

**UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

**Stanovení 25-hydroxyvitaminu D<sub>3</sub> v séru pomocí  
vysokoučinné kapalinové chromatografie**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**2007**

**Bc. Barbora Navrátilová**

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**  
**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD**

**STANOVENÍ**  
**25-HYDROXYVITAMÍNU D3**  
**POMOCÍ VYSOKOÚČINNÉ**  
**KAPALINOVÉ CHROMATOGRFIE**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

AUTOR PRÁCE: Bc. Barbora Navrátilová

VEDOUCÍ PRÁCE: Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.

**2007**

**UNIVERSITY OF PARDUBICE  
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY  
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCE**

**HIGH-PERFORMANCE LIQUID  
CHROMATOGRAPHIC ASSAY FOR  
25-HYDROXYVITAMIN D3 IN  
SERUM**

**THESIS**

**AUTHOR: Bc. Barbora Navrátilová**

**SUPERVISOR: Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.**

**2007**

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 24.4. 2007

.....  
Podpis

### Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu diplomové práce Mgr. Romanu Kand'árovi, Ph.D. za odborné vedení a pomoc při experimentální práci v laboratoři a věcné připomínky při psaní mé diplomové práce. Déle bych chtěla poděkovat všem dobrovolným dárcům krve. V neposlední řadě děkuji své rodině a příteli za podporu a pochopení během celé doby studia.

# Obsah

<b>SOUHRN</b>	9
<b>SUMMARY</b>	10
<b>SEZNAM ZKRATEK</b>	11
<b>1. ÚVOD</b>	12
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b>	13
<b>2.1. Vitamin D3</b>	13
2.1.1 Chemická struktura	13
2.1.2 Fyziologie	15
2.1.3 Funkce	16
2.1.4 Výskyt	17
2.1.5 Referenční rozmezí	18
2.1.6 Denní doporučená dávka	19
2.1.7 Hodnocení nutričního stavu	20
2.1.8 Deficit	21
2.1.8.1 Deficit vitamínu D u dětí (rachitis)	21
2.1.8.2 Deficit vitamínu D u dospělých	23
2.1.9 Toxicita	28
<b>2.2. Možnosti stanovení 25-OH vitamínu D3</b>	29
2.2.1 Kapalinová chromatografie	29
2.2.2 Radioizotopové metody	30
2.2.3 Enzymová imunoanalýza	31
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	32
<b>3.1 Přístroje a pomůcky</b>	32
<b>3.2 Použité chemikálie</b>	33
<b>3.3 Příprava roztoků</b>	33
<b>3.4 Postup stanovení 25-OH vitamínu D3</b>	34

3.4.1	Vzorky krve	34
3.4.1.1	Zpracování vzorku pro chromatografickou analýzu	34
3.4.2	Chromatografická analýza	34
3.4.2.1	Mobilní fáze	34
3.4.2.2	Parametry pro HPLC	35
3.4.2.3	Kalibrační řada	36
3.4.2.4	Identifikace 25-OH vitamínu D3	36
3.4.2.5	Kvantifikace 25-OH vitamínu D3	36
3.4.3	Přesnost v sérii	36
3.4.4	Správnost	36
3.4.5	HPLC s elektrochemickou detekcí	37
3.4.5.1	Mobilní fáze	37
3.4.5.2	Parametry pro HPLC s elektrochemickou detekcí	37
3.4.5.3	Kalibrační řada	38
<b>4.</b>	<b>Výsledky</b>	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Chromatografická analýza</b>	<b>38</b>
4.1.1	Kalibrace	38
4.1.2	Přesnost	39
4.1.3	Správnost	39
4.1.4	Určení orientačních hodnot 25-OH vitamínu D3 u dobrovolných dárců krve	40
4.1.4.1	Chromatografické záznamy	40
<b>4.2</b>	<b>Statistická analýzy dat</b>	<b>45</b>
4.2.1	Analýzy jednoho výběru	45
4.2.1.1	Dobrovolní dárci krve se suplementací vitamínem D	45
4.2.1.2	Dobrovolní dárci krve bez suplementace vitamínem D	46
4.2.1.3	Dobrovolní dárci krve	46
4.2.2	Analýza dvou výběrů	47
4.2.2.1	Porovnání koncentrací 25-OH vitamínu D3 mezi dobrovolnými dárci krve se suplementací a bez suplementace vitamínem D	47

4.2.3 Korelace	48
4.2.3.1 Dobrovolní dárci krve	48
<b>5. Diskuse</b>	49
<b>6. Závěr</b>	52
<b>7. Seznam použité literatury</b>	53



# SOUHRN

Pod pojmem vitamin D rozumíme dvě chemické sloučeniny lišící se pouze složením vedlejšího řetězce. Ergokalciferol (vitamin D<sub>2</sub>), který se vyskytuje v rostlinách a cholekalciferol (vitamin D<sub>3</sub>) vyskytující se v živočišných tkáních. Vitamin D a jeho metabolity jsou důležité pro regulaci homeostasy vápníku a pro kostní metabolismus. Nejdůležitějšími metabolity vitaminu D jsou 25-OH vitamin D<sub>3</sub> a 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>.

Stanovení vitaminu D (25-OH vitaminu D<sub>3</sub>) bylo provedeno za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV-VIS detekcí. Pro separaci 25-OH vitaminu D<sub>3</sub> byla zvolena kolona s reverzní fází a mobilní fáze obsahující methanol – H<sub>2</sub>O (95:5; v/v).

Tato metoda byla aplikována na stanovení koncentrací 25-OH vitaminu D<sub>3</sub> u dobrovolných dárců krve. Zpracováním dat, získaných od dobrovolných dárců krve, bylo získáno orientační rozmezí analyzované látky, pro 25-OH vitamin D<sub>3</sub> 10,42 – 116,20 nmol/l. Byla zpracována statistická analýza naměřených dat, včetně porovnání získaných hodnot u dobrovolných dárců krve se suplementací vitaminem D a bez suplementace vitaminem D. Při analýze nebyla nalezena statisticky významná odlišnost dat.

## SUMMARY

As vitamin D we understand two chemical compounds differing only in the constitution of their secondary chain. Ergocalciferol (vitamin D<sub>2</sub>), which occurs in plants, and cholecalciferol (vitamin D<sub>3</sub>), which is common in animal tissues. Vitamin D and its metabolites are important for the regulation of calcium homeostasis and for bone metabolism. The most important metabolites of vitamin D are 25-OH vitamin D<sub>3</sub> and 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>.

The determination of vitamin D (25-OH vitamin D<sub>3</sub>) was made by method of high-performance liquid chromatography with UV-VIS detection. In order to separate 25-OH of vitamin D<sub>3</sub> the column with a reverse phase and a mobile phase containing methanol-H<sub>2</sub>O (95:5; v/v) were chosen.

This method was applied to determinate the concentration of 25-OH vitamin D<sub>3</sub> in blood donors. Processing the data acquired from blood donors resulted in the orientation range of the substance analysed, for 25-OH vitamin D<sub>3</sub> 10.42-116.20 nmol/l. The statistic analysis of the data measured was processed, including comparing the values obtained from the blood donors with the supplementation of vitamin D and the ones without the supplementation of vitamin D. No statistically significant data diversity was found out in the analysis.

# SEZNAM ZKRATEK

VDBP	vitamin D - vázající protein (z angl. vitamin D - binding protein)
NADPH	nikotinamidadenindinukeotidfosfát, redukována forma
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (z angl. messenger RNA)
CBP	vápník vázající protein (z angl. calcium – binding protein)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
AI	adekvátní příjem vitamínu D
VDDR I	vitamin D – dependentní rachitida typu I
VDDR II	vitamin D – dependentní rachitida typu II
RTG	rentgen
M – CSF	makrofágové kolonie stimulující faktor
TNF	tumor nekrotizující faktor (z angl. tumor necrosis factor)
RANKL	aktivátor receptoru pro $\kappa$ B, ligandu nukleárního faktoru
RANK	aktivátor receptoru pro nukleární faktor
IM	infarkt myokardu
NS	nervový systém
UL	nejvyšší tolerovaná dávka
U.I.	mezinárodní jednotky
IS	vnitřní standard (z angl. internal standard)
Sac – Cel	celulosa s ovčí protilátkou
WASHBUF	fosfátový tlumivý fyziologický roztok obsahující Tween
Ag	antigen
Ab	protilátka
RIA	radioimunoanalýza
EIA	enzymatická imunoanalýza
Aufs	absorbanční jednotky v úplném rozsahu (z angl. absorbance units full scale)

# 1. ÚVOD

V roce 1906 byla poprvé vyslovena domněnka, že rachitis je onemocnění způsobené nedostatkem známé látky vitaminového charakteru v potravě. V roce 1922 byla přítomnost antirachitického faktoru detekována v nezmýdelnitelném podílu rybího tuku. Velmi důležitou úlohu při hledání antirachitického faktoru měly výsledky zkoumání účinků ultrafialového světla. Kolem roku 1930 byl ozařováním ergosterolu vyroben preparát s vysokou antirachitickou účinností, ale pokusy o izolaci krystalických forem vitaminu byly spojeny s mnoha těžkostmi. Samotný vitamin D3 byl připraven až v roce 1936 nejprve ozáření syntetického 7-dehydrocholesterolu, posléze byl izolován z rybího tuku. Vitamin D3 patří do skupiny vitaminů rozpustných v tucích. Tuková tkáň je jeho nekonečnou zásobárnou.<sup>(1)</sup>

Vitamin D3, ačkoli je zařazován do skupiny vitaminů, může být posuzován spíše jako steroidní hormon. Vitamin D3 je všeobecně užívaný termín zahrnující strukturně příbuzné, biologické metabolity vitaminu D3. 25-OH vitamin D3, nazývaný kalcidiol, vzniká hydroxylací v játrech. Hydroxylace vitaminu D3 v játrech je regulována zpětnou vazbou. 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D3, nazývaný kalcitriol, vzniká další hydroxylací převážně v ledvinách. Kapacita ledvinné tvorby kalcitriolu je omezená a řízena hladinou vápníku a fosforu v plasmě.<sup>(2, 3, 4, 5, 6)</sup>

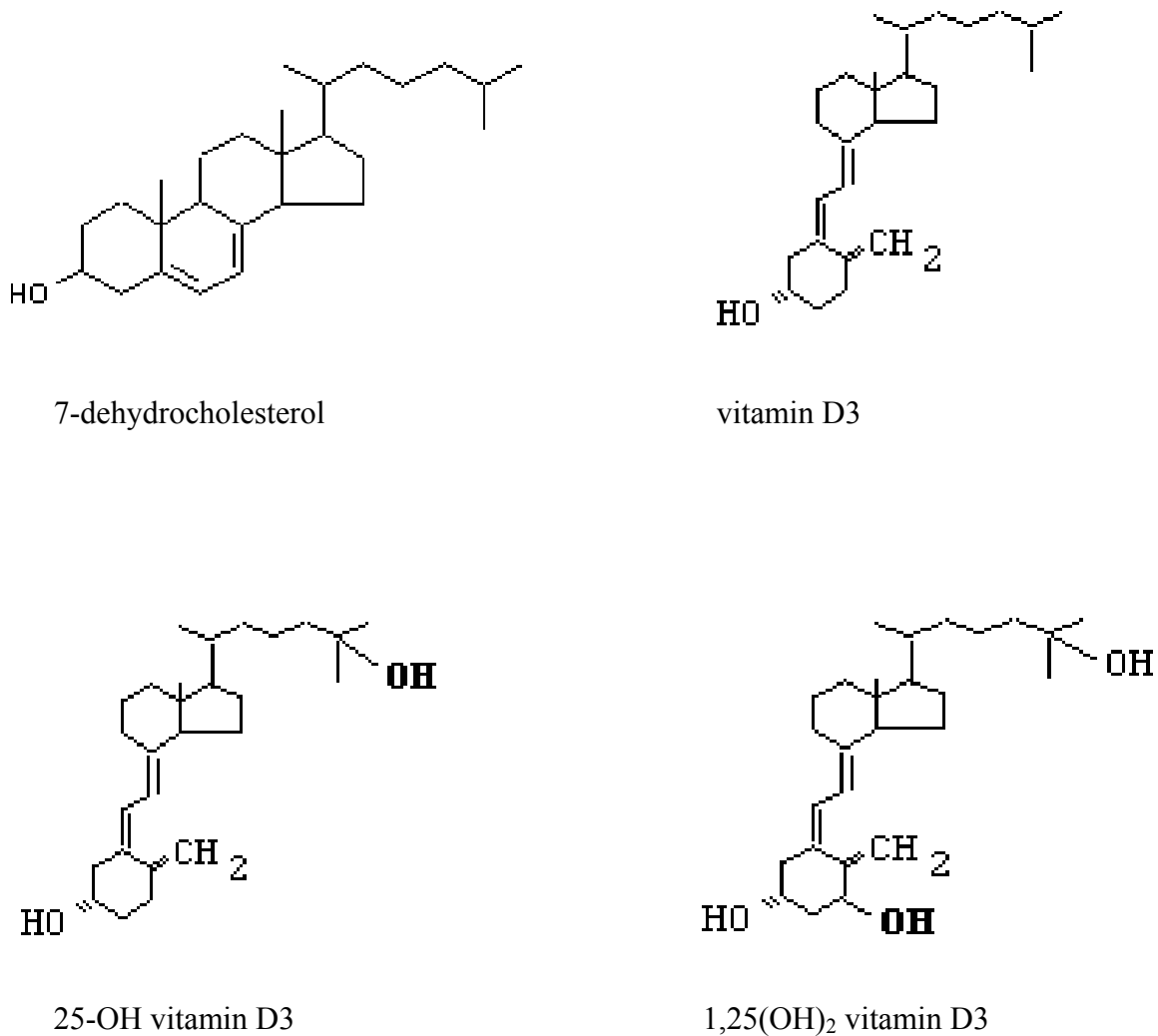
Cílem této práce bylo vypracovat experimentální metodu pro stanovení 25-OH vitaminu D3, určit analytické parametry metody a orientační hodnoty u dobrovolných dárců krve. Dále porovnat skupinu dobrovolných dárců krve s a bez suplementace vitaminem D.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Vitamin D3

