



ANÁLISIS DE LA VITAMINA D EN MUESTRAS BIOLÓGICAS MEDIANTE TÉCNICAS ANALÍTICAS CROMATOGRÁFICAS (HPLC)

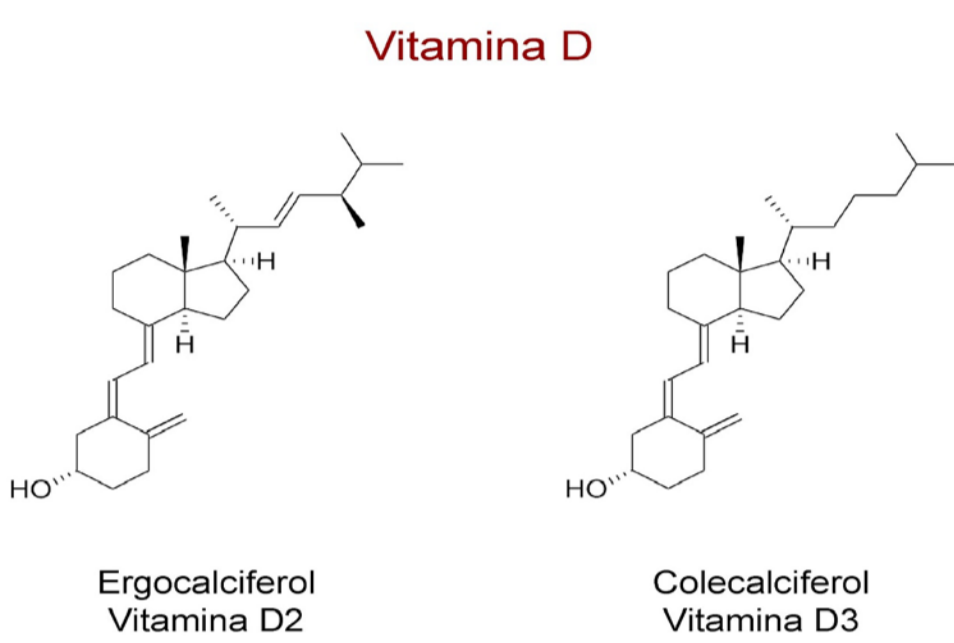
Pedro Daniel Melián Peña
Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia
Trabajo de Fin de Grado 2019

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

OBJETIVOS

- En 1921 McCollum descubrió la cuarta vitamina (vit. D), buscando sustancias para prevenir el raquitismo.
- La vitamina D es una hormona compleja que interviene en la homeostasis del calcio y en otras múltiples funciones.
- Existen dos tipos de vitamina: D3 o colecalciferol y la D2 o ergocalciferol:

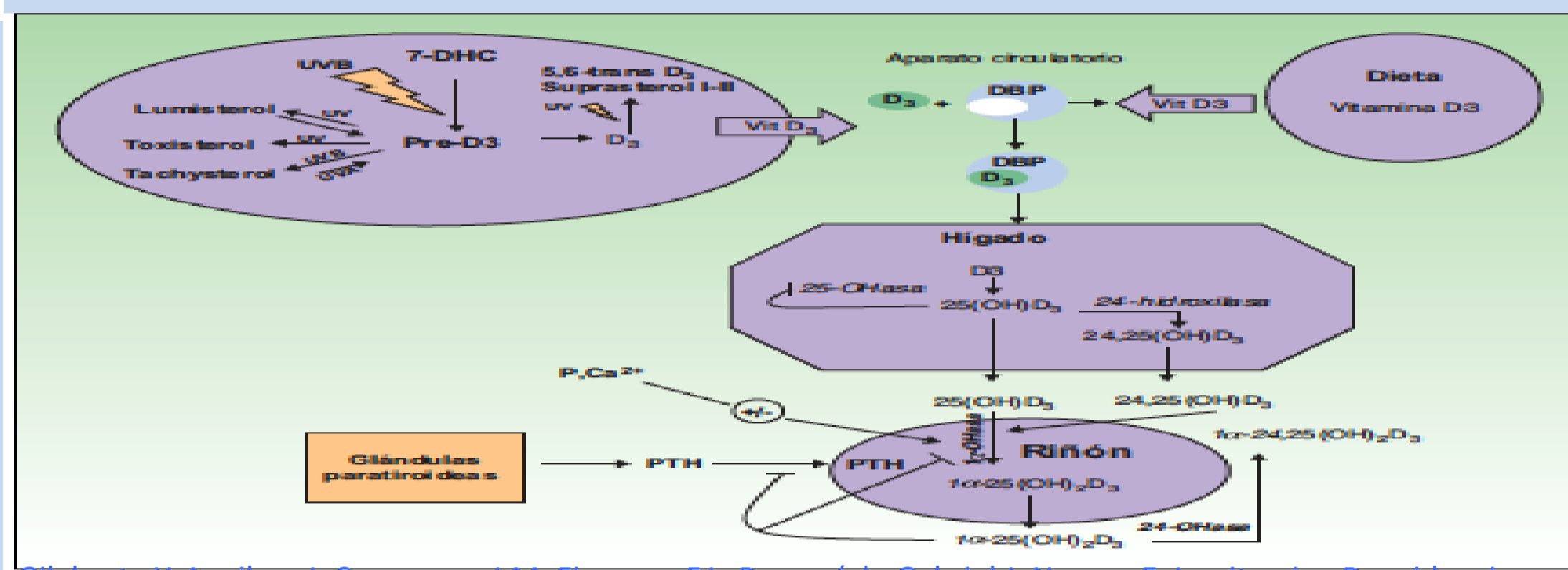
- La principal fuente natural de la vitamina D es consecuencia de la exposición solar.
- Forma activa: calcitriol ó 1,25(OH)2D, forma más abundante y sustrato de medición: calcidiol ó 25(OH)D.
- Valores de referencia: Concentración sérica de la 25(OH)D
 Normales: 30-75ng/mL, Insuficiencia: 20-30ng/mL, Deficiencia: <20ng/mL
- Patologías relacionadas:
 Metabolismo óseo, enfermedades autoinmunes, cáncer, diabetes,...



