

Stanovení vitamínů



Vitaminy

- Dostupné ve stravě a náš organismus většinou ztratil schopnost je syntetizovat
- Hlavní funkce
 - Prekurzory biokatalyzátorů – koenzymy, hormony
 - Antioxidační fce
 - Metabolismus živin

Rozdělení

- **Vitaminy rozpustné ve vodě**
 - Vit. C
 - Vitaminy B – thiamin (B_1), riboflavin (B_2), pyridoxin (B_6), cyanokobalamin (B_{12}), kyselina listová (B_9), kyselina nikotinová (B_3), kyselina pantothenová (B_5), biotin (B_7)
- **Vitaminy rozpustné v tucích**
 - A, D, E, K

Vstřebávání vitamínů

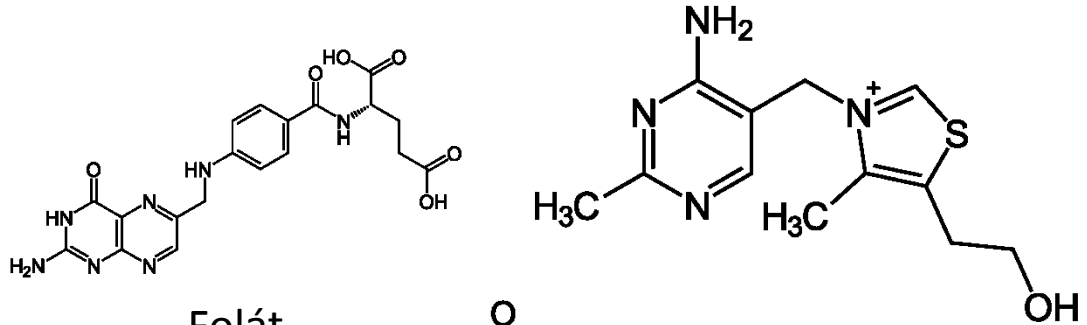
- Rozpustné ve vodě
 - Rychle, duodenum
 - S výjimkou B₁₂
 - Žaludek – HCl, trávicí enzymy => uvolnění B₁₂ -> vazba na haptokorin=B₁₂ -> pankreatické enzymy štěpí -> vazba B₁₂ na vnitřní faktor („intrinsic factor“)
 - Absorpce – ileum, skrze transportér endocytózou do enterocytů
- Rozpustné v tucích
 - Pomaleji, s tuky
 - A, D, K₂ – resorpce bez závislosti na micelách
 - E, K₁ a K₃ – transport ke kartáčovému lemu v micelách

Rozpustnost

| | Ve vodě | V tucích |
|------------|---------------------------|-----------------------|
| Absorpce | Přímo do krve | Do lymfy, pak do krve |
| Transport | Volně | Transportní protein |
| Uskladnění | Volně ve vodním prostředí | Tuková tkáň, játra |
| Vylučování | Ledvinami | - |
| Potřeba | Pravidelně (1-3 dny) | Občas (týdny, měsíce) |

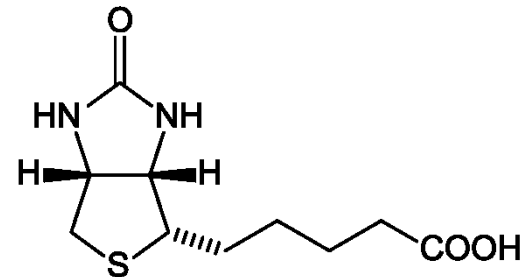
Rozdíly oproti živinám

- Struktura



Folát

- Fce



Biotin

- Obsah v potravě
– μg až mg

Biologická využitelnost

- Množství vitamínu
- Absorbované množství
 - Účinnost trávení a transitní čas
 - předchozí příjem živin
 - Výživový stav
 - Ostatní konzumovaná potrava ve stejný čas
 - Technologická úprava
 - Zdroj nutrientu

Biologická využitelnost

- Prekurzory
 - Provitaminy (β -karoten \rightarrow vitamin A (retinol))
- Organický původ
- Nestabilita
 - teplo, světlo, technologické úpravy
 - Labilní (folát, kys. panthotenová, vit. C, B₁₂, B₁, K)
 - Stabilní (D, E, biotin, niacin, B₆, B₂)

Stanovení vitamínů

- Přímé
 - hladina v krvi, v moči, tkáni
- Nepřímé
 - hladina metabolitu v krvi, moči
 - měření koncentrace po zátěži substrátem
 - změna aktivity enzymu po dodání vhodného koenzymu (vitaminu) reakce
 - produkt reakce katalyzované vitaminem
- Saturační testy

Nepřímé metody měření saturace vitamínu

- Měření sérové, močové nebo tkáňové koncentrace typického metabolitu
- Měření koncentrace hromadícího se metabolitu po zátěži substrátem
- Zvýšení aktivity enzymu po dodání koenzymu
- Stanovení produktu vytvořeného působením vitamínu

Saturační testy

- Zvýšené vychytávání vitamínu v organismu po jeho podání
 - Zvýšení jeho obsahu ve tkáních
 - snížená exkrece v moči

např. po podání vitamínu C v dávce 10 mg/kg

- jedná-li se o deficit vitamínu – nedochází k jeho vylučování močí

Metody stanovení vitaminů

- Mikrobiologické testy
- Chemické postupy
- Enzymatické testy
- Imunoanalýza
- Separační metody

Chemické metody

- Bez předchozí separace jsou použitelné omezeně
 - čisté a koncentrované vzorky (potravinářské nebo farmaceutické)
- chybí specifita a sensitivita pro kvantitativní stanovení vitaminů v biologických vzorcích
 - obsahují často řadu neznámých interferentů
- nejsou vhodné ani pro diferenciaci mezi vitamíny

Enzymové metody

- Využití jejich funkce jakožto koenzymů
- Hlavně při stanovení aktuálního stavu saturace organismu vitaminy
- Stanovuje se aktivita enzymu s a bez aktivace
přídavkem koenzymu (vitaminu)
 - sledováním změn koncentrace substrátů nebo produktů
- často z plné krve nebo v erytrocytech, mohou být měřeny na automatických analyzátoch
- Nevýhodou je komplikovaná standardizace, nestabilita enzymů během skladování a interference

Imunochemické metody

- Zahrnují specifické protein-vázající postupy
- Snadno proveditelné v biologických matricích
- Snadná automatizace
- Kompetitivní reakce
 - Značení: izotopové, fluorescenční
 - Příklad: vitamín B₁₂, folát
- Enzymoimunoanalýzy
 - Volný vitamin kompetuje s vitamínem značeným enzymem o vazbu na protilátku
 - například: pyridoxin

Imunochemické metody

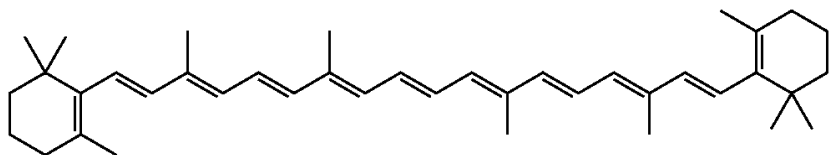
- Problémy
 - Zkřížené reakce s ostatními modifikacemi vitamínu
- Výhoda
 - krátká doba analýzy
 - dobrá dostupnost
 - instalace na random access automatických analyzátorech

