

# Validacija hromatografskih metoda u biohemijskoj laboratoriji

asist. dr Tamara Gojković, dr Sandra Vladimirov, prof. dr Aleksandra Zeljković, prof. dr Vesna Spasojević-Kalimanovska

Katedra za medicinsku biohemiju – Farmaceutski fakultet,  
Univerzitet u Beogradu

Beograd, 2021.

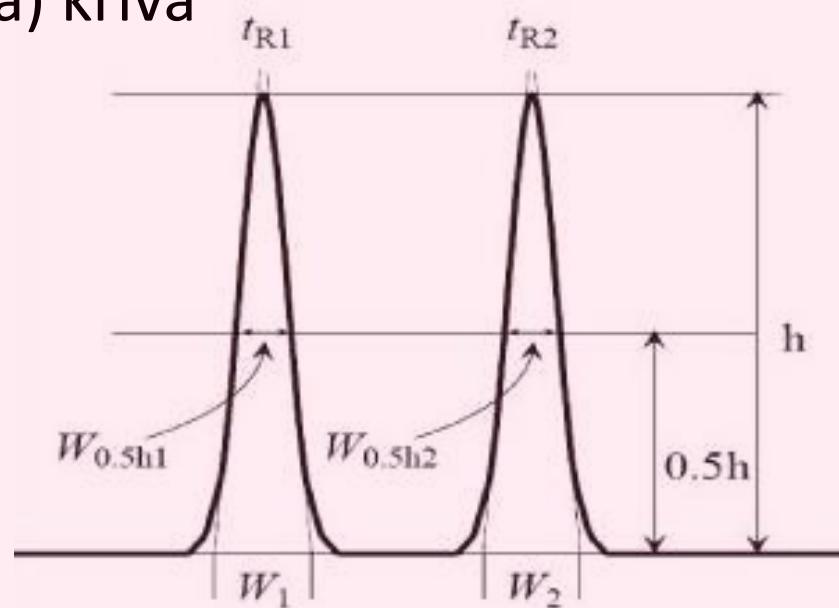
# Dimenziije i simetrija pika

IUPAC: „Physical method of separation in which the components to be separated are distributed between two phases, one of which is stationary (stationary phase) while the other (the mobile phase) moves in a definite direction“.

➤ Idealno – simetrična (Gausova) kriva

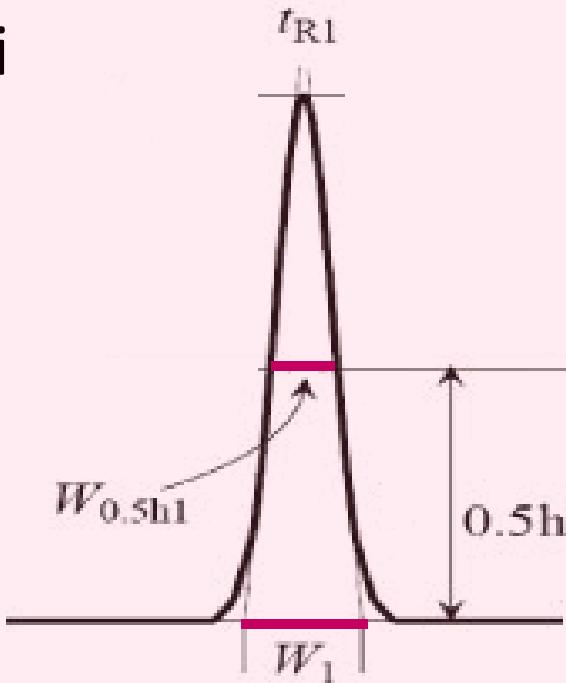
➤ Parametri pika:

- Širina
- Visina
- Površina
- Retencione vreme ( $R_t$ )



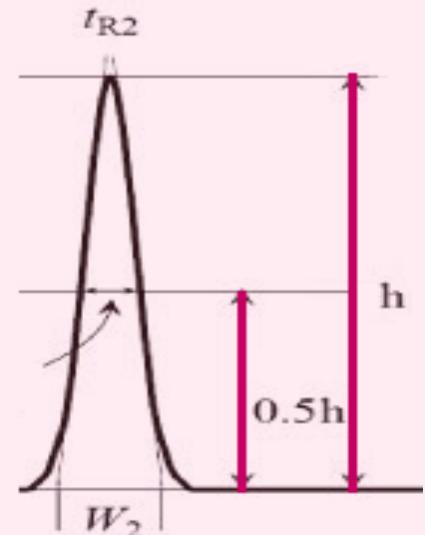
# Širina pika

- Pri baznoj liniji  $w_1$  ili na polovini visine  $w_{0,5}$
- Zavisi od:
  - ✓ Vremena zadržavanja na koloni
  - ✓ Dimenzije punjenja
  - ✓ Količine analita
  - ✓ Rastvarača
- Utiče na rezoluciju
  - Tečna hromatografija koristi punjene kolone – širi pikovi
  - Gasna hromatografija kapilarne kolone – uži pikovi

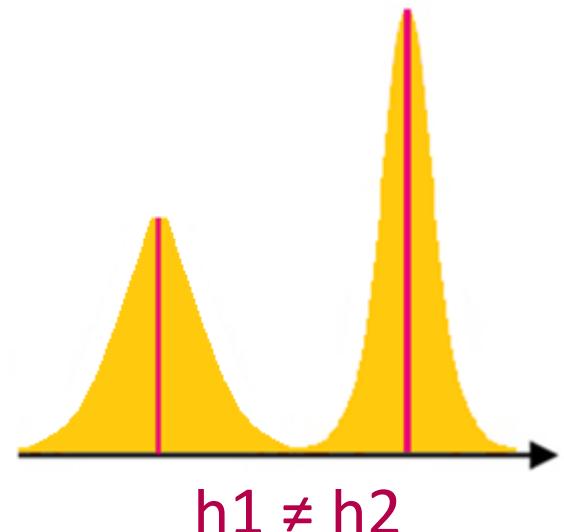


# Visina pika

- Od bazne linije (interpolacije) do vrha pika.
- Srazmerna je koncentraciji analita (retko u kvantitativnoj analizi - zavisnost nije uvek linearna).

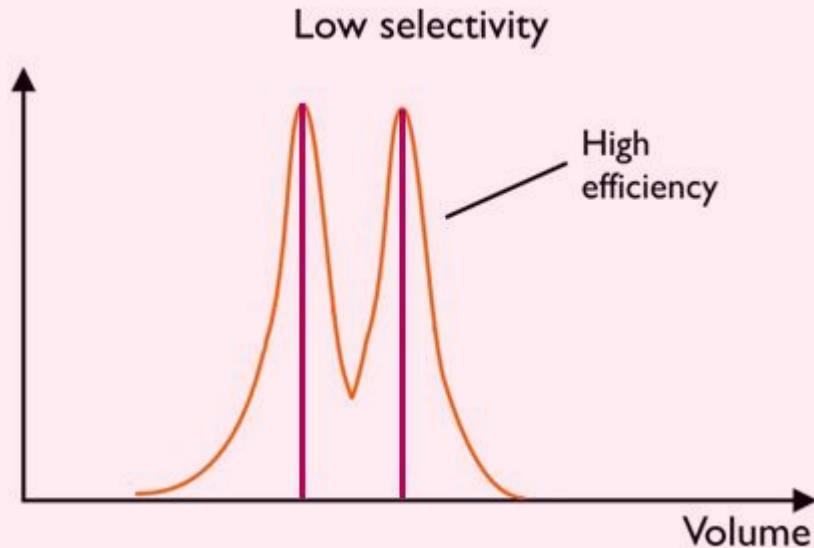
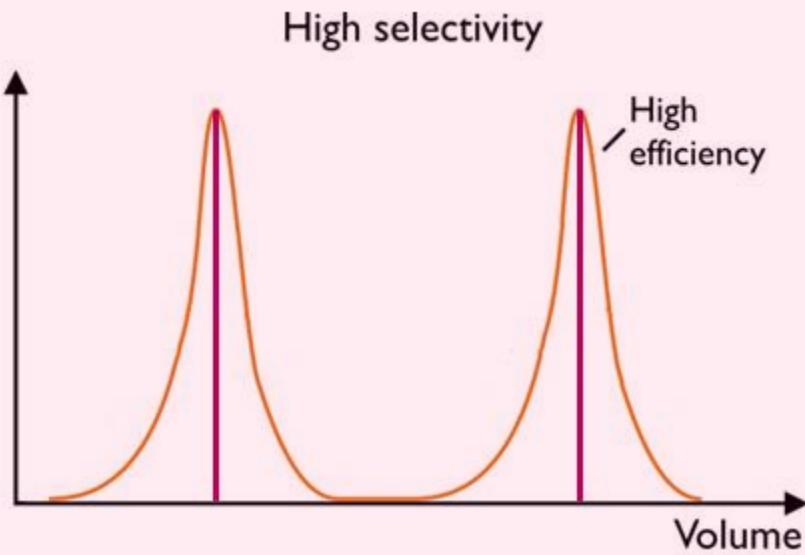