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

Biosíntesis:

- En la piel se produce la transformación de la provitamina D3 en vitamina D3.
- Es excretada y transportada junto al cofactor (DBP) viaja al hígado.
- Tras una serie de reacciones enzimáticas se forma la 25(OH)D3.



Gilaberte Y, Aguilera J, Carrascosa J.M, Figueroa F.L, Romani de Gabriel J, Nagore E. La vitamina D: evidencias y controversias. Actas Dermosifiliogr. 2011;102(8):572-588

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

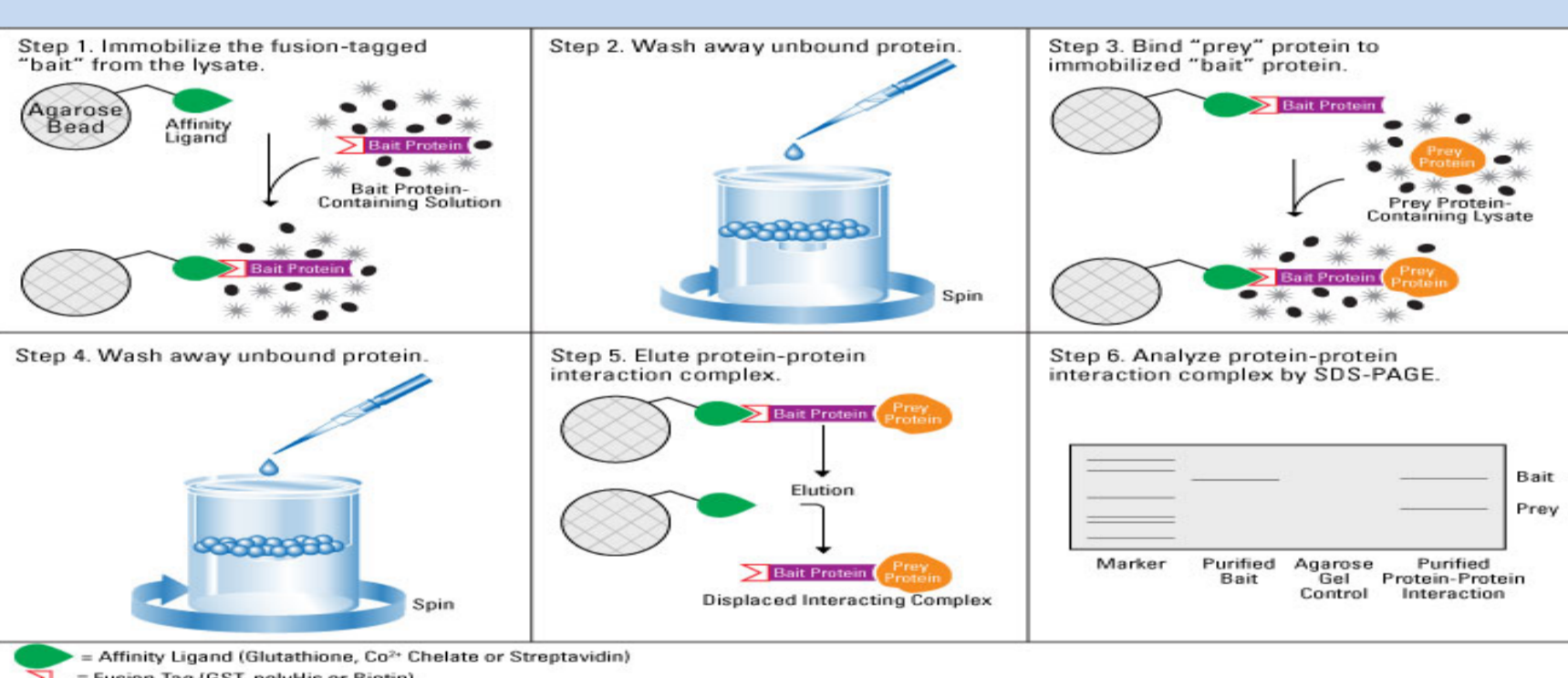
METODOLOGÍA

- Búsqueda bibliográfica en las bases de datos: UpToDate, PubMed, GoogleScholar y Scielo
