



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO
“ANÁLISIS DE LA VITAMINA D EN
MUESTRAS BIOLÓGICAS MEDIANTE
TÉCNICAS ANALÍTICAS CROMATOGRÁFICAS
(HPLC)”

Autor: Pedro Daniel Melián Peña

Fecha: 29/06/2019

Tutor: Ana Isabel Olives Barba

ÍNDICE

1	Introducción y antecedentes.....	4
1.1	Historia de la vitamina D.....	4
1.2	Fisiología	4
1.3	Biosíntesis.....	5
1.4	Valores de referencia	6
1.5	Fisiopatología relacionada a la vitamina D.....	7
2	Objetivos.....	9
3	Material y métodos.....	9
4	Resultados y discusión.....	9
4.1	Descripción de la cromatografía HPLC:	9
4.2	Métodos principales para el análisis de la vitamina D:	14
5	Conclusiones	20
6	Bibliografía	20

Resumen:

En este estudio se ha realizado una descripción tanto de la vitamina D, como de los diferentes métodos para el análisis de ésta. Se ha comenzado con una descripción de la vitamina D, que incluía la historia de la misma, su biosíntesis y los procesos biológicos donde se encuentra presentes. A su vez se han descrito patologías que pueden ocurrir por encontrarse las concentraciones sanguíneas fuera de los valores de referencia que también se establecen. Se han propuesto diferentes métodos para la medición de estos valores, estableciendo una relación entre ellos, la eficacia y utilidad en la práctica diaria para la prevención y tratamiento de estas patologías. Se ha descrito el mecanismo y los componentes presentes en un equipo de HPLC , citando los avances tecnológicos que este tipo de métodos para el análisis de la vitamina D han sido descubiertos en los últimos tiempos. Se han puesto de ejemplo dos estudios donde se analizaban la vitamina D, con este tipo de equipos especificando más sobre el tipo de muestras y su preparaciones , a la vez que los diferentes tipos de columnas cromatográficas utilizadas. Por último, se ha realizado una reflexión sobre las diferencias que los métodos analíticos presentaban, y una relación entre la utilidad y el coste de los mismos.

Abstract

In this study, a description has been made of both vitamin D and the different methods for its analysis. It has begun with a description of vitamin D, which included the history of it, its biosynthesis and the biological processes where it is present. In turn, pathologies have been described that can occur because blood concentrations are outside the reference values that are also established. Different methods have been proposed for the measurement of these values, establishing a relationship between them, the efficacy and utility in daily practice for the prevention and treatment of these pathologies. The mechanism and the components present in an HPLC team have been described, citing the technological advances that this type of methods for the analysis of vitamin D have been discovered in recent times. Two studies were analyzed where vitamin D was analyzed, with this type of equipment specifying more about the type of samples and their preparations, as well as the different types of chromatographic columns used. Finally, a reflection was made on the differences that the analytical methods presented, and a relation between the utility and the cost of the same.

1 Introducción y antecedentes

1.1 *Historia de la vitamina D*

La comunidad científica describe la vitamina D como un avance evolutivo remoto. El fitoplancton y el zooplancton que viven en el océano desde hace 500 millones de años producen vitamina D cuando se exponen al sol. Durante la revolución industrial, en el siglo XVII, en el norte de Europa es cuando diversos científicos como Glissen, DeBoot y Whistler, citan por primera vez evidencias de que una escasez de exposición solar provocaba un retraso en el crecimiento de los niños y desarrollaban deformidades esqueléticas, denominándolo raquitismo. En el año 1822 fue Sniadecki el primero en relacionar directamente esta enfermedad con la exposición al sol. Sin embargo, tuvieron que pasar casi 100 años, para que en 1921 McCollum descubrió una sustancia presente en ciertas grasas que podía prevenir el raquitismo. Fue entonces cuando se encontró la cuarta vitamina y es el motivo por el que se la conoce como vitamina D. Un año más tarde el doctor Hess publicó que exponer al sol a los niños de su Hospital en Nueva York diariamente durante meses, era un tratamiento óptimo para el raquitismo.

1.2 *Fisiología*

La vitamina D es una hormona compleja que interviene en la homeostasis del calcio y en otras múltiples funciones en diversos órganos. Es una vitamina liposoluble, su forma más activa es el calcitriol. Existen dos tipos de vitamina D: la vitamina D3, o colecalciferol, y la vitamina D2, o ergocalciferol. La vitamina D3 es la principal fuente de vitamina D en el ser humano, es sintetizada por la piel gracias a la acción de la luz ultravioleta (UVB) sobre la 7-dehidrocolesterol. La principal fuente natural de vitamina D es consecuencia de la exposición solar, por ello no se le puede denominar vitamina como tal, pues una vitamina se considera como tales aquellos compuestos orgánicos que el organismo necesita en cantidades pequeñas. Como el ser humano es capaz de sintetizar vitamina D por sí solo, la podemos considerar una hormona. Este es el principal mecanismo de obtención de la vitamina en el ser humano, existen otros métodos como es la ingesta de algunos alimentos tales como el pescado azul y algunos aceites de pescado, la yema de huevo, el hígado y la grasa de algunos mamíferos marinos, pero en todos ellos su presencia sería en cantidades significativas. Es decir, que sin la exposición solar sería prácticamente imposible llegar a los niveles requeridos a no ser del uso de complementos vitamínicos. Por otro lado la vitamina D2 la producen los hongos, gracias también a la exposición solar y nosotros podemos obtenerla ingiriendo estos hongos.

Para el estudio de la vitamina D es importante diferenciar las distintas formas de la misma. El calcitriol ó 1,25(OH)2D, es la forma activa, sin embargo el calcidiol ó 25(OH)D, es la forma más abundante en nuestro organismo, y en su defecto, será la que utilizaremos para la medición de la vitamina D en las diferentes muestras biológicas que nos indicará si existe o no insuficiencia. El calcitriol será clave en la homeostasis del calcio, aunque en la actualidad se conoce que no solo se limita a regular la mineralización ósea y el metabolismo

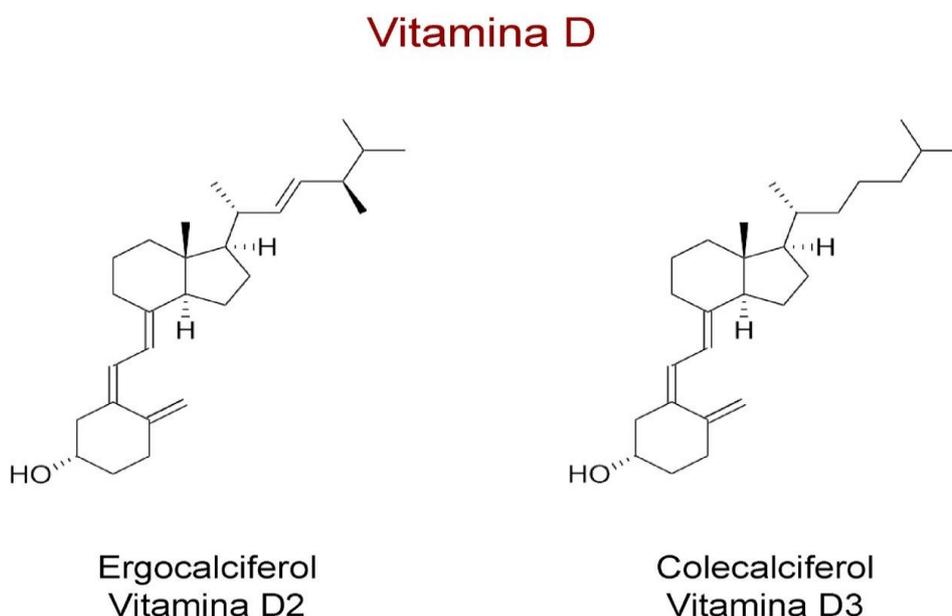
fosfocálcico, sino que es una de las sustancias más potentes inductoras de la maduración celular e inhibidoras de la proliferación celular.

