



## 25-hydroxy-vitamine D3, van HPLC-UV naar UPLC-MS

**Erik Olyslager 2, Stephan Kamphuis 1.**

1 Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium  
2 Klinisch Farmaceutisch & Toxicologisch Laboratorium  
Postbus 9014  
7300 DS Apeldoorn  
e.olyslager@gelre.nl  
www.docfrog.nl

### Inleiding

Het laboratoriumonderzoek op lichaamsvreemde stoffen wordt in Nederland meestal verricht in laboratoria van ziekenhuisapotheken, waarbij lichaamseigen stoffen veelal worden bepaald in klinisch chemische laboratoria. In ons apotheeklaboratorium maken we o.a. gebruik van HPLC technieken en hiermee worden meerdere vitaminebepalingen uitgevoerd. Tot ongeveer een jaar geleden werd voor de vitamine D analyse een standaard applicatie gebruikt van de firma "Chromsystems". Deze standaard applicatie maakt gebruik van HPLC in combinatie met UV detectie. Door de mindere aspecten van deze applicatie waaronder lange analysetijd, matige sensitiviteit en bewerkelijke monstervoorbewerking, is de applicatie omgezet naar UPLC-MS.

### Vitamine D

Vitamine D is een groep van in vet oplosbare prohormonen, waarvan de twee belangrijkste vormen vitamine D2 (ergocalciferol, de plantaardige vorm) en vitamine D3 (cholecalciferol, de dierlijke vorm) zijn. Vitamine D3 kan in het menselijk lichaam worden aangemaakt onder invloed van ultraviolet licht van de zon. De endogene synthese (>90%) is veelal ontoereikend waardoor aanvoer uit externe aanvoer noodzakelijk blijft.

Vitamine D3 wordt vaak gezien als prohormoon, en is de precursor bij de 25-hydroxylering en 1-hydroxylering in respectievelijk lever en nieren, waarna het actieve hormoon 1,25-dihydroxyvitamine D wordt geproduceerd (1). Vitamine D speelt een belangrijke rol in diverse orgaansystemen, waaronder de darmen, nieren, bot en de bijnieren. Indien geen nier en/of leverproblemen aanwezig zijn kan volstaan worden met alleen een meting van 25-OH vitamine D (Vit. D3).

Vitamine D is tegenwoordig een hot topic en wordt veelvuldig kritisch besproken in diverse medische discussies zowel internationaal als nationaal. Een lage vitamine D-status wordt

in verband gebracht met een verhoogd risico op bovenste luchtweginfecties, astma, auto-immuunziekten en diverse typen maligniteiten, zoals prostaat-, colon- en borstkanker. Een tekort is gerelateerd aan het optreden van hartfalen. De Nederlandse Gezondheidsraad adviseert daarom voor 25-hydroxyvitamine D momenteel een algemene ondergrens van 30 nmol/l en voor vrouwen  $\geq 50$  jaar en mannen  $\geq 70$  jaar een ondergrens van 50 nmol/l (2).

Internationale experts pleiten voor een serumconcentratie 25-hydroxyvitamine

D van tenminste 75 nmol/l (3,4) ten behoeve van de niet-calcaemische functies en kankerpreventie (5). Nederlandse laboratoria houden gemiddeld genomen 50 nmol/l 25-hydroxyvitamine D als minimum aan voor alle seizoenen en leeftijden, conform voorgesteld Europees beleid, en 75 of 80 nmol/l als streefwaarde (6).

Aangezien het aantal aanvragen voor vitamine D de laatste jaren erg is toegenomen is het zeer wenselijk om een kwalitatief goede bepaling in huis te hebben die snel, gevoelig en goedkoop is.

### Materiaal en Methode

#### Chemicaliën en apparatuur

##### Leveranciers

Ammoniumformiaat, mierenzuur en methanol: Fluka.  
Ammonia, natriumhydroxyde (NaOH) en zinksulfaat-heptahydraat: Merck.  
Standaarden: Chromsystems.  
Controles: UTAK.

