

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA  
V HRADCI KRÁLOVÉ**

**Katedra analytické chemie**



**Rigorózní práce**

**Porovnání stanovení 25(OH)D v lidském  
séru metodami UHPLC-MS/MS a CMIA  
Abbott Architect**

**Vedoucí rigorózní práce:** Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

**Školitel specialista:** Doc. RNDr. Dagmar Solichová, Ph.D.

**Vedoucí katedry:** Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Praze dne

Podpis

Děkuji Doc. RNDr. Dagmar Solichové, Ph.D. za vstřícnou, poučnou a velmi milou pomoc při zpracovávání rigorózní práce. Dále děkuji Mgr. Jiřímu Plíškovi, Mgr. Evě Kasalové a Mgr. Janě Aufartové Ph.D. za pomoc s provedením experimentální části práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala vedení III. Interní kliniky gerontometabolické Fakultní nemocnice v Hradci Králové a společnosti Omnilab s.r.o. za poskytnutí prostor a přístrojového vybavení k uskutečnění experimentálního zpracování rigorózní práce.

# 1. Obsah

1.	Obsah.....	4
2.	Úvod a cíl práce .....	7
3.	Seznam zkratk.....	8
4.	Teoretická část.....	10
4.1.	Vitamin D.....	10
4.2.	Stanovení vitamínu D .....	12
4.2.1.	Standardizace stanovení 25(OH)D a mezilaboratorní srovnání .....	13
4.3.	Metody stanovení vitamínu D .....	15
4.3.1.	Separační techniky.....	16
4.3.2.	Imunochemické vyšetřovací techniky .....	21
5.	Experimentální část.....	27
5.1.	Metoda UHPLC-MS/MS .....	27
5.1.1.	Přístroje, pomůcky, chemikálie, standardy .....	27
5.1.2.	Příprava zásobních a pracovních roztoků .....	28
5.1.3.	Preanalytická fáze.....	28
5.1.4.	Analytická fáze .....	29
5.2.	Metoda ABBOTT ARCHITECT 25(OH) Vitamin D .....	32
5.2.1.	Přístroje, pomůcky, chemikálie, standardy .....	32
5.2.2.	Preanalytická fáze:.....	33
5.2.3.	Analytická fáze: .....	33
5.3.	Porovnání metod.....	34
5.3.1.	Statistické vyhodnocení .....	37
6.	Závěr .....	41
7.	Použitá literatura .....	42
8.	Přílohy .....	46

## Abstrakt

V rigorózní práci byly porovnány metody UHPLC-MS/MS a CMIA Abbott Architect pro stanovení 25(OH)D (kalcidiol) z lidského séra.

Vzorky lidského séra byly nejprve vyšetřeny metodou na principu CMIA a následně identické vzorky zpracovány UHPLC-MS/MS metodou, která byla vyvinuta a validována Výzkumnou laboratoří III. Interní gerontometabolické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové pro klinický monitoring 25(OH)D<sub>3</sub> a 25(OH)D<sub>2</sub>.

Porovnání obou metod bylo provedeno pomocí statistického programu NCSS 2007 (Number Cruncher Statistical Software, Kaysville, Utah, USA). Deskriptivními statistickými metodami byly popsány základní vlastnosti obou souborů výsledků (průměr, medián, směrodatná odchylka výběru a další). Bylo provedeno hodnocení párovými T testy, posouzena rozdílnost či shoda mezi oběma soubory dat. Pomocí regresní analýzy byla vyhodnocena vzájemná korelace obou souborů hodnot.

Statistickým zpracováním výsledků jsme dospěli k závěru, že hodnoty dosažené metodami UHPLC-MS/MS a CMIA Abbott Architect se statisticky významně liší ( $p=0,0000$ ), ale vykazují těsnou korelaci (korelační koeficient  $r = 0,8832$ ). Obě metody jsou vzájemně dobře srovnatelné a jejich výsledky je možné mezi sebou přepočítávat.

## Abstract

In this rigorous work UHPLC-MS/MS and Abbott Architect CMIA methods for determination of 25(OH)D (calcidiol) in human serum were compared.

Human serum samples were firstly analysed by the principle of CMIA and subsequently identical samples were processed by UHPLC-MS/MS method that was developed and validated in Research Laboratory of III. Internal Gerontometabolic Clinic of University Hospital in Hradec Králové for 25(OH)D<sub>3</sub> and 25(OH)D<sub>2</sub>.clinical monitoring.

Comparison of these methods was performed using the statistical software NCSS 2007 (Number Cruncher Statistical Software, Kaysville, Utah, USA). Descriptive statistical methods described basic properties of both result sets (mean, median, standard deviation, etc.). The evaluation was tested using pair T-tests to assess the diversity or consensus between the two datasets. Correlation of the two sets of values was investigated by regression analysis.

Based on statistical analysis of the results we can conclude that the values obtained by UHPLC-MS/MS and CMIA Abbott Architect methods are statistically significantly different ( $p = 0.0000$ ), but the correlation is very good ( $r = 0,8832$ ). Therefore the both methods are well comparable and the results can be converted to each other.

## 2. Úvod a cíl práce

Rigorózní práce byla vypracována v návaznosti na tematiku řešenou v diplomové práci Porovnání extrakčních postupů ze séra pro HPLC stanovení liposolubilních vitamínů (Nápravníková 2011), která se zabývala vývojem a optimalizací preanalytické fáze stanovení 25(OH)D.

Vzhledem k stále rostoucí "popularitě", analytu 25(OH)D v klinické praxi je nyní nejdiskutovanějším problémem stanovení standardizace všech současně používaných analytických metod, která by umožnila vzájemné porovnání výsledků dosažených jak imunochemickými metodami na analyzátoch jednotlivých firem s různými principy měření, tak i separačními metodami chromatografickými.

V této rigorózní práci měla být porovnána metoda UHPLC-MS/MS, která umožňuje separaci jednotlivých metabolitů 25(OH)D<sub>3</sub> a 25(OH)D<sub>2</sub> a Abbott Architect princip měření CMIA, pro stanovení celkové koncentrace analytu 25(OH)D. Cílem práce bylo zjistit, zda jsou výsledky dosažené těmito odlišnými analytickými metodami vzájemně porovnatelné a vhodné pro klinické hodnocení hladiny 25(OH)D v lidském séru.

### 3. Seznam zkratek

ACN	acetonitril
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
AV	vztažná hodnota
BEH	ethylen bridged hybrid
CMIA	chemiluminiscenční imunoanalýza
CPBA	analýza kompetitivní vazby na proteiny
CV	variační koeficient
DL	desolvation line
Dmax	přijatelný rozdíl v procentech
DDD	doporučená denní dávka
ECLIA	elektrochemiluminiscenční imunoanalýza
EHK	externí hodnocení kvality
EIA	enzymoimunoanalýza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IS	interní standard
ITSP	instrument top sample preparation
LL	dolní mez
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
MS	hmotnostní spektrometrie
MRM	multiple reaction monitoring
NIST	National Institut of Standard and Technology USA
Nout	počet výsledků vyloučených před výpočtem
Nsuee	počet úspěšných účastníků
Ntot	celkový počet účastníků
PC	počítač
pH	kyselost, vodíkový exponent
PTH	parathormon
Q	rychlost otáčení
r	poloměr otáčení
RIA	radioimunoanalýza
RCF	relativní centrifugační síla



RoM	robustní průměr
SPE	extrakce na pevnou fázi
Srel	relativní úspěšnost
SRM	standardní referenční materiál
SD	směrodatná odchylka
UAV	rozšířená nejistota vztažné hodnoty (k=2)
UL	horní mez
UHPLC	ultra účinná kapalinová chromatografie
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast spektra
VDR	vitamin D receptor
VDBP	vitamin D vázající protein

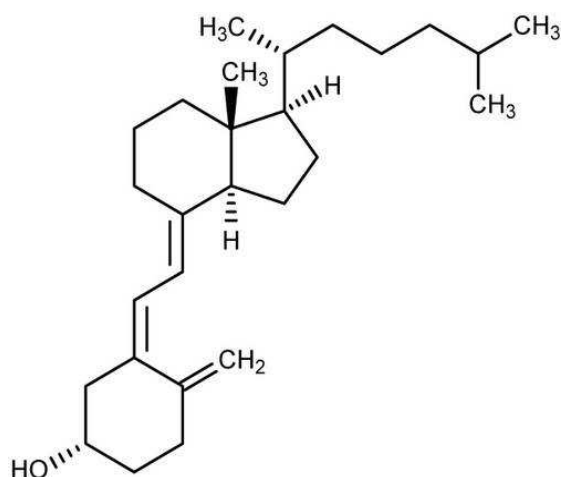
## 4. Teoretická část

### 4.1. Vitamin D

Vitamin D (kalciferol) se řadí mezi skupinu vitaminů rozpustných v tucích. Chemickou strukturou se jedná o sekosteroid (viz. Obr 1). Pojem vitamin D je reprezentován dvěmi chemickými formami ergokalciferolem (vitamin D<sub>2</sub>) a cholekalciferolem (vitamin D<sub>3</sub>) (viz. Obr 1) [1, 2].

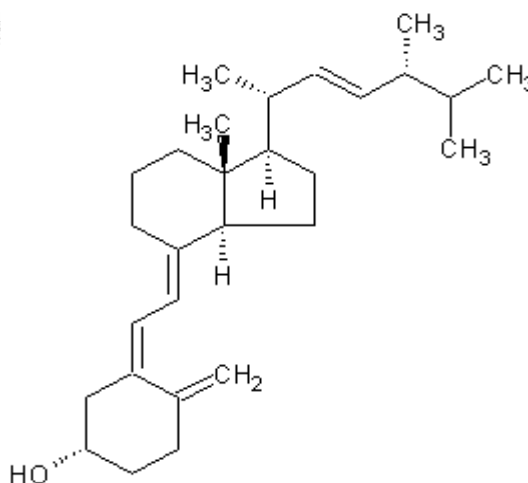
**Obr 1** vitamín D<sub>3</sub> – cholekalciferol [5]

Chemická struktura: C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O



vitamín D<sub>2</sub> - ergokalciferol [6]

C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O



Cholekalciferol tvoří 95% cirkulujících kalciferolů v lidském organismu. Cholekalciferol je syntetizován v kůži z prekursoru 7-dehydrocholesterolu. Po ozáření ultrafialovým B zářením o vlnové délce 290-315 nm vzniká pre-vitamin D<sub>3</sub>, který je termodynamicky nestabilní a isomerizuje na vitamin D<sub>3</sub> (cholekalciferol) [2,7].

Cholekalciferol může být také získán z živočišné potravy. Ergokalciferol je syntetizován z rostlinného ergosterolu. Ergokalciferol je přijímán ve formě potravy nebo jako syntetická forma [7].

Kalciferoly jsou neaktivní formy vitaminu D, mají liposolublní, hydrofóbní charakter, tvoří zásobní frakci vitaminu D. V případě potřeby jsou ve vazbě na specifický transportní protein (vit. D vázající protein-DBP) transportovány do jater. V endoplazmatickém retikulu jaterní buňky za přítomnosti Mg<sup>2+</sup>, NADPH, O<sub>2</sub>,

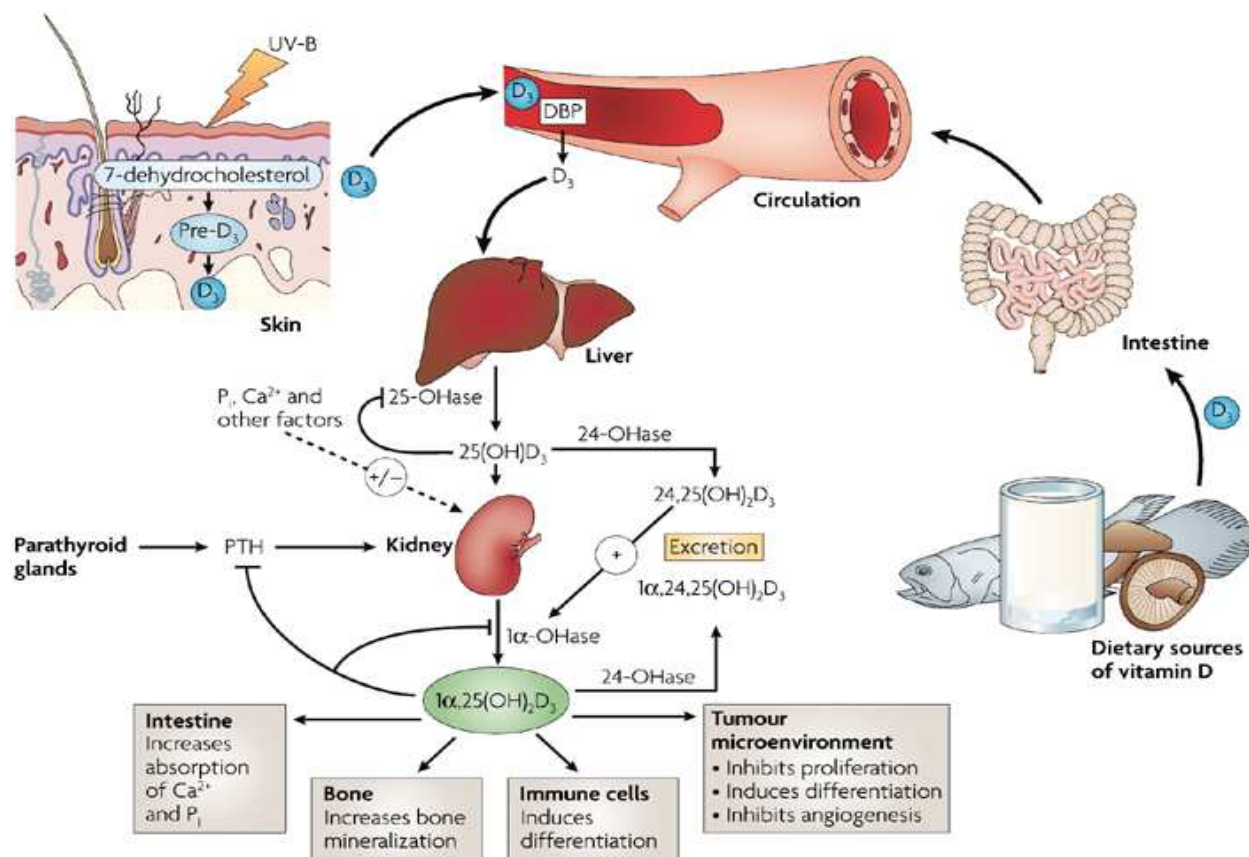
necharakterizovaného cytoplasmatického faktoru a enzymů NADPH dependentní cytochrom P450 reduktasy a cytochromu C450 dojde k hydroxylaci v poloze 25 enzymem 25-hydroxylázou za vzniku kalcidiolu. Kapacita jater pro tvorbu kalcidiolu je vysoká a jeho koncentrace je proto vhodným ukazatelem množství vitamínu D v organismu. Kalcidiol je neúčinným metabolitem s poločasem cirkulace v krvi 2 až 3 týdny ve vazbě na VDBP [7,8,9].

