

Continguts: <http://www.acclc.cat/volumen/vol-18/>*In vitro veritas*Pàgina web de la revista: <http://www.acclc.cat/invitro/>**Article original****Estudi de verificació del sistema de mesura Acquity UPLC[®] UV[®] per al mesurament simultani de la concentració de substància de retinol i α -tocoferol en el sèrum**Raül Rigo Bonnin, M^a José García Escolano, Mercedes Sanjuás Iglesias, Teodora Lucía Rubio Campos, Susana Voces Marfil, Ariadna Padró Miquel, Pedro Alía Ramos

Àrea de Bioquímica Especial, Laboratori Clínic de l'Hospital Universitari de Bellvitge, Laboratori Clínic Territorial Metropolitana Sud, L'Hospitalet de Llobregat

2017 © Publicat per l'Associació catalana de ciències de Laboratori Clínic

1. Introducció

El retinol és una vitamina liposoluble que pertany a un grup de molècules que es troben estretament relacionades a nivell estructural i metabòlic anomenades *retinoïds* o *vitamina A*. Els principals composts de vitamina A inclouen les formes esterificades de retinol (èsters de retinol), la forma aldehídica (retinal), la forma alcoholica (retinol), la forma carboxílica (àcid retinoic) i el 3-deshidrorretinol (vitamina A2), sent el retinol la forma molecular predominant en la sang. La vitamina A exerceix un paper essencial en la funció de la retina, en el creixement i la diferenciació del teixit epitelial, en el creixement de l'ós, així com en la reproducció i el desenvolupament embrionari. La deficiència de vitamina A cobreix les anomenades manifestacions "subclíniques" (mobilització fèrrica deficient, diferenciació cel·lular alterada, depressió de la resposta immunitària) i clíniques (augment de la morbiditat i mortalitat infeccioses, retard del creixement, ceguesa nocturna, anèmia i xeroftalmia, entre altres). En països en desenvolupament, la deficiència de vitamina A és la causa principal de ceguesa mentre que als països desenvolupats, la deficiència de vitamina A presenta un major interès en pacients amb trastorns malabsortius o que han estat sotmesos a algun tipus de cirurgia bariàtrica. No obstant, en persones d'edat avançada, la malnutrició és força prevalent i constitueix un dels principals determinants de la freqüència i durada de l'estada hospitalària. Per altra banda, els quadres d'intoxicació per vitamina A no solen ser freqüents. Els símptomes i signes més freqüents són l'eritema i la descamació,

la sequedat de les mucoses, la quilosi, la glossitis, les nàusees, els vòmits, l'alopècia, les cefalees, la desmineralització òssia, l'amenorrea, la pèrdua de gana i les alteracions hepàtiques, com per exemple, la fibrosis hepàtica amb hipertensió portal (1-4).

L' α -tocoferol és una vitamina liposoluble que pertany a un grup de molècules que es troben estretament relacionades, a nivell estructural i metabòlic, anomenades *tocos* o *vitamina E*. Els principals composts de vitamina E són l' α -tocoferol, el β -tocoferol, la γ -tocoferol, el δ -tocoferol, l' α -tocotrienol, el β -tocotrienol, la γ -tocotrienol i el δ -tocotrienol, sent l' α -tocoferol la forma molecular predominant en la sang. La vitamina E actua com un agent antioxidant i eliminador de radicals lliures, protegint la integritat dels lípids insaturats de les biomembranes de totes les cèl·lules i preservant el retinol de la seva descomposició oxidativa. També promou la formació de prostaciclina en les cèl·lules endotelials i inhibeix la formació dels tromboxans en trombòcits (plaquetes), minimitzant així l'agregació de plaquetes en la superfície de l'endoteli. La deficiència de vitamina E està associada principalment a una mala nutrició o una mala absorció intestinal. S'ha trobat un dèficit de vitamina E en pacients amb diverses neuropaties sensorials i motores (principalment en població infantil), malalties cardiovasculars, càncer, malalties intestinals, malalties pancreàtiques, colèstasi crònica, malaltia celíaca, fibrosi quística, entre altres. Addicionalment, es poden trobar valors disminuïts de la concentració d' α -tocoferol en el sèrum en pacients amb abetalipoproteinèmia degut, principalment, a una falta de síntesi

<http://www.acclc.cat/invitro/estudi-de-verificacio-del-sistema-de-mesura-acquity-uplc-uv-per-al-mesurament-simultani-de-la-concentracio-de-substancia-de-retinol-i-alfa-tocoferol-en-el-serum/>

2017 © ACCLC. Tots els drets reservats.

de lipoproteïnes de baixa densitat i de quilomicrons per part de les cèl·lules intestinals. Els quadres d'intoxicació per vitamina E solen ser infreqüents. S'ha observat que una de les causes de tromboflebitis està associada amb la ingesta excessiva de vitamina E (1-3, 5).

