

# Validacija analitičkih metoda

---

**Božić, Josipa**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:581055>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-03**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Josipa Božić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA

## Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Nives Galić

Zagreb, godina 2020.



Datum predaje prve verzije Završnog rada: 30. lipnja 2020.  
Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita: 25. rujna 2020.

Mentor rada: prof. dr. sc. Nives Galić

Potpis:



## Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Načela analitičke prakse.....</b>	<b>2</b>
<b>2.2. Validacija.....</b>	<b>3</b>
2.2.1. <i>Pristup validaciji.....</i>	<i>3</i>
<b>2.3. Otopine, standardi i postupci pri validaciji .....</b>	<b>4</b>
<b>2.4. Procjena značajki (parametara) metode.....</b>	<b>4</b>
2.4.1. <i>Preciznost.....</i>	<i>5</i>
2.4.2. <i>Selektivnost/specifičnost.....</i>	<i>6</i>
2.4.3. <i>Granica detekcije i granica kvantifikacije .....</i>	<i>7</i>
2.4.4. <i>Linearnost .....</i>	<i>8</i>
2.4.5. <i>Raspon.....</i>	<i>9</i>
2.4.6. <i>Robusnost.....</i>	<i>9</i>
2.4.7. <i>Točnost.....</i>	<i>10</i>
2.4.8. <i>Analitički povrat.....</i>	<i>11</i>
2.4.9. <i>Osjetljivost .....</i>	<i>11</i>
<b>2.5. Dokumentacija i korištenje validiranih metoda.....</b>	<b>11</b>
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XII</b>



## § Sažetak

Validacija analitičke metode prvi je korak nakon razvijanja određene metode. S obzirom na važnost analitičke kemije u ispitivanju i kontroli kvalitete proizvoda koji su nužni za život i zdravlje pojedinca, važno je da i validacija bude pravodobno i ispravno provedena te dokumentirana. Validacija ili vrednovanje metode jest proces utvrđivanja da je metoda prikladna za korištenje u određenu svrhu. Validaciji se može pristupiti laboratorijski (unutarnje vrednovanje) i međulaboratorijski (dva laboratorija ispituju isti uzorak). Na temelju međulaboratorijskog pristupa skraćuje se vrijeme potrebno za provedbu eksperimenata svim budućim korisnicima (sličnih) metoda. Upravo zato važno je na propisan i jasan način dokumentirati validaciju.

Alati koji se koriste za validaciju pojedinih značajki metode su slijepa probe, obogaćeni uzorci, standardi (referentni ili potvrđeni referentni materijali), rutinski test uzorci, i konačno, statistička analiza. Značajke metode koje se validiraju su preciznost, selektivnost, granica detekcije, granica kvantifikacije, linearnost, raspon, robusnost, točnost, analitički povrat i osjetljivost. Ovisno o metodi, bila ona kvalitativna ili kvantitativna, potrebno je odrediti različite značajke metode.

U ovome će radu biti opisani svi navedeni alati za validaciju, kao i spomenute značajke metode.





## § 1. UVOD

Validacija ili vrednovanje metode jest postupak utvrđivanja, odnosno potvrđivanja, da je metoda prikladna za korištenje u određenu svrhu, to jest validacijom potvrđujemo kako će metoda dati točne rezultate.<sup>1</sup> S obzirom na ubrzani tehnološki razvoj važno je utvrditi pravila koja industrije koje imaju izravan utjecaj na ljudsko zdravlje trebaju slijediti. Prehrambena, kozmetička, farmaceutska i petrokemijska samo su neke od grana industrije u kojima se svakodnevno razvijaju nove metode za analizu novih dobara za poboljšanje ljudskog života, a prvi korak nakon razvijanja određene metode, kako bismo se uvjerali da će metoda uistinu biti dobra, jest upravo validacija metode. Osim novih metoda, validirati je potrebno i metode koje se temelje na prethodno poznatim (i validiranim) metodama, ali je njihov postupak modificiran te je također potrebno validirati metodu pri preuzimanju iste (između dva laboratorija).<sup>1</sup>

Značajke metode koje je potrebno validirati su granica detekcije, granica kvantifikacije, linearnost, raspon, preciznost, točnost, reproducibilnost, selektivnost i robusnost.<sup>1</sup>

U ovom će radu biti riječi o načinima validacije, o razlici validacije i verifikacije te o značajkama metode koje je potrebno validirati. Potom će biti spomenuto kako koristiti validirane metode te kako validaciju određene metode dokumentirati.

