



# ADAPTACE METODY RECIPE® 25-OH-VITAMIN D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> IN PLASMA AND SERUM – ON LINE ANALYSIS PRO VZORKY SUCHÉ KREVNÍ SKVRNY (DBS)



Institut Nutrice  
a Diagnostiky  
Pardubice

**Voříšek V.<sup>1,2</sup>, Šafaříková L.<sup>2</sup>, Horna A.<sup>2</sup>, Plecháčová I.<sup>2</sup>, Kabrhelová J.<sup>2</sup> and Knirsch M.<sup>3</sup>.**

*1/ÚSTAV KLINICKÉ BIOCHEMIE A DIAGNOSTIKY FAKULTNÍ NEMOCNICE V HRADCI KRÁLOVÉ, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové*

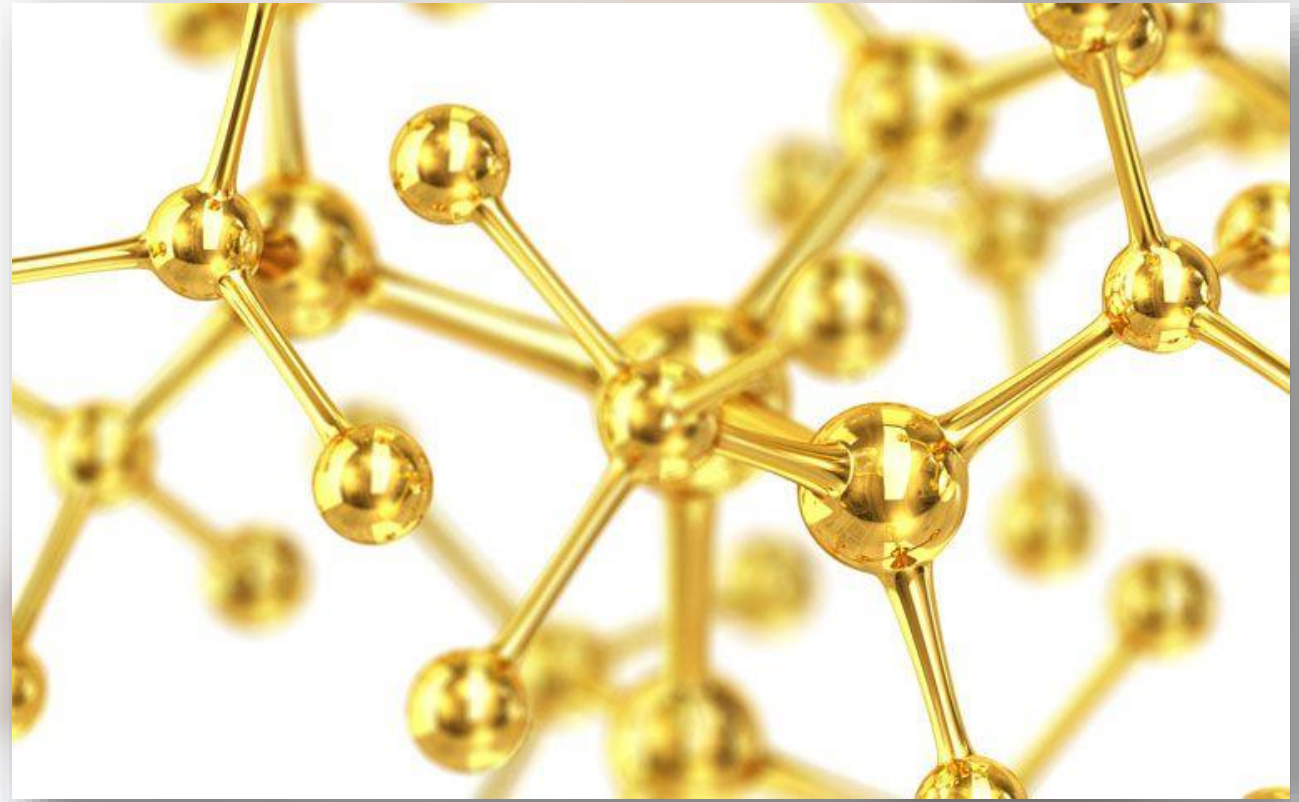
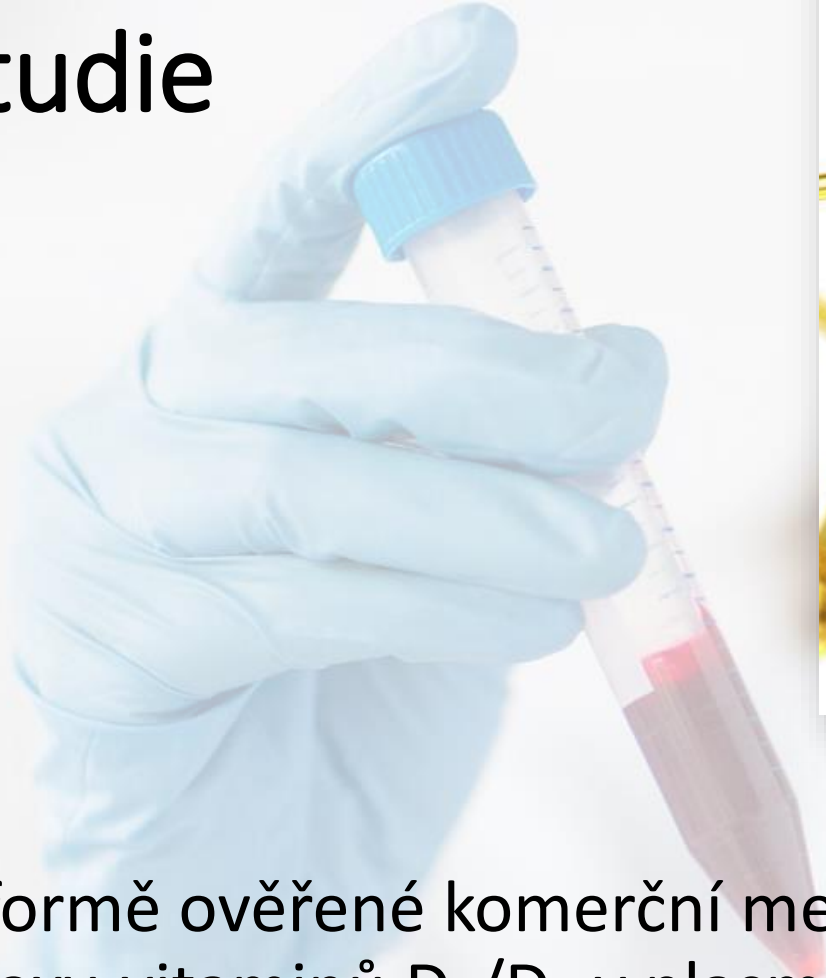
*2/RADANAL s.r.o., Okružní 613, 530 03 Pardubice*

*3/ RECIPE Chemicals + Instruments GmbH, Dessauerstrasse 3, 80992 München, Bayern, Bundesrepublik Deutschland*

[horna@radanal.cz](mailto:horna@radanal.cz)

*Klíčová slova: suchá krevní skvrna, dried blood spot (DBS), cholekalciferol, ergokalciferol, UHPLC/HRMS*

# Cíl studie



Na platformě ověřené komerční metody fy RECIPE pro stanovení 25-hydroxy-vitaminů  $D_2/D_3$  v plasmě či séru vyvinout robustní a spolehlivou metodu DBS, která je pro pacienta atraktivní s ohledem na korespondenční formu méně invazivního odběru vzorků

# „VITAMÍN D“

Zahrnuje skupinu steroidů, které hrají klíčovou roli:

- v inkorporaci vápníku do kostní hmoty
- v buněčné proliferaci
- pozitivní vliv vyšších hladin ergokalciferolu ( $D_2$ )

