leiden tot een $S/N = 3$ bedraagt $0,009 \mu\text{g/ml}$. Bijgevolg wordt de LOD geschat op $0,009 \mu\text{g/ml}$.

Voor een methode zal men niet werken met verschillende detectie- en kwantificatielimieten dus neemt men gewoon de hoogste waarde tussen zuigelingenmelk en voedingssupplementen. Deze waarden verschillen niet veel van elkaar, namelijk slechts één duizendste.

4.2.4. Precisie

De precisie van een analysemethode is de mate van spreiding in de meetresultaten. Deze kan verkregen worden door de methode beschreven uit de norm meerdere malen te herhalen onder vastgelegde condities en dit op hetzelfde staal. Na de metingen zal er sprake zijn van een afwijking die

wordt uitgedrukt als de standaardafwijking: $s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$

De relatieve standaardafwijking wordt dan weer uitgedrukt als: $RSD = \frac{s}{\bar{x}}$

Procentueel wordt dit vaker uitgedrukt omdat dit beter bekend staat als de toevallige fout of random error. $CV = \frac{s}{\bar{x}} * 100$

Voor te werken zal men gebruik maken van de relatieve standaardafwijking wat de standaardafwijking gedeeld door het gemiddelde is. Men kan dit ook procentueel uitdrukken als de variatiecoëfficiënt.

De afwijking op de metingen is een gevolg van toevallige fout en deze zal altijd aanwezig zijn bij welke methode dan ook.

In de validatiemethode die hier gehanteerd wordt moeten voor de precisie de herhaalbaarheid en de reproduceerbaarheid nagegaan worden. Als men spreekt over herhaalbaarheid dienen er herhaalde metingen over een kort tijdsinterval gemeten te worden. In dit geval zal men hier 6 analyses verrichten op dezelfde stalen die meerder malen behandeld werden in identieke omstandigheden.

De herhaalbaarheid, ook wel within-run precisie genoemd is dus de precisie als men metingen gaat herhalen in min of meer dezelfde omstandigheden in een korte tijdsperiode. Men zal dus bijvoorbeeld op een paar dagen tijd 20 metingen gaan doen onder exact dezelfde omstandigheden. Men zal niet zomaar eender welk staal kunnen gebruiken voor de herhaalbaarheid omdat hier specifieke voorwaarden aan verbonden zijn. Het staal moet representatief zijn voor de te testen methode bijvoorbeeld een SRM, een routinemonster of een blanco monster dat identiek is op vlak van de matrix. Hier zal men gebruik maken van een SRM. Ook hier dient men dus minstens 6 analyses uit te voeren onder dus herhaalbaarheidsomstandigheden.

Bij reproduceerbaarheid worden metingen verricht op minstens 3 verschillende dagen. Deze metingen mogen niet binnen een kort tijdsinterval. De reproduceerbaarheid wordt dan weer de between-run precisie genoemd en hier zal het dus gaan over de precisie tussen opeenvolgende metingen. Hierbij gaan de metingen onder reproduceerbare omstandigheden worden uitgevoerd, alleen zal het hier gaan over verschillende dagen, verschillende laboranten, verschillende toestel, enzovoort in tegenstelling tot herhaalbaarheid.

Ook zullen hier de stalen van de supplementen en de zuigelingenmelk op verschillende dagen dienen gemeten te worden maar stalen blijven maar 1 dag bruikbaar dus zal men elke keer opnieuw een staal dienen op te zuiveren. Een andere laborant van de afdeling dient de opzuivering uitvoeren. Een ander toestel is helaas niet mogelijk aangezien er maar 1 HPLC met een post-kolom beschikbaar is in het laboratorium van Tervuren.

De methode dient voor het FLVVT gevalideerd te zijn voor zowel voedingssupplementen als zuigelingenmelk wat betekent dat voor de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van beide een SRM dient meegenomen te worden evenals een staal van gemiddelde concentratie die vaak binnenkomen voor analyses. Bij voedingssupplementen maakt men dus gebruik een staal met een

concentratie van 14 µg/ml als laagste waarde en een SRM met een concentratie van 23,4 µg/ml als hogere concentratie.

Voor zuigelingenvoeding analyseert men een SRM en een staal met concentratie van 0,13 µg/ml en een SRM met een concentratie van 1,89 µg/ml.

Voor de validatie procedure die gevolgd dient te worden binnen het FAVV wordt gebruikt gemaakt van een Excel file genaamd "2014/866/LAB Berekening precisie". Aan de hand hiervan zal men exact de waardes voor %RSD_r, %RSD_{Rw}, de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid in µg/ml. Voor de Horwitz wordt het percentage RSD_{r max} en RSD_{Rw max} bepaald evenals de horrat ratio. Al deze factoren dienen kleiner te zijn dan de maximaal toegelaten waarde.

%RSD_r staat voor de variatiecoëfficiënt ofwel Repeatability Relative Standard Deviation wat zo veel betekend dat herhaalbaarheid relatieve standaard afwijking. %RSD_{Rw} staat dan weer voor de intralaboratoriumreproduceerbaarheid. De bekomen waarde voor deze functies dienen logischerwijs onder de maximum waarde van deze methode te liggen.

Ook zal men een grubbs test uitvoeren om eventuele outliers te identificeren. Deze zullen bijgevolg uitgesloten worden bij verdere bewerkingen.

