

Validacija metode za određivanje glikogena kod školjkaša

Tokić, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:299427>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Valentina Tokić

1049/PI

**VALIDACIJA METODE ZA
ODREĐIVANJE GLIKOGENA
KOD ŠKOLJKAŠA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji na Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Marine Krpan te uz pomoć dr. sc. Saše Drakule.

ZAHVALA

Najveću zahvalu dugujem mentorici izv. prof. dr. sc. Marini Krpan i dr. sc. Saši Drakuli na njihovoj nesebičnoj pomoći, strpljenju, znanjima koje su mi prenijele i pruženim prilikama te bez kojih izrada ovog diplomskog rada ne bi bila moguća niti bi ovo akademsko iskustvo bilo isto.

Posebno hvala i mojoj obitelji koja me podržavala i usmjeravala ka ostvarenju ciljeva i bez čije potpore ne bih bila tu gdje jesam.

I hvala mojim prijateljima na lijepim i nezaboravnim trenucima tijekom svih ovih godina studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

VALIDACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE GLIKOGENA KOD ŠKOLJKAŠA

Valentina Tokić, 1049/PI

Sažetak: *Validacija je postupak kojim se određuje da li metoda zadovoljava postavljene zahtjeve kako bi bila utvrđena njena prikladnost željenoj primjeni. Cilj ovog rada bio je provesti validaciju spektrofotometrijske metode za određivanje glikogena kod školjkaša prilikom čega su kao uzorak korištene usitnjene i smrznute kamenice, a s kojom je provedeno indirektno mjerenje koncentracije glikogena nakon njegove razgradnje amiloglukozidazom do glukoze. Parametri validacije koji su pritom određeni su linearnost, točnost, ponovljivost, međupreciznost te granica detekcije i granica kvantifikacije. Rezultati analize pokazali su kako je ova metoda linearna u području ispitivane koncentracije te dovoljno precizna sa zadovoljavajućim granicama detekcije i kvantifikacije. Za točnost je utvrđeno kako bi prilikom određivanja baždarne krivulje u obzir trebao biti uzet i matriks uzorka, a ne samo čisti analit kako bi bili dobveni točniji rezultati.*

Ključne riječi: *glikogen, kamenice, parametri validacije, školjkaši, validacija metode*

Rad sadrži: 39 stranica, 6 tablica, 5 slika, 51 literaturni navod

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *izv. prof. dr. sc. Marina Krpan*

Pomoć pri izradi: *dr. sc. Saša Drakula*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. *Mirjana Hruškar*
2. izv. prof. dr. sc. *Marina Krpan*
3. doc. dr. sc. *Tibor Janči*
4. prof. dr. sc. *Sanja Vidaček Filipec (zamjena)*

Datum obrane: 23. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Quality Control

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

VALIDATION OF THE METHOD FOR DETERMINATION OF GLYCOGEN IN SHELLFISH

Valentina Tokić, 1049/PI

Abstract: *Validation is a procedure that determines whether a particular method meets the set requirements in order to determine its suitability for the desired application. The aim of this study was to validate the spectrophotometric method for the determination of glycogen in shellfish, using crushed and frozen oysters as a sample, which indirectly measures the concentration of glycogen after its degradation by amyloglucosidase to glucose. The validation parameters that were determined were linearity, accuracy, repeatability, intermediate precision, the limit of detection and the limit of quantification. The results of the analysis showed that this method is linear in the range of the tested concentration, and sufficiently precise with satisfactory limits of detection and quantification. For accuracy, it was found that when determining the calibration curve, the sample matrix should be taken into account and not just the pure analyte, in order to obtain more accurate results.*

Keywords: *glycogen, method validation, oysters, shellfish, validation parameters*

Thesis contains: 39 pages, 6 tables, 5 figures, 51 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD Marina Krpan, Associate Professor*

Technical support and assistance: *PhD Saša Drakula, Assistant*

Reviewers:

1. PhD *Mirjana Hruškar*, Full professor
2. PhD *Marina Krpan*, Associate professor
3. PhD *Tibor Janči*, Assistant Professor
4. PhD *Sanja Vidaček Filipec*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 23rd September, 2021

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. ŠKOLJKAŠI.....	3
2.1.1. Kamenice (lat. <i>Ostrea edulis</i>)	3
2.2. GLIKOGEN.....	4
2.2.1. Utjecaj sadržaja glikogena na školjkaše.....	6
2.3. VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA	7
2.3.1. Parametri validacije metode.....	10
2.3.1.1. Specifičnost i selektivnost.....	11
2.3.1.2. Linearnost	12
2.3.1.3. Radno područje	13
2.3.1.4. Točnost	13
2.3.1.5. Preciznost.....	16
2.3.1.6. Granica kvantifikacije i granica detekcije	17
2.3.1.7. Robusnost	19
2.3.1.8. Osjetljivost.....	19
2.3.1.9. Stabilnost	20
3. EKSPERIMENTALNI DIO	21
3.1. MATERIJALI I METODE.....	21
3.1.1. Uređaji i oprema.....	21
3.1.2. Kemikalije	21
3.1.3. Metoda određivanja glikogena	23
3.1.4. Validacija metode.....	23
3.1.4.1. Linearnost	23
3.1.4.2. Točnost	24
3.1.4.3. Međupreciznost	24
3.1.4.4. Ponovljivost	24
3.1.4.5. Granica detekcije i kvantifikacije	25

3.1.5. Obrada podataka	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. LINEARNOST	26
4.2. MEĐUPRECIZNOST	29
4.3. PONOVLJIVOST	29
4.4. TOČNOST.....	30
4.5. GRANICA DETEKCIJE I KVANTIFIKACIJE.....	31
5. ZAKLJUČAK	34
6. LITERATURA.....	35

1. UVOD

Riba i morski plodovi jedan su od ključnih dijelova prehrane ljudi diljem svijeta te njihova konzumacija sve više raste i sve češće takvi proizvodi mogu biti pronađeni u preporukama za pravilnu i uravnoteženu prehranu. Razlog njihove popularnosti leži ponajprije u bogatoj nutritivnoj vrijednosti koja je očitovana u visokom udjelu proteina te vitamina kao što su A, B i D i mineralnih tvari kao što su fosfor, magnezij, željezo, cink, selen, bakar, kalij, uz niski sadržaj zasićenih masnih kiselina. Osobito je važan visok sadržaj omega-3 masnih kiselina koje pokazuju pozitivan utjecaj na zdravlje srca i razvoj mozga, a vrste omega-3 EPA (eikozapentanoična kiselina) i DHA (dokozaheksaenska kiselina) djeluju protuupalno, poboljšavaju razinu kolesterola u krvi te smanjuju rizik od smrti od srčanog i moždanog udara. Razvojem hlađenja i zamrzavanja na brodovima, kao i prijevozom u hladnjačama, poboljšana je kvaliteta i rok trajanja ribe i morskih plodova, što je ujedno omogućilo i veću i lakšu dostupnost potrošaču.

Jedan od najvažnijih primjera morskih plodova su školjkaši, poznati po svojoj karakterističnoj ljušturi unutar koje se nalazi meko tkivo koje je uglavnom konzumirano sirovo ili pripremljeno na posebne načine. Karakteristični su i zbog svog načina hranjenja prilikom čega djeluju kao filteri morske vode što može uzrokovati kontaminaciju toksinima i patogenim organizmima, a što će direktno utjecati na njihovo preživljavanje. Osim problema s kontaminacijom koja može narušiti njihovu dostupnost i kvalitetu, veliku ulogu u preživljavanju ima i glikogen, glavno skladište energije, čije su varijacije uočljive prilikom promjene raznih unutarnjih i vanjskih čimbenika, a osiguranje dovoljnih količina istog bitno je za daljnji razvoj i preživljavanje školjkaša.

Kako bi sadržaj glikogena mogao biti pravilno, precizno i točno određen, ključna je odgovarajuća metoda koja zadovoljava sve te kriterije, a za što je potrebno tu metodu validirati. Validacija metode je proces definiranja analitičkog zahtjeva i prikupljanja objektivnih dokaza kojima se potvrđuje da ispitivana metoda zadovoljava postavljene zahtjeve za određenu namjenu ili primjenu. Tijekom provedbe procesa validacije bitno je definirati svrhu metode, zatim odrediti parametre validacije koji će biti proučavani, kao i kriterije prihvatljivosti za tražene parametre, nakon čega slijedi postupak analize, obrada podataka te usporedba dobivenih rezultata s postavljenim kriterijima.

Stoga, cilj ovog rada bio je validirati metodu za određivanje glikogena kod školjkaša, u ovom slučaju kamenica. Pritom je primijenjena spektrofotometrijska metoda kojom je provedeno indirektno mjerenje koncentracije glikogena nakon njegove razgradnje amiloglukozidazom do glukoze. Ključni validacijski parametri bili su linearnost, točnost, ponovljivost međupreciznost te granica kvantifikacije i granica detekcije, a validacija je provedena prema ICH (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) smjernicama.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ŠKOLJKAŠI

Školjkaši su vrsta morskih i slatkovodnih organizama s bočno stisnutim tijelima koja se nalaze unutar čvrste i krute vanjske ljušture koja raste sa životinjom, a sastavljena je od kalcijevog karbonata kojeg izlučuje epiderma plašta i podijeljena je na dva dijela koji je spojen na jednom rubu fleksibilnim ligamentom zajedno sa zubima. Većina vrsta nema glave, a jestivo tkivo je uglavnom sastavljeno od plašta i iznutrica. Najpoznatije vrste koje potrošači konzumiraju su: školjke, dagnje, kamenice i češljače (Anacleto i sur., 2016). Uglavnom nastanjuju estuarije rijeka te priobalna područja, a žive prilijepljeni za podlogu. Zbog načina kako se hrane, djeluju kao filteri vode pa je iz tog razloga vrlo bitno održavati vodu u kojoj žive čistom i sigurnom (Ricardo i sur., 2021). Globalna proizvodnja ovih organizama raste godinama, s milijun tona 1950. na više od 17 milijuna tona 2018. godine (Qin i sur., 2021).

Što se tiče njihove nutritivne vrijednosti, utvrđeno je da mekušci, poput školjki, kamenica, češljača i dagnji, imaju veliki postotak nekolesterolnih spojeva koji djeluju pozitivno na razinu kolesterola, a ujedno su i bogat izvor esencijalnih minerala kao što su u slučaju kamenica to cink, željezo i bakar, dok su dagnje, školjke i češljače bogate kalijem. Svi školjkaši dobar su izvor joda, fosfora i selena, a pripremajući i konzumirajući ih sirove ili kuhane bez dodane masti predstavljaju hranu s niskim udjelom masti i niskim kalorijskim sadržajem. Osim toga, dobar su izvor proteina kojih sadrže između 17 % i 25 % te svih esencijalnih aminokiselina (Vilanova, 2014).

2.1.1. Kamenice (lat. *Ostrea edulis*)

Jedan od najpoznatijih primjera i vrsta akvakulture, koji je ujedno korišten u ovom radu, jesu kamenice koje su u svjetskoj gastronomiji smatrane posebno cijenjenom delikatesom. Kamenice su vrste školjkaša koje pripadaju obiteljima *Ostreidae* i *Gryphaeidae* (Bivalvia, Mollusca) (Guo i sur., 2008). Građene su od dvije polovice ljušture te dva mišića koja prolaze između unutarnjih površina dviju valvi. Ljuštura im je duguljasta, nesimetrična i srcolikog oblika, a boja ljušture varira od kameno do bjelkasto sive te može narasti do 13 cm u dužinu, a žive prilijepljene za podlogu (FAO, 2021).