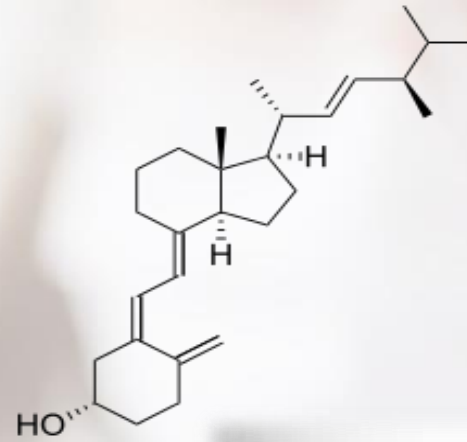
zejména cholekalciferolu ( $D_3$ ) na úroveň humorální imunitní připravenosti organismu a modulaci jeho protizánětlivé odpovědi

**(v konotaci s vážnými průběhy COVID-19 – cytokinová bouře - velmi pozoruhodná role!)**

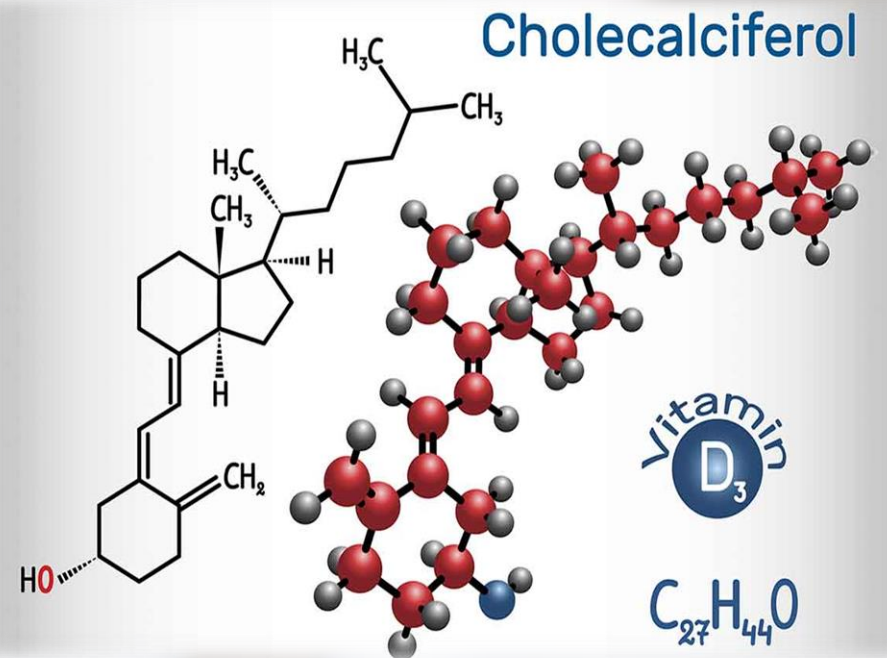
- prevence i pozitivní vliv na DM I. i II. typu
- homeostasis TK



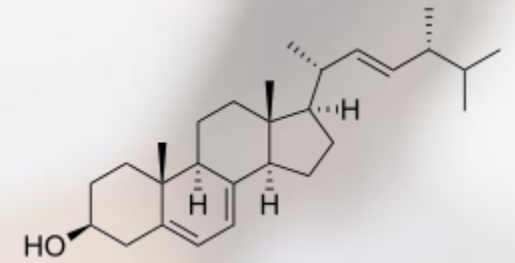
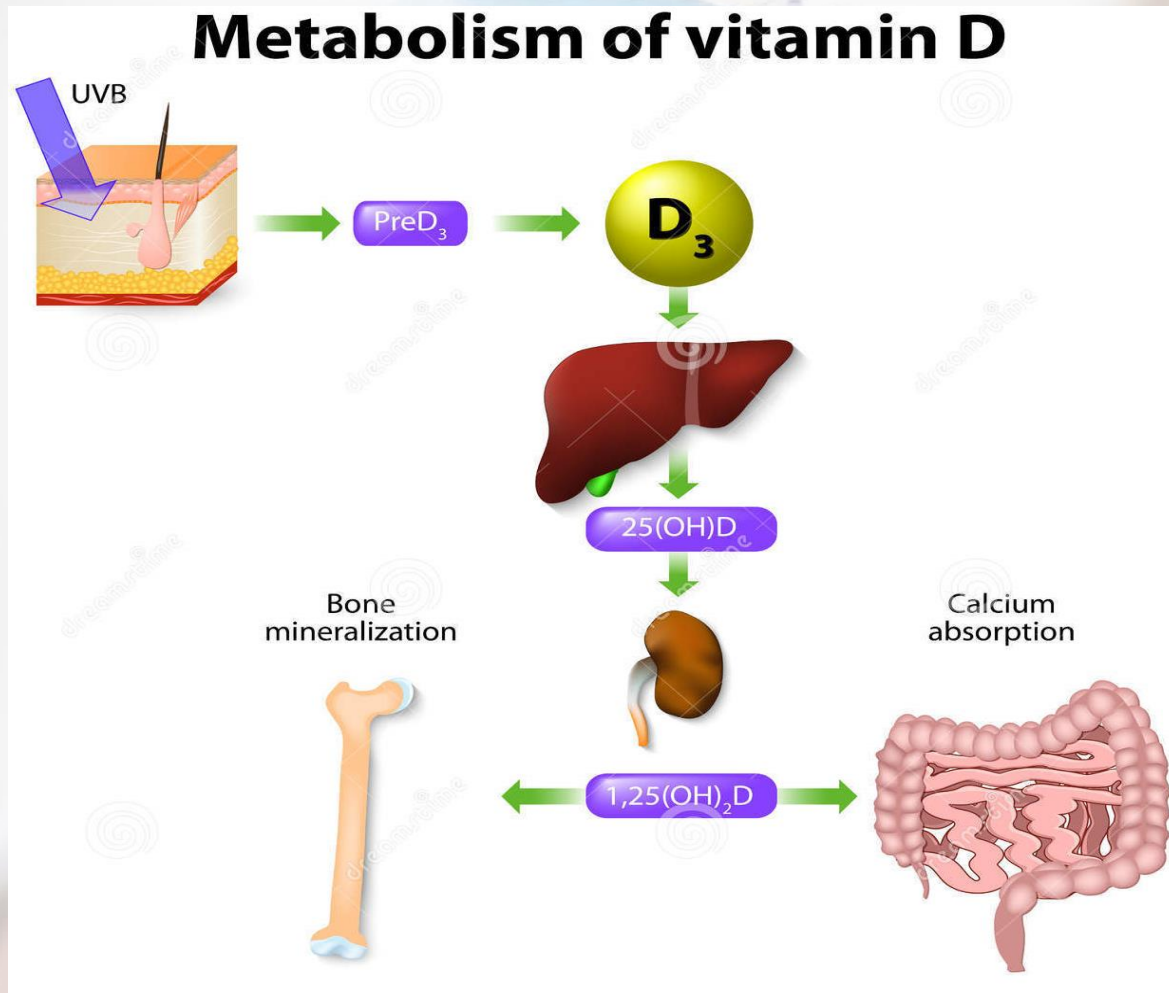
• VITAMIN D<sub>2</sub> – ERGOKALCIFEROL



• VITAMIN D<sub>3</sub> – CHOLEKALCIFEROL



- Biologicky Aktivní formy jsou steroly: 25(OH)D<sub>2</sub>, 25(OH)D<sub>3</sub> - biosynthesa v játrech
- 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> – biosynthesa v ledvinách (KALCITRIOL) - přes 25(OH)D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> (stimulace parathormonem – příštítná tělíska)



Ergosterol – zdroj vitamínu D<sub>2</sub>  
(houby, *S.cerevisiae*)

- Dostatečná expozice slunečnímu světlu (UV-B) znamená rychlou biosynthesu (konverzi)  $D_2$  na klíčový  $D_3$



