

Validacija atomskog apsorpcijskog spektrofotometra AA - 7000 za analizu cinka u serumu

Randić, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:174583>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Sara Randić

**Validacija atomskog apsorpcijskog
spektrofotometra AA – 7000 za analizu cinka u
serumu**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Klinička biokemija organa i organskih sustava I Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb, pod vodstvom prof. dr. sc. Dunje Rogić i dr. sc. Željke Vogrinc, znanstvene suradnice.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Dunji Rogić i suvoditeljici dr. sc. Željki Vogrinc na njihovom strpljenju, uloženom trudu te savjetima koji su pridonijeli izradi ovog rada. Želim zahvaliti i ostalim djelatnicima Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb na ugodnoj radnoj atmosferi i 'prijateljskoj ruci' koju su mi pružili tijekom mog boravka i rada u laboratoriju.

Također zahvaljujem svojim kolegama bez kojih studentski dani ne bi bili pamtljivi. Nije nam bilo lako ali uspjeli smo podržavajući jedni druge. Zahvaljujem i prijateljicama koje nisu sa mnom dijelile studentsku klupu ali su me bodrile i tješile pri svakom padu i slavile sa mnom svaki moj uspjeh.

Najveću zahvalnost ipak dugujem svojim roditeljima Sandri i Adu, te bratu Marijanu, kao i ostalim članovima moje obitelji, koji su mi pružili bezuvjetnu podršku ne samo za vrijeme studiranja nego kroz cijeli život. Bez vas ne bi bila ono što jesam.

POPIS KRATICA

5-Br-PAPS = 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(N –propil-N-sulfopropilamino)-fenol

95% CI = eng. *95% confidence interval* = 95%- tni interval pouzdanosti

AAS = eng. *atomic absorption spectroscopy* = atomska apsorpcijska spektrofotometrija

AFS = eng. *atomic fluorescence spectroscopy*

Bias = mjera sustavne pogreške u ispitivanju točnosti

CRIP = eng. *cystein rich intestinal protein* = cisteinom bogat intestinalni protein

CV = eng. *coefficient of variation* = koeficijent varijacije

Difference plot = razlikovni dijagram

DRI = eng. *dietary reference intake* = Prehrambeni referentni unos

EMZ = elektromagnetsko zračenje

KBC = Klinički bolnički centar

KZLD = Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku

LOQ = eng. *limit of quantification* = granica kvantifikacije

r = koeficijent korelacije u ispitivanju linearnosti

RI = referentni interval

Sb = validacijska međupreciznost (standardna devijacija izračunata iz aritmetičkih sredina svakog dana ponavljanja)

SD = standardna devijacija

Sr = ponovljivost (skupna standardna devijacija izračunata iz standardnih devijacija dobivenih svakog dana tokom 10 dana mjerenja)

Threshold = prag

WHO = eng. *World Health Organization* = Svjetska zdravstvena organizacija

Sadržaj

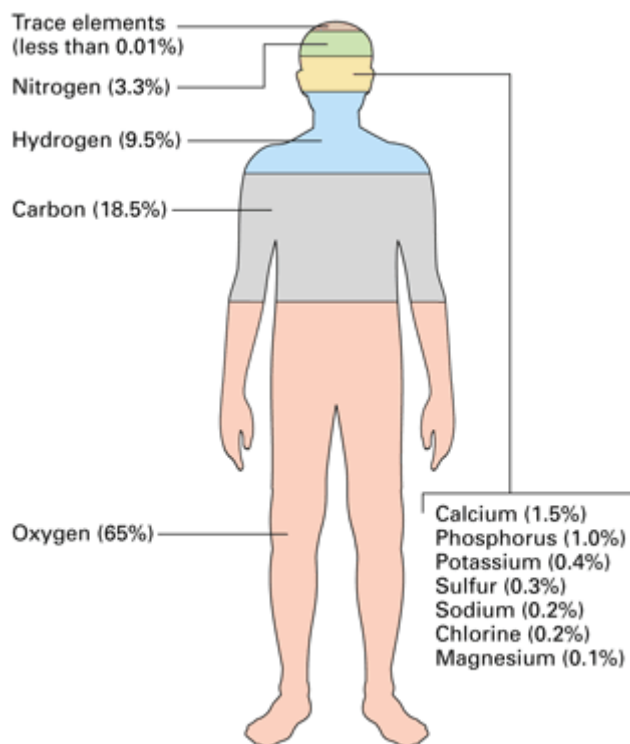
1. UVOD	1
1.1. Elementi u tragu	1
1.2. Cink	2
1.2.1. Biokemija	2
1.2.2. Unos i apsorpcija	3
1.2.3. Raspodjela i izlučivanje.....	3
1.2.4. Hipercinkemija i deficijencija cinka.....	4
1.2.5. Referentni interval za cink.....	5
1.2.6. Određivanje cinka.....	5
1.3. Spektrofotometrije.....	5
1.3.1. Atomska apsorpcijska spektrofotometrija	8
1.4. Kolorimetrija	9
1.5. Validacija.....	10
1.5.1. Preciznost	12
1.5.2. Točnost	13
1.5.3. Granica kvantifikacije	13
1.5.4. Usporedba dviju metoda.....	13
1.5.5. Linearnost.....	14
1.5.6. Provjera referentnog intervala	14
2. OBRAZLOŽENJE TEME	16
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. Uzorci biološkog materijala	17
3.2. Reagensi, kalibrator, kontrole	17
3.3. Metode.....	17
3.3.1. Kolorimetrijsko određivanje cinka	17
3.3.2. Određivanje cinka metodom atomske apsorpcijske spektrofotometrije.....	18
3.4. Uređaji.....	18
3.4.1. Biokemijski analizator Cobas 6000 c501, Roche.....	18
3.4.2. Atomski apsorpcijski spektrofotometar AA – 7000, Shimadzu (slika 13.).....	18
3.5. Postupak validacije.....	18
3.5.1. Ispitivanje preciznosti.....	19
3.5.2. Ispitivanje točnosti.....	19

3.5.3. Ispitivanje analitičke osjetljivosti (granice kvantifikacije).....	19
3.5.4. Usporedba dviju metoda.....	19
3.5.5. Ispitivanje linearnosti	20
3.5.6. Provjera referentnih intervala	20
3.6. Statistička obrada	20
3.6.1. Jednadžbe	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. Ispitivanje preciznosti.....	23
4.1.1. Međupreciznost	23
4.1.2. Ponovljivost.....	24
4.2. Ispitivanje točnosti	25
4.3. Dokazivanje donje granice kvantifikacije	26
4.4. Usporedba dviju metoda.....	26
4.5. Ispitivanje linearnosti	30
4.6. Provjera referentnih intervala	31
4.7. Rasprava.....	32
5. ZAKLJUČCI	35
6. LITERATURA	36
7. SAŽETAK.....	38
8. SUMMARY	39

1. UVOD

1.1. Elementi u tragu

Ljudsko tijelo se najvećim dijelom sastoji od četiri elementa; kisik, ugljik, vodik i dušik. U manjim postotcima su zastupljeni i kalcij, fosfor, kalij, sumpor, natrij, klor i magnezij. Preostalih 0,1% tjelesne mase čovjeka čine elementi u tragu tj. oligoelementi (Slika 1). To su većinom elementi s atomskim brojem do 34. mjesta u periodnom sustavu elemenata, s iznimkom molibdena i joda koji imaju atomski broj 42, odnosno 53, te svaki čini manje od 0,01% tjelesne mase živog organizma (Štraus i Rumora, 2009).



Slika 1. Sastav elemenata u ljudskom tijelu (Preuzeto sa

<http://bodell.mtchs.org/OnlineBio/BIOCD/text/chapter4/04images/04-01.gif>)

Oligoelemente dijelimo na esencijalne i na neesencijalne. Esencijalni oligoelementi su uključeni u održavanje normalne funkcije organizma. Dio su mnogih metaboličkih procesa, uključeni su u imunološki odgovor a bitni su i za proces rasta. Kao takvi potrebni su za život. Smatra se da je oligoelement esencijalan ukoliko se simptomi nastali uslijed njegove deficijencije ne povuku u potpunosti nakon adekvatnog unosa. Za sve žive organizme esencijalni oligoelementi su bakar (Cu), cink (Zn), kobalt (Co), mangan (Mn) molibden (Mo),

i željezo (Fe). Sisavcima su potrebni još i fluor (F), jod (I), krom (Cr), selen (Se) i stroncij (Sr) te prema nekim literaturama i nikel (Ni) i vanadij (Va). Neesencijalni oligoelementi nisu potrebni za život međutim ljudsko ih tijelo ipak sadrži u niskim koncentracijama. Kada im koncentracija u tijelu poraste većina neesencijalnih elemenata, pogotovo kadmij (Cd), olovo (Pb) i živa (Hg), postaju potencijalno toksični. Razlikujemo dva bitna patofiziološka stanja koja nastaju uslijed promjene u koncentracijama oligoelemenata; manjak esencijalnih elemenata te nakupljanje neesencijalnih elemenata u tragu. Do smanjene koncentracije esencijalnih elemenata u tragu dolazi zbog neadekvatnog unosa, poremećene ravnoteže ili uslijed neke bolesti. Ukoliko dođe do nakupljanja neesencijalnih oligoelemenata oni mogu iz tijela istisnuti esencijalne oligoelemente ali i djelovati toksično na razne organe/stanice. Na primjer, kadmij u povišenim koncentracijama istiskuje cink iz spojeva u tijelu te se taloži u stijenkama aorte uzrokujući arterijsku hipertenziju.. Manjak esencijalnih kao i toksičnost neesencijalnih oligoelemenata dijagnosticira se u laboratoriju ispitivanjem koncentracije oligoelemenata u uzorku seruma ili plazme, u eritrocitima ili u mokraći.

1.2. Cink

1.2.1. Biokemija

Cink je esencijalan element u tragu s atomskim brojem 30 i relativnom atomskom masom 65,39. Drugi je najzastupljeniji oligoelement u tijelu nakon željeza i najzastupljeniji stanični oligoelement. Prisutan je u obliku Zn^{2+} iona koji u fiziološkim uvjetima stupaju u neutralne redoks reakcije kao elektron akceptori to jest jake Lewisove kiseline. Zbog toga je cink važna strukturna, katalitička i signalna komponenta živih organizama (Kambe i sur., 2005). Poznato je više od 300 metaloenzima za čiju je aktivnost potreban cink i koje možemo razvrstati u svih šest razreda enzimskog sustava. Karboanhidraza koja sudjeluje u eliminaciji ugljičnog dioksida iz tkiva i u održavanju acido bazne ravnoteže u krvi, DNA polimeraza koja je glavni enzim replikacije i transkripcije te alkalna fosfataza koja defosforilira različite molekule u optimalnom pH rasponu od 9,8 - 10,5 samo su tri od mnogih bitnih enzima koji sadrže cink kao kofaktor. Valja napomenuti da cink uglavnom ima aktivacijsko svojstvo u niskim koncentracijama dok alkalnu fosfatazu npr. inhibira pri povišenim koncentracijama, dok neke enzime kao što je ribonukleaza inhibira u cijelom svom koncentracijskom rasponu. Do danas je otkriveno i više od 500 proteina uključenih u replikaciju i ekspresiju gena koji sadrže motiv cinkova prsta. Pojam zinc finger tj. cinkov prst prvi je puta uveden 1983. godine kada je dokazano da je cink bitan za strukturnu stabilnost i funkciju transkripcijskog faktora IIIA (TFIIIA) Afričke kandžaste žabe. Cinkov prst opisuje mali, proteinski strukturni motiv koji

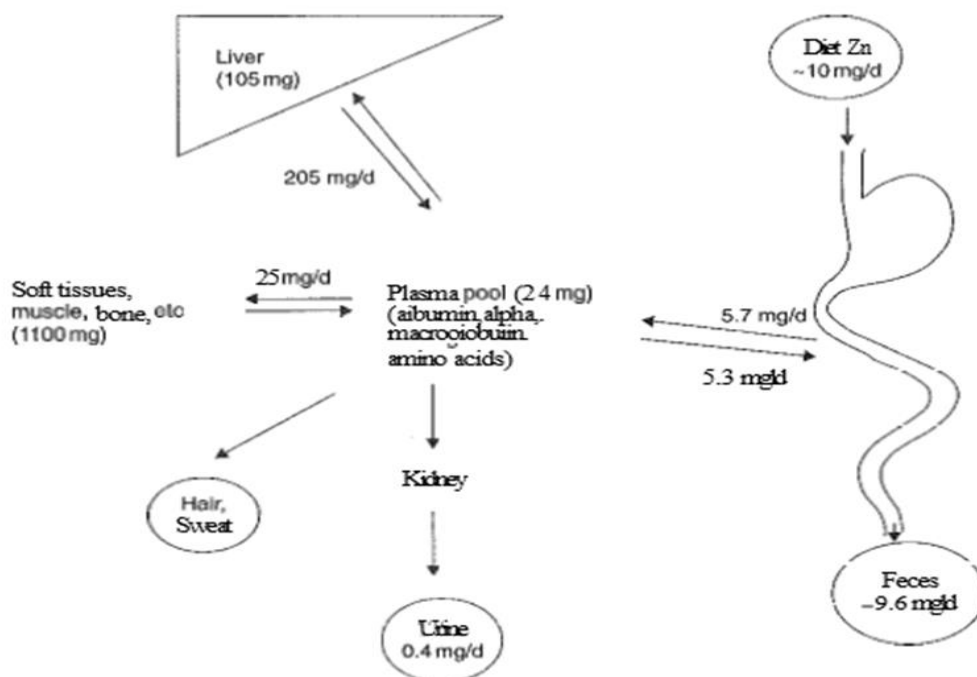
preko svojih cisteinskih i histidinskih ostataka koordinira tj. veže tetrahedralni cinkov ion. Ovaj cinkov ion pridonosi strukturnoj stabilnosti ali i funkciji mnogih transkripcijskih proteina zato što može stupati u interakcije s raznim makromolekulama kao što su nukleinske kiseline i tako pomaže u vezanju TF na DNA ili RNA. Cink je prepoznat i kao drugi glasnik mnogih signalnih kaskada u tijelu. Na primjer, nedavno je dokazano da su cink i njegovi transporteri bitni za sintezu, sekreciju i funkciju inzulina u homeostazi glukoze. Činjenica da cink može utjecati na aktivnost inzulina otvara cijelo novo polje istraživanja o čimbenicima rizika i nastanku dijabetes mellitusa.

