

# Validacija analitičke metode za određivanje citrata u urinu metodom ionske kromatografije

---

Sučić, Hrvoje

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:685694>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske  
dijagnostike**

**Hrvoje Sučić**

**VALIDACIJA ANALITIČKE METODE  
ZA ODREĐIVANJE CITRATA U URINU  
METODOM IONSKE  
KROMATOGRFIJE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2015.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske  
dijagnostike**

**Hrvoje Sučić**

**VALIDACIJA ANALITIČKE METODE  
ZA ODREĐIVANJE CITRATA U URINU  
METODOM IONSKE  
KROMATOGRFIJE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2015.**

Rad je ostvaren na Odjelu za ispitivanje vode i zraka u Zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije.

Mentor rada: doc. dr. sc. Vatroslav Šerić, mag. med. biochem.

Rad ima 44 lista, 12 tablica i 12 slika.

## **Zahvala**

Sjedi zeko u šumi i nešto piše... Naiđe tuda jedna lisica i upita ga:

– Što to pišeš, zeko?

– Doktorsku disertaciju! – odgovori on.

– A što ti je tema? – upita ga lisica.

– Kako oderati lisicu – odgovori zeko.

– Idiote jedan, kako se usuđuješ? – poviče lisica, uhvati zeku i odvuče ga u grmlje, iz kojeg se potom začuše krici.

Zeko potom izađe iz grmlja i nastavi pisati... Malo kasnije naiđe tuda i vuk.

– Što to pišeš? – upita vuk.

– Doktorsku disertaciju!

– A o čemu?

– Kako oderati vuka.

– Kako se usuđuješ – zaurla sada vuk pa i on odvuče zeku u grmlje.

Ponovo su se čuli krici, a onda se sve umiri. Izađe zec iz grmlja, a s njim i medo koji mu reče tapšući ga po ramenu:

– Jesi li vidio, zeko? **Nije važno što ti je tema, važno je tko ti je mentor!**

Najbolje prolaze u životu upravo oni koji znaju da je sve prolazno. Takvi ne zastajkuju na svakoj stanici, ne okreću se iza sebe i ne razmišljaju s brigom, već s povjerenjem o onome što ih čeka naprijed. Takvi svaku prepreku baš tako – prođu. Da, najbolje prolaze u životu oni koji ne zastajkuju nego idu pravo i odlučno, tamo gdje im je naređeno i preporučeno. Ka dobru.

**Hvala svima koji su uz mene koračali naprijed, ustrajno i odlučno... ka dobru!**

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Validacija analitičke metode .....	1
1.2. Osnovni parametri validacije .....	2
1.3. Važnost citrata u urinu .....	4
<b>2. CILJ RADA</b> .....	<b>6</b>
<b>3. ISPITANICI I METODE</b> .....	<b>7</b>
3.1. Ustroj studije .....	7
3.2. Ispitanici .....	7
3.3. Metode.....	7
3.3.1. Laboratorijska spektrofotometrijska metoda određivanja citrata u urinu ispitanika.....	7
3.3.2. Laboratorijska metoda određivanja citrata u urinu metodom ionske kromatografije (IC)	10
3.3. Statističke metode .....	13
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>14</b>
4.1. Validacija analitičke metode za određivanje citrata metodom ionske kromatografije (IC).....	14
4.1.1. LINEARNOST .....	14
4.1.2. GRANICA DETEKCIJE.....	19
4.1.3. GRANICA KVANTIFIKACIJE .....	20
4.1.4. PRECIZNOST.....	21
4.1.5. TOČNOST .....	25

4.1.6. SPECIFIČNOST/SELEKTIVNOST.....	26
4.1.7. PODRUČJE PRIMJENE.....	27
4.1.8. SAŽETAK REZULTATA .....	28
4.2. Usporedba dobivenih rezultata određivanja citrata u urinu postojećom enzimsko-spektrofotometrijskom metodom s metodom ionske kromatografije (IC).....	29
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>39</b>
<b>7. SAŽETAK.....</b>	<b>40</b>
<b>8. SUMMARY.....</b>	<b>41</b>
<b>9. LITERATURA .....</b>	<b>42</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>44</b>

## 1. UVOD

### 1.1. Validacija analitičke metode

Opće primjenjiv propis kako validirati analitičku metodu ne postoji. Postoje naputci, regulatorni zahtjevi, smjernice, različiti pristupi općenitog i specifičnog sadržaja. Validacija je postupak dokazivanja da je analitička metoda (ispitni ili mjerni postupak) prikladan za točno određenu namjenu, odnosno skupljanje objektivnih dokaza da navedena metoda ispunjava određene kriterije. Tijekom provedbe validacije potrebno je definirati svrhu metode, odrediti prikladne parametre validacije, postaviti kriterije prihvatljivosti, napraviti laboratorijske eksperimente, obraditi podatke te usporediti rezultate s postavljenim kriterijima (1).

Zašto validirati analitičku metodu? Prvenstveno, to je profesionalna odgovornost analitičara kako bi dobio viziju o tome koliko se uspio približiti cilju te stvarnim vrijednostima koje očekuje. Nadalje, postoje i službeni (regulatorni) zahtjevi koji su spojeni u principe poput Dobre laboratorijske prakse (DLP, 1976. FDA), Dobre proizvođačke prakse (DPP), Dobre analitičke prakse (DAP), ISO norme po kojima su postupci validacije analitičkih metoda postali obveza (2). Metoda se validira prije uvođenja nove metode u uporabu, kada se promijene uvjeti zbog kojih se metoda validira te kada se sama metoda promijeni. Kada govorimo o potpunoj validaciji, ona se provodi kod razvoja nove ili prenamjeni postojeće metode, dok se djelomična validacija provodi kod poboljšanja ili prilagodbe postojeće metode, promjene u sintezi proizvoda ili kod prenošenja metode na drugi instrument. Isti postupci se ne primjenjuju na sve metode. Različito se pristupa validaciji kvalitativnih i kvantitativnih metoda (3).

Vrijeme i novac uloženi u validaciju analitičke metode investicija su koja će se višestruko isplatiti tijekom korištenja metode pružajući sigurnost analitičarima te vjerodostojnost njihovim podacima.



## 1.2. Osnovni parametri validacije

Parametri validacije metode definirani su u različitim radnim grupama nacionalnih i međunarodnih odbora te su kao takvi opisani u literaturi. Pokušaj harmonizacije napravljen je za farmaceutske primjene od strane ICH (International Committee for Harmonisation) koji sačinjavaju regulatorne agencije iz SAD-a, Europe i Japana (4).

Tako usuglašeni i literaturno najcitiraniji parametri validacije su:

1. Linearnost, *eng. Linearity*
2. Granica detekcije (LOD), *eng. Limit of detection*
3. Granica kvantifikacije (LOQ), *eng. Limit of quantification*
4. Preciznost, *eng. Precision*
  - Ponovljivost, *eng. Repeatability*
  - Međupreciznost, *eng. Intermediate precision*
  - Obnovljivost, *eng. Reproducibility*
5. Točnost, *eng. Accuracy*
6. Specifičnost/selektivnost, *eng. Specificity/Selectivity*
7. Područje primjene, *eng. Range*

Kombinacijom gore navedenih parametara oblikuje se plan validacije.

Tablica 1.2.1. Validacijski parametri potrebni za validaciju analitičkih metoda prema ICH-u (4)

Validacijski parametri	Identifikacijski testovi	Analiza tragova		Sadržaj
		Kvantitativna	Limit test	
Točnost	NE	DA	NE	DA
Ponovljivost	NE	DA	NE	DA
Medupreciznost	NE	DA	NE	DA
Selektivnost	DA	DA	DA	DA
Granica detekcije	NE	NE	DA	NE
Granica kvantifikacije	NE	DA	NE	NE
Linearnost	NE	DA	NE	DA
Područje primjene	NE	DA	NE	DA

Tablica 1.2.2. Kriterij prihvatljivosti ovisne o koncentraciji analita prema procjeni AOAC-a (2)

Parametar validacije	Kriterij prihvatljivosti
<b>Linearnost</b>	
Koeficijent korelacije	$r \geq 0,995$
<b>Preciznost</b>	
Ponovljivost retencijskog vremena ( $R_t$ ) Ponovljivost mjerenja površine Ponovljivost određivanja koncentracije Intermedijarna preciznost (koncentracija)	$RSD \leq 10 \%$
<b>Točnost</b>	
Iskorištenje (Recovery)	90 - 110 %

### 1.3. Važnost citrata u urinu

Urolitijaza označava prisutnost kamenaca u urinarnom traktu (sabirnim tubulima, čašicama ili nakapnicama bubrega i/ili mokraćnom mjehuru). Bolesti urinarnog trakta i dalje zauzimaju važno mjesto u svakodnevnoj liječničkoj praksi. Opasnost obolijevanja od bubrežnih kamenaca tijekom životnoga vijeka kreće se u rasponu od pet do deset posto. Moglo bi se reći da je između četvrtog i petog desetljeća života incidencija bubrežnih kamenaca najviša. Mokraćni inhibitori stvaranja, rasta te združivanja kristala igraju veliku ulogu u nastanku bubrežnih kamenaca. Kod zdravih pojedinaca ti inhibitori pružaju otpor, odnosno štite naš organizam od nastajanja bubrežnih kamenaca. Citrati i glikozaminoglikani su najvažniji i gotovo u potpunosti imaju inhibirajuće djelovanje na nastajanje bubrežnih kamenaca. Citrat je prirodna tvar koja inhibira nastajanje mokraćnih kamenaca te smanjeno izlučivanje citrata mokraćom dovodi do bubrežnih bolesti, odnosno bubrežnih kamenaca (5). Citrat usporava formiranje bubrežnih kamenaca dvama mehanizmima:

1. Vežanje za kalcij čime se smanjuje ionska koncentracija kalcija najbitniji je, odnosno glavni mehanizam (6, 7).
2. Inhibiranje kristalizacije kalcij oksalata i kalcij fosfata aglomeracijom kalcij oksalata. Citrat djeluje kao jaki inhibitor rasta kalcijevog fosfata. Pored toga, citrat ima sposobnost smanjiti kristalizaciju kalcijevih oksalata izazvanih mokraćnom kiselinom (8, 9).

