

ZR1 – Toksikologija**ZR1-1****Validacija kvalitativnih kromatografskih metoda**

Samošćanec K

Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

Validacija je postupak ispitivanja pouzdanosti, točnosti i preciznosti metode. Ona je važan element svih metoda mjerenja pošto je usko povezana sa kvalitetom dobivenih rezultata. Mjerne metode karakteriziraju parametri kojima se procjenjuje analitička prihvatljivost. Oni moraju biti u skladu s prethodno definiranim zahtjevima. Svi parametri ovise o tipu i karakteristikama same metode. Konvencionalna klasifikacija metode dijeli na kvalitativne i kvantitativne. Prema definiciji kvalitativne metode su analize čiji odgovor je prisutnost ili odsutnost analita koji se mjeri bilo direktno, ili indirektno u točno određenoj količini uzorka. Rezultat se dobiva očitanjem signala mjerenja, uspoređivanjem odgovora na referentnu ili dogovornu vrijednost. Rezultat je binaran (da/ne; prisutan/odsutan). Referentni materijal može biti vanjski ili unutarnji. Vanjski referentni materijal je dobro karakteriziran (certificirani referentni materijal), dok unutarnji referentni materijal može biti ili dobro obrađen uzorak poznatih vrijednosti ili komercijalan uzorak koji se nalazi u komercijalnim pakiranjima testa.

Kvalitativni parametri se moraju pažljivo prepoznati i odabrati prema zahtjevima metode. Oni su uključeni u pojedinosti koje su povezane s informacijama koje želimo dobiti: verifikacija sljedivosti, određivanje netočnosti povezane s rezultatom (lažno pozitivni/lažno negativni), osjetljivost i specifičnost, selektivnost: interferencije, granica detekcije, područje nepouzdanosti i robusnost metode.

Sljedivost prema definiciji Eurachema je svojstvo rezultata mjerenja ili vrijednosti standarda koje su povezane s referentnim materijalom, obično nacionalnih ili internacionalnih standarda, putem neprekidnog niza uspoređivanja. Odnosno, sljedivost možemo procijeniti uspoređivanjem rezultata dobivenih ili referentnom metodom ili korištenjem referentnog materijala.

U okvirima kvalitativne analize osjetljivost i specifičnost predstavljaju sposobnost testa za razlikovanje stvarno pozitivnih (osjetljivost) od stvarno negativnih (specifičnost) uzoraka. Visoka osjetljivost i specifičnost nekog testa osigurava izbjegavanje lažnog rezultata. Mora se voditi računa o selektivnosti koja je usko povezana sa speci-

ZR1 – Toxicology**ZR1-1****Validation of qualitative chromatography methods**

Samošćanec K

University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Validation is a procedure of testing the reliability, accuracy and precision of a method. Being closely related to the quality of the results obtained, it is an important element of all methods of measurement. These methods are characterized by parameters evaluating analytical acceptability, which should be in agreement with the previously defined requirements. All these parameters depend on the type and characteristics of the method. Methods are conventionally classified into qualitative and quantitative methods. By definition, qualitative methods include those analyses that point to the presence or absence of the analyte measured directly or indirectly in a strictly defined sample quantity. The result is obtained by reading off the measurement signal and comparing it with the reference or predetermined value. The result is binary (yes/no; present/absent). The reference material may be external or internal. External reference material is well characterized (certified reference material), whereas internal reference material may be a properly processed sample of known values or a commercial sample found in commercial test kits.

Qualitative parameters should be carefully identified and chosen according to the method requirements. They are substantial for the information to be obtained, e.g., verification of traceability, determination of result related inaccuracy (false positive/false negative), sensitivity and specificity, and selectivity: interferences, detection limits, unreliability area, and method robustness.

According to Eurachem definition, traceability is a characteristic of the measurement result or standard value related to reference material, usually national or international standards, through a continuing sequence of comparisons. This means that traceability can be assessed by comparison of results obtained by the reference method or by use of the reference material.

In qualitative analysis, sensitivity and specificity represent the test potential to differentiate true positive (sensitivity) from true negative (specificity) samples. High test sensitivity and specificity ensure false results to avoid. Selectivity should also be taken in consideration, as it is closely related to specificity and false positive results. Poor

fičnošću i lažno pozitivnim rezultatima. U slučaju utjecaja reagensa i matriksa uzorka govorimo o slaboj selektivnosti samog testa: što je viša selektivnost to je veća vjerojatnost identificiranja analita u uzorku. Proizvođač je također obavezan objaviti spisak kemijski sličnih supstancija koje ne izazivaju križne reakcije.

