

Ταυτόχρονος ποσοτικός προσδιορισμός μεταβολιτών της βιταμίνης D σε λιπώδη ιστό με LC-MS/MS

Σ. Τσάφου, Α. Καρκαμπούνας, M.E. Λέκκα
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110, Ιωάννινα, Ελλάδα
τηλ. 2651008367 Φαξ. 2651008774
mlekka@uoi.gr

Περίληψη

Η βιταμίνη D θεωρείται ότι εμπλέκεται στη λειτουργία πολλών συστημάτων όπως το ανοσολογικό, το καρδιαγγειακό και το αναπαραγωγικό, ειδικότερα δε σχετίζεται με τη ρύθμιση της ομοιοστασίας ασβεστίου και φωσφόρου και την υγεία των οστών. Μετά τη βιοσύνθεσή της στο δέρμα των θηλαστικών με επίδραση της υπεριώδους ηλιακής ακτινοβολίας, αποθηκεύεται στον λιπώδη ιστό.

Ο προσδιορισμός μεταβολιτών της βιταμίνης D σε δείγματα λιπώδους ιστού παρουσιάζει πολλές δυσκολίες, λόγω της πολυπλοκότητάς της μήτρας, της δομικής ομοιότητας των μεταβολιτών, του υδρόφοβου χαρακτήρα και της ιδιαίτερα χαμηλής συγκέντρωσής τους στα βιολογικά δείγματα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη και αξιολόγηση αναλυτικής μεθόδου για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό τεσσάρων μεταβολιτών της βιταμίνης D (D3, D2, 25(OH)D3, 24,25(OH)₂D3) σε δείγματα λιπώδους ιστού με φασματομετρία μάζας σε σύζευξη με υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής πίεσης (UHPLC-MS/MS), με χρήση του υβριδικού αναλυτή μάζας Orbitrap.

Η κατεργασία των δειγμάτων λιπώδους ιστού περιλαμβάνει ομογενοποίηση με χρήση υπερήχων, εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE) και αντίδραση Diels-Alder για τη δημιουργία παραγώγων των μεταβολιτών με το αντιδραστήριο 4-φαίνυλο-1,2,4-τριαζόλινο-3,5-διόνη (PTAD), πριν την τελική ανάλυσή τους με LC-MS/MS.

Με χρήση UHPLC ανάστροφης φάσης σε κατάλληλο πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης επιτεύχθηκε ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των 4 μεταβολιτών της βιταμίνης D σε δείγματα λιπώδους ιστού χοίρου. Η ανάκτηση της εκχύλισης για τους μεταβολίτες D3, D2, 24,25(OH)₂D3 βρέθηκε 65 ±4%, ενώ για το μεταβολίτη 25(OH)D3 βρέθηκε 40 ±5%. Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου βελτιστοποιήθηκαν σημαντικά με την δημιουργία παραγώγων των μεταβολιτών, καθώς και με τη χρήση μεθυλαμίνης στην κινητή φάση.

Συμπερασματικά, η παρούσα μέθοδος επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τεσσάρων μεταβολιτών της βιταμίνης D. Χαρακτηρίζεται από ικανοποιητική επαναληψιμότητα, αναπαραγωγιμότητα, χαμηλό όριο ανίχνευσης και είναι γραμμική για ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων.

Λέξεις-Κλειδιά: βιταμίνη D, λιπώδης ιστός, LC-MS/MS

Abstract

Vitamin D is involved in the function of numerous systems, such as immune, cardiovascular and reproductive system, whilst it mainly relates to the regulation of calcium and phosphorus homeostasis and bone health. Following its biosynthesis in mammalian skin by the action of UV radiation, vitamin D is stored in the adipose tissue.

The determination of vitamin's D metabolites in adipose tissue presents difficulties, due to the matrix complexity, the structural similarity that they exhibit, their hydrophobicity and their very low concentration in biological fluids.