- Osetljivija na:
- preopterećenje detektora
- promene hromatografskih performansi (širenje/deformisanje pikova, stareње kolone, uticaja matriksa, preopterećenja kapaciteta, promena temperature, promene sastava mobilne faze i sl).



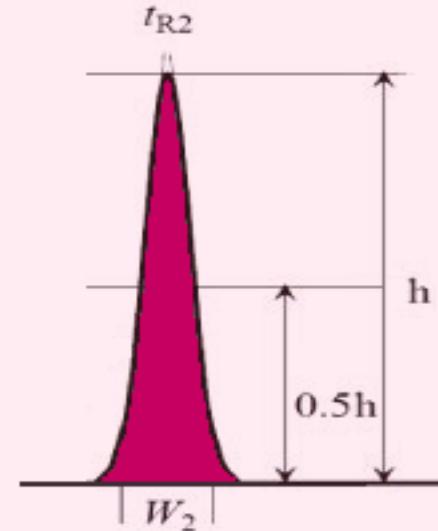
# Visina pika

- Manje osetljiva na preklapanje pikova i šum
- U slučajevima loše rezolucije može biti pogodnija i pouzdanija od površine.
- Ako preklapanje nije previše izraženo, visina pika ostaće relativno nepromenjena.
- Visina pika je pogodnija kod analize tragova (kada je S/N nizak)

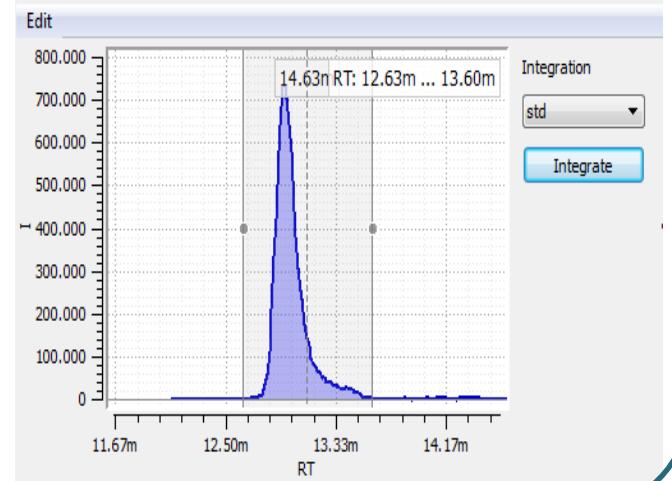


# Površina pika

- Površina pika (A) najčešće se koristi kao mera koncentracije pri kvantitativnoj analizi.
- Površina se mnogo češće koristi, naročito kada su pikovi nepravilni, širina im je promenjiva ili retencijono vreme.

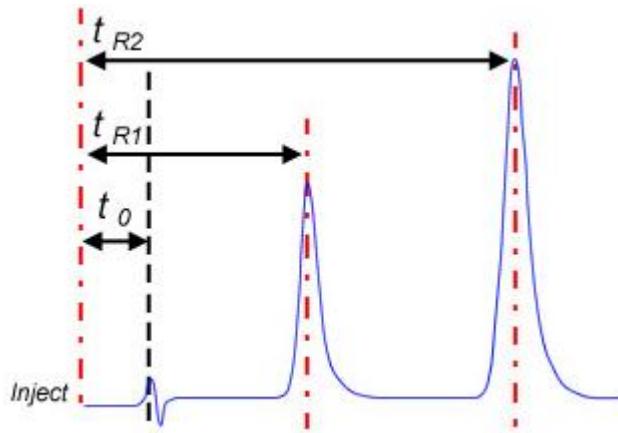


- Nekada-gravimetrijski
- Danas-standardna funkcija svih softvera



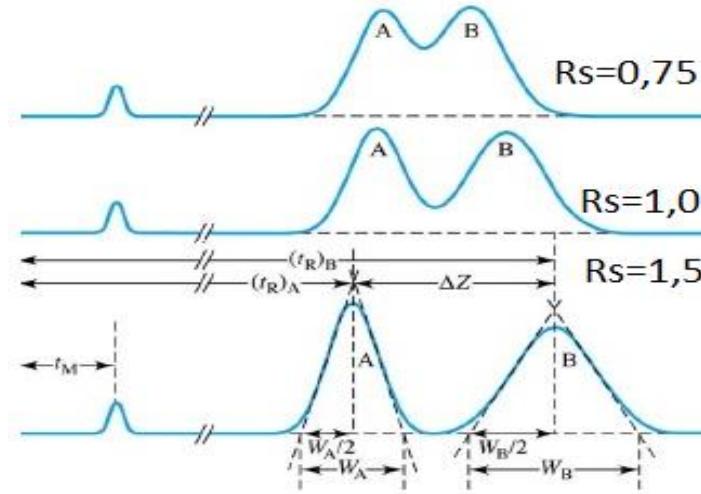
# Selektivnost i rezolucija

- *Selektivnost ( $\alpha$ )* hromatografskog sistema je merilo razlike u retencionim vremenima dva pika i opisuje koliko efikasno sistem može da razdvoji dve komponente.
- Da bi se dva jedinjenja razdvojila, neophodno je da im se koeficijenti raspodele dovoljno razlikuju
- $\alpha=1$  – preklapanje pikova
- $\alpha=\infty$  – nepotrebno duga analiza



$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

- *Rezolucija ( $R_s$ )* – Parametar koji uzima u obzir i razlike u zadržavanju i širinu pikova (za razliku od  $\alpha$ ), pa je zbog toga bolji pokazatelj kvaliteta razdvajanja.
- $R_s=0,8$  – za kvantifikaciju dva susedna pika podjednake veličine
- $R_s=1$  – postoji preklapanje
- $R_s=1,5-1,6$  – postignuto je razdvajanje pri baznoj liniji

