

## STANDARDNI OPERATIVNI POSTUPAK

DATUM PRIMJENE: 20.06.2024

### NAZIV:

VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA

### SVRHA:

Opisati postupak provođenja validacije analitičkih metoda.

### UKLJUČENA PODRUČJA:

Analitički laboratoriji, Razvoj  
Kemijski i instrumentalni laboratorij, Kontrola kvalitete  
Stabilnost

### RAZLOG ZA REVIZIJU

Periodička revizija dokumenta. Promjena naziva radnih mesta. Prema ICH Q2(R2) Validation of Analytical procedures navedeno je da se intermedijarna preciznost i reproducibilnost mogu razmatrati u kontekstu jednog seta podataka; te da se u validacijskom izvještaju mogu prikazati rezultati dobiveni tijekom razvoja/provjere metode kao i tijekom validacijskih studija provedenih u sklopu drugih projekata. Dodatno opisani postupci analiza potenciometrijskom, LC-MS metodom i reološkom metodom. Dodano da se metode za mikrobiološku čistoću validiraju kako je opisano u SOP000054 „Ispitivanje pogodnosti metoda za određivanje mikrobiološke čistoće“. Kriterij za točnost za oslobađanje usklađem je s novom smjernicom ICH Q2 (R2) Validation of Analytical procedures. Kod validacije metoda u slučaju određivanja onečišćenja ponovljivost je moguće provesti na samom ispitivanom uzorku ili na uzorku placeba kojem se doda točno poznata koncentracija specificiranih onečišćenja na šest zasebno pripremljenih uzoraka.

### DEFINICIJE, OPREMA, SREDSTVA:

Odgovornost (OD) – obveza ispunjavanja određenih dužnosti, te osiguranje njihove provedbe (uz zadane uvjete). Opće odgovornosti su određene Ugovorom o radu i Opisom radnog mesta, odlukama Uprave / direktora društva Belupa d.d. i drugim općim aktima Belupa d.d., dok su posebne odgovornosti koje su vezane uz pojedine procese i druge aktivnosti, definirane u pripadajućim dokumentima.

Ovlast (OV) – ograničeno pravo uporabe resursa organizacije, poduzimanja pojedinih aktivnosti i mjera, donošenje odluka, i usmjeravanje napora ljudi u željenom pravcu. Ovlasti imaju Članovi Uprave i Direktori organizacijskih cjelina te ostali kojima je u pisanoj formi delegirana određena ovlast.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	3
2. OPIS POSTUPKA .....	3
3. Selektivnost .....	7
4. Preciznost .....	7
4.1. Preciznost mjerjenja .....	7
4.2. Intermedijarna preciznost.....	8
4.3. Reproducibilnost.....	8
5. Točnost.....	9
6. Linearnost.....	10
7. Raspon .....	11
8. Granica detekcije.....	11
9. Granica kvantifikacije .....	12
10. Robustnost.....	12
11. Stabilnost otopina .....	12
11.1. Stabilnost osnovnih otopina standarda.....	12
11.2. Stabilnost mjernih otopina.....	12
12. Utjecaj filtera .....	13
13. Testovi pogodnosti sustava.....	13
14. Faktori korekcije .....	13

## 1. UVOD

Svrha svakog analitičkog mjerenja (postupka) je dobivanje dosljednih, točnih i pouzdanih podataka. Cilj validacije analitičke metode je pokazati da je metoda pogodna za namijenjenu svrhu. Najčešći tipovi analitičkih postupaka koji se validiraju su:

- Identifikacijski testovi
- Kvantitativni testovi za određivanje sadržaja onečišćenja (npr. srodne tvari, ostatna otpala, elementna onečišćenja, nitrozaminska onečišćenja,...)
- Limit testovi za kontrolu onečišćenja
- Kvantitativna ispitivanja sadržaja djelatne tvari ili neke druge odabrane komponente u sirovinama ili gotovim oblicima
- Testovi ispitivanja oslobađanja djelatne tvari
- Testovi određivanja veličine čestica

Metode za mikrobiološku čistoću validiraju se kako je opisano u SOP000054 „Ispitivanje pogodnosti metoda za određivanje mikrobiološke čistoće“.

## 2. OPIS POSTUPKA

DIJAGRAM TOKA I OPIS AKTIVNOSTI	NOSITELJ AKTIVNOSTI (OV/OD)	ULAZNI DOKUMENTI	IZLAZNI DOKUMENTI
<p style="text-align: center;">1 IZRADA VALIDACIJSKOG PROTOKOLA</p> <p>Protokol o validaciji metode je detaljno opisan postupak određivanja svakog pojedinog parametra validacije sa definiranim kriterijima prihvatljivosti koje svaki parametar mora zadovoljiti. Protokol o validaciji metode mora biti odobren prije početka validacijske studije. Protokol se izrađuje prema radnoj uputi RUP000311 „Izrada protokola za validaciju analitičkih metoda“. Parametri koji se ispituju tijekom validacije metode ovise o vrsti i namjeni metode.</p> <p>Napomena: parametri koji se ispituju tijekom validacije metode navedeni su u tablici 1 i 2, i detaljno su opisani u tekstu ovog SOP-a.</p>	tehničar specijalist I.tehničar specijalist II/ specijalist analitičar, stručnjak analitičar/vodeći stručnjak analitičar, voditelj tima za analitiku/ voditelj službe(OD), odgovorna osoba iz Razvoja (OV), odgovorna osoba iz Upravljanja kvalitetom (OV)	Radna analitička metoda (WAPDP, wAPA ili wAPE), radna uputa RUP000311 “Izrada protokola za validaciju analitičkih metoda“	Protokol za validaciju analitičke metode (PMVP, PMVA ili PMVE)