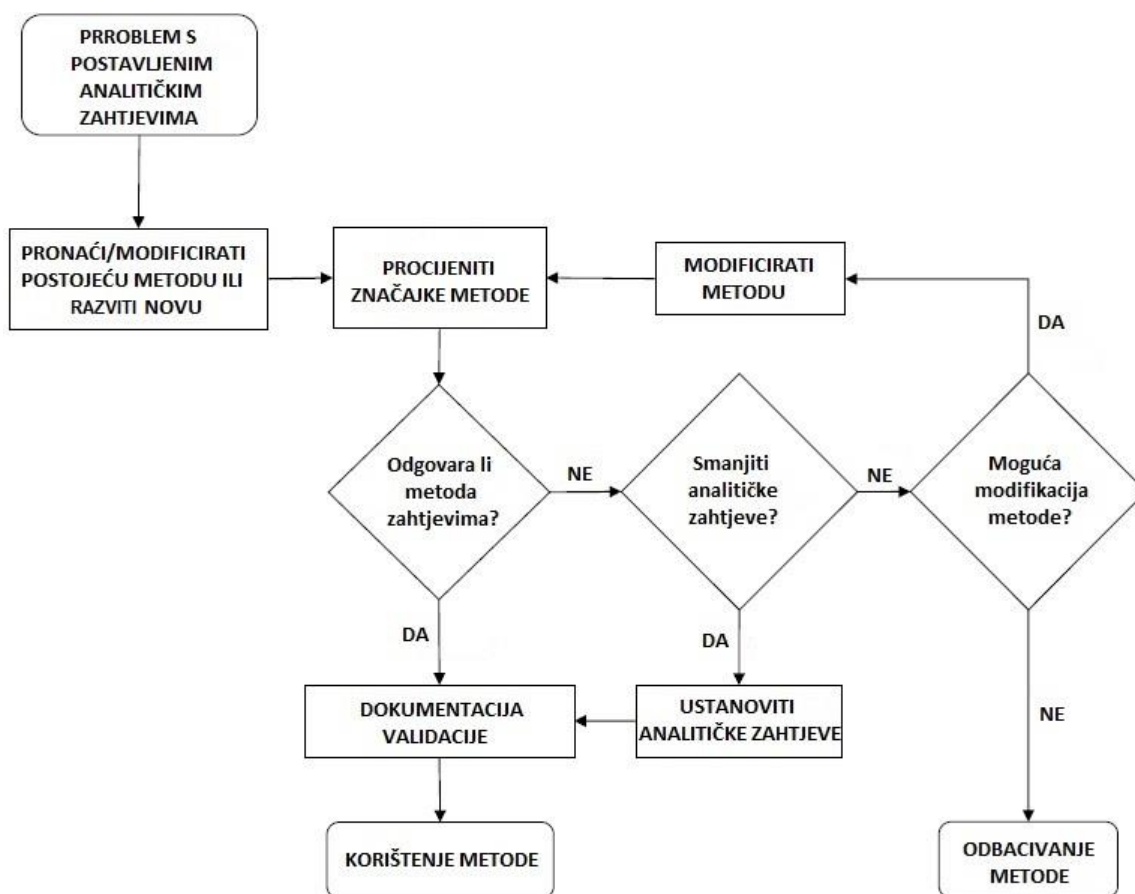
Cilj je ovoga rada čitatelju objasniti validaciju metode kao nužan proces u razvitku bilo koje metode i daljnjih istraživanja te ukazati na njezinu važnost.

## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Načela analitičke prakse

Načela analitičke prakse nužni su uvjeti da bi se laboratorij mogao smatrati relevantnim. Spomenuta načela su da *i)* analitička mjerenja trebaju biti takva da zadovoljavaju dogovorene uslove *ii)* trebaju biti obavljena koristeći opremu i metode koje su prethodno potvrđeni kao dobre za tu svrhu *iii)* moraju biti u skladu s mjerenjima dobivenim u nekom drugom laboratoriju i *iv)* redovno je potrebna neovisna procjena tehničkih mogućnosti laboratorija. Nadalje, osoblje koje provodi analitička mjerenja treba za to biti kvalificirano i kompetentno, a institucije koje provode analitička mjerenja trebaju imati dobro definiranu kontrolu kvalitete te postupke osiguravanja iste.<sup>2</sup>

Pri susretu s analitičkim problemom, analitičar mora pronaći ili osmisliti metodu koja zadovoljava potrebe rješavanja istog. Potrebno je postupati prema shemi prikazanoj na slici 1.<sup>2</sup>



Slika 1. Validacijski proces: od postavljenog analitičkog problema do odluke laboratorija može li se problemu pristupiti odabranom metodom<sup>2</sup>

