

Développement et validation d'une méthode quantitative par LC-ESI-MS/MS pour les 25-hydroxyvitamine D2&D3 et de leur épimère C3.

Pierre-Luc Mallet^{1,2} and Guy Fink^{1,3}

¹ Département de biochimie clinique, CIUSSS-CHUS, Québec, Canada; ² Département de biochimie et de médecine coléculaire, Université de Montréal, Québec, Canada; ³ Département de biochimie, Université de Sherbrooke, Québec, Canada

Introduction

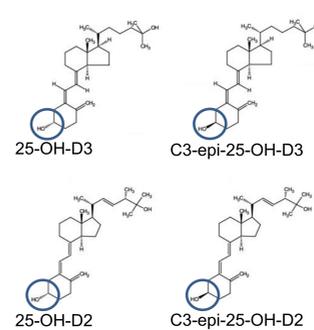
La vitamine D est importante pour l'homéostasie des os. Récemment, elle a aussi été liée à la réduction des risques de développer diverses maladies auto-immunes, neurodégénératives, mentales, et cardiovasculaires ainsi que le diabète et le cancer. La vitamine D2 et D3 subissent une 25-hydroxylation au niveau du foie et les 25-OH-D2&D3 sont les métabolites circulant les plus abondants. Donc, ils sont utilisés comme critères pour mesurer le niveau de vitamine D. Les 25-OH-D2&D3 sont une fois de plus hydroxylés en position 1 au niveau des reins pour former les métabolites actifs 1,25-(OH)₂-D2&D3. Ces métabolites actifs ont une faible affinité de liaison avec la protéine liant la vitamine D, DBP, résultant en une courte demi-vie et ainsi de faibles niveaux sanguins. De plus, il a été démontré que les niveaux des métabolites 1,25-(OH)₂-D2&D3 ne corrèlent pas de façon systématique avec le statut des niveaux de vitamine D des patients (1).

La LC-MS/MS est la méthode de référence pour la quantification des 25-OH-D2&D3. Néanmoins, une des contraintes rencontrées est la présence de l'épimère C3 des composés de la vitamine D. Ces épimères C3 ont une activité biologique très réduite (1). Généralement les niveaux des épimères C3 sont élevés chez les nouveau-nés et les enfants. Toutefois, une étude récente a détecté la présence des épimères C3 dans plus de 99 % des échantillons de patients provenant de nouveau-nés jusqu'à des personnes âgées de plus de 80 ans. De plus, la proportion de ces épimères C3 peut représenter plus de 25 % du niveau total de la vitamine D (2). Donc, la "National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)" suggère que toute technique LC-MS/MS quantitative pour les métabolites de la vitamine D aient la capacité de séparer ces épimères C3, afin d'éviter une surestimation des niveaux réels de vitamine D (1). Dans le projet ci-présent, le développement et la validation d'une méthode quantitative par LC-ESI-MS/MS pour le dosage des 25-OH-D2&D3 et de leur épimère C3 respectif ont été effectués.

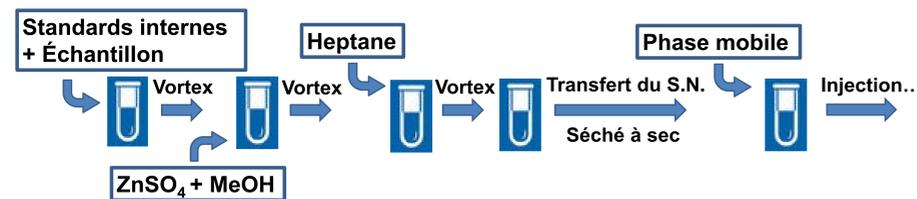
Matériels et Méthodes

Calibrateurs, standards internes et contrôles qualités

Composé	Fournisseur
25-OH-D3	Cerilliant, Round Rock, TX
25-OH-D2	
C3-25-OH-D3	Isosciences, King of Prussia, PA
C3-25-OH-D2	
25-OH-D3- ² H ₃	
25-OH-D2- ² H ₃	
C3-25-OH-D3- ² H ₃	Roche, Laval, QC
PCV1 et PCV2	
DEQUAS # 471 à 480	Charing Cross Hospital, London, UK



Préparation des échantillons



Conditions pour la HPLC

Système HPLC	1290 infinity (Agilent, Santa Clara, CA)
Pré-colonne	Pursuit 3PFP Metaguard 10 mm X 2.0 mm (Agilent, Santa Clara, CA)
Colonne	Pursuit 3 PFP 100 mm X 3.0 mm (Agilent, Santa Clara, CA)
Température colonne	45°C
Phase mobile (A)	0.1 % acide formique dans H ₂ O
Phase mobile (B)	0.1 % acide formique dans MeOH
Programme d'élution	Isocratique - 32 % (A) et 68 % (B)
Débit de la phase mobile	0.8 ml/min
Volume d'injection	20 µl
Temps d'exécution	13 min