Tabel 5: Overzicht van de bekomen % RSD_r en %RSD_{Rw} en hun respectievelijke maximaal toegelaten waarden volgende uit de vergelijking van Horwitz

Zuigelingenvoeding (NIST SRM 1869 – 1,89 µg/ml vitamine B8)			
FLVVT		Horwitz	
%RSD _r	8,47	%RSD _{r max}	9,69
%RSD _{Rw}	10,48	%RSD _{Rw max}	14,54

Zuigelingsmelk (staal 21020376- 0,13 µg/ml vitamine B8)			
FLVVT		Horwitz	
%RSD _r	4,83	%RSD _{r max}	14,50
%RSD _{Rw}	14,87	%RSD _{Rw max}	21,75

Voedingssupplement (NIST SRM 3280 – 23,4 µg/ml vitamine B8)			
FLVVT		Horwitz	
%RSD _r	4,71	%RSD _{r max}	6,64
%RSD _{Rw}	5,76	%RSD _{Rw max}	9,95

Voedingssupplement (staal 20421470 – 13,998 µg/ml vitamine B8)			
FLVVT		Horwitz	
%RSD _r	5,63	%RSD _{r max}	7,17
%RSD _{Rw}	9,14	%RSD _{Rw max}	10,76

4.2.5. Juistheid

De juistheid van een methode is de mate waarin het gemiddelde van een reeks meetwaarde overeenkomt met de werkelijke waarde. Men zal deze test voor de validatie dus alleen met een SRM kunnen doen omdat dit het enige staal is waarvan men de werkelijke waarde aan aanwezige biotine heeft.

Ook hier zal een afwijking aanwezig zijn, deze wordt vastgesteld als de systematische fout of ook bias genoemd en betreft op het gemiddelde min de werkelijke waarde. Men zal dit ook procentueel kunnen uitdrukken door de systematisch te delen door de werkelijke waarde en vervolgens te vermenigvuldigen met 100:
$$bias = \frac{(\bar{x} - target) * 100}{target}$$

Het gaat hier dan over bijvoorbeeld over instrumentele fouten en methodefouten.

Net als bij de herhaalbaarheid dient men hier te werken met een SRM onder herhaalbaarheidscondities.

De juistheid van een SRM of van een staal moet tussen de 70% en 120% liggen van de werkelijke waarde en wordt berekend door
$$\frac{\bar{x}}{target} * 100$$

Tabel 6: Overzicht parameters Juistheid

Staal	Bias	Juistheid
Zuigelingenmelk 0,13 µg/ml	15,38	115 %
Zuigelingenmelk SRM	2,64	102 %
Voedingssupplement 13,988 µg/ml	3,989	96 %
Voedingssupplement SRM	3,034	103 %

Zoals te zien is in Tabel 6 liggen de bekomen waarden voor de juistheid allemaal binnen de vooropgestelde marge gaande van 70 tot 120 %.

4.2.6. Specificiteit

De specificiteit is de mate waarin de gezochte component ondubbelzinnig kan bepaald worden en in welke mate alleen biotine wordt gedetecteerd. Dit kan bijvoorbeeld onderzocht worden door een staal te spiken of zelf onzuiverheden te gaan toevoegen.

De specificiteit wordt hier niet onderzocht. De HPLC scheiding combineert met een fluorescentiemeting van een specifiek complex, gevormd tussen biotine en avidine. Dit complex wordt gevormd door de post-kolom die aan de HPLC gekoppeld wordt. Dit gecombineerd met de keuze van de stationaire en mobiele fase is doorslaggevend om te kunnen besluiten dat de methode specifiek is.

Een bijkomende factor is dat de methode werkt met een fluorescentiedetector. Deze zorgt ook voor een nog hogere specificiteit omdat niet veel stoffen fluorescent zijn en al zeker niet omdat er geen reactie zal plaatsvinden met het fluorescent reagens avidine.

4.2.7. Selectiviteit

De selectiviteit heeft ook te maken met de chromatogram net als de selectiviteit alleen gaat het hier niet over het feit dat men nauwkeurig biotine zal kunnen isoleren uit een staal maar wel over de mate van scheiding. Dit betekent dat een methode een hoge selectiviteit heeft als de gevormde pieken goed en zonder twijfel van elkaar gescheiden zijn. De gebruikte methode is specifiek, dit betekent automatisch ook dat ze selectief is.

4.2.8. Robuustheid

Onder robuustheid van een methode wordt de ongevoeligheid van het analyseresultaat verstaan voor kleine variaties in omstandigheden en uitvoering, zoals deze in de praktijk kunnen voorkomen.

Meestal wordt de robuustheid geëvalueerd aan de hand van langetermijnsvalidatie (Shewart-controlekaarten). Aangezien er momenteel onvoldoende resultaten van routineanalyses beschikbaar zijn, zullen deze parameters in de toekomst geëvalueerd worden.