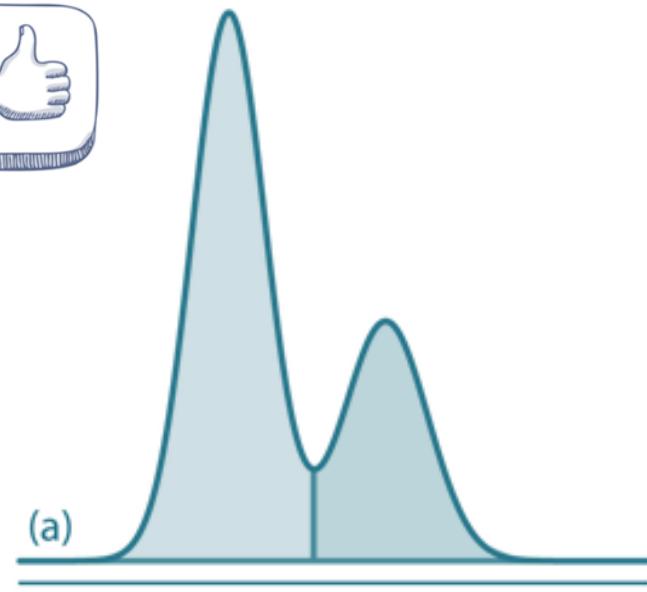


$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{(W_{b2} + W_{b1})/2}$$

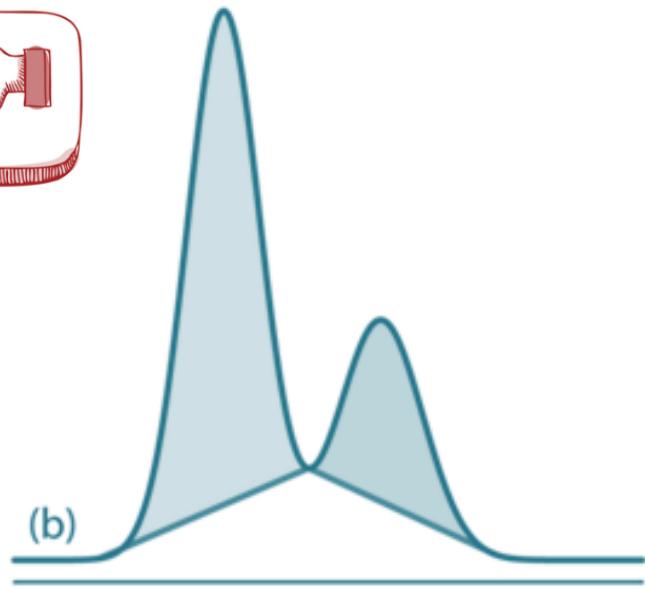
# Pravilno integraljenje pikova



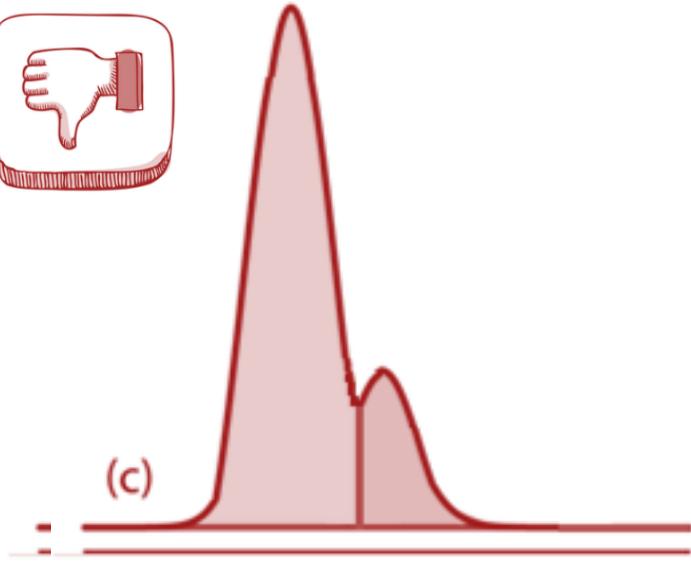
(a)



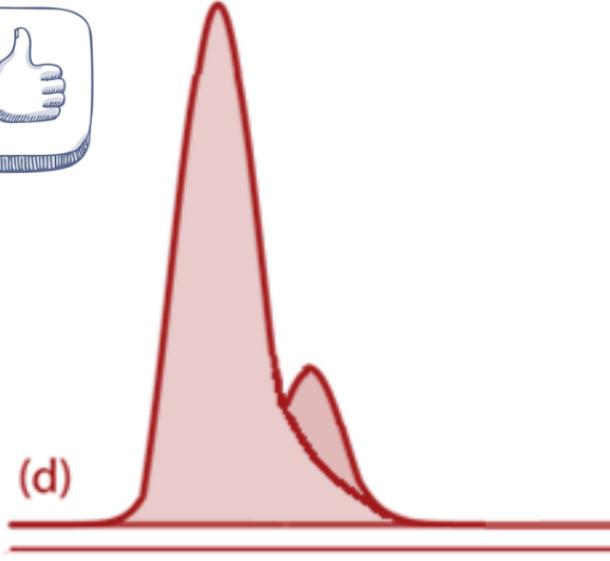
(b)



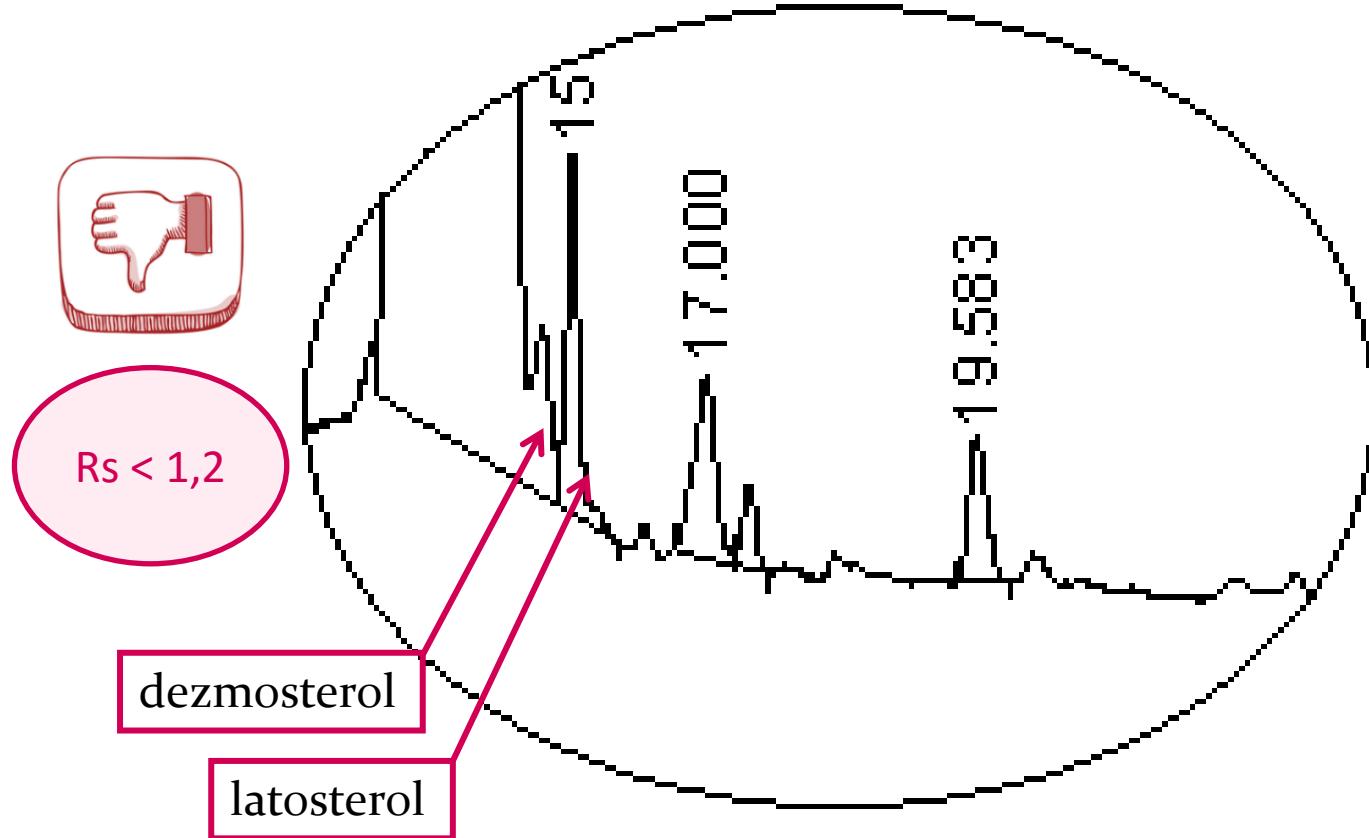
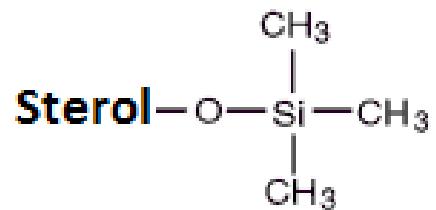
(c)