Kako je rezultat kvalitativne metode binaran, parametar mjerne nesigurnosti u kvantitativnim analizama je zamijenjen sa područjem nepouzdanosti u kvalitativnim analizama jer bolje opisuje područje u kojem postoji veća vjerojatnost pogreške. U kvalitativnim testovima s uzorkom poznate koncentracije (kalibrator/kontrola) najbolje se definira područje oko granične vrijednosti (*cut-off*: COV). Područje nepouzdanosti se definira dobivenim parametrima osjetljivosti i specifičnosti. Broj lažno (+) pozitivnih i lažno (-) negativnih rezultata možemo procijeniti modifikacijom COV, tj. smanjiti broj lažno (-) negativnih rezultata smanjenjem COV, odnosno smanjiti broj lažno (+) pozitivnih povećanjem COV. Robusnost je osnovno analitičko svojstvo kojim je opisana postojanost binarnog rezultata u odnosu na neznatne promjene eksperimentalnih uvjeta (promjena količine uzorka, pH, vremena izvođenja, temperature, postotka otapala i slično).

e-pošta: ksamosc1@gmail.com

ZR1-2

Validacija kvantitativnih kromatografskih metoda

Granić P

Zavod za farmakokinetiku i analitičku toksikologiju, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Kromatografske se metode često koriste za kvantitativne i kvalitativne analize lijekova, produkata lijekova i spojeva u biološkim tekućinama.

Validacija metode je proces kojim se metoda provjerava od strane onog tko ju je razvio ili od strane korisnika. Metode su ponovljive kada ih koriste i drugi analitičari na drugoj jednako vrijednoj opremi, u drugo vrijeme ili na drugoj lokaciji. Postupak validacije može biti učinjen u početku razvojnog ciklusa, ali može ići i dalje u obliku revalidacije ukoliko dođe do promjena u metodi.

Parametri validacije kvantitativnih kromatografskih metoda su: točnost, granica detekcije, granica kvantifikacije, linearnost, preciznost, obnovljivost, pouzdanost, stabilnost supstance, analitička specifičnost/selektivnost.

e-pošta: pgranic@kbc-zagreb.hr

test selectivity implies the impact of reagent and sample matrix, i.e. the higher the selectivity, the greater the likelihood of analyte identification in the sample. The manufacturer is also obliged to provide a list of chemically similar substances that do not induce cross reactions.

As the result of a qualitative method is binary, the parameter of measuring uncertainty in quantitative methods is substituted by the area of unreliability in qualitative analyses because it better describes the area with a higher probability of error. In qualitative tests with a sample of known concentration (calibrator/control), the area around borderline value (cut-off, COV) is best defined. The area of unreliability is defined by the sensitivity and specificity parameters obtained. The number of false (+) positive and false (-) negative results can be evaluated by modifying COV, i.e. reducing the number of false (-) negative results by COV decrease, or reducing the number of false (+) positive results by COV increase. Robustness is a basic analytical characteristic describing the stability of binary result against slight changes in experimental conditions (change in sample quantity, pH, time of performance, temperature, solvent percent, etc.).

e-mail: ksamosc1@gmail.com

ZR1-2

Validation of quantitative chromatographic methods

Granić P

Division of pharmacokinetics and analytic toxicology, Zagreb University Hospital Center, Zagreb, Croatia

Chromatographic methods are commonly used for the quantitative and qualitative analysis of drug substances, drug products and compounds in biological fluids.

Validation of a method is the process by which a method is tested by the developer or user. Methods should be reproducible when used by other analysts, on other equivalent equipment, on other days or locations. The process of validation should be early in the development cycle, but validation should be continued form of revalidation with method changes.

Parameters for validation of quantitative chromatographic method are: accuracy, detection limit and quantitation limit, linearity, precision, reproducibility range, recovery, sample solution stability, specificity/selectivity.

e-mail: pgranic@kbc-zagreb.hr

ZR1-3**Mjerna nesigurnost i validacija metoda**

Gašljević V

Hrvatsko mjeriteljsko društvo, Zagreb

U današnjemu globalnome svijetu važnost točnih, pouzdanih i usporedivih mjernih rezultata od vitalnog je značaja. Stoga i norme koje propisuju zahtjeve na rad laboratorija (ISO/IEC 17025, ISO 15189) traže mjeriteljski pristup procesu mjerenja, zahtijevajući validaciju/verifikaciju metoda, osiguranje mjeriteljske sljedivosti, poznavanje mjerne nesigurnosti, praćenje trendova u mjernim procesima i sl.