The aim of the present study was the development and evaluation of an analytical method for the simultaneous quantification of four metabolites of vitamin D (D3, D2, 25(OH)D3, 24,25(OH)₂D3) in adipose tissue samples, by mass spectrometry coupled with high-performance-liquid chromatography (UHPLC-MS/MS), utilizing the hybrid Orbitrap mass analyzer.

The pretreatment of adipose tissue samples involves homogenization by the use of ultrasonicator, liquid-liquid extraction (LLE) and Diels-Alder reaction to generate derivatives of the metabolites using 4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione (PTAD) reagent, before the analysis by LC-MS / MS.

Using reversed phase HPLC on suitable elution gradient program the chromatographic separation of four metabolites of vitamin D on porcine adipose tissue samples was achieved. The extraction recovery rate of D3, D2, 24,25(OH)₂D3 was 65 ± 4%, and for the metabolite 25(OH)D3, 40 ± 5% respectively. The analytical characteristics of the method were significantly optimized by the derivatization of the metabolites and by the addition of methylamine in the mobile phase.

In conclusion, the present method allows the simultaneous determination of four metabolites of vitamin D. It is characterized by repeatability, reproducibility, very low detection limit and it is linearity over a wide range of concentrations.

Keywords: vitamin D, adipose tissue, LC-MS/MS

1. Εισαγωγή

Ο ρόλος της βιταμίνης D στην εντερική απορρόφηση του ασβεστίου αποτελεί την πιο σημαντική και μια από τις πιο γνωστές δράσεις της, ενώ είναι ευρέως γνωστός ο ρόλος της και στην εντερική απορρόφηση του φωσφόρου, παρότι αυτός έχει μελετηθεί σε πολύ μικρότερο βαθμό. Ελλείψει βιταμίνης D, η εντερική απορρόφηση του ασβεστίου κυμαίνεται σε ποσοστό 10 - 15%, ενώ του φωσφόρου σε ποσοστό 60%. Ωστόσο, η βιταμίνη D εμπλέκεται επιπλέον και στη λειτουργία πολλών συστημάτων όπως το ανοσολογικό, το καρδιαγγειακό και το αναπαραγωγικό.

Η βιταμίνη D ανήκει στις σεκο-στεροειδείς ενώσεις, όπως καλούνται οι στεροειδείς ενώσεις στις οποίες ένας από τους δακτυλίους έχει υποστεί διάσπαση. Στην περίπτωση της βιταμίνης D πρόκειται για τον β-δακτύλιο. Κατατάσσεται στις ορμόνες και όχι στις βιταμίνες, καθώς η σημαντικότερη για τον άνθρωπο μορφή της βιταμίνης D, η βιταμίνη D3, παράγεται στην επιδερμίδα μέσω της επίδρασης της υπεριώδους ακτινοβολίας, ενώ η βιταμίνη D2 λαμβάνεται μέσω της διατροφής. Οι δύο αυτές μορφές της βιταμίνης D διαφέρουν δομικά στις πλευρικές αλυσίδες, με την D2 να περιέχει επιπλέον έναν διπλό δεσμό μεταξύ των ανθράκων C22-C23 και μια μεθυλομάδα στον C24.

Ο μεταβολισμός της βιταμίνης D – όπου αναφέρεται ως D, αντιπροσωπεύονται αμφότερες οι D3 και D2 – περιλαμβάνει αρχικά μια υδροξυλίωση στον άνθρακα 25, η οποία λαμβάνει χώρα κατά κύριο λόγο στο ήπαρ. Ο μεταβολίτης 25(OH)D, αποτελεί την κύρια κυκλοφορούσα μορφή της βιταμίνης D στο αίμα και είναι αυτός που προσδιορίζεται κλινικά για τον καθορισμό των επιπέδων της στον οργανισμό. Η υδροξυλίωση στον C24-αποτελεί το πρώτο βήμα καταβολισμού των μεταβολιτών της βιταμίνης D, που οδηγεί στην απέκκρισή τους από τον οργανισμό ως καλσιτροϊκό οξύ και λαμβάνει χώρα κατά κύριο λόγο στους νεφρούς.

