

УДК: 543.433:543.38:543.05

СРАВНЕНИЕ ТОЧНОСТИ МЕТОДА АБСОЛЮТНОЙ ГРАДУИРОВКИ И МОДИФИЦИРОВАННОГО МЕТОДА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫХ СТАНДАРТНЫХ ДОБАВОК НА ПРИМЕРЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ 3-(2,2,2-ТРИМЕТИЛГИДРАЗИНИЙ)-ПРОПИОНОВОЙ КИСЛОТЫ В МОЧЕ В УСЛОВИЯХ НЕЛИНЕЙНОСТИ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ (ЭЛЕКТРОСПРЕЙ)

**Т.Е. Морозова¹, Г.В. Каракашев¹, П.Н. Сорокоумов¹,
Е.И. Савельева¹, И.Г. Зенкевич²**

¹ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены,
профпатологии и экологии человека» ФМБА России
188663 Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский,
ст. Капитолово, корп. № 93
t-morozova07@yandex.ru

²Санкт-Петербургский государственный университет, химический факультет 198504
С-Петербург, Университетский пр. 26

Поступила в редакцию 16 декабря 2012 г.,
после исправлений – 14 марта 2013 г.

На примере ВЭЖХ-МС определения 3-(2,2,2-триметилгидразиний)пропионовой кислоты (ТНР) в моче (способ ионизации электроспрей) показано, что применение модифицированного метода последовательных стандартных добавок, включающего экстраполяцию результатов на бесконечно большую величину добавки, позволяет получать результаты, характеризующиеся большей точностью, чем при использовании нелинейной абсолютной градуировки.

Ключевые слова: 3-(2,2,2-триметилгидразиний)пропионовая кислота, ВЭЖХ-МС анализ, нелинейность детектирования, метод последовательных стандартных добавок, нелинейная абсолютная градуировка.

Морозова Татьяна Евгеньевна – младший научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИГПЭЧ» ФМБА России.

Область научных интересов: ВЭЖХ-МС анализ биологических образцов.

Автор/соавтор четырех публикаций.

Каракашев Георгий Васильевич – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИГПЭЧ» ФМБА России.

Область научных интересов: хромато-масс-спектрометрия, ВЭЖХ-МС анализ биологических образцов, фармакокинетические исследования.

Автор/соавтор пятнадцати публикаций.

Сорокоумов Павел Николаевич – инженер лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИГПЭЧ» ФМБА России.

Область научных интересов: хромато-масс-спектрометрия, фармакокинетические исследования.

Вторая публикация.

Савельева Елена Игоревна – д.х.н., зав. лабораторией аналитической токсикологии ФГУП «НИИГПЭЧ» ФМБА России.

Область научных интересов: хромато-масс-спектрометрия, анализ биологических образцов, фармакокинетические исследования.

Автор/соавтор более 50 публикаций.

Зенкевич Игорь Георгиевич – профессор, д.х.н., зав. лабораторией газовой хроматографии химического факультета СПбГУ.

Область научных интересов: хроматографические методы анализа, идентификация неизвестных соединений.

Автор/соавтор более 550 публикаций.

Введение

В настоящее время для анализа многих лекарственных препаратов в биологических жидкостях часто используют метод ВЭЖХ-МС с таким способом ионизации как электроспрей (ESI). Однако его особенностью является невысокая воспроизводимость результатов количественных определений, (особенно «day-to-day») [1-5], в том числе связанная с нелинейностью детектирования. В таких случаях для количественного определения содержания аналитов в пробах часто используют такой прием как нелинейную абсолютную градуировку [6, 7]. Для частичной компенсации нелинейности детектирования предложено использовать дополнительный внутренний стандарт [8], выбор которого в условиях ESI достаточно сложен. С другой стороны, показано [5], что метод последовательных стандартных добавок с экстраполяцией результатов на нулевую или бесконечно большую величины добавок позволяет получать приемлемые по точности результаты в условиях нелинейности детектирования.

3-(2,2,2-Триметилгидразиний)пропионовая кислота (в литературе чаще встречается название «пропионат 3-(2,2,2-триметилгидразиния)» $[(\text{CH}_3)_3\text{N}^+-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}]$, ТНР, CAS 86426-17-7) является основной субстанцией ряда фармацевтических препаратов. ТНР блокирует биосинтез карнитина, способствуя накоплению в организме его предшественника – γ -бутиробетаина, улучшающего микроциркуляцию крови в тканях. Препараты на основе ТНР показали хорошие результаты при профилактике и лечении ишемической болезни сердца, с чем связан повышенный интерес к ним в последнее время. Появление серии «вторичных» препаратов (так называемых дженериков) инициировало исследования их биоэквивалентности относительно оригинального препарата ТНР (МилдронатTM) [9].