En l'actualitat, la concentració de retinol i d' α -tocoferol en el sèrum es mesuren, principalment, mitjançant sistemes basats en la cromatografia líquida d'alta eficàcia o HPLC (acrònim de l'anglès *high-performance liquid chromatography*) acoblada a la l'espectrometria d'absorció molecular, la fluorimetria, la voltamperometria o a l'espectrometria de masses en tàndem o MS/MS (acrònim de l'anglès *tandem mass spectrometry*) (1-5).

L'objectiu d'aquest treball és dur a terme un estudi de verificació del sistema de mesura Acquity®-UPLC® UV® de Waters (Milford, Estats Units), que empra l'HPLC acoblada a l'espectrometria d'absorció molecular a l'ultraviolat com a principi de mesura, per al mesurament simultani de la concentració de substància de retinol i d' α -tocoferol en el sèrum..

2. Materials i mètodes

2.1. Sistema i procediment de mesura

S'empra un sistema Acquity® UPLC® acoblat a un detector d'absorció molecular Acquity® UV®, ambdós de Waters.

2.1.1. Productes químics i reactius

El metanol de qualitat HPLC és proporcionat per Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), mentre que l'aigua de qualitat HPLC és subministrada per Merck Biosciences (Darmstadt, Alemanya).

S'utilitza l'equip de reactius *Vitamin A and E Reagent kit for HPLC analysis* (referència: 34000) de Chromsystems® (Gräfelfing, Alemanya). Cada equip conté: una ampolla d'1 L de fase mòbil, un material de calibratge, una ampolla de 2,5 mL amb una solució precipitant de proteïnes, una ampolla de 40 mL amb un dissolvent orgànic apolar, una ampolla de 2 mL amb una solució de treball d'estàndard intern i una bossa amb 100 tubs opacs tipus Eppendorf d'1,5 mL.

S'empren els materials de control de matriu sèrica *Vitamins A/E Serum Control, Level I+II* (referència: 0032) i el material de calibratge *Vitamins A and E Serum Calibration Standard* (referència: 34004), ambdós de Chromsystems®.

El material de calibratge i els materials de control es preparen seguint les instruccions i recomanacions del fabricant (6).

2.1.2. Mostres de pacients

Les mostres de sang dels pacients s'obtenen per punció venosa i es recullen en tubs *Vacvette® Serum Clot Activator Separator* (referència: 456073) de Greiner Bio-One GmbH (Kremsmünster, Àustria). Els tubs se centrifuguen a 2000 g durant 10 minuts a 18 - 22 °C i el sèrum resultant és emmagatzemat, protegit de la llum, a -18 °C.

2.1.3. Preparació de les mostres

La preparació de les mostres consisteix en una precipitació de proteïnes i una posterior extracció líquid-líquid amb un dissolvent orgànic apolar. En un tub tipus Eppendorf opac d'1,5 mL, s'afegeixen 200 μ L de cada calibrador, control o mostra de sèrum, 20 μ L de la solució de treball d'estàndard intern i 25 μ L de la solució precipitant de proteïnes. La mescla s'agita durant 30 s en un agitador tipus vòrtex i, seguidament, s'addicionen 400 μ L del dissolvent orgànic apolar. Després de l'agitació de la nova barreja durant 30 s (en un agitador vòrtex), finalment, es realitza una centrifugació a 11000 g durant 10 min i el sobrenedant es transfereix a un vial cromatogràfic de vidre específic per al seu processament.

2.1.4. Condicions cromatogràfiques

La separació cromatogràfica dels diferents components de la mostra es porta a terme a 30 °C, utilitzant una columna C₁₈ en fase reversa *Acquity UPLC® BEH 2,1 x 100 mm; 1,7 μ m* (Waters), a la qual se li ha incorporat un suport que conté un filtre de 2,0 μ m i una precolumna *Acquity UPLC® BEH VanGuard Pre-column 2,1 x 5 mm; 1,7 μ m* (Waters). Les mostres es mantenen a 15 °C a l'interior del mostrejadore. Es treballa a un flux de 0,5 mL/min en modalitat isocràtica. El volum d'injecció de la mostra és 5 μ L en un bucle de 5 μ L, treballant en la modalitat d'injecció total.

2.1.5. Condicions del detector d'absorció molecular a l'ultraviolat

Les longituds d'ona de treball són 325 nm i de 295 nm per al retinol i l' α -tocoferol, respectivament. Des de l'inici de la cromatografia fins al minut 3,5 el detector ultraviolat treballa a una longitud d'ona de 325, minut a partir del qual es canvia a la longitud d'ona a 295 nm.