Ως λιπόφιλο μόριο, η βιταμίνη D αποθηκεύεται στα κύτταρα του λιπώδους ιστού, από όπου ελευθερώνεται στην κυκλοφορία, προσδεμένη στην πρωτεΐνη πρόσδεσης της βιταμίνης D (DBP, D Binding Protein), όταν είναι απαραίτητη στον οργανισμό.

Η ανάλυση των μεταβολιτών της βιταμίνης D είναι απαιτητική, καθώς οι μεταβολίτες αυτοί παρουσιάζουν ισχυρά υδρόφοβο χαρακτήρα και μεγάλη δομική ομοιότητα, ενώ η συγκέντρωσή τους στο αίμα βρίσκεται σε επίπεδα της τάξης των nmol και pmol. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των μεταβολιτών της βιταμίνης D σε δείγματα λιπώδους ιστού δυσχεραίνεται επιπλέον από την αυξημένη πολυπλοκότητα της μήτρας, οπότε και απαιτούνται ευαίσθητες μέθοδοι εκχύλισης και ανίχνευσης. Αν και τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί μεγάλη πρόοδος προς την κατεύθυνση της ποσοτικής ανάλυσης των μεταβολιτών της βιταμίνης D σε δείγματα πλάσματος / ορού, στην περίπτωση δειγμάτων λιπώδους ιστού η βιβλιογραφία είναι σπάνια.

Μέθοδοι βασισμένες στην υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης σε σύζευξη με φασματογράφο μάζας (LC-MS/MS) έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών της βιταμίνης D στο αίμα. Οι μέθοδοι αυτές επιτρέπουν το διαχωρισμό των αναλυτών με βάση την πολικότητα, τον ιονισμό και την αναλογία μάζα προς φορτίο (m/z), ενώ δύνανται να προσφέρουν πολύ χαμηλά όρια ποσοτικοποίησης. (Shimada, Mitamura et al. 2001) Οι μεταβολίτες της βιταμίνης D παρουσιάζουν μικρή ικανότητα ιοντισμού κατά τη χρήση πηγών ηλεκτροψεκασμού (ESI) και χημικού ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI), λόγω της έλλειψης ευκόλως ιοντιζόμενων ομάδων στο μόριό τους. Ωστόσο, το σύστημα συζυγιακών διπλών δεσμών που περιέχουν, καθιστά δυνατή τη δημιουργία παραγώγων τους μέσω αντίδρασης τύπου Diels–Alder. (Aronov, Hall et al. 2008) Η παραγωγοποίηση έχει συχνά χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της ικανότητας ιοντισμού μιας ελάχιστα ιοντιζόμενης ένωσης σε ESI/APCI-MS. Έτσι, με σκοπό την αύξηση της ευαισθησίας των ενώσεων της βιταμίνης D στους διάφορους τρόπους ιοντισμού, έχει εξεταστεί η εφαρμογή αντιδραστηρίων τύπου Cookson (4-υποκατεστημένη 1,2,4-τριαζολινο-3,5-διόνη), τα οποία αντιδρούν ταχέως και ποσοτικά με την ομάδα του συζυγούς διένιου που βρίσκεται παρούσα σε όλα τα μόρια των μεταβολιτών της βιταμίνης D. Το αντιδραστήριο PTAD (4-φαινυλο-1,2,4-τριαζολινο-3,5-διόνη), αντιπροσωπευτικό των αντιδραστηρίων τύπου Cookson, πλεονεκτεί σημαντικά ως προς το ότι είναι εμπορικά διαθέσιμη. Επιπλέον, περαιτέρω αύξηση στην ικανότητα ιοντισμού των ενώσεων αυτών επιτυγχάνεται με την προσθήκη μεθυλαμίνης στην κινητή φάση, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ιόντων προσθήκης υψηλής έντασης. (Higashi, Shibayama et al. 2008)