Donošenje ispravne odluke je li neka metoda prikladna za određenu svrhu (validacija) kao i realno procjenjivanje mjernih nesigurnosti mogući su samo uz dobro poznavanje mjernih procesa. „Dobrotu“ mjernog procesa određuje iznos slučajnih i sustavnih pogrešaka. Eksperimenti koje provodimo u svrhu validacije metode mogu dati dobar uvid u njihovu veličinu, ali i izvore pa stoga mogu poslužiti i pri procjenjivanju mjernih nesigurnosti. U ovome članku opisano je kako ciljana mjerna nesigurnost može utjecati na postavljanje kriterija na parametre pri validaciji metode kao što su: ponovljivost mjerenja, intermedijarna preciznost (međupreciznost), sustavna pogreška (iskorištenje) te na koji način rabiti validacijske eksperimente za procjenjivanje mjernih nesigurnosti rezultata.

e-pošta: visnja.gasljevic@hmd.t-com.hr

ZR1-4**Statistička obrada validacija u analitičkoj toksikologiji**

Nikolac N

Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb

Validacija analitičkog postupka u laboratoriju uključuje potvrđivanje netočnosti, nepreciznosti, linearnosti, utjecaja interferencija, te ukoliko je u laboratoriju prisutan paralelni analitički sustav, njihovu međusobnu usporedbu. Mjerenje netočnosti uključuje usporedbu rezultata mjerenja sa poznatim ciljnim vrijednostima. Rezultat se izražava kao postotak odstupanja (engl. *bias*) i ukazuje na postojanje sustavne pogreške. Test iskorištenja (engl. *recovery test*) kao mjera točnosti ispituje postojanje propor-

ZR1-3**Measurement uncertainty and method validation**

Gašljević V

Croatian Metrology Society, Zagreb, Croatia

In today global world accurate, reliable and traceable measurement results are of vital importance. Therefore, the standards for laboratories like ISO/IEC 17025 and ISO 15189 demand a metrological approach to measurement processes requiring validation/verification of methods, assurance of metrological traceability, knowledge of measurement uncertainty, monitoring of trends etc.

Making the right decision on whether or not a method is adequate for a stated use (validation), as well as a realistic estimation of measurement uncertainty are only possible when a measurement process is well known. Its 'goodness' is characterized in terms of the random and systematic errors that affect the measurements. Experiments conducted in order to validate a method can give good insight into their magnitude and also into their sources and therefore can be used for measurement uncertainty estimation. This article describes how target measurement uncertainty can affect the establishment of the validation criteria on method parameters like: repeatability, intermediate precision, bias and how to use validation experiments for measurement uncertainty estimation.

e-mail: visnja.gasljevic@hmd.t-com.hr

ZR1-4**Statistical analysis in validation of methods in analytical toxicology**

Nikolac N

University Department of Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Laboratory validation of analytical procedures includes confirmation of inaccuracy, imprecision, linearity, interferences and method comparison, if a parallel system is already present in the laboratory.

Inaccuracy is expressed as percentage of deviation (bias) and includes comparison of results with known target values. Bias is a measure of systematic error. Recovery test discovers proportional systematic errors by measuring samples spiked with increasing known amount of analyte.

cionalne sustavne pogreške dodavanjem poznate količine mjernog analita u uzorak.

Nepreciznost se ispituje ponovljenim mjerenjima unutar serije i između serija. Kao rezultat se za kvantitativne metode izražava srednja vrijednost, standardna devijacija i koeficijent varijacije, a za kvalitativne postotak rezultata koji odstupaju od najčešće dobivene vrijednosti. Ispitivanje nepreciznosti otkriva postojanje slučajnih pogreški.

Potvrđivanje linearnosti (samo za kvantitativne metode) uključuje mjerenje različitih koncentracija dobivenih razrjeđivanjem uzoraka, kako bi se odredio raspon koncentracija unutar kojih rezultati pokazuju linearnu međuovisnost. Podaci se analiziraju linearnom regresijom i izračunavaju se koeficijent regresije i koeficijent determinacije. Međutim, u nekim slučajevima koeficijent determinacije može biti vrlo visok (0,98), a da ovisnost nije linearna nego zvonolika, što se može uočiti prikazom reziduala.

