Prevalidacija i usporedba postupaka za određivanje nitrita prema Griessu

Cerovec, Mateja

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:872345

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Mateja Cerovec

Prevalidacija i usporedba postupaka za određivanje nitrita prema Griessu

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju *Analitika lijekova 2* Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova, pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Jadranke Vuković Rodríguez.

ZAHVALA

Posebna zahvala mentorici izv. prof. dr. sc. Jadranki Vuković Rodríguez na prijateljskom pristupu i stručnoj pomoći bez koje ovaj rad ne bi ugledao svjetlo dana.

Također, posebno zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Renati Jurišić Grubešić na velikoj pomoći, podršci i organizaciji obrane ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem svim dragim kolegicama, kolegama i prijateljima na bezuvjetnoj pomoći i podršci tijekom svih mojih godina školovanja, na svim lijepim trenucima koje smo proveli zajedno.

Veliko hvala mojoj obitelji koja je vjerovala u mene i koja me poticala da budem bolja iz dana u dan.
Najljepše hvala mojem ocu koji je sve ovo omogućio.

SADRŽAJ

1.UVOD.....1

1.1. Pozadina odnosa NO i NO_3^-/NO_2^- 1

1.2. Pozadina Griessove reakcije.....3

1.3. Literaturni pregled određivanja nitrata/nitrita.....4

1.4. Prevalidacijska filozofija, strategija i praksa.....6

1.4.1. Temeljno polazište.....8

1.4.2. Anatomija prevalidacijskog sustava.....9

1.4.3. Funkcija odgovora u mjernom procesu.....10

2. OBRAZLOŽENJE TEME.....13

3. MATERIJALI I METODE.....14

3.1. Tvari, otopine i pribor.....14

3.2. Metode i postupci ispitivanja.....14

3.2.1. Mikroanalitička metoda određivanja sadržaja nitrita s Griessovim reagensom.....14

3.2.2. Spektrofotometrijska metoda određivanja sadržaja nitrita s Griessovim reagensom.....15

3.3. Prevalidacijski protokol.....15

4. REZULTATI I RASPRAVA.....17

4.1. Prevalidacija *NO_2-Mikro*, *NO_2-SFM1* i *NO_2-SFM2* postupaka.....17

4.1.1. Karakterizacija skupina od 1 do 6.....17

4.1.2. Provjera graničnih skupina 1 i 6.....21

4.1.3. Ispitivanje homogenosti.....21

4.1.4. Ispitivanje odnosa analit-signal.....24

4.1.5. Prepoznavanje bjegunaca.....24

4.1.6. Prosudba graničnih vrijednosti.....24

5. ZAKLJUČCI.....32

6.LITERATURA.....34

7. SAŽETAK/ SUMMARY.....38
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD.....40

1. UVOD

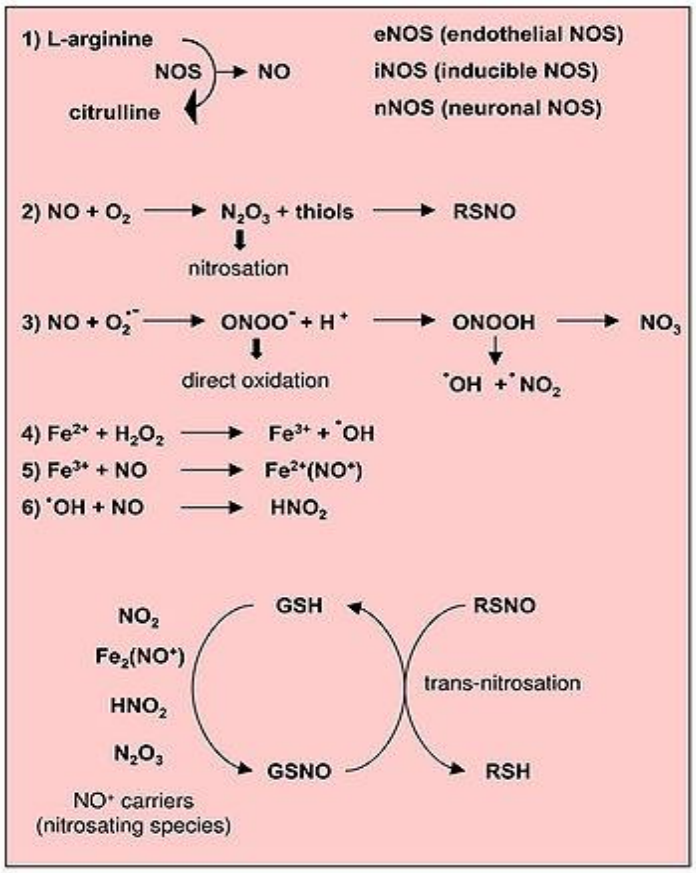
1.1. Pozadina odnosa NO i NO_3^-/NO_2^-

Dušikov oksid (NO) je visoko reaktivni spoj koji sudjeluje u regulaciji mnogih fizioloških i patoloških procesa. Definiranje bioloških funkcija NO je bio temelj za dodjelu Nobelove nagrade za medicinu 1998. godine trima farmakolozima: Robertu Furchgottu, Louisu Ignarru i Feridu Muradu. NO, plinoviti paramagnetični radikal, je vrlo važan glasnik u biološkim sustavima koji sudjeluje u brojnim reakcijama (www.sigmaaldrich.com). NO je vrlo različit od svih ostalih prijenosnika signala: sintetizira se nakon specifične aktivacije enzima, ima kratko $t_{1/2,}$ te se brzo pretvara u NO_3^- i NO_2^-, ne može se čuvati u lipidnim vezikulama već slobodno difundira kroz stanične membrane, njegovo djelovanje ne završava njegovom razgradnjom već interakcijom s ciljnom molekulom koja je u pravilu intracelularni sekundarni prenosilac, a ne receptor na membrani (Žanić Grubišić i Rumora, 2015).

Učinci NO mogu biti dvojaki i izazivati smrt ili preživljavanje stanica ovisno o dozi ili tipu stanica. NO je molekularni medijator mnogih fizioloških i patoloških procesa, uključujući vazodilataciju, upalu, trombozu, imunitet i neurotransmisiju (www.probes.com). Signali koje prenosi NO imaju učinak na glatke mišiće, na inhibiciju agregacije trombocita, na inhibiciju razvoja upale u krvnim žilama. NO proizvode stanice poput makrofaga, fibroblasta, hepatocita u mikromolarnim koncentracijama kao odgovor na proupalnu stimulaciju (Arbor, 2014). U ovom slučaju, biološka uloga NO je protektivna, budući da nas štiti od raznih patogena temeljem oksidativne toksičnosti (Arbor, 2014). S druge strane, NO stimulira hipotalamus na sekreciju gonadotropina, te nadbubrežnu žlijezdu na sekreciju adrenalina. Važna je i njegova uloga u oplodnji s obzirom da NO inhibira ulazak drugih spermija u već oplođenu jajnu stanicu. Vrlo važnu ulogu NO ima i u živčanom sustavu. U autonomnom živčanom sustavu, neki motorni neuroni parasimpatikusa, otpuštaju NO kao svoj neurotransmitor, dok se u centralnom živčanom sustavu NO, zajedno sa svojim lokalnim učinkom, lako prenosi iz jedne sinapse u drugu (Žanić Grubišić i Rumora, 2015).

Dušikov oksid se sintetizira u biološkim sustavima pomoću enzima sintaze dušikovog oksida (NOS). NOS je izrazito kompleksan enzim koji koristi molekulski kisik, arginin i NADPH za proizvodnju NO, citrulina i $NADP^+$ (Arbor, 2014). Ovaj proces zahtjeva pet dodatnih kofaktora (FMN, FAD, hem, kalmodulin, i tetrahidrobiopterin) te dva dvovalentna kationa (kalcij i željezo iz hema) (Arbor, 2014). Identificirane su tri posebne izoforme NOS-a,

neuronalna (nNOS), endotelna (eNOS) i inducibilna (iNOS) kako je prikazano na Slici 1. Svaka od tih izoformi NOS-a je odgovorna za različite učinke dušikovog oksida. Najvažniji učinci NO, stvorenog djelovanjem nNOS, uključuju aktivaciju enzima gvanilat ciklaze i produkciju cGMP, regulaciju sinteze noradrenalina i glutamata, relaksaciju i dilataciju glatkih mišića (Žanić Grubišić i Rumora, 2015). Inducibilna NOS se sintetizira u aktivnim neutrofilima, makrofagima, astrocitima i hepatocitima. NO stvoren djelovanjem iNOS, zbog visoke koncentracije, djeluje kao moćni citotoksin, ubijajući intracelularne parazite i tumorske stanice. NO stvoren djelovanjem eNOS uzrokuje vazodilataciju, izaziva inhibiciju agregacije trombocita i adhezije leukocita, te ima antitrombotičko i protuupalno djelovanje. Dakle, količina proizvedenog NO u biološkim sustavima može varirati kroz nekoliko redova veličine, te je njegova kemijska reaktivnost raznolika. NO reagira s nizom različitih molekula u biološkim tekućinama (Slika 1.).



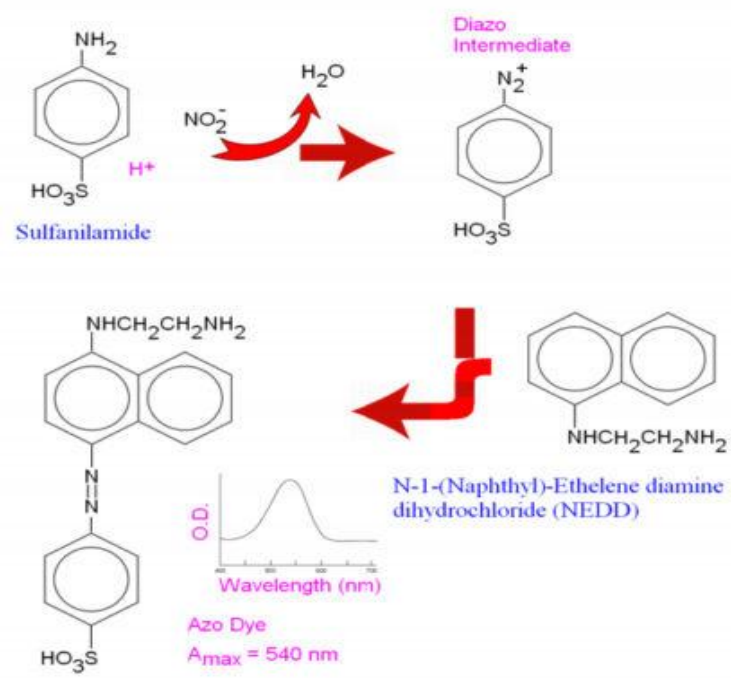
Slika 1. Reakcije u kojima sudjeluje NO (https://www.google.hr/search?q=sl.wikipedia.com)

Konačni produkti dušikovog oksida *in vivo* su nitriti (NO_2^-) i nitrati (NO_3^-) (Arbor, 2014). Relativni omjer NO_2^- i NO_3^- je promijenjiv i ne može se sa sigurnošću predvidjeti (Arbor, 2014). Dakle, najbolji pokazatelj ukupne NO proizvodnje je suma NO_2^- i NO_3^- (Arbor, 2014).

1.2. Pozadina Griessove reakcije

Griessov reagens je široko korišten reagens za određivanje nitrata i nitrita u biološkim tekućinama (plazma, serum, urin) i drugim matricama. Metoda određivanja nitrita Griessovim reagensom jedna je od najkorištenijih i najjednostavnijih metoda koja se koristi za detekciju NO, nitrita i nitrata (www.sigmaaldrich.com). U fiziološkim uvjetima, pomoću Griessovog reagensa, možemo odrediti nitrite koji su nastali spontanom oksidacijom NO (www.probes.com). Griessovim reagensom, *in vitro*, možemo odrediti nitrate nakon njihove katalitičke redukcije u nitrite. Griessova metoda određivanja ukupne koncentracije NO_3^-/NO_2^- u uzorcima sastoji se od dva koraka (Arbor, 2014). Prvi korak obuhvaća pretvorbu nitrata u nitrite pomoću enzima nitrat reduktaze. Drugi korak obuhvaća dodatak Griessovog reagensa koji pretvara nitrit u ljubičasti azo spoj. Koncentraciju nitrita zatim određujemo spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije azo spoja na 540 nm.

Griessovu reakciju prvi je uspostavio Johann Peter Griess 1879. godine kao metodu analize nitrita (Tsikas, 2006). Ova reakcija se temelji na pretvorbi sulfanilne kiseline (Griess A) u diazonijevu sol u prisutnosti nitrita u kiselom mediju (www.probes.com), koja zatim reagira s aromatičnim aminom N-(1-naftil)etilendiamin dihidrokloridom (Griess B), tvoreći crveno-ljubičastu, u vodi topljivu azo boju, koju možemo kvantitativno odrediti mjereći njezinu apsorbanciju na 540 nm (Tsikas, 2006). Kemija Griessove reakcije prikazana je na Slici 2. NADPH je esencijalni kofaktor koji je potreban za aktivnost NOS. Nažalost, NADPH interferira s kemizmom Griessove reakcije. Jedan od načina kako izbjeći ovu interferenciju predlaže upotrebu malih količina NADPH u kombinaciji s katalitičkim sustavom koji reciklira istrošen $NADP^+$ i vraća ga natrag u NADPH. Ovo dobro funkcionira kod analize nitrata i nitrita u biološkim tekućinama, poput plazme i urina, ali je djelotvorno i kod određivanja niskih koncentracija nitrita pomoću visoko osjetljive fluorometrijske metode. Međutim, opisani se postupak ne može koristiti za analizu nitrata i nitrita u *in vitro* uvjetima NOS testa u koji je dodan suvišak NADPH (Arbor, 2014).