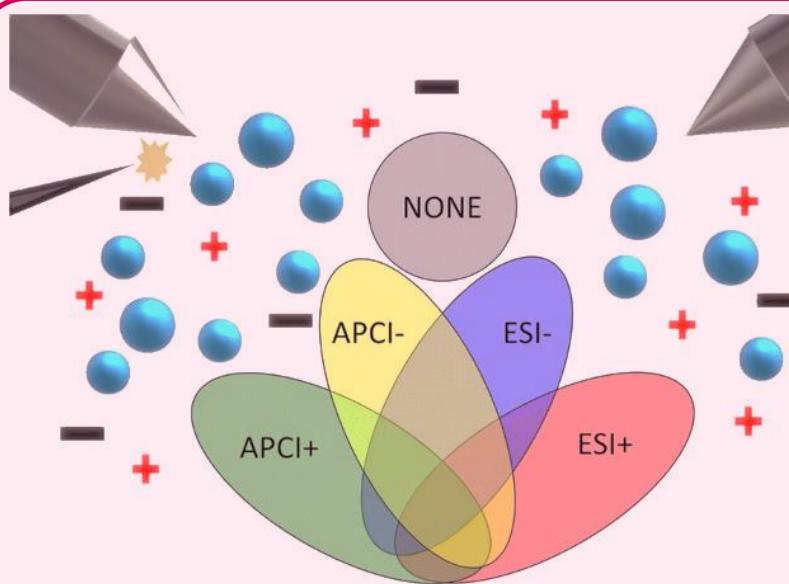
(d)



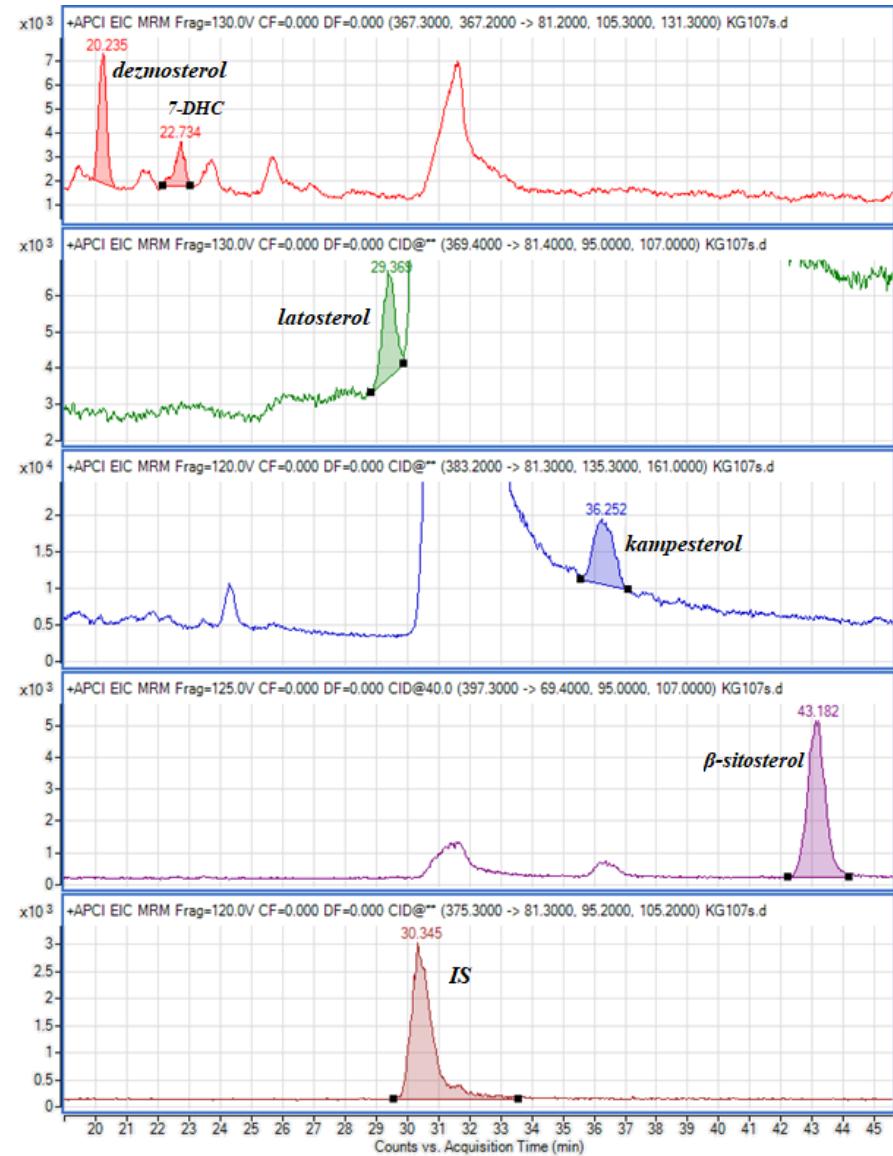
# Selektivnost i rezolucija – problemi iz prakse - GC-FID



# Selektivnost i rezolucija – problemi iz prakse - HPLC-MS/MS



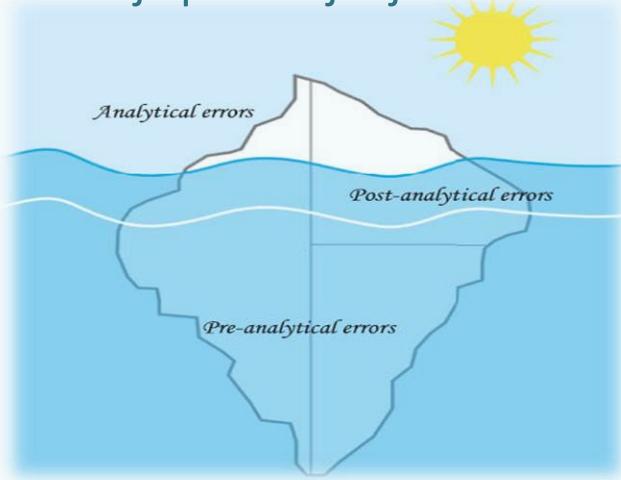
- Promena jonskog izvora
- Dužina kolone
- Promena pH mobilne faze
- Manja injekciona zapremina



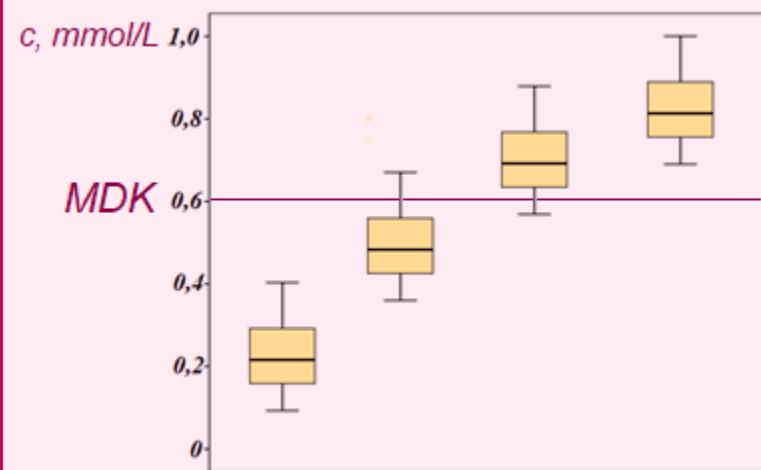
# Validacija metoda

*Absolute certainty is a privilege of uneducated minds and fanatics. - It is, for scientific folk, an unattainable ideal. – Cassius Kayser*