Kad su izložene zraku, tijekom ciklusa plime i oseke, kamenice se čvrsto zatvaraju kako bi bilo spriječeno isušivanje unutarnjih tkiva. Mogu disati anaerobno kada su izvan vode, ali moraju izbaciti otrovne metaboliti kada dođe do pojave plime i ponovnog kontakta s vodom tako da su prema tome prilagođene na život u zonama plime i oseke te na preživljavanje kroz duži period bez vode (Lang i Bopp, 2018). Poznato je da mogu preživjeti dugo vremena i pri niskim temperaturama poput onih koje su korištene za skladištenje nakon prikupljanja, a osim fluktuacija temperature, dobro su prilagođene i na razlike u salinitetu. Ujedno imaju bitnu ekološku i ekonomsku ulogu s obzirom na to da su ključne vrste koje obitavaju u estuarijima gdje djeluju kao filteri i kao organizmi koji grade grebene te su kao takvi važni za akvakulturu i riblju industriju diljem svijeta (Guo i sur., 2015).

Što se uzgoja tiče, razlikujemo uzgoj korištenjem divljih larvi, zatim u mrijestilištima, ribnjacima te metodom kultivacije već naraslih kamenica. Najviše su uzgajane u područjima Kine, Francuske, Koreje, SAD-a, Japana i Australije (Lang i Bopp, 2018; Kocher i Kole, 2008).

2.2. GLIKOGEN

Glikogen je polisaharid glukoze koji se nalazi u stanicama većine sisavaca, ali i nesisavaca te u nekim mikroorganizama i biljkama, a služi kao sistemski i stanični izvor energije, kao i njeno skladište. Kod kralježnjaka je pohranjen u jetri kao rezerva glukoze te se u stanicama jetre akumulira i mobilizira s obzirom na koncentraciju glukoze u krvi, a osim toga je pohranjen u mišićima i masnim stanicama. Njegova koncentracija može varirati ovisno o prehrani, stresu, ali i fizičkoj aktivnosti (Rocha, 2003).

Molekula glikogena građena je od dva linearna lanca glukoze nazvana A i B, a svaki od tih lanaca sadrži otprilike 13 jedinica D-glukoze koje su međusobno povezane α -1,4-glikozilnim vezama. Na četvrtoj i osmoj glukozilnoj jedinici B-lanca vezan je novi A-lanac α -1,6-glikozilnim vezama čime dolazi do grananja molekule glikogena. Ukupan broj lanaca je otprilike 4100. Težina jedne molekule iznosi 9 do 10 milijuna Da i sadrži oko 55000 ostataka glukoze. Molekule glikogena postoje u dva oblika: makro- i proglikogen koji se razlikuju po sadržaju proteina, veličini i topljivosti. Proglikogen sadrži 10 % proteina, netopljiv je u kiselini te mu molekulska masa iznosi 400000 Da, dok je makroglikogen molekulske mase 10^7 Da, topljiv u kiselini te sadrži manje od 1 % proteina (Przybylski i sur., 2006).

Velik broj hormona i enzima reguliraju sintezu i razgradnju glikogena. Što se tiče *de novo* sinteze, donor glukoze je uridin difosfat glukoza (UDP-glukoza) koja predstavlja aktivirani oblik glukoze te nastaje u reakciji glukoza-1-fosfata s uridin trifosfatom (UTP) koja je katalizirana fosforilazom UDP-glukoze pri čemu nastaje pirofosfat koji se *in vivo* hidrolizira u ortofosfat pomoću anorganske pirofosfataze. Potom se aktivirana glikozilna jedinica UDP-glukoze prenosi na hidroksilnu skupinu na C-4 atomu s kojom se povezuje putem α -1,4-glikozidne veze što katalizira glikogen-sintaza. Bitnu ulogu pritom ima i enzim glukozil-transferaza nazvana glikogenin koji obavlja funkciju početnice s obzirom na to da glikogen sintaza može dodati glukoznu jedinicu samo na polisaharidni lanac koji sadrži više od 4 ostatka. Glikogenin je građen od dvije podjedinice, a svaka katalizira dodatak osam glukozilnih jedinica na drugu podjedinicu pri čemu su stvoreni kratki α -1,4-glukozni polimeri koji su vezani na tirozinski ostatak u svakoj glikogeninskoj podjedinici pri čemu je donor glukoze UDP-glukoza. Osim glikogen-sintaze koja stvara α -1,4-veze, za sintezu α -1,6-veza zbog kojih je glikogen razgranat, potreban je enzim grananja (engl. *branching enzyme*) koji kida α -1,4-vezu i prenosi blok od sedam ostataka prema unutrašnjosti lanca gdje stvara α -1,6-veze. Grananje je važno jer povećava topljivost glikogena (Stryer, 2013).

Razgradnja glikogena može se odvijati na dva načina. Prvi je citosolni put u kojem glavnu ulogu imaju glikogen fosforilaza koja katalizira fosforolitičko cijepanje najudaljenijih ostataka glukoze na nereducirajućim krajevima čime nastaje glukoza-1-fosfat koja se pretvara u glukozu (jetra) ili dovodi u glikolitički put za proizvodnju energije (mišići) te enzim razgranjenja (engl. *debranching enzyme*) koji uklanja ostatke glukoze blizu točke grananja tako da prvo transferaza enzima premješta tri glukozne jedinice s grane na susjedni nereducirajući kraj gdje dolazi do povezivanja α -1,4-glikozidnom vezom, a posljednja jedinica glukoze koja je ostala vezana u točki grananja oslobođena je kao slobodna glukoza djelovanjem α -1,6-glukozidaze koja je također dio enzima razgranjenja. Važnu ulogu ima i enzim fosfoglukomutaza koji donira fosforilnu skupinu serina glukoza-1-fosfatu čime nastaje glukoza-1,6-bisfosfat, nakon čega se fosforilna skupina s C-1 glukoze prenosi nazad na enzim, nastaje ponovno fosforilirani enzim te glukoza-6-fosfat koja u mišićima služi kao izvor energije, a u jetri za otpuštanje glukoze u krvotok kako bi se povisila koncentracija glukoze u krvi. Drugi način razgradnje glikogena uključuje prijenos molekula glikogena u lizosome gdje djelovanjem α -glukozidaze dolazi do razgradnje glikogena na glukozu (Stryer 2013; Roach i Zeeman, 2016).

2.2.1. Utjecaj sadržaja glikogena na školjkaše

Kao i u svim prehrambenim industrijama, tako i u ribljoj industriji, vrlo je teško i izazovno održati ujednačenu kvalitetu i senzorske karakteristike proizvoda tijekom cijele godine. Najviše utjecaja na sirovine pritom imaju sezonske promjene, promjene uvjeta u okolišu u kojem obitavaju te promjene tijekom razmnožavanja, rasta i razvoja što uzrokuje promjene u biokemijskom sastavu kao što je metabolizam glikogena, a osim toga veliku ulogu imaju i *post mortem* stanje te način manipuliranja nakon ulova (Vidode Mattio i sur., 2001; Li i sur., 2017; Samain, 2011).

Govoreći o glikogenu kao skladištu energije, školjkaši sadrže nešto veći udjel u odnosu na masti, a na njegov udjel utječu unutarnji čimbenici, poput rasta i spolnog sazrijevanja, te vanjski čimbenici, poput dostupnosti hrane i drugih čimbenika okoliša. Dakle, sadržaj glikogena varira ovisno o fiziološkom stanju organizma, a može biti korišten za procjenu fiziološkog stanja u različitim vrstama školjkaša. U dosadašnjim je istraživanjima sadržaj glikogena analiziran kod periske kao važna komponenta okusa mišića aduktora, a osim toga, procijenjen je i odnos između spolnog sazrijevanja i godišnjih varijacija glikogena u mišiću aduktora, plaštu i u probavnoj žlijezdi periske, te nutritivni status organizma na temelju varijacija glikogena u stopalu lađarica. U Manila školjkama, nekoliko je istraživanja također procijenilo učinak godišnjih i sezonskih varijacija mekog tkiva na okus i varijabilnost glikogena povezanih s rastom i spolnim sazrijevanjem. Prema tome, važno je napomenuti kako glikogen i njegov sadržaj variraju između vrsti, ali i između različitih dijelova školjke. Aduktorski mišić predstavlja glavno skladište glikogena kod periske, dok kod lađarica i Manila školjki to predstavlja stopalo. Razdoblja veće i niže akumulacije glikogena u skladištima u organizmu također variraju među vrstama. Periske su pokazale vrhunac sadržaja glikogena u proljeće, a najniže vrijednosti u jesen, dok su lađarice vrhunac imale u razdoblju zima-proljeće, a najniže vrijednosti u ljeto-jesen, a Manila školjke vrhunac u proljeće-ljeto, a najniže vrijednosti u jesen-zimu (Yurimoto, 2015).

Prema nekim istraživanjima veliki utjecaj imaju temperatura i vrijeme skladištenja nakon ulova jer smanjenjem temperature i produljenjem vremena skladištenja dolazi do smanjenja koncentracije glikogena (Chiou, 1998). Kada govorimo o sezonskim promjenama, one su uglavnom povezane s opskrbom hranom i godišnjim reproduktivnim ciklusom. U prirodnim ekosustavima, izvori hrane mogu se razlikovati tijekom godine čime dolazi do razdoblja gladovanja ili ograničene dostupnosti hrane. Prema tome, školjkaši su razvili fiziološke

strategije preživljavanja pa tako u razdobljima ograničene dostupnosti hrane smanjuju brzinu filtracije zatvarajući valve čime dolazi i do smanjenje potrošnje kisika, a također smanjujući razmak među valvama, dodatno štede energiju. Sposobnost čuvanja energetskih supstrata, poput glikogena i drugih ugljikohidrata, također je ključna osobina koja služi za preživljavanje. Energija potrebna za održavanje vitalnih funkcija školjkaša tijekom razdoblja gladovanja ili ograničene dostupnosti hrane razlikuje se ovisno o vrsti, spolu i životnom stadiju (da Costa i sur., 2012; Cordeiro i sur, 2016). Stoga je bitno, tijekom uzgoja ljeti i u proljeće osigurati im dovoljno kvalitetne, nutritivno bogate hrane kako bi se školjkaši razmnožavali i razvili u dovoljnoj mjeri te kako bi se uskladištilo dovoljno energije, ponajprije u obliku glikogena, za preživljavanje zimi (Løfstedt, 2010; Gallardi, 2014). Reproductivna aktivnost ovih organizama je ciklična, s gametogenskim razvojem i fazom stagnacije koja se javlja u različito doba godine, ovisno o vrsti. Dakle, kontrola skladištenja i mobilizacije glikogena vjerojatno je glavna komponenta metabolizma školjkaša (Berthelin i sur., 2000).

2.3. VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA

Metodu je potrebno validirati kako bi bila određena njena prikladnost određenoj svrsi te kako bi bilo osigurano da će svako buduće analitičko mjerenje biti dovoljno blizu stvarne vrijednosti analita u uzorku (Raposo i Ibelli-Bianco, 2020). Prema odredbi ISO/IEC 17025 validacija je potrebna za sve metode koje nisu standardne, zatim za metode razvijene od strane pojedinog laboratorija, za modificirane metode i za standardne metode koje su korištene izvan predviđenog opsega, ali i za procjenu stupnja podudaranja rezultata dobivenih dvjema metodama. U kojoj će mjeri validacija biti provedena, tj. koji će sve parametri biti uzeti u obzir, ovisi o prirodi metode i njenoj primjeni, provedenim promjenama te svim uvjetima u kojima će metoda biti korištena (Magnusson i Örnemark, 2014). Validacija metode mora slijediti određeni plan i protokol u kojem je opisana metoda i parametri koji će biti validirani, način, vrijeme, mjesto i analitičar koji će provesti validaciju te svi rezultati uz zaključak kako bi bilo utvrđeno da li je metoda prihvatljiva za primjenu ili ne. Što se tiče parametara koji će biti određeni, oni ovise o samoj metodi i prema tome razlikujemo potpunu validaciju prilikom koje su određeni svi parametri te djelomičnu kojom su određeni samo pojedini. Sam postupak validacije može biti podijeljen u nekoliko osnovnih koraka (González i Herrador, 2007):

1. određivanje primjenjivosti, prikladnosti za svrhu i kriterija prihvatljivosti
2. određivanje specifičnosti i selektivnosti
3. kalibracijska studija, koja uključuje određivanje baždarne krivulje i raspona koncentracije, osjetljivosti i granice detekcije te procjenu učinka matriksa
4. studija točnosti, koja uključuje određivanje istinitosti, preciznosti, robusnosti i točnosti te razinu nesigurnosti.