Применение ВЭЖХ-МС для количественного определения ТНР не требует трудоемкой подготовки проб и позволяет определять следы этого препарата, как в водных растворах, так и непосредственно в биологических жидкостях (моча). Для изучения профиля экскреции ТНР ранее [9, 10] был использован метод абсолютной градуировки.

Интенсивность сигнала, усл. ед.

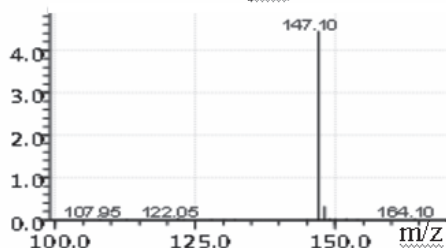


Рис. 1. Масс-спектр ТНР в пробе мочи (способ ионизации – электроспрей)

Настоящая работа посвящена сравнению возможностей методов абсолютной градуировки и последовательных стандартных добавок (ПСД) на примере определения ТНР в условиях нелинейности детектирования. Определение содержания ТНР в моче в условиях его курсового применения позволило получить новые данные о профиле экскреции этого соединения и его накоплении в организме.

Экспериментальная часть

Приготовление градуировочных образцов и подготовка проб мочи к анализу. Пробы мочи центрифугировали при 15000 g в течение 10 минут, после чего отбирали верхний слой. Градуировочные растворы ТНР в моче с концентрациями 10, 50, 100, 400, 500, 600 и 1000 мкг/мл готовили методом последовательных разбавлений. Все пробы непосредственно перед ВЭЖХ-МС анализом разбавляли деионизованной водой в 100 раз.

Условия хроматографического анализа. Анализ проб проводили на жидкостном масс-спектрометре Shimadzu LC-20AB с масс-селективным детектором Shimadzu LCMS-2010EV (ESI). Колонка Supelcosil LC-NH₂ 150 x 3 мм, размер частиц сорбента 3 мкм, элюент: компонент А – 10 мМ раствор формиата аммония в воде, компонент Б – ацетонитрил; изократический режим элюирования: 70 % Б, объемная скорость подвижной фазы через колонку 0.35 см³/мин, температура термостата колонки 40 °С, объем проб (петли) 5 мкл, время удерживания ТНР 7.3 мин.

Регистрацию параметров хроматографических пиков проводили с использованием программного обеспечения LC-MS Solution (версия 3). Число параллельных определений площадей пиков составляло не менее пяти. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали программное обеспечение Microsoft Excel (2003) и Origin (версия 8.1).

На рис. 1 представлен масс-спектр ТНР в пробе мочи (ESI). Единственный интенсивный сигнал с $m/z = 147$ непосредственно соответствует катионам ТНР $[(\text{CH}_3)_3\text{NNHCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}]^+$, так что для детектирования этого соединения его дополнительное протонирование в растворе не требуется.

Результаты и их обсуждение

Метод абсолютной градуировки предполагает предварительную градуировку прибора по серии заранее приготовленных растворов аналита с различными концентрациями. Это подразумевает соответствующие затраты времени на выполнение этой операции и, главное, стабильность параметров режима детектирования во времени. Поскольку при использовании такого способа ионизации как электроспрей существует проблема временной нестабильности режимов ионизации («day-to-day»),

то более предпочтительными представляются методы количественного анализа, не требующие использования градуировочных уравнений с заранее определенными параметрами.

Использование метода последовательных стандартных добавок основано на соотношениях (1):

$$M_{xi} = \frac{\sum m_{добi}}{\frac{S_{x+добi}}{S_x} - 1}, \quad (1)$$

где M_{xi} – количество аналита, определяемое в результате i -й добавки, $\sum m_{добi}$ – суммарное количество стандартной добавки на i -й стадии, $S_{x+добi}$ и S_x – площади пиков определяемого компонента после и до i -й добавки, соответственно.