Aktivní metabolit kalcitriol je z kalcidiolu syntetizován ledvinami, v menší míře také placentou, buňkami granulomatózní tkáně a kostmi. Kalcidioly jsou v případě potřeby transportovány (převážně) do ledvin, kde jsou hydroxylovány specifickým enzymem 1 $\alpha$ -hydroxylázou v mitochondriích proximálních tubulů za účasti Mg<sup>2+</sup>, NADPH, O<sub>2</sub> a systému třech enzymů: flavoproteinu, ferredoxinu a cytochromu P450. Vznikají vysoce aktivní formy kalcitriol: 1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) nebo 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyergocalciferol (1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub>). Tvorba kalcitriolů je regulována koncentrací Ca<sup>2+</sup> iontů a PTH [7,9].

Aktivní forma vitamínu D je v cirkulaci transportována ve vazbě na VDBP. Po uvolnění z vazby přechází do buňky, kde se váže na jaderný vitamin D receptor (VDR). Touto vazbou se kalcitrioly stávají transkripčním faktorem pro přibližně 3% lidského genomu [7,8, 10].

Receptor pro vitamin D (VDR) se nachází téměř ve všech tkáních, včetně imunitního systému viz. Obr 2. VDR receptory jsou v organismu ovlivňovány plošně. Aktivní forma vitamínu D je regulátorem transkripčních DNA mechanismů, účinek závisí na typu tkáně a má komplexní a neselektivní charakter [11].

**Obr 2** Metabolická cesta Vitaminu D [3]



Nature Reviews | Cancer

## 4.2. Stanovení vitamínu D

V současné době je identifikováno kolem 40 metabolitů vitamínu D, nejsou však objasněny jejich přesné vlastnosti, význam ani vzájemné interakce. Praktické využití proto nachází pouze stanovení  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  a  $25(\text{OH})\text{D}$ . Nehydroxylované formy vitamínu D mají poločas cirkulace pouze 24 hodin a jejich koncentrace je okamžitě ovlivňována slunečním zářením a stravou. Pro stanovení aktivních forem vitamínu D je limitující velmi nízká koncentrace řádově pmol/l a také velmi krátký poločas cirkulace v krvi pouze 4 hodiny. Aktivní formy proto nejsou zcela vhodnými analyty, je zde prakticky nemožné načasování odběru vzorku a není vypovídající hodnota o skutečném stavu hladiny vitamínu D v organismu, stav je ovlivňován např. PTH, Ca. Oproti tomu kalcidioly mají poločas cirkulace až 3 týdny a jejich koncentrace je regulována pouze aktivitou jaterní vitamín D 25-hydroxylázy. Kalcidioly jsou vhodným ukazatelem hladiny vitamínu D v těle. Hodnocení hladiny vitamínu D v krvi člověka viz. Tab 1 [8, 13,30].

**Tab 1** Hladina vitamínu D v krvi člověka [30].

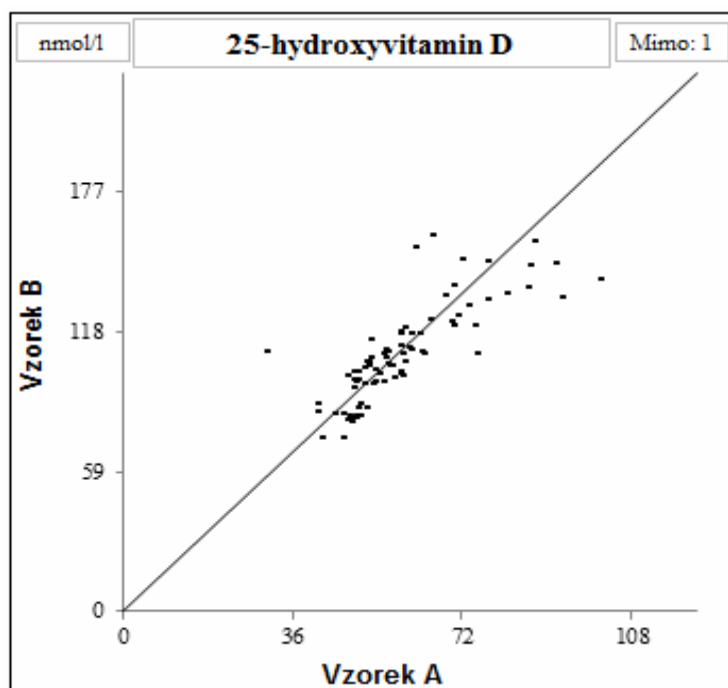
<b>koncentrace</b>	<b>nmol/l</b>	<b>ng/l</b>
<b>deficit</b>	< 50	< 20
<b>insuficience</b>	50 - 75	21 - 29
<b>dostatečnost</b>	75 - 250	30 -100
<b>nadbytek</b>	250 - 375	101 -150
<b>intoxikace</b>	> 375	> 150

#### **4.2.1. Standardizace stanovení 25(OH)D a mezilaboratorní srovnání**

Vzhledem k stále rostoucímu množství požadavků na stanovení vitamínu D došlo i k zvýšení počtu firem nabízejících toto vyšetření. Standardizace stanovení 25(OH)D byla provedena za účelem vyšší úrovně srovnatelnosti a interpretace výsledků mezi jednotlivými metodami s odlišnými principy měření. Byl proto stanoven referenční materiál s definovanými referenčními hodnotami a referenční metoda stanovení.

Úroveň srovnatelnosti metod různých výrobců pro analyt 25(OH)D lze hodnotit pomocí externího hodnocení kvality (EHK). Jedná se o mezilaboratorní srovnání koncentrace analytu obsaženého v kontrolních materiálech. Materiál je rozeslán označený názvem cyklu a číslem vzorku bez uvedení koncentrace. Účastníci po změření odesílají své výsledky zpět do společnosti provádějící externí hodnocení kvality. Účastníci definují použitý analytický systém (princip měření, výrobce). Společnost vyhodnotí doručené výsledky a zašle laboratoři informace o výsledku a hodnocení laboratoře. Mezinárodní program EHK významný pro vitamin D je britský program EHK DEQAS, který využívá směsi vzorku nativních patientských sér, které jsou rozesílány čtvrtletně, výsledky jsou hodnoceny dle použité diagnostiky. Dále se hodnocením EHK pro vitamin D zabývají například CAP USA (Ligand) a německý kontrolní program DGKL. V České republice má největší počet účastníků EHK společnost SEKK, kde je 25(OH)D zahrnut v cyklu kostní markery. Účastníci jsou rozděleni dle principu měření a výrobce, vztažná hodnota je stanovena jako robustní průměr. Účastník získá statistické a grafické hodnocení svého výsledku v stejnorodé skupině viz Obr 3 a Tab 2 [35, 36, 37]. V závěrech všech programů EHK jsou stále velké rozdíly mezi intervaly hodnot, v nichž jednotlivé diagnostiky měří, což poukazuje na nutnost standardizace k již dostupnému SRM 972 NIST a referenční metodě viz. níže.

**Obr 3** EHK SEKK BM1/13 graficky stanovení 25(OH)D [35]



**Tab 2** Výtah ze statistického vyhodnocení SEKK [35]

EHK BM1/13 Kostní markery 25(OH)D nmol/l						
Metoda stanovení dle výrobce a principu	Vzorek	AV (nmol/l)	$U_{AV}$ (%)	SD (nmol/l)	CV (%)	Počet účastníků
Imunochemické metody Abbott	A	48,1	1,6	2,39	4,97	13
	B	82,9	3	4,41	5,32	
Imunochemické metody Roche	A	55	2,1	5,8	10,5	47
	B	106	3,1	8,76	8,24	
Imunochemické metody Diasorin	A	82,5	13	13,7	16,6	7
	B	129	12	11,9	9,19	
Imunochemické metody Siemens	A	71,2	11	8,67	12,2	9
	B	142	14	11,1	7,86	
Imunochemické metody IDS	A	79,9	89	31,4	39,3	5
	B	121	84	29,7	24,5	
Ostatní	A	69	22	15,4	22,3	3
	B	122	43	30,5	25,1	

## Referenční standardní materiál (SRM) 972

Tento SRM je určen k hodnocení koncentrace metabolitů vitamínu D v lidském séru a to: 25-hydroxyvitaminu D<sub>2</sub> 25(OH)D<sub>2</sub> a 25-hydroxyvitaminu D<sub>3</sub> 25(OH)D<sub>3</sub> a 3-epi-25-hydroxyvitaminu D<sub>3</sub> 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>. Standard obsahuje čtyři hladiny zmražených sér o různých koncentracích. Hladina 1 je připravena z "normálního" lidského séra, hladina 2 připravena zředěním hladiny 1 koňským sérem. Hladina 3 obsahuje "normální" lidské sérum obohacené o 25(OH)D<sub>2</sub>. Hladina 4 obsahuje "normální" lidské sérum obohacené o 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> [36].

### 3-epi-25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>

Epimery jsou sloučeniny identických molekulárních struktur s odlišným stereochemickým uspořádáním. C3-epimer 25(OH)D může být příčinou nadhodnocení výsledných koncentrací 25(OH)D. C3-epimer 25(OH)D se liší jen v tom, že hydroxylová skupina v poloze C3 je uspořádána asymetricky. Charakterizace pomocí hmotnostní spektrometrie není snadná vzhledem k podobným MRM přechodům. Epimery však lze oddělit pomocí izokratické separace. Významnější koncentrace C3-epi-25(OH)D byli prokázány zejména u dětí ale i u dospělých [39,40].

## 4.3. Metody stanovení vitamínu D

Existuje velké množství metod pro stanovení vitamínu D a jeho metabolitů v biologickém materiálu. Současně používané techniky lze rozdělit do dvou velkých skupin:

- Separční techniky – metody schopné rozlišit metabolity vitamínu D (chromatografické metody)
  - komerční kity ve spojení s HPLC nebo LC-MS/MS
  - „in-house“ metody HPLC nebo LC-MS/MS
- Imunochemické vyšetřovací techniky - metody, které nejsou schopny kvantitativně rozlišit metabolity vitamínu D
  - RIA, EIA, CLIA, CMIA, ECLIA

Všechny metody stanovení 25(OH)D jsou ovlivněny vazbou metabolitu na VDBP. Koncentrace VDBP je v krvi 100-1000 krát vyšší než koncentrace 25(OH)D, řádově 4-14 μmol/l. Pro kvantitativní stanovení metabolitů 25(OH)D musí každé analýze předcházet uvolnění z vazby na VDBP a inaktivace proteinu [30].

### **4.3.1. Separační techniky**

#### **4.3.1.1. Kapalinová chromatografie**

Stanovení 25(OH)D metabolitů pomocí kapalinové chromatografie vyniká schopností kvantifikovat koncentraci 25-hydroxyvitaminu D<sub>2</sub> 25(OH)D<sub>2</sub> a 25-hydroxyvitaminu D<sub>3</sub> 25(OH)D<sub>3</sub>. V praxi nachází využití HPLC uspořádání s UV nebo elektrochemickou detekcí a spojení HPLC s tandemovým hmotnostním spektrometrem LC-MS/MS.

Pro obě uspořádání je velmi důležitá preanalytická fáze, která zahrnuje deproteinaci, extrakci a purifikaci vzorku [27].