## 2.2. Validacija

Validacija metode jest proces utvrđivanja prikladnosti metode za korištenje u određenu svrhu, a slijedi nakon razvoja metode.<sup>1</sup> Njome potvrđujemo sigurnost u točnost rezultata dobivenih određenom metodom. Potrebno je validirati nestandardne metode, nove metode razvijene u laboratoriju, standardne metode izvan njihovog radijusa te modificirane standardne metode (bilo promjenom procesa, instrumenta, analita ili matrice). Važno je naglasiti razliku između validacije i verifikacije. Naime, verifikacija je proces koji se koristi za metode koje su validirane, a kojom laboratorij potvrđuje da je u mogućnosti primjeniti spomenutu metodu provedbom nekoliko eksperimenata koji pokazuju dobro funkcioniranje instrumenata u laboratoriju.<sup>2</sup>

### 2.2.1. Pristup validaciji

Dva su pristupa validaciji: međulaboratorijski (vanjsko vrednovanje) te laboratorijski (unutarnje vrednovanje). Prethodno validaciji, potrebno je pomno osmisliti eksperimente kojima se daje uvid u značajke metode. Zaposlenici laboratorija u obzir trebaju uzeti za što se metoda koristi te na temelju toga odlučiti koje se značajke trebaju okarakterizirati validacijom te koliko detaljno. Nadalje, u obzir je važno uzeti i troškove te tehničke mogućnosti određenog laboratorija, kao i regulatorne zahtjeve te prethodna iskustva sa (sličnom) metodom.<sup>2</sup>

Regulatorni zahtjevi mogu biti različiti za određena područja, ali većinom slično zahtijevaju od izvoditelja validacije. Postoje 4 razine validacije od kojih razina 1 i 2 koriste laboratorijski, a 3 i 4 međulaboratorijski pristup. Svaka sljedeća razina nosi sa sobom veće kriterije, ovisno o njenoj budućoj primjeni. Dakle, razina 3 i 4 koriste se za široku primjenu, a 1 i 2 za laboratorijska ispitivanja u jednom laboratoriju. Svakoj je razini važno zadovoljiti određeni kriterij postavljen pravilnikom.<sup>1</sup>

Ukoliko je razvijena metoda za široku primjenu, potreban je međulaboratorijski pristup validaciji. U tom pristupu dva ili više laboratorija ispituju identičan analitički uzorak uz dogovorene uvjete u svrhu provjere izvedbenih uvjeta ispitivanja. Velika je prednost ovog pristupa validaciji što objavljeni podaci (preciznost i točnost) značajno skraćuju opseg posla za buduće laboratorije koji će koristiti određenu validiranu metodu.<sup>2</sup>

Laboratorijski pristup koristi se kada je određena metoda potrebna u neku svrhu, ali prethodno nije objavljena kao standard. Također, koristi se kada je potrebna samo jednom laboratoriju. Proviđa se tako da laboratorij uz različite uvjete i u različitim vremenskim intervalima primjenjuje metodu za analiziranje istih ili različitih uzoraka.<sup>2</sup>

### 2.3. Otopine, standardi i postupci pri validaciji

Pri validaciji metode koriste se **slijepe probe** (engl. *blanks*) kako bi se utvrdilo koji dio mjenenog signala je uistinu posljedica prisutnosti analita, a koji uzrokovan drugim tvarima prisutnim u uzorku. Pri tome se mogu koristiti slijepe probe reagensa (engl. *reagent blanks*) koji se koriste tijekom analize, uključujući otapala te slijepe probe uzorka (engl. *sample blanks*), koje su zapravo matrice (uzorak bez analita). Treba napomenuti da je ponekad vrlo teško prirediti slijepu probu uzorka u kojoj bi bile zastupljene sve interferencije.<sup>2</sup>

Nadalje, pri validaciji često se koriste **obogaćeni uzorci** u kojima se u otopinu dodaje poznata količina analita (engl. *spiked solutions*). Također je moguće u uzorak dodati različite količine interferirajuće tvari kako bi se odredila koncentracija pri kojoj interferirajuća tvar smeta određivanju analita.<sup>2</sup>

Pri postupku validacije koriste se i **standardi**, koji mogu biti referentni materijali ili certificirani referentni materijali. Razlika je u tome što certificirani referentni materijali podliježu strožim kontrolama te je njihova karakterizacija načinjena korištenjem različitih postupaka. Navedeni materijali koriste se pri validaciji na različite načine, naprimjer mogu se koristiti za baždarenja ili potvrdu mjerne metode.<sup>2</sup>

Za objektivne je procjene nužno testiranje signifikantnosti podataka statističkom analizom. Ona daje podatke o mjerama varijabiliteta (varijanca, standardna devijacija, raspon) te o značajnosti pretpostavljenih hipoteza (uz pomoć statističkih testova) koji govore o ispravnosti same metode, ukazuju na pogrešna mjerenja te govore o slaganju rezultata s pretpostavljenim fizikalnim načelima koje metoda prati.

