

Determinación del 25-hidroxicolecalciferol en suero

M. L. Traba, M. Quesada, A. Marín, C. de la Piedra, M. Babé y F. Navarro

Fundación Jiménez Díaz
Unidad Metabólica
Avda. Reyes Católicos, 2
Madrid-3

(Recibido el 18 de octubre de 1982)

M. L. TRABA, M. QUESADA, A. MARIN, C. DE LA PIEDRA, M. BABÉ and F. NAVARRO.
Determination of 25-Hydroxycholecalciferol in Serum. Rev. esp. Fisiol., **40**, 69-76. 1984.

A precise specific method for measuring 25-hydroxycholecalciferol (25-OH CC) in 2 ml of human serum is described. It includes extraction with acetonitrile, separation with Sep-Pak C-18 cartridges, purification through HPLC and a further quantitation by means of a protein-binding assay. An exhaustive study of this protein-binding method has been performed.

The sensitivity of the protein-binding assay is 20 pg/tube and the inter and intra-assay coefficients of variation are 9.6 % and 8.7 % respectively. The precision of the overall process has been assessed by calculating the inter and intra-assay coefficients of variation, 15.5 and 10.4 % respectively. Mean serum value of 25-OH CC in normal subjects (18-50 years old, during spring) is 11.2 ± 5.5 ng/ml.

Key words: 25-Hydroxycholecalciferol, Sep-Pak C18, Liquid chromatography, Protein competition.

En la última década se ha puesto de manifiesto que la vitamina D es uno de los factores responsables, junto con la hormona paratiroidea y la calcitonina, del mantenimiento homeostático del calcio (1).

Al hablar de vitamina D no podemos referirnos a un único compuesto, sino a toda una familia que tiene carácter vitamínico, siendo el ergocalciferol o vitamina D₂ y el colecalciferol o vitamina D₃ los más importantes (9).

El aporte de vitamina D al organismo se realiza a través de la dieta (15) y por ac-

ción de la luz ultravioleta sobre la piel, convirtiendo el 7-dehidrocolesterol en pro-vitamina D₃ que por acción térmica se transforma en vitamina D₃. La vitamina D₃, de origen endógeno o exógeno, se almacena fundamentalmente en los depósitos grasos del organismo, desde los cuales pasa al hígado por requerimientos fisiológicos, experimentando en dicho órgano la primera hidroxilación, en posición 25, dando origen al 25-hidroxicolecalciferol (25-OH CC). Este metabolito es de 2 a 5 veces más activo que la vitamina D₃ y es el que se encuen-

tra en mayor concentración en sangre (9).

Los niveles séricos de 25-OH CC reflejan el estado nutricional del individuo y su determinación resulta de gran utilidad en el control terapéutico de sujetos tratados con vitamina D, en el conocimiento de la etiología de la hipercalcemia, en el estudio de enfermedades óseas que cursan con osteomalacia, en la cirrosis hepática y en individuos tratados con anticonvulsivantes (15).

En este trabajo presentamos una técnica de determinación de los niveles séricos de 25-OH CC. El metabolito se extrae con acetonitrilo y se purifica a través de cartuchos de Sep-Pak C-18, cromatografía líquida de alta resolución (fase normal y reversa) y se cuantifica por competición proteica, utilizando como proteína ligadora suero humano procedente de sujetos normales u osteomalácidos, realizándose un detallado estudio del método de competición proteica.

Material y métodos

Aparatos. Sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Waters equipado con: bomba M-6000A, inyector universal U6K, módulo de compresión radial RCM-100, detector UV M-440 de longitud de onda fija (254 nm) y registrador-integrador M-730. Contador de radiación β modelo Searle Marck III 6880. Sonificador Branson 32.

Columnas cromatográficas. Columnas Waters de fase normal Radial Pak A (silicagel 10μ). Columnas Waters de fase reversa Radial Pak (C-18, 10μ). Cartuchos Sep-Pak C-18 (Waters).