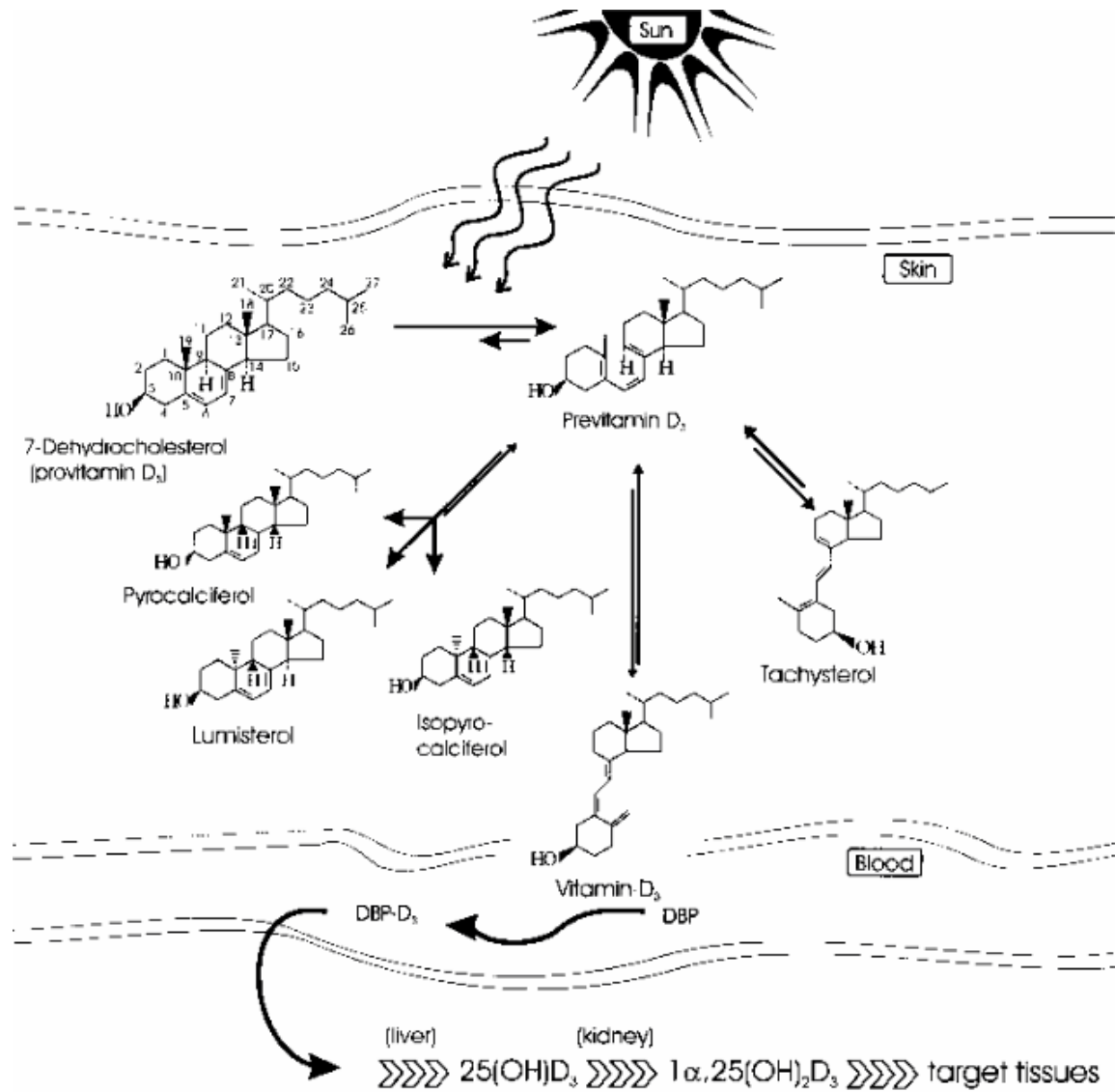
#### 2.1.1 Chemická struktura

Chemická struktura vitaminu D3 a jeho metabolitů je znázorněna na obrázku 1.



Obrázek 1. Chemická struktura vitaminu D3 a jeho metabolitů

Metabolismus vitamínu D<sub>3</sub> v lidském těle je znázorněn na obrázku 2.



Obrázek 2. Metabolismus vitamínu D<sub>3</sub> v lidském těle

## 2.1.2 Fyziologie

**Absorpce a transport:** Potravou je přijímán vitamin D3 a vstřebává se v tenkém střevě při neporušené absorpci tuků. Vitamin D3 je také syntetisován v lidském organismu. Proto není vitaminem, ale spíše steroidním hormonem. Prekurzorem vitaminu D3 je 7-dehydrocholesterol, vitamin D3 (cholekalCIFerol) se tvoří v Malpighiho vrstvě epidermis. Děje se tak neenzymovou reakcí, tzv. fotolytickou reakcí působením ultrafialového světla. V krvi je vitamin D3 přenášen pomocí DBP, vázán je i na albumin. Vitamin D3 se do určité míry ukládá v játrech, v ledvinách a v tukové tkáni. Jistá zásoba je přítomná i v krevní plasmě, kde je vitamin D3 vázán na proteiny. Nadbytečné vystavení těla ultrafialovým paprskům snižuje tvorbu vitaminu D3 a vznikají fotoprodukty bez biologického účinku. <sup>(7, 8, 9)</sup>

**Metabolismus a exkrece:** Nejdůležitější fází metabolismu je přeměna neaktivní formy vitaminu D3 na formu aktivní, což můžeme vidět na obrázku 2. CholekalCIFerol je vázán na specifický transportní protein zvaný DBP, který vitamin D3 transportuje z kůže nebo tenkého střeva do jater. Zde probíhá jeho 25-hydroxylace, což je nezbytná reakce při biosyntese kalcitriolu. 25-hydroxylace probíhá v endoplasmatickém retikulu reakcí, která vyžaduje hořčík, NADPH, kyslík a dva enzymy: NADPH-dependentní cytochrom P-450 reduktasu a cytochrom P-450. Vzniklý 25-OH vitamin D3 (kalcidiol) vstupuje do krve a ve vazbě na DBP je transportován do ledvin. 25-OH vitamin D3 ovlivňuje metabolismus vápníku v kosti a podporuje tubulární reabsorpci vápníku. Také je nejpřesnějším indikátorem stavu saturace vitaminem D. Další hydroxylace ( $1\alpha$ ) nastává v mitochondriích renálních proximálních tubulů v komplexní, tříkomponentové monooxygenasové reakci, která vyžaduje NADPH, hořčnaté ionty, kyslík a nejméně tři enzymy: flavoproteinovou renální ferredoxinreduktasu, protein obsahující síru a železo – renální ferredoxin a cytochrom P-450. Tento systém tvoří nejúčinnější, přirozeně se vyskytující metabolit vitaminu D,  $1,25(\text{OH})_2$  vitamin D3 (kalcitriol).

$1\alpha$  hydroxylace probíhá i v jiných tkáních, pomocí 25D-1-hydroxylasy (aktivované makrofágy a monocyty, při tuberkulóze, sarkoidóze).

Tento produkt hydroxylace působí na receptory, jak v klasických kalcium regulujících orgánech (střevo, kosti, ledviny, příštítná tělíska), tak v imunitním systému,  $\beta$  buňkách pankreatu a buňkách kůže. Aktivní forma vitamínu D3 je účinná jen několik dní, poté se hydroxyluje. Vytvořené produkty se vylučují žlučí. <sup>(7, 8)</sup>

### **2.1.3 Funkce**

1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D3 je schopen se vázat k receptorům přibližně třiceti cílových orgánů nalézajících se v gonádách, pankreatu, žaludku, mozku, mléčné žláze a mononukleárních buňkách. <sup>(1, 10, 11)</sup>

#### **Podpora resorpce vápenatých iontů a fosfátů v tenkém střevě**

Aktivní forma vitamínu D3 se transportuje do jader epitelových buněk tenkého střeva, kde vyvolává tvorbu mRNA pro syntézu proteinu transportujícího vápenaté ionty. Protein, který transportuje vápenaté ionty má vysoký podíl molekul asparaginu a kyseliny glutámové. Protein obsahuje 4 skupiny, které mají schopnost vázat vápenaté ionty. Na příjmu vápenatých iontů do epitelových buněk se podílí Ca<sup>2+</sup>-ATPasa a alkalická fosfatasa. Vápenaté ionty se transportují pomocí proteinu do buněk a následně se uvolňují do krevní plasmy. Nejvyšší obsah proteinů transportující vápenaté ionty je v období růstu. <sup>(8)</sup>

#### **Podpora mobilizace vápenatých iontů a fosfátu z kostí**

Zde nastává úzká spolupráce s parathormonem. Při nedostatečné tvorbě aktivní formy vitamínu D3 je účinnost parathormonu v kostech malá. Účinek se realizuje zvýšenou tvorbou kyselin uhličitých a mléčných v osteocytech. Rozsah výměny minerálních látek v kostech závisí na výživě a věku. <sup>(8)</sup>

#### **Funkce 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamínu D3 v buňkách příštítných tělísek**

V buňkách příštítných tělísek způsobuje 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D3 inhibici syntézy parathormonu. Proto při normálním obsahu vápníku v krevní plasmě brzdí mobilizaci minerálních látek z kostí. <sup>(8)</sup>



### **Funkce 1,25(OH)<sub>2</sub> vitaminu D3 v buňkách syntetizující prolaktin**

V buňkách, které syntetizují prolaktin, podporuje 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D3 tvorbu hormonů. Ke konci gravidity a v průběhu laktace stoupá obsah kalcitriolu v krevní plasmě, což stimuluje tvorbu prolaktinu.<sup>(8)</sup>

### **Funkce 1,25(OH)<sub>2</sub> vitaminu D3 v β - buňkách pankreatu**

1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D3 podporuje v β - buňkách pankreatu sekreci insulinu.<sup>(8)</sup>

### **Další významné funkce 1,25(OH)<sub>2</sub> vitaminu D3**

1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D3 stimuluje transkripci genu a tvorbu specifických mRNA.

1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D3 indukuje mRNA kódující CBP.

V lymfocytech inhibuje 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D3 mitosu, vyvolanou přidavkem fytohemaglutininu.<sup>(8)</sup>

1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D3 je nezbytný pro působení vápníku na cévní stěnu.

1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D3 podporuje fagocytosu.

V keratinocytech umožňuje 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D3 vznik C<sub>2</sub> ceramidů.

1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D3 zvyšuje diferenciaci a tlumí proliferaci buněk.<sup>(9)</sup>

## **2.1.4 Výskyt**

Vitamin D3 je zastoupen pouze v živočišné stravě. Nejbohatším zdrojem je však působení ultrafialových paprsků.

Významné množství vitaminu D obsahují pouze játra, oleje z rybích jater, tuk herinků, makrel a sardinek, fortifikované margariny a vaječný žloutek. Obsah v mléku a v másle závisí na ročním období, protože v organismu krav je syntetizován ve větším množství při pastvě na slunci, a tak se zvyšuje i jeho obsah v mléce.<sup>(1, 12, 13)</sup>



### Ovlivnění výsledků

Snížené hodnoty se objevují ve vysokém věku, při dlouhodobém užívání antikonvulsních léků (cimetidin, izoniazid), které způsobují inhibici hydroxylace vitamínu D<sub>3</sub>.<sup>(9)</sup>

Zvýšené hodnoty se objevují u vyšší expozice slunečními paprsky, po předchozí aplikaci heparinu, v závislosti na menstruačním cyklu (vzestup v době ovulace), v těhotenství nebo po užívání léků (fenobarbital).<sup>(9)</sup>

## 2.1.6 Doporučená denní dávka

Vitamin D má mezi vitaminy zvláštní postavení, poněvadž může být v těle syntetizován a není nutné ho vždy dodávat potravou. Doporučené hodnoty příjmu vitamínu D představují pouze množství podané per os. Při adekvátním slunečním záření není perorální příjem zapotřebí, protože v tomto případě může být v kůži každého dospělého jedince syntetizováno dostatečné množství vitamínu D. Exogenní potřeba vitamínu D závisí na geografických, klimatických a kulturních faktorech, které předurčují expozici kůže slunečnímu záření.

Do roku 2002 nebyly stanoveny hodnoty doporučeného příjmu vitamínu D, protože neexistuje dostatek znalostí o celkovém příjmu vitamínu D. Dnes jsou publikovány pouze tzv. hodnoty adekvátního příjmu (AI) vitamínu D. Adekvátní příjem představuje takový příjem vitamínu, který pravděpodobně pokryje potřeby všech členů jednotlivých skupin podle věku a pohlaví.<sup>(1, 14)</sup>

Tabulka II. Hodnoty AI pro vitamin D v USA<sup>(1, 15, 16)</sup>

Osoby	Vitamin D <sub>3</sub> (µg/den)
Kojenci, děti, adolescenti obojího pohlaví	5
Muži, ženy do 50 let	5
Muži, ženy do 70 let	10
Muži, ženy nad 70 let	15
Těhotné a kojící ženy	5

Tabulka III. Hodnoty AI pro vitamin D v Německu, Rakousku a Švýcarsku<sup>(1, 11)</sup>

Osoby	Vitamin D3 (µg/den)
Kojenci do 1 roku	10
Děti a adolescenti	5
Dospělí od 19 – 65 let	5
Dospělí nad 65 let	10
Těhotné a kojící ženy	5

Tabulka IV. Hodnoty AI pro vitamin D v ČR<sup>(17)</sup>

Osoby	Vitamin D3 µg/den
Kojenci do 1 roku	5 - 10
Děti 7 – 17 let	15
Dospělí od 19 – 65 let	5
Dospělí nad 65 let	10
Těhotné a kojící ženy	10

## 2.1.7 Hodnocení nutričního stavu

Stav saturace organismu vitaminem D nejpřesněji odrážejí hladiny 25-OH vitaminu D3 v plasmě. Normální hodnoty tohoto metabolitu spolu s normálními hladinami vápníku, fosforu, parathormonu a normální aktivitou alkalické fosfatasy v krvi indikují adekvátní příjem vitaminu D.