4.2.9. Samenvatting

Validatieparameter	Criterium	Behaald?
Lineariteit en werkgebied	Minimaal 5 kalibratiepunten Voldoen aan: Lack-of-fit test en Comparison of regression lines	OK Kwaticatie obv curve in solvent
Precisie (%RSD _r en RSD _{RW})	RSD _{RW} < RSD _{RW} max (volgens vergelijking van Horwitz)	Zuigelingenvoeding SRM: (RSD _{RW}) 10,48 < 14,54 (RSD _{RW} max) Voedingssupplement SRM: (RSD _{RW}) 5,76 < 9,95 (RSD _{RW} max)
Juistheid/terugvinding	Juistheid tussen 70 en 120%	Zuigelingenvoeding SRM: 102 % Voedingssupplement SRM: 103 %.
Kwantificatielimiet (LOQ)	S/N = 6	Zuigelingenvoeding: 0,018 µg/ml Voedingssupplement: 0,017 µg/ml
Detectielimiet (LOD)	S/N= 3	Zuigelingenvoeding: 0,009 µg/ml Voedingssupplement: 0,008 µg/ml
Selectiviteit/specificiteit	Kenmerken analyse	OK

5. Besluit

Alle validatieparameters, opgelegd door het FAVV, werden geanalyseerd en bekeken. De resultaten tonen aan dat deze methode voldoet aan de criteria die behaald dienen te worden. Dit geldt niet alleen voor de opgelegde waarde van het FAVV uit maar ook de EN-norm 15607. Hier stonden namelijk de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid bij zuigelingmelk in vermeld en deze kwamen overeen. Met het afronden van de validatie staat de methode helemaal op punt om routinematig te kunnen gebruikt worden bij stalen waarop vitamine B8 bepaald dient te worden. De meetonzekerheid dient nog bepaald te worden met de beschikbare gegevens uit het validatiedossier.

Vervolgens zal deze methode worden voorgelegd aan de Belgische Accreditatie-instelling (BELAC). Wanneer de methode dan ge-audit wordt, is de volledige implementatie van de kwantitatieve bepaling van vitamine B8 in voedingssupplementen en zuigelingenvoeding met behulp van HPLC helemaal een feit en kan de microbiologische methode definitief verworpen worden, gezien deze ondertussen achterhaald is.

6. Bibliografie

(2002). *Richtlijn 2002/46/EG*.

vitamine b8. (sd). Opgehaald van Vitamine-info: <https://www.vitamine-info.nl/alle-vitamines-en-mineralen-op-een-rij/vitamine-b8/>

accreditatie. (2019, Juni 21). Opgehaald van Economie fgov: <https://economie.fgov.be/nl/themas/kwaliteit-veiligheid/accreditatie>

avidin-biotin-interaction. (sd). Opgehaald van thermofisher: <https://www.thermofisher.com/be/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/avidin-biotin-interaction.html>

biotine. (sd). Opgehaald van voedingscentrum: <https://www.voedingscentrum.nl/encyclopedie/biotine.aspx>

biotine. (sd). Opgehaald van s ortho health foundation: <https://www.sohf.nl/nutrient/biotine>

Bratthauer, G. L. (2010). The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods. *Methods in molecular biology*, 257-70. doi:10.1007/978-1-59745-324-0_26

De Henauw, S. (sd). Handboek voeding.

De Smet, S. (2010). *Ontwikkeling van een HPLC-MS methode voor de bepaling van antioxidanten in natuurproducten*. Universiteit Gent. Opgehaald van https://libstore.ugent.be/fulltxt/RUG01/001/458/661/RUG01-001458661_2011_0001_AC.pdf

DG Laboratoria. (2020). *Procedure Validatie*.

Dolan, J. (2016). *How Does It Work? Part V: Fluorescence Detectors*. Opgehaald van <https://www.chromatographyonline.com/view/how-does-it-work-part-v-fluorescence-detectors>

Enterococcus-faecalis. (sd). Opgeroepen op 2021, van Micropia: <https://www.micropia.nl/nl/ontdek/microbiologie/Enterococcus-faecalis/>

FLVVT. (2009). *Bepaling van biotine*. Tervuren. Opgeroepen op 2021

Hinshaw, J. V. (2015, November 1). What Is “Dead” Volume and Why Should Chromatographers Worry About It? *LCGC North America*, 850-855. Opgehaald van <https://www.chromatographyonline.com/view/what-dead-volume-and-why-should-chromatographers-worry-about-it>

Horwitz, W., & Albert, R. (2006). The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. *Journal of AOAC International*, 1095-109. Opgehaald van <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16915851/>

HPLC separations modes. (sd). Opgehaald van Waters: https://www.waters.com/waters/en_US/HPLC-Separation-Modes/nav.htm?cid=10049076&locale=en_US

ISO. (2006). *SO 3534-1*. ISO. Opgehaald van <https://www.iso.org/standard/40145.html>

ISO-IEC-17025. (sd). Opgehaald van NBN: <https://www.nbn.be/nl/ISO-IEC-17025>

Jain, A., & Cheng, K. (2016). The Principles and Applications of Avidin-Based Nanoparticles in Drug Delivery and Diagnosis. *J Control Release*, 27-40. doi:10.1016/j.jconrel.2016.11.016

LiChrospher® 100 RP-18 endcapped (5 µm) LiChroCART® 250-4. (sd). Opgehaald van Merck millipore: https://www.merckmillipore.com/BE/fr/product/LiChrospher-100-RP-18-endcapped-5-m-LiChroCART-250-4,MDA_CHEM-150838?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F

Nielsen, S. S. (2017). *Food analysis (5th ed.)*. Springer International Publishing.