Slika 2. Kemizam Griessove reakcije

(https://www.google.hr/search?q=Kemizam+Griessove+reakcije+ishigirl.tripod.com)

1.3. Literaturni pregled određivanja nitrata/nitrita

Nitrati i nitriti mogu se određivati različitim tehnikama u brojnim matricama, koristeći pritom različite reagense. Neke od najpoznatijih tehnika određivanja ovih spojeva su HPLC, LC, GC, ionska kromatografija, kapilarna elektroforeza, UV-spektrofotometrija, kemiluminescencija, kolorimetrija, itd. Nitrati i nitriti se određuju u različitim matricama, najčešće u biološkim uzorcima kao što su humana plazma, serum i urin, te u hrani i vodi. Metoda određivanja NO_3^- i NO_2^- u malim volumenima morske vode koristi vanadij (III) klorid kao reducirajući agens (Schnetger i Lehners, 2014). Ova metoda služi kao zamjena za dobro poznatu metodu koja koristi kadmij za redukciju nitrata u nitrite budući da je pritom izbjegnuta toksičnost kadmija (Schnetger i Lehners, 2014). Nitriti koji nastaju kvantitativno se određuju dobro utvrđenom Griess-Ilosvay reakcijom, a mjerenja se najčešće izvode na UV-Vis spektrofotometru ili, ako su dostupni samo vrlo mali volumeni uzoraka, na čitaču mikrotitarskih ploča (Schnetger i Lehners, 2014). Na isti se način može provesti određivanje NO_3^- i NO_2^- u mlijeku i mliječnom prahu (Woollard i Indyk, 2014), a razvijen je i SIA[1] sustav (Lima i sur., 2006) za spektrofotometrijsko određivanje u mliječnim proizvodima. Taj sustav

[1] eng. *Sequential injection analysis*

koristi bakar-kadmij leguru za redukciju NO_3^- u NO_2^-. Spektrofotometrijsko određivanje ovih spojeva ponovo se temelji na Griessovoj reakciji. Zanimljiva je tehnika kapilarne elektroforeze za istovremeno određivanje NO_3^-/NO_2^- u dječjoj hrani. Prednost ove metode je jednostavnost izvođenja i sposobnost razdvajanja analita u manje od 0,5 minuta (Betta i sur., 2014). Metoda je validirana prema smjernicama EURACHEM i primijenjena je za analizu 14 uzoraka hrane za bebe te se pokazala pogodnom za primjenu u prehrambenim laboratorijima za rutinsko određivanje nitrata i nitrita (Betta i sur., 2014). Nitrit i nitrat mogu se točno izmjeriti u uzorcima biljnog i životinjskog podrijetla primjenom HPLC-UV/Vis tehnike. Ovi su anioni ujedno i toksini zbog čega je regulirana njihova koncentracija u određenim namirnicama (Croitoru, 2012). Postoje mnoge metode za otkrivanje nitrita i nitrata, ali većina njih ne prepoznaje nitrit u biološkim uzorcima, dok nova HPLC-UV/Vis metoda lako otkriva niske koncentracije ovih analita prisutnih u krvi i urinu sisavaca i biljnim uzorcima (Croitoru, 2012). Jedna od novijih metoda simultanog određivanja NO_3^- i NO_2^- koristi bienzimatski biosenzor koji sadrži bakar, cink superoksid dismutazu i nitrat reduktazu imobilizirane na ugljikove nanocjevčice (Madasamy i sur., 2014), dok druga koristi AgZEGE[2] elektrodu za određivanje u vodenim otopinama (Manea i sur., 2010). Ciklička voltametrija se koristi za opisivanje elektrokemijskog ponašanja elektrode u prisutnosti pojedinih nitratnih i nitritnih aniona ili njihove mješavine u 0,1 M otopini Na_2SO_4 koja podržava elektrolite (Manea i sur., 2010). Zanimljivo je i određivanje i usporedba koncentracija NO_3^-/NO_2^- u uzorcima humane plazme i seruma koristeći Griessovu reakciju, HPLC i GC-MS. Masena spektrometrija je referentna tehnika za određivanje nitrita/nitrata u plazmi i serumu, međutim, zbog svoje jednostavnosti i brzine, testovi temeljeni na Griess reakciji ili HPLC-u se uglavnom koriste u kliničkim ispitivanjima (Romitelli i sur., 2007). Posebna pozornost se posvećuje deproteinizaciji uzoraka plazme i seruma prije analize nitrita/nitrata pomoću Griess testa, HPLC-a i GC-MS-a (Romitelli i sur., 2007).

[2] eng. *Ag-doped zeolite-expanded graphite-epoxy*

1.4. Prevalidacijska filozofija, strategija i praksa

Pouzdana analitička mjerenja farmaceutskih uzoraka važan su dio u donošenju odluka koje utječu na određene dijelove društva, uključujući brigu o zdravlju, unapređenje kakvoće lijekova, itd. Sve veći broj analitičke literature u području kontrole kakvoće lijekova stvara potrebu za jasnom prosudbom o prednostima i nedostacima analitičkog postupka. Validacija analitičkog postupka nedvojbeno je dio razvoja farmakopejskih i drugih analitičkih postupaka za kontrolu kakvoće lijekova. Međutim, validacijski postupak je dugotrajan, skup i naporan proces, te uvelike ovisi o namjeri metode, izabranoj tehnici i ispitivanom postupku.

Grupa eksperata u SFSTP[3] vodiču (Hubert i sur., 1999) predložila je prevalidaciju kao prvi korak u validaciji kromatografskih bioanalitičkih metoda. Svrha ovog vodiča je optimalno iskoristiti informacije dobivene iz eksperimenata, provedenih tijekom prevalidacijskog koraka, kako bi se kao idući korak, u validaciji kromatografskih metoda, primijenio integriran i učinkovit dizajn. Prevalidacija u SFSTP vodiču omogućava prosudbu najprikladnijeg kalibracijskog modela, pragova određivanja, kalibracijsko radno područje, kao i optimalni broj eksperimenata koje je potrebno provesti u validacijskoj fazi.

Kao informativna pretraživačka metoda, prevalidacija treba biti korisna u preliminarnoj prosudbi analitičkog postupka, s daljnjom potrebom za validacijom i sustavnim dobivanjem vrijednih podataka koji se ne mogu dobiti propisanim validacijskim postupcima (USP, 2002; EDQM, 1996; ICH, 1994; CMP/ ICH, 1989; FDA, 1996). Ključna literatura za ovu temu vrijedan je rad Ermera (Ermer, 2001), prijašnje rasprave o cjelovitom analitičkom postupku (Kaiser 1968, 1978; Boumans, 1978) i radovi o standardizaciji kvantitativnih analitičkih postupaka (Gottschalk, 1975a,b, 1976, 1979; Luterotti i Grdinić 1995).

Kako bi se odredili uvjeti prema zahtjevima i tako dobio proces s poželjnim, često optimalnim značajkama (Massart i sur., 1997), može se primijeniti i metodologija eksperimentalnog dizajna, primjerice, frakcijski faktorijalni dizajn, Plackett-Burmanov dizajn (Vander Heyden i sur., 1995, 1998a, 1998b; Grdinić i sur., 1994) ili superzasićeni dizajn (Vander Heyden i sur., 2000). Prevalidacijska faza se ne mora provesti ukoliko su, nakon provedenog eksperimentalnog dizajna, analitičaru dostupne izvedbene značajke postupka (Boulanger i sur., 2003).

[3] franc. *Societe Francaise Sciences et Techniques Pharmaceutiques*

Ispitivanje otpornosti sastoji se u prosudbi glavnih ukupnih učinaka, otkrivanju bjegunaca, provjeri zakrivljenosti krivulje i određivanju glavnih nedostataka (Bosque- Sendra i sur., 1999). Svrha ispitivanja je potvrditi otpornost metode otkrivanjem čimbenika koji su odgovorni za neotpornost metode, odnosno čimbenika koji uzrokuju veliku promjenu u analitičkom odgovoru za malu promjenu njihovih vrijednosti (Vander Heyden i sur., 2000). Premda se u osnovi ispitivanje otpornosti provodi na kraju postupka validacije metode, neposredno prije provođenja međulaboratorijskih ispitivanja (Younden i Steiner, 1975; Vander Heyden i sur., 1999, 1995), danas se sve više ispitivanje otpornosti primjenjuje na kraju razvojne faze metode ili na početku validacijskog postupka (ICH, 1994; Vander Heyden i sur., 2001). Namjera predloženog postupka prevalidacije (Grdinić i Vuković, 2004) nije zamijeniti ili umanjiti vrijednost ispitivanja otpornosti. Prikladno je prevalidacijsku strategiju primijeniti nakon prosudbe pouzdanosti analitičkog postupka eksperimentalnim dizajnom. Nakon provedenih ispitivanja, analitički postupak kojemu je potvrđena primjenjivost ulazi u *prostor cjelovitog analitičkog postupka*.

Istraživanja unutar laboratorija i simulirana ograničena međulaboratorijska ispitivanja mogu biti uključena u prevalidacijski proces. To odgovara prvom i drugom stadiju u razvoju analitičkog postupka prema Conacheru (Conacher, 1990). Prisutna su približno tri stadija u razvoju analitičkog postupka: *(1)* prosudba prihvatljivih izvedbenih značajki unutar laboratorija, *(2)* prikaz uspješne izvedbe u ograničenom broju međulaboratorijskih ispitivanja i *(3)* prikaz uspješne izvedbe u suradničkim istraživanjima. Kao napredak od prvog do trećeg stupnja, raste stupanj pouzdanosti koji se može pripisati validaciji određenog postupka. Treći stupanj predstavlja najviši stupanj postupka validacije, prvi stupanj se može zvati prevalidacija, a u drugom stupnju se može provesti prevalidacija i/ili validacija. Zamišljeno je da se interna metoda prevalidacije sastoji od prevalidacijskog koraka provedenog unutar jednog laboratorija, primjerice, za prevalidaciju nove analitičke metode ili za potvrdu analitičke metode preuzete iz nekog drugog izvora.

Prevalidacija je važna za ispitivanje valjanosti podataka, npr. kada validirani (službeni) postupak ne postoji, kada nema dovoljno vremena za potpunu validaciju postupka, te u kriznim situacijama. U ovim se situacijama od laboratorija zahtijeva da daje analitičke podatke na neplanskoj, hitnoj razini i odluke koje se temelje na ovim podacima imaju značajne ekonomske i/ili javnozdravstvene posljedice.

Prevalidacija predstavlja brzi proces prijenosa vrijednosti iz prostora željenih (i tipičnih) analitičkih značajki u prostor realnih (i tipičnih) analitičkih značajki. Svaka se analitička metoda, koja prolazi prevalidacijski proces, treba temeljiti na čvrstim znanstvenim načelima i mora zadovoljavati odgovarajuće, prihvatljive izvedbene kriterije. Podnošenje opisa metodologije (kompendij), primjerice (USP, 2002), za nove ili revidirane analitičke postupke treba sadržavati dovoljno informacija za prosudbu značajki predloženog postupka. Ukoliko prevalidacijski postupak ne da povoljne rezultate, postupak validacije će rezultirati povećanim troškovima kao i izgubljenim vremenom. Nadalje, samo povoljna analitička prevalidacija je *conditio sine qua non* za analitičku validaciju. Suprotno validaciji koja je definirana kao proces koji prikazuje da je analitički postupak prikladan za određenu svrhu (www.ich.org), prevalidacija je formalni dokaz da analitički sustav čini ono za što je namijenjen i da nastavlja činiti isto. Ova posljednja definicija pokazuje analogiju s Tranterom (Tranter, 1990), budući da pretpostavlja postojanje opisa što analitički sustav treba činiti.

1.4.1. Temeljno polazište

Metoda prevalidacije se provodi kako bi se dijagnosticirala kakvoća analitičkog postupka, odnosno za donošenje odluke može li ispitivana metoda dati točne i pouzdane rezultate. Svrha prevalidacije je dobivanje saznanja o analitičkom postupku i validacijskim značajkama (Grdinić i Vuković, 2004). Ovaj proces služi za ispitivanje validacijskih parametara sa svrhom dokazivanja prikladnosti analitičkog postupka. Svrha prevalidacijskog postupka dobivanje je najprikladnije kalibracijske funkcije (često linearne kalibracijske funkcije), koja pokriva najmanje radno područje u kojemu su najmanja i najveća količina analita u omjeru 1:10. Učinkovitost prevalidacijskog postupka opisana je karakterističnim podacima, kao što su konstante kalibracijske i prosudbene analitičke funkcije, standardno odstupanje postupka, prag određivanja, metrološke karakteristike analitičkog postupka i tako redom. Metoda prevalidacije je pretposljednji korak u razvoju metode. U razvoju pouzdanih analitičkih postupaka, ovaj prevalidacijski rad može se učinkovito provesti s nekoliko eksperimenata, s ciljem stvaranja temelja za korak koji slijedi, validaciju analitičkog postupka. Ovaj jednostavan, ali vrlo informativan koncept sastoji se od opće sheme mjerenja na koje se primjenjuje set matematičko-statističkih ispitivanja. Istraživanje ovisnih i neovisnih varijabli, kao sastavnica analitičkog sustava, posebice odnos među njima, daje uvid u kakvoću rezultata

i metroloških značajki metode. Ukoliko ove metrološke značajke zadovoljavaju prevalidacijske zahtjeve, kao idući korak potrebno je provesti validaciju analitičkog postupka.

