

# Validacija analitičke metode za određivanje profila acil-karnitina iz plazme primjenom tandemске spektrometrije masa

---

**Antolić, Nives**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*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:163:468647>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-02**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Nives Antolić**

**Validacija analitičke metode za određivanje  
profila acil-karnitina iz plazme primjenom  
tandemske spektrometrije masa**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju *Specijalna područja kliničke biokemije* Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ksenije Fumić.

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD .....   | 1  |
| 1.1 Rijetke metaboličke bolesti .....                                 | 1  |
| 1.2 Karnitin i acil – karnitini .....                                 | 2  |
| 1.2.1 Važnost karnitina.....  | 5  |
| 1.3 Nasljedni metabolički poremećaji oksidacije masnih kiselina ..... | 6  |
| 1.3.1 Nasljedni metabolički poremećaji ciklusa karnitina .....        | 9  |
| 1.4 Analiza profila acil - karnitina.....                             | 12 |
| 1.5 Tandemska spektrometrija masa .....                               | 15 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME .....  | 17 |
| 3. MATERIJALI I METODE .....  | 18 |
| 1.1 Materijali .....  | 18 |
| 1.2 Metode .....  | 18 |
| 1.2.1 Postupak analize na LC / MS – MS .....                          | 19 |
| 1.2.2 Postupak validacije.....  | 24 |
| 1.2.3 Statistička obrada podataka .....                               | 25 |
| 4. REZULTATI.....   | 28 |
| 5. RASPRAVA.....  | 51 |
| 6. ZAKLJUČAK .....  | 52 |
| 7. LITERATURA.....  | 53 |
| 8. SAŽETAK / SUMMARY .....  | 56 |

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

## 1. UVOD

### 1.1 Rijetke metaboličke bolesti

Rijetke bolesti, tzv. „*Orphan diseases*“, zahvaćaju vrlo mali postotak populacije. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, njihova prevalencija je jednaka ili manja od 1:2 000. Europsko udruženje za rijetke bolesti procjenjuje da postoji oko 5 000 - 7 000 raznih oboljenja koje spadaju u kategoriju rijetkih bolesti, te da je samo u Europi zahvaćeno 6-8 % populacije s takvom dijagnozom. Takve bolesti su kronične, degenerativne, često i smrtonosne, no zbog svoje rijetkosti kasno se dijagnosticiraju. Bolesti najčešće imaju genetsko podrijetlo, a simptomi su prisutni kroz cijeli život iako se ponekad ne pojavljuju od rođenja. Simptomi iste bolesti variraju od pojedinca do pojedinca pa je sama dijagnostika teška, a zbog toga što su rijetke, lako se, greškom, svrstavaju pod druge dijagnoze. Za velik dio rijetkih bolesti još uvijek nisu pronađeni učinkoviti lijekovi, dok oni koji postoje, naravno, skupi su budući da njihova proizvodnja nije financijski isplativa farmaceutskim firmama.

([www.eurordis.org/content/what-rare-disease](http://www.eurordis.org/content/what-rare-disease))

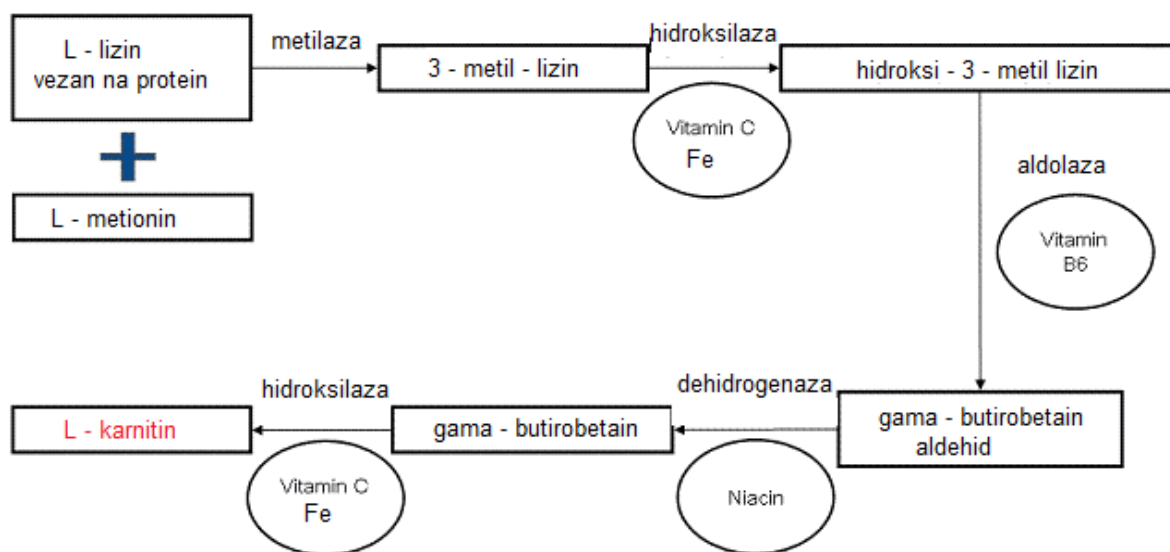
Drugi važan aspekt rijetkih bolesti je psihosocijalna strana, javnost, pa i stručni krugovi koji imaju vrlo malo saznanja o rijetkim bolestima. S obzirom da postoji širok spektar simptoma, a mnogi od njih su vrlo teški, oboljeli rijetko kad mogu sudjelovati u društvenom životu svoje zajednice koja nije prilagođena njihovim potrebama što im dodatno smanjuje kvalitetu života. (<http://www.rijetke-bolesti.hr/o-bolestima>)

Pravovremeno kliničko prepoznavanje, kao i laboratorijska potvrda dijagnoze, ključ su uspješnog liječenja. Kako simptomi variraju, dijagnostika temeljem kliničke slike nije dovoljna, već je potrebna potvrda laboratorijskim testovima. Rano, pravodobno otkrivanje, osigurano je za poremećaje koji su unutar nacionalnog programa novorođenačkog probira (Čvorišćec i sur, 2009).

Novorođenački probir (engl. *screening*) je sustavno pretraživanje cjelokupne populacije novorođenčadi određene regije ili cijele države na one bolesti koje su dostupne liječenju, a koje se klinički ne mogu dovoljno rano prepoznati. Takav pristup omogućuje rano otkrivanje bolesti u njezinoj pretkliničkoj fazi ili u vrlo ranoj fazi njezina razvoja (American Academy of Pediatrics, 1996). Probir na metaboličke bolesti znatno je unaprijeđen primjenom novih laboratorijskih testova, najviše razvojem tandemske spektrometrije masa kojom se u kapi krvi mogu identificirati metaboliti specifični za blizu 50-ak nasljednih metaboličkih bolesti.

## 1.2 Karnitin i acil – karnitini

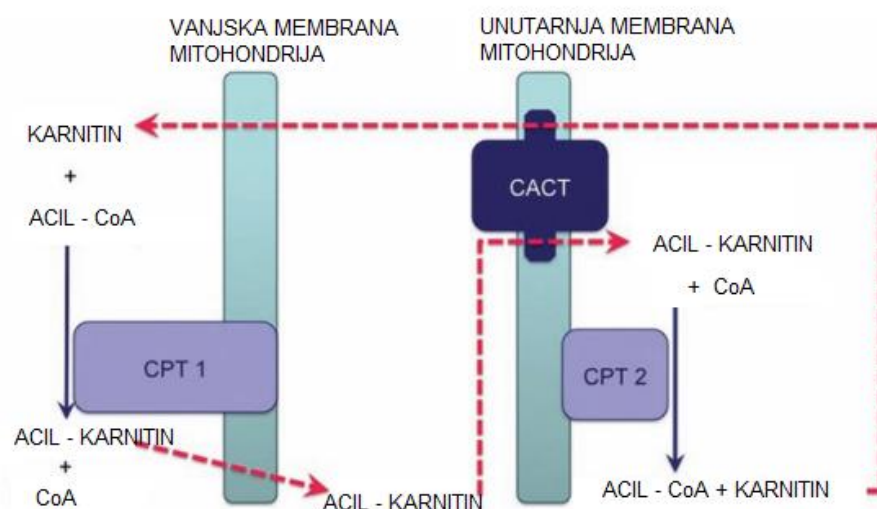
Hidrofilni aminokiselinski derivat, karnitin (3-hidroksi-4-*N*-trimetil-aminobutirična kiselina), uvjetno je esencijalan nutrijent koji ima vitalnu ulogu u procesu proizvodnje energije i metabolizma masnih kiselina. 75% karnitina ljudi unose hranom. L - karnitin je biološki aktivan stereoizomer koji se apsorbira iz hrane, bilo aktivnim ili pasivnim transportom kroz enterocite pa biodostupnost L - karnitina ovisi o prehrani. Prisutan je u mnogim namirnicama animalnog podrijetla, dok je manje zastupljen u namirnicama biljnog podrijetla, pa je kod vegetarijanaca skoro sav karnitin sintetiziran endogeno. Karnitin koji se ne unese hranom može nastati endogenom sintezom u bubrezima, jetri i mozgu iz dvije esencijalne aminokiseline, metionina i lizina. (Slika 1.) Askorbinska kiselina, željezo, piridoksin i niacin također su neophodni kofaktori za sintezu pa njihov manjak također može dovesti do manjka karnitina. Budući da srčani i skeletni mišići ne mogu proizvesti karnitin, njihov izvor karnitina je plazma (Kendler, 1986, De Vivo i Tein, 1990).



Slika 1. Shematski prikaz endogene sinteze karnitina iz lizina i metionina (preuzeto i prilagođeno s <https://honestsupplementreview.com/l-carnitine-benefits-and-side-effects>)

Karnitin sudjeluje u prijenosu masnih kiselina dugog lanca (>12 C atoma) iz citosola kroz unutarnju mitohondrijsku membranu u matriks mitohondrija, gdje se uključuje u proces  $\beta$  – oksidacije masnih kiselina i na taj način osigurava oko 80% energije skeletnim i srčanim mišićima u obliku adenzin trifosfata (ATP-a). Prijenos masnih kiselina kroz vanjsku

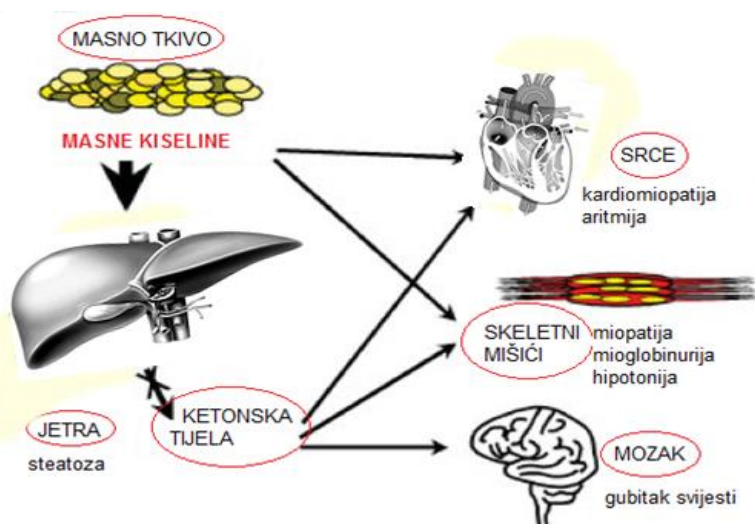
membranu mitohondrija započinje stvaranjem tioestera dugolančane masne kiseline s CoA, pri čemu se troši jedna molekula ATP-a. Reakcija je katalizirana acil – CoA sintetazom koja se nalazi na vanjskoj strani mitohondrija. Tioester dugolančane masne kiseline i CoA ulazi u mitohondrijski međumembranski prostor i u ravnoteži je s esterom karnitina. Molekula acil – karnitina lagano prolazi kroz lipidne membrane. Između dvije mitohondrijske membrane obavlja se reakcija u kojoj s jedne strane ulazi tioester dugolančane masne kiseline i CoA, a s druge strane karnitin. Iz reakcije izlazi acil - karnitin i CoA. Ovu reakciju katalizira karnitin – palmitoil – transferaza (CPT I, engl. *carnitine palmitoyltransferase I*) koja se nalazi na vanjskoj strani mitohondrija, dok karnitin – translokaza (CT, engl. *carnitine – acyl – carnitine translocase*) prenosi acil – karnitin iz međumembranskog prostora u matriks mitohondrija u zamjenu za molekulu karnitina koja iz matriksa izlazi u međumembranski prostor. Aktivirana masna kiselina ulazi u proces  $\beta$  – oksidacije masnih kiselina. Prijelazom masne kiseline iz spoja s karnitinom na CoA ponovno nastaje acil – CoA. Iz mitohondrija izlazi karnitin koji se pomoću CPT II (CPT II, engl. *carnitine palmitoyltransferase II*) vraća u međumembranski prostor da bi mogao vezati sljedeće masne kiseline i sudjelovati u prijenosu kroz mitohondrij. Osim toga, karnitin potiče oksidaciju  $\alpha$  – ketokiselina razgranatog lanca, kontrolira omjer acil – CoA i CoA u mitohondriju i veže potencijalno toksične spojeve CoA s različitim molekulama koje mogu djelovati inhibitory na ciklus ureje, limunske kiseline, glukoneogeneze, ali i oksidacije masnih kiselina (Čvorišćec i sur., 2009). Slika 2. skraćeno prikazuje ciklus karnitina.



Slika 2. Ciklus karnitina (preuzeto i prilagođeno prema Santra i Hendriksz, 2010)

Primarno dakle, karnitin omogućuje translokaciju dugolančanih masnih kiselina u mitohondrij i njegovu oksidaciju, dok je važna i njegova sekundarna metabolička uloga, a to je uklanjanje kratih i srednjelančanih masnih kiselina (acetilnih ostataka) koji nastaju kao produkti oksidacije masnih kiselina i omogućuje njihovo vezanje na koenzim A i nastanak acetil – CoA. Produkt ove akumulacije je toksičan, inhibira aktivnost piruvat dehidrogenaze i oksidaciju glukoze (Mate i sur., 2010).

Količinski, masne kiseline predstavljaju najveću zalihu energije u ljudskom organizmu. U zdravom ljudskom tijelu odraslog čovjeka ukupna količina karnitina je oko 15 grama, s najvećom količinom u mišićima, za razliku od plazme u kojoj je njena koncentracija svega 40  $\mu\text{mol/L}$ . L - karnitin je u organizmu prisutan i kao slobodan, ali i u aciliranom esterskom obliku kada je vezan na kiseline (acil – karnitini) pa se deficit L - karnitina može se izraziti s obzirom na slobodni karnitin ( $< 40 \mu\text{mol/L}$ ) ili gledajući omjer konjugiranog/slobodnog karnitina koji mora biti  $> 0,4$ . Bilo koji manjak L – karnitina ometa oksidaciju masnih kiselina. Poremećaj oksidacije masnih kiselina znači nemogućnost korištenja dugolančanih masnih kiselina za dobivanje energije, one se otpustaju u velikoj količini iz adipocita koje tijelo ne može prevesti u ketone u jetri pa kako tijelo nema energije, akumuliraju se u unutarnjim organima (jetra, srce, skeletni mišići, mozak) te ometaju njihovu funkciju. (Slika 3.)



Slika 3. Masne kiseline u stanjima bez energije (preuzeto i prilagođeno prema Longo i sur., 2006)

Najviše se to odnosi na srce i skeletne mišiće, a manjak karnitina znači po život opasno stanje (Jeukendrup i sur., 1998, Longo i sur., 2006). Manjak izvora energije uzrokuje hepatičku steatozu, mišićnu slabost, kardiomiopatiju s kongestivnim zatajenjem srca te gubitak svijesti.

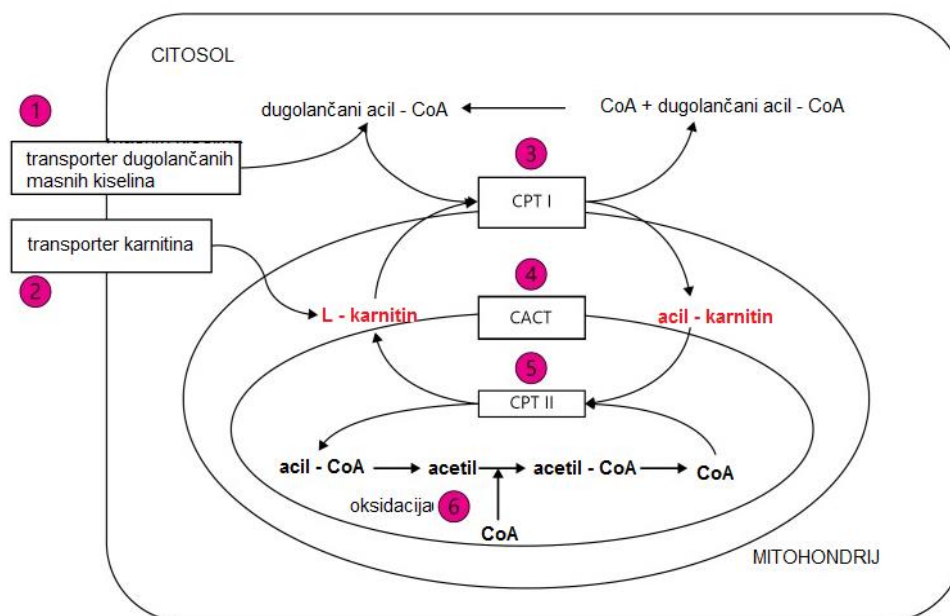


### 1.2.1 Važnost karnitina

Manjak karnitina po život je opasan upravo zato jer je on vrlo važan spoj u ljudskom tijelu bez kojega nema normalnog iskorištavanja masti. Uzroci manjka karnitina mogu biti primarni ili sekundarni manjak uslijed mnogih nasljednih metaboličkih bolesti, ali i vrlo brojnih drugih češćih patoloških stanja. Ta stanja, kao i kliničku sliku manjka karnitina, važno je poznavati jer samo pravovremeno prepoznavanje omogućuje i pravovremeno liječenje nadoknadom. Karnitin se obično dobro podnosi. U metaboličkim krizama se navedena ili po potrebi dvostruko veća doza daje venski, čime se kao problem mimoilazi dosta slaba crijevna resorpcija karnitina. Iako je očito da je primarni manjak karnitina teška, nerijetko smrtonosna bolest, neki pojedinci s tom bolešću nemaju simptoma ili su oni minimalni. Karnitin štiti od srčanih bolesti i liječi ih, povećava izdržljivost, doprinosi dugovječnosti, potiče izgaranje masnog tkiva i funkcije mozga, daje energiju, poboljšava sportske rezultate itd. Dostupan je u najrazličitijim oblicima i bez recepta (Barić, 2009). Brojna su stanja, osim nasljednih metaboličkih bolesti, povezana s nedostatkom karnitina, koji u njima može biti jednako opasan kao što je primarni manjak ili bar biti presudan dodatni čimbenik nepovoljnog, ponekad fatalnog ishoda bolesti. Jedno takvo stanje je Fanconijev sindrom, koji ne mora nastati samo kao posljedica nasljednih metaboličkih bolesti (Stanley, 2004). Općenito, kad god postoje znaci oštećenja tubula treba misliti na mogući manjak karnitina zbog ometene reapsorpcije. Manjak karnitina može nastati i pri nedovoljno kvalitetnoj parenteralnoj prehrani, strogoj vegetarijanskoj prehrani, u razdobljima hiperalimentacije, kroničkoj ishemiji ili kao popratna pojava kod pacijenata s hemodijalizom. Manjak karnitina mogu uzrokovati i neki lijekovi, posebice valproat koji se veže za karnitin, ali i blokira beta-oksidaciju masnih kiselina te se natječe s karnitinom za reapsorpciju u tubulima (Proulx i sur., 1997). Mnogo radova navodi to da karnitin pojačava imunost, smanjuje umor onkoloških bolesnika, pojačava osjetljivost na inzulin u bolesnika sa šećernom bolešću tipa 2, povećava kvantitetu i kvalitetu spermija u neplodnih muškaraca, smanjuje kognitivne poteškoće u starosti i Alzheimerovoj bolesti, smanjuje oštećenje miokarda nakon ishemije, pomaže pri bolesti perifernih arterija, smanjuje teškoće u sindromu hiperaktivnosti i manjka pažnje. Karnitin se preporučivao i sportašima za poboljšanje atletskih rezultata, pretilima kao sredstvo za mršavljenje itd. I tu njegova korist nije jasno nedokazana, a utjecaj farmaceutske propagande sigurno je doprinio njegovoj širokoj i često nekritičnoj uporabi (Barić, 2009).