SPE blok : Waters Positive Pressure-96 Processor

HPLC : Waters ACQUITY UPLC

Detector : Waters Quattro Premier

Kolom : Waters CSH C18, lengte : 50 mm, diameter : 2,1 mm, deeltjes grootte: 1,7  $\mu$ m

$\mu$ Elutie 96

well plate : Waters OASIS HLB, 2 mg, 30  $\mu$ m



UPLC instellingen

Eluens A : 5 mM ammoniumformiaatbuffer pH=3,0  
Eluens B : methanol met 0,1% mierenzuur  
Gradient  
(curve lineair) : t=0 : 80% B  
                          t=0,7 : 80% B  
                          t=2,0 : 95% B  
                          t=3,0 : 95% B  
                          t=3,01: 80% B  
                          t=4,0 : 80% B  
Flow : 0,4 ml/min  
Injectievolume : 10 µl  
Kolom temperatuur : 40°C

- 96 kanaaltjes boven elke well voor een gecontroleerde vloeistofstroom door de 96 kolommetjes van de plaat. Zo kunnen snel 96 monsters parallel opgewerkt worden.
- M.b.v. SPE OASIS HLB 2 mg 96-well micro elutie plaat:
  - Conditioneer met 200 µl methanol en 200 µl water.
  - Pipetteer 100 µl water op de kolommetjes.
  - Breng de bovenlaag van reageerbuis op de kolommetjes en elueer op lage flow.
  - Was met 500 µl water.
  - Was met 200 µl 50% methanol in water en trek droog.
  - Plaats een 96 well collection plate onder de 96-well plaat.
  - Elueer met 100 µl 0,1% mierenzuur in acetonitril.
  - Elueer met 100 µl 5 mM ammoniumformiaatbuffer pH=3,0.
  - Zet de collection plate in de UPLC en injecteer 10 µl.

MassaSpectrofotometer (MS) instellingen

| Stof                                          | Moeder ion | Dochter ion | Cone (V) | Collision energie (V) |
|-----------------------------------------------|------------|-------------|----------|-----------------------|
| 25-hydroxy-vitamine-D3                        | 401,48     | 365,2       | 20       | 10                    |
|                                               |            | 383,3       | 20       | 10                    |
| D3-25-hydroxy-vitamine-D3 (interne standaard) | 404,49     | 368,3       | 15       | 10                    |
|                                               |            | 386,3       | 15       | 10                    |
| 25-hydroxy-vitamine-D2                        | 413,44     | 355,2       | 15       | 12                    |
|                                               |            | 395,2       | 15       | 10                    |

Standaarden

**Interne standaard:**  
400 µg/l D3-25-hydroxy-vitamine-D3 in acetonitril.

Een Chromsystems kalibrator wordt voor het begin van een reeks in 3-voud opgewerkt en later in de reeks 2 keer meegenomen. Door al deze standaarden mee te nemen in de kalibratie wordt een 1 punts kalibratie in 5-voud verkregen.

Naast de standaard worden 3 levels van UTAK (25, 67 en 185 nmol/l) meegenomen verdeeld over de reeks.

Monstervoorbewerking

Pipetteer in kleine glazen reageerbuisjes achtereenvolgens: 200 µl serum en 50 µl interne standaard.  
Voeg 40 µl 4M natriumhydroxide toe om de eiwitbinding te breken.  
Vortex kort en laat 10 minuten staan in het donker.  
Voeg 200 µl 0,1 M zinksulfaat en 200 µl acetonitril toe.  
Vortex even en zet vervolgens minimaal 20 minuten in de koelkast.  
Centrifugeer 4 minuten bij 4500 rpm.

