

Ústav lékařské chemie a klinické biochemie
2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole

**Stanovení obsahu křemíku v biologických materiálech
v závislosti na konzumaci minerální vody Krondorf**

Řešitel: **Prim. MUDr. Jana Čepová, Ph.D., MBA**
a kolektiv

Závěrečná zpráva z projektu Stanovení obsahu křemíku

Úvod

Křemík má v lidském organismu nezastupitelný význam. Podílí se zejména na tvorbě pojivové tkáně, kde má vliv na zlepšení její pevnosti a pružnosti. Nejvíce křemíku se nachází v kostech, dále v kůži, nehtech, vlasech, v zubní sklovině, ale i v aortě, očních čočkách, svalové hmotě, slinivce, štítné žláze. Křemík je také nezbytnou součástí mnoha enzymů. Křemík v těle pozitivně působí na snížení hladiny cholesterolu. Je důležitý při léčbě neurotoxicity hliníku, která je hypotetickým rizikovým faktorem pro rozvoj Alzheimerovy choroby. Mohl by být využíván při léčbě pacientů s osteoporózou, kde napomáhá lepšímu zabudování vápenatých iontů do kostní tkáně.

Toxicita perorálně podaného křemíku jako doplňku stravy nebyla pozorována. Nadměrný příjem z potravin může ale participovat na tvorbě močových kamenů.

Minimální denní dávka není v dostupné literatuře přesně stanovena. Doporučený denní příjem křemíku se v jednotlivých literárních zdrojích liší, nejčastěji je uváděno 5-20 mg (u sportovců až 35 mg).

Křemík se vyskytuje zejména v přesličce rolní, odkud se taktéž získává pro další využití (farmaceutický průmysl). V běžné potravě se vyskytuje v některých minerálních vodách, pivu, kuřecí kůži, vepřových játrech, celozrnných potravinách. Mezi potraviny s nejvyšším obsahem křemíku patří zejména obilniny - oves (3400-6300 mg/kg), ječmen (1400-2900 mg/kg) a pšenice (20-190mg/kg).

Dle publikace WHO z roku 1996 se koncentrace křemíku v moči pohybuje mezi 3-12 mg/l, zatímco v séru je koncentrace pouhých 0,3 mg/l.

Cíl studie

Cílem studie bylo stanovit množství křemíku v biologickém materiálu u zdravých jedinců po konzumaci pramenité minerální vody Krondorf obohacené křemíkem v dávce 42 mg/l.

Účastníci a design studie

Dobrovolníci

Studie se zúčastnilo celkem 30 subjektů (18 žen a 12 mužů) věkového rozmezí mezi 20 a 60 lety. Průměrný věk dobrovolníků je $39,0 \pm 18,5$ let. Všichni dobrovolníci byli zdraví, bez hypertenze, bez drogové zátěže, pili maximálně 3 kávy denně a neužívali žádné doplňky stravy.

Kontrolní skupina

Kontrolní skupinu tvořilo celkem 10 dobrovolníků (5 žen a 5 mužů), kteří vodu obohacenou křemíkem nekonzumovali a byli stejného věkového rozmezí jako dobrovolníků, tj. 20-60 let.

Design studie

Dobrovolníci byli rozděleni do dvou skupin podle délky konzumace, aby se projevilo případné zvýšení množství křemíku v těle při delší užívání vody obohacené o křemík v dávce 42 mg/l. V každé skupině bylo po patnácti dobrovolnících.