Disolventes. Todos los disolventes utilizados son de grado analítico (Merck, Ferosa). Para la purificación de las muestras por Sep-Pak C-18 y HPLC los disolventes fueron destilados antes de su uso, excepto el agua, que fue bidestilada. Los

utilizados para HPLC fueron sonicados durante media hora antes de su uso.

Metabolitos. La pureza química del 25-OH CC, cedido por los laboratorios Upjohn y Roussel, se comprobó por cromatografía en placa fina en sílica gel F₂₅₄ (Merck) con hexano:acetato de etilo 6:4 como eluyente (5) y por HPLC con columna de sílica gel con hexano:etanol 95:5 como eluyente, a un flujo de 1 ml/min o con columna de C-18 con metanol:agua 90:10 a un flujo de 1,5 ml/min.

El 25-OH CC estándar se disolvió en metanol hasta dar una disolución 0,005 % (p/v) (disolución A) que se guardó en alícuotas hasta el momento de su uso. La concentración se comprobó mediante espectrofotometría de absorción utilizando un coeficiente de extinción de 18.300 a 265 nm (5).

Veinticinco μ Ci de 25-hidroxi (26[27]-metil-³H)-colecalfiferol (³H-25-OH CC) (Radiochemical Center, Amersham, actividad específica de 9 Ci/mmol) contenidos en 0,5 ml de una disolución de tolueno:etanol 1:1 se secaron bajo corriente de nitrógeno y se redisolviéron en 50 ml de metanol para dar una concentración final de 0,5 μ Ci/ml (disolución B). La disolución se fraccionó en alícuotas que se almacenaron a 4° C hasta el momento de su uso.

Proteína ligadora. Como proteína ligadora se utiliza suero humano, procedente de individuos normales u osteomalácidos, diluido 1/40 en tampón de veronal sódico 0,05 M, pH 8,4 (disolución C) y se almacena en alícuotas a -20° C.

Suspensión carbón-dextrano. Como medio de separación de las fracciones ligada y libre de 25-OH CC se utiliza una suspensión que contiene 1,25 g de carbón y 0,125 g de dextrano T 70 en 100 ml de tampón verona sódico (0,05 M, pH 8,4), que se mantiene en agitación constante media hora antes de su uso.

Líquido de centelleo. Se utiliza una solución compuesta por 8 g de PPO, 0,2 g de POPOP, 360 ml de Triton X-100 y 900 ml de tolueno.

Muestras de suero. Las muestras de sangre para determinar el 25-OH CC se extraen al sujeto en ayunas, entre las 8 y 10 de la mañana, y el suero se almacena a -20°C hasta el momento del ensayo.

MÉTODO EXPERIMENTAL

Extracción. A 2 ml de acetonitrilo se le añaden 2 ml de suero que contienen 4.000 dpm de ^3H -25-OH CC como marcador para calcular la recuperación. Tras agitar la mezcla se mantiene en reposo a 4°C durante 30 min. Después se centrifuga a 2.500 rpm a 4°C , durante 15 min, el sobrenadante se utiliza para la etapa de purificación posterior.

Purificación con Sep-Pak C-18. Se adapta un cartucho de Sep-Pak C-18 a una jeringa de vidrio y se acondiciona con 10 ml de una disolución de metanol:agua 50:50. El sobrenadante procedente de la extracción con acetonitrilo se pasa a través del Sep-Pak C-18 desechándose el eluido. Se lava el cartucho con 3 ml de metanol:agua 70:30 que también se desechan. El 25-OH CC, junto con otros metabolitos de la vitamina D, es eluido con 3 ml de acetonitrilo. La muestra así obtenida se seca bajo corriente de nitrógeno (N_2) en baño de agua a temperatura no superior a 40°C .

Purificación por HPLC. El extracto seco procedente de la purificación por Sep-Pak C-18 se resuspende en $300\ \mu\text{l}$ de una disolución de hexano:etanol 95:5 y se inyecta en el cromatógrafo equipado con una columna de sílica gel. Se eluye con hexano:etanol 95:5 a un flujo de 1 ml/min; la fracción que contiene el 25-OH CC se colecta y se seca bajo corriente de N_2 .