Četiri su najčešća tipa metoda koje su validirane (Taverniers i sur., 2004; ICH, 2005):

- a) identifikacijski testovi koji su korišteni za određivanje analita u uzorku usporedbom svojstava analita sa svojstvima referentnog uzorka
- b) testovi koji su korišteni za ispitivanje nečistoća u uzorku s ciljem preciznog određivanja čistoće uzorka
- c) limit testovi za kontrolu nečistoća u uzorku
- d) kvantitativni testovi za određivanje aktivnih komponenata u uzorku.

U tablici 1. prikazani su parametri koji su određeni prilikom validacije za svaki navedeni tip metoda.

Tablica 1. Parametri validacije prema tipu analitičke metode (Magnusson i Örnemark, 2014)

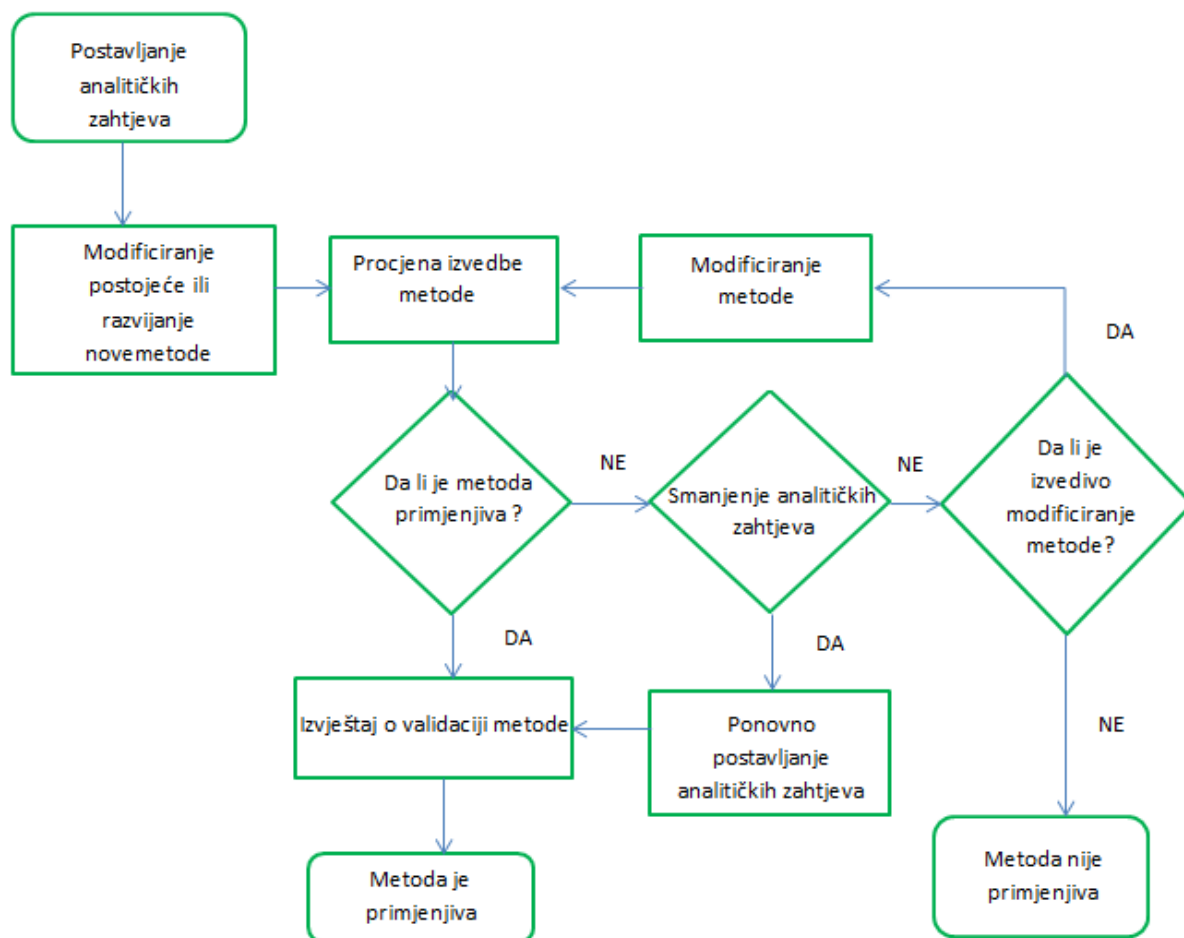
Validacijski parametri	TIP ANALITIČKE METODE			
	Identifikacijski testovi	Kvantitativni testovi za nečistoće	Limit testovi za nečistoće	Kvantitativni testovi
Selektivnost	x	x	x	x
Granica detekcije			x	
Granica kvantifikacije		x		
Linearnost		x		x
Istinitost		x		x
Preciznost		x		x

Dva su načina kojima se može pristupiti validaciji: međulaboratorijska validacija i validacija provedena u jednom laboratoriju. Međulaboratorijska validacija primijenjena je u slučaju da metoda ima planiranu široku primjenu pa je stoga poželjno da su kriteriji validacije određeni u više laboratorija te analitičari na taj način definiraju i potvrđuju mogućnost primjene metode.

S druge strane, validacija može biti provedena samo u jednom laboratoriju kada ne postoji opći interes za njenom primjenom, već je namijenjena samo za taj jedan laboratorij ili u slučaju kada laboratoriji predstavljaju konkurenciju jedan drugom (Taverniers i sur., 2004).

Prilikom postupka validacije bitno je pripremiti sve potrebne otopine i standarde. Slijepe probe omogućuju procjenu dijela izmjenog signala koji se odnosi na analit, odnosno dijela koji se odnosi na neku drugu komponentu uzorka. Pri tome se razlikuju slijepe probe reagensa koji su korišteni tijekom analize te slijepe probe uzorka, odnosno matriks uzorka, koje predstavljaju uzorak bez analita. Zatim, korišteni su i rutinski test uzorci koji mogu pružiti informacije o preciznosti i interferencijama koje bi mogle biti pronađene u svakodnevnim analizama te obogaćeni uzorci, tj. materijali ili otopine u kojima je analit namjerno dodan, a mogu biti dodane i različite količine interferirajuće tvari kako bi analitičari odredili koncentraciju pri kojoj interferirajuća tvar smeta određivanju analita. Ovi materijali ili otopine mogu već sadržavati traženi analit pa je bitno osigurati da daljnje dodavanje ne dovodi do razine analita izvan radnog područja metode. Ujedno, primijenjeni su i mjerni standardi koji su korišteni za izradu baždardne krivulje i identifikaciju (Magnusson i Örnemark, 2014).

Na slici 1. prikazan je postupak validacije metode koji započinje postavljanjem analitičkih zahtjeva kojima su definirane karakteristike koje metoda treba imati. Na temelju tog zahtjeva, laboratorij odlučuje hoće li koristiti postojeću metodu, provesti određene preinake postojeće metode, tj. modificirati ju ili će razviti neku novu. Zatim laboratorij treba identificirati i procijeniti izvedbu metode i usporediti ju s analitičkim zahtjevima. Postupak validacije završava zaključkom i izjavom da li je analitički zahtjev zadovoljen ili ne. Ako analitički zahtjev nije zadovoljen, potreban je daljnji razvoj metode. Ovaj proces razvoja i ocjenjivanja nastavljen je sve dok se za metoda ne utvrdi da je sposobna ispuniti traženi zahtjev (Magnusson i Örnemark, 2014).



Slika 1. Grafički prikaz postupka validacije (Magnusson i Örnemark, 2014)

2.3.1. Parametri validacije metode

Kako bi postupak validacije analitičke metode bio proveden, bitno je odrediti neke od validacijskih parametara, a koji će biti određeni ovisi o vrsti metode. Prema tome, na temelju rezultata dobivenih određivanjem tih parametara, na kraju postupka validacije utvrđena je prihvatljivost metode i mogućnost njene daljnje primjene. Validacijski parametri su sljedeći (ICH, 2005; Thompson i sur., 2002; Huber, 2007):

- specifičnost i selektivnost
- linearnost
- radno područje
- točnost
- preciznost

- granica detekcije i granica kvantifikacije
- robusnost
- osjetljivost
- stabilnost

2.3.1.1. *Specifičnost i selektivnost*

Selektivnost (engl. *selectivity*) je parametar koji se odnosi na stupanj do kojeg metoda može biti korištena za određivanje određenih analita u smjesama ili matriksu bez interferencije drugih komponenata sličnih svojstava (Vessman i sur., 2001). Analitičke metode sastavljene su od faze mjerenja u kojoj koncentracija analita nije mjerena izravno već je kvantificirano određeno svojstvo kao npr. intenzitet svjetlosti pa je pritom bitno da se to svojstvo, odnosno rezultati odnose isključivo na željeni analit, a ne na nešto kemijski ili fizikalno slično. Iz tog razloga, dakle kako bi došlo do povećanja selektivnosti, provedena je i faza izolacije analita koja prethodi fazi mjerenja. Selektivnost metode obično je određena proučavanjem njene sposobnosti mjerenja analita u uzorcima u kojima su namjerno uvedene specifične smetnje, tj. one za koje se smatra da bi mogle biti prisutne u uzorcima i time uzrokovati odstupanja. U slučaju da nije posve jasno jesu li smetnje prisutne ili ne, selektivnost metode može biti procijenjena proučavanjem njene sposobnosti mjerenja analita u usporedbi s drugim neovisnim metodama. Uz to, važan aspekt određivanja selektivnosti koji treba uzeti u obzir je definiranje oblika u kojem se analit nalazi u uzorku (vezan ili nevezan, anorganski ili organometalni, različita oksidacijska stanja itd.) (Magnusson i Örnemark, 2014).

Specifična metoda je ona kojom je određen samo jedan specifični analit, a selektivna ona kojom može biti određeno više različitih analita koji se mogu međusobno razlikovati i koji pri određivanju ne interferiraju jedan s drugim. Specifičnost je bitno odrediti prilikom identifikacije kako bi bio osiguran identitet analita, zatim kod ispitivanja čistoća kako bi bilo osigurano da svi provedeni analitički postupci daju točne rezultate o sadržaju nečistoća te kod različitih analiza sadržaja analita kako bi bili dobiveni što točniji rezultati o traženim vrijednostima (ICH, 2005). Analitičar koji provodi validaciju metode uvijek bi trebao imati na umu da selektivnost može biti ocijenjena kao niska, visoka, loša, djelomična, dobra itd., dok se pojam specifičnost odnosi uvijek na 100 % –tnu selektivnost, odnosno na 0 % interferencija (Gonzalez i Herrador, 2007). Drugim riječima, metoda može biti specifična samo ako je 100 % selektivna. Jedan od načina na koji specifičnost može biti određena je

primjena identifikacijskih testova čija je uloga identificirati analit pri čemu specifičnost predstavlja sposobnost razlikovanja spojeva usko povezanih struktura koje mogu istovremeno biti prisutne (Taverniers, 2004).

2.3.1.2. Linearnost

Baždarna krivulja (engl. *calibration curve*) predstavlja odnos između poznate koncentracije analita u uzorku i odgovora instrumenta (signala) te može biti linearna i nelinearna (Bretnall i Clarke, 2011). Međutim, bitno je spomenuti kako neki analitički postupci, poput imunotestova, ne pokazuju linearan odnos pa u tom slučaju analitički odgovor treba biti opisan odgovarajućom funkcijom koncentracije analita u uzorku (ICH, 2005). Podaci dobiveni baždarnom krivuljom mogu biti korišteni za određivanje preciznosti, granice detekcije i granice kvantifikacije (Crowther, 2011; González i Herrador, 2007).