1.4.2. Anatomija prevalidacijskog sustava

Pri postavljanju metode potrebno je pokazati da metoda odgovara zahtjevima korisnika, daje točne i precizne rezultate mjerenja određene supstancije, da se metoda odlikuje niskim pragovima dokazivanja itd. (Massart i sur., 1997). Prevalidacija se može podijeliti u *istraživačku prevalidaciju* i *cjelovitu prevalidaciju*. U procesu istraživačke prevalidacije se s ograničenim brojem kalibracijskih uzoraka utvrđuje je li analitički postupak prikladan za određenu svrhu. Tada se eksperimentalni plan i *ad hoc* dijagnoza temelje na $N = 8$ mjerenja. Ako su rezultati istraživačke prevalidacije prihvatljivi, slijedi mnogo detaljnija cjelovita prevalidacija koja se temelji na $N = 24$ mjerenja. Hoće li istraživana metoda osigurati povoljne rezultate, koji zadovoljavaju cilj definiran u namjeni metode, ovisi o prevalidacijskim kriterijima prihvata, koji trebaju biti unaprijed definirani. Tipični kriteriji prihvata prikazani su u Tablici 1.

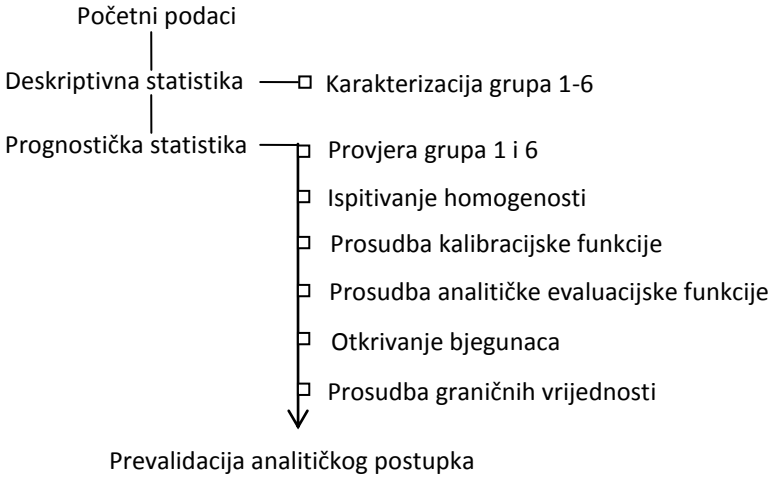
Tablica 1. Kriteriji prihvata u prevalidacijskom postupku

Prevalidacijska ispitivanja	*zahtjevi za analitički postupak*
Linearnost	šest razina, svaka četiri ponovljena mjerenja[a]
Kalibracijska funkcija	računanje, statistički/matematički pristup
Analitička funkcija	računanje, statistički/matematički pristup
Homogenost	
ANOVA(slijepi pokusi)	$F<2,77$
Bartlettovo ispitivanje	$\chi^2<20$
Preciznost	
Ponovljivost	RSD<5% (RSD>5% ovisno o tipu analize i koncentraciji analita)
Prag dokazivanja	$L_D = 3{,}3 s_{BN}/V$
Prag određivanja	$L_Q = 10 s_{BN}/V$
Kalibracijsko područje	prosudba iz istraživanja linearnosti i preciznosti
Bjegunci	$2{,}069 \le \lvert S^* \rvert < 2{,}807$, najviše jedna vrijednost

[a]u spektrofotometriji i drugim instrumentalnim metodama preporučava se provesti dva ponovljena mjerenja istog uzorka.

Obrada odgovora dobivenih mjerenjem predstavlja matematički/statistički pristup, koji se sastoji od brojnih metoda matematičke statistike. Izračunavanja se koriste za dvije različite

skupine zahtjeva: *(1)* deskriptivnu statistiku, kojom se na deskriptivan način prikazuju brojni rezultati, korištenjem karakterističnih statističkih veličina i *(2)* prognostičku statistiku, za dobivanje prognoza na temelju vrijednosti dobivenih dijagnozom, koje služe u prosudbi analitičkog postupka/metode. Cjeloviti proces ekstrakcije prevalidacijskih značajki prikazan je na Slici 3.



Slika 3. Standardizirana anatomija prevalidacijskog sustava, $N = 24$.

Uspješno provedena strategija prevalidacije ovisi o kakvoći mjernih rezultata. Kako bi se dobili povoljni rezultati, iz kojih će se matematičko-statističkom prosudbom dobiti uvid u kakvoću postupka, potrebno je prethodno definirati primjereni model kalibracije, broj mjerenja, tip i sastav uzorka, te radno područje analita. Specifično radno područje analita u prevalidaciji pokriveno s $N = 24$ mjerenja prikazano je u Tablici 2.

1.4.3. Funkcija odgovora u mjernom procesu

Funkcija odgovora analitičke metode unutar radnog područja postojeći je odnos između odgovora (signala) i koncentracije (sadržaja) analita u uzorku (Hubert i sur., 1999). Funkcija odgovora može biti linearna (pravac), ali se mogu dobiti i neki nelinearni modeli koji ovise o metodi detekcije ili posebno širokom radnom području. Ponekad je potrebno, za dobivanje linearnog modela regresijskom analizom, rezultate ispitivanja matematički transformirati (ICH, 1996). Neki analitički postupci, kao što su imunološka ili mikrobiološka ispitivanja, intrinzički su zakrivljeni ili nelinearni i nakon transformacije. U tom slučaju, analitički rezultat potrebno je opisati prikladnom funkcijom koncentracije (sadržaja) analita u uzorku (nelinearna, kvadratna, logaritamska itd.) (ICH, 1994; Findlay i sur., 2000; Miller i Miller, 2000). Kod mnogih instrumentalnih metoda odgovor je proporcionalan koncentraciji analita u

odgovarajućem koncentracijskom području (Miller i Miller, 2000), premda neke tehnike detekcije, kao što je MS detekcija, ne pokazuju linearnost. Uobičajena situacija je da je kod malih količina analita kalibracijska krivulja pravac, koji postaje zakrivljen kod većih količina analita.

Tablica 2. Strategija standardiziranih prevalidacijskih mjerenja (N = 24 mjerenja)

Proces dobivanja rezultata	
Tip mjerenja	slijepa mjerenja (B), gruba mjerenja (y)
Broj analitičkih skupina[a]	$J = 6$, $j = 1, 2, ..., 6$
Volumen skupine	I = IV, i = I, ..., IV
Ukupan broj mjerenja	$N = J \times I = 24$, $n = 1, 2, \ldots, 24$
Količina analita	x (izraženo kao količina, masa ili koncentracija)
Radno područje analit	x_U do x_L (x_U i x_L su gornja i donja razina analita): $1{,}0x_U = x_1$, $0{,}8\ x_U = x_2$, $0{,}6\ x_U = x_3$, $0{,}4\ x_U = x_4$, $0{,}2\ x_U = x_5$, $0{,}1\ x_U = x_6 = x_L$
Redoslijed mjerenja unutar grupe	1, 6, 2, 5, 3, 4
Mjera (neto signal)[b]	$S = y - B$
Grubi signal	y
Slijepi signal	B

[a] Za *ad hoc* prevalidacijska mjerenja: $J = 2$, I = IV, $N = 8$.

[b] Pojam *mjera* odnosi se na neto signal, odnosno razliku između grubog i slijepog signala (279). Kako bi se olakšala rasprava, pretpostavljeno je da, u načelu, veličine S, y i B imaju normalnu raspodjelu, što može biti predmet rasprave u određenim slučajevima.

Analitički rezultat je analitički signal izražen u jedinicama sadržaja analita za čiju se konverziju koristi kalibracijska funkcija. Između analitičkog signala i analitičkog rezultata postoji uvijek kalibracijski korak. Analitički signal i rezultat su ovisne varijable. S druge strane sadržaj analita u uzorku je neovisna varijabla. Nažalost, razlike između analitičkog rezultata i količine ili koncentracije analita često su previđene (Ferrús i Egea, 1994). Liteanu i Rîcă su to izbjegli obilježavanjem analitičkog rezultata sa c i stvarne vrijednosti sa c' (Liteanu i Rîcă, 1975) ili $\hat{c}$ (Liteanu i Rîcă, 1980). Nadalje, razlika između količine analita q u dijelu ispitivanog uzorka i koncentracije analita c u laboratorijskom uzorku je nevažna za svrhu prevalidacija. Jasno je da je važan analitički signal na temelju kojega se provode izračunavanja i donosi odluka. Budući da se standardizirana mjerenja provode sa standardnim

uzorcima poznata sastava, prosudbena analitička funkcija ne može se postaviti bez prethodne potvrde linearne analitičke kalibracijske funkcije. Razlog tomu su signali koji su ovisne vrijednosti i mnogi postupci pretpostavljaju da koncentracije, kao standardne poznate vrijednosti, ne sadrže pogrešku (Miller i Miller, 2000). Kalibracija analitičkog postupka provedena sa standardnim uzorcima rezultira s kalibracijskom funkcijom $\hat{S} = f(x)$. Utvrđivanje povoljne analitičke kalibracijske funkcije prethodi utvrđivanju prosudbene analitičke funkcije. U postupku prevalidacije cjelovita se kalibracija i utvrđivanje navedenih funkcija, osim uobičajenom metodom najmanjih kvadrata, provode statističkim *t*-ispitivanjem na realnost konstanti.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Prosudba optimalnih radnih uvjeta novih postupaka i njihovih izvedbenih vrijednosti, otpornost na manja odstupanja u radu, dokaz valjanosti analitičkih postupaka (validacija), te usporedba alternativnih metoda i proučavanje odnosa između farmakopejskih zahtjeva i legalnih postupaka, nezaobilazne su karike modernih istraživanja novih analitičkih postupaka. Dokaz valjanosti analitičkih postupaka nedvojbeno je sastavni i službeni dio razvoja farmakopejskih i drugih dozvoljenih postupaka za kontrolu kakvoće lijekova.

Namjera ovog rada je provjeriti valjanost jednostavnih, osjetljivih i brzih metoda određivanja nitrita pomoću Griessovog reagensa, i to kako spektrofotometrijske tako i mikroanalitičke metode. Metoda određivanja nitrata/nitrita Griessovim reagensom jedna je od najkorištenijih i najjednostavnijih metoda kvantifikacije spomenutih analita u različitim matricama (plazma, serum, urin, hrana, voda).

Prosudba izvedbenih značajki i kontrola kakvoće predloženog Griessovog postupka za određivanje nitrita provest će se primjenom cjelovite i informativne prevalidacijske strategije (Grdinić i Vuković, 2004). Ova strategija uključuje deskriptivnu i prognostičku statistiku, kao i utvrđivanje preciznosti, točnosti, graničnih vrijednosti postupaka, te kalibracijske i analitičke funkcije. Predloženim ispitivanjem će se ispitati prednosti i nedostatci spektrofotometrijskog i mikroanalitičkog postupka, dok će se usporedbom postupaka utvrditi njihova prikladnost.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Tvari, otopine i pribor

Za sve postupke upotrijebljeni su reagensi analitičke čistoće. Sve otopine pripremljene su korištenjem ultračiste vode, ukoliko nije drugačije navedeno. Za spektrofotometrijsko određivanje nitrita korištene su sljedeće otopine: 200 μM otopinu nitrita, 1% otopinu sulfanilnamida u fosfatnoj kiselini, te 0,1% otopinu N-(1-naftil)etilendiamin dihidroklorida (NED). Standardna otopina nitrita (0,1 M) pripremljena je otapanjem 345,0 mg natrijeva nitrita (Kemika, Zagreb, Hrvatska) u 50,0 ml vode u odmjernoj tikvici. Otopina radnog standarda potrebne koncentracije od 200 μM pripremljena je razrjeđivanjem standardne otopine nitrita. Griessov reagens se sastoji od dvije otopine: 1% otopina sulfanilnamida (Griess A) i 0,1% otopina N-(1-naftil)etilendiamin dihidroklorid (Griess B). Griess A pripremljen je otapanjem 500 mg sulfanilamida (Sigma Aldrich, SAD) u 50 mL 5% fosfatne kiseline (Lachron, Češka Republika) koja se priprema razrijeđivanjem 85% otopine u 100 mL vode. Griess B se priprema otapanjem 50 mg NED-a (Sigma Aldrich, SAD) u 50 mL vode u odmjernoj tikvici. Sve se otopine čuvaju na 2-6°C u hladnjaku, zaštićene od svijetla. Za mikroanalitičku metodu određivanja nitrita u radnom području od 5 do 50 μM (*NO_2-Mikro*) koristili smo: iste otopine kao i u gore navedenim ispitivanjima te 20 mM otopinu Tris pufera pH 7,6 (Sigma Aldrich, SAD).

3.2. Metode i postupci ispitivanja

3.2.1. Mikroanalitička metoda određivanja sadržaja nitrita s Griessovim reagensom

Mikroanalitički postupak (*NO_2-Mikro*) provodi se u mikrotitarskim pločicama ravnog dna s 96 jažica (Nunc-Nundon, Danska). Odgovarajući volumen 200 μM standardne otopine nitrita koji sadrži 5 do 50 μM nitrita nadopuni se do konačnog volumena uzorka od 80 μL dodatkom Tris pufera u mikrotitarskoj ploči. U svaku reakcijsku smjesu doda se 50 μL 1% otopine sulfanilamida i 50 μL 0,1% otopine NED-a, nadopuni do 200 mL puferom, promiješa, te ostavi stajati 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon stajanja mjeri se apsorbancija na 540 nm pomoću čitača mikropločica (Wallac Victor, Perkin Emer, SAD). Sadržaj NO_2^- se dobije iz kalibracijskog pravca nitrita dobivenog iz odnosa apsorbancije i koncentracije standardne otopine nitrita. Standardna otopina nitrita (200 μM) je korištena za pripremu kalibracijskog pravca. Pravac je dobiven korištenjem šest različitih koncentracija nitrita (5, 10, 20, 30, 40 i 50 μM) dobivenih razrjeđivanjem standardne otopine nitrita s Tris puferom kako je prikazano u Tablici 3.