El extracto seco procedente de la purificación por sílica gel se resuspende en $500\ \mu\text{l}$ de metanol:agua 90:10 que se inyectan en el cromatógrafo, eluyéndose a través de una columna de C-18 con el mismo disolvente, a un flujo de 1,5 ml/min. La fracción que contiene el 25-OH CC se seca en corriente de N_2 y se resuspende en $500\ \mu\text{l}$ de metanol. Para calcular la recuperación se utilizan $200\ \mu\text{l}$ y el resto, a diluciones adecuadas, se utiliza en el ensayo de competición proteica. Los tiempos de retención del 25-OH CC, tanto en fase normal como en fase reversa, se calibran antes del ensayo debido a pequeñas variaciones en las condiciones de la columna o del disolvente.

Determinación del 25-OH CC por competición proteica. La curva patrón se construye para cantidades de 25-OH CC comprendidas entre 0,005 y 2,5 ng/tubo. Para ello se hace una serie de diluciones a 1/2 con metanol a partir de la disolución A.

La mezcla de incubación contiene $100\ \mu\text{l}$ de la disolución patrón correspondiente, $400\ \mu\text{l}$ de una disolución de ^3H -25-OH CC (preparada añadiendo a 72 ml de tampón veronal sódico 0,05 M, pH 8,4, 1 ml de la disolución B) y $500\ \mu\text{l}$ de una disolución de proteína ligadora. La dilución de la proteína ligadora debe ser tal, que sea capaz de unir el 50 % del ^3H -25-OH CC en ausencia de 25-OH CC. Es conveniente calcular la dilución adecuada antes de cada ensayo, pues la preparación de proteína ligadora (disolución C) pierde actividad muy rápidamente (aproximadamente es estable durante 1 mes).

La mezcla de incubación se prepara en tubo de vidrio Pyrex (10 × 60 mm) en el que las pérdidas por adhesión a las paredes son menores que en otros materiales (18). Se agitan los tubos y la mezcla se somete a incubación durante 90 min a 4°C . Transcurrido este tiempo se añaden $200\ \mu\text{l}$ de la suspensión de carbón-

dextrano, se agita y después de 15 min de reposo se centrifuga a 2.500 rpm, a 4° C, durante 15 min. Novecientos μ l del sobrenadante (fracción ligada) se transfieren a viales añadiéndose a continuación 10 ml de líquido de centelleo. Se agita y se procede al conteo de la radiactividad en un contador β .

Cuentas iniciales (I). Se calculan a partir de una mezcla de incubación que contiene 100 μ l de metanol, 400 μ l de la disolución de ^3H -25-OH CC y 500 μ l de la disolución de proteína ligadora. Después del período de incubación se añaden 200 μ l de tampón veronal sódico en lugar de la suspensión de carbón-dextrano.

Unión no específica (D). Se calcula a partir de una mezcla de incubación en que se ha sustituido la proteína ligadora por 500 μ l de tampón veronal sódico.

Fracción ligada inicial (B₀). Es la fracción de ^3H -25-OH CC que se une a la proteína ligadora en ausencia de 25-OH CC. Se calcula a partir de una mezcla de incubación a la que se han añadido 100 μ l de metanol en lugar de los 100 μ l de la disolución patrón.

Problemas. En la mezcla de incubación de las muestras problema se sustituyen los 100 μ l de disolución patrón de 25-OH CC por 100 μ l de una disolución en metanol del extracto sérico obtenido después de la etapa de purificación por HPLC en fase reversa.

Cálculos. La curva patrón se construye representando gráficamente el porcentaje de unión [$\%B = (\text{dpm sobr.} / I - D / I) \times 100$] en ordenadas, frente a la cantidad de 25-OH-CC patrón (ng/tubo). Para conocer la cantidad de 25-OH CC presente en los tubos problema se interpola su $\%B$ en la curva patrón. Para calcular la concentración real debe tenerse en cuenta la re-

cuperación del proceso de extracción y purificación para cada muestra.