- V zimním a časném jarním období klimatu mírného pásma je potom vhodná bohatá na kalciferol nezbytná pro udržení dostatečné imunitní obranyschopnosti

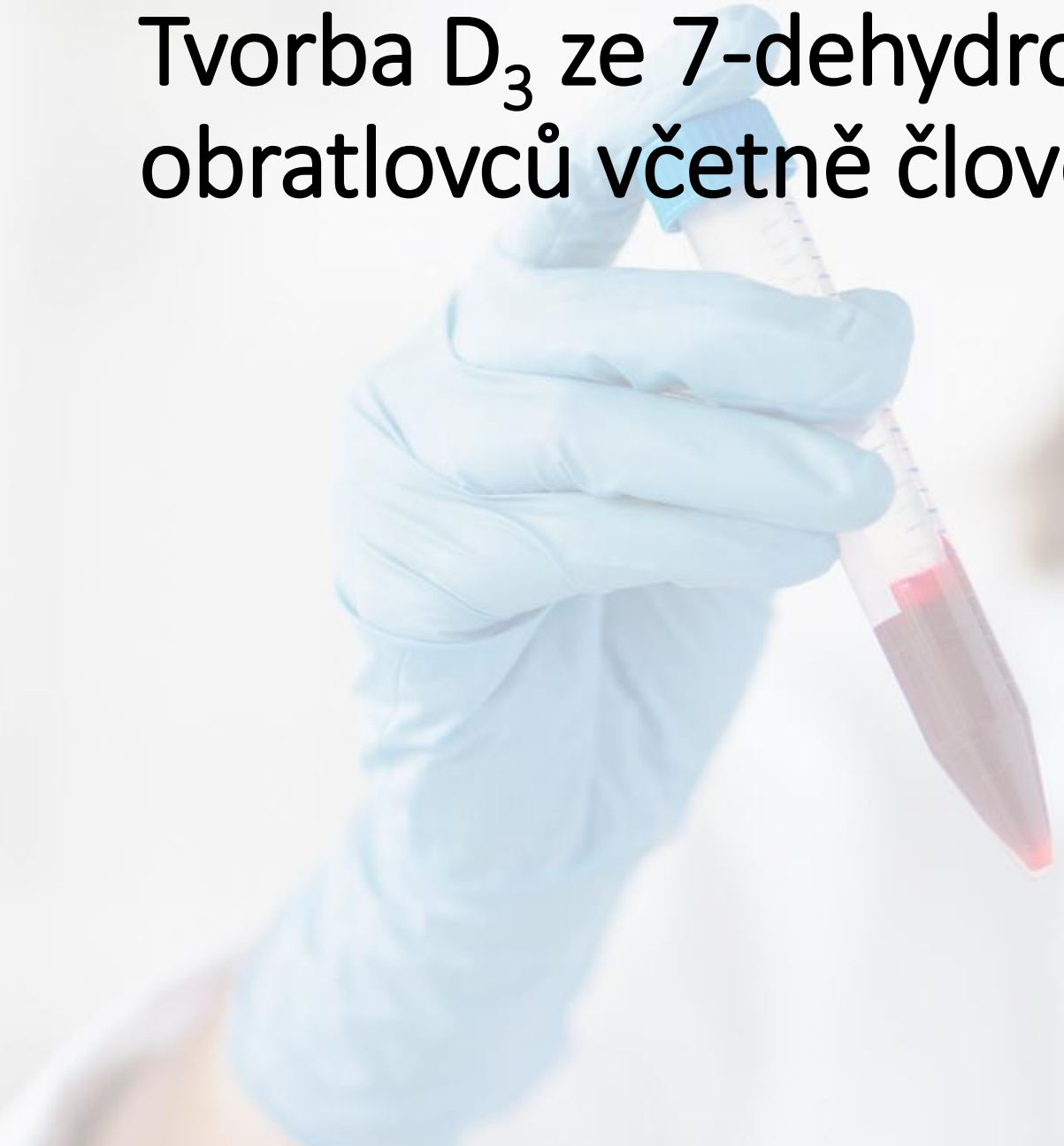
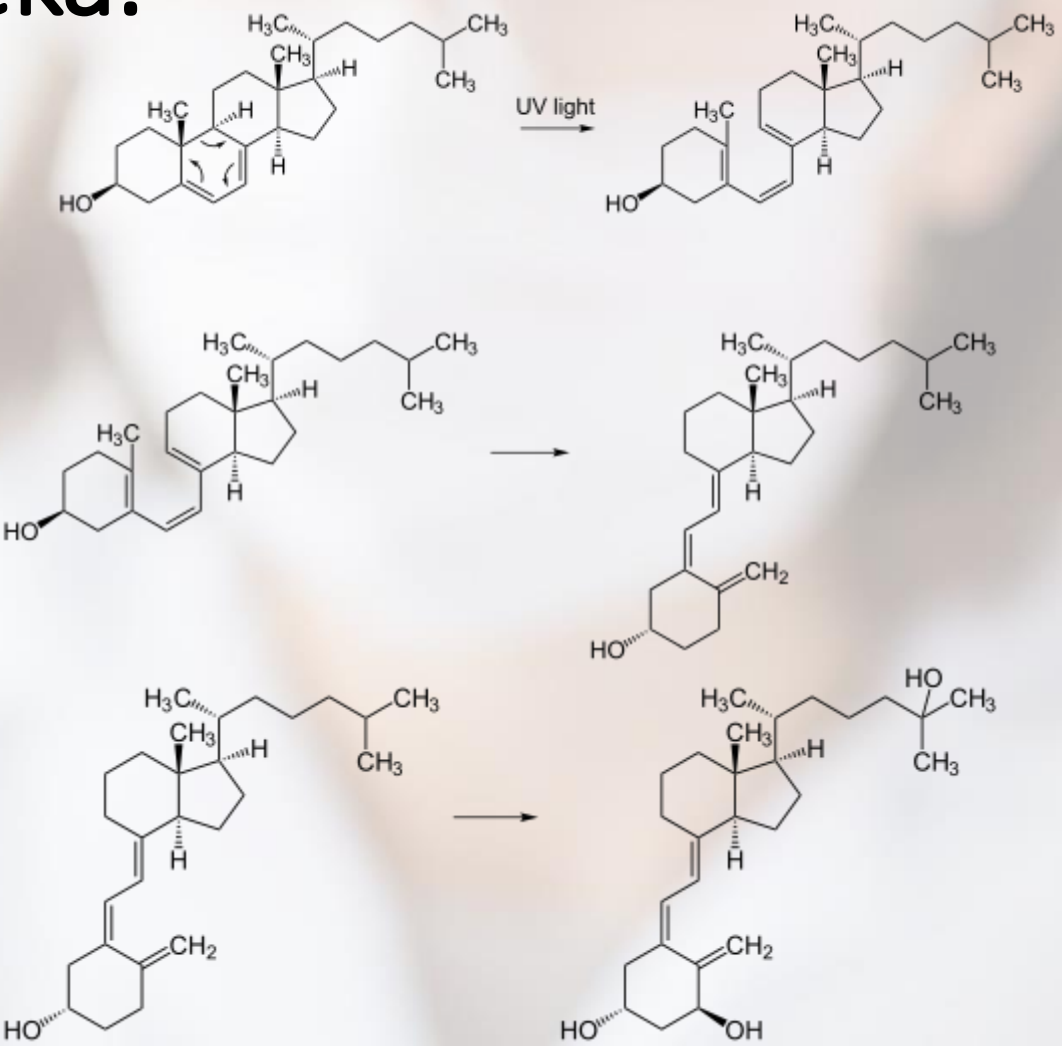
- Optimální **denní dávka** vitamínu  $D_3$  ve věkovém rozpětí 1 – 70 let bez ohledu na pohlaví je **15  $\mu\text{g}$**  (*Zákon č. 352/2009 Sb.*, DDD je od 25 let věku výše jen 5  $\mu\text{g}$ )