1.2.2. Unos i apsorpcija

Dnevno se u tijelo hranom, vodom pa čak i zrakom unosi 10-15 mg cinka (Štraus i Rumora, 2009). Kao najbolji izvor cinka nekad su se navodili brašno, šećer i žitarice međutim rafiniranjem ove namirnice gube na svojoj nutritivnoj vrijednosti pa se danas kao najbolji izvor navode meso, riba i orasi. Cink se iz hrane apsorbira u duodenumu i proksimalnom jejunumu gdje se najprije veže na receptore u mukozi a potom transcelularnim prijenosom prolazi kroz membrane vezan na CRIP. Apsorpciju pospješuju neke aminokiseline poput histidina i triptofana te zasićene, dugolančane masne kiseline. Kalcij i željezo s druge strane mogu kompetitivno istisnuti cink s određenih proteina uključenih u apsorpciju. Fitati i citrati keliraju s cinkom stvarajući netopljive komplekse koji sprječavaju vezanje na receptore u intestinalnoj mukozi pa se apsorpcija cinka također smanjuje.

1.2.3. Raspodjela i izlučivanje

U tijelu odrasle osobe nalazimo 2 do 2,5 g cinka (Shenkin i Baines, 2008), većina kojeg se nalazi u stanicama metabolički aktivnih tkiva vezan na proteine. U bubrezima na primjer cink stvara kompleks s proteinom metalotioneinom koji sadrži veliki broj cisteinskih ostataka putem kojih reverzibilno veže cink. Osim u bubrezima nalazimo ga i u prostati, slezeni, gušterači, plućima, srcu, i dr. Najveća količina se ipak nalazi u mekim tkivima, nešto više od 50% u mišićima i oko 30% u kostima. Što se tiče krvi, u eritrocitima nalazimo 10 puta veću količinu cinka nego u plazmi zbog velike koncentracije karboanhidraze čiji je cink kofaktor. 60% cinka u plazmi je vezano na albumin a preostalih 40% na α_2 makroglobulin i slobodne aminokiseline. Cink koji se uopće ne apsorbira ili se reapsorbira u crijeva izlučuje se u najvećem postotku fecesom. Dnevno se faecesom eliminira oko 9,6 mg cinka u odnosu na 0,4 mg koji se eliminira mokraćom. Doduše, ekskrecija mokraćom raste u stanju ketoze i kod kataboličkih bolesti jer se cink otpušta iz skeletnih mišića. Cink se nalazi i u drugim tjelesnim tekućinama kao što su suze, slina i znoj pa se gubi i kod na primjer pretjeranog znojenja.



Slika 2. Sažetak metabolizma cinka (Preuzeto od Shenkin i Baines, 2008).

1.2.4. Hipercinkemija i deficijencija cinka

S obzirom na raspodjelu cinka po svim metabolički aktivnim tkivima i njegovu funkciju u mnogim biokemijskim procesima u tijelu ne iznenađuje činjenica da se promjene u koncentraciji cinka klinički očituju kao razni, nespecifični simptomi. Hipercinkemija ili povišena koncentracija cinka u serumu je rijetka i nastaje kao posljedica eozinofilije, hipertenzije ili multiplog mijeloma dok je smanjena koncentracija, to jest deficijencija cinka, puno češća pojava koja najčešće nastaje uslijed neadekvatnog unosa ali može biti i posljedica terapije kelatorima cinka kao što je npr. penicilamin. Koncentracija cinka se smanjuje i uslijed nekih bolesti kao što su Acrodermatitis enteropathica, jetrena ciroza, hepatitis, akutna tuberkuloza, leukemija, i dr. Vegetarijanci i vegani su rizična skupina jer se zbog njihove prehrane obilne vlaknima i fitatima smanjuje apsorpcija cinka. Neki od simptoma deficijencije cinka su povećana podložnost infekcijama, atrofija testisa, slabo zacjeljivanje rana, dijareja, kožne lezije, hepatosplenomegalija te zastoje u rastu. Jetrenu cirozu i nefrotski sindrom karakterizira i pojačano izlučivanje cinka mokraćom to jest cinkurija. Kod primjene oralnih kontraceptiva dolazi do smanjenja koncentracije cinka u serumu međutim koncentracija u eritrocitima raste, to jest dolazi do preraspodjele cinka u krvi. Unatoč brojnim simptomima i komplikacijama deficijencija cinka još uvijek nije prepoznata i liječena suplementima u onoj mjeri u kojoj se primjenjuju suplementi željeza (Shenkin i Baines, 2009; Štraus i Rumora, 2009).

1.2.5. Referentni interval za cink

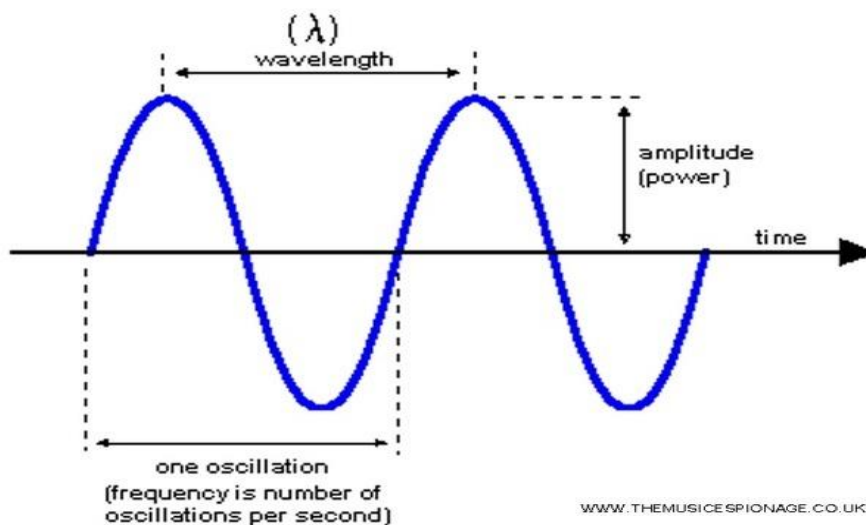
U Sjedinjenim Američkim Državama DRI za cink je 11 mg/dan za muškarce i 8mg/dan za žene (Shenkin i Baines, 2008). Okvirni referentni interval je 9,9 – 17,9 umol/L. Prema smjernicama Hrvatske komore medicinskih biokemičara referentni interval za cink u serumu za djecu od 1 – 5g je 10,3 – 18,1 umol/L, a za djecu od 6 – 7g 11,8 – 16,4 umol/L. Referentni interval za dobnu skupinu od 8 – 18g je 12,1 – 19,5 umol/L a za odrasle muškarce i žene 9,9 – 17,9 umol/L (<https://www.hkmb.hr>). Bitno je napomenuti da je koncentracija u serumu 5 – 15% veća od one u plazmi jer se cink otpušta iz krvnih stanica tijekom zgrušavanja. Dokazane su i dnevne oscilacije u koncentraciji cinka. Koncentracija je najviša ujutro a najniža navečer, te je niska nakon unosa hrane i puno viša nakon kratkog gladovanja. S obzirom na to da je koncentracija 10 puta veća u eritrocitima nego u plazmi mjerenja se ne bi smjela vršiti u hemoliziranim uzorcima. Također valja napomenuti da koncentracija cinka u serumu nije uvijek realno stanje cinka u organizmu s obzirom na to da je 60% cirkulirajućeg cinka vezano na albumin pa stoga do deficijencije cinka može doći i uslijed hipoalbuminemije.

1.2.6. Određivanje cinka

Cink se najčešće određuje u tjelesnim tekućinama; u serumu ili plazmi, u krvnim stanicama, slini ili mokraći. Koncentracija cinka u serumu korelira s količinom cinka u tkivima dok se određivanjem cinka u mokraći prati eliminacija i gubitak cinka iz organizma s obzirom na to da kod deficijencije organizam štedi cink tako da smanji njegovu ekskreciju. Preporučena metoda za određivanje cinka u serumu i u mokraći je atomska apsorpcijska spektrofotometrija (AAS), međutim u mnogim se laboratorijima cink još uvijek određuje kolorimetrijski (Štraus i Rumora, 2009).

1.3. Spektrofotometrije

U početku se pojam spektroskopije tj. spektrofotometrije odnosio na granu znanosti koja se bavila interakcijom čestica (atomi i molekule) s vidljivom svjetlošću razlučenom na određene valne duljine koje čine spektar. Međutim, danas, uz vidljivu svjetlost, spektroskopija obuhvaća i proučavanje interakcija čestica s drugim vrstama elektromagnetskog zračenja kao što su X zrake, ultraljubičast, infracrveno, mikrovalno i radio zračenje. Pod spektroskopske se metode ubrajaju čak i tehnike koje ne uključuju elektromagnetsko zračenje kao što su masena i elektronska spektroskopija (Skoog i sur., 1999). Postoje dva modela elektromagnetskog zračenja (EMZ). Dualizam je fizikalno svojstvo EMZ da pokazuje i valna i čestična svojstva. Kao i svaki val, EMZ se može definirati pomoću osnovnih parametara kao što su amplituda, valna duljina, brzina i frekvencija (Slika 2).



Slika 3. Valna svojstva elektromagnetskog zračenja (Preuzeto sa <https://www.quora.com/How-does-frequency-affect-loudness>).

Tijekom svojih eksperimenata, početkom 20. Stoljeća, Albert Einstein je opazio da se neka ponašanja EMZ ipak ne mogu objasniti valnim modelom te je predložio prvi model fotona. On je pretpostavio da EMZ ima i čestično svojstvo tj. da se može smatrati kao strujanje čestica ili 'paketa' energije koje nazivamo fotonima. Oslanjajući se na Einsteinov teorem, Max Planck je 1900. godine opisao interakciju atoma i zračenja u svojoj jednadžbi (slika 3). Pretpostavio je da je energija fotona proporcionalna frekvenciji zračenja te da ne može poprimiti bilo koju vrijednost već je kvantizirana.

Planckova jednadžba: $E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$

ϵ = Energija zračenja

$h\nu$ = kvantna energija fotona

h = Planckova konstanta (6.63×10^{-34} J·s)

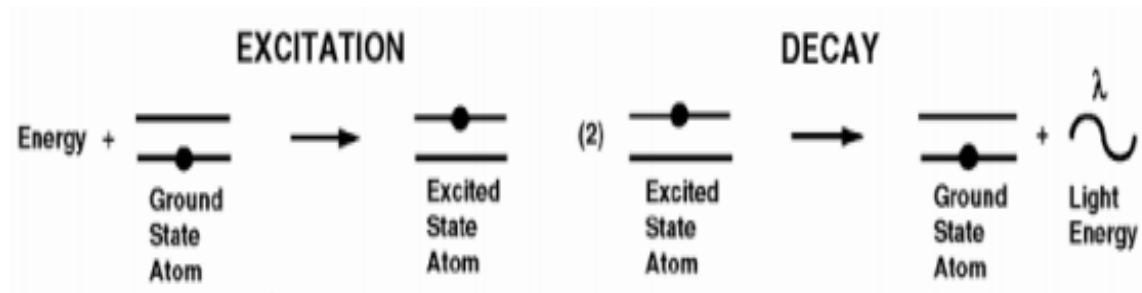
ν = Frekvencija zračenja

c = Brzina svjetlosti u vakuumu (3.00×10^8 m/s)

λ = Valna duljina zračenja

Na temelju vlastitih i prethodnih istraživanja svojih kolega, Bohr je 1913. zaključio da atomi ne postoje u nasumičnim energetska stanjima. (Welz, 1999) Prema najjednostavnijem modelu, svaki atom se sastoji od male, pozitivne nabijene jezgre (protoni i neutroni) te specifičnog broja negativnih elektrona . Elektroni orbitiraju oko jezgre na točno određenim udaljenostima, tj. prema strogo definiranim pravilima raspodijeljeni su po orbitalama

(luskama određene energije). Takva definirana konfiguracija, s najnižom energijom, naziva se osnovnim energetske stanjem. Kada se atomu dovede energija zračenja, dolazi do apsorpcije onih fotona ($h\nu$) koji odgovaraju razlici u energiji između osnovnog stanja i ljuske više energije tj. pobuđenog stanja. Pobuđeno stanje je nestabilno pa se zbog toga elektron nakon 10^{-9} do 10^{-6} s vraća u osnovno energetske stanje emitirajući fotone iste (atomska apsorpcijska spektroskopija, AAS) ili različite (atomska fluorescencijska spektroskopija, AFS) valne duljine (slika 4).



Slika 4. Ekscitacija i povratak u osnovno stanje (preuzeto od Beaty i Kerber, 1993).