DIJAGRAM TOKA I OPIS AKTIVNOSTI	NOSITELJ AKTIVNOSTI (OV/OD)	ULAZNI DOKUMENTI	IZLAZNI DOKUMENTI
<p style="text-align: center;"><b>2</b> <b>POSTUPAK VALIDACIJE ANALITIČKE METODE PREMA ODOBRENOM VALIDACIJSKOM PROTOKOLU</b></p> <p>U laboratoriju se provode analize prema odobrenom validacijskom protokolu.</p>	viši tehničar/ tehničar specijalist I, tehničar specijalist II/ specijalist analitičar, stručnjak analitičar/vodeći stručnjak analitičar, voditelj tima za analitiku (OD)	Protokol za validaciju metode	rezultati navedeni u dnevniku rada analitičara, PEO obrascima, CDS Empower, Excel tablice
<p style="text-align: center;"><b>3</b> <b>PROCJENA SVIH REZULTATA DOBIVENIH TIJEKOM VALIDACIJSKE STUDIJE</b></p> <p>Nakon provedenih svih analiza prema validacijskom protokolu, donosi se odluka o uspješnosti provedene validacije. Ukoliko su rezultati za sve parametre unutar zahtjeva propisanih protokolom, pristupa se izradi validacijskog izvještaja prema radnoj uputi RUP000402 „Izrada izvještaja o validaciji analitičkih metoda“. Ukoliko se za barem jedan od parametara dobije rezultat izvan kriterija propisanih protokolom, dobiveni rezultat se istraži prema SOP000031 „Laboratorijsko istraživanje rezultata izvan specifikacije (OOS) i ostalih neočekivanih rezultata u odjelu Analitički laboratoriji“, a ukoliko je potrebno modificira se radna metoda prema SOP000030 „Razvoj analitičkih metoda“, te provesti revalidaciju metode.</p> <p>Napomena: Osim u slučaju modifikacije analitičke metode, revalidacija metode provodi se i u slučaju promjene sastava gotovog proizvoda, u nekim slučajevima i promjene procesa proizvodnje, promjene puta sinteze djelatne tvari, itd. Parametri koji se ispituju tijekom revalidacije metode ovise o utjecaju promjena na analitičku metodu. U validacijskom protokolu se navode parametri koji će se ponovno ispitivati i obrazloženje koji neće.</p>	specijalist analitičar, stručnjak analitičar/vodeći stručnjak analitičar, voditelj tima za analitiku (OD)	rezultati navedeni u dnevniku rada analitičara, PEO obrascima, CDS Empower, Excel tablice	n/p

DIJAGRAM TOKA I OPIS AKTIVNOSTI	NOSITELJ AKTIVNOSTI (OV/OD)	ULAZNI DOKUMENTI	IZLAZNI DOKUMENTI
<p style="text-align: center;"><b>4 IZRADA VALIDACIJSKOG IZVJEŠTAJA</b></p> <p>Nakon završetka eksperimentalnog dijela validacijske studije izrađuje se izvještaj o validaciji analitičke metode prema RUP000402 „Izrada izvještaja o validaciji analitičkih metoda“ koji sadrži sumirane rezultate validacije, podatke o korištenim kemikalijama, standardima, instrumentima, kriterije prihvatljivosti i zaključke o prihvatljivosti pojedinih parametara. Validacija analitičke metode završava odobrenjem izvještaja o validaciji analitičke metode.</p>	Specijalist analitičar, stručnjak analitičar/vodeći stručnjak analitičar, voditelj tima za analitiku/ voditelj službe (OD), odgovorna osoba iz Razvoja (OV), odgovorna osoba iz Upravljanja kvalitetom (OV)	Protokol za validaciju metode, izvještaji koji uključuju rezultate za pojedine validacijske parametre	Izvještaj o validaciji analitičke metode (AMVP, AMVA, AMVE)  Verificirana radna metoda

Tablica 1: Smjernice o parametrima validacije metode za analizu supstancije

Tip metode	T <sub>O</sub>	L <sub>I</sub>	R <sub>E</sub>	I <sub>P</sub>	S <sub>E</sub>	G <sub>D</sub>	G <sub>K</sub>	S <sub>s</sub>	R <sub>B</sub>
Identifikacija:					+				
- spektroskopija					+				
- kromatografija					+				
- kemijske reakcije					+				
Fizikalno-kemijske analize:		+	+	+					+
- veličina čestica		+	+	+					+
Kationi/anioni:									
- ion selektivne elektrode	+	+	+	+	+	+	+		
- atomska spektroskopija	+	+	+	+	+	+	+		
Onečišćenja (kvantitativno):									
- U/HPLC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- ICP-MS	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- GC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- LC-MS	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voda:									
- KF titracija	+		+						
Sadržaj:									
- titracija	+	+	+	+					+
- spektrofotometrija	+	+	+	+	+				+
- kromatografija	+	+	+	+	+			+	+

Skraćenice:

T<sub>O</sub> = točnost

L<sub>I</sub> = linearnost

R<sub>E</sub> = ponovljivost

I<sub>P</sub> = intermedijarna preciznost

S<sub>E</sub> = selektivnost

G<sub>D</sub> = granica detekcije

G<sub>K</sub> = granica kvantifikacije

R<sub>B</sub> = robustnost

S<sub>s</sub> = pogodnost sustava (system suitability test)

Tablica 2: Smjernice o parametrima validacije metode za analizu gotovog proizvoda

<b>Tip metode</b>	<b>O</b>	<b>T<sub>O</sub></b>	<b>L<sub>I</sub></b>	<b>R<sub>E</sub></b>	<b>I<sub>P</sub></b>	<b>S<sub>E</sub></b>	<b>G<sub>D</sub></b>	<b>G<sub>K</sub></b>	<b>S<sub>s</sub></b>	<b>R<sub>B</sub></b>
Identifikacija spektroskopski kromatografski						+				
Fizikalno-kemijske analize: čvrstoča tableta raspadljivost oslobađanje djelat. tvari - trenutno - modificirano	+								+	+
	+								+	+
Onečišćenja (kvanitativno): - ICP-MS - U/HPLC - GC - LC-MS										
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sadržaj konzervansa/antioksidansa: UV/VIS kromatografija									+	+
	+	+	+	+	+	+			+	+
	+	+	+	+	+	+			+	+
Sadržaj aktivne komponente: UV/VIS kromatografija									+	+
	+	+	+	+	+	+			+	+
	+	+	+	+	+	+			+	+

Skraćenice:

O = ništa

T<sub>O</sub> = točnost

L<sub>I</sub> = linearnost

R<sub>E</sub> = ponovljivost

I<sub>P</sub> = intermedijarna preciznost

S<sub>E</sub> = selektivnost

G<sub>D</sub> = granica detekcije

G<sub>K</sub> = granica kvantifikacije

R<sub>B</sub> = robustnost

S<sub>s</sub> = pogodnost sustava (system suitability test)

Najčešći parametri koji se ispituju tijekom validacije metoda su:

Selektivnost (Selectivity)

Preciznost (Precision)

- Preciznost mjerena
- Ponovljivost (Repeatability)
- Intermedijarna preciznost (Intermediate precision)
- Reproducibilnost (Reproducibility)

Točnost (Accuracy)

Linearost (Linearity)

Raspon (Range)

Granica detekcije (Limit of Detection, LOD)

Granica kvantifikacije (Limit of Quantification, LOQ)

Robustnost (Robustness)

Utjecaj filtera

Stabilnost otopina

- Stabilnost osnovnih otopina standarda
- Stabilnost mjernih otopina

Testovi pogodnosti sustava (System Suitability Tests)

## Faktori korekcije

### 3. Selektivnost

Selektivnost metode je mogućnost nedvosmislenog određivanja analita u prisustvu potencijalnih komponenata uzorka, npr. onečišćenja, razgradnih produkata, drugih komponenata formulacije, itd.

Kod kromatografskih metoda selektivnost se ispituje snimanjem kromatograma diluenta, otopina standarda, uzorka i otopine koja sadrži sve ostale (potencijalne) komponente uzorka osim analita. U slučaju kad uzorak ne sadrži komponente koje se određuju, npr. onečišćenja ili ostatna otapala, ispitivanje selektivnosti se provodi na način da se u uzorak doda poznata količina analita i potom snime kromatogrami. Selektivnost LC-MS metode u slučaju kad je analit nitrozodimetilamin (NDMA), ispitaj snimanjem kromatograma dimetilformamida.

Selektivnost HPLC-UV metoda za kvantitativna ispitivanja sadržaja djelatne tvari i određivanje sadržaja onečišćenja u sirovinama ili gotovim oblicima dodatno se ispituje prisilnom razgradnjom djelatne tvari i placebo u kiselim, lužnatim, oksidirajućim i fotolitičkim uvjetima. Uzorci djelatne tvari i placebo pripremaju se zagrijavanjem na 90°C pod povratnim hladilom u 0,5M HCl, 0,5M NaOH i 3% vodikovom peroksidu. Uzorci se neutraliziraju u određenom vremenskom intervalu, ovisno o stabilnosti, tj. dok nije postignut raspad 10 % - 30 % djelatne tvari. Za nestabilne supstancije kod kojih je uočen raspad veći od 30 %, koncentracija korištenih otapala, temperatura i vrijeme se po potrebi trebaju korigirati da se postigne odgovarajuća degradacija. Potencijalni fotolitički produkti se ispituju izlaganjem djelatne tvari, placebo i gotovog oblika svjetlosti u komori za ispitivanje fotostabilnosti pri minimalno 200 W m<sup>-2</sup> i 1,2 × 10<sup>6</sup> lux sati. Tako tretirani uzorci analiziraju na HPLC-DAD sistemu, a pikovima analita odredi se njihova čistoća. Ukoliko se ni nakon 6 h hidrolitičkog razaranja i primanja svjetlosti od 1,2 × 10<sup>6</sup> lux sati ne postigne navedeni nivo raspada, supstancija se smatra stabilnom pri testiranim uvjetima.

Kod UV-VIS metoda selektivnost se određuje snimanjem spektara i mjerjenjem apsorbancije otopina standarda, uzorka i otopine koja sadrži sve ostale komponente uzorka osim analita kod određene valne duljine.