### 1.3 Nasljedni metabolički poremećaji oksidacije masnih kiselina

Općenito govoreći, nasljedne metaboličke bolesti pripadaju skupini monogenetskih nasljednih bolesti; uzrokovane su mutacijom jednog gena, većinom se nasljeđuju prema Mendelovim pravilima nasljeđivanja, a čine oko 10% svih monogenetskih nasljednih bolesti. Njihova patogeneza se objašnjava metaboličkim, odnosno biokemijskim poremećajima; mutacija gena dovodi do promjene strukture ili nedovoljne sinteze određenog genskog produkta, uz njegovu neadekvatnu funkciju radi čega nastaje biokemijski poremećaj uz nastanak određene kliničke slike. Nasljedni metabolički poremećaji ciklusa oksidacije masnih kiselina otkrivaju se vrlo rijetko i svi se nasljeđuju autosomno recesivno, znači uvjetovane su genima, odnosno nasljeđuju se.



Slika 4. Različiti uzroci poremećaja masnih kiselina (preuzeto i prilagođeno prema Magoulas i El – Hattab, 2012)

- (1) Transport i vezanje dugolančanih masnih kiselina (2) defekt unosa karnitina, (3) manjak CPT I, (4) manjak CT, (5) manjak CPT II, (6) VLCAD, MCAD and SCAD manjak.

Masne kiseline predstavljaju vrlo važan izvor energije. Srednjelančane i kratkolančane masne kiseline transportiraju se direktno u citosol i mitohondrij dok je za unos dugolančanih kiselina potreban karnitin s kojim se konjugiraju i transportiraju kroz membranu mitohondrija i tamo oksidiraju zajedno s ostalim masnim kiselinama. Za svaki poremećaj oksidacije masnih kiselina (ima ih oko 20), javlja se problem u jednom od koraka ciklusa  $\beta$  – oksidacije (Rinaldo i sur., 2008). (Slika 4.)

Bolesti uključuju bilo koji dio  $\beta$  – oksidacije u mitohondriju, uključujući funkciju plazmatske membrane, transporta masnih kiselina u mitohondrij ili put oksidacije kratko, srednje i dugolančanih masnih kiselina. Pa tako na primjer CPT I, CT i CPT II označavaju poremećaje karnitinskog ciklusa koji omogućuje ulazak dugolančanih masnih kiselina u mitohondrij. Dugolančana, srednjelančana i kratkolančana acil – CoA dehidrogenaza enzimi su koji su odgovorni za metabolizam acil – CoA lanaca duljine C12 – C18, C6 – C10 i C4 – C6. Neki od poremećaja opisani su u daljnjem tekstu rada. *Tablica 1.* prikazuje teoretsku podjelu nekih poremećaja oksidacije masnih kiselina.

Tablica 1. Klasifikacija poremećaja vezanih uz oksidaciju masnih kiselina

| <i>Skupina</i>   | <i>Specifični poremećaj</i>   |
|--|---|
| Poremećaj funkcije karnitina                                   | Poremećaji transporta i vezanja masnih kiselina   |
| Poremećaj prijenosa masnih kiselina kroz membranu mitohondrija | Manjak CPT I<br>Manjak CT<br>Manjak CPT II  |
| Poremećaj oksidacije dugolančanih masnih kiselina              | Manjak VLCAD<br>Manjak dugolančane L3 – hidroksil – CoA dehidrogenaze   |
| Poremećaj oksidacije srednjelančanih masnih kiselina           | Manjak MCAD<br>Manjak kratkolančane i srednjelančane L3 – hidroksil – CoA dehidrogenaze<br>Manjak srednjelančane 3 – ketoacil CoA tiolaze |
| Poremećaj oksidacije kratkolančanih masnih kiselina            | Manjak SCAD   |

Najčešći poremećaj  $\beta$ –oksidacijskog ciklusa je **manjak acil dehidrogenaze srednjeg lanca** (MCADD, engl. *Medium chain acyl – CoA dehydrogenase deficiency*) i u mnogim državama je uključen u prošireni probir novorođenčadi. Klinički znakovi najčešće počinju nakon 2 do 3 mj. života i obično se pojavljuju nakon gladovanja. Bolesnici povraćaju i letargični su, što može brzo uznapredovati do konvulzija, kome, a ponekad i smrti. Tijekom napada, bolesnici imaju hipoglikemiju, hiperamonijemiju i neočekivano niske ketone u plazmi i mokraći. Česta je metabolička acidoza, no ona može biti i kasni znak bolesti. Dijagnoza se

postavlja na osnovi abnormalnih metabolita u krvi ili mokraći ili dokazivanja manjka enzima u kulturi fibroblasta; međutim, pretraga DNK može potvrditi većinu slučajeva. Akutni napadi se liječe 10%-tnom glukozom intravenozno. Prevencija je prehrana siromašna mašću, bogata ugljikohidratima te izbjegavanje dugotrajnijeg gladovanja. Izvjesnu sigurnost za noćnog gladovanja često osigurava davanje kukuruznog škroba (Rinaldo, 2002).

Drugi poremećaj oksidacije masnih kiselina po učestalosti jest **manjak hidroksi acil – CoA dehidrogenaze dugog lanca** (LCHADD, engl. *Long chain acyl – CoA dehydrogenase deficiency*). Ima mnoge zajedničke odlike s MCADD, no bolesnici mogu također imati kardiomiopatiju; rbdomiolizu, izrazito povišenje keratin kinaze i mioglobinuriju nakon mišićnog napora; perifernu neuropatiju i abnormalnu funkciju jetre. Majke s fetusom koji boluje od LCHADD često u trudnoći imaju HELLP sindrom (Preece i Green, 2002). Dijagnoza se postavlja temeljem viška dugolančanih hidroksikiselina, prilikom analize na organske kiseline i na njihove karnitinske konjugate prilikom pretrage na acilkarnitin ili glicinske konjugate prilikom pretrage na acilglicin. Može se potvrditi enzimskom pretragom fibroblasta kože. Akutni napadi se liječe hidracijom, velikim dozama glukoze, mirovanjem u krevetu, alkalizacijom mokraće i nadoknadom karnitina. Dugoročno liječenje uključuje prehranu bogatu ugljikohidratima, nadoknadu triglicerida srednjeg lanca te izbjegavanje gladovanja i težeg fizičkog napora.

**Manjak acil–CoA–dehidrogenaze kratkog lanca**, (SCADD, engl. *Short chain acyl – CoA dehydrogenase deficiency*) poremećaj je oksidacije masnih kiselina koji obuhvaća spektar različitih manifestacija od kojih bolest može biti fatalna ili cijeli život biti asimptomatska. Karakterizira ju mišićna hipotonija i zaostajanje u razvoju. Za potvrdu dijagnoze radi se sekvenciranje SCAD gena u kojem se vidi mutacija (625G → A and 511C → T), biokemijska analiza enzima, fibroblasta i mišića (Rinaldo i sur., 2002).

**Glutarična acidemija tipa II** poremećaj je prijenosa elektrona iz koenzima acil dehidrogenaze masnih kiselina. Prijenosni lanac elektrona utječe na reakcije masnih kiselina svih duljina lanca (višestruki manjak acil–CoA–dehidrogenaze); također je zahvaćena i oksidacija nekolicine aminokiselina. Klinički znakovi stoga uključuju hipoglikemiju nakon gladovanja, tešku metaboličku acidozu i hiperamonijemiju. Dijagnoza se postavlja na osnovi povišenja etilmalonične, glutarične, 2– i 3–hidroksiglutararne i drugih dikarboksilnih kiselina prilikom analize organskih kiselina te glutaril i izovaleril i ostalih acilkarnitina u pretragama tandemskom spektrometrijom mase. Manjak enzima u fibroblastima kože može služiti kao potvrda. Liječenje je slično onome kod MCADD, osim što nekim bolesnicima može pomoći riboflavin.

### 1.3.1 Nasljedni metabolički poremećaji ciklusa karnitina

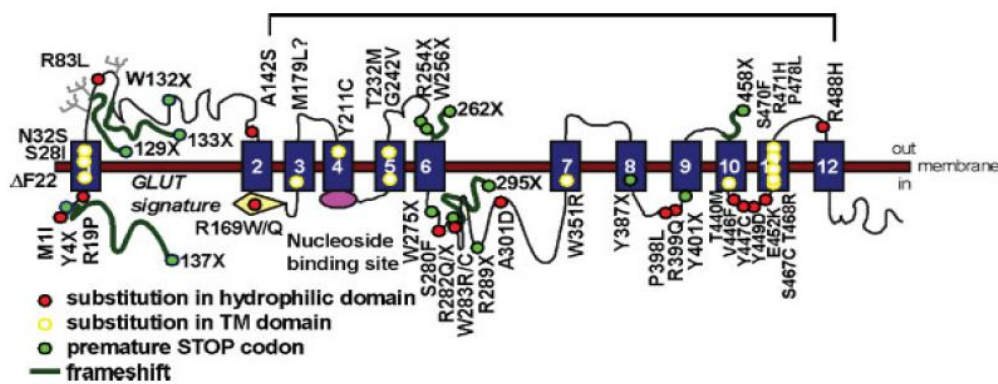
Ciklus karnitina dio je oksidacijskog ciklusa masnih kiselina. U ovom radu opisano je nekoliko bolesti kod kojih postoji poremećaj u transportu karnitina. Dijagnostika obuhvaća fizički pregled, anamnezu pojedinca i povijest bolesti u obitelji, analiza plazme, urina i likvora te testovi probira bazirani na biokemijskim i genetskim markerima bolesti. *Tablica 2.* predstavlja specifične urođene greške metabolizma koje su povezane s poremećenim transportom karnitina (Saudubray i sur., 2006). Ovi nasljedni metabolički poremećaji mogu se pojaviti u bilo kojoj životnoj dobi, a pojava za sobom obično povlači pojam metaboličke krize. Ona se javlja prilikom smanjenog unosa hrane i manifestira se kao stanje hipoketotične hipoglikemije, bolesti jetre, kardiomiopatije, a može izazvati neočekivanu smrt (Rinaldo i sur., 2008).

Tablica 2. Urođene metaboličke greške povezane s poremećajem u transportu karnitina

| <i>Bolesti</i>   | <i>Skupina</i>                       | <i>Specifični poremećaj</i>   |
|--|--------------------------------------|---|
|  |                                      | Sistemi primarni deficit karnitina  |
| Poremećaj stvaranja energije                                 | Poremećaj oksidacije masnih kiselina | Nedostatak karnitin translokaze (CT)  |
|  | Hiperhomocisteinemija                | Deficit metilentetrahidrofolat reduktaze  |
| Bolesti kod kojih dolazi do nakupljanja toksičnih metabolita | Organska acidurija                   | Izovalerična acidemija<br>Glutarična acidemija tipa I<br>Propionična acidemija<br>3 – metilkrotonil glicinurija<br>3 – metilglutakonična acidurija tipa I |
|  | Poremećaj urea ciklusa               |   |

**Primarni manjak karnitina** genski je uvjetovan nedostatkom transportera karnitina kroz staničnu membranu najčešće zbog nemogućnosti unosa dugolančanih masnih kiselina u stanicu odnosno stvaranja energije i ketonskih spojeva iz lipida (Čvorišćec i sur., 2009). Spada u rijetke autosomno – recesivne poremećaje, a karakterizira ga mutacija SLC22A5

gena, (Slika 5.) gena koji kodira visokoafinitetni transporter karnitina OCTN2 i čija je ekspresija prisutna na plazmatskoj membrani miocita, skeletnih mišića, bubrežnim tubulima, fibroblastima te intestinalnom i placentalnom tkivu. OCTN2 normalno prenosi karnitin kroz membranu stanice i omogućuje esencijalno visoku unutarstaničnu koncentraciju karnitina. Ukoliko OCTN2 ne funkcioniše, dolazi do smanjenog transporta karnitina, a time i smanjene koncentracije karnitina unutar stanice. Ovaj poremećaj utječe na metabolizam dugolančanih masnih kiselina, a energija se dobiva metabolizmom ugljikohidrata. Glukoza postaje primaran supstrat za dobivanje energije pa ovo stanje karakterizira hipoglikemija. (Magoulas i El – Hattab, 2012).



Slika 5. Mutacija OCTN2 transportera karnitina kod primarnog manjka karnitina (preuzeto od Longo i sur., 2010)

Klinička manifestacija ovog poremećaja varira, pa tako može uzrokovati metaboličku krizu kod novorođenčadi i kardiomiopatiju kod djece ili se simptomi bolesti ne pojavljuju uopće do odrasle dobi. Najuobičajniji fenotip povezan je s progresivnom kardiomiopatijom sa ili bez mišićne slabosti koja se javlja od 1 – 4 godine starosti. Kardiomiopatiju prezentira hipoketotična hipoglikemična encefalopatija, hepatomegalija i kardiomegalija (Fu i sur., 2013). Srčana aritmija je također vezana uz primarni deficit karnitina, iako rijedak simptom, kao i bradikardija i atrijska aritmija. Stanje je, također, karakterizirano pojačanim gubitkom karnitina urinom, niskim serumskim karnitinom (0-5  $\mu$ M, dok je referentni interval 25 – 50  $\mu$ M) te smanjenom akumulacijom karnitina u tkivima (Sharma i Black, 2009). Osim za ovu bolest tipično izrazito niskog ukupnog i slobodnog karnitina, bez znakova ikakvog nakupljanja nekog od acilkarnitina, druge biokemijske abnormalnosti odražavaju u različitim kombinacijama zahvaćenost pojedinih organa - povišene aminotransferaze, povišena kreatin kinaza, ponekad povišen mioglobin u serumu, povišen omjer slobodnih masnih kiselina

prema ketonima, te već prije spomenute hiperamonijemija i hipoketotična hipoglikemija (Barić, 2009).

Ukoliko se ovaj poremećaj ne liječi pravovremeno, ishod ove bolesti je fatalan budući da je sama bolest vrlo progresivna i zahvaća vitalne organe. Liječenje je stoga nužno, a što više bolest napreduje, oštećenja organa su nepovratna. FDA je odobrio L – karnitin za liječenje primarnog manjka karnitina u količini 100-400 mg/kg/dne u obliku levokarnitina za oralnu primjenu koja se pokazala kao vrlo učinkovita terapija kod novorođenčadi i mora se primjenjivati cijeli život kao dodatak prehrani (Pierpont i sur., 2000). Primarni manjak karnitina razlikuje se od ostalih deficita karnitina. Oni uključuju brojne organske acidurije, poremećaje oksidacije masnih kiselina i ciklusa karnitina (Scaglia i Longo, 1999). Za potvrdu svih dijagnoza potrebno je napraviti analizu organskih kiselina u urinu, aminokiseline u plazmi te profil acil - karnitina s obzirom da nizak karnitin može biti posljedica tubularne disfunkcije, kao što je Fankonijev sindrom.

CPT I enzim je koji konjugira masne kiseline s karnitinom i omogućuje njihov unos u mitohondrij. Postoje 3 različite izoforme CPT I s različitom tkivnom ekspresijom, kodirane različitim genima. Tako razlikujemo jetreni tip enzima (CPT-IA) kodiran genom na mjestu 11q13 i jedini prisutan kod ljudi, zatim mišićni tip (CPT-IB) kodiran na mjestu 22qter te moždani tip (CPT-IC) na mjestu 19q13. (Bonfont i sur., 2004.) **Manjak karnitin – palmitoil transferaze I** obično se aktivira u stanju gladovanja ili razvojem bolesti opasne po život. Javlja se kod djece, obično po rođenju ili do 18 mjeseci starosti uz simptome hepatomegalije i mentalnog statusa. Laboratorijskim pretragama uviđa se ne – ketotična hipoglikemija, blaga hiperamonijemija, povišene vrijednosti jetrenih testova i masnih kiselina. Kod ove bolesti, plazmatski karnitin nije snižen, već uobičajeno povišen (Korman i sur., 2005). Sumnja na ovu dijagnozu počinje detekcijom povišenih koncentracija slobodnih i kratkolančanih acil – karnitina. Terapija podrazumijeva primjenu posebne prehrane s niskim unosom masti i unosom hrane bogate srednjelančanim trigliceridima koji ne trebaju ciklus karnitina za oksidaciju. CPT I manjak može se otkriti primjenom novorođenačkog probira koristeći tandemsku spektrometriju masa (MS/MS). Iako je kod ove bolesti povišena razina slobodnog karnitina (C0), povišen omjer slobodnog karnitina i zbroja palmitoil – karnitina (C16) i stearoil – karnitina (C18) dozvoljavaju suplementaciju egzogenim karnitinom (Fingerhut i sur., 2001).

Enzim karnitin translokaza, već ranije spomenut, nalazi se na unutarnoj strani mitohondrijske membrane i omogućuje izmjenu karnitina/acil – karnitina kroz nju. (Slika 5.) **Nedostatak karnitin translokaze** može se javiti odmah po rođenju pa tako novorođeni pate

od konvulzija, srčanih aritmija i apneje – često razvojem komplikacija poput plućnih i srčanih smetnji dolazi do smrtnog ishoda. Ako se simptomi bolesti jave kasnije, stanje je karakterizirano hipoglikemijom bez kardiomiopatije. Zajedničko im je da uzrokuju encefalopatiju, hepatomegaliju i aritmiju, hiperamonijemiju, povišenu aktivnost kreatin kinaze, izrazito niski karnitin i relevantno visoku koncentraciju dugolančanih acilkarnitina i pad razine slobodnog karnitina (Sharma i Black., 2009). Sumnja na ovu dijagnozu je iz abnormalnih vrijednosti iz plazme profila acil – karnitina sa sniženim slobodnim karnitinom i povišenim C16 – C18. Terapiju ove bolesti provodi se primjenom posebne prehrane koja podrazumijeva viši unos ugljikohidrata, smanjen unos masti te suplementacija karnitinom. S obzirom da bolest nastupa jako rano, novorođenački probir ne bi u potpunosti spriječio razvoj neuroloških simptoma, ali primjenom ove terapije može se djelovati preventivno na buduće metaboličke krize i aritmije (Iacobazzi i sur., 2004).