- Aktivní metabolit **1,25-dihydroxycholecalciferol** hraje důležitou regulační roli v produkci antimikrobiálních peptidů (např. katelicidinu)

- Kalcitriol – steroidní hormon přes parathormon (hydroxylace v tkáni ledvin) zajišťuje biologickou dostupnost vápníku pro jeho inkorporaci do kostní hmoty

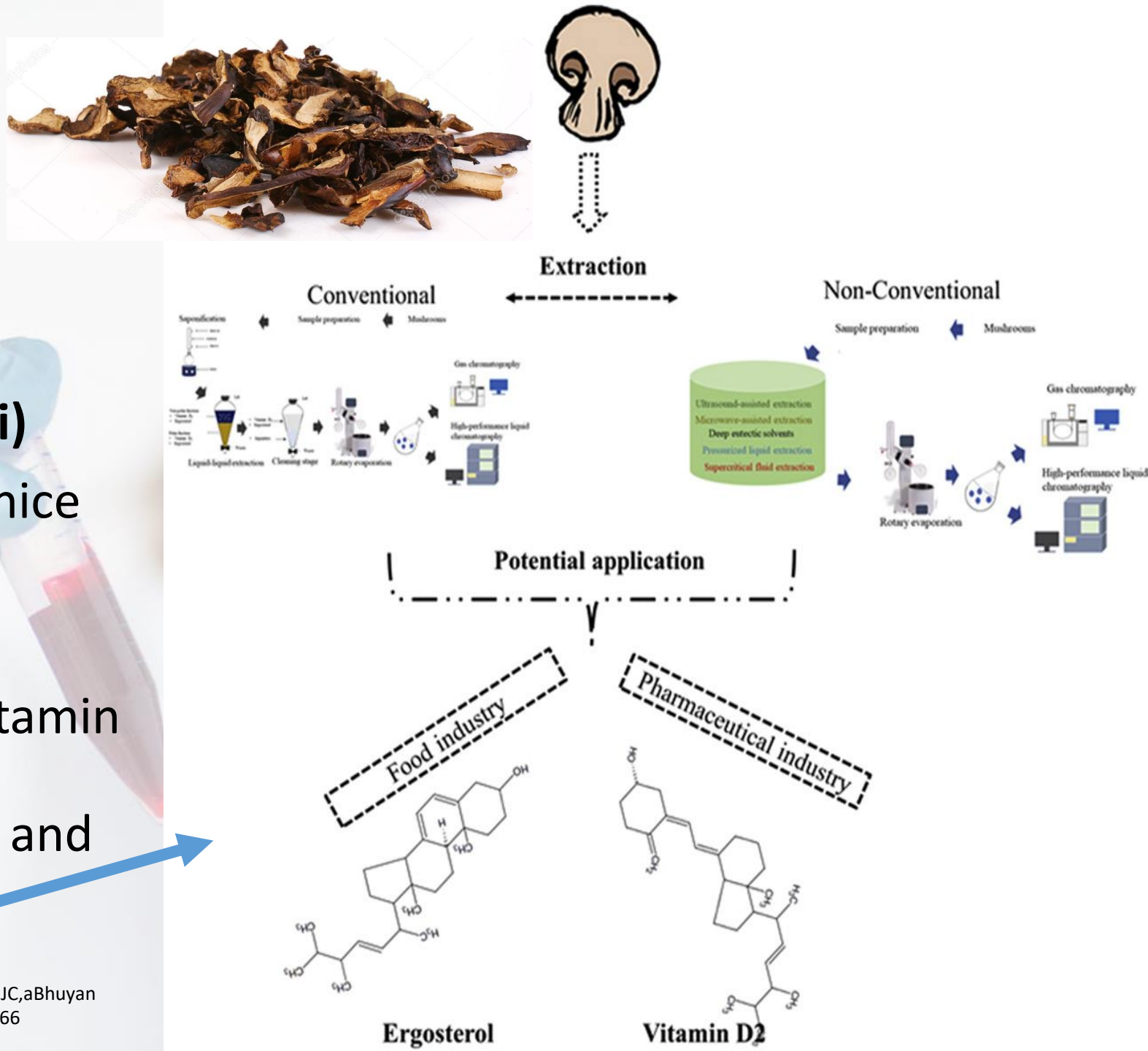


# Tvorba D<sub>3</sub> ze 7-dehydrocholesterolu v kůži obratlovců včetně člověka:



# Mimotělní zdroje vitamínu D<sub>2</sub>

- sušené houby (UV – na slunci)
- kvasinky (*S.cerevisiae*) – kvasnice (český chléb)
- Recovery of ergosterol and vitamin D<sub>2</sub> from mushroom waste - Potential valorization by food and pharmaceutical industries:





# Mimotělní zdroje vitamínu D<sub>3</sub>



- potraviny živočišného původu – ryby, zejména tresčí játra
- Potraviny rostlinného původu – č. Solanaceae – zejména rajčata a brambory

*obsah D<sub>3</sub> a 7-dehydrocholesterolu klesá ve směru:*

*listy – plody – stonky - oddenky(hlízy)*



- Obiloviny, zejména oves
- V komerci v současné době tzv. fortifikovaná rostlinná mléka (ovesné, mandlové, kokosové)



# Preanalytická fáze odběr vzorků DBS CAPITAINER (Sweden):

- Kapka kapilární krve z prstu dobrovolníka byla aplikována na startovací pozici speciální odběrové soupravy fy Capitainer (Quantitative blood sampling card Capitainer B, The quantitative DBS system)
- zkoncentrována na produktový disk, který byl použit k vlastní analýze

# Analytická metodika

## 1. Počáteční příprava analytického vzorku

- K extrakci z disku DBS byl použit **roztok RECIPE Precipitant P/IS** ( $d_6$ -25-OH-D3, parent iont 389.368 m/z) o objemu **200 $\mu$ l**
- Vortex 90 minut, centrifugace 15000 ot/min po dobu 5 minut
- **10 minut inkubace** při 4°C, opět **centrifugace** při stejných podmínkách jako v první a nástřik **50  $\mu$ l výsledného supernatantu** přímo na systém UHPLC/HRMS
- Na základě studia výtěžnosti byl čas vortexování ustálen až na **6 hodinách, objem P/IS 400  $\mu$ l**, poté následovala již jen **centrifugace** za stejných podmínek bez inkubace

# Analytická metodika

## 2. Počáteční příprava analytického vzorku

- Celý proces byl také zkoušen na systému 10539735 fy Whatman
- Terčíky určené pro novorozenecký screening  
(filtrační papír s vyšším obsahem celulózy)
- Poněvadž se jedná o mnohem tenčí sací vrstvu může být doba vortexování oproti systému fy Capitainer zkrácena na dobu maximálně 3 hodin, doba 2 hodin již postačí