Separation Science HPLC Solutions. (sd). *How to Determine Signal-to-Noise Ratio. Part 3*. Opgehaald van blog.sepscience.com: <https://blog.sepscience.com/liquidchromatography/hplc-solutions-124-how-to-determine-signal-to-noise-ratio.-part-3>

(2020). *Validatieonderzoek chemische methode buiten beschikking*. Opgeroepen op 2021

vitamine B8. (sd). Opgehaald van [vitamine-info](http://www.vitamine-info.nl): <https://www.vitamine-info.nl/alle-vitamines-en-mineralen-op-een-rij/vitamine-b8/>

(2016). *Voedingsaanbevelingen voor België*. Health Belgium. Opgeroepen op 2021, van https://www.health.belgium.be/sites/default/files/uploads/fields/fpshealth_theme_file/9285_voedingsaanbev_16122016_a5.pdf

Zhang, D., Sadikin, S., Redkar, S., & Inloes, R. (2011, Mei 1). Ghost Peak Investigation in a Reversed-Phase Gradient LC System. *LCGC North America*, pp. 394-400. Opgehaald van <https://www.chromatographyonline.com/view/ghost-peak-investigation-reversed-phase-gradient-lc-system>

Dolan, J. (2016). *How Does It Work? Part V: Fluorescence Detectors*. Opgehaald van <https://www.chromatographyonline.com/view/how-does-it-work-part-v-fluorescence-detectors>

7. Bijlagen

A: Excel file voor precisie van zuigelingenmelk SRM

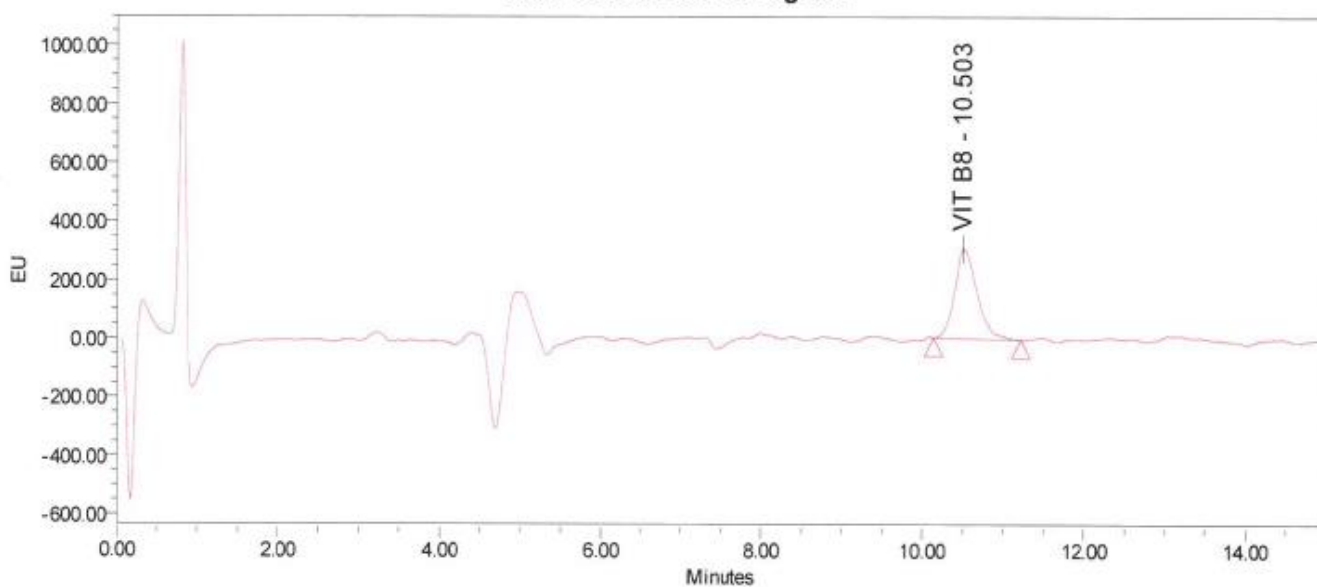
5	Concentratieniveau/Niveau de concentration:	1,83	(+/- 0,24)	Eenheid/Unité:	µg/ml								
6				Gehalte =	0,0000183 g/g								
7	- Vervuldig de algemene gegevens in de daartoe voorziene velden/Complétez les données dans les champs prévus			%RSD _{repe} =	9,69 %								
8	- Vul de waarden van de meetreeksen in in de daartoe voorziene velden/Remplir les valeurs des séries dans les champs prévus			%RSD _{betw} =	14,54 %								
9	- Herhaalbaarheid, %RSD _r , reproduceerbaarheid en %RSD _B worden automatisch berekend volgens de formules van intermediaire precisie en weergegeven in de paars gekleurde velden			HorRat =	0,72 OK								
10	- Herhaalbaarheid, %RSD _r , reproductibilité et RSD _B sont calculées automatiquement selon les formules de fidélité intermédiaire et sont reproduites dans les champs violets				tussen 0,5 en 2,07								
11													
12	Datum:	6-5-2021	11-5-2021	26-5-2021	28-5-2021								
13	Uitvoerder:	J. Cornelis	J. Cornelis	J. Cornelis	J. Cornelis								
14	Apparaatnr:	HPLC keten 13	HPLC keten 13	HPLC keten 13	HPLC keten 13								
15													
16													
17		Reeks/Série 1	Reeks/Série 2	Reeks/Série 3	Reeks/Série 4	Reeks/Série 5	Reeks/Série 6	Reeks/Série 7	Reeks/Série 8	Reeks/Série 9	Reeks/Série 10	Reeks/Série 11	Reeks/Série 12
18	1	1,734	1,656	1,875	2,198	2,198							
19	2	1,996	2,013	1,839	2,028	2,028							
20	3	2,231	2,124	1,985	2,130	2,130							
21	4	1,767	1,790	1,863	2,230	2,230							
22	5	1,637	1,516	1,814	2,154	2,154							
23	6	1,880	1,995	1,978	2,147	2,147							
24	7												
25	8												
26	9												
27	10												
28	<div style="background-color: #f08080; padding: 5px; display: inline-block;">Reset</div>												
29	som van som van (u-gemiddelde)/somme des sommes des (u-moyenne)												
30	totaal aantal resultaten/nombre total de résultats =												
31	totale som van de resultaten/somme totale des résultats =												
32	totaal gemiddelde/moyenne totale =												
33	som/somme (n _i) - p =												
34	variantie herhaalbaarheid/variance de répétabilité s _r ² =												
35	%RSD _r =												
36	gemiddeld aantal per reeks/ nombre moyen par série =												
37	variantie tussen reeksen/variance entre séries =												
38	variantie intralabre produceerbaarheid/variance reproductibilité intrala												
39	%RSD _B =												
40	Herhaalbaarheid/Répetabilité t(2,8 * s _r) =												
41	Reproduceerbaarheid/Réproductibilité R(2,8 * s _B) =												
42													
				Aantal resultaten / Nombre de résultats (n)									
				Reeks/Série 1	Reeks/Série 2	Reeks/Série 3	Reeks/Série 4	Reeks/Série 5	Reeks/Série 6	Reeks/Série 7	Reeks/Série 8	Reeks/Série 9	Reeks/Série 10
				6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
				Reeks/Série 1	Reeks/Série 2	Reeks/Série 3	Reeks/Série 4	Reeks/Série 5	Reeks/Série 6	Reeks/Série 7	Reeks/Série 8	Reeks/Série 9	Reeks/Série 10
				11,31	11,09	11,35	12,89						
				1,88	1,85	1,89	2,15	0,00	0,01	0,00	0,04		
				#VERY!									
				Somme totale des résultats (u)									
				(gem. reekse - gem. reekse) / (moyenne reekse - moyenne reekse) ²									
				Som van (u-gem) ² / Somme de (u-moy) ²	0,22	0,28	0,03	0,02					