Resultados

La recuperación obtenida en el proceso de extracción con acetonitrilo y posterior purificación por Sep-Pak C-18 y HPLC (fase normal + fase reversa) ha sido del $58 \pm 11,3 \%$ en 20 determinaciones. La figura 1 muestra el perfil cromatográfico obtenido por HPLC en un suero problema, tras el paso por la columna de fase normal (a) y fase reversa (b), respectivamente.

El método de competición proteica está basado en el de MORRIS y PEACOCK (14). Se estudian varios parámetros implicados en el mismo, realizando diversas modificaciones. Se utiliza tampón veronal sódico en lugar de tampón de fosfatos, por encontrar una menor adherencia del metabolito al vidrio (18). Se estudia la influencia del pH en el medio de incubación (fig. 2), observando que el pH óptimo se encuentra comprendido entre 8,4 y 8,8. El pH influye significativamente sobre el porcentaje de unión a bajas concentraciones de 25-OH CC, mientras que

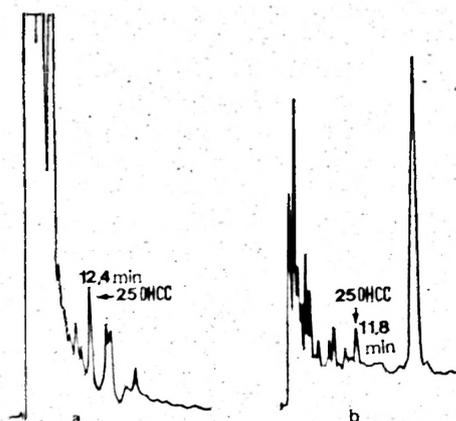


Fig. 1. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC de sueros problema.

(a) Fase normal: hexano/etanol 95:5, flujo: 1 ml/min. Sensibilidad 0,01 AUFS. (b) Fase reversa: metanol/agua 90:10, flujo: 1,5 ml/min. Sensibilidad 0,005 AUFS.

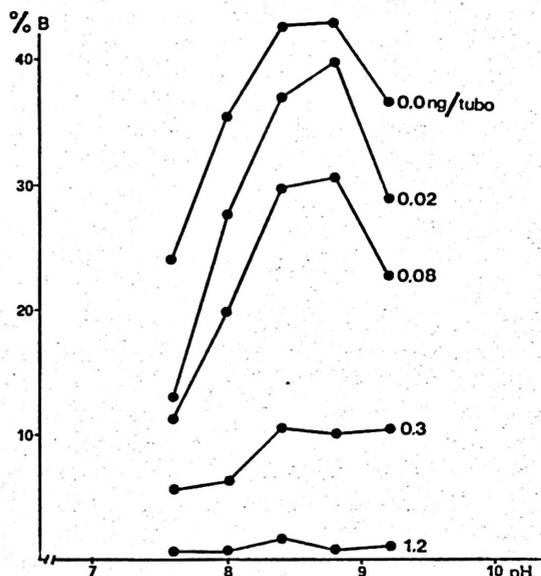


Fig. 2. Efecto del pH sobre el porcentaje de unión de diferentes concentraciones de 25-OH CC a la proteína ligadora.

no parece ser tan decisivo para concentraciones altas. También se estudia la influencia de la concentración de carbón en la suspensión de carbón-dextrano. Se han realizado curvas patrón variando la concentración de carbón (0,312, 0,625, 1,250 y 5,0 g %) y dejando fija la concentración de dextrano (0,125 g %), encontrando que la concentración de carbón más adecuada es 1,25 g %.

Se realizan 6 curvas patrón a diferentes tiempos de incubación, encontrándose que desde los 60 hasta los 150 min no se obtienen diferencias significativas en el porcentaje de unión y tras la adición de la suspensión carbón-dextrano no hay variación de la curva patrón entre los 15 y 30 min. Por otra parte, se observa que durante 30 min después de la centrifugación, no hay variaciones en las cantidades relativas de las fracciones ligada y libre.