Если все значения M_{xi} совпадают друг с другом, то такой способ не требует дополнительной обработки результатов за исключением их усреднения. Однако в наиболее сложных случаях (матрицы образцов обладают сорбционными свойствами или в условиях нелинейности детектирования [4, 5, 11]) значения M_{xi} могут быть не равны друг другу, что требует их дополнительной обработки. Известные примеры применения метода ПСД предполагают экстраполяцию результатов на «нулевую» величину добавки ($m_{добi} \rightarrow 0$) с использованием уравнения линейной регрессии:

$$M_{xi} = a \sum m_{добi} + b \quad (2)$$

и, далее, $\lim (M_{xi}) | (m_{добi} \rightarrow \infty) = b$,

где a и b – коэффициенты уравнения линейной регрессии, вычисляемые методом наименьших квадратов.

Примечательно, что в формулу (2) формально не входят величины аналитических сигналов (площади пиков, S), но это означает, что соотношения (1) и (2) должны использоваться только в сочетании друг с другом.

Если необходимо определять не абсолютные количества, а концентрации аналитов, то формулу (1) преобразуют с учетом объема образцов (V):

$$C_{xi} = M_{xi} / V. \quad (3)$$

Систематическая характеристика возможностей и ограничений метода ПСД [4, 5, 11] привела к выявлению его необычного варианта, а именно случаев, которые требуют экстраполяции результатов не на нулевые, а на бесконечно большие величины добавок. Здесь для описания зависимости количества аналита в образце от массы добавки $M_x(m_{доб})$ линейная регрессия (2) неприменима и необходим выбор функции, имеющей предел при ($m_{доб} \rightarrow \infty$). Такому условию отвечает несколько функций, но в работе [11] была выбрана простейшая гиперболическая зависимость

$$M_x = \frac{a}{m_{доб}} + b \quad (4)$$

для которой $\lim (M_{xi}) | (m_{добi} \rightarrow \infty) = b$.

Мерой погрешностей результатов экстраполяции при использовании как уравнения (2), так и соотношения (4), являются стандартные отклонения коэффициентов b .

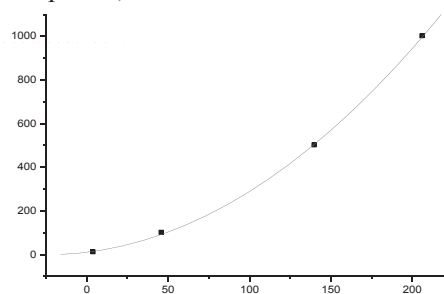
Таким образом, определение содержания целевого аналита (ТНР) в пробах мочи проводили двумя независимыми методами: с использованием нелинейной абсолютной градуировки (типичный вид нелинейного градуировочного графика для ТНР представлен на рис. 2) и модифицированным методом ПСД с экстраполяцией результатов на бесконечно большие величины добавок.

Рис. 2 представлен в координатах «площадь пика (аргумент) – определяемая концентрация ТНР (функция)». Наблюдаемая нелинейная зависимость может быть удовлетворительно аппроксимирована уравнением второго порядка вида $C_x = dS^2 + eS + f$, где $d = 0.019 \pm 0.001$, $e = 0.91 \pm 0.30$, $f = 10.4 \pm 11.1$. В литературе известны примеры линейной аппроксимации аналогичных градуировочных зависимостей для ТНР [10], однако они выявлены для областей значительно меньших концентраций ТНР в пробах и меньших диапазонов их вариаций. В нашем же случае нелинейный градуировочный график охватывает два порядка концентраций ТНР (от 10 до 1000 мкг/мл). Такой диапазон необходим при определении фармакокинетических характеристик ТНР, когда его содержание в биологических жидкостях может варьировать в широких пределах.

Для оценки погрешностей результатов, полученных методом нелинейной абсолютной градуировки, использовали приближенное соотношение $\Delta C_x \approx \Delta dS^2 + \Delta eS + \Delta f$.

Подобный способ количественного анализа достаточно прост и при определении содержания ТНР им можно было бы ограничиться, если бы не отмеченная выше недостаточная воспроизводимость характеристик электроспрея «day-to-day». Это приводит к необходимости регулярной проверки постоянства коэффициентов градуировочного уравнения и, при необходимости, их пересчета. В таких условиях метод ПСД оказывается более предпочтительным. Пример обработки результатов определения содержания ТНР этим методом с

Концентрация, мкг/мл.



Площадь пика, усл. ед.