Konzumace minerální vody Krondorf a odběry biologického materiálu byly provedeny podle následujícího schématu:

1. skupina

odběr před začátkem pitné kúry → 1 týden pitná kúra → odběr po 1. týdnu → 1 týden pitná kúra → odběr po 2. týdnu → 2 týdny pauza → poslední odběr na konci 4. týdne

2. skupina

odběr před začátkem pitné kúry → 1 týden pitná kúra → odběr po 1. týdnu → 1 týden pitná kúra → odběr po 2. týdnu → 2 týdny pitná kúra → odběr po 4. týdnu → 4 týdny pauza → poslední odběr na konci 8. týdne

Kontrolní skupina dobrovolníků

pouze odběr biologického materiálu

Každý dobrovolník poskytl biologický materiál (ranní moč + krev) dle výše uvedeného schématu. Tento materiál byl následně laboratorně zpracován.

Moč byla odebírána do plastových sterilních jednorázových močových zkumavek (Monovette, Německo). Plná krev byla odebírána do speciálních plastových zkumavek určených pro analýzu stopových prvků (Vacuette, Rakousko). Plná krev byla centrifugována v chlazených centrifugách (4 °C) při 4000 otáčkách po dobu 10 minut. Získané sérum bylo odebráno, alikvotováno a skladováno při -18 °C; stejně tak i vzorky moči.

Metodika

Většina dostupné literatury pro stanovení křemíku je založena na principu atomové absorpční spektrometrie (AAS) a týká se převážně stanovení křemíku ve vodách (Li et al. Nutrition Journal 2010, 9:44; Barroso et al. Food Additives and Contaminants 2009, 2:2). Jedinou dostupnou publikací stanovení křemíku v biologickém materiálu je práce Davenwarda z roku 2013, ve které kolektiv autorů sledoval vliv křemíku na toxicitu hliníku u pacientů s Alzheimerovou chorobou.

Dalšími metodami umožňujícími toto stanovení jsou metody fotometrické. Jejich citlivost je nižší, ale jsou velmi snadno proveditelné a v běžných laboratořích přístrojově dostupné.

Nejvíce jsou rozšířeny metody založené na reakci křemičitanů s molybdenanem amonným v kyselém prostředí, kde molybdenan reaguje s křemičitany za vzniku žluté molybdatokřemičité kyseliny. Byl testován rozsah vlnových délek 200-500 nm a jako optimální vlnová délka pro fotometrické stanovení byla zvolena vlnová délka 350 nm.

Roztoky

Molybdenové činidlo: 7,5 g molybdenanu amonného rozpuštěno v 50 ml destilované vody a přidáno k 50 ml zředěného roztoku kyseliny dusičné (1:1)

Mravenčnanový pufr: 56,1 g hydroxidu draselného rozpuštěno v 250 ml destilované vody, přidáno 50 ml bezvodé kyseliny mravenčí a doplněno na objem 500 ml

Kalibrační roztoky křemíku: připraveny ze zásobního roztoku analytického standardu křemíku pro AAS (Sigma Aldrich) o koncentraci 1000 mg/l

Kalibrační křivka byla sestavena ze čtyř kalibračních bodů o koncentracích 1 mg/l, 2 mg/l, 5 mg/l a 10 mg/l. Ze získané regresní rovnice byly vypočítány koncentrace křemíku v biologických vzorcích. Hodnota spolehlivosti (R) byla vždy vyšší než 0,94.

Analýza vzorků

K 5 ml mravenčnanového pufru bylo přidáno 0,5 ml molybdenového činidla a doplněno destilovanou vodou na objem 12 ml. Nakonec bylo přidáno 0,5 ml vzorku. Poté byl vzorek krátce vortexován a měřen na spektrofotometru Helios (Thermo Fisher Scientific) při vlnové délce 350 nm. Při veškeré manipulaci se vzorky bylo použito plastové nádobí, aby se zabránilo výluhu Si ze skla.

Výsledky

Byla provedena validace metody, validační parametry byly stanoveny na dvou koncentračních hladinách.

Variační koeficient opakovatelnosti a reprodukovatelnosti obou hladin nepřesáhl 7,3 %. Bias u opakovatelnosti na obou hladinách nepřesáhl 12,0 %. Bias u reprodukovatelnosti na obou hladinách nepřesáhl 15,4 %.