2.1.6. Obtenció dels valors mesurats de la concentració de substància de retinol i d' α -tocoferol en el sèrum

La integració de les àrees dels pics cromatogràfics suavitzats i el càlcul de la concentració de les diferents vitamines en el sèrum es realitza utilitzant el programa informàtic *Empower®* versió 3.0 de Waters.

Aquest programa informàtic calcula directament la concentració de les diferents vitamines en el sèrum seguint les equacions següents:

$$[\text{Retinol}] \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{Àrea pic}_{\text{Mostra}} \cdot \text{Àrea pic}_{\text{IS Cal}}}{\text{Àrea pic}_{\text{Cal}} \cdot \text{Àrea pic}_{\text{IS Mostra}}} \cdot [\text{Cal}] \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \right)$$

$$[\text{Tocoferol}] \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{Àrea pic}_{\text{Mostra}} \cdot \text{Àrea pic}_{\text{IS Cal}}}{\text{Àrea pic}_{\text{Cal}} \cdot \text{Àrea pic}_{\text{IS Mostra}}} \cdot [\text{Cal}] \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \right)$$

on [Retinol] = Concentració de retinol; IS = Estàndard intern; Cal. = Calibrador; [Cal] = Concentració del calibrador; [Tocoferol] = Concentració de tocoferol.

2.2. Estudi de verificació

L'estudi de verificació està basat, parcialment, en la *Guia per a la verificació dels sistemes de mesura de magnituds biològiques per a l'acreditació segons la norma ISO 15189* del Comitè d'Harmonització de l'ICS (7). Es recalca que es realitza un estudi de verificació i no de validació donada la condició de la marca "CE" de l'equip de reactius¹. A més de les propietats metrològiques a verificar que són descrites en aquest document (imprecisions intraserials i interdiàries), s'ha dut a terme un estudi del biaix i la compatibilitat metrològica, de la incertesa de mesura, de la traçabilitat metrològica, i de la intercanviabilitat dels valors mesurats obtinguts pel sistema de mesura en estudi i els sistemes de mesura, basats en l'HPLC-UV, que empen distints laboratoris externs on el nostre laboratori subcontractava abans el mesurament de les magnituds biològiques en estudi..

2.2.1. Estudi de la imprecisió (estudi de la precisió de mesura)

Es processen 10 vegades, en una única sèrie i en un mateix dia, així com 6 vegades, en 6 dies repartits en dos mesos, els dos

¹ Segons la Directiva 98/79 de la Comissió Europea sobre els productes sanitaris per al diagnòstic *in vitro*, els fabricants de la indústria del diagnòstic *in vitro* han de validar els sistemes (i procediments) de mesura que fabriquen i subministren amb la marca "CE" (8).

materials de control de matriu sèrica. Posteriorment, prèvia eliminació dels possibles valors aberrants fent servir la prova paramètrica de Dixon (9), es calcula la mitjana (\bar{x}), la desviació estàndard (s) i el coeficient de variació (CV) per cadascun dels materials de control mitjançant l'equació:

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

El sistema de mesura es considera verificat si els CV són inferiors o iguals als documentats pel fabricant (6) multiplicats per 1,2 (7), i els valors d'imprecisió són inferiors als requisits metrològics establerts al nostre laboratori (15 %).

2.2.2. Estudi del biaix i de la compatibilitat metrològica (estudi de la veracitat de mesura)

Per a l'estimació del biaix i la compatibilitat metrològica se segueix el protocol experimental següent (11):

- Es processen 6 vegades, en 6 dies repartits en dos mesos, els dos materials de control de matriu sèrica.
- Es realitza un estudi dels possibles valors aberrants emprant la prova paramètrica de Dixon (9).
- Es calcula, prèvia eliminació dels valors aberrants, la mitjana (\bar{x}_{INTER}).
- Es calcula el biaix (δ) i el biaix relatiu (δ_r) mitjançant les equacions:

$$\delta = \bar{x}_{INTER} - \mu$$

$$\delta_r(\%) = \frac{(\bar{x}_{INTER} - \mu)}{\mu} \cdot 100$$

on μ és el valor convencional assignat pel fabricant del material de control.

- Es calculen els valors de la incertesa de mesura combinada dels valors estimats per al biaix (u_δ) fent servir la següent equació:

$$u_\delta = \sqrt{u_v^2 + u_x^2}$$

on u_v i u_x són la incertesa estàndard del valor assignat al material de control i la incertesa estàndard de la mitjana obtinguda, respectivament.

