

ANTONIJE ONJIA<sup>1</sup>  
TATJANA VASILJEVIĆ<sup>2</sup>  
ĐURO ČOKEŠA<sup>1</sup>  
MILE LAUŠEVIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut za nuklearne nauke  
Vinča, Vinča

<sup>2</sup>Tehnološko–metalurški  
fakultet, 11001 Beograd

STRUČNI RAD

543.544+001.818

## OSVEŽIMO NAŠE ZNANJE VALIDACIJA HROMATOGRFSKE ANALIZE

*U radu su razmatrani parametri za razvoj i validaciju hromatografske analitičke metode. Opisana je uloga preciznosti, tačnosti, granice detekcije, granice kvantitativnog određivanja, specifičnosti, opsega, linearnosti i robustnosti, kao i pogodnosti sistema u analitičkoj primeni hromatografije. Date su preporuke za ove parametre u skladu sa ICH i FDA regulativom.*

Obezbeđivanje brzih, tačnih i pouzdanih analitičkih podataka jedan je od ključnih faktora za uspešan prizvodni program u mnogim granama privrede, zdravu životnu sredinu i kvalitetno praćenje medicinskih tretmana. Kvalitet ovih podataka veoma zavisi od primenjene analitičke metode i njene validnosti

Validacija se može definisati kao postupak kojim se ispituje određena analitička metoda u cilju dokazivanja njene valjanosti za određenu primenu.

Pitanje koje se postavlja svakom analitičaru je: kada vršiti validaciju i koje su to metode koje treba ispitati? Prema uputstvima dobre laboratorijske prakse (Good Laboratory Practice, GLP), postupak validacije treba sprovesti kada se neka metoda uvodi u rutinsko korišćenje, kada se sama metoda ili cilj metode promene i kada se promene uslovi u kojima se izvodi analiza npr. instrument itd. Obavezno treba validirati metode koje se razvijaju u sopstvenoj laboratoriji, a takođe i standardne metode (ISO, AOAC, USP, BP, EPA, ASTM...) ukoliko ne postoji dokumentacija o njihovoj validaciji ili ako analitički zahtevi nisu identični.

Za analitičke metode u farmaceutskoj industriji validacija se najčešće izvodi po programima USP (United States Pharmacopeia) [1], ICH (International Conference on Harmonisation) [2] i FDA (Food and Drug Administration) [3–4]. Za analitiku životne sredine prema EPA (Environmental Protection Agency) preporukama [5], a za analizu velikog broja raznovrsnih materijala AOAC (Association of Official Analytical Chemists) postupcima [6] i prema ISO (International Standard Organisation) standardima [7]. Najčešće se validacija odvija kroz međulaboratorijska ispitivanja [5–7].

U navedenim programima različitih organizacija postoji saglasnost šta ispitivati, međutim razlike se javljaju u tome kako vršiti ispitivanja [8–9]. Analitički postupak se sastoji od niza stupnjeva i prilikom tretmana uzoraka i kod instrumentalnog merenja. Postupkom validacije se svaki pojedinačni stupanj izolovano ispituje i utvrđuje efekat njegove varijacije na validnost ukupne metode.

Ovaj rad razmatra validaciju analitičkog postupka na primeru jedne visoko–efikasne metode tačne hromatografije (High–performance liquid chromatography, HPLC), imajući u vidu da je HPLC jedna od najčešće korišćenih analitičkih tehnika [10]. Hromatografska analiza obuhvata složenu proceduru koja se sastoji od uzorkovanja, tretmana uzoraka, instrumentalnog merenja i obrade rezultata. Treba naglasiti da uzimanje i tretman uzoraka često mogu biti kritičan deo analize u smislu njene ukupne preciznosti i tačnosti. U ovom radu pažnja je posvećena instrumentalnom delu analitičkog postupka pretpostavljajući da su doprinosi varijacija u ne–hromatografskom delu minorni.

Hromatografske analize se u proizvodnji i kontroli najčešće rade u slučajevima:

- A. identifikacije,
- B. određivanja prisutnih nečistoća i
- C. kvantitativnog određivanja neke supstance u različitim matriksima.

Analitički parametri koji se obično ispituju u validacionim postupcima su: specifičnost, selektivnost, linearnost, opseg, tačnost, preciznost, granica detekcije, granica kvantitativnog određivanja, robustnost i pogodnost sistema. Navedeni parametri nemaju podjednak značaj u sva tri slučaja, tako da tip analize određuje validacione karakteristike koje treba razmatrati (tabela 1).