Svrha izlučivanja citrata u urinu je filtracija, reapsorpcija, peritubularni transport i sinteza renalnim stanicama. Proksimalni tubuli reapsorbiraju većinu (70 - 80 %) filtriranog citrata te je izlučivanje citrata zanemarivo. Acidobazni status igra najznačajniju ulogu u izlučivanju citrata. Alkalozna povećava izlučivanje citrata, dok ga acidoza smanjuje. To rezultira nižim razinama intracelularnog citrata, olakšavanjem reapsorpcije citrata i smanjenjem izlučivanja citrata. Izlučivanje citrata je narušeno acidozom, hipokalemijom, dijetom s previše proteina životinjskog porijekla te infekcijama urinarnog trakta (10). Limunska kiselina je važan međuprodukt u metabolizmu te najjače sredstvo za kompleksiranje kalcija u urinu. Igra važnu ulogu kao inhibitor u sprječavanju prezasićenosti s obzirom na formiranje kalcijevog oksalata (11).

U ljudskom se tijelu citrati metaboliziraju i izlučuju bubrezima te njihova prisutnost u urinu doprinosi inhibicijskom potencijalu smanjenja kristalizacije kalcijevih soli.

Bubrežni bolesnici imaju značajno niže srednje vrijednosti izlučivanja limunske kiseline i koncentracije urina u odnosu na zdrave pojedince (12). Razina citrata u mokraći uvelike ovisi o prehranbenim navikama te s obzirom na to i značajno varira. Veći unos životinjskih proteina i natrija općenito smanjuje razinu citrata u urinu. Određivanje citrata je postao važan alat u procjeni prezasićenosti urina kalcijevim oksalatima i fosfatima (13). Ukratko, hipocitraturija (niska razina izlučivanja citrata urinom) pojačava prezasićenje mokraće kalcijevim solima i smanjuje inhibiranje kristalizacije kalcija te time povećava rizik od nastanka bubrežnih kamenaca (14).

## **2. CILJ RADA**

Novija istraživanja pokazala su kako postojeće enzimsko-spektrofotometrijske metode ponekad nemaju zadovoljavajuću osjetljivost i specifičnost, dok se kod metode ionskom kromatografijom omogućava detekcija puno nižih koncentracija analita u uzorku urina.

Sukladno tomu, ciljevi predloženog istraživanja bili su:

1. Provesti validaciju analitičke metode ionske kromatografije za određivanje citrata u urinu.
2. Utvrditi korelaciju dobivenih rezultata određivanja citrata u urinu postojećom enzimsko-spektrofotometrijskom metodom s metodom ionske kromatografije.

### **3. ISPITANICI I METODE**

#### **3.1. Ustroj studije**

Provedeno istraživanje ustrojeno je po načelu *cross-sectional* (*presječne*) studije, odnosno kao tipična metoda istraživanja presjeka ili prevalencije. Takva vrsta istraživanja spada u opazajni tip epidemioloških istraživanja i može biti deskriptivne ili analitičke prirode. Analiziraju se podatci dobiveni u određenom trenutku te je naglasak na povezanosti mjerenih obilježja ili na usporedbi dvaju analitičkih metoda. Tom se metodom analitičkog istraživanja u epidemiologiji istodobno istražuje prisutnost bolesti te mogućeg uzročnog čimbenika u promatranj populaciji, odnosno skupini ispitanika (15).

#### **3.2. Ispitanici**

Za provođenje predloženog istraživanja dobivena je privola Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Osijeku. U istraživanje je ukupno bilo uključeno 50 nasumičnih uzoraka urina pacijenata s urolitijazom prikupljenih na Odjelu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek od 1. rujna do 11. rujna 2015. godine.

#### **3.3. Metode**

##### **3.3.1. Laboratorijska spektrofotometrijska metoda određivanja citrata u urinu ispitanika**

Citrati su odrađeni spektrofotometrijskom metodom koja se zasniva na primjeni enzimске kinetike završne točke u UV području. Analize se odrađuju na biokemijskom analizatoru Olympus AU 680.

**Princip metode:**

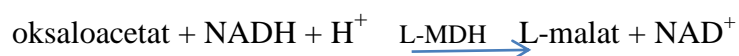
Limunska kiselina (citrata) pretvara se u oksaloacetat i acetat u reakciji katalize uz enzim citrat liazu (CL).

## 1. Glavna ili primarna reakcija



U prisutnosti enzima L-malat dehidrogenaze (L-MDH) i L-laktat dehidrogenaze (L-LDH), oksaloacetat i njegov dekarboksilirani produkt piruvat, reduciraju se u L-malat i L-laktat, odnosno dolazi do redukcije nikotinamid-adenin dinukleotida (NADH) (17, 18).

## 2. Indikatorska reakcija



## 3. Indikatorska reakcija



Količina oksidiranog NADH u reakciji (2) i (3) je proporcionalan količini citrata. NADH se određuje uz apsorbanciju na 334, 340 ili 360 nm. Princip metode je optički test koji se temelji na apsorpcijskim svojstvima koenzima  $\text{NAD}^+$  i  $\text{NADP}^+$ , odnosno njihovih reduciranih oblika  $\text{NADH}_2$  i  $\text{NADPH}_2$ . Reducirani koenzimi ( $\text{NADH}_2$  i  $\text{NADPH}_2$ ) apsorbiraju svjetlost između 300 i 390 nm, maksimum na 339 nm. Oksidirani koenzimi ( $\text{NAD}^+$  i  $\text{NADP}^+$ ) ne apsorbiraju svjetlost u tom području. Oksidacijom se apsorpcija smanjuje ( $\text{NADH}$  u  $\text{NAD}^+$ ). Redukcijom se apsorpcija povećava ( $\text{NAD}^+$  u  $\text{NADH}$ ) (19).

**Reagensi:**

Svi su reagensi komercijalno dostupni (Boehringer Mannheim/R-Biopharm, Roche Cat.No. 10 139 076 035) te imaju sljedeći sastav:

R1:

- 1.4 g liofilizata pufera glicilglicina pH cca. 7.8
- L-malat dehidrogenaza cca. 136 U
- L-laktat-dehidrogenaza cca 280 U
- NADH cca. 5 mg

R2:

- 50 mg liofilizirane citrat liaze cca.12 U

Kontrolni materijal: 5 mmol otopina Na-citrata dihidrata (Art.6448, Merck-Alkaloid)

**Priprema reagensa za analizu:**

Otopiti sadržaj bočice R1 u 30 ml redestilirane vode te otopiti sadržaj R2 u 10 ml redestilirane vode.

**Prikupljanje i obrada uzoraka urina:**

Određivanje citrata rađeno je iz 24-satnog urina bez prethodne pripreme.

Pacijent kojemu se određuju citrati u urinu upućen je isključivo na utvrđivanje uzroka urolitijaze.

**Analitička procedura:**

Kontrolni uzorci i uzorci urina analizirani su na automatskom analizatoru Olympus AU 680, prema zadanim specifičnim test parametrima:

- 2  $\mu$ L uzorka
- 210  $\mu$ L R1
- 60  $\mu$ L R2





Slika 3.3.1.1. Biokemijski analizator Olympus AU680, autor slike: Hrvoje Sučić

### 3.3.2. Laboratorijska metoda određivanja citrata u urinu metodom ionske kromatografije (IC)

Sustav za ionsku kromatografiju Dionex ICS-3000 (u daljnjem tekstu: ICS-3000) predviđen je za kvalitativnu i kvantitativnu analizu iona (aniona i kationa) u raznim vrstama tekućih uzoraka. Razdvajanje iona u uzorku se postiže principom ionske kromatografije, a detekcija i kvantifikacija se vrši određivanjem vodljivosti.

#### Princip metode:

Princip odjeljivanja aniona temelji se na teoriji ionske (tekućinske) kromatografije. Određena količina uzorka unese se u petlju injektora. Uzorak nošen eluensom (mobilna faza) putuje kroz kolonu u kojoj se nalazi anionski izmjenjivač (stacionarna faza). Anioni iz uzorka se tijekom putovanja kroz kolonu raspodjeljuju između stacionarne i mobilne faze, ovisno o njihovoj konstanti ionsko-izmjenjivačke ravnoteže te uslijed toga izlaze iz kolone nakon kraćeg ili dužeg vremenskog perioda (koji nazivamo retencijsko vrijeme), što ovisi o samom analitu (anionu). Razdvojene anione na izlasku iz kolone detektira se konduktometrijskim detektorom. Da bi se smanjila pozadinska

vodljivost mobilne faze i povećala osjetljivost metode, anioni otopljeni u mobilnoj fazi (eluensu) prije ulaska u detektor prolaze kroz supresor u kojem se ioni eluensa zamjenjuju za vodikove ione. Na osnovu retencijskog vremena „peaka“ aniona na kromatogramu dokazujemo da je određen anion prisutan u otopini, a na osnovu izmjerene vodljivosti (površina pika na kromatogramu), usporedbom s kalibracijskom krivuljom pripremljenom pri istim uvjetima analize, izračunava se koncentracija aniona u uzorku (20).

### **Priprema standarda za kalibraciju:**

Kalibracijske točke i standardi su napravljeni razrjeđivanjem osnovnog standarda Citrate Ion Chromatography Standard Solution (Fluka, 38730, 05/2016). Razrjeđenja su rađena s ultra čistom vodom prema Tablici 3.3.2.1.

Tablica 3.3.2.1. Priprema kalibracijskih standarda

<b>CITRATI</b>							
Koncentracija (mg/l)		<b>C-1</b>	<b>C-2</b>	<b>C-3</b>	<b>C-4</b>	<b>C-5</b>	<b>C-6</b>
Faktor razrjeđenja	<b>1</b>	<b>2000</b>	<b>800</b>	<b>400</b>	<b>200</b>	<b>125</b>	<b>100</b>
Koncentracija (mg/L)	<b>1000</b>	0,5	1,25	2,5	5	8	10
<b>VOLUMEN (ml/ml)</b>							
Faktor razrjeđenja	<b>1</b>	<b>2000</b>	<b>800</b>	<b>400</b>	<b>200</b>	<b>125</b>	<b>100</b>
Volumen osnovnog standarda (ml)	-	<b>0,025</b>	<b>0,025</b>	<b>0,050</b>	<b>0,100</b>	<b>0,080</b>	<b>0,100</b>
Volumen tikvice (ml)	-	50	20	20	20	10	10

### **Prikupljanje i obrada uzoraka urina:**

Uzorci se uzorkuju u čiste polietilenske ili staklene posude i u njima se transportiraju u mraku na temperaturi od 2 do 8°C. Uzorci se analiziraju u roku 24 sata od uzorkovanja, a do tada se čuvaju u hladnjaku na temperaturi od 2 do 8°C.

Uzorke je potrebno profiltrirati prije injektiranja kroz membranski filter veličine pore od 0,45 µm te razrijediti s ultra čistom vodom u odgovarajućem omjeru. Uzorak se za analizu prenese u *Dionex Polyvial* posudice od 5 ml i začepi s *Filtar Caps* čepom (koji sadrži u sebi 20 µm filter). Tijekom iniciranja uzorak se ujedno i filtrira kroz 20 µm filter (21).