B: Rapport standard biotine 0,1 µg/ml

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	STD Bio 0.1 µg/ml	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	VIT B8_21_04_28
Vial:	26	Acq. Method Set:	VIT B8
Injection #:	1	Processing Method:	VIT B8
Injection Volume:	30.00 µl	Channel Name:	490_520
Run Time:	15.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2475ChA ex490/em520
Date Acquired:	28/04/2021 9:25:55 CEST		
Date Processed:	28/04/2021 14:23:12 CEST		

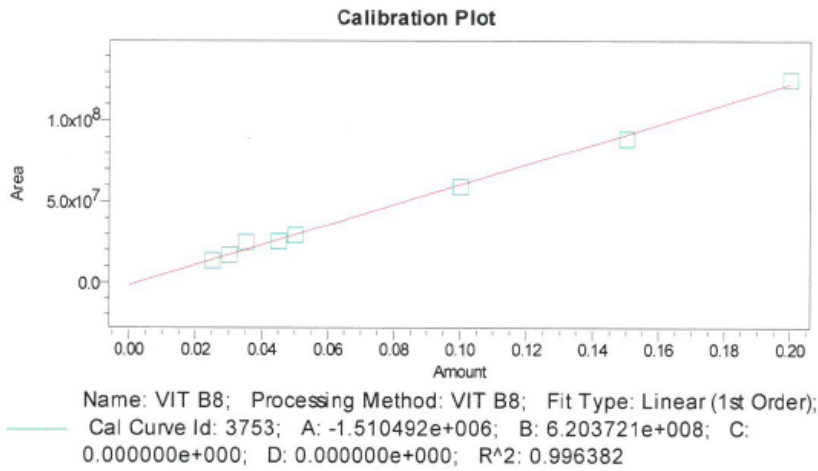
Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

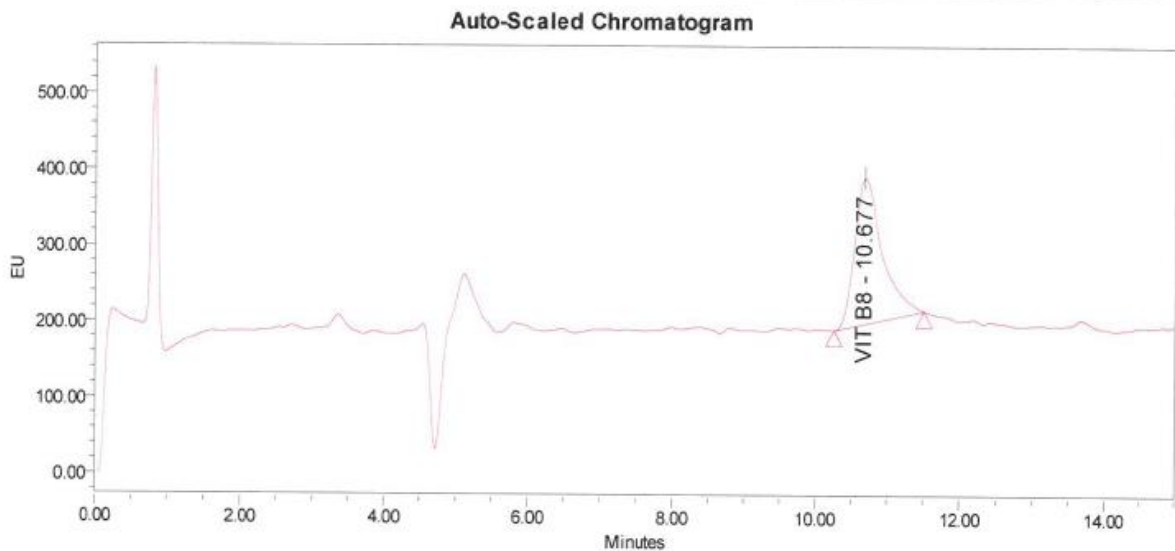
Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1 VIT B8	10.503	58871146	3071691	0.100	µg/ml

