

Vitaminsy a stopové prvky – možnosti a úskalí analýz v biologických materiálech

J. Vávrová, V. Spěváčková

Svým charakterem se vitaminy i stopové prvky řadí mezi mikronutrienty, esenciální složky potravy přítomné zde i v organismu ve velmi nízkých koncentracích. Požadavky na stanovení stopových prvků v biologických matricích se soustřeďují jednak na toxikologické aspekty (otravy akutní nebo chronické – sledovanými prvky bývají nejčastěji As, Cd, Hg, Pb), diagnostické důvody sledující aplikace léků (např. Li, Pt), projevy různých onemocnění (např. Cu, Zn), či biologický monitoring sledování aktuální zátěže populace, úrovně saturace stopovými prvky nebo zjišťování dlouhodobých trendů ve vztahu k mikronutrientům. Zvláštní pozornost se v této oblasti analýz věnuje rovněž stanovení referenčních hodnot profesionálně nezatížené populace. Vitaminy jsou obvykle definovány jako nízkomolekulární organické sloučeniny různých chemických vlastností, které jsou v nepatrném množství nezbytné pro řadu důležitých biochemických a fyziologických funkcí lidského organismu. Většina vitaminů je velmi citlivá na nejrůznější fyzikální a chemické

vlivy, dělí se obvykle podle rozpustnosti ve vodě a v tucích. Jejich funkce v buněčném metabolismu je významně závislá na jejich chemickém složení. Hodnocení stavu zásobení organismu vitaminy vycházející z analytických dat musí zohledňovat rovněž intraindividuální variace.

Specifikem analytiky mikronutrientů, stopových prvků i vitaminů je podmínka vyrovnání se s řádově nižšími stanovovanými koncentracemi ve srovnání s rutinně kvantifikovanými analyty (pro názornost uvedme např. relaci mezi rutinními parametry v séru sodíkem 140 000 $\mu\text{mol/l}$, nebo draslíkem 4100 $\mu\text{mol/l}$, vedle obvyklé hladiny rtuti 0,005 $\mu\text{mol/l}$). Stanovovaná koncentrační úroveň je rozhodujícím a limitujícím ukazatelem pro dosažení přesnosti a porovnatelnosti naměřených hodnot; pro různé analyty obsažené v různých matricích lze teoreticky odhadnout reálnost přesnosti měření na základě Horwitzovy závislosti, která zobecňuje matematickou formulaci exponenciální závislosti mnohaleté sledování a vyhodnocení empirických dat. Pro velmi nízké koncentrační úrovně mikronutrientů předpokládané v biologických matricích proto nelze očekávat zázračnou přesnost měření a teoretický výpočet odůvodňuje předpoklad hodnot CV až 60 %. Tabulka 1 uvádí porovnání teoretického odhadu Horowitzovy závislosti s vyhodnocením reálných souborů dat mezilaboratorního porovnání (Erlangen). Prokazatelný posun k optimističtějším údajům z praxe je zřejmě také důsledkem stále se zdokonalujících technických možností instrumentace a preanalytických postupů.

Tabulka 1. Limitace reálných možností laboratoří v analýze mikronutrientů

Koncentrační hladina $\mu\text{g/l}$: Mh = $\mu\text{mol/l}$	Erlangen CV %	Horwitz CV %	Příklad analytů v séru, krvi, moči
0,5	40	50	Cd, Hg, S_Cr
5	30	35	Mn, Al, B_Cr
50	20	25	Pb, Se, U_Cu
500	11	18	B_Cu
5000	3	13	B_Zn

Volba postupu analýzy k určení obsahu stopových prvků je ovlivňována řadou aspektů. Koncentrace stopových prvků jsou navíc extrémně nízké, což klade vysoké nároky na instrumentaci. U biologických vzorků je zvláštní otázkou přístup k eliminaci biologické matrice. Řada metod pro analýzu stopových prvků proto zahrnuje i extrakci, prekoncentraci, čištění, nebo další kombinace separačních postupů. Nezbytné je rovněž dodržovat striktní pravidla pro eliminaci nežádoucích preanalytických vlivů. Tato

pozornost se týká především možných kontaminací stopovými prvky při odběru, skladování a přípravě vzorku před vlastním měřením. V rutinní biochemické praxi se setkáváme zejména s využíváním technik atomové absorpční spektrometrie, dalšími postupy se spektrofotometrickou detekcí a v malé míře i dalšími, např. elektrochemickými. Postupy v analýzách vitaminů jsou směřovány často k separačním technikám, zejména proto, že tyto metody jsou schopny rozdělit a identifikovat v jedné analýze

řadu vitaminů a vitamerů. Dominuje kapalinová chromatografie. V analýzách vitaminů nabývá navíc v poslední době velkého významu automatizace, zejména pro rychlou dostupnost výsledku a možnost zpracování větších sérií vzorků. Tady pak hlavní roli představují imunochemické metody.