**Analitička procedura i dijelovi aparata:**

ICS-3000 je sustav predviđen za simultanu analizu aniona i kationa, a sastoji se od nekoliko dijelova: autosamplera (AS40), pumpe za eluens (DP), eluent generatora (EG) i odjeljka za smještaj kolona i detektora (DC).

**1. AS40**

AS40 je uređaj koji omogućuje automatsko injektiranje uzoraka za analizu prema prethodno programiranoj sekvenci u softveru aparata. Uzorci se stavljaju u posebno predviđene plastične posudice od 5 ml (Dionex PolyVial 5 ml), zatvore se posebnim čepom s ugrađenim 20 µm filtrom (Dionex Filtar Caps for 5 ml PolyVial) i smještaju u kazete u koje stane šest posudica. U AS40 se može smjestiti najviše 11 kazeta s posudicama, a iz svake posude se može izvršiti do tri injektiranja uzorka (22).

**2. DP**

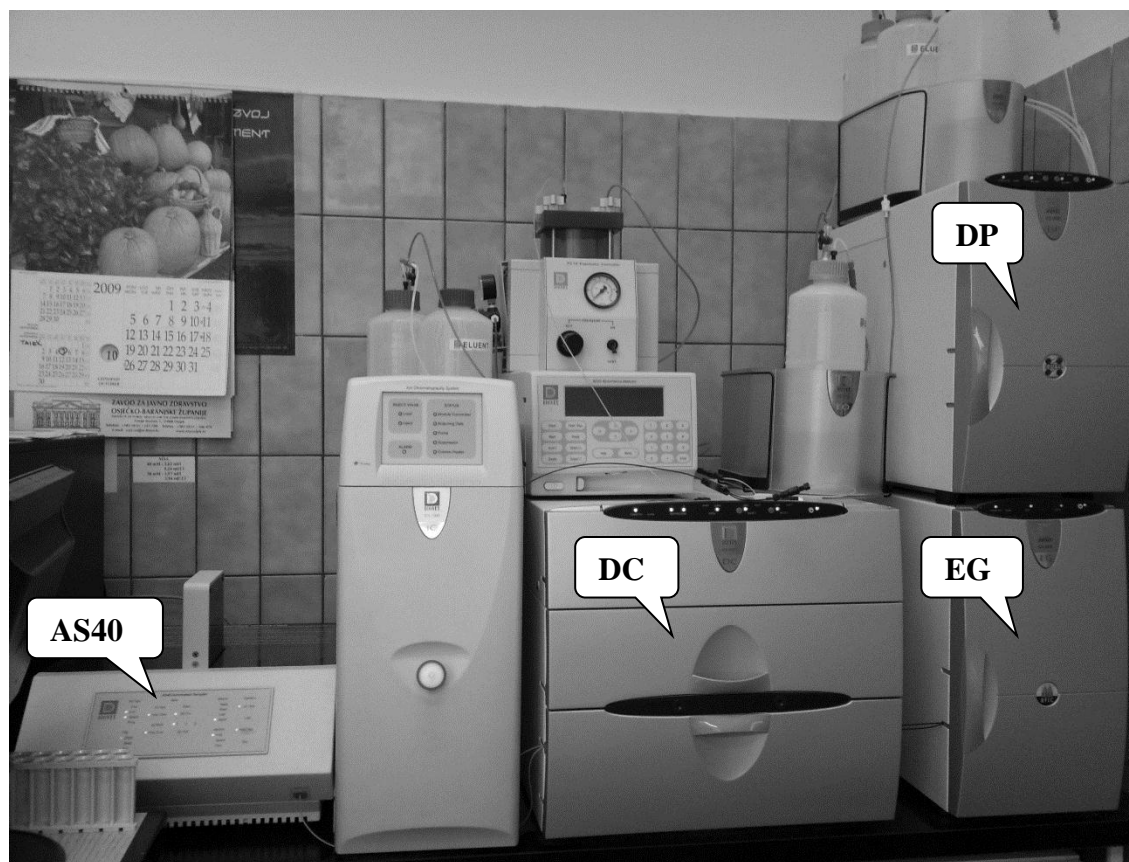
DP (Dual Pump) modul se sastoji od dvije pumpe za eluens. Pumpa 2 (ISOCRATIC) je spojena na posudu od 2 l u kojoj se nalazi ultra čista voda od koje se u EG automatski pripravlja eluens za određivanje aniona (kalij hidroksid - KOH). Pumpe su predviđene za rad pri tlaku do 5000 psi, uz protok od 0,001 do 10 ml/min.

**3. EG**

Eluent generator (EG) služi za spravljanje proizvoljne koncentracije eluensa (u ovom slučaju KOH) u željenom vremenu tijekom analize. Glavni dijelovi su naponska jedinica, uređaj za otplinjavanje, kartuša s koncentratom eluensa (Dionex EGC II KOH) i CR-ATC kolona za dodatno uklanjanje nečistoća u eluensu. EG je predviđen za rad pri tlaku od 2000 do 3000 psi.

**4. DC**

U DC (Detector Compartment) modulu nalaze se dva sustava za simultanu analizu aniona i kationa. Sustav za određivanje aniona sastoji se od sljedećih dijelova: injektorski ventil s petljom za uzorak za anione (oko 50 µl); predkolona (Dionex IONPAC AG-19 4 x 50 mm) i kolona (Dionex IONPAC AS-19 4 x 250 mm); elektrolitički supresor (Dionex AERS 500) i detektor vodljivosti (CD). Temperatura u DC modulu može se podesiti u rasponu 15 - 40°C.



Slika 3.3.2.1. Izgled glavnih komponenti ICS-3000, autor slike: Hrvoje Sučić

### 3.3. Statističke metode

Osnovni parametri validacije obrađeni su metodom deskriptivne statistike te su prikazani tablično. Usporedba dobivenih rezultata prikazana je Bland-Altman i „Mountain“ grafikonom. Metode su uspoređene koeficijentom korelacije metoda te Passing-Bablock i Demingovom regresijskom analizom. Za prikaz rezultata i statističku obradu podataka korišteni su računalni programi Excel 2010, Microsoft Office (Microsoft, Redmond, SAD), MedCalc v.12.5.0.0. (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija) te ISO 8466-1:1990.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Validacija analitičke metode za određivanje citrata metodom ionske kromatografije (IC)

Provjereni su sljedeći parametri validacije:

#### 4.1.1. LINEARNOST

Mogućnost metode da u određenom području daje rezultate proporcionalne koncentraciji analita u uzorku nazivamo linearnost. Utvrđuje se izradom kalibracijskog pravca.

Priprema standardnih otopina za kalibracijski pravac:

Otopine se pripremaju iz certificiranog referentnog materijala (CRM) Citrate Ion Chromatography Standard Solution (Fluka, Lot 38730, 05/2016) koncentracije 1000 mg/l. Pripremljeno je šest kalibracijskih točaka, svaka u tri replike, a rezultati analize prikazani su u Tablici 4.1.1.2.

Tablica 4.1.1.1. Priprema kalibracijskih standarda citrata u različitim koncentracijama

Koncentracije (mg/l)		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Faktor razrjeđenja	<b>1</b>	<b>2000</b>	<b>800</b>	<b>400</b>	<b>200</b>	<b>125</b>	<b>100</b>
Koncentracija (mg/l)	<b>1000</b>	0,5	1,25	2,5	5	8	10

#### VOLUMEN (ml/ml)

Faktor razrjeđenja		2000	800	400	200	125	100
Volumen osnovnog standarda (ml)	-	<b>0,025</b>	<b>0,025</b>	<b>0,050</b>	<b>0,100</b>	<b>0,080</b>	<b>0,100</b>
Volumen tikvice (ml)	-	50	20	20	20	10	10

Tablica 4.1.1.2. Rezultati analize standardnih otopina citrata u različitim koncentracijama

Broj točaka	Replike	KONCENTRACIJA (mg/l)	POVRŠINA (mS/min)	Rt (min)
<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	0,1061	9,747
	<b>1</b>	<b>0,5</b>	0,1068	9,783
	<b>1</b>	<b>0,5</b>	0,1068	9,717
<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1,25</b>	0,2153	9,667
	<b>2</b>	<b>1,25</b>	0,2147	9,793
	<b>2</b>	<b>1,25</b>	0,2163	9,730
<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2,5</b>	0,3729	9,877
	<b>3</b>	<b>2,5</b>	0,3726	9,847
	<b>3</b>	<b>2,5</b>	0,3726	9,650
<b>4</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	0,6858	9,907
	<b>4</b>	<b>5</b>	0,6897	9,790
	<b>4</b>	<b>5</b>	0,6882	9,673
<b>5</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	1,0741	9,733
	<b>5</b>	<b>8</b>	1,0747	9,667
	<b>5</b>	<b>8</b>	1,0753	9,657
<b>6</b>	<b>6</b>	<b>10</b>	1,3292	9,660
	<b>6</b>	<b>10</b>	1,3249	9,687
	<b>6</b>	<b>10</b>	1,3222	9,680

Kalibracijski pravac izrađen je s tablicom 4.1.1.3.