Matériels et Méthodes

Conditions pour le MS/MS

Conditions paramétriques pour le MS/MS

Température du gaz	290°C
Débit du gaz	5 L/min
Pression du nébuleur	30 psi
Température du gaz rideau	350°C
Débit du gaz rideau	11 L/min
Voltage du capillaire	5000 V
Voltage de l'injecteur	500 V
Delta du VME	400 V
Résolution	Unit
Polarité	positif

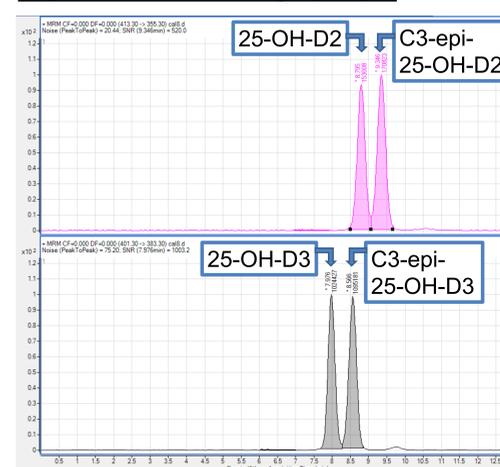
Transitions MRM avec leurs paramètres spécifiques d'acquisitions

Composé	Ion précurseur (amu)	Ion produit (amu)	Arrêt temporisé (ms)	Fragmenteur (V)	Energie de Collision (V)	Cellule d'accélération (V)	Polarité
25-OH-D3- ² H ₃	404.3	386.3	125	83	6	2	+
25-OH-D2- ² H ₃	416.3	358.3	125	88	6	2	+
C3-epi-25-OH-D3- ² H ₃	404.3	386.3	125	83	6	2	+
25-OH-D3†	401.3	383.3	125	83	6	2	+
25-OH-D3‡	401.3	365.3	125	83	6	2	+
25-OH-D2†	413.3	355.3	125	88	6	2	+
25-OH-D2‡	413.3	395.3	125	88	6	2	+
C3-epi-25-OH-D3†	401.3	383.3	125	83	6	2	+
C3-epi-25-OH-D3‡	401.3	365.3	125	83	6	2	+
C3-epi-25-OH-D2†	413.3	355.3	125	88	6	2	+
C3-epi-25-OH-D2‡	413.3	395.3	125	88	6	2	+

† Transition pour le quantificateur; ‡ Transition pour le qualificateur

Résultats

Séparation chromatographique



Mesure de la résolution entre les pics (R_s)

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{1.7(w_{0.5,1} + w_{0.5,2})}$$

Entre 25-OH-D2 et C3-epi-25-OH-D2

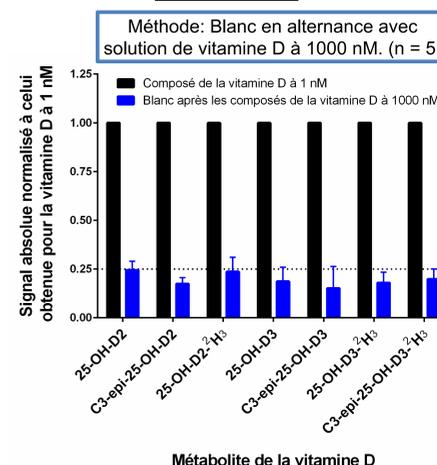
$$R_s = 1.27$$

Entre 25-OH-D3 et C3-epi-25-OH-D3

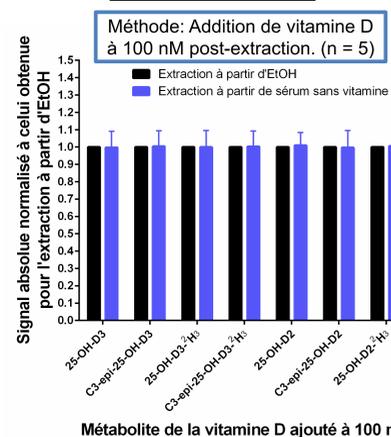
$$R_s = 1.59$$

Valeur minimum recommandé par le CLSI:
R_s ≥ 1.25

Rémanence



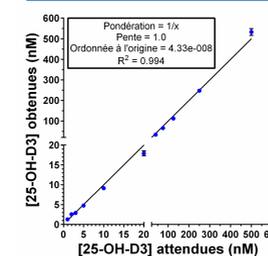
Effets de matrice



Résultats

Linéarité

Méthode: Dilution non-série.
Régression linéaire. (n = 5)