Kapalinová chromatografie nabízí velké množství individuálních řešení např: provedení preanalytické fáze, složení mobilní fáze, typ kolony, typ detekce a další volitelné parametry (tlak, teplota, typ ionizace, průtok atd.). Lze využít i komerčních kitů výrobce.

##### **4.3.1.1.1. „In-house“ metody HPLC nebo LC-MS/MS**

#### **Referenční metoda stanovení 25(OH)D**

Referenční metoda pro stanovení vitamínu D z lidské krve byla vyvinuta a publikována pracovníky NIST (National Institut of Standard and Technology USA) v roce 2010 a kalibrována na certifikovaný referenční standard SRM NIST 972. Metoda je založena na LC-MS/MS, výsledkem je stanovení koncentrace 25(OH)D<sub>2</sub> a 25(OH)D<sub>3</sub>.

Preanalytická fáze:

K vzorku je přidán interní standard obou analytů, následuje ustálení směsi při pokojové teplotě přibližně 1 hodinu, upravení pH na 9,8±0,2 LLE vzorku s hexanem-ethyl acetátem (50:50) a 10 minut třepání. Odebrání vrchní vrstvy hexan-ethyl acetát do centrifugační zkumavky. LLE je zopakována po dobu 3 minut, vrchní vrstva opět separována. Směs extraktů vysušena pod dusíkem při 45°C. Odparek je rekonstituován methanolem pro LC-MS/MS.



Analytická fáze:

Přístrojové vybavení Agilent 1100 series LC systém ve spojení s Applied Biosystems API 4000 LC-MS/MS. Použita kolona Zorbax SB CN (250 mm x 4,6 mm, 5µm). zahřívána na 30°C, izokratický režim, mobilní fáze 34% voda, 66% methanol (v/v), průtok 1 ml/min. Proplach po každé analýze 100% methanolem 12 minut a před analýzou 15minut. Nástřik vzorku 10-20 µL pomocí autosampleru ze zásobníku chlazeného na 10 °C. Ionizace APCI v pozitivním iontovém módu a za využití MRM přechodů. Kolizní a sušící plyn dusík, proud na jehle 5µA za teploty 350 °C [29].

### **Automatizovaná SPE-LC/MS/MS pro stanovení 25(OH)D metabolitů ze séra**

Preanalytická fáze:

Precipitace (acetonitril, kys. mravenčí), inkubace, centrifugace, přemístění supernatantu do skleněných vialek pro ITSP SPE metodu. ITSP kolonka Evolute C8 (10mg), použitý systém CTC Analytics HTC PAL s 100 µL jehlou a chlazením. SPE extrakce je provedena v 12 krocích s rozpouštědly A: Acetonitril, B: Methanol, C: 0.1% kys. mravenčí, D: 50% Methanol ve vodě.

Analytická fáze:

Přístrojové vybavení LC systém Agilent Model 1200 Rapid Resolution<sup>TM</sup> ve spojení s Agilent Model 6410A s HotBox s MultiMode zdroj. Mobilní fáze A: 0.1% kys. mravenčí ve vodě mobilní B: 0.1% kys. mravenčí v metanolu. Analytická kolona Agilent Zorbax Bonus RP (2.1 x 50 mm, 3.5µm) vyhřívána na 30°C, nástřik 5 µL, průtok 0.4 mL/min. MS/MS ionizace APCI pozitivní separace MRM MS/MS.

MRM přechody: 25(OH)D<sub>3</sub>            401.3>159.3  
                  25(OH)D<sub>2</sub>            413.3>159.3 [50]

#### 4.3.1.1.2. Komerční kity

Komerční kity ke stanovení vitamínu 25(OH)D poskytují vybavení chemikáliemi. Zajišťují postup preanalytické a analytické fáze stanovení. Neposkytují přístrojové vybavení.

#### Immundiagnostik AG

- Metoda 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> HPLC Kit
- Metoda: 25(OH) Vitamin D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> HPLC Kit

Jedná se o kity pro stanovení 25(OH)D<sub>3</sub> nebo 25(OH)D<sub>3</sub> a 25(OH)D<sub>2</sub> ze séra a plazmy. Kity obsahují všechny reagensie pro HPLC separaci (mobilní fáze MOPHA), extrakci (promývací roztok WASHSOL, eluční roztok ELUSOL, regenerační roztok C18-kolonek REGSOL), deproteinaci vzorku (precipitační roztok PREC), kalibrátor, standard, kontroly.

Analýze vzorku na HPLC systému předchází precipitace, inkubace, centrifugace a solid phase extrakce na C18 kolonkách. Následuje odpaření eluátu pod dusíkem, rekonstituce mobilní fází a nástřik 100µl vzorku. Separace probíhá v izokratickém režimu při 30°C na koloně plněné silikagelem (normální fáze) (4µm, 125mm x 4mm), průtok metoda: 25(OH)D<sub>3</sub> 1-1,5ml/min, metoda: 25(OH)D<sub>3</sub> a 25(OH)D<sub>2</sub> 0,75ml/min. Analýza je zakončena UV detekcí při 264nm. Čas analýzy je 20 minut, preanalytická fáze trvá přibližně 50 minut [28].

- 25-OH Vitamin D<sub>3</sub> / D<sub>2</sub> LC-MS/MS Kit

Kit byl vyvinut pro stanovení 25-hydroxyvitaminu D<sub>2</sub> 25(OH)D<sub>2</sub> a 25-hydroxyvitaminu D<sub>3</sub> 25(OH)D<sub>3</sub> pomocí LC-MS/MS. Součástí kitu je opět vybavení chemikáliemi ne přístrojové vybavení, to je pouze doporučeno. Pro tento kit se nabízí tři možnosti přípravy vzorku, první typ je proteinová precipitace, která je doporučována k použití a provádění vysoce citlivé LC-MS/MS. Druhý a třetí typ využívá SPE kolonek, kde opět kolony nejsou součástí kitu. Doporučená analytická kolona 1,7 µm ACQUITY UPLC BEH C18, čas separace 3,5min, průtok mobilní fáze 0,3ml/min, nástřik 50µl vzorku. Ionizace ESI pozitivní polarita, separace MRM MS/MS [49].

MRM přechody:	25(OH) Vitamin D <sub>3</sub>	25(OH) Vitamin D <sub>2</sub>
	401.23 > 383.2	413.18 > 395.15
	401.23 > 158.67	413.18 > 82.83 [49]

### **PerkinElmer MSMS vitamin D kit**

Kit pro kvantitativní stanovení 25-hydroxyvitaminu D<sub>2</sub> 25(OH)D<sub>2</sub> a 25-hydroxyvitaminu D<sub>3</sub> 25(OH)D<sub>3</sub> v lidském séru. Kit obsahuje interní standard, kalibrátor, kontrolní materiál, 500 nebo 200µl mikrotitrační destičky [26].

Využití s přístroji např. HPLC-MS/MS Waters Triple Quadrupole Detector (TQD) mass spectrometer-Waters HPLC systém nebo UPLC/MS/MS uspořádání Waters Xevo TQD mass Spectrometer-Waters ACQUITY UPLC® Systém viz Obr 4 [25,26].

**Obr 4** Waters UPLC Xevo TQD MS systém [26]



### **Chromsystems - MassChrom® Integrovaný kit pro LC-MS/MS analýzu 25-OH-Vitaminu D<sub>3</sub> a D<sub>2</sub> ze séra a plasmy**

Komponenty: analytická kolona, záchyťová kolonka, kalibrátory, kontrolní materiál

Komponenty k dokoupení: precipitační činidlo, mobilní fáze A a B, promývací roztok, interní standard, reakční vialky

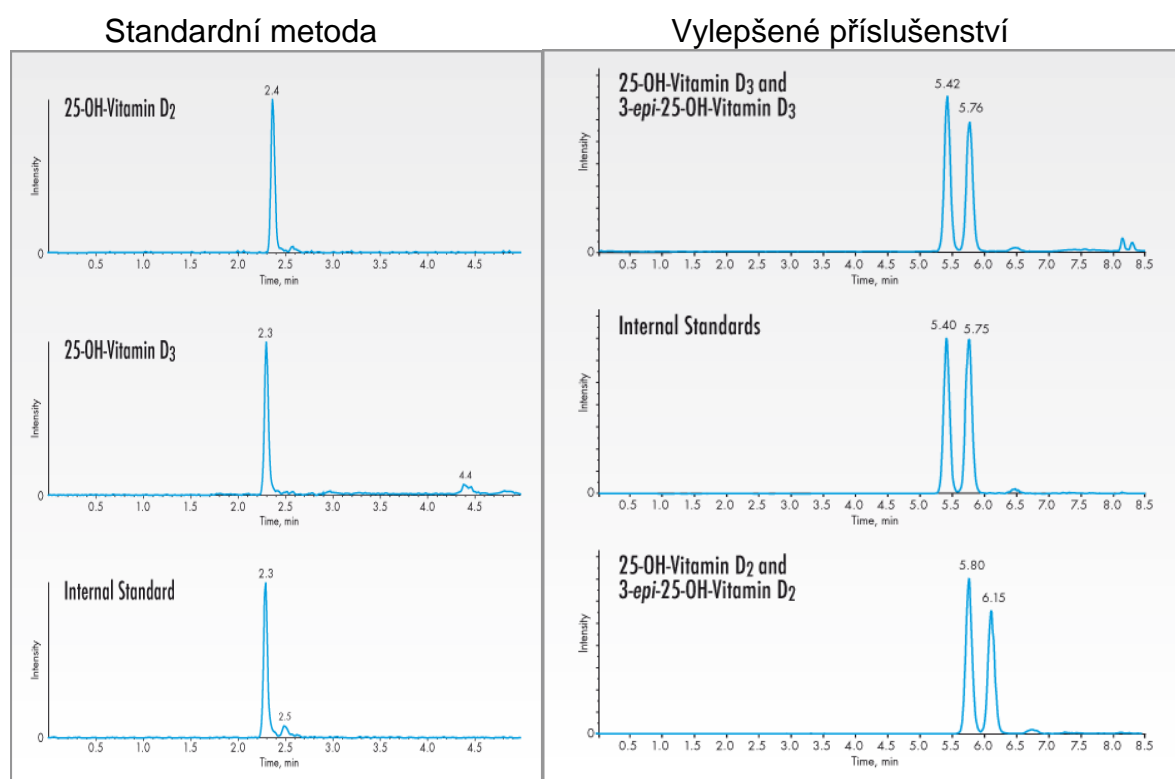
Preanalytická fáze: Nepipetovat 100µl vzorku do reakční zkumavky, přidat 25µl precipitačního činidla a 200µl interního standardu a promíchat na vortexu 20 s. Následuje inkubace 10min při 4°C, centrifugace 5min při 15000 g. Po centrifugaci je 200µl supernatantu přemístěno do vialky autosampleru.

Analytická fáze: Nástřik 10-50µl vzorku na záchyťovou kolonku s průtokem mobilní fáze A 0,6ml/min (zkonzentrování analytů odstranění interferujících látek).

Následuje rozdělení analytů na analytické koloně za využití mobilní fáze B průtok 1 ml/min. Kolony jsou připojeny na šesticečný ventil. Ionizace vzorku je provedena pomocí APCI pozitivní polarita a separace MRM MS/MS mód čas analýzy 5 min.

- Firma také nabízí vylepšené příslušenství pro stanovení diastereoizomerních forem 25(OH) Vitaminu D<sub>3</sub> a D<sub>2</sub> ze séra a plasmy. Stanovení se liší v použitých kalibrátorech, kontrolních materiálech a kolonách. Čas analýzy 8,5 -10 min. Záznamy chromatogramů obou metod viz.Obr 5 [46].

**Obr 5** Chromsystems LC-MS/MS analýza 25-OH-Vitaminu D<sub>3</sub> a D<sub>2</sub> [46]



### Výhody separačních technik

- kvalitativní identifikace analytů
- kvantitativní stanovení koncentrace analytů
- možnost separace C3 interferujících epimerů 25(OH)D
- vysoká citlivost
- rychlost analýzy
- není třeba odebírat reagentie od výrobce přístroje
- referenční metoda

### **Nevýhody separačních technik**

- nutná preanalytická fáze (optimalizace podmínek deproteintace, extrakce atd...)
- optimalizace podmínek analýzy
- složitější interpretace výsledků, náročnější na obsluhu (VŠ personál)
- finanční náročnost přístrojového vybavení

### **4.3.2. Imunochemické vyšetřovací techniky**

- Manuální
- Automatizované

#### **4.3.2.1. Radioimunoanalýza (RIA)**

RIA patří mezi radioizotopové imunochemické metody. Je modifikací využívající na pevný sorbent navázanou specifickou protilátku proti stanovovanému antigenu. Antigen soutěží o vazebné místo na protilátce se známým množstvím antigenu značeným vhodným radioaktivním izotopem. Po inkubaci se odmyje vzorek i značený antigen a zůstanou pouze imunokomplexy vzniklé vazbou antigenu z roztoku se specifickou protilátkou vázanou na pevném nosiči. Čím větší množství stanovovaného antigenu je přítomno, tím méně vznikne imunokomplexů značených. Radioaktivita je nepřímo úměrná množství stanovovaného antigenu [14].