#### 4.1.1.3. Pomoćna tablica za izračun koeficijenta kalibracijskog pravca

	$x_i$	$x_i^2$	$y_i$	$y_i^2$	$x_i \cdot y_i$	$x_i - \bar{X}$	$y_i - \bar{Y}$
1	0,5000	0,2500	0,1066	0,0114	0,0533	-4,0417	-0,5239
2	1,2500	1,5625	0,2154	0,0464	0,2693	-3,2917	-0,4150
3	2,5000	6,2500	0,3727	0,1389	0,9318	-2,0417	-0,2578
4	5,0000	25,0000	0,6879	0,4732	3,4395	0,4583	0,0574
5	8,0000	64,0000	1,0747	1,1550	8,5976	3,4583	0,4442
6	10,0000	100,0000	1,3254	1,7568	13,2543	5,4583	0,6950
<b>SUM</b>	<b>27,2500</b>	<b>197,0625</b>	<b>3,7827</b>	<b>3,5816</b>	<b>26,5458</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
$\bar{X}$	<b>4,5417</b>	<b>32,8438</b>	<b>0,6305</b>	<b>0,5969</b>	<b>4,4243</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>

	$\hat{y}_i$	$\hat{y}_i - \bar{Y}$	$(\hat{y}_i - \bar{Y})^2$	$(x_i - \bar{X})^2$	$(y_i - \bar{Y})^2$	$(x_i - \bar{X}) \cdot (y_i - \bar{Y})$	$\hat{y}_i$
1	0,1140	-0,5164	0,2667	16,3351	0,2745	2,1174	0,1140
2	0,2099	-0,4206	0,1769	10,8351	0,1722	1,3661	0,2099
3	0,3696	-0,2609	0,0681	4,1684	0,0664	0,5263	0,3696
4	0,6890	0,0586	0,0034	0,2101	0,0033	0,0263	0,6890
5	1,0723	0,4419	0,1953	11,9601	0,1974	1,5363	1,0723
6	1,3279	0,6974	0,4864	29,7934	0,4830	3,7934	1,3279
<b>SUM</b>	<b>3,7827</b>	<b>0,0000</b>	<b>1,1967</b>	<b>73,3021</b>	<b>1,1968</b>	<b>9,3658</b>	<b>3,7827</b>
$\bar{X}$	<b>0,6305</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,1994</b>	<b>12,2170</b>	<b>0,1995</b>	<b>1,5610</b>	<b>0,6305</b>

Legenda:

$x_i$ - koncentracija standardne otopine (mg/l)	$y_i$ - površina pika standardne otopine - srednja vrijednost 3 replike ( $\mu\text{S min}$ )	$\bar{X}$ - srednja vrijednost koncentracija standardnih otopina	$\bar{Y}$ - srednja vrijednost površina pika standardnih otopina
$\hat{y}_i$ - predviđena vrijednost površine pika standardne otopine na osnovu kalibracijske funkcije	SUM - zbroj svih članova u stupcu	AVE - srednja vrijednost svih članova u stupcu	Rt - retencijsko vrijeme

Određeni su koeficijenti kalibracijskog pravca ( $a$  i  $b$ ) te koeficijenti korelacije ( $r$ ) i determinacije ( $r^2$ ) sa sljedećim jednadžbama:

$$y = a + bx \quad (1)$$

(jednadžba pravca)

$$b = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (2)$$

(izračunavanje koeficijenta  $b$  - nagib pravca)

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (3)$$

(izračunavanje koeficijenta  $a$  - odsječak na osi  $y$ )

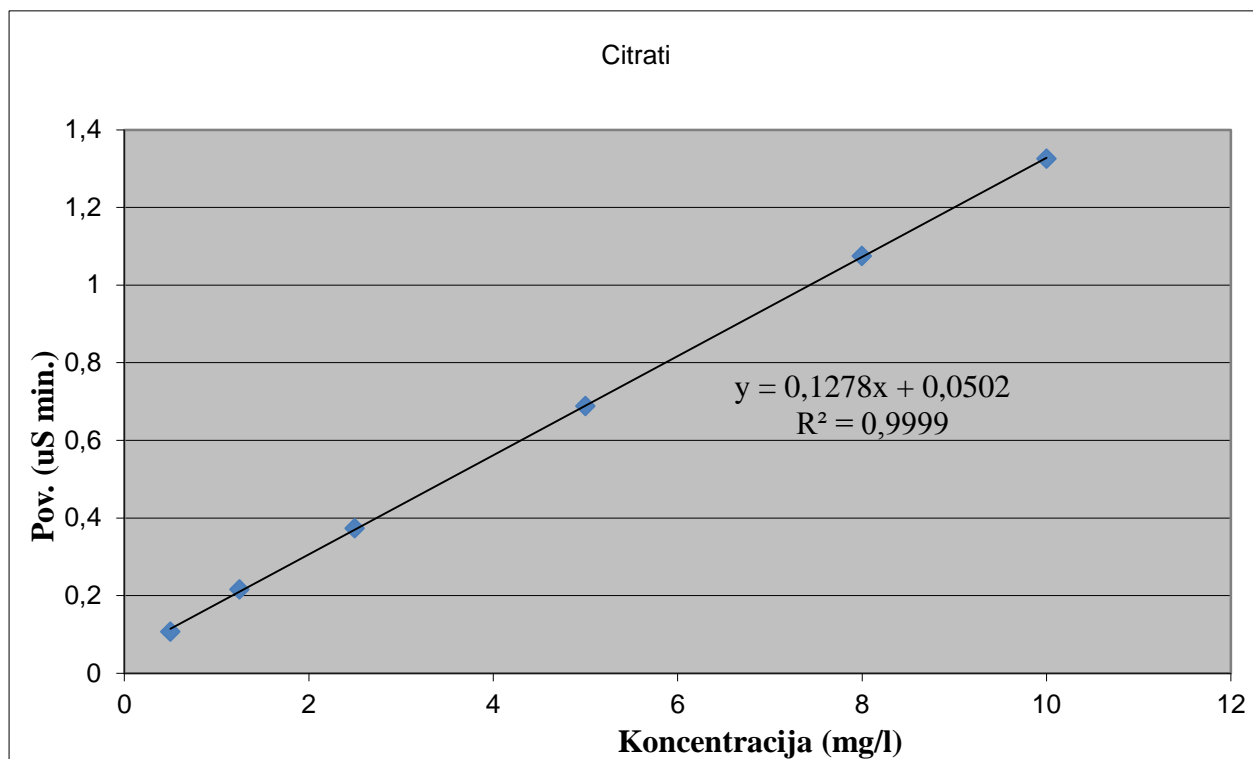
$$r = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}} \quad (4)$$

(izračunavanje koeficijenta korelacije  $r$ )

$$r^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2} \quad (5)$$

(izračunavanje koeficijenta determinacije  $r^2$ )





Slika 4.1.1.1.1. Kalibracijski pravac za analizu citrata ionskom kromatografijom

Prema jednadžbama (1) - (5) te s podacima iz Tablici 4.1.1.3. izračunate su sljedeće vrijednosti parametara kalibracijskog pravca:

$$b = 0,1278 \mu\text{S min l/mg}$$

$$a = 0,0502 \mu\text{S/min}$$

$$r^2 = 0,9999$$

$$r = \mathbf{0,9999}$$

Jednadžba kalibracijskog pravca (prema (1)) izgleda ovako:

$$y = 0,0502 + 0,1278 x$$

(6)

Odnosno, kada se traži nepoznata koncentracija iz površine pika:

$$x = (y - 0,0502)/0,1278 \quad (7)$$

Parametar  $r$  (koeficijent korelacije) kalibracijske krivulje **ZADOVOLJAVA** kriterij prihvatljivosti ( $r > 0,995$ ).

#### 4.1.2. GRANICA DETEKCIJE

Granica detekcije (LOD) dobivena je pomoću sljedeće jednadžbe:

$$LOD = \frac{3,3 * S_y}{b} \quad (8)$$

gdje je  $b$  nagib kalibracijskog pravca,  $S_y$  rezidualna standardna devijacija kalibracijskog pravca (računa se prema jednadžbi (9)),  $n$  je broj mjerenja s kalibracijskim otopinama.

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y})^2}{n-2}} \quad (9)$$

Tablica 4.1.1.4 Pomoćna tablica za izračunavanje standardne devijacije kalibracijskog pravca

	Konc. $x_i$	Pov. (stvarna) $y_i$	Pov. (procjena) $\hat{y}_i$	$y_i - \hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
1	0,5000	0,1066	0,1140498	-0,0074831	0,0000560
2	1,2500	0,2154	0,2098776	0,0055557	0,0000309
3	2,5000	0,3727	0,3695908	0,0031092	0,0000097
4	5,0000	0,6879	0,6890170	-0,0011170	0,0000012
5	8,0000	1,0747	1,0723286	0,0023714	0,0000056
6	10,0000	1,3254	1,3278696	-0,0024362	0,0000059
$\bar{x}$	27,2500	0,6305	SUM	0,0000000	0,0001093
			AVE	0,0000000	0,0000182

S jednadžbama (8) i (9) te Tablicom 4.1.1.4. izračunata je granica detekcije (LOD) za određivanje citrata metodom IC koja iznosi:

$$n = 18$$

$$S_y = 0,002614102$$

$$\text{LOD} = 0,068 \text{ mg/l (0,00035 mmol/l)}$$

#### 4.1.3. GRANICA KVANTIFIKACIJE

Granica kvantifikacije (LOQ) dobivena je pomoću sljedeće jednadžbe:

$$LOQ = \frac{10 \cdot S_y}{b} \quad (10)$$

Gdje je  $b$  nagib kalibracijskog pravca, a  $S_a$  je standardna devijacija odsječka na  $y$  osi ( $a$ ) koja se računa prema jednadžbi (10).

S jednadžbama (9) i (10) te Tablicom 4.1.1.4. izračunata je granica kvantifikacije za određivanje citrata metodom IC koja iznosi:

$$\text{LOQ} = 0,20 \text{ mg/l (0,0010 mmol/l)}$$

#### 4.1.4. PRECIZNOST

Preciznost je izraz slaganja među nizom mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima.

##### a) REPETIBILNOST (PONOVLJIVOST)

Preciznost pri uvjetima ponovljivosti u kraćem vremenskom razdoblju (jedan dan) određena je mjerenjem kontrolne standardne otopine citrata koncentracije 5 mg/l. Rezultati su prikazani u Tablici 4.1.4.1.

Tablica 4.1.4.1. Repetibilnost (ponovljivost) u kraćem vremenskom razdoblju (jedan dan)

INJEKTIRANJE BROJ	Rt (min)	POVRŠINA ( $\mu$ S/min)	KONCENTRACIJA (mg/l)
1	36,510	0,6688	4,8420
2	37,027	0,6671	4,8288
3	36,821	0,6816	4,9418
4	36,833	0,6873	4,9864
5	36,743	0,6895	5,0040
6	36,430	0,7088	5,1547
7	36,890	0,6991	5,0791
8	36,487	0,6883	4,9943
9	36,863	0,6876	4,9890
10	36,400	0,6901	5,0086
Srednja vrijednost	36,7004	0,6868	4,9829
SD	0,223145294	0,012453183	0,097378769
RSD (%)	0,61 %	1,81 %	1,95 %

Ponovljivost retencijskog vremena (Rt) za određivanje citrata metodom IC iznosi 0,61 %. Ponovljivost mjerenja površine pika za određivanje citrata metodom ionske kromatografije iznosi **1,81 %**, što **ZADOVOLJAVA** kriterij prihvatljivosti (RSD < 10 %). Ponovljivost određivanja koncentracije citrata metodom ionske kromatografije iznosi **1,95 %**, što **ZADOVOLJAVA** kriterij prihvatljivosti (RSD < 10 %).

## b) INTERMEDIJARNA PRECIZNOST

Intermedijarna preciznost određena je mjerenjem kontrolne standardne otopine citrata koncentracije 5 mg/l kroz duže vremensko razdoblje (16 dana). Rezultati se nalaze u Tablici 4.1.4.2. Ponovljivost određivanja koncentracije citrata metodom ionske kromatografije iznosi **2,21 %**, što **ZADOVOLJAVA** kriterij prihvatljivosti (RSD < 10 %).