Muestra de ello, es que diversos estudios realizados demuestran que existen receptores del calcitriol en múltiples órganos y tejidos, como el páncreas(células beta), los osteoblastos, los linfocitos B y T activados, el estómago, el intestino delgado y el colon, el cerebro, el aparato yuxtglomerular, el corazón, las células del músculo liso vascular, las gónadas, la próstata y la mama. Debido a la presencia de numerosos receptores en diferentes localizaciones, se le atribuyen diversas funciones tales como la modulación de los linfocitos B y T activados, la estimulación de producción de insulina, prevención de la enfermedad inflamatoria, efectos de contractibilidad miocárdica y promoción de la secreción de TSH, entre otras. Este es el motivo por lo que cada vez se le da más importancia a esta vitamina, ya que su déficit se relaciona con múltiples patologías.

1.3 Biosíntesis

Quando hablamos de vitamina D, tenemos que considerar dos moléculas de estructura y origen diferente, como hemos indicado anteriormente:

- La vitamina D3 o colecalciferol, formada en la piel a partir de la absorción de radiación UV por el 7-dehidrocolesterol (fig. 1).
- La vitamina D2 o ergocalciferol, formada por la acción de la radiación ultravioleta sobre el esteroide ergosterol en las plantas.

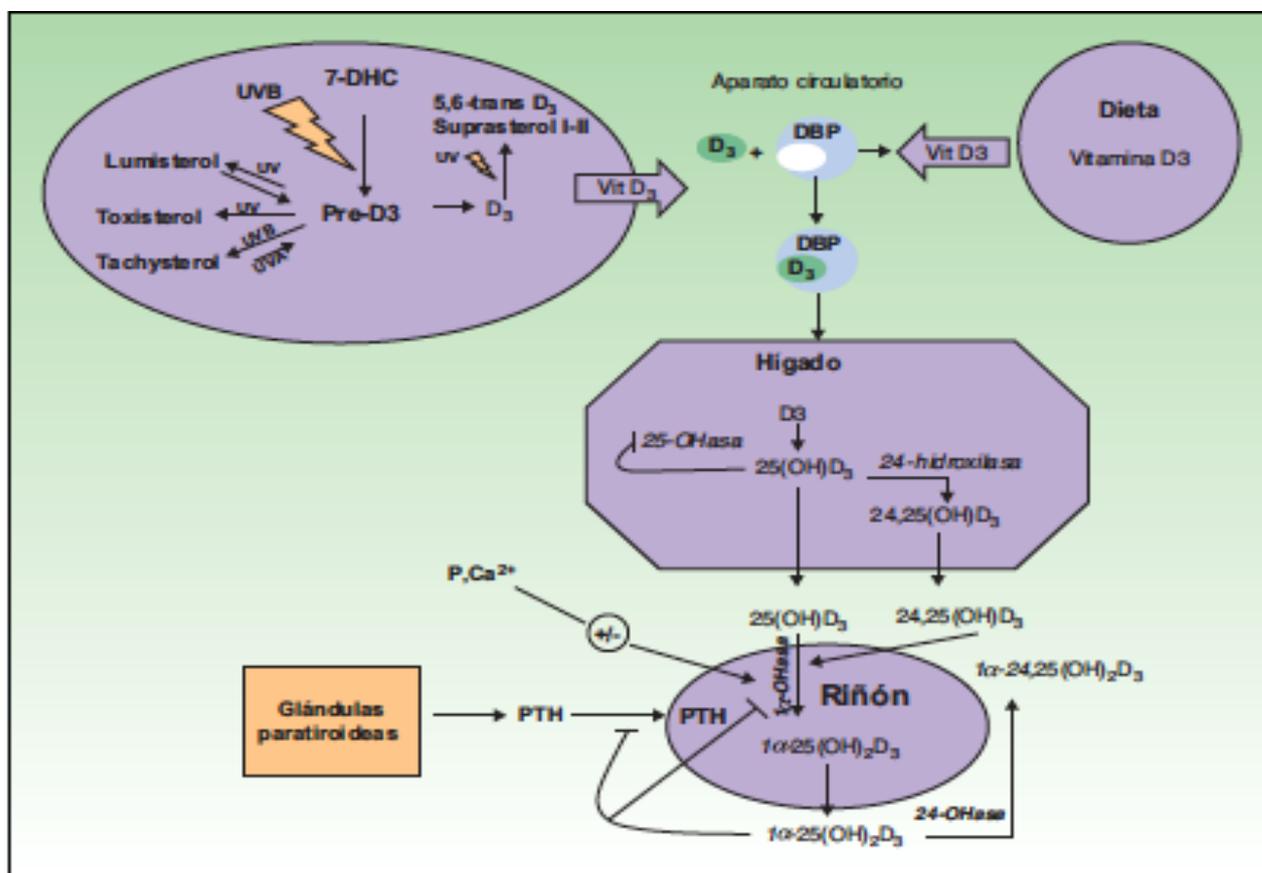


<http://las-hormonas.blogspot.com/2013/07/la-vitamina-d-de-mis-huesos.html>. Fig1

Estructura química de las dos moléculas de vitamina D.

A partir del 7-dehidrocolesterol, o provitamina D3, y tras la absorción de radiación ultravioleta se forma el compuesto llamado pre-vitamina D3. Tras este primer paso, y mediante la absorción de fotones tanto del tipo UVB como UVA y una batería de reacciones

fotorreversibles, se forman otros derivados tipo lumisterol y taquisterol, del mismo modo que a través de la absorción de fotones por parte de la vitamina D₃ se producen compuestos como la 5,6-trans-vitamina D₃ y suprasterol I y II (fig. 2). La vitamina D₃ es excretada al exterior, junto al cofactor de la proteína transportadora de la vitamina D (DBP), viaja por el torrente sanguíneo hasta que finalmente llega al hígado. Aquí y tras sucesivas reacciones enzimáticas es hidroxilada hasta formar el compuesto 25-hidroxivitamina D₃, o 25(OH)D₃, o como mencionamos antes el calcitriol. Tras la primera hidroxilación, puede sufrir a su vez una segunda, catalizada por la enzima 24-hidroxilasa, dando lugar a la forma 24,25(OH)D₃. El calcitriol es la forma circulante mayoritaria que luego volverá a ser hidrolizada, pero a diferencia de la anterior, esta hidroxilación ocurrirá en el riñón. Esta última reacción estará catalizada por la enzima 1-hidroxilasa, y producirá la forma más activa de la vitamina, también conocida como 1,25-hidroxivitamina D₃, o 1,25(OH)D₃. Sin embargo, todos estos mecanismo fisiológicos vendrán regulados por diferentes factores como son el metabolismo tanto del fósforo y el calcio, la parathormona(PTH) y el magnesio.



Gilaberte Y, Aguilera J, Carrascosa J.M, Figueroa F.L, Romaní de Gabriel J, Nagore E. La vitamina D: evidencias y controversias. Actas Dermosifiliogr. 2011;102(8):572-588 Fig 2
 Vías metabólicas de la síntesis de vitamina D. DBP: proteína transportadora de la vitamina D; 7-DHC: 7-dehidrocolesterol; Pre-D3: pre-vitamina D₃; PTH: parathormona.