Najvažniji aspekti koji trebaju biti uzeti u obzir prilikom planiranja kalibracije su (Raposo i Ibelli-Bianco, 2020):

- ❖ vrsta uzoraka, odnosno potrebno je utvrditi da li uzorak sadrži matriks ili ne
- ❖ metodologija kalibracije, odnosno da li je korišten vanjski standard, unutarnji standard ili dodatak standarda
- ❖ raspon koncentracija i raspodjela točaka duž baždarne krivulje
- ❖ broj ponovljenih mjerenja za svaku razinu kalibracije

Linearnost (engl. *linearity*) metode predstavlja sposobnost metode da unutar određenog raspona daje rezultate proporcionalne koncentraciji analita u uzorku te time pokazuje pri kojim je koncentracijama analita metoda primjenjiva (ICH, 2005; Spínola i sur., 2014). Određena je mjerenjem signala, tj. odziva instrumenta za minimalno 5 poznatih koncentracija analita u uzorku (Thompson i sur., 2002; ICH, 2005). Linearnost može biti prikazana matematički i grafički. Matematički je izražena putem linearne regresije i jednadžbe pravca koja glasi:

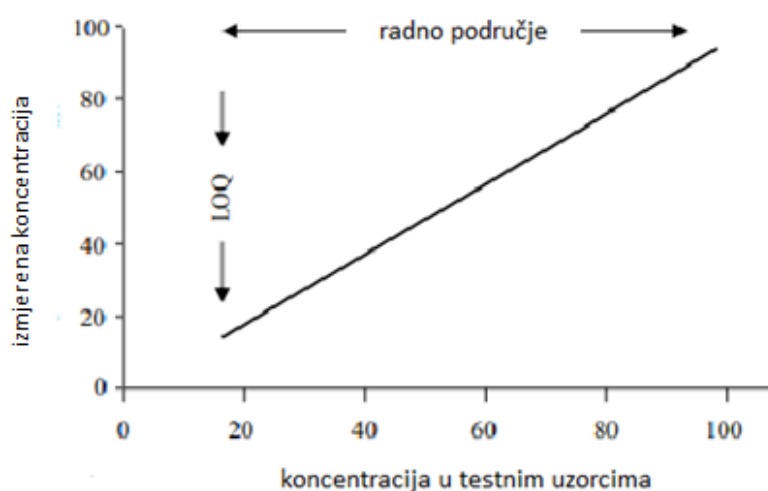
$$y = ax + b \quad (1)$$

pri čemu y predstavlja analitički signal, a nagib pravca koji ukazuje na osjetljivost metode, x koncentraciju analita te b odsječak na y -osi. Osim toga, analiza odstupanja dobivenih rezultata

od regresijske linije također može biti korisna za procjenu linearnosti (ICH, 2005). Ujedno, bitno je izračunati i koeficijent korelacije r koji mora biti jednak ili veći od 0,999 kako bi metoda zadovoljila kriterije linearnosti. Što se grafičkog prikaza tiče, korištena su dva načina. Prvi način prikazuje ovisnost dobivenog odziva o koncentraciji ili o logaritmu koncentracije. Drugi način prikazuje ovisnost omjera odziva i pripadajućih koncentracija, što predstavlja relativni odgovor metode i nalazi se na x-osi, i logaritamskih vrijednosti koncentracija koje se nalaze na y-osi. Dobivena krivulja trebala bi biti vodoravna kroz cijelo linearno područje (Araujo, 2009).

2.3.1.3. Radno područje

Radno područje (engl. *working range*) metode predstavlja interval unutar kojeg metoda daje rezultate s određenom razinom nesigurnosti pri čemu donju granicu čini granica kvantifikacije, a gornju one koncentracije kod kojih se pojavljuju greške i odstupanja vezane za osjetljivost metode. Drugim riječima, utvrđivanjem radnog područja, potvrđeno je da analitički postupak pruža prihvatljiv stupanj linearnosti, točnosti i preciznosti kada je primijenjen na uzorke koji sadrže količine analita unutar ili na krajevima navedenog raspona radnog područja (ICH, 2005). Primjer krivulje dobivene na taj način prikazan je na slici 2. gdje vidimo grafičku ovisnost koncentracije poznatog testnog uzorka i izmjerene koncentracije (Magnusson i Örnemark, 2014).



Slika 2. Prikaz grafičke ovisnosti koncentracije poznatog testnog uzorka i izmjerene koncentracije (Magnusson i Örnemark, 2014)

2.3.1.4. Točnost

Točnost (engl. *accuracy*) predstavlja stupanj podudaranja rezultata prihvaćene referentne vrijednosti i srednje vrijednosti dobivene analizom određenog broja uzoraka. Smatra se jednim od najvažnijih parametara te je određena prilikom validacije svake analitičke metode s obzirom na to da je time omogućena procjena mjere do koje pogreške utječu na određenu metodu (Olivieri, 2009). Poblizje rečeno, ono što je bitno prije utvrđivanja točnosti je utvrditi preciznost, linearnost, selektivnost i istinitost metode. Određivanje točnosti bitno je provesti na tri koncentracijske razine u tri ponavljanja (ICH, 2005; Spinola i sur., 2007). Točnost analitičkog postupka izražava bliskost slaganja između vrijednosti koja je prihvaćena kao konvencionalna stvarna vrijednost ili prihvaćena referentna vrijednost i dobivene vrijednosti, a ponekad se naziva i istinitost. Točnost može biti prikazana kao iskorištenje koje je dobiveno ispitivanjem poznate dodane količine analita uzorku ili kao razlika između srednje i prihvaćene stvarne vrijednosti zajedno s intervalima pouzdanosti (ICH, 2005).

Postoji nekoliko pristupa određivanja točnosti (Araujo, 2009; Shabir, 2007; ICH, 2005):

- ❖ mjerenjem analita u određenom referentnom materijalu i uspoređivanjem rezultata s potvrđenom vrijednošću može biti primijenjeno pod uvjetom da koncentracija analita i matriks referentnog materijala u velikoj mjeri sliče ispitivanom uzorku
- ❖ mjerenjem koncentracije analita koji je dodan u matriks uzorka u poznatoj koncentracije čime je određeno iskorištenje (engl. *recovery*) što je najčešće primijenjeno za tekuće uzorke, otopine ili uzorke koji će u potpunosti biti uništeni
- ❖ usporedbom ispitivanih rezultata s rezultatima određene referentne metode, odnosno validirane, službeno priznate metode kojom su korišteni slični principi mjerenja
- ❖ primjenom standardne metode dodavanja analita i određivanje njegove koncentracije što je uglavnom korišteno u slučajevima gdje nema uzoraka slijepe probe

Točnost metode može biti opisana pomoću nekoliko termina kao što su odstupanje metode, relativno odstupanje i iskorištenje metode. Odstupanje metode (engl. *bias*) definirano je kao razlika između srednje vrijednosti dobivene s velikim brojem ponovljenih mjerenja i referentne vrijednosti, dok je prilikom određivanja relativnog odstupanja (engl. *relative bias*) osim razlike, uzeta u obzir i referentna vrijednost (Lisinger, 2008). Ono može biti izraženo

kao apsolutna vrijednost b putem jednadžbe 2, relativna vrijednost izražena u postocima b (%) što je prikazano u jednadžbi 3, zatim kao relativni analitički oporavak obogaćenog uzroka R' (%) izraženo putem jednadžbe 4 te kao relativni analitički oporavak metode R (%) putem jednadžbe 5.

$$b = \bar{x} - x_{ref} \quad (2)$$

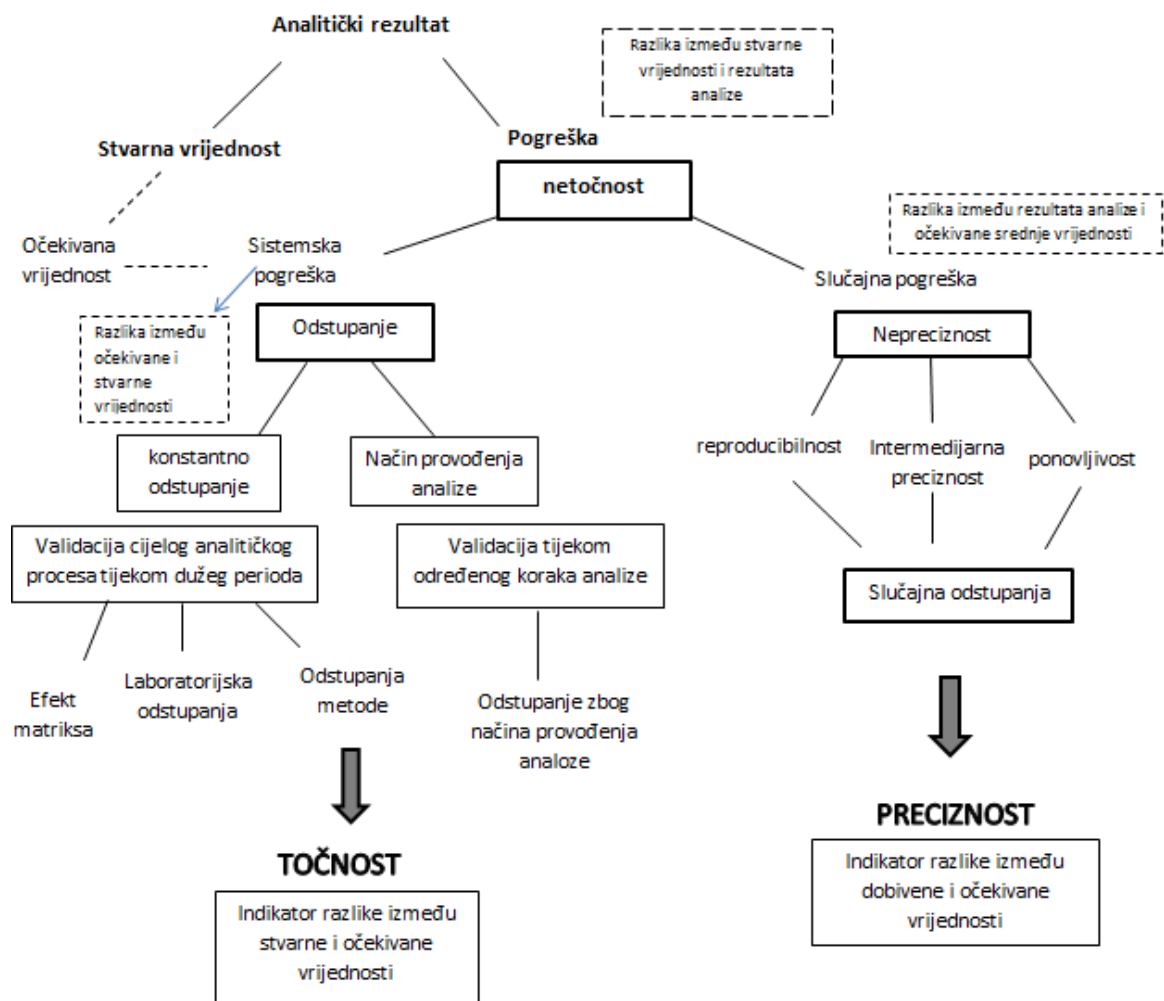
$$b(\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100 \quad (3)$$

$$R' = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{spike}} \times 100 \quad (4)$$

$$R(\%) = \frac{\bar{x}}{x_{ref}} \times 100 \quad (5)$$

gdje su \bar{x} srednja vrijednost, x_{ref} referentna vrijednost, \bar{x}' srednja vrijednost uzorka u koji je dodana poznata količina analita, a x_{spike} dodana koncentracija (Magnusson i Örnemark, 2014).

Točnost je definirana kao funkcija slučajnih i sustavnih pogrešaka, tj. točnost predstavlja način definiranja ukupne analitičke pogreške, a vrste i međusobni odnos takvih pogrešaka prikazani su na slici 3.



Slika 3. Razlike među pogreškama koje se mogu javiti tijekom validacije (Taverniers, 2004)

2.3.1.5. Preciznost

Preciznost (engl. *precision*) opisuje bliskost slaganja izmjerenih vrijednosti dobivenih ponovljenim mjerenjima na istim ili sličnim uzorcima pod određenim uvjetima te je najčešće izražena kao standardna devijacija, relativna standardna devijacija, odstupanje ili kao koeficijent varijabilnosti niza mjerenja (ICH, 2005). Preporučeno je procjenjivanje preciznosti na najmanje tri razine koncentracije (niska, srednja, visoka) kroz tri ponovljena mjerenja za svaku. Podijeljena je na tri vrste: ponovljivost (engl. *repeatability*), međupreciznost (engl. *intermediate precision*) i reproducibilnost (engl. *reproducibility*) (Bridwell i sur., 2010; Tiwari, 2010).