**Manjak karnitin – palmitoil transferaze II** javlja se najčešće kod adolescenata i mladeži, ali i po rođenju uz respiratorne smetnje, konvulzije, hepatomegalije, srčane aritmije, simptome koji su slični i ostalim urođenim metaboličkim bolestima. Ukoliko se bolest javi u neonatalnom obliku, ishod je fatalan, a bolest se manifestira metaboličkim krizama koje označavaju hipoketotičnu hipoglikemiju, gubitak svijesti i konvulzije u stanjima gladovanja ili infekcija. Laboratorijski testovi pokazuju hiperamonijemiju, metaboličku acidozu, hipoketotičnu hipoglikemiju s povišenom aktivnošću kreatin kinaze. Koncentracija karnitina je snižena, a povišene su vrijednosti dugolančanih acil – karnitina, slično kao i kod manjka karnitin translokaze pa je i terapija slična. Ako se bolest javi kasnije, karakterizira ju mišićna bol uz mioglobinuriju i povišenu serumsku kreatin kinazu (Gempel i sur., 2002).

#### 1.4 Analiza profila acil - karnitina

Analiza profila acil-karnitina provodi se biokemijskim testovima kao probir za poremećaje u oksidaciji masnih kiselina i metabolizma organskih kiselina. U nekim slučajevima rezultati analize mogu biti dovoljno specifični za pojedinu dijagnozu, dok se u ostalim slučajevima moraju provesti dodatni testovi za postavljanje precizne dijagnoze. Ovom analizom možemo otkriti bolesti povezane s nakupljanjem C2-C18 acil-CoA molekula, koji su supstrati enzima karnitin acil-CoA transferaze, različito eksprimirne u pojedinim staničnim komponentama. Neki od glavnih nasljednih poremećaja koje možemo uvidjeti analizom acil – karnitina, prikazani su u *Tablici 3.* (Santra i Hendriksz, 2010).

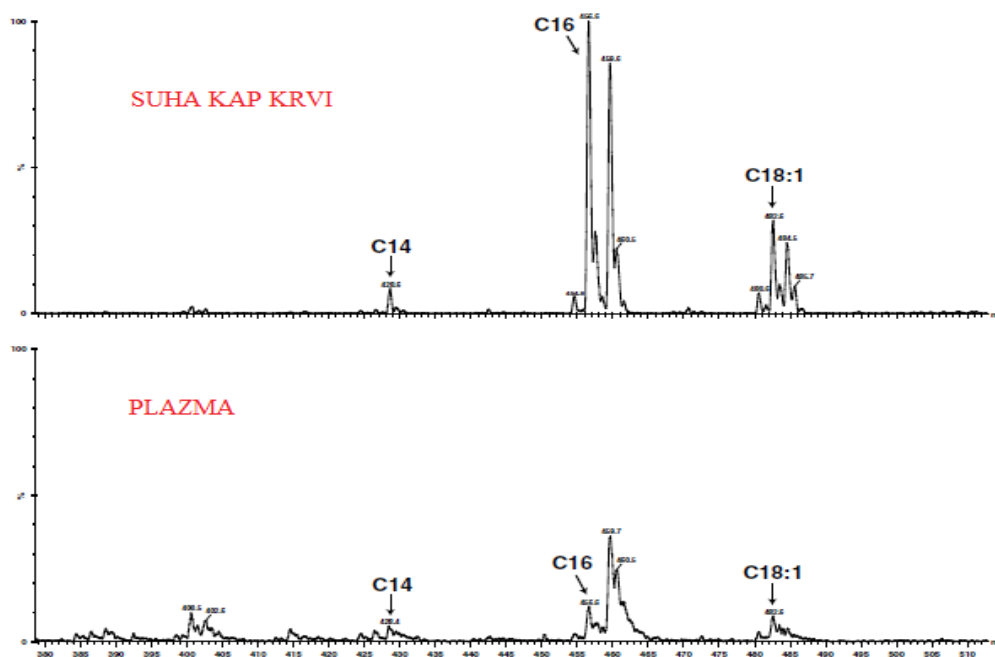


Tablica 3. Prikaz glavnih nasljednih metaboličkih poremećaja koji se mogu detektirati analizom profila acil - karnitina

| <i>Duljina lanca</i> | <i>Naziv acil - karnitina</i>  | <i>Poremećaj</i>  |
|----------------------|--------------------------------|---|
| C0                   | Slobodni karnitin              | Manjak CPT I<br>Primarni manjak karnitina                                     |
| C3                   | Propionil karnitin             | Metil malonična acidemija<br>Propionična acidemija                            |
| C3 - DC              | Malonil karnitin               | Malonična acidurija   |
| C4                   | Butiril karnitin               | SCAD<br>MCAD<br>Manjak izobutiril Co – A dehidrogenaze                        |
| C5                   | Izovaleril karnitin            | Izovalerična acidemija<br>Manjak 2 – metil – 3 – butiril Co – A dehidrogenaze |
| C5 - DC              | Glutaril karnitin              | Glutarična acidemija tip I<br>Glutarična acidemija tip II                     |
| C6                   | Heksanoil karnitin             | MCAD<br>Glutarična acidemija tip II   |
| C8                   | Oktanoil karnitin              | MCAD<br>Glutarična acidemija tip II   |
| C10                  | Dekanoil karnitin              | MCAD<br>Glutarična acidemija tip II   |
| C14:1                | Tetradekanoil karnitin         | LCHAD<br>VLCHAD   |
| C16                  | Heksadekanoil karnitin         | CPT I<br>CPT II<br>CT   |
| C16 - OH             | Hidroksiheksadekanoil karnitin | LCHAD   |

Određivanje ovih analita provodi se u vidu evaluacije pacijenata sa simptomima poremećaja, evaluacije asimptomatske, ali rizične populacije, novorođenačkog probira i praćenja, prenatalne dijagnostike ili postmortem probira. Dok je za novorođenački probir uzorak za analizu suha kap krvi na filter papiru, za ostale analize mogu se izvoditi testovi

koristeći plazmu. Dosadašnja istraživanja pokazala su kako odabir uzorka ponekad može značiti krivo postavljenu dijagnozu pa tako manjak CPT I temeljem određivanja slobodnog karnitina iz plazme može biti izostavljen. Zato se uzima u obzir omjer slobodnog karnitina i acil – karnitina jer ima veću dijagnostičku osjetljivost. Obrnuto, za dijagnozu manjka CPT II bolja je plazma nego suha kap krvi na filter papiru. U istraživanju (De Sain i sur., 2013) prikazana je usporedba profila acil – karnitina iz plazme i suhe kapi krvi. Statističkim testom pokazana je značajna razlika dobivenih vrijednosti između pojedinih acil – karnitina, a za slobodni karnitin dobivena je 36% veća koncentracija u odnosu na suhu kap krvi. *Slika 6.* Prikazuje dobiven profil acil – karnitina iz plazme i suhe kapi krvi tog rada. Naglasak je stavljen na C14, C16 te C18:1 koji su se značajno razlikovali, a karakteristični su za već predhodno opisane poremećaje oksidacije masnih kiselina. Za dijagnostiku svih ostalih metaboličkih poremećaja, mnoge su studije pokazale korisnost i plazme i suhe kapi krvi kao uzorka za analizu profila acil – karnitina. Danas, skoro svi laboratoriji provode analizu profila acil-karnitina koristeći tandemsku spektrometriju masa (MS/MS) kao analitičku platformu za analizu (Rinaldo i sur., 2008).

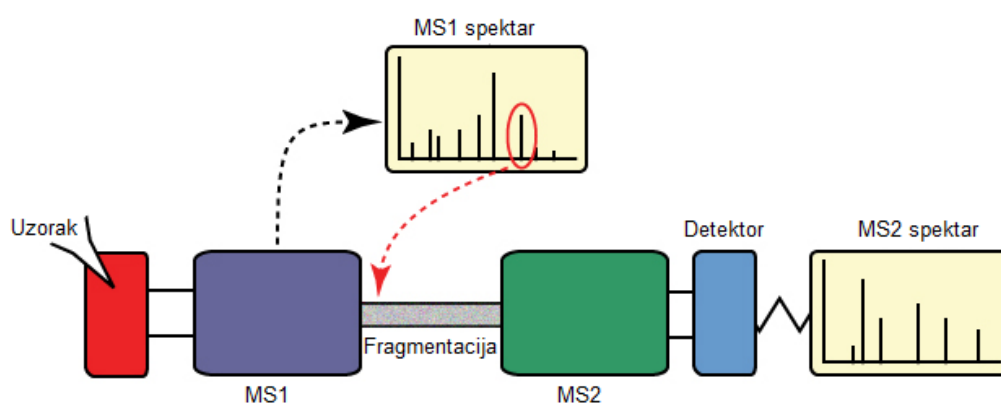


Slika 6. Prikaz dobivenog spektra profila acil – karnitina iz plazme i suhe kapi krvi s naglaskom na naznačene analite (preuzeto i prilagođeno prema De Sain i sur., 2013)

## 1.5 Tandemska spektrometrija masa

Tijekom posljednjih nekoliko godina dvojni maseni spektrometri (engl. *tandem mass spectrometers*, MS/MS), također poznati kao „trostruki kvadropolni” maseni spektrometri, postali su značajni i pouzdani rutinski analitički uređaji. Ti su analizatori, osobito ako su povezani tehnikama pripreme uzorka temeljene na tekućinskoj kromatografiji visoke učinkovitosti (HPLC), omogućili provedbu kvantitativne i kvalitativne analize malih organskih molekula u femtomolskom rasponu, - i to kako ksenobiotika, tako i endogenih metabolita. HPLC-MS/MS (engl. *high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) predstavlja sustav koji omogućuje odjeljivanje komponenata smjese i njihovu detekciju na temelju omjera mase i naboja ( $m/z$ ) nabijenih čestica. Čini ga vezani sustav tekućinske kromatografije visokog učinka zajedno sa spektrometrijom masa. Ova tehnologija koristi se danas u brojnim područjima, od toksikoloških ispitivanja, proteomike, endokrinoloških laboratorija, pa sve do metaboličkih laboratorija u svrhu ispitivanja metaboličkih bolesti i novorođenačkog probira (Pitt, 2009).

Pridjev tandemski koristimo, jer se ovakav tip instrumenta sastoji od dva serijski povezana masena analizatora razdvojena kolizijskom ćelijom u kojoj se vrši fragmentacija iona. To znači da nabijena molekula najprije prolazi kroz prvi spektrometar masa i kolizijsku ćeliju prije nego što stigne do drugog spektrometra masa. (Slika 7.) Maseni analizator se sastoji od tri osnovna dijela: ionskog izvora, analizatora masa (MS1 i MS2), te detektora. Svaki od tih dijelova može biti različitih karakteristika, ovisno o konfiguraciji uređaja.



Slika 7. Shematski prikaz tandemске spektrometrije masa (preuzeto i prilagođeno prema Jungmann i Heeren, 2013)

Iako je bolja učinkovitost analiza HPLC-MS/MS (poboljšana preciznost i točnost, bolja specifičnost i povećana osjetljivost koje rezultiraju manjim potrebnim količinama uzorka te nižim granicama kvantifikacije) jasno dokazana tijekom proteklih godina, još uvijek je primjena te tehnologije prisutna u relativno malo laboratorija. To je zato je za spektrometriju masa potrebna zahtjevna vještina operatera, ali i financijsko opterećenje kod kupnje samog uređaja. Osim toga, ako se takva tehnika uvodi od početka, istraživača očekuje prilično duga eksperimentalna faza prije moguće provedbe temeljite konačne validacije pretrage (Seger i Griesmacher, 2007).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Analiza profila acil – karnitina, uz analizu organskih kiselina u mokraći i mjerenje aminokiselina u plazmi čini osnovu laboratorijske dijagnostike nakon postavljene sumnje na nasljednu metaboličku bolest. Takvi poremećaji su nedovoljno prepoznati zbog svoje rijetkosti, ali se provođenjem racionalne dijagnostike, mogu pravovremeno dijagnosticirati. Metodom određivanja profila acil – karnitina iz plazme, omogućit će se pravovremena dijagnostika i praćenje tijeka liječenja u većine bolesnika s nasljednim metaboličkim bolestima.

Kratku validaciju metode je neophodno provoditi za sve nove analitičke postupke koji se planiraju koristiti u rutinskom radu laboratorija. Sukladno tome, cilj je ovog rada provesti validaciju nove metode radi uvođenja u svakodnevnu kliničku primjenu. Kao dio postupka validacije provedena je:

- 1.) Procjena preciznosti
  - ponovljivost
  - međupreciznost
- 2.) Procjena točnosti
- 3.) Sljedivost.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 1.1 Materijali

Za validaciju ove analitičke metode korištena su dva komercijalna kontrolna uzorka naziva ERDNIM 2017.1. i ERNDIM 2017.2. (engl. *European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism*) kao dio vanjske kontrole kvalitete. Za izvođenje analize korišten je *MassChrom®* komercijalni kit reagensa, dizajniran na način da omogućuje brzu i jednostavnu semi – kvantitativnu analizu tandemskom spektrometrijom masa. Analiza je provedena sukladno postupku proizvođača.

##### Instrumenti:

- HPLC sustav s pumpom, injektorom, autosemplerom i detektorom
- Termostabilna mješalica (Thermoshaker)
- Fen za sušenje uzoraka
- Centrifuga
- Pipete i nastavci za pipete
- Mikrotitarske pločice sa zaštitnom folijom
- Eppendorf epruvete

##### *MassChrom®* komercijalni kit:

- Mobilna faza
- Interni standard
- Derivatizacijski reagens
- Rekonstitucijski pufer
- Ekstrakcijski pufer
- Otopina za ispiranje

#### 1.2 Metode

##### 1. Predanalitička faza

#### a. Vrsta uzorka

Karnitin i njegovi esteri nalaze se u biološkim tekućinama. Preferirani tip uzorka za analizu simptomatske i asipmtomatske populacije je serum, odnosno plazma. Upravo ovu vrstu uzorka zahtjeva naša metoda određivanja profila acil – karnitina.

Neki laboratoriji koriste suhu kap krvi za analizu upravo zbog jednostavnosti za transport i činjenice da može povećati osjetljivost same metode pri detekciji poremećaja oksidacije dugolančanih masnih kiselina. Analiza iz suhe kapi krvi obično je u svrhu novorođenačkog probira. Nekoliko acil – karnitina moguće je odrediti i analizom staničnih kultura fibroblasta, limfocita i amniocita (za prenatalnu dijagnostiku), kao i homogeniziranih jetrenih i mišićnih stanica.

#### b. Volumen uzorka

Volumen i oblik uzorka prilikom transporta te njegovo rukovanje razlikuje se od laboratorija do laboratorija po točno uspostavljenim pravilima i zahtjevima. Za razliku od suhe kapi krvi koja može biti na sobnoj temperaturi, ostale vrste uzoraka potrebno je zamrznuti što je prije moguće i transportirati na suhom ledu ako je transport potreban. Pohrana uzoraka na sobnoj temperaturi uzrokuje progresivan gubitak acil – karnitina, posebice degradaciju kratkolančanih masnih kiselina u većoj mjeri nego dugolančanih. Acil – karnitini stabilni su na temperaturi od - 20°C. Naša metoda koristi svega 3 µL uzorka plazme.

### 1.2.1 Postupak analize na LC / MS – MS

Prije same analize potrebno je pripremiti uzorke acil – karnitina za analizu. Na radnu listu potrebno je upisati sekvencu te obilježiti Eppendorf epruvete i posložiti ih na stalak.

#### c. Rekonstitucija internog standarda (IS)

Komercijalno dostupan IS koristi se za kalibraciju svakog uzorka i obilježen je izotopom. Svaki IS sadrži certifikat proizvođača i pripravlja se po njihovom postupku. Prema certifikatu proizvođača, napravljena je *Tablica 4.* koja prikazuje koncentracije pojedinih acil – karnitina. Nakon rekonstitucije, IS dodaje se svakom uzorku već u prvom koraku analize i prolazi čitavu predanalitičku fazu zajedno s uzorkom. Za našu metodu, liofiliziranom internom standardu dodana je ekstrakcijska otopina sukladno postupku proizvođača. S obzirom da je IS lako raspadljiv, treba izbjegavati direktno izlaganje IS suncu i pohranjivati ga na niskoj

temperaturi (2 - 8°C). Tako pohranjen i čvrsto zatvoren u odmjernoj tikvici, stabilan je do tri tjedna.

Tablica 4. Koncentracije IS obilježenog izotopom LOT no.1615 prema proizvođaču *MassChrom®* za acil – karnitine

| <i>Analit</i>    | <i>Koncentracija / <math>\mu\text{mol/L}</math></i> | <i>Koncentracija u uzorku / <math>\mu\text{mol/L}</math><br/>(200 <math>\mu\text{L}</math> IS + 3 <math>\mu\text{L}</math> plazme)</i> |
|------------------|---|--|
| <b>C0 – d9</b>   | 0,352   | 22,7   |
| <b>C2 – d3</b>   | 0,170   | 10,9   |
| <b>C3 – d3</b>   | 0,045   | 2,90   |
| <b>C4 – d3</b>   | 0,022   | 1,40   |
| <b>C5 – d9</b>   | 0,023   | 1,48   |
| <b>C5DC – d6</b> | 0,021   | 1,34   |
| <b>C6 – d3</b>   | 0,022   | 1,44   |
| <b>C8 – d3</b>   | 0,021   | 1,33   |
| <b>C10 – d3</b>  | 0,018   | 1,13   |
| <b>C12 – d3</b>  | 0,022   | 1,45   |
| <b>C14 – d3</b>  | 0,020   | 1,31   |
| <b>C16 – d3</b>  | 0,043   | 2,80   |
| <b>C18 – d3</b>  | 0,041   | 2,66   |

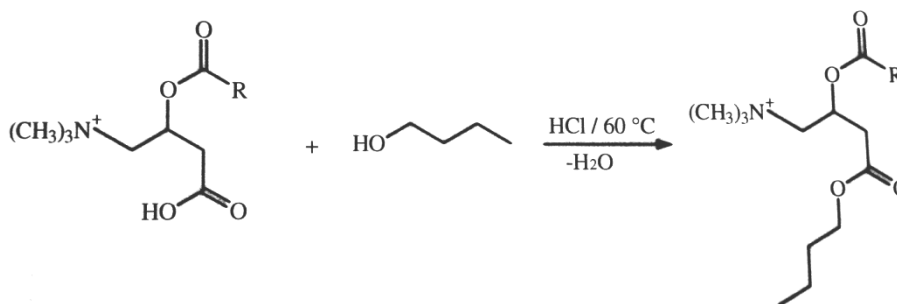
#### d. Priprema uzorka – protokol

*Deproteinizacija:* 200  $\mu\text{L}$  otopljenog internog standarda + 3  $\mu\text{L}$  uzorka staviti u Eppendorf epruvetu i cantrifugirati na 13 000 okretaja / 5 min. Interni standard priprema se prema smjernicama *ChromSystems Instruments and Chemical Standards* i koristi se kao zasebni kalibrator za svaki uzorak kako bi se smanjio utjecaj matrice na analizu na minimum. Obilježen je deuterijem i topljiv u acetonitrilu, mravljoj kiselini ili metanolu. Potrebno je uključiti digestor i mješalicu (Thermoshaker) kako bi se postigla temperatura od 25°C. Pipetom se pažljivo sadržaj iznad taloga prebacuje u jažice miktitarske pločice i stavlja na mješalicu (600 rpm). Nakon toga se sadržaj u jažicama suši pod strujom toplog zraka.