## Razvoj i postavljanje metode



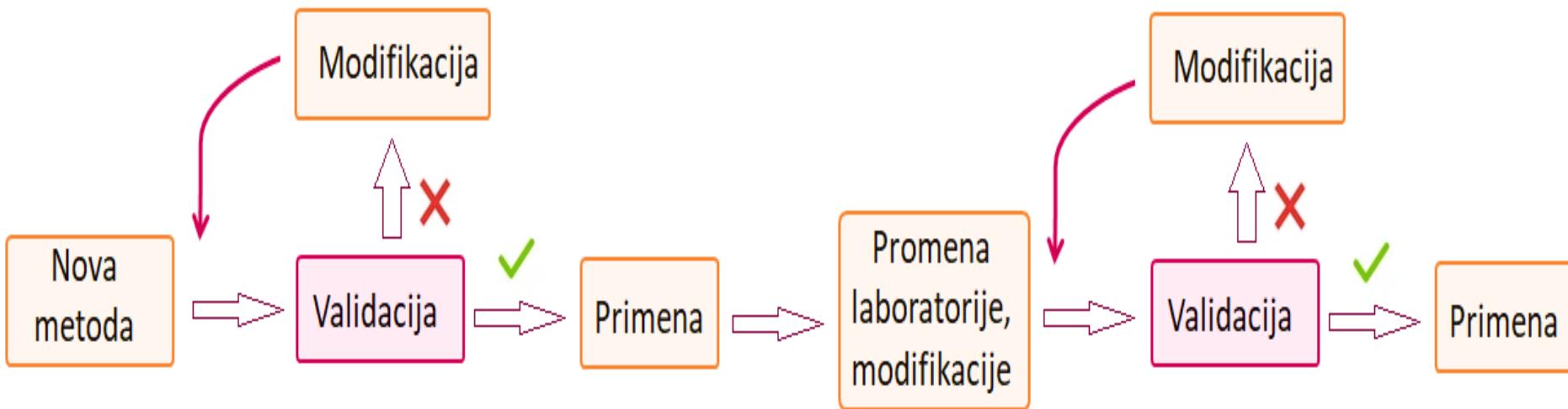
## Zakonski kriterijumi i dijagnostičke svrhe



- *Odstupanja koja nije moguće ukloniti (preanalitička i analitička):*
- Hemikalije (stepen čistoće, homogenost, priroda primesa, itd.)
- Okruženje (ambijentalni uslovi u laboratoriji – temperatura, vlažnost, itd.)
- Analitičar (grube greške, subjektivnost, itd.)
- Oprema (odstupanje kalibracija, pozadinski šum, itd.)
- Hemijske i fizičke zakonitosti (kinetika reakcije, ravnoteža, jonizacija, itd.)

# Validacione petlja

- Validacija se vrši u toku razvoja nove metode
- Stav 5.4.5.2. standarda ISO/IEC 17052 propisuje: Da bi potvrdila pogodnost metode za predviđenu upotrebu, laboratorija mora da validira nestandardne metode, metode razvijene u laboratoriji, standardne metode koje se koriste izvan predviđenog područja upotrebe, kao i proširene ili modifikovane standardne metode. (...) Ako se izvrše neke promene u validiranim nestandardnim metodama, uticaj tih promena treba dokumentovati i, ako je pogodno, treba izvršiti novu validaciju.



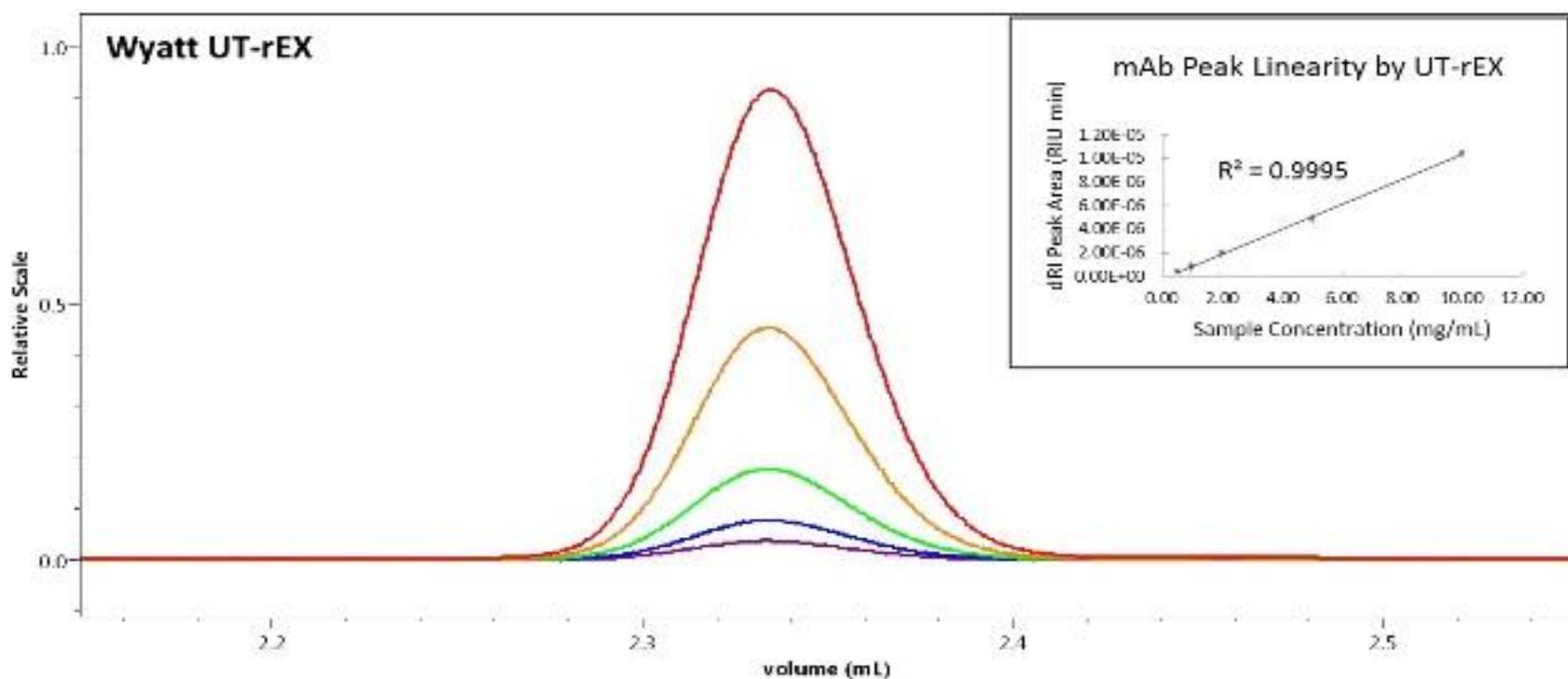
# Osnovni koraci validacije

- Eksperimentalno određivanje i statistička evaluacija
  - Ispitivanje linearnosti
  - Selektivnost i uticaj matriksa
  - Ispitivanje tačnosti i preciznosti metode
  - Određivanje LOD i LOQ vrednosti
  - Stabilnost uzorka