Tablica 3. Standardne koncentracije nitrita za *NO_2-Mikro* postupak

koncentracija (µM)	*$NaNO_2$ (µL)*	*TRIS pufer (µL)*
0	0	80
5	5	75
10	10	70
20	20	60
30	30	50
40	40	40
50	50	30

3.2.2. Spektrofotometrijska metoda određivanja sadržaja nitrita s Griessovim reagensom

Valjanost spektrofotometrijskog postupka je ispitana u dva koncentracijska područja, 5 do 50 µM (*NO_2-SFM1*) i 10 do 100 µM (*NO_2-SFM2*) nitrita. Odgovarajući volumen 200 µM standardne otopine nitrita koji sadrži 5 do 50 µM (10 do 100 µM) nitrita nadopuni se do konačnog volumena uzorka od 300 µL dodatkom ultračiste vode u epruveti. U tako priređenu reakcijsku smjesu doda se 100 µL Griessa A i 100 µL Griessa B, nadopuni do 3 mL vodom, promiješa, te ostavi stajati 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon stajanja mjeri se apsorbancija u 1 cm kvarcnoj kiveti na 540 nm pomoću UV/Vis spektrofotometra Agilent 8453 (Agilent, Njemačka). Sadržaj NO_2^- se dobije iz kalibracijskog pravca nitrita dobivenog iz odnosa apsorbancije i koncentracije standardne otopine nitrita. Izračunavanje sadržaja NO_2^- dobije se korištenjem gore navedene jednadžbe. Standardna otopina nitrata (200 µM) je korištena za pripremu kalibracijskog pravca. Pravac je dobiven korištenjem šest različitih koncentracija nitrita (5, 10, 20, 30, 40 i 50 µM, odnosno 10, 20, 40, 60, 80 i 100 µM) dobivenih razrjeđivanjem standardne otopine nitrita s vodom kako je prikazano u Tablici 4.

3.3. Prevalidacijski protokol

Standardizirana mjerenja se sastoje od 24 podatka, odnosno šest skupina, u svakoj po četiri mjerenja. Standardni i slijepi uzorci mjereni su u standardnom radnom području u kojemu je odnos najmanje i najveće količine analita 1:10, prema redoslijedu 1, 6, 2, 5, 3 i 4 kako je prikazano u Tablicama 12, 13 i 14 u poglavlju 4.

Matematičko-statistička ispitivanja opisana su u nekoliko glavnih skupina: karakterizacija podataka, ispitivanje homogenosti podataka, postavljanje kalibracijske i prosudbene analitičke funkcije, prepoznavanje bjegunaca i izračunavanje graničnih vrijednosti postupka.

Tablica 4. Standardne koncentracije nitrita za *NO_2-SFM1* i *NO_2-SFM2* postupak

koncentracija (μM)	*$NaNO_2$ (μL)*	*H_2O (μL)*
0	0	300
5	7,5	292,5
10	15	285
20	30	270
30	45	255
40	60	240
50	75	225
60	90	210
80	120	180
100	150	150

Statističke vrijednosti zahtjeva označene su kao *R*, a veličine *P* i *f* predstavljaju razinu pouzdanosti i stupanj slobode (Grdinić i Vuković, 2004). Prevalidacijski ekspertni sustav primijenjen je za prosudbu valjanosti mikroanalitičkog i spektrofotometrijskog postupaka za određivanje sadržaja nitrita. Analitički i instrumentalni parametri ispitivanih sustava prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Analitički i instrumentalni parametri za *NO_2-Mikro* i *NO_2-SFM1(2)* postupke

	NO_2-Mikro	*NO_2-SFM1(2)*
Analitički		
analit	nitrit	
Radno područje (μM)	5,0-50,0	5,0-50,0 (10,0-100,0)
Reagens	Griess	
Ukupni volumen (mL)	0,2	3
matrica	nema	
Instrumentalni		
Metoda	spektrofotometrija	
Instrument	UV-Vis spektrofotometar	
Valna duljina, λ	540	
Kivete (d = 1 cm)	kvarcna	
optička duljina puta (cm)	1	

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Prevalidacija *NO_2-Mikro, NO_2-SFM1* i *NO_2-SFM2* postupaka

Primjenom prevalidacijske strategije (Grdinić i Vuković, 2004) provedena je provjera valjanosti i utvrđivanje izvedbenih značajki mikroanalitičkog i spektrofotometrijskog postupka za određivanje nitrita.

4.1.1. Karakterizacija skupina od 1 do 6

Karakterizacija sustava i usporedba početnih podataka provedena je pomoću deskriptivne statistike izračunavanjem srednjih vrijednosti i stupnja disperzije. Rezultati dobiveni u ovom koraku korišteni su za daljnju dijagnozu u prognostičkoj statistici. Standardizirana mjerenja i izračunate vrijednosti pojedinih sustava dani su u Tablicama 6, 7 i 8. Iz rezultata je vidljivo da je dobiven zadovoljavajući stupanj preciznosti unutar mjernog područja s nižim stupnjem preciznosti na donjoj granici radnog područja za sva tri sustava. U *NO_2-Mikro* sustavu (Tablica 6.) vrijednosti s_{rB} iznose od 2,90 do 12,74%, s_{ry} od 1,61 do 22,16%, s_{rS} od 1,95 do 23,85%, u *NO_2-SFM1* sustavu (Tablica 7.) s_{rB} od 2,72 do 27,68%, s_{ry} od 1,28 do 13,15%, s_{rS} od 1,02 do 22,67%, a u *NO_2-SFM2* sustavu (Tablica 8.) s_{rB} od 4,44 do 8,02%, s_{ry} od 1,41 do 13,15%, s_{rS} od 2,26 do 23,58%. Najveća kolebanja s_r, se javljaju kod neto apsorbancija, *S*. Glavni uzrok tomu su velika kolebanja vrijednosti grubih i slijepih signala, koji utječu na povećanje rasapa neto apsorbancije u sva tri ispitivana sustava.

Tablica 6. Standardna mjerenja za sustav *NO_2-Mikro*

Skupina (j)	*Uzorak br. (i)*	x^a *(μM)*	*B*	$\bar{B} / s_B / s_{rB}$(%)	*y*	$\bar{y} / s_y / s_{ry}$(%)	*S*	$\bar{S} / s_S / s_{rS}$ (%)	A^b	$\bar{A} / s_A / s_{rA}$(%)
1	I	50	0,047	0,046/±0,002/±3,28	1,386	1,390/±0,029/±2,08	1,339	1,345/±0,028/±2,07	0,027	0,027/±0,001/±2,07
	II		0,044		1,367		1,323		0,026	
	III		0,045		1,376		1,331		0,027	
	IV		0,047		1,432		1,385		0,028	
6	I	5	0,047	0,047/±0,003/±6,08	0,185	0,189/±0,017/±8,85	0,138	0,141/±0,019/±13,55	0,028	0,028/±0,004/±13,55
	II		0,047		0,179		0,132		0,026	
	III		0,051		0,177		0,126		0,025	
	IV		0,044		0,213		0,169		0,034	
2	I	40	0,043	0,045/±0,001/±2,90	1,136	1,142/±0,023/±2,03	1,093	1,097/±0,023/±2,10	0,027	0,027/±0,001/±2,10
	II		0,046		1,129		1,083		0,027	
	III		0,044		1,126		1,082		0,027	
	IV		0,045		1,176		1,131		0,028	
5	I	10	0,044	0,043/±0,005/±12,74	0,342	0,301/±0,067/±22,16	0,298	0,258/±0,061/±23,85	0,030	0,026/±0,006/±23,85
	II		0,046		0,328		0,282		0,028	
	III		0,047		0,331		0,284		0,028	
	IV		0,035		0,201		0,166		0,017	
3	I	30	0,041	0,041/±0,003/±6,38	0,868	0,871/±0,014/±1,61	0,827	0,830/±0,016/±1,95	0,028	0,028/±0,001/±1,95
	II		0,045		0,858		0,813		0,027	
	III		0,040		0,868		0,828		0,028	
	IV		0,039		0,891		0,852		0,028	
4	I	20	0,040	0,040/±0,003/±7,87	0,616	0,583/±0,051/±8,75	0,576	0,544/±0,048/±8,85	0,029	0,027/±0,002/±8,85
	II		0,041		0,601		0,560		0,028	
	III		0,042		0,608		0,566		0,028	
	IV		0,035		0,507		0,472		0,024	
$\bar{s}(\bar{s}_r, \%)$				±0,003(±7,31)		±0,038 (±10,47)		±0,037 (±11,86)		±0,003 (±11,86)

Tablica 7. Standardna mjerenja za sustav *NO_2-SFM1*

Skupina (j)	*Uzorak br. (i)*	x^a *(μM)*	*B*	$\overline{B} / s_B / s_{rB}$ (%)	*y*	$\overline{y} / s_y / s_{ry}$ (%)	*S*	$\overline{S} / s_S / s_{rS}$ (%)	A^b	$\overline{A} / s_A / s_{rA}$ (%)
1	I	50	0,033	0,034/±0,001/±4,16	0,230	0,227/±0,005/±2,10	0,197	0,193/±0,005/±2,50	0,0039	0,004/±0,0001/±2,50
	II		0,036		0,230		0,194		0,0039	
	III		0,034		0,220		0,186		0,0037	
	IV		0,033		0,228		0,195		0,0039	
6	I	5	0,034	0,035/±0,001/±2,72	0,059	0,059/±0,003/±4,30	0,025	0,023/±0,003/±13,31	0,0050	0,005/±0,0006/±13,31
	II		0,036		0,055		0,019		0,0038	
	III		0,035		0,061		0,026		0,0052	
	IV		0,036		0,059		0,023		0,0046	
2	I	40	0,033	0,034/±0,002/±4,44	0,203	0,202/±0,003/±1,28	0,170	0,168/±0,002/±1,02	0,0043	0,004/±0,00004/±1,02
	II		0,033		0,201		0,168		0,0042	
	III		0,036		0,205		0,169		0,0042	
	IV		0,033		0,199		0,166		0,0042	
5	I	10	0,064	0,045/±0,013/±27,68	0,101	0,090/±0,012/±13,15	0,037	0,045/±0,010/±22,67	0,0037	0,005/±0,0010/±22,67
	II		0,040		0,099		0,059		0,0059	
	III		0,039		0,077		0,038		0,0038	
	IV		0,038		0,083		0,045		0,0045	
3	I	30	0,036	0,041/±0,006/±14,18	0,174	0,167/±0,007/±4,06	0,138	0,127/±0,009/±7,03	0,0046	0,004/±0,0003/±7,03
	II		0,048		0,171		0,123		0,0041	
	III		0,036		0,164		0,128		0,0043	
	IV		0,042		0,159		0,171		0,0039	
4	I	20	0,053	0,042/±0,008/±19,72	0,118	0,126/±0,009/±7,27	0,065	0,084/±0,016/±19,46	0,0033	0,004/±0,0008/±19,46
	II		0,038		0,123		0,085		0,0043	
	III		0,041		0,123		0,082		0,0041	
	IV		0,034		0,139		0,105		0,0053	
$\overline{s}(\overline{s}_r, \%)$				±0,007(±15,28)		±0,007 (±6,67)		±0,009 (±13,70)		±0,0006 (±13,70)

Tablica 8. Standardna mjerenja za sustav *NO_2-SFM2*

Skupina (j)	*Uzorak br. (i)*	*x^a (μM)*	*B*	$\overline{B} / s_B / s_{rB}$(%)	*y*	$\bar{y} / s_y / s_{ry}$(%)	*S*	$\overline{S} / s_S / s_{rS}$(%)	A^b	$\overline{A} / s_A / s_{rA}$(%)
1	I	100	0,033	0,035/±0,002/±6,29	0,426	0,439/±0,034/±7,85	0,393	0,404/±0,033/±8,13	0,0039	0,004/±0,0003/±8,13
	II		0,036		0,416		0,380		0,0038	
	III		0,034		0,423		0,389		0,0039	
	IV		0,038		0,490		0,452		0,0045	
6	I	10	0,040	0,038/±0,002/±4,46	0,101	0,090/±0,012/±13,15	0,061	0,052/±0,012/±23,58	0,0061	0,005/±0,001/±23,58
	II		0,039		0,077		0,038		0,0038	
	III		0,038		0,083		0,045		0,0045	
	IV		0,036		0,100		0,063		0,0063	
2	I	80	0,033	0,034/±0,002/±4,44	0,361	0,374/±0,009/±2,34	0,328	0,340/±0,008/±2,40	0,0041	0,004/±0,0001/±2,40
	II		0,033		0,377		0,344		0,0043	
	III		0,036		0,380		0,344		0,0043	
	IV		0,033		0,378		0,345		0,0043	
5	I	20	0,038	0,037/±0,003/±8,02	0,118	0,126/±0,009/±7,27	0,080	0,089/±0,010/±11,76	0,0040	0,004/±0,0005/±11,76
	II		0,041		0,123		0,082		0,0041	
	III		0,034		0,123		0,089		0,0045	
	IV		0,036		0,139		0,103		0,0051	
3	I	60	0,036	0,038/±0,003/±8,00	0,264	0,278/±0,013/±4,60	0,228	0,241/±0,014/±5,89	0,0038	0,004/±0,0002/±5,89
	II		0,036		0,292		0,256		0,0043	
	III		0,042		0,271		0,229		0,0038	
	IV		0,036		0,285		0,249		0,0042	
4	I	40	0,033	0,034/±0,002/±4,44	0,201	0,201/±0,003/±1,41	0,168	0,167/±0,004/±2,26	0,0042	0,004/±0,0001/±2,26
	II		0,033		0,205		0,172		0,0043	
	III		0,036		0,199		0,163		0,0041	
	IV		0,033		0,199		0,166		0,0042	
$\bar{s}(\bar{s}_r,\%)$				±0,002(±6,15)		±0,017 (±7,26)		±0,016 (±11,59)		±0,0006 (±11,59)

4.1.2. Provjera graničnih skupina 1 i 6

Kontrola kakvoće mjerenja u skupini s najmanjom količinom analita x_6, pokazala je da za sustave *NO_2-Mikro* i *NO_2-SFM2* nije potrebno povećati količinu analita u skupini x_6, budući da je zadovoljen zahtjev R1, dok je za sustav *NO_2-SFM1* potrebno povećati količinu analita u skupini x_6, budući da isti zahtjev nije zadovoljen (Tablica 9.). Budući da je u svim sustavima slijepi signal dovoljno manji od grubog signala, zanemaren je utjecaj rasapa slijepih signala na s_M postupka (R2, Tablica 9.). Heurističko ispitivanje položaja praga određivanja, L_{DG}, pokazalo je da se prag određivanja očekuje ispod donje granice radnog područja (R3, Tablica 9.). Dodatno ispitivanje kakvoće razlikovanja grubog i slijepog signala temelji se na R4 (Tablica 9.). U sustavima *NO_2-Mikro* i *NO_2-SFM1* moguće je vrlo dobro razlučivanje grubih i slijepih signala, dok je u *NO_2-SFM2* sustavu moguće dobro razlučivanje signala (R4, Tablica 9.). Preliminarno ispitivanje linearnosti, koje uključuje samo osjetljivosti graničnih skupina analita x_1 i x_6, pokazuje da se linearna kalibracijska funkcija očekuje u svim sustavima (R5, Tablica 9.).