Separační techniky

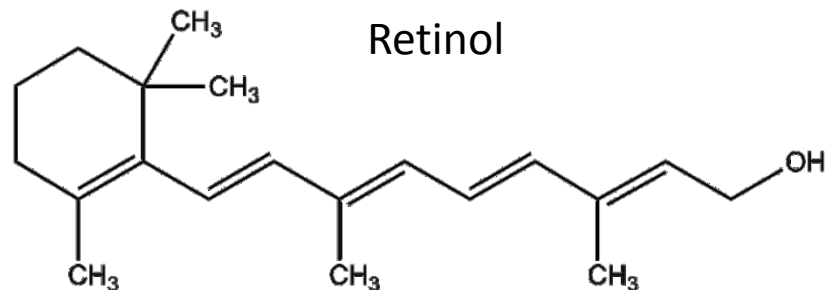
- Dělení a identifikace v jednom běhu řadu vitamínů a jejich derivátů
- HPLC/UVD; FLD; ED; MS
- LC-MS
 - přispívá k informacím o struktuře, velmi sensitivní
- CE – mikroemulzní elektrochromatografie
- CE-MS
 - vhodný postup vysoce citlivého stanovení některých vitamínů ve složitých maticích
- GC a TLC méně časté
- Imunoafinitní chromatografie je využívání k čištění a zakoncentrování vzorků

Vitamin A

β -karoten

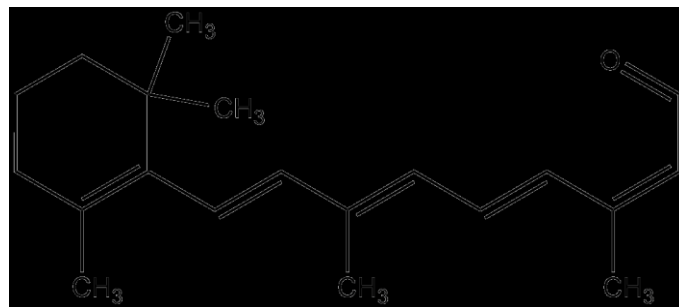


Retinol

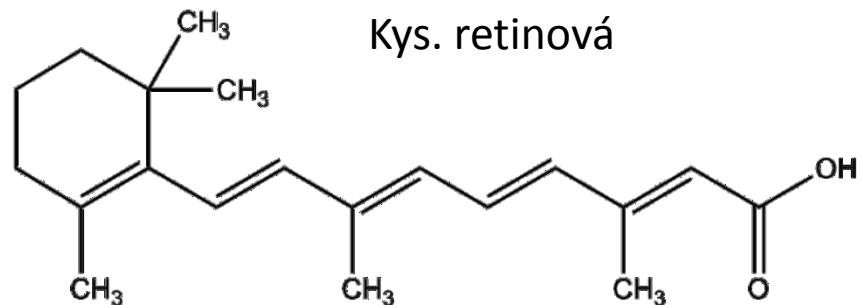


Zdroje (DDD \sim 1 mg)

- β -karoten – provitamin
 - Barvené ovoce a zelenina
- Retinol
 - Pouze živočišná strava (především játra, částečně žloutky)



Kys. retinová

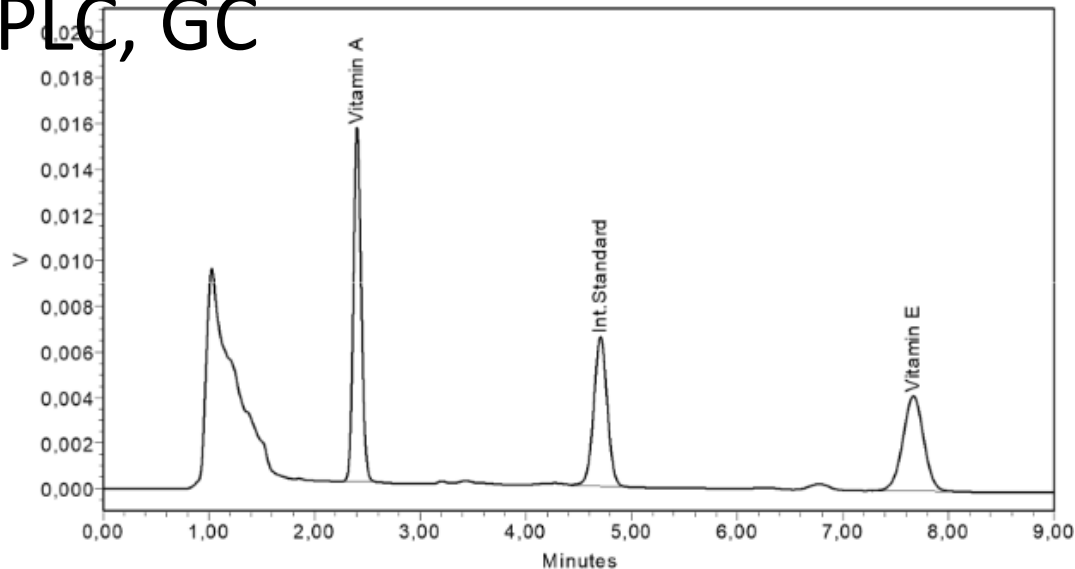


Vitamin A

- Deficit
 - Malabsorbce celiakie, poruchy pankreatu
 - Především v rozvojových zemích – slepota, snížená imunita u dětí
- Hypervitaminóza
 - Teratogenní (nebezpečné u těhotných – neměly by konzumovat játra)

Vitamin A

- Referenční metoda: LC/MS
- Certifikovaný ref. materiál: SRM 986b
- Preamalytika
 - Vit. A = tma (UV záření); -20°C; zabránit hemolýze
- Rutinní metody: HPLC, GC

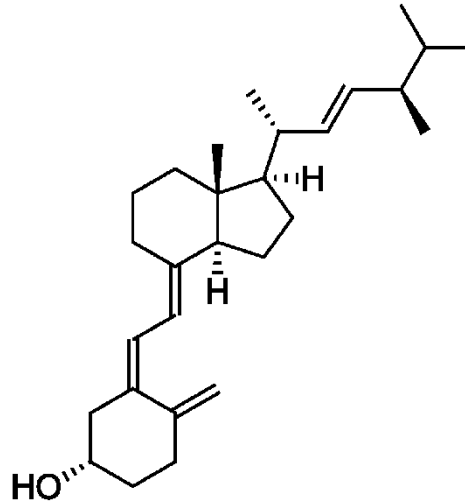


Vitamin D

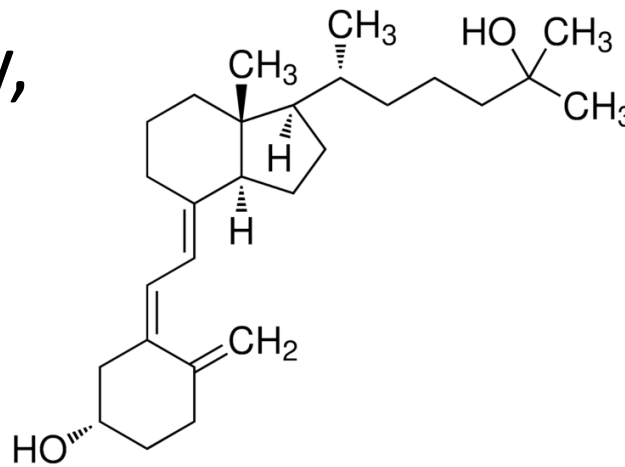
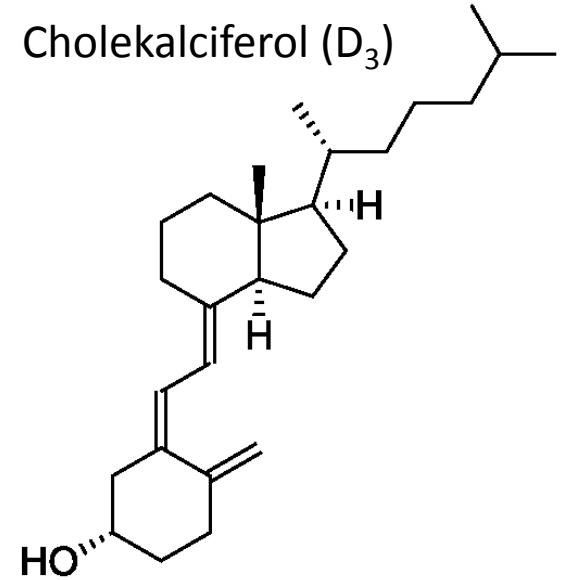
Zdroje (DDD ~ 10 ug)

