**Prilog 1. VERIFIKACIJA FIZIKALNO KEMIJSKIH METODA S IZVEDBENIM KARAKTERISTIKAMA**

1. **CERTIFICIRANE REFERENCIJSKI MATERIJALI I KRITERIJI PRIHVATLJIVOSTI**
   1. **Certificirane referencijski materijali**

Prije početka verifikacije/validacije metoda pregledati **certificirane referencijske materijale (CRM)** koji će se koristi za verifikaciju/validaciju metoda; zadovoljavaju li zahtjevima metode i relevantnog zakonskog propisa. To se prvenstveno odnosi na referencijske materijale koji će se koristiti za verifikaciju/validaciju amonija, nitrita i nitrata.

Primjer: Certificirana referencijska tvar za nitrite može biti deklarirana kao:

1. 1000 mg/L kao N

ili

1. 1000 mg/L kao NO2

Relevantni zakonski propis u području vode za ljudsku potrošnju zahtjeva izražavanje rezultata za nitrite kao mg/L NO2 dok na primjer propisi u području otpadnih voda zahtijevaju izražavanje kao N odnosno NO2-N

Ukoliko se posjeduje certificirana refencijska tvar pod a); rezultati se računski moraju preračunati u mg/L NO2.

Identično može biti prisutno i kod certificiranog referentnog materijala za nitrate i amonij.

* 1. **Kriteriji prihvatljivosti**

Kriteriji prihvatljivosti koji moraju biti sastavni dio Izvještaja o verifikaciji/validaciji metode određuju se sukladno nekom od eksternih dokumenata u kojima je jasno definirano koji je kriterij prihvatljiv za pojedini parametar validacije metode. U tu svrhu koriste se zakonski i podzakonski akti (npr. relevantni zakonski propis o parametrima sukladnosti, metodama analiza i monitorinzima vode namijenjene za ljudsku potrošnju), norme za ispitivanje, materijali Hrvatskog mjeriteljskog društva (HMD), materijali sa seminara Validacija analitičkih metoda ili AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals i slično.

**AOAC smjernice za kriterije prihvatljivosti moguće je pronaći na poveznici:**

https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app\_f.pdf

Appendix F, p.9. (tablica A 4 i A 5)

Minimalni kriteriji prihvatljivosti za metode u području ispitivanja vode za ljudsku potrošnju definirani su Pravilnikom o parametrima sukladnosti, metodama analize i monitorinzima vode za ljudsku potrošnju (NN 88/23) i to u Prilogu III, dio B gdje je definirano da metode koje se primjenjuju trebaju minimalno moći mjeriti koncentracije jednake vrijednosti parametra s granicom kvantifikacije od 30% ili manje od relevantne vrijednosti parametra odnosno maksimalno dozvoljene koncentracije - MDK vrijednosti. Kao kriterij postavljena je i uvjet za mjernu nesigurnost, no kako isporučitelji vode u ovom trenutku nisu u obvezi iskazivati mjernu nesigurnost nisu niti u obvezi postaviti taj kriterij.

P

Za nitrate MDK vrijednosti iznosi 50 mg/L NO3. Kriterij prihvatljivosti po pitanju granice kvantifikacije iznosi minimalno 15 mg/L. Metoda čija bi granica kvantifikacije iznosila 20 mg/L nije prihvatljiva, dok bi metoda čija bi granica kvantifikacije npr. iznosila 10 mg/L bila prihvatljiva.

Na isti način za aluminij čija MDK vrijednost iznosi 200 µg/L kriterij prihvatljivosti po pitanju granice kvantifikacije iznosi bi minimalno 60 µg/L. Metoda čija bi granica kvantifikacije bila veća od 60 µg/L nije prihvatljiva dok su metode s granicom kvantifikacije manjom od 60 µg/L prihvatljive.

1. **PARAMETRI VERIFIKACIJE**
   1. **Točnost**

Točnost metode ispituje se višestrukim mjerenjem certificiranog referentnog materijala (npr. minimalno tri koncentracije unutar radnog područja metode). Točnost se može ispitati i drugim uzorcima poznate koncentracije npr. koristeći uzorke iz međulaboratorijskih poredbenih ispitivanja.

Utvrđuje se stupanj podudaranja između stvarne vrijednosti potvrđenog referentnog materijala i one dobivene mjerenjem.

Iz dobivenih rezultata izračuna se srednja vrijednost replika za svaki koncentracijski nivo i srednje iskorištenje za svaki koncentracijski nivo. Podaci za srednju vrijednost iscrpka (recovery) govore o točnosti metode tj. blizini rezultata stvarnoj vrijednosti. Izračunava se i relativna standardna devijacija (RSD). Rezultate prikazati tablično i grafički.