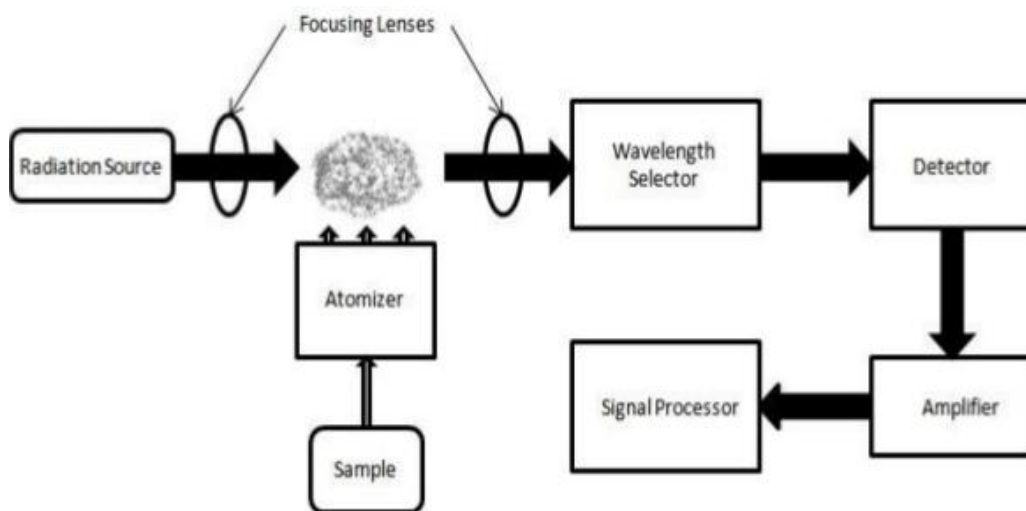
1.3.1. Atomska apsorpcijska spektrofotometrija

Fenomen apsorpcije zračenja poznat je još od početka 19. stoljeća kada je Fraunhofer zapazio crne linije na određenim pozicijama u spektru sunčeve svjetlosti (Van Loon JC, 1980). Međutim, tek je 1955. godine Sir Alan Walsh (Slika 5) otkrio metodu atomske apsorpcijske spektrofotometrije koja se danas primjenjuje u različitim područjima kemije.



Slika 5. Sir Alan Walsh (1916-1998) sa svojim atomskim apsorpcijskim spektrofotometrom (Preuzeto sa <https://web.nmsu.edu/~esevosti/walsh.htm>)

AAS je brza, selektivna i precizna metoda koja se često koristi za određivanje zemnoalkalijskih i prijelaznih metala (atomi i elementni ioni). Prvi korak je nebulizacija uzorka u kojem se uzorak isparava tj. atomizira te se potom raspršuje (nebulizira) u obliku fine vodene pare (Skoog i sur., 1999). Za AAS se koristi plinska ili elektroplinska vrsta atomizacije. Plinovita para se potom miješa s plinovitim gorivom (zrak i plin acilen na temp. 2200 do 2400 °C) te se ovako obrađen uzorak potom obasja izvorom UV-VIS svjetlosti (najčešće deuterijeva lampa ili šuplja katodna cijev/lampa). Kada apsorbiraju foton čiji kvant energije odgovara razlici u energiji između osnovnog i pobuđenog stanja, elektroni prelaze u nestabilno, pobuđeno stanje gdje se zadržavaju 10^{-9} do 10^{-6} s. Potom se iz pobuđenog stanja relaksiraju natrag u osnovno stanje emitirajući fotone iste valne duljine tj. frekvencije (Kirchhoffov zakon). Emitirano zračenje se skuplja na fokusirajućim lećama i fokusira na monokromator. Samo fotoni određene valne duljine se propuštaju prema detektoru i prevode u električne signale koji se amplificiraju i analiziraju na računalu. (Slika 6).



Slika 6. Shema AAS (Preuzeto i prilagođeno sa <https://image.slidesharecdn.com/aas1stgroup-131106135116-phpapp01/95/atomic-absorption-spectroscopy-aas-aka-spektroskopi-serapan-atom-ssa-6-638.jpg?cb=1383747408>).

1.4. Kolorimetrija

Kolorimetriju možemo definirati kao spektroskopsku metodu kojom kvantificiramo boju. Mnoge tvari, a pogotovo prijelazni elementi, stvaraju obojene komplekse sa specifičnim ligandima. Što je veća koncentracija nastalog kompleksa to je intenzitet obojenja otopine jači. Koncentracija obojenog produkta se određuje na temelju Beer Lambertovog zakona koji kaže da je koncentracija proporcionalna apsorbanciji svjetla određene valne duljine. Kolorimetrijskim metodama mjerimo apsorbanciju svjetla u vidljivom dijelu spektra. Izvor vidljivog svjetla pada na difrakcijsku rešetku ili filter koji propušta samo svjetlost određene valne duljine na kivetu s uzorkom definiranih dimenzija tj debljine. Dio se svjetlosti apsorbira a transmitancija tj. količina svjetla koja prolazi kroz uzorak pada na detektor te se prevodi u digitalni signal.

$$A = \epsilon cl$$

$$T = \frac{I_t}{I_0} = 10^{-A}$$

A=apsorbancija

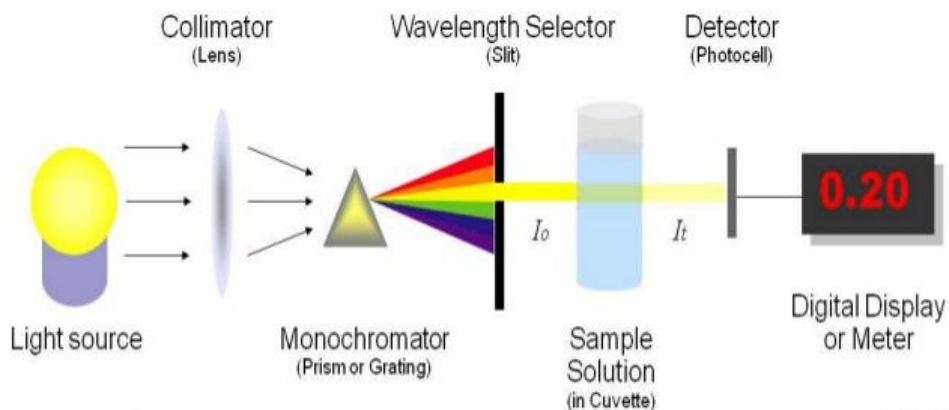
ϵ =molarni ekstinkcijski koeficijent

l=debljina kivete

T=transmitancija

I_t = Intenzitet svjetla propuštenog kroz uzorak

I_0 =Intenzitet svjetla koji pada na uzorak



Slika 7. Jednostavni prikaz kolorimetra (Preuzeto i prilagođeno sa

<https://image.slidesharecdn.com/colorimetry-160617153135/95/colorimetry-9-638.jpg?cb=1466177509>).

1.5. Validacija

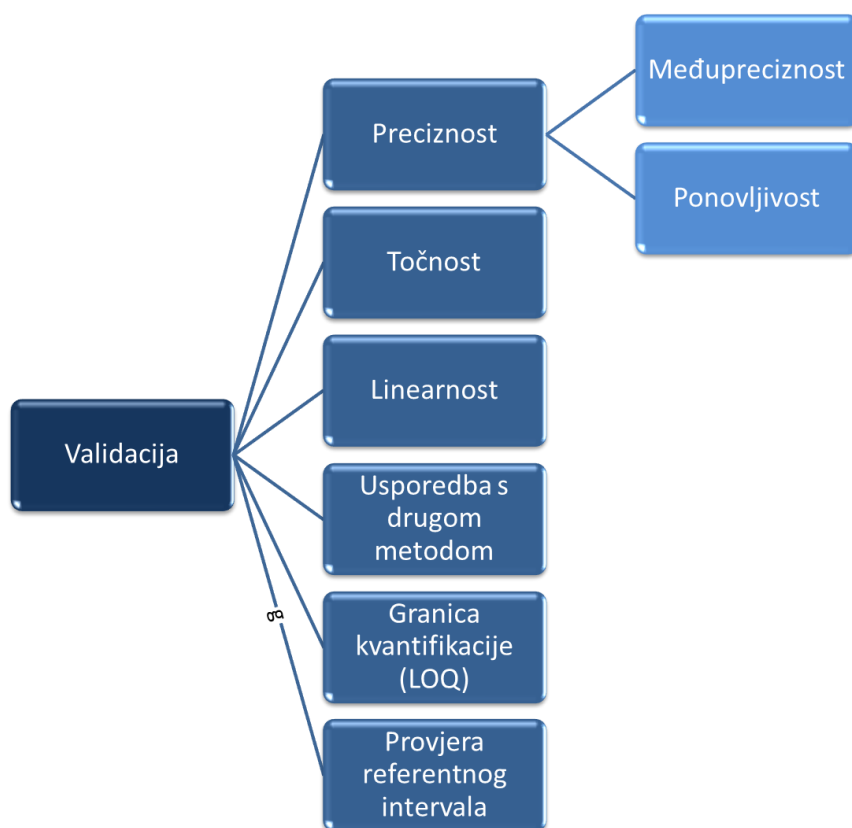
S obzirom na to da neka istraživanja (Badrack, 2013) upućuju na to da se više od 70% dijagnoza postavlja na temelju laboratorijskih nalaza a pogreške u vrijednostima mogu ugroziti zdravlje pa čak i život pacijenata, od iznimne je. Dobra laboratorijska praksa uključuje korištenje standardiziranih i preporučenih tj. referentnih metoda i tehnika. Ako laboratorij želi uvesti novu ili poboljšati staru metodu, metodu je potrebno procijeniti, provjeriti i potvrditi. Evaluacija obuhvaća procjenu metode dok se procesom validacije potvrđuje da je odabrana metoda prikladna za odgovarajuću namjenu. Svjetska zdravstvena organizacija opisuje validaciju kao postupak kojim se ispituje odgovara li metoda određenim zahtjevima te ostvaruje li odgovarajuće rezultate (WHO, 1999). Plan i proces validacije ovise o vrsti analitičke metode (kvantitativna, polukvantitativna, kvalitativna), namjeni metode u kliničkoj praksi, raspoloživosti i stabilnosti kontrolnih uzoraka. Najčešće se ispituju parametri kao što su preciznost, točnost, linearnost i granica detekcije/kvantifikacije, ali se moraju provjeriti i referentni intervali te napraviti usporedba s drugom metodom.

Tablica 1. Pojmovi i mjerenja u postupku validacije

Validacija (validation)	Ovjera da su specifični zahtjevi prikladni za utvrđenu uporabu
Ovjera (verification)	Osiguranje objektivnog dokaza da dani element zadovoljava utvrđene zahtjeve
Mjerna metoda (measurement method)	Opći opis smislene organizacije postupaka koji se upotrebljavaju u mjerenju
Mjerni postupak (measurement procedure)	Podroban opis mjerenja u skladu s jednim ili više mjernih načela i danom mjernom metodom, na temelju mjernog modela i uključujući svaki izračunkako bi se dobio mjerni rezultat
Referentni mjerni postupak (reference measurement procedure)	Mjerni postupak prihvaćen za osiguranje prikladnosti mjernih rezultata za njihovu namjeravanu uporabu u ocjeni istinitosti mjerenja vrijednosti mjerne veličine dobivenih iz drugih mjernih postupaka za veličine iste vrste ili u karakterizaciji referentnih tvari
Mjerna točnost (measurement accuracy)	Bliskost slaganja između izmjerene vrijednosti veličine i istinite vrijednosti mjerene veličine
Mjerna istinitost (measurement trueness)	Bliskost slaganja između prosječne vrijednosti beskonačna broja izmjerenih vrijednosti veličine dobivenih opetovanim mjerenjem referentne vrijednosti veličine
Mjerna preciznost (measurement precision)	Bliskost slaganja između pokazivanja ili izmjerenih vrijednosti veličine dobivenih opetovanim mjerenjem na istim ili sličnim predmetima pod utvrđenim uvjetima
Mjerna pogreška (measurement error)	Razlika između izmjerene vrijednosti veličine i referentne vrijednosti veličine
Sustavna mjerna pogreška (systematic measurement error)	Sastavnica mjerne pogreške koja pri opetovanim mjerenjima ostaje stalna ili se mijenja na predvidiv način
Slučajna mjerna pogreška (random measurement error)	Sastavnica mjerne pogreške koja se pri opetovanim mjerenjima mijenja na nepredvidiv način
Uvjet ponovljivosti mjerenja (repeatability condition of measurement)	Mjerni uvjet iz skupa uvjeta koji uključuje isti mjerni postupak, iste rukovoditelje, isti mjerni sustav, iste radne uvjete, isto mjesto i mjerenja koja se ponavljaju na istim ili sličnim predmetima u kraćem razdoblju
Mjerna ponovljivost (measurement repeatability)	Mjerna preciznost pod skupom uvjeta ponovljivosti mjerenja
Uvjet međupreciznosti mjerenja (intermediate precision condition of measurement)	Mjerni uvjet iz skupa uvjeta koji uključuje isti mjerni postupak, isto mjesto i mjerenja koja se ponavljaju na istim ili sličnim predmetima u duljem razdoblju, ali mogu uključivati i druge uvhete koji izazivaju promjene
Međupreciznost mjerenja (intermediate measurement)	Mjerna preciznost pod skupom uvjeta međupreciznosti mjerenja

precision)	
Uvjet obnovljivosti mjerenja (reproducibility condition of measurement)	Uvjet mjerenja iz skupa uvjeta koji uključuje različita mjesta, rukovatelje i mjerne sustave, i mjerenja opetovana na istim ili sličnim predmetima
Mjerna obnovljivost (measurement reproducibility)	Mjerna preciznost pod uvjetima obnovljivosti mjerenja