Výsledky hodnot obou skupin byly zpracovány do přehledných tabulek. V Tab. 1. jsou uvedeny hodnoty dobrovolníků, kteří užívali vodu Krondorf po dobu dvou týdnů. V Tab. 2. jsou uvedeny hodnoty dobrovolníků, kteří užívali vodu Krondorf po dobu čtyř týdnů. V této studii byla měřena i kontrolní skupina dobrovolníků, u kterých byl proveden pouze jeden odběr (Tab. 3).

Diskuze

Pro zjištění pozitivních i negativních účinků konzumace minerální vody Krondorf na lidský organismus jsme dobrovolníky minerální vody požádali o vyplnění krátkého anonymního dotazníku.

- 71 % dobrovolníků nemělo během či krátce po skončení konzumace žádné zažívací obtíže (zácpa, průjem), 29 % mělo mírné zažívací potíže (zvýšená peristaltika a plynatost)
- 24 % dobrovolníků pozorovalo pozitivní vliv na kůži, vlasy a nehty (snížené vypadávání vlasů, vyšší pevnost nehtů)
- jemná perlivost při konzumaci vody nevadila 95 % dobrovolníků
- průměrná známka (1-nejlepší, 5-nejhorší) udělená účastníky hodnotící chuť vody byla 2,19

Mezi další účinky pozorované při daném pitném režimu dobrovolníci uvedli redukcii hmotnosti a pocit žízně po vypití celé lahve.

Závěr

Kvůli časové náročnosti vývoje metody, přípravy a měření vzorků se nám podařilo vyvinout pouze spektrofotometrickou metodu na stanovení křemíku v moči. Vývoj metody stanovení křemíku v séru by představoval časově daleko náročnější úkol, který byl v tomto časovém rozpětí nerealizovatelný.

U kontrolní skupiny dobrovolníků hladina křemíku většinou nepřesáhla limit detekce (< 1 mg/l).

V příložených tabulkách jsou dobrovolníci rozděleni dle délky užívání vody Krondorf a dále dle pohlaví (F – žena, M – muž).

Bylo provedeno porovnání dat pomocí t-testu mezi jednotlivými týdny odběrů u obou skupin dobrovolníků. Ve skupině dobrovolníků užívajících vodu Krondorf 2 týdny (Tab. 1) je statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$) mezi hladinami křemíku před započítáním experimentu a po 2 týdnech užívání minerální vody (ukončení experimentu). Hladiny křemíku se statisticky významně neliší ($p > 0,01$) při porovnání hladin před započítáním experimentu a po 2 týdnech od ukončení pitné kúry.

U druhé skupiny dobrovolníků (Tab. 2), kteří užívali minerální vodu 4 týdny je rozdílnost dat podobná první skupině dobrovolníků. Statisticky významně ($p < 0,01$) se liší hladiny křemíku mezi odběry před započítáním experimentu a po 2 týdnech užívání vody. Totéž platí i pro hladiny křemíku mezi odběry před započítáním experimentu a po 4 týdnech užívání vody ($p < 0,01$). Hladiny křemíku po 2 týdnech užívání a po 4 týdnech užívání nevykazovaly významnou odlišnost dat ($p > 0,01$). Nevýznamnou odlišnost dat ($p > 0,01$) vykazují hladiny křemíku mezi odběry před započítáním experimentu a po 4 týdnech od ukončení pitné kúry.

Dále jsme porovnávali obě skupiny dobrovolníků mezi sebou. Při porovnání hladin křemíku z odběrů před započítáním experimentu jsme prokázali statisticky nevýznamnou rozdílnost dat ($p > 0,01$). Totéž platí jak pro porovnání dat z odběrů po 2 týdnech užívání minerální vody, tak pro porovnání dat z odběrů po absenci minerální vody. Statisticky nevýznamnou odlišnost

dat jsme také prokázali u hladin křemíku z odběrů po 4 týdnech užívání vs. 2 týdnech užívání minerální vody ($p > 0,01$).