1.4 Valores de referencia

Dentro de los estudios de la vitamina D, sus fuentes de obtención o mecanismos fisiológico en los que interviene, tenemos que establecer lo valores de referencia que indican

unos niveles óptimos. La determinación de estos valores se realiza en su mayoría, midiendo la concentración sérica de 25-OH-vitamina D, que a su vez nos permite clasificar la situación de los depósitos corporales de vitamina D en; “normal”(concentraciones de 30-75ng/mL), “insuficiencia”(20-30ng/mL), “deficiencia”(valores inferiores a 20ng/mL). Sin embargo estos valores pueden variar según los criterios aplicados en las diferentes comunidades científicas.

Desde un punto de visto fisiológico los valores de 25-OH-vitamina D serían adecuados cuando sean capaces de mantener concentraciones normales de PTH y una absorción intestinal de calcio máxima. La relación entre las concentraciones de PTH y 25-OH-vitamina D no es lineal y hay gran variabilidad, ya que una vez se alcanzan valores críticos por debajo de 20ng/mL, la PTH estaría en un estado de máxima supresión, mientras que a partir de valores por encima de 30ng/mL se consideraría un estado de normalidad pudiendo llegar hasta los 70ng/ml. Por ello existe esta diferencia de opiniones dentro de las sociedades científicas, aunque todas establecen que a partir de 30ng/mL de 25-OH-vitamina D en sangre serían valores normales y que todos lo que superen los 20ng/mL son suficientes para proteger al 97,5% de la población de los efectos deletéreos de la insuficiencia de vitamina D.

1.5 Fisiopatología relacionada a la vitamina D

Previamente se hizo mención a las diferentes funciones biológicas donde interviene la vitamina D. Aunque es cierto que en la anterioridad se la denominaba la vitamina de los huesos, cada vez se descubren más procesos biológicos donde se demuestra que juega un papel fundamental. Las funciones más importantes donde interviene son en la homeostasis del calcio y la modulación de la respuesta inmune, y en su defecto mencionaré las patologías derivadas por la hipovitaminosis, aunque también haré mención a otras patologías no relacionadas con estos dos procesos.

- **Metabolismo óseo:** la vitamina D interviene en el mantenimiento de los niveles séricos de calcio evitando la hipocalcemia y estimulando la mineralización a través de un triple mecanismo. Por lo tanto desde un punto de vista clínico su déficit es un factor de riesgo para la osteoporosis.
- **Enfermedades autoinmune:** recientemente se descubrió que la vitamina D tiene un receptor en la mayoría de células del sistema inmune adaptativo. Se ha demostrado que el calcitriol inhibe la proliferación de los linfocitos T, la secreción de citocinas y la progresión del ciclo celular. En relación a las diferentes funciones de la vitamina, ocurrirán patologías autoinmunes cuando los individuos no alcancen los valores de referencia:

Esclerosis múltiple: diversos estudios han demostrado que el déficit de vitamina D, produce una mayor incidencia de esta enfermedad, aunque hace referencia sobretudo a pacientes de raza blanca. Por otro lado, también sugieren diversos estudios que suplementar con vitamina D a pacientes en remisión de la enfermedad puede prevenir a la aparición de nuevos brotes, aunque también estar condicionado por déficit de otros elementos o de la radiación ultravioleta.

Diabetes mellitus: en un estudio multicéntrico se comprobó una relación inversa entre la radiación UVB y la incidencia de la diabetes mellitus tipo I. También se demostró que la administración de 2000 IU/día de vitamina D disminuyó significativamente el desarrollo de DM insulino dependiente.

Psoriasis: en 1985 se descubre que la administración de vitamina D3 mejora la psoriasis en un caso aislado, sin embargo su capacidad de alterar el metabolismo del calcio limitó su uso. Se buscó análogos de la vitamina pero con menos actividad hipercalcemiante. Las acciones biológicas de estos análogos incluyen la regulación de la proliferación y diferenciación celular epidérmica, la inhibición de la angiogénesis y la modulación de la producción de citocinas. Gracias a estas diversas funciones que presentan se han utilizado en otros procesos centrados en la alteración de la cinética celular como algunos tipos de cáncer.

- **Infecciones:** la vitamina D juega un papel fundamental en la activación de la inmunidad inmediata a través de los receptores Toll-like. Circunstancia que nos indica su participación en la aparición de diversas infecciones, ya que estos receptores son unos de los primeros en actuar frente a cualquier patógeno, y una lenta o nula activación puede significar el desarrollo de una infección.

- **Enfermedades cardiovasculares:**

Hipertensión: la vitamina D interviene en los procesos de regulación de la tensión arterial a través de la inhibición del sistema renina-angiotensina, aunque probablemente también están implicados otros factores como el metabolismo del calcio o la prevención del hiperparatiroidismo.

Insuficiencia cardiaca congestiva: en principio se podría relacionar la insuficiencia cardiaca congestiva con las otras patologías ya citadas como puede ser una mal tratada diabetes mellitus o la hipertensión arterial. Sin embargo el concepto de ICC(insuficiencia cardiaca congestiva) ha cambiado desde una perspectiva puramente hemodinámica, hacia una visión más global donde también se incluyen conceptos como citocinas proinflamatorias, tales como la interleucina 6 o el factor de necrosis tumoral. Varios estudios epidemiológicos demuestran que una hipovitaminosis D, aumentan la prevalencia de este tipo de patologías y a su vez se observó que la mortalidad de estos pacientes era mayor en invierno, cuando la exposición lumínica es inferior. También es conocido, que los receptores de vitamina D, se expresan en los cardiomiocitos, las células del músculo liso vascular y el endotelio, donde la vitamina D puede estar implicada en la inflamación, la proliferación y la diferenciación celular.

- **Cáncer:** en diferentes estudios que se han realizado, se ha relacionado niveles óptimos de vitamina D con una menor incidencia del cáncer y un aumento de la supervivencia en aquellos pacientes que tenían valores adecuados de la vitamina. Su mecanismo de acción tiene una alta probabilidad de estar relacionado con los efectos que posee la vitamina D sobre la muerte celular, angiogénesis y la diferenciación celular. Por ello los estudios han evaluado los niveles de vitamina D, los polimorfismos en el receptor de la vitamina D (VDR) y los suplementos dietéticos con el papel que desempeña la vitamina en la carcinogénesis.

2 OBJETIVOS

- Describir las Técnicas Analíticas más frecuentemente utilizadas en el análisis de la vitamina D.
- Ejemplos de análisis de vitamina D por HPLC en muestras biológicas. Comparación con otras técnicas no cromatográficas.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de esta revisión bibliográfica descriptiva se utilizaron buscadores de fuentes bibliográficas primarias y secundarias. Se llevaron a cabo una serie de búsquedas en la base de datos UpToDate®, PubMed, GoogleScholar y SciELO además de otras fuentes de información .