Evidentní nedostatek vitaminu D se zvýšeným rizikem rachitidy a osteomalacie je diagnostikován při hladinách 25-OH vitaminu D3 pod 10 nmol/l. Zvýšené hladiny parathormonu byly nalezeny již při hladinách 25-OH vitaminu D3 v séru mezi 10 – 25 nmol/l. Tyto hodnoty jsou proto považovány za indikátor suboptimálního příjmu.<sup>(1, 11)</sup>

Tabulka V. Nutriční stav <sup>(1,14)</sup>

Hodnoty 25-OH vitamínu D3 v séru	
80 – 120 nmol/l	Nejnižší koncentrace indikující normální saturaci
20 – 25 nmol/l	Těžký deficit vitamínu D vedoucího k rachitidě a osteomalacii.
<100 nmol/l	Deficit vitamínu D u starých lidí

## 2.1.8 Deficit

Nedostatek vitamínu D interferuje s homeostasou vápníku a metabolismem fosforu. Nedostatkem vitamínu D trpí kojenci, malé děti a staří lidé. Proto se např. kojencům do šesti měsíců vitamin D podává per os.

Další rizikovou skupinou, která může trpět nedostatkem vitamínu D jsou vegetariáni, alkoholici, epileptici, lidé s nemocemi jater a ledvin nebo lidé s poruchou absorpce tuků.

Nedostatek vitamínu D se projevuje svalovou slabostí, ztuhlostí a také zvýšenou citlivostí k infekcím. U dětí se mohou vyskytovat nespecifické symptomy, např. roztěkanost, podrážděnost, nadměrné pocení a nechutenství. Nedostatek vitamínu D může vést ke zvýšené křehkosti kostí ve stáří. Akutní nedostatek vitamínu D se projevuje u dětí onemocněním zvaným křivice (rachitis), u dospělých osteomalacií a osteoporosou.<sup>(6)</sup>

### 2.1.8.1 Deficit vitamínu D3 u dětí (rachitis)

#### Definice a charakteristika

Rachitida je osteomalacie objevující se u dětí. Nedostatek vitamínu D způsobuje snížení kalcifikace základních organických látek kostí. Tvoří se tkáň chudá na minerální látky (osteoidy) s malou mechanickou odolností. Křiví se páteř a na kostech se tvoří deformity.<sup>(18)</sup>

## Formy rachitidy

U dětí se vyskytují 3 formy geneticky podmíněné rachitidy.

1. Při hypofosfatémii závislé na chromozomu X je snížena tvorba kalcitriolu při normálním příjmu vitamínu D.  
Absorpce fosfátů v tenkém střevě, jako i reabsorpce fosfátů v tubulech ledvin je snížena.<sup>(8)</sup>
2. Vitamin D-dependentní rachitida typu I (VDDR I)  
Tato choroba se dědí autozomálně recesivně. Jde o defektní produkci  $1,25(\text{OH})_2$  vitamínu D ledvinami, pravděpodobně jako defekt  $1\alpha$ -hydroxylasy. Sérová koncentrace 25-OH vitamínu D3 je normální nebo dokonce zvýšená.<sup>(6)</sup>
3. Vitamin D-dependentní rachitida typu II (VDDR II)  
Tuto rachitidu vyvolává defekt ve výstavbě receptorů pro kalciferol, resp. nedostatečná účinnost komplexu  $1,25(\text{OH})_2$  vitamínu D3 a receptoru v jádře buňky.<sup>(8)</sup>

## Klinický obraz

Při pohmatu dochází k měknutí lebeční kosti, těžší deformity lebky jsou vzácné. Zduřením na rozhraní mezi kostěnou a chrupavčitou částí žebí vzniká rachitický růženeč, hrudník bývá zploštělý. U neléčených forem rachitidy dochází k progresivním deformitám pánve, kosti stehenní, kosti holenní, kosti vřetenní a kosti loketní.<sup>(6)</sup>

Obrázek 3. RTG nález deformity pánve u dítěte



## **Diagnostika**

K nejdůležitějším vyšetřením patří vyšetření rentgenologické, což můžeme vidět na obrázku 3. U biochemického vyšetření sledujeme hladinu vápníku, fosfátu, alkalické fosfatasy a 25-OH vitamínu D3 v plasmě. Biochemické vyšetření provádíme s ohledem k věku pacienta.

## **Terapie**

Vynikající účinek na léčbu rachitidy má metabolit vitamínu D, 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D3. 25-OH vitamin D3 ve vysokých koncentracích může aktivovat receptor pro 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D3.<sup>(6)</sup>

### **2.1.8.2 Deficit vitamínu D u dospělých**

#### **Metabolicky podmíněné nemoci kostí**

Metabolicky podmíněné nemoci kostí čili metabolické osteopatie jsou choroby kosterního aparátu, které mají příčinu v porušeném metabolismu kostí. Rozvíjejí se pomalu, spíše roky až měsíce. Jsou velmi časté a neustále jich přibývá.<sup>(18)</sup>

Nejčastější metabolicky podmíněnou nemocí kostí je osteoporosa (5 – 8 % bělošské populace), na druhém místě osteomalacie.<sup>(19)</sup>

#### **Osteoporosa (prořídnutí kostí)**

Osteoporosa je definována jako systémové onemocnění skeletu, charakterizované ztrátou kostní hustoty a změnou mikroarchitektury kostní tkáně.<sup>(19)</sup>

Z kostí se ztrácí vápník, dochází k poklesu density kostního materiálu. Kost je méně pevná, je zde sklon k frakturám.

Osteoporosa postihuje hlavně ženy po klimakteriu. Touto metabolickou chorobou trpí každá pátá žena v ČR.<sup>(18)</sup>

Patofyziologický podklad osteoporosy je dán nerovnováhou mezi osteoresorpcí a novotvorbou kostní tkáně. Tyto procesy, které jsou navzájem úzce vázány a propojeny mnoha autokrinními a parakrinními působky, probíhají v kostní tkáni po celý život jedince.

Osteoresorpce je výsledkem činnosti aktivovaných, velkých mnohjaderných buněk s bohatou metabolickou aktivitou. Jejich vznik z pluripotentních kmenových buněk a preosteoklastů je regulován faktory, uvolněnými z osteoblastů. Významnou roli sehrává především růstový faktor M – CSF a poměrně nově popsané lokální působky, patřící do rodiny TNF a jeho receptorů. Osteoklasty produkují RANKL, který se váže na receptor na povrchu osteoklastů (RANK). Aktivací tohoto receptoru se v osteoklastech spouští kaskáda pochodů, vedoucích k transkripčním dějům v jádře buňky a tedy aktivaci osteoklastů. Aktivovaný osteoklast odbourává kostní tkáň (její organickou i anorganickou složku).

Paralelně aktivované osteoblasty nasedají na resorbované místo a secernují organickou složku budoucí kosti, osteoid, který je následně mineralizován. Tento proces je neustálý a nezbytný k reparaci mikropoškození kostní tkáně.<sup>(19)</sup>

## **Formy osteoporosy**

### **1. Primární**

Typ I. Tato forma osteoporosy nemá zjevnou příčinu (idiopatické, esenciální). Vzniká jako důsledek přestavby kostí u žen v klimakteriu při deficitu estrogenů. Dochází ke stimulaci osteoresorpce při nezměněné nebo snížené osteosyntese a množství kostní tkáně a kostního materiálu postupně klesá.

Typ II. Senilní osteoporosa postihující obě pohlaví a manifestující se obvykle až po 65. roce života.<sup>(19)</sup>

Jiné možné příčiny primární osteoporosy jsou výživové faktory, hlavně nedostatek vápníku v potravě nebo poruchy v jeho využití v organismu. Rizikovým faktorem je také kouření.<sup>(18)</sup>

### **2. Sekundární**

Vznikají druhotně při jiném onemocnění.

Osteoporosa z inaktivity, která vzniká při dlouhodobém znehybnění na lůžku, je součástí tzv. imobilizačního syndromu.<sup>(18)</sup>



Osteoporosa steroidní, která vzniká v důsledku nadbytku glukokortikoidů (hyperkortikalismus) nebo při dlouhodobém léčení vysokými dávkami kortikoidů. <sup>(18)</sup> Osteoporosa při revmatoidní artritidě, thyreotoxikose, nebo při léčbě antiepileptiky.

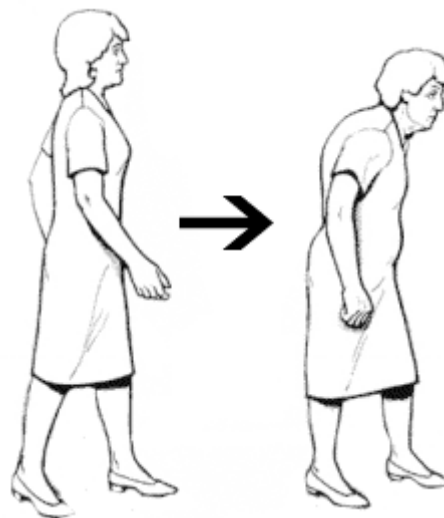
### **Klinický obraz**

Klinické příznaky osteoporosy jsou zpočátku málo výrazné. Mohou se projevit bolestmi v zádech či bolestmi dlouhých kostí. Typické jsou příznaky vyvolané komplikacemi, především frakturami obratlů. Ty vedou k typické deformaci postavy s výraznou hrudní kyfosou a bederní hyperlordosou a zmenšením tělesné výšky. Deformace postavy vede ke stlačení hrudních orgánů s častými respiračními problémy a ke stlačení horní části zažívacího traktu. <sup>(19)</sup>

Obrázek 4. RTG nález úbytku kostní tkáně



Obrázek 5. Změna tvaru osteoporotických obratlů



### **Diagnostika**

Zobrazovací techniky. Rozhodujícím diagnostickým kritériem je pokles density kostního materiálu, měřený pomocí kostních denzitometrů (modifikované RTG přístroje).

Biochemické markery. Stanovení laboratorních ukazatelů kostního metabolismu je založeno na měření aktivity enzymů specifických pro osteoblasty a osteoklasty, které se podílejí na osteosyntéze a osteoresorpci. Dále se stanovují organické složky kostní matrix, které jsou uvolňovány do cirkulace.

Mezi hlavní markery kostní novotvorby patří aktivita kostního isoenzymu alkalické fosfatasy a osteokalcin, jako hlavní nekolagenní protein kostní tkáně. Dalším ukazatelem kostní formace mohou být C a N terminální propeptid prokolagenu typu I.

Mezi markery kostní resorpce odrážející aktivitu osteoklastů patří především degradační produkty kolagenu (hydroxyprolin, pyridinolin, deoxypyridinolin).<sup>(19, 20)</sup>

### **Terapie**

Základem je aktivita pacienta, který musí výrazně zvýšit příjem vápníku potravou. K základním terapeutickým opatřením patří suplementace vápníku (500 – 1000 mg/den) a současně suplementace vitamínem D.

V případě postmenopausálního deficitu estrogenů je hormonální suplementace léčbou první volby.<sup>(19)</sup>

### **Osteomalacie (měknutí kostí)**

Osteomalacie je metabolická osteopatie, vyznačující se nedostatečnou mineralizací nově vytvořené organické kostní tkáně (osteoidu). Nedostatečně mineralizovaná kost je měkká.

Při patofysiologii je hlavní příčinou nedostatek mineralizujících látek (sloučenin vápníku a fosforu), které se do organismu dostávají v nedostatečném množství (špatné stravování, onemocnění gastrointestinálního traktu) nebo se organismu v nadměrném množství ztrácejí (u ledvinových chorob).

Dalšími příčinami je tzv. osteomalacie z nedostatku vitamínu D nebo jeho biologicky aktivních metabolitů nebo osteoid není schopen mineralizovat, i když minerálních látek je dostatek.<sup>(18)</sup>

## Klinický obraz

Jedná se o deformity kostí (kyfosa hrudní páteře, deformity pánve, ohnutí kosti holenní nebo kosti stehenní, vpáčení postranních částí hrudníku). Pacient ztrácí výšku, snadno utrpí zlomeniny kostí. Hojení kostí je zdlouhavé.<sup>(18)</sup>

Obrázek 6. Těžké deformity kostí



Obrázek 7. RTG nález hrudní kyfosy



## Diagnostika

Stejně jako u křivice je nejdůležitějším vyšetřením potvrzující diagnosu osteomalacie vyšetření rentgenologické. U biochemické diagnostiky osteomalacie stanovujeme vápník, fosfor a cirkulující 25-OH vitamin D3 v séru pacienta. Pro diagnosu osteomalacie je dnes velice důležitá i kostní biopsie.<sup>(6)</sup>

## Terapie

Terapie osteomalacie je schodná s terapií u křivice a osteoporosy.