Kod ICP-MS metoda selektivnost je osigurana samim dizajnom uređaja koji je opremljen univerzalnom kvadrupolnom kolizijsko/reakcijskom čelijom koja može raditi u dva načina: standardno bez plina i kolizijski s nereaktivnim plinom (helij). Primjenom kolizijskog načina rada eliminiraju se prisutne interferencije. Selektivnost metode se dokazuje provjerom njene točnosti.

### 4. Preciznost

#### 4.1. Preciznost mjerena

Preciznost mjerena određuje se na najmanje jednoj otopini standarda iz najmanje pet mjerena usporedbom odgovora detektora (površina, visina pika ili K vrijednost) kod kromatografskih metoda ili usporedbom izmjerene apsorbancije kod spektrofotometrijskih metoda.

Kod metoda za određivanje raspodjele veličine čestica tehnikom laserske difrakcije preciznost mjerena ispituje se određivanjem ponovljivosti mjerena.

#### 4.2. Ponovljivost

Ponovljivost izražava preciznost pod istim radnim uvjetima u kratkom vremenskom razdoblju. Ponovljivost se kod određivanja sadržaja onečišćenja, sadržaja djelatne tvari, određivanja raspodjele veličine čestica ili neke druge odabrane komponente u sirovini ili gotovim oblicima određuje na šest zasebno pripremljenih uzoraka, kod određivanja ujednačenosti sadržaja djelatne tvari na deset uzoraka, a kod testova oslobađanja na dvanaest uzoraka (dva oslobađanja). Kod validacije metoda za određivanje srodnih tvari ili ostatnih otapala ispitivanje ponovljivosti moguće je provesti i dodavanjem poznatih onečišćenja/otapala u ispitivani uzorak

u koncentracijama specifikacijskih limita. Ovaj postupak se preporuča provesti u slučajevima kada u uzorku nisu detektirana onečišćenja ili su količine ispod limita kvantifikacije metode.

Kod validacije metoda u slučaju određivanja onečišćenja ponovljivost je moguće provesti na samom ispitivanom uzorku ili na uzorku placebo kojem se doda točno poznata koncentracija specificiranih onečišćenja na šest zasebno pripremljenih uzoraka.

Kod ICP-MS metoda ponovljivost se ispituje na 6 neovisnih priprema uzoraka kojima su dodani standardi elementnih onečišćenja kod definiranog koncentracijskog nivoa.

Kod potenciometrijske titracije ponovljivost se ispituje na 6 neovisnih pripremljenih ispitivanih otopina.

Kod LC-MS metoda, u slučajevima kada u uzorku nisu detektirana onečišćenja ili su količine ispod limita kvantifikacije metode, ispitivanje ponovljivosti provedi dodavanjem poznatih onečišćenja u ispitivani uzorak u koncentracijama specifikacijskih limita.

Kod reoloških mjerena ponovljivost određuje se mjeranjem viskoznosti uzoraka iz 6 pojedinačnih primarnih spremnika.

#### **4.3. Intermedijarna preciznost**

Intermedijarna preciznost označava promjene unutar laboratorija, npr. provedba analize drugi dan koju provodi drugi analitičar koristeći drugu opremu. Intermedijarna preciznost se određuje kod određivanja sadržaja onečišćenja, sadržaja djelatne tvari, određivanja raspodjele veličine čestica ili neke druge odabrane komponente u sirovini ili gotovim oblicima na šest zasebno pripremljenih uzoraka, kod određivanja ujednačenosti sadržaja djelatne tvari na deset uzoraka, a kod testova oslobođanja na dvanaest uzoraka (dva oslobođanja). Za analizu se koristi druga oprema, npr. druga kolona, drugi HPLC sustav, drugi aparat za ispitivanje oslobođanja, itd., i analizu provodi drugi analitičar drugi dan od ispitivanja ponovljivosti. Kod određivanja srodnih tvari ili ostalih otapala ispitivanje intermedijarne preciznosti moguće je provesti i dodavanjem poznatih onečišćenja ili otapala u ispitivani uzorak u koncentracijama specifikacijskih limita. Ovaj postupak se preporuča provesti u slučajevima kada su u uzorku detektirane količine onečišćenja ispod limita kvantifikacije metode. Kod kromatografskih onečišćenja, kromatogrami dobiveni kod ispitivanja ponovljivosti i intermedijarne preciznosti moraju biti slični, tj. ne smije biti pojave novih odnosno nestanka pikova (onečišćenja iznad LOQ vrijednosti).

Kod validacije metoda u slučaju određivanja onečišćenja ponovljivost je moguće provesti na samom ispitivanom uzorku ili na uzorku placebo kojem se doda točno poznata koncentracija specificiranih onečišćenja na šest zasebno pripremljenih uzoraka.

Kod ICP-MS metoda intermedijarna preciznost se ispituje na 6 neovisnih priprema uzoraka kojima su dodani standardi elementnih onečišćenja kod definiranog koncentracijskog nivoa, a analizu provodi drugi dan drugi analitičar.

Kod potenciometrijske titracije intermedijarnu preciznost odredi titracijom na 6 neovisno pripremljenih ispitivanih otopina. Analize provodi drugi analitičar drugi dan od ispitivanja ponovljivosti.

Kod LC-MS metoda, u slučajevima kada u uzorku nisu detektirana onečišćenja ili su količine ispod limita kvantifikacije metode, ispitivanje provedi dodavanjem poznatih onečišćenja u ispitivani uzorak u koncentracijama specifikacijskih limita. Za analizu se koristi druga kolona i analizu provodi drugi analitičar drugi dan od ispitivanja ponovljivosti.