- La estrategia de búsqueda consistió en la utilización de las siguientes palabras: 'Vitamina D', 'HPLC', '25OHD'.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción de las Técnicas Analíticas

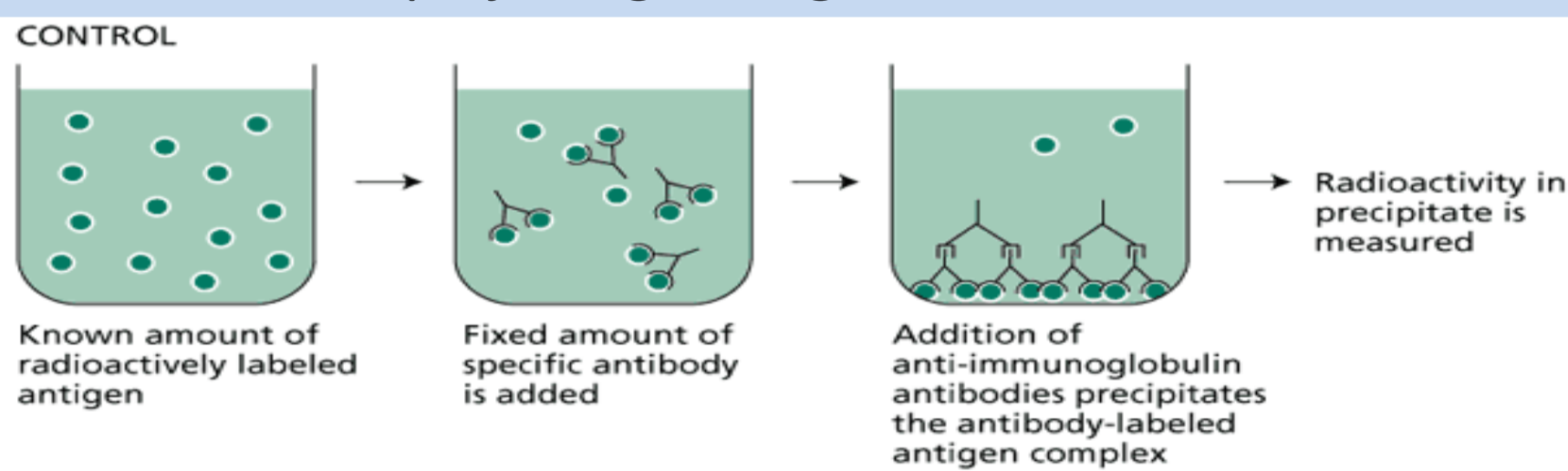
- Ensayos de uniones competitivas de proteínas:**
 Extracto de 25OHD sin marcar-25OHD3 marcado-proteínas.



<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>

2. Inmunoensayos:

- **RIA:** complejos AgAc/ Ag*Ac



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

- **QLIA:** Inmunoensayo competitivo directo quimioluminiscente.