Tabulka VI. Další onemocnění související s nedostatkem nebo selháním metabolismu vitamínu D<sup>(2)</sup>

Ledvinové onemocnění	nefrotický syndrom, proteinurie
Svalová dysfunkce	svalová slabost, svalová nerovnováha
Diabetes	insulinová rezistence, obezita, syndrom X
Selhání imunitního systému	tuberkulóza, roztroušená skleróza, revmatoidní artritida, tyreoiditida
Srdeční a oběhové selhání	IM, ateroskleróza, hypertenze
Onkologické onemocnění	rakovina prsu, tlustého střeva, non-Hodgkinův lymfom
Dysfunkce NS	deprese, schizofrenie, Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba

### 2.1.9 Toxicita

Toxicita vitamínu D je nízká. Nejvyšší tolerované dávky jsou uvedeny v tabulce VII. V určitých případech nebyly zjištěny vedlejší účinky ani u dávek do 3000-4000 U. I./den vitamínu D. Kritická dávka se pohybuje okolo 5000 U. I./den. Toxicita vitamínu D nebyla prokázána u nadměrné expozice slunečními paprsky. Toxicita byla prokázána až při perorálním podání vitamínu D. Po podání více než 25000 U. I. vitamínu D/den byla prokázána toxická reakce ve formě žaludečních symptomů (nucení ke zvracení, zvracení, průjem), bolesti hlavy, nadměrná žízeň, nadměrné močení a další symptomy spojené s hyperkalcémií.

Dlouhodobé užívání vitamínu D může vést k hypertenzi a nefrolithiase.<sup>(2, 21, 22)</sup>

Při užívání vitamínu D nebyly prokázány žádné mutagenní, karcinogenní ani teratogenní účinky.<sup>(1)</sup>

Tabulka VII . Nejvyšší tolerované dávky vitamínu D

Věková skupina	UL vitamínu D3 (U.I./den)
Děti do 3 let	2000
Děti a adolescenti	10000
Dospělí	20000
Dospělí nad 65 let	15000
Těhotné ženy	10000

## 2.2 Možnosti stanovení 25-OH vitamínu D3

### 2.2.1 Kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je metoda umožňující separaci a stanovení látek ve směsi. Směs látek je unášena mobilní fází (MF) skrz chromatografickou kolonu. Chromatografická kolona obsahuje náplň (tzv. stacionární fázi, SF), kde dochází k rozdělení látek obsažených ve směsi mezi SF a MF podle jejich fyzikálních a chemických vlastností. Eluát (MF se složkou směsi) vytékající z kolony prochází průběžně detektorem, který je zapojen za kolonou.

Detektor automaticky a kontinuálně měří některou z fyzikálních vlastností eluátu, např. absorpci v UV nebo viditelné části spektra (spektrofotometrický UV-VIS detektor), fluorescenci (fluorescenční detektor), atd. <sup>(23)</sup>

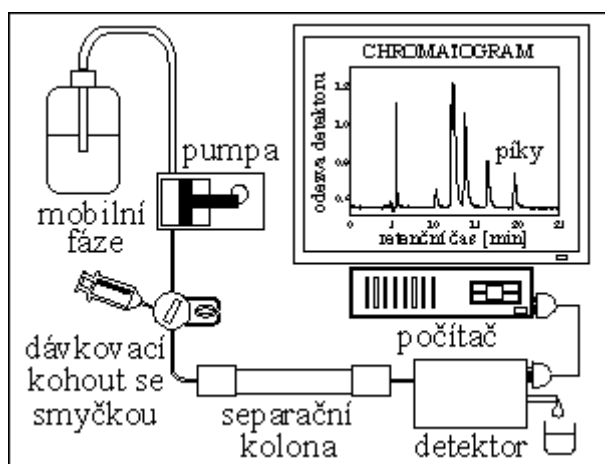
#### *Příklad 1*

Možnost stanovení pomocí soupravy Chromsystems 25-OH vitamín D3 v séru/plasmě. Souprava Chromsystems 25-OH vitamín D3 v séru/plasmě je kompletní testovací systém pro extrakci a kvantifikaci 25-OH vitamínu D3 pomocí HPLC s UV-VIS detekcí. Tato souprava je vyráběna firmou Chromsystems.

#### *Příklad 2*

Možnost stanovení 25-OH vitamínu D3 pomocí extrakce do n-hexanu a následné odpaření organické vrstvy parami atmosférického dusíku. Po odpaření je vorek rozpuštěn v methylalkoholu (methanolu). <sup>(24)</sup>

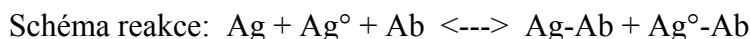
Obrázek 8. Schéma HPLC



## 2.2.2 Radioizotopové metody (RIA)

Při radioizotopových metodách dochází ke kompetitivní reakci konstantního množství značeného antigenu a neznámého množství vyšetřované látky (neznačeného antigenu nebo haptenu, obecně ligandu) s konstantním množstvím protilátky, které je však nižší, než je potřeba k vyvázání veškerého antigenu (značeného i neznačeného).

Aktivita komplexu antigen-protilátka je tím vyšší, čím nižší je koncentrace stanovované látky ve vzorku.<sup>(25)</sup>



### *Příklad 1*

Značený antigen :  $^{125}\text{I}$  DBP

Neznačený antigen : DBP v lidském séru

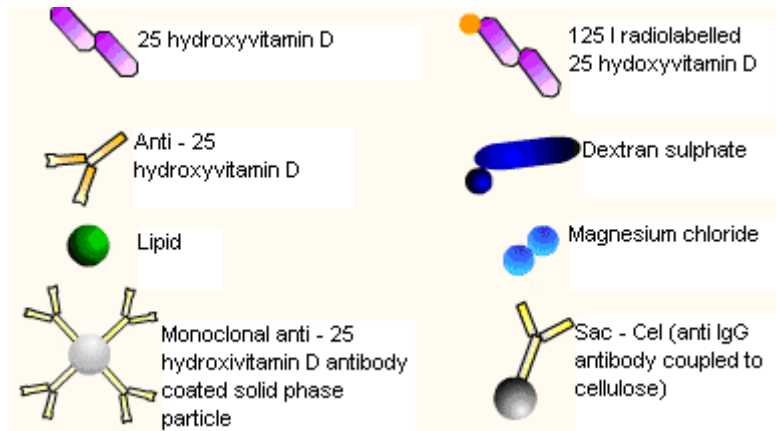
Monoklonální králičí protilátky : anti-DBP<sup>(26)</sup>

### *Příklad 2*

Možnost stanovení pomocí soupravy IDS Gamma-B 25-Hydroxy Vitamin D RIA. Souprava IDS Gamma-B 25-Hydroxy Vitamin D RIA je kompletní testovací systém pro extrakci a kvantifikaci 25-OH vitamínu D a dalších hydroxylovaných metabolitů v séru nebo plasmě. Vyrobeno: IDS. Product Insert Gamma-B 25-Hydroxy Vitamin D RIA, 2005.

Obrázek 9. Schéma stanovení 25-OH vitamínu D3 pomocí soupravy IDS Gamma-B

### 25-Hydroxy Vitamin D RIA

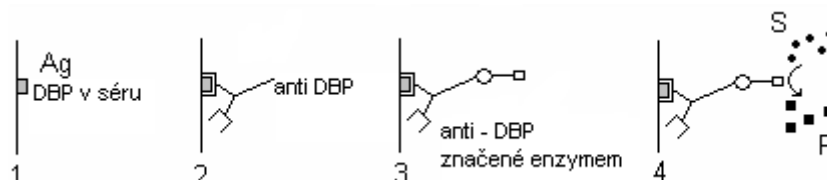


### 2.3.3 Enzymová imunoanalýza (EIA)

Enzymové imunoanalýzy jsou citlivé imunochemické metody, které využívají enzymů ke značení antigenu nebo protilátky. Jako enzymová značka slouží obvykle peroxidasa nebo alkalická fosfatasa.

**Heterogenní enzymová imunoanalýza** se označuje enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). U tohoto typu metody je jedna komponenta imunochemické reakce (antigen nebo protilátka) nespecificky adsorbována na povrch pevné fáze. Jako pevné fáze se užívají různé materiály – zkumavky, jamky mikrotitračních destiček, magnetické částice. Pevná fáze usnadňuje oddělení vázaných a volných značených reaktantů. <sup>(25)</sup>

Obrázek 10. Schéma reakce enzymové imunoanalýzy



## 3. Experimentální část

### 3.1 Přístroje a pomůcky

Hlubokomrazicí box MDF – U3086	Sanyo, Japonsko
Chladnička	Calex, Česká Republika
Autosampler SIL – 10 AD <sub>VP</sub>	Schimadzu, Japonsko
Třepačka HEIDOLPH REAX top	Heidolph, Německo
Ultrazvuková vana K 12	Kraintek, Slovensko
Termovap TV 10	Ecom spol.s.r.o., ČR
Vysokotlaké analytické čerpadlo LC – 10AD <sub>VP</sub>	Schimadzu, Japonsko
Chromatografická kolona	
LiChoCART (R) 125 – 4 Purospher (R) star RP – 18e opatřená ochranou předkolonou 4-4	Merck, Německo
Chromatografická mikrokolona	
Discovery Bio Wide Pore (C 18 HPLC column 15cm x 1mm x 5µm)	Sigma - Aldrich, Německo
Termostat kolony CTO – 10 AC <sub>VP</sub>	Schimadzu, Japonsko
Řídicí systém SLC – 10 AD <sub>VP</sub>	Schimadzu, Japonsko
UV-VIS detektor SPD – 10 A <sub>VP</sub>	Schimadzu, Japonsko
Coulochem III	ESA, USA
Vyhodnocovací software Clarity	Data Apex, ČR
Odběrové zkumavky Vacuette K <sub>3</sub> EDTA	Greiner, bio-one, Německo
Automatické pipety	Biohit, Finsko
Multidávkoč	Eppendorf, Německo
Kádinky, odměrné válce, skleněné zkumavky, mikrozkušavky, tmavé vialky	



## 3.2 Použité chemikálie

deionizovaná voda ( $G < 0,1 \mu\text{S}$ )

methanol pro HPLC ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , čistota $\geq 99\%$ )	MERCK, Německo
ethanol pro přípravu vzorku ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , čistota $\geq 99\%$ )	MERCK, Německo
n-hexan pro přípravu vzorku ( $\text{C}_6\text{H}_6$ , čistota $\geq 99\%$ )	MERCK, Německo
kyselina chloristá 85%, $c = 11,59 \text{ mol/l}$	Sigma - Aldrich, Německo
25-OH vitamin D3 ( $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}$ , $M_r = 384,62$ )	Sigma - Aldrich, Německo
IS vitaminu D3	Chromsystems, Německo

## 3.3 Příprava roztoků

### Zásobní roztok 25-OH vitaminu D3 o koncentraci cca 40 mg/l

Navážka 1 mg standardu 25-OH vitaminu D3 byla rozpuštěna v 25 ml methanolu. Zásobní roztok byl uchováván při  $-80^\circ\text{C}$ . Takto připravený roztok byl rozpipetován po 250  $\mu\text{l}$  do tmavých polyethylenových mikrozkušavek.

Koncentrace byla určena fotometricky, kdy k 250  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku bylo přidáno 600  $\mu\text{l}$  methanolu.

$$A = c \times l \times 18300$$

A = absorbance standardu

c = koncentrace analytu v nmol/l

l = tloušťka květy

absorpční koeficient = 18300

Pracovní roztoky 25-OH vitaminu D3 o koncentraci cca 1000 nmol/l, 500 nmol/l a 250 nmol/l. Pracovní roztoky 25-OH vitaminu D3 o dané koncentraci byly připraveny odpovídajícím ředěním v methanolu.

### Příprava roztoku vnitřního standardu

Vnitřní standard byl připraven naředěním 200  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku s 800  $\mu\text{l}$  methanolu.

## **3.4 Postup stanovení 25-OH vitamínu D3**

### **3.4.1 Vzorky krve**

Vzorky venózní krve byly získány od dobrovolných dárců krve z KBBV univerzity Pardubice, (19 žen ve věku 22 – 68 let).

Krev byla odebrána do odběrových zkumavek Vacuette K<sub>3</sub>EDTA . Do třiceti minut po odběru byla krev odstředěna (1600 r. p. m., 15 minut, 8 °C) a plasma uchována před dalším zpracováním při – 80 °C.

#### **3.4.1.1 Zpracování vzorku**

K 200 µl vzorku plasmy bylo přidáno 20 µl IS a 200 µl ethanolu. Vzorky byly důkladně promíchány. Ke vzorkům bylo dále přidáno 500 µl n-hexanu a obsah byl intenzivně třepán 10 minut. Po 10-ti minutovém třepání byly vzorky centrifugovány (22000 r. p. m., 4 °C, 10 minut). Po centrifugaci byla opatrně odpipetována vrchní hexanová vrstva do připravených tmavých polyethylenových mikrozkušavek. K reziduu bylo opět přidáno 500 µl n-hexanu a extrakční krok opakován. Následně byly spojené hexanové vrstvy odpařeny v atmosféře dusíku při laboratorní teplotě. Po odpaření byly odparky rozpuštěny v 100 µl methanolu a přepipetovány do tmavých vialek.

### **3.4.2 Chromatografická analýza**

Stanovení 25-OH vitamínu D3 bylo provedeno metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na reverzní fázi s UV-VIS detekcí.

#### **3.4.2.1 Mobilní fáze**

Složení mobilní fáze:

Methanol – voda (95 : 5; v/v)

Příprava mobilní fáze:

Pro přípravu 1000 ml mobilní fáze methanol – voda (95 : 5; v/v) bylo smícháno 950 ml methanolu s 50 ml vody. Po smíchání byla takto připravená mobilní fáze přefiltrována přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,2 µm a odvzdušněna pomocí ultrazvuku (asi 30 min).

