

Comparación de los métodos de HPLC y PB en la cuantificación de 25OHD

Se compara por la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y por la de competición proteica (PB), la cuantificación del 25OHD, metabolito de la vitamina D. Se han analizado dos grupos bien diferenciados: recién nacidos y adultos osteoporóticos. Asimismo se ha estudiado la reproductibilidad a partir de la cuantificación de una monomuestra en 10 ensayos diferentes y de dos niños con sobredosificación de vitamina D.

Previamente a la cuantificación se ha efectuado una extracción y purificación mediante elución a través de Sep-Pak C-18 (5). El análisis por HPLC se ha realizado midiendo la absorbancia a 254 nm en la cromatografía de fase reversa en C-18 con metanol: agua (85:15) y flujo de elución 0,7 ml/min. Para la cuantificación por PB se ha empleado la reacción de competición cromatográfica correspondiente al 25OHD, mediante la reacción de competición descrita por TRABA *et al.* (6). Se han seguido volúmenes de elución y porcentajes de recuperación mediante la adición de 25OHD marcado isotópicamente.

Los resultados obtenidos con ambos métodos son homogéneos (tabla I), mientras la concentración a detectar sea relativamente alta, no inferior a los límites de sensibilidad de la cuantificación por HPLC (4 ng absolutos inyectados). Así, en el grupo de recién nacidos en época estival (2), y en la prueba interensayo, las medias obtenidas por cada método son muy similares, debido a que en la mayoría de los casos pudieron ser cuantificados

tanto por HPLC como por PB. Los coeficientes de correlación entre los dos métodos descritos fueron buenos ($r = 0,94$). Se ha observado además que en casos con 25OHD elevado, en la cromatografía eluye acompañado de otra sustancia que interfiere en su cuantificación por HPLC, dando valores superiores a los obtenidos mediante PB (sueros en casos de sobredosificación de vitamina D), dato concordante con resultados ya descritos (4).

En los grupos de pretérminos y de recién nacidos en época de invierno, en que existen concentraciones más bajas que en el grupo anterior (1), la determinación por HPLC resultó problemática, ya que las cantidades encontradas estaban por debajo en los límites de sensibilidad del método. Además en recién nacidos y sobre todo en los pretérminos, en ningún caso la cantidad de suero superó 1 ml (0,5-1 ml). Por competición proteica se procesaron y cuantificaron absolutamente todos los casos.

En el grupo de los osteoporóticos, donde se encuentran también concentraciones bajas de 25OHD (3), de los 16 casos analizados, sólo 5 quedaron sin cuantificar por HPLC, debido a que al tratarse de personas adultas el volumen de sangre extraído en todos los casos rindió más de 1 ml de suero, partiendo por tanto de cantidades absolutas de 25OHD superiores.

Para la prueba interensayo se escogió un volumen de muestra cuya concentración estaba dentro de los límites de sensibilidad del HPLC, pero no tan alta como

Table I. Relación entre las concentraciones séricas (ng/ml + SD) de 25OHD medidas mediante HPLC y PB.

Grupo	HPLC	PB	p	r
Recién nacido Invierno (n = 10)	3,9 ± 5,7	8,7 ± 3,4	< 0,05	0,65 (p < 0,01)
Recién nacido Verano (n = 15)	12,8 ± 11,3	12,5 ± 6,1	NS	0,94 (p < 0,01)
Pretérminos (n = 8)	3,6 ± 4,1	9,5 ± 2,2	< 0,01	0,19 (NS)
Osteoporóticos (n = 16)	4,9 ± 5,2	6,9 ± 4,4	NS	0,66 (p < 0,005)
Interensayo (n = 10)	18,1 ± 2,3	17,6 ± 1,7	NS	0,94 (p < 0,005)
Sobredosificación (n = 2)	22,7 60,0	13,8 45,0	— —	— —

NS = no significativo.

para provocar solapamientos de picos en el cromatograma. Comparando los dos métodos la diferencia entre las medias no fue significativa; sin embargo, al hallar el error cometido se revela como de mayor fiabilidad el método de competición proteica, 12% frente al 9% (p < 0,005) respectivamente.

El método HPLC es más corto, menos laborioso y de menor coste económico, aunque la cromatografía se ha de realizar con una fase móvil y flujo de elución tales que permitan aislar totalmente el pico de 25OHD, con lo que los tiempos de retención a que eluye se alargan, en este caso fueron del orden de 20 min.

El método de HPLC se revela, por tanto, apto para detectar un raquitismo, sobredosificación o conocer el estado nutricional de vitamina D, una vez establecidos los valores normales para el laboratorio, aunque no es aconsejable su utilización analítica con fines de investigación, siendo en este caso necesario recurrir a su combinación como método de purificación con la competición proteica.

Palabras clave: 25-Hidroxivitamina D, Cromatografía líquida de alta presión (HPLC), Competición proteica (PB).

Key words: 25-Hydroxyvitamin D, High Pressure Liquid Chromatography (HPLC), Protein binding (PB).

Bibliografía

1. Markestad, T., Aknes, L., Finne, P. H. y Aarskog, D.: *Pediatrics Res.*, 18, 269-272, 1984.
2. Moya, M., Doménech, E., López-Arias, F. et al.: *An. Esp. Pediatr.*, 16, 383-390, 1982.
3. Riggs, B. L. y Melton, L. J.: *New Engl. J. Med.*, 314, 1676-1686, 1986.
4. Traba, M. L., Quesada, M. Marín, A.: En «Vitamin D. Chemical, Biochemical and Clinical Endocrinology of Calcium Metabolism». (Norman, A. W., Schaefer, K., Herrath, D. V., Frigoleit, H. C., eds.). Walter de Gruyter. Berlin, 1982, pp. 804-807.
5. Traba, M. L., Babé, M., De la Piedra, C. y Marín, A.: *Clin. Med.*, 29, 1806-1807, 1983.
6. Traba, M. L., Quesada, M., Marín, A. et al.: *Rev. esp. Fisiol.*, 40, 69-76, 1984.

I. BALLESTER, E. CORTÉS, M. MOYA y F. CLEMENTE.

Departamento de Pediatría
Facultad de Medicina
03080 Alicante

(Recibido el 15 de octubre de 1986)