C: Rapport kalibratiecurve en Standaard biotine in matrix, 0,15 µg/ml



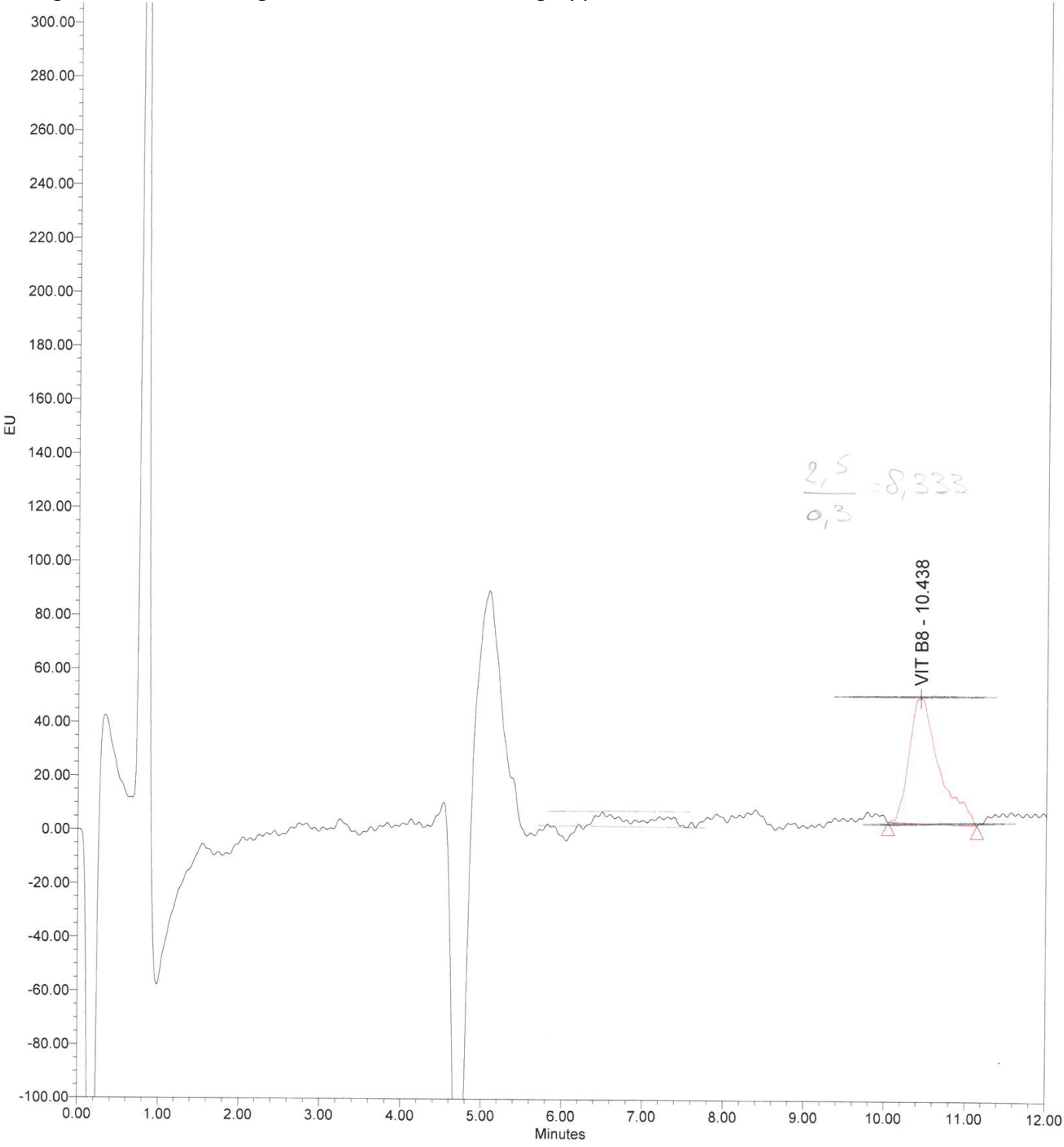
Vit B8

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	STD Bio matrix 0.15 µg/ml	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	VIT B8_21_05_04
Vial:	35	Acq. Method Set:	VIT B8
Injection #:	1	Processing Method:	VIT B8
Injection Volume:	45.00 µl	Channel Name:	490_520
Run Time:	15.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2475ChA ex490/em520
Date Acquired:	4/05/2021 11:16:33 CEST		
Date Processed:	4/05/2021 14:49:11 CEST		



Peak Results						
	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	VIT B8	10.677	51381527	1916553	0.144	µg/ml