La estrategia de búsqueda consistió en la utilización de las siguientes palabras clave: “Vitamina D”, “HPLC”, “25 OHD”. La búsqueda se completó con la revisión de algunas de las referencias incluidas en los artículos recuperados y la consulta de libros con información relevante sobre el tema en cuestión. La selección de dichos artículos fue realizándose, mediante la evaluación de los títulos y sus resúmenes. A su vez se incluyeron informaciones y resultados de diferentes estudios experimentales que fueron esenciales a la hora de aportar datos que nos aportara los conocimientos necesario para poder hacer una conclusión óptima. También se obtuvieron tablas e imágenes que nos ilustraron los conceptos que queríamos transmitir en el estudio.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

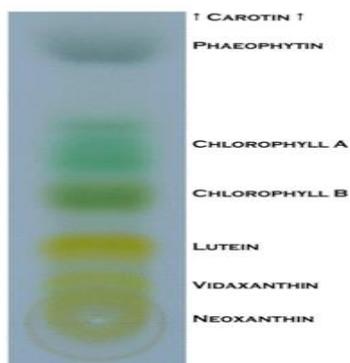
4.1 Descripción de la cromatografía HPLC:

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica analítica de separación más utilizada en la actualidad, acoplada con distintas modalidades de detección.. Un ejemplo de ello es su acoplamiento a la espectrometría de masas, conocido como técnica *tandem* (HPLC-MS), una técnica analítica conocida como la *gold-standard* para el análisis de la vitamina D.

Introducción histórica de la cromatografía:

La cromatografía fue descrita por primera vez en 1906 por el italiano nacido en Rusia Mikhail Tswett, utilizándose en sus comienzos para separar pigmentos vegetales. Se basó en un cono formado por un tubo de vidrio (en vertical) relleno de carbonato cálcico en polvo (fase estacionaria) y usando éter como eluyente (fase móvil). La solución recorrió el tubo, y los componentes individuales de la mezcla migraron hacia abajo con diferentes velocidades; la columna quedó marcada con bandas horizontales de distintos colores correspondientes a pigmentos diferentes. El resultado fue llamado cromatograma, justificando el nombre que se dio a la técnica: chroma, del griego, que significa «color», y graphein, que significa «escribir». En 1931, Kuhn y Lederer utilizaron la cromatografía líquida para separar muchos productos naturales. En 1952, Martin y Synge introdujeron la cromatografía de reparto, empezando a utilizar el concepto de la distribución y coeficiente de reparto. Stahl, en 1956, interesado en la separación de los componentes de las células, diseñó un aparato que aplicaba capas de adsorbente en placas, llamándolo cromatografía de capa delgada o fina. Al final de los sesenta y tras haberse desarrollado ampliamente la técnica, se comenzó con la fabricación de columnas, rellenos y detectores en continuo que permitió el nacimiento de la cromatografía líquida de alta eficacia o alta resolución, también denominada cromatografía de HPLC.

Primer cromatograma:



<https://vdocuments.mx/chromatography-and-instrumentation-invented-by-a-russian-botanist-mikhail.html> Fig 3

Primer cromatograma realizado por Mikhail Tswett

Fundamentos de la técnica:

La cromatografía líquida es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Esta técnica contiene dos fases por donde se distribuirán los analitos de la mezcla en función de sus afinidades con las diferentes fases de la cromatografía. Existe una fase estacionaria (columna) y una fase móvil. La muestra es inyectada en la fase móvil, los componentes migran de acuerdo a las interacciones no-covalentes que sufren entre la fase estacionaria y la fase móvil. Aquellos compuestos más afines a la fase estacionaria se quedarán más tiempo retenidos en ella y le costará más tiempo a la fase móvil desplazarlos de su unión estacionaria.

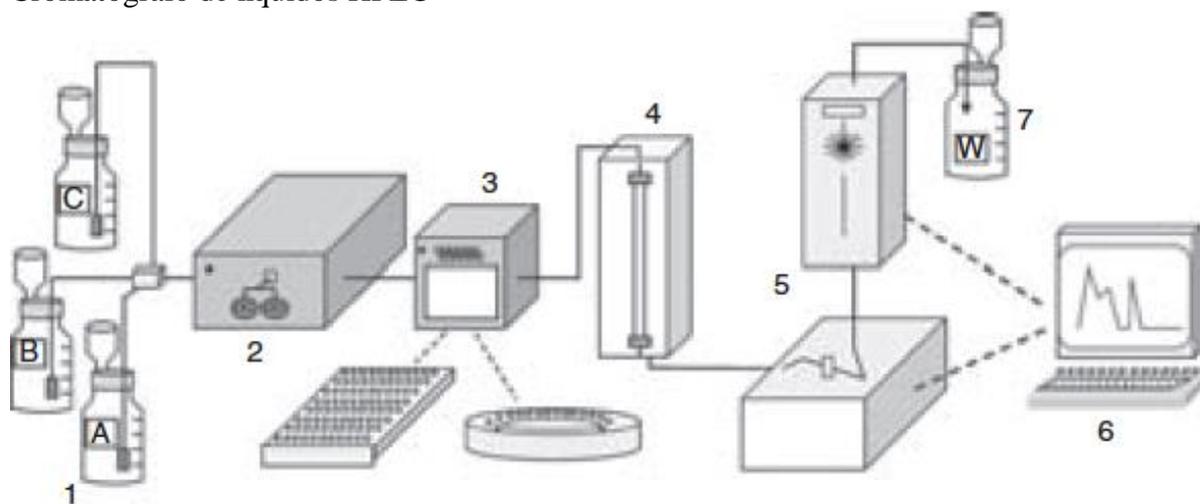
La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna en el que por acción de una bomba, se hace pasar la mezcla de compuestos o analitos en un sistema disolvente, que en esta actuará como la fase móvil. Esta fase móvil pasa a través de

una columna cromatográfica, que contiene la fase estacionaria a un caudal constante impuesto por la bomba.

En cuanto a los modos de separación se diferenciaron dos tipos de desarrollo, donde son conocidos como fase normal y fase inversa. En un comienzo la cromatografía evolucionó a partir del uso de la fase estacionaria polar y de un eluyente no polar como componente principal de la fase móvil, por ello se consideró la práctica normal, y se utilizó el nombre de fase normal. Sin embargo, existían una gran cantidad de mezcla de analitos que no eran polares y tenían características hidrofóbicas que necesitaba separación. El uso de una fase estacionaria no polar, con una fase móvil polar ayudó a separar analitos hidrofóbicos. Debido a que esta práctica era inversa a la normal, se utiliza el término fase inversa. Sin embargo, en la actualidad se disponen de fases móviles que pueden ir variando su composición durante el análisis para ir aumentando su poder de elución, a este tipo de separaciones se le denomina en gradiente de composición de fase móvil, mientras que si la fase móvil permanece su composición igual durante toda la separación se denomina isocrático.

Componentes de un equipo HPLC:

Cromatógrafo de líquidos HPLC



Plou Gasca Francisco J, Torres Salas P. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (CSIC).

Fig 4

Todo equipo de cromatografía líquida de alta resolución debe disponer de, al menos, los siguientes módulos:

Reservorio de la fase móvil: los reservorios utilizados para las fases móviles van desde el sencillo frasco de disolvente hasta los sistemas más complejos capaces de filtrar, desgasificar, mantener una atmósfera inerte, termostatar, agitar, etc. Los equipos modernos de HPLC suelen incorporar 2-4 reservorios (que permiten la preparación automatizada de mezclas de disolventes como fase móvil o la formación de los correspondientes gradientes. Lo más habitual suele ser el bombeo de un gas inerte (típicamente helio) en forma de pequeñas burbujas para desplazar el aire, y en algunos casos se emplean desgasificadores automatizados en línea.

Sistema de bombeo: se denomina bomba cromatográfica al dispositivo capaz de proporcionar a la fase móvil la presión necesaria para atravesar, al flujo seleccionado, la columna y el resto del sistema.