El coeficiente de variabilidad (C. V.) intraanálisis del método de competición proteica para un mismo problema fue del 8,7 % (n=8). EL C. V. interanálisis para el mismo problema fue del 9,6 % (n = 10). La

sensibilidad del ensayo es de 20 pg/tubo calculada por el método de las dos desviaciones estándar del punto cero (B_0). Se estudia también la posible interferencia de otros metabolitos 24,25-(OH)₂CC (figura 3). El 50 % de desplazamiento del ³H-25-OH CC se consigue con concentraciones de 25-OH CC similares a las del 24,25-(OH)₂ CC. No se encuentra reacción cruzada con el colecalciferol.

Con objeto de estudiar si el 25-OH CC sérico y el patrón tienen el mismo comportamiento frente a la proteína ligadora, a extractos séricos procedentes tanto de sujetos controles como de pacientes intoxicados con vitamina D. Se les hicieron diluciones seriadas encontrando un total paralelismo entre la curva patrón y el extracto. En la figura 4 se representan las diluciones seriadas de un suero procedente de un paciente intoxicado con vitamina D.

Para estudiar la recuperación del método de competición proteica se adicionan inmediatamente antes de realizar el ensayo de competición proteica, diferentes cantidades de 25-OH CC (0,08, 0,313 y 1,2 ng/tubo) a un extracto sérico de concentración conocida, perteneciente a un suero normal, encontrando recuperacio-

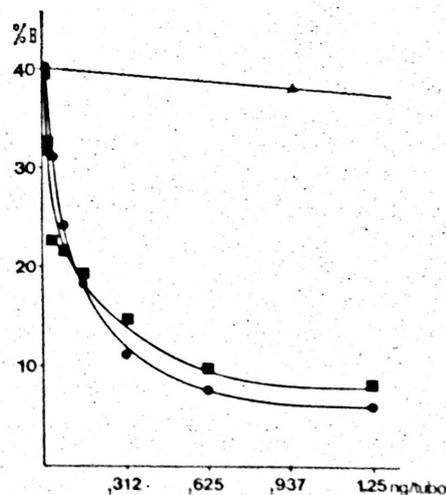


Fig. 3. Curvas patrón obtenidas con diferentes metabolitos (● 25-OH CC, ■ 24,25-(OH)₂ CC, ▲ colecalciferol) frente a la misma proteína ligadora.

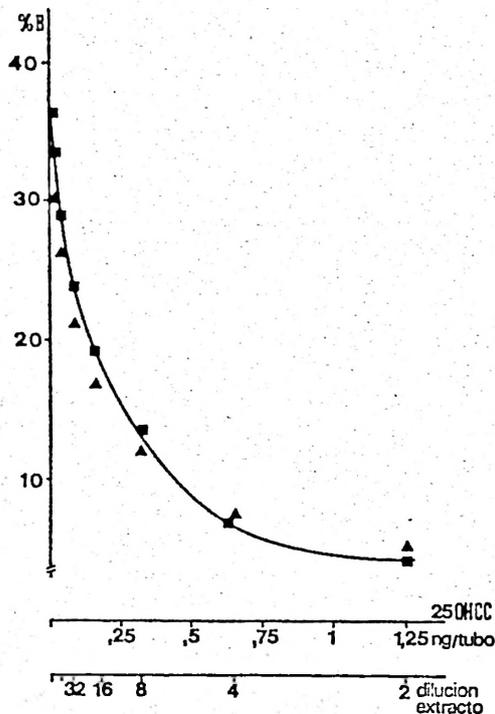


Fig. 4. Similitud entre el comportamiento de distintas diluciones de un extracto sérico y de diferentes concentraciones de 25-OH CC (curva patrón), frente a la proteína ligadora.

nes de 96,5, 84,9 y 59,8 % respectivamente.