2. Μεθοδολογία

2.1 Υλικά

Οι πρότυπες ουσίες D3, D2, 25(OH)D και 24,25(OH)2D, το αντιδραστήριο PTAD, οι υψηλού βαθμού καθαρότητας διαλύτες ακετονιτρίλιο (AcN) και μεθυλο-tert-βουτυλαιθέρας (MTBE), το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) και το άζωτο (N₂) προμηθεύτηκαν από τη Sigma-Aldrich. Οι διαλύτες για την ανάλυση με LC-MS προμηθεύτηκαν από τη Fisher Scientific.

2.2 Προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων και δειγμάτων

Οι πρότυπες ουσίες διαλυτοποιήθηκαν σε AcN και παρασκευάστηκε μείγμα προτύπων ουσιών που αποθηκεύτηκε στους -20°C. Τα δείγματα υποδόριου λιπώδους ιστού χοίρου

τεμαχίστηκαν σε πολύ λεπτά κομμάτια, ομογενοποιήθηκαν σε 10% w/w PBS με τη χρήση υπερήχων και αποθηκεύτηκαν στη συνέχεια στους -80°C μέχρι τη στιγμή της ανάλυσης.

2.3 Εκχύλιση

Δείγμα ομογενοποιήματος αποψύχεται και ακολουθεί κατεργασία με διαλύτη AcN για την αποδέσμευση των μεταβολιτών από τις πρωτεΐνες δέσμευσης και εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης οπότε οι μεταβολίτες κατανέμονται μεταξύ συστήματος διαλυτών AcN:MTBE:PBS. (Lipkie, Janasch et al. 2013)

2.4 Σχηματισμός παραγώγων

Το συνολικό εκχύλισμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού υπό ατμόσφαιρα N₂, οπότε ακολουθεί η προσθήκη του αντιδραστηρίου PTAD για τη δημιουργία παραγώγων των μεταβολιτών.

2.5 LC-MS/MS

Για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό των αναλυτών χρησιμοποιήθηκε στήλη PFP Hypersil Gold (50x2.1 mm, 1.9μ) σε σταθερή θερμοκρασία 25°C. Η κινητή φάση A αποτελείται από H₂O με 0.1% φορμικό οξύ - 5μM μεθυλαμίνη και η κινητή φάση B από AcN με 0.1% φορμικό οξύ - 5μM μεθυλαμίνη. Η ταχύτητα ροής ρυθμίστηκε στα 300 μL/min ενώ το σύστημα βαθμωτής έκλουσης είχε ως εξής: 65% B, 0-3.5 min: 98% B, 4.5 min: 98% B, 8 min: 65% B και 10 min: 65% B. Ο όγκος έγχυσης ήταν 4μL. Η ποσοτικοποίηση των αναλυτών έλαβε χώρα με τη χρήση διαδοχικής φασματομετρίας μάζας (MS / MS), σε φασματογράφο μάζας LTQ Orbitrap XL συζευγμένο με πηγή παραγωγής ιόντων ESI, σε θετικό ιονισμό.