Inyector (manual o automático): el inyector es un dispositivo hermético que se encuentra situado a la salida de la bomba y permite, mediante el empleo de válvulas, incorporar la muestra a la fase móvil antes de la columna, sin pérdidas de presión que alteren el flujo constante proporcionado por la bomba.

Columna: la columna es la parte más importante del sistema cromatográfico. Las variables a considerar en una columna HPLC, además de la naturaleza química de su fase estacionaria, son su longitud, el tamaño de la partícula, el diámetro interno así como la homogeneidad entre partículas y el diámetro del poro. En función de la composición, las fases estacionarias que se utilizan en HPLC suelen ser : poliméricas, con base de sílice o sílice modificada químicamente. También se puede incluir una precolumna, que se disponen antes de la columna analítica, aumentando la vida de la misma. Estas precolumnas se encargan de retener partículas sólidas y otros interferentes presentes en la fase móvil, así como otros componentes de la muestra que se unen irreversiblemente a la fase estacionaria.

Uno o varios detectores en series: los detectores serán los encargados de recoger la señal que proporcionan los compuestos a analizar. Estos detectores se caracterizan por tener una gran sensibilidad y precisión lineal. Los detectores se pueden clasificar en universales, que son aquellos capaces de detectar cambios de una propiedad de la disolución, y los detectores selectivos, que solo son capaces de detectar los compuestos que tienen una determinada propiedad física. En la tabla 1. se indica el tipo de detector que es y la propiedad física que analiza. El límite de detección se define como la masa de compuesto inyectada que da lugar a una relación señal/ruido de 5/1, para un analito de masa molecular de 200 g/mol y un volumen de inyección de 10 microlitros.

Sistema de tratamiento de datos.

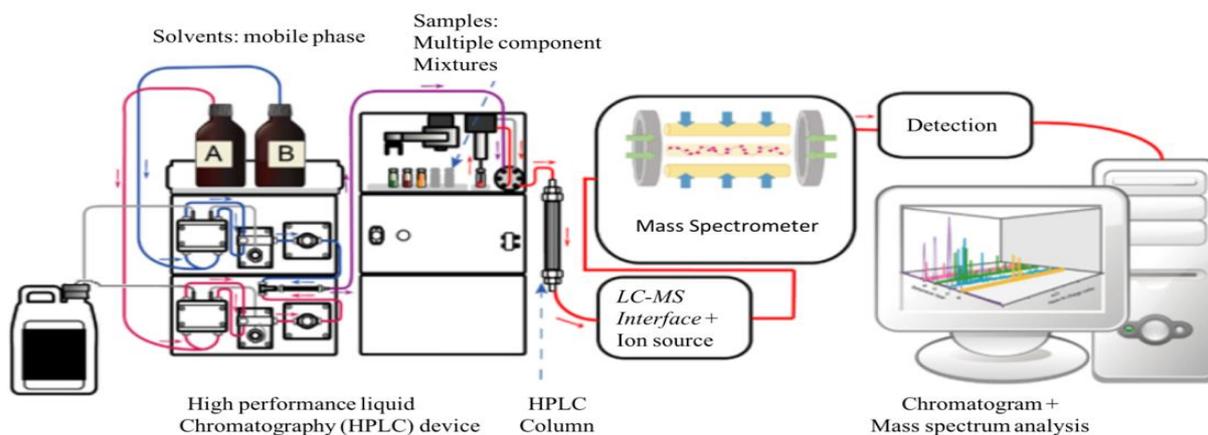
Botella para recoger los desechos.

Tabla 1

Detector	Tipo	Límite de detección ¹
Absorbancia	Selectivo	100 pg – 1 ng
Fluorescencia	Selectivo	1 – 10 pg
Índice de refracción	Universal	100 ng – 1 µg
Quimioluminiscencia	Selectivo	0,1 – 1 pg
Electroquímico	Selectivo	10 pg – 1 ng
Evaporativo de <i>light-scattering</i>	Universal	1 –100 ng
Conductividad	Selectivo	500 pg – 1 ng
Espectrometría de masas	Universal	100 pg – 1 ng
Aerosol cargado (CAD)	Universal	100 pg – 10 ng

HPLC-MS:

La cromatografía líquida de alta eficacia-espectrometría de masas (HPLC-MS) es una técnica que ha sido considerada la *gold-standar* del análisis de la vitamina D, aunque la complejidad del sistema y el personal cualificado para su manejo no permite que su uso sea muy extendido. El motivo de que sea la técnica de referencia es porque combina las capacidades de separación de la cromatografía HPLC con la fiabilidad de la espectrometría de masas (MS). Mientras que la cromatografía de líquidos separa las mezclas con múltiples componentes, la espectrometría de masas proporciona una identidad estructural de los componentes individuales con alta especificidad molecular y sensibilidad de detección. Además de los dispositivos de cromatografía líquida y espectrometría de masas, un sistema LC-MS contiene una interfaz que transfiere eficientemente los componentes separados de la columna de HPLC a la fuente de ionización del espectrómetro de masas. Mientras que la fase móvil en un sistema HPLC es un líquido presurizado, los analizadores de MS trabajan en vacío. Por lo tanto, no es posible bombear directamente el eluido desde la columna de HPLC a la fuente de ionización MS. En general, la interfaz es una parte mecánicamente simple del sistema LC-MS que transfiere la cantidad máxima de analito, elimina una parte significativa de la fase móvil de HPLC y preserva la identidad química de los compuestos separados cromatográficamente. Como requisito, la interfaz no debe interferir con la eficiencia ionizante y las condiciones de vacío del sistema MS. Esta técnica en *tándem* se puede utilizar para analizar compuestos bioquímicos, orgánicos e inorgánicos que se encuentran comúnmente en muestras complejas de origen ambiental y biológico. Este precisamente es el caso del análisis de vitamina D, donde el análisis de los diferentes metabolitos activos de la vitamina D presentan una serie de problemas asociados a sus características moleculares.



https://en.wikipedia.org/wiki/Liquid_chromatography%E2%80%93mass_spectrometry

Fig 5

4.2 Métodos principales para el análisis de la vitamina D:

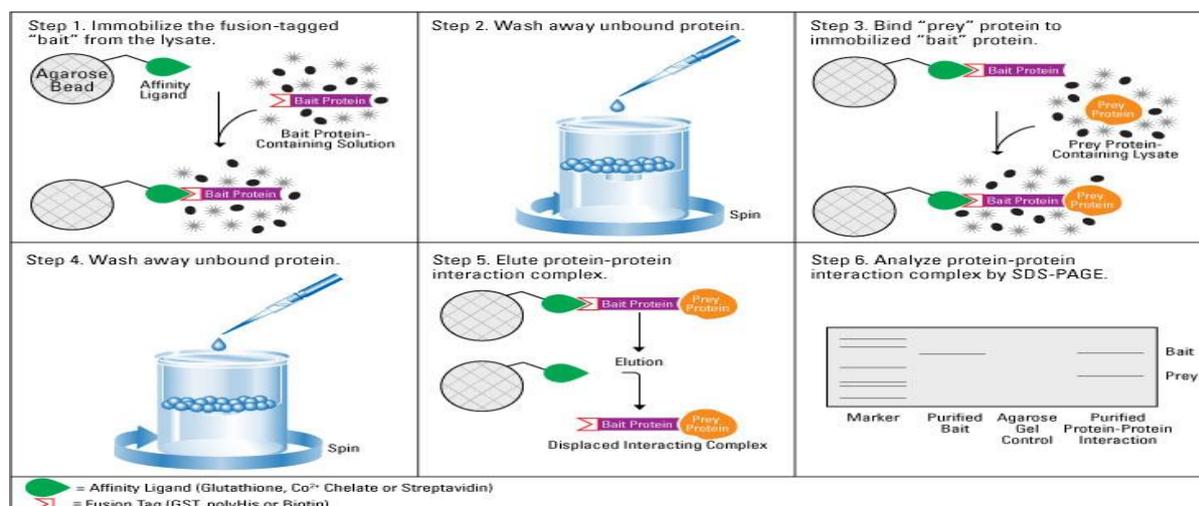
Factores que contribuyen al problema analítico de la vitamina D:

Antes de describir los diferentes tipos de métodos analíticos de la vitamina D, vamos a enumerar las principales dificultades que nos presenta su análisis debido a la composición de la misma.