### 3.4.2.2 Parametry pro HPLC analýzu

#### HPLC sestava:

Vysokotlaké analytické čerpadlo LC – 10 AD <sub>VP</sub>	Schimadzu, Japonsko
Chromatografická kolona	
LiChoCART (R) 125 – 4 Purospher (R) star RP – 18e opatřená ochranou předkolonou 4-4	Merck, Německo
Chromatografická mikrokolona	
Discovery Bio Wide Pore (C 18 HPLC column 15cm x 1mm x 5µm)	Sigma Aldrich, Německo
Termostat kolony CTO – 10 AC <sub>VP</sub>	Schimadzu, Japonsko
Řídicí systém SCL – 10 AD <sub>VP</sub>	Schimadzu, Japonsko
UV-VIS detektor SPD – 10 A <sub>VP</sub>	Schimadzu, Japonsko
Vyhodnocovací zařízení Clarity	Data Apex, ČR

#### HPLC podmínky:

Mobilní fáze	methanol – voda (95 : 5; v/v)
Průtok mobilní fáze	0,5 ml/min
Objem nástřiku	50 µl
Objem nástřiku na mikrokolonu	5 µl
Teplota kolony	37 °C
Autosampler	8 °C
Detekce 25 OH vitamínu D3	$\lambda = 265 \text{ nm}$
Nastavení citlivosti detektoru	0,0003 aufs

### 3.4.2.3 Kalibrační řada

Pro stanovení 25-OH vitamínu D3 v plasmě byla připravena osmibodová kalibrační řada v rozmezí cca 10 -500nmol/l.

### 3.4.2.4 Identifikace 25-OH vitamínu D3

Odečtením poměru píku 25-OH vitamínu D3 a vnitřního standardu u vzorku byla určena koncentrace v nmol/l.

### 3.4.2.5 Kvantifikace 25-OH vitamínu D3

Pro určení koncentrace 25-OH vitamínu D3 byla použita metoda kalibrační křivky.

U jednotlivých kalibračních roztoků byl zjištěn poměr ploch 25-OH vitamínu D3 a vnitřního standardu a sestrojena kalibrační křivka.

### 3.4.3 Přesnost v sérii

Přesnost stanovení 25-OH vitamínu D3 v sérii byla určena analýzou 10-ti nezávisle připravených vzorků. Jako míru přesnosti byl použit variační koeficient CV.

$$CV_x = S_x / \bar{x} \cdot 100,$$

kde  $S_x$ , je směrodatná odchylka daného měření a  $\bar{x}$  aritmetický průměr

### 3.4.4 Správnost

Výtěžnost metody byla určena pomocí přidavku známého množství (10 $\mu$ l) standardu 25-OH vitamínu D3 o koncentracích 1209, 2418 a 4836 nmol/l k 190  $\mu$ l plasmy.

Hodnoty recovery byly vypočteny dle vztahu:

$$R(\%) = (c_1 - c_0) / c \cdot 100,$$

kde  $c_1$  je koncentrace vzorku s přidavkem,  $c_0$  endogenní koncentrace analytu a  $c$  je přidané množství

### 3.4.5 HPLC s elektrochemickou detekcí

Stanovení 25-OH vitamínu D3 bylo provedeno také pomocí HPLC elektrochemickou detekcí.

#### 3.4.5.1 Mobilní fáze

Složení mobilní fáze:

Methanol – voda – kyselina chloristá (95 : 5 : 1; v/v/v)

Příprava mobilní fáze:

Pro přípravu 1000 ml mobilní fáze methanol – voda – kyselina chloristá (95 : 5 : 1; v/v/v) bylo smícháno 950 ml methanolu s 50 ml vody. Po smíchání byl přidán 1 ml koncentrované kyseliny chloristé . Takto připravená mobilní fáze byla přefiltrována přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,2  $\mu\text{m}$  a odvzdušněna pomocí ultrazvuku (asi 30 min).

#### 3.4.5.2 Parametry pro HPLC s elektrochemickou detekcí

HPLC sestava:

Vysokotlaké analytické čerpadlo LC – 10 AD<sub>VP</sub> Schimadzu, Japonsko

Chromatografická kolona

LiChoCART (R) 125 – 4 Purospher (R) star RP – 18e Merck, Německo  
opatřená ochranou předkolonou 4-4

Elektrochemický detektor Coulochem III ESA, USA

Dávkovací ventil Rheodyne s 10-ti  $\mu\text{l}$  smyčkou

HPLC podmínky:

Analytická cela modul 5010

$E_1 = 200 \text{ mV}$

$E_2 = 600 \text{ mV}$

Nastavení citlivost detektoru 200 nA

Mobilní fáze methanol – voda – kyselina chloristá (95 : 5 : 1; v/v/v)

Průtok mobilní fáze 0,5 ml/min

Objem nástřiku 10  $\mu$ l

Teplota kolony 25  $^{\circ}$ C

### 3.4.5.3 Kalibrační řada

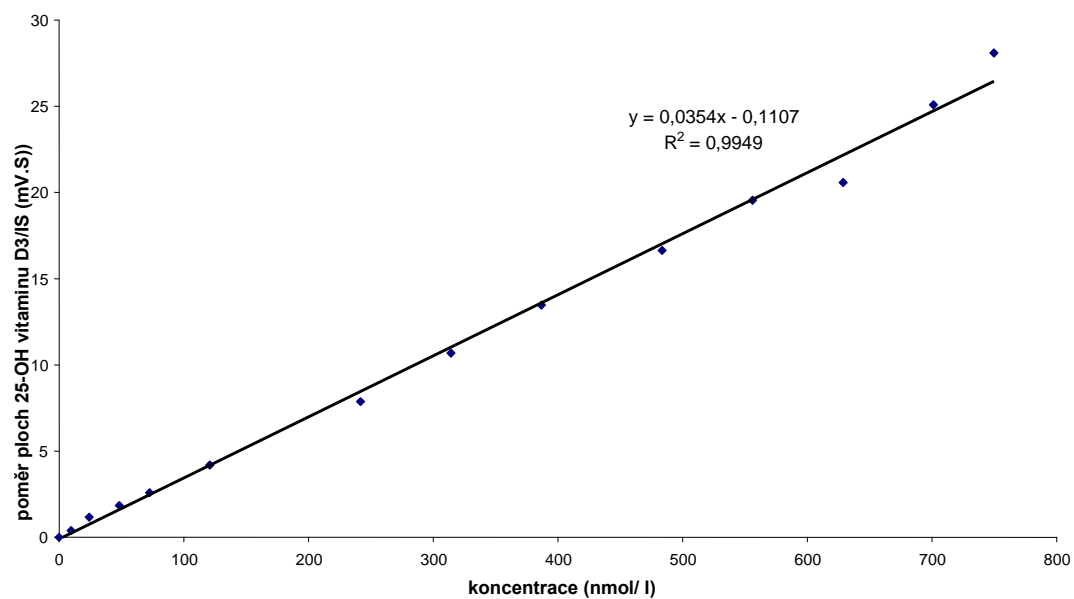
Pro stanovení 25-OH vitamínu D3 v plasmě byla připravena pětibodová kalibrační řada, kde výsledné koncentrace standardu 25-OH vitamínu D3 byly cca 10 – 500 nmol/l.

## 4. Výsledky

### 4.1 Chromatografická analýza

#### 4.1.1 Kalibrace

Kalibrační závislost plochy píků na koncentraci pro 25-OH vitamín D3 je znázorněna na obrázku 11. Z grafu je zřejmé, že linearita byla zachována v celém rozsahu sledovaných koncentrací.



Obrázek 11. Kalibrační křivka 25-OH vitamínu D3

### 4.1.2 Přesnost

V tabulce VIII a IX jsou uvedeny údaje charakterizující přesnost metody.

Tabulka VIII. Přesnost metody pro koncentraci v rozmezí referenčních hodnot

	25-OH vitamin D3
Počet měření	10
Aritmetický průměr (nmol/l)	58,64
Variační koeficient CV (%)	9,88

Tabulka IX. Přesnost metody pro koncentraci vyšší než je referenční rozmezí

	25-OH vitamin D3
Počet měření	10
Aritmetický průměr (nmol/l)	275,10
Variační koeficient CV (%)	3,72

### 4.1.3 Správnost

Správnost charakterizovaná tzv. recovery byla určena metodou standardních přídavek. V tabulce X jsou uvedeny výtěžnosti metody pro stanovení 25-OH vitaminu D3 v plasmě.

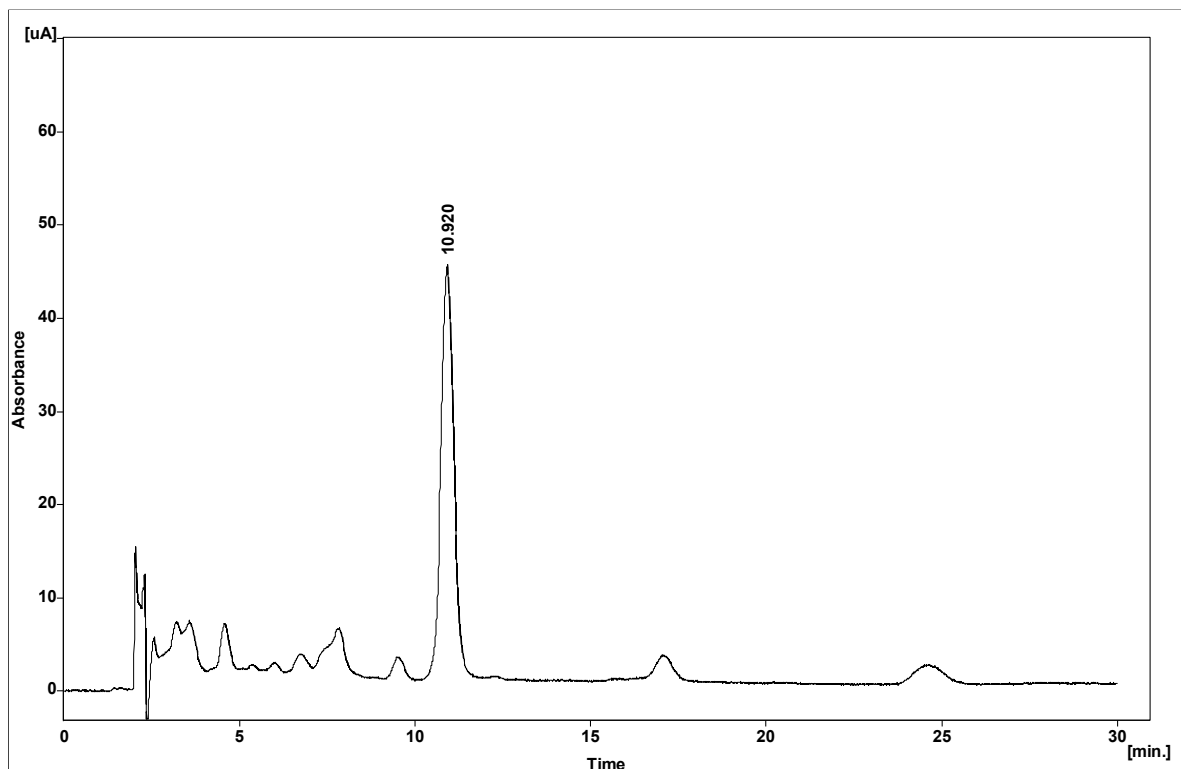
Tabulka X. Výtěžnost metody pro stanovení 25-OH vitaminu D3 v plasmě

25-OH vitamin D3		
Přídavek (nmol/l)		Výtěžnost (%)
c teoretická	c skutečná	-
0	0	-
60,45	52,69	87,16
120,90	120,20	99,42
241,80	234,88	97,14
<b>Průměrná výtěžnost (%)</b>		<b>94,57</b>

#### 4.1.4 Určení orientačních hodnot 25-OH vitamínu D3 u dobrovolných dárců krve

Přehledná tabulka výsledků určení koncentrací 25-OH vitamínu D3 u dobrovolných dárců krve, včetně věku je uvedena v příloze 1. Pokud nebylo možné odečíst plochu píku a následně vypočítat koncentraci bylo do tabulky zapsáno písmeno N (nedetekováno).