- D₃ – sluneční záření, ryby, žloutek, játra, mléko, máslo
- D₂ – kvasinky, droždí

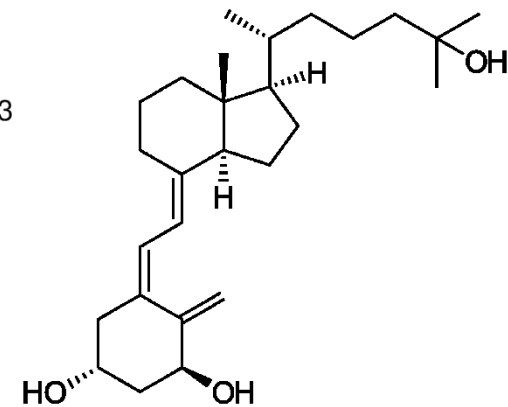
Ergokalciferol (D₂)



Cholekalciferol (D₃)



Kalcidiol (hydroxyD₃)



Kalcitriol (1,25-dihydroxykalciferol)

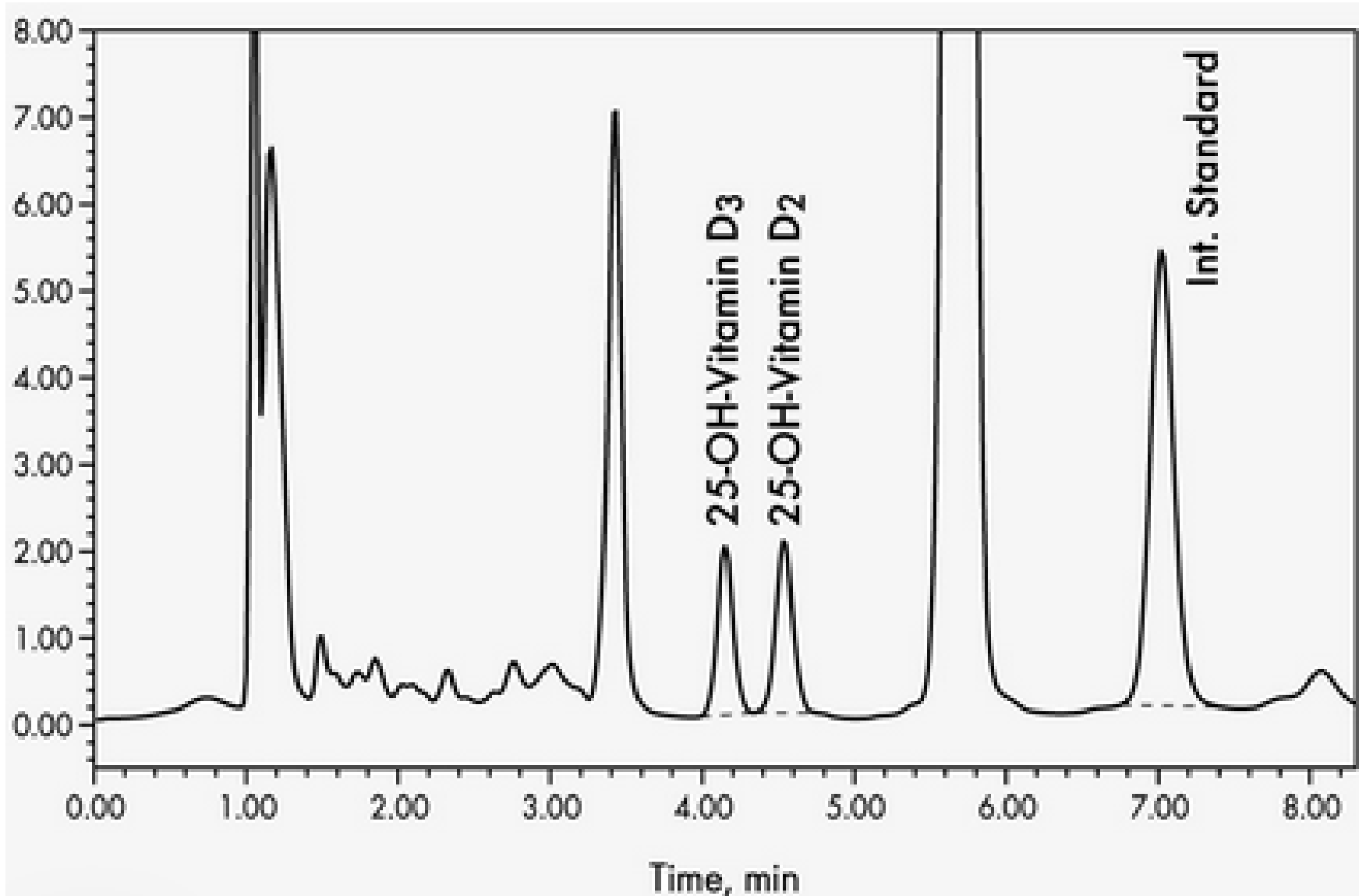
Vitamin D

- Deficit
 - Při vývoji rachitis, osteomalacie
 - V pokročilejším věku osteoporóza
- Hypervitaminóza
 - Hyperkalcémie, kalcifikace měkkých tkání

Vitamin D

- Referenční metoda:
 - ID-LC-MS/MS
- Certifikovaný ref. materiál: UME CRM 1308
- Preanalytika
 - Vit. D = tma (UV záření); vzdušný kyslík; -20°C;
- Rutinní metody: imunochemicky; HPLC;
(dokáže rozlišit jednotlivé formy vit. D= D₂, D₃); LC/MS (1,25-OH D₃)