- Per al càlcul de la u_v , donat que no es disposa d'aquest valor per part del fabricant del material de control, aquesta s'estima a partir de l'interval de control proporcionat suposant que les dades es distribueixen segons una distribució triangular (incertesa tipus B):

$$u_v = \frac{L_{sup} - L_{inf}}{2 \cdot \sqrt{6}}$$

- Per al càlcul de la u_x , es fa servir la següent equació:

$$u_x = \frac{\bar{x}_{INTER} \cdot u_{c,rel}}{100 \cdot \sqrt{n}}$$

sent $u_{c,rel}$, la incertesa combinada relativa del sistema de mesura:

$$u_{c,rel} = \sqrt{u_{cal,rel}^2 + CV_{INTER}^2}$$

on $u_{cal,rel}$ és la incertesa estàndard relativa del valor assignat al material de calibratge (%) i CV_{INTER} és la imprecisió interdiària del sistema de mesura (%).

- Es calculen els valors de la incertesa de mesura expandida (amb un factor de cobertura $k = 2$) dels valors estimats per al biaix mitjançant l'equació:

$$U_\delta = 2 \cdot u_\delta$$

Es considera que no existeix un biaix significatiu si la mitjana dels valors són compatibles amb els valors assignats als materials de control, és a dir, si $|\delta| \leq U_\delta$ (11). Per altra banda, el biaix relatiu obtingut ha de ser inferior al requisit metrològic establert al nostre laboratori (15 %).

2.2.3. Estudi de la incertesa de mesura (estudi de l'exactitud de mesura) i la traçabilitat metrològica

Per a l'estimació de la incertesa de mesura se segueix el protocol experimental següent (12):

- Es processen 6 vegades, en 6 dies repartits en dos mesos, els dos materials de control de matriu sèrica.
- Es realitza un estudi dels possibles valors aberrants emprant la prova paramètrica de Dixon (9).
- Es calcula, prèvia eliminació dels valors aberrants, la mitjana (\bar{x}_{INTER}), la desviació estàndard (s_{INTER}) i el coeficient de variació (CV_{INTER}).
- Es calculen els valors de la incertesa de mesura combinada (u_c) i la incertesa de mesura combinada relativa ($u_{c,rel}$) del sistema de mesura, fent servir les següents equacions (12):

$$u_c = \sqrt{u_{cal}^2 + s_{INTER}^2 + u_{fc}^2}$$

$$u_{c,rel} = \sqrt{u_{cal,rel}^2 + CV_{INTER}^2 + u_{fc,rel}^2}$$

on u_{cal} i $u_{cal,rel}$ són la incertesa estàndard absoluta i relativa del valor assignat al material de calibratge; i u_{fc} i $u_{fc,rel}$ són la incertesa estàndard absoluta i relativa del factor de correcció a utilitzar per corregir el biaix (si és que aquest és significatiu).

- Es calculen els valors de la incertesa de mesura expandida absoluta i relativa (amb un factor de cobertura $k = 2$) mitjançant les equacions:

$$U = 2 \cdot u_c$$

$$U_{rel} = 2 \cdot u_{c,rel}$$

El valor de la incertesa de mesura ha de ser inferior a 2/3 de l'error de mesura màxim permès (13,3 %, al nostre cas).

La cadena de traçabilitat metrològica dels resultats de mesura es porta a terme en base a les dades facilitades pel proveïdor de l'equip de reactius i de l'Institut Nacional de Patrons i Tecnologia o NIST (acrònim de l'anglès *National Institute of Standards and Technology*).

2.2.4. Estudi d'intercanviabilitat de valors mesurats

Per a l'estudi de la intercanviabilitat es processen, durant dos mesos, 58 mostres de pacients amb valors representatius de tot l'interval de mesura, pel sistema de mesura en estudi i pels sistemes emprats en els laboratoris externs basats en l'HPLC-UV. Posteriorment, es duu a terme un estudi dels possibles valors aberrants individuals emprant la prova paramètrica de Grubbs (10) i la prova paramètrica de Bland-Altman (11) per als possibles valors aberrants per parelles. Seguidament, es realitza una regressió no paramètrica de Passing i Bablok (12, 13) dels valors mesurats obtinguts, emprant el programa estadístic

Analyse-it® Method Evaluation Edition versió 2.05 (Analyse-it Software Ltd, Leeds, Regne Unit).

3. Resultats

En les condicions cromatogràfiques descrites en aquest estudi, el temps de retenció per al retinol i l' α -tocoferol és 1,13 min i 4,94 min, respectivament, i pel seu estàndard intern 2,67 min (Figura 1).