Extractie

Voor de Solid Phase Extraction (SPE) maken we gebruik van een 96-well micro elutie plaat. Met deze platen werken we 96 monsters in één keer op. De extractie wordt uitgevoerd met een Positive Pressure-96 Processor van Waters. Dit apparaat zorgt d.m.v. een positieve stikstof druk op de



Positive Pressure-96 Processor



Positive Pressure-96 Processor in gebruik

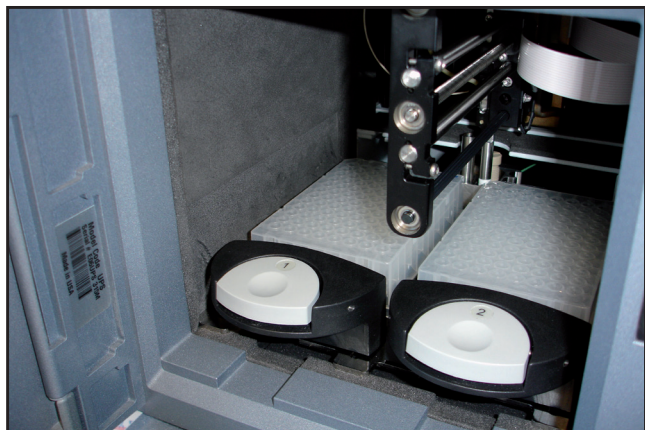
## Resultaten / discussie

### MS overgangen

In de literatuur worden regelmatig LCMS methodes gepubliceerd voor de bepaling van 25-hydroxy-vitamine D. De chromatografie-methoden zijn bij de meeste artikelen weinig verschillend. Meestal betreft het een combinatie van 0,1M mierenzuur met methanol wat is aangezuurd met mierenzuur. Bij de keuze van de massa overgangen worden wel verschillen waargenomen. Soms is de molecuulmassa +H-H<sub>2</sub>O (389) als moeder gekozen. Daarbij worden dan bijvoorbeeld dochters 211 en 229 gevonden (7). Op ons laboratorium kwam tijdens het bepalen van de dochters het fragment 389 als grootste tevoorschijn. In sommige publicaties wordt dit ion als kwantificerings ion gebruikt (8,9). Naast 389 werden tevens 365, 159 en 105 als dochter ion gevonden. Voor fragment 105 is een behoorlijk hoge collision energie nodig wat resulteert in een nogal druk fragmentatie patroon. De keuze voor 389 ligt niet voor de hand omdat dit ion voortkomt uit waterverlies ook al is deze duidelijk het grootst (een factor 3 groter dan 365 of 159). Dit heeft geresulteerd in de keuze voor het kwantificerings ion 365 wat eventueel ook 159 had kunnen zijn. Als kwalifier wordt dan wel 389 meegenomen.

### Monstervoorbewerking

Het grootste deel van de methodeontwikkeling is besteed aan de monstervoorbewerking. In een aantal publicaties wordt gewerkt met een vloeistof-vloeistof extractie met heptaan of hexaan (10,11). Een combinatie van neerslaan met acetonitril of methanol eventueel met zinksulfaat gevolgd door een extractie met heptaan (of hexaan) blijkt ook bij ons goed te werken. De belangrijkste nadelen van deze methode zijn echter de emulsie vorming, het overbrengen van de bovenlaag gevolgd door het indampen hetgeen nogal veel tijd kost bij zulke grote series en het proces is tevens lastig te automatiseren. Het vervolgonderzoek richtte zich derhalve meer op de SPE monstervoorbewerking.



Sample manager van de UPLC met 2 96 well collection plates

In verband met de seriegrootte was het plan om over te stappen naar gebruik van 96 well platen. Samen met de Positive Pressure-96 Processor gaan de SPE stappen snel en gemakkelijk. De opgevangen eluenten kunnen rechtstreeks vanuit de 96-well Sample Collection Plate geïnjecteerd worden, waarvan indien nodig 2 stuks in de UPLC gezet kunnen worden. Zo kunnen er zonder modificatie aan het systeem in 1 nacht 192 monsters weggewerkt worden.

Toch waren er wel een aantal aanloopproblemen op te lossen alvorens een goed werkbare SPE methode beschikbaar was waarmee we naar tevredenheid konden werken. Het eerste probleem was de eiwitbinding. Serum, al dan niet verdund met water over een SPE kolom levert slechts zeer kleine pieken op. Er moet eerst ont-eiwit worden. Ont-eiwitten met methanol bleek in ieder geval aanmerkelijk minder effectief dan ont-eiwitten met acetonitril. Met mierenzuur aangezuurde acetonitril (2%) of puur acetonitril maakte geen verschil.