#### **DiaSorin (USA), metoda 25-hydroxyvitamin D 125I RIA kit.**

Metoda je založena na reakci oslí (anti-kozí, 125I značené) protilátky s kozí polyklonální protilátkou proti 25(OH)D. Metoda detekuje obě formy kalcidiolu ale i další hydroxylované metabolity. Je náročná na manuální práci a čas. Nevhodná z hlediska využití radioaktivních izotopů [15].

#### **Immunodiagnostic 25-hydroxy vitamin D RIA kit**

Kit je rovněž určen pro kvantitativní stanovení celkového 25(OH)D a dalších hydroxylovaných metabolitů [34].

#### **4.3.2.2. Enzyoimunoanalýza (EIA)**

EIA je skupina imunochemických metod využívající enzymy ke značení antigenu nebo protilátky a tím celého imunokomplexu. Enzym navázaný na protilátce či antigenu je aktivován přidáním vhodného substrátu. Výsledkem je barevná reakce detekovatelná fotometricky (ELISA), fluorometricky (FEIA), luminometricky (LEIA) [14].

- Homogenní EIA
- Heterogenní EIA-ELISA
  - Sendvičová – průkaz antigenu, protilátky
  - Kompetitivní – kompetice antigenu (analyt - značený antigen)

#### **Imunodiagnostic systems metoda OCTEIA 25-hydroxy vitamin D EIA.**

Jedná se o manuální metodu, kde je vzorek nepipetováno do skleněné zkumavky, následně je přidán konjugát 25(OH)D-biotin a směs promíchána na vortexu. Přesně definované množství směsi se přepipetuje na mikrotitrační destičku s vázanou protilátkou anti-25D. Reakční směs je inkubována 2 hodiny při pokojové teplotě. Po inkubaci je mikrotitrační destička třikrát promyta za účelem odstranění nenavázaného konjugátu. K detekci navázaného množství konjugátu je po 30 minutách od promytí přidán avidin a následně substrát, následuje 30 minut inkubace. Reakce je ukončena stopovací reagenty (kyselina). Výsledek stanovení je odečten jako absorbance pomocí fotometrické čtečky při 450nm. Koncentrace 25(OH)D ve vzorku je nepřímo úměrná absorbanci. Metoda může být automatizována [17].

#### **EUROIMMUNE 25-OH vitamin D ELISA**

Metoda kde je vzorek séra napipetován na mikrotitrační destičku s navázanými anti-25(OH)D protilátkami pevně ukotvenými na destičce viz Obr 6. 25(OH)D se vyváže ze vzorku na protilátky. Následně je ke směsi přidán značený 25(OH)D, je vyvážen na zbylá vazebná místa a poté je přidán substrát, který spustí barevnou reakci. Absorbance je měřena fotometrem při 450nm a je nepřímo úměrná koncentraci [18].

**Obr 6** Elisa EUROIMMUNE [24]



#### **4.3.2.3. Elektrochemiluminiscenční analýza (ECLIA)**

ECLIA je využívána firmou Roche, je založená na nejstarší popsaném způsobu stanovení vitamínu D, kompetitivní vazbě na protein (CPBA „competitive protein-binding analysis) s využitím elektrochemiluminiscenční reakce [15].

Roche, metoda: Elecsys Vitamin D total. Příklad viz. Obr 7.

**Obr 7** Příklad přístroje Roche Cobas e411 [23]



Metoda stanovuje oba kalcidioly. Stanovení předchází denaturace a uvolnění 25(OH)D z vazby na VDBP. Metoda je založena na vazbě 25(OH)D s rutheniem značeným vitamin D vázícím proteinem. Následně je přidán biotinem značený 25(OH)D, dojde ke kompetici o vazebná místa na ruthenilovaném VDBP. Dále jsou přidány streptavidinem potažené mikročástice, proběhne interakce biotin streptavidin. Reakční směs je nasáta do měřicí cely, kde jsou mikročástice zachyceny

magnetickým polem na povrchu elektrody. Nenavázané složky jsou následně odmyty. Přivedené napětí na elektrodě vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů. Emise fotonů je změřena fotonásobičem a je nepřímo úměrná množství 25(OH)D ve vzorku [16, 31].

#### 4.3.2.4. Chemiluminiscenční imunoanalýza

##### **DiaSorin Liaison 25-OH Vitamin D Total Essay**

Metoda je určena pro stanovení koncentrace 25(OH)D a dalších hydroxylovaných metabolitů vitamínu D [22].

Metoda je založena na chemiluminiscenční imunoanalýze. V první fázi stanovení proběhne inkubace vzorku s činidlem, které uvolní 25(OH)D z vazby na VDBP. Po uvolnění se analyt naváže na specifickou protilátku navázanou na pevné fázi. Po 10 minutové inkubaci je přidán chemiluminiscenční látkou značený 25(OH)D, který obsadí volné protilátky. Po 10 minutové inkubaci následuje odmytí nenavázané frakce. Následně je přidána startovací reagentie, která spustí chemiluminiscenční reakci. Vzniklé záření je snímáno fotonásobičem v jednotkách RLU, kdy signál je nepřímo úměrný koncentraci analytu [21]. Přístroj viz. Obr 8.

**Obr 8** Přístroj DiaSorin Liaison [19]





**Abbott ARCHITECT 25-OH Vitamin D** Přístroj viz. Obr 9.

**Obr 9** Přístroj Abbott Architect ci16200 [20]



Metoda slouží ke stanovení celkového 25(OH)D. Vzorek je smíchán s přípravnou reagensí (denaturace), následuje promíchání a inkubace směsi. Směs se smíchá s ředícím roztokem pro metodu a s paramagnetickými mikročásticemi potaženým protilátkami proti 25(OH)D (ovčí polyklonální protilátky proti lidskému 25(OH)D). Dojde k vyvázání ze vzorku na mikročástice. Po inkubaci je přidán konjugát (komplex biotinylovaného 25(OH)D a konjugátu myších monoklonálních protilátek proti biotinu s akrinidem). Komplex se naváže na neobsazená vazebná místa na mikročásticích pro 25(OH)D. Paramagnetické částice jsou následně zachyceny pomocí magnetu a nenavázaný komplex a zbytky směsi vzorku jsou odstraněny promytím. K zbylé reakční směsi jsou přidány roztoky peroxidu vodíku a hydroxidu sodného. Dojde k chemiluminiscenční reakci, která je měřena v relativních světelných jednotkách (RLU). Množství 25(OH)D je nepřímo úměrné množství RLU [4].

Stejný princip jako firmy Diasorin a Abbott využívá i firma Siemens a IDS

- **ADVIA Centaur Vitamin D Total Essay**
- **IDS iSYS 25-hydroxy Vitamin D**

Metody jsou založeny na kompetitivní imunoanalýze využívající paramagnetických částic s chemiluminiscenční detekcí [32, 33].

Porovnání nejběžnějších automatizovaných imunochemických metod pro stanovení 25(OH) vitamínu D viz. Tab 3.

**Tab 3** Porovnání automatizované imunoanalýzy [16, 31, 32, 33].

Výrobce	Princip	Objem vzorku (μl)	Čas analýzy (min)	Přesnost (%)	Rozsah měření (nmol/l)	Standard	Protilátka
<b>ABBOTT</b>	CLIA	10	30	<10	20 – 400	interní standard s návazností na LC/MS/MS	ovčí polyklonální
<b>ROCHE</b>	ECLIA	15	27	<10	7,5 – 175	interní standard s návazností na LC/MS/MS	interakce VDBP s vit D
<b>SIEMENS</b>	CLIA	20	18	<11,1	10,5 – 375	interní standard s návazností na LC/MS/MS	myší monoklonální
<b>DIASORIN</b>	CLIA	25	35	<20	10 – 375	/	kozí polyklonální
<b>IDS</b>	CLIA	10	/	/	13,75 – 350	interní standard s návazností na LC/MS/MS	/

### Výhody automatizovaných imunochemických metod

- automatizovaný kontinuální proces
- validované metody výrobcem
- čas analýzy
- lze provést analýzu z primárních zkumavek pacienta
- jednoduché na obsluhu

### Nevýhody imunochemických metod

- nelze rozlišit jednotlivé metabolity, možnost falešně vyšších výsledků
- většinou uzavřený systém (nutnost použít reagentie výrobce)
- ne vždy standardizace na (SRM) 972
- velké rozdíly v hodnotách dosažených na různých systémech

## 5. Experimentální část

### 5.1. Metoda UHPLC-MS/MS

Analýza vzorků byla provedena za využití UHPLC-MS/MS metody, která byla vyvinuta a validována pracovníky Výzkumné laboratoře III. Interní kliniky gerontometabolické Fakultní nemocnice v Hradci Králové pro klinický monitoring 25(OH)D<sub>3</sub> a 25(OH)D<sub>2</sub>. Metoda je založena na použití mezinárodního standardu SRM 972, který řeší problém s používáním nestandardizovaných materiálů při vývoji metod pro monitoring 25(OH)D<sub>3</sub> a 25(OH)D<sub>2</sub> v lidském séru.

#### 5.1.1. Přístroje, pomůcky, chemikálie, standardy

##### Chemikálie

- LC/MS voda, acetonitril, methanol, Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
- LC/MS kyselina mravenčí, Merck KgGa (Darmstadt, Německo)
- Precipitační činidlo, Chromsystems (Mnichov, Německo)
- Kalibrátory – lyofilizované lidské sérum NIST (Gaithersburg, USA)
- Kontrolní materiály- lyofilizované lidské sérum NIST (Gaithersburg, USA)
- Standardy 25(OH)D<sub>2</sub> a 25(OH)D<sub>3</sub> Sigma Aldrich (Praha, Česká Republika)

##### Přístroje a pomůcky

- Laboratorní třepačka LT-1 Kavalier (Sázava, Česká republika)
- pH metr Sentron Argus, sonda ISFET Sentron, Sentron (AC Rodhen, Nizozemí)
- Mikrotitrační destička s filtrem Acro Prep TM96, 0,2µm/350µl, Pall Corporation (Ann Arbor, USA)
- Vakuová pumpa VAC-SPACE-50 Chromservis (Praha, Česká republika)
- Elektrický vibrační strojek LAB DANCER, IKA WERKE (Staufen, Německo)
- Chlazená centrifuga Eppendorf Centrifuge Model 5810 / Refrigerated Model 5810 R (Praha, Česká republika)
- rotor: Eppendorf Swing-bucket Rotor A-4-62 pro Centrifugu 5810 / 5810 R, (Praha, Česká republika)
- UHPLC systém Nexera, Shimadzu (Kyoto, Japonsko)

- DGU-20A3 trojkanálový on-line degaser
- dvě čerpadla LC-30AD
- Autosampler SIL/30 AC
- Rack changer III.
- CTO-20AC termostat kolon
- CBM-20A komunikační jednotka
- LCMS-8030 Triple quadrupole Mass Spectrometer detektor, Shimadzu (Kyoto, Japonsko)
- Generátor dusíku NM32LA Peak Scientific (Frankfurt, Německo)
- Vakuová pumpa E2M28 Edwards (Crawley, Anglie)
- Analytická kolona pro UHPLC Kinetex (1,7 $\mu$ m C18 100A, 100 mm x 3mm), Phenomenex (Aschaffenburg, Německo)
- Security guard ultra cartridge C18 Phenomenex (Aschaffenburg, Německo)
- Mikropipety Finnpipe F1, Thermo Scientific (Vantaa, Finsko)
- Software LabSolutions 5.41 SP1, Shimadzu (Kyoto, Japonsko)

### 5.1.2. Příprava zásobních a pracovních roztoků

Pracovní roztoky:

- Standardní zásobní roztoky 25(OH)D<sub>3</sub> a 25(OH)D<sub>2</sub> byly připraveny rozpuštěním v methanolu na koncentraci: c = 242,5 $\mu$ mol/l a c = 249,79 $\mu$ mol/l.
- Pracovní roztoky 25(OH)D<sub>3</sub> a 25(OH)D<sub>2</sub> byly zředěny methanolem na koncentraci 0,1-10 $\mu$ mol/l.
- Lyofilizované kontrolní materiály a kalibrátory byly rozpuštěny ve 2ml a 1ml vodě pro LC/MS.

### 5.1.3. Preanalytická fáze

Vlastní chromatografické analýze předchází deproteinace séra za účelem uvolnění analytů z vazby na transportní proteiny. Následuje LLE ze séra do methanolu s inkubací. Centrifugace a filtrace přes mikrotitrační destičku za vakua pro odstranění nečistot. Čas preanalytické fáze je přibližně 20minut.

## Pracovní postup

200 µl lidského séra odpipetovat do skleněné zkumavky, přidat 50µl precipitačního činidla od firmy Chromsystem a 400µl methanolu, uzavřít zkumavku gumovou zátkou. Směs protřepat na vortexu 20s, poté inkubovat v chladničce 10min při 4°C. Zkumavky centrifugovat 5min při 4°C a 3220xg. Po centrifugaci odebrat 200µl supernatantu. Napipetovat do filtrační mikrotitrační destičky, přefiltrovat za pomoci vakuové pumpy do nové destičky a vložit do analyzátoru.