Vitamin D



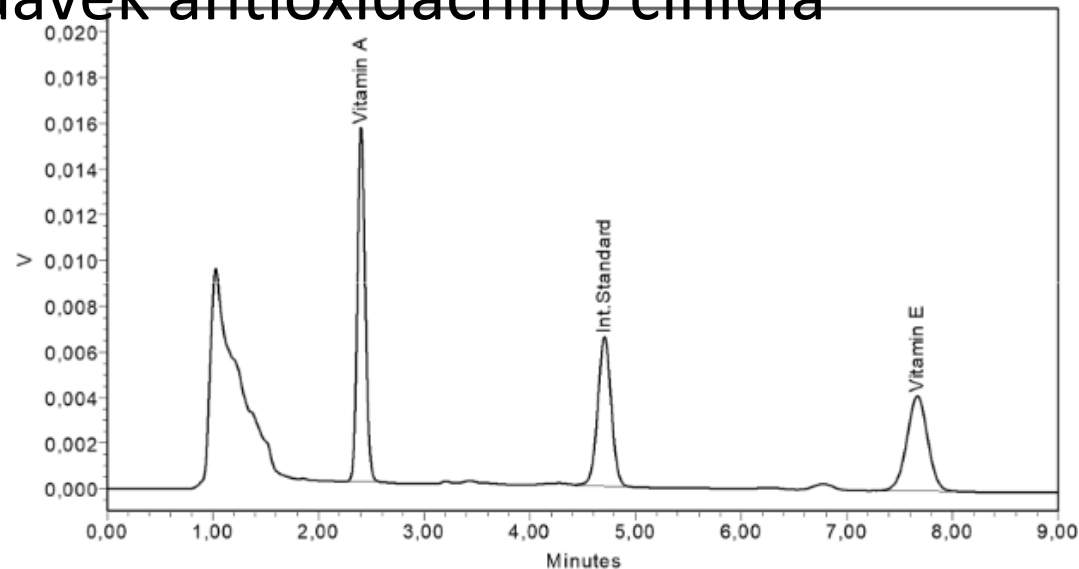
Vitamin E

- Deficit
 - Snížená životnost erytrocytů až hemolytická anémie
 - Funkční změny periferních nervů
 - Myopatie, retinopatie, nekróza jater
- Hypervitaminóza
 - GIT obtíže, únava, bolest hlavy, horší vstřebávání vitamínu K, porucha fce gonád

Vitamin E

- Referenční metoda: HPLC
- Certifikovaný ref. materiál: SRM 986b
- Preamalytika
 - Vit. E = tma (UV záření); -20°C; zabránit hemolýze; deproteinace; přídavek antioxidačního činidla

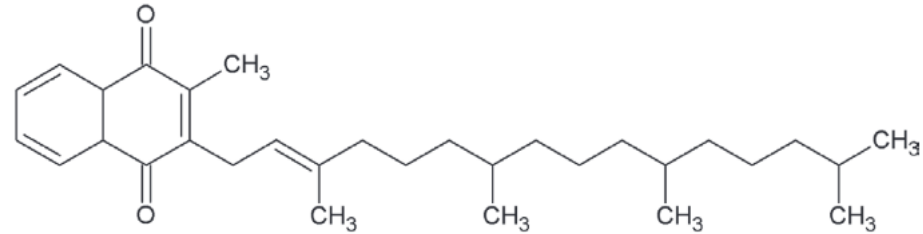
- Rutinní metody:
HPLC, GC



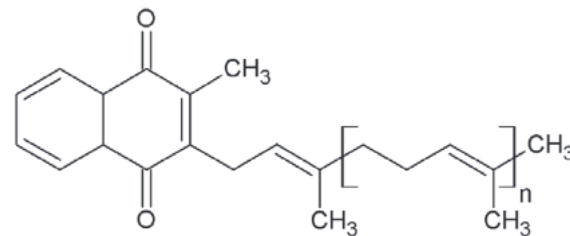
Vitamin K

Zdroje (DDD ~ 90-120 ug)

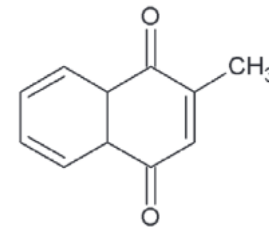
- K₁ – listová zelenina
brokolice, špenát, salát
- K₂ – sýr, maso, tvaroh,
játra, žloutky, tuk, natto
- K₃ – vyrábí se synteticky,
doplňěk stravy v
krmivech



Vitamin K₁



Vitamin K₂



Vitamin K₃

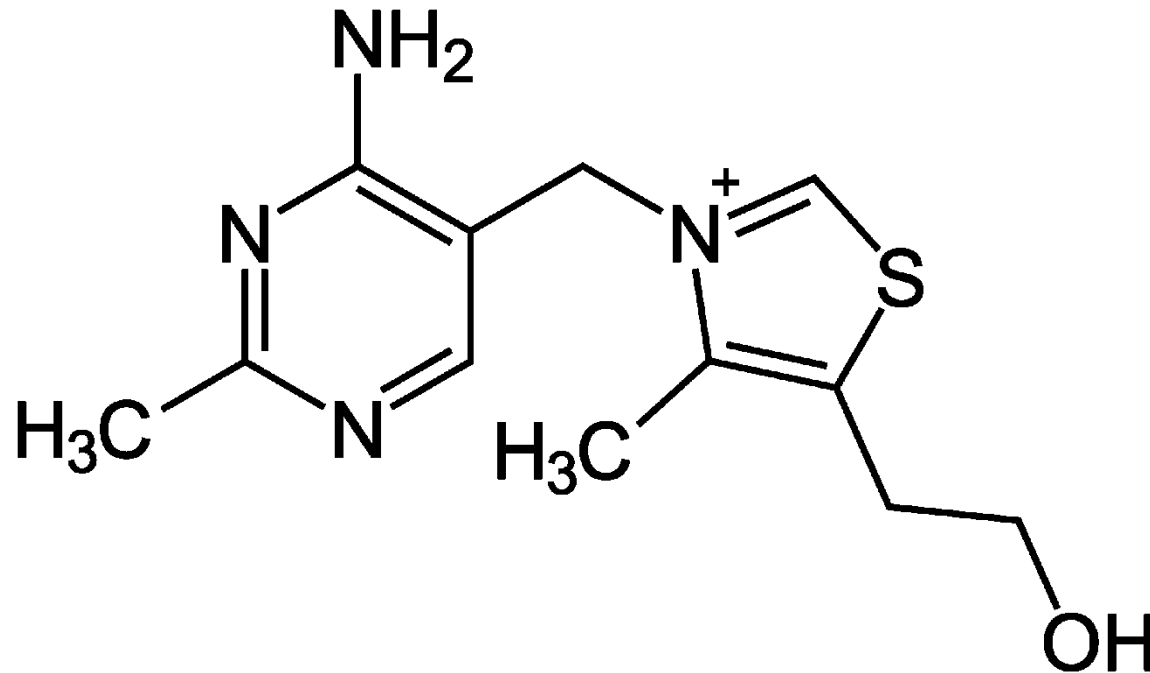
Vitamin K

- Deficit
 - Poruchy srážlivosti krve (u novorozenců může být život ohrožující)
 - Osteoporóza
- Hypervitaminóza
 - Není známa

Vitamin K

- Referenční metoda: není
- Certifikovaný ref. materiál: není
- Rutinní metody: nestanovuje se
- RUO metody: K_1 HPLC – FLD (postkolonová redukce Zn), K_1+K_2 HPLC-chemiluminiscence,
- K_1+K_2 LC-APCI-MS