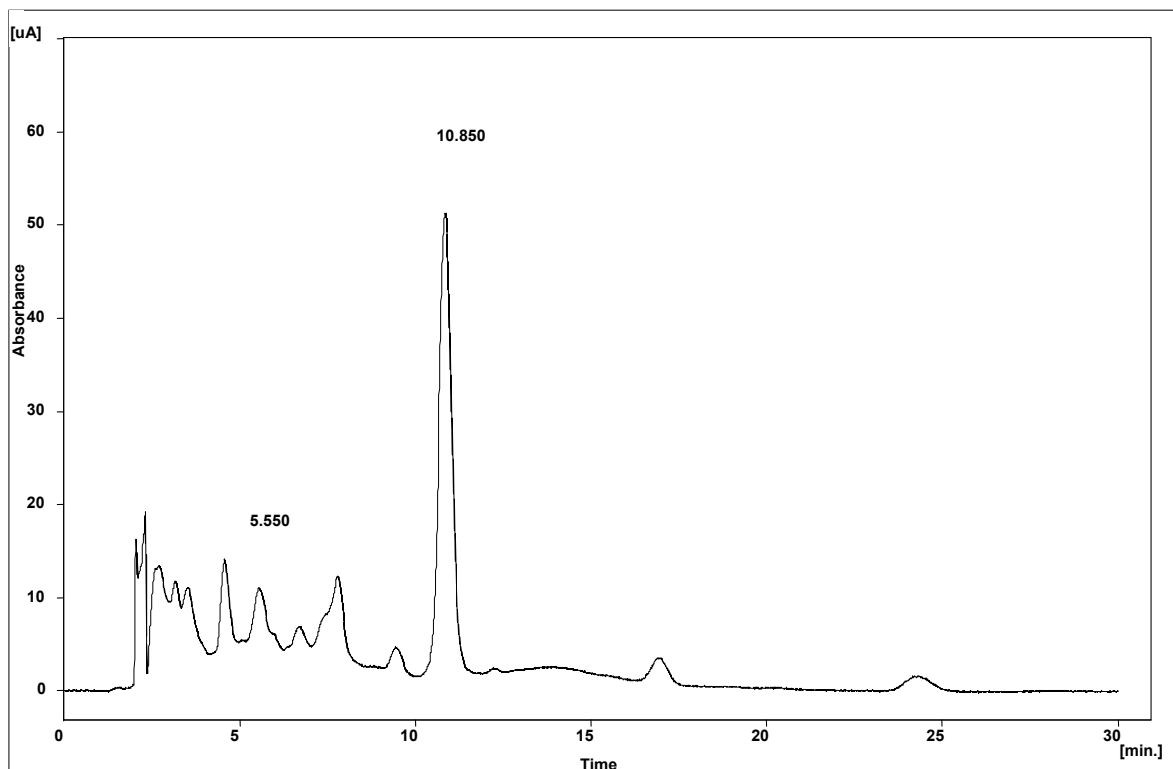
##### 4.1.4.1 Chromatografické záznamy



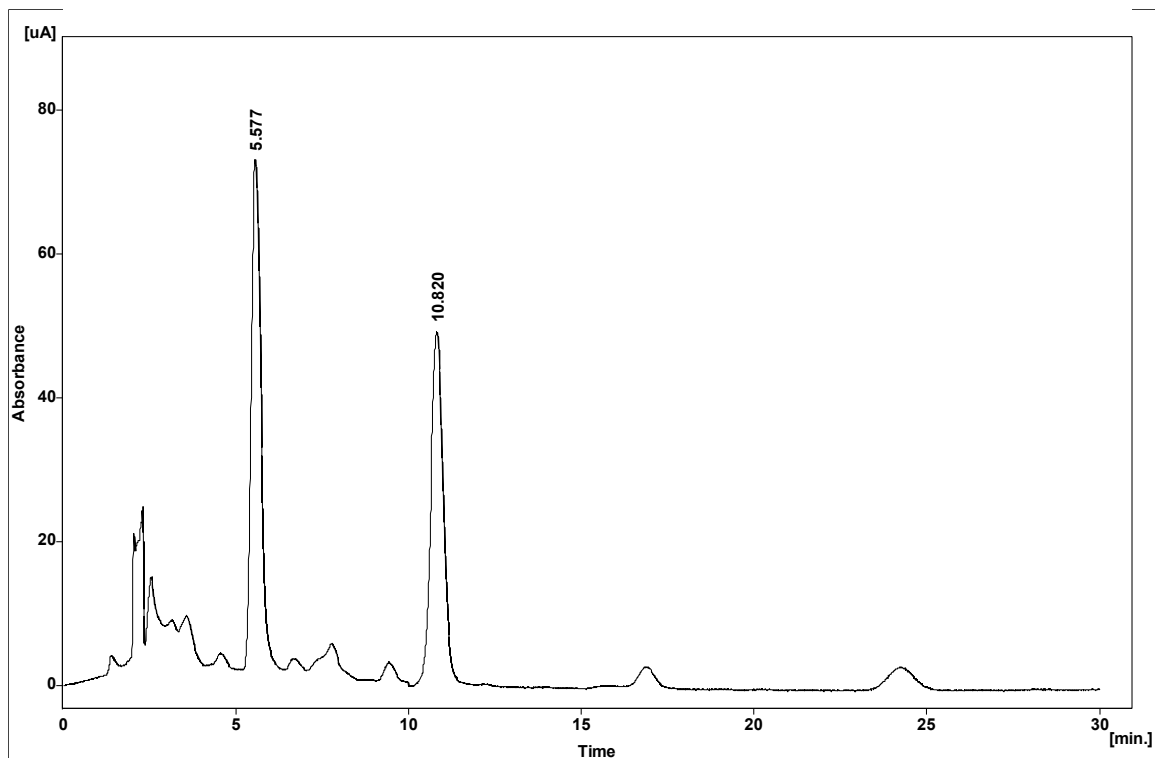
Obrázek 12. Chromatografický záznam nulového standardu, 10,92 min: IS

HPLC podmínky: mobilní fáze methanol – voda (95:5; v/v), průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, objem nástřiku 50  $\mu$ l, teplota kolony 37 °C, citlivost detektoru 0,0003 aufs,  $\lambda$ = 265 nm

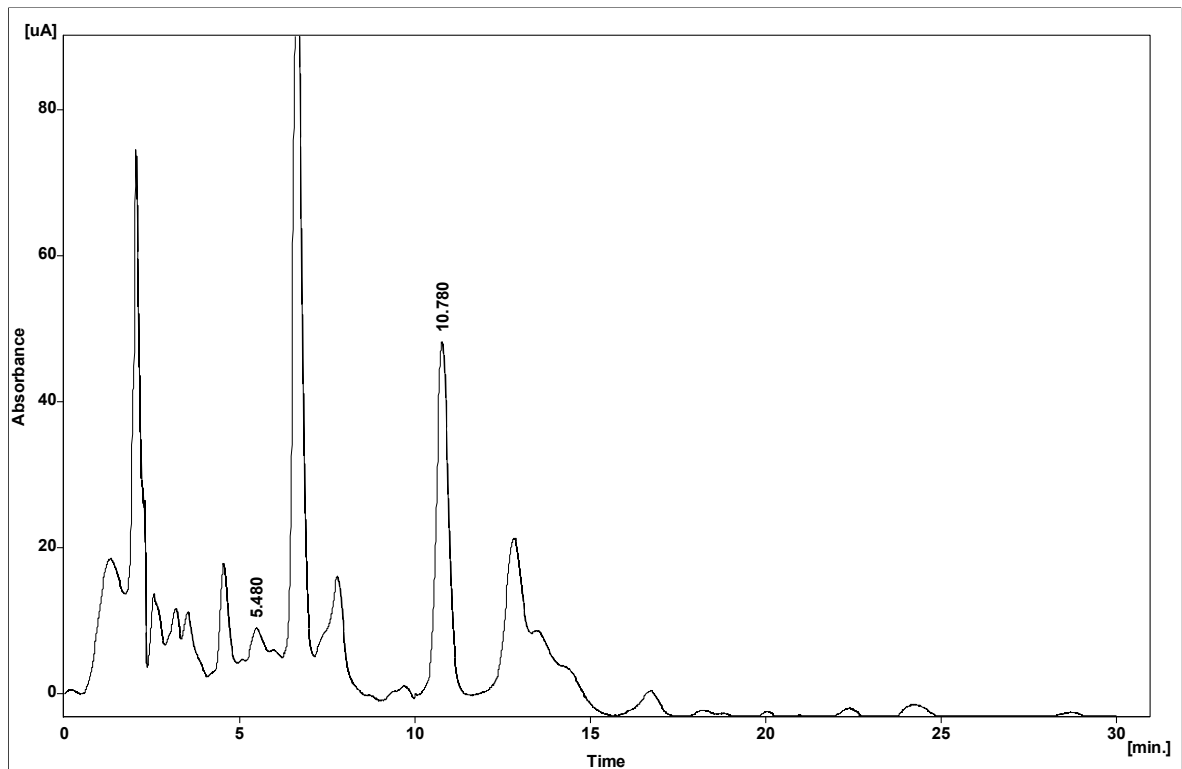




Obrázek 13. Chromatografický záznam standardu 25-OH vitaminu D3 o koncentraci 72,54 nmol/l, 5,55 min: 25-OH vitamin D3, 10,85 min: IS  
HPLC podmínky: viz. obrázek 12



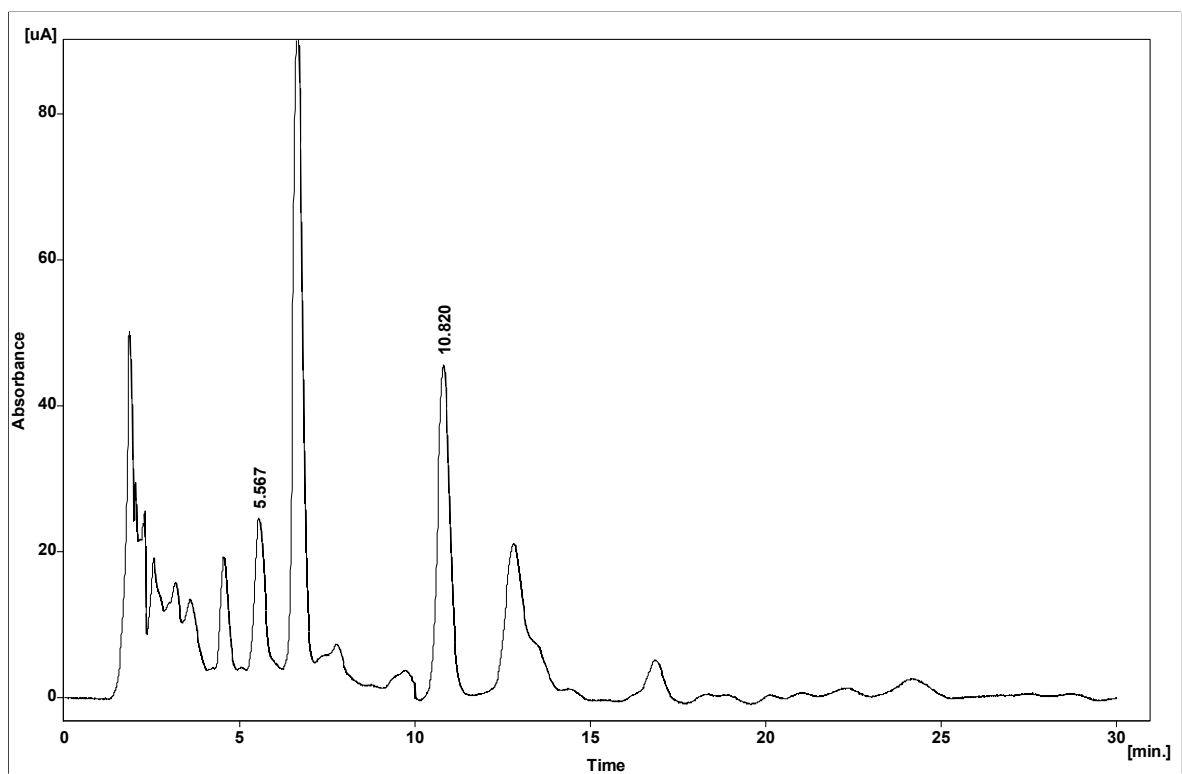
Obrázek 14. Chromatografický záznam standardu 25-OH vitaminu D3 o koncentraci 749,58 nmol/l, 5,58 min: 25-OH vitamin D3, 10,82 min: IS  
HPLC podmínky: viz. obrázek 12