### 5.1.4. Analytická fáze

#### Podmínky UHPLC

- mobilní fáze: ACN : LC/MS voda (72% : 28%) – úprava pH vody kyselinou mravenčí na pH = 2,58
- průtok mobilní fáze: 0,5ml/min za izokratických podmínek
- objem nástřiku: 20 µl
- analytická kolona: Kinetex C18 (1,7µm, 100 mm x 3 mm)
- předkolona: Security guard ultra cartridge C18
- kolonový termostat: 50 °C
- promývání a ekvilibrace kolony:
  - od 5,9 do 6,5 minuty změna průtoku z 0,5 na 0,8 ml/min a koncentrace ACN z 72% na 90%
  - od 7,5 do 8,0 minuty změna průtoku z 0,8 na 0,5 ml/min a koncentrace ACN z 90% na 72%
- doba analýzy: 9 minut

## Podmínky MS/MS

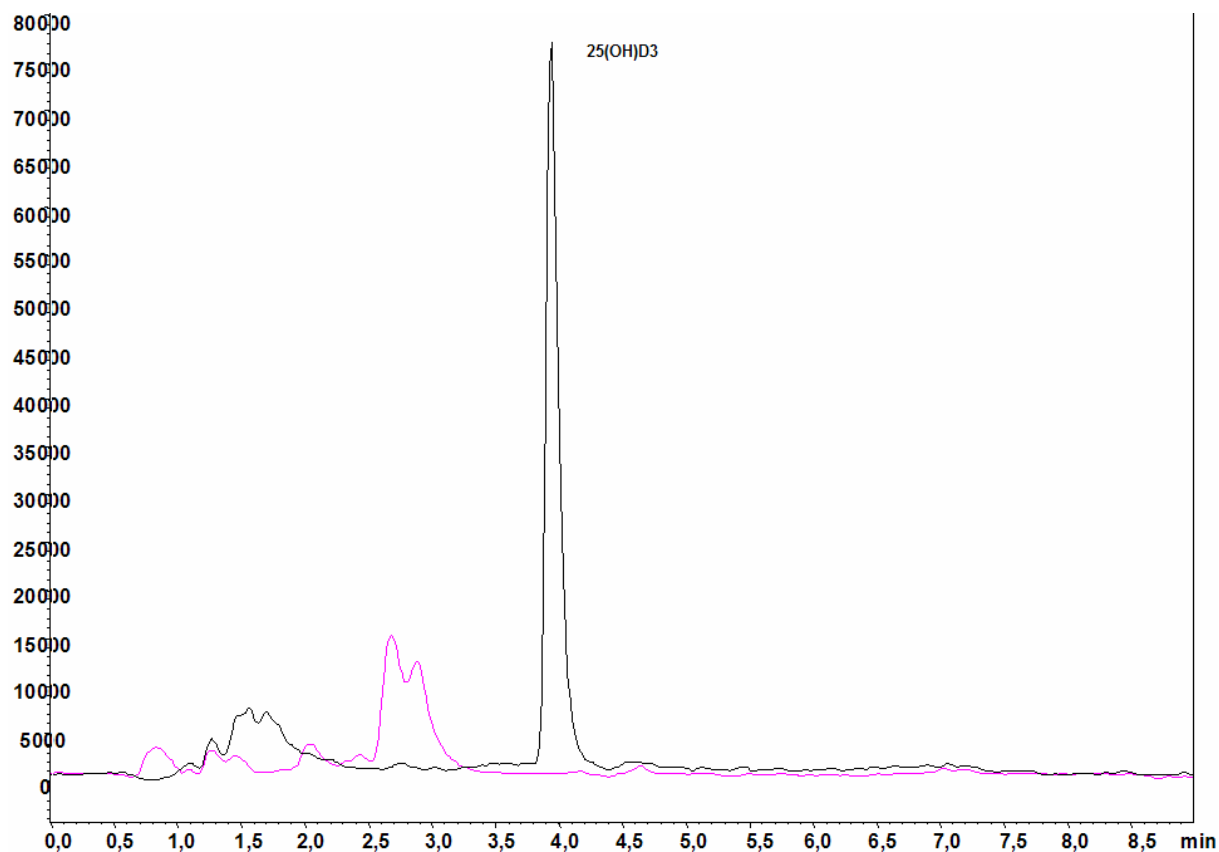
- ionizace elektrosprejem (ESI) v pozitivním módu
- MRM parametry viz Tab 4:

**Tab 4** Parametry MRM

	Prekurzor	Produkt	Q1 [V]	CE [V]	Q3 [V]
25(OH)D <sub>3</sub>	401,4	383,15	-16	-10	-30
25(OH)D <sub>2</sub>	413,2	83,1	-16	-25	-16

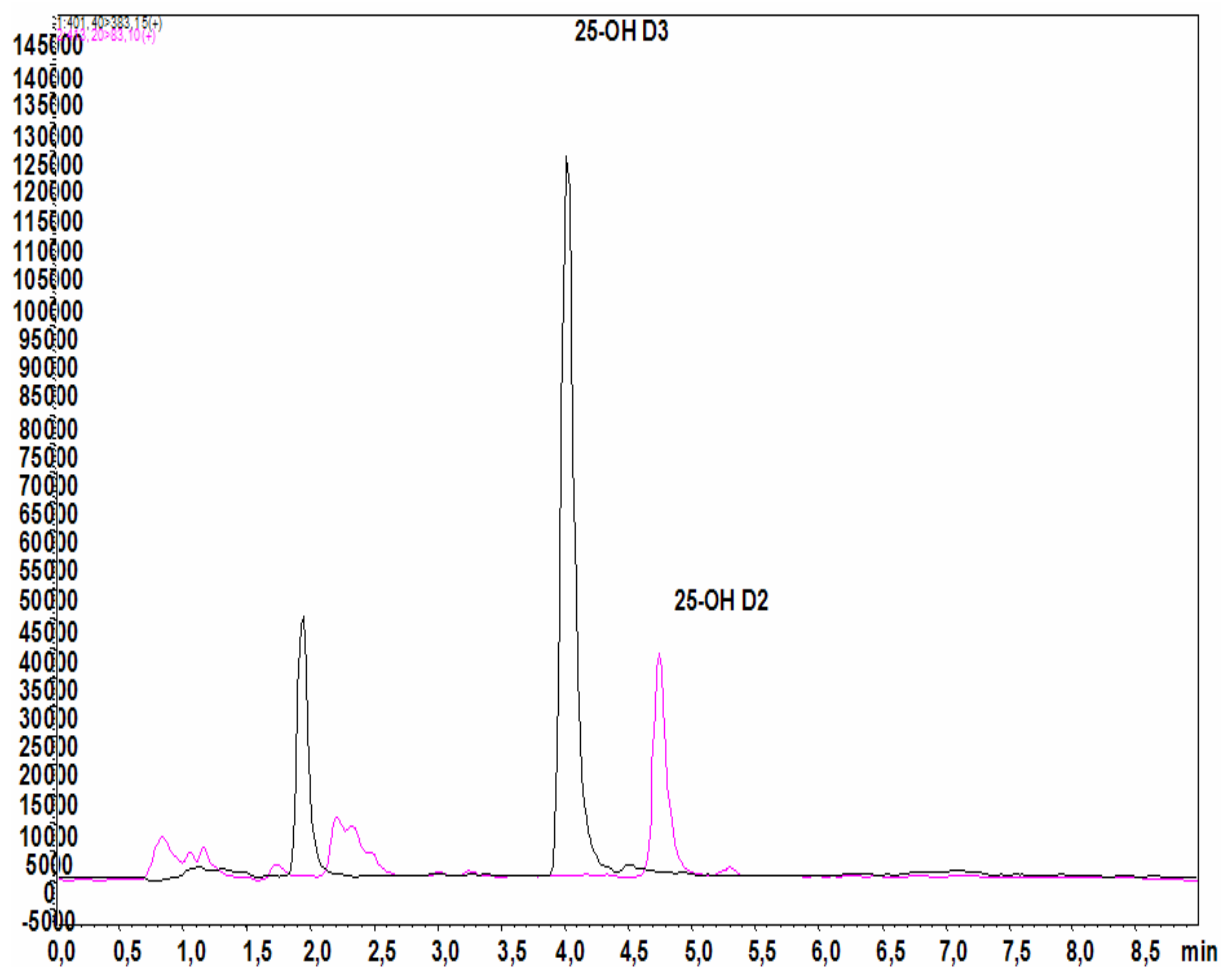
- průtok nebulizačního plynu: 3 l/min
- průtok sušícího plynu: 15 l/min
- teplota vyhřívaného bloku: 400 °C
- DL teplota: 250 °C
- sušící a nebulizační plyn: dusík
- kolizní plyn: argon

**Obr 10** Chromatogram 25(OH)D UHPLC-MS/MS



Chromatogram viz. Obr 10 zobrazuje měření séra pacienta s výslednou koncentrací 25(OH)D  $c = 55,13$  nmol/l . Z chromatogramu je patrné, že byl identifikován pouze analyt 25(OH)D<sub>3</sub> nikoliv 25(OH)D<sub>2</sub> . Proto je výsledná koncentrace 25(OH)D<sub>3</sub> rovna celkové koncentraci 25(OH)D. Stejný vzorek byl na systému Abbott Architect změřen s výsledkem  $c = 62,3$  nmol/l. Analyt 25(OH)D<sub>2</sub> u testovaného souboru pacientů byl detekován pouze ve dvou případech a to ve velmi nízkých koncentracích. Pro ukázkou je přiložen záznam z měření obou forem 25(OH)D viz. Obr 11. Jedná se o chromatogram lyofilizovaného kontrolního séra hladina II. S koncentracemi analytu 25(OH)D<sub>3</sub>  $c = 75,3 - 113$  nmol/l a 25(OH)D<sub>2</sub>  $c = 73,2-110$  nmo/l. Naměřené koncentrace 25(OH)D<sub>3</sub>  $c = 88,49$  nmol/l a 25(OH)D<sub>2</sub>  $c = 82,02$  nmo/l.

**Obr 11** Chromatogram kontrolní lyofilizované sérum firmy Chromsystems



## **5.2. Metoda ABBOTT ARCHITECT 25(OH) Vitamin D**

### **5.2.1. Přístroje, pomůcky, chemikálie, standardy**

#### **Přístroje:**

- ARCHITECT i2000, ABBOTT (Wiesbaden, Německo)
- Centrifuga Allegra X-12R, Beckman Coulter (USA)
- Rotor SX 4750A, 3 750 rpm/3 270 g Beckman Coulter (USA)

#### **Chemikálie, pomůcky:**

- ARCHITECT Reagenčí kit: 1 lahvička mikročástice, konjugát, ředící roztok, předběžně ošetřující roztok 1, 2, ABBOTT (Wiesbaden, Německo)
- Další chemikálie: promývací pufr, spouštěcí roztok, před spouštěcí roztok, ABBOTT (Sligo, Irsko)
- Reakční kyvety, ABBOTT (Wiesbaden, Německo)
- Septum, ABBOTT (Wiesbaden, Německo)
- Zkumavky BD Vacutainer, BD Vacutainer (Franklin Lakes, USA)

#### **Kalibrátor:**

- ARCHITECT 25(OH) Vitamin D Calibrators, ABBOTT (Wiesbaden, Německo)

Šest lahviček s šesti různými koncentracemi specifickými pro šarži kalibrátoru.

#### **Kontrolní materiály:**

- ARCHITECT 25(OH) Vitamin D Controls ABBOTT (Wiesbaden, Německo)

Tři lahvičky kontrol s nízkou, střední a vysokou koncentrací. Koncentrace je specifická pro danou šarži.