# Analytická metodika

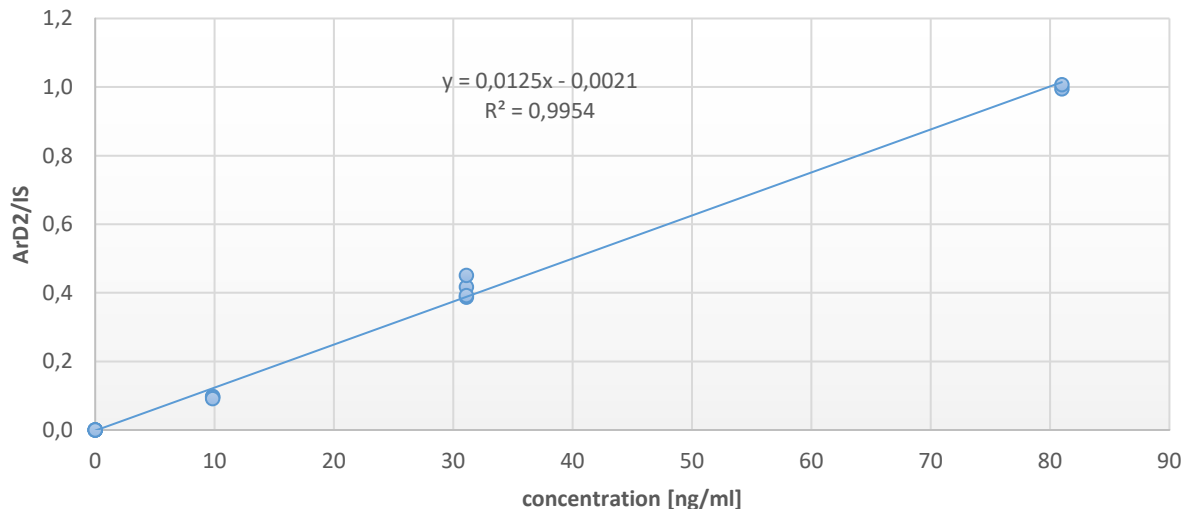
## 3. UHPLC/HRMS

- Systém Q EXACTIVE FOCUS (Thermo Fisher Scientific) v režimu plného skenu (full scan)
- Optimalizován v režimu Tune na MS7014 RECIPE<sup>®</sup> Optimisation Mix (parentní ionty: 395.325 – D2, 383.331-D3)
- UHPLC Ultima 3000, kolona LUNA<sup>®</sup>Omega, 1.6 $\mu$ m Polar C18, 50 x 2.1mm

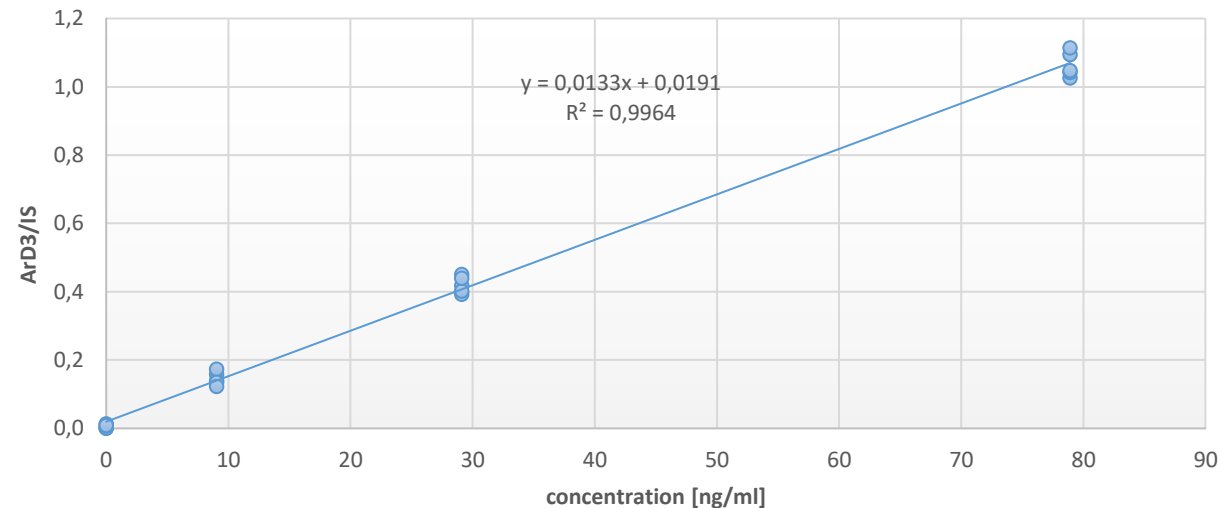
# Kalibrace

- Kalibrováno na **ClinCal<sup>®</sup>-Calibrator RECIPE**  
(0 – 197 nmol/l/D3,  $r^2 = 0.9964$ , 0 – 196 nmol/l/D2,  $r^2 = 0.9954$ )
- kontrolováno pomocí ClinChek<sup>®</sup> - Control (serum, Level I s cílovou hodnotou 35.5 nmol/l, bias 11% pro D2, s cílovou hodnotou 37.1 nmol/l, bias 9.4% pro D3, Level II s cílovou hodnotou 103.0 nmol/l, bias 6.3% pro D2, s cílovou hodnotou 105.0 nmol/l, bias 4.6 % pro D3)

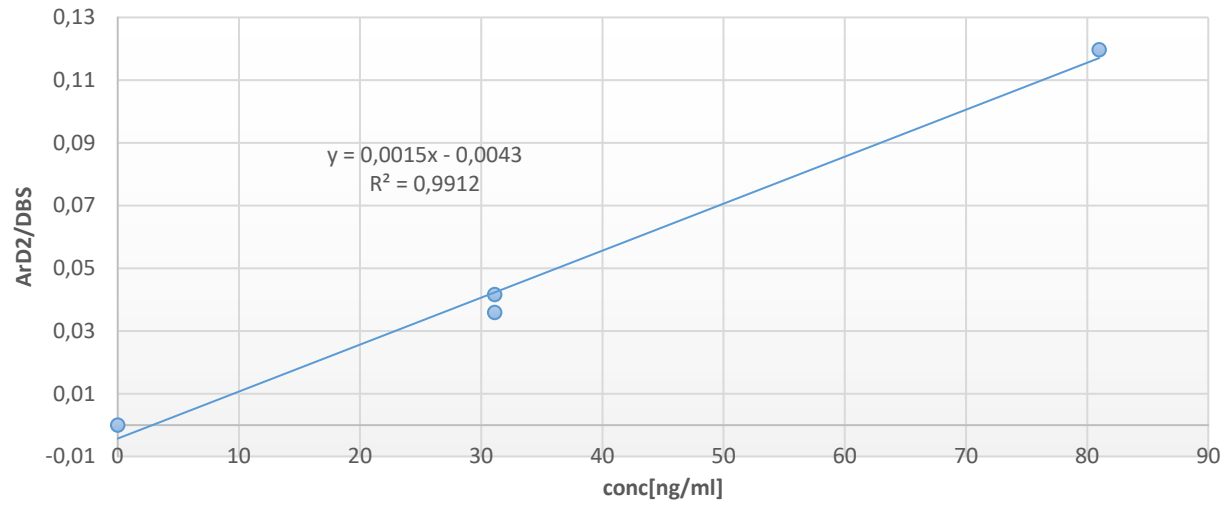
VITAMIN D2-Calibration, kolona LUNA Omega Polar C18



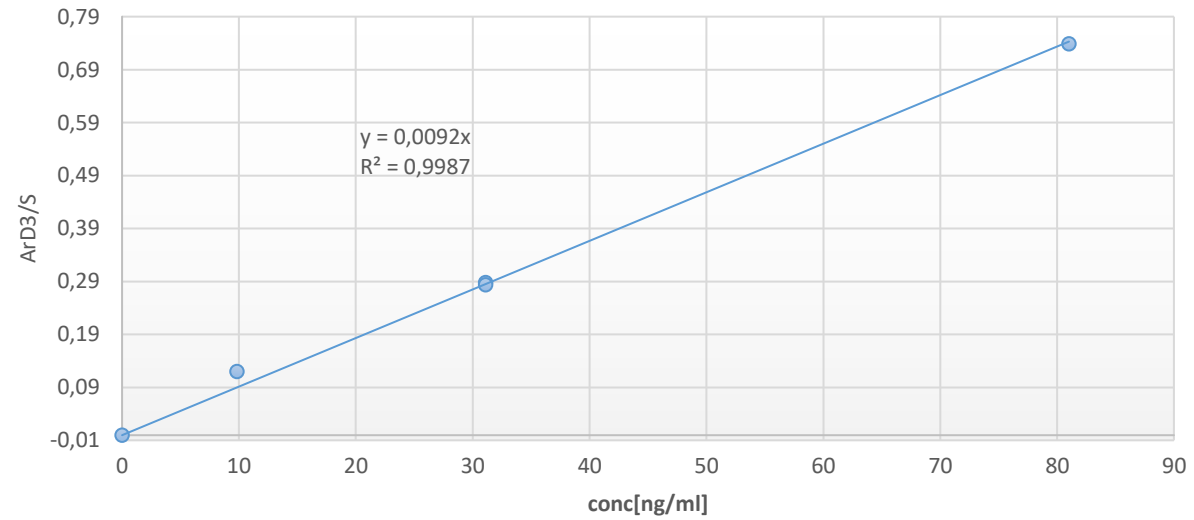
VITAMIN D3-Calibration, kolona LUNA Omega Polar C18