Rezultate usporedbe dvaju paralelnih analitičkih postupaka za kvantitativne metode najčešće prikazujemo Bland-Altmanovim grafikonom i Passing-Bablok regresijom.

Postoji nekoliko načina prikaza Bland-Altmanovog grafikona, a najčešće se na apscisu nanose srednje vrijednosti mjerenja analita u uzorku dvjema metodama, a na ordinatu razlika između dva mjerenja. Ukoliko se sva mjerenja nalaze unutar $\pm 1,96$ SD, metode su podudarne. Ovaj je prikaz pogodan za otkrivanje sistemске pogreške i vrijednosti koje znatno odstupaju (engl. *outliera*).

Passing-Bablok regresija je statistički postupak usporedbe dviju varijabli, kada nije poznato koja je varijabla zavisna, a koja nezavisna. Kao rezultat izračunava se jednadžba pravca, koja je definirana koeficijentom smjera i odsječkom na osi x uz pripadajuće intervale pouzdanosti. Vrijednosti intervala pouzdanosti izuzetno su važne za interpretaciju rezultata: ako interval pouzdanosti za odsječak na osi x ne obuhvaća nulu, znači da postoji stalna razlika u mjerenjima između dviju metoda; ako interval pouzdanosti koeficijenta smjera pravca ne obuhvaća jedinicu, postoji proporcionalna razlika u mjerenjima. Također je potrebno izračunati i Pearsonov koeficijent korelacije (r). Treba imati na umu da je interpretacija koeficijenta korelacije različita u odnosu na korelacije u biološkim sustavima pa za zadovoljavajuću korelaciju dviju metoda koeficijent korelacije treba biti barem 0,95.

Ukoliko se radi međusobna usporedba dviju kvalitativnih metoda, prikaz i obrada rezultata znatno su jednostavniji. Stupanj slaganja se prikazuje kao postotak mjerenja u kojima je dobiven isti rezultat objema metodama.

Specifičnosti analitičke validacije kromatografskih metoda osim standardnih parametara uključuju određivanje i nekih dodatnih specifičnih parametara: selektivnosti, raspona mjerenja, granice kvantifikacije (engl. *limit of quantitation*, LOQ), granice detekcije (engl. *limit of detection*, LOD) i robusnosti metode.

e-pošta: nora.nikolac@gmail.com

Imprecision is determined by repeated within-run and between run measurements. For the quantitative methods, mean, standard deviation and coefficient of variation are calculated and for the qualitative methods, percentage of results that deviate from the most common result. Imprecision measurement reveals the existence of random errors.

Linearity confirmation (for quantitative methods) includes dilution measurements in order to determine concentration range with linear dependence. Results are analyzed with linear regression and coefficients of regression and determination are calculated. However, in some cases, very high coefficients of determination (0.98) could be obtained, but the dependence is not linear but curved, which could be established by calculating residuals.

Comparison of two parallel analytical procedures for quantitative methods is analyzed with Bland-Altman graph and Passing-Bablok regression.

There are several ways of presenting Bland-Altman graph. In the most commonly used approach mean values of two measurements on x-axis are plotted against the differences of two measurements on y-axis. If all measurements are within ± 1.96 SD, there is a good conformance between methods. This type of graph is suitable for detecting systematic errors and outliers.

Passing-Bablok regression is a statistical procedure for comparison of two variables in cases when it is not known which variable is dependent and which one is independent. As a result, line equation is calculated, with slope and intercept and their corresponding confidence intervals (CI). Confidence intervals are extremely important for interpreting results: if CI for intercept doesn't include value 0, there is a constant difference between measurements. Also, if CI for slope doesn't include value 1, there is a proportional difference between measurements.

Also, Pearson's coefficient of correlation should be calculated. Interpretation of correlation coefficients in analytical validation is different than in biological systems. For acceptable correlation, coefficient of correlation should be at least 0.95.

Comparison of two qualitative methods is much simpler: result is expressed as a percentage of measurements in which the same result is obtained.

Validation in analytical toxicology also includes some specific parameters: selectivity, range of measurements, limit of quantitation, limit of detection and robustness.

e-mail: nora.nikolac@gmail.com