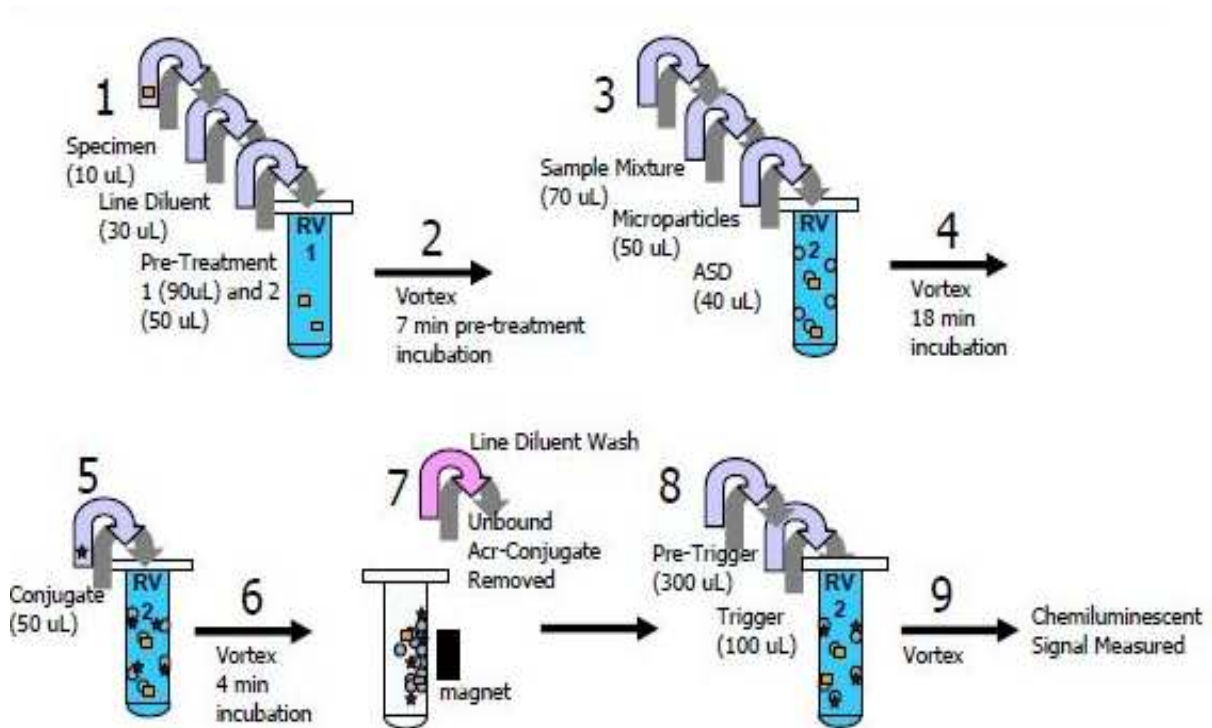
### **5.2.2. Preanalytická fáze:**

Preanalytická fáze probíhá dle interních předpisů laboratoře. Krev k vyšetření je odebrána vakuovým systémem do zkumavky se separačním gelem bez antikoagulačního činidla. Jedná se o svozovou laboratoř, proto je krev následně dopravena při teplotě 15-25°C do laboratoře, kde je provedena centrifugace a tím oddělení krevních buněk od séra pomocí gelu. Pracovnice příjmu následně doručí materiál ke zpracování laborantce. Laborantka je zodpovědná za přípravu přístroje k provozu, provede potřebné kalibrace dle pokynů přístroje a změří kontrolní materiály dle instrukcí na pracovišti (střídají se 3 hladiny kontrol dle rozpisu). Kalibrace pro 25(OH)D se provede 1x za 14 dní na 6 hladinách kalibrátoru od výrobce. Pokud laborantka úspěšně kalibrovala změří všechny 3 hladiny kontrolních materiálů, pokud vyjdou dle předem definovaných mezí, zpracuje vzorek.

### **5.2.3. Analytická fáze:**

Zbavit zkumavku víčka vložit do stojánku, vložit stojánek do k tomu určených pozic přístroje. Přístroj je vybaven podavačem stojánků, který automaticky dle zadání, které si stroj přečte na zkumavce označené čárovým kódem, dopraví materiál k pipetorům. Pipetor následně nepipetuje ze zkumavky potřebný objem vzorku do reakční nádoby a zahájí tak automatizovaný proces analýzy viz: Obr 12.

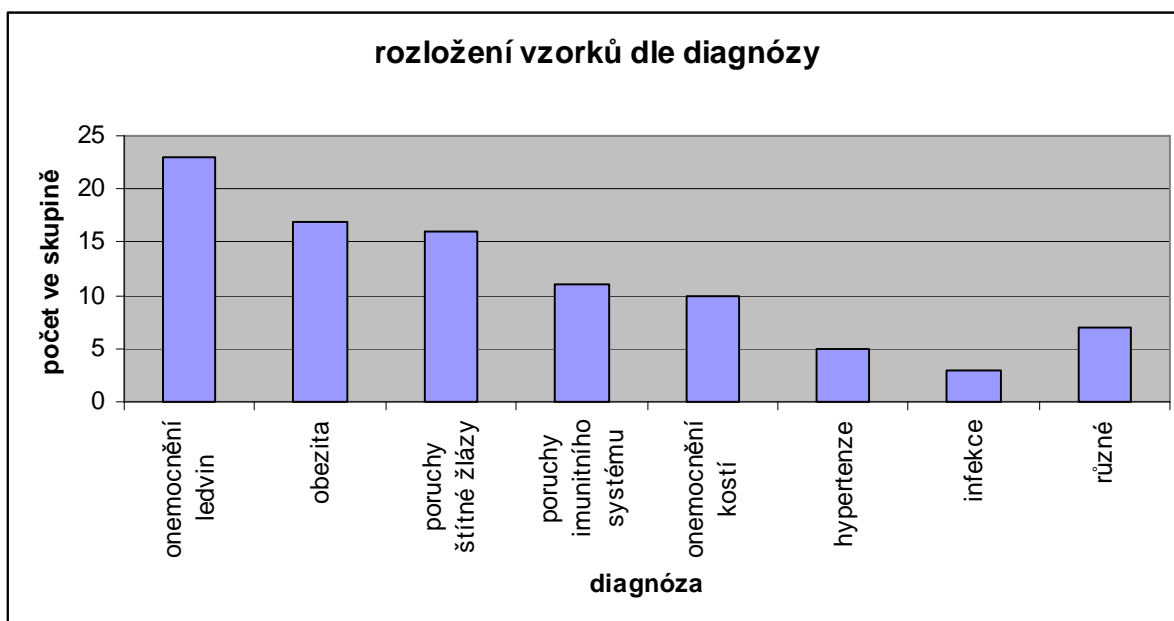
**Obr 12** Proces analýzy stanovení 25(OH) Vitamin D ABBOTT ARCHITECT



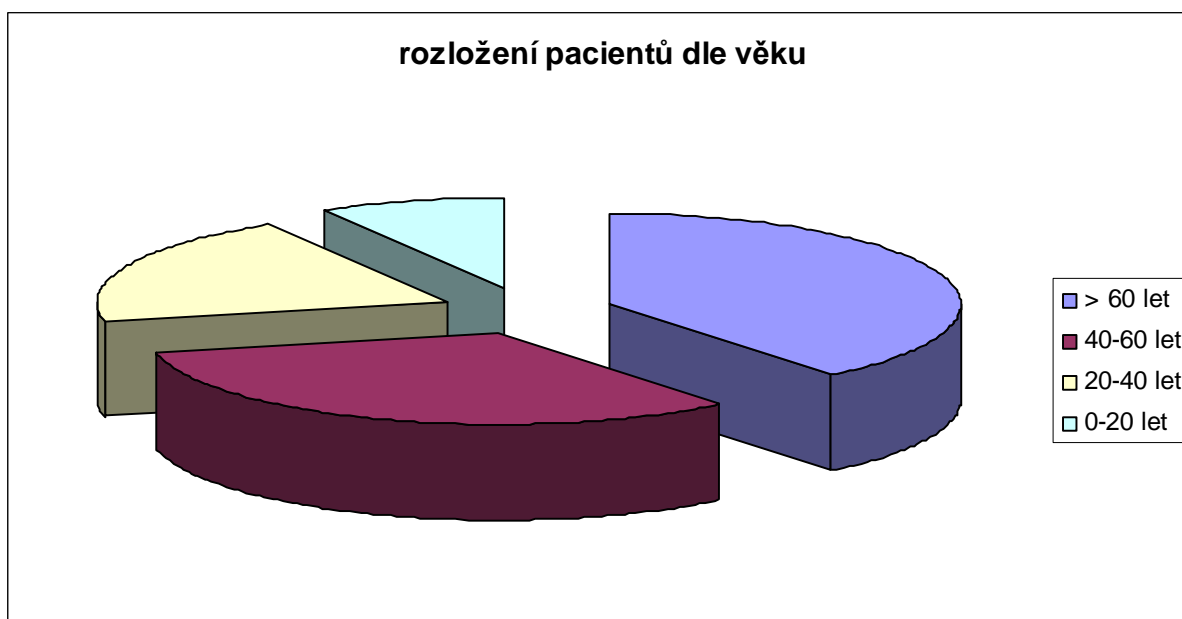
### 5.3. Porovnání metod

Metody byly porovnány v souboru s 92 vzorky lidského séra. Tyto vzorky byly vybrány tak, aby stanovené hladiny vitaminů pokryly celý rozsah možných sérových koncentrací. Sérum bylo získáno od pacientů všech věkových kategorií a různých diagnóz (Obr 13, Obr 14).

**Obr 13** Rozložení vzorků dle diagnózy



**Obr 14** Rozložení vzorků dle věku pacientů

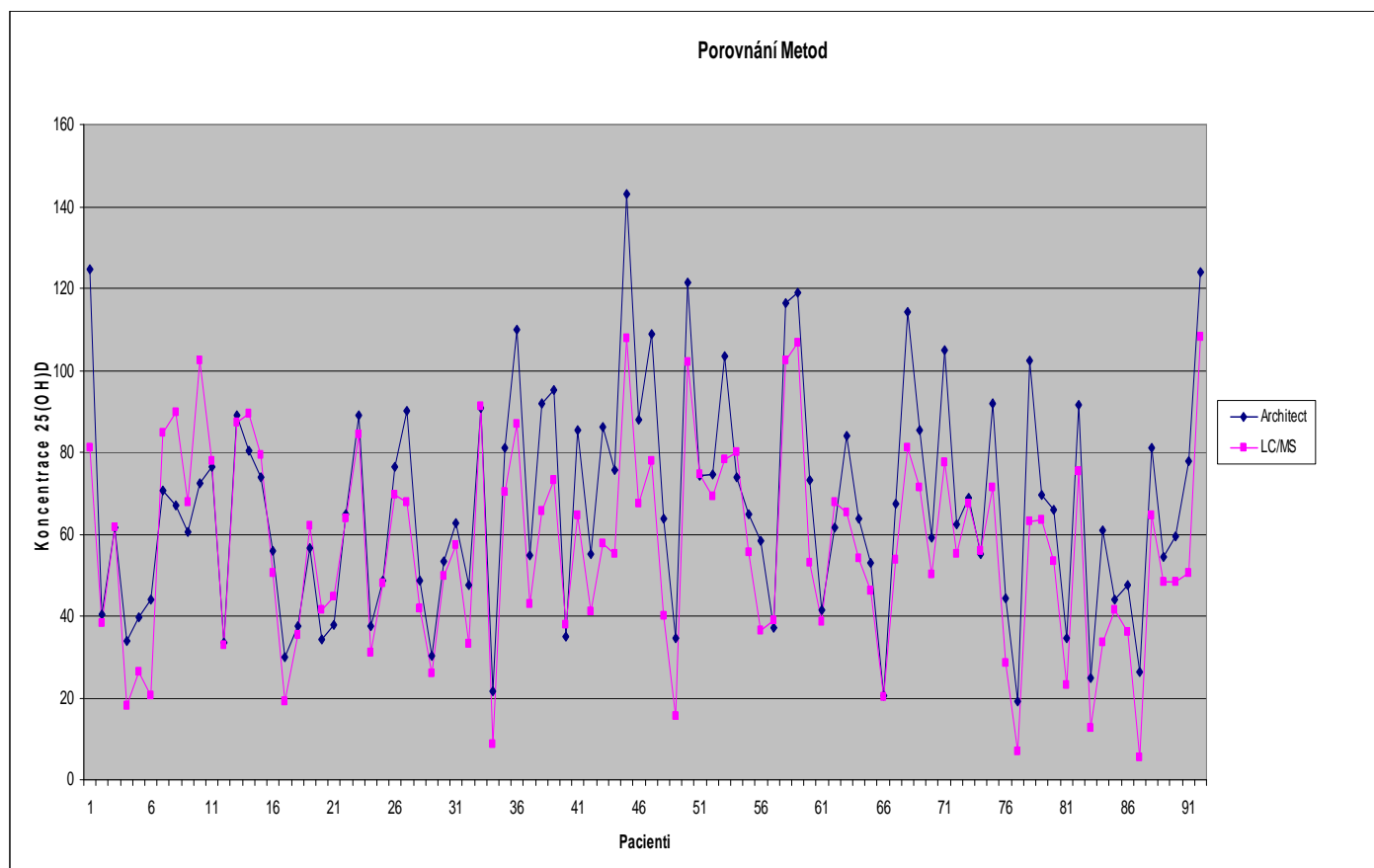


Všechna séra byla nejprve změřena v laboratoři Omnilab s.r.o. na přístroji Abbott Architect i2000 z primárních zkumavek BD Vacutainer se separačním gelem. Následně z důvodů nutného převozu vzorku z Prahy do Hradce Králové bylo odebráno z každé primární zkumavky přibližně 500 $\mu$ l séra do zkumavky Eppendorff, která byla řádně označena a uskladněna při teplotě -20 $^{\circ}$ C. Pro účely změření vzorků na UHPLC-MS/MS byly vzorky transportovány v polystyrénovém boxu s chladícími kazetami a dopraveny na místo měření ve zmraženém stavu. Pokusné vzorky byly

měřeny ve dvou sériích. V první sérii bylo změřeno 30 vzorků, v druhé sérii 62 vzorků. V první sérii byly vzorky mražené maximálně 2 měsíce v druhé byl čas zamražení až 4 měsíce. 25(OH)D je všeobecně považován za analyt stabilní i při opakovaném rozmražení a zamražení, což dokládají publikované práce (37, 47, 48).