Obrázek 15. Chromatografický záznam vzorku plasmy dobrovolného dárce krve

56,26 nmol/l, 5,48 min: 25-OH vitamin D3, 10,78 min: IS

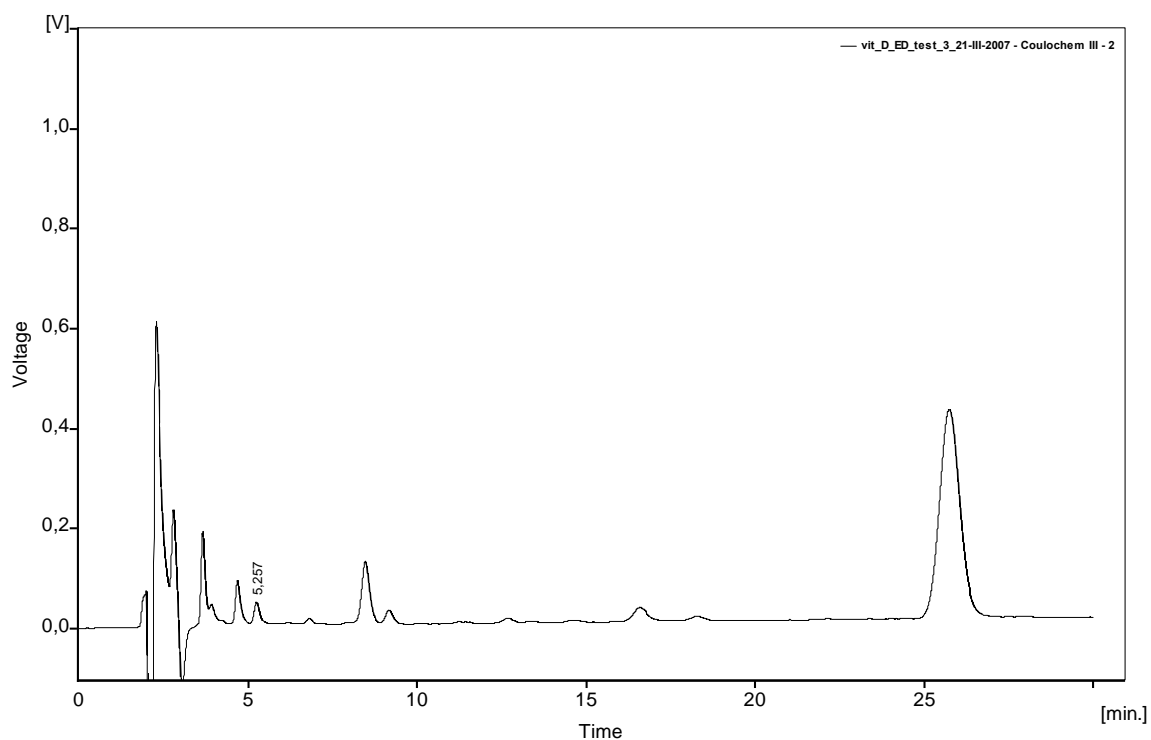
HPLC podmínky: viz. obrázek 12



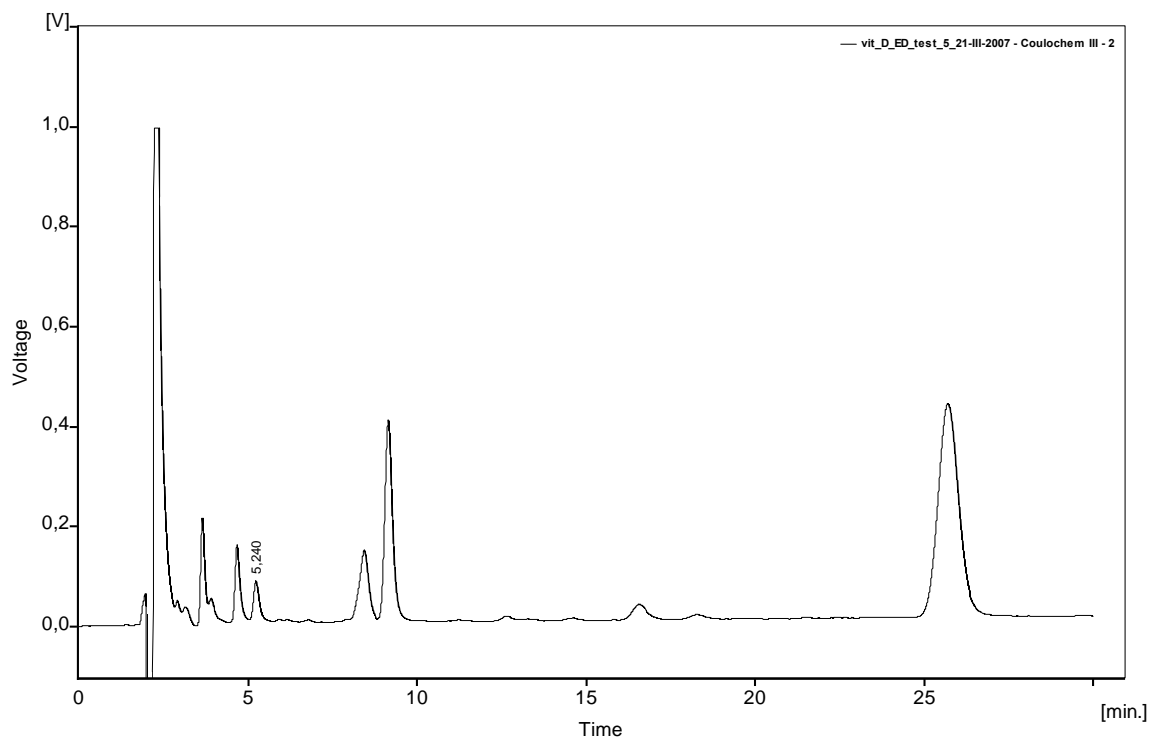
Obrázek 16. Chromatografický záznam vzorku plasmy dobrovolného dárce krve

270,38 nmol/l, 5,57 min: 25-OH vitamin D3, 10,82 min: IS

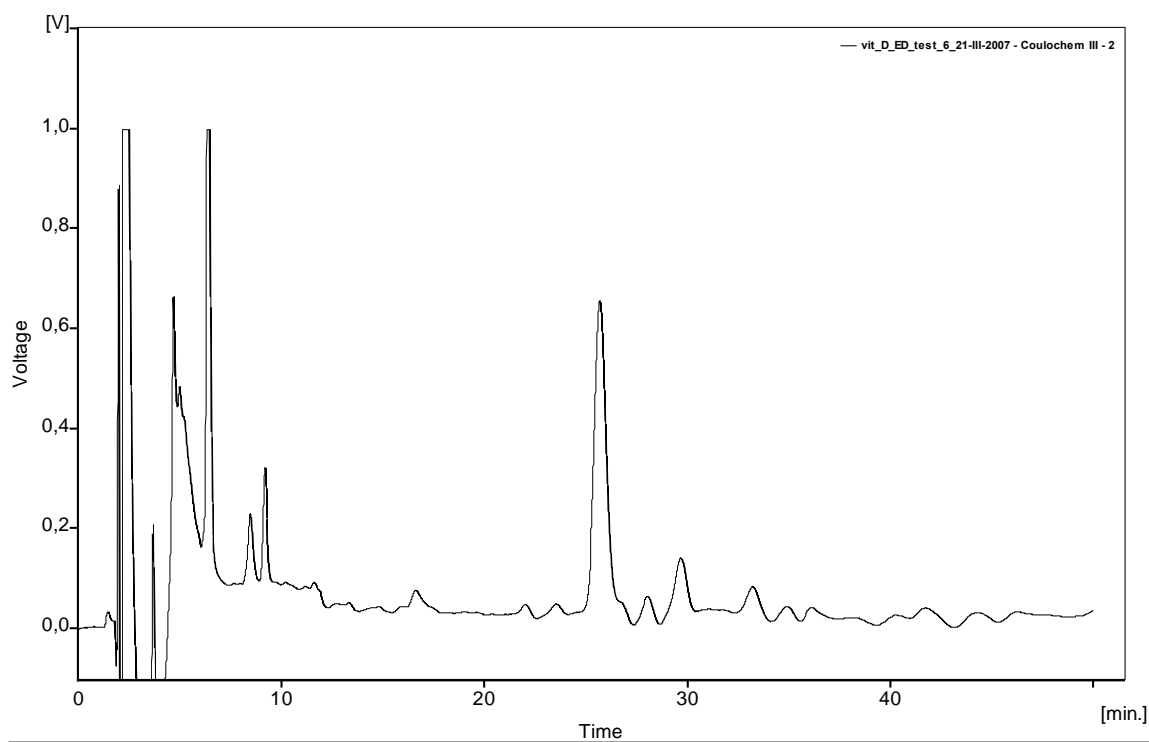
HPLC podmínky: viz. obrázek 12



Obrázek 17. Chromatografický záznam standardu 25-OH vitamínu D3 o koncentraci 142,073 nmol/l, 5,26 min: 25-OH vitamin D3  
HPLC podmínky: analytická cela model 5010,  $E_1 = 200$  mV,  $E_2 = 600$  mV, mobilní fáze methanol – voda – kyselina chloristá (95 : 5: 1; v/v/v), průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, objem nástřiku 10  $\mu$ l, teplota kolony 25°C, citlivost detektoru 200 nA



Obrázek 18. Chromatografický záznam standardu 25-OH vitaminu D3 o koncentraci 284,15 nmol/l, 5,24 min: 25-OH vitamin D3  
HPLC podmínky: viz. obrázek 17



Obrázek 19. Chromatografický záznam vzorku dobrovolného dárce krve (N)  
HPLC podmínky: viz. obrázek 17

## 4.2 Statistická analýza experimentálních dat

### 4.2.1 Analýza jednoho výběru

Analýza jednoho výběru byla zpracována pomocí statistického programu ADSTAT. V jednotlivých podkapitolách rozdělených dle analyzovaných skupin jsou uvedeny tabulky klasických a robustních odhadů parametrů hodnot 25-OH vitamínu D3.

#### 4.2.1.1 Dobrovolní dárce krve se suplementací vitamínem D

Hladina významnosti alfa: 0,05

Tabulka XI. Klasické odhady parametrů hodnot 25-OH vitamínu D3 – dobrovolní dárce krve se suplementací vitamínem D

	25-OH vitamín D3 (nmol/l)
Průměr	57
Směrodatná odchylka	28
Rozptyl	762
Spodní mez	31
Horní mez	82

Tabulka XII. Robustní odhady parametrů hodnot 25-OH vitamínu D3 – dobrovolní dárce krve se suplementací vitamínem D

	25-OH vitamín D3 (nmol/l)
Medián	48
Směrodatná odchylka mediánu	18
Rozptyl mediánu	314
Spodní mez	26
Horní mez	70

#### 4.2.1.2 Dobrovolní dárce krve bez suplementace vitaminem D

Hladina významnosti alfa: 0,05

Tabulka XIII. Klasické odhady parametrů hodnot 25-OH vitaminu D3 – dobrovolní dárce krve bez suplementace vitaminem D

	25-OH vitamin D3 (nmol/l)
Průměr	42
Směrodatná odchylka	32
Rozptyl	1031
Spodní mez	17
Horní mez	67

Tabulka XIV. Robustní odhady parametrů hodnot 25-OH vitaminu D3 – dobrovolní dárce krve bez suplementace vitaminem D

	25-OH vitamin D3 (nmol/l)
Medián	32
Směrodatná odchylka mediánu	25
Rozptyl mediánu	641
Spodní mez	10
Horní mez	54

#### 4.2.1.3 Dobrovolní dárce krve

Hladina významnosti alfa: 0,05

Tabulka XV. Klasické odhady parametrů hodnot 25-OH vitaminu D3 – dobrovolní dárce krve

	25-OH vitamin D3 (nmol/l)
Průměr	49
Směrodatná odchylka	28
Rozptyl	790
Spodní mez	28
Horní mez	71

Tabulka XVI. Robustní odhady parametrů hodnot 25-OH vitamínu D3 – dobrovolní dárci krve

	25-OH vitamín D3 (nmol/l)
Medián	44
Směrodatná odchylka mediánu	25
Rozptyl mediánu	621
Spodní mez	25
Horní mez	63

## 4.2.2 Analýza dvou výběrů

Analýza dvou výběrů byla zpracována pomocí statistického programu ADSTAT. Tato analýza slouží k porovnání dvou náhodných výběrů s využitím rozličných kritérií.

### 4.2.2.1 Porovnání koncentrací 25-OH vitamínu D3 mezi dobrovolnými dárci krve se suplementací a bez suplementace vitamínem D

Pro test homogenity rozptylu byl zvolen Fischerův-Snedecorův F-test. Pro test shody průměru bylo zvoleno testovací kritérium  $T_3$  (modifikovaná šikmost), protože právě testovací kritérium je nejvhodnější v případě, že se oba analyzované výběry odchyľují od normality.

### Dobrovolní dárci krve

Tabulka XVII. Test homogenity rozptylu hodnoty 25-OH vitamínu D3 mezi dobrovolnými dárci krve se suplementací vitamínem D a dobrovolnými dárci krve bez suplementace vitamínem D.

<b>25-OH vitamín D3</b>	Tabulkový kvantil F ( $1 - \alpha/2$ , Df1, Df2)	5,5996
	F - statistika	1,7763
	<b>Závěr:</b> Rozptyly se považují za shodné, $H_0$ přijata	
	Vypočtená hladina významnosti	0,250

Tabulka XVIII. Test shody průměru hodnot 25-OH vitamínu D3 u dobrovolných dárců krve (testovací kritérium  $T_3$ )

<b>25-OH vitamin D3</b>	Tabulkový kvantil $t(1 - \alpha/2, Df1)$	2,1199
	t- statistika	1,2333
	<b>Závěr</b> : průměry se považují za shodné, $H_0$ přijata	
	Vypočtená hladina významnosti	0,235

### 4.2.3 Korelace

Vzájemný vztah, tedy korelace, mezi hodnotami 25-OH vitamínu D3 a věkem jednotlivých dárců krve byla zpracována pomocí statistického programu ADSTAT.

#### 4.2.3.1 Dobrovolní dárci krve

Statistické charakteristiky regrese:

Tabulka XIX: Korelace mezi hodnotami 25-OH vitamínu D3 a věkem – dobrovolní dárci krve

<b>25-OH vitamin D3</b>	Vícenásobný korelační koeficient	0,20961
	Koeficient determinace	0.0043937

Testování regresního tripletu:

Tabulka XX. Fischerův-Snedecorův F-test test významnosti modelu – dobrovolní dárci krve

<b>25-OH vitamin D3</b>	Hodnota kritéria F	0,64338
	Kvantil F ( $1 - \alpha, m-1, n-m$ )	4,6061
	Pravděpodobnost	0,436
	<b>Závěr:</b>	<b>model je nevýznamný</b>



## 5. Diskuse

Vitamin D je steroidní hormon, který zásadním způsobem ovlivňuje absorpci vápníku v gastrointestinálním traktu a reguluje homeostasu vápníku. Forma vitaminu D<sub>3</sub> (25-OH vitamin D<sub>3</sub>) je hlavním cirkulujícím metabolitem vitaminu D v krvi. Analýza 25-OH vitaminu D<sub>3</sub> dává lepší informaci o stavu metabolismu vitaminu D, než stanovení 1,25(OH)<sub>2</sub> vitaminu D<sub>3</sub>, a proto se upřednostňuje v diagnostice poruch metabolismu vitaminu D. Vyšetření 25-OH vitaminu D<sub>3</sub> se provádí u diagnostiky a kontroly terapie pacientů s osteoporosou, osteomalacií a osteodystrofií, u diagnostiky neonatální hypokalcémie, diagnostiky subklinického deficitu vitaminu D a diagnostiky intoxikace vitaminem D.<sup>(27, 28, 29)</sup>

Cílem této práce bylo zavést metodu stanovení 25-OH vitaminu D<sub>3</sub>, vhodnou pro klinickou praxi, a to ve spolupráci s Oddělením klinické biochemie a diagnostiky Nemocnice Pardubice.

Metoda HPLC s UV-VIS detekcí, která byla zvolena pro stanovení 25-OH vitaminu D, je časově i finančně nenáročná a v budoucnu dobře použitelná také pro stanovení dalších látek vitaminového charakteru (vitamin A, vitamin E a β-karoten).<sup>(30)</sup> Další metodiky pro stanovení 25-OH vitaminu D<sub>3</sub>, jako například RIA, HPLC s hmotnostní detekcí a HPLC s elektrochemickou detekcí, jsou z hlediska přístrojového vybavení, tak také finančně, velmi náročné.<sup>(26, 31, 32)</sup>

Pro přípravu vzorku bylo vyzkoušeno několik postupů. Prvně jsme zpracovávali vzorek pomocí SPE techniky, komerčně dostupné od firmy Chromsystems. Pomocí této techniky jsme se zbavili kontaminujících látek, které koeluovaly společně s 25-OH vitaminem D<sub>3</sub>. Ovšem problémem byla nedostatečná výtěžnost pro 25-OH vitamin D<sub>3</sub>, což vedlo u většiny vzorků k nemožnosti detekovat jej.