Рис. 2. Градуировочный график ТНР в диапазоне концентраций 10-1000 мкг/мл (способ ионизации – электроспрей)

Таблица 1

Результаты количественного определения ТНР в моче методом последовательных стандартных добавок с экстраполяцией на бесконечно большие величины добавок

Параметр определений	Концентрация ТНР в растворе, мкг/л		
	50	400	600
$m_{доб1}$, МКГ	200	100	100
$m_{доб2}$, МКГ*	300	200	200
$m_{доб3}$, МКГ	400	300	300
$m_{доб4}$, МКГ	500	-	-
$S_x \pm$ станд. откл.	$(12.0 \pm 0.4) \times 10^6$	$(100.0 \pm 1.7) \times 10^6$	$(145.1 \pm 2,8) \times 10^6$
$S_{x+доб1} \pm$ станд. откл.	$(46.2 \pm 1.1) \times 10^6$	$(114.8 \pm 2,2) \times 10^6$	$(165.1 \pm 1,9) \times 10^6$
$S_{x+доб2} \pm$ станд. откл.	$(63.9 \pm 1.6) \times 10^6$	$(135.5 \pm 2,7) \times 10^6$	$(190.9 \pm 3,6) \times 10^6$
$S_{x+доб3} \pm$ станд. откл.	$(94.9 \pm 1.6) \times 10^6$	$(160,1 \pm 2,7) \times 10^6$	$(215.0 \pm 3,5) \times 10^6$
$S_{x+доб4} \pm$ станд. откл.	$(116.7 \pm 2.3) \times 10^6$	-	-
C_{x1} , мкг/мл**	70.2	671.6	725.5
C_{x2} , мкг/мл**	69.3	563.3	633.6
C_{x3} , мкг/мл**	57.9	499.2	622.7
C_{x4} , мкг/мл**	57.3	-	-
a	$(4.6 \pm 1.9) \times 10^3$	$(24.7 \pm 3.2) \times 10^3$	$(16.0 \pm 2.4) \times 10^3$
b	48.8 ± 6.4	426.7 ± 21.8	562.8 ± 16.3
r	0.86	0,991	0.98
$C_{x,0} \pm$ станд. откл.	49 ± 6	427 ± 22	563 ± 16

Примечания: * – для второй и последующих добавок указано суммарное с предыдущими количество аналитов; ** – значения приведены без погрешностей, поскольку данные результаты можно рассматривать как промежуточные.

экстраполяцией на бесконечно большие величины добавок с использованием уравнений (1) и (4) приведен в табл. 1.

В табл. 1 включены значения $C_{x1} - C_{x3}$ (C_{x4}), определенные по разным величинам добавок. Первое из них всегда оказывается существенно завышенным, а приемлемые по точности результаты соответствуют только экстраполированным величинам.

В табл. 2 сопоставлены некоторые результаты количественного определения ТНР в модельных образцах, полученные как методом нелинейной абсолютной градуировки, так и методом ПСД с экс-

траполяцией результатов на бесконечно большие величины добавок.

Как следует из данных табл. 2, метод ПСД по сравнению с методом абсолютной градуировки дает результаты более близкие к заданным. Относительные погрешности в первом случае составляют всего 4-9 %, тогда как во втором – 9-40 %. Только лишь для наибольшей концентрации 600 мкг/мл результаты определений двумя методами сравнимы по точности. Однако следует еще раз отметить, что большая точность метода ПСД по сравнению с нелинейной абсолютной градуировкой достигается за счет несколько больших затрат времени, что может стать существенным ограничением при необходимости анализа больших серий образцов.

Оба метода были использованы при изучении профиля экскреции ТНР из организма в условиях курсового приема. Из рис. 3, на котором представлен усредненный профиль экскреции ТНР, следует, что фактический диапазон измеряемых концентраций аналита в моче при курсовом приеме терапевтических доз препарата (2500 мг/сутки) составлял 150-350 мкг/мл.