### 2.4. Procjena značajki (parametara) metode

Svaka metoda, kao planirani način provedbe analize nekog uzorka, ima značajke koje treba odrediti validacijom. Ovisno o svrsi metode te o tome je li metoda kvalitativna ili kvantitativna, procjenjuju se određeni parametri (značajke) metode. Navedeno je prikazano u Tablici 1.

U slučaju modificiranih metoda, potrebno je obratiti pozornost na svrhu modifikacije te utvrditi mijenja li modifikacija preciznost i točnost metode. Ukoliko se takva metoda želi koristiti, prvo je potrebno provesti eksperiment s nemodificiranom metodom, a zatim i sa modificiranom te usporedbom procijeniti koliko je modificirana metoda prihvatljiva.<sup>1</sup>

Definicije značajki metode u daljnjem tekstu većinom su preuzete iz *Pravilnika o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata*,<sup>3</sup> dok je većinski opis procjene temeljen na pravilniku Međunarodnog vijeća za harmonizaciju tehničkih zahtjeva za farmaceutske proizvode za primjenu u ljudi (engl. *International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*, ICH)<sup>4</sup>, uz dodatne opaske drugih pravilnika navedenih u referencama (Eurachem<sup>2</sup>, FDA<sup>1</sup>).

Tablica 1: Podjela analitičkih metoda na kvalitativne i kvantitativne ovisno o tome koje značajke metode je potrebno odrediti za njihovu validaciju. "+" označava koja se značajka validira<sup>1</sup>

	KVALITATIVNE METODE	KVANTITATIVNE METODE
PRECIZNOST		+
SELEKTIVNOST	+	+
GRANICA DETEKCIJE	+	+
GRANICA KVANTIFIKACIJE		+
LINEARNOST		+
RASPON		+
NESIGURNOST MJERENJA	+	+
ROBUSNOST	+	+
POTVRDA IDENTITETA	+	+
TOČNOST		+
ISKORIŠTENJE		+
OSJETLJIVOST	+	

#### 2.4.1. Preciznost

Preciznost (engl. *precision*) je stupanj podudarnosti između rezultata nezavisnih ispitivanja dobivenih pod unaprijed određenim propisanim uvjetima.<sup>3</sup> Izražava se kao nepreciznost, odnosno računa kao standardna devijacija rezultata ispitivanja. Cilj je procijeniti sve što može utjecati na varijacije u laboratoriju te isto minimizirati.

Preciznost se promatra na tri razine: ponovljivost (engl. *repeatability*), međupreciznost (engl. *intermediate precision*) te obnovljivost (engl. *reproducibility*). Za svaku od navedenih razina potrebno je navesti standardnu devijaciju, relativnu standardnu devijaciju (koeficijent varijancije) i interval pouzdanosti.

Nužno je preciznost istražiti na temelju homogenog uzorka, koji je poželjno autentičan, no u slučaju nemogućnosti pripreve takvog homogenog uzorka, mogu se koristiti i oni umjetno pripremljeni.<sup>4</sup>

**Ponovljivost** (nepreciznost u seriji) jest preciznost u uvjetima pod kojima isti analitičar, koristeći istu opremu u istom laboratoriju, dobije nezavisne rezultate ispitivanja primjenjujući istu metodu na istovjetnim ispitivanim uzorcima.<sup>3</sup> Za određivanje ponovljivosti potrebno je *i*) minimalno 9 određivanja u specifičnom rasponu za određenu metodu (npr. 3 koncentracije/3 ponavljanja za svaku) ili *ii*) minimalno 6 određivanja pri 100%-tnoj test-koncentraciji.

Računa se prema jednadžbi (1), pri čemu je  $s_i$  standardno odstupanje za svaku seriju mjerenja za različite vremenske razmake, a  $n$  broj vremenskih razmaka.<sup>5</sup>

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n s_i^2}{n}} \quad (1)$$

**Međupreciznost** (nepreciznost iz dana u dan) predstavlja neslaganja unutar laboratorija u nekom neodređenom vremenskom periodu, a koja su posljedica promjene uvjeta kao što su promjena reagensa, analitičara ili instrumenata. Analitičar treba procijeniti kakvi su utjecaji promjene prethodno navedenih uvjeta na promatranu metodu te na temelju toga odrediti koje će utjecaje proučiti.<sup>4</sup> Računa se kao standardno odstupanje prema jednadžbi (2), a  $\bar{x}$  se računa prema jednadžbi (3).<sup>5</sup>

$$s_b = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n \bar{x}_i}{n} \quad (3)$$