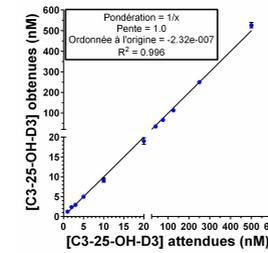
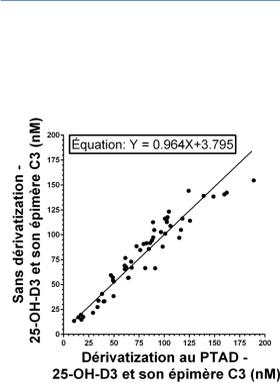
CV et biais

Méthode: 5 échantillons/jour sur 5 jours différents. (N = 25)

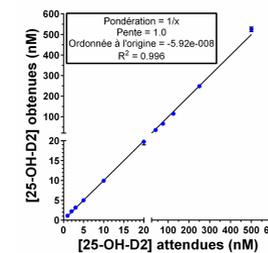
25-OH-D3 (nM)	CV intra-jour (%)	CV inter-jour (%)	Biais total (%)
0.5	7.69	15.95	100.06
1.0	3.33	12.68	36.78
2.0	4.14	9.46	26.74
3.0	5.18	2.39	-0.40
5.0	3.15	2.16	-6.96

Corrélation

Méthode: Régression de Deming. (N = 55)

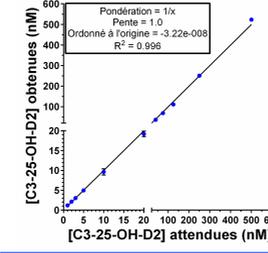


C3-25-OH-D3 (nM)	CV intra-jour (%)	CV inter-jour (%)	Biais total (%)
0.5	22.15	16.36	80.67
1.0	6.85	22.40	32.20
2.0	4.99	16.83	18.19
3.0	5.78	5.75	1.38
5.0	4.12	9.40	-3.16



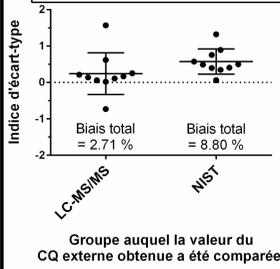
25-OH-D2 (nM)	CV intra-jour (%)	CV inter-jour (%)	Biais total (%)
0.5	31.52	20.87	16.41
1.0	12.40	4.81	9.51
2.0	9.22	7.62	20.97
3.0	7.65	4.91	1.39
5.0	5.66	2.36	-2.60

Résultat non disponible pour la vitamine D2, car les valeurs sont inférieures à la limite de quantification de la méthode LC-MS/MS utilisée en référence.



C3-25-OH-D2 (nM)	CV intra-jour (%)	CV inter-jour (%)	Biais total (%)
0.5	20.02	19.34	44.21
1.0	10.00	19.11	9.37
2.0	10.82	13.62	1.40
3.0	4.45	5.46	-5.74
5.0	4.50	6.59	-7.50

IET et biais - CQ ext.



Conclusions

La validation, de la méthode développée ci-dessus, a été basée sur un document publié par le "Clinical and Laboratory Standards Institute" (3). Afin de compléter la validation, l'effet des cycles gel-dégel, la stabilité de conservation et les interférences (hémolyse, ictere et lipémie) seront vérifiés. Une limite de quantification inférieure pour les 25-OH-D2&D3 et de leur épimère C3 a été établie à 3 nM. Dans un premier temps, ceci permet d'éliminer la surestimation des niveaux de vitamine D à cause de l'interférence par les épimères C3. Dans un second temps, cette méthode permettra de quantifier les épimères C3 et ainsi avec la collaboration d'autres groupes de recherche d'investiguer les fonctions physiologiques de ces épimères C3.

Finalement, la mise au point d'une plateforme automatisée pour la préparation des échantillons sera développée et validée. Ceci permettra de diminuer le temps de travail, d'obtenir une meilleure précision et ainsi de diminuer les erreurs grossières.

Références

- Volmer DA, Mendes LR, Stokes CS. Mass Spectrom Rev. 2015 Jan-Feb;34(1):2-23.
- Lensmeyer G, Poquette M, Wiebe D, Binkley N. J Clin Endocrinol Metab. 2012 Jan;97(1):163-8.
- Clarke W and al. CLSI. 2014. Liquid chromatography-mass spectrometry methods; Approved guideline. C62-A.