B₁ thiamin



Zdroje (L

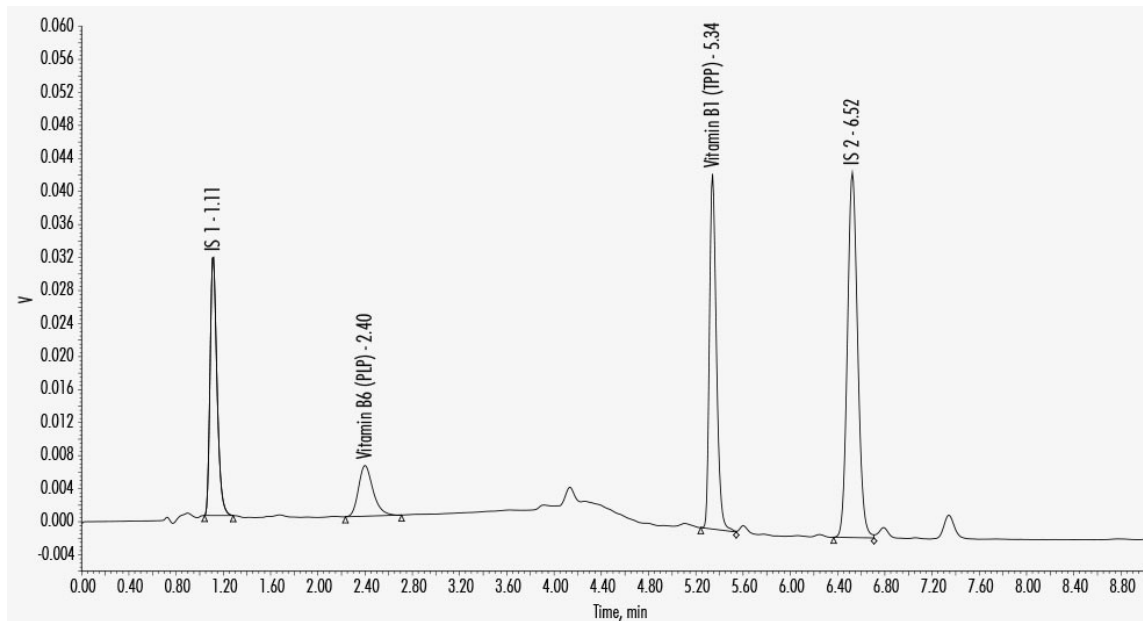
- Droždí, otruby, játra, ovesné vločky
neloupaná rýže, ořechy, pohanka, klíčky
- Alkohol inhibuje aktivní transport do
enterocytů (pasivní > 5mg/den zachován)

B₁ thiamin

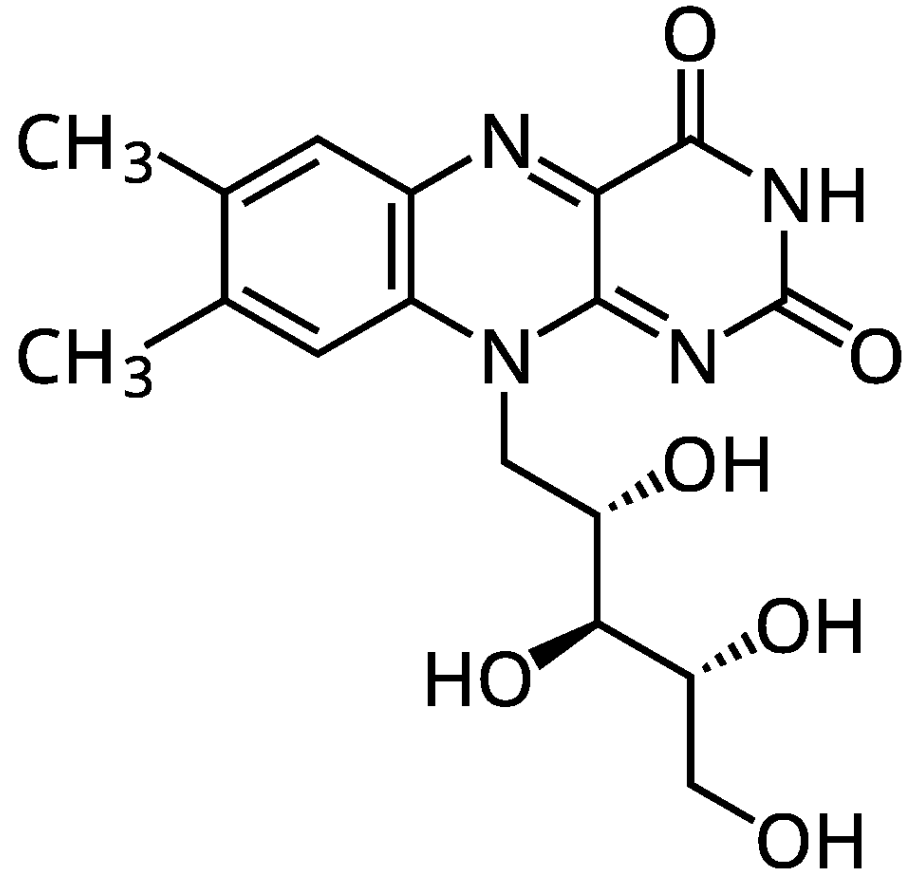
- Deficit
 - Beri – beri (slabost)
 - Anorexie, dyspepsie, únava
 - Suchá forma: postihnutí periferních nervů, parézie až paralýza
 - Mokrú forma: otoky, dušnost, hepatomegalie, tachykardie, selhání srdce, laktátová acidóza
- Hypervitaminóza
 - Není známá

B₁ thiamin

- Referenční metoda: není k dispozici
- Certifikovaný ref. materiál: není k dispozici
- Preamalytika
 - Vit. B1 = tma (UV záření);
- Rutinní metody:
HPLC-FLD



B₂ riboflavin



Zdroje (DDD ~ 1,4-1,8 mg)

- Droždí, játra, ledviny, v
- Rostlinné zdroje – kaka
(vegetariáni a vegani musí často
suplementovat)

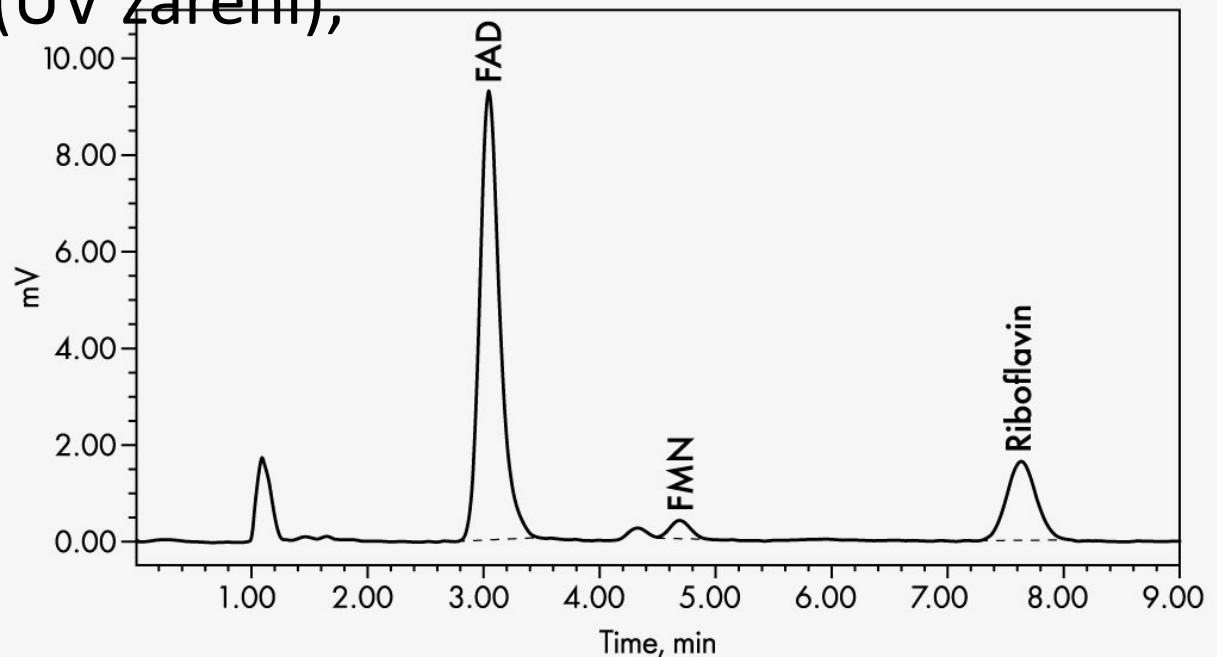
B₂ riboflavin

- Deficit
 - Záněť ústních koutků, rtů, jazyka, spojivek,
 - Dlouhodobě vede k atrofii
- Hypervitaminóza
 - Není známá