Kod reoloških mjerena, intermedijarna preciznost određuje se mjeranjem viskoznosti uzoraka iz 6 pojedinačnih primarnih spremnika. Analize provodi drugi analitičar, drugi dan od ispitivanja ponovljivosti.

#### **4.4. Reproducibilnost**

Reproducibilnost izražava preciznost između laboratoriјa. Ovaj parametar je opcionalan i ukoliko se njegovo ispitivanje ne definira u protokolu za validaciju analitičke metode ispituje se naknadno prilikom prijenosa (transfera) metode iz ishodišnog laboratoriјa (vlasnika metode) u

odredišni laboratorij SOP000019 „Prijenos analitičkih metoda koje su validirane u Belupu“. Ukoliko je ovaj parametar ispitani između dvaju laboratorijskih (ishodišnog i odredišnog) tijekom validacije metode, nije potrebno provoditi prijenos metode između tih laboratorijskih. Reproducibilnost se kod određivanja sadržaja onečišćenja, sadržaja djelatne tvari ili neke druge odabrane komponente u gotovim oblicima određuje na najmanje šest zasebno pripremljenih uzoraka, kod određivanja ujednačenosti sadržaja djelatne tvari na deset uzoraka, kod testova oslobađanja na najmanje dvanaest uzoraka u drugom laboratoriju. Nakon odobrenja, kontrolirana kopija validacijskog protokola i metoda dostavljaju se u odredišni(e) laboratorij(e) koji sudjeluju u validaciji metode. Provjereni i odobreni rezultati analize odredišnog(ih) laboratorijskih dostavljaju se u ishodišni laboratorij putem e-maila ili kao kopije analitičkih izvješća autoru validacijskog protokola. Ukoliko rezultati odredišnog laboratorijskog postupa ne zadovoljavaju postavljenje kriterije za reproducibilnost postupa se prema proceduri u slučaju neuspjelog prijenosa metode opisnoj u SOP-u SOP000019 „Prijenos analitičkih metoda koje su validirane u Belupu“.

Kod određivanja srodnih tvari ili ostatnih otapala, u slučajevima kada u uzorku nisu detektirana onečišćenja ili su količine ispod limita kvantifikacije metode, ispitivanje provedi dodavanjem poznatih onečišćenja/otapala u ispitivani uzorak u koncentracijama specifikacijskih limita.

Kod kromatografskog određivanja onečišćenja, kromatogrami dobiveni kod ponovljivosti i reproducibilnosti moraju biti slični, tj. ne smije biti pojave novih odnosno nestanka pikova (onečišćenja iznad LOQ vrijednosti).

Kod validacije metoda u slučaju određivanja onečišćenja ponovljivost je moguće provesti na samom ispitivanom uzorku ili na uzorku placebo kojem se doda točno poznata koncentracija specificiranih onečišćenja na najmanje šest zasebno pripremljenih uzoraka.

Kod reoloških ispitivanja reproducibilnost se određuje mjeranjem viskoznosti iz 6 pojedinačnih primarnih spremnika. Analize provodi drugi laboratorij.

Kod potenciometrijskih mjeranja reproducibilnost se odredi titracijom na 6 neovisno pripremljenih ispitivanih otopina. Analize provodi drugi analitičar drugi dan od ispitivanja ponovljivosti.

**NAPOMENA:** Prema ICH Guideline, Validation of Analytical procedures, Q2(R2), ukoliko se provodi test reproducibilnosti, za intermedijarnu preciznost nije potrebno producirati eksperimentalne podatke, već se za obradu može iskoristiti set podataka dobivenih analizom reproducibilnosti. No, suprotno, korištenje podataka intermedijarne preciznosti za izračun reproducibilnosti nije moguće.

## 5. Točnost

Točnost analitičke metode označava bliskost slaganja između vrijednosti koja je prihvaćena bilo kao konvencionalno prava ili kao prihvaćena referentna i vrijednosti dobivene metodom. Točnost metode određuje se na uzorcima placebo (sadrži sve komponente formulacije osim analita) kojima je dodana poznata koncentracija analita. Uzorci za točnost pripremaju se uvagivanjem ispitivane komponente u placebo, a ako zbog niskih koncentracija točno uvagivanje nije moguće, uzorci se pripremaju dodavanjem odgovarajućeg alikvota otopine standarda.

Kod GC metoda za analizu ostatnih otapala u sirovinama točnost se određuje na način da se sirovini dodaje točno poznata količina ostatnog otapala i tako pripremljeni uzorci analiziraju. Iz dobivenih podataka i količine ostatnih otapala određenih u sirovini metodom koja se validira, izračuna se povrat.

Točnost se određuje:

- kod određivanja sadržaja, u triplikatu kod najmanje tri točke, 80%, 100% i 120% od ispitivane koncentracije,
- kod određivanja ujednačenosti sadržaja, u triplikatu kod najmanje tri točke, 70%, 100% i 130% od ispitivane koncentracije,
- kod određivanja sadržaja onečišćenja kod HPLC metode, u triplikatu na najmanje pet točaka, u području od LOQ do najmanje 150% maksimalno dozvoljene vrijednosti tijekom roka valjanosti,

- kod ispitivanja oslobađanja iz gotovih oblika sa trenutnim oslobađanjem u triplikatu na najmanje tri točke u području koncentracija od Q – 45% do 130% od ispitivane koncentracije,
- kod oblika sa produljenim oslobađanjem u triplikatu na najmanje tri točke u području od LOQ ili od najnižeg zahtjeva definiranog specifikacijom do 130% od ispitivane koncentracije.