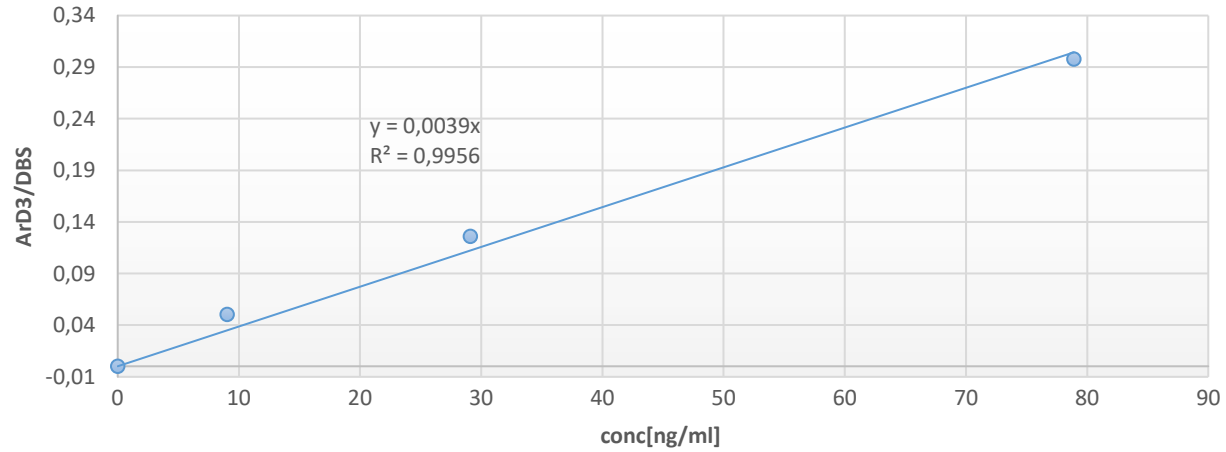
### 25OHD2/DBS



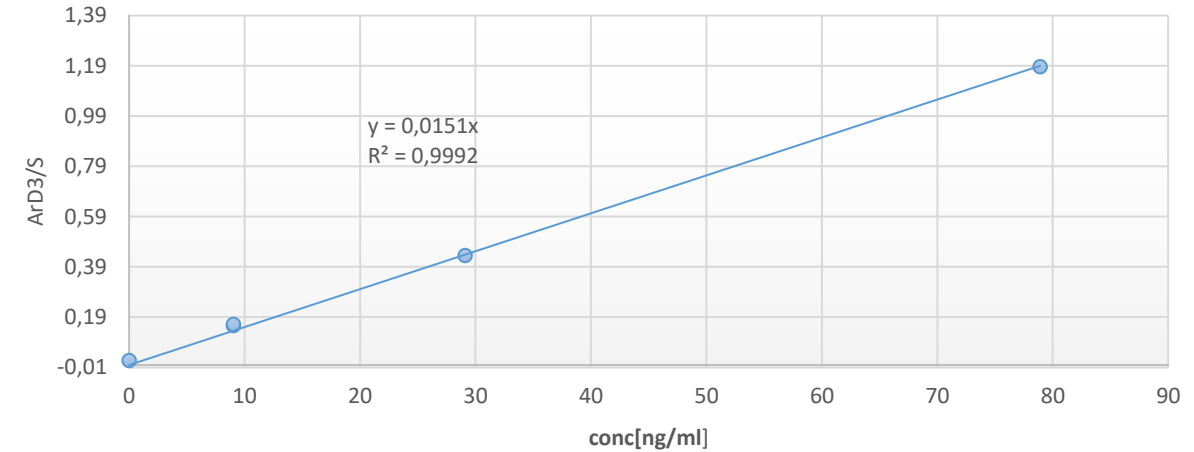
### 25OHD2/Serum



### 25OHD3/DBS



### 25OHD3/Serum



# Výsledky - DBS CAPITAINER B

- Ve vzorcích DBS u první skupiny 8 dobrovolníků stanoven  $D_3$  v rozsahu hodnot 22.56 – 93.56 nmol/l bez přepočtu na hematokrit
- $D_2$  v těchto vzorkách detekován nebyl
- Po optimalizaci doby třepání ad1. byla pro ověření na reálném vzorku DBS testována krev dobrovolnice s již podstatně vyšší hodnotou (62.57 nmol/l) a dále měřeny další DBS
- Druhá skupina 7 dobrovolníků porovnány hodnoty v séru vs. DBS



# Výsledky - DBS CAPITAINER

vzorek	25OHD3		
	[ $\mu\text{g/l}$ ]	[nmol/l]	doba vortex [h]
D	9,06	22,56	1,5
AH	15,74	39,19	1,5
AH29	16,87	40,99	1,5
JČ	12,23	29,72	1,5
L	11,41	27,73	1,5
M	13,89	33,75	1,5
MČ	10,74	26,10	1,5
T	13,14	31,93	1,5
LŠ	38,50	93,56	4,0
IP	25,75	62,57	4,0

# Výsledky - DBS vs. SERUM

- Ve vzorcích DBS:

D<sub>2</sub> v rozsahu hodnot 19,64 – 20,56 nmol/l bez přepočtu na hematokrit

D<sub>3</sub> v rozsahu hodnot 48,68 – 109,26 nmol/l bez přepočtu na hematokrit

- Ve vzorcích SERUM:

D<sub>2</sub> v rozsahu hodnot **BUDE DOPLNĚNO** nmol/l bez přepočtu na hematokrit

D<sub>3</sub> v rozsahu hodnot **BUDE DOPLNĚNO** nmol/l bez přepočtu na hematokrit