Pro klinické použití měření koncentrací stopových prvků a vitaminů v biologických materiálech je stejně jako u mnoha dalších rutinních parametrů důležitým předpokladem srovnatelnost výsledků důležitá pro zajištění ekvivalentních klinických hodnocení (diagnostická a terapeutická rozhodování) výsledků. Podmínkou srovnatelnosti je návaznost měření. Návaznost výsledků měření se realizuje používáním certifikovaných referenčních materiálů ke kalibraci měření. V rutinních laboratořích, zabývajících se analýzou stopových prvků a vitaminů, se obvykle nepředpokládá přímé použití certifikovaných referenčních materiálů ke kalibraci, kontrole a validaci pro jejich ekonomickou nedostupnost. Od nich by však měly být odvozovány hodnoty rutinně používaných pracovních kalibrátorů a kontrolních materiálů. Současný stav potvrzuje dlouholetý nedostatek referenčních materiálů a metod pro měření vitaminů v biologických materiálech, pro měření stopových prvků je situace podstatně příznivější. Důležitým zdrojem informací k aktuálnímu stavu je databáze JCTLM dostupná např. cestou:

www.bipm.fr/en/committees/jc/jctlm/jctlm-db/

Nabídka mezilaboratorního porovnávání pro analýzy mikronutrientů se zaměřuje především na nejčastěji stanovené stopové prvky a vitaminy, přičemž spektrum je opět významně příznivěji nakloněno stopovým prvkům.

Mezinárodní programy EHK pro stopové prvky:

- SRN (Erlangen) pro moč, sérum a krev (www.g-euas.de),
- IAEA zaměřený na analýzy ve tkáni (www.iaea.org/programmes/aqcs),
- Kanada (Quebec) pro moč, sérum a krev (www.ctq.qc.ca),
- GB pro koncentrace stopových prvků v plné krvi (www.ukneqas.org.uk),
- IMEP hodnotí analýzy ve tkáni (www.imep.ws).

Tuzemská nabídka systému externího hodnocení kvality SEKK (www.sekk.cz) nabízí laboratořím dvě varianty mezilaboratorního porovnání pro stopové prvky - TE 01 pro esenciální prvky v séru a TE 02 pro toxické stopové prvky v plné krvi. Každý cyklus obsahuje dva vzorky o různých koncentračních hladinách (A, B), laboratoř je úspěšná pouze v případě, že jsou v tolerančním rozpětí oba výsledky. Přehled počtu laboratoř a jejich úspěšnosti při stanovení Cu a Zn v cyklech TE 01 v letech 2003-2008 uvádí tabulka 2. Nejčteněji testované prvky měď a zinek jsou stanovovány z 30 - 40% atomovou absorpční spektrometrií, spektrofotometricky jejich obsah hodnotí 20 - 30% laboratoř. Ostatní stanovené analyty v letech 2003 - 2008 (úspěšnost, počet laboratoř) jsou zastupovány v mezilaboratorním porovnávání cyklu esenciálních stopových prvků TE 01 malým počtem laboratoř: Mn (50 - 100 %, 1 - 4), Se (70 - 100 %, 8 - 10), Al (25 - 100 %, 4), Cr, Ni, Co, Pt - analýzy prováděly 1 - 3 laboratoře. Podobná bilance je zaznamenána v tabulce 3 pro kontrolní cykly toxických stopových prvků. Je evidentní, že počet laboratoř účastnících se cyklu TE 02 je výrazně nižší, od roku 2004 do 2007 je téměř stabilní - vzrostl ze 12 na 14.