Preuzeto i prilagođeno iz Međunarodnog mjeriteljskog rječnika- osnovni i opći pojmovi i pridruženi nazivi (VIM), Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM) 200:2008, Izdavač Mirko Vuković, Državni zavod za mjeriteljstvo, Zagreb, 2008

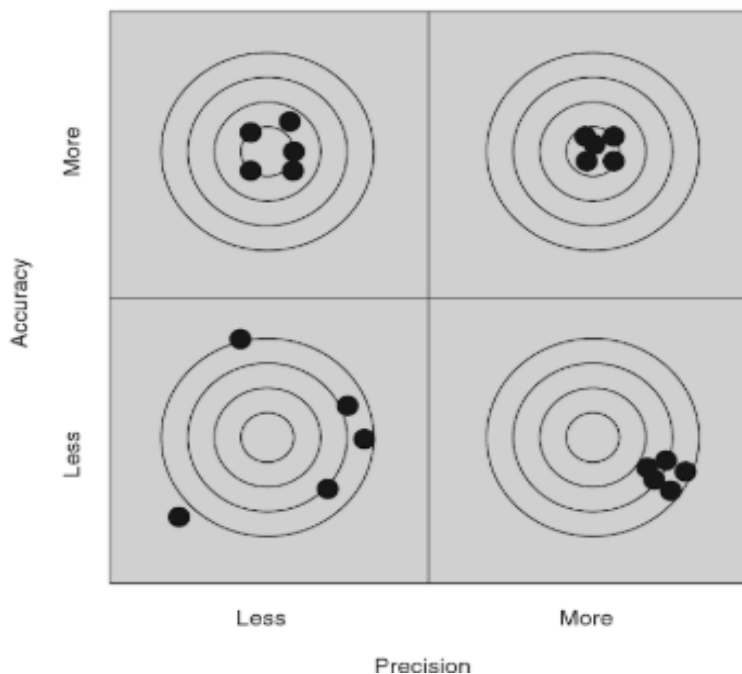


Slika 8. Parametri ispitivani u validaciji AAS za cink u serumu

1.5.1. Preciznost

Preciznost se definira kao bliskost slaganja između neovisnih rezultata mjerenja dobivenih u postavljenim uvjetima. Točnije bi bilo govoriti o nepreciznosti, te tako razlikujemo nepreciznost u seriji tj. ponovljivost i nepreciznost iz dana u dan tj. međupreciznost (Kubiak i Benbow, 2009). Ponovljivost govori o slaganju niza uzastopnih mjerenja odrađenih u identičnim, nepromijenjenim uvjetima dok međupreciznost ukazuje na bliskost slaganja u mjerenjima tijekom dužeg vremenskog razdoblja, pri čemu može doći do promjene u nekim

od uvjeta (promjena temperature, reagensa, analitičara, itd.). Preciznost ne govori o stvarnoj vrijednosti već samo ukazuje na distribuciju slučajne pogreške. Precizno mjerenje ne mora nužno biti i točno (slika 10).



Slika 9. Preciznost i točnost: gornja lijeva slika predstavlja neprecizne ali točne rezultate, gornja desna slika precizne i točne rezultate, donja lijeva slika neprecizne i netočne rezultate dok donja desna slika predstavlja precizne ali netočne rezultate. (Kubiak i Benbow, 2009)

1.5.2. Točnost

Točnost ili istinitost se definira kao odstupanje izmjerene vrijednosti i prave vrijednosti mjerene veličine te je mjera sustavne pogreške (engl. *bias*). Najčešće se prikazuje kao postotak odstupanja (% bias).

1.5.3. Granica kvantifikacije

Granica kvantifikacije (engl. *limit of quantification- LOQ*) se definira kao najniža koncentracija koja se može odrediti tj. kvantificirati s prihvatljivom preciznošću i točnošću.

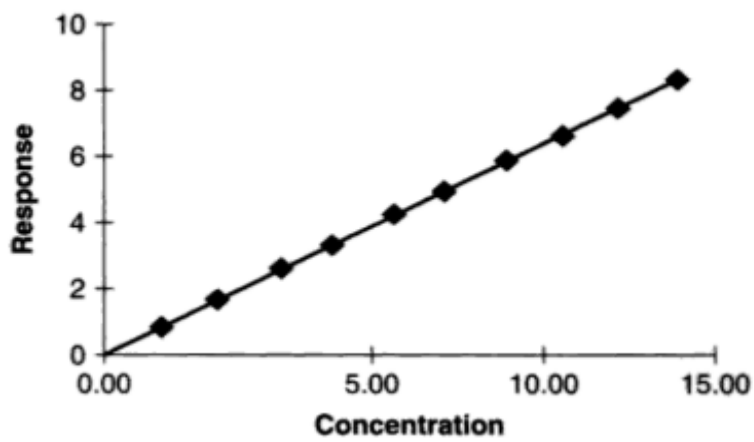
1.5.4. Usporedba dviju metoda

Najčešći razlog za uvođenje nove metode je neka njezina prednost (bolja osjetljivost, specifičnost, selektivnost, točnost...) u usporedbi s metodom koja je u trenutnoj uporabi. Usporedba 'stare' i 'nove' metode koje mjere isti analit je s toga važan dio validacijskog postupka koji za cilj ima dokazati slaganja u mjerenjima na oba analizatora. Za usporedbu se

najčešće primjenjuju Passing i Bablok te Bland i Altman analize kojima se dobivaju informacije o slaganjima ili eventualnim sustavnim pogreškama između 2 metode.

1.5.5. Linearnost

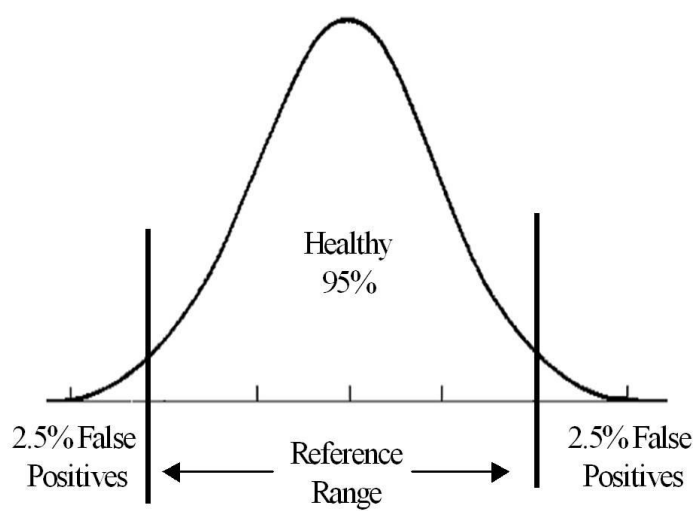
Linearnost se definira kao sposobnost analitičke metode da bez dodatnog razrjeđenja uzorka daje rezultate ispitivanja proporcionalne koncentraciji analita. Linearna povezanost između dvije varijable se može prikazati jednačbom pravca. Porastom vrijednosti na apscisi proporcionalno raste vrijednost na ordinati. (Ažman i sur., 2006)



Slika 10. Linearna ovisnost između različitih razrjeđenja uzorka i mjerenja (Chan i sur., 2004).

1.5.6. Provjera referentnog intervala

Referentni intervali su najčešće korišten alat u interpretiranju laboratorijskih mjerenja. Oni predstavljaju raspon vrijednosti nekog mjerenja kod zdravih osoba i koriste se kod odlučivanja da li je pacijent zdrav ili ima određenu bolest (Boyd, 2010). Čak 70% dijagnoza se postavlja na temelju laboratorijskih nalaza te je stoga bitno da su referentni intervali pažljivo definirani. Kod definiranja referentnih intervala za neku pretragu potrebno je odabrati dovoljno veliku skupinu zdravih ljudi (> 120) različite dobi, spola, i drugih parametara koji mogu utjecati na rezultate. Rezultati mjerenja se prikazu grafički pomoću Gaussove krivulje, koja se još naziva i normalna raspodjela. Definira se prag (eng. threshold) unutar kojeg pada 95% zdravih ispitanika što rezultira isključenjem njih 5% tj. 2,5% ispitanika s najnižim i 2,5% ispitanika s najvišim vrijednostima (slika 8).



Slika 11. Gaussova krivulja za određivanje referentnih intervala (Boyd, 2010)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Zagreb, cink u serumu se rutinski određuje kolorimetrijskom metodom na analizatoru Cobas 6000 c501. U laboratoriju je nabavljen novi uređaj za atomsku apsorpcijsku spektrofotometriju AA-7000 tvrtke Shimadzu na kojem je bilo potrebno postaviti metodu za određivanje cinka u serumu kao referentnu metodu za ovu pretragu. Stoga je cilj ovog rada bio validirati novi uređaj i metodu za mjerenje cinka u serumu. Kao dio postupka validacije provedena je:

Procjena preciznosti (ponovljivost i međupreciznost)

Procjena točnosti

Usporedba s drugom metodom (Cobas 6000 c501)

Procjena analitičke osjetljivosti (granica kvantifikacije, LOQ)

Procjena mjernog područja (linearnost)

Provjera referentnog intervala

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci biološkog materijala

U istraživanju su korišteni ostadni uzorci biološkog materijala (seruma) pacijenata koji su preostali nakon rutinske obrade i to:

- 20 uzoraka zdravih osoba za provjeru referentnih intervala. Odabrani ispitanici nisu bolovali od bolesti koje su povezane s metabolizmom cinka ili imaju utjecaja na vrijednosti cinka u serumu. Uzorci su uzorkovani u sterilne epruvete s podtlakom i sintetskom smolom, bez antikoagulansa.
- 40 uzoraka pacijenata, različite dobi i spola, odabrana tako da pokrivaju širok raspon referentnih i patoloških koncentracija cinka za usporedbu AA -7000 i Cobas 6000 c501 analizatora. Uzorci su uzorkovani u sterilne epruvete s podtlakom i sintetskom smolom, bez antikoagulansa. Antikoagulansi poput EDTA mogu interferirati s rezultatom mjerenja.

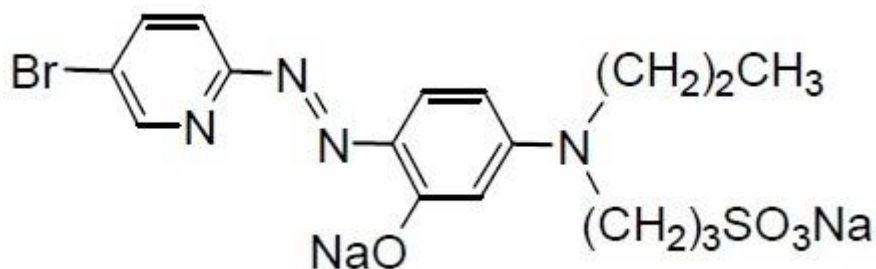
3.2. Reagensi, kalibratori, kontrole

- Matična otopina Zn za izradu kalibratora, 1000 mg/L Zn u 2 % HNO₃ (Proizvođač PerkinElmer)
- Kalibrator 1, konc. Zn 3,06 umol/L
- Kalibrator 2, konc. Zn 7,65 umol/L
- Kalibrator 3, konc. Zn 12,23 umol/L
- Kalibrator 4, konc. Zn 22,94 umol/L
- Kalibrator 5, konc. Zn 38,24 umol/L
- Komercijalni kontrolni uzorak, Randox level 2, konc. Zn 21,5 umol/L
- Komercijalni kontrolni uzorak, Randox level 3, konc. Zn 31,6 umol/L

3.3. Metode

3.3.1. Kolorimetrijsko određivanje cinka

Princip metode: cink iz uzorka (serum, plazma, urin ili likvor) se kelira s 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(N –propil-N-sulfopropilamino)-fenolom (Skrraćeno 5-Br-PAPS). Ova dinatrijeva sol s cinkom stvara crveni kompleks koji se mjeri kolorimetrijski na 560nm.



Slika 12. Struktura 5-Br-PAPS 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(N –propil-N-sulfopropilamino)-fenola (Preuzeto sa https://www.dojindo.com/Images/Product%20Photo/B026_fig1.jpg).

3.3.2. Određivanje cinka metodom atomske apsorpcijske spektrofotometrije

Princip metode objašnjen je u poglavlju 1.3.1.

3.4. Uređaji

3.4.1. Biokemijski analizator Cobas 6000 c501, Roche

3.4.2. Atomski apsorpcijski spektrofotometar AA – 7000, Shimadzu (slika 13.)



Slika 13. AAS AA-7000 proizvođača Shimadzu (Preuzeto sa https://www.researchgate.net/figure/Atomic-Absorption-Spectrophotometer-AA-7000-Flame-Model_fig2_284716673)

3.5. Postupak validacije

Postupak validacije za pretragu cinka u serumu na AA-7000 atomskom apsorpcijskom spektrofotometru proveden je u skladu s protokolom za validaciju vlastitih (in house), kvantitativnih, analitičkih metoda. Protokol je izrađen od strane ovlaštenih VSS djelatnika u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb (interni dokument OP-5.5-000-1).