4.1.3. Ispitivanje homogenosti

Jednostavna analiza varijance primijenjena na *NO_2-Mikro* i *NO_2-SFM2* sustav pokazala je da su slijepe vrijednosti nehomogene, dok su za sustav *NO_2-SFM1* te vrijednosti homogene, te da rasap slijepih vrijednosti nije moguće zanemariti (R6 i R7, Tablica 10.). Stoga se grubi signali ne mogu korigirati srednjom vrijednošću svih slijepih signala, $\overline{B}_N$, već se svaki grubi signal korigira pripadajućim slijepim signalom. Posljednji zahtjev R8 je ispunjen, pa se značajnost utjecaja nehomogenosti slijepih vrijednosti umanjuje. Bartlettovo ispitivanje primijenjeno je na s i s_r vrijednosti za B, y, S i A u svim sustavima i dovodi do oprečnih zaključaka. Prema ovom ispitivanju, slijepi signali dobiveni u *NO_2-Mikro* i *NO_2-SFM2* su strogo homogeni, dok su u *NO_2-SFM1* gotovo homogeni do nehomogeni. Nehomogenost s_S i s_{rS} vrijednosti može se objasniti većim rasapom koji potječe od slijepih i grubih mjerenja. Bartlettovo ispitivanje, primijenjeno na prividne mase analita, $\hat{x}$, ukazuje na strogo homogene vrijednosti za *NO_2-Mikro* sustav, te na homogene vrijednosti za *NO_2-SFM1* i *NO_2-SFM2* sustav. Vrijednosti $s_{r\hat{x}}$ odlikuju se stupnjem nehomogenosti za *NO_2-Mikro* i *NO_2-SFM1* sustave, te manjim stupnjem homogenosti za *NO_2-SFM2* sustav (Tablice 10, 12, 13 i 14.).

Tablica 9. Provjera graničnih skupina 1 i 6

NO_2-Mikro		*NO_2-SFM1*		*NO_2-SFM2*	
rezultat	*dijagnoza*	*rezultat*	*dijagnoza*	*rezultat*	*dijagnoza*
R1: AC = 3,99	Ne treba mijenjati količinu analita kod x_6	*R1: AC* = 1,66	Vjerojatno treba mijenjati količinu analita kod x_6	*R1: AC* =2,35	Ne treba mijenjati količinu analita kod x_6
R2: R = 29,89% $s_{rB1} = \pm 3{,}28\%$ $s_{rB6} = \pm 6{,}08\%$	Utjecaj rasapa slijepih signala na s_M zanemariv	*R2: R* = 6,60% $s_{rB1} = \pm 4{,}16\%$ $s_{rB6} = \pm 2{,}72\%$	Utjecaj rasapa slijepih signala na s_M zanemariv	*R2: R* = 13,53% $s_{rB1} = \pm 6{,}29\%$ $s_{rB6} = \pm 4{,}46\%$	Utjecaj rasapa slijepih signala na s_M zanemariv
R3 $s_{ry6} = \pm 8{,}85\%$ $s_{rS6} = \pm 13{,}55\%$ $s_{ry1} = \pm 2{,}08\%$ $s_{rS1} = \pm 2{,}07\ \%$ $L_{DG} = 0{,}136\ \mu M$ $\bar{L}_{DG} = 0{,}028\ \mu M$ $s_{rL} = \pm 25{,}19\%$	Heurističkim ispitivanjem očekuje se prag određivanja manji od količine analita u x_6	R3 $s_{ry6} = \pm 4{,}30\%$ $s_{rS6} = \pm 13{,}31\%$ $s_{ry1} = \pm 2{,}10\%$ $s_{rS1} = \pm 2{,}50\ \%$ $L_{DG} = 0{,}039\ \mu M$ $\bar{L}_{DG} = 0{,}0080\ \mu M$ $s_{rL} = \pm 25{,}19\%$	Heurističkim ispitivanjem očekuje se prag određivanja manji od količine analita u x_6	R3 $s_{ry6} = \pm 13{,}15\%$ $s_{rS6} = \pm 23{,}58\%$ $s_{ry1} = \pm 7{,}85\%$ $s_{rS1} = \pm 8{,}13\ \%$ $L_{DG} = 0{,}066\ \mu M$ $\bar{L}_{DG} = 0{,}014\ \mu M$ $s_{rL} = \pm 25{,}19\%$	Heurističkim ispitivanjem očekuje se prag određivanja manji od količine analita u x_6
R4: R = 7,22	Vrlo dobro razlučivanje signala	*R4: R* = 6,69	Vrlo dobro razlučivanje signala	*R4: R* = 3,82	Dobro razlučivanje signala
R5: R = 0,70	Očekuje se linearna kalibracijska funkcija	*R5: R* = 2,52	Očekuje se linearna kalibracijska funkcija	*R5: R* = 1,80	Očekuje se linearna kalibracijska funkcija

Tablica 10. Ispitivanje homogenosti podataka

NO_2-Mikro		*NO_2-SFM1*		*NO_2-SFM2*	
rezultat	*dijagnoza*	*rezultat*	*dijagnoza*	*rezultat*	*dijagnoza*
R6 $s_{Bw}^2 = 9{,}79 \times 10^{-6}$ $s_{Bb}^2 = 3{,}31 \times 10^{-5}$ $R = 3{,}38$	Slijepe vrijednosti nehomogene	R6 $s_{Bw}^2 = 4{,}37 \times 10^{-5}$ $s_{Bb}^2 = 8{,}95 \times 10^{-5}$ $R = 2{,}05$	Slijepe vrijednosti homogene	R6 $s_{Bw}^2 = 5{,}04 \times 10^{-6}$ $s_{Bb}^2 = 1{,}56 \times 10^{-5}$ $R = 3{,}10$	Slijepe vrijednosti nehomogene
R7 $\overline{B}_N < 0{,}007$ $\overline{B}_N = 0{,}044$	Utjecaj slijepih signala nije zanemariv	R7 $\overline{B}_N < 0{,}001$ $\overline{B}_N = 0{,}038$	Utjecaj slijepih signala nije zanemariv	R7 $\overline{B}_N < 0{,}002$ $\overline{B}_N = 0{,}036$	Utjecaj slijepih signala nije zanemariv
$s_{rBN} = 8{,}86\%$ $s_{BN} = 3{,}86 \times 10^{-3}$		$s_{rBN} = 19{,}08\%$ $s_{BN} = 7{,}32 \times 10^{-3}$		$s_{rBN} = 7{,}54\%$ $s_{BN} = 2{,}71 \times 10^{-3}$	
$R(s_B) = 7{,}05$ $R(s_{rB}) = 7{,}55$ $R(s_y) = 9{,}62$ $R(s_{ry}) = 25{,}11$ $R(s_S) = 7{,}46$ $R(s_{rS}) = 25{,}19$ $R(s_A) = 24{,}35$ $R(s_{rA}) = 25{,}19$	s.h. s.h. s.h. n.h s.h. n.h. n.h. n.h.	$R(s_B) = 22{,}54$ $R(s_{rB}) = 18{,}53$ $R(s_y) = 9{,}34$ $R(s_{ry}) = 15{,}81$ $R(s_S) = 14{,}07$ $R(s_{rS}) = 22{,}02$ $R(s_A) = 23{,}05$ $R(s_{rA}) = 22{,}02$	n.h. g.h. s.h. g.h. h. n.h. n.h. n.h.	$R(s_B) = 2{,}75$ $R(s_{rB}) = 2{,}25$ $R(s_y) = 15{,}31$ $R(s_{ry}) = 13{,}56$ $R(s_S) = 12{,}59$ $R(s_{rS}) = 18{,}68$ $R(s_A) = 22{,}69$ $R(s_{rA}) = 18{,}68$	s.h. s.h. g.h. h. h. g.h. n.h. g.h.

4.1.4. Ispitivanje odnosa analit-signal

Primjenom metode najmanjih kvadrata za ispitivane sustave utvrđena je značajna korelacija između koncentracije analita i signala (R10-R12, Tablica 11.). Za ispitivane sustave utvrđena je značajnost koeficijenta korelacije. Nadalje, sustavnim ispitivanjem realnosti konstanti utvrđene su idealna kalibracijska i prosudbena analitička funkcija. Ostali karakteristični podaci su srednje pogreške konstanti i standardno odstupanje analitičkog postupka, s_M, u određenom radnom području. Pomoću dobivene kalibracijske i prosudbene analitičke funkcije izračunate su prividne vrijednosti signala $\hat{S}$ i prividne mase analita $\hat{x}$. S definiranom analitičkom funkcijom dana je prosudba točnosti ispitivanih sustava usporedbom stvarne (x) i prividne mase analita ($\hat{x}$). Slučajna odstupanja, kao mjera preciznosti, su najpovoljnija za *NO_2-Mikro* sustav ($s_{r\hat{x}}$ od ± 1,95% do ± 13,55%), dok su manje povoljna za *NO_2-SFM1* ($s_{r\hat{x}}$ od ± 1,02% do ± 22,7%) i *NO_2-SFM2* ($s_{r\hat{x}}$ od ± 2,26% do ± 23,6%) sustave. Sustavna odstupanja, kao mjera točnosti, su također najpovoljnija za *NO_2-Mikro* sustav ($\Delta\bar{x}$ od -1,22% do +5,78%, Tablica 17.). Struktura podataka za sva tri sustava prikazana je u Tablicama 12, 13 i 14.

4.1.5. Prepoznavanje bjegunaca

Ispitivanje bjegunaca provedeno je usporedbom $|S^*|$ i $|x^*|$ vrijednosti s t-vrijednosti intervala na razini pouzdanosti od P = 95 i 99%. Pregledom rezultata otkrivena je prisutnost dva bjegunca unutar $|S^*|$ i $|x^*|$ vrijednosti u *NO_2-Mikro* ispitivanom sustavu koji, prema prevalidacijskom kriteriju, imaju utjecaj na homogenost podataka S i x (R15, Tablica 15.). U *NO_2-SFM1* i *NO_2-SFM2* sustavima otkrivena je prisutnost jednog bjegunca koji za skupinu podataka u *NO_2-SFM2* sustavu, prema prevalidacijskom kriteriju, nema utjecaja na homogenost podataka S i x. Premda je jedan bjegunac otkriven i u *NO_2-SFM1* sustavu, njegovo odstupanje, prema prevalidacijskom kriteriju nije moguće tolerirati.

4.1.6. Prosudba graničnih vrijednosti

Prema preliminarnom ispitivanju R3 (Tablica 10.), izračunate granične vrijednosti manje su od količine analita u skupini s najmanjim sadržajem, x_6, čime se potvrđuje osjetljivost postupka. Prema preporučenim kriterijima prosuđeni pragovi dokazivanja manji su od količine analita na donjoj granici radnog područja x_6 u sva tri ispitivana sustava (R16, Tablica

16.). Granične vrijednosti signala (S_D) su manje od korigiranih signala dobivenih u skupini x_6 za *NO_2-Mikro* postupak, dok su u *NO_2-SFM1* sustavu veće od korigiranih signala.

Za *NO_2-SFM2* postupak je utvrđeno da su granične vrijednosti signala manje, no vrlo bliske signalu u skupini n_6. Utvrđeni prag određivanja za *NO_2-Mikro* i *NO_2-SFM2* sustav manji je od donje granice radnog područja, dok je L_Q za *NO_2-SFM1* sustav veći od donje granice radnog područja. Metrološke značajke, kritične za izbor izvedbenih značajki mikroanalitičkog i spektrofotometrijskog postupka za određivanje sadržaja nitrita, zbirno su prikazane u Tablicama 17, 18 i 19.