Bij onze uitgangsmethode werd 200 µl serum samen met 50 µl interne standaard en 250 µl acetonitril geschud, in de koelkast gezet en vervolgens gecentrifugeerd. De bovenlaag bevatte ca. 60% acetonitril.

Deze bovenlaag werd op losse 1 ml OASIS HLB SPE kolommetjes met 10 mg sorbent gebracht. Ondanks het hoge acetonitril gehalte werd 25-OH-vitamine-D vastgehouden op de kolommetjes. De 96-well µElutieplaat bevat per kolommetje echter maar 2 mg sorbent. Dit bleek te weinig met als gevolg dat de 25-OH-vitamine-D ging doorbreken tijdens het opbrengen van de bovenlaag.

De voorlopige conclusie was dat de methode nader aangepast moest worden. De eiwitbinding moet goed verbroken worden en er mag niet te veel acetonitril in de bovenlaag zitten.

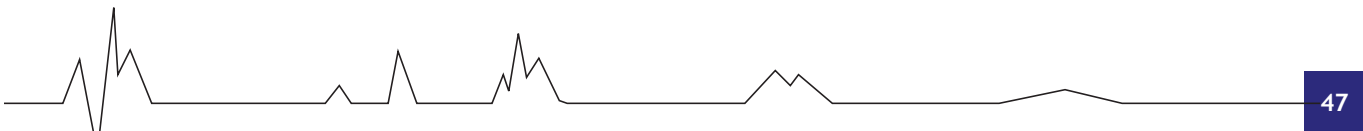
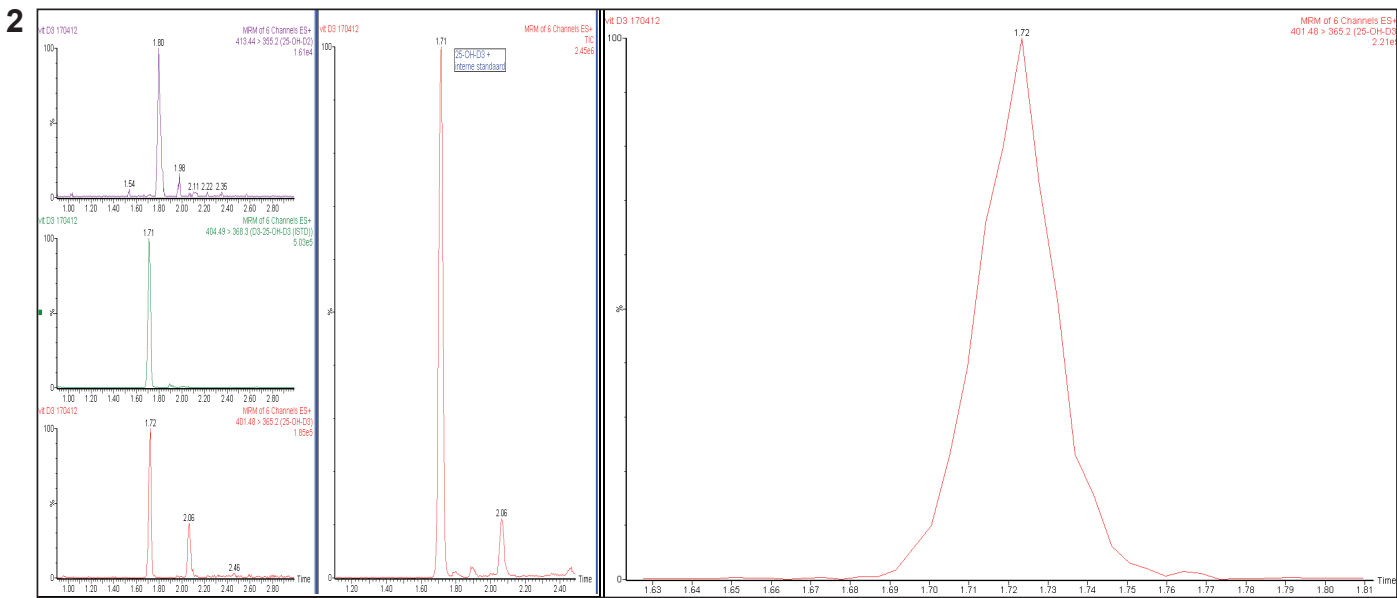
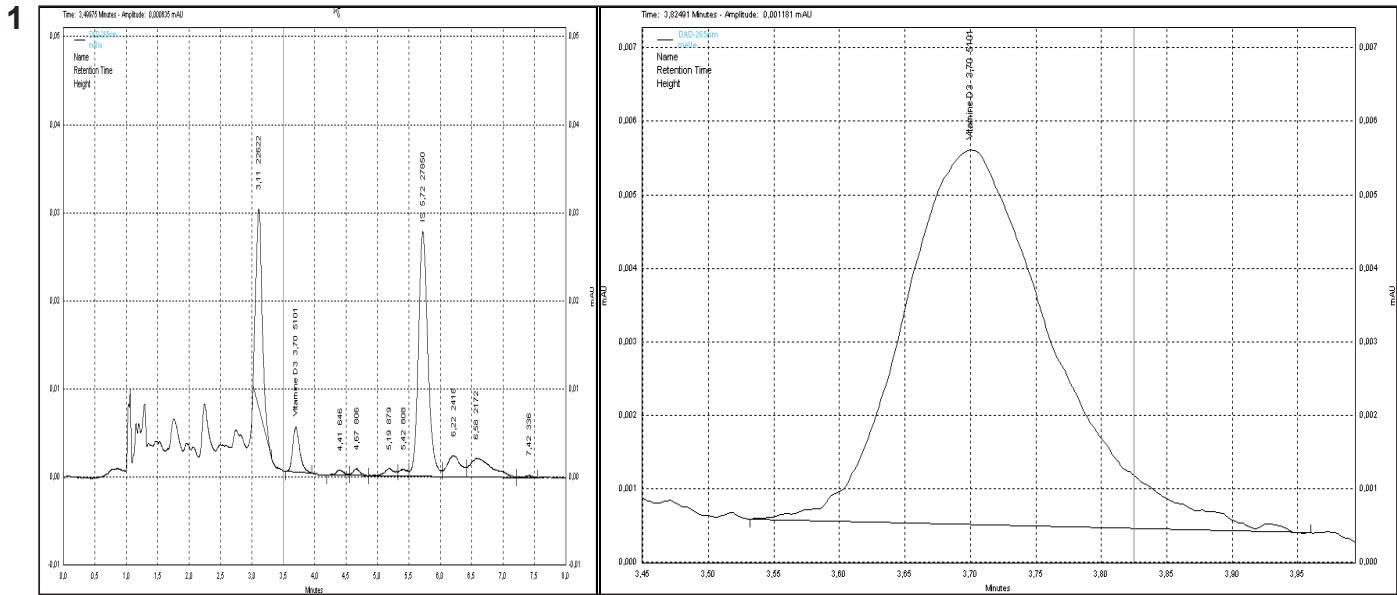
Na onderzoek bleek dat het maximale percentage acetonitril zonder dat er 25-OH-D3 doorbraak plaatsvond ongeveer 40% is, bij 2 mg sorbent OASIS HLB. In eerste instantie is geprobeerd de acetonitril concentratie te verlagen door met een combinatie van zinksulfaat en acetonitril te werken, hetgeen geen optimale resultaten opleverde. Door het serum basisch te maken met 4 M NaOH en minimaal 10 minuten te incuberen is geprobeerd de eiwitbinding beter te breken. Om niet teveel acetonitril in de oplossing te krijgen is na incubatie met NaOH, 200 µl water toegevoegd gevolgd door 200 µl acetonitril. Na 10 minuten in de koelkast bleek dat de patiënten monsters niet goed waren te centrifugeren. Er bleef neerslag rondzweven of deels drijven waarschijnlijk veroorzaakt door het scheiden van de basische waterlaag en de acetonitril laag. Vervangen van de 200 µl water door 200 µl 0,1 M zinksulfaat gaf wel heldere bovenlagen. Deze bovenlaag van ca. 650 µl bevat nu 36% acetonitril. Dit is voldoende laag om de 25-OH-vitamine-D3 vast te laten houden. Na elueren van de nogal basische bovenlaag wordt met water gewassen en vervolgens nog eens met 200 µl 50% methanol hetgeen resulteerde in schone extracten.