**Obnovljivost** (reproducibilnost) pak predstavlja preciznost dobivenu u istom laboratoriju pod propisanim (unaprijed određenim) uvjetima (npr. metoda, materijal koji se ispituje, analitičari, okoliš) u opravdanim vremenskim razmacima.<sup>3</sup> Potrebno ju je promatrati u slučaju standardizacije analitičke metode, a podrazumijeva ispitivanje u najmanje dva laboratorija.<sup>4</sup> Računa se kao standardno odstupanje prema jednadžbi (4),

$$s_R = \sqrt{s_m^2 - s_r^2 \frac{n-1}{n}} \quad (4)$$

pri čemu je  $s_m^2$  standardno odstupanje svih laboratorija koji sudjeluju u procjeni obnovljivosti.<sup>5</sup> Za isti broj rezultata ispitivanja standardno odstupanje jednako je:

$$s_m^2 = \frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p (\hat{y}_i - \hat{m})^2 \quad (5)$$

gdje  $p$  predstavlja broj laboratorija,  $\hat{y}_i$  je srednja vrijednost za  $i$ -ti laboratorij, a  $\hat{m}$  predstavlja opću srednju vrijednost rezultata svih laboratorija koji sudjeluju u procjeni obnovljivosti. Izračunava se prema jednadžbi (6), pri čemu je  $n_i$  broj rezultata  $i$ -tog laboratorija koji sudjeluje u procjeni obnovljivosti.<sup>5</sup>

$$\hat{m} = \frac{\sum_{i=1}^p n_i \bar{y}_i}{\sum_{i=1}^p n_i} \quad (6)$$

#### 2.4.2. Selektivnost/specifičnost

Selektivnost (engl. *selectivity*) je svojstvo metode da razlikuje analit koji se određuje u smjesi ili matrici od drugih tvari.<sup>3</sup> Pojam selektivnost preporučuje IUPAC, ali se također, pogotovo u farmaceutskoj industriji koristi i pojam specifičnost (engl. *specificity*), odnosno analitička specifičnost.<sup>2</sup> Iako se u praksi često poistovjećuju, to su dva različita svojstva metode. Specifična metoda je ona kojom se može odrediti samo jedan specifičan analit, a selektivna je ona kojom se istovremeno može odrediti više komponenata koje pri određivanju ne smetaju

jedna drugoj. Selektivnost pokazuje koliko se danom metodom može odrediti željeni analit uz interferenciju drugih tvari sa sličnim karakteristikama (izomeri, produkti razgradnje, metaboliti). Interferencije mogu pojačavati ili smanjivati signale koji se pripisuju analitu.

Selektivnost je potrebno procjenjivati tijekom validacije metode. Ukoliko nije moguće postići zadovoljavajuću selektivnost, odnosno specifičnost određene metode prema nekom analitu, potrebno je koristiti dvije ili više metoda kako bi se postigla potrebna razina razlikovanja analita i interferencija.<sup>4</sup> Pri određivanju selektivnosti/specifičnosti, koriste se identifikacijski testovi i testovi onečišćenja, posebno u farmaceutskoj industriji i to pri kromatografskoj analizi lijekova, razgradnih produkata, itd.<sup>4</sup>

**Identifikacijski testovi** trebali bi razlikovati tvari sličnih struktura. Je li razlikovanje postignuto utvrđuje se na temelju dobivenih pozitivnih rezultata (usporedbom sa referentnim materijalom) analizom uzoraka koji sadrže analit, odnosno negativnih rezultata dobivenih analizom uzoraka koji ne sadrže analit. Moguć je i drugačiji pristup, onaj u kojem se identifikacijski test primjenjuje na tvari slične strukture analitu kako bi se utvrdilo da nema pozitivnog odgovora. Spomenute tvari koje imaju strukturu sličnu analitu odabiru se na temelju procjene analitičara o mogućim interferirajućim tvarima u uzorku.<sup>4</sup>

Ako su onečišćenja poznata i dostupna, u uzorak analita dodaju se određene količine onečišćenja kako bi se pokazalo potpuno odjeljivanje onečišćenja od analita danom metodom.<sup>4</sup>

Ako onečišćenja nisu dostupna, specifičnost se može pokazati usporedbom rezultata analize uzorka s onečišćenjima ili degradacijskim produktima s rezultatima dobivenim drugom, dobro karakteriziranom (i validiranom) metodom.<sup>4</sup>