Tabulka 2. Trend úspěšnosti laboratoř pro stanovení Cu a Zn v cyklech TE 01 v letech 2003-2008

	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Cu - Počet laboratoř	36	37	35	36	36	34
úspěšnost %	83,3	89	86	83	86	91
Zn - Počet laboratoř	32	33	33	36	26	35
úspěšnost %	94	88	94	88	88,4	94

Tabulka 3. Úspěšnosti laboratoř pro stanovení Cd, Pb a Hg v cyklech TE 02 v letech 2004-2007

	2004	2005	2006	2007
Cd - Počet laboratoř	6	8	6	7
úspěšnost %	33	50	50	71
Pb - Počet laboratoř	12	13	13	14
úspěšnost %	58	70	70	64
Hg - Počet laboratoř	6	5	2	2
úspěšnost %	67	100	40	100

Externí hodnocení kvality má z pohledu stanovení obsahu vitaminů v biologických maticích mnohem menší možnosti volby ve srovnání se stopovými prvky. Tuzemská nabídka SEKK poskytuje prozatím dva analyty v rámci cyklů Endokrinologie 2 - kyselinu listovou a vitamin B12. Spektrum nabídky německého systému DGKL je širší; vitaminy A, B6 a vitamin E jsou v laboratořích stanovovány výhradně HPLC technikou, vitamin B12 a kyselina listová využívají imunochemických diagnostických souprav s fluorescenční nebo luminometrickou detekcí, imunochemicky se stanovuje také 25-OH-vitamin D3 a to LIA nebo RIA technikou, současně jsou v kontrolních cyklech zastoupeny také laboratoře využívající pro kvantifikaci 25-OH-vitaminu D3 HPLC techniku.

Zvolme příklad stanovení vitaminu D pro ilustraci některých úskalí analytiky i interpretace dat při současných analytických možnostech našich laboratoří. Podnětem pro tento příklad nepochybně může být trend nových pohledů na úlohu vitaminu D zaznamenaný v uplynulém roce v renomovaných odborných časopisech, např. Deficit vitaminu D – rizikový faktor pro srdeční onemocnění (Wang, TJ. et al.: Circulation, 2008); Znovuobjevení vitaminu D (Beastall G. and Rainbow S.: Clin Chem 54:4, 630-632, 2008). V neposlední řadě otázka cíleně položená: Jsou klinické laboratoře připraveny měřit 25 OH vitamin D? (Seiden-Long I. and Vieth R.: Clin Chem 53:6, 1104-1108, 2007). Také potřeba hodnocení a sdílení výsledků měření tohoto parametru a jejich interpretace různými pracovišti mohla být i motivací pro zařazení stanovení 25 (OH) vitaminu D3 do pilotní studie SEKKu věnované kostním markerům v lednu tohoto roku (podrobnosti o vyhodnocení cyklu BM/08 jsou dostupné v archivu EHK na www.sekk.cz). Mezilaboratorního porovnání tří vzorků se v rámci hodnocení vitaminu D zúčastnilo 13 laboratoří, všechny analýzy byly provedeny imunochemicky, 6 laboratoří použilo stejný automatický imunoanalytický postup, 4 manuálně provedenou radioimunoanalýzu diagnostickým kitem téhož výrobce. Z vyhodnocení plynou přinejmenším některé důležité poznatky. Prvním je zjištění, že při stanovení 25-hydroxyvitaminu D bylo u 13 laboratoří použito tří variant jednotek měření se dvěma různými sadami číselných výsledků, významným krokem ke srovnatelnosti výsledků a krokem v zájmu pacientů především by

tedy mělo být sjednocení jednotek měření, a tím i odstranění různosti jejich číselných výsledků. Další potvrzenou skutečností v rámci této pilotní studie se zdá být závěr, že dosažení srovnatelnosti výsledků je podmíněno použitím měřicích systémů téhož výrobce. Při používání imunoanalytických postupů toto zjištění nijak zvlášť nepřekvapuje, možné důsledky heterogenity v původu výsledků a úroveň reprodukovatelnosti měření mezi laboratořemi jsou patrné z tabulky 4. Za povšimnutí jistě stojí výrazný číselný rozdíl výsledků ve všech třech hodnocených kontrolních vzorcích. Ze zkušenosti vlastní laboratoře můžeme konstatování mezilaboratorního srovnání kontrolních materiálů doložit souborem reálných klinických vzorků (n=33) stanovených oběma zde uvedenými postupy (obr. 1) potvrzujícími průměrnou diferencí mezi oběma metodami přes 35 %. Usuzovat lze i na nevyváženost srovnatelnosti obou postupů v rozsahu celé kalibrace; regresní analýzu podle Passinga&Babloka vyjadřuje vztah: $y = 6,1755 + 0,5819 x$. Další souvislosti, plynoucí s mezilaboratorního porovnávání výsledků měření 25 hydroxyvitaminu D, lze demonstrovat na výsledcích kontrolních cyklů vitaminů organizovaných německým programem DGKL. Kupříkladu v cyklu VT 1/08 se hodnocení tohoto analytu účastnilo 70 laboratoří. Bez ohledu na nesourodost používaných jednotek měření lze z vyhodnocení Youdenovými grafy velmi názorně sledovat závislost výsledné hodnoty na použité metodě, výrazný je rozdíl v kalibračních metod sjednocených výrobcí do diagnostických souprav a postupů separačních (obr. 2). Organizátoři kontrolního cyklu použili pro hodnocení vitaminu D toleranční limit 40 %, tato hodnota opět potvrzuje dosažitelné možnosti porovnatelnosti při velmi nízkých koncentracích vycházející jak z teoreticky odhadnutelných předpokladů, tak z praxí ověřených instrumentálních možností.