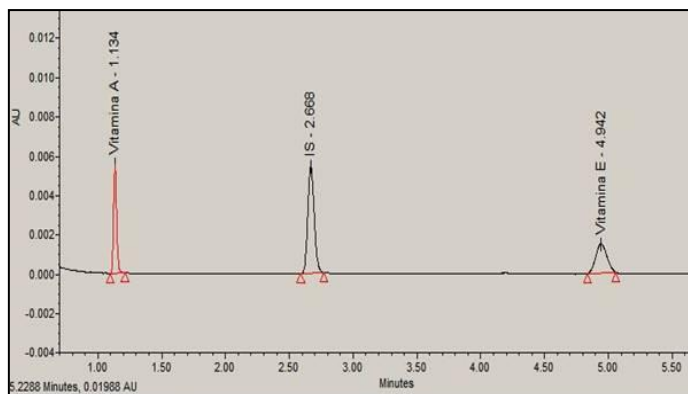


Figura 1. Cromatograma obtingut després de processar una mostra d'un pacient amb una concentració de substància de retinol i d' α -tocoferol en el sèrum de 0,89 $\mu\text{mol/L}$ i 16,7 $\mu\text{mol/L}$, respectivament. IS = estàndard intern.

El temps d'anàlisi (interval que transcorre entre dos injeccions consecutives) és 5,0 minuts. El temps de processament per a 20 mostres, incloent el temps necessari per a la seva preparació, és inferior o igual a 2,5 h.

3.1. Imprecisió intraserial i interdiària (precisió de mesura)

Els valors d'imprecisió intraserial i interdiària i biaix relatiu es mostren a la Taula 1 i 2, respectivament.

Els CV obtinguts no superen 1,2 vegades els subministrats pel fabricant dels equips de reactius, ni el requisit metrològic per a la imprecisió establert al nostre laboratori (15 %).

3.2. Biaix i compatibilitat metrològica

Els resultats obtinguts per al biaix es detallen a la Taula 3.

Els CV obtinguts no superen 1,2 vegades els subministrats pel fabricant dels equips de reactius, ni el requisit metrològic per a la imprecisió establert al nostre laboratori (15 %).

Els δ obtinguts no superen el requisit metrològic per al biaix establert al nostre laboratori (15 %).

Magnitud	\bar{x}_{INTRA}	n_{INTRA}	Imprecisió intraserial emprant materials de control		Imprecisió intraserial declarada pel fabricant dels reactius
			s_{INTRA}	CV_{INTRA} (%)	CV_{INTRA} (%)
Srm—Retinol; c.subst. [$\mu\text{mol/L}$]	1,82	9	0,019	1,1	2,5
	4,52	9	0,016	0,4	0,9
Srm— α -Tocoferol; c.subst. [$\mu\text{mol/L}$]	23,3	9	0,475	2,0	2,4
	49,9	9	0,274	0,5	2,2

Taula 1. Valors d'imprecisió intraserial utilitzant materials de control obtinguts a l'estudi i els declarats pel fabricant dels equips de reactius. \bar{x}_{INTRA} , mitjana intraserial; n_{INTRA} , nombre de materials de control processats en una mateixa sèrie; s_{INTRA} , desviació estàndard intraserial; CV_{INTRA} , coeficient de variació intraserial.

Magnitud	\bar{x}_{INTER}	n_{INTER}	Imprecisió interdiària emprant materials de control		Imprecisió interdiària declarada pel fabricant dels reactius
			s_{INTER}	CV_{INTER} (%)	CV_{INTER} (%)
Srm—Retinol; c.subst. [$\mu\text{mol/L}$]	1,82	6	0,054	3,0	2,6
	4,54	6	0,097	2,1	3,0
Srm— α -Tocoferol; c.subst. [$\mu\text{mol/L}$]	22,3	6	0,806	3,6	3,0
	49,6	6	1,212	2,4	2,0

Taula 2. Valors d'imprecisió interdiaris utilitzant materials de control obtinguts a l'estudi i els declarats pel fabricant dels equips de reactius. \bar{x}_{INTER} , mitjana interdiària; n_{INTER} , nombre de materials de control processats en dies diferents; s_{INTER} , desviació estàndard interdiària; CV_{INTER} , coeficient de variació interdiari.