*Derivatizacija:* uzorku se doda 60  $\mu\text{L}$  derivatizacijskog reagensa zbog čega se uzorak pretvara u butiril estere. Acil – karnitini najčešće se analiziraju kao butiril esteri, iako su mogući i drugi postupci (primjerice metilacija). Uzorak tako postaje stabilniji. Pločica se



prekriva zaštitnom folijom i stavlja na mješalicu (600 rpm, 60°C, 15min) nakon čega se skida zaštitna folija i ponovno miješa na mješalici pod istim uvjetima istovremeno sušeći fenom dok ne upari do suha. *Slika 8.* prikazuje derivatizaciju acil – karnitina u butiril estere.



Slika 8. Derivatizacija acil – karnitina butanolom u butiril estere  
(R = alkilni ogranak)

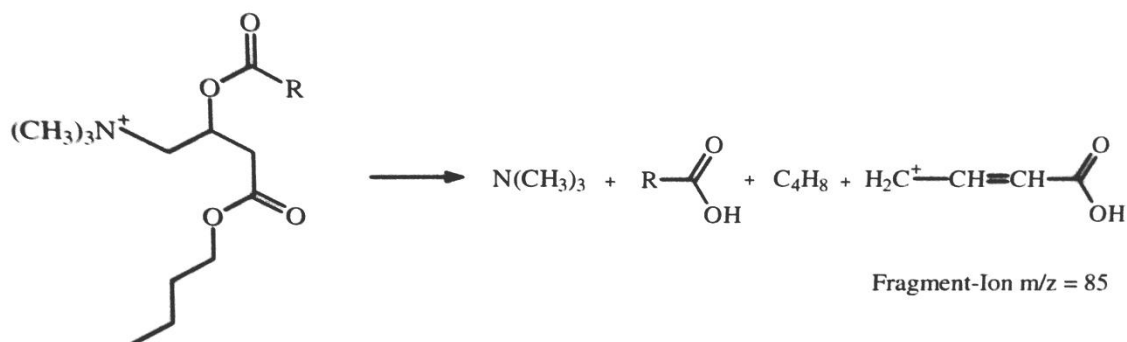
*Rekonstitucija:* u jažice dodati 100  $\mu$ L rekonstitucijskog pufera, prekriti zaštitnom folijom i kratko promješati na mješalici (600  $\mu$ L, 1 min) na sobnoj temperaturi te prebaciti mikrotitarsku pločicu u autosempler na LC – MS / MS.

## 2. Analitička faza

Metoda koristi UPLC , tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography*) koja pruža prednosti tehnoloških dosega u djelotvornosti kemije čestica, optimizaciji sistema, dizajnu detektora i obradi podataka te njihovoj kontroli. Ona proizlazi iz HPLC-a koji koristi fine čestice, štedi vrijeme i smanjuje potrošnju otapala. Kako se veličina čestica punila kod HPLC-a smanjuje, efikasnost i rezolucija se povećavaju. Koristeći manje čestice punila (promjer < 2,5  $\mu$ m) broj pikova koje je moguće odvojiti u jedinici vremena dovodi se u novo područje poznato kao ultra djelotvornost. Također, ima i mnoge prednosti pred klasičnim metodama kao što su: robusnost, lakoća korištenja, dobra selektivnost i prilagodljiva osjetljivost (Zhu i sur.,2005). UPLC kolone punjene su znatno manjim česticama (1,7 – 1,8  $\mu$ m) od HPLC kolona (3 – 10  $\mu$ m) te za razliku od HPLC-a postiže tlakove do 1000 bara, dok je HPLC ograničen na 400 bara. Navedene promjene u tehnologiji instrumenta i kolona dovele su do značajnog povećanja razlučivosti, brzine i osjetljivosti tekućinske kromatografije. (www.waters.com)

U ovome je sustavu spektrometar masa samo detektor, dok se analiti razdvajaju mijenjanjem udjela vode ili pufera pomiješanih s organskim otapalom. (*Mobilna faza A* : 0,1 % mravlja kiselina – voda, *Mobilna faza B* : metanol)

Nakon što se analiti razdvoje na UPLC-u, oni se unose u tandemski spektrometar masa. Razlikujemo nekoliko vrsta ionizacije uzorka, a za metodu određivanja profila acil – karnitina koristi se elektrosprej ionizacija (engl. *ElectroSpray Ionisation*, ESI) koja je samo jedna od postojećih tehnika ionizacije uzorka na atmosferskom tlaku. Ionizacija se odvija primjenom visokog napona uz plinoviti dušik dok je analit u tekućoj fazi. Otopljeni analit, stvara ione u otopini koja se propušta kroz kapilaru u prostor pod vakuumom. Kada otopina uđe u evakuiranu komoru, ona se raspršuje u aerosol, zbog odbijanja iona u otopini. Otapalo isparava s kapljicama, ostavljajući ione analita. Ova tehnika se koristi za ionizaciju makromolekula jer se one vrlo lako fragmentiraju. Ionizacijom molekula nastaju molekularni ioni koji se dalje mogu fragmentirati u fragmente koji su karakteristični za pojedinu molekulu. (*Slika 9.*)

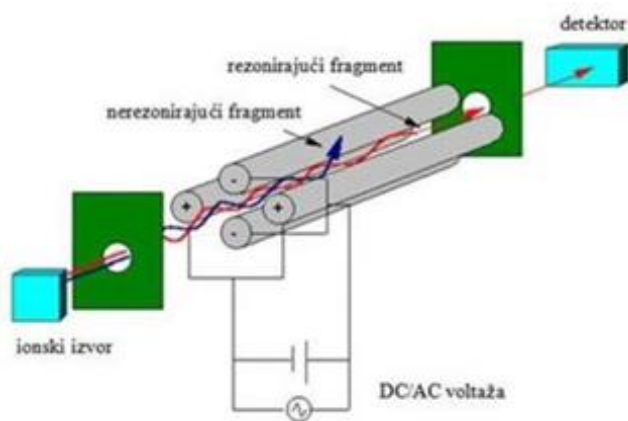


Slika 9. Prikaz fragmentacije molekule na karakteristične fragmente  
(R = alkilni ogranak)

Nakon ionizacije, slijedi kretanje u masenom analizatoru pod visokim vakuumom pri čemu se događa razdvajanje na temelju omjera mase i naboja. Postoje različiti tipovi masenog analizatora, ovdje se radi o kvadripolnom analizatoru koji se sastoji od dva kvadripola te kolizijske ćelije (Pitt, 2009).

Kvadripol se sastoji od 4 paralelne elektrode hiperboličnog presjeka, od kojih dvije imaju isti, a dvije suprotni naboj. Mijenjanjem polariteta elektroda nastaje promjenjivo električno polje koje omogućuje odbijanje ili prolaz samo jednog iona određenog  $m/z$  omjera duž osi kvadripola do detektora. Svi ostali prisutni ioni će se zalijepiti na elektrode ili će ih odstraniti

vakuum sustav. Softverski je određena voltaža koja će se koristiti, te će stoga ioni različitog  $m/z$  omjera biti sekvencijski propušteni do detektora u određenom trenutku, a kao rezultat toga će se dobiti spektar. Na *slici 10.* je prikazan opisan princip kretanja iona kroz kvadripol.



Slika 10. Kretanje iona kroz kvadripol (preuzeto i prilagođeno prema Pitt, 2009)

U prvom se kvadripolu (Q1) događa propuštanje i/ili skeniranje, u drugom (Q2) koji služi kao kolizijska ćelija događa se fragmentacija iona ako je napunjen dušikom, treći kvadripol (Q3) isto tako služi za propuštanje i/ili skeniranje iona. Ova metoda koristi različite SCAN modove za različite analite. U slučaju određivanja profila acil - karnitina primjenjuje se *Neutral Loss Scan* ili *Precursor Ion Scan* (Schwartz i sur.,1990). (Slika 11.)

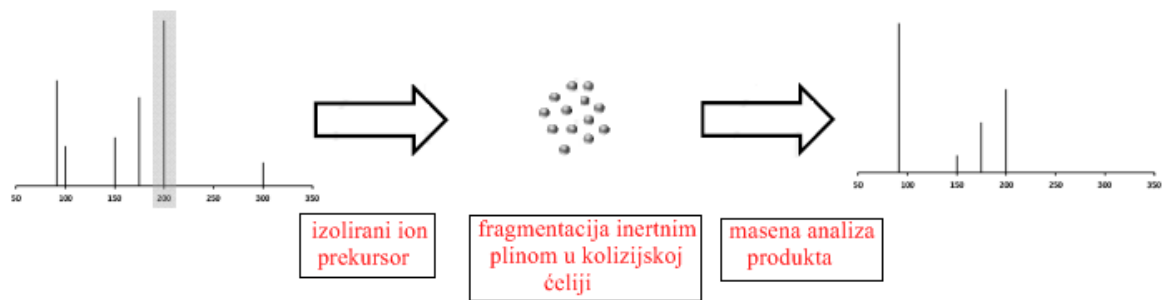


Slika 11. Prikaz *Neutral Loss Scan* i *Precursor Ion Scan* moda (preuzeto od Madeira i Florencio, 2012)

*CID – kolizijska ćelija, Q1,Q2,Q3 - kvadripoli*

Softver je podešen tako da kroz prvi kvadripol (Q1) prolaze svi ioni, fragmentiraju se u kolizijskoj ćeliji (Q2), a kroz treći kvadripol (Q3) prolaze samo specifični ioni.

Nakon što prođu kroz maseni analizator, ioni dolaze i do detektora koji se sastoji od dioda koje pojačavaju ionske impulse i pretvaraju ih u signal. Dobiveni spektar predstavlja funkciju zbroja svih iona dobivenih u jedinici vremena što se grafički prikazuje kao ovisnost  $m/z$  vrijednosti o intenzitetu signala (Hoffmann, 1996). (Slika 12.)



Slika 12. Princip dobivanja masenog spektra nakon izolacije iona prekursora u MS1, fragmentacije u kolizijskoj ćeliji inertnim plinom i analize produkta u drugom masenom spektrometru ((preuzeto i prilagođeno prema Madeira i Florencio, 2012)

### 3. Postanalitička faza

Na temelju dobivenih vrijednosti određena je nepreciznost u seriji (ponovljivost) i nepreciznost iz dana u dan (međupreciznost) te točnost.

#### 1.2.2 Postupak validacije

Ovisno o opsežnosti postupka evaluacije razlikujemo validaciju i verifikaciju. Validacija je postupak ispitivanja analitičkih karakteristika neke metode ili analitičkog sustava, a provodi ju uglavnom proizvođač. Prema direktivi EU IVD 98/79/EC (engl. *Directive on in vitro diagnostic medical devices*), svaki proizvođač mora provesti postupak validacije za svaku metodu i/ili analitički sustav koji ima dijagnostičku svrhu. Verifikacija je postupak evaluacije, kojim se potvrđuju analitičke karakteristike neke metode, ispitane postupkom validacije, te da su one primjenjive za svakodnevni rad u rutinskom laboratoriju. Verifikaciju provodi laboratorij koji uvodi novu metodu i/ili analitički sustav, i ona je dovoljna ako se u laboratorij uvodi originalna metoda proizvođača sa dokazima o provedenoj validaciji. Ukoliko se uvodi

nova metoda uspostavljena u vlastitom laboratoriju (tzv. *in-house-metoda*) ili se modificira metoda proizvođača, potrebno je provesti postupak validacije.

U postupku validacije metode za određivanje profila acil – karnitina primjenom tandemске spektrometrije masa određena je:

1. Preciznost – slaganje niza nezavisnih mjerenja izvedenih u određenim uvjetima. Mjeri se i računa nepreciznost metode, a ona se izražava koeficijentom varijacije (CV %), uz izračunatu srednju vrijednost ispitivanog analita.
2. Točnost – bliskost slaganja između srednje vrijednosti niza vrijednosti neke veličine, dobivenih opetovanim mjerenjem, i referente vrijednosti te veličine. Mjera za točnost je odstupanje (engl. *bias*), a definirano je kao razlika između srednje vrijednosti rezultata dobivenih određenom metodom u određenim uvjetima i poznate vrijednosti certificiranoga referentnog materijala ili vrijednosti izmjerene usporednom metodom.
3. Sljedivost – svojstvo rezultata ispitivanja ili vrijednosti etalona po kojemu se može povezati s navedenim referencijama, obično nacionalnim ili međunarodnim etalonima, kroz neprekinuti lanac usporedbi koje sve imaju navedene nesigurnosti.

### 1.2.3 Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je program Microsoft Office Excel 2016, a dobiveni podaci uspoređivani su s kriterijima prihvatljivosti.

#### 1. Procjena preciznosti

Procjenu preciznosti izračunavamo prema formulama za nepreciznosti u seriji (ponovljivost) i nepreciznost iz dana u dan (međupreciznost). Preciznost isključivo ovisi o distribuciji slučajne pogreške te ne govori o točnosti i pravoj vrijednosti. Nepreciznost se izražava kao standardna devijacija (SD) ili koeficijent varijacije koji govori o odnosu standardne devijacije prema aritmetičkoj sredini (koliko % od aritmetičke sredine iznosi standardna devijacija) (Šimundić, 2006).

- a. Ponovljivost, preciznost u seriji ( $SD_r$ ) računata prema formuli:

$$SDr = \sqrt{\frac{Sd_1^2 + Sd_2^2 + Sd_3^2 + Sd_4^2 + Sd_5^2}{D}} \quad CV(\%) = \frac{SDr \times 100}{\bar{x}}$$

Skupno standardno odstupanje, za 5 dana ( $D = 5$ ) gdje je  $Sd_1, Sd_2, Sd_3, Sd_4, Sd_5$  standardno odstupanje za svaku seriju od tri mjerenja, a  $CV$  koeficijent varijacije.

b. Međupreciznost, tj. preciznost iz dana u dan ( $SD_b$ ), izračunava se pomoću varijance srednjih vrijednosti mjerenja izračunatih za svaki dan eksperimenta prema formuli:

$$\bar{\bar{X}} = \frac{\bar{x}_1 + \bar{x}_2 + \bar{x}_3 + \bar{x}_4 + \bar{x}_5}{D} \quad SDr = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D (\bar{X}_d - \bar{\bar{X}})^2}{D-1}}$$

$$CV(\%) = \frac{SD_b \times 100}{\bar{x}}$$

$\bar{\bar{x}}$  *grand mean* – srednja vrijednost svih srednjih vrijednosti mjerenja tijekom pet dana  
(*x ukupni*)

$S_b$  – međupreciznost; standardno odstupanje aritmetičkih sredina dobivenih za svaki dan  
(seriju) mjerenja ( $D = 5$ ), a  $CV$  koeficijent varijacije.

Dobiveni rezultati uspoređivani su s kriterijima prihvatljivosti koje je odredio proizvođač. Za procjenu ponovljivosti vrijedi kriterij prihvatljivosti proizvođača:  $CV$  između 4 – 20 %, a za međupreciznost kriterij prihvatljivosti je:  $CV$  između 8 – 28 %. Prema dokumentaciji za validaciju novih analitičkih metoda (OP – 5.5 – 000 – 1/4) *Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku (KZLD) (Kliničkog bolničkog centra Zagreb)* dozvoljeno odstupanje od 10 % u odnosu na deklarirane vrijednosti proizvođača smatraju se prihvatljivima.

## 2. Procjena točnosti

Za svaku kontrolu napravljena je i procjena točnosti. Ciljne vrijednosti kontrola uspoređivane su s dobivenim vrijednostima, te je njihov odnos iskazan koeficijentima varijacije (CV %). Ciljne vrijednosti čine medijani svih laboratorija koji su proveli analizu kontrola ERNDIM 2017.1. i ERNDIM 2017.2. za vanjsku procjenu kvalitete. Za mjeru točnosti postavljen je kriterij prihvatljivosti  $CV < 15\%$  za visoke koncentracije analita, odnosno  $CV < 20\%$  za one analite čija je koncentracija niska (OP – 5.5 – 000 – ¼).

## 3. Sljedivost

Sa svrhom osiguravanja točnih, reproducibilnih i pouzdanih rezultata ne samo unutar pojedinog laboratorija, već i na međunarodnoj razini, ključan je proces harmonizacije. Unatoč primjeni raznovrsnih metoda u provođenju pretraga, različitoj opterećenosti pojedinih sustava brojem pacijenata, financijskim mogućnostima, zajednički cilj jest postići globalnu harmonizaciju koja bi izjednačila kvalitetu usluge na svjetskoj razini. Harmonizacija podrazumijeva prepoznavanje, razumijevanje i objašnjavanje razlika među pojedinim laboratorijima s ciljem postizanja uniformnosti.

ERNDIMQA (engl. *External Quality Assurance Programme*) sustav je koji omogućuje osiguranje vanjske kvalitete pri provođenju metoda određivanja aminokiselina, kvantitativnih organskih kiselina, purina i pirimidina, cistina i leukocita, lizosomskih enzima te specijalnih analiza u serumu i urinu pa tako i karnitina i acil – karnitina. Sustav postoji na način da svaki laboratorij u svijetu, koji provodi metodu po međunarodnim standardima, upisuje dobivene rezultate za svoj laboratorij. Sukladno tome, izračunaju se medijani odnosno srednje vrijednosti svih laboratorija koji su provodili tu analizu. Medijani su izračunati prema publikaciji *Sciacovelli, ClinChimActa 309 (2001) 183-189*. Za mjeru sljedivosti provedene metode, dobiveni rezultat uspoređuje se s rezultatima svih laboratorija. Nakon statističke analize dobiva se izvještaj s detaljnim informacijama na kojem je naznačena vrsta uzorka, analit, metoda i rezultat. Izvještaj donosi i  $Z$  – vrijednost, vrijednost koja govori koliko je dobro izvedena analiza.  $Z$  – vrijednost manja od 2 znači odličnu izvedbu, 2 – 3 prihvatljivu izvedbu, a  $Z$  – vrijednost veća od 3 upućuje na slabu izvedbu. Također, rezultat se svrstava u skupine ovisno o tome koliko je veći ili manji u odnosu na ostale laboratorije.