Dalším postupem přípravy vzorku byla extrakce do n-hexanu.<sup>(24)</sup> Tato metoda přípravy vzorku byla velmi jednoduchá, časově nenáročná a levná. Ovšem oproti SPE technice se nám nepodařilo dostatečně odstranit kontaminující látky, které koeluovaly společně s 25-OH vitaminem D<sub>3</sub> (Obr. 15 a 16). Výtěžnost této extrakce však byla dostačující.

Z důvodu kontaminace látkami, které se z kolony vymývají mnohem později než 25-OH vitamin D<sub>3</sub> i vnitřní standard, jsme prodloužili analýzu na 30 minut. Do budoucna by bylo výhodnější zařadit vymývací krok mobilní fázi se silnější eluční silou.

Analytické parametry metody nejsou dostatečné, což je dáno velmi nízkými koncentracemi 25-OH vitamínu D3 v lidské plasmě. Problémem navíc bylo, že při zvýšení citlivosti UV-VIS detektoru padala základní linie (baseline) pod hodnotu -10 mV, kde již nedochází k integraci chromatografického záznamu. Tento problém by mohl být v budoucnu vyřešen pořízením vyhodnocovacího softwaru LCsolution od firmy Shimadzu.

Určili jsme orientační rozmezí 25-OH vitamínu D3 pouze u malé skupiny dárců krve naší katedry, jelikož ve vzorcích plasmy dárců krve a pacientů z Oddělení klinické biochemie a diagnostiky Nemocnice Pardubice jsme prakticky nedetekovali žádný 25-OH vitamín D3. Domníváme se, že vzorek krve byl nevhodně transportován a zpracován. Pro stanovení 25-OH vitamínu D3 je nutné zajistit, aby transportovaná krev byla chráněna před světlem a separace plasmy od krevního koláče byla provedena při nízké teplotě (do 8 °C) a v místnosti chráněné před přímým slunečním zářením. Plasmu doporučujeme uchovávat před analýzou v hlubokomrazicím boxu (-80 °C).

Skupinu dobrovolných dárců krve jsme rozdělili na dvě skupiny. Jedna skupina užívala vitaminový preparát Nature's Bounty, který obsahuje doporučenou denní dávku vitamínu D (10 µg) a vitamínu A (1500 µg), a to po dobu jednoho týdne před odběrem krve. Druhá skupina dobrovolných dárců krve žádný vitaminový preparát neužívala. Porovnáním obou skupin jsme nezjistili statisticky významné rozdíly v hladinách 25-OH vitamínu D3 v plasmě (57 nmol/l oproti 42 nmol/l,  $p = 0,235$  na hladině  $\alpha = 0,05$ ; Studentův t-test), což může být dáno tím, že užívání vitaminového preparátu bylo jen krátkodobé. Navíc jsme nenalezli statisticky významnou korelaci mezi hladinou 25-OH vitamínu D3 v plasmě a věkem dobrovolných dárců krve.

Zajímavé bylo zjištění, že orientační hodnoty u dobrovolných dárců krve se pohybovaly na dolní hranici referenčních hodnot uváděných v literatuře.

Jelikož jsme prakticky nedetekovali žádný 25-OH vitamín D3 ve vzorcích získaných z Oddělení klinické biochemie a diagnostiky Nemocnice Pardubice (hodnoty pod 10 nmol/l), bylo by vhodné sledovat stabilitu tohoto vitamínu při různých teplotách (laboratorní teplota, 8 °C, -20 °C a -80 °C). Jelikož je 25-OH vitamín D3 velmi citlivý na světlo, bylo by dobré zjistit, jak rychle se snižuje jeho hladina v biologickém materiálu vystavenému dennímu světlu i přímým slunečním paprskům.

Stanovovali jsme 25-OH vitamín D3 také pomocí kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí. Separace probíhala za stejných podmínek jako u HPLC s UV-VIS detekcí, pouze jsme nepatrně modifikovali mobilní fázi tak, že jsme ji

okyselili koncentrovanou kyselinou chloristou, methanol-voda-kyselina chloristá (95:5:0,1, v/v/v). Přídavkem kyseliny chloristé jsme dosáhli zvýšení vodivosti mobilní fáze, která je nutná pro elektrochemickou detekci. Při elektrochemické detekci však bylo detekováno množství interferujících látek, které eluovaly společně s 25-OH vitamínem D3 (Obr. 19).

Vypracovali jsme HPLC metodu pro stanovení 25-OH vitamínu D3 v lidské plasmě, která by po vyřešení výše zmíněných problémů mohla být použitelná pro klinickou praxi. Navíc se rýsuje možnost simultánního stanovení 25-OH vitamínu D3 společně s vitamínem A, vitamínem E a  $\beta$ -karotenem.

## **6. Závěr**

U vzorků dobrovolných dárců krve byly stanoveny koncentrace 25-OH vitamínu D3 a pomocí statistické analýzy určeno orientační rozmezí této látky.

Dále bylo pomocí statistické analýzy dat zpracováno porovnání koncentrací mezi dobrovolnými dárci krve se a bez suplementace vitamínem D. Výsledkem tohoto porovnání bylo, že dané skupiny se od sebe statisticky významně neliší.

Při porovnání koncentrací dobrovolných dárců krve s věkem nebyla nalezena statisticky významná korelace.

## Seznam použité literatury

1. HLÚBIK, P. – OPLTOVÁ, L. *Vitamíny*. Praha: Grada, 2004. 47 – 53. ISBN 80 – 247 – 0373 – 4.
2. HART, R. – FURNISS, L. – LAURIE, D. a kol. *Measurement of Vitamin D Status Background, Clinical Use, and Methodologies*. Clin. Lab. , 2006, vol. 52, 335 – 343.
3. MAWER, EB. *The metabolism of vitamin D in man*. Biochem. Soc. Spec. Pub., 1974, vol. 3, 27 – 42.
4. BOUILLON, R. – OKUMARA, WH. – NORMAN, AW. *Structure – function relationships in the vitamin D endocrine system*. Endocr. Rev., 1995, vol. 16, 200 – 257.
5. MACINTYRE, I. *The action and control of the calcium – regulating hormones*. J Endocrinol Invest, 1978, vol. 1, 277 – 284.
6. BROULÍK, P. *Osteoporosa*. Praha: Maxdorf Jessenius, 1999. 44, 103 – 117. ISBN 80 – 85800 – 93 – 4.
7. MURRAY, RK. – GRANNER, DK. – MAYES, PA. – RODWELL, VW. *Harperova biochemie*. Jinočany: H+H, 2002. 544 – 545. ISBN 80 – 7319 – 013 – 3.
8. SCHENCK, M. – KOLB, E. *Základy fyziologickej chemie*. Bratislava: Príroda Bratislava, 1956. 73 – 76. ISBN 80 – 07 – 00418 – 1.
9. KOPÁČ, J. *Lékařská laboratorní diagnostika*. Turnov: Lékařská laboratoř Turnov, 2004. 704 – 705.
10. CANNATA – ANDIA, JB. – GOMÉZ – ALONSO, C. *Vitamin D deficiency: neglected aspect of disturbed calcium metabolism in renal failure*. Nephrol. Dial. Transplant., 2002, vol. 17, 1875 – 1878.

11. Reference values for nutrient intake. 1<sup>st</sup> engl. ed. Bonn: DGE, 2002. 216.
12. DAVÍDEK, J. – JANÍČEK, G. – POKORNÝ, J. *Chemie potravin*. Praha: SNTL, 1983. 629.
13. ŽÁČEK, Z. – ŽÁČEK, A. *Potravinové tabulky*. Praha: SPN, 1994. 484.
14. VIETH, R. – FRASER, D. *Vitamin insufficiency: no recommended dietary allowance exists for this nutrient*. Can. Med. Assoc. J., 2002, vol. 166, 1541 - 1542.
15. FAIRFIEDL, KM. – FLETCHER, RH. *Vitamins for chronic disease prevention in adults*. JAMA, 2002, vol. 287, 3116 – 3125.
16. MONSEN, ER. *Dietary reference intakes for antioxidant nutrients. Vitamin C, Vitamin E, Selenium and carotenoids*. J. Amer. Diet. Assoc., 2002, vol. 100, 637 – 640.
17. SBORNÍK KONFERENCE. *Vitamíny 2001*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2001. L 2/5. ISBN 80 – 7194 – 380 – 0.
18. PACOVSKÝ, V. *Vnitřní lékařství*. Praha: Osvěta, 1993. 274 – 277. ISBN 80 – 217 – 0558 – 2.
19. POHLÍDAL, A. *Osteoporosa*. Practicus: Odborný časopis lékařů, 2002. Ročník 1. Číslo 1. 18 – 20.
20. RACEK, J. a kol. *Klinická biochemie*. Praha: Galén, 1999. 179 – 182. ISBN 80 – 7262 – 023 – 1.
21. CHESNEY, RW. *Vitamin D: Can an upper limit be defined?* Journal of Nutrition, 1989, vol. 119, 1825 – 1828.

22. BLANC, S. – SCANLON, KS. – SINKS, TH. a kol. *An outbreak of hypervitaminosis D associated with the overfortification of milk*. Am. J. Public Health, 1995, vol. 85, 656 – 659.
23. KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2003. 25 – 26. ISBN 80 – 86369 – 07 – 2.
24. AKSNES, L. *A simplified high-performance liquid chromatographic method for determination of vitamin D3, 25-hydroxyvitamin D2 and 25-hydroxyvitamin D3 in human serum*. Scand. J. Lab. Invest., 1992, vol. 52, 177 – 182.
25. BARTUŇKOVÁ, J. – PAULÍK, M. a kol. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Praha: Grada, 2005. 53 – 56. ISBN 80 – 247 – 0691 – 1.
26. HOLLIS, BW. *Comparison of commercially available <sup>125</sup>I-based RIA methods for the determination of circulating 25-hydroxyvitamin D*. Clin. Chem., 2000, vol.46, 1657-1661.
27. THOMAS, L. *Clinical Laboratory Diagnostics*. TH-Books. 1998, 1527.
28. VESPER, HW. - DEMIERIS, LM. - EASTELL, R. a kol. *Assesment and recommendations open Factors Contributing to Preanalytical Variability of Urinary PD and DPD*.
29. EASTEL, R. - BAUMANN, M. - HOYLE, NR. a kol. *Bone Markers*. Martin Dunitz. 2001. 252.
30. BATES, CJ. *Vitamin analysis*. Ann. Clin. Biochem., 1997, vol. 34, 599 – 626.
31. LANSMEYER, GL. – WIEBE, DA. – BINKLEY, N. – DREZNER, MK. *HPLC Method for 25-Hydroxyvitamin D Measurment: Comparsion with Contemporary Assays*. Clinical Chemistry, 2006, vol. 52:6, 1120 – 1126.

32. SAENGER, AK. – LAHA, TJ. – BREMNER, DE. – SADRZADEH, SMH.  
*Quantification of Serum 25-Hydroxyvitamin D2 and D3. Using HPLC – Tandem Mass Spectrometry and Examination of Reference Intervals for Diagnosis of Vitamin D Deficiency.* Am. J. Clin. Pathol., 2006, vol. 125, 914 – 920.



# Příloha

## Příloha 1

Přehled stanovených koncentrací 25-OH vitamínu D3

číslo vzorku	Věk	Pohlaví	Koncentrace 25-OH vitamínu D3
1	24	Ž	114,30
2	25	Ž	43,89
3	24	Ž	47,77
4	22	Ž	64,05
5	24	Ž	N
6	26	Ž	N
7	44	Ž	57,30
8	29	Ž	39,34
9	26	Ž	31,14
10	50	Ž	21,04
11	31	Ž	N
12	32	Ž	32,25
13	26	Ž	62,53
14	47	Ž	10,42
15	68	Ž	116,20
16	28	Ž	50,10
17	23	Ž	39,29
18	29	Ž	28,98
19	25	Ž	18,63

## ÚDAJE PRO KNIHOVNICKOU DATABÁZI

Název práce	Stanovení 25-hydroxyvitaminu D3 v séru pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie
Autor práce	Bc. Barbora Navrátilová
Obor	Analýza biologických materiálů
Rok obhajoby	2007
Vedoucí práce	Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.
Anotace	Stanovení 25-hydroxyvitaminu D3 v séru pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV-VIS detekcí ve vzorcích krve dobrovolných dárců.
Klíčová slova	Vitamin D, 25-OH vitamin D3, HPLC, osteoporosa, osteomalacie, křivice

## FORMULÁŘ PRO ZPŘÍSTUPNĚNÍ PRÁCE V ELEKTRONICKÉ FORMĚ – ČESKY

Typ dokumentu	<i>Diplomová práce</i>		
Autor	<b>Bc. Navrátilová, Barbora</b>		
E-mail adresa autora	barboran@seznam.cz		
URN			
Název závěrečné práce	<i>Stanovení 25-hydroxyvitaminu D3 v séru pomocí vysokoučinné kapalinové</i>		
Stupeň studia	<i>Magisterské</i>		
Katedra	<b>Katedra biologických a biochemických věd</b>		
Vedoucí práce	<b>Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D., vedoucí práce</b>		
Klíčová slova	<i>Vitamin D, 25-OH vitamin D3, osteoporosa, osteomalacie, křivice</i>		
Datum obhajoby	2007-06-06		
Označení rozsahu zpřístupnění	<i>Souhlasím se zveřejněním celé práce</i>	Datum: 24.4. 2007	Podpis autora:
Abstrakt	<i>Studie o 25-hydroxyvitaminu D3 a jeho stanovení pomocí vysokoučinné chromatografie s UV-VIS detekcí ve vzorcích krve dobrovolných dárců.</i>		
Název souborů	<i>Diplomová práce</i>	Velikost souboru	672 Kb