- El compuesto 25OHD es hidrofóbico.
- Su naturaleza lipofílica hace que mantenga una fuerte unión con las proteínas, interfiriendo así en los resultados.
- Existen diferentes metabolitos de estructura química muy semejante, que muchas veces interfieren los unos con los otros en el análisis de los mismos, manifestando problemas de selectividad..
- La 25OHD y sus metabolitos son fotolábiles, dificultando el transporte, la conservación y pretratamiento de las muestras para su posterior análisis.

Ensayos de uniones competitivas de proteínas:

En la década de los 70, se desarrolló el primer método para el análisis de vitamina D. Este método utilizaba una extracción preliminar, para poder desechar todas las sustancias y metabolitos que pudieran interferir en el ensayo, y una purificación cromatográfica lo que daba como resultado la eliminación de las proteínas unidas a la vitamina D. Este extracto contenía el 25OHD desconocido sin marcar, se incubó con una concentración conocida de 25OHD3 marcada radiactivamente, y compitieron por una cantidad limitada adicional de proteínas de unión. A medida que fueron evolucionando este tipos de ensayos las proteínas de unión competitivas utilizadas derivaban de ratas, pollos o seres humanos permitiendo así la corrección de pérdidas ocurrido durante los procedimientos de extracción y purificación con una recuperación analítica de $82 \pm 3.5\%$ (SD). El problema ocurrido en estos ensayos como en la mayoría de los ensayos que contaremos posteriormente, eran las reacciones cruzadas con los diferentes metabolitos de la 25OHD. En esta ocasión sufrieron inestabilidad de las preparaciones de proteínas de unión y no pudieron simplificarse eliminando la etapa de la cromatografía.



<https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-protein-protein-interaction-analysis.html>

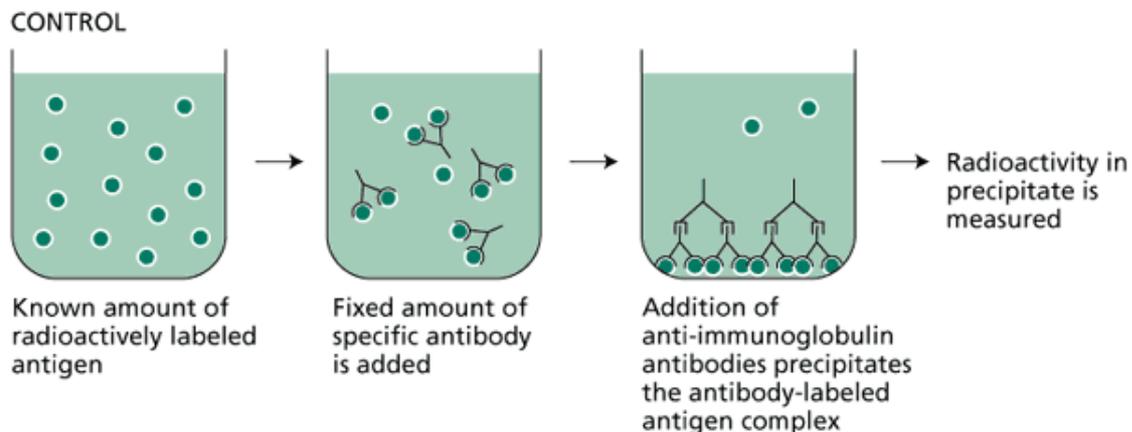
Fig 6

Debido a los múltiples problemas que este método presentaba, sobretodo derivado de las interacciones que presentaban con otros sustratos, y al descubrimientos de nuevos métodos mucho más exactos, la unión a proteínas para el análisis de vitamina D se encuentra en desuso.

Inmunoensayos:

Dentro de los inmunoensayos existen dos métodos ampliamente utilizados en el análisis de la vitamina D. RIA (Radioinmunoensayo), método más usado y antiguo y otro método basado en la quimioluminiscencia, de reciente desarrollo y automatizado.

- RIA: este método se basa en la competencia existente entre el anticuerpo, un antígeno no marcado y una cantidad del antígeno marcado para formar complejos AgAc o Ag*Ac. Con estos tres componentes puede realizarse el ensayo en el que manteniendo constante la cantidad de Ag* y de Ac se observará que a mayor cantidad de Ag menos queda de Ag* queda unido a la cantidad fija de Ac, lo que nos permitirá relacionar la radioactividad con la concentración de Ag.



<http://ehu.eus/biomoleculas/isotopos/ria.htm>

Fig 7

- QLIA: es un inmunoensayo competitivo directo quimioluminiscente. En este método lo que se cuantifica es la emisión de luz que se produce por la reacción quimioluminiscente entre los derivados Ag-Ac* marcados con peroxidasa y un sustrato en presencia de peróxido de hidrógeno.

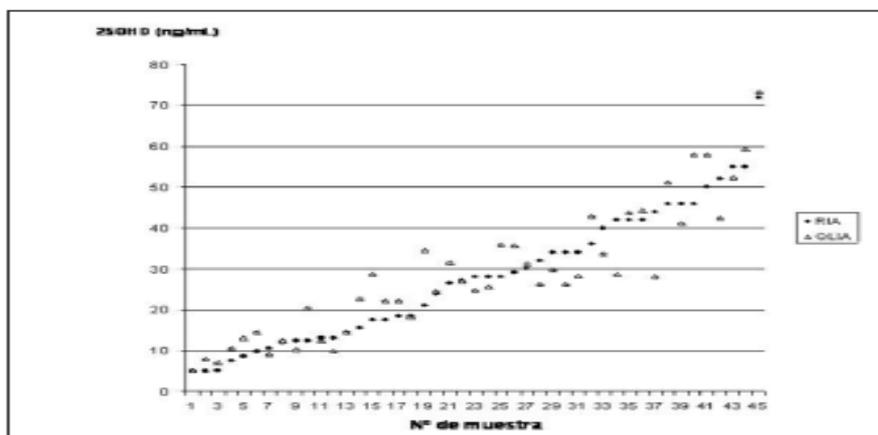


https://www.researchgate.net/figure/Figura-6-Deteccion-de-proteinas-por-quimioluminiscencia_fig5_302966266 Fig 8

Para explicar estos dos métodos en relación a la aplicación de los mismos en el estudio, se basó en otro estudio comparativo que ponía de manifiesto el uso de ellos y tanto los resultados como los coeficientes de variación entre ellos, además de una conclusión explicativa de cual era el que nos aportaba una mejor eficacia teniendo en cuenta tiempo, resultados y exactitud.