Uz specifičnost moguće je i identificirati produkt, što je još jedna od značajki koja je potrebna u validaciji metoda, posebice kvalitativnih. Identifikacija se temelji na uspoređivanju dobivenih rezultata s rezultatima otprije poznatih referentnih materijala te se na taj način potvrđuje ili isključuje pretpostavka o strukturi analita.<sup>4</sup>

#### 2.4.3. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije (engl. *limit of detection*) je najmanja količina analita u uzorku koju je metodom moguće detektirati, ali ne nužno i kvantitativno odrediti. Granica kvantifikacije (engl. *limit of quantification*) je pak najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti uz zadovoljavajuću preciznost i točnost.<sup>4</sup>

Postoji nekoliko različitih pristupa određivanja **granice detekcije**:

a) vizualna metoda – analizom uzorka s poznatom koncentracijom analita određuje se najmanja količina analita koja se može detektirati;

b) metoda temeljena na omjeru signala i šuma (engl. *signal-to-noise*, S/N) – uspoređuje se izmjereni signal uzorka s poznatom koncentracijom analita s izmjerenim signalom slijepe probe te utvrđuje minimalna koncentracija analita koja se može pouzdano detektirati. Obično se kao vrijednost S/N uzima 3:1;



c) metoda temeljena na standardnoj devijaciji odgovora i nagiba kalibracijske krivulje.

Granica detekcije (DL) računa se množenjem standardne devijacije ( $\sigma$ ) sa faktorom 3.3, te dijeljenjem sa nagibom kalibracijske krivulje (S) (jednadžba 7). Spomenuta standardna devijacija dobiva se iz preporučenog broja ponavljanja eksperimenta, a najčešće je taj broj 10. Moguće ju je dobiti ili računanjem iz analitičkog odgovora dobivenog analizom prikladnog broja slijepih proba ili iz regresijom dobivene krivulje koja je rezultat korištenja uzoraka koji sadrže analit u granici detekcije, odnosno granici kvantifikacije.<sup>4</sup>

$$DL = \frac{3.3 \sigma}{S} \quad (7)$$

Standardna devijacija računa se na različite načine:

- a) analizom slijepa probe (6 do 10 mjerenja) i računanjem standardne devijacije odgovora
- b) iz kalibracijske krivulje dobivene analizom uzoraka koji sadrže analit u rasponu granice detekcije, pri čemu se koristi standardna devijacija pravca ili odsječka na osi y.<sup>4</sup>

**Granica kvantifikacije (QL)** također se može odrediti: a) vizualnom metodom, b) metodom omjera signala i šuma pri čemu omjer S/N mora iznositi 10:1 ili c) na temelju standardne devijacije odgovora i nagiba pravca prema izrazu<sup>4</sup>:

$$QL = \frac{10 \sigma}{S} \quad (8)$$

#### 2.4.4. Linearnost

Linearnost (engl. *linearity*) potječe od pretpostavke da između dviju varijabli postoji takva ovisnost koja se može prikazati jednadžbom pravca (9) u kojoj porastom vrijednosti jedne varijable, dolazi do promjene vrijednosti druge varijable. Gledajući na danu definiciju s analitičkog stajališta, to znači da je analitički signal linearna funkcija količine ili koncentracije analita u uzorku.<sup>4</sup>

$$y = a x + b \quad (9)$$

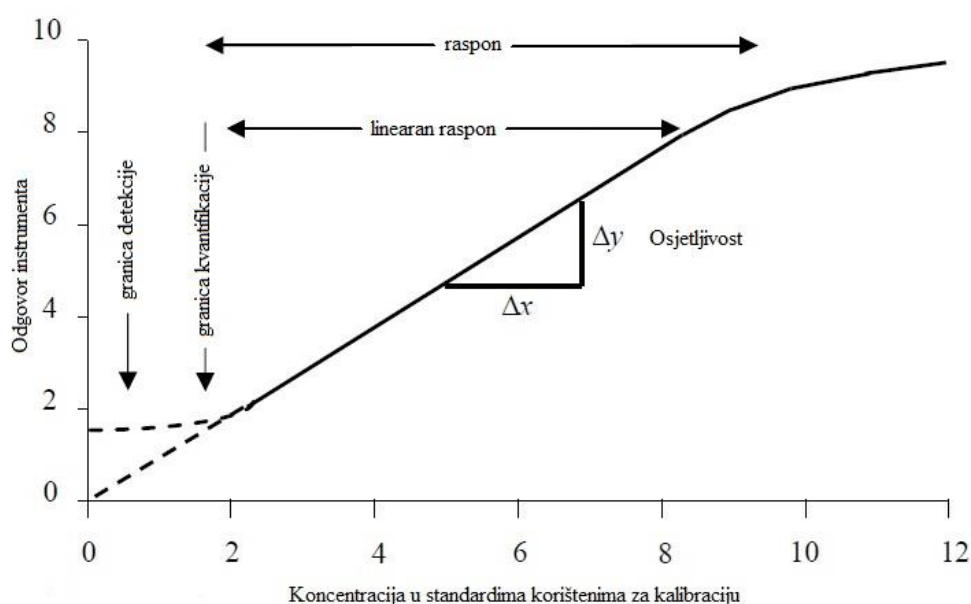
Za utvrđivanje linearnosti potrebno je provesti minimalno 5 mjerenja, a potrebno ih je provesti na cijelom rasponu metode. Evaluacija dobivenih rezultata može se provesti vizualno, odnosno linearnom regresijskom analizom (metodom najmanjih kvadrata).<sup>4</sup>