**NAPOMENA:** ukoliko nije moguće postići navedene zahtjeve za točnost metode, uz opravdani razlog donja i gornja granica raspona metode mogu se modificirati.

Kod metoda za određivanje sadržaja ostatnih otapala ili srodnih tvari na sirovinama, sirovini kojoj će se dodati poznate količine otapala ili standarda onečišćenja, prethodno se određuje količina otapala na najmanje 6 uzoraka. Iz dobivenih rezultata izračuna se povrat.

Kod određivanja elementnih onečišćenja primjenom ICP-MS metode točnost se određuje na najmanje 3 koncentracijska nivoa u području od granice kvantifikacije metode pa do 150 % definiranog limita. Za svaki koncentracijski nivo pripremi se uzorak u triplikatu na način da se ispitivanom uzorku dodaju odgovarajuće količine standarda elementnih onečišćenja. Iz dobivenih rezultata izračuna se povrat.

Kod određivanja sadržaja potenciometrijskom metodom točnost se određuje kod najmanje tri točke, 80%, 100% i 120% u odnosu na koncentraciju propisanu analitičkom metodom. Za svaki koncentracijski nivo pripremi se uzorak u triplikatu. Iz dobivenih rezultata izračuna se povrat.

Kod određivanja onečišćenja LC-MS metodom, točnost se određuje na uzorcima sirovine ili gotovog proizvoda ili smjesama placebo i API. Točnost se određuje na najmanje 3 koncentracijska nivoa u području od granice kvantifikacije pa sve do minimalno 150% definiranog limita. Za svaki koncentracijski nivo pripremi se uzorak u triplikatu na način da se ispitivanom uzorku dodaju odgovarajuće količine standarda onečišćenja. Iz dobivenih rezultata izračuna se povrat.

Kod ICP-MS i LC-MS metoda prethodno odredi količinu analita na najmanje 3 uzorka sirovine ili gotovog proizvoda ili smjesama placebo i API bez dodatka onečišćenja te izračunaj srednju vrijednost.

## 6. Linearnost

Linearnost metode je mogućnost da, unutar danog područja, daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Linearnost metode određuje se na uzorcima placebo (sadrži sve komponente formulacije osim analita) kojima je dodana poznata koncentracija analita. Uzorci se pripremaju uvagivanjem ispitivane komponente u placebo, a ako zbog niskih koncentracija točno uvagivanje nije moguće, uzorci se pripremaju dodavanjem odgovarajućeg alikvota otopine standarda.

Kod GC metoda za analizu ostatnih otapala u sirovinama uzorci za provjeru linearnosti se pripremaju dodatkom točno poznate količine ostatnih otapala sirovini.

Linearnost metode određuje se:

- kod određivanja sadržaja i ujednačenosti sadržaja na najmanje šest točaka od 40% do 140% od ispitivane koncentracije,
- kod određivanja sadržaja onečišćenja na najmanje šest točaka u području od LOQ do 150% maksimalno dozvoljene vrijednosti tijekom roka valjanosti,
- kod ispitivanja oslobađanja iz gotovih oblika sa trenutnim oslobađanjem na najmanje šest točaka u području koncentracija od Q – 45% do 130% od ispitivane koncentracije,
- kod oblika sa produljenim oslobađanjem na najmanje šest točaka u području od LOQ ili od najnižeg zahtjeva definiranog specifikacijom do 130% od ispitivane koncentracije.

Kod određivanja raspodjele veličine čestica (PSD) difrakcijom laserske svjetlosti ispitivanje linearnosti odnosi se na definiranje granica obskuracije unutar kojih je izmjerena raspodjela veličine čestica nezavisna od količine dodanog uzorka.

Linearost ICP-MS metode određuje se na poredbenim otopinama koje se pripremaju i analiziraju kako je opisano u analitičkoj metodi.

Linearost potenciometrijske titracije određuje se na ispitivanim otopinama (80%, 100% i 120% u odnosu na koncentraciju propisanu analitičkom metodom).

Linearost LC-MS metode određuje se na kalibracijskim otopinama koje se pripremaju i analiziraju kako je opisano u analitičkoj metodi.

Napomena: ukoliko nije moguće postići navedene zahtjeve za linearnost metode, uz opravdani razlog donja i gornja granica raspona metode mogu se modificirati.

## 7. Raspon

Raspon analitičke metode je interval između gornje i donje koncentracije (količine) analita u uzorku (uključujući i te koncentracije) za koje je dokazano da analitička metoda ima odgovarajući stupanj preciznosti, točnosti i linearnosti. Ispitivani raspon metoda za određivanje sadržaja je od 80% do 120% od ispitivane koncentracije, kod metoda za određivanje ujednačenosti sadržaja od 70% do 130% od ispitivane koncentracije, kod metoda za određivanja sadržaja onečišćenja u području od LOQ do 150% maksimalno dozvoljene vrijednosti tijekom roka valjanosti, kod metoda za ispitivanje oslobađanja iz gotovih oblika sa trenutnim oslobađanjem u području koncentracija od Q – 45% do 130% od ispitivane koncentracije, a kod oblika sa produljenim oslobađanjem u području od LOQ ili od najnižeg zahtjeva definiranog specifikacijom do 130% od ispitivane koncentracije. Kod ICP-MS metoda raspon se ispituje u području od granice kvantifikacije pa do 150 % definiranog limita.