Na obrázku (Obr 15) je grafické znázornění výsledků dosažených oběma použitými metodami. Je zde patrný stálý trend nižších hodnot u metody UHPLC-MS/MS v porovnání se stanovením metodou Abbott Architect, což odpovídá našim předpokladům, literárním údajům (43, 44, 45) i možností stanovení imunochemických metod.

**Obr 15** Porovnání výsledků metod UHPLC-MS/MS a Abbott Architect



### 5.3.1. Statistické vyhodnocení

Porovnání metod Abbott Architect a UHPLC-MS/MS bylo provedeno pomocí statistického programu NCSS 2007 (Number Cruncher Statistical Software, Kaysville, Utah, USA). Na základě deskriptivní statistiky byly popsány vlastnosti souborů výsledků získaných oběma použitými metodami jako jsou průměr, medián, nejnižší a nejvyšší naměřené hodnoty koncentrací, směrodatná odchylka výběru a další. Vybrané hodnoty jsou uvedeny v Tab 5. Dále byla vyhodnocena párovými T testy rozdílnost či shoda mezi oběma soubory dat testováním na základě rozdílnosti průměrů a mediánů. Hladina statistické významnosti byla zvolena jako  $p = 0,05$ . Pomocí regresní analýzy nakonec byla také posouzena případná vzájemná korelace obou získaných datových souborů. Míra korelace byla vyjádřena Pearsonovým a Spearmanovým korelačním koeficientem.

**Tab 5** Základní statistické vlastnosti výsledkových souborů

Metoda	ARCHITECT	UHPLC-MS/MS
Počet vzorků	92	92
Aritmetický průměr (nmol/l)	67,04	56,74
Medián (nmol/l)	64,30	55,59
Standardní odchylka (SD) (nmol/l)	27,20	24,60
Rozptyl (nmol/l)	740	605
Nejnižší hodnota (nmol/l)	19,10	5,56
Nejvyšší hodnota (nmol/l)	142,90	107,99

#### 5.3.1.1. Regresní analýza

Skupina vzorků je analyzována oběma metodami, kdy výsledky každé z nich jsou vyneseny na jednu osu. V ideálním případě jsou výsledky shodné  $y=x$ , leží na přímce. V našem případě výsledky shodné nejsou, lze je popsat rovnicí regresní přímky kdy:  $y = ax + b$

a.....je směrnice přímky vyjadřuje proporcionální složku systematické chyby

b.....značí úsek, který přímka vytíná na ose y, je mírou konstantní složky systematické chyby

Výsledky x získané jednou metodou lze přepočítat na výsledky y pouze v případě, že se korelační koeficient rovnice (r) blíží 1,0 tzn. body leží na přímce.

Korelační koeficient ( $r$ ) je míra rozptylu bodů kolem přímky a hodnotí míru vztahu (asociace) hodnocených dat k sobě navzájem, nabývá hodnot  $-1$  až  $1$  [38].

Pro porovnávané soubory dat byly spočteny tyto korelační koeficienty:

**Pearsonův korelační koeficient ..... $r = 0,8832$**

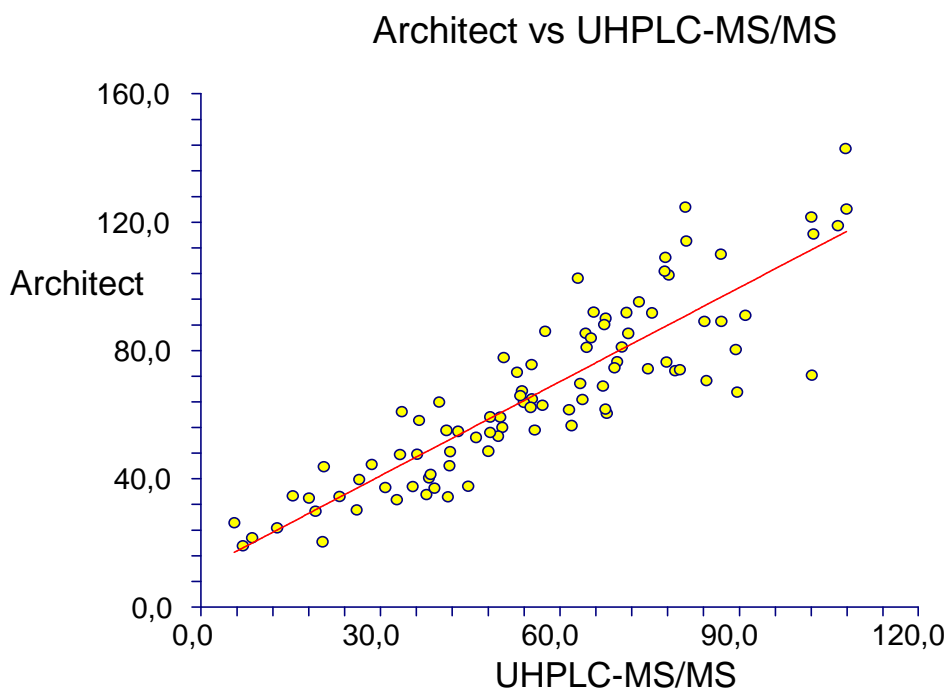
Popisuje míru síly vztahu:  $r$  do  $0,20$  vztah hodnot je zanedbatelný,  $0,20-0,40$  nepřilíš těsný vztah,  $0,40-0,70$  hodnoceno jako středně těsný vztah,  $0,70-0,90$  je velmi těsný vztah,  $r$  více než  $0,90$  je „extrémně“ těsný vztah a také jaký má směr (kladný nebo záporný).

**Spearmanův korelační koeficient ..... $r_s = 0,8956$**

Popisuje lineární ale i rostoucí a klesající vztahy mezi hodnotami, koreluje pořadí proměnných.

Míru korelace zachycuje také graf regresní analýzy dat zkoumaných metod viz: Obr 16.

**Obr 16** Graf regresní analýzy stanovení 25(OH)D Abbott Architect a UHPLC-MS/MS



### 5.3.1.2. Analýza dat - Wilcoxon a T-test

Analýza dat je statistická funkce sloužící k testování rozdílnosti nebo shodnosti středních hodnot dvou výběrů pro zvolenou hladinu významnosti  $p$ . Představuje pravděpodobnost nulové hypotézy o shodě rozptylů obou souborů (pravděpodobnost chyby  $\alpha$ ).

**Pro zvolenou hladinu významnosti  $p = 0,05$  následně platí:**

$p > 0,05$  znamená, že rozdíl mezi rozptyly je statisticky nevýznamný

$p < 0,05$  znamená, že rozdíl mezi rozptyly je statisticky významný

Pro testování rozdílnosti souborů dat získaných použitými metodami Architect a UHPLC-MS/MS byl použit parametrický párový T-test a neparametrický Wilcoxon test s hladinou významnosti  $p=0,05$ . Na základě výsledků uvedených testů bylo prokázáno, že získané soubory dat se statisticky významně liší,  $p = 0,0000$  (Tab 6).

**Tab 6** T-testy

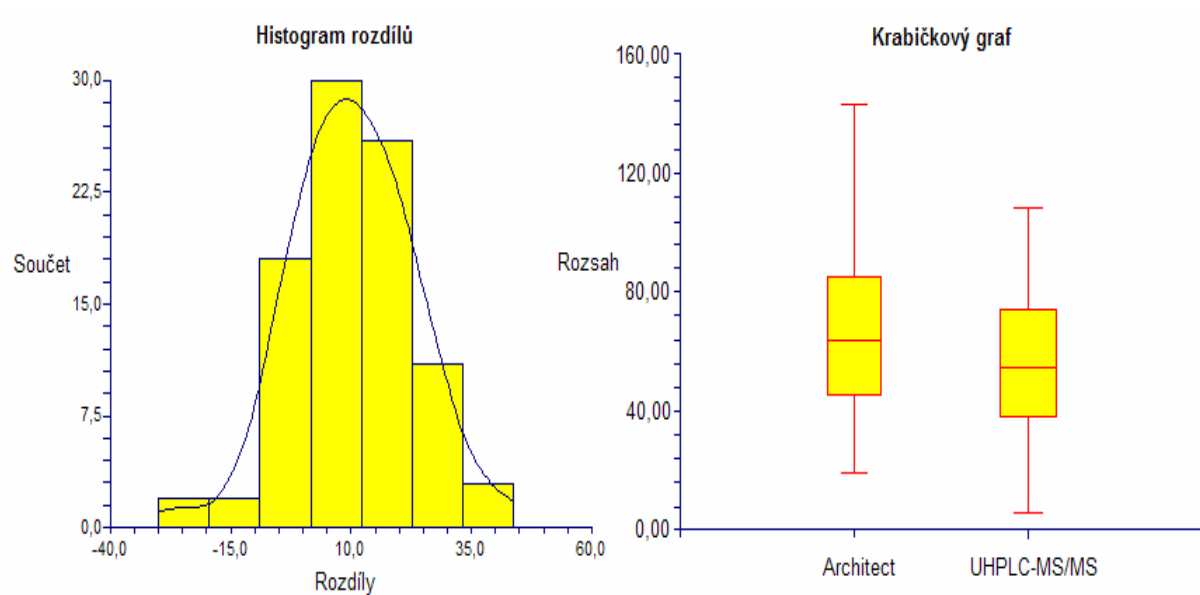
Statistická funkce	Hodnota p
T- test	0,0000
Wilcoxon test	0,0000

Tato rozdílnost souborů dat získaných použitými metodami je znázorněna také pomocí krabičkového grafu viz: Obr 17, kde střední čáry v krabicích symbolizují mediány a horní a dolní okraje krabic symbolizují dolní a horní kvartily.

**Dolní kvartil** - výsledky seřazené vzestupně, kde první čtvrtina výsledku je menší nebo rovna dolnímu kvartilu

**Horní kvartil** - výsledky seřazené vzestupně, kde poslední čtvrtina výsledku je menší nebo rovna hornímu kvartilu [41]

**Obr 17** Histogram a krabičkový diagram zobrazující rozdíly mezi metodami Abbott Architect a UHPLC-MS/MS



Ze statistického zpracování a porovnání získaných dat obou souborů měření – imunologická metoda Architect Abbott a UHPLC-MS/MS vyplývá, že výsledky získané těmito dvěma různými technikami se sice statisticky významně liší, ale obě metody vykazují velice těsnou lineární korelaci (Spearmanův korelační koeficient  $r_s = 0,8956$ , Pearsonův korelační koeficient  $r_p = 0,8832$ ). Toto zjištění je v souladu s výsledky získanými v různých dalších studiích (4, 42, 44). Naměřené vyšší hodnoty koncentrací u systému Architect Abbott odpovídají rovněž možnostem imunologických stanovení, které dosahují falešně vyšších výsledků z důvodu zkřížené reaktivity 25(OH)D metabolitů a nerozlišení jednotlivých forem.



## 6. Závěr

V rigorózní práci byly porovnány dvě principiálně velmi odlišné analytické metody pro stanovení celkové koncentrace 25(OH)D v lidském séru a to: UHPLC-MS/MS metoda vyvinutá a validovaná Výzkumnou laboratoří III. Interní gerontometabolické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové a imunochemický princip CMIA firmy Abbott Architect. Oba analytické systémy byly porovnány v rámci skupiny 92 vzorků lidského séra. Testovaná skupina pokrývala celý klinicky významný rozsah koncentrací 25(OH)D.

Statistickým vyhodnocením výsledků jsme dospěli k závěru, že obě metody poskytují s pravděpodobností 100% rozdílné hodnoty koncentrace 25(OH)D. Avšak tyto rozdílné výsledky mezi sebou dobře korelují, mají vysokou míru asociace a lze je tak vzájemně přepočítávat pomocí rovnice regresní přímky.

Dosažené závěry také velmi dobře korespondují s údaji, uvedenými výrobcem metody CMIA Abbott, který ve svém příbalovém letáku [4], udává hodnotu korelačního koeficientu s LC-MS/MS 0,90 v testované skupině 107 vzorků. V praxi lze výsledky dosažené oběma způsoby stanovení považovat za shodné a vhodné pro klinické hodnocení hladiny vitamínu D v případě, že bude zvoleno rozdílné referenční rozmezí pro hodnocení těchto výsledků a hladina vitamínu D u konkrétního pacienta bude monitorována stále na stejném analytickém systému.