### SPECIFIČNOST

Izraz specifičan se odnosi na metod u kome se dobija analitički odgovor samo na jednu ciljanu komponentu.

Adresa autora: M. Laušević, Tehnološko–metalurški fakultet, P. fah 494, 11001 Beograd  
Rad primljen: Decembar 20, 2001.  
Rad prihvaćen: Februar 14, 2002.

Tabela 1. Tipovi analiza i validacione karakteristike koje treba razmatrati [2].

Table 1. Types of analysis and validation characteristics that must be considered [2]

Parametar	Tip analize			
	A Identifikacija	B Određivanje nečistoća		C Kvantitativna analiza
		kvant.	limit	
Tačnost	-	+	-	+
Preciznost	-	+	-	+
Specifičnost <sup>1)</sup>	+	+	+	+
Granica detekcije	-	- <sup>2)</sup>	+	-
Granica kvantifikacije	-	+	-	-
Linearnost	-	+	-	+
Opseg	-	+	-	+

+ parametar koji se obično ispituje

- parametar koji se obično ne ispituje

<sup>1)</sup>nedostatak specifičnosti analitičkog postupka može se nadoknaditi upotrebom dodatne metode.

<sup>2)</sup>može biti potrebno u nekim slučajevima.

tu u prisustvu drugih komponenata u sistemu. Ovaj parametar ima poseban značaj u analizi kompleksnih smeša. Hromatografske tehnike se odlikuju dobrom specifičnošću zato što omogućavaju razdvajanje komponenata smeše pre njihove detekcije, za razliku od npr. kiselo-baznih titracija gde se određuje ukupna kiselost (ili baznost) sistema koja može poticati od više komponenata.

Često se u praksi ne pravi razlika između izraza specifičan i selektivan, što je veoma pogrešno.

### Selektivnost

Selektivnost predstavlja mogućnost izdvajanja analitičkog odgovora za određenu komponentu u odnosu na druge komponente u sistemu. Selektivnost se kod HPLC metode postiže najčešće optimizacijom hromatografskih uslova. Često se javlja dilema da li izvestan hromatografski pik predstavlja samo jednu komponentu ili se u njemu nalazi više komponenata. Ovakva situacija u novije vreme se uspešno prevazilazi upotrebom savremenih detektora npr. diode-array detektora ili masenih spektrometara. Diode-array detektorima se može odrediti nečistoća od 0,05–0,1% [11]. Za kriterijum selektivnosti se obično postavlja uslov da rezolucija pika analita i najbližeg pika u hromatogramu ne bude manja od 1,5 [12].

### LINEARNOST

Linearnost se definiše kao mogućnost da se u datom opsegu detektuje signal koji je direktno proporcij-

onalan koncentraciji ili količini analita. Opseg linearnosti zavisi od prirode analita i tipa detektora. U linearnom opsegu regresioni koeficijent ( $r$ ) treba da bude  $r > 0,999$  [3], a odsečak na ordinati ( $y_0$ ) ne treba značajno da odstupa od nule. Parametar  $r$  predstavlja stepen rasturanja tačaka oko idealne prave linije ( $r > 1,000$ ), dok  $y_0$ -vrednost predstavlja indikator postojanja problema uticaja matriksa (background) ( $y_0 > 0$ ), ili gubitka analita adsorpcijom na zidovima sudova ili degradacijom ( $y_0 < 0$ ). Nagib predstavlja osetljivost metode tj. veći nagib omogućuje da mala promena u količini analita proizvodi veliku razliku u odgovoru sistema. Pri ispitivanju linearnosti treba koristiti najmanje pet standardnih rastvora čija koncentracija se kreće u opsegu od 80–120% od očekivane koncentracije analita.

### ANALITIČKI OPSEG

Opseg analitičke metode predstavlja interval između gornjeg i donjeg nivoa koncentracije u kome se analiza može vršiti sa određenom tačnošću, preciznošću i linearnošću. Opseg se može odrediti ispitivanjem tačnosti i linearnosti metode. Da bi se zadovoljio i kriterijum preciznosti za dati opseg, pri ispitivanju tačnosti koriste se najmanje triplikati opterećenih uzoraka. Preporuke za preciznost u analitičkom opsegu su izražene kao relativne standardne devijacije (RSD): 3% za slučaj C i 10% za slučaj B.