Při porovnání odlišnosti dat mezi odběry před zahájením experimentu u obou skupin dobrovolníků a u kontrolní skupiny dobrovolníků (Tab. 3) jsme prokázali statisticky nevýznamnou rozdílnost dat ($p > 0,01$).

V dostupné literatuře (Davenward et al. Journal of Alzheimer's Disease 2013, 33) zabývající se užíváním minerálních vod s vysokým obsahem křemíku užívali dobrovolníci dané vody po dobu až 12 týdnů jeden litr za den. Tato studie prokázala, že již po 2 týdnech užívání obohacené vody křemíkem lze pozorovat nárůst hladin křemíku v moči. Po ukončení pitné kúry se hladiny křemíku vrátily na původní hodnoty.

Poděkování

Tato studie vznikla za finanční podpory dotace Karlovarského kraje.



Přílohy

Tabulka 1 - Dvoutýdenní užívání vody Krondorf

Koncentrace Si v moči (mg/l)	před zahájením užívání	po týdnu užívání	po dvou týdnech užívání (konec užívání)	po dalších dvou týdnech abstinence
Dobrovolník číslo				
2/F	2,69	2,84	5,92	<1,00
6/F	3,48	8,63	8,88	1,39
9/F	7,20	9,36	10,24	9,03
10/F	4,09	6,92	8,70	2,75
11/F	<1,00	1,27	5,38	<1,00
23/F	<1,00	6,55	7,32	3,65
25/F	<1,00	4,04	6,72	4,21
26/F	2,25	4,91	6,45	3,59
27/F	<1,00	<1,00	1,37	<1,00
28/F	<1,00	<1,00	1,05	<1,00
12/M	1,07	2,81	5,04	2,99
24/M	<1,00	6,62	8,13	3,02
30/M	3,28	6,99	8,58	4,51
31/M	<1,00	5,73	6,88	4,70
33/M	1,82	2,16	5,28	4,19
Průměr	2,19	4,72	6,40	3,20
SD	1,76	2,79	2,58	2,13

Tabulka 2 - Čtyřtýdenní užívání vody Krondorf

Koncentrace Si v moči (mg/l)	před zahájením užívání	po týdnu užívání	po dvou týdnech užívání	po 4 týdnech užívání (konec užívání)	po dalších 4 týdnech abstinence
Dobrovolník číslo					
5/F	3,47	4,59	7,04	9,27	1,99
13/F	<1,00	7,88	8,48	8,48	<1,00
15/F	<1,00	4,14	7,66	2,62	<1,00
18/F	<1,00	7,69	9,20	9,42	<1,00
19/F	1,05	1,55	4,12	6,94	1,54
20/F	<1,00	1,10	1,71	2,19	<1,00
21/F	<1,00	8,42	8,52	9,25	2,68
22/F	4,07	6,74	9,03	9,19	7,32
1/M	1,02	3,62	3,89	5,39	1,52
3/M	<1,00	<1,00	<1,00	4,80	2,39
4/M	<1,00	<1,00	<1,00	5,15	3,34
7/M	6,27	6,83	7,26	12,33	7,35
8/M	5,10	5,33	7,32	9,38	3,16
14/M	<1,00	1,63	1,82	<1,00	<1,00
17/M	<1,00	1,10	3,05	9,36	<1,00
Průměr	2,00	4,17	5,41	6,99	2,49
SD	1,80	2,83	3,12	3,29	2,13

Tabulka 3 – Kontrolní skupina

Kontrolní skupina	Koncentrace Si v moči (mg/l)
M	1,27
M	<1,00
M	<1,00
M	<1,00
M	1,02
F	<1,00
F	<1,00
F	1,36
F	2,45
F	<1,00
Průměr	1,21
SD	0,46