Ponovljivost se odnosi na preciznost koja je određena tijekom jednog dana, odnosno kraćeg vremenskog razdoblja pod istim uvjetima analize koristeći isti uzorak. Kada se govori o istim

uvjetima, prvotno se misli na provođenje metode analize od strane istog analitičara, u istom laboratoriju te s istom aparaturom (Rogers, 2013). Može biti određena pomoću minimalno devet mjerenja ako se radi o različitim koncentracijama raspoređenima u određenom rasponu ili minimalno šest mjerenja ako se radi o 100 %-tnoj testnoj koncentraciji (ICH, 2005)

Međupreciznost ili intermedijarna preciznost predstavlja odstupanje do kojeg dolazi prilikom analize istih uzoraka u istom laboratoriju tijekom nekoliko dana uz moguću promjenu uvjeta kao što je npr. promjena analitičara, reagensa i slično pri čemu je bitno procijeniti do koje mjere takve promjene uvjeta utječu na metodu i hoće li pritom biti dobiveni isti rezultati (Magnusson i Örnemark, 2014; Rogers, 2013). Mjera do koje treba proučavati međupreciznost ovisi o okolnostima pod kojima će postupak biti korišten (ICH, 2005).

Reproducibilnost je korištena kako bi bilo procijenjeno podudaranje rezultata različitih laboratorija primjenom iste metode analize, dakle procijenjen je međulaboratorijskim ispitivanjem, a najčešće je provedena u svrhu normiranja metode (ICH, 2005).

Osim preciznosti metode, bitno je odrediti i preciznosti instrumenta koji je pritom korišten, što je provedeno ponovljenim mjerenjem (injektiranjem) uzorka dovoljno visoke koncentracije, koja se nalazi u radnom području, primjenom uvjeta ponovljivosti. Preciznost instrumenta određena je prema signalu instrumenta, što ovisi o korištenoj tehnici kao npr. za kromatografiju gdje je to vrijeme zadržavanja i površina pika, za UV i VIS gdje je provjerena apsorbancija ili transmisija na odabranoj valnoj duljini itd. (Raposo i Ibelli-Bianco, 2020).

2.3.1.6. Granica kvantifikacije i granica detekcije

Granica kvantifikacije (engl. *limit of quantification, LOQ*) predstavlja najmanju koncentraciju analita u uzorku koja može biti kvantificirana s određenom preciznošću i točnošću, dok granica detekcije (engl. *limit of detection, LOD*) predstavlja najmanju koncentraciju analita koja može biti detektirana isto tako s određenom preciznošću i točnošću (Ribani, 2007). Bitno je naglasiti kako ta koncentracija ne predstavlja razliku između detektiranog i/ili kvantificiranog i onoga što ne može biti detektirano i/ili kvantificirano, već je ovdje fokus stavljen na točnost, preciznost i pouzdanost tih podataka pri čemu se treba osloniti na primjenu statističkih metoda. Uz to, isti pristup određivanju granice kvantifikacije i detekcije ne može biti primijenjen na sve analitičke metode zbog razlika u načinu na koji analitičke tehnike daju instrumentalne signale (Raposo i Ibelli-Bianco, 2020).

Najčešće metode koje su korištene kako bi granica kvantifikacije i detekcije bile određene su vizualna metoda, zatim metoda temeljena na omjeru signala i šuma te primjena standardne devijacije (ICH, 2005). Vizualnom metodom određena je najmanja količina analita koja može biti detektirana, odnosno kvantificirana, na način da bude provedena analiza uzorka s poznatom koncentracijom analita. Metoda koja je temeljena na omjeru signala i šuma (engl. *signal-to-noise ratio*) je najčešće korištena te primjenom takve metodom uspoređen je izmjereni signal uzorka s poznatom koncentracijom analita s izmjerenim signalom slijepe probe pri čemu je utvrđena minimalna koncentracija analita koja može biti pouzdano detektirana/kvantificirana, a pritom odnos signala i šuma mora biti 3 : 1 ili 2 : 1 za granicu detekcije i 10 : 1 za granicu kvantifikacije. Metoda koja je temeljena na standardnoj devijaciji signala te nagibu baždarne krivulje primijenjuje sljedeće jednadžbe (Ribani, 2007; Shabir, 2004; ICH, 2005):

$$LOQ = 10 \frac{\sigma}{S} \quad (6)$$

$$LOD = 3.3 \frac{\sigma}{S} \quad (7)$$

gdje se jednadžba 6 odnosi na granicu kvantifikacije, a jednadžba 7 na granicu detekcije te σ predstavlja standardna devijaciju, a S nagib baždarne krivulje. Standardna devijacija može biti određena na temelju standardne devijacije slijepe probe, iz regresijom dobivene krivulje koja je rezultat korištenja uzoraka koji sadrže analit na granici detekcije, odnosno granici kvantifikacije te iz odsječka na y-osi. Kako bi ti podaci bili dobiveni, baždarna krivulja određena je mjerenjem signala uzorka pripremljenog od čistog analita u određenom matriksu, uključujući one koncentracije koje su blizu očekivane granice detekcije, odnosno kvantifikacije (Gonzalez i sur., 2014). Što se tiče prikaza rezultata, u slučaju da su oni određeni vizualnom procjenom ili na temelju omjera signala i šuma, prikazani su relevantnim kromatogramom, a u slučajevima kada je procijenjena vrijednost granice detekcije/kvantifikacije dobivena izračunavanjem ili ekstrapolacijom, ta procjena može biti naknadno potvrđena neovisnom analizom odgovarajućeg broja uzoraka za koje se zna da su blizu ili su pripremljeni na granici detekcije/kvantifikacije (ICH, 2005).

2.3.1.7. Robusnost

Robusnost (engl. *robustness*) je parametar koji se bavi učinkom eksperimentalnih uvjeta svojstvenih analitičkom postupku (npr. temperatura, sastav pokretne faze, valna duljina, pH, brzina protoka) na analitički rezultat i trebalo bi ju razmotriti tijekom razvojne faze (ICH, 2005). Time je zapravo procijenjen stupanj do kojeg su rezultati analize konstantni kada su namjerno promijenjeni uvjeti analize do čega može doći prilikom transfera metode među laboratorijima. Ako promjene u uvjetima analize daju rezultate u prihvatljivim granicama selektivnosti, preciznosti i točnosti, metoda može biti smatrana robusnom. U suprotnom, ove promjene moraju biti kontrolirane i u postupak uključene mjere predostrožnosti (Bridwell, 2010).

Robusnost obično nije uzeta u obzir u većini smjernica za validaciju pa je iz tog razloga rijetko primijenjena, međutim analitičari ju smatraju vrlo korisnim parametrom jer se na taj način može vidjeti kako tipične promjene laboratorijskih uvjeta mogu utjecati na rezultate metode (Valente i sur., 2014).

2.3.1.8. Osjetljivost

Osjetljivost (engl. *sensitivity*) je parametar koji se odnosi na nagib baždarne krivulje te je korišten za izračun granice detekcije i granice kvantifikacije, međutim nije uvijek nužan dio validacije u službenim smjernicama. Metoda je definirana kao osjetljiva ako mala promjena koncentracija ili količina analita uzrokuje veliku promjenu izmjerenog signala (Taverniers, 2004). Prema jednadžbi 8 osjetljivost je promjena analitičkog signala Y podijeljena s odgovarajućom promjenom koncentracije analita Z pri zadanoj koncentraciji Z_0 , a ako je baždarna krivulja linearna, osjetljivost je samo nagib pri svakoj vrijednosti koncentracije analita (Gonzalez i Herrador, 2007).

$$\text{Osjetljivost} = \left(\frac{dY}{dZ} \right)_{Z_0} \quad (8)$$

Iako, kao što je već rečeno, nije određena prečesto prilikom validacije metode, no postoje neke korisne primjene kao što su:

1. Teorijska analitička osjetljivost kao npr. prilikom primjene ionskih selektivnih elektroda gdje se točno zna kolika je njihova osjetljivost te koja se promjena signala može očekivati tijekom analize.

2. Određivanje osjetljivosti u spektrofotometrijskim mjernim sustavima gdje apsorbancija može biti predviđena iz Beer-Lambertovog zakona te takve provjere osjetljivosti uglavnom mogu biti korištene kao provjera performansi instrumenta, a ponekad i za provjeru standarda (Magnusson i Örnemark, 2014).

2.3.1.9. Stabilnost

Analiza stabilnosti (engl. *stability*) određena je kako bi bila osigurana stabilnost analita tijekom skladištenja, pripreme i analize uzoraka (Rozet i sur., 2011). Stabilnost može biti ispitivana na sobnoj temperaturi tijekom vremenskog razdoblja koje obuhvaća tipično vrijeme potrebno za pripremu uzorka, rukovanje uzorkom i analizu. Međutim, ne postoji sporazumno prihvaćen kriterij kojim je definirana prihvatljiva stabilnost već samo dogovor da razgradnja analita treba biti minimalna (Spinola, 2014).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI I METODE

3.1.1. Uređaji i oprema

- Magnetska miješalica, HI180C–2, HANNA instruments, Rumunjska
- Odmjerne tikvice
- Laboratorijske staklene čaše
- Analitička vaga, AX 200, Shimadzu, Japan
- Odmjerna tikvica
- Pipetman, Eppendorf
- Pipete
- Epruvete od 1,5 mL, Eppendorf
- Centrifuga, MICROCL 21, Thermo Fisher Scientific, Sjedinjene Američke Države
- Epruvete s čepom
- Vodena kupelj
- Spektrofotometar, UV/VIS Spectrometer Lambda 35, PerkinElmer, Sjedinjene Američke Države
- Homogenizator Ultraturrax, IKA T18 basic, Njemačka
- Plastične epruvete

3.1.2. Kemikalije

- Amiloglukozidaza, Sigma-Aldrich
- Glikogen, Sigma-Aldrich
- $C_6H_8O_7 \times H_2O$, limunska kiselina monohidrat, T.T.T. d.o.o.
- $C_7H_8N_2O_2$, hidrazid *p*-hidroksibenzojeve kiseline (PAHBAH), Sigma-Aldrich
- Deionizirana voda
- HCl, klorovodična kiselina, 37 %, Carlo Erba

- $C_6H_5NaO_7 \times H_2O$, natrijev citrat dihidrat, Alkaloid AD
- $CaCl_2 \times 2H_2O$, kalcijev klorid dihidrat, Sigma-Aldrich
- NaOH, natrijev hidroksid, T.T.T. d.o.o.

Otopina za određivanje glukoze

Otopina za određivanje glukoze, tzv. radna otopina pripremljena je miješanjem otopine A i otopine B na sam dan analize i potrebno ju je iskoristiti u roku 4–5 sati. Otopina A pripremljena je vaganjem 2,5 g PAHBAH u čaši kojem je potom dodano 15 mL deionizirane vode i sve je stavljeno na miješanje na magnetskoj miješalici uz dodatak 2,5 mL koncentrirane otopine HCl. Nakon što je sve u potpunosti otopljeno, sadržaj čaše je kvantitativno prebačen u tikvicu od 50 mL i dopunjen do oznake. Za pripremu otopine B prvo je izvagano 6,225 g natrijeva citrata dihidrata u čašu uz dodatak 125 mL deionizirane vode, a potom 0,55 g $CaCl_2 \times 2 H_2O$ uz dodatak 62,5 mL deionizirane vode nakon čega su te dvije otopine pomiješane u tikvici od 500 mL uz dodatak 10 g NaOH te je sve otopljeno do kraja i dopunjeno do oznake deioniziranom vodom. Radna otopina pripremljena je na način da je otopina A razrijeđena u otopini B 10 puta.