## 7. Použitá literatura

- [1] Čepová J. et al., Vit D3 v praxi, Ústav klinické biochemie a patobiochemie UK 2.LF a FN Motol, Pracovní dny uživatelů analytických systému Roche 2010
- [2] Gören A.C. et al., Rapid and simultaneous determination of 25-OH-vitamin D2 and D3 in human serum by LC/MS/MS: Validation and uncertainty assessment, A C G publication J. Chem. Metrl. 1:1 (2007), 1-9
- [3][http://www.nature.com/nrc/journal/v7/n9/fig\\_tab/nrc2196\\_F1.html](http://www.nature.com/nrc/journal/v7/n9/fig_tab/nrc2196_F1.html) (navštíveno dne 3.10.2012)
- [4] Příbalový leták firmy Abbott Laboratories k metodě Architect 25-OH Vitamin D, [http://international.abbottdiagnostics.com/Support/Technical\\_Library/login.cfm?lang=CZE](http://international.abbottdiagnostics.com/Support/Technical_Library/login.cfm?lang=CZE) (navštíveno dne 21.1.2013)
- [5]<http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---V/Vitamin-D3---Cholecalciferol.htm> (navštíveno dne 21.1.2013)
- [6]<http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---V/Vitamin-D2.-0iP.htm> (navštíveno dne 21.1.2013)
- [7] Čepová J., Vitamin D, jeho význam a suplementace vitaminem D u pacientů s osteoporózou, Ústav klinické biochemie a patobiochemie 2.LF UK a FN Motol, Praha (2008)
- [8] El-Khoury J.M. et al., Progress if liquid chromatography-mass spektrometry in measurment of vitamin D metabolites and analogues, Clinical Biochemistry 44 (2011), 66-76
- [9] <http://mefanet-motol.cuni.cz/download.php?fid=884> (navštíveno dne 21.1.2013)
- [10] Fuchsová R., Vitamín D - Jaká hladina je a bude "normální". CEVA [online] 4. září 2012 , poslední aktualizace 4. září 2012 [cit. 4.9.2012]. Dostupný z <http://www.ceva-edu.cz/mod/data/view.php?d=13&rid=164>
- ISSN 1803-8999.
- [11] Budoucnost aktivace receptoru pro vitamin D překračuje rámeček nefrologie, Medical Tribune, Ročník VII, číslo 18, 15.8.2011
- [12] Bianchi S. et al, Preanalytical, analytical (DiaSorin LIAION) and clinical variables potentially affecting the 25-OH Vitamin D estimation, Clin Biochem (2012). <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.08.003>

- [13] Holick M.F., VITAMIN D STATUS: MEASUREMENT, INTERPRETATION AND CLINICAL APPLICATION, NIH Public Access Author manuscript , Ann Epidemiol., available in PMC 2010 February 1.
- [14] Drahošová M. et al., Vyšetřovací metody v klinické mikrobiologii a klinické imunologii, Imunochemické vyšetřovací metody, Radioizotopové metody, Kompetitivní RIA v pevné fázi, vydala Střední zdravotnické škola a Vyšší zdravotnická škola Hradec Králové (2004), stran: 68, str: 58 <http://www.zshk.cz>
- [15] Bartoš V. et al., Srovnání dvou metod na stanovení vitamínu D: RIA metody (DiaSorin) a inovované metody Elecsys Vitamin D total (Roche), Labor Actuell, 04/11 <http://www.roche-diagnostics.cz/download/la/0411/VitaminD.pdf> (navštíveno dne 10.9.2012)
- [16] Čepová J. et al., Slunce, ryby a vitamin D, Labor Aktuell 03/11, Ústav klinické biochemie a patobiochemie, 2. LF UK Praha a FN Motol <http://www.roche-diagnostics.cz/download/la/0311/VitaminD.pdf> (navštíveno dne 15.8.2012)
- [17] Produkt support IDS, OCTEIA 25-Hydroxy Vitamin D, katalogové číslo AC-57PS, vydáno 10.11.2004, [http://www.radmed.com.tr/usr\\_img/nonizotopik/octeia/ac57ps\\_25vitd\\_elisa.pdf](http://www.radmed.com.tr/usr_img/nonizotopik/octeia/ac57ps_25vitd_elisa.pdf) (navštíveno dne 16.12.2012)
- [18] EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, EUROIMMUN 25-OH vitamin D ELISA: Reliable and efficient, 01/2011, [http://www.euroimmun.com/fileadmin/template/images/pdf/Vitamin\\_D\\_EN.pdf](http://www.euroimmun.com/fileadmin/template/images/pdf/Vitamin_D_EN.pdf) (navštíveno dne 13.2.2013)
- [19] <http://www.kitmondo.com/equipment-images/470893/diasorin-liaison.jpg> (navštíveno dne 20.2.2013)
- [20] [http://img.medicaexpo.com/images\\_me/photo-g/automatic-biochemistry-analyzer-with-immunology-analyzer-71024-130045.jpg](http://img.medicaexpo.com/images_me/photo-g/automatic-biochemistry-analyzer-with-immunology-analyzer-71024-130045.jpg) ( navštíveno dne 20.2.2013)
- [21] <http://labmed.ucsf.edu/labmanual/db/resource/proc-25OHvitDTtotal.pdf> (navštíveno dne 20.2.2013)
- [22] [http://www.diasorin.com/sites/default/files/allegati\\_prodotti/Vitamin%20D%20Spin%204209.pdf](http://www.diasorin.com/sites/default/files/allegati_prodotti/Vitamin%20D%20Spin%204209.pdf) ( navštíveno dne 13.2.2013)
- [23] <http://www.roche-diagnostics.cn/products/PublishingImages/cobas%204000.jpg> (navštíveno dne 20.2.2013)
- [24] <http://www.euroimmun.de/index.php?id=1042&L=1> (navštíveno dne 27.2.2013)

- [25] Performance of PerkinElmer LC-MSMS Vitamin D Assay against Diasorin LIAISON® 25OH Vitamin D TOTAL essay, Technical note, [http://our.bmskorea.co.kr/Intranet\\_Notice/Notice/data/PE%20LC-MSMS%20Vitamin%20D%20kit%203075-0010%20vs%20Diasorin%20LIAISON.pdf](http://our.bmskorea.co.kr/Intranet_Notice/Notice/data/PE%20LC-MSMS%20Vitamin%20D%20kit%203075-0010%20vs%20Diasorin%20LIAISON.pdf) (navštíveno dne 20.2.2013)
- [26] <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10064408> (navštíveno dne 27.2.2013)
- [27] Wallace AM, et al. Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: Current procedures, performance characteristics and limitations. Steroids (2010), doi:10.1016/j.steroids.2010.02.012
- [28] <http://www.immunodiagnostik.com/Immundiagnostik/index.htm> (navštíveno dne 12.3.2013)
- [29] [http://www.nist.gov/customcf/get\\_pdf.cfm?pub\\_id=903827](http://www.nist.gov/customcf/get_pdf.cfm?pub_id=903827) (navštíveno 12.3.2013)
- [30] [http://www.rochediagnostics.cz/download/la/0212/VitaminD\\_primCepova.pdf](http://www.rochediagnostics.cz/download/la/0212/VitaminD_primCepova.pdf)  
Čepova J., Vitamin D ve zdraví a nemoci, 13. Bergmeyerova konference, Labor Aktuell 02/12, (navštíveno dne 12.3.2013)
- [31] <http://www.roche-diagnostics.cz/objednavky/info/05894913p.pdf> příbalový leták (navštíveno dne 10.4.2013)
- [32] <http://healthcare.siemens.com/clinical-specialities/bone-metabolism/advia-centaur-vitamin-d-total-assay> (navštíveno dne 10.4.2013)
- [33] <http://www.idsplc.com/en-gb/products/ids-isys-25-hydroxy-vitamin-d-is-2700> (navštíveno dne 10.4.2013)
- [34] <http://www.idsplc.com/en-gb/products/25-hydroxy-vitamin-d-ria-aa-35f1> (navštíveno dne 10.4.2013)
- [35] [www.sekk.cz](http://www.sekk.cz) (navštíveno dne 10.4.2013)
- [36] <https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/972.pdf> (navštíveno dne 17.4.2013)
- [37] <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2011/2011-3/KBM-2011-3-Friedecky-vitD.pdf> (navštíveno dne 17.4.2013)
- [38] Racek J. et al., Klinická Biochemie druhé přepracované vydání, nakladatelství Galén, Praha 5, str:37-38, 2006
- [39] [http://www.chem.agilent.com/Library/posters/Public/MSACL\\_2013\\_Post43\\_Epi-vitD.pdf](http://www.chem.agilent.com/Library/posters/Public/MSACL_2013_Post43_Epi-vitD.pdf) (navštíveno dne 17.4.2013)
- [40] Ravinder J.S et al., C-3 Epimers Can Account for a Significant Proportion of Total Circulating 25-Hydroxyvitamin D in Infant, Complicating Accurate Measurement

and Interpretation of Vitamin D Status, Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, Zář 2006, číslo (8) 3055-3061

[41] [http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/publik/Kap\\_4\\_Desatero.pdf](http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/publik/Kap_4_Desatero.pdf) (navštíveno dne 10.5.2013)

[42] Turpeinen U. et al., Determination of 25-Hydroxyvitamin D in Serum by HPLC and Immunoassay, Helsinki University Central Hospital, Finland, Clinical Chemistry 49, číslo 9, 2003

[43] [http://www.medical.siemens.com/siemens/en GLOBAL/gg\\_diag\\_FBAs/files/products\\_disease\\_states/bone\\_metabolism/VitaminD\\_Advertorial\\_S4\\_FINAL.pdf](http://www.medical.siemens.com/siemens/en GLOBAL/gg_diag_FBAs/files/products_disease_states/bone_metabolism/VitaminD_Advertorial_S4_FINAL.pdf)

(navštíveno dne 17.4.2013)

[44] Farrell Ch-J L. et al., State-of-the-Art Vitamin D Assays: A Comparison of Automated Immunoassays with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Methods, Endocrinology and Metabolism, Clinical Chemistry 58:3, 2012

[45] Wallace A.M. et al., Measurement of 25-hydroxyvitamin D in clinical laboratory: Current procedures, performance characteristics and limitation, Elsevier Inc. Steroids 75 (2010) 477-488

[46] <http://chromsystems.com/en/produkte/vitamin-d3-d2-crosslinks/masschrom-r-25-oh-vitamin-d3-d2/reagenzienkits/masschrom-r-25-oh-vitamin-d3-d2-reagenzienkit-fuer-die-lc-ms-ms-analytik> (navštíveno dne 17.4.2013)

[47] Wielders J.P.M. et al., Preanalytical Stability of 25(OH)-Vitamin D3 in Human Blood or Serum at Room Temperature: Solid as a Rock, Clinical Chemistry 55:8 (2009)

[48] Lissner D. et al., Stability of vitamin D metabolites in human blood serum and plasma. Clinical Chemistry 1981, 27:773-4

[49] [http://www.immundiagnostik.com/fileadmin/pdf/Vitamin%20D3D2\\_%20LC%20MS\\_RUO\\_KM5000.pdf](http://www.immundiagnostik.com/fileadmin/pdf/Vitamin%20D3D2_%20LC%20MS_RUO_KM5000.pdf) (navštíveno dne 25.5.2013)

[50] [https://us.vwr.com/stibo/hi\\_res/7651336.pdf](https://us.vwr.com/stibo/hi_res/7651336.pdf) (navštíveno dne 25.5.2013)

## 8. Přílohy

Tab 7 Koncentrace 25(OH)D v 1. a 2. sérii měření Abbott Architect a UHPLC-MS/MS

Červeně 1.série měření, Černě 2. série měření

Číslo vzorku	Architect (nmol/l)	LC-MS/MS (nmol/l)
1	124,7	81,03
2	40,3	38,14
3	61,5	61,58
4	34	18,05
5	39,8	26,45
6	43,8	20,54
7	70,6	84,55
8	67	89,71
9	60,4	67,87
10	72,3	102,2
11	76,4	77,87
12	33,5	32,75
13	89,1	87,03
14	80,3	89,47
15	73,7	79,31
16	56	50,4
17	29,9	19,13
18	37,6	35,42
19	56,6	61,99
20	34,4	41,3
21	37,7	44,68
22	64,7	63,83
23	89,1	84,23
24	37,3	30,82
25	48,6	48,05
26	76,5	69,63
27	90	67,7
28	48,5	41,68
29	30,3	26,04
30	53,3	49,72
31	62,88	57,13
32	47,55	33,29
33	90,9	91,06
34	21,6	8,54
35	81,1	70,39
36	110	86,97
37	54,8	43
38	91,96	65,68
39	95,16	73,27
40	35,1	37,71

41	85,4	64,34
42	55,1	41,07
43	86	57,57
44	75,6	55,31
45	142,9	107,83
46	88,1	67,46
47	109	77,7
48	63,9	39,83
49	34,7	15,35
50	121,6	102,12
51	74,3	74,77
52	74,6	69,18
53	103,5	78,24
54	74	80,11
55	64,9	55,36
56	58,2	36,48
57	37,1	39,05
58	116,3	102,47
59	118,9	106,54
60	73,2	52,86
61	41,4	38,41
62	61,7	67,66
63	83,9	65,25
64	63,8	54,01
65	52,9	46,02
66	20,4	20,31
67	67,4	53,69
68	114,1	81,18
69	85,3	71,48
70	59,2	50,04
71	104,7	77,56
72	62,3	55,13
73	68,9	67,24
74	55,2	55,82
75	91,8	71,19
76	44,48	28,56
77	19,1	6,99
78	102,5	63,04
79	69,7	63,42
80	65,9	53,43
81	34,48	23,18
82	91,7	75,45
83	24,7	12,71
84	60,9	33,58
85	44,1	41,56
86	47,7	36,15
87	26,3	5,56
88	81	64,5

<b>89</b>	<b>54,4</b>	<b>48,37</b>
<b>90</b>	<b>59,3</b>	<b>48,36</b>
<b>91</b>	<b>77,8</b>	<b>50,63</b>
<b>92</b>	<b>124,1</b>	<b>107,99</b>