La recuperación total del método de determinación del 25-OH CC en suero se calcula adicionando 12,5 ng/ml de 25-OH CC a un suero normal con una concentración de 12,8 ng/ml de 25-OH CC y sometiénolo al proceso de extracción con acetonitrilo, purificación por Sep-Pak C-18 y HPLC en fase normal y reversa y ensayo por competición proteica. Sobre un valor teórico esperado de 25,3 ng/ml (12,8 + 12,5) se obtuvo en 6 determinaciones un valor medio de 21,6 \pm 2,25 ng/ml, es decir, una recuperación del 85,2 %.

La precisión del proceso total (extracción, purificación y determinación por competición proteica) se estudia calculando el C.V. intra e interanálisis siendo

de 10,4 y 15,5 %, respectivamente, en 6 determinaciones.

Los valores normales de 25-OH CC en suero, por el método descrito, son de 11,2 \pm 5,5 ng/ml en 16 sujetos controles de edades comprendidas entre los 18 y 50 años, durante los meses de primavera.

Discusión

Los métodos químicos y biológicos descritos en la literatura (8, 16, 19) no son útiles para determinar el 25-OH CC sérico por su baja sensibilidad. La aparición de los métodos de competición proteica de gran sensibilidad, permite la cuantificación de dicho metabolito. Estos métodos utilizan proteínas ligadoras de diversos orígenes (4, 6, 12-14) que dan reacción cruzada con otros metabolitos de la vitamina D, por lo que se requiere un cuidadoso proceso de extracción (2-4, 6, 7, 12-14) y purificación (2, 3, 7, 12, 13) del 25-OH CC antes del ensayo.

Trabajos previos (20) han demostrado que la extracción con acetonitrilo conduce a una mayor recuperación total que la obtenida con metanol (4), por eliminar una etapa de secado en la que sería preciso la utilización del rotavapor por el gran volumen de disolvente empleado.

Se ha elegido la purificación por Sep-Pak C-18 frente al Sep-Pak sílica y Sephadex LH-20, en base a su rapidez, economía y por la obtención de mejores perfiles cromatográficos, ya que se elimina gran parte de contaminantes que absorben a 254 nm (20).

Se ha utilizado una doble purificación por cromatografía líquida de alta resolución (fase normal + fase reversa) para aislar el 25-OH CC presente en el suero, con el fin de evitar las reacciones cruzadas de la proteína ligadora con otros metabolitos de la vitamina D.

Por otra parte, se ha realizado un estudio crítico del método de determinación del 25-OH CC por competición proteica, llegándose a establecer las condiciones

más favorables para el ensayo. Se ha reducido el tiempo de diversas etapas de la técnica y se permite, en algunas de ellas, una mayor flexibilidad en cuanto a: tiempo de incubación (6-150 min), reposo tras la adición del carbón-dextrano (15-30 min) y tras la centrifugación (0-30 min).

La mínima cantidad detectable en el análisis del 25-OH CC por competición proteica es de 20 pg/tubo, lo que permite detectar el valor de este metabolito en individuos normales y osteomalácicos.

Los coeficientes de variación intra e interanálisis encontrados, tanto en el ensayo de competición proteica como en el proceso total, se encuentran dentro de los márgenes establecidos en la literatura (2, 10, 12).

Los valores de 25-OH CC en sujetos normales ($11,2 \pm 5,5$ ng/ml) están dentro del rango dado por otros autores (2, 3, 6, 7, 10, 12, 13, 17) cuando se utiliza un proceso de purificación previo al análisis por competición proteica, y son inferiores a los valores expresados cuando se omite el proceso de purificación (4, 11).

Nota adicional. En «Revista Clínica Española». 171, 195-199, 1983, se ha publicado, por los mismos autores, un estudio comparativo para la determinación de 25-OH CC en el cual se indica que no es absolutamente necesaria la purificación por fase reversa en HPLC.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado gracias a una ayuda concedida por la Comisión Asesora de la Investigación Científica y Técnica del Ministerio de Universidades e Investigación.