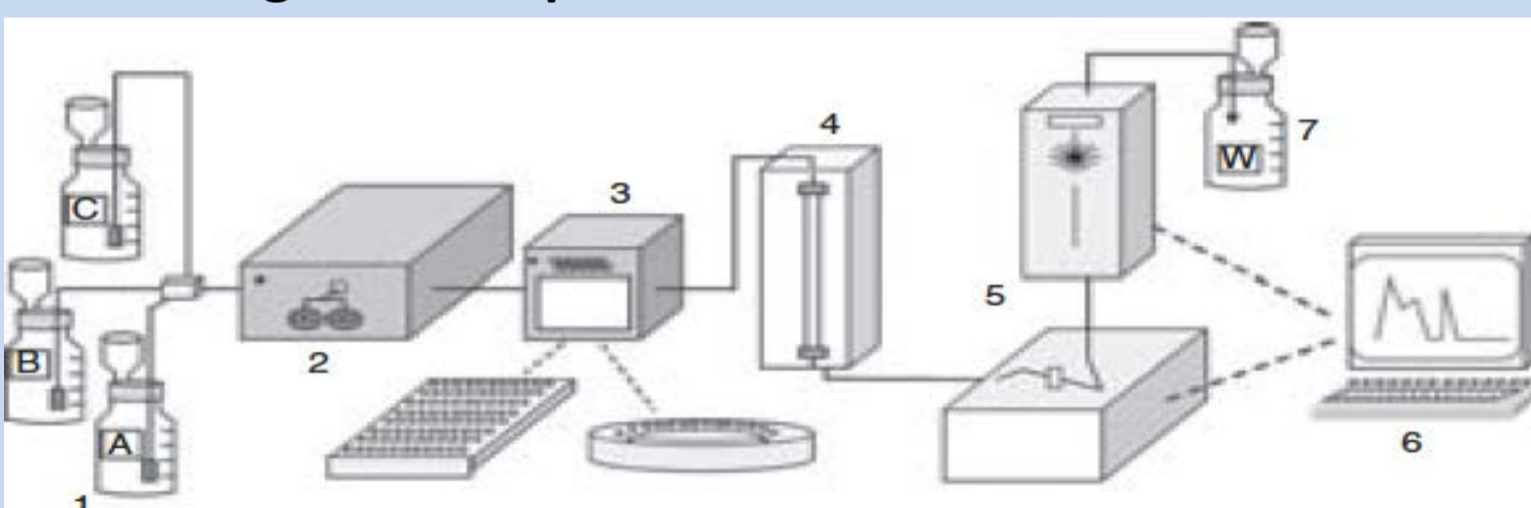


https://www.researchgate.net/figure/Figura-6-Deteccion-de-proteinas-por-quimioluminiscencia_fig5_30296266

3. HPLC:

- La cromatografía líquida es una técnica para separar los componentes de una mezcla.
- La HPLC es una cromatografía en columna en el que por acción de una bomba, se hace pasar la mezcla de analitos en un sistema disolvente.