## 4. REZULTATI

Koristeći predhodno opisan postupak analize određivanja acil – karnitina iz plazme tandemskom spektrometrijom masa, dobiveni su slijedeći rezultati. Tablice u ovom poglavlju sustavno prikazuju rezultate, kao i izračunatu preciznost i točnost prema postupku navedenim u poglavlju 3. *Materijali i metode*.

Tablica 5. Rezultati analize za slobodni karnitin kroz 5 dana u triplikatu.

| <i>C0</i>       |               |        | <i>ERNDIM 2017.1.</i> |        |        |
|-----------------|---------------|--------|-----------------------|--------|--------|
| DAN             | 1             | 2      | 3                     | 4      | 5      |
| #1              | 72,763        | 64,629 | 76,730                | 66,543 | 63,1   |
| #2              | 74,484        | 73,447 | 70,738                | 61,236 | 72,636 |
| #3              | 72,339        | 73,002 | 77,418                | 66,605 | 70,073 |
| ( $\bar{x}$ )   | 73,195        | 70,359 | 74,962                | 64,795 | 68,603 |
| SD              | 1,136         | 4,968  | 3,674                 | 3,082  | 4,935  |
| <b>X ukupni</b> | <b>70,383</b> |        |                       |        |        |

Tablica 6. Dobivena preciznost i točnost za slobodni karnitin

| Preciznost u seriji |       | Preciznost iz dana u dan |       | Točnost             |                   |       |       |
|---------------------|-------|--------------------------|-------|---------------------|-------------------|-------|-------|
| SD <sub>r</sub>     | CV %  | SD <sub>b</sub>          | CV %  | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %  |
| 1,580               | 2,245 | 3,977                    | 5,651 | 70,383              | 78,000            | 5,386 | 7,260 |

Tablica 7. Rezultati statističke obrade podataka za slobodni karnitin

| <i>C0</i>       |               |        | <i>ERNDIM 2017.2.</i> |        |         |
|-----------------|---------------|--------|-----------------------|--------|---------|
| DAN             | 1             | 2      | 3                     | 4      | 5       |
| #1              | 89,6          | 87,263 | 101,999               | 90,625 | 97,486  |
| #2              | 88,1          | 88,679 | 99,465                | 93,629 | 104,923 |
| #3              | 84,44         | 89,654 | 92,082                | 88,579 | 101,278 |
| ( $\bar{x}$ )   | 87,380        | 88,532 | 97,849                | 90,944 | 101,229 |
| SD              | 2,654         | 1,202  | 5,152                 | 2,540  | 3,719   |
| <b>X ukupni</b> | <b>93,187</b> |        |                       |        |         |



Tablica 8. Dobivena preciznost i točnost za slobodni karnitin

| Preciznost u seriji |       | Preciznost iz dana u dan |       | Točnost             |                   |       |       |
|---------------------|-------|--------------------------|-------|---------------------|-------------------|-------|-------|
| SD <sub>r</sub>     | CV    | SD <sub>b</sub>          | CV    | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %  |
| 1,475               | 1,582 | 6,059                    | 6,502 | 93,187              | 94,800            | 1,141 | 1,214 |

Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. iznosi 2,25 % , a nepreciznost iz dana u dan 5,65 %. Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2. iznosi 1,58 %, a nepreciznost iz dana u dan 6,50 % .

Točnost izražena koeficijentom varijacije, CV, iznosi 7,26 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. odnosno 1,21 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2.

Vrijednosti pripadaju unutar kriterija prihvatljivosti.

Tablica 9. Rezultati analize za acetil - karnitin kroz 5 dana u triplikatu.

|                 | <i>C2</i> |        | <i>ERNDIM 2017.1.</i> |        |        |
|-----------------|-----------|--------|-----------------------|--------|--------|
| DAN             | 1         | 2      | 3                     | 4      | 5      |
| #1              | 26,949    | 26,423 | 31,554                | 26,948 | 25,593 |
| #2              | 27,69     | 29,894 | 28,593                | 25,465 | 29,691 |
| #3              | 27,827    | 30,718 | 30,894                | 28,388 | 27,802 |
| ( $\bar{x}$ )   | 27,489    | 29,012 | 30,347                | 26,934 | 27,695 |
| SD              | 0,472     | 2,279  | 1,554                 | 1,462  | 2,051  |
| <b>X ukupni</b> |           |        | <b>28,295</b>         |        |        |

Tablica 10. Dobivena preciznost i točnost za acetil - karnitin

| Preciznost u seriji |       | Preciznost iz dana u dan |       | Točnost             |                   |       |       |
|---------------------|-------|--------------------------|-------|---------------------|-------------------|-------|-------|
| SD <sub>r</sub>     | CV %  | SD <sub>b</sub>          | CV %  | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %  |
| 0,698               | 2,468 | 1,377                    | 4,867 | 28,295              | 31,300            | 2,125 | 7,130 |

Tablica 11. Rezultati statističke obrade podataka za acetil - karnitin

| <i>C2</i>       |        |        | <i>ERNDIM 2017.2.</i> |        |        |
|-----------------|--------|--------|-----------------------|--------|--------|
| DAN             | 1      | 2      | 3                     | 4      | 5      |
| #1              | 18,326 | 16,772 | 18,922                | 17,498 | 19,756 |
| #2              | 17,228 | 17,432 | 17,787                | 18,816 | 21,075 |
| #3              | 16,857 | 17,081 | 17,995                | 16,736 | 20,184 |
| ( $\bar{x}$ )   | 17,470 | 17,095 | 18,235                | 17,683 | 20,338 |
| SD              | 0,764  | 0,330  | 0,604                 | 1,052  | 0,673  |
| <b>X ukupni</b> |        |        | <b>18,164</b>         |        |        |

Tablica 12. Dobivena preciznost i točnost za acetil - karnitin

| Preciznost u seriji |              | Preciznost iz dana u dan |              | Točnost             |                   |       |              |
|---------------------|--------------|--------------------------|--------------|---------------------|-------------------|-------|--------------|
| SD <sub>r</sub>     | CV           | SD <sub>b</sub>          | CV           | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %         |
| 0,262               | <b>1,440</b> | 1,283                    | <b>7,065</b> | 17,400              | 18,164            | 0,540 | <b>3,039</b> |

Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. iznosi 2,47 %, a nepreciznost iz dana u dan 4,87 %. Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2. iznosi 1,44 %, a nepreciznost iz dana u dan 7,07 %.

Točnost izražena koeficijentom varijacije, CV, iznosi 7,13 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. odnosno 3,04 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2.

Vrijednosti pripadaju unutar kriterija prihvatljivosti.

Tablica 13. Rezultati analize za propionil - karnitin kroz 5 dana u triplicatu.

| <i>C3</i>       |       |       | <i>ERNDIM 2017.1.</i> |       |       |
|-----------------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1     | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 2,473 | 1,841 | 2,309                 | 2,115 | 1,66  |
| #2              | 2,071 | 2,025 | 1,966                 | 2,359 | 2,122 |
| #3              | 2,625 | 1,979 | 2,351                 | 2,415 | 1,979 |
| ( $\bar{x}$ )   | 2,390 | 1,948 | 2,209                 | 2,296 | 1,920 |
| SD              | 0,286 | 0,096 | 0,211                 | 0,160 | 0,237 |
| <b>X ukupni</b> |       |       | <b>2,153</b>          |       |       |

Tablica 14. Dobivena preciznost i točnost za propionil - karnitin

| Preciznost u seriji |       | Preciznost iz dana u dan |       | Točnost             |                   |       |       |
|---------------------|-------|--------------------------|-------|---------------------|-------------------|-------|-------|
| SD <sub>r</sub>     | CV %  | SD <sub>b</sub>          | CV %  | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %  |
| 0,073               | 3,396 | 0,210                    | 9,735 | 2,153               | 2,300             | 0,104 | 4,679 |

Tablica 15. Rezultati statističke obrade podataka za propionil - karnitin

|                 | <i>C3</i> |       | <i>ERNDIM 2017.2.</i> |       |       |
|-----------------|-----------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1         | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 7,671     | 8,345 | 7,190                 | 9,062 | 7,381 |
| #2              | 6,525     | 6,652 | 6,980                 | 8,870 | 7,235 |
| #3              | 6,183     | 7,077 | 8,184                 | 7,172 | 8,575 |
| ( $\bar{x}$ )   | 6,793     | 7,358 | 7,451                 | 8,368 | 7,730 |
| SD              | 0,779     | 0,881 | 0,643                 | 1,040 | 0,735 |
| <b>X ukupni</b> |           |       | <b>7,540</b>          |       |       |

Tablica 16. Dobivena preciznost i točnost za propionil - karnitin

| Preciznost u seriji |       | Preciznost iz dana u dan |       | Točnost             |                   |       |       |
|---------------------|-------|--------------------------|-------|---------------------|-------------------|-------|-------|
| SD <sub>r</sub>     | CV    | SD <sub>b</sub>          | CV    | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %  |
| 0,152               | 2,014 | 0,575                    | 7,621 | 7,540               | 7,960             | 0,297 | 3,831 |

Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. iznosi 3,39 %, a nepreciznost iz dana u dan 9,74 %. Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2. iznosi 2,01 %, a nepreciznost iz dana u dan 7,62 %.

Točnost izražena koeficijentom varijacije, CV, iznosi 4,68 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. odnosno 3,81 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2.

Vrijednosti pripadaju unutar kriterija prihvatljivosti.

Tablica 17. Rezultati analize za butiril - karnitin kroz 5 dana u triplikatu.

| <i>C4</i>       |              |       | <i>ERNDIM 2017.1.</i> |       |       |
|-----------------|--------------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1            | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 4,31         | 3,862 | 4,820                 | 3,868 | 3,724 |
| #2              | 4,186        | 4,292 | 4,252                 | 3,712 | 4,041 |
| #3              | 4,178        | 4,189 | 4,469                 | 4,123 | 4,038 |
| ( $\bar{x}$ )   | 4,225        | 4,114 | 4,514                 | 3,901 | 3,934 |
| SD              | 0,074        | 0,225 | 0,287                 | 0,207 | 0,182 |
| <b>X ukupni</b> | <b>4,138</b> |       |                       |       |       |

Tablica 18. Dobivena preciznost i točnost za butiril - karnitin

| Preciznost u seriji |              | Preciznost iz dana u dan |              | Točnost             |                   |       |               |
|---------------------|--------------|--------------------------|--------------|---------------------|-------------------|-------|---------------|
| SD <sub>r</sub>     | CV %         | SD <sub>b</sub>          | CV %         | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %          |
| 0,078               | <b>1,881</b> | 0,248                    | <b>6,004</b> | 4,138               | 5,060             | 0,652 | <b>14,183</b> |

Tablica 19. Rezultati statističke obrade podataka za butiril - karnitin

| <i>C4</i>       |              |       | <i>ERNDIM 2017.2.</i> |       |       |
|-----------------|--------------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1            | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 1,061        | 0,915 | 1,049                 | 0,941 | 1,013 |
| #2              | 0,968        | 0,931 | 0,941                 | 1,019 | 1,085 |
| #3              | 0,887        | 0,943 | 0,956                 | 0,880 | 1,071 |
| ( $\bar{x}$ )   | 0,972        | 0,930 | 0,982                 | 0,947 | 1,056 |
| SD              | 0,087        | 0,014 | 0,059                 | 0,070 | 0,038 |
| <b>X ukupni</b> | <b>0,977</b> |       |                       |       |       |

Tablica 20. Dobivena preciznost i točnost za butiril - karnitin

| Preciznost u seriji |              | Preciznost iz dana u dan |              | Točnost             |                   |       |               |
|---------------------|--------------|--------------------------|--------------|---------------------|-------------------|-------|---------------|
| SD <sub>r</sub>     | CV           | SD <sub>b</sub>          | CV           | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %          |
| 0,028               | <b>2,896</b> | 0,049                    | <b>4,987</b> | 0,977               | 1,160             | 0,129 | <b>12,087</b> |

Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. iznosi 1,88 %, a nepreciznost iz dana u dan 6,01 %. Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2. iznosi 2,90 %, a nepreciznost iz dana u dan 4,99 %.

Točnost izražena koeficijentom varijacije, CV, iznosi 14,18 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. odnosno 12,09 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2.

Vrijednosti pripadaju unutar kriterija prihvatljivosti.

Tablica 21. Rezultati analize za izovaleril - karnitin kroz 5 dana u triplikatu.

| <i>C5</i>       |       |       | <i>ERNDIM 2017.1.</i> |       |       |
|-----------------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1     | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 4,548 | 3,932 | 4,820                 | 4,521 | 5,138 |
| #2              | 4,943 | 4,008 | 4,562                 | 3,827 | 5,387 |
| #3              | 6,11  | 5,402 | 5,610                 | 4,557 | 5,665 |
| ( $\bar{x}$ )   | 5,200 | 4,447 | 4,997                 | 4,302 | 5,397 |
| SD              | 0,812 | 0,828 | 0,546                 | 0,411 | 0,264 |
| <b>X ukupni</b> |       |       | <b>4,869</b>          |       |       |

Tablica 22. Dobivena preciznost i točnost za izovaleril - karnitin

| Preciznost u seriji |              | Preciznost iz dana u dan |              | Točnost             |                   |       |              |
|---------------------|--------------|--------------------------|--------------|---------------------|-------------------|-------|--------------|
| SD <sub>r</sub>     | CV           | SD <sub>b</sub>          | CV           | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %         |
| 0,247               | <b>5,079</b> | 0,475                    | <b>9,766</b> | 4,869               | 5,450             | 0,411 | <b>7,967</b> |

Tablica 23. Rezultati statističke obrade podataka za izovaleril - karnitin

| <i>C5</i>       |       |       | <i>ERNDIM 2017.2.</i> |       |       |
|-----------------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1     | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 1,608 | 1,638 | 1,389                 | 1,307 | 1,565 |
| #2              | 2,059 | 1,559 | 1,387                 | 1,986 | 1,305 |
| #3              | 1,183 | 1,113 | 1,915                 | 1,326 | 1,79  |
| ( $\bar{x}$ )   | 1,617 | 1,437 | 1,564                 | 1,540 | 1,553 |
| SD              | 0,438 | 0,283 | 0,304                 | 0,387 | 0,243 |
| <b>X ukupni</b> |       |       | <b>1,542</b>          |       |       |

Tablica 24. Dobivena preciznost i točnost za izovaleril - karnitin

| Preciznost u seriji |       | Preciznost iz dana u dan |       | Točnost             |                   |       |       |
|---------------------|-------|--------------------------|-------|---------------------|-------------------|-------|-------|
| SD <sub>r</sub>     | CV    | SD <sub>b</sub>          | CV    | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %  |
| 0,080               | 5,164 | 0,066                    | 4,262 | 1,542               | 1,460             | 0,058 | 3,863 |

Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. iznosi 5,08 %, a nepreciznost iz dana u dan 9,77 %. Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2. iznosi 5,16 %, a nepreciznost iz dana u dan 4,26 %.

Točnost izražena koeficijentom varijacije, CV, iznosi 7,97 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. odnosno 3,86 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2.

Vrijednosti pripadaju unutar kriterija prihvatljivosti.

Tablica 25. Rezultati analize za glutaril - karnitin kroz 5 dana u triplikatu.

|                 | <i>CSDC</i> |       | <i>ERNDIM 2017.1.</i> |       |       |
|-----------------|-------------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1           | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 0,538       | 0,744 | 0,506                 | 0,269 | 0,502 |
| #2              | 0,443       | 0,662 | 0,307                 | 0,538 | 0,448 |
| #3              | 0,587       | 0,448 | 0,461                 | 0,331 | 0,41  |
| ( $\bar{x}$ )   | 0,523       | 0,618 | 0,425                 | 0,379 | 0,453 |
| SD              | 0,073       | 0,153 | 0,104                 | 0,141 | 0,046 |
| <b>X ukupni</b> |             |       | <b>0,480</b>          |       |       |

Tablica 26. Dobivena preciznost i točnost za glutaril - karnitin

| Preciznost u seriji |       | Preciznost iz dana u dan |        | Točnost             |                   |       |        |
|---------------------|-------|--------------------------|--------|---------------------|-------------------|-------|--------|
| SD <sub>r</sub>     | CV    | SD <sub>b</sub>          | CV     | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %   |
| 0,045               | 9,340 | 0,093                    | 19,440 | 0,480               | 0,205             | 0,194 | 56,726 |

Tablica 27. Rezultati statističke obrade podataka za glutaril - karnitin

|                 | <i>C5DC</i> |       | <i>ERNDIM 2017.2.</i> |       |       |
|-----------------|-------------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1           | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 1,434       | 0,739 | 1,075                 | 1,075 | 1,147 |
| #2              | 1,793       | 0,88  | 1,793                 | 0,962 | 1,173 |
| #3              | 0,768       | 0,993 | 1,344                 | 0,932 | 1,165 |
| ( $\bar{x}$ )   | 1,332       | 0,871 | 1,404                 | 0,990 | 1,162 |
| SD              | 0,520       | 0,127 | 0,363                 | 0,075 | 0,013 |
| <b>X ukupni</b> |             |       | <b>1,152</b>          |       |       |

Tablica 28. Dobivena preciznost i točnost za glutaril - karnitin

| Preciznost u seriji |               | Preciznost iz dana u dan |               | Točnost             |                   |       |               |
|---------------------|---------------|--------------------------|---------------|---------------------|-------------------|-------|---------------|
| SD <sub>r</sub>     | CV            | SD <sub>b</sub>          | CV            | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %          |
| 0,214               | <b>18,558</b> | 0,224                    | <b>19,485</b> | 1,152               | 0,450             | 0,496 | <b>61,948</b> |

Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. iznosi 9,34 %, a nepreciznost iz dana u dan 19,44 %. Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2. iznosi 18,56 % a nepreciznost iz dana u dan 19,49 %.

Točnost izražena koeficijentom varijacije, CV, iznosi 56,73 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. odnosno 61,95 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2.