### TAČNOST

Tačnost analitičke metode je stepen saglasnosti između dobijene vrednosti u postupku i stvarne vrednosti. Određivanje se vrši poređenjem dobijenih rezultata sa rezultatima dobijenim korišćenjem standardne referentne metode ili korišćenjem sertifikovanog referentnog materijala (Standard reference material, SRM). Kada SRM nije dostupan mogu se koristiti standardni uzorci opterećeni poznatom količinom analita. Koncentracije standardnih uzoraka treba da budu u opsegu od interesa, a najmanje jedan standardni uzorak treba da ima koncentraciju blisku granici kvantitativnog određivanja. Dobijena tačnost u velikoj meri zavisi od načina pripreme uzoraka, matriksa i koncentracije uzoraka. Za određivanje tačnosti treba koristiti najmanje tri različite koncentracije analita u uzorcima i analizu ponoviti tri puta. Tačnost se najčešće izražava kao procenat prinosa analitičkog postupka (recovery) za poznatu dodatnu količinu analita u uzorak.

Za tip analize C koncentracioni nivo treba da obuhvati opseg od 50–150%, dok prosečan "recovery" u opsegu 80–120% treba da bude  $100 \pm 2\%$ . Za tip analize B ispitivani koncentracioni opseg treba da bude od 0,1–2,5 mas.% sa prosečnim "recovery" od 0,1% absolutne ili 10% relativne vrednosti [12].

## PRECIZNOST

Stepen rasturanja dobijenih rezultata u seriji uzorkovanja i merenja istog homogenog uzorka naziva se preciznošću. Preciznost se najčešće izražava kao standardna devijacija ili koeficijent varijacije. Za određivanje preciznosti treba uraditi najmanje pet analiza. Kod instrumentalnih hromatografskih metoda vrednosti za RSD se preporučuju za slučaj B  $RSD \leq 10\%$ , a za slučaj C  $RSD \leq 2\%$ .

## GRANICA DETEKCIJE

Najniža koncentracija analita koja se može detektovati u uzorku, ali ne neophodno i kvantifikativno odrediti, naziva se granicom detekcije (DL). Postoji nekoliko pristupa određivanju DL: vizuelno, na osnovu odnosa signal/šum bazne linije (S/N) i na osnovu standardne devijacije odgovora detektora i nagiba kalibracione prave.

S/N se određuje merenjem signala analita koji se nalazi u poznatoj, veoma niskoj koncentraciji i uzorka bez analita, pri čemu se utvrđuje najniža koncentracija analita koju je moguće detektovati. Za granicu detekcije obično se uzima vrednost koncentracija koje daju  $S/N=3$  ili  $S/N=2$ .

DL se nekada izračunava po formuli (1):

$$DL = \frac{3.3 \sigma}{F} \quad (1)$$

gde je:

$\sigma$  – standardna devijacija odgovora detektora,

F – nagib kalibracionog grafika.

$\sigma$  se dobija kao standardna devijacija serije merenja signala uzorka bez analita, ili kao standardna devijacija odsečka na ordinati dobijenog iz kalibracione prave sa koncentracijama bliskim DL.

## GRANICA KVANTIFIKATIVNOG ODREĐIVANJA

Granica kvantifikativnog određivanja se definiše kao najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti sa prihvatljivom preciznošću i tačnošću. Ovaj parametar je naročito važan kod analize nečistoća ili degradacionih produkata. Određuje se analogno određivanju detekcionog limita, koristeći  $S/N=10$ , ili jednačinu (2):

$$DL = \frac{10 \sigma}{F} \quad (2)$$

## ROBUSTNOST

Robustnost sistema predstavlja indeks pouzdanosti metode u toku njene upotrebe a opisuje se kao kapacitet metode da ostane nepromenjena u svojoj validnosti ako dođe do namerne male izmene analitičkih uslova. Tipični analitički uslovi su: stabilnost rastvora,

vreme ekstrakcije, sastav i protok mobilne faze, različite kolone, temperatura, itd.

## POGODNOST HROMATOGRAFSKOG SISTEMA

Tačnost i preciznost HPLC podataka u velikoj meri zavisi i od samog analitičkog instrumenta. Testiranje pogodnosti hromatografskog sistema integralni je deo validacionog procesa. Parametri koje treba odrediti su: faktor kapaciteta (k), preciznost injektovanja (RSD'), rezolucija (R), razvlačenje pika (T), teorijski broj podova (N). Definicije ovih parametara nalaze se i u IUPAC preporukama [13] i USP [1]. Vrednosti koje treba zadovoljiti su [3]:  $k > 2$ ,  $RSD' \leq 1\%$  (za  $n > 5$ ),  $R > 2$ ,  $T \leq 2$ ,  $N > 2000$ .