Kod LC-MS metoda raspon se ispituje u području od granice kvantifikacije pa do minimalno 150 % definiranog limita.

## 8. Granica detekcije

Granica detekcije metode je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati, ali se ne mora i nužno točno kvantificirati. Granica detekcije se kod HPLC i GC metoda određuje tako da se uzorcima placebo doda točno poznata količina analita, snimi kromatogram te izračuna njegov omjer signal/šum. Količina analita kod koje je omjer signal/šum najmanje 3:1 granica je detekcije metode.

Također, LOD može se odrediti iz kalibracijskih krivulja iz linearnosti.

Kod GC metoda za analizu ostatnih otapala u sirovinama uzorci se pripremaju dodatkom točno poznate količine ostatnih otapala sirovini.

Kod ICP-MS metoda granica detekcije se određuje primjenom sljedećeg izraza:

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{a}$$

gdje je:

$\sigma$  – standardna devijacija odziva slijepo probe

$a$  – nagib kalibracijskog pravca određen linearnom regresijom

Slijepa proba priprema se u triplikatu prema postupku opisanom u analitičkoj metodi.

Kod LC-MS metoda granica detekcije se određuje iz kalibracijskih krivulja primjenom sljedećeg izraza:

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{a}$$

gdje je:

$\sigma$  – standardna devijacija za odsječak kalibracijskog pravca  
 $a$  – nagib kalibracijskog pravca

## 9. Granica kvantifikacije

Granica kvantifikacije metode je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti s odgovarajućom preciznosti i točnosti. Granica kvantifikacije se kod HPLC i GC metoda određuje tako da se uzorcima placebo doda točno poznata količina analita, snimi kromatogram te izračuna njegov omjer signal/šum. Kod GC metoda za analizu ostatnih otapala u sirovinama uzorci se pripremaju dodatkom točno poznate količine ostatnih otapala sirovini.

Pripremi se najmanje šest uzoraka u koncentraciji pri kojoj je omjer signal/šum najmanje 10:1 te izračuna povrat i RSD.

Kod ICP-MS metoda granica kvantifikacije se određuje tijekom ispitivanja točnosti metode. Najniži koncentracijski nivo kod koje je zadovoljen zahtjev za točnost je granica kvantifikacije. Za koncentracijski nivo pripremi se 6 otopina na način da se ispitivanom uzorku dodaju odgovarajuće količine standarda elementnih onečišćenja. Iz dobivenih rezultata se izračuna povrat.

Kod LC-MS metoda, granica kvantifikacije se određuje tijekom ispitivanja točnosti metode. Najniži koncentracijski nivo kod koje je zadovoljen zahtjev za točnost je granica kvantifikacije. Za koncentracijski nivo pripremi se 6 otopina na način da se ispitivanom uzorku dodaju odgovarajuće količine standarda onečišćenja. Iz dobivenih rezultata se izračuna povrat i RSD.

## 10. Robustnost

Robusnost analitičkog postupka je mjera njegove sposobnosti da ostane nepromijenjen uslijed malih, ali namjernih varijacija u parametrima metode i pokazatelj je njegove pouzdanosti tijekom normalnog korištenja. Tipične promjene koje se ispituju mogu se podijeliti u dvije skupine:

- a) promjene kod pripreme uzorka – promjena vremena ekstrakcije, sastava diluenta, broja okretaja aparata za oslobođanje, promjena volumena disperznog sredstva u fazi pripreme uzorka, promjene količine surfaktanta,...
- b) promjena uvjeta mjerjenja – kod kromatografskih metoda promjena temperature kolone, udjela organske faze u mobilnoj fazi, pH mobilne faze, tlaka plina kod GC metoda, kod reoloških mjerjenja vrijeme stajanja uzorka na Peltier plate prije spuštanja geometrije, kod potenciometrijskih metoda promjena vremena miješanja otopine na potenciometru, promjena brzine miješanja magnetske miješalice,...

## 11. Stabilnost otopina

### 11.1. Stabilnost osnovnih otopina standarda

Stabilnost osnovnih otopina standarda je parametar koji definira vremensko razdoblje u kojem su pripremljene osnovne otopine standarda stabilne i mogu se koristiti za izradu mjernih otopina standarda. Stabilnost osnovnih otopina standarda određuje se usporedbom faktora odgovora detektora (RF) svježe pripremljenih otopina i otopina čuvanih kod određenih uvjeta (sobna temperatura ili hlađenje), tijekom 48 sati, a po potrebi i dulje ili izračunatim povratom otopina čuvanih na određenim uvjetima uz svježe pripremljene otopine.

### 11.2. Stabilnost mjernih otopina

Stabilnost mjernih otopina je parametar koji definira vremensko razdoblje u kojem se pripremljene otopine trebaju analizirati. Stabilnost otopine standarda određuje se usporedbom faktora odgovora detektora (RF) svježe pripremljenih otopina i otopina čuvanih kod određenih

uvjeta (sobna temperatura ili hlađenje), a ovisno o trajanju analize unutar 24 ili 48 sati, a po potrebi i dulje ili izračunatim povratom otopina čuvanih na određenim uvjetima uz svježe pripremljene otopine. Za praćenje stabilnosti unutar 24 h kriteriji prihvatljivosti definiraju se preko kriterija za pogodnost sustava propisanih u analitičkoj metodi (najčešće RSD vrijednosti za sva injektiranja).