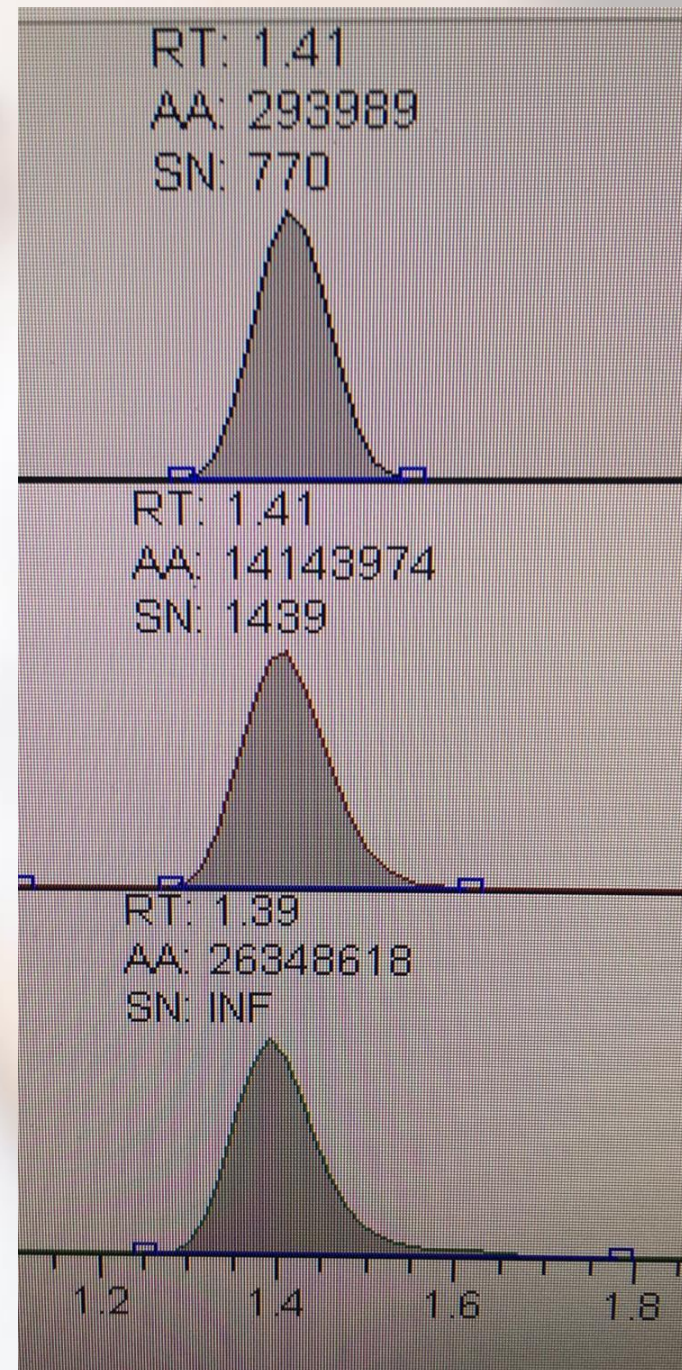
vzorek	DBS				SERUM			
	25OHD2 [µg/l]	25OHD2 [nmol/l]	25OHD3 [µg/l]	25OHD3 [nmol/l]	25OHD2 [µg/l]	25OHD2 [nmol/l]	25OHD3 [µg/l]	25OHD3 [nmol/l]
LS1/DBS	8,1189	19,6476	29,1486	72,5801	0	0	15,5658	38,7587
LS2/DBS	8,3089	20,1075	26,5299	66,0595	nebylo testováno			
MARPLISm_93	0	0	24,5576	61,1484	0	0	35,5498	88,5189
MARPLISz_71	8,2235	19,9009	28,4183	70,7616	0,2966	0,7177	18,5340	46,1497
MARPLISz_93	8,2628	19,9961	26,6676	66,4022	0	0	20,2460	50,4126
VLADPLm_69	0	0	43,8831	109,2689	0	0	36,0264	89,7058
IP	8,4980	20,5653	24,8268	61,8187	0	0	20,1662	50,2139
ALSLz_68	8,2687	20,0102	19,5521	48,6847	0	0	23,0024	57,2760
AH	nebylo testováno				0	0	16,6394	41,4320