Профиль концентраций ТНР имел характерный для курсового применения пилообразный характер, но график экскреции может быть аппроксимирован логарифмической кривой, которая к последнему

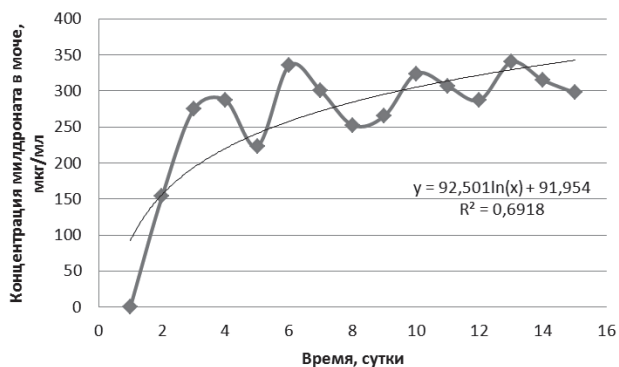


Рис. 3. Графическая иллюстрация нарастания экскреции ТНР с мочой в течение курсового приема

Таблица 2

Пример результатов определения концентраций ТНР в модельных образцах, полученных методом абсолютной градуировки и методом последовательных стандартных добавок (ПСД) с экстраполяцией результатов на бесконечно большие величины добавок

Задано, мкг/мл (C_0)	Найдено методом нелинейной абсолютной градуировки, мкг/мл (C_x)	Относительная погрешность, $(C_x - C_0)/C_0$, %	Найдено методом ПСД, мкг/мл (C_y)	Относительная погрешность, $(C_y - C_0)/C_0$, %
50	30 ± 16	40	49 ± 6	4
400	293 ± 51	27	427 ± 22	9
600	545 ± 76	9	563 ± 16	7

дню приёма приближается к насыщению (рис. 3). Тем не менее, точка насыщения, после которой скорость экскреции аналита достигла бы скорости его поступления, в рамках двухнедельного курса не была достигнута.

Выбор способа экстраполяции результатов, полученных методом последовательных стандартных добавок. Сравнение данных настоящей работы с известными ранее вариантами применения метода ПСД [4, 5, 11] показывает, что, в зависимости от объекта анализа и способа детектирования, существует два принципиально разных способа дополнительной обработки получаемых результатов, а именно: 1) экстраполяция на «нулевые» величины добавок и 2) экстраполяция на бесконечно большие величины добавок. Второй вариант выявлен относительно недавно, и число иллюстрирующих его примеров пока еще невелико. Тем более затруднительно предсказать характер экстраполяции результатов на основании природы образцов.

Тем не менее, математический критерий выбора варианта аппроксимации может быть предложен. При этом вид зависимостей $M_x(m_{доб})$ или $C_x(m_{доб})$ (возрастающие или убывающие) не может являться критерием такого выбора. Более надежным критерием оказывается сопоставление величин отношений $\Delta S_{доб}/C_{доб} = (S_{x+доб} - S_x)/C_{доб}$. Уменьшение этих отношений при переходе от первой к последующим добавкам отвечает экстраполирующей функции $C_x = am_{доб} + b$ и, следовательно, «направлению» экстраполяции $m_{доб} \rightarrow 0$, тогда как их увеличение – функции $C_x = a/m_{доб} + b$ и $m_{доб} \rightarrow \infty$, соответственно. Значения таких отношений могут быть оценены непосредственно по исходным данным до их обработки. Для оценки тенденции их вариаций минимальное число отношений $\Delta S_{доб}/C_{доб}$ может быть равно двум, но для последующего вычисления параметров регрессионных уравнений $C_x = f(m_{доб})$ с использованием метода наименьших квадратов число добавок должно быть не менее трех.

Указанное общее правило можно проиллюстрировать как данными работ [4, 5, 11], так и данными табл. 1 (например для концентрации ТНР 50 мкг/л). Значения четырех отношений $(S_{x+доб} - S_x)/C_{доб}$ равны 17.1, 17.3, 18.2 и 20.9, то есть образуют

возрастающую последовательность. Для второго примера (концентрация ТНР 400 мкг/л) три отношения равны 14.8, 17.8 и 20.0. Следовательно, в обоих случаях требуется экстраполяция результатов на бесконечно большие величины добавок.

Заключение

На примере определения содержания 3-(2,2,2-триметилгидразиний)пропионовой кислоты в моче показано, что в условиях нелинейности детектирования (способ ионизации – электроспрей) метод последовательных стандартных добавок обеспечивает получение более точных результатов по сравнению с методом абсолютной градуировки.

Особенностью применения метода последовательных стандартных добавок в условиях нелинейности детектирования является необходимость дополнительной обработки получаемых результатов, в данном случае их экстраполяция на бесконечно большую величину добавки.