Tablica 4.1.4.2. Intermedijarna preciznost određivanja citrata kroz duže vremensko razdoblje (16 dana)

INJEKTIRANJE BROJ	DATUM	KONCENTRACIJA (mg/l)
1	14.9.2015	4,8425
2	15.9.2015	5,1999
3	16.9.2015	4,8565
4	17.9.2015	4,9699
5	18.9.2015	5,1125
6	21.9.2015	4,9214
7	22.9.2015	5,1269
8	23.9.2015	4,9299
9	24.9.2015	4,9299
10	25.9.2015	5,1168
11	28.9.2015	4,9658
12	29.9.2015	5,1699
13	30.9.2015	4,9990
14	1.10.2015	5,0129
15	2.10.2015	5,1169
16	5.10.2015	5,0169
	Srednja vrijednost	5,0180
	SD	0,110654115
	RSD (%)	2,21%

#### 4.1.5. TOČNOST

Točnost metode rađena je mjerenjem kontrolnih standardnih otopina citrata koncentracije 5 mg/l kroz period od deset uzastopnih mjerenja pri čemu je dobiveno srednje iskorištenje citrata. (Tablica 4.1.5.1.)

Tablica 4.1.5.1. Iskorištenje (Recovery) standardne otopine citrata koncentracije 5 mg/l

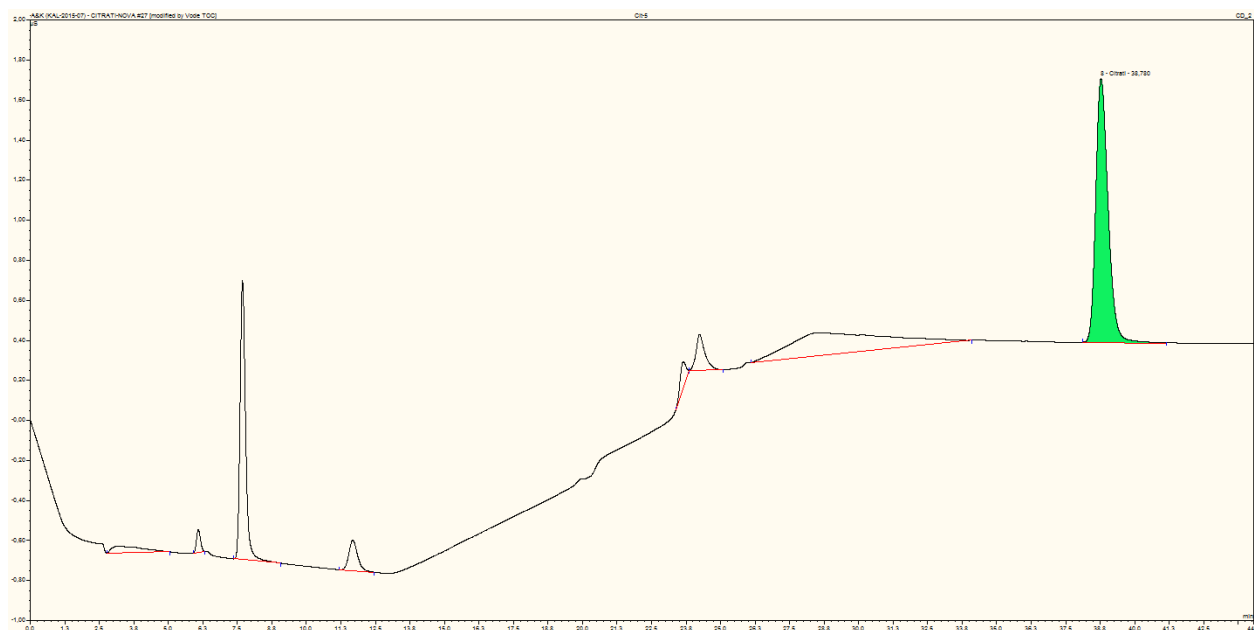
INJEKTIRANJE BROJ	KONCENTRACIJA (pripremljeno) (mg/l)	KONCENTRACIJA (izmjereno) (mg/l)	ISKORIŠTENJE Recovery (%)
1	5,000	4,842	96,84%
2	5,000	4,829	96,58%
3	5,000	4,942	98,84%
4	5,000	4,986	99,73%
5	5,000	5,004	100,08%
6	5,000	5,155	103,09%
7	5,000	5,079	101,58%
8	5,000	4,994	99,89%
9	5,000	4,989	99,78%
10	5,000	5,009	100,17%
	Srednja vrijednost	4,9829	99,66%
	SD	0,097378769	1,95%
	RSD (%)	1,95%	1,95%

Srednje iskorištenje citrata iznosi **99,66 %**, tako da možemo reći da metoda **ZADOVOLJAVA** kriterij prihvatljivosti (točnost  $\pm 10 \%$ ).

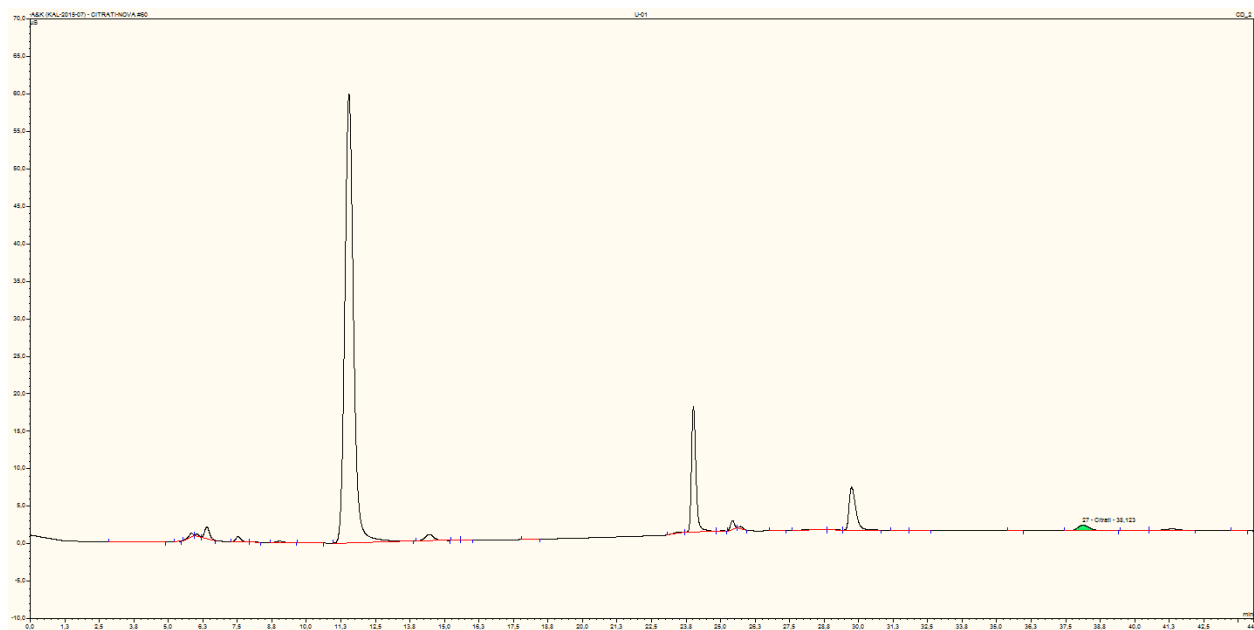


#### 4.1.6. SPECIFIČNOST/SELEKTIVNOST

Specifičnom metodom nedvojbeno možemo odrediti i razlikovati jedan analit od ostalih komponenti (Slika 4.1.6.1.), dok kod selektivne metode možemo odrediti više komponenti istodobno, ali pod uvjetom da te komponente ne smetaju jedna drugoj (Slika 4.1.6.2.). Dokazuje se usporedbom reprezentativnih kromatograma koji pokazuju čistoću pikova certificiranih referentnih materijala analita, kromatograma smjesa komponenti ili nacijepljenog uzorka matriksa.



Slika 4.1.6.1. Specifičnost metode prikazana kromatogramom s certificiranim referentnim materijalom citrata (zeleni peak) koncentracije 5 mg/l



Slika 4.1.6.2. Selektivnost metode prikazana kromatogramom nacijepljenog uzorka urina (smjesa komponenti) s određenom koncentracijom citrata (zeleni peak)

#### 4.1.7. PODRUČJE PRIMJENE

Raspon među donjom i gornjom koncentracijom granice analita u uzorku koji se mogu kvantificirati uz određenu linearnost, preciznost i istinitost (točnost).

**Raspon se nalazi u 0,20 mg/l (LOQ) i 10 mg/l citrata (najveća točka kalibracijske krivulje), odnosno u 0,0010 mmol/l i 0,052 mmol/l.**

#### 4.1.8. SAŽETAK REZULTATA

Sažetak rezultata validacijskih parametara iz kojeg proizlazi zaključak da je metoda primjenjiva svrsi, prikazan je u tablici 4.1.8.1.