Stabilnost otopine uzorka određuje se na najmanje tri paralelno pripremljene otopine uzorka usporedbom rezultata određenih u ispitivanom vremenskom periodu uz svježe pripremljene otopine standarda. Otopine uzoraka se čuvaju kod istih uvjeta kao otopine standarda. Ako rezultati stabilnosti pokažu da mjerne otopine nisu stabilne kod navedenih uvjeta čuvanja, mjerne otopine pripremaju se neposredno prije samog mjerjenja.

## 12. Utjecaj filtera

Ukoliko se kod određivanja sadržaja djelatne tvari, sadržaja onečišćenja u sirovinama ili gotovim oblicima, ili kod testova oslobađanja djelatne tvari iz gotovih oblika filtrira samo otopina uzorka, a ne i poredbena otopina, potrebno je ispitati utjecaj korištenog filtera. Utjecaj filtera se ispituje usporedbom odgovora detektora filtriranih otopina (otopina standarda, otopina placebo i standarda) i nefiltriranih odnosno centrifugiranih otopina pri 100% ispitivane koncentracije.

## 13. Testovi pogodnosti sustava

Testovi pogodnosti sustava su sastavni dio mnogih analitičkih postupaka. Testovi se temelje na konceptu da oprema, elektronika, analitički rad i uzorak koji se analizira čine cjeloviti sustav koji se može vrednovati kao takav. Parametri koji se ispituju prilikom tih testova ovise o vrsti metode. Npr., kod HPLC ili GC metoda parametri koji se prate su:

- vremena zadržavanja pikova analita
- broj teoretskih tavana
- rezolucija
- simetričnost pikova
- ponovljivost injektiranja

Tijekom validacije metode cilj je utvrditi vrijednosti tih parametara kako bi se definirale granice unutar kojih je cijeli sustav ispitivanja (uključujući instrumente, reagense, kolone, analitičare) pogodan za namjeravanu svrhu.

Kod ICP-MS metoda pogodnost sustava ispituje se analizom kontrolnih otopina koje se pripremaju i analiziraju prema postupku opisanom u analitičkoj metodi.

Kod LC-MS metoda pogodnost sustava ispituje se analizom kalibracijskih otopina koje se pripremaju i analiziraju prema postupku opisanom u analitičkoj metodi.

## 14. Faktori korekcije

Poznata onečišćenja u uzorku mogu biti određena prema standardu djelatne tvari ako je za svako onečišćenje određen faktor korekcije. Faktor korekcije je odnos odgovora detektora djelatne tvari prema odgovoru detektora svakog poznatog onečišćenja. Faktor korekcije određuje se na tri zasebno pripremljene otopine standarda aktivne komponente i svakog poznatog onečišćenja u području koncentracija od 60%, 100% i 160% od maksimalno dozvoljene vrijednosti.

## **KRITERIJI I METODE PRAĆENJA PROCESA**

Procjenom rizika RIZ000770 „Rizici i prilike kod primjene SOP000030 Validacija analitičkih metoda“ nije detektiran niti jedan rizik razine veće od 4 za koji bi bilo nužno definirati mjere praćenja i suzbijanja.

## **NEPOSREDNI RIZICI I PRILIKE POVEZANI UZ OVAJ POSTUPAK**

U svrhu analize neposrednih rizika i prilika povezanih uz ovaj postupak izrađena je procjena rizika RIZ000770 „Rizici i prilike kod primjene SOP000030 Validacija analitičkih metoda. Procjenom rizika nije detektiran niti jedan rizik razine veće od 4 za koji bi bilo nužno definirati mjere praćenja i suzbijanja.

## **ČUVANJE DOKUMENTACIJE:**

Validacijski protokoli i izvještaji izrađuju se u elektroničkom obliku i čuvaju se trajno u EDMS sustavu.

## **VEZANI DOKUMENTI**

RUP000311 „Izrada protokola za validaciju analitičkih metoda“  
SOP000019 „Prijenos analitičkih metoda koje su validirane u Belupu“  
SOP000031 „Laboratorijsko istraživanje rezultata izvan specifikacije (OOS) i ostalih neočekivanih rezultata u odjelu Analitički laboratoriјi“  
RUP000402 „Izrada izvještaja o validaciji analitičkih metoda“  
SOP000030 „Razvoj analitičkih metoda“  
RIZ000770 „Rizici i prilike kod primjene SOP000034 Validacija analitičkih metoda“  
SOP000054 „Ispitivanje pogodnosti metoda za određivanje mikrobiološke čistoće“

## **LITERATURA:**

1. ICH Guideline, Validation of analytical procedures – text and methodology, Q2(R2), 2024
2. J. Ermer and J. H. McB. Miller, Method Validation in Pharmaceutical Analysis, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005
3. C.C. Chan et al, Analytical method validation and Industry Performance Verification, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2004
4. Ph.Eur. 9.3 Determination of Elemental Impurities 20420 (01/2018)
5. ISO 9001:2015
6. ISO 13485:2016
7. Pravilnik o dobroj praksi u prometu lijekovima, davanju dozvola za promet na veliko lijekovima i davanju potvrde o dobroj praksi u prometu lijekovima na veliko, srpanj 2013.