**Primjer dostupan u Prilogu 1a. Predložak za verifikaciju fizikalno-kemijskih metoda**

* 1. **Linearnost**

Linearnost metode ispitati u rasponu koncentracije radnih standardnih otopina (pripremljenih iz certificiranog referentnog materijala određene koncentracije ispitivanog parametra). Raspon ovisi o očekivanom koncentracijskom području ispitivanog pokazatelja (analita) i mogućnostima instrumenta. Najniža koncentracija (prva točka) kalibracijskog pravca predstavlja granicu kvantifikacije metode. Granica kvantifikacije mora zadovoljiti 30% ili manje od MDK vrijednosti iz relevantnog zakonskog propisa.

Napraviti kalibracijski pravac za analit u očekivanomrasponu koncentracija (linearno područje), od najmanje u pet koncentracijskih razina (kalibracijskih točaka) od kojih svaka predstavlja srednju vrijednost minimalno tri pripremljene otopine iste koncentracije, te odrediti jednadžbu regresijskog pravca, nagib, odsječak i koeficijent korelacije. Ako se radi o širokom koncentracijskom području, potrebno je napraviti više kalibracijskih pravaca npr. za više i niže koncentracijsko područje.

**Primjer dostupan u Prilogu 1a. Predložak za verifikaciju fizikalno-kemijskih metoda**

* 1. **Preciznost**

**Ponovljivost mjerenja**

Ponovljivost mjerenja ispitati uzastopnim mjerenjem homogenog uzorka. Ispitivanje provesti na način da se pripremi uzorak u skladu sa zahtjevima metode. Uzorak se mjeri minimalno šest puta. Statistička obrada podataka dobivenih mjerenja sadrži izračunavanje: srednje vrijednosti, standardnog odstupanja i relativnog standardnog odstupanja.

Ponovljivost mjerenja može se ispitati i na koncentraciji radnog standarda unutar radnog područja metode.

Ponovljivost je potrebno napraviti i na realnim uzorcima. Ukoliko u uzorku nema traženog analita, potrebno je realni uzorak nacijepiti tim analitom.

**Primjer dostupan u Prilogu 1a. Predložak za verifikaciju fizikalno-kemijskih metoda**

* 1. **Granica detekcije**

1. Granicu detekcije (GD) odrediti na bazi standardne devijacije signala deset slijepih proba i nagiba kalibracijskog pravca. U tu svrhu potrebno je pripremiti deset slijepih proba i očitati vrijednosti apsorpcije ili signala.

GD=3,3 σ/a

gdje je:

σ - standardna devijacija deset mjerenja signala slijepe probe

a - nagib kalibracijskog pravca

**ili**

1. Granicu detekcije odrediti na bazi standardne devijacije mjerenja najniže koncentracije analita prirodnog uzorka (deset mjerenja; proračun kao i kod slijepih proba)
   1. **Granica kvantifikacije**
2. Granicu kvantifikacije (GK) odrediti na bazi standardne devijacije signala slijepe probe i nagiba kalibracijskog pravca. Pripremiti deset slijepih probi i očitati vrijednosti. Granicu kvantifikacije izračunati prema formuli

GK=10 σ/a,

gdje je:

σ - standardna devijacija deset mjerenja signala slijepe probe

a - nagib kalibracijskog pravca

**ili**

1. Granicu kvantifikacije odrediti na bazi standardne devijacije mjerenja najniže koncentracije analita prirodnog uzorka (deset mjerenja; proračun kao i kod slijepih proba)
2. Razređivanjem osnovne otopine

Granicu kvantifikacije odrediti mjerenjem standardne otopine (pripremljene iz potvrđenog referentnog materijala određene koncentracije ispitivanog parametra). Iz ishodne otopine pripremiti razrijeđenja otopina i svaku otopinu titrirati/mjeriti u minimalno pet replika. Za granicu kvantifikacije uzeti najnižu koncentraciju uz dobru ponovljivost pri kojoj su zadovoljene definirane granice prihvatljivosti (RSD)

**Primjer dostupan u Prilogu 1a. Predložak za verifikaciju fizikalno-kemijskih metoda**

**Napomena: Vrijednosti prikazane u Excel dokumentu nisu rezultat stvarnih mjerenja nego samo prikaz za bolje razumijevanje izvedbenih karakteristika verifikacije metode.**

**Primjer izgleda tablice s definiranim kriterijima prihvatljivosti i zaključna tablica s rezultatima verifikacije kojom se dokazuje da metoda odgovara svrsi nalaze se u Excel dokumentu Predložak za verifikaciju fizikalno-kemijskih metoda**