Citrani pufer, pH 5,0

U tikvici od 2 L pripremljeno je 1600 mL deionizirane vode u koju je dodano prethodno izvaganih 17,24 g limunske kiseline te 34,7 g natrijeva citrata dihidrata. Sve je dobro promiješano i dopunjeno deioniziranom vodom do oznake.

0,5 % –tna otopina amiloglukozidaze

0,05 g enzima amiloglukozidaze otopljeno je u 10 mL citratnog pufera, a tako pripremljena otopina čuva se u hladnjaku i potrebno ju je potrošiti što prije zbog stabilnosti otopine.

3.1.3. Metoda određivanja glikogena

Na analitičkoj vagi izvagano je 1 g usitnjenog uzorka školjki u plastičnu epruvetu od 50 mL i dodano je 25 mL citratnog pufera. Tako pripremljeni uzorak potom je zagrijavan 10 min u vodenoj kupelji na 100 °C u začepljenim epruvetama te je nakon isteka vremena ohlađen i takav je homogeniziran na Ultraturrax-u. Nakon homogenizacije, pipetirano je 1 mL homogenata u epruvetu od 1,5 mL uz dodatak 100 µL enzima amiloglukozidaze i sve je tako ostavljeno stajati preko noći, odnosno 16 h kako bi enzim razgradio glikogen do glukoze, nakon čega slijedi centrifugiranje 30 min na 1300 g. Potom je 10 µL dobivenog supernatanta, 490 µL pufera i 5 mL radne otopine za određivanje glukoze pipetirano u epruvete s čepom koje su začepjene zagrijavane u vodenoj kupelji 5 min na 100 °C. Nakon isteka vremena zagrijavanja, uzorak je ohlađen te je unutar 10 min očitana apsorbancija na spektrofotometru na 410 nm.

3.1.4. Validacija metode

Postupak validacije metode napravljen je prema smjernicama ICH (2005).

Uzorak

Prilikom analize korišteni su prethodno usitnjeni, homogenizirani i smrznuti uzorci kamenica (lat. *Ostrea edulis*) dopremljene sa zadarskog područja te su do postupka analize skladištene pri -18 °C.

3.1.4.1. Linearnost

Linearnost metode određena je analizom otopina standarda glikogena pripremljenih na pet koncentracijskih razina (6 mg mL⁻¹, 4,8 mg mL⁻¹, 3,6 mg mL⁻¹, 2,4 mg mL⁻¹ i 1,2 mg mL⁻¹) u tri ponavljanja na svakoj koncentracijskoj razini kojima je nakon potrebne pripreme uzoraka i djelovanja enzima amiloglukozidaze izmjerena apsorbancija na spektrofotometru na 410 nm. Na temelju dobivenih rezultata izrađena je baždarna krivulja koja pokazuje ovisnost apsorbancije (y) o koncentraciji glikogena (x) te krivulja koja pokazuje ovisnost omjera apsorbancije i koncentracije standarda (y) glikogena o logaritmu koncentracije (x).

3.1.4.2. Točnost

Točnost metode određena je pripremom uzorka kamenica koji je obogaćen otopinom glikogena koncentracija 6 mg mL⁻¹, 3,6 mg mL⁻¹ i 1,2 mg mL⁻¹ u tri ponavljanja za svaku pripremljenu koncentraciju kojima je nakon djelovanja enzima amiloglukozidaze izmjerena apsorbancija na spektrofotometru na 410 nm. Kako bi točnost bila određena, uvrštavanjem vrijednosti izmjerene apsorbancije (y) u jednadžbu pravca određena je koncentracija glikogena (x) te se potom od tako određenih koncentracija pripremljenih obogaćenih otopina (c (obogaćena otopina)) oduzela koncentracija čistog uzorka (c (uzorak)) i na temelju dobivenih vrijednosti izračunato je iskorištenje putem jednadžbe 9:

$$\text{točnost (\%)} = \left(\frac{c(\text{obogaćena otopina}) - c(\text{uzorak})}{c(\text{otopina standarda})} \right) \times 100 \quad (9)$$

3.1.4.3. Ponovljivost

Ponovljivost je određena pripremom uzoraka otopine standarda glikogena koncentracija 6 mg mL⁻¹, 3,6 mg mL⁻¹ i 1,2 mg mL⁻¹ kojima je nakon djelovanja enzima amiloglukozidaze izmjerena apsorbancija na spektrofotometru na 410 nm od strane istog analitičara, istim postupkom, na istoj opremi tijekom jednog dana. Ispitivanje je provedeno u tri ponavljanja za svaku koncentracijsku razinu. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija izračunata je srednja vrijednost te standardna devijacija, a na temelju dobivenih rezultata putem jednadžbe 10 određena je relativna standardna devijacija (RSD):

$$\text{RSD (\%)} = \left(\frac{\text{standardna devijacija}}{\text{srednja vrijednost}} \right) \times 100 \quad (10)$$

3.1.4.4. Međupreciznost

Međupreciznost je određena pripremom uzoraka otopine standarda glikogena koncentracija 6 mg mL⁻¹, 3,6 mg mL⁻¹ i 1,2 mg mL⁻¹ kojima je nakon djelovanja enzima amiloglukozidaze i izmjerena apsorbancija na spektrofotometru na 410 nm, a ispitivanje je provedeno, tj. ponovljeno kroz kraće vremensko razdoblje od tri dana od strane istog analitičara, istim postupkom i na istoj opremi u tri ponavljanja za svaku koncentracijsku razinu. Iz dobivenih

vrijednosti za apsorbanciju određena je srednja vrijednost i standardna devijacija na temelju kojih je pomoću jednadžbe navedene kod ponovljivosti, izračunata relativna standardna devijacija.

3.1.4.5. Granica detekcije i kvantifikacije

Granica detekcija i granica kvantifikacije određene su mjerenjem apsorbancije na 410 nm pripremljenih otopina standarda glikogena koncentracije 0,6 mg mL⁻¹ provedenog u 10 ponavljanja nakon djelovanja enzima amiloglukozidaze. Na temelju dobivenih rezultata izračunata je standardna devijacija s_0 . Granica detekcije, odnosno najmanja koncentracija analita koja može biti određena s određenom pouzdanošću i točnošću određena je putem jednadžbe 11:

$$\text{LOD} = 3,3 \times \frac{s_0}{a} \quad (11)$$

gdje s_0 označuje standardnu devijaciju, a a nagib pravca koji je izračunat prilikom određivanja linearnosti.

Dok je granica kvantifikacije, odnosno najmanja koncentracija analita koja može biti kvantificirana s određenom pouzdanošću i točnošću, određena jednažbom 12:

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{s_0}{a} \quad (12)$$

3.1.5. Obrada podataka

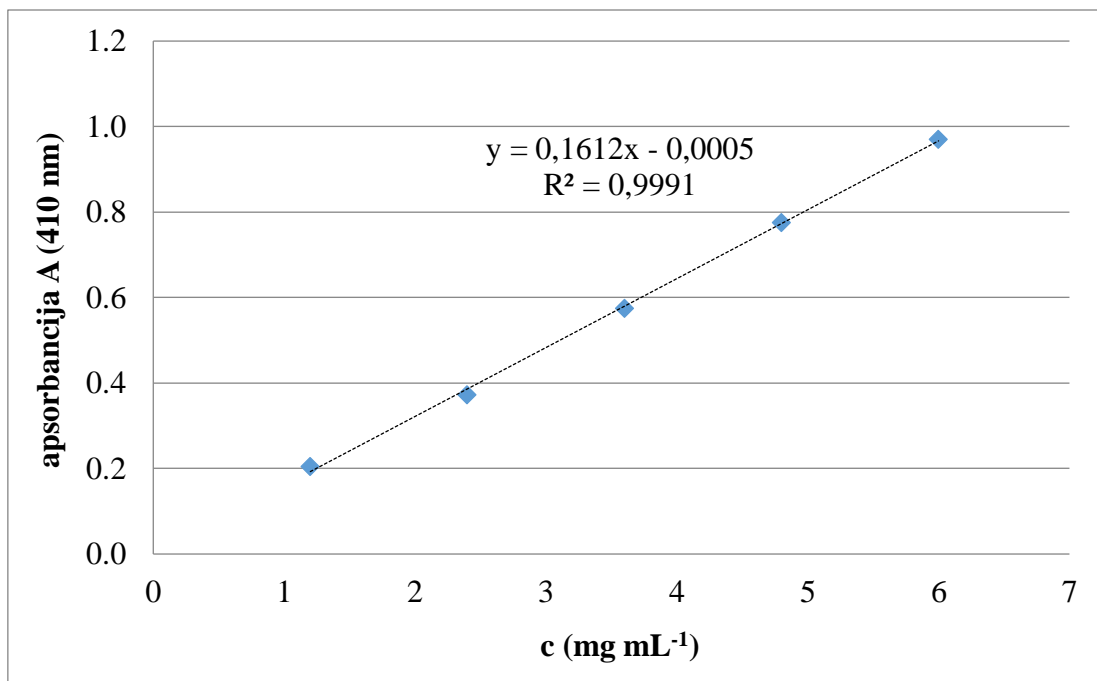
Rezultati analiza obrađeni su u programu MS Office Excel 2010.

4. REZULTATI I RASPRAVA

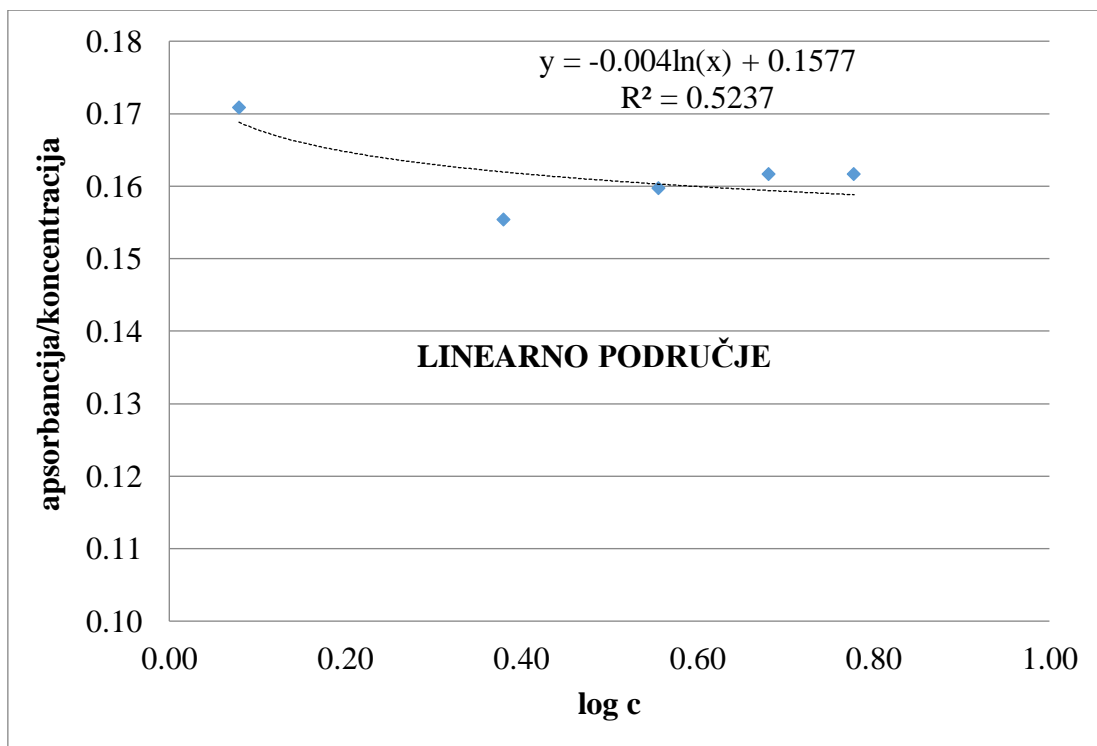
Cilj ovog diplomskog rada bila je validacija metode za određivanje glikogena kod školjkaša, u ovom slučaju kod kamenica, koja je temeljena na spektrofotometrijskom mjerenju sadržaja glikogena nakon njegove razgradnje do glukoze do koje dolazi djelovanjem enzima amiloglukozidaze. Tijekom istraživanja određeni su linearnost, točnost, ponovljivost, međupreciznost, te granica detekcije i granica kvantifikacije prema smjernicama *Vodiča za validaciju analitičkih metoda* kojeg je izradila odgovarajuća skupina stručnjaka iz Međunarodnog vijeća za harmonizaciju tehničkih zahtjeva za lijekove za ljudsku uporabu (ICH, 2005). Rezultati su nakon obrade u Excel-u prikazani putem tablica i grafičkih prikaza te su uspoređeni s postavljenim kriterijima prihvatljivosti na temelju kojih je utvrđena primjenjivost ove metode.