Bioanalytical Method  
Validation  
Guidance for Industry  
FDA

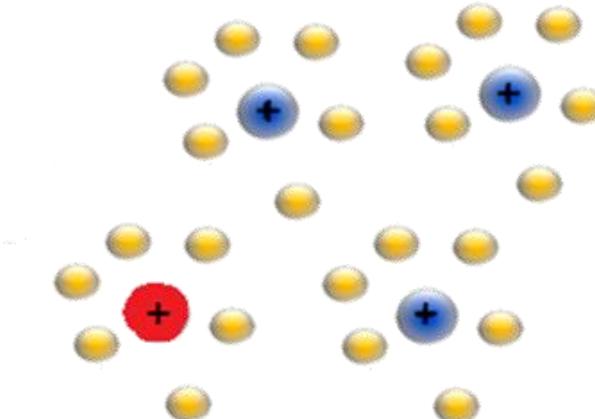
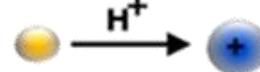
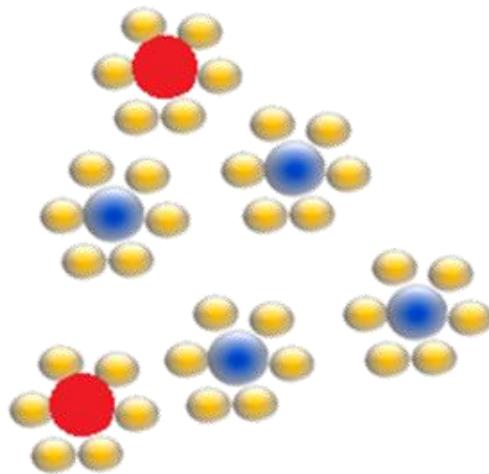
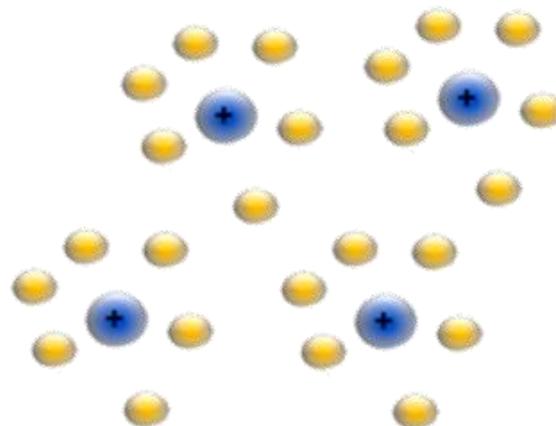
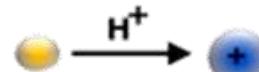
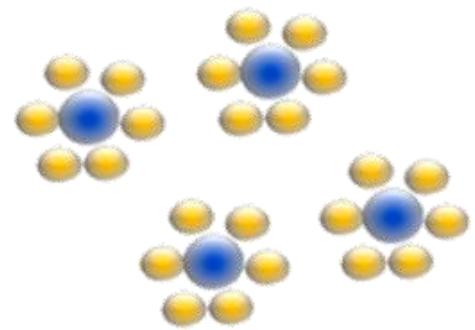
# Kvantitativna HPLC i GC analiza - linearost

- Linearost – sposobnost metode da dâ signal linearno srazmeran koncentraciji
- Rastvori poznatih koncentracija
- ST pripremljeni u *matriksu* jednakom ili sličnom *matriksu* uzorka
- Interni standard



# Selektivnost i uticaj matriksa – HPLC-MS/MS

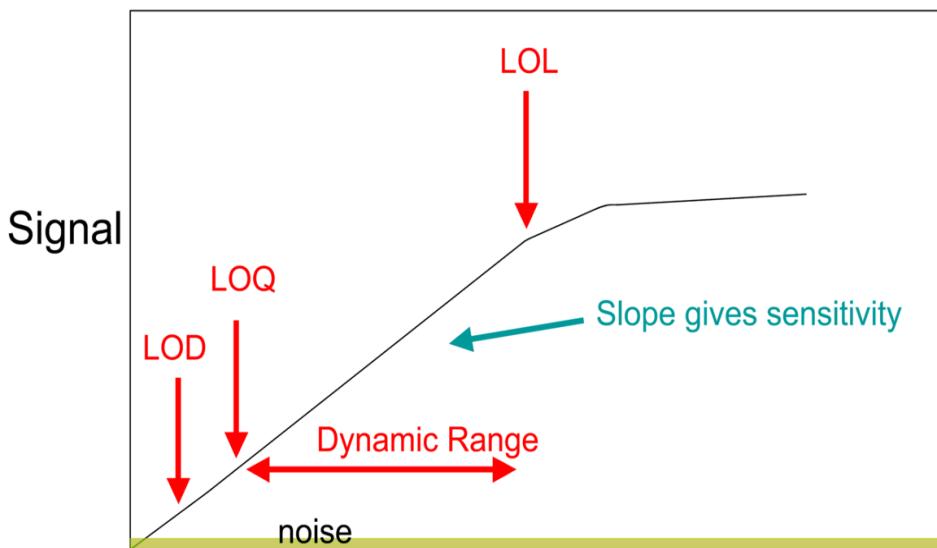
Selektivnost – merilo uticaja drugih supstanci prisutnih u uzorku na određivanje analita po dатoj proceduri.



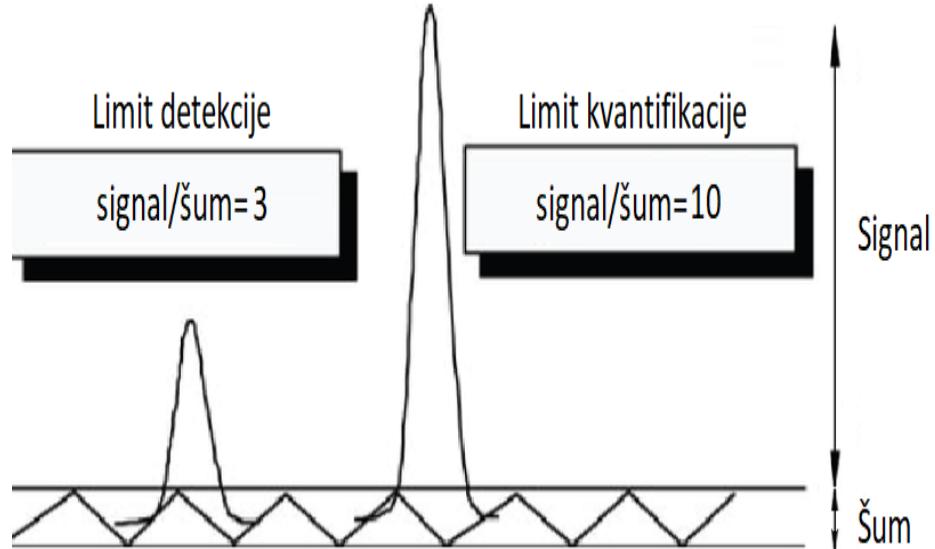
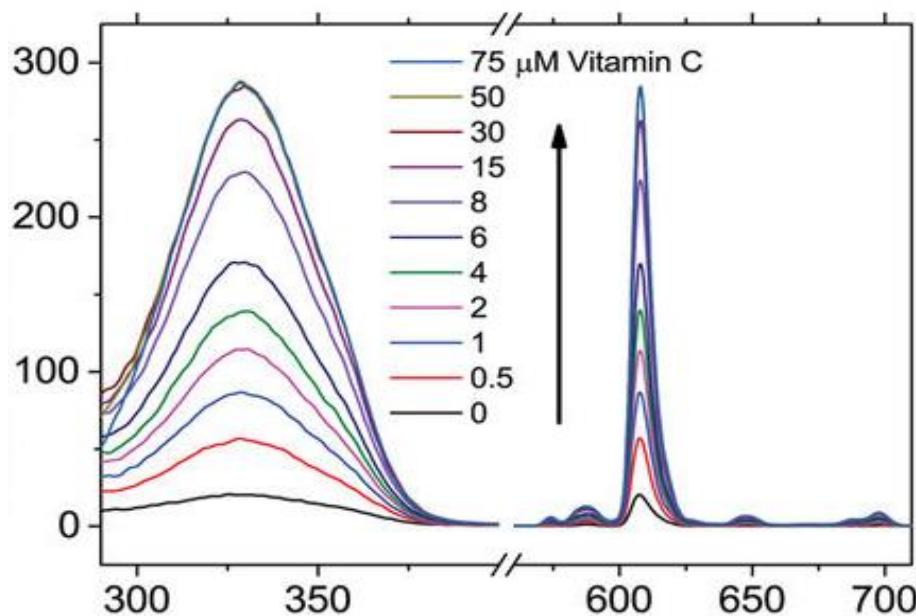
# Kvantitativna HPLC-MS/MS – efekat matriksa