Tablica 4.1.8.1. Sažetak rezultata validacijskih parametara

Parametar validacije	Kriterij prihvatljivosti	Rezultat	Zadovoljava kriterije (DA/NE)
<b>Linearnost</b>			
Koeficijent korelacije	$r \geq 0,995$	0,9999	<b>DA</b>
<b>Granica detekcije</b>			
LOD	Informacija	0,068 mg/l (0,00035 mmol/l)	-
<b>Granica kvantifikacije</b>			
LOQ	Informacija	0,20 mg/l (0,001 mmol/l)	-
<b>Preciznost</b>			
Ponovljivost Rt	$RSD \leq 10 \%$	$RSD = 0,61 \%$	<b>DA</b>
Ponovljivost mjerenja površine	$RSD \leq 10 \%$	$RSD = 1,81 \%$	<b>DA</b>
Ponovljivost određivanja koncentracije	$RSD \leq 10 \%$	$RSD = 1,95 \%$	<b>DA</b>
Intermedijarna preciznost (konc.)	$RSD \leq 10 \%$	$RSD = 2,21 \%$	<b>DA</b>
<b>Točnost</b>			
Iskorištenje	90 - 110 %	99,66 %	<b>DA</b>
<b>Specifičnost/selektivnost</b>			
Metoda mora biti u stanju detektirati analit u prisutnosti drugih iona u matriksu urina			
<b>Područje primjene</b>			
0,20 mg/l - 10 mg/l (0,0010 - 0,052 mmol/l)			

#### 4.2. Usporedba dobivenih rezultata određivanja citrata u urinu postojećom enzimsko-spektrofotometrijskom metodom s metodom ionske kromatografije (IC)

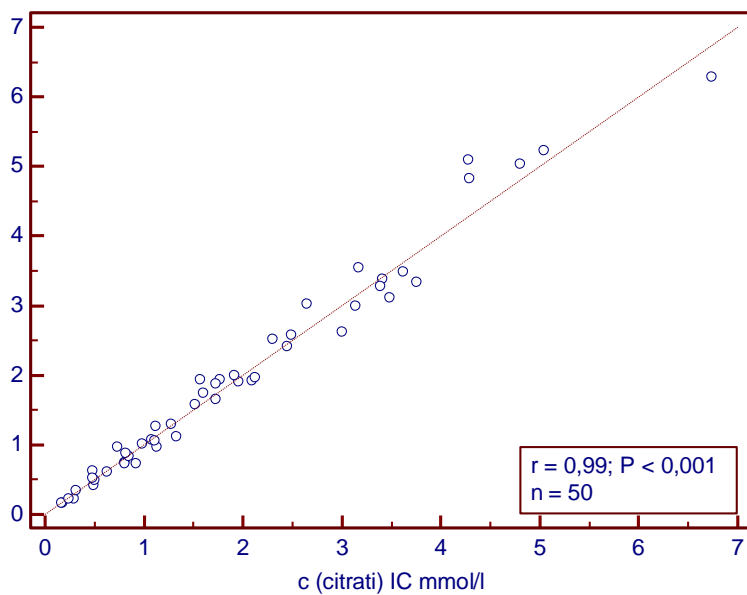
Usporedba dobivenih rezultata (Tablica 4.2.1.) prikazana je Bland-Altman i „Mountain“ grafikonom. Usporedba metoda obrađena je koeficijentom korelacije metoda te je izvršena Passing-Bablock i Demingovom regresijskom analizom. Grafikonom raspršenja vrijednosti (Slika 4.2.1.1.) prikazani su parovi podataka za obje metode. Koeficijent korelacije (r) iznosi 0,99, a razina značajnosti (p) manja je od 0,001.

Tablica 4.2.1. Usporedba dobivenih rezultata citrata u urinu postojećom enzimsko-spektrofotometrijskom metodom na analizatoru AU 680 s metodom ionske kromatografije (IC).

Uzorak	Koncentracija citrata (mmol/l) na analizatoru AU 680	Koncentracija citrata (mmol/l) na ionskom kromatografu (IC)
1.	1,92	2,09
2.	3,38	3,41
3.	3,27	3,39
4.	1,94	1,77
5.	3,02	2,65
6.	1,58	1,52
7.	3,54	3,17
8.	1,93	1,57
9.	1,29	1,28
10.	5,03	4,80
11.	3,49	3,62
12.	2,57	2,49
13.	2,51	2,30

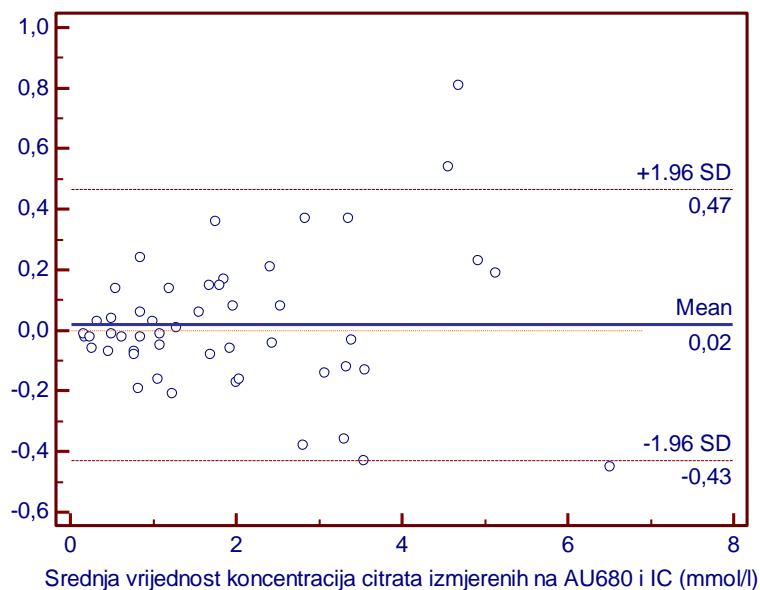
14.	6,29	6,74
15.	0,42	0,49
16.	1,12	1,33
17.	1,90	1,96
18.	1,07	1,08
19.	5,23	5,04
20.	0,97	1,13
21.	0,23	0,29
22.	0,16	0,18
23.	1,26	1,12
24.	1,01	0,98
25.	3,33	3,76
26.	2,62	3,00
27.	0,74	0,81
28.	0,16	0,17
29.	1,06	1,11
30.	0,62	0,48
31.	0,73	0,81
32.	0,61	0,63
33.	3,00	3,14
34.	0,83	0,85
35.	4,83	4,29
36.	0,97	0,73
37.	1,75	1,60
38.	5,09	4,28
39.	0,34	0,31

40.	2,00	1,92
41.	1,88	1,73
42.	2,41	2,45
43.	1,96	2,12
44.	0,49	0,50
45.	0,22	0,24
46.	0,88	0,82
47.	1,65	1,73
48.	3,12	3,48
49.	0,73	0,92
50.	0,52	0,48



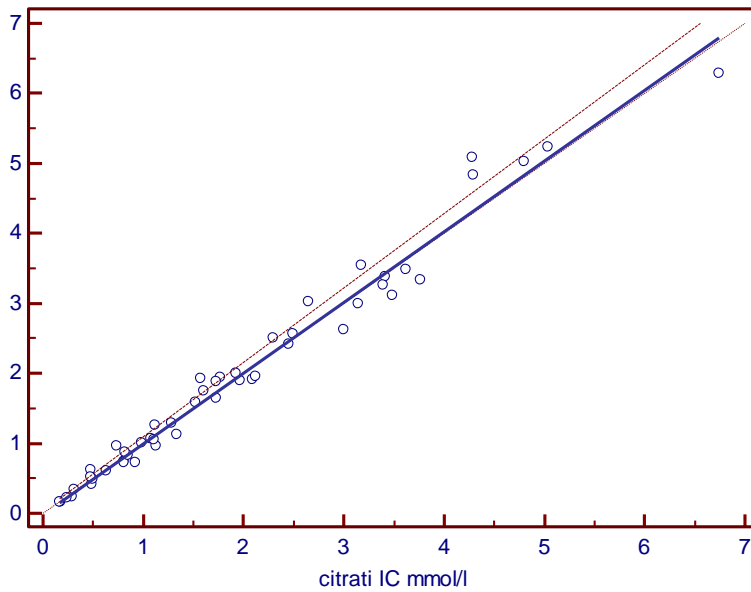
Slika 4.2.1.1. Grafikon raspršenja vrijednosti

Bland-Altman grafikon (Slika 4.2.1.2.) prikazuje razliku među dobivenim rezultatima mjerenja ovisno o razlici koncentracija citrata i srednjoj vrijednosti koncentracije citrata rađenih objema metodama.  $N = 50$ ; puna linija predstavlja srednju vrijednost razlike u mjerenjima (0,02), dok isprekidana linija predstavlja raspon vrijednosti u  $\pm 1,96$  SD.



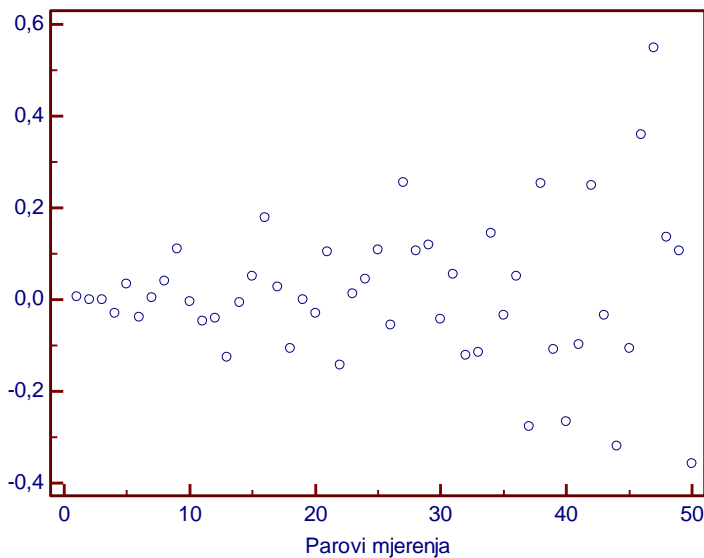
Slika 4.2.1.2. Bland-Altman grafikon razlike među dobivenim rezultatima mjerenja

Passing-Bablok regresija (Slika 4.2.1.3.) je model linearne regresije koji pretpostavlja kako niti jedna od dvaju varijabli nije niti zavisna niti nezavisna. Rezultat je prikazan kroz grafički prikaz vrijednosti odsječka i nagiba pravca s intervalom pouzdanosti koji pritom ukazuje na postojanje stalne ili proporcionalne razlike među rezultatima mjerenja.  $N = 50$ ; puna linija predstavlja regresijski pravac  $y = 1,012195 x - 0,0225810$ , dok isprekidana linija predstavlja interval pouzdanosti 95 % CI (0,9606 - 1,0634) za nagib pravca, a za os x 95 % CI (-0,07405-0,02484).



Slika 4.2.1.3. Passing-Bablok regresijska analiza metoda

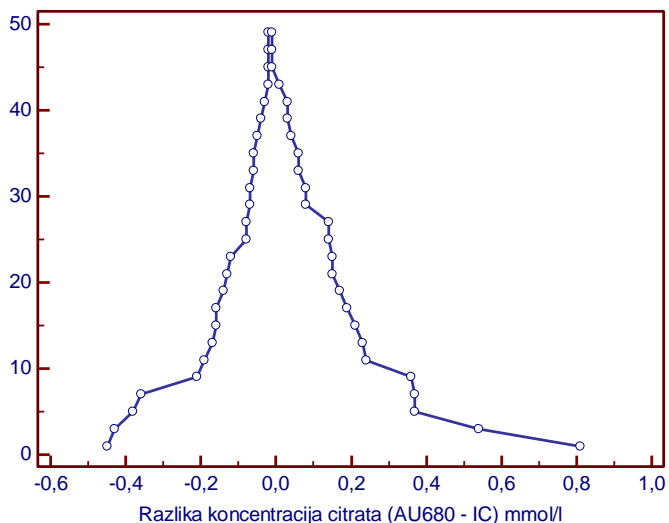
Pogreška prognoze (rezidual) (Slika 4.2.1.4) prikazuje variranje rezultata oko pravca u rasponu vrijednosti u kojem s određenom sigurnošću nalazimo predviđene rezultate (uobičajeno 95 % CI).