D : Signaal ruis verhouding zelf berekend voor voedingsupplement



E : Statgraphics rapport voor voedingsupplement

Simple Regression - Area_S vs. Conc_S

Regression Analysis - Linear model: $Y = a + b \cdot X$

Dependent variable: Area_S
Independent variable: Conc_S

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	-32365,8	869090,0	-0,037241	0,9712
Slope	3,51687E8	7,06671E6	49,7667	0,0000

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	5,07103E15	1	5,07103E15	2476,73	0,0000
Residual	1,63798E13	8	2,04747E12		
Total (Corr.)	5,08741E15	9			

Correlation Coefficient = 0,998389
R-squared = 99,678 percent
Standard Error of Est. = 1,4309E6

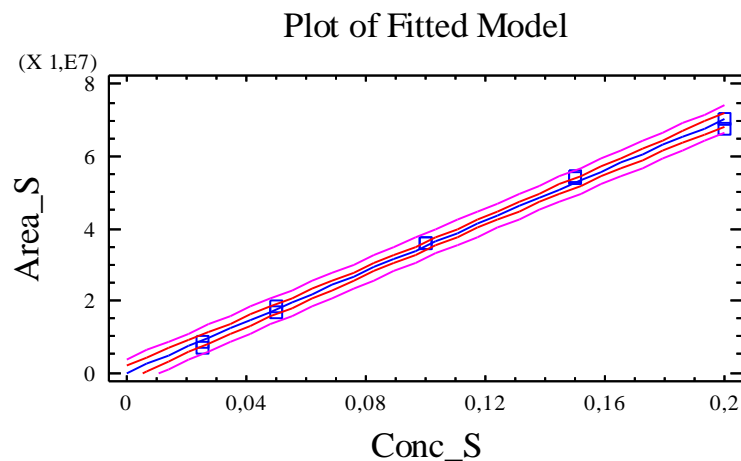
The StatAdvisor

The output shows the results of fitting a linear model to describe the relationship between Area_S and Conc_S. The equation of the fitted model is

$$\text{Area}_S = -32365,8 + 3,51687E8 \cdot \text{Conc}_S$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between Area_S and Conc_S at the 99% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 99,678% of the variability in Area_S. The correlation coefficient equals 0,998389, indicating a relatively strong relationship between the variables. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 1,4309E6. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Forecasts option from the text menu.



Analysis of Variance with Lack-of-Fit

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	5,07103E15	1	5,07103E15	2476,73	0,0000
Residual	1,63798E13	8	2,04747E12		
Lack-of-Fit	1,10772E13	3	3,6924E12	3,48	0,1064
Pure Error	5,30257E12	5	1,06051E12		
Total (Corr.)	5,08741E15	9			

The StatAdvisor

The lack of fit test is designed to determine whether the selected model is adequate to describe the observed data, or whether a more complicated model should be used. The test is performed by comparing the variability of the current model residuals to the variability between observations at replicate values of the independent variable X. Since the P-value for lack-of-fit in the ANOVA table is greater or equal to 0.10, the model appears to be adequate for the observed data.

Simple Regression - Area_M vs. Conc_M

Regression Analysis - Linear model: $Y = a + b \cdot X$

Dependent variable: Area_M
Independent variable: Conc_M

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	-2,31907E6	1,95666E6	-1,18522	0,2699
Slope	3,68334E8	1,59099E7	23,1513	0,0000

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	5,56247E15	1	5,56247E15	535,98	0,0000
Residual	8,30248E13	8	1,03781E13		
Total (Corr.)	5,6455E15	9			

Correlation Coefficient = 0,99262
R-squared = 98,5294 percent
Standard Error of Est. = 3,22151E6

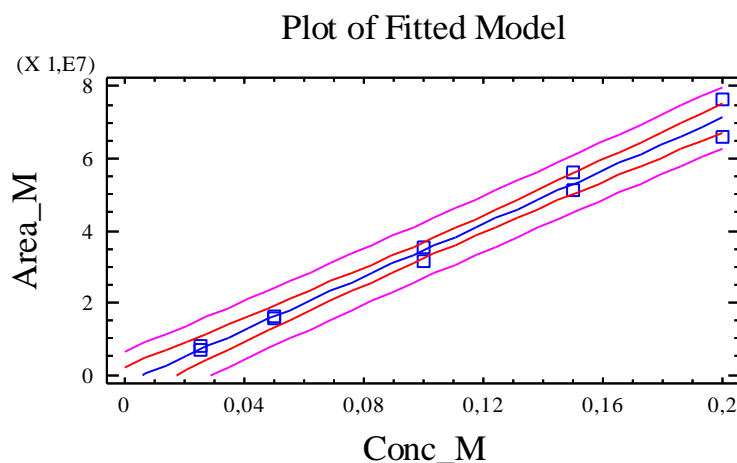
The StatAdvisor

The output shows the results of fitting a linear model to describe the relationship between Area_M and Conc_M. The equation of the fitted model is

$$\text{Area}_M = -2,31907E6 + 3,68334E8 \cdot \text{Conc}_M$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between Area_M and Conc_M at the 99% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 98,5294% of the variability in Area_M. The correlation coefficient equals 0,99262, indicating a relatively strong relationship between the variables. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 3,22151E6. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Forecasts option from the text menu.