4.1. LINEARNOST

Na temelju rezultata dobivenih mjerenjem apsorbancije, izrađena je baždarna krivulja ovisnosti apsorbancije (y) o koncentraciji (x) prikazana na slici 4. te baždarna krivulja ovisnosti omjera izmjerene apsorbancije i koncentracije (y) o logaritmu koncentracije (x) što je prikazano na slici 5.



Slika 4. Baždarna krivulja ovisnosti apsorbancije o koncentraciji glikogena



Slika 5. Ovisnosti omjera izmjerene apsorbancije i koncentracije o logaritmu koncentracije u analiziranom području metode

Iz baždarne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji određena je jednadžba pravca koja glasi:

$$y = 0,1612x - 0,0005$$

a ujedno na temelju te jednadžbe određen je nagib pravca $a = 0,1612$ i odsječak na y-osi $b = -0,0005$. Metoda je linearna u zadanom području koncentracija od $1,2 \text{ mg mL}^{-1}$ do 6 mg mL^{-1} što pokazuje i vrijednost dobivena za koeficijent korelacije $r = 0,9995$ koja odgovara kriteriju prihvatljivost $r > 0,99$ (AOAC, 2002).

Ujedno, putem dobivene jednažbe pravca uvrštavanjem izmjerenih vrijednosti apsorbancije izračunata je izmjerena vrijednost koncentracije u uzorku što je uspoređeno sa stvarnom vrijednošću i prikazano u tablici 2.

Tablica 2. Usporedba rezultata dobivenih mjerenjem sa stvarnom vrijednošću koncentracije

Stvarna vrijednost koncentracije (mg mL⁻¹)	Izmjerena vrijednost koncentracije (mg mL⁻¹)
6,0	6,1
4,8	4,8
3,6	3,6
2,4	2,3
1,2	1,3

Iz dobivenih rezultata prikazanih u tablici 2 vidljivo je kako su vrijednosti koncentracije dobivene pripremom uzoraka i analizom približno jednake stvarnoj koncentraciji uz minimalno odstupanje primijećeno kod koncentracije $6,1 \text{ mg mL}^{-1}$, $2,3 \text{ mg mL}^{-1}$ te $1,3 \text{ mg mL}^{-1}$.

4.2. PONOVLJIVOST

Na temelju rezultata dobivenih određivanjem ponovljivosti, izračunata je srednja vrijednost apsorbancije te standardna devijacija pomoću kojih je izračunata relativna standardna devijacija koja je uspoređena s kriterijima prihvatljivosti, a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Prikaz rezultata dobivenih određivanjem ponovljivosti

Koncentracija glikogena (mg mL ⁻¹)	Srednja vrijednost apsorbancije	Standardna devijacija apsorbancije	RSD (%)
6,0	1,047	0,062	6
3,6	0,636	0,021	4
1,2	0,209	0,003	2

RSD – relativna standardna devijacija

Dobivena vrijednost relativne standardne devijacije za koncentraciju 6 mg mL⁻¹ iznosi 6 %, za koncentraciju 3,6 mg mL⁻¹ iznosi 4 % te za koncentraciju 1,2 mg mL⁻¹ iznosi 2 %. Kriteriji prihvatljivosti određeni su prema AOAC International smjernicama, a razlikuju se ovisno o koncentraciji (AOAC, 2011). Za koncentraciju 6 mg mL⁻¹ kriterij prihvatljivosti iznosi 8,95 % iz čega je uočeno da je dobivena vrijednost od 6 % ispod te vrijednosti. Za koncentraciju 3,6 mg mL⁻¹ kriterij iznosi 10 % te je dobivena vrijednost od 4 % također ispod kriterija, a za koncentraciju od 1,2 mg mL⁻¹ iznosi 10,9 % te je dobiveni rezultat od 2 % isto tako ispod te vrijednosti. Dakle, dobiveni rezultati nalaze se ispod kriterija prihvatljivosti na koji se odnose s obzirom na koncentraciju što se smatra prihvatljivim.

4.3. MEĐUPRECIZNOST

Određivanjem međupreciznosti, izmjerena je apsorbancija za svaku pojedinu koncentraciju te su dobiveni podaci na temelju kojih je izračunata srednja vrijednost, standardna devijacija te relativna standardna devijacija, a sve je prikazano u tablici 3.

Tablica 3. Rezultati dobiveni prilikom određivanja međupreciznosti

Koncentracija glikogena (mg mL ⁻¹)	Srednja vrijednost apsorbancije	Standardna devijacija apsorbancije	RSD (%)
6,0	1,023	0,077	8
3,6	0,664	0,033	5
1,2	0,212	0,013	6

RSD – relativna standardna devijacija

Dobivena vrijednost relativne standardne devijacije za koncentraciju 6 mg mL⁻¹ iznosi 8 %, za koncentraciju 3,6 mg mL⁻¹ iznosi 5 % te za koncentraciju 1,2 mg mL⁻¹ iznosi 6 %. Dakle, dobiveni raspon za međupreciznost iznosi od 6 % do 8 %.

4.4. TOČNOST

Prilikom određivanja točnosti, izmjerena je apsorbanija pripremljenih otopina na temelju koje je određena koncentracija glikogena u uzorku te su dobiveni rezultati uspoređeni sa stvarnom vrijednošću koncentracije na temelju čega je izračunata točnost, tj. iskorištenje metode. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Rezultati dobiveni određivanjem točnosti

Koncentracija glikogena (mg mL ⁻¹)	Izmjerena vrijednost koncentracije (mg mL ⁻¹)	Točnost (%)
6,0	6,9	115,0
3,6	4,6	127,8
1,2	1,8	138,5

Dobiveno iskorištenje za uzorak obogaćen koncentracijom otopine glikogena 6 mg mL^{-1} iznosilo je 115,0 %, za uzorak obogaćen koncentracijom otopine glikogena $3,6 \text{ mg mL}^{-1}$ iznosilo je 127,8 %, dok je za uzorak obogaćen koncentracijom otopine glikogena $1,2 \text{ mg mL}^{-1}$ iznosilo 138,5 %. S obzirom na to da rezultati pokazuju malo više iskorištenje od kriterija prihvatljivosti koji iznosi 80-110 % koji je definiran prema AOAC International smjernicama (AOAC, 2011), pretpostavljeno je da glavni razlog tomu leži u činjenici da matriks utječe na rezultat te da je potrebno u budućim istraživanjima analizu provesti uz izradu baždarne krivulje metodom dodatka standarda, odnosno uz prisutnost matriksa.

4.5. GRANICA DETEKCIJE I KVANTIFIKACIJE

Mjerenjem apsorbancije otopina standarda glikogena koncentracije $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ u 10 ponovljenih mjerenja, dobiveni su podaci na temelju kojih je određena standardna devijacija, a time i granica detekcije i granica kvantifikacije, a rezultati su prikazani u tablici 6.

Tablica 6. Rezultati dobiveni određivanjem granice detekcije i granice kvantifikacije

Standardna devijacija apsorbancije ponovljenih mjerenja	0,02
Granica detekcije (mg mL^{-1})	0,4
Granica kvantifikacije (mg mL^{-1})	1,2

Pomoću jednadžbi navedenih u eksperimentalnom dijelu rada koje se temelje na standardnoj devijaciji i nagibu pravca, dobivena je vrijednost za granicu detekcije koja iznosi $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ te za granicu kvantifikacije koja iznosi $1,2 \text{ mg mL}^{-1}$. Dobiveni rezultati definirani su kao zadovoljavajući s obzirom na to da se vrijednosti nalaze ispod baždarne krivulje, odnosno ispod linearnog područja.

U usporedbi s rezultatima prethodnih istraživanja, kao što je validacija ove metode koju su proveli Burton i suradnici koristeći uzorke kamenica tako što su, između ostalog, odredili linearnost, preciznost i točnost vidimo kako su također došli do zaključka da je metoda linearna s koeficijentom korelacije 0,98. Osim toga, preciznost se također pokazala prihvatljivom određivanjem relativne standardne devijacije koja je dobivena u rasponu od 3,29 % do 3,66 % za ponovljivost te 4,46 % do 3,15 % za međupreciznost, dok je za točnost utvrđeno da je zadovoljavajuća za više koncentracije u rasponu od 25 mg dL⁻¹ do 111 mg dL⁻¹ te iznosi od 94 % do 104,5 %, dok je za niže koncentracije od 13,3 mg dL⁻¹ iznosila 27,1% što je ipak preniska vrijednost i nije prihvatljiva (Burton i sur., 2000). Burton i suradnici su također proveli jednaku takvu validaciju metode i na uzorcima dagnji. Metoda se prilikom validacije pokazala linearnom, preciznom i točnom. Relativna standardna devijacija dobivena određivanjem međupreciznosti bila je u rasponu od 1,10 % do 2,10 %, a RSD dobivena određivanjem ponovljivosti u rasponu od 0,75 % do 0,96 %, što je manje od 3 % te se prema postavljenom kriteriju to smatra prihvatljivo. Niže vrijednosti u usporedbi s validacijom metode s uzorcima kamenica objašnjene su na temelju mogućih tehničkih pogrešaka i grešaka analitičara. Točnost je dobivena u rasponu od 95 % do 99,3 % što je prihvatljivo za koncentracije od 103,8 mg dL⁻¹ do 108 mg dL⁻¹, dok su niže koncentracije glikogena pokazale vrijednosti iznad kriterija prihvatljivosti (Burton i sur., 1997).

Osim na uzorcima školjkaša, validacija ove metode provedena je i na uzorku jetre zeca u istraživanju koje su proveli Roehrig i Allred te se i u tom slučaju metoda pokazala linearnom uz 97,8 %-tnu točnost (Roedrig i Allred, 1974). Validacija je provedena i na sličnim metodama za određivanje glikogena kod školjkaša. Vodáková i Douda su u svom istraživanju proveli validaciju metode koja se temelji na biopsiji tkiva u kombinaciji s fenol-sumpornom kiselinom prilikom čega su kao uzorke korištene dagnje kako bi odredili sadržaj glikogena u različitim tkivima i njegovu distribuciju. Metoda je određena kao linearna uz koeficijent korelacije 0,9769, točnom uz zadovoljavajuće rezultate u rasponu od 82 % do 109 % te preciznom što je zaključeno određivanjem međupreciznosti iz relativne standardne devijacije koja je iznosila 7,4 % pa do 10 % što je odgovaralo postavljenim kriterijima prihvatljivosti (Vodáková i Douda, 2019). Gao i suradnici su validirali metodu koja primijenjuje ionsku kromatografiju za određivanje glikogena u kamenicama koja je također određena kao linearna i precizna (Gao i sur., 2008). Nagaraja i suradnici su u svom istraživanju razvili i validirali kolorimetrijsku metodu koristeći ljudsku plazmu koja je, kao i metoda Burtona i suradnika, temeljena na reakciji glukoza oksidaze/peroksidaze te su zaključili kako je metoda linearna s

koeficijentom korelacije 0,9987, a uz to i precizna s obzirom da je dobivena međupreciznost iznosila 1,33 % do 2,89 %, a ponovljivost 0,98 % do 1,4 % što je odgovaralo postavljenim kriterijima prihvatljivosti, uz dovoljno niske vrijednosti granice kvantifikacije i detekcije. Raspon rezultata dobivenih određivanjem točnosti iznosio je 96 % do 102 % što je određeno kao zadovoljavajuće (Nagaraja i sur., 2012).