Slika 4.2.1.4. Passing-Bablok regresijska analiza metoda - reziduali

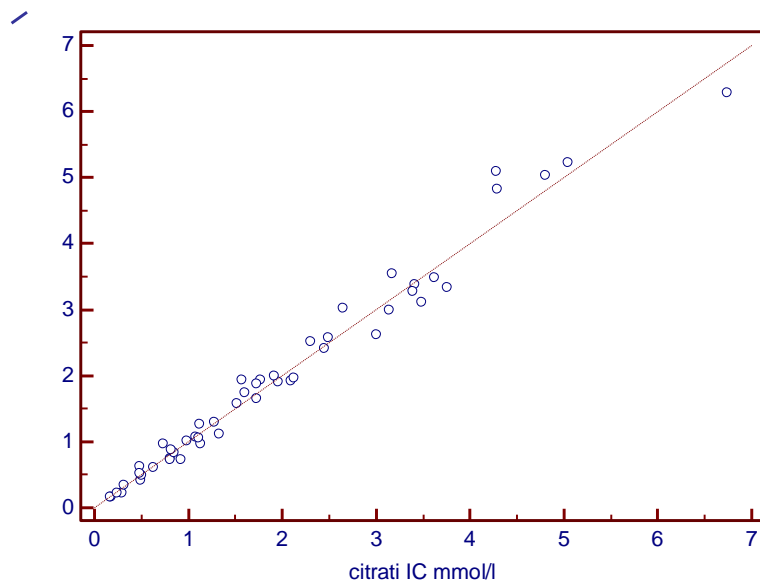


Razlika koncentracija citrata uspoređena je "Mountain" grafikonom (Slika 4.2.1.5.) gdje je vidljivo da se vrh grafikona nalazi vrlo blizu nule.

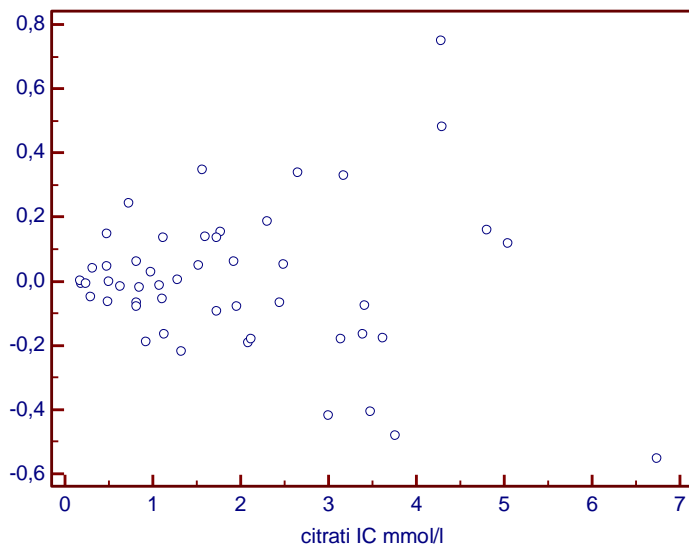


Slika 4.2.1.5. "Mountain" grafikon razlike među dobivenim rezultatima mjerenja

Demingova regresijska analiza (Slika 4.2.1.6.) uzima u obzir nepreciznost obje mjerne metode te je preporučena za praćenje konstantnih pogrešaka.  $N = 50$ ; puna linija predstavlja regresijski pravac  $y = 1,0177x - 0,01611$ , dok isprekidana linija predstavlja interval pouzdanosti 95 % CI (0,9347-1,1008) za nagib pravaca, a za os x 95 % CI (-0,1325-0,1003).



Slika 4.2.1.6. Demingova regresijska analiza metoda



Slika 4.2.1.7. Demingova regresijska analiza metoda - reziduali

## 5. RASPRAVA

Provedenim istraživanjem provjereni su svi parametri validacije. Linearnost je utvrđena izradom kalibracijskog pravca koji se sastoji od šest koncentracijskih razina standardnih otopina, s najmanje tri mjerenja po koncentracijskoj razini. Iz dobivenih podataka izračunati su kalibracijska funkcija tj. ovisnost odziva (površine pika) o koncentraciji analita i koeficijenti kalibracijske krivulje (a, b). U ovom radu linearnost je izračunata preko kalibracijske krivulje. Dobiveni koeficijent korelacije iznosi 0,999 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti ( $r \geq 0,995$ ) za kliničke laboratorijske sustave korištene u medicinsko laboratorijskoj dijagnostici (23) i usporedivo je s rezultatima koje su dobili Kaleemullah i sur. (koeficijent korelacije 0,9999) (24).

Granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ) izračunate su pomoću standardne devijacije kalibracijske krivulje. Granica detekcije iznosi 0,068 mg/l (0,00035 mmol/l), a granica kvantifikacije iznosi 0,20 mg/l (0,001 mmol/l) što je usporedivo s rezultatima dobivenim u istraživanju Erdema i sur. (LOQ = 0,009 mmol/l) (25).

Preciznost pri uvjetima ponovljivosti u kraćem vremenskom razdoblju (jedan dan) određena je mjerenjem deset uzastopnih mjerenja kontrolne standardne otopine citrata koncentracije 5 mg/l gdje ponovljivost retencijskog vremena ( $R_t$ ) za određivanje citrata metodom ionske kromatografije (IC) iznosi 0,61 %, a ponovljivost mjerenja površine pika za određivanje citrata metodom ionske kromatografije (IC) iznosi 1,81 %, što zadovoljava kriterij prihvatljivosti (RSD < 10 %). Ponovljivost određivanja koncentracije citrata metodom ionske kromatografije (IC) iznosi 1,95 %, što zadovoljava kriterij prihvatljivosti (RSD < 10 %), a dobiveni rezultat usporediv je s rezultatom dobivenom u istraživanju koje su provodili Kaleemullah i sur. (RSD = 3,6%) (24). Intermedijarna preciznost određena je mjerenjem kontrolne standardne otopine citrata koncentracije 5 mg/l kroz duže vremensko razdoblje (16 dana). Ponovljivost određivanja koncentracije citrata metodom ionske kromatografije (IC) kroz duže vremensko razdoblje (16 dana) iznosi 2,21 %, što zadovoljava kriterij prihvatljivosti (RSD < 10 %), a dobiveni rezultat je usporediv s dobivenom vrijednosti Kaleemullah i sur. (RSD = 4,6%) (24).

Točnost je određena mjerenjem kontrolnih standardnih otopina citrata koncentracije 5 mg/l kroz period od deset uzastopnih mjerenja pri čemu je dobiveno srednje iskorištenje citrata od 99,66 %, tako da možemo reći da metoda zadovoljava kriterij prihvatljivosti (točnost  $\pm 10$  %), što je

usporedivo s vrijednostima Kaleemullah i sur. (srednje iskorištenje citrata od 103,8 %) (24) te Erdem i sur. (srednje iskorištenje citrata od 100,3 %) (25).

Specifičnost i selektivnost se često poistovjećuju, međutim specifičnom metodom nedvojbeno možemo odrediti i razlikovati jedan analit od ostalih komponenti, dok kod selektivne metode možemo odrediti više komponenti istodobno, ali pod uvjetom da te komponente ne smetaju jedna drugoj. Prikazane su usporedbom reprezentativnih kromatograma koji pokazuju čistoću pikova certificiranih referentnih materijala analita te kromatograma smjesa komponenti s nacijepljenim uzorkom matriksa (26).

Područje primjene predstavlja raspon između donje i gornje koncentracije granice analita u uzorku koji se mogu kvantificirati uz određenu linearnost, preciznost i točnost (27). Raspon se nalazi između 0,20 mg/l (što ujedno predstavlja granicu kvantifikacije) i 10 mg/l citrata koju čini najviša točka kalibracijske krivulje (0,0010 - 0,052 mmol/l).

Daljnje istraživanje pokazalo je kako postojeća enzimsko-spektrofotometrijska metoda i validirana metoda ionske kromatografije (IC) daju usporedive rezultate. Pretraživanjem literaturnih podataka nisu pronađene reference koje opisuju usporedbu gore navedenih metoda. Određivanjem koncentracije citrata u urinu enzimsko-spektrofotometrijskom metodom i metodom ionske kromatografije dobiveni su rezultati u rasponu od 0,16 mmol/l do 6,74 mmol/l. Grafikonom raspršenja vrijednosti prikazani su parovi podataka za obje metode. Koeficijent korelacije ( $r$ ) iznosi 0,99, a razina značajnosti ( $P$ ) je manja od 0,001, što potvrđuje dobru povezanost te jaku korelaciju ( $r = 0,8 - 1$ ) među dobivenim rezultatima obje metoda.

Bland-Altman grafikon prikazuje razliku među dobivenim rezultatima mjerenja ovisno o razlici koncentracija citrata i srednjoj vrijednosti koncentracije citrata rađenih obje metoda.  $N = 50$ ; puna linija predstavlja srednju vrijednost razlike u mjerenjima (0,02), dok isprekidana linija predstavlja raspon vrijednosti u  $\pm 1,96$  SD-a.

Passing-Bablok regresija je model linearne regresije koji pretpostavlja kako niti jedna od dvaju varijabli nije niti zavisna niti nezavisna, a kao rezultat prikazuje kroz grafički prikaz vrijednost odsjeka i nagiba pravca s intervalom pouzdanosti koji pritom ukazuje na postojanje stalne ili proporcionalne razlike među rezultatima mjerenja.  $N = 50$ ; puna linija predstavlja regresijski

pravac  $y = 1,012195 x - 0,0225810$ , dok isprekidana linija predstavlja interval pouzdanosti 95 % CI (0,9606-1,0634) za nagib pravca, a za os x 95 % CI (-0,07405-0,02484). Pogreška prognoze (rezidual) prikazuje variranje rezultata oko pravca u rasponu vrijednosti u kojem s određenom sigurnošću nalazimo predviđene rezultate (uobičajeno 95 % CI) (28). 95 % CI (Confidence interval) ili interval pouzdanosti tumači se kao raspon vrijednosti u kojem se s 95 % pouzdanosti nalazi prava vrijednost aritmetičke sredine.

Ukoliko interval pouzdanosti (CI) kod odsjeka na osi sadrži nulu, nema sistemskih konstantnih razlika te kod nagiba pravca sadrži jedan, onda nema niti proporcionalne razlike.