Analysis of Variance with Lack-of-Fit

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	5,56247E15	1	5,56247E15	535,98	0,0000
Residual	8,30248E13	8	1,03781E13		
Lack-of-Fit	4,9383E12	3	1,6461E12	0,11	0,9534
Pure Error	7,80865E13	5	1,56173E13		
Total (Corr.)	5,6455E15	9			

The StatAdvisor

The lack of fit test is designed to determine whether the selected model is adequate to describe the observed data, or whether a more complicated model should be used. The test is performed by comparing the variability of the current model residuals to the variability between observations at replicate values of the independent variable X. Since the P-value for lack-of-fit in the ANOVA table is greater or equal to 0.10, the model appears to be adequate for the observed data.

Comparison of Regression Lines - Area versus Conc by S_M

Comparison of Regression Lines

Dependent variable: Area
 Independent variable: Conc
 Level codes: S_M

Number of complete cases: 20
 Number of regression lines: 2

Multiple Regression Analysis

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
CONSTANT	-3,25007E6	2,01068E6	-1,61641	0,1255
Conc	3,81348E8	1,63491E7	23,3253	0,0000
S_M=Solvent	3,86393E6	2,84352E6	1,35885	0,1930
Conc*S_M=Solvent	-3,37966E7	2,31211E7	-1,46172	0,1632

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	1,09154E16	3	3,63847E15	332,01	0,0000
Residual	1,75345E14	16	1,0959E13		
Total (Corr.)	1,10908E16	19			

R-Squared = 98,419 percent
 R-Squared (adjusted for d.f.) = 98,1226 percent
 Standard Error of Est. = 3,31044E6
 Mean absolute error = 1,874E6
 Durbin-Watson statistic = 1,30917

Residual Analysis

	Estimation	Validation
n	20	
MSE	1,0959E13	
MAE	1,874E6	
MAPE	5,5829	
ME	-1,86265E-9	
MPE	0,252517	

The StatAdvisor

The output shows the results of fitting a linear regression model to describe the relationship between Area, Conc and S_M. The equation of the fitted model is

$$\begin{aligned} \text{Area} = & -3,25007E6 + 3,81348E8 * \text{Conc} \\ & + 3,86393E6 * (\text{S_M}=\text{Solvent}) \\ & - 3,37966E7 * \text{Conc} * (\text{S_M}=\text{Solvent}) \end{aligned}$$

where the terms similar to S_M=Solvent are indicator variables which take the value 1 if true and 0 if false. This corresponds to 2 separate lines, one for each value of S_M. For example, when S_M=Matrix, the model reduces to

$$\text{Area} = -3,25007E6 + 3,81348E8 * \text{Conc}$$

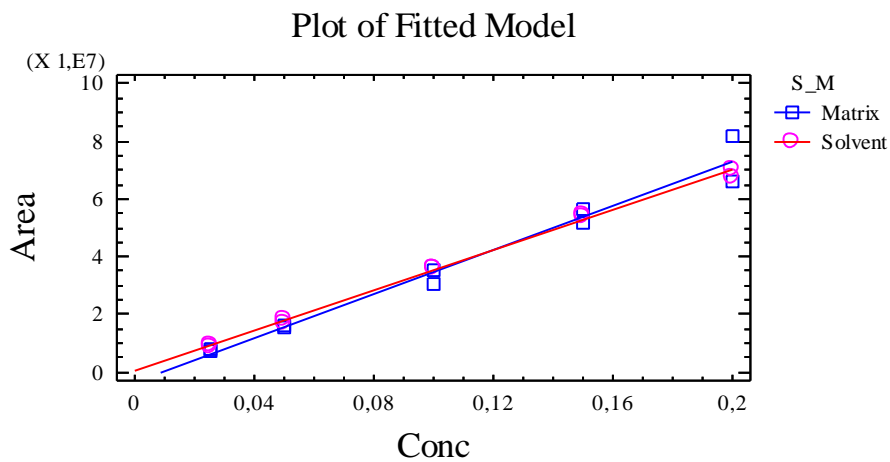
When S_M=Solvent, the model reduces to

$$\text{Area} = 613861,0 + 3,47551E8 * \text{Conc}$$

Because the P-value in the ANOVA table is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between the variables at the

99% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 98,419% of the variability in Area. The adjusted R-Squared statistic, which is more suitable for comparing models with different numbers of independent variables, is 98,1226%. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 3,31044E6. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Forecasts option from the text menu. The mean absolute error (MAE) of 1,874E6 is the average value of the residuals. The Durbin-Watson (DW) statistic tests the residuals to determine if there is any significant correlation based on the order in which they occur in your data file. Because the DW value is less than 1.4, there may be some indication of serial correlation. Plot the residuals versus row order to see if there is any pattern which can be seen. To test for statistically significant differences between the intercepts and/or slopes, select Conditional Sums of Squares from the list of Tabular Options.



Further ANOVA for Variables in the Order Fitted

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Conc	1,08915E16	1	1,08915E16	993,84	0,0000
Intercepts	4,9703E11	1	4,9703E11	0,05	0,8340
Slopes	2,34154E13	1	2,34154E13	2,14	0,1632
Model	1,09154E16	3			

The StatAdvisor

This table allows you to test the statistical significance of the terms in the model. Because the P-value for the slopes is greater than or equal to 0.10, there are not statistically significant differences among the slopes for the various values of S_M at the 90% or higher confidence level. You can force equal slopes by setting the appropriate checkbox on the Analysis Options dialog box. Because the P-value for the intercepts is greater than or equal to 0.10, there are not statistically significant differences among the intercepts for the various values of S_M at the 90% or higher confidence level. You can force equal intercepts by setting the appropriate checkbox on the Analysis Options dialog box.