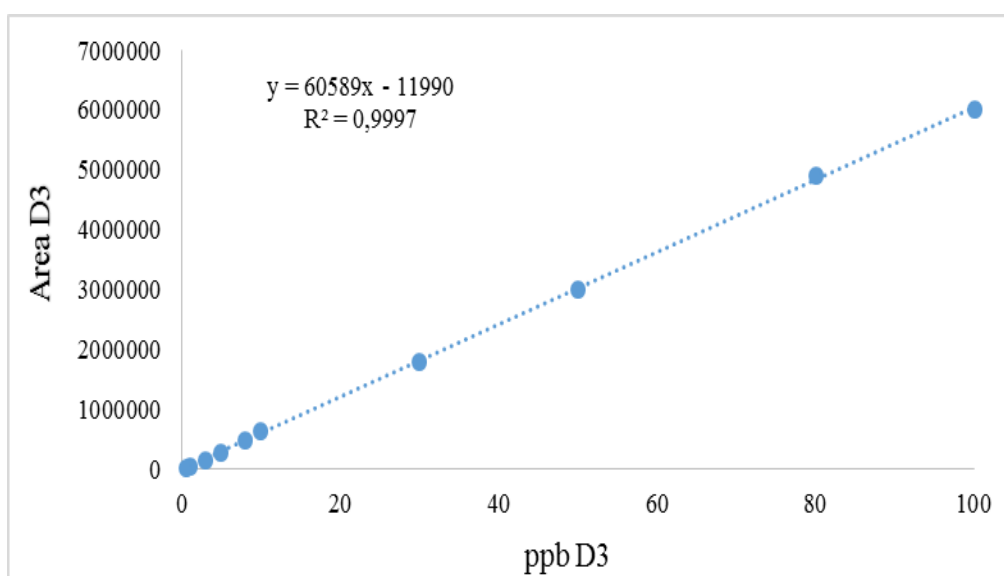
3. Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο σχήμα 1 απεικονίζεται ενδεικτικά η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για το μεταβολίτη D3. Οι συντελεστές των γραμμικών περιοχών των αναλυτών βασίζονται σε τουλάχιστον έξι σημεία δεδομένων και όπως φαίνεται στον πίνακα 1, η ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης έδειξε εξαιρετική γραμμικότητα σε όλο το εύρος βαθμονόμησης ($R^2 \geq 0,999$). Στον πίνακα 1 απεικονίζονται τα κυριότερα αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου, τα όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης για τα παράγωγα των μεταβολιτών της βιταμίνης D με το αντιδραστήριο PTAD, καθώς και για τις μητρικές ενώσεις.

Η ανάκτηση της εκχύλισης για τους μεταβολίτες D3, D2, 24,25(OH)₂D3 βρέθηκε 65 ±4% για την LLE, ενώ για το μεταβολίτη 25(OH)D3 40 ±5%. Στα ποσοστά ανάκτησης της μεθόδου συμβάλλει σημαντικά η επίδραση της μήτρας, η οποία ελαττώνει το λαμβανόμενο σήμα, όπως έδειξε η αναλυτική μελέτη του φαινομένου.

Η παρούσα μέθοδος χαρακτηρίζεται από χαμηλό όριο ανίχνευσης (0.5-2 ppb, ανάλογα με το μεταβολίτη), επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα. Οι μεταβολίτες της βιταμίνης D δίνουν ένα πολύ πλούσιο φάσμα ιόντων MS/MS λόγω μεγάλου αριθμού πορειών θραυσματοποίησης σε χαμηλή ενέργεια. Αντίθετα, τα φάσματα των παραγόμενων ιόντων των μεταβολιτών της D με το αντιδραστήριο PTAD επιδεικνύουν μόνο ένα κύριο ιόν θραύσματος σε m/z 298, οπότε ευνοείται σημαντικά η ανάλυση του φάσματος μάζας. Η μεθυλαμίνη που προστίθεται στην κινητή φάση αυξάνει επιπλέον την ευαισθησία της μεθόδου με το σχηματισμό των ιόντων προσθήκης $[M + CH_3NH_3]^+$, χωρίς να επηρεάζεται ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των αναλυτών. (Higashi, Shibayama et al. 2008)