Tablica 11. Kakvoća odnosa analit-signal

NO_2-Mikro		*NO_2-SFM1*		*NO_2-SFM2*	
rezultat	*dijagnoza*	*rezultat*	*Dijagnoza*	*rezultat*	*Dijagnoza*
R10: r = 0,9970 b = 0,0272 a = -0,0007 s_y = ± 0,0271 s_b = ±0,0021 s_a = ± 0,0105 centroid = (25,833, 0,702)		*R10:* r = 0,9896 b = 0,0039 a = -0,0066 s_y = ± 0,0019 s_b = ±0,0006 s_a = ± 0,0008 centroid = (25,83, 0,11)		*R10:* r = 0,9926 b = 0,0040 a = -0,0094 s_y = ± 0,0058 s_b = ±0,0005 s_a = ± 0,0023 centroid = (51,67, 0,22)	
R11: R = 60,38 Korelacija značajna		*R11:* R = 32,19 Korelacija značajna		*R11:* R = 38,31 Korelacija značajna	
±C_b = 0,0272 ± 0,0060 ±C_a = -0,0007± 0,0297		±C_b = 0,0039 ± 0,0016 ±C_a = -0,0066± 0,0021		±C_b = 0,0040 ± 0,0014 ±C_a = -0,0094± 0,0064	
t-*ispitivanje na realnost konstanti kalibracijske funkcije*		t-*ispitivanje na realnost konstanti kalibracijske funkcije*		t-*ispitivanje na realnost konstanti kalibracijske funkcije*	
$\boldsymbol{V}$ = 0,0272 $R_{\boldsymbol{V}}$ = 117,7 s_V = ± 0,0002 s_M = ± 0,0343 $\hat{S}$ = 0,027x	Idealna kalibracijska funkcija	$\boldsymbol{V}$ = 0,0041 $R_{\boldsymbol{V}}$ = 61,3 s_V = ± 0,00007 s_M = ± 0,0098 $\hat{S}$ = 0,004x	Idealna kalibracijska funkcija	$\boldsymbol{V}$ = 0,0041 $R_{\boldsymbol{V}}$ = 73,5 s_V = ± 0,00006 s_M = ± 0,0167 $\hat{S}$ = 0,004x	Idealna kalibracijska funkcija
t-*ispitivanje na realnost konstanti prosudbene analitičke funkcije*		t-*ispitivanje na realnost konstanti prosudbene analitičke funkcije*		t-*ispitivanje na realnost konstanti prosudbene analitičke funkcije*	
V = 36,7 R_V = 117,7 s_V = 0,3120 s_M = 1,2615 $\hat{x}$ = 36,7S	Idealna prosudbena analitička funkcija	V = 244,9 R_V = 61,3 s_V = 3,9931 s_M = 2,4166 $\hat{x}$ = 244,9S	Idealna prosudbena analitička funkcija	V = 241,9 R_V = 73,5 s_V = 3,2916 s_M = 4,0374 $\hat{x}$ = 241,9S	Idealna prosudbena analitička funkcija

Tablica 12. Struktura podataka za sustav *NO_2-Mikro*

j	*I*	*S*	$\hat{S}$	ΔS	*S**	*x*	$\hat{x}$	$\bar{\hat{x}}$	$s_{\bar{x}}$	$s_{r\hat{x}}$ *(%)*	Δx	$\Delta x/x \times 100(\%)$	$\Delta\bar{x}$	$\Delta\bar{x}/x \times 100(\%)$	*x**
1	I	1,339	1,359	0,020	0,582	50	49,18	49,39	±1,020	±2,07	-0,816	-1,63	-0,61	-1,22	0,647
	II	1,323		0,036	1,048		48,60				-1,404	-2,81			1,113
	III	1,331		0,028	0,816		48,89				-1,110	-2,22			0,880
	IV	1,385		0,026	0,759		50,87				+0,873	+1,75			0,692
6	I	0,138	0,136	0,002	0,061	5	5,07	5,19	±0,703	±13,55	+0,069	+1,38	+0,19	+3,77	0,055
	II	0,132		0,004	0,114		4,85				-0,151	+3,03			0,120
	III	0,126		0,010	0,288		4,63				-0,372	-7,44			0,295
	IV	0,169		0,033	0,965		6,21				+1,207	+24,15			0,957
2	I	1,093	1,087	0,006	0,170	40	40,15	40,30	±0,846	±2,10	+0,148	+0,37	+0,30	+0,75	0,117
	II	1,083		0,004	0,122		39,78				-0,220	+0,55			0,174
	III	1,082		0,005	0,151		39,74				-0,256	-0,64			0,203
	IV	1,131		0,044	1,277		41,54				+1,543	+3,86			1,223
5	I	0,298	0,272	0,026	0,764	10	10,95	10,58	±0,322	±3,04	+0,946	-9,46	+0,58	+5,78	0,750
	II	0,282		0,010	0,297		10,36				+0,358	+3,58			0,284
	III	0,284		0,012	0,356		10,43				+0,432	+4,32			0,342
	IV	0,166		0,106	3,083		6,10				0,000	0,000			3,094
3	I	0,827	0,815	0,012	0,339	30	30,38	30,49	±0,595	±1,95	+0,377	+1,26	+0,49	+1,62	0,299
	II	0,813		0,002	0,069		29,86				-0,137	+0,46			0,109
	III	0,828		0,013	0,368		30,41				+0,414	+1,38			0,328
	IV	0,852		0,037	1,067		31,30				+1,295	+4,32			1,027
4	I	0,576	0,544	0,032	0,945	20	21,16	19,96	±1,768	±8,85	+1,157	+5,79	-0,04	-0,18	0,917
	II	0,560		0,016	0,478		20,57				+0,570	-2,85			0,452
	III	0,566		0,022	0,653		20,79				+0,790	-3,95			0,626
	IV	0,472		0,072	2,086		17,34				-2,663	-13,31			2,111

Bartlettovo ispitivanje za $\hat{x}$: $R(s)$ = 7,46, s.h. ; $R(s_r)$ = 25,19, n.h. Srednja vrijednost šest skupina za $\hat{x}$: $\bar{s}$ = ±1,343 ; $\bar{s}_r$ = ±11,86%.

Tablica 13. Struktura podataka za sustav *NO_2-SFM1*

j	*I*	*S*	$\hat{S}$	ΔS	*S**	*x*	$\hat{x}$	$\bar{\hat{x}}$	$s_{\bar{x}}$	$s_{r\hat{x}}$ *(%)*	Δx	$\Delta x/x \times 100(\%)$	$\Delta\bar{x}$	$\Delta\bar{x}/x \times 100(\%)$	*x**
1	I	0,192	0,203	0,006	0,603	50	48,24	47,26	±1,183	±2,50	-1,756	-3,51	-2,74	-5,47	0,727
	II	0,192		0,009	0,908		47,51				-2,491	+4,98			1,031
	III	0,182		0,017	1,721		45,55				-4,450	+8,90			1,841
	IV	0,190		0,008	0,806		47,75				-2,246	+4,49			0,929
6	I	0,021	0,020	0,005	0,479	5	6,12	5,69	±0,758	±13,31	+1,122	+22,45	+0,69	+13,88	0,464
	II	0,017		0,001	0,131		4,63				-0,347	+6,94			0,144
	III	0,023		0,006	0,580		6,37				+1,367	-27,34			0,566
	IV	0,021		0,003	0,275		5,63				+0,633	+12,65			0,262
2	I	0,165	0,162	0,008	0,778	40	41,63	41,20	±0,418	±1,02	+1,632	+4,08	+1,20	+3,01	0,675
	II	0,163		0,006	0,575		41,14				+1,142	+2,86			0,473
	III	0,167		0,007	0,677		41,39				+1,387	-3,47			0,574
	IV	0,161		0,004	0,372		40,65				+0,652	+1,63			0,270
5	I	0,063	0,041	0,004	0,365	10	9,06	10,96	±2,484	±22,67	-0,939	-9,39	+0,96	+9,59	0,389
	II	0,061		0,018	1,872		14,45				+4,449	+44,49			1,841
	III	0,039		0,003	0,263		9,31				-0,694	+6,94			0,287
	IV	0,045		0,004	0,449		11,02				+1,020	-10,20			0,422
3	I	0,136	0,122	0,016	1,651	30	33,80	30,98	±2,177	±7,03	+3,795	+12,65	+0,98	+3,26	1,570
	II	0,133		0,001	0,126		30,12				+0,122	+0,41			0,050
	III	0,126		0,006	0,634		31,35				+1,346	+4,49			0,557
	IV	0,121		0,005	0,484		28,65				-1,348	+4,49			0,558
4	I	0,080	0,081	0,016	1,644	20	15,92	20,63	±4,016	±19,46	-4,082	+20,41	+0,63	+3,16	1,689
	II	0,085		0,004	0,389		20,82				+0,816	-4,08			0,338
	III	0,085		0,0008	0,084		20,08				+0,081	-0,41			0,034
	IV	0,101		0,024	2,422		25,71				+5,714	-28,57			2,364

Bartlettovo ispitivanje za $\hat{x}$: $R(s)$ = 14,07 h. ; $R(s_r)$ = 22,02 n.h. Srednja vrijednost šest skupina za $\hat{x}$: $\bar{s}$ = ± 2,21 ; $\bar{s}_r$ = ±13,70%

Tablica 14. Struktura podataka za sustav *NO_2-SFM2*

j	*I*	*S*	$\hat{S}$	ΔS	*S**	*x*	$\hat{x}$	$\bar{\hat{x}}$	$s_{\bar{x}}$	$s_{r\hat{x}}$ *(%)*	Δx	$\Delta x/x \times 100(\%)$	$\Delta\bar{x}$	$\Delta\bar{x}/x \times 100(\%)$	*x**
1	I	0,393	0,412	0,019	1,121	100	95,06	97,60	±7,931	±8,13	-4,938	-4,94	-2,40	-2,40	1,223
	II	0,380		0,032	1,901		91,92				-8,083	+8,08			2,002
	III	0,389		0,023	1,361		94,09				-5,910	+5,91			1,463
	IV	0,452		0,040	2,422		109,33				+9,333	+9,33			2,312
6	I	0,061	0,041	0,019	1,191	10	14,76	12,52	±2,952	±23,58	+4,755	+47,55	+2,92	+29,22	1,178
	II	0,038		0,003	0,190		9,19				+0,808	+8,08			0,200
	III	0,045		0,004	0,230		10,89				+0,885	-8,85			0,219
	IV	0,063		0,022	1,311		15,24				+5,239	+52,39			1,298
2	I	0,328	0,329	0,001	0,080	80	79,34	82,30	±1,979	±2,40	-0,661	+0,83	+2,03	+2,88	0,164
	II	0,344		0,015	0,881		83,21				+3,209	+4,01			0,795
	III	0,344		0,015	0,881		83,21				+3,209	-4,01			0,795
	IV	0,345		0,015	0,941		83,45				+3,451	+4,31			0,855
5	I	0,080	0,082	0,002	0,140	20	19,35	21,41	±2,518	±11,76	-0,649	-3,25	+1,41	+7,03	0,161
	II	0,082		0,0003	0,020		19,84				-0,165	+0,83			0,041
	III	0,089		0,007	0,400		21,53				+1,528	+7,64			0,379
	IV	0,103		0,021	1,241		24,91				+4,914	-24,57			1,217
3	I	0,228	0,247	0,019	1,141	60	55,15	58,17	±3,424	±5,89	-4,850	+8,08	-1,82	-3,04	1,201
	II	0,256		0,009	0,540		61,92				+1,923	+3,21			0,476
	III	0,229		0,018	1,081		55,39				-4,608	+7,68			1,141
	IV	0,249		0,002	0,120		60,23				+0,230	+0,38			0,057
4	I	0,168	0,165	0,003	0,200	40	40,64	40,46	±0,913	±2,26	+0,637	+1,59	+0,46	+1,14	0,158
	II	0,172		0,007	0,440		41,61				+1,605	-4,01			0,397
	III	0,163		0,002	0,100		39,43				-0,572	-1,43			0,141
	IV	0,166		0,001	0,080		40,15				+0,153	-0,38			0,038

Bartlettovo ispitivanje za $\hat{x}$: $R(s)$ = 12,59 h. ; $R(s_r)$ = 18,68 g.h. Srednja vrijednost šest skupina za $\hat{x}$: $\bar{s} = \pm 3{,}97$; $\bar{s}_r = \pm 11{,}59\%$

Tablica 15. Ispitivanje na prisutnost bjegunaca

NO_2-Mikro		*NO_2-SFM1*		*NO_2-SFM2*	
rezultat	*dijagnoza*	*rezultat*	*dijagnoza*	*rezultat*	*dijagnoza*
R15 $\left\|S_{16}^{*}\right\|$ >2,069 2,807> $\left\|S_{24}^{*}\right\|$ >2,069	Više bjegunaca, nezadovoljavajući podaci	R15 2,807> $\left\|S_{24}^{*}\right\|$ >2,069	Jedan bjegunac, nema utjecaja na podatke	R15 2,807> $\left\|S_{4}^{*}\right\|$ > 2,069	Jedan bjegunac, nema utjecaja na podatke
$\left\|x_{16}^{*}\right\|$ > 2,069 2,807> $\left\|x_{24}^{*}\right\|$ > 2,069	Više bjegunaca, nezadovoljavajući podaci	2,807> $\left\|x_{24}^{*}\right\|$ > 2,069	Jedan bjegunac, nema utjecaja na podatke	2,807> $\left\|x_{4}^{*}\right\|$ > 2,069	Jedan bjegunac, nema utjecaja na podatke