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu provedena je validacija spektrofotometrijske metode za određivanje glikogena kod školjkaša.

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Ključni validacijski parametri bili su: linearnost, ponovljivost, međupreciznost, točnost te granica detekcije i granica kvantifikacije.
2. Metoda se u ispitivanom području pokazala linearnom što potvrđuje dobiveni koeficijent korelacije koji iznosi 0,9995 i zadovoljava postavljeni kriterij prihvatljivosti.
3. Metoda se pokazala preciznom određivanjem međupreciznosti i ponovljivosti. Relativna standardna devijacija određena ispitivanjem međupreciznosti dobivena je u rasponu od 6 % do 8 %, dok je ponovljivost dobivena u rasponu od 2 % do 6 % što je u skladu s kriterijima prihvatljivosti.
4. Dobiveno iskorištenje određeno u okviru ispitivanja točnosti metode bilo je u rasponu 114 % do 139 % i nije bilo u skladu s postavljenim kriterijima prihvatljivosti. S obzirom na mogući utjecaj matriksa, u budućim istraživanjima bi pri izradi baždarne krivulje trebala biti korištena metoda dodatka standarda.
5. Granica detekcije iznosila je $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$, a granica kvantifikacije $1,2 \text{ mg mL}^{-1}$.
6. Validacijom metode utvrđeno je da je ona linearna i precizna te da su u budućnosti potrebna dodatna istraživanja vezana za određivanje točnosti.

6. LITERATURA

- ❖ Anacleto, P., Maulvault, A. L., Barbosa, V., Nunes, M. L., Marques, A. (2016) Shellfish: Characteristics of Crustaceans and Mollusks. U: Encyclopedia of Food and Health, (Caballero, B., Finglas, P. M., Toldrá, F., ured.), 1. izd, Elsevier, str. 764–771.
- ❖ AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals (2002) AOAC International
- ❖ Araujo, P. (2009) Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **877**, 2224–2234.
- ❖ Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M. (2000) Histological Characterization and Glucose Incorporation into Glycogen of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* Storage. *Cells. Mar. Biotechnol.* **2**, 136–145.
- ❖ Bretnall, A. E., Clarke, G. S. (2011) Validation of Analytical Test Methods. *Sep. Sci. Technol.* **10**, 429–457.
- ❖ Bridwell, H., Dhingra, V., Peckman, D., Roark, J., Lehman, T. (2010) Perspectives on method validation: importance of adequate method validation. *Qual. Assur. J.* **13**, 72–77.
- ❖ Burton, S. A., Mackenzie, A. L., Davidson, T. J., Macnair N. (2000) Evaluation of a glucose oxidase/peroxidase method for indirect measurement of glycogen content in Oysters (*Crassostrea Virginica*). *J. Shellfish Res.* **19**, 841–844.
- ❖ Burton, S. A., Mackenzie, A. L., Davidson, T. J., Macnair, N. (1997) Evaluation of a glucose oxidase/peroxidase method for indirect measurement of glycogen content in marine mussels (*Mytilus edulis*). *J. Shellfish Res.* **16**, 435–439.
- ❖ Chiou, T.-K., Lin, J.-F., Shiau, C.-Y. (1998) Changes in Extractive Components and Glycogen in the Edible Meat of Hard Clam *Meretrix lusoria* During Storage at Different Temperatures. *J. Fish. Sci.* **64**, 115–120.
- ❖ Cordeiro, N. I. S., Andrade, J. T. M., Montresor, L. C., Luz, D. M. R., Martinez, C. B., Darrigran, G., Pinheiro, J., Vidigal, T. (2016) Effect of starvation and subsequent feeding on glycogen concentration, behavior and mortality in the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae). *J. Limnol.* **75**, 618–625.
- ❖ Crowther, J. B. (2011) Validation of Pharmaceutical Test Methods. U: Handbook of modern Pharmaceutical analysis, (Ahuja, S., Scypinski, S., ured.), Academic Press,

- San Diego/ San Francisco/ New York/ Boston/ London/ Sydney/ Tokyo, str. 418–438.
- ❖ da Costa, F., Nóvoa, S., Ojea, J., Martínez-Patiño, D. (2012) Effects of algal diets and starvation on growth, survival and fatty acid composition of *Solen marginatus* (Bivalvia: Solenidae) larvae. *Sci. Mar.* **76**, 527–537.
 - ❖ FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2021) Fisheries & Aquaculture - *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758), <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ostrea_edulis/en>. Pristupljeno 5. rujna 2021.
 - ❖ Gallardi, D., Hobbs, K., Mills, T., Couturier, C., Parrish, C. C., Murray, H. M. (2014). Effects of extended ambient live holding on cultured blue mussels (*Mytilus edulis* L.) with reference to condition index, lipid profile, glycogen content and organoleptic testing. *Aquac.* **430**, 149–158.
 - ❖ Gao, R., Yuan, L., Wang, Q., Xue, Y., Feng, H., Yin, L., Wang, J., Xue, C. (2008) Innovative method for determining glycogen content in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) by ion chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1208**, 239–241.
 - ❖ González, G. A., Ángeles Herrador, M. (2007) A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends Analyt. Chem.* **26**, 227–238.
 - ❖ González, O., Blanco, M. E., Iriarte, G., Bartolomé, L., Maguregui, M. I., Alonso, R. M. (2014) Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. *J. Chromatogr. A*, **1353**, 10–27.
 - ❖ Guo, X., He, Y., Zhang, L., Lelong, C., Jouaux, A. (2015) Immune and stress responses in oysters with insights on adaptation. *Fish Shellfish Immunol.* **46**, 107–119.
 - ❖ Guo, X., Wang, Y., Wang, L., Lee, J.-H. (2008) Oysters. U: Genome Mapping and Genomics in Fishes and Aquatic Animals. (Kocher, T., Kole, C., ured.), Springer, str.163–164.
 - ❖ Huber, L. (2007) Validation of Analytical Methods. U: Validation and Qualification in Analytical Laboratories, 2. izd, Informa Healthcare, New York, str. 125–154.
 - ❖ ICH (2005) ICH Harmonised Tripartite Guideline – Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). International Conference on

Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, str. 1–13.

- ❖ ISO/IEC 17025:2017, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- ❖ Li, B., Meng, J., Li, L., Liu, S., Wang, T., Zhang, G. (2017) Identification and Functional Characterization of the Glycogen Synthesis Related Gene Glycogenin in Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*). *J. Agric. Food Chem.* **65**, 7764–7773.
- ❖ Linsinger, T. P. J. (2008) Use of recovery and bias information in analytical chemistry and estimation of its uncertainty contribution. *Trends Anal. Chem.* **27**, 916–923.
- ❖ Løfstedt, M. B. (2010) The effect of food quality on glycogen content, the fatty acid profile and winter mortality in cultivated oyster spat (*Ostrea edulis*). *Aquac. Nutr.* **16**, 625–636.
- ❖ Magnusson, B., Örnemark, U. (2014) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2. izd.
- ❖ Nagaraja, P., Krishna, H., Shivakumar, A., Shrestha, A. K. (2012) Development of quantitative enzymatic method and its validation for the assay of glucose in human serum. *Clin. Biochem.* **45**, 139–143.
- ❖ Olivieri, A. C., Faber, N. M. (2009) Validation and Error. U: Comprehensive Chemometrics, (Brown, S. D., Tauler, R., Walczak, B., ured.), Elsevier, str. 91–120.
- ❖ Przybylski, W., Monin, G., Koćwin-Podsiadła, M., a Krzęcio, E. (2006) Glycogen Metabolism In Muscle And Its Effects On Meat Quality In Pigs – A Mini Review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **15**, 257–262.
- ❖ Qin, L., Zhang, R., Liang, Y., Wu, L., Zhang, Y., Mu, Z., Deng, P., Yang, L.-L., Zhou, Z., Yu, Z. (2021) Concentrations and health risks of heavy metals in five major marketed marine bivalves from three coastal cities in Guangxi, China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **223**. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112562>
- ❖ Raposo, F., Ibelli-Bianco, C. (2020) Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. *Trends Analyt. Chem.* **129**. doi.org/10.1016/j.trac.2020.115913
- ❖ Ribani, M., Collins, C. H., Bottoli, C. B. G. (2007) Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. *J. Chromatogr. A* **1156**, 201–205.

- ❖ Ricardo, F., Gonçalves, D., Pimentel, T., Mamede, R., Domingues, M. R. M., Lillebø, A. I., Calado, R. (2021) Prevalence of phylogenetic overenvironmental drivers on the fatty acid profiles of the adductor muscle of marine bivalves and its relevance for traceability. *Ecol. Indic.* **129**, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.108017>
- ❖ Roach, P. J., Zeeman, S. C. (2016) Glycogen and Starch. U: Encyclopedia of Cell Biology, (Bradshaw, R. A., Stahlstr, P. D., ured.), Academic Press, str. 263–270.
- ❖ Rocha Leão, M. H. M. (2003) Glycogen. U: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, (Caballero, B., ured.), Academic Press, str. 2930–2937.
- ❖ Roehrig, K. L., Allred, J. B. (1974) Direct enzymatic procedure for the determination of liver glycogen. *Anal. Biochem.* **58**, 414–421.
- ❖ Rogers, H. A. (2013) How composition methods are developed and validated. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 8312–8316.
- ❖ Rozet, E., Marini, R. D., Ziemons, E., Boulanger, B., Hubert, P. (2011) Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **55**, 848–858.
- ❖ Samain, J. (2011) Review and perspectives of physiological mechanisms underlying genetically-based resistance of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to summer mortality. *Aquat. Living Resour.* **24**, 227–236.
- ❖ Shabir, G. (2004) A practical approach to validation of HPLC methods under current good manufacturing practices. *J. Valid. Technol.* **10**, 210–218.
- ❖ Spínola, V., Llorent-Martínez, E. J., Castilho, P. C. (2014) Determination of vitamin C in foods: Current state of method validation. *J. Chromatogr. A* **1369**, 2–17.
- ❖ Standard Format and Guidance for AOAC Standard Method Performance Requirement (SMPR) Documents (2011) AOAC International
- ❖ Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele, E. (2004) Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends Anal. Chem.* **23**, 535–552.
- ❖ Thompson, M., Ellison, S. L. R., Wood, R. (2002) Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical report). *Pure Appl. Chem.* **74**, 835–855.
- ❖ Tiwari, G. T. R. (2010) Bioanalytical method validation: an updated review. *Pharm. Meth.* 25–38.

- ❖ Valente, A., Sanches-Silva, A., Albuquerque, T. G., Costa, H. S. (2014) Development of an orange juice in-house reference material and its application to guarantee the quality of vitamin C determination in fruits, juices and fruit pulps. *Food Chem.* **154**, 71–77.
- ❖ Vessman, J., Stefan, R. I., Van Staden, J. F., Danzer, K., Lindner, W., Burns, D. T., Fajgelj, A., Muller, H. (2001) Selectivity in analytical chemistry (IUPAC recommendations 2001). *Pure Appl. Chem.* **73**, 1381–1386.
- ❖ Vidode Mattio, N. D., Paredi, M. E., Crupkin, M. (2001) Postmortem Changes in the Adductor Muscle of Scallop (*Chlamys tehuelchus*) in Chilled and Frozen Storage. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* **10**, 49–60.
- ❖ Vilanova, X. M. (2014). Species of meat animals: Shellfish. U: Encyclopedia of Meat Sciences, (Dikeman, M., Devine, C., ured.), Elsevier Ltd., str. 380–387.
- ❖ Vodáková, B., Douda, K. (2019) Variation in Glycogen Distribution among Freshwater Bivalve Tissues: Simplified Protocol and Implications. *J. Aquat. Anim. Health.* **31**, 107–111.
- ❖ Yurimoto, T. (2015) Seasonal Changes in Glycogen Contents in Various Tissues of the Edible Bivalves, Pen Shell *Atrina lischkeana*, Ark Shell *Scapharca kagoshimensis*, and Manila Clam *Ruditapes philippinarum* in West Japan. *J. Mar. Biol.* **2015**, 1–5.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ime i prezime studenta