# Venózní krev, muž, roč.1993

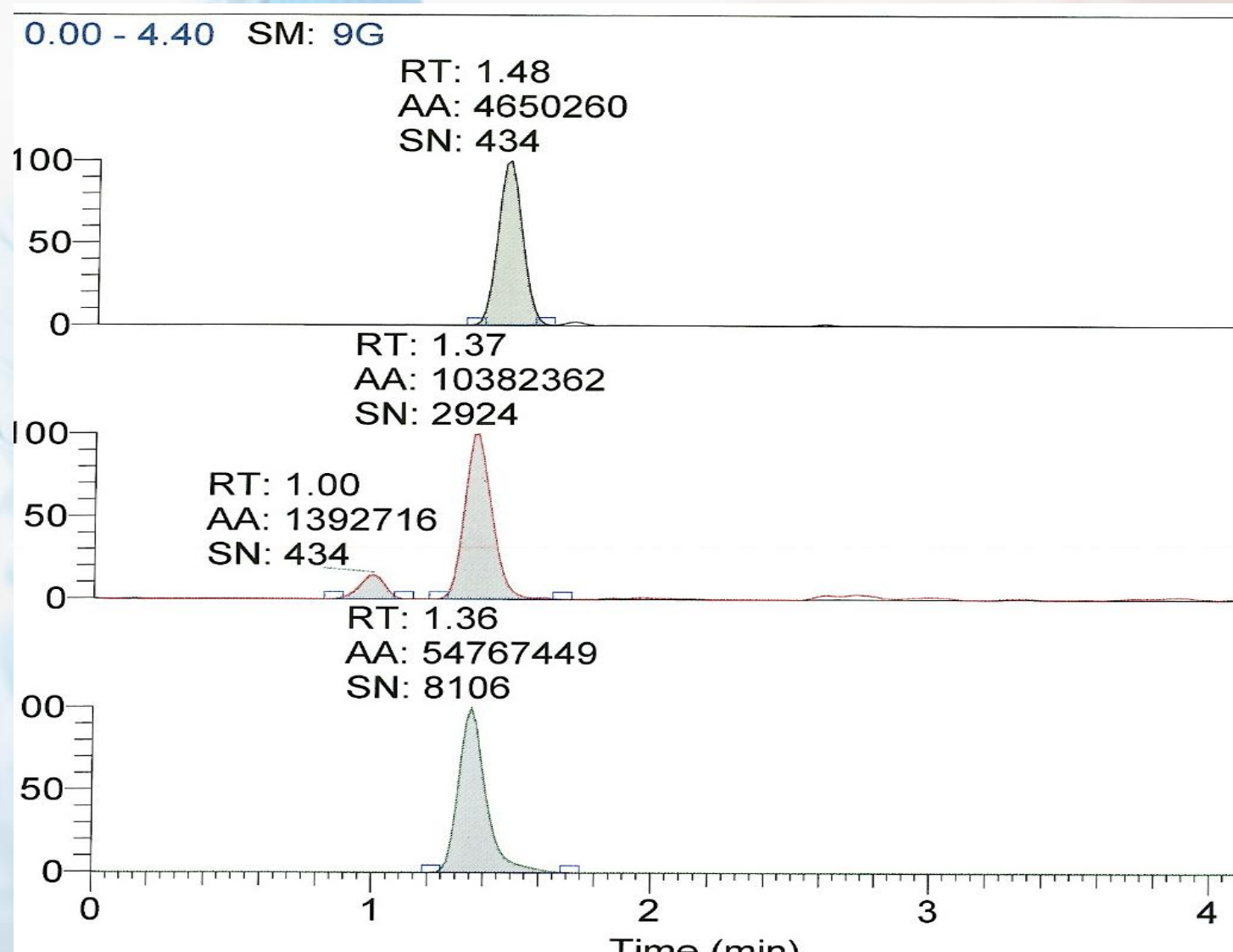
- 25OHD2

- 25OHD3

- IS



# RECIPE ClinChek<sup>®</sup>-Serum Control, Level I (mean value 14,7/14.9 µg/L)

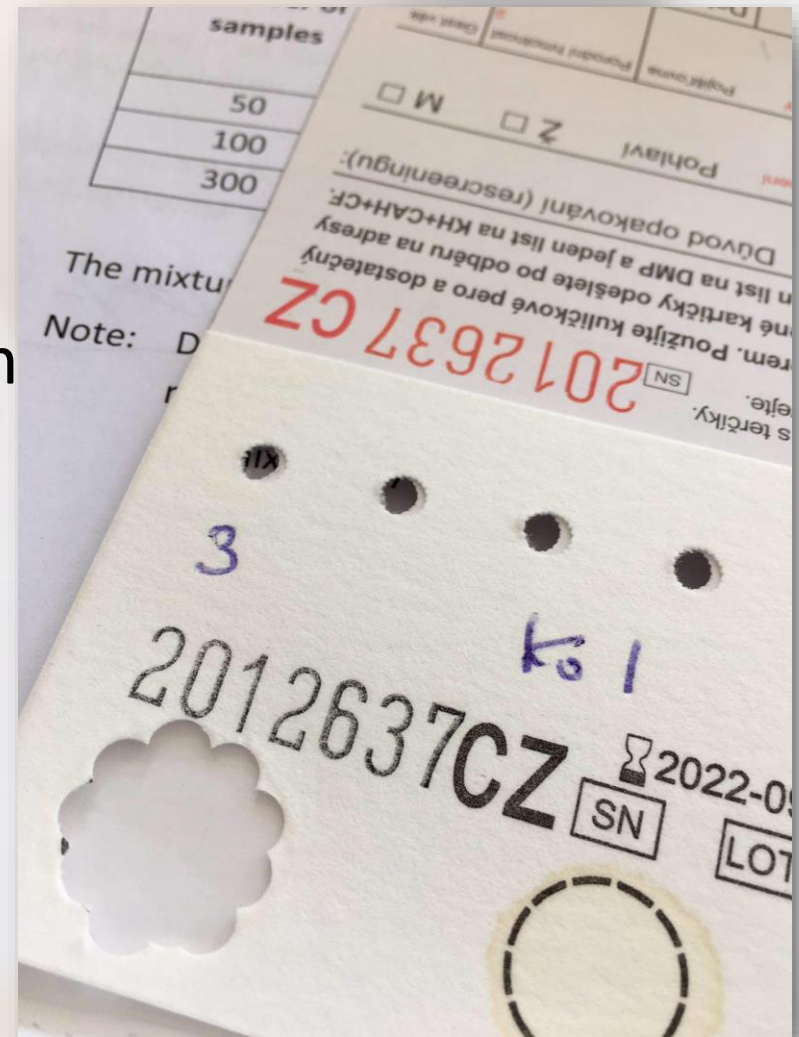


# Diskuse a závěr

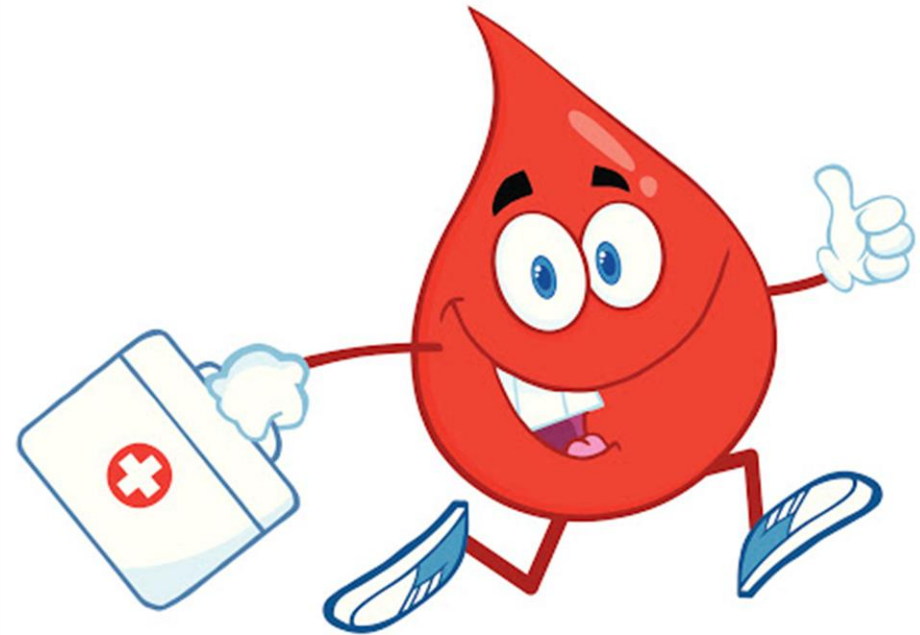
- Za optimální hladiny vitamínu D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> jsou četnými odborníky považovány hladiny v plasmě/séru kolem **100 nmol/l a vyšší**
- Avšak v evropské populaci včetně naší jsou nalézány hodnoty bohužel běžně **nižší než 50 nmol/l**
- Poznatky z první fáze vývoje metody byly úspěšně využity v nyní probíhající validační fázi, která zahrnovala přípravu 50 µl aliquotů rekonstituovaných kalibrátorů a kontrol hlubokým zmrazením na -70°C a jejich postupné proměřování v DBS režimu Capitainer a Whatman
- Validace DBS kalibrací bez nutnosti stanovení konvergenčního faktoru (kapalné vzorky v. DBS/kapilární krev v. krev venózní) z první fáze vývoje metody bude nutným předpokladem použití metody v rutinním režimu monitorování DBS vzorků širší populace zejména v rámci

# Závěr

- Nevýhoda Whatman terčků oproti Capitainer diskům - **větší poloměr**, nutnost celý terčik rozštípat speciálními štípacími kleštěmi na poměrně velký počet malých dílčích terčků → prodloužení doby centrifugace a celkové doby zpracování vzorku před extrakcí
- Nízké nálezy D2 jdou evidentně na konto **kvality nutrice dobrovolníků/pacientů** (i když prozatím statisticky nevýznamný počet), viz přirozené zdroje  $D_2/D_3$ .



# Děkuji za pozornost!



Poděkování všem **spolupracovníkům** Institutu nutriční a diagnostiky – RADANAL, s.r.o.  
za výborný a vysoce efektivní podíl na projektu.

Zvláštní poděkování za dostatečně neocenitelnou výtečnou pomoc při zpracování  
práce  
**Ing. Martině Plíškové**, RADANAL, s.r.o.



# Literatura

1. J. M. Lacey, Clin. Chem. 2004, 50:3, 621.
2. T. Wong, Clin. Chem. 1992, 38, 1830.
3. P. A. Donohue, The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8th ed., Vol. 3. New York: McGraw-Hill, 2001, 4077.
4. Wiesinger T., Mechtler TP, Schwarz M, Engl J., Kaspar DC, Steroid Profiling in Dried Blood Spots by using the RECIPE LC-MS/MS, ARCHIMEDlife/RECIPE Poster
5. Yetley EA, Pfeiffer CM, Schleicher RL, Phinney KW, Lacher DA, Christakos S, et al.: NHANES, 140(11), 2030S-2045S, 2010, DOI <http://doi.org/10.3945/jn.110.121483>.
6. MS7000, MS7100, MS7200, 25-OH-Vitamin D2/D3 in Plasma and Serum, ClinMass LC-MS/MS Complete Kit, Instruction Manual IVDD,98/79/EC, RECIPE GmbH
7. Mathew EM, Moorkoth S., Rane PD, Lewis L., Rao P.: Cost Effective HPLC-UV Method for Quantification of VitaminD2 and D3 in Dried Blood Spot: A Potential Adjunct to Newborn Screening for Prophylaxis of Intractable Paediatric Seizures, Chem.Pharm.Bull. 67(2), 88 -95(2019)
8. Heath AK, Williamson EJ, Ebelig PR, Kvaskoff D., Eyles DW, English DR: Measurements of 25-Hydroxyvitamin D Concentrations in Archived Dried Blood Spots are Reliable and Accurately Reflect Those in Plasma. J Clin Endocrinol Metab., September 2014, 99(9): 3319-3324, doi: 10.1210/jc.2014-1269
9. Gupta, R., Behera, C., Paudwal, G. *et al.* Recent Advances in Formulation Strategies for Efficient Delivery of Vitamin D. *AAPS PharmSciTech* **20**, 11 (2019)
10. Hoeller U, Baur M, Roos FF, et al. Application of dried blood spots to determine vitamin D status in a large nutritional study with unsupervised sampling: the Food4Me project. *Br J Nutr.* 2016;115(2):202-211.

*Srdečně zvu jménem organizátorův konference naše milé kolegyně a kolegy dychtící zažítí na okamžik genius loci místa oplývajícího legendami a dodnes dýchajícího jistým mystériem Ducha svatého k návštěvě barokního špitálu a bývalých lázní Jeho hraběcí Milosti, neohroženého pána pana Františka Antonína ze Šporků v blízkém Kuksu, kterouž svým slovem zasvěceným ve vsí skromnosti milerád opatřím a doprovodím*