Per altra banda, les dades corresponents a l'estudi de la compatibilitat metrològica són les següents:

Srm—Retinol; c.subst.		
	Material de Control 1	Material de control 2
Mitjana interdiària ($\mu\text{mol/L}$)	1,82	4,54
s interdiària ($\mu\text{mol/L}$)	0,05	0,10
CV interdiari (%)	2,97	2,13
n	6	6
μ ($\mu\text{mol/L}$)	1,70	4,35
δ ($\mu\text{mol/L}$)	0,12	0,19
L_{sup} ($\mu\text{mol/L}$)	2,06	5,10
L_{inf} ($\mu\text{mol/L}$)	1,34	3,60
u_v ($\mu\text{mol/L}$)	0,15	0,31
Valor material calibratge ($\mu\text{mol/L}$)	4,89	4,89
$u_{\text{cal rel}}$ (%)	1,30	1,30
$u_{\text{c rel}}$ (%)	3,25	2,50
u_x ($\mu\text{mol/L}$)	0,02	0,05
u_δ ($\mu\text{mol/L}$)	0,73	0,88
U_δ ($\mu\text{mol/L}$)	1,47	1,75

Srm—α-Tocoferol; c.subst.		
	Material de Control 1	Material de control 2
Mitjana interdiària ($\mu\text{mol/L}$)	22,2	49,6
s interdiària ($\mu\text{mol/L}$)	0,8	1,2
CV interdiari (%)	3,6	2,4
n	6	6
μ ($\mu\text{mol/L}$)	21,6	47,5
δ ($\mu\text{mol/L}$)	0,65	2,10
L_{sup} ($\mu\text{mol/L}$)	24,8	54,0
L_{inf} ($\mu\text{mol/L}$)	18,4	41,0
u_v ($\mu\text{mol/L}$)	1,31	2,65
Valor material calibratge ($\mu\text{mol/L}$)	46,4	46,4
u_{cal rel} (%)	0,90	0,90
u_{c rel} (%)	3,72	2,60
u_x ($\mu\text{mol/L}$)	0,34	0,53
u_{δ} ($\mu\text{mol/L}$)	1,31	1,53
U_{δ} ($\mu\text{mol/L}$)	2,63	3,07

Es considera que no existeix un biaix significatiu perquè la mitjana dels valors obtinguts per a les dues magnituds biològiques són compatibles amb els valors assignats als materials de control, és a dir, els $|\delta|$ són inferiors a les U_{δ} .

3.3. Incertesa de mesura (exactitud de mesura) i traçabilitat metrològica

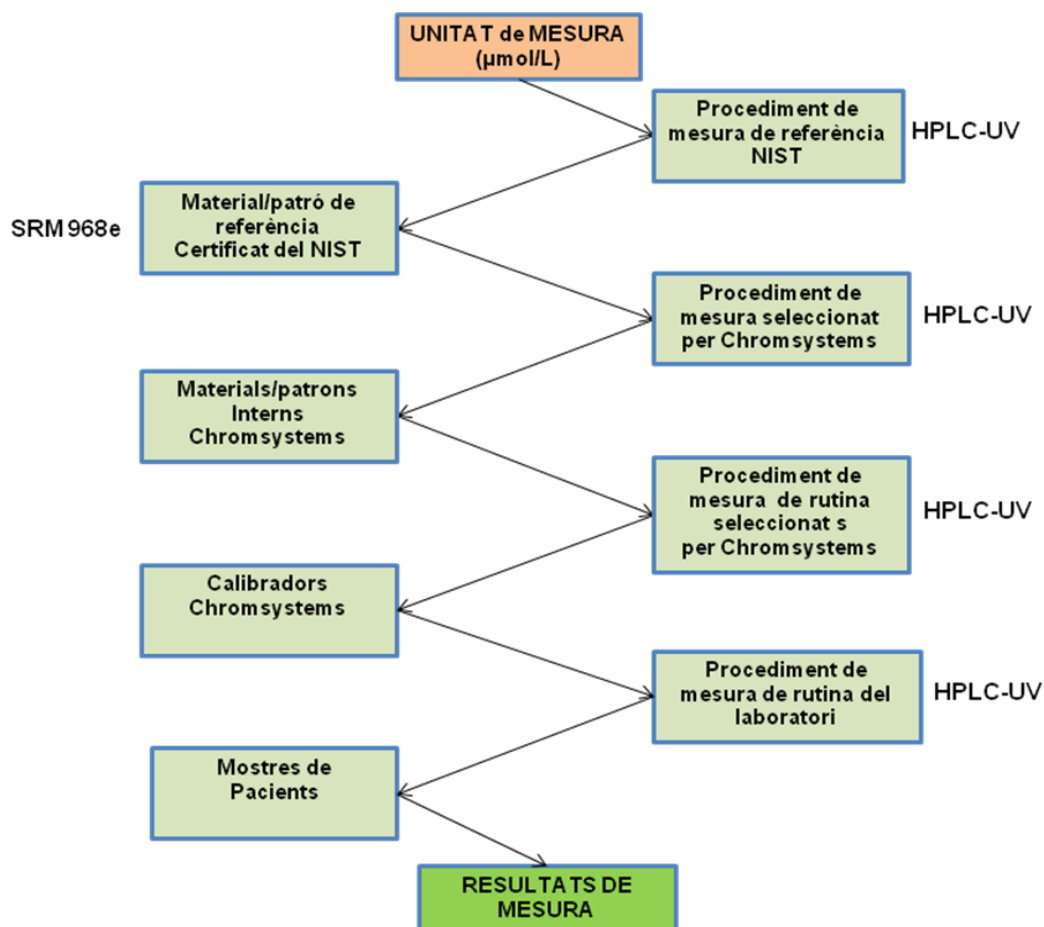
Les dades corresponents a l'estudi de la incertesa de mesura es mostren a continuació:

Srm—Retinol; c.subst.		
	Material de Control 1	Material de control 2
Mitjana interdiària ($\mu\text{mol/L}$)	1,82	4,54
s interdiària ($\mu\text{mol/L}$)	0,05	0,10
CV interdiari (%)	2,97	2,13
n	6	6
μ ($\mu\text{mol/L}$)	1,70	4,35
Valor material calibratge ($\mu\text{mol/L}$)	4,89	4,89
u_{cal rel} (%)	1,30	1,30
u_{c rel} (%)	3,25	2,50
U_{c rel} (%)	6,49	4,99
U_c ($\mu\text{mol/L}$)	0,12	0,23
Requisit error de mesura (%)	20,0	20,0
Requisit incertesa (%)	13,3	13,3

Srm— α -Tocoferol; c.subst.		
	Material de Control 1	Material de control 2
Mitjana interdiària ($\mu\text{mol/L}$)	22,2	49,6
s interdiària ($\mu\text{mol/L}$)	0,80	1,21
CV interdiari (%)	3,6	2,4
n	6	6
μ ($\mu\text{mol/L}$)	21,6	47,5
Valor material calibratge ($\mu\text{mol/L}$)	46,4	46,4
$u_{cal,rel}$ (%)	0,90	0,90
$u_{c,rel}$ (%)	3,72	2,60
$U_{c,rel}$ (%)	7,44	5,21
U_c ($\mu\text{mol/L}$)	1,65	2,58
Requisit error de mesura (%)	20,0	20,0
Requisit incertesa (%)	13,3	13,3

Es considera que la incertesa de mesura és acceptable donat que és inferior a 2/3 de l'error de mesura relatiu (13,3 % al nostre cas). Els resultats de mesura per als materials de control són $(22,2 \pm 1,7) \mu\text{mol/L}$ i $(49,6 \pm 2,6) \mu\text{mol/L}$.

La traçabilitat metrològica dels resultats obtinguts per a la concentració de substància de retinol i d' α -tocoferol en el sèrum és la següent:



3.4. Intercanviabilitat de valors mesurats

Els valors mesurats per a la concentració de substància de retinol en el sèrum obtinguts mitjançant ambdós sistemes de mesura no són intercanviables, existeix un biaix constant. Els paràmetres a (ordenada a l'origen) i b (pendent) de la recta de regressió, així com els respectius intervals de confiança obtinguts amb una significació estadística de 0,05 (valors entre parèntesi) són $a = 0,11$ (0,01 – 0,20) i $b = 1,06$ (0,98 – 1,15).

Els valors mesurats per a la concentració de substància d' α -tocoferol en el sèrum obtinguts mitjançant ambdós sistemes de mesura són intercanviables. Els paràmetres a (ordenada a l'origen) i b (pendent) de la recta de regressió, així com els respectius intervals de confiança obtinguts amb una significació estadística de 0,05 (valors entre parèntesi) són $a = 1,12$ (-1,18 – 3,67) i $b = 0,94$ (0,83 – 1,06).

4. Discussió i conclusions

El retinol i l' α -tocoferol són dues vitamines liposolubles essencials que participen en nombrosos processos biològics. El seu dèficit pot donar lloc a diverses malalties. Aquesta situació fa que s'hagi de controlar quin és el seu estat nutricional a l'organisme mitjançant el mesurament de les seves concentracions en el sèrum. De tots els sistemes de mesura emprats en l'actualitat, els basats en la HPLC acoblada a l'espectrometria d'absorció molecular a l'ultraviolat són el més àmpliament utilitzats.

Per altra banda, quan els sistemes de mesura i reactius són subministrats íntegrament per la indústria de diagnòstic *in vitro* cal tenir en compte que aquests productes estan sotmesos a la directiva 98/79 de la Comissió Europea sobre els productes sanitaris per al diagnòstic *in vitro*, que estableix que els fabricants han de validar els sistemes de mesura que fabriquen i subministren amb la marca "CE" (8). Aquest aspecte és clau a l'hora d'establir les obligacions del laboratori clínic per garantir, mitjançant proves objectives, que un sistema de mesura satisfà els requisits especificats (16). No obstant, en el procés de transport o instal·lació es poden produir desviacions respecte de les condicions en què el fabricant va fer la validació del sistema de mesura, fet que obliga al laboratori clínic a haver de realitzar un estudi de verificació (7).