3.5.1. Ispitivanje preciznosti

Tri uzorka različitih koncentracija (niske, srednje i visoke) analizirano je na AA-7000 atomskom apsorpcijskom spektrofotometru, u duplikatu, u seriji od 10 ponovljenih mjerenja. S obzirom na to da barem jedan uzorak mora imati koncentraciju blizu granice kvantifikacije, kao uzorak niske koncentracije korišten je kalibrator 1 sa koncentracijom cinka 3,06 umol/L. Kao uzorak srednje koncentracije korištena je kontrola Randox level 2 (koncentracija cinka 21,5 umol/L) a kao uzorak visoke koncentracije kontrola Randox level 3 (koncentracija cinka 31,6 umol/L). Uzorci su se nakon svakog odrađenog radnog dana pohranjivali na 4°C do idućeg jutra. Na temelju dobivenih rezultata određena je nepreciznost iz dana u dan (međupreciznost) te nepreciznost u seriji (ponovljivost) koje su izražene kroz standardnu devijaciju i koeficijent varijacije. Usporedbom dobivenih rezultata s dozvoljenim vrijednostima prema Westgard-u (www.westgard.com/biodatabase1.htm) donesena je odluka o preciznosti metode.

3.5.2. Ispitivanje točnosti

Koristeći srednje vrijednosti kontrolnih uzoraka dobivenih iz mjerenja ponovljivosti računski se odredi bias tj. sustavna pogreška. Usporedbom dobivenog rezultata sa deklariranim dopuštenim vrijednostima prema Westgard-u donesena je odluka o točnosti tj. istinitosti metode.

3.5.3. Ispitivanje analitičke osjetljivosti (granice kvantifikacije)

Uzorak najniže koncentracije, u ovom slučaju najniža točka kalibracijske krivulje tj. kalibrator 1 s deklariranom koncentracijom cinka 3,06 umol/L, analiziran je u duplikatu u 10 ponovljenih mjerenja. Koristeći rezultate mjerenja izračunata je standardna devijacija, koeficijent varijacije i bias koji moraju zadovoljiti kriterije definirane za preciznost i točnost prema Westgard-u kako bi se dokazala donja granica kvantifikacije.

3.5.4. Usporedba dviju metoda

Usporedba dvije metode je važan dio validacijskog postupka kojemu je cilj dokazati slaganja i eventualne sustavne pogreške između dvije metode. Uzorci 40 pacijenata različite dobi i spola su analizirani na Cobas 6000 c501 analizatoru a netom kasnije i na AA-7000 atomskom apsorpcijskom spektrofotometru. Uzorci su odabrani tako da pokrivaju širok raspon referentnih ali i patoloških koncentracija cinka te su zbog mogućih interferencija isključeni lipemični, ikterični i hemolizirani uzorci. Vremenski razmak u mjerenju na dva različita analizatora bio je do 4 sata te su mjerenja izvršena tijekom 5 radnih dana.

3.5.5. Ispitivanje linearnosti

Kod ispitivanja mjernog područja za metode čiji je odnos između mjernog signala i koncentracije analita linearan potrebno je u definiranom rasponu odrediti 5 koncentracija u 3-6 ponovljenih mjerenja. Ako odnos nije linearan potrebno je više točaka za određivanje kalibracijske krivulje. S obzirom na linearan odnos, u ovom su slučaju, uzorci kalibratora 1,2,3,4 i 5 s relativnim koncentracijama 3,06 umol/L, 7,65 umol/L, 12,23 umol/L, 22,94 umol/L, te 38,24 umol/L analizirani u triplikatu u 5 ponovljenih mjerenja. Iz izmjerenih vrijednosti izračunate su srednje vrijednosti za svako od 5 mjerenja koje su potom vizualno uspoređene s deklariranim vrijednostima putem linijskog grafikona. Izračunata je jednadžba pravca, nagib, odsječak i koeficijent korelacije koji mora biti $r > 0,990$ kako bi se dokazala linearnost metode.

3.5.6. Provjera referentnih intervala

Prema internom dokumentu OP-5.5-000-1/5 ako su referentni intervali preuzeti iz literature potrebno je deklarirane vrijednosti ispitati na 20 zdravih pacijenata različite dobi i spola. U ovom ispitivanju se na AA-700 analizatoru odredila koncentracija cinka u 20 uzoraka te su se dobivene vrijednosti potom grafički prikazale pomoću Gausove krivulje. Iz krivulje se odredio prag (eng. *threshold*) unutar kojeg pada 95% zdravih ispitanika što rezultira isključenjem njih 5%, tj. 2,5% ispitanika s najnižim i 2,5% ispitanika s najvišim vrijednostima. Smatra se da su deklarirani referentni intervali ispravni ako i niža i viša referentna vrijednost padaju unutar praga od 95%.

3.6. Statistička obrada

Za statističku obradu rezultata korišteni su program Microsoft Office Excel 2010 i statistički softver Med Calc.

Microsoft Office Excel 2010 je korišten za obradu rezultata preciznosti, točnosti i granice kvantifikacije te za provjeru linearnosti.

Za statističku obradu rezultata usporedbe metode AAS na AA-7000 s kolorimetrijskom metodom na Cobas 6000-c501 te za provjeru referentnih intervala korišten je Med Calc program i to Passing i Bablok te Bland i Altman analize kojima se dobivaju informacije o slaganju dvije metode i mogućoj sistemskoj pogrešci između njih (Bilić-Zulle, 2011). Passing i Bablok analiza daje točkasti dijagram s pravcem regresije i jednadžbom pravca gdje odsječak ukazuje na konstantno, a nagib pravca na proporcionalno odstupanje u mjerenjima. Točke koje jako odskaču na grafičkom prikazu ukazuju na moguću nelinearnost tj. neslaganje

između mjerenja putem dvije metode. Alternativni izbor za usporedbu dvije metode je često Bland i Altman analiza koja daje manje robustan razlikovni dijagram (engl. *Difference plot*). Ovakav dijagram koji nije prikladan za ponavljana mjerenja prikazuje odnos između neproporcionalnih razlika u mjerenju na dva analizatora (na ordinati) te vrijednosti mjerenja na referentnom analizatoru koji je u ovom slučaju AAS (na apscisi) (Giavarinan, 2015).

3.6.1. Jednadžbe

Jednadžbe za međupreciznost (Galjanić i sur., 2010)

$$SD = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + (x_3 - \bar{x})^3 \dots + (x_n - \bar{x})^2}{n}}$$

$$\bar{\bar{x}} = \frac{\bar{x}_1 + \bar{x}_2 + \bar{x}_3 \dots \bar{x}_n}{n}$$

$$Sb = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D (\bar{\bar{x}} - \bar{x})^2}{D-1}}$$

$$CV \% = 100 \times \frac{Sb}{\bar{\bar{x}}}$$

Jednadžbe za izračunavanje ponovljivosti

$$SD = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + (x_3 - \bar{x})^3 \dots + (x_n - \bar{x})^2}{n}}$$

$$\bar{\bar{x}} = \frac{\bar{x}_1 + \bar{x}_2 + \bar{x}_3 \dots \bar{x}_n}{n}$$

$$Sr = \sqrt{\frac{sd_1^2 + sd_2^2 + sd_3^2 \dots + sdn^2}{n}}$$

$$CV \% = 100 \times \frac{Sr}{\bar{\bar{x}}}$$

Jednadžbe za izračunavanje točnosti

$$\bar{\bar{x}} = \frac{\bar{x}_1 + \bar{x}_2 + \bar{x}_3 \dots \bar{x}_n}{n}$$

$$BIAS = \bar{\bar{x}} - true\ value$$

$$\% BIAS = 100 \times \frac{bias}{true\ value} = 100 \times \frac{(\bar{\bar{x}} - true\ value)}{true\ value}$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Ispitivanje preciznosti

4.1.1. Međupreciznost

Tablica 2. Rezultati ispitivanja međupreciznosti za uzorak s niskom koncentracijom cinka na AA-7000 analizatoru.

KALIBRATOR KAL 1 (Prava vrijednost 3,06 umol/L)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. mjerenje (umol/L)	3,04	3,07	3,04	3,09	3,08	3,01	3,06	3,02	3,05	3,03
2. mjerenje (umol/L)	3,06	3,07	3,01	3,07	3,05	2,98	3,09	3,00	3,09	3,04
\bar{x}_d (umol/L)	3,050	3,070	3,025	3,080	3,065	2,995	3,075	3,010	3,070	3,035
Sd	0,010	0,000	0,015	0,010	0,015	0,015	0,015	0,010	0,020	0,005
\bar{x} (umol/L)	3,048									
Sb	0,030									
CV (%)	0,098%									

Tablica 3. Rezultati ispitivanja međupreciznosti za uzorak sa srednjom koncentracijom cinka na AA-7000 analizatoru.

KONTROLA- RANDOX LEVEL 2 (Prava vrijednost 21,5 umol/L)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. mjerenje (umol/L)	21,85	21,49	22,02	21,99	21,03	21,17	22,05	21,60	22,02	21,75
2. mjerenje (umol/L)	21,74	21,59	21,89	21,77	21,32	21,33	21,97	21,65	21,90	21,56
\bar{x}_d (umol/L)	21,795	21,540	21,955	21,880	21,175	21,250	22,010	21,625	21,960	21,655
Sd	0,055	0,050	0,065	0,110	0,145	0,080	0,040	0,025	0,060	0,095
\bar{x} (umol/L)	21,685									
Sb	0,779									
CV (%)	3,593%									

Tablica 4. Rezultati ispitivanja međupreciznosti za uzorak s visokom koncentracijom cinka na AA-7000 analizatoru.

KONTROLA- RANDOX LEVEL 3 (Prava vrijednost 31,6 umol/L)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. mjerenje (umol/L)	31,43	32,04	31,49	31,30	32,04	31,94	31,62	31,98	31,24	31,97
2. mjerenje (umol/L)	31,20	31,94	31,51	31,56	31,88	31,68	31,83	31,72	31,45	31,70
\bar{x}_d (umol/L)	31,315	31,990	31,500	31,430	31,960	31,810	31,725	31,850	31,345	31,835
Sd	0,115	0,050	0,010	0,130	0,080	0,130	0,105	0,130	0,105	0,135
\bar{x} (umol/L)	31,676									
Sb	0,587									
CV (%)	1,853%									

4.1.2. Ponovljivost

Tablica 5. Rezultati ispitivanja ponovljivosti za uzorak s niskom koncentracijom cinka na AA-7000 analizatoru.

KALIBRATOR KAL 1 (Prava vrijednost 3,06 umol/L)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. mjerenje (umol/L)	3,04	3,07	3,04	3,09	3,08	3,01	3,06	3,02	3,05	3,03
2. mjerenje (umol/L)	3,06	3,07	3,01	3,07	3,05	2,98	3,09	3,00	3,09	3,04
\bar{x}_d (umol/L)	3,050	3,070	3,025	3,080	3,065	2,995	3,075	3,010	3,070	3,035
Sd	0,010	0,000	0,015	0,010	0,015	0,015	0,015	0,010	0,020	0,005
\bar{x} (umol/L)	3,048									
Sr	0,107									
CV (%)	3,518%									

Tablica 6. Rezultati ispitivanja ponovljivosti za uzorak sa srednjom koncentracijom cinka na AA-7000 analizatoru

KONTROLA- RANDOX LEVEL 2 (Prava vrijednost 21,5 umol/L)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. mjerenje (umol/L)	21,85	21,49	22,02	21,99	21,03	21,17	22,05	21,60	22,02	21,75
2. mjerenje (umol/L)	21,74	21,59	21,89	21,77	21,32	21,33	21,97	21,65	21,90	21,56
\bar{x}_d (umol/L)	21,795	21,540	21,955	21,880	21,175	21,250	22,010	21,625	21,960	21,655
Sd	0,055	0,050	0,065	0,110	0,145	0,080	0,040	0,025	0,060	0,095
\bar{x} (umol/L)	21,685									
Sr	0,269									
CV (%)	1,242%									

Tablica 7. Rezultati ispitivanja ponovljivosti za uzorak s visokom koncentracijom cinka na AA-7000 analizatoru

KONTROLA- RANDOX LEVEL 3 (Prava vrijednost 31,6 umol/L)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. mjerenje (umol/L)	31,43	32,04	31,49	31,30	32,04	31,94	31,62	31,98	31,24	31,97
2. mjerenje (umol/L)	31,20	31,94	31,51	31,56	31,88	31,68	31,83	31,72	31,45	31,70
\bar{x}_d (umol/L)	31,315	31,990	31,500	31,430	31,960	31,810	31,725	31,850	31,345	31,835
Sd	0,115	0,050	0,010	0,130	0,080	0,130	0,105	0,130	0,105	0,135
\bar{x} (umol/L)	31,676									
Sr	0,315									
CV (%)	0,993%									

4.2. Ispitivanje točnosti

Tablica 8. Rezultati ispitivanja točnosti (istinitosti) za uzorak s niskom koncentracijom cinka na AA-7000 analizatoru

KALIBRATOR KAL 1 (Prava vrijednost 3,06 umol/L)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. mjerenje (umol/L)	3,04	3,07	3,04	3,09	3,08	3,01	3,06	3,02	3,05	3,03
2. mjerenje (umol/L)	3,06	3,07	3,01	3,07	3,05	2,98	3,09	3,00	3,09	3,04
\bar{x}_d (umol/L)	3,050	3,070	3,025	3,080	3,065	2,995	3,075	3,010	3,070	3,035
Sd	0,010	0,000	0,015	0,010	0,015	0,015	0,015	0,010	0,020	0,005
\bar{x} (umol/L)	3,048									
Bias	0,012									
% Bias	0,392%									

Tablica 9. Rezultati ispitivanja točnosti (istinitosti) za uzorak sa srednjom koncentracijom cinka na AA-7000 analizatoru