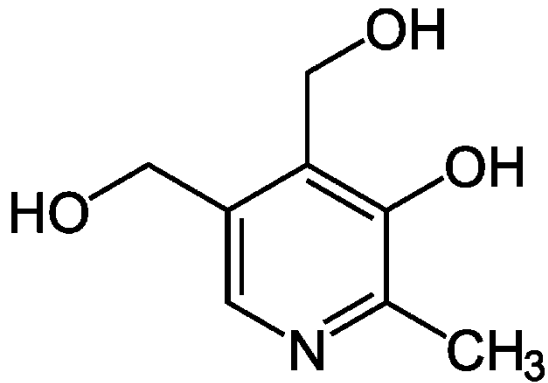
B₂ riboflavin

- Referenční metoda: není k dispozici
- Certifikovaný ref. materiál: není k dispozici
- Preamalytika
 - Vit. B₂ = tma (UV záření);

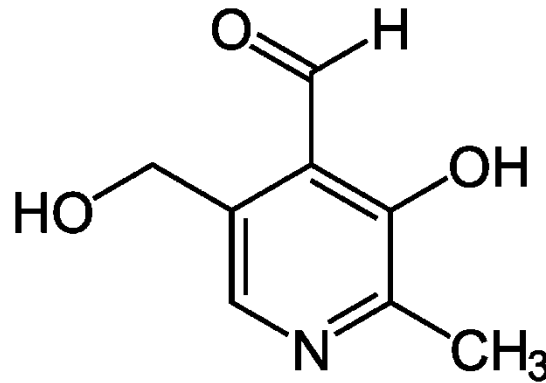
Rutinní
metody:
HPLC-FLD,
LC-MS



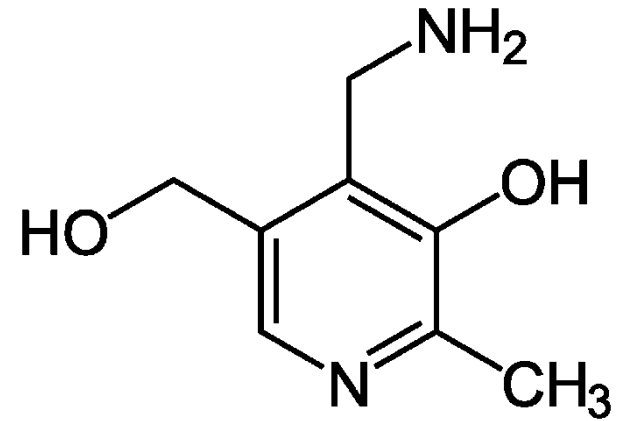
B₆ pyridoxin



Pyridoxol



Pyridoxal



Pyridoxamin

Zdroje (DDD ~ 1,4-1,8 mg)

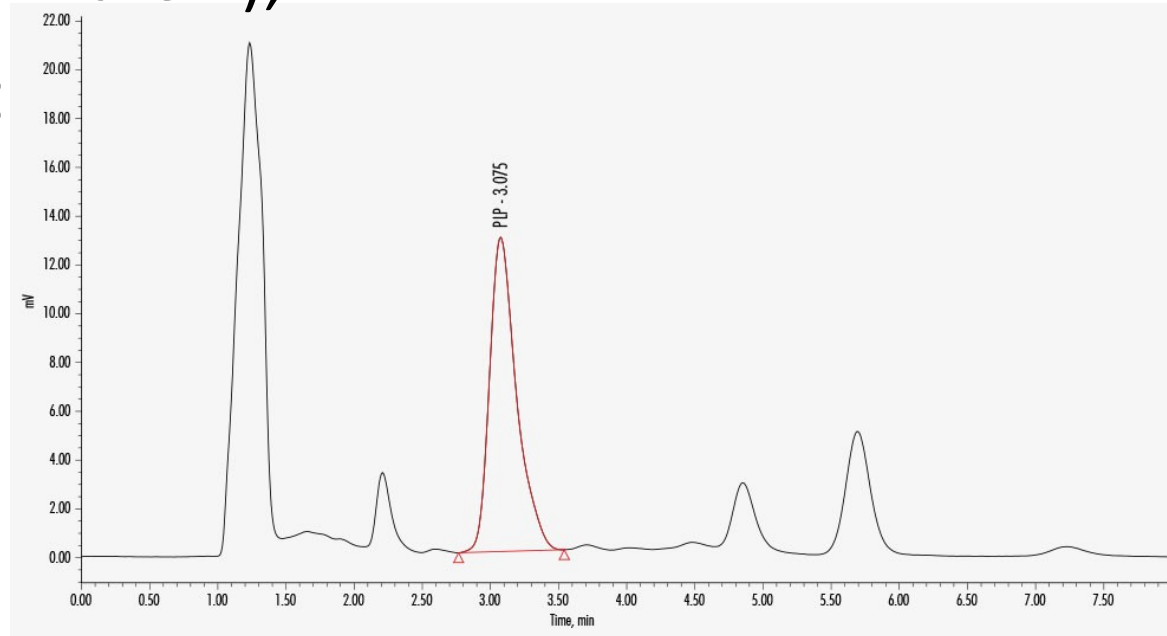
- Játra, vepřové maso, makrely, vejce, droždí, pšeničné klíčky, celozrnné pečivo, banány, ořechy, semínka, pohanka, otruby, maso

B₆ pyridoxin

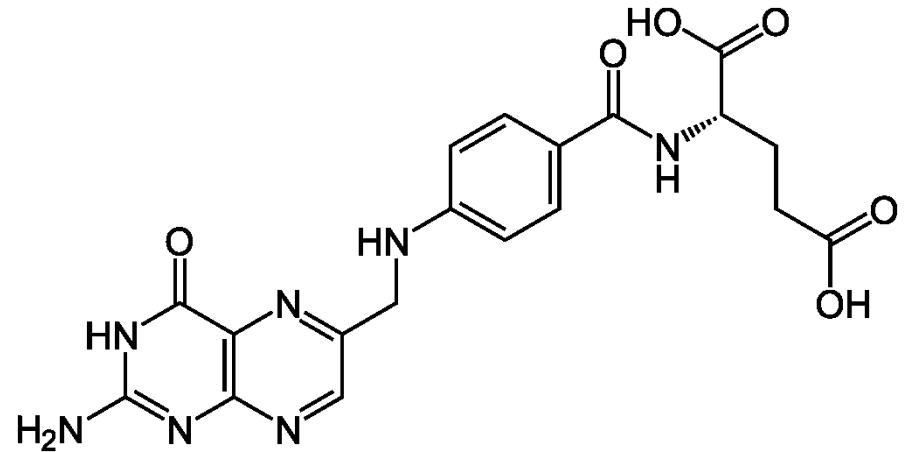
- Deficit
 - Při zvýšeném výdeji (těhotenství, sportovci s vysokým příjmem masa, alkoholismu, dialýza)
 - Neurologické symptomy
 - Hypochromní sideroblastická anemie, zápaly očních a ústních koutků
 - U novorozenců mentální retardace, defomity skeletu, trombózy, osteoporóze, poruchy vidění
- Hypervitaminóza
 - Není známá