Tablica 16. Prosudba graničnih vrijednosti

NO_2-Mikro		*NO_2-SFM1*		*NO_2-SFM2*	
rezultat	*dijagnoza*	*rezultat*	*dijagnoza*	*rezultat*	*dijagnoza*
R16: Idealna kalibracijska funkcija $\hat{S}$ = 0,027x S_D = 0,050 L_D = 0,23 μM L_Q = 1,42 μM	 S_D<S_6 L_D<x_6 L_Q<x_6	R16: Idealna kalibracijska funkcija $\hat{S}$ = 0,004x S_D = 0,050 L_D = 2,97 μM L_Q = 18,05 μM	 S_D>S_6 L_D<x_6 L_Q>x_6	R16: Idealna kalibracijska funkcija $\hat{S}$ = 0,004x S_D = 0,040 L_D = 1,08 μM L_Q = 6,58 μM	 S_D<S_6 L_D<x_6 L_Q<x_6

Tablica 17. Preciznost i točnost *NO_2-Mikro* postupka za određivanje nitrita

Analit (μM)	*NO_2-Mikro*					
Teorijska	50,00	40,00	30,00	20,00	10,00	5,00
Eksperimentalna	49,39	40,30	30,49	19,96	10,58	5,19
Slučajna odstupanja						
$s_{\hat{x}}$ (μM)	±1,020	±0,846	±0,595	±1,768	±0,322	±0,703
$s_{r\hat{x}}$ (%)	±2,07	±2,10	±1,95	±8,85	±3,04	±13,55
Sustavna odstupanja						
$\Delta\bar{x}$ (μM)	-0,61	+0,30	+0,49	-0,04	+0,58	+0,19
$\Delta\bar{x}$ (%)	-1,22	+0,75	+1,62	-0,18	+5,78	+3,77

Tablica 18. Preciznost i točnost *NO_2-SFM1* postupka za određivanje nitrita

Analit (μM)	*NO_2-SFM1*					
Teorijska	50,00	40,00	30,00	20,00	10,00	5,00
Eksperimentalna	47,26	41,20	30,98	20,63	10,96	5,69
Slučajna odstupanja						
$s_{\hat{x}}$ (μM)	±1,183	±0,418	±2,177	±4,016	±2,484	±0,758
$s_{r\hat{x}}$ (%)	±2,50	±1,02	±7,03	±19,46	±22,67	±13,31
Sustavna odstupanja						
$\Delta\bar{x}$ (μM)	-2,74	+1,20	+0,98	+0,63	+0,96	+0,69
$\Delta\bar{x}$ (%)	-5,47	+3,01	+3,26	+3,16	+9,54	+13,88

Tablica 19. Preciznost i točnost *NO_2-SFM2* postupka za određivanje nitrita

Analit (μM)	*NO_2-SFM2*					
Teorijska	100,00	80,00	60,00	40,00	20,00	10,00
Eksperimentalna	97,60	82,30	58,17	40,46	21,41	12,52
Slučajna odstupanja						
$s_{\hat{x}}$ (μM)	±7,931	±1,979	±3,424	±0,913	±2,518	±2,952
$s_{r\hat{x}}$ (%)	±8,13	±2,40	±5,89	±2,26	±11,76	±23,58
Sustavna odstupanja						
$\Delta\bar{x}$ (μM)	-2,40	+2,03	-1,82	+0,46	+1,41	+2,92
$\Delta\bar{x}$ (%)	-2,40	+2,88	-3,04	+1,14	+7,03	+29,2

5. ZAKLJUČCI

U okviru ovog diplomskog rada provedena je cjelovita prevalidacija za utvrđivanje analitičkih značajki i provjeru kakvoće spektrofotometrijske (*SFM1* i *SFM2*) i mikroanalitičke metode (*NO_2*-Mikro) određivanja nitrata prema Griessu. Kakvoća spektrofotometrijskog postupka ispitana je u radnom području od 5 do 50 μM (*NO_2-SFM1*), te od 10 do 100 μM (*NO_2-SFM2*), dok je kakvoća *NO_2-Mikro* postupka ispitana u području od 5 do 50 μM. Prevalidacijska strategija je također korištena za usporedbu analitičkih značajki postupaka, kao i za procjenu prednosti i nedostataka svakog postupka. Utvrđene izvedbene značajke su: provjera valjanosti mjerenja na rubnim djelovima radnog područja, homogenost mjerenja, bjegunci, linearnost, granične vrijednosti, preciznost i točnost. Kontrola kakvoće mjerenja u skupini s najmanjom količinom analita x_6, pokazala je da za sustave *NO_2-Mikro* i *NO_2-SFM2* nije potrebno povećati količinu analita u skupini x_6, dok je za sustav *NO_2-SFM1* potrebno povećati količinu analita u skupini x_6, budući da kakvoća mjerenja na donjoj granici radnog područja nije zadovoljena. Ispitivanje homogenosti mjerenja za sva tri ispitivana postupka dalo je oprečne rezultate. Jednostavna analiza varijance pokazala je nehomogenost slijepih mjerenja u sustavima *NO_2-Mikro* i *NO_2-SFM2*. Bartlettovo ispitivanje homogenosti varijanci za *B*, *y*, *S* i *A* vrijednosti pokazalo je raznoliku homogenost. Bartlettovo ispitivanje primijenjeno na prividne mase analita, $\hat{x}$, ukazuje na strogo homogene vrijednosti za *NO_2-Mikro* sustav, te na homogene vrijednosti za *NO_2-SFM1* i *NO_2-SFM2* sustav. Ispitivanjem bjegunaca otkrivena je prisutnost dva bjegunca unutar $|S^*|$ i $|x^*|$ vrijednosti u *NO_2-Mikro* ispitivanom sustavu što, prema prevalidacijskom kriteriju, ima utjecaj na homogenost podataka *S* i *x*. U sustavima *NO_2-SFM1* i *NO_2-SFM2* otkrivena je prisutnost jednog bjegunca koji za skupinu podataka u *NO_2-SFM1* nije moguće tolerirati, jer je njegovo odstupanje, veće od dopuštenog. Primjenom metode najmanjih kvadrata za ispitivane sustave utvrđena je linearnost unutar sva tri sustava te značajna korelacija između koncentracije analita i signala. Sustavnim ispitivanjem realnosti konstanti utvrđene su idealna kalibracijska i prosudbena analitička funkcija za sva tri sustava. Prema preporučenim kriterijima prosuđeni pragovi dokazivanja manji su od količine analita na donjoj granici radnog područja x_6 u sva tri ispitivana sustava. Utvrđeni pragovi određivanja za *NO_2-Mikro* i *NO_2-SFM2* sustav manji su od količine analita na donjoj granici radnog područja, dok kod *NO_2-SFM1* sustava to nije slučaj. Izvedbene karakteristike *NO_2-Mikro* postupka pokazale su idealnu linearnu kalibracijsku ($\hat{S} = 0{,}027x$), idealnu analitičku evaluacijsku funkciju ($\hat{x} = 36{,}7S$), vrlo nisku granicu određivanja (L_Q = 1,42 μM),

zadovoljavajuću preciznost ($s_{r\hat{x}}$ od ± 1,95% do ± 13,55%) i točnost ($\Delta\bar{x}$ od -1,22% do +5,78%). Procijenjena kakvoća spektrofotometrijskih postupaka *NO_2-SFM1* i *NO_2-SFM2* je nešto niža. Metoda *NO_2-SFM1* karakterizirana je nižom preciznošću ($s_{r\hat{x}}$ od ± 1,02% do ± 22,67%) i točnošću ($\Delta\bar{x}$ od -5,47% do +13,88%), te lošijom granicom određivanja (L_Q = 18,05 μM), dok je metoda *NO_2-SFM2* također karakterizirana niskom preciznošću ($s_{r\hat{x}}$ od ± 2,26% do ± 23,58%) i točnošću ($\Delta\bar{x}$ od -3,04% do +29,2%), ali povoljnijom granicom određivanja (L_Q = 6,58 μM) od *NO_2-SFM1* postupka. Iz gore navedenih rezultata zaključujemo da se *NO_2-Mikro* postupak odlikuje većom osjetljivošću i povoljnijim analitičkim značajkama s obzirom na spektrofotometrijski postupak. Jednako tako otkriveni su nedostatci i ograničenja sustava. U svim sustavima je utvrđena nepovoljna homogenost podataka, posebice u *NO_2-Mikro* postupku gdje su otkrivena dva bjegunca, te u *NO_2-SFM1* sustavu gdje je otkriven bjegunac s velikim odstupanjem. Utvrđena je nezadovoljavajuća granica određivanja u sustavu *NO_2-SFM1*, no ujedno, prihvatljiva preciznost i točnost sustava. Radi pouzdanijeg određivanja analita na donjoj granici radnog područja kod *NO_2-SFM1* postupka preporučuje se promjena radnog područja izborom prikladnije donje granice. Visoki stupanj disperzije slijepih vrijednosti u svim analitičkim skupinama, posebice kod donje granice radnog područja, utjecao je na kakvoću mjerenja te, u konačnici, na kakvoću svih ispitivanih sustava. Povećanjem preciznosti mjerenja i pažljivosti analitičara pri provođenju ispitivanja smanjio bi se utjecaj veličine i varijabilnosti slijepih signala na neto signal uzorka. Time bi se vjerojatno dobile povoljnije izvedbene značajke postupaka.

6. LITERATURA

Arbor A. 2014. U. S. Patent 780,001.

Betta FD, Vitali L, Fett R, Oliveira Costa AC. Development and validation of a sub-minute capillary zone electrophoresis method for determination of nitrate and nitrite in baby foods. *Talanta*, 2014, 122, 23-29.

Boulanger B, Chiap P, Dewe W, Crommen J, Hubert Ph. An analysis of the SFSTP guide on validation of chromatographic bioanalytical methods: progresses and limitations. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 32, 753-765.

Boumans PWJM. A tutorial of some elementary concepts in the statistical evaluation of trace element measurements. *Spectrochim Acta B*, 1978, 33, 625-634.

Bosque-Sendra JM, Nechar M, Cuadros Rodriguez L. Decision protocol for checking robustness with previous outlier detection in the validation of analytical methods, *Fresenius J Anal Chem*, 1999**,** 365**,** 480-488.

Conacher HBS. Validation of methods used in crisis situation: task force report. *J AOAC Int*, 1990, 73, 332-334.

CPMP/ICH. Working party on quality of medicinal products, Analytical validation commission of the European communities, 1989, str1-9.

Croitoru MD. Nitrite and nitrate can be accurately measured in samples of vegetal and animal origin using an HPLC-UV/VIS technique. *J Chromatogr B*, 2012, 911, 154-161.

EDQM. Technical Guide for the Elaboration of Monographs. 2nd Edition, *Pharmeuropa*, 1996, Special Issue, 1-42.

Ermer J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. *J Pharm Biomed Anal*, 2001, 24, 757-767.

Ferrús R, Egea MR. Limit of discrimination, limit of detection and sensitivity in analytical systems. *Anal Chim Acta*, 1994, 287, 119-145.

Findlay JWA, Smith WC, Lee JW, Nordblom GD, Das I, DeSilva BS, Khan MN, Bowsher RR. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm Biomed Anal*, 2000, 21, 1249-1273.

Gottschalk G. Standardisierung Quantitativer Analysenverfahren I. Allgemeine Grundlagen. *Fresenius Z Anal Chem*, 1975, 275, 1-10.

Gottschalk G. Standardisierung Quantitativer Analysenverfahren II. Standardisierte Messung und Auswertung. *Fresenius Z Anal Chem*, 1975, 276, 81-95.

Gottschalk G. Standardisierung Quantitativer Analysenverfahren IV. Anwendung von Standardverfahren. *Fresenius Z Ana. Chem,* 1976, 278, 1-12.

Gottschalk G. Schnelltests zur Leistungsfähigkeit von Bestimmungsverfahren. *Talanta*, 1979, 26, 657-663.

Grdinić V, Jakševac-Mikša M, Bezjak A, Radaić A, Briški D. Importance of factors for ruggedness test in phase solubility analysis. *Eur J Pharm Sci,* 1994, 2, 293-296.

Grdinić V, Vuković J. Prevalidation in pharmaceutical analysis. Part I. Fundamentals and critical discussion. *J Pharm Biomed Anal,* 2004, 35, 489-512.

Griess Reagent Kit for Nitrite Determination (G-7921), 2003., http://www.lifetechnologies.com/hr/en/home/brands/molecular-probes.html, pristupljeno 10.05.2015.

Hubert Ph, Chiap P, Crommen J, Boulanger B, Chapuzet E, Mercier N, Bervoas-Martin S, Chevalier P, Grandjean D, Lagorce P. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington conference to the laboratory. *Anal Chim Acta,* 1999, 391, 135-148.

ICH Harmonized Tripartite Guideline prepared within the International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Q2A, Text on Validation of Analytical Procedures, 1994., http://www.ich.org/ich5q.html, pristupljeno 02.05.2015.

ICH Harmonized Tripartite Guideline prepared within the International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals or Human Use (ICH) Q2B, Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996., http://www.ich.org/ich5q.html, pristupljeno 02.05.2015.

Kaiser H. Two papers on the limit of detection of a complete analytical procedure. London, Adam Higler, 1968, str. 52-53.

Kaiser H. Foundations for the critical discussion of analytical methods. *Spectrochim Acta,* 1978, 33B, 551-576.

Lima RMJ, Fernandes SMV, Rangel AOSS. Determination of nitrate and nitrite in dairy samples by sequential injection using an in-line cadmium-reducing column. *Int Dairy J,* 2006, 16, 1442-1447.

Liteanu C, Rîcă I. On the frequentometric estimation of the detection limit. *Mikrochim Acta* II, 1975, 311-323.

Luterotti S, Grdinić V. Statistical analysis of spectrophotometric procedures for determination of Fe(III) and V(V) with desferrioxamine B. *J AOAC Int,* 1995, 78, 1112-1123.

Madasamy T, Pandiaraj M, Balamurugan M, Bhargava K, Sethy NK, Karunakaran C. Copper, zinc superoxide dismutase and nitrate reductase coimmobilized bienzymatic biosensor for the simultaneous determination of nitrite and nitrate. *Biosens Bioelectron,* 2014, 52, 209-215.