Tablica 29. Rezultati analize za heksanoil - karnitin kroz 5 dana u triplikatu.

|                 | <i>C6</i> |       | <i>ERNDIM 2017.1.</i> |       |       |
|-----------------|-----------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1         | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 1,071     | 0,725 | 1,117                 | 0,673 | 0,885 |
| #2              | 0,99      | 0,863 | 0,784                 | 0,492 | 0,833 |
| #3              | 0,857     | 0,83  | 0,768                 | 1,126 | 0,826 |
| ( $\bar{x}$ )   | 0,973     | 0,806 | 0,890                 | 0,764 | 0,848 |
| SD              | 0,108     | 0,072 | 0,197                 | 0,327 | 0,032 |
| <b>X ukupni</b> |           |       | <b>0,856</b>          |       |       |

Tablica 30. Dobivena preciznost i točnost za heksanoil - karnitin

| Preciznost u seriji |        | Preciznost iz dana u dan |       | Točnost             |                   |       |       |
|---------------------|--------|--------------------------|-------|---------------------|-------------------|-------|-------|
| SD <sub>r</sub>     | CV     | SD <sub>b</sub>          | CV    | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %  |
| 0,117               | 13,706 | 0,080                    | 9,388 | 0,856               | 0,940             | 0,059 | 6,614 |

Tablica 31. Rezultati statističke obrade podataka za heksanoil - karnitin

|                 | <i>C6</i> |       | <i>ERNDIM 2017.2.</i> |       |       |
|-----------------|-----------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1         | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 1,79      | 1,269 | 2,008                 | 2,040 | 1,956 |
| #2              | 1,405     | 1,697 | 2,424                 | 1,871 | 2,07  |
| #3              | 1,543     | 1,787 | 1,744                 | 1,778 | 1,372 |
| ( $\bar{x}$ )   | 1,579     | 1,584 | 2,059                 | 1,896 | 1,799 |
| SD              | 0,195     | 0,277 | 0,343                 | 0,133 | 0,374 |
| <b>X ukupni</b> |           |       | <b>1,784</b>          |       |       |

Tablica 32. Dobivena preciznost i točnost za heksanoil - karnitin

| Preciznost u seriji |       | Preciznost iz dana u dan |        | Točnost             |                   |       |       |
|---------------------|-------|--------------------------|--------|---------------------|-------------------|-------|-------|
| SD <sub>r</sub>     | CV    | SD <sub>b</sub>          | CV     | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %  |
| 0,101               | 5,644 | 0,206                    | 11,560 | 1,784               | 1,780             | 0,003 | 0,143 |

Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. iznosi 13,71 %, a nepreciznost iz dana u dan 9,39 %. Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2. iznosi 5,64 %, a nepreciznost iz dana u dan 11,56 %.

Točnost izražena koeficijentom varijacije, CV, iznosi 6,61 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. odnosno 0,14 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2.



Tablica 33. Rezultati analize za oktanoil - karnitin kroz 5 dana u triplikatu.

| <i>C8</i>       |              |       | <i>ERNDIM 2017.1.</i> |       |       |
|-----------------|--------------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1            | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 3,065        | 2,533 | 3,632                 | 2,716 | 2,585 |
| #2              | 2,967        | 3,564 | 2,308                 | 2,107 | 3,326 |
| #3              | 4,054        | 3,761 | 3,420                 | 3,065 | 3,861 |
| ( $\bar{x}$ )   | 3,362        | 3,286 | 3,120                 | 2,629 | 3,257 |
| SD              | 0,601        | 0,660 | 0,711                 | 0,485 | 0,641 |
| <b>X ukupni</b> | <b>3,131</b> |       |                       |       |       |

Tablica 34. Dobivena preciznost i točnost za oktanoil - karnitin

| Preciznost u seriji |              | Preciznost iz dana u dan |              | Točnost             |                   |       |               |
|---------------------|--------------|--------------------------|--------------|---------------------|-------------------|-------|---------------|
| SD <sub>r</sub>     | CV %         | SD <sub>b</sub>          | CV %         | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %          |
| 0,085               | <b>2,716</b> | 0,294                    | <b>9,382</b> | 3,131               | 5,860             | 1,930 | <b>42,926</b> |

Tablica 35. Rezultati statističke obrade podataka za oktanoil - karnitin

| <i>C8</i>       |              |       | <i>ERNDIM 2017.2.</i> |       |       |
|-----------------|--------------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1            | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 0,346        | 0,548 | 0,725                 | 0,502 | 0,846 |
| #2              | 0,583        | 0,587 | 0,511                 | 0,696 | 0,587 |
| #3              | 0,369        | 0,448 | 0,712                 | 0,817 | 0,759 |
| ( $\bar{x}$ )   | 0,433        | 0,528 | 0,649                 | 0,672 | 0,731 |
| SD              | 0,131        | 0,072 | 0,120                 | 0,159 | 0,132 |
| <b>X ukupni</b> | <b>0,602</b> |       |                       |       |       |

Tablica 36. Dobivena preciznost i točnost za oktanoil - karnitin

| Preciznost u seriji |              | Preciznost iz dana u dan |               | Točnost             |                   |       |               |
|---------------------|--------------|--------------------------|---------------|---------------------|-------------------|-------|---------------|
| SD <sub>r</sub>     | CV           | SD <sub>b</sub>          | CV            | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %          |
| 0,032               | <b>5,293</b> | 0,120                    | <b>19,963</b> | 0,602               | 0,850             | 0,175 | <b>24,109</b> |

Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. iznosi 2,72 %, a nepreciznost iz dana u dan 9,39 %. Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2. iznosi 5,29 %, a nepreciznost iz dana u dan 19,96 %.

Točnost izražena koeficijentom varijacije, CV, iznosi 42,93 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. odnosno 24,11 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2.

Tablica 37. Rezultati analize za dekanol - karnitin kroz 5 dana u triplikatu.

| <i>C10</i>      |       |       | <i>ERNDIM 2017.1.</i> |       |       |
|-----------------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1     | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 0,547 | 0,477 | 0,559                 | 0,490 | 0,462 |
| #2              | 0,53  | 0,529 | 0,543                 | 0,509 | 0,484 |
| #3              | 0,541 | 0,522 | 0,591                 | 0,531 | 0,477 |
| ( $\bar{x}$ )   | 0,539 | 0,509 | 0,564                 | 0,510 | 0,474 |
| SD              | 0,009 | 0,028 | 0,024                 | 0,021 | 0,011 |
| <b>X ukupni</b> |       |       | <b>0,519</b>          |       |       |

Tablica 38. Dobivena preciznost i točnost za dekanol - karnitin

| Preciznost u seriji |       | Preciznost iz dana u dan |       | Točnost             |                   |       |        |
|---------------------|-------|--------------------------|-------|---------------------|-------------------|-------|--------|
| SD <sub>r</sub>     | CV    | SD <sub>b</sub>          | CV    | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %   |
| 0,008               | 1,622 | 0,034                    | 6,554 | 0,519               | 0,680             | 0,114 | 18,927 |

Tablica 39. Rezultati statističke obrade podataka za dekanol - karnitin

| <i>C10</i>      |       |       | <i>ERNDIM 2017.2.</i> |       |       |
|-----------------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1     | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 1,317 | 1,049 | 1,035                 | 0,8   | 1,149 |
| #2              | 1,307 | 1,092 | 0,979                 | 0,926 | 1,128 |
| #3              | 1,391 | 0,934 | 1,081                 | 1,091 | 0,906 |
| ( $\bar{x}$ )   | 1,338 | 1,025 | 1,032                 | 0,939 | 1,061 |
| SD              | 0,046 | 0,082 | 0,051                 | 0,146 | 0,135 |
| <b>X ukupni</b> |       |       | <b>1,079</b>          |       |       |

Tablica 40. Dobivena preciznost i točnost za dekanol - karnitin

| Preciznost u seriji |       | Preciznost iz dana u dan |        | Točnost             |                   |       |        |
|---------------------|-------|--------------------------|--------|---------------------|-------------------|-------|--------|
| SD <sub>r</sub>     | CV    | SD <sub>b</sub>          | CV     | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %   |
| 0,046               | 4,306 | 0,152                    | 14,081 | 1,079               | 2,100             | 0,722 | 45,420 |

Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. iznosi 1,62 %, a nepreciznost iz dana u dan 6,55 %. Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2. iznosi 4,31 %, a nepreciznost iz dana u dan 14,08 %.

Točnost izražena koeficijentom varijacije, CV, iznosi 18,93 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. odnosno 45,42 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2.

Tablica 41. Rezultati analize za tetradekanoil - karnitin kroz 5 dana u triplikatu.

|                 | <i>C14</i> |       | <i>ERNDIM 2017.1.</i> |       |       |
|-----------------|------------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1          | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 0,496      | 0,693 | 0,805                 | 0,610 | 0,517 |
| #2              | 0,752      | 0,7   | 0,741                 | 0,530 | 0,698 |
| #3              | 0,572      | 0,696 | 0,707                 | 0,628 | 0,823 |
| ( $\bar{x}$ )   | 0,607      | 0,696 | 0,751                 | 0,589 | 0,679 |
| SD              | 0,131      | 0,004 | 0,050                 | 0,052 | 0,154 |
| <b>X ukupni</b> |            |       | <b>0,665</b>          |       |       |

Tablica 42. Dobivena preciznost i točnost za tetradekanoil - karnitin

| Preciznost u seriji |       | Preciznost iz dana u dan |        | Istinitost          |                   |       |        |
|---------------------|-------|--------------------------|--------|---------------------|-------------------|-------|--------|
| SD <sub>r</sub>     | CV %  | SD <sub>b</sub>          | CV %   | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %   |
| 0,063               | 9,405 | 0,067                    | 10,013 | 0,665               | 1,230             | 0,400 | 42,210 |

Tablica 43. Rezultati statističke obrade podataka za tetradekanoil - karnitin

| <i>C14</i>      |              |       | <i>ERNDIM 2017.2.</i> |       |       |
|-----------------|--------------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1            | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 0,219        | 0,214 | 0,257                 | 0,245 | 0,146 |
| #2              | 0,219        | 0,331 | 0,183                 | 0,277 | 0,238 |
| #3              | 0,356        | 0,26  | 0,278                 | 0,210 | 0,244 |
| ( $\bar{x}$ )   | 0,265        | 0,268 | 0,239                 | 0,244 | 0,209 |
| SD              | 0,079        | 0,059 | 0,050                 | 0,034 | 0,055 |
| <b>X ukupni</b> | <b>0,245</b> |       |                       |       |       |

Tablica 44. Dobivena preciznost i točnost za tetradekanoil - karnitin

| Preciznost u seriji |       | Preciznost iz dana u dan |       | Točnost             |                   |       |       |
|---------------------|-------|--------------------------|-------|---------------------|-------------------|-------|-------|
| SD <sub>r</sub>     | CV    | SD <sub>b</sub>          | CV    | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %  |
| 0,016               | 6,714 | 0,024                    | 9,646 | 0,245               | 0,250             | 0,003 | 1,390 |

Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. iznosi 9,41 %, a nepreciznost iz dana u dan 10,01 %. Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2. iznosi 14,47 %, a nepreciznost iz dana u dan 9,65 %.

Točnost izražena koeficijentom varijacije, CV, iznosi 42,21 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. odnosno 1,39 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2.

Tablica 45. Rezultati analize za *cis* – 5 – tetradekanoil - karnitin kroz 5 dana u triplikatu.

| <i>C14:1</i>    |              |       | <i>ERNDIM 2017.1.</i> |       |       |
|-----------------|--------------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1            | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 0,305        | 0,389 | 0,314                 | 0,424 | 0,4   |
| #2              | 0,291        | 0,281 | 0,404                 | 0,300 | 0,287 |
| #3              | 0,215        | 0,366 | 0,407                 | 0,285 | 0,272 |
| ( $\bar{x}$ )   | 0,270        | 0,345 | 0,375                 | 0,336 | 0,320 |
| SD              | 0,048        | 0,057 | 0,053                 | 0,076 | 0,070 |
| <b>X ukupni</b> | <b>0,329</b> |       |                       |       |       |

Tablica 46. Dobivena preciznost i točnost za cis – 5 – tetradekanoil - karnitin

| Preciznost u seriji |       | Preciznost iz dana u dan |        | Istinitost          |                   |       |        |
|---------------------|-------|--------------------------|--------|---------------------|-------------------|-------|--------|
| SD <sub>r</sub>     | CV    | SD <sub>b</sub>          | CV     | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %   |
| 0,012               | 3,579 | 0,039                    | 11,726 | 0,329               | 0,150             | 0,127 | 52,910 |

Tablica 47. Rezultati statističke obrade podataka za cis – 5 – tetradekanoil - karnitin

|                 | <i>CI4:1</i> |       | <i>ERNDIM 2017.2.</i> |       |       |
|-----------------|--------------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1            | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 0,168        | 0,205 | 0,215                 | 0,262 | 0,155 |
| #2              | 0,152        | 0,143 | 0,102                 | 0,135 | 0,2   |
| #3              | 0,173        | 0,275 | 0,232                 | 0,213 | 0,198 |
| ( $\bar{x}$ )   | 0,164        | 0,208 | 0,183                 | 0,203 | 0,184 |
| SD              | 0,011        | 0,066 | 0,071                 | 0,064 | 0,025 |
| <b>X ukupni</b> |              |       | <b>0,189</b>          |       |       |

Tablica 48. Dobivena preciznost i točnost za cis – 5 – tetradekanoil - karnitin

| Preciznost u seriji |        | Preciznost iz dana u dan |       | Točnost             |                   |       |       |
|---------------------|--------|--------------------------|-------|---------------------|-------------------|-------|-------|
| SD <sub>r</sub>     | CV     | SD <sub>b</sub>          | CV    | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %  |
| 0,027               | 14,467 | 0,017                    | 9,260 | 0,189               | 0,190             | 0,001 | 0,548 |

Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. iznosi 3,58 %, a nepreciznost iz dana u dan 11,73 %. Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2. iznosi 14,47 %, a nepreciznost iz dana u dan 9,26 %.

Točnost izražena koeficijentom varijacije, CV, iznosi 52,91 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. odnosno 0,55 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2.

Tablica 49. Rezultati analize za palmitoil - karnitin kroz 5 dana u triplikatu.

| <i>C16</i>      |              |       | <i>ERNDIM 2017.1.</i> |       |       |
|-----------------|--------------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1            | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 0,715        | 0,613 | 0,608                 | 0,910 | 0,805 |
| #2              | 0,567        | 1,071 | 0,608                 | 0,528 | 0,852 |
| #3              | 0,949        | 0,932 | 0,721                 | 0,719 | 0,783 |
| ( $\bar{x}$ )   | 0,744        | 0,872 | 0,646                 | 0,719 | 0,813 |
| SD              | 0,193        | 0,235 | 0,065                 | 0,191 | 0,035 |
| <b>X ukupni</b> | <b>0,759</b> |       |                       |       |       |

Tablica 50. Dobivena preciznost i točnost za palmitoil - karnitin

| Preciznost u seriji |               | Preciznost iz dana u dan |               | Istinitost          |                   |       |              |
|---------------------|---------------|--------------------------|---------------|---------------------|-------------------|-------|--------------|
| SD <sub>r</sub>     | CV            | SD <sub>b</sub>          | CV            | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %         |
| 0,088               | <b>11,575</b> | 0,087                    | <b>11,490</b> | 0,759               | 0,740             | 0,013 | <b>1,768</b> |

Tablica 51. Rezultati statističke obrade podataka za palmitoil - karnitin

| <i>C16</i>      |              |       | <i>ERNDIM 2017.2.</i> |       |       |
|-----------------|--------------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1            | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 2,475        | 2,836 | 2,362                 | 2,328 | 2,033 |
| #2              | 2,688        | 2,733 | 2,903                 | 2,276 | 2,807 |
| #3              | 2,497        | 2,013 | 2,334                 | 2,179 | 2,362 |
| ( $\bar{x}$ )   | 2,553        | 2,527 | 2,533                 | 2,261 | 2,401 |
| SD              | 0,117        | 0,448 | 0,321                 | 0,076 | 0,388 |
| <b>X ukupni</b> | <b>2,455</b> |       |                       |       |       |

Tablica 52. Dobivena preciznost i točnost za palmitoil - karnitin

| Preciznost u seriji |              | Preciznost iz dana u dan |              | Točnost             |                   |       |              |
|---------------------|--------------|--------------------------|--------------|---------------------|-------------------|-------|--------------|
| SD <sub>r</sub>     | CV           | SD <sub>b</sub>          | CV           | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %         |
| 0,166               | <b>6,742</b> | 0,124                    | <b>5,054</b> | 2,455               | 2,520             | 0,046 | <b>1,846</b> |

Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. iznosi 11,58 %, a nepreciznost iz dana u dan 11,49 %. Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2. iznosi 6,74 %, a nepreciznost iz dana u dan 5,06 %.

Točnost izražena koeficijentom varijacije, CV, iznosi 1,77 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. odnosno 1,85 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2.

Tablica 53. Rezultati analize za 3 – OH – palmitoil - karnitin kroz 5 dana u triplikatu.

| <i>C16 - OH</i> |              |       | <i>ERNDIM 2017.1.</i> |       |       |
|-----------------|--------------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1            | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 0,393        | 0,264 | 0,473                 | 0,248 | 0,331 |
| #2              | 0,192        | 0,435 | 0,224                 | 0,357 | 0,441 |
| #3              | 0,252        | 0,465 | 0,350                 | 0,198 | 0,338 |
| ( $\bar{x}$ )   | 0,279        | 0,388 | 0,349                 | 0,268 | 0,370 |
| SD              | 0,103        | 0,108 | 0,125                 | 0,081 | 0,062 |
| <b>X ukupni</b> | <b>0,331</b> |       |                       |       |       |

Tablica 54. Dobivena preciznost i točnost za 3 – OH – palmitoil - karnitin

| Preciznost u seriji |              | Preciznost iz dana u dan |               | Istinitost          |                   |       |               |
|---------------------|--------------|--------------------------|---------------|---------------------|-------------------|-------|---------------|
| SD <sub>r</sub>     | CV           | SD <sub>b</sub>          | CV            | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %          |
| 0,025               | <b>7,435</b> | 0,054                    | <b>16,428</b> | 0,331               | 0,275             | 0,039 | <b>13,012</b> |

Tablica 55. Rezultati statističke obrade podataka za 3 – OH – palmitoil - karnitin

| <i>C16 - OH</i> |              |       | <i>ERNDIM 2017.2.</i> |       |       |
|-----------------|--------------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1            | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 0,301        | 0,435 | 0,458                 | 0,322 | 0,431 |
| #2              | 0,446        | 0,383 | 0,650                 | 0,518 | 0,583 |
| #3              | 0,378        | 0,275 | 0,583                 | 0,362 | 0,965 |
| ( $\bar{x}$ )   | 0,375        | 0,364 | 0,564                 | 0,401 | 0,660 |
| SD              | 0,073        | 0,082 | 0,097                 | 0,104 | 0,275 |
| <b>X ukupni</b> | <b>0,473</b> |       |                       |       |       |

Tablica 56. Dobivena preciznost i točnost za 3 – OH –palmitiol - karnitin

| Preciznost u seriji |        | Preciznost iz dana u dan |        | Točnost             |                   |       |        |
|---------------------|--------|--------------------------|--------|---------------------|-------------------|-------|--------|
| SD <sub>r</sub>     | CV     | SD <sub>b</sub>          | CV     | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %   |
| 0,084               | 17,822 | 0,132                    | 27,929 | 0,473               | 0,390             | 0,058 | 13,552 |

Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. iznosi 7,44 %, a nepreciznost iz dana u dan 16,42 %. Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2. iznosi 17,82 %, a nepreciznost iz dana u dan 27,93 %.

Točnost izražena koeficijentom varijacije, CV, iznosi 13,01 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. odnosno 13,55 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2.