Matriks	Holesterol (5 mmol/L)	BSA (0.1%)	BSA+holesterol (0.1% + 5 mmol/L)		
Metanol	1.600	0.983	1.583		
Holesterol (5mmol/L)	-	1.630	0.991		
BSA (0.1%)	-	-	1.614		
	Nagib, b(%)				
Holesterol, (mmol/L)	3.625	5	6.125	7.5	10
2.5	1.946	2.063	2.343	2.396	2.915
3.625	-	1.058	1.204	1.231	1.492
5	-	-	1.136	1.162	1.414
6.125	-	-	-	1.023	1.239
7.5	-	-	-	-	1.211

# Određivanje LOD i LOQ vrednosti



- *LOD – Limit detekcije*
- *LOQ – Limit kvantifikacije*
- *LOL – Limit linearnosti*



# Tačnost i preciznost metode

- Preciznost – rasipanje rezultata oko srednje vrednosti
- Tačnost – bliskost analizom određene vrednosti tačnoj vrednosti

## PLAZMA

Recovery

93-108%

Tačnost

## PLAZMA

$KV_{us}=2,75-9,55$

$KV_{is}=5,80-7,75\%$

Preciznost

## SERUM

Recovery

83-127%

25%



## SERUM

$KV_{us}=3,10-5,72 \%$

$KV_{is}=3,05-10,97\%$

15%

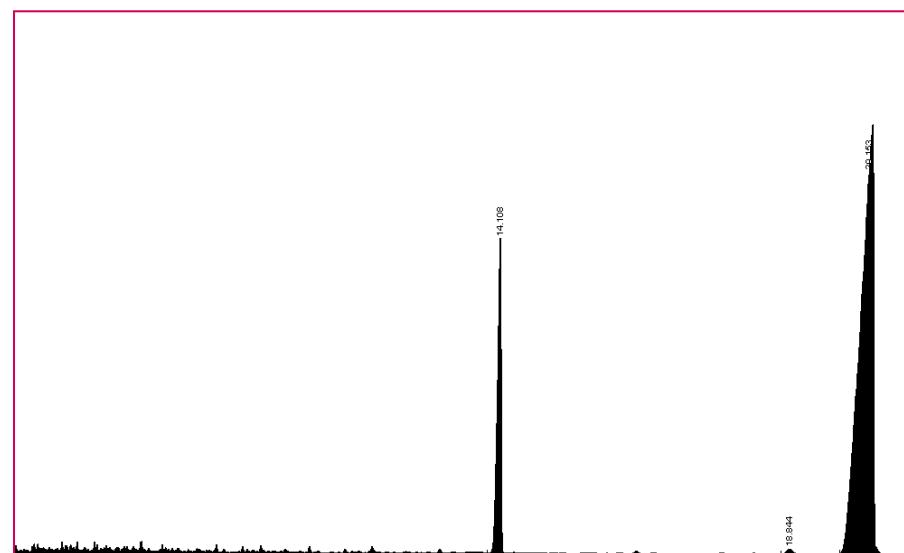
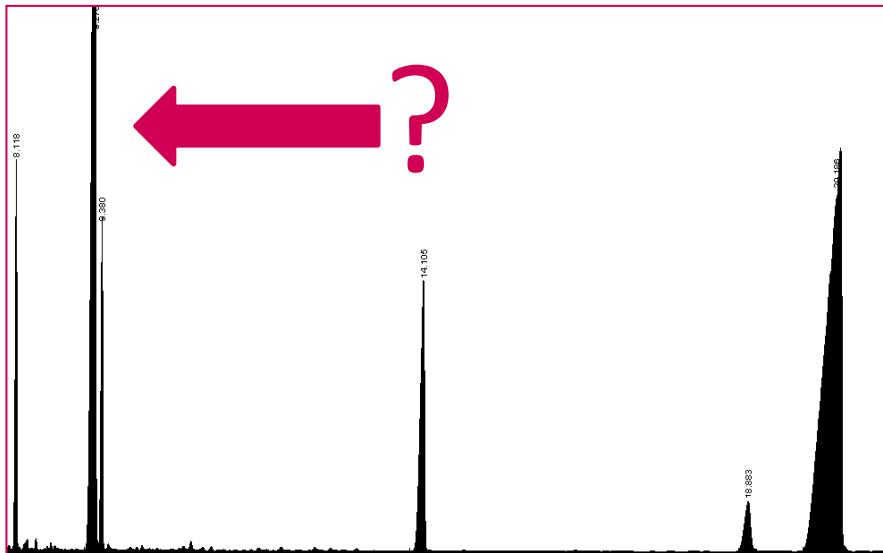


# Stabilnost uzoraka

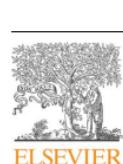
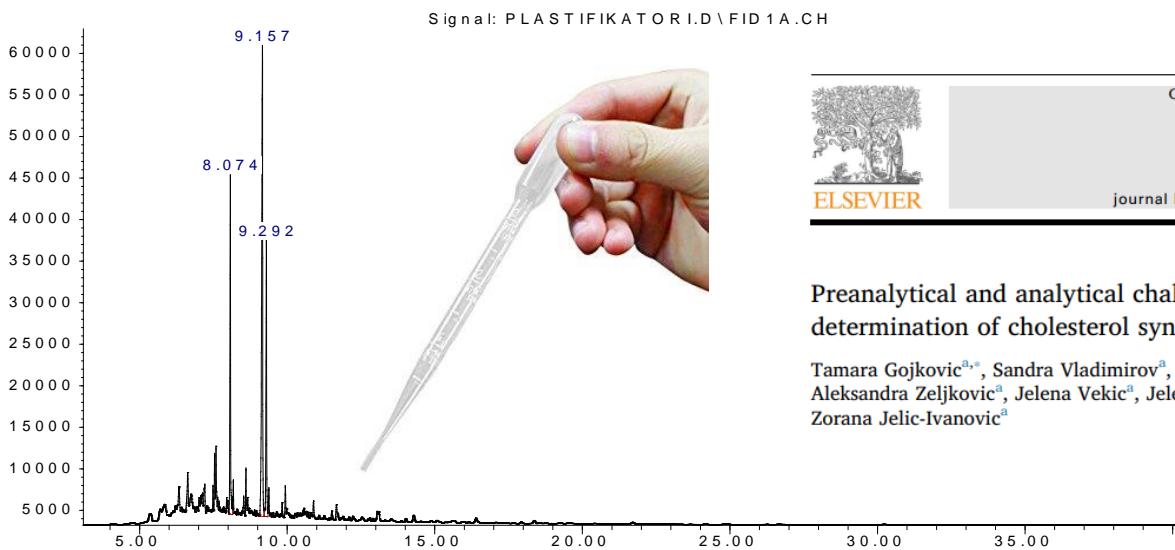
- Biomolekuli – oksidacija, fotoliza, hidroliza, mikrobijalna degradacija, denaturacija

Plazma						
NHS	1. dan	2. dan	7. dan	15. dan	30. dan	60. dan
Dezmosterol, µmol/L	13,8±0,56	14,0±0,73	14,1±0,68	14,1±0,55	13,6±0,89	13,7±0,75
Latosterol, µmol/L	13,4±0,46	13,9±0,57	14,1±0,45	13,9±0,69	13,1±0,41	13,0±0,51
Kampesterol, µmol/L	21,4±0,66	21,1±0,57	21,1±0,62	21,7±0,29	21,0±0,52	20,9±0,34
Stigmasterol, µmol/L	4,4±0,42	4,7±0,36	4,3±0,44	5,1±0,49	4,8±0,34	4,6±0,42
β-sitosterol, µmol/L	9,6±0,26	9,9±0,21	9,0±0,27	8,9±0,34	8,4±0,22	9,2±0,23