Manea F, Remes A, Rodovan C, Pode R, Picken S, Schoonman J. Simultaneous electrochemical determination of nitrate and nitrite in aqueous solution using Ag-doped zeolite-expanded graphite-epoxy electrode. *Talanta*, 2010, 83, 66-71.

Massart DL, Vanderginste BGM, Buydens LMC, de Jong S, Lewi PJ, Smeyers-Verbeke J. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. Amsterdam, Elsevier Science, 1997.

Miller JN, Miller JC. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. Essex, Pearson Education Limited, 2000.

Nitrate/ nitrite Assay Kit Colorimetric, 2015., http://www.sigmaaldrich.com/european-export.html**,** pristupljeno 10. 05. 2015.

Romitelli F, Santini SA, Chierici E, Pitocco D, Tavazzi B, Amorini AM, Lazzarino G, Di Stasio E. Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC–MS: The importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. *J Chromatogr B*, 2007, 851, 257-267.

Schnetger B, Lehners C. Determination of nitrate plus nitrite in small volume marine water samples using vanadium (III) chloride as a reduction agent. *Mar Chem,* 2014, 160, 91-98.

Tranter RL. Methodology validation. *Anal Proc,* 1990, 27, 229-300.

Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B,* 2007, 851, 51-70.

Vander Heyden Y, Hartman C, Massart DL, Michel L, Kiechle P, Erni F. Ruggedness tests for a high-performance liquid chromatographic assay: Comparison of an evaluation at two and three levels by using two-level Plackett-Burman designs. *Anal Chim Acta,* 1995, 316, 15-26.

Vander Heyden Y, Questier f, Massart DL. A ruggedness test strategy for procedure related factors: experimental set-up and interpretation. *J Pharm Biomed Anal,* 1998, 17, 153-168.

Vander Heyden Y, Questier f, Massart DL. Ruggedness testing of chromatographic methods: selection of factors and levels. *J Pharm Biomed Anal*, 1998, 18, 43-56.

Vander Heyden Y, Jimidar M, Hund E, Niemeijer N, Peeters R, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, Hoogmartens J. Determination of system suitability limits with a robustness test. *J Chromatogr A*, 1999, 845, 145-154.

Vander Heyden Y, Kuttathharmmakul S, Smeyers-Verbeke J, Massart DL. Supersaturated designs for robustness testing. *Anal Chem*, 2000, 72, 2869-2874.

Vander Heyden Y, Nijhuis A, Smeyers-Verbeke J, Vanderginste BGM, Massart DL. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J Pharm Biomed Anal*, 2001, 24, 723-753.

Žanić Grubišić, Rumora, NO- Dušikov oksid, 2015., http://fbf-arhiva.s2.novenaweb.info, pristupljeno 15. 05. 2015.

Woollard DC, Indyk HE, Colorimetric determination of nitrate and nitrite in milk and milk powders – Use of vanadium (III) reduction. *Int Dairy J*, 2014, 35, 88-94.

Younden WJ, Steiner EH. Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA, The Association of Official Analytical Chemists, 1975, str. 33-36, 70-71, 82-83.

7. SAŽETAK

U okviru ovog diplomskog rada provedena je prosudba validacijskih značajki i kontrola kakvoće spektrofotometrijske (*SFM1* i *SFM2*) i mikroanalitičke metode (*NO_2-Mikro*) za određivanje nitrita prema Griessu. Određivanje nitrita po Griessu je postupak koji se temelji na pretvorbi sulfanilne kiseline u diazonijevu sol u prisutnosti nitrita u kiselom mediju, koja zatim reagira s aromatičnim aminom N-(1-naftil)etilendiamin dihidrokloridom, tvoreći crveno-ljubičastu azo boju, koju možemo kvantitativno odrediti mjereći njezinu apsorbanciju na 540 nm. Prosudba i kontrola valjanosti predloženih spektrofotometrijskih postupaka provedena je primjenom cjelovite prevalidacijske strategije koja je uključivala karakterizaciju skupina od 1 do 6, provjeru graničnih skupina 1 i 6, ispitivanje homogenosti, ispitivanje odnosa analit-signal, prepoznavanje bjegunaca i prosudbu graničnih vrijednosti. Izvedbene karakteristike *NO_2-Mikro* postupka pokazale su idealnu linearnu kalibracijsku ($\hat{S} = 0{,}027x$), idealnu analitičku evaluacijsku funkciju ($\hat{x} = 36{,}7S$), vrlo nisku granicu određivanja (L_Q = 1,42 μM), značajnu preciznost ($s_{r\hat{x}}$ od ± 1,95% do ± 13,55%) i točnost ($\Delta\bar{x}$ od -1,22% do +5,78%). Procijenjena kakvoća spektrofotometrijskih postupaka *NO_2-SFM1* i *NO_2-SFM2* je nešto niža. Metoda *NO_2-SFM1* karakterizirana je nižom preciznošću ($s_{r\hat{x}}$ od ± 1,02% do ± 22,67%) i točnošću ($\Delta\bar{x}$ od -5,47% do +13,88%), te lošijom granicom određivanja (L_Q = 18,05 μM), dok je metoda *NO_2-SFM2* također karakterizirana niskom preciznošću ($s_{r\hat{x}}$ od ± 2,26% do ± 23,58%) i točnošću ($\Delta\bar{x}$ od -3,04% do +29,2%), ali povoljnijom granicom određivanja (L_Q = 6,58 μM) od *NO_2-SFM1* postupka. Usporedba postupaka je pokazala da se *NO_2-Mikro* postupak odlikuje većom osjetljivošću i povoljnijim analitičkim značajkama s obzirom na spektrofotometrijski postupak. Jednako tako, provedena prevalidacija ukazala je na nedostatke postupaka kao što je nehomogenost slijepih vrijednosti koji utječu na cjelokupnu kakvoću postupaka.

SUMMARY

In this work, the evaluation of validation characteristics and the quality control of spectrophotometric and microanalytical procedures for the determination of nitrite using the Griess reagent was carried out. This procedure is based on the conversion of sulfanilic acid to a diazonium salt by reaction with nitrite in acid solution. The diazonium salt is then coupled to the aromatic amine N-(1-naphthyl)ethylenediamine, forming a red-violet coloured azo dye that can be spectrophotometrically quantitated based on its absorbance at 540 nm. Quality control and evaluation of the analytical parameters was carried out using a comprehensive prevalidation strategy which included characterization of the groups from 1 to 6, checking of limiting groups, homogeneity testing, the quality of analyte-signal relationship, outlier recognition, and evaluation of limiting values. Performance characteristics of the *NO_2-Mikro* procedure showed an ideal linear calibration ($\hat{S} = 0{,}027x$), ideal analytical evaluation function ($\hat{x} = 36{,}7S$), very low limit of quantitation (L_Q = 1,42 μM), significant precision ($s_{r\hat{x}}$ from ± 1,95% to ± 13,55%) and accuracy ($\Delta\bar{x}$ from -1,22% to +5,78%). The quality of spectrophotometric procedures *NO_2-SFM1* and *NO_2-SFM2* is somewhat lower. The method *NO_2-SFM1* is characterized with lower precision ($s_{r\hat{x}}$ from ± 1,02% to ± 22,67%) and accuracy ($\Delta\bar{x}$ from -5,47% to +13,88%), and higher limit of quantitation (L_Q = 18,05 μM); the method *NO_2-SFM2* is characterized with lower precision ($s_{r\hat{x}}$ from ± 2,26% to ± 23,58%) and accuracy ($\Delta\bar{x}$ from -3,04% to +29,2%), but lower limit of quantitation (L_Q = 6,58 μM) than *NO_2-SFM1* procedure. The comparison of the procedures indicated that the *NO_2-Mikro* procedure showed higher sensitivity and greater reliability than the spectrophotometric procedure. Moreover, complete prevalidation pointed out disadvantages of the procedures such as inhomogenity of blank measurements which influence the quality of the procedures.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

PREVALIDACIJA I USPOREDBA POSTUPAKA ZA ODREĐIVANJE NITRITA PREMA GRIESSU

Mateja Cerovec

SAŽETAK

U okviru ovog diplomskog rada provedena je prosudba validacijskih značajki i kontrola kakvoće spektrofotometrijske (*SFM1* i *SFM2*) i mikroanalitičke metode (*NO_2-Mikro*) za određivanje nitrita prema Griessu. Određivanje nitrita po Griessu je postupak koji se temelji na pretvorbi sulfanilne kiseline u diazonijevu sol u prisutnosti nitrita u kiselom mediju, koja zatim reagira s aromatičnim aminom N-(1-naftil)etilendiamin dihidrokloridom, tvoreći crveno-ljubičastu azo boju, koju možemo kvantitativno odrediti mjereći njezinu apsorbanciju na 540 nm. Prosudba i kontrola valjanosti predloženih spektrofotometrijskih postupaka provedena je primjenom cjelovite prevalidacijske strategije koja je uključivala karakterizaciju skupina od 1 do 6, provjeru graničnih skupina 1 i 6, ispitivanje homogenosti, ispitivanje odnosa analit-signal, prepoznavanje bjegunaca i prosudbu graničnih vrijednosti. Izvedbene karakteristike *NO_2-Mikro* postupka pokazale su idealnu linearnu kalibracijsku ($\hat{S}$ = 0,027*x*), idealnu analitičku evaluacijsku funkciju ($\hat{X}$ = 36,7*S*), vrlo nisku granicu određivanja (L_Q = 1,42 μM), značajnu preciznost ($S_{r\hat{x}}$ od ±1,95% do ±13,55%) i točnost ($\Delta\bar{x}$ od -1,22% do +5,78%). Procijenjena kakvoća spektrofotometrijskih postupaka *NO_2-SFM1* i *NO_2-SFM2* je nešto niža. Metoda *NO_2-SFM1* karakterizirana je nižom preciznošću ($S_{r\hat{x}}$ od ±1,02% do ±22,67%) i točnošću ($\Delta\bar{x}$ od -5,47% do +13,88%), te lošijom granicom određivanja (L_Q = 18,05 μM), dok je metoda *NO_2-SFM2* također karakterizirana niskom preciznošću ($S_{r\hat{x}}$ od ±2,26% do ±23,58%) i točnošću ($\Delta\bar{x}$ od -3,04% do +29,2%), ali povoljnijom granicom određivanja (L_Q = 6,58 μM) od *NO_2-SFM1* postupka. Usporedba postupaka je pokazala da se *NO_2-Mikro* postupak odlikuje većom osjetljivošću i povoljnijim analitičkim značajkama s obzirom na spektrofotometrijski postupak. Jednako tako, provedena prevalidacija ukazala je na nedostatke postupaka kao što je nehomogenost slijepih vrijednosti koji utječu na cjelokupnu kakvoću postupaka.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 41 stranicu, 3 grafička prikaza, 19 tablica i 45 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Griessov reagens, nitriti, prevalidacija

Voditeljica: **Dr. sc. Jadranka Vuković Rodríguez**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Ocjenjivači: **Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Dr. sc. Olga Gornik, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Dr. sc. Živka Juričić, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: srpanj, 2015.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Pharmaceutical Analysis
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

PREVALIDATION AND COMPARISON OF METHODS FOR DETERMINATION OF NITRITE ACCORDING TO GRIESS

Mateja Cerovec

SUMMARY

In this work, the evaluation of validation characteristics and the quality control of spectrophotometric and microanalytical procedures for the determination of nitrite using the Griess reagent was carried out. This procedure is based on the conversion of sulfanilic acid to a diazonium salt by reaction with nitrite in acid solution. The diazonium salt is then coupled to the aromatic amine N-(1-naphthyl)ethylenediamine, forming a red-violet coloured azo dye that can be spectrophotometrically quantitated based on its absorbance at 540 nm. Quality control and evaluation of the analytical parameters was carried out using a comprehensive prevalidation strategy which included characterization of the groups from 1 to 6, checking of limiting groups, homogeneity testing, the quality of analyte-signal relationship, outlier recognition, and evaluation of limiting values. Performance characteristics of the *NO_2-Mikro* procedure showed an ideal linear calibration ($\hat{S}$ = 0,027*x*), ideal analytical evaluation function ($\hat{X}$ = 36,7*S*), very low limit of quantitation (L_Q = 1,42 μM), significant precision ($S_{r\hat{x}}$ from ±1,95% to ±13,55%) and accuracy ($\Delta\bar{x}$ from -1,22% to +5,78%). The quality of spectrophotometric procedures *NO_2-SFM1* and *NO_2-SFM2* is somewhat lower. The method *NO_2-SFM1* is characterized with lower precision ($S_{r\hat{x}}$ from ±1,02% to ±22,67%) and accuracy ($\Delta\bar{x}$ from -5,47% to +13,88%), and higher limit of quantitation (L_Q = 18,05 μM); the method *NO_2-SFM2* is characterized with lower precision ($S_{r\hat{x}}$ from ±2,26% to ±23,58%) and accuracy ($\Delta\bar{x}$ from -3,04% to +29,2%), but lower limit of quantitation (L_Q = 6,58 μM) than *NO_2-SFM1* procedure. The comparison of the procedures indicated that the *NO_2-Mikro* procedure showed higher sensitivity and greater reliability than the spectrophotometric procedure. Moreover, complete prevalidation pointed out disadvantages of the procedures such as inhomogenity of blank measurements which influence the quality of the procedures.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 41 pages, 3 figures, 19 tables, and 45 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Griess reagent, nitrites, prevalidation

Mentor: **Jadranka Vuković Rodríguez**, **Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Renata Jurišić Grubešić**, **Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Olga Gornik, **Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Živka Juričić, **Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July, 2015