Tablica 57. Rezultati analize za stearoil - karnitin kroz 5 dana u triplikatu.

|                 | <i>C18</i> |       | <i>ERNDIM 2017.1.</i> |       |       |
|-----------------|------------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1          | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 0,407      | 0,392 | 0,474                 | 0,413 | 0,394 |
| #2              | 0,41       | 0,431 | 0,436                 | 0,373 | 0,433 |
| #3              | 0,383      | 0,435 | 0,475                 | 0,388 | 0,389 |
| ( $\bar{x}$ )   | 0,400      | 0,419 | 0,462                 | 0,393 | 0,405 |
| SD              | 0,015      | 0,024 | 0,022                 | 0,028 | 0,024 |
| <b>X ukupni</b> |            |       | <b>0,416</b>          |       |       |

Tablica 58. Dobivena preciznost i točnost za stearoil - karnitin

| Preciznost u seriji |       | Preciznost iz dana u dan |       | Istinitost          |                   |       |       |
|---------------------|-------|--------------------------|-------|---------------------|-------------------|-------|-------|
| SD <sub>r</sub>     | CV    | SD <sub>b</sub>          | CV    | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %  |
| 0,005               | 1,183 | 0,027                    | 6,580 | 0,416               | 0,460             | 0,031 | 7,126 |



Tablica 59. Rezultati statističke obrade podataka za stearoil - karnitin

| <i>C18</i>      |       |       | <i>ERNDIM 2017.2.</i> |       |       |
|-----------------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1     | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 0,775 | 0,71  | 0,808                 | 0,704 | 0,798 |
| #2              | 0,775 | 0,728 | 0,765                 | 0,804 | 0,842 |
| #3              | 0,716 | 0,727 | 0,788                 | 0,768 | 0,801 |
| ( $\bar{x}$ )   | 0,755 | 0,722 | 0,787                 | 0,759 | 0,814 |
| SD              | 0,034 | 0,010 | 0,022                 | 0,051 | 0,025 |
| <b>X ukupni</b> |       |       | <b>0,767</b>          |       |       |

Tablica 60. Dobivena preciznost i točnost za stearoil - karnitin

| Preciznost u seriji |       | Preciznost iz dana u dan |       | Točnost             |                   |       |       |
|---------------------|-------|--------------------------|-------|---------------------|-------------------|-------|-------|
| SD <sub>r</sub>     | CV    | SD <sub>b</sub>          | CV    | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %  |
| 0,015               | 1,980 | 0,035                    | 4,533 | 0,767               | 0,780             | 0,009 | 1,164 |

Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. iznosi 1,18 %, a nepreciznost iz dana u dan 6,58 %. Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2. iznosi 1,98 %, a nepreciznost iz dana u dan 4,53 %.

Točnost izražena koeficijentom varijacije, CV, iznosi 7,13 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. odnosno 1,16 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2.

Tablica 61. Rezultati analize za 3 – OH –stearoil - karnitin kroz 5 dana u triplicatu.

| <i>C18 - OH</i> |       |       | <i>ERNDIM 2017.1.</i> |       |       |
|-----------------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1     | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 0,04  | 0,069 | 0,068                 | 0,125 | 0,036 |
| #2              | 0,082 | 0,098 | 0,031                 | 0,039 | 0,277 |
| #3              | 0,125 | 0,069 | 0,095                 | 0,038 | 0,132 |
| ( $\bar{x}$ )   | 0,082 | 0,079 | 0,065                 | 0,067 | 0,148 |
| SD              | 0,043 | 0,017 | 0,032                 | 0,050 | 0,121 |
| <b>X ukupni</b> |       |       | <b>0,088</b>          |       |       |

Tablica 62. Dobivena preciznost i točnost za 3 – OH – stearoil - karnitin

| Preciznost u seriji |        | Preciznost iz dana u dan |        | Istinitost          |                   |       |        |
|---------------------|--------|--------------------------|--------|---------------------|-------------------|-------|--------|
| SD <sub>r</sub>     | CV     | SD <sub>b</sub>          | CV     | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %   |
| 0,040               | 45,800 | 0,034                    | 38,961 | 0,088               | 0,429             | 0,241 | 93,157 |

Tablica 63. Rezultati statističke obrade podataka za 3 – OH – stearoil - karnitin

|                 | <i>C18 - OH</i> |       | <i>ERNDIM 2017.2.</i> |       |       |
|-----------------|-----------------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1               | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 0,115           | 0,175 | 0,128                 | 0,217 | 0,154 |
| #2              | 0,149           | 0,107 | 0,084                 | 0,195 | 0,118 |
| #3              | 0,235           | 0,106 | 0,133                 | 0,132 | 0,193 |
| ( $\bar{x}$ )   | 0,166           | 0,129 | 0,115                 | 0,181 | 0,155 |
| SD              | 0,062           | 0,040 | 0,027                 | 0,044 | 0,038 |
| <b>X ukupni</b> |                 |       | <b>0,149</b>          |       |       |

Tablica 64. Dobivena preciznost i točnost za 3 – OH – stearoil - karnitin

| Preciznost u seriji |       | Preciznost iz dana u dan |        | Točnost             |                   |       |        |
|---------------------|-------|--------------------------|--------|---------------------|-------------------|-------|--------|
| SD <sub>r</sub>     | CV    | SD <sub>b</sub>          | CV     | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %   |
| 0,013               | 8,537 | 0,027                    | 18,097 | 0,149               | 0,700             | 0,389 | 91,672 |

Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. iznosi 45,80 %, a nepreciznost iz dana u dan 38,96 %. Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2. iznosi 8,54 %, a nepreciznost iz dana u dan 18,10 %.

Točnost izražena koeficijentom varijacije, CV, iznosi 93,16 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. odnosno 91,67 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2.

Tablica 65. Rezultati analize za oleoil - karnitin kroz 5 dana u triplikatu.

| <i>C18:1</i>    |              |       | <i>ERNDIM 2017.1.</i> |       |       |
|-----------------|--------------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1            | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 1,361        | 1,106 | 1,458                 | 1,307 | 1,465 |
| #2              | 1,146        | 1,407 | 1,495                 | 1,090 | 1,292 |
| #3              | 0,918        | 1,653 | 1,609                 | 1,324 | 1,156 |
| ( $\bar{x}$ )   | 1,142        | 1,389 | 1,521                 | 1,240 | 1,304 |
| SD              | 0,222        | 0,274 | 0,079                 | 0,130 | 0,155 |
| <b>X ukupni</b> | <b>1,319</b> |       |                       |       |       |

Tablica 66. Dobivena preciznost i točnost za oleoil - karnitin

| Preciznost u seriji |              | Preciznost iz dana u dan |               | Točnost             |                   |       |              |
|---------------------|--------------|--------------------------|---------------|---------------------|-------------------|-------|--------------|
| SD <sub>r</sub>     | CV           | SD <sub>b</sub>          | CV            | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %         |
| 0,077               | <b>5,819</b> | 0,144                    | <b>10,944</b> | 1,319               | 1,400             | 0,057 | <b>4,206</b> |

Tablica 67. Rezultati statističke obrade podataka za oleoil - karnitin

| <i>C18:1</i>    |              |       | <i>ERNDIM 2017.2.</i> |       |       |
|-----------------|--------------|-------|-----------------------|-------|-------|
| DAN             | 1            | 2     | 3                     | 4     | 5     |
| #1              | 0,305        | 0,246 | 0,469                 | 0,404 | 0,385 |
| #2              | 0,334        | 0,249 | 0,379                 | 0,389 | 0,473 |
| #3              | 0,313        | 0,355 | 0,355                 | 0,296 | 0,386 |
| ( $\bar{x}$ )   | 0,317        | 0,283 | 0,401                 | 0,363 | 0,415 |
| SD              | 0,015        | 0,062 | 0,060                 | 0,059 | 0,051 |
| <b>X ukupni</b> | <b>0,356</b> |       |                       |       |       |

Tablica 68. Dobivena preciznost i točnost za oleoil - karnitin

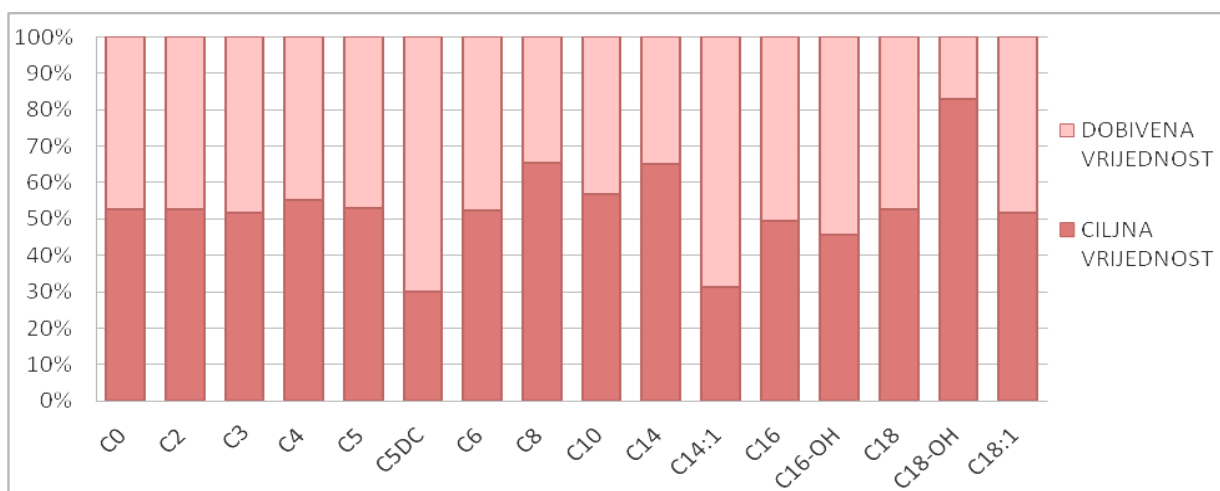
| Preciznost u seriji |              | Preciznost iz dana u dan |               | Točnost             |                   |       |              |
|---------------------|--------------|--------------------------|---------------|---------------------|-------------------|-------|--------------|
| SD <sub>r</sub>     | CV           | SD <sub>b</sub>          | CV            | Dobivena vrijednost | Ciljna vrijednost | SD    | CV %         |
| 0,020               | <b>5,521</b> | 0,055                    | <b>15,577</b> | 0,356               | 0,280             | 0,054 | <b>0,027</b> |

Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. iznosi 5,82 %, a nepreciznost iz dana u dan 10,94 %. Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2. iznosi 5,52 %, a nepreciznost iz dana u dan 15,58 %.

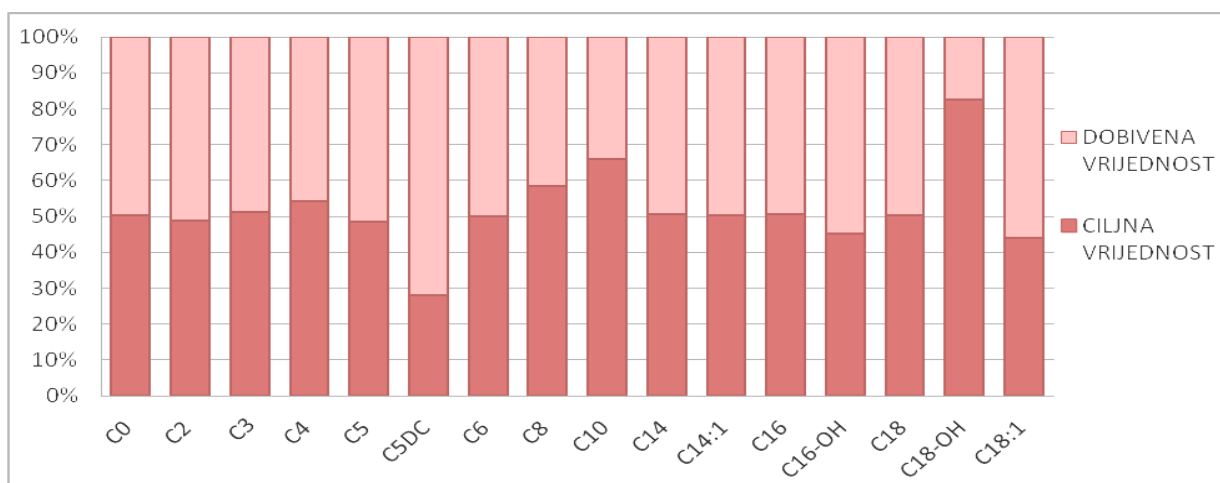
Točnost izražena koeficijentom varijacije, CV, iznosi 4,21 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. odnosno 0,03 % za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2.

Sve dobivene vrijednosti zajedno sa ciljnom vrijednostima za pojedinu kontrolu, prikazane su slikovno grafom. Ovim jednostavnim prikazom mogu se uočiti sličnosti u vrijednostima, odnosno njihova odstupanja. *Slika 12.* i *Slika 13.* pokazuju odnose u veličinama.

Slika 12. Grafički prikaz dobivenih rezultata za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.1. u odnosu na medijane prema ERNDIMQA (ciljna vrijednost)



Slika 13. Grafički prikaz dobivenih rezultata za kontrolni uzorak ERNDIM 2017.2. u odnosu na medijane prema ERNDIMQA (ciljna vrijednost)

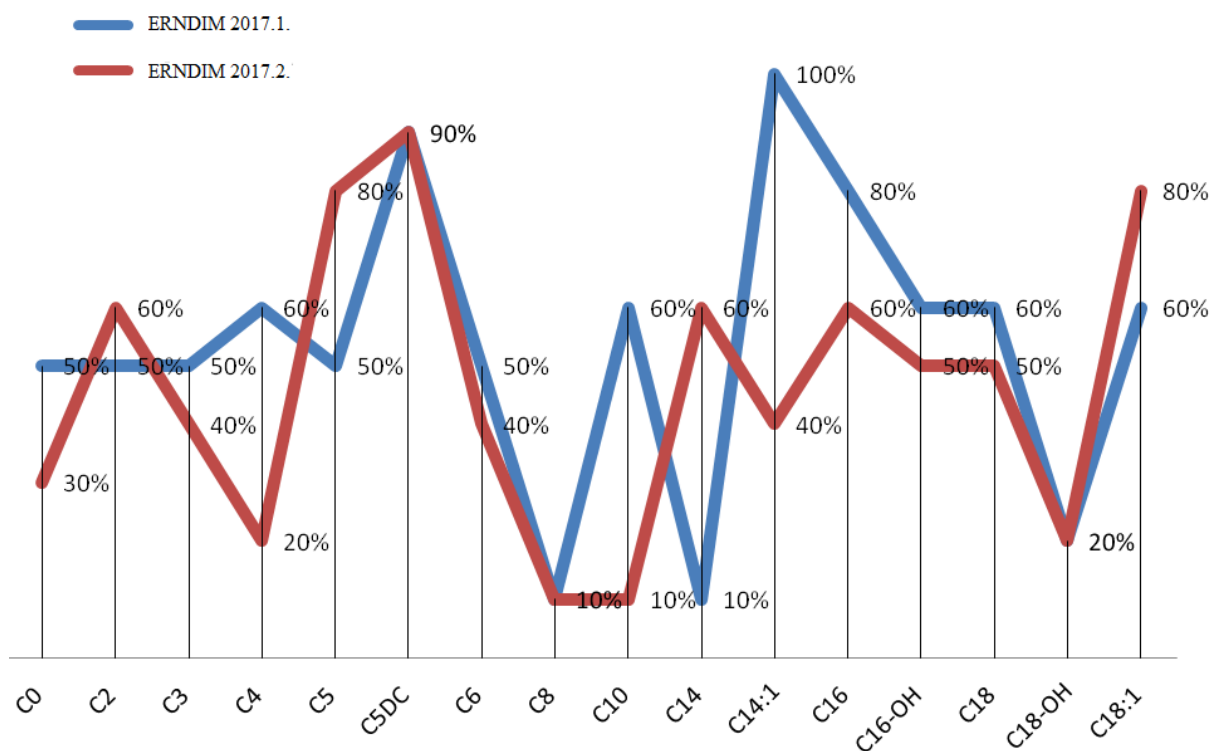


Tablica 69. Raspodjela dobivenih vrijednosti u rasponu od 10 – 100 % za svaki analit s prikazom distribucije rezultata u odnosu na ostale laboratorije. (Oznake: rozo – ERNDIM 2017.1., plavo – ERNDIM 2017.2., narančasto – podudaranje obje kontrole.)

| Analit          | 10 %           | 20 % | 30 %                      | 40 % | 50 %           | 60 % | 70 %                      | 80 % | 90 %                          | 100 % |
|-----------------|----------------|------|---------------------------|------|----------------|------|---------------------------|------|-------------------------------|-------|
| C0              |                |      |                           |      |                |      |                           |      |                               |       |
| C2              |                |      |                           |      |                |      |                           |      |                               |       |
| C3              |                |      |                           |      |                |      |                           |      |                               |       |
| C4              |                |      |                           |      |                |      |                           |      |                               |       |
| C5              |                |      |                           |      |                |      |                           |      |                               |       |
| C5 - DC         |                |      |                           |      |                |      |                           |      |                               |       |
| C6              |                |      |                           |      |                |      |                           |      |                               |       |
| C8              |                |      |                           |      |                |      |                           |      |                               |       |
| C10             |                |      |                           |      |                |      |                           |      |                               |       |
| C14             |                |      |                           |      |                |      |                           |      |                               |       |
| C14:1           |                |      |                           |      |                |      |                           |      |                               |       |
| C16             |                |      |                           |      |                |      |                           |      |                               |       |
| C16 - OH        |                |      |                           |      |                |      |                           |      |                               |       |
| C18             |                |      |                           |      |                |      |                           |      |                               |       |
| C18 - OH        |                |      |                           |      |                |      |                           |      |                               |       |
| C18:1           |                |      |                           |      |                |      |                           |      |                               |       |
| <i>Interval</i> | <i>ERNDIM</i>  |      | <i>Zasebna vrijednost</i> |      | <i>ERNDIM</i>  |      | <i>Zasebna vrijednost</i> |      | <i>Kumulativna vrijednost</i> |       |
| < 10%           | <i>2017.1.</i> |      | 12 %                      |      | <i>2017.2.</i> |      | 12 %                      |      | 12 %                          |       |
| 10 – 90 %       |                |      | 81 %                      |      |                |      | 88 %                      |      | 84%                           |       |
| > 90%           |                |      | 6 %                       |      |                |      | 0 %                       |      | 3 %                           |       |

Distribucija dobivenih rezultata ovisi o tome koliko su točna preklapanja rezultata s ciljnim vrijednostima – medijanima svih laboratorija. Tablica 69. prikazuje distribuciju dobivenih rezultata po intervalima za svaki analit kao i za pojednu kontrolu i njihov zbroj. Raspon od 10 – 90 % znači o zadovoljavajuće vrijednosti, dok je 50 % najidealnije jer je to ona vrijednost koju je dobila većina laboratorija. Ako je dobivena vrijednost u području vrijednosti < 10 % to znači da je naš rezultat niži od prosjeka, a ako je u području > 90 % tada se radi o vrijednostima višim od prosjeka većine laboratorija i takvi se rezultati moraju preispitati.