B₆ pyridoxin

- Referenční metoda: není k dispozici
- Certifikovaný ref. materiál: není k dispozici
- Preamalytika
 - Vit. B₆ = tma (UV záření);
- Rutinní metody:
HPLC-FLD



B₉ – folát, kys. listová



Zdroje (DDD ~ 200-300 µg)

- Listová i další zelenina, droždí, vnitřnosti, ořechy, celozrnné obilniny, ovoce

B₉ – folát, kys. listová

- Deficit
 - Megaloblastová anémie, trombocytopenie
 - Defekty neurální trubice plodu
 - Kardiovaskulární onemocnění (hyperhomocysteinémie)
 - Deprese
- Hypervitaminóza
 - žaludeční potíže, vysoké dávky můžou maskovat některé příznaky nedostatku v B₁₂

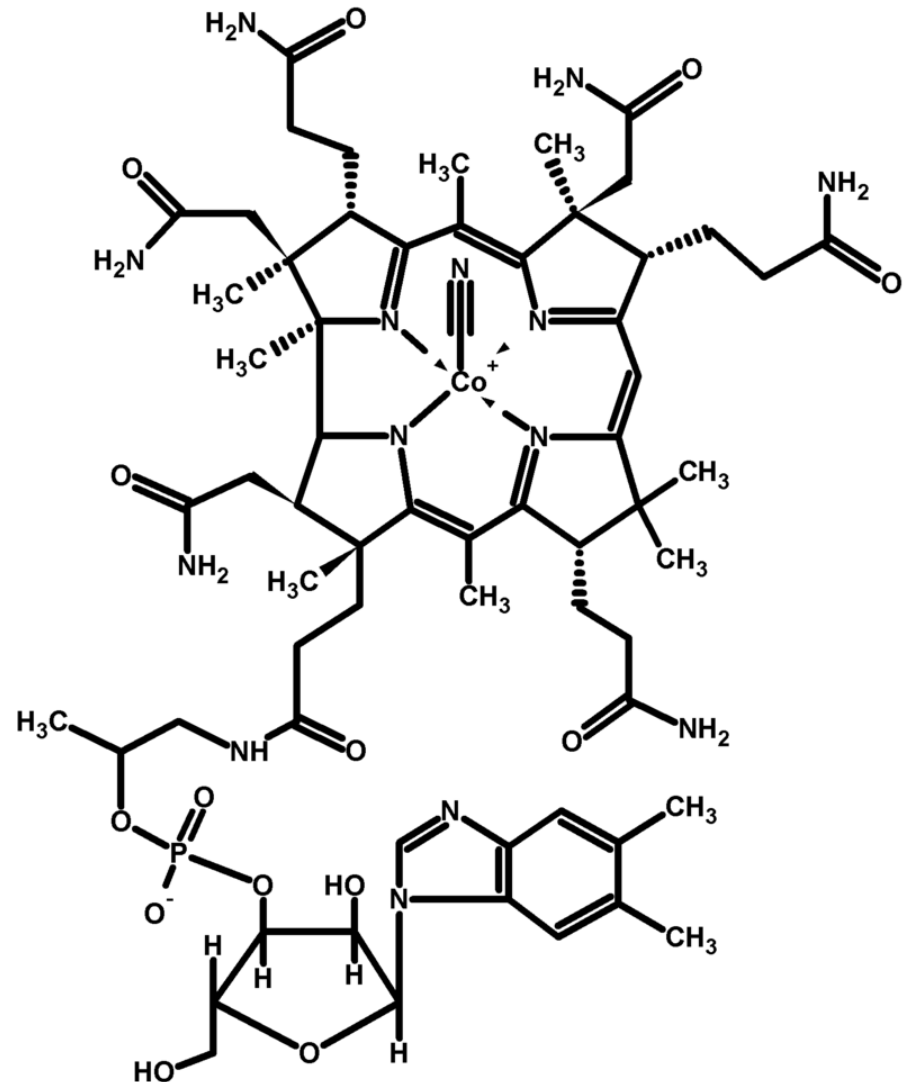
B₉ – folát, kys. listová

- Referenční metoda: není k dispozici
- Certifikovaný ref. materiál: není k dispozici
- Rutinní metody: imunochemicky

B₁₂ kobalamin

Zdroje (DDD ~ 2,5 ug)

- Játra, ledviny, maso, ryby, žloutek, mléčné výrobky
- Rostlinné zdroje – pouze malé množství u fermentovaných potravin



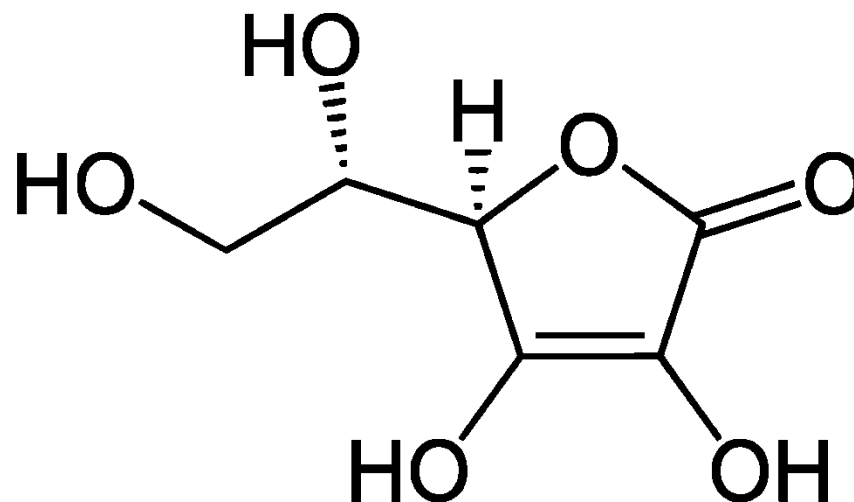
B₁₂ kobalamin

- Deficit
 - Velké zásoby v játrech (5-10 let) – projeví se opožděně
 - Makrocytární anémie, neurologické poruchy (nedostatečná syntéza myelinu), perniciózní anémie
- Hypervitaminóza
 - Nemí známá

B₁₂ kobalamin

- Referenční metoda: není k dispozici
- Referenční materiál: NIBSC 03/178
- Rutinní metody: Imunochemie

Vitamin C kys. askorbová



Zdroje (DDD ~ 80-90 mg)

- Citrusy, paprika, brambory, jahody, šípky, černý rybíz, křen, ranná cibule, kysané zelí