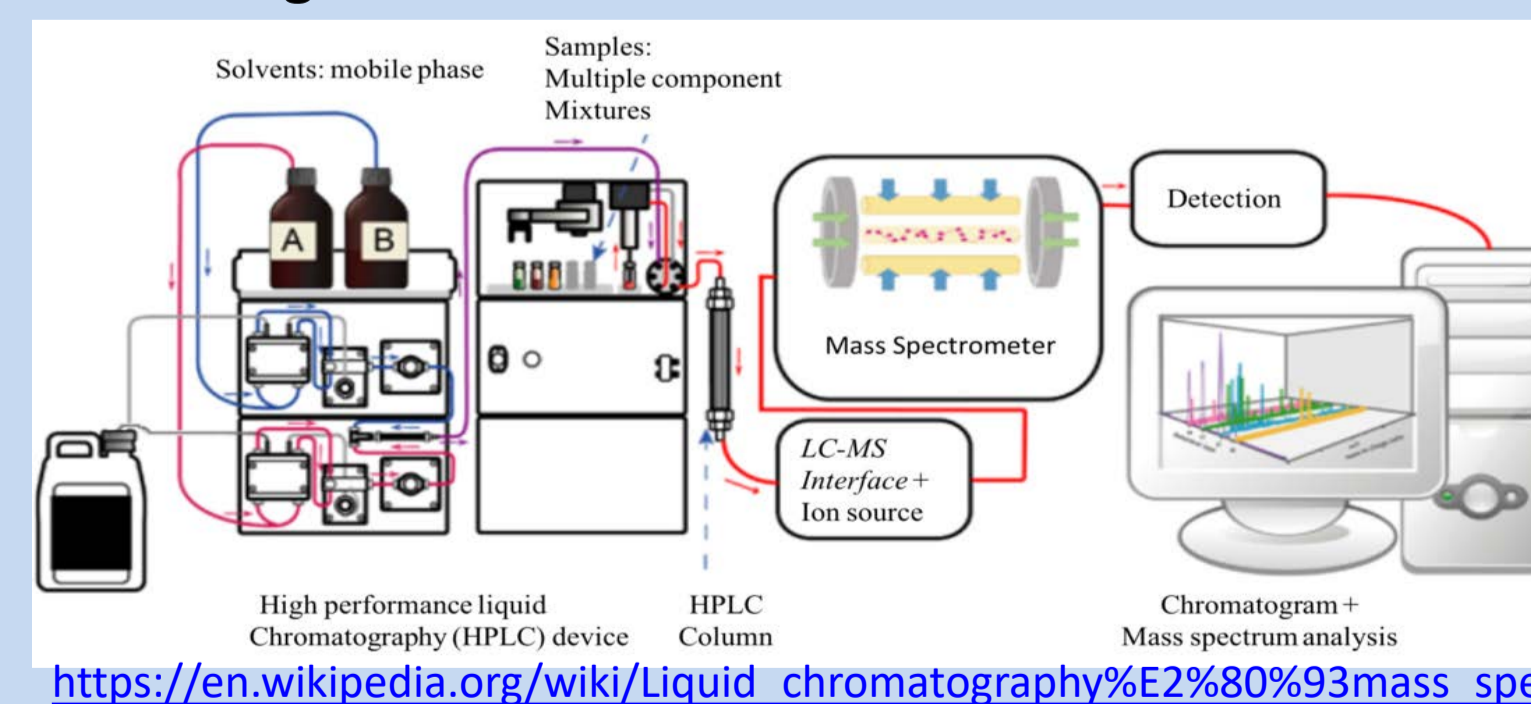
Cromatógrafo de líquidos HPLC



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

- Añadiéndole a este sistema un espectrómetro de masas se estableció lo que hoy en día se conoce como la técnica *gold-standard* para el análisis de la vitamina D.

Cromatógrafo HPLC-MS



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

ENSAYOS DE HPLC-MS				
ESTUDIOS	TIPO DE MUESTRA	PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA	TIPOS DE FASES	RESULTADOS (coeficiente de varianza)
Simultaneous measurement of plasma vitamin D3 metabolites, including 4b,25-dihydroxyvitamin D3, using liquid chromatography-tandem mass spectrometry	Plasma humano	-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.	-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	-CV intraensayo: 1,1% -12,4% CV Interensayo: 1,0%-13,8% -La recuperación del analito estuvieron entre el 96%-106%.
		Quantification of Serum 25-Hydroxyvitamin D2 and D3 Using HPLC-Tandem Mass Spectrometry and Examination of Reference Intervals for Diagnosis of Vitamin D Deficiency	Plasma humano	-Para cada muestra de suero y muestra de control de paciente, se colocaron 200 µL de muestra en un tubo desechable de 13 x 100 mm de vidrio seguido de 200 µL de estándar interno. -Las muestras se mezclaron con vórtice, 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.

CONCLUSIONES

- Se han descrito las técnicas analíticas más usadas para la determinación de la vitamina D.
- HPLC-MS aporta especificidad muy alta en el análisis de las diferentes sustancias de una muestra, pero no es útil en el uso rutinaria para la cuantificación de vitaminaD.
- QLIA nos pueden aportar información muy útil con bajo coste y alta precisión.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso López C, Ureta Velasco N, Pallás Alonso CR, Grupo PrevInfad. Vitamina D profiláctica. Servicio de Neonatología. Hospital 12 de Octubre. Madrid. España.
- Varsavsky M, Alonso G, García-Martín A. Vitamina D: presente y futuro. Rev Clin Esp.2014;7:2-5
- Gilaberte Y, Aguilera J, Carrascosa J.M, Figueroa F.L, Romani de Gabriel J, Nagore E. La vitamina D: evidencias y controversias. Actas Dermosifiliogr. 2011;102(8):572-588
- Plou Gasca Francisco J, Torres Salas P. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (CSIC).
- Zerwekh Joseph E. The measurement of vitamin D: analytical aspect. Ann Clin Biochem. 2004; 41: 273-278