Resumen

Se presenta una técnica precisa y específica para la determinación de los niveles de 25-hidroxicolecalciferol (25-OH CC) en 2 ml de suero, que implica extracción con acetonitrilo, purificación mediante cartuchos de Sep-Pak C-18, cromatografía líquida

de alta resolución y cuantificación por análisis de competición proteica, realizándose un detallado estudio de este último.

La sensibilidad del método presentado es de 20 pg/tubo y los coeficientes de variación inter e intra-análisis son de 9,6 % y 8,7 % respectivamente. Los valores de 25-OH CC encontrados en 16 sujetos normales (18-50 años, durante la primavera) han sido de $11,2 \pm 5,5$ ng/ml. La precisión del proceso total se ha estudiado calculando el coeficiente de variación interanálisis (15,5 %) e intraanálisis (10,4 %).

Bibliografía

1. AVIOLI, S. V.: *Arch. Intern. Med.*, **138**, 835-888, 1978.
2. BAYARD, F., BEC, P. y LOUET, J. P.: *Eur. J. Clin. Invest.*, **2**, 195-198, 1972.
3. BELSEY, R., DE LUCA, H. F. y POTTS, J. T.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **33**, 554-557, 1971.
4. BELSEY, R., DE LUCA, H. F. y POTTS, J. T.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **38**, 1046-1051, 1974.
5. BLUNT, J. W., DE LUCA, H. F. y SCHNOES, H. K.: *Biochemistry*, **7**, 3317-3322, 1968.
6. BOUILLON, R., VAN KERHOVE, P. y DE MOOR, P.: *Clin. Chem.*, **22**, 364-368, 1976.
7. CALDAS, A. E., GRAY, R. W. y LEMMANN, J.: *J. Lab. Clin. Med.*, **91**, 840-849, 1978.
8. CHIN, P. S.: *Analyt. Chem.*, **37**, 301-303, 1965.
9. DE LUCA, H. F.: «Vitamin D, metabolism and function». Springer. Verlag, Berlín, 1979.
10. EDELSTEIN, S., CHARMAN, M., LAWSON, D. E. M. y KODICEK, E.: *Clin. Sci. Mol. Med.*, **46**, 231-240, 1974.
11. GARCÍA PASCUAL, B., PEYTREMANN, A., COURVOISIER, B. y LAWSON, D. E. M.: *Clin. Chim. Acta*, **68**, 99-105, 1976.
12. HADDAD, J. G. y CHYN, J. K.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **33**, 992-995, 1971.
13. HOLLIS, B. W., BURTON, J. H. y DRAPER, H. H.: *Steroids*, **30**, 285-293, 1977.
14. MORRIS, J. F. y PEACOCK, M.: *Clin. Chim. Acta*, **72**, 383-391, 1976.
15. NORMAN, A. W.: En «Vitamin D: The Calcium Homeostatic Steroid Hormone». Academic Press. Nueva York, 1979, pp. 402-460.
16. PASSANNANTE, A. J. y AVIOLI, L. V.: *Analyt. Biochem.*, **15**, 287-289, 1966.
17. PREECE, M. A., O'RIORDAN, J. L. H., LAWSON, D. E. M. y KODICEK, E.: *Clin. Chim. Acta*, **54**, 235-242, 1974.

18. QUESADA, M.: Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma, Madrid, 1980.
19. SCHACHTER, D. y ROSEN, S. M.: *Amer. J. Physiol.*, 196, 357-361, 1959.
20. TRABA, M., NAVARRO, F., MARIN, A., DE LA PIEDRA, C., BABÉ, M. y SACEDA, M.: En «Vitamin D. Chemical, Biochemical and Clinical Endocrinology of Calcium Metabolism» (A. W. Norman, K. Schaefer, D. von Herrath y H.-G. Frigoleit, eds.). Walter de Gruyter, Berlín, 1982, pp. 804-807.