Ukoliko postoji linearna ovisnost, prilikom dokumentacije potrebno je navesti korelacijski koeficijent, odsječak na  $y$  osi ( $b$  u jednadžbi (9)), nagib ( $a$  u jednadžbi (9)) te reziduale dobivenog pravca.<sup>4</sup>

#### 2.4.5. Raspon

Raspon (engl. *working range*) predstavlja interval između gornje i donje koncentracije analita u uzorku u kojem metoda daje rezultate sa prihvatljivom nesigurnošću i točnošću.<sup>4</sup> Donja granica intervala je zapravo granica kvantifikacije, a gornja granica je koncentracija pri kojoj su opažena značajna odstupanja u analitičkoj osjetljivosti.<sup>2</sup> Između tih dviju granica, odnosno u danom rasponu, instrument kojim se izvodi metoda pokazuje određenu ovisnost koja može biti linearna, kvadratna, logaritamska. Validacijom je potrebno provjeriti upravo tu ovisnost te time potvrditi kompatibilnost raspona danog instrumenta sa željenim intervalom metode, odnosno utvrditi da metoda daje dovoljno točne i precizne rezultate (slika 2).

Kako bi se ovisnost potvrdila, potrebno je interval (koncentracijski raspon) proširiti (za  $\pm 20\%$  ili  $30\%$ ) i za dobiveni interval provjeriti krivulju vizualno i statistički.<sup>4</sup>



Slika 2. Tipična ovisnost odgovora instrumenta o koncentraciji u standardima korištenim za kalibraciju. Grafički su identificirane sljedeće značajke metode: granica detekcije, granica kvantifikacije, osjetljivost, linearan raspon te raspon<sup>2</sup>

#### 2.4.6. Robusnost

Robusnost (engl. *ruggedness/robustness*) predstavlja podložnost analitičke metode na promjene uvjeta ispitivanja u odnosu na različitost vrste uzoraka, analita, uvjete pohrane, uvjeta okoliša i/ili uvjeta pripreme uzoraka pod kojima se metoda može primjenjivati onakva kakva jest ili uz utvrđene manje izmjene.<sup>3</sup> Treba ukazati na sve uvjete ispitivanja koji bi u

praksi mogli biti podložni promjenama, a mogu utjecati na rezultat analize (npr. stabilnost reagensa, sastav uzorka, pH, temperatura).<sup>3</sup>

Procjena robusnosti nužna je tijekom razvoja metode, a ovisi o samoj metodi. Potrebno je dokazati da metoda daje dobre rezultate unošenjem promjena u spomenutim uvjetima ispitivanja.<sup>4</sup> Robusnost se tako i testira: uvode se promjene uvjeta analize određenom metodom i istražuje njihov utjecaj na rezultate analize. Na taj je način moguće utvrditi koje varijable imaju najveći utjecaj na metodu te je takve varijable potrebno strogo kontrolirati prilikom izvođenja eksperimenata s validiranim metodama.<sup>2</sup>

#### 2.4.7. Točnost

Točnost (engl. *accuracy*) predstavlja stupanj podudarnosti između rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednosti. Točnost se utvrđuje utvrđivanjem preciznosti i istinitosti (engl. *trueness*).<sup>3</sup>

Preciznost je prethodno opisana, a istinitost predstavlja podudarnost između srednje vrijednosti dobivene iz velikog niza rezultata i prihvaćene referentne vrijednosti. Istinitost se obično izražava kao mjerno odstupanje (engl. *bias*) koje predstavlja razliku između aritmetičke sredine rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednosti, ili pak njihov odnos.<sup>3</sup>