Razlika koncentracija citrata uspoređena je "Mountain" grafikonom gdje je vidljivo da se vrh grafikona nalazi vrlo blizu nule, što ukazuje na dobru korelaciju rezultata, budući da su vrijednosti od vrha simetrično centrirane prema nuli.

Demingova regresijska analiza uzima u obzir nepreciznost obe mjerne metode te je preporučena za praćenje konstantnih pogrešaka.  $N = 50$ ; puna linija predstavlja regresijski pravac  $y = 1,0177 x - 0,01611$ , dok isprekidana linija predstavlja interval pouzdanosti 95 % CI (0,9347 - 1,1008) za nagib pravca, a za os x 95 % CI (-0,1325-0,1003). Budući da interval pouzdanosti za nagib pravca uključuje jedan, možemo reći da nema proporcionalne razlike u mjerenjima, a kako interval pouzdanosti za odsječak na osi sadrži nulu, nema ni konstantne razlike u mjerenjima.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju ovog istraživanja zaključeno je sljedeće:

1. Analiza citrata u urinu je vrlo važna za procjenu urolitijaze, bolesti koja je posljedica procesa patološke biomineralizacije u urotaktu koja rezultira s pojavom mokraćnih kamenaca.
2. Provođenjem validacije analitičke metode ionske kromatografije potvrđeno je kako se svi provedeni validacijski parametri (linearnost, granica detekcije i kvantifikacije, preciznost, točnost, specifičnost, selektivnost te područje primjene) nalaze u rasponu prihvatljivosti
3. Metoda ionske kromatografije primjenjiva je opisanoj svrsi.
4. Usporedbom dobivenih rezultata prikazanih Bland-Altman i „Mountain“ grafikonom te usporedbom obiju metoda Passing-Bablok i Demingovom regresijskom analizom nameće se zaključak kako postoji jaka korelacija i usporedivost među objema metodama.

## 7. SAŽETAK

**Uvod:** Analiza citrata u urinu vrlo je važna za procjenu urolitijaze, bolesti koja je posljedica procesa patološke biomineralizacije u urotaktu koja rezultira s pojavom mokraćnih kamenaca.

**Cilj istraživanja:** Ciljevi predloženog istraživanja su provesti validaciju analitičke metode ionske kromatografije za određivanje citrata u urinu te utvrditi korelaciju dobivenih rezultata određivanja citrata u urinu s postojećom enzimsko-spektrofotometrijskom metodom.

**Nacrt istraživanja:** Presječno istraživanje.

**Ispitanici i metode:** U istraživanje je ukupno bilo uključeno 50 nasumičnih uzoraka urina pacijenata s urolitijazom. Kao metode za određivanje citrata korištene su postojeća enzimsko-spektrofotometrijska metoda (Olympus AU680) te metoda ionske kromatografije (Dionex ICS-3000).

**Rezultati:** Određivanjem koncentracije citrata u uzorcima urina dobiveni su rezultati od 0,16 do 6,74 mmol/l. Dobiveni koeficijent korelacije kalibracijskog pravca iznosi 0,999. Granica detekcije iznosi 0,00035 mmol/l, a granica kvantifikacije 0,001 mmol/l. Ponovljivost određivanja koncentracije citrata iznosi 1,95 %. Intermedijarna preciznost u 16 dana iznosi 2,21 %. Određivanjem točnosti dobiveno je iskorištenje od 99,66 %. Područje primjene nalazi se između 0,0010 i 0,052 mmol/l. Usporedbom dviju metoda za određivanje citrata dobiven je koeficijent korelacije 0,99. Passing-Bablockovom regresijom dobiven je regresijski pravac  $y = 1,012195x - 0,0225810$ , a Demingovom regresijskom analizom regresijski pravac  $y = 1,0177x - 0,01611$ .

**Zaključak:** Provođenjem validacije metode ionske kromatografije potvrđeno je kako se svi provedeni validacijski parametri nalaze u kriteriju prihvatljivosti, iz čega proizlazi zaključak kako je metoda primjenjiva svrsi. Uvidom u rezultate statističke obrade, možemo uočiti kako obje metode daju jako usporedive rezultate.

**Ključne riječi:** citrati, validacija, ionska kromatografija

## 8. SUMMARY

**Introduction:** Analysis of citrates in the urine is very important for the evaluation of urolithiasis, a disease that is a consequence of pathological processes of biomineralization in the urinary tract, which results in the appearance of urinary stones.

**Objectives:** The objectives of the proposed research are to carry out validation of analytical methods for ion chromatography for the determination of citrate in the urine and to determine the correlation of the results of determination of citrate in the urine with the existing enzyme – spectrophotometric method.

**The research design:** Cross-sectional survey.

**Patients and Methods:** The study included a total of 50 random urine samples of patients with urolithiasis. Methods used for the determination of citrate are existing enzyme-spectrophotometric method (Olympus AU680) and method of ion chromatography (Dionex ICS-3000).

**Results:** By determining the concentration of citrate in the urine, the results ranged from 0.16 to 6.74 mmol/l. The resulting correlation coefficient of the calibration curve is 0.999. The detection limit is 0.00035 mmol/l, and the limit of quantification of 0.001 mmol/l. Repeatability of determining the concentration of citrate is 1.95%. Intermediate precision for a period of 16 days is 2.21%. By determination, accuracy was obtained in a yield of 99.66%. Scope is between 0.0010 and 0.052 mmol/l. Comparing the two methods for the determination of citrate, the correlation coefficient is 0.99. Passing-Bablokovom regression obtained by the regression line is  $y = 1,012195x - 0.0225810$ , and Deming regression analysis regression line  $y = 1,0177x - 0.01611$ .

**Conclusion:** The implementation of validation of ion chromatography confirmed that all the validation parameters are carried out within the eligibility criteria, which resulted in the conclusion that the method is applicable. In examination of the results of statistical analysis, we can see that both methods provide very comparable results.

**Keywords:** citrate, validation, ion chromatography



## 9. LITERATURA

1. IUPAC Technical Report: Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 74, No. 5, pp. 835-855, 2002
2. AOAC (American Association Of Official Analytical Chemists) How to Meet ISO 17025 Requirements for Method Verification Prepared by AOAC INTERNATIONAL 481 N. Frederick Ave, Suite 5002007
3. NATA: Technical Note #17 – Guidelines for the Validation and Verification of Chemical Test Methods, April 2009
4. International Committee for Harmonisation (<http://www.ich.org>) ICH – Guidance for Industry Q2(R1) – Validation of Analytical Procedures – Methodology
5. Tekin A, Tekgul S, Atsu N, Bakkaloglu, Kendi S. *J Urol*, 2002; 2572-74.
6. Meyer JL, Smith LH. *Invest Urol*, 1975; **13**: 36- 39. *Jawalekar et al, J Adv Sci Res*, 2013, 4(1): 34-37 **37 Journal of Advanced Scientific Research**, 2013, 4(1)
7. Pak CYC, Nicar MJ, Northcutt C. *Contrib Nephrol*, 1982; **33**:136-151.
8. Meyer JL, Smith LH. *Invest Urol*, 1975; **13**:36.
9. Pak CYC, Paterson R. *Arch Intern Med*, 1986; **146**:863.
10. Rajgopal G. *Indian J Exp Biol*, 1985; **22**:391-92.
11. Michele Petrarulo, Patrizia F. *Clin Chem*, 1995; **41/10**: 1518-1521.
12. Nicar M J, Skurla C, Sakhaee K, Pak CY. *Urology*, 1983; **21**: 8-14.
13. Rudman D, Kutner M H, Redd S C II, et al. *J Clin Endocrinol Metab*, 1982; **55(6)**: 1052-7.
14. Nikkila M, Koivula T, Jokela H. *Eur Urol*, 1989; **16**: 382-385.
15. Puntarić D, Ropac D. Metodologija epidemiološkog istraživanja. U: Puntarić D, Ropac D, urednici. Opća epidemiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2004. str. 31-42.
16. Gruber, W. & Möllering, H. (1966) Citrat-Lyase und Bestimmung von Citrat, *Biochemische Zeitschrift* **346**, 85-88
17. Möllering, H. & Gruber, W. (1966) Determination of citrate with citrate lyase, *Anal. Biochem.* **17**, 369-376

18. Dagley, St. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1607-1611; Verlag Chemie Weinheim and (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 2nd ed., vol. 3, pp. 1562-1565, Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London
19. Möllering, H. (1985) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. VII, pp. 2-12; Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
20. Weiss J, Reinhard S, Pohl C, Saini C. and Narayanan L., *J.Chromatography* **706**(1995)81.
21. Lee D.P, *J.Chromatogr.Sci.* **22**(8)(1984)327.
22. Vlacil F and Vins I, *J.Chromatogr.* **391**(1987)119.
23. International Vocabulary of Metrology – Basic and General Concepts and Associated Terms (VIM 3), JCGM 200:2008.
24. Kaleemullah T, Ahmed M, Sharma HK and Nageswara Rao M, Sensitive ion chromatographic determination of citrate and formate in pharmaceuticals, *Rasayan J.Chem.* Vol.4, No. 4(2011);844-852
25. Erdem M, Bedir A, A novel method for the determination of urinary citrate levels: Ion-pair and high performance liquid chromatography with liquid membrane extraction technique, *J.Exp.Clin.Med.*, (2014); 31:237-240
26. BIPM/IEC/IFCC/ISO/IUPAC/IUPAP/OIML: Guide to the expression of uncertainty in measurement, 1995
27. Simundic AM, Topic E. Quality indicators. *Biochemia Medica* 2008; 18:311-9.
28. Petrie A, Sabin C. *Medical Statistics at Glance*. 2nd Ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2005.

## 10. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci:

Ime i prezime: Hrvoje Sučić

Datum i mjesto rođenja: 13. studenoga 1985., u Osijeku

Adresa: Bednjanska 15, 31000 Osijek

Telefon: 031/297-283, 091/560-81-55

E-mail : s\_hrvoje@hotmail.com

### Obrazovanje:

- 2004. godine završena Tehnološka škola «Ruđer Bošković» , Osijek; smjer: kemijski tehničar
- 2010. - 2013. završen Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike pri Medicinskom fakultetu u Osijeku, zvanje: univ. bacc. med. lab. diagn.
- 2013. - 2015. Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike pri Medicinskom fakultetu u Osijeku

### Radno iskustvo:

Zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije od 1. lipnja 2007. godine do 30. rujna 2009. godine, od 23. studenoga 2009. godine do 31. prosinca 2009. godine, te od 22. rujna 2010. godine do danas.

### Hobi i interesi:

- od 2010. godine član Izvršnog odbora Društva kemičara i tehnologa Osječko-baranjske županije
- aktivno odbojka, muški odbojkaški klub "Željezničar"