Κατά την αντίδραση των αναλυτών με το αντιδραστήριο PTAD σχηματίζονται δύο επιμερείς ενώσεις, οι 6S και 6R, λόγω του ότι το αντιδραστήριο αντιδρά με την S-cis-διενο ομάδα τόσο από την α όσο και από τη β πλευρά. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο χρωματογραφικών κορυφών, με την προϋπόθεση ότι τα δύο επιμερή διαχωρίζονται πλήρως κατά το χρωματογραφικό διαχωρισμό. Στην περίπτωση αυτή, η κύρια κορυφή, που ανήκει στο ισομερές 6S, χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό. Στη μελέτη μας η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης (300 $\mu\text{L}/\text{mL}$) είχε ως αποτέλεσμα την έκλυση των δύο ισομερών ως μία κορυφή για όλους τους μεταβολίτες, όπως ενδεικτικά φαίνεται στο σχήμα 2 για το μεταβολίτη D3, γεγονός που αύξησε περαιτέρω την ευαισθησία ανίχνευσης.

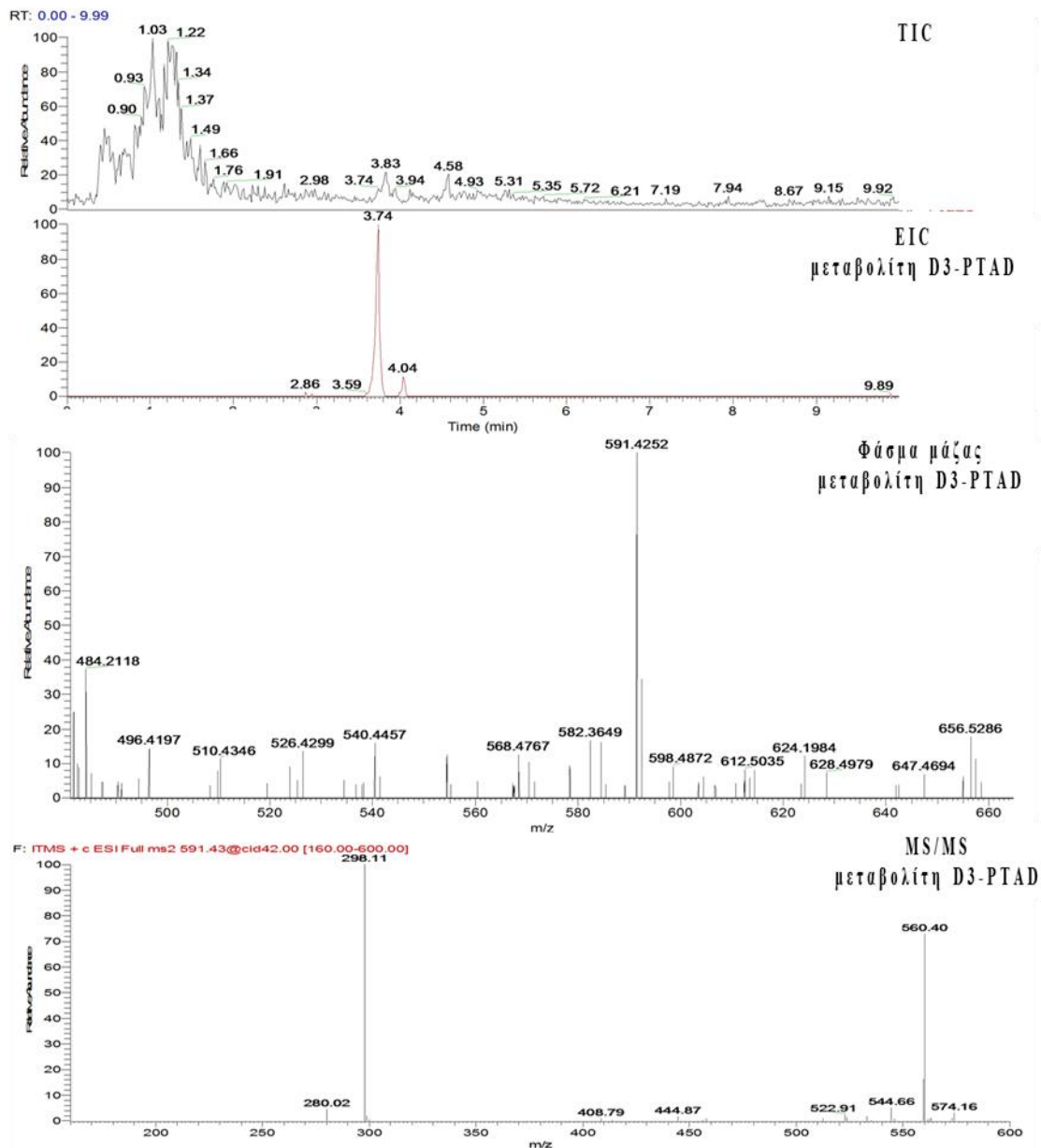


Σχήμα 1: Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για το μεταβολίτη D3

Πίνακας 1

Παράγωγο PTAD	με	Μάζα (m/z)	Θραύσμα (m/z)	LOD ¹ (ppb)	LOQ ² (ppb)	R ²	LOD ³
D3		591,4252	298.1	0.2	0.5	0.9997	3
D2		603,4275	298.1	0.4	1	0.9994	4
25(OH)D3		607,4216	298.1	0.4	1	0.9996	4
24,25(OH) ₂ D3		623,4160	298.1	0.5	2	0.9995	6

1.Όριο ανίχνευσης 2. Όριο Ποσοτικοποίησης 3.Όριο ανίχνευσης μητρικών ενώσεων



Σχήμα 2: TIC, EIC, MS και MS/MS αντιπροσωπευτικού μεταβολίτη D3-PTAD δείγματος λιπώδους ιστού

4. Συμπεράσματα

Με την παρούσα μέθοδο επιτυγχάνεται ο ταυτόχρονος ποσοτικός προσδιορισμός τεσσάρων σημαντικών μεταβολιτών της βιταμίνης D και συγκεκριμένα των D3, D2, 25(OH)D3 και 24,25(OH)₂D3 σε δείγματα λιπώδους ιστού. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από ικανοποιητική επαναληψιμότητα, αναπαραγωγιμότητα, χαμηλό όριο ανίχνευσης και γραμμικότητα για ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων. Η χρήση εκχύλισης υγρής-υγρής φάσης απλοποιεί τη διαδικασία απομόνωσης των μεταβολιτών από τη μήτρα. Η δημιουργία παραγώγων των μεταβολιτών και η χρήση μεθυλαμίνης στην κινητή φάση ενισχύουν σε μεγάλο βαθμό την ευαισθησία της ανίχνευσης. Η U-HPLC βελτιώνει σημαντικά τον χρωματογραφικό διαχωρισμό, τον χρόνο ανάλυσης (10 min) και σε σύζευξη με MS επιτρέπει την ανάλυση ιδιαίτερα απαιτητικών βιολογικών δειγμάτων.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:

Οι συγγραφείς θα ήθελαν να ευχαριστήσουν τη Μονάδα Περιβαλλοντικής Οργανικής και Βιοχημικής Ανάλυσης υψηλής ευκρίνειας ORBITRAP–LC–MS του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την πρόσβαση στις υπηρεσίες της μονάδας.

4. Βιβλιογραφία

Aronov, P. A., L. M. Hall, et al. (2008). "Metabolic profiling of major vitamin D metabolites using Diels–Alder derivatization and ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry." *Anal Bioanal Chem* **391**(5): 1917-1930.

Higashi, T., Y. Shibayama, et al. (2008). "Liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of salivary 25-hydroxyvitamin D3: a noninvasive tool for the assessment of vitamin D status." *Anal Bioanal Chem* **391**(1): 229-238.

Lipkie, T. E., A. Janasch, et al. (2013). "Quantification of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D in soft tissues by liquid chromatography–tandem mass spectrometry." *J Chromatogr B* **932**(0): 6-11.

Shimada, K., K. Mitamura, et al. (2001). "Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids." *J Chromatogr A* **935**(1–2): 141-172.