KONTROLA- RANDOX LEVEL 2 (Prava vrijednost 21,5 umol/L)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. mjerenje (umol/L)	21,85	21,49	22,02	21,99	21,03	21,17	22,05	21,60	22,02	21,75
2. mjerenje (umol/L)	21,74	21,59	21,89	21,77	21,32	21,33	21,97	21,65	21,90	21,56
\bar{x}_d (umol/L)	21,795	21,540	21,955	21,880	21,175	21,250	22,010	21,625	21,960	21,655
Sd	0,055	0,050	0,065	0,110	0,145	0,080	0,040	0,025	0,060	0,095
\bar{x} (umol/L)	21,685									
Bias	0,185									
%Bias	0,860%									

Tablica 10. Rezultati ispitivanja točnosti (istinitosti) za uzorak s visokom koncentracijom cinka na AA-7000 analizatoru

KONTROLA- RANDOX LEVEL 3 (Prava vrijednost 31,6 umol/L)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. mjerenje (umol/L)	31,43	32,04	31,49	31,30	32,04	31,94	31,62	31,98	31,24	31,97
2. mjerenje (umol/L)	31,20	31,94	31,51	31,56	31,88	31,68	31,83	31,72	31,45	31,70
\bar{x}_d (umol/L)	31,315	31,990	31,500	31,430	31,960	31,810	31,725	31,850	31,345	31,835
Sd	0,115	0,050	0,010	0,130	0,080	0,130	0,105	0,130	0,105	0,135
\bar{x} (umol/L)	31,676									
Bias	0,076									
% Bias	0,241%									

4.3. Dokazivanje donje granice kvantifikacije

Tablica 11. Rezultati ispitivanja donje granice kvantifikacije za uzorak s najnižom koncentracijom cinka (najniža točka kalibracijske krivulje)

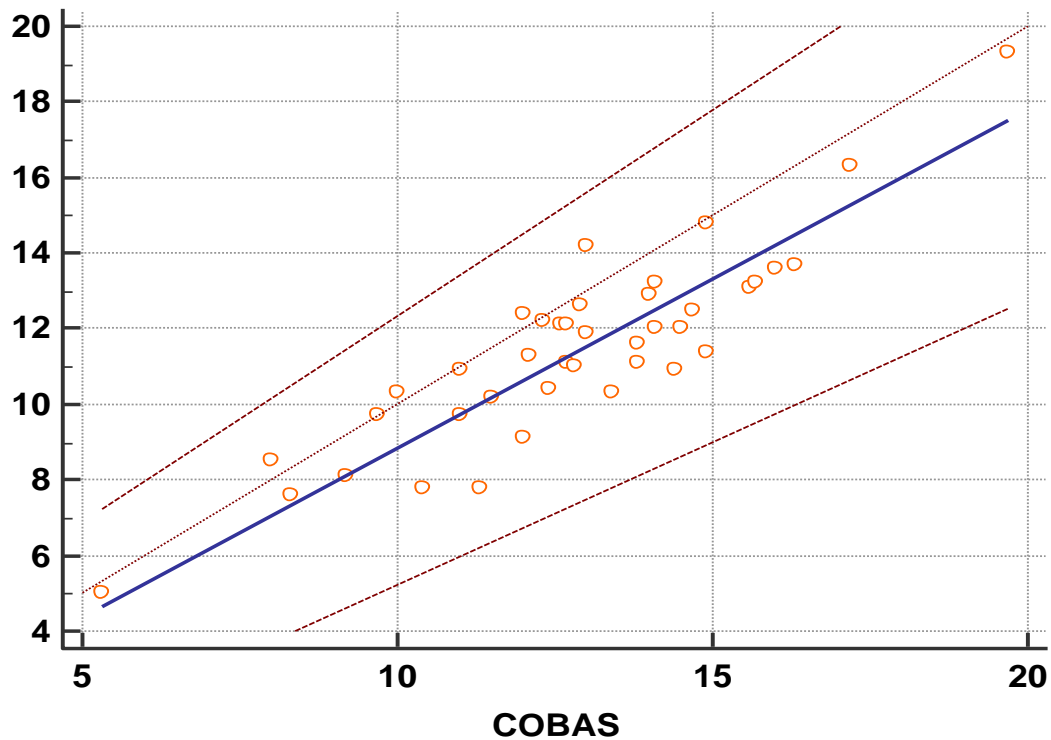
Ponavljanje	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. mjerenje (umol/L)	3,09	3,07	3,01	3,01	3,02	3,06	3,05	3,05	3,06	3,03
2. mjerenje (umol/L)	3,05	3,08	3,06	3,04	3,02	3,09	3,04	3,08	3,02	3,08
\bar{x} (umol/L)	3,070	3,075	3,035	3,025	3,020	3,075	3,045	3,065	3,040	3,055
Sd	0,020	0,005	0,025	0,015	0,000	0,015	0,005	0,015	0,020	0,025
$\bar{\bar{x}}$ (umol/L)	3,051									
Sr	0,120									
CV	3,95%									
Prava Vrijednost (umol/L)	3,06									
Bias	0,009									
% Bias	0,294%									

4.4. Usporedba dviju metoda

Tablica 12. Rezultati mjerenja cinka u serumu metodom AAS na AA - 7000 i kolorimetrijskom metodom na Cobas 6000 c501

REDNI BROJ	DATUM	IME I PREZIME	DOB (godine)	SPOL	AAS (umol/L)	COBAS (umol/L)
1	10.4.2018	Ž.J.	59	Ž	16,3	17,2
2	10.4.2018	M.K.	43	Ž	11,4	14,9
3	10.4.2018	B.U.	44	Ž	10,3	13,4
4	10.4.2018	J.Z-F.	43	M	9,1	12,0
5	11.4.2018	M.M.	22	Ž	13,1	15,6
6	12.4.2018	M.B.	74	Ž	7,8	10,4
7	12.4.2018	B.B.	18	M	10,4	12,4
8	13.4.2018	M.G.	74	Ž	12,0	14,1
9	13.4.2018	D.K.	30	Ž	13,6	16,0
10	17.4.2018	A.R-Ć.	43	Ž	8,5	8,0
11	18.4.2018	A.K.	12	M	11,6	13,8
12	18.4.2018	N.Š.	30	Ž	11,1	12,7
13	18.4.2018	J.Z.	64	M	12,0	14,5
14	23.4.2018	F.C.	73	Ž	12,6	12,9
15	23.4.2018	B.C.	56	Ž	11,1	13,8

16	23.4.2018	D.S.	51	Ž	10,9	14,4
17	24.4.2018	V.B.	24	M	12,2	12,3
18	24.4.2018	I.K.	68	M	14,8	14,9
19	24.4.2018	G.P.	58	Ž	14,2	13,0
20	9.5.2018	A.M.	82	Ž	5,0	5,3
21	10.5.2018	A.B.	48	Ž	19,3	19,7
22	15.5.2018	J.B.	62	M	12,9	14,0
23	15.5.2018	A.K.	20	Ž	10,2	11,5
24	15.5.2028	J.L.	32	Ž	11,0	12,8
25	15.5.2018	D.M.	66	M	8,1	9,2
26	16.5.2018	H.B.	37	M	12,5	14,7
27	16.5.2018	V.T.	30	Ž	13,2	15,7
28	21.5.2018	B.N.	49	M	7,8	11,3
29	22.5.2018	R.A.	57	Ž	10,3	10,0
30	22.5.2018	Z.Č.	37	Ž	12,4	12,0
31	22.5.2018	A.R-Đ.	57	Ž	10,9	11,0
32	22.5.2018	J.S.	57	Ž	7,6	8,3
33	22.5.2018	K.Š.	10	Ž	9,7	9,7
34	23.5.2018	V.Đ.	49	Ž	12,1	12,6
35	23.5.2018	I.H.	68	Ž	9,7	11,0
36	23.5.2018	P.P.	8 Mj	Ž	11,3	12,1
37	23.5.2018	M.P.	21	M	13,7	16,3
38	23.5.2018	L.S.	5	M	11,9	13,0
39	23.5.2018	M.V.	41	M	13,2	14,1
40	23.5.2018	M.Ž.	74	M	12,1	12,7



Slika 14. Passing - Bablokovska regresijska analiza. Na apscisi su prikazane vrijednosti koncentracije cinka u serumu izmjerene na starom analizatoru (Cobas 6000 c501) a na ordinati vrijednosti koncentracije cinka u serumu izmjerene na novom AA – 7000 analizatoru.

Broj uzoraka= 40

Jednadžba pravca= $y = -0,124675 + 0,896104x$

Odsječak na ordinati= 0,1247

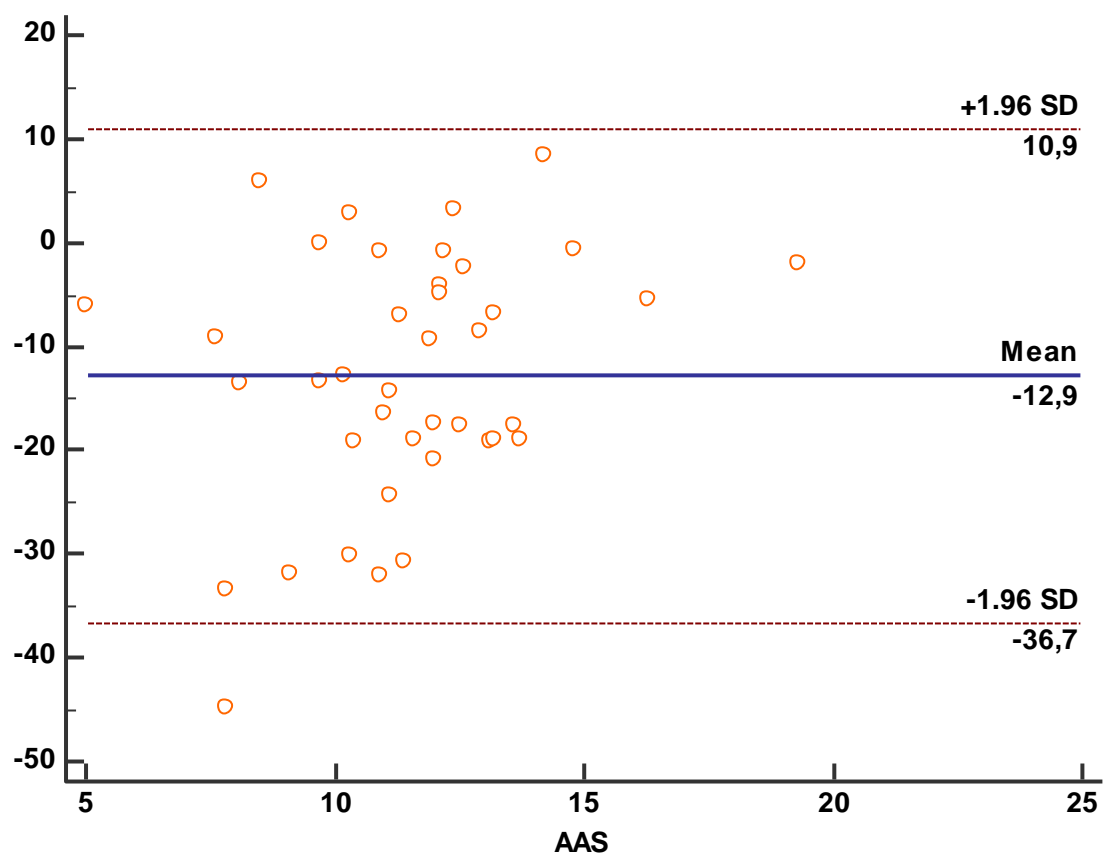
95% CI= -2,3591 do 1,4324

Nagib pravca= 0,8961

95% CI= 0,7568 do 1,0909

P (CUSUM test linearnosti)= 0,8 → Nema odstupanja od linearnosti jer je 0,8 >> 0,05

pa se nul hipoteza odbacuje

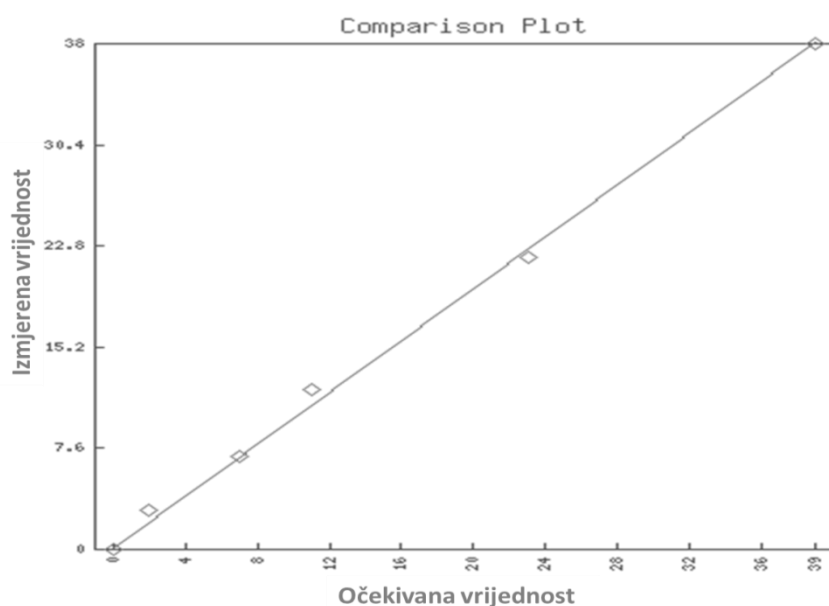


Slika 15. Bland- Altmanov grafikon za usporedbu dvije metode. Na apscisi su prikazane vrijednosti mjerenja dobivena na novom, AA - 7000, analizatoru a na ordinati je prikazana razlika u mjerenjima dobivenim na AAS i Cobas analizatorima.