Таким образом, на рассмотренном примере показано, что модифицированный метод последовательных стандартных добавок представляет интерес при работе с биологическими жидкостями для ВЭЖХ-МС определения фармакокинетических характеристик лекарственных препаратов с использованием такого способа ионизации как электроспрей, отличающегося нелинейностью детектирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Screening for drugs in serum by electrospray ionization/collision-induced dissociation and library searching / W. Weinmann et [al.] // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1999. V. 10, № 10. P. 1028-1037.
2. Reproducibility of an HPLC-ESI-MS/MS method for the measurement of stable-isotope enrichment of in vivo-labeled muscle ATP synthase beta subunit / S. Everman et [al.] // [Электронный ресурс]: <http://ukpmc.ac.uk> (дата обращения октябрь 2012 г.).
3. Lien G.W., Chen C.Y., Wang G.S. Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for determining estrogenic chemicals in water by liquid chromatography tandem

- mass spectrometry with chemical derivatization // J. Chromatogr A. 2009. V. 1216. P. 956-966.
4. Зенкевич И.Г., Морозова Т.Е. Особенности ВЭЖХ-МС определения моноэтаноламина в водных растворах методом стандартной добавки // Аналитика и контроль. 2012. Т. 16, № 2. С. 181-187.
5. Морозова Т.Е., Мариничев А.Н., Зенкевич И.Г. Количественный анализ методом стандартной добавки в условиях нелинейности детектирования. ВЭЖХ-МС определение моноэтаноламина в водных растворах // Вестн. С-Петербург. ун-та. Сер. физ.-хим. 2012. Вып. 4. С. 126-132.
6. Lim J.H, Yan H.I Comparison of linear and non-linear equation for the calibration of roxithromycin analysis using liquid chromatography/mass spectrometry // Korean J. Vet. Res. 2010. V. 50, № 1. P.11-17.
7. Jelisavac L. Determination of Ethyl Centralite Stabilizer in a Double-Base Propellant by Gas Chromatography: Linearity, Accuracy, Precision // Scientific Technical Review. 2007. V. 57, № 3-4. P. 87-93.
8. Руководство по современной тонкослойной хроматографии / [Под ред. А.М. Волощука]. М.: 1994. 311 с.
9. Мельдоний-МИК и милдронат: Особенности фармацевтического действия и эквивалентность / Д.А. Рождественский и [др.] // Лечебное дело. 2011. № 6 (22). С. 47-51.
10. Lu Y.F., Hu X., Bi K.S. Determination of milidronate in human plasma and urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry // J. Chromatogr. B. 2007. V. 852. P. 35-39.
11. Зенкевич И.Г., Морозова Т.Е. Особенности метода стандартной добавки для количественного определения аналитов в сложных матрицах, обладающих сорбционными свойствами // Аналитика и контроль. 2010. Т. 14. № 3. С. 164-171.

COMPARISON OF ACCURACY OF THE METHOD OF ABSOLUTE CALIBRATION AND THAT OF MODIFIED SUCCESSIVE STANDARD ADDITIONS BY DETERMINING 3-(2,2,2-TRIMETHYLHYDRAZINIUM) PROPIONATE IN URINE AT NON-LINEAR DETECTION (ELECTROSPRAY)

**Tatiana E. Morozova¹, Georgy V. Karakashev¹, Pavel N. Sorokoumov¹,
Elena I. Savelieva¹, Igor G. Zenkevich²**

¹Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology
188663, Russia, Leningrad Region., Vsevolozhsk district, town Kuzmolovsky,
Art. KapitoloVo, Bldg. № 93
t-morozova07@yandex.ru

²St. Petersburg State University, Department of Chemistry
198504, Russia, Saint-Petersburg, Universitetskiy pr. 26.

Contemporary determining of pharmaceuticals in biological liquids for the purposes of pharmacokinetic studies and therapeutic drug monitoring implies the use of high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) with electrospray as a method of ionization. However, this technique is characterized by a rather narrow linear detection range. It causes the restrictions in quantitation of analytes by method of absolute calibration.

On the example of the determination of 3-(2,2,2-trimethylhydrazinium) propionate (THP) in urine it is shown that the method of successive standard additions provides more precise results comparing with those obtained with non-linear absolute calibration at the same levels of analyte concentrations. Its principal feature is the need to extrapolate the results to an infinite value of addition.

Keywords: 3-(2,2,2-trimethylhydrazinium) propionate, LC-MS, detection nonlinearity, successive standard addition, non-linear absolute calibration.