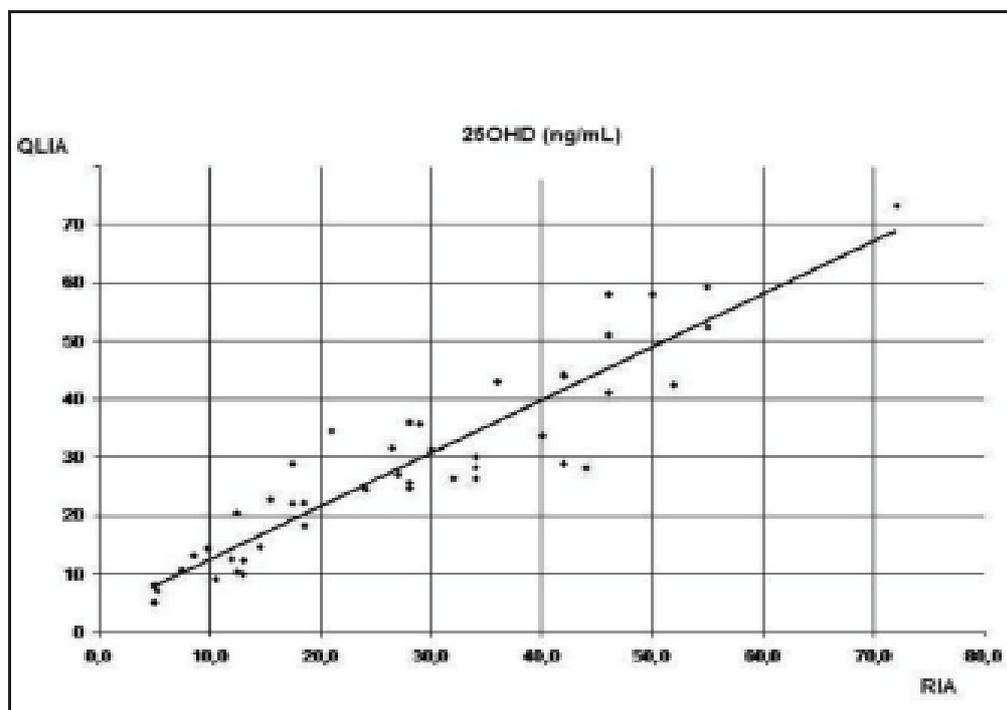
En primer lugar es importante definir qué metabolito de la vitamina D se va a analizar y en qué muestra biológica se encuentra. En el caso de este ensayo, se indicaba que para la evaluación del *status* de la vitamina D es la medición de 25OHD sérica, que puede derivar de la hidroxilación de la vitamina D2 y de la vitamina D3. Por este motivo, se iba a medir la 25OHD total, es decir la suma de los dos metabolitos, la 25OHD2 y la 25OHD3. A su vez establecían que debido a que tenía una vida media larga, se podía considerar que estaba en equilibrio con la vitamina D almacenada en el cuerpo.

Como conclusión sobre la explicación de estos dos métodos, los resultados fueron que ambos mostraron una alta correlación y porcentajes semejantes en el coeficiente de variación. La diferencia ocurría en el número de ensayos y muestras que se habían utilizado para establecer estos valores, ya que el RIA era el método más utilizado y tenían una experiencia más contrastada, mientras que el QLIA era de reciente incorporación. Sin embargo, sabiendo que el QLIA era un ensayo automatizado y que se había obtenido una gran correlación lineal entre ambos, se demostró que era un avance para la medición de la vitamina D.



Fuentes A.M, Fierro M.F, Medici M, Perharic C, Drnosvek M, Ercolano M, Glikman P. Medición de 25-hidroxitamina D sérica: comparación de dos inmunoensayos.Revista de Endocrinología y Metabolismo.2010;47:4,2-5. Fig 8

En la figura 8 se ven los datos del análisis de la 25OHD obtenidos por QLIA y RIA.



Fuentes A.M, Fierro M.F, Medici M, Perharic C, Drnosvsek M, Ercolano M, Glikman P. Medición de 25-hidroxivitamina D sérica: comparación de dos inmunoensayos.Revista de Endocrinología y Metabolismo.2010;47:4,2-5. Fig 9.

La figura 9 indica la correlación entre los resultados de 25OHD medidos por RIA y QLIA. Los datos están expresados en ng/mL.

Ensayos de HPLC y HPLC-MS:

Las dos técnicas analíticas de mayor precisión para la determinación de la vitamina D son la cromatografía líquida de alta eficacia y HPLC-espectometría de masas. Estos métodos son la referencia para este tipo de análisis, por lo que en este estudio se hará una breve comparativa entre ambos utilizando los resultados de diversos estudios, donde se reflejará los diferentes métodos de pretratamiento de muestras, tipos de columnas utilizados, las diferentes características de las fases estacionaria y móvil, así como el análisis de los resultados. Se concluirá haciendo una valoración de las ventajas y desventajas que cada una de estas técnicas analíticas presente y su aplicación en el uso general de estos análisis.

En las tabla 2 mostrada a continuación se pone de ejemplo dos ensayos donde se miden los diferentes metabolitos de la vitamina D. Los datos recogidos son únicamente ejemplos de pretratamiento de muestras y las diferentes columnas y gradientes empleados en ellos. Como resultados, se han tomado dos valores de referencia que son el coeficiente de varianza porcentual, el cual es una medida estadística que nos informa acerca de la dispersión relativa de un conjunto de datos. Visto que el objetivo de este estudio era una breve descripción de cómo eran los complejos de HPLC-espectometría de masas, se quiere demostrar que tanto la

sensibilidad y especificidad de estos ensayos es bastante alta, ya que los coeficientes de varianza son bajos. A su vez según los datos obtenidos en los estudios la recuperación del analito son cercanas al 100% por lo que los datos obtenidos en los ensayos corresponden a la muestra analizada, con bajas tasas de pérdidas del analito.

Tabla 2

<p>Quantification of Serum 25-Hydroxyvitamin D2 and D3 Using HPLC-Tandem Mass Spectrometry and Examination of Reference Intervals for Diagnosis of Vitamin D Deficiency</p>	<p>Plasma humano</p>	<p>-Para cada muestra de suero y muestra de control de paciente, se colocaron 200 µL de muestra en un tubo desechable de 13 × 100 mm de vidrio seguido de 200 µL de estándar interno. -Las muestras se mezclaron con vórtex, se extrajeron con 1 ml de n-heptano y se centrifugaron durante 4 minutos a 3.000 rpm. La capa orgánica se eliminó, se evaporó bajo nitrógeno y se reconstituyó en 100 µL de alcohol etílico. -Los estándares se ensayaron sin extraer, con 100 µl de estándar mezclado con 200 µl de estándar interno. Esta solución se mezcló con vórtice y se secó bajo nitrógeno. Los estándares se reconstituyeron en alcohol etílico y las soluciones se transfirieron a viales de muestreador automático.</p>	<p>- El sistema LC-MS / MS consistió en una HPLC de Waters Alliance 2795 interconectada con un espectrómetro de masas de cuadrupolo de Waters Micromass Quattro tandem. La separación cromatográfica de 25 (OH) D2, 25 (OH) D3 y Δ9-THC-D3 se logró con una columna analítica a una temperatura de 35 ° C. Se usó una fase móvil isocrática y consistió en metanol al 100% con 2 mmol / l de acetato de amonio y ácido fórmico al 0,1%.</p>	<p>-CV intraensayo: 11,4%-11,5% y del 7,7%-9,8% -CV interesnensayo: 6,9%-8,8% La recuperación del analito estuvieron entre el 93% - 106%</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