4.5. Ispitivanje linearnosti

Tablica 13. Rezultati ispitivanja linearnosti AAS metode za određivanje cinka u serumu

	Kal. 1	Kal. 2	Kal. 3	Kal. 4	Kal. 5
1. mjerenje	3,09	7,90	11,90	22,98	38,70
2. mjerenje	3,05	7,78	12,17	23,21	38,57
3. mjerenje	3,02	7,81	12,03	22,90	38,38
\bar{x}_d (umol/L)	3,053	7,830	12,033	23,030	38,550
Sd	0,029	0,051	0,110	0,131	0,131
Očekivana vrijednost	3,06	7,65	12,23	22,94	38,24
Bias	0,007	0,18	0,197	0,09	0,31
Bias (%)	0,229%	2,353%	1,611%	0,039%	0,811%



Slika 16. Grafička usporedba očekivanih i izmjerenih vrijednosti za analizu cinka u serumu na AA - 7000 analizatoru. Na apscisi su prikazane deklarirane vrijednosti 5 kalibratora a na ordinati izmjerene vrijednosti na AAS uređaju.

$$\text{Jednadžba pravca} = y = 0,26 + 0,9442x$$

$$\text{Odsječak na ordinati} = 0,26$$

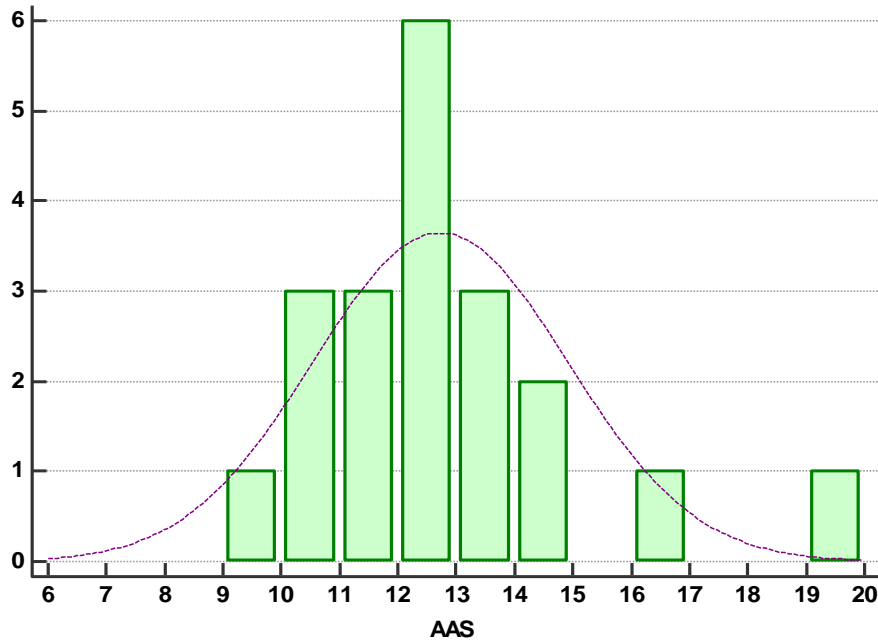
$$\text{Nagib pravca} = 0,9442$$

$$r = 0,9991$$

4.6. Provjera referentnih intervala

Tablica 14. Provjera referentnih intervala za analizu cinka u serumu AAS metodom.

Broj uzorka	Datum	Ime i prezime	Dob (godine)	Spol	AAS (umol/L)
1	10.04.2018	Ž.J.	59	Ž	16,3
2	11.4.2018	M.M.	22	Ž	13,1
3	13.4.2018	D.K.	30	Ž	13,6
4	18.4.2018	A.K.	12	M	11,6
5	18.4.2018	J.Z.	64	M	12,0
6	23.4.2018	F.C.	73	Ž	12,6
7	23.4.2018	D.S.	51	Ž	10,9
8	24.4.2018	V.B.	24	M	12,2
9	24.4.2018	I.K.	68	M	14,8
10	24.4.2018	G.P.	58	Ž	14,2
11	10.5.2018	A.B.	48	Ž	19,3
12	22.5.2018	R.A.	57	Ž	10,3
13	22.5.2018	Z.Č.	37	Ž	12,4
14	22.5.2018	A.R-Đ.	57	Ž	10,9
15	22.5.2018	K.Š.	10	Ž	9,7
16	23.5.2018	V.Đ.	49	Ž	12,1
17	23.5.2018	P.P.	8 Mj	Ž	11,3
18	23.5.2018	L.S.	5	M	11,9
19	23.5.2018	M.V.	41	M	13,2
20	23.5.2018	M.Ž.	74	M	12,1



Slika 17. Gaussova krivulja koja prikazuje normalnu raspodjelu vrijednosti cinka u serumu za 20 zdravih pacijenata

Donja granica= 8,4357

95% CI= 7,0173 do 9,9541

Gornja granica= 17,0143

95% CI= 15,5959 do 18,4327

4.7. Rasprava

Kada laboratorij želi u rutinski rad uvesti novu ili poboljšati staru metodu, metodu je potrebno evaluirati i validirati. Validacija je postupak kojim se ispituje odgovara li metoda određenim zahtjevima te ostvaruje li odgovarajuće rezultate (WHO, 1999).

U ovom radu je validirana metoda za određivanje cinka u krvi na novom atomskom apsorpcijskom spektrofotometru AA – 7000 tvrtke Shimadzu. Postupak validacije obuhvatio je ispitivanje preciznosti, istinitosti, granice kvantifikacije i linearnosti, usporedbu s dosad korištenom metodom i provjeru deklariranih referentnih intervala. Postupak validacije je proveden je u skladu s protokolom za validaciju vlastitih (in house) metoda (OP-5.5-000-1).

Za analizu cinka u serumu, kriterij prihvatljivosti za nepreciznost prema Westgardu je 4,7%. Za analizu preciznosti analizirana su 3 uzorka s niskom, srednjom i visokom koncentracijom cinka u duplikatu tijekom 10 dana. Koristeći jednadžbe navedene u poglavlju

3.6.1. i rezultate prikazane u tablicama 2 – 7 izračunata je međupreciznost i ponovljivost za svaki od odabrana tri uzorka. Kao uzorak niske koncentracije cinka odabran je kalibrator 1 (konc. 3,06 umol/L). Izračunata međupreciznost iznosi 0,098% a izračunata ponovljivost 3,518%. Kao uzorak srednje koncentracije cinka odabran je komercijalni kontrolni uzorak, Randox level 2 (konc. 21,5 umol/L). Izračunata međupreciznost iznosi 3,593% a izračunata ponovljivost 1,242%. Kao uzorak visoke konc. cinka odabran je komercijalni kontrolni uzorak, Randox level 3 (konc. 31,6 umol/L). Izračunata međupreciznost iznosi 1,853% a izračunata ponovljivost 0,993%. Koeficijent varijacije za međupreciznost i ponovljivost, za svaki od tri odabrana uzorka, zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti koji prema Westgardu iznosi do 4,7%, te se može zaključiti da AA – 7000 analizator daje precizne rezultate mjerenja cinka u serumu.

Koristeći rezultate dobivene za ispitivanje ponovljivosti i jednakžbe iz poglavlja 3.6.1. izračunata je sustavna pogreška tj. bias za svaki od odabrana 3 uzorka (tablice 8 – 10). Kriterij prihvatljivosti za bias, prema Westgardu iznosi do 3,3%. Izračunati bias za kalibrator 1 je 0,392%, za Randox level 2 komercijalnu kontrolu 0,860% a za Randox level 3 kontrolu 0,241%. Dobivene vrijednosti biasa su unutar kriterija prihvatljivosti pa se može zaključiti da uz precizna, analizator AA – 7000 daje i točna mjerenja cinka u serumu.

Za ispitivanje donje granice kvantifikacije (najniža koncentracija analita koja se može odrediti s pouzdanom točnošću i preciznošću), analizirana je najniža točka kalibracijske krivulje tj. kalibrator 1 s koncentracijom cinka 3,06 umol/L u duplikatu u 10 ponovljenih mjerenja (Tablica 11). Koristeći rezultate mjerenja izračunata je nepreciznost te sustavna pogreška tj. bias. Izmjerena nepreciznost za uzorak najniže koncentracije cinka iznosi 3,947% te je unutar kriterija prihvatljivosti do 4,7%. Odstupanje izmjerenih vrijednosti od očekivane vrijednosti iznosi 0,294% te je unutar kriterija prihvatljivosti do 3,3%. Na temelju rezultata može se zaključiti da se na analizatoru AA – 7000 mogu pouzdano odrediti koncentracije cinka u serumu $\geq 3,06$ umol/L

Kako bi se utvrdilo slaganje između AAS i kolorimetrijske metode analizirano je 40 uzoraka pacijenata različitih dobi i spola, sa širokim rasponom koncentracije cinka, pomoću obje metode unutar 5 radnih dana. Rezultati su uspoređeni koristeći MedCalc statistički program tj. Paasing i Bablok (Slika 14) te Bland i Altman (Slika 15) analize. Ako ne postoji statistički značajna razlika između dvije metode, odsječak na ordinati je 0 a nagib pravca je 1. U praksi se međutim koriste 95%-tni intervali pouzdanosti (engl. *95% confidence interval*).

Kada bi se istraživanje ponovilo više puta, u 95% slučajeva bi prava ili prosječna vrijednost bila unutar ovog intervala. Kako bi se sa sigurnošću potvrdilo slaganje između 2 metode vrijednosti 0 i 1 za odsječak na ordinati i nagib pravca moraju biti unutar 95%-tnih intervala pouzdanosti. Ako nula nije unutar 95% CI, za odsječak na ordinati postoji konstantna razlika u metodama, a ukoliko vrijednost 1 nije unutar 95% CI za nagib pravca postoji proporcionalno odstupanje. U ovom su istraživanju navedeni kriteriji zadovoljeni. 95% CI za odsječak na ordinati je -2,3591 do 1,4324 što uključuje nulu, a 95% CI za nagib pravca je 0,7568 do 1,0909 što uključuje vrijednost 1. Stoga se može zaključiti da ne postoji konstantna ali ni proporcionalna razlika između dvije metode. Bland i Altman analiza daje manje robustan razlikovni dijagram. 95% CI srednje razlike sadrži nulu pa se ovom analizom može dodatno potvrditi da ne postoji statistički značajna razlika između kolorimetrijske metode i metode AAS za mjerenje cinka u serumu.

Za ispitivanje linearnosti analizirano je pet kalibratora različitih koncentracija, u triplikatu u pet ponovljenih mjerenja (Tablica 13). Rezultati su se, koristeći Med Calc statistički program, vizualno usporedili sa deklariranim vrijednostima putem linijskog grafikona (Slika 16) iz kojeg se izračunao koeficijent korelacije koji u ovom slučaju iznosi 0,9991. S obzirom da je $r > 0,990$ dokazana je linearnost metode. Analizator AA – 7000 daje rezultate mjerenja proporcionalne koncentraciji analita bez dodatnog razrjeđenja uzorka.

Za provjeru referentnih intervala, analizirano je 20 uzoraka zdravih pacijenata (Tablica 14). U MedCalc statističkom programu je iz dobivenih vrijednosti derivirana Gaussova krivulja (Slika 17) sa naznačenim pragom (eng. threshold) unutar kojeg pada 95% zdravih pacijenata. 95% CI za donju granicu RI je 7,0173- 9,9541 a za gornju granicu RI je 15,5959 - 18,4327 $\mu\text{mol/L}$. Referentni interval za cink u serumu je 9,9 – 17,9 $\mu\text{mol/L}$. Gornja i donja referentna vrijednost se nalaze unutar 95% CI te se na temelju rezultata mogu potvrditi referentni intervali. Prema tome, metoda AAS na analizatoru AA-7000 daje rezultate mjerenja cinka u serumu kod zdravih osoba unutar deklariranih referentnih intervala.

Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je da parametri validacije zadovoljavaju kriterije prihvatljivosti te se atomski apsorpcijski spektrofotometar AA – 7000 može uvesti u rutinsku primjenu za analizu koncentracije cinka u serumu.

5. ZAKLJUČCI

1. Nepreciznost (u seriji te iz dana u dan) analizatora AA – 7000 analizatora za određivanje cinka u serumu u skladu je s kriterijima prihvatljivosti prema Westgardu. Dokazana je prihvatljiva bliskost slaganja između neovisnih rezultata mjerenja dobivenih u određenim uvjetima
2. Sustavna pogreška tj. bias za određivanje cinka u serumu na analizatoru AA – 7000 u skladu je s kriterijima prihvatljivosti prema Westgardu. Odstupanja izmjerenih vrijednosti od pravih vrijednosti su minimalna te je dokazana točnost tj. istinitost metode.
3. Najniža koncentracija cinka u serumu tj. najniža točka kalibracijske krivulje određena je s prihvatljivom preciznošću i točnošću. Dokazana je donja granica kvantifikacije te se koncentracije cinka do 3,06 umol/L mogu pouzdano određivati na analizatoru AA – 7000.
4. Usporedbom rezultata dobivenih mjerenjem cinka na analizatoru AA – 7000 s rezultatima mjerenja cinka na analizatoru Cobas 6000 c501 te statističkom obradom podataka ustanovljeno je da ne postoje konstantne niti proporcionalne razlike između dvije navedene metode. Rezultati mjerenja cinka u serumu pacijenata različitih dobi i spola na oba analizatora mogu se smatrati jednakim
5. Grafičkom usporedbom dobivenih i očekivanih vrijednosti za pet kalibratora dokazana je linearnost metode. AA – 7000 analizator daje rezultate ispitivanja proporcionalne koncentraciji analita bez dodatnog razrjeđenja uzorka.
6. Određivanjem cinka u serumu 20 zdravih pacijenata te statističkom analizom rezultata mogu se potvrditi referentni intervali za cink u serumu (9,9 – 17,9 umol/L).
7. Svi parametri validacije zadovoljavaju kriterije prihvatljivosti te se atomski apsorpcijski spektrofotometar AA – 7000 može uvesti u rutinsku primjenu za analizu koncentracije cinka u serumu.