## ZAKLJUČAK

Ovom prilikom prikazan je samo mali segment GLP-a koji treba razmatrati od strane onih koji se bave hromatografijom da bi se održavao kvalitetan analitički rad. Dati parametri su opisani u najkraćim crtama. Njihovo detaljnije razmatranje se može naći u brojnoj publikovanoj literaturi [1–19].

Navedeni kriterijumi validacije prvenstveno se odnose na HPLC metodu, bez obzira na tipove korišćenih detektora i načine razdvajanja komponenata u koloni, a skoro u potpunosti se mogu primeniti i na druge instrumentalne hromatografske tehnike (GC, GC-MS, HPTLC,...), kao i na sve popularniju kapilarnu elektroforezu (CE). Većina principa je validna i za spektroskopske tehnike koje se takođe veoma koriste (UV/VIS, FTIR, NMR, AAS, XRF, ICP-AES, ICP-MS,...).

## LITERATURA

- [1] U.S. Pharmacopeia XXIII, National Formulary XVIII, p. 1982, United States Pharmacopeial Convention Inc., 1995.
- [2] International Conference on Harmonisation, Guideline on Validation of Analytical Procedures: Definition and Terminology, Federal Register, Vol. 60, p. 11260, March 1, 1995.
- [3] Riviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods, Food and Drug Administration, 1994.
- [4] Guideline for Submitting Samples and Analytical Data for Methods Validation, Food and Drug Administration, 1987.
- [5] US EPA, Guidance for methods development and methods validation for the resource Conservation and Recovery Act Program, Washington, USA, 1995.
- [6] AOAC Peer Verified methods Program, Manual on Policies and Procedures, Arlington, USA, Nov. 1993.
- [7] ISO/IEC Guide 25, EURACHEM Secretariat, Teddington, UK, 1993.
- [8] Clarke, G.S., J. Pharm. Biomed., Anal., **12** (1990) 643.
- [9] Inman, E.L., Frischman, J.K., Jimenez, P.J., Winkel, G.D., Persinger, M.L., Rutherford, B.S., J. Chromatogr. Sci., **25** (1987) 252.
- [10] Lee, C.R., Porziemsky, J.P., Gaspar, M., Krstulović, A.M., LC.GC Int., **9**(7) (1996) 414.
- [11] Huber, L., LC.GC Int., **11**(2) (1998) 96.

- [12] Green, J.M., *Anal. Chem.*, **68** (1996) 305A.
- [13] Ettre, L.S., *Pure Appl. Chem.*, **65** (1993) 819.
- [14] Debesis, E., Boehlert, T.E., Givant, J., Sheridan, J.C., *Pharm. Technol.*, **91** (1982) 120.
- [15] Paul, W.L., *Pharm. Technol.*, **15** (1991) 130.
- [16] Wilson, T.D., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **8** (1990) 389.
- [17] Huber, L., *Good Laboratory Practice and Current Good Manufacturing Practice*, Hewlett-Packard Primer, 1994.
- [18] Szepesy, G., Gazdag, M., Mihalyfi, K., *J. Chromatogr.*, 1989, 464, 265.
- [19] Swartz, M.E., Krull, I.S., *Analytical Method Development and Validation*, Marcel Dekker, 1997.

## SUMMARY

### VALIDATION OF CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS

(Professional paper)

Antonije Onjia<sup>1</sup>, Tatjana Vasiljević<sup>2</sup>, Djuro Čokeša<sup>1</sup>, Mile Laušević<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The Vinča Institute of Nuclear Sciences, P.O. Box 522, 11001 Belgrade

<sup>2</sup>Faculty of Technology and Metallurgy, P.O. Box 494, 11001 Belgrade

The parameters for the development of a chromatographic (HPLC) method and its validation are discussed in the paper. Chromatographic analysis involves a multi-step procedure consisting of sample collection, pretreatment, instrumental measurements and data processing. Emphasis was placed on the instrumental part of the analysis presuming that the contributions of the other variables were minor. The roles of precision, accuracy, detection limit, quantification limit, specificity, selectivity, range, linearity and robustness, as well as system suitability in the analytical application of chromatography were described. Recommendations for the validation of these parameters according to ICH and FDA guidelines are given. The criteria of validation described above can be almost completely applied to other instrumental chromatographic techniques such as GC, GC-MS, HPTLC, etc.

Key Words: Validation • HPLC • Precision • Accuracy •  
Ključna reči: Validacija • HPLC • Preciznost • Tačnost •