# Kvalitativna GC-FID i GC-MS analiza – problemi iz prakse



ndance



Clinica Chimica Acta 478 (2018) 74–81

Contents lists available at ScienceDirect

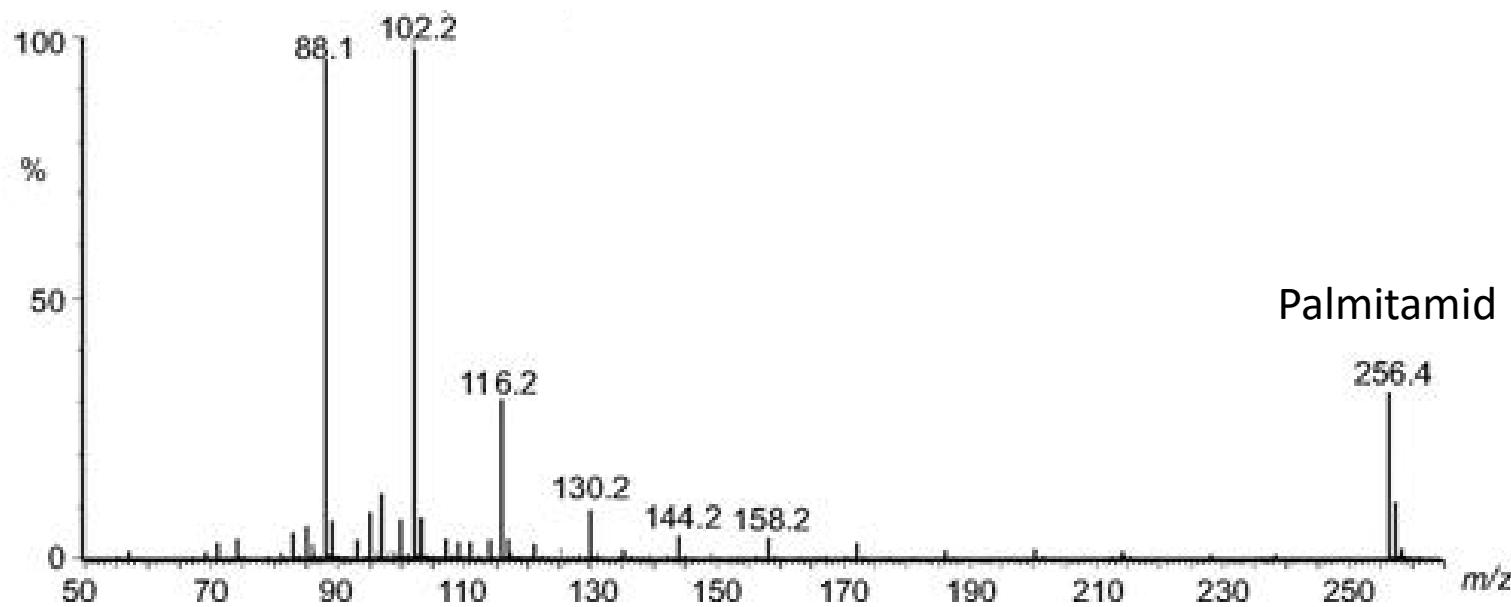
Clinica Chimica Acta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cca](http://www.elsevier.com/locate/cca)



# Kvalitativna GC-FID i GC-MS analiza – problemi iz prakse

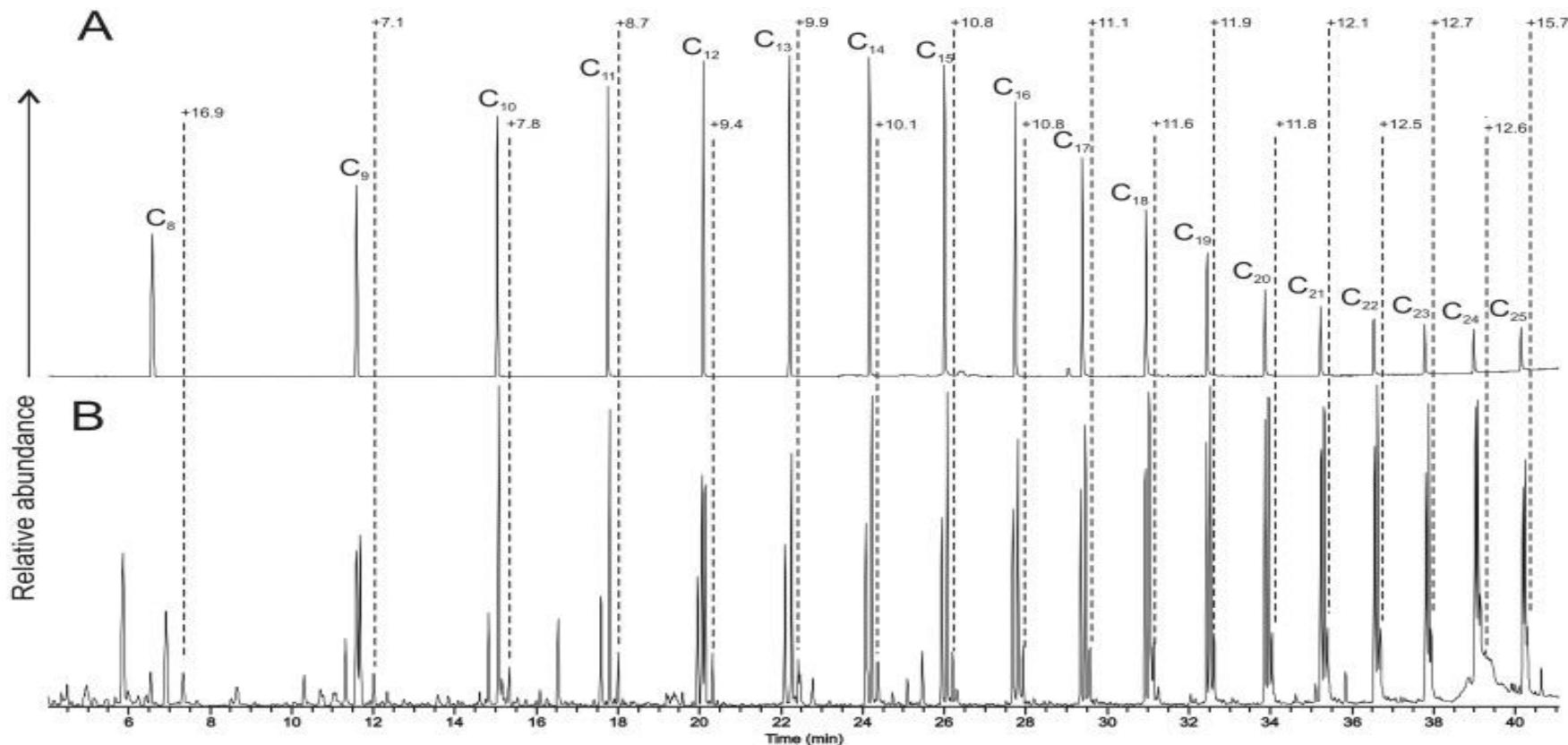
## MS spektralne biblioteke



- Poređenje masenog spektra prvog reda ( $MS^1$ ) nepoznatog jedinjenja sa referentnim spektrima iz biblioteke.
- Koriste se kondenzovani pikovi – samo karakteristični pikovi
- *NIST 17 Mass Spectral Library*
- *Wiley MS Libraries*

# Kvalitativna GC-FID i GC-MS analiza – problemi iz prakse

- Korišćenje serije homologih internih standarda
- Retencioni indeksi:
  - *n*-alkani (Kovačevi indeksi)
  - alkan-2oni (Bajkerovi indeksi)
- Robusniji su od relativnih retencionih vremena



# Hvala na pažnji!

Ne dozvolite da vam se pikovi "pojedu"