Koristi se nekoliko metoda za određivanje točnosti. Na primjer, u farmaceutskoj industriji pri određivanju aktivne tvari u lijekovima pristupi su sljedeći: *i*) analitička metoda primijeni se za analizu lijeka poznate čistoće (npr. referentni materijal), *ii*) usporede se rezultati dobiveni predloženom metodom sa rezultatima dobivenim korištenjem druge, otprije okarakterizirane metode ili *iii*) izvodi se zaključak o točnosti na temelju procijenjene preciznosti, linearnosti i selektivnosti.<sup>4</sup>

Pri određivanju onečišćenja, točnost se treba procijeniti na uzorcima u koje su dodane poznate količine onečišćenja. Provodi se minimalno 9 eksperimenata na najmanje 3 različite koncentracije (3 koncentracije uz 3 ponavljanja).<sup>4</sup>

Mjerno odstupanje (engl. *bias*) može se odrediti na tri načina: a) analizom referentnog materijala, b) eksperimentima određivanja analitičkog povrata korištenjem obogaćenih uzoraka te c) usporedbom rezultata s onima dobivenim drugom metodom. Ponekad je potrebno kombinirati različite pristupe.

Mjerno odstupanje (*bias*, *b*) može se izraziti u apsolutnoj vrijednosti (jednadžba 10), kao relativna vrijednost u postocima *b*(%) (jednadžba 11), kao relativni analitički povrat obogaćenog uzroka *R'*(%) (jednadžba 12) te kao relativni analitički povrat *R*(%) (jednadžba 13).<sup>2</sup>

$$b = \bar{x} - x_{ref} \quad (10)$$

$$b(\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100 \quad (11)$$

$$R'(\%) = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{spike}} \times 100 \quad (12)$$

$$R(\%) = \frac{\bar{x}}{x_{ref}} \times 100 \quad (13)$$

gdje su  $x_{ref}$  referentna vrijednost,  $\bar{x}'$  srednja vrijednosti uzorka u koji je dodana poznata količina analita (engl. *spiked sample*), a  $x_{spike}$  dodana koncentracija.

#### 2.4.8. Analitički povrat

Analitički povrat (engl. *recovery*) predstavlja postotak stvarne koncentracije tvari izdvojene tijekom analitičkog postupka. Analitički povrat potrebno je odrediti ukoliko potvrđeni referentni materijal nije dostupan.<sup>3</sup>

#### 2.4.9. Osjetljivost

Osjetljivost (engl. *sensitivity*) je promjena u odgovoru instrumenta, a koja se ogleda u promjeni mjerene veličine. Definira se kao nagib kalibracijske krivulje u točki blizu granice kvantifikacije. Nije pretjerano korisna, pa se ne koristi često.<sup>2</sup>

## 2.5. Dokumentacija i korištenje validiranih metoda

Nakon validacije metode, sve korake validacije potrebno je zapisati. To je od velike važnosti jer kvaliteta dokumentacije može utjecati na preciznost i nesigurnost budućih mjerenja koje izvode drugi analitičari.

Dokumentacija validirane metode treba sadržavati identitet spoja, raspon, korištene matrice, protokol u kojem su opisani reagensi, opremu, potrebne kalibracije, postupke te potencijalne mjere sigurnosti koje je potrebno poduzeti. Nužno je navesti i svrhu korištenja metode te njena potencijalna ograničenja.<sup>6</sup>

Iako postoje standardizirane (validirane) metode pogrešno je koristiti ih bez prethodne provjere. Ono što je važno jest da je analitičar u potpunosti upoznat sa metodom koju treba koristiti, te ako je početnik, da ga netko sa više iskustva nadgleda. Važno je i utvrditi koliko se uzoraka istovremeno može analizirati, te se uvjeriti da je sve što je potrebno za provedbu analize prisutno u laboratoriju.<sup>2</sup>

Podaci validacije mogu se koristiti za unutarnju i vanjsku kontrolu kvalitete nekog laboratorija jer validacija daje podatke o sposobnostima i granicama metode, a samim time i sposobnostima i ograničenjima laboratorija.<sup>2</sup>

### § 3. LITERATURNI IZVORI

1. *Guidelines for the Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products 3<sup>rd</sup> Edition*, U.S. Food and Drug Administration, Foods Program, 2019.
2. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics 2<sup>nd</sup> Edition*, Eurachem, 2014.
3. *Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata*, Narodne novine broj 2/05
4. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.
5. E. Trogrlić, A. Strineka, D. Sekulić, *Međulaboratorijska ispitivanja i njihova primjena*, Vol. 61, Građevinar, Zagreb, 2009., str. 643-654.
6. *Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis*, Vol 74, International Union of Pure and Applied Chemistry, 2002., 835-855.