UPLC versus HPLC

De overgang van de oude HPLC-UV methode naar UPLC-MS heeft tot gevolg gehad dat de runtijden zijn gehalveerd en de gevoeligheid sterk is toegenomen. Die gevoeligheidswinst wordt mede veroorzaakt door de aan de MS gekoppelde UPLC. De piekbreedte van 25-OH-D3 met de gebruikte UPLC kolom is slechts 4 a 5 seconden. Met de oorspronkelijke HPLC methode was deze ruim 20 seconden. Een chromatogram van een patiënt met een redelijke concentratie 25-OH-D3 geanalyseerd met die HPLC methode is te zien in figuur 1. In figuur 2 is een chromatogram te zien van een kalibrator geanalyseerd met de nieuwe methode. In dit chromatogram is ook de iets later eluerende 25-OH-D2 piek te zien welke in monsters maar zelden wordt aangetroffen.

Figuur 1:  
chromatogram  
van 500 µl opge-  
werkt patiënten  
monster met 112  
nmol/l 25-OH-  
vitamine-D3 met  
daarnaast een uit-  
vergroting van de  
vitamine D3 piek.  
Injectievolume:  
50 µl

Figuur 2:  
chromatogram  
van 200 µl opge-  
werkte kalibrator  
met 92 nmol/l  
25-OH-vitamine-  
D3 met daarnaast  
de uitvergroting  
van de 25-OH-  
vitamine-D3 piek.  
Injectievolume:  
10 µl



## Conclusie

De omzetting van HPLC-UV naar de UPLC-MS methode voor de detectie van 25-OH vitamine D3 brengt veel voordelen met zich mee, waaronder snellere analyses, detectie van lagere levels van Vitamine D3 en lagere kosten.

## References

- 1 Holick MF. Vitamin D deficiency. N Engl J Med. 2007; 357:266-281.
- 2 Gezondheidsraad. Naar een toereikende inname van vitamine D. 2008.
- 3 Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, et al. Estimates of optimal vitamin D status. Osteoporosis Int. 2005;16:713-6.
- 4 Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, et al. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcome. Am J Clin Nutr. 2006;84:18-28.
- 5 Bischoff-Ferrari HA, Shao A, Dawson-Hughes B, et al. Benefit-risk assessment of vitamin D supplementation. Osteoporosis Int. 2010;21:1121-32.
- 6 Standing Committee of European Doctors (CPME). Vitamin D nutritional policy in Europe 2009.
- 7 [www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/Clinical-Forensic-Toxicology/forensics\\_A015](http://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/Clinical-Forensic-Toxicology/forensics_A015)
- 8 [http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5990-4549en\\_lo%20CMS.pdf](http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5990-4549en_lo%20CMS.pdf)
- 9 [http://www.chem-agilent.com/cimg/ASMS2009-01\\_Automated\\_SPE-LCMSMS\\_Assay.pdf](http://www.chem-agilent.com/cimg/ASMS2009-01_Automated_SPE-LCMSMS_Assay.pdf)
- 10 [http://acgpubs.org/JCM/2007/Volume%201/Issue%201/vitaminD\\_JCM-01.pdf](http://acgpubs.org/JCM/2007/Volume%201/Issue%201/vitaminD_JCM-01.pdf)
- 11 Zoë Maunsell, Dennis J. Wright, and Sandra J. Rainbow; Routine Isotope-Dilution Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Assay for Simultaneous Measurement of the 25-Hydroxy Metabolites of Vitamins D2 and D3; Clinical Chemistry 51:9 000-000 (2005).