ESTUDIOS	TIPO DE MUESTRA	PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA	TIPOS DE FASES	RESULTADOS (coeficiente de varianza)
<p>Simultaneous measurement of plasma vitamin D3 metabolites, including 4b,25-dihydroxyvitamin D3, using liquid chromatography-tandem mass spectrometry</p>	<p>Plasma humano</p>	<p>-1 ml(plasma) se transfirió a un tubo de polipropileno de 15 ml. - Se enriqueció con 10 µl de solución estándar interna de trabajo, se mezcló con vórtice y se dejó equilibrar para 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. -Las proteínas se precipitaron agregando 2 ml de acetonitrilo y mezclando con vórtice, seguido de centrifugación. -El sobrenadante se transfirió a un tubo de vidrio y el volumen se redujo bajo una corriente de nitrógeno. La solución restante (1 ml) se sometió a extracción líquido-líquido (LLE) agregando 5 ml de acetato de etilo. -Tras centrifugación y completar la evaporación de solvente con nitrógeno, se añadió al residuo acetonitrilo y se dejó 1h. Y se transfirió a un vial de vidrio.</p>	<p>-La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna de Hypersil Gold a 40°C en un sistema Agilent 1200 LC utilizando acetonitrilo (B) / agua como fase móvil Las condiciones iniciales de gradiente fueron 40% B con un caudal de 0.2ml / min. - Bajo estas condiciones , el pico de interferencia 4b, 25(OH) 2D3 se separó de la, 25 (OH) 2D</p>	<p>-CV intraensayo: 1,1% -12,4% CV Interensayo: 1,0%-13,8%</p> <p>-La recuperación del analito estuvieron entre el 96%-106%.</p>

Tras la recopilación de datos y la comparativa realizada en diversos estudios, los resultados de determinación de vitamina D suelen ser similares entre los equipos clásicos de HPLC y los más modernos que adaptan el espectrómetro de masas. Sin embargo, gracias a la alta capacidad de medición que tienen los equipos más novedosos siempre nos aportan datos más exactos. En este caso, como se trata de determinación de vitamina D, esa exactitud es útil cuando queremos medir uno de los metabolitos en concreto y no la suma total de la 25OHD, que es lo que suele ocurrir con el resto de metodologías analíticas. Para un análisis de rutina, es decir, para diagnosticar un déficit de vitamina D en los pacientes no es necesario el conocer la concentración analito a analito y esto sumado al alto coste de los equipos hacen que su uso para este tipo de análisis sea mínimo.

5 CONCLUSIONES

1. Se han descrito las técnicas analíticas más frecuentemente utilizadas para la determinación de vitamina D y sus metabolitos. Entre ellas los inmunoensayos con detección radioquímica (RIA) y quimioluminiscente (QLIA), HPLC-UV y HPLC-MS.
2. HPLC-MS aporta una especificidad muy alta y resultados que no se podrían obtener mediante otras técnicas analíticas, el alto coste de estos equipos, el tiempo de análisis por muestra, y el personal cualificado que se requiera, no es útil para el diagnóstico rutinario de déficits de la vitamina. Aún así, son de gran utilidad para ensayos que requieren de aplicaciones diferentes que las determinaciones diagnósticas cotidianas.
3. Los inmunoensayos quimioluminiscente (QLIA), automatizados pueden aportar información muy útil para la prevención y tratamiento de las patologías asociadas a los bajos niveles de vitamina D, con bajo coste y de gran precisión en las medidas.

6 BIBLIOGRAFÍA

1. Gilaberte Y, Aguilera J, Carrascosa J.M, Figueroa F.L, Romaní de Gabriel J, Nagore E. La vitamina D: evidencias y controversias. Actas Dermosifiliogr. 2011;102(8):572-588.
2. Alonso López C, Ureta Velasco N, Pallás Alonso CR, Grupo PrevInfad. Vitamina D profiláctica. Servicio de Neonatología. Hospital 12 de Octubre. Madrid. España.
3. Varsavsky M, Alonso G, García-Martín A. Vitamina D: presente y futuro. Rev Clin Esp.2014;7:2-5.
4. Las-Hormonas.blogspot.com (2019).*Hormonas* (online); Available in: <http://las-hormonas.blogspot.com/2013/07/la-vitamina-d-de-mis-huesos.html>
5. Wikipedia.es (2019).*Vitamina D*(online) Available in: https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Vitamina_D&oldid=115016126
6. Plou Gasca Francisco J, Torres Salas P. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (CSIC).
7. Vdocuments.mx(2019).*Chromatography and Instrumentation*.(online); Available in: <https://vdocuments.mx/chromatography-and-instrumentation-invented-by-a>

- russian-botanist-mikhail.html
8. Wikipedia.org(2019)*Liquid chromatography-mass spectrometry*(online); Available in: https://en.wikipedia.org/wiki/Liquid_chromatography%E2%80%93mass_spectrometry
 9. Fuentes A.M, Fierro M.F, Medici M, Perharic C, Drnosvsek M, Ercolano M, Glikman P. Medición de 25-hidroxivitamina D sérica: comparación de dos inmunoensayos. *Revista de Endocrinología y Metabolismo*.2010;47:4,2-5.
 10. Ehu.eus(2019).*Radioinmunoensayo* (online) ; Available in: <http://ehu.eus/biomoleculas/isotopos/ria.htm>
 11. Researchgate.net(2019).*Quimioluminiscencia* (online); Available in: https://www.researchgate.net/figure/Figura-6-Deteccion-de-proteinas-por-quimioluminiscencia_fig5_302966266
 12. Farrell C. L, Martin S, McWhinney B, Straub I., Williams P, Herrman M. State-of-the-Art Vitamin D Assays: A Comparison of Automated Immunoassays with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Methos. *Clinical Chemistry*. 2012; 58:3, 532-541
 13. Zerwekh Joseph E. The measurement of vitamin D: analytical aspect. *Ann Clin Biochem*. 2004; 41: 273-278
 14. Fuentes A.M, Fierro M.F, Medici M, Perharic C, Drnosvsek M, Ercolano M, Glikman P. Medición de 25-hidroxivitamina D sérica: comparación de dos inmunoensayos.
 15. Thermofisher.com(2019) *Protein-Protein Interaction Analysis* (online), Available in: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-protein-protein-interaction-analysis.html>
 16. Zerwekh Joseph E. Blood Biomarkers of vitamin D status. *Ann Clin Nutr*.2008;87,1-5.
 17. Turpeinen U, Hohenthal U, Stennan U. Determination of 25-Hidroxivitamin D in Serum by HPLC and Immunoassay. *Clinical Chemistry*.2003;49:9, 1-3.
 18. Saenger A. K, Phd, Laha T. J, Bremner D. E, Sadrzadeh S. M.H, Quantification of Serum 25_Hydroxyvitamin D2 and D3. Using HPLC-Tandem Mass Spectrometry and Examination of Reference Intervals for Diagnosis of Vitamin D Deficiency. *Clinical Chemistry*. 2006;125, 915-919.
 19. Mata-Granados JM, Ferreiro-Verab C, Luque de Castro MD, Quesada Gómez JM. Determinación de los metabolitos principales de vitamina D en suero mediante la extracción en fase sólida en línea con cromatografía líquida espectrometría de masas en tándem. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*.2010;2:2, 57-59.
 20. Wang Z, Senn, Kalthorn T, Zheng Xi E, Zheng S, Davis Connie L, Herbert Mary F, Lin Yvonne S, Thummel Kenneth E. Simultaneous measurement of plasma vitamin D3 metabolites, including 4b,25-dihydroxyvitamin D3, using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 2011;418, 127-132.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia y el/la Tutor/a no se hacen responsables de la información contenida en el mismo.