Možnosti a úskalí analýz koncentrací vitaminů a stopových prvků v biologických materiálech zůstávají v mnoha otázkách otevřeným tématem, právem si však zaslouží pozornost a úsilí o společnou řeč při sledování a předávání výsledků s cílem správné interpretace v zájmu pacientů.

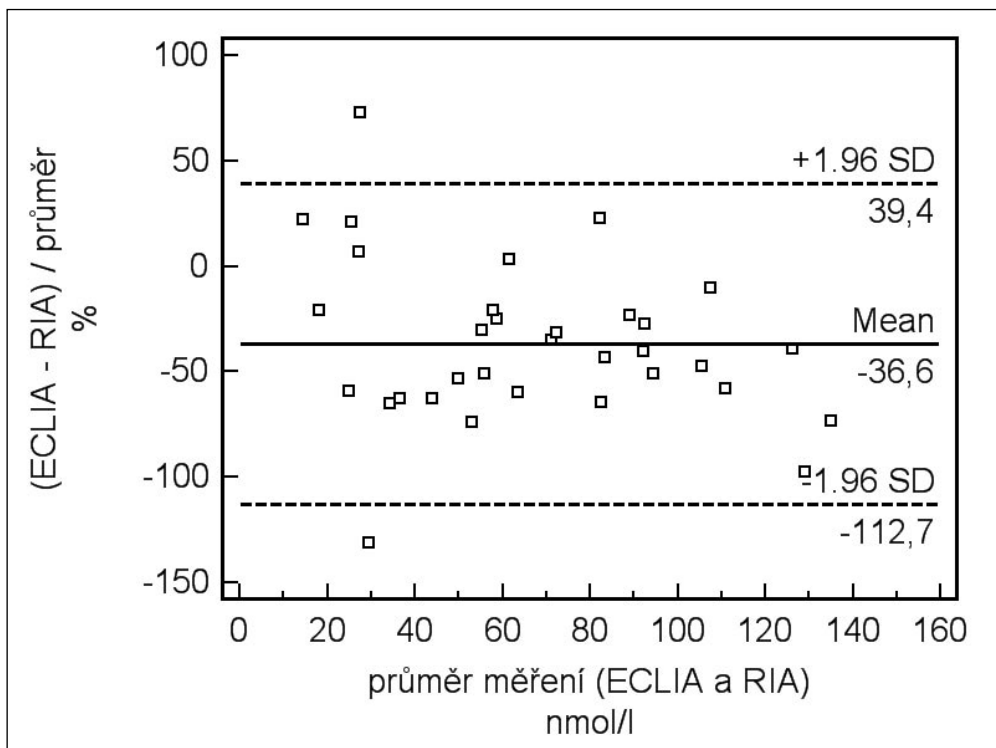
Literatura u autora

Sdělení bylo předneseno v rámci bloku Vitaminy a stopové prvky na sympoziu FONS 2008 v září 2008 v Pardubicích

Tabulka 4. Vitamin D – reprodukovatelnost měření diagnostických souprav téhož výrobce

Analyt	Metoda	Průměr měření ve vzorcích (nmol/l)			Průměr CV%
		A	B	C	
25-OH vit D	ECLIA, automatizovaná imunoanalýza	155	59,3	88,6	7,8
	RIA, manuálně	290	85,9	138	28

obr. 1: Bland-Altmanův diagram pro imunostanovení 25 vitamínu D ECLIA vs RIA



obr. 2: Vliv použité metody měření na mezilaboratorní porovnání výsledků