El procediment de mesura utilitzat per al mesurament de la concentració de substància de retinol i d' α -tocoferol en el sèrum està basat en les recomanacions del fabricant de l'equip de reactius amb marcat "CE" (6), motiu pel qual s'ha realitzat un estudi de verificació enlloc d'un de validació. Tot i això, també s'han dut a terme altres estudis (compatibilitat metrològica, incertesa de mesura i intercanviabilitat de valors mesurats) que es consideren necessaris, inclús en un estudi de verificació.

L'estudi de la verificació ha posat de manifest que el sistema de mesura Acquity®-UPLC® UV® presenta unes propietats metrològiques acceptables per al nostre laboratori clínic.

En conclusió, tenint en compte les propietats metrològiques obtingudes per al sistema de mesura avaluat, aquest seria apte per dur a terme el mesurament simultani de la concentració de retinol i d' α -tocoferol en el sèrum.

5. Bibliografia

- (1) Deulofeu Piquet R, Olmedilla Alonso, dirs. *Vitaminas Liposolubles*. Barcelona: Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; 2006. [ISBN 978-84-89975-26-2].
- (2) Illera Martín M, Ellera del Portal J, Illera del Portal JC. *Vitaminas y minerales*. Madrid: Editorial Complutense; 2000. [ISBN 84-7491-590-2].
- (3) Greaves RF, Woollard GA, Hoad KE, Walmsley TA, Johnson LA, Briscoe S, et al. *Laboratory Medicine Best Practice Guideline: Vitamins A, E and the carotenoids in blood*. *Clin Biochem Rev* 2014;35:81-114.
- (4) Granado Lorenzo F, Córdoba Chicote C, Olmedilla Alonso B, Deulofeu Piquet R, Ruiz Budría J. Evaluación del estatus nutricional de vitamina A. Documentos de la SEQC 2015:82-90.
- (5) Olmedilla Alonso B, Córdoba Chicote C, Deulofeu Piquet R, Granado Lorenzo F, Lara Navarro E, Ruiz Budría J. Evaluación del estatus nutricional de vitamina E. *Lab Clin* 2017; Pentent publicació: <http://www.seqc.es/es/comisiones/comision-de-nutricion-y-vitaminas/_id:20/> (consulta: 2017-01-10).
- (6) Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH. *Chromsystems® Instruction manual for HPLC analysis of Vitamin A and E in serum/plasma*. Version 6.0.0. Munich: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH; 2014.
- (7) Miró Balagué J, Fuentes Arderiu X, Jordi Baiges A, Martínez Casademont M, Pastor Ferrer C, Pérez Remón B, et al. Guia per a la verificació dels sistemes de mesura de magnituds biològiques per a l'acreditació segons la norma ISO 15189. *In vitro veritas* 2009;10: <<http://www.acclcat.com/continguts/ivv113.pdf>> (consulta: 2017-01-10).
- (8) European Parliament, Council of European Union. Directive 98/79 of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on *in vitro* diagnostic medical devices. *Official Journal of European Communities* 1998;(7.12.98):L331/1-L331/37.
- (9) Dixon WJ. Processing data for outliers. *Biometrics* 1983;9:74-89.
- (10) Barnett V, Lewis T. *Outliers in Statistical Data*. Nova York: Wiley; 1994.
- (11) Gella Tomás FJ, Canalias Reverter F, Izquierdo Alvarez S, Martínez Morillo E, Sánchez Manrique M. Recomendaciones para el estudio de la veracidad de los procedimientos de medida en el laboratorio clínico mediante la utilización de materiales de referencia. Documentos de la SEQC 2010:2-6.
- (12) Gella Tomás FJ, Canalias Reverter F, Izquierdo Alvarez S, Martínez Vázquez V, Sánchez Manrique M. Recomendaciones para la estimación de la incertidumbre de medida en el laboratorio clínico. Documentos de la SEQC 2009:27-9.
- (13) Altman DG. *Practical statistics for medical research*. Londres: Chapman and Hall; 1991.
- (14) Passing H, Bablok WA. New biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21:709-20.
- (15) Passing H, Bablok WA. General regression procedure for method transformation. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988;26:783-90.
- (16) International Organization for Standardization. *Medical laboratories—particular requirements for quality and competence*. ISO 15189. Geneva: ISO; 2012.