Na Slici 14. Mogu se uočiti sličnosti, različitosti ili preklapanja rezultata za pojedini analit i obje kontrole.



Slika 14. Grafički prikaz distribucije dobivenih rezultata i njihov odnos

## 5. RASPRAVA

Acil – karnitini u posljednje vrijeme privlače veliku pažnju kao markeri za bolesti oksidacije masnih i amino kiselina, povezanih sa metaboličkim sindromom. Štoviše, upravo ti metaboliti nameću svoju prediktivnu moć kod takvih bolesti u njenom nastajanju i progresiji. Različiti acil – karnitini javljaju se u obliku izomera i u vrlo niskim koncentracijama stoga je izrazito važno postaviti metodu koja će pouzdano, brzo i efikasno odrediti profil acil – karnitina. Kako su svi acil – karnitini slične molekulske mase, korištena je kromatografija ultra visoke učinkovitosti za njihovu učinkovitu separaciju. Derivatizacija uzorka (butilacija) omogućila je povećanje osjetljivosti same metode. U ovakvim visoko specifičnim uvjetima i vrlo razvijenom tehnologijom, napravljena je analiza profila acil – karnitina. Tablice u poglavlju 4. *Rezultati* prikazuju dobivene vrijednosti, izračunatu preciznost i točnost metode. Prema formulama za izračun, navedenim u poglavlju 3. *Materijali i metode (3.2.3. Statistička obrada podataka)* dobiveni rezultati su slijedeći.

Ispitali smo preciznost, točnost i sljedivost kao analitičke značajnosti. Rezultati ispitivanja preciznosti, prikazani kao nepreciznost u seriji i nepreciznost iz dana u dan, pokazali su kako sve dobivene vrijednosti zadovoljavaju kriterije prihvatljivosti koje je deklarirao proizvođač, odnosno možemo zaključiti kako rezultati imaju zadovoljavajuću ponovljivost (nepreciznost u seriji) i međupreciznost (nepreciznost iz dana u dan). Potrebno je naglasiti kako preciznost ovisi isključivo o distribuciji slučajne pogreške te ne daje informacije o točnosti i pravoj vrijednosti. Porast vrijednosti standardnog odstupanja (SD) i koeficijenta varijacije (CV) upućuje na porast nepreciznosti mjerenja. Rezultati ispitivanja točnosti izraženi su koeficijentom varijacije dobivenih vrijednosti u odnosu na ciljnu vrijednost te možemo zaključiti kako se izmjerena odstupanja za slobodni karnitin, ali i većinu acil – karnitina nalaze unutar kriterija prihvatljivosti. Odstupanje analita izvan kriterija prihvatljivosti rezultat je vrlo niske koncentracije analita, blizu granice detekcije i odnosi se na izomerne oblike acil – karnitina (*Tablica 5. – Tablica 68., poglavlje 4. Rezultati*).

Rezultati provedene metode (*Tablica 69., Slika 14., poglavlje 4. Rezultati*) prikazuju odličnu sljedivost za obje kontrole. Analitima, čije su vrijednosti u području < 10 % ili > 90 % treba pridodati veću pozornost, no kako ne postoje preklapanja za obje kontrole u tim kritičnim intervalima, možemo reći da svi imaju zadovoljavajuću vrijednost u odnosu na ostale laboratorije. U prilog tome ide i Z – vrijednost koja pripada intervalu odlične izvedbe, kao i kumulativna vrijednost distribucije za obje kontrole vanjske kvalitete.

## 6. ZAKLJUČAK

Provedbom verifikacije ispitali smo ispunjava li nova metoda sve uvjete potrebne za implementaciju u rutinski rad. Statističkom obradom i interpretacijom rezultata zaključujemo sljedeće:

- nepreciznost metode za određivanje svih analita novom metodom analize profila acil – karnitina iz plazme tandemskom spektrometrijom masa zadovoljava kriterije prihvatljivosti
- ispitivanjem točnosti metode pokazali smo da nova metoda daje točne rezultate unutar zadanih kriterija
- ERDNIMQA usporedbom pokazali smo odličnu sljedivost rezultata

Uspjeli smo uvesti metodu, senzitivnu i robusnu koja omogućuje kvantifikaciju velikog broja acil – karnitina uključujući i izomerne forme pojedinih metabolita vezanih uz metabolizam aminokiselina i oksidacije masnih kiselina, u rutinski rad našeg laboratorija.



## 7. LITERATURA

- Antonina Gucciardi A, Pirillo P, Di Gangi IM, Naturale M, Giordano G. A rapid UPLC–MS/MS method for simultaneous separation of 48 acylcarnitines in dried blood spots and plasma useful as a second-tier test for expanded newborn screening. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 404, 741 – 751.
- American Academy of Pediatrics, Comitee on Genetics. Newborn screening Fact Sheets. *Pediatrics*, 1996, 98, 473 – 450.
- Barić I. Kome treba karnitin. *Paediatr Croat*, 2009, 53, 186 – 189.
- Bonnefont JP, Djouadi F, Prip – Buus C, Gobin S, Munnich A, Bastin J. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: Biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med*, 2004, 25, 495 – 520.
- Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 548 – 550.
- De Sain-van der Velden MGM, Diekman EF, Jans JJ, van der Ham M, Prinsen BHCTM, Visser G, Verhoeven-Duif NM. Differences between acylcarnitine profiles in plasma and bloodspots. *Mol Gen and Met*, 2013, 110, 116 – 121.
- De Vivo DC, Tein I. Primary and secondary disorders of carnitine metabolism. *Int Pediatr*, 1990, 5, 134 – 141.
- Fingerhut R, Roschinger W, Muntau AC, Dame T, Kreischer J, Arnecke R, Superti-Furga A, Troxler H, Liebl B, Olgemoller B, Roscher AA. Hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency: Acylcarnitine profiles in blood spots are highly specific. *Clin Chem*, 2001, 47, 1763 – 1768.
- Fu L, Huang M, Chen S. Primary carnitine deficiency and cardiomiopathy. *Korean Circ*, 2013, 74, 197 – 207.
- Gempel K, Kiechl S, Hofmann S, Lochmuller H, Kiechl-Kohlendorfer U, Willeit J, Sperl W, Rettinger A, Bieger I, Pongratz D, Gerbitz KD, Bauer MF. Screening for carnitine palmitoyltransferase II deficiency by tandem mass spectrometry. *J Inherit Metab Dis*, 2002, 25, 17 – 27.
- Giesbertz P, Ecker J, Haag A, Spanier B, Daniel H. An LC-MS/MS method to quantify acylcarnitine species including isomeric and odd-numbered forms in plasma and tissues. *J Lip Res*, 2015, 56, 2029 – 2037.

- Hrvatski savez za rijetke bolesti, <http://www.rijetke-bolesti.hr/o-bolestima>, pristupljeno 11.8.2017.
- Iacobazzi V, Pasquali M, Singh R, Matern D, Rinaldo P, Amat di San Filippo C, Palmieri F, Longo N. Response to therapy in carnitine/acylcarnitine translocase (CACT) deficiency due to a novel missense mutation. *Am J Med Genet* 2004, 126A, 150 – 155.
- Jeukendrup AE, Saris WH, Wagenmakers AJ. Fatt metabolism during exercise: a review. Part I: fatty acid mobilization and muscle metabolism. *Int Sports Med* 1998, 19, 231 – 244.
- Jungmann JH, Heeren RMA. Emerging Technologies in Mass Spectrometry Imaging. *J Proteom*, 2012, 75, 5077 – 5092.
- Kendler BS. Carnitine: an overview of its role in preventive medicine. *Prev Med*, 1986, 15, 373–390.
- Korman SH, Waterham HR, Gutman A, Jakobs C, Wanders RJ. Novel metabolic andmolecular findings in hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency. *Mol Genet Metab*, 2005, 86, 337 – 343.
- L-Carnitine Benefits And Side Effects, 2017., <https://honestsupplementreview.com/l-carnitine-benefits-and-side-effects>, pristupljeno 15.8.2017.
- Longo N, Amat di San Filippo C, Pasquali M. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Med Genet*, 2006, 142C, 77 – 85.
- Madeira PJA, Florêncio MH. Applications of Tandem Mass Spectrometry: From Structural Analysis to Fundamental Studies. Rijeka, InTech, 2012, str. 31.
- Magoulas PL, El – Hattab AW. Systemic primary carnitine deficiency; an overview of clinical manifestation, diagnosis and managment. *Orphanet J Rare Dis*, 2012, 18, 68.
- Mate A, Miguel – Carrasco JL, Monserrat MT, Vasquez CM. Systemic antioxidant properties of L – carnitine in two different models of arterial hypertension. *J Physiol Biochem*, 2010, 66, 127 – 136.
- Pierpont ME, Breningstall GN, Stanley CA, Singh A. Famililal carnitine transporter defect: A treatable cause of cardiomyopathy in children. *Am Heart J*, 2000, 139, 96 – 106.
- Pitt J. Principles and Applications of Liquid Chromatography – Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin Biochem Rev*, 2009, 30, 1, 19 – 34.
- Preece MA, Green A. Pregnancy and inherited metabolic disorders: maternal and fetal complications. *Ann Clin Biochem*, 2002, 39, 444 – 455.
- Proulx F, Lacroix J, Qureshi IA, Nadeau D, Gauthier M, Lambert M. Acquired carnitine abnormalities in critically ill children. *Eur J Pediatr*, 1997, 156, 864 – 869.

- Rinaldo P, Cowan TM, Matern D. Acylcarnitine profile analysis. *Genet Med*, 2008, 10, 151 – 156.
- Rinaldo P, Matern D, Bennett MJ. Fatty acid oxidation disorders. *Annu Rev Physiol*, 2002, 64, 477 – 502.
- Santra S, Hendriksz C. How to use acylcarnitine profiles to help diagnose inborn errors of metabolism. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*, 2010, 95, 151 – 156.
- Saudubray JM, Sedel F, Walter JH. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases; An introduction. *J Inherit Metab Dis*, 2006, 29, 261 – 274.
- Schwartz, JC., Wade AP i sur. Systematic delineation of scan modes in multidimensional mass spectrometry. *Anal Chem*, 1990, 62, 1809 – 1818.
- Seger C, Griesmacher A. Važni aspekti uspostave dvojne spektrometrije masa u uvjetima rutinskoga kliničkog laboratorija. *Biochem med*, 2007, 17, 29 – 51.
- Sharma S, Black SM. Carnitine homeostasis, mitochondrial function and cardiovascular disease. *Drug Discov Today Dis*, 2009, 6, 31 – 39.
- Stanley CA. Carnitine deficiency disorders in children. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1033, 42 – 51.
- Šimundić AM. Statistički testovi za ispitivanje usporedivosti metoda. U: Upravljanje kvalitetom laboratorijskog rada. Šimundić AM. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 21 – 32.
- Šimundić AM. Tipovi podataka i raspodjela. *Acta Medica Croatica*, 2006, 60, 17 – 35.
- What is a rare disease?, 2014., <http://www.eurordis.org>, pristupljeno 11.8.2017.
- Zhu C, Goodall dm, Wren SAC. A Review on Ultra Performance Liquid Chromatography. *Int. J. Drug Dev. And Res*, 2013, 5, 29 – 34.

## 8. SAŽETAK / SUMMARY

Acil – karnitini produkti su oksidacije masnih kiselina i aminokiselina prisutni u tkivima i tjelesnim tekućinama. Važan su dijagnostički marker za nasljedne bolesti vezane uz oksidacijske procese. Analiza profila acil-karnitina provodi se biokemijskim testovima kao probir za poremećaje u oksidaciji masnih kiselina i metabolizma organskih kiselina. Različiti acil – karnitini javljaju se u obliku izomera i u vrlo niskim koncentracijama stoga je izrazito važno postaviti metodu koja će pouzdano, brzo i efikasno odrediti profil acil – karnitina.

Tijekom posljednjih nekoliko godina dvojni maseni spektrometri (MS/MS) postali su značajni i pouzdani rutinski analitički uređaji koji su omogućili puno osjetljiviju, specifičniju, pouzdanu i usporedivu analizu u odnosu na tradicionalni novorođenački probir. Metodom određivanja profila acil – karnitina iz plazme, omogućit će se pravovremena dijagnostika i praćenje tijekom liječenja u većine bolesnika s nasljednim metaboličkim bolestima. U ovom radu opisana je nova LC – MS/MS metoda za analizu slodobnog karnitina, ali i acil – karnitina duljine lanca C2 – C18 uz ERNDIM vanjsku kontrolu kvalitete.

Nepreciznost metode za određivanje svih analita novom metodom analize profila acil – karnitina iz plazme tandemskom spektrometrijom masa zadovoljava kriterije prihvatljivosti kao i rezultati točnosti koji su unutar zadanih kriterija. ERDNIMQA usporedbom pokazali smo odličnu sljedivost rezultata.

Uspjeli smo uvesti metodu, senzitivnu i robusnu koja omogućuje kvantifikaciju velikog broja acil – karnitina uključujući i izomerne forme pojedinih metabolita vezanih uz metabolizam aminokiselina i oksidacije masnih kiselina, u rutinski rad našeg laboratorija.

Acylcarnitines are intermediates of fatty acid and amino acid oxidation found in tissues and body fluids. They are important diagnostic markers for inherited diseases of peroxisomal and mitochondrial oxidation processes. Acylcarnitine profile analysis is performed for the biochemical screening of disorders of fatty acid oxidation and organic acid metabolism. Quantification of acylcarnitine species can become challenging because various species occur as isomers and/or have very low concentrations.

Over the past decade laboratories that test for metabolic disorders have introduced tandem mass spectrometry (MS/MS), which is more sensitive, specific, reliable, and comprehensive than traditional assays, into their newborn screening programs. MS/MS is rapidly replacing these one – analysis, one – metabolite, one – disease classic screening techniques with a one analysis, many – metabolites, many – diseases approach that also facilitates the ability to add new disorders to existing newborn screening panels. Here we described a new LC – MS/MS method for analysis of free carnitine and acylcarnitine species with acyl – chain lengths from C2 to C18 using ERNDIM.

Method validation in plasma showed excellent accuracy and precision with good within – laboratory variation and intermediate inter – laboratory variation. Values obtained from ERNDIMQA, compared to international laboratory results showed good practice and reliable results.

In conclusion, the LC – MS/MS method presented here allows robust quantification of isomeric acylcarnitine species and extends the palette of acylcarnitines with diagnostic potential. All results indicate that described method can be used in routine.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### VALIDACIJA ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE PROFILA ACIL - KARNITINA IZ PLAZME PRIMJENOM TANDEMSKE SPEKTROMETRIJE MASA

Nives Antolić

#### SAŽETAK

Acil – karnitini produkti su oksidacije masnih kiselina i aminokiselina prisutni u tkivima i tjelesnim tekućinama. Važan su dijagnostički marker za nasljedne bolesti vezane uz oksidacijske procese. Analiza profila acil-karnitina provodi se biokemijskim testovima kao probir za poremećaje u oksidaciji masnih kiselina i metabolizma organskih kiselina. Različiti acil – karnitini javljaju se u obliku izomera i u vrlo niskim koncentracijama stoga je izrazito važno postaviti metodu koja će pouzdano, brzo i efikasno odrediti profil acil – karnitina.

Tijekom posljednjih nekoliko godina dvojni maseni spektrometri (MS/MS) postali su značajni i pouzdani rutinski analitički uređaji koji su omogućili puno osjetljiviju, specifičniju, pouzdanu i usporedivu analizu u odnosu na tradicionalni novorođenački probir. Metodom određivanja profila acil – karnitina iz plazme, omogućit će se pravovremena dijagnostika i praćenje tijekom liječenja u većine bolesnika s nasljednim metaboličkim bolestima. U ovom radu opisana je nova LC – MS/MS metoda za analizu slobodnog karnitina, ali i acil – karnitina duljine lanca C2 – C18 uz ERNDIM vanjsku kontrolu kvalitete.

Nepreciznost metode za određivanje svih analita novom metodom analize profila acil – karnitina iz plazme tandemskom spektrometrijom masa zadovoljava kriterije prihvatljivosti kao i rezultati točnosti koji su unutar zadanih kriterija. ERDNIMQA usporedbom pokazali smo odličnu sljedivost rezultata.

Uspjeli smo uvesti metodu, senzitivnu i robusnu koja omogućuje kvantifikaciju velikog broja acil – karnitina uključujući i izomerne forme pojedinih metabolita vezanih uz metabolizam aminokiselina i oksidacije masnih kiselina, u rutinski rad našeg laboratorija.

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

Rad sadrži: 57 stranica, 14 grafičkih prikaza, 69 tablica i 35 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Urođene metaboličke bolesti, poremećaji oksidacije masnih kiselina, profil acil – karnitina, validacija, tandemaska spektrometrija masa

Mentor: **Dr. sc. Ksenija Fumić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ksenija Fumić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

**Dr. sc. Lidija Bach Rojceky**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta..*

**Dr. sc. Olga Gornik**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2017.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD FOR ACYLCARNITINE PROFILE ANALYSIS IN PLASMA USING TANDEM MASS SPECTROMETRY

**Nives Antolić**

#### SUMMARY

Acylcarnitines are intermediates of fatty acid and amino acid oxidation found in tissues and body fluids. They are important diagnostic markers for inherited diseases of peroxisomal and mitochondrial oxidation processes. Acylcarnitine profile analysis is performed for the biochemical screening of disorders of fatty acid oxidation and organic acid metabolism. Quantification of acylcarnitine species can become challenging because various species occur as isomers and/or have very low concentrations.

Over the past decade laboratories that test for metabolic disorders have introduced tandem mass spectrometry (MS/MS), which is more sensitive, specific, reliable, and comprehensive than traditional assays, into their newborn screening programs. MS/MS is rapidly replacing these one – analysis, one – metabolite, one – disease classic screening techniques with a one analysis, many – metabolites, many – diseases approach that also facilitates the ability to add new disorders to existing newborn screening panels. Here we described a new LC – MS/MS method for analysis of free carnitine and acylcarnitine species with acyl – chain lengths from C2 to C18 using ERNDIM.

Method validation in plasma showed excellent accuracy and precision with good within – laboratory variation and intermediate inter – laboratory variation. Values obtained from ERNDIMQA, compared to international laboratory results showed good practice and reliable results.

In conclusion, the LC – MS/MS method presented here allows robust quantification of isomeric acylcarnitine species and extends the palette of acylcarnitines with diagnostic potential. All results indicate that described method can be used in routine.

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

Thesis includes: 57 pages, 14 figures, 67 tables and 35 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Inborn metabolic disorders, fatty acid oxidation disorders, acylcarnitine profile, validation, tandem mass spectrometry

Mentor: **Ksenija Fumić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ksenija Fumić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Lidija Bach Rojceky, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Olga Gornik, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2017.