6. LITERATURA

Ažman J, Frković V, Bilić-Zulle L, Petrovečki M. Korelacija i regresija. *Acta Medica Croatica*, 2006, 60, 81-93.

Badrick T. Evidence-Based Laboratory Medicine. *The Clinical Biochemist Reviews*, 2013.

Beatty RD, Kerber JD. Concepts, Instrumentation, and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry. Perkin-Elmer Corporation, 1993.

Bilić-Zulle L. Comparison of method: Passing and Bablok regression. *Biochemia Medica*, 2011, 21, 49-52.

Boyd JC. Defining laboratory reference values and decision limits: populations, intervals, and interpretations. *Asian Journal of Andrology*, 2010.

Chan CC, Lee YC, Lam H, Zhang XM. Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification. Wiley, 2004.

Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation, 2014, <http://www.westgard.org>., pristupljeno 25.08.2019.

Državni zavod za mjeriteljstvo, Međunarodni mjeriteljski rječnik osnovni i opći pojmovi i pridruženi nazivi (VIM), *Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM)*, Zagreb, 2008.

Galjanić S, Vukasović I, Meštrić ZF. Akreditacija medicinsko-biokemijskog laboratorija. Medicinska naklada, 2010, str. 123-133.

Giavarinani D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochemia Medica* 2015, 25, str. 141-51.

Hrvatska komora medicinskih biokemičara. Harmonizacija specijalističkih i visokodiferentnih pretraga iz područja medicinske biokemije, laboratorijske imunologije i analitičke toksikologije, <https://www.hkmb.hr/>, pristupljeno 11.09.2019.

Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Itsumura N. The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. *American Physiological Society*, 2015.

Kubiak TM, Benbow DW, The Certified Six Sigma Black Belt Handbook, *ASQ Quality Press*, 2009.

Lovrić M, Zadro R, Batinić D, Vogrinc Ž. Validacija analitičkih metoda, interni akreditacijski dokument, OP-5.5-000-1, KZLD KBC Zagreb, Zagreb 2017.

Shenkin A, Baines M. Vitamins and Trace Elements. U: Teitz Fundamentals of Clinical Chemistry, Sixth edition. Burtis CA, Ashwood EA, Bruns DE, Saunders, an imprint of Elsevier Inc., 2008, str. 496-508.

Skoog DA, West DM, Holler FJ. Osnove analitičke kemije. Školska knjiga, 1999, 24, str. 595-611.

Štraus B, Rumora L, Elementi u tragu. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 389-408.

Van Loon JC. Analytical Atomic Absorption Spectroscopy: Selected Methods. *Academic Press*, 1980.

Welz B, Sperling M. Atomic Absorption Spectrometry. Wiley-VCH, 1999, str. 1-3.

World Health Organisation (WHO). Expert Committee on Biological Standardization. *Glossary of Terms for Biological Substances Used for Texts of Requirements*, 1999.

7. SAŽETAK

Cink je jedan od najbitnijih oligoelemenata u ljudskom tijelu koji djeluje kao kofaktor u više od 300 metaloenzima. Do deficita cinka u organizmu uglavnom dolazi zbog smanjenog unosa, keliranja lijekovima ili različitih bolesti dok je hipercinkemija puno rjeđa. Mjerenjem koncentracije cinka u krvi može se pratiti njegov sadržaj u tijelu. Referentna metoda za mjerenje cinka u krvi je atomska apsorpcijska spektrofotometrija, no zbog veće dostupnosti i jednostavnosti se u većini laboratorija cink rutinski određuje kolorimetrijskim metodama.

Cilj ovog istraživačkog rada bio je validirati metodu za određivanje cinka u krvi na novom atomskom apsorpcijskom spektrofotometru AA – 7000 tvrtke Shimadzu u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb. Postupak validacije obuhvatio je ispitivanje preciznosti, istinitosti, granice kvantifikacije i linearnosti, usporedbu s dosad korištenom metodom i provjeru deklariranih referentnih intervala.

Dobiveni rezultati za nepreciznost (iz dana u dan i u seriji) te sustavnu pogrešku (bias) u skladu su s kriterijima prihvatljivosti prema Westgardu. Rezultati ispitivanja granice kvantifikacije su pokazali da se metodom atomske apsorpcijske spektrofotometrije na uređaju AA – 7000 može pouzdano mjeriti koncentracije cinka u serumu od 3,06 $\mu\text{mol/L}$ što je prihvatljivo za rutinski rad. Ispitivanje linearnosti napravljeno pomoću pet kalibratora pokazalo je da uređaj AA – 7000 daje rezultate ispitivanja proporcionalne koncentraciji analita bez dodatnog razrjeđenja uzorka čime je potvrđena dobra linearnost. Rezultati usporedbe ispitivane metode s ranije korištenom kolorimetrijskom metodom su pokazali da ne postoje konstantne niti proporcionalne razlike između dvije navedene metode i da se rezultati mjerenja cinka u serumu pacijenata različitih dobi i spola na oba analizatora mogu smatrati jednakim. Određivanjem cinka u 20 uzoraka seruma zdravih pacijenata metodom atomske apsorpcijske spektrofotometrije na uređaju AA-7000 provjereni su referentni intervali, a iz Gaussove krivulje je vidljivo da se dobivene vrijednosti nalaze unutar očekivanog raspona.

Na temelju rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da se uređaj AA – 7000 tvrtke Shimadzu može uvesti u rutinsku primjenu za analizu cinka u serumu

8. SUMMARY

Trace elements (also called oligoelements) make up 0,1% of an organisms body mass. They can be divided into essential oligoelements which are crucial for the normal body function and non-essential oligoelements which can become toxic in high concentrations. One of the main oligoelements is Zinc (Zn) which acts as a cofactor for more than 300 metalloenzymes. Zinc deficiency is more common than hyperzincemia, and it is mostly caused by a low uptake and chelating drugs. It is also a symptom of many diseases. Although many clinical laboratories still use, colorimetric methods to determine the serum concentration of zinc because of their availability and simplicity, atomic absorption spectroscopy is considered the standard, reference method.

The main purpose of this research was to validate the AA-7000 atomic absorption spectrophotometer in order to confirm that it can be used in the routine testing of serum Zn concentrations at the Department of Laboratory Diagnostics at the University Hospital Center Zagreb. AAS method validation included tests of precision, trueness, linearity and limits of quantification (LOQ) as well as comparing the AA – 7000 analyser to the older Cobas 6000 c501 analyser and checking the reference intervals for serum Zn concentrations.

The calculated imprecisions and bias are in accordance with the desirable specifications according to Westgard. Through testing the lower limit of quantification it was confirmed that concentrations of serum Zinc as low as 3,06 $\mu\text{mol/L}$ can be determined with a high degree of precision and trueness. Comparing the two analysers using the Passing-Bablok and Bland-Altman plots it was concluded that no constant or proportional differences can be found between the two methods and that we can consider the results obtained by these two analysers equal. The correlation coefficient was calculated to be greater than 0,990 and therefore the linearity of the method was confirmed. The generally accepted reference intervals were also confirmed by reading from the Gauss curve.

Based on this research it was confirmed that the atomic absorption spectrophotometer AA – 7000 analyser from Shimadzu can be incorporated into the routine laboratory practice for the analysis of serum zinc concentrations.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Validacija atomskog apsorpcijskog spektrofotometra AA – 7000 za analizu cinka u serumu

Sara Randić

SAŽETAK

Cink je jedan od najbitnijih oligoelemenata u ljudskom tijelu koji djeluje kao kofaktor u više od 300 metaloenzima. Do deficita cinka u organizmu uglavnom dolazi zbog smanjenog unosa, keliranja lijekovima ili različitih bolesti dok je hipercinkemija puno rjeđa. Mjerenjem koncentracije cinka u krvi može se pratiti njegov sadržaj u tijelu. Referentna metoda za mjerenje cinka u krvi je atomska apsorpcijska spektrofotometrija, no zbog veće dostupnosti i jednostavnosti se u većini laboratorija cink rutinski određuje kolorimetrijskim metodama. Cilj ovog istraživačkog rada bio je validirati metodu za određivanje cinka u krvi na novom atomskom apsorpcijskom spektrofotometru AA – 7000 tvrtke Shimadzu u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb. Postupak validacije obuhvatio je ispitivanje preciznosti, istinitosti, granice kvantifikacije i linearnosti, usporedbu s dosad korištenom metodom i provjeru deklariranih referentnih intervala. Dobiveni rezultati za nepreciznost (iz dana u dan i u seriji) te sustavnu pogrešku (bias) u skladu su s kriterijima prihvatljivosti prema Westgardu. Rezultati ispitivanja granice kvantifikacije su pokazali da se metodom atomske apsorpcijske spektrofotometrije na uređaju AA – 7000 može pouzdano mjeriti koncentracije cinka u serumu od 3,06 $\mu\text{mol/L}$ što je prihvatljivo za rutinski rad. Ispitivanje linearnosti napravljeno pomoću pet kalibratora pokazalo je da uređaj AA – 7000 daje rezultate ispitivanja proporcionalne koncentraciji analita bez dodatnog razrjeđenja uzorka čime je potvrđena dobra linearnost. Rezultati usporedbe ispitivane metode s ranije korištenom kolorimetrijskom metodom su pokazali da ne postoje konstantne niti proporcionalne razlike između dvije navedene metode i da se rezultati mjerenja cinka u serumu pacijenata različitih dobi i spola na oba analizatora mogu smatrati jednakim. Određivanjem cinka u 20 uzoraka seruma zdravih pacijenata metodom atomske apsorpcijske spektrofotometrije na uređaju AA-7000 provjereni su referentni intervali, a iz Gaussove krivulje je vidljivo da se dobivene vrijednosti nalaze unutar očekivanog raspona. Na temelju rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da se uređaj AA – 7000 tvrtke Shimadzu može uvesti u rutinsku primjenu za analizu cinka u serumu

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

Rad sadrži: 39 stranica, 17 grafičkih prikaza, 14 tablica i 20 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: element u tragu, cink, serum, validacija, preciznost, točnost, granica kvantifikacije, Passing i Bablok, Bland i Altman, linearnost, referentni interval

Mentor: **Dr. sc. Dunja Rogić**, *izvanredna profesorica* Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dunja Rogić**, *izvanredna profesorica* sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Dr. sc. Željka Vogrinc, *znanstvena suradnica*, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb

Dr. sc. Mila Lovrić, *docent*, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medicinal Biochemistry
Department of
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Validation of atomic absorption spectrophotometer AA – 7000 for the analysis of serum Zinc

Sara Randić

SUMMARY

Trace elements (also called oligoelements) make up 0,1% of an organisms body mass. They can be divided into essential oligoelements which are crucial for the normal body function and non-essential oligoelements which can become toxic in high concentrations. One of the main oligoelements is Zinc (Zn) which acts as a cofactor of more than 300 metalloenzymes. Zinc deficiency is more common than hyperzincemia, and it is mostly caused by a low uptake and chelating drugs. It is also a symptom of many diseases. Although many clinical laboratories still use, colorimetric methods to determine the serum concentration of zinc because of their availability and simplicity, atomic absorption spectroscopy is considered the standard, reference method. The main purpose of this research was to validate the AA–7000 atomic absorption spectrophotometer in order to confirm that it can be used in the routine testing of serum Zn concentrations at the Department of Laboratory Diagnostics at the University Hospital Center Zagreb. AAS method validation included tests of precision, trueness, linearity and limits of quantification (LOQ) as well as comparing the AA – 7000 analyser to the older Cobas 6000 c501 analyser and checking the reference intervals for serum Zn concentrations. The calculated imprecisions and bias are in accordance with the desirable specifications according to Westgard. Through testing the lower limit of quantification it was confirmed that concentrations of serum Zinc as low as 3,06 $\mu\text{mol/L}$ can be determined with a high degree of precision and trueness. Comparing the two analysers using the Passing-Bablok and Bland-Altman plots it was concluded that no constant or proportional differences can be found between the two methods and that we can consider the results obtained by these two analysers equal. The correlation coefficient was calculated to be greater than 0,990 and therefore the linearity of the method was confirmed. The generally accepted reference intervals were also confirmed by reading from the Gauss curve. Based on this research it was confirmed that the atomic absorption spectrophotometer AA – 7000 analyser from Shimadzu can be incorporated into the routine laboratory practice for the analysis of serum zinc concentrations.

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

Thesis includes: 39 pages, 17 figures, 14 tables and 19 references. Original is in Croatian language.

Keywords: trace elements, zinc, serum, validation, precision, trueness, limit of quantification, Passing – Bablok, Bland – Altman, linearity, reference interval

Mentor: **Dunja Rogić, Ph.D.**

Reviewers: **Dunja Rogić, Ph.D.** Associate professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željka Vogrinc, Ph.D. Assistant Research scientist, Department of laboratory diagnostics, University Hospital Centre Zagreb
Mila Lovrić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2019.