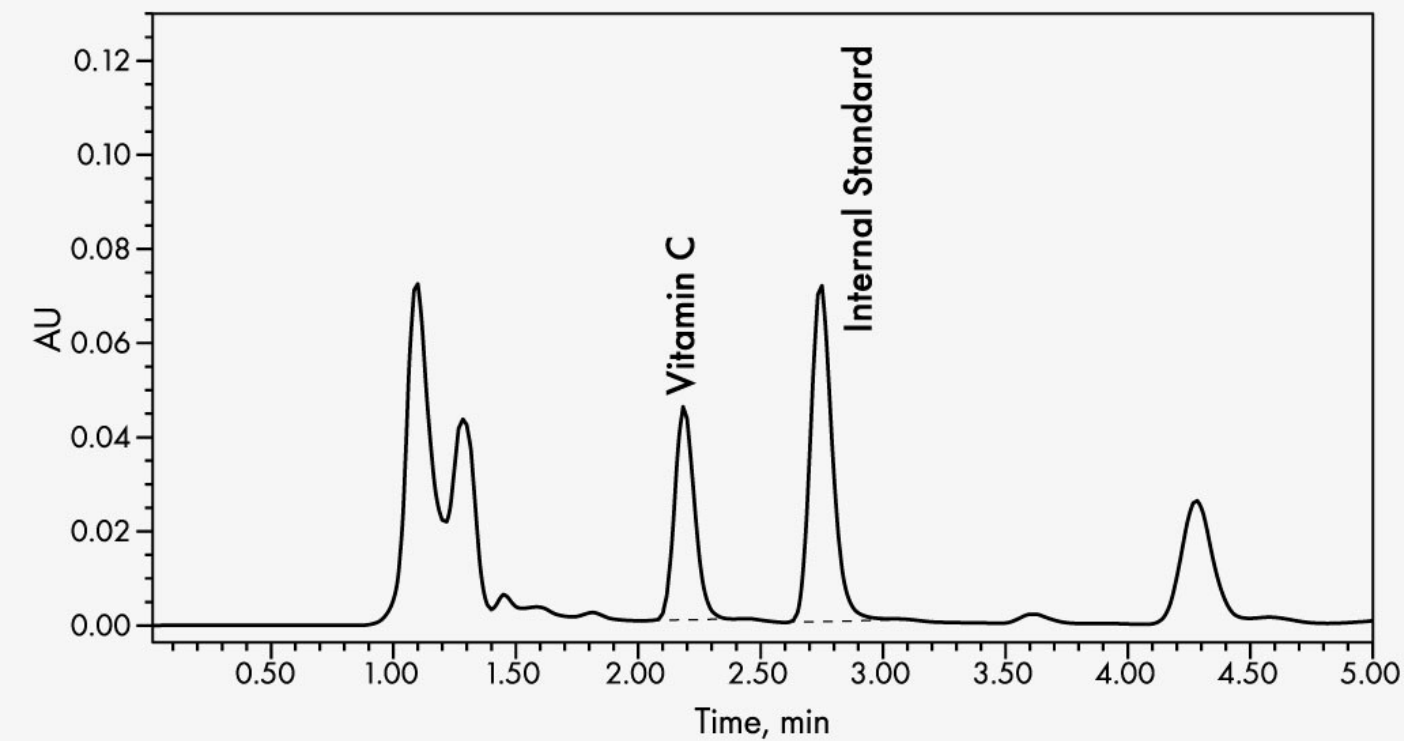
Vitamin C kys. askorbová

- Deficit
 - Únava, prodloužená rekonvalescence, zhoršení hojení ran, kurděje (skorbut)
- Hypervitaminóza
 - Nadměrné užívání suplementů může vést k tvorbě oxalátů (konverze cca 1 % vitC -> lithiáza)
 - Interference při některých oxidoredukčních biochemických testech

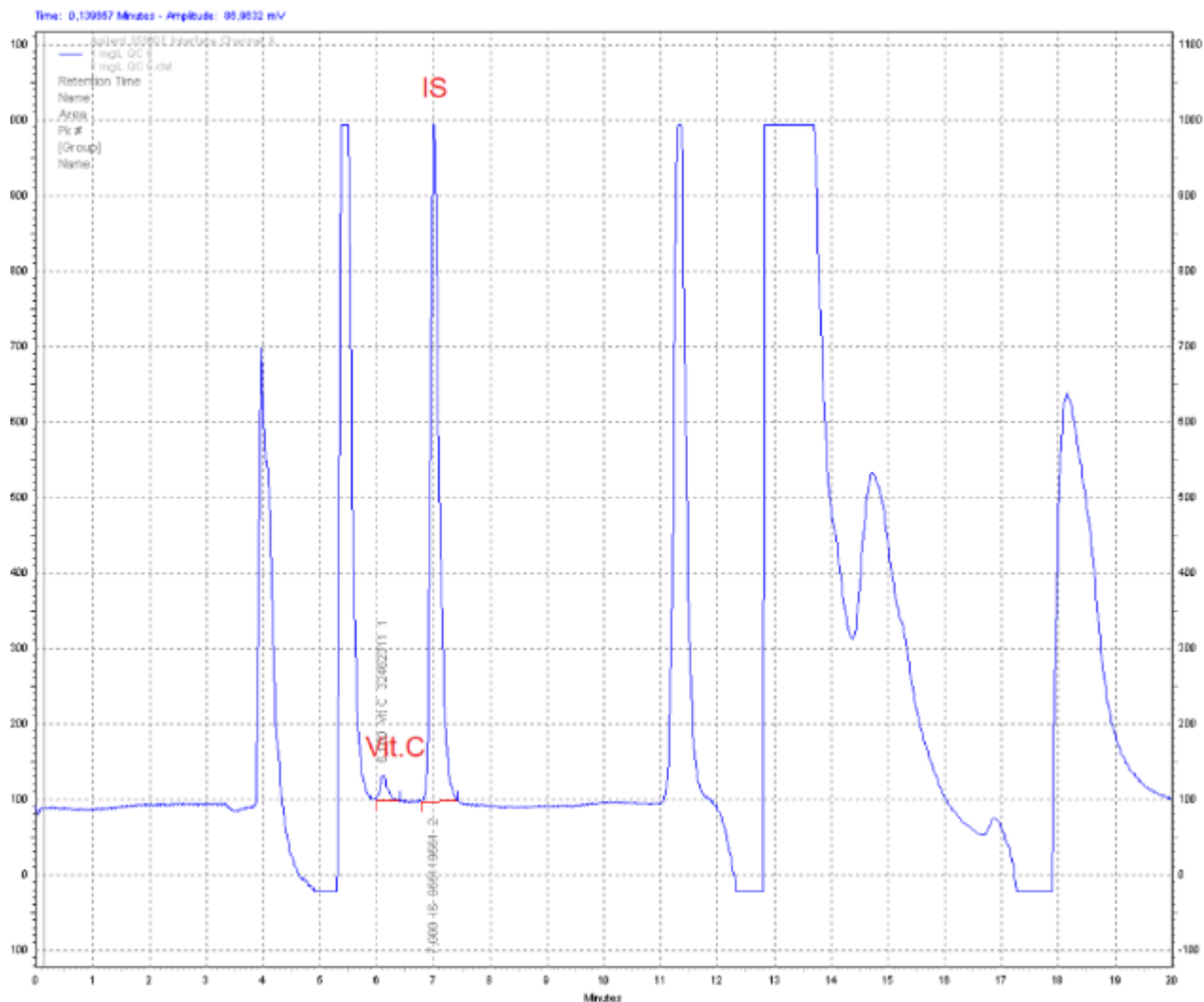
Vitamin C kys. askorbová

- Referenční metoda: HPLC
- Certifikovaný ref. materiál: SRM970
- Nestabilní – snadná oxidace na oxalovou kyselinu (okyselení, deproteinace, přídavek red. činidla, -70°C)
- Rutinní metody: HPLC-UV, HPLC-CE

Vitamin C kys. askorbová



Vitamin C kys. askorbová



Děkuji za pozornost