

Continguts: www.acclc.cat/ivv_docs.php?any=2015*In vitro veritas*Pàgina web de la revista: www.acclc.cat/ivv.php

Article original

Estudi de verificació del sistema de mesura Acquity UPLC-FLR[®] per al mesurament simultani de la concentració de substància de difosfat de tiamina i 5'-fosfat de piridoxal en la sang

Raül Rigo Bonnin, Pedro Alía Ramos

Àrea de Bioquímica Especial, Laboratori Clínic de l'Hospital Universitari de Bellvitge, Laboratori Clínic Territorial Metropolitana Sud, L'Hospitalet de Llobregat

2016 © Publicat per l'Associació catalana de ciències de Laboratori Clínic

1. Introducció

La tiamina, també coneguda amb el nom no recomanat *vitamina B1*, és una vitamina hidrosoluble essencial que conté dos anells heterocíclics (una pirimidina i un tiazol) units entre sí mitjançant un grup metilè i un àtom de nitrogen quaternari (Figura 1). La tiamina és absorbida a l'intestí prim, principalment a nivell del jejú i de l'ili, mitjançant diferents mecanismes —via difusió passiva, difusió activa o transportador específic— segons sigui la seva concentració intraluminal. Una vegada a la sang, aquesta entra dins dels eritròcits generant la seva forma molecular biològicament activa, el difosfat de tiamina o pirofosfat de tiamina (Figura 1) (1-3).

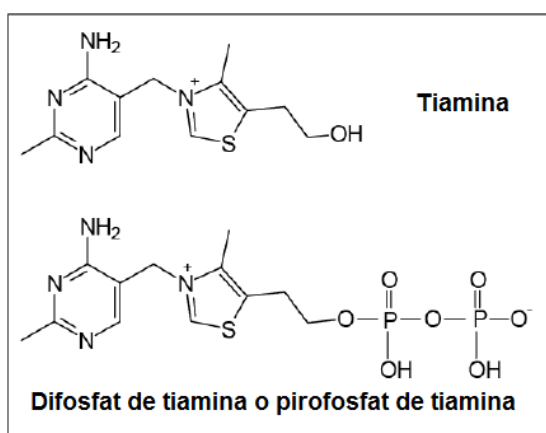


Figura 1. Estructura química de la tiamina i de la seva forma biològicament activa (difosfat de tiamina).

El difosfat de tiamina actua, principalment, com a coenzim de la piruvat-descarboxilasa (EC 4.1.1.1), l' α -cetoglutarat-deshidrogenasa (EC 1.2.4.2) i la trançetolasa (EC 2.2.1.1) que catalitza la formació de ribosa-5-fosfat a partir de xilulosa-5-fosfat. També participa en el mecanisme de la conducció del senyal nerviós, en l'alteració del metabolisme de la glucosa i en l'activitat de diversos neurotransmissors com els serotoninèrgics, adrenèrgics i colinèrgics. El valor semiològic de la concentració de difosfat de tiamina en la sang rau en conèixer quin és l'estat nutricional d'aquesta vitamina en l'organisme donat que un dèficit pot donar lloc a diverses malalties, com la de beri-beri, l'encefalopatia de Wernicke, el síndrome de Korsakov i la paràlisi de Landry. Conseqüentment apareixen signes i símptomes cardíacs, musculars, neuronals i digestius com: dany del miocardi, falla cardíaca, alteracions del ritme cardíac, neuritis, degeneració muscular, debilitat, dolors musculars, disminució dels reflexes, confusió mental, convulsions, paràlisis, vòmits, pèrdua de pes i irritabilitat, entre altres (1-3).

El terme *vitamina B6* inclou sis vitamines hidrosolubles, tres derivades de la piridina: piridoxina, piridoxamina y piridoxal i els seus èsters fosforilats: 5'-fostat de piridoxina, 5'-fostat de piridoxamina i 5'-fostat de piridoxal (Figura 2). Tot i presentar la mateixa activitat biològica, el 5'-fostat de piridoxal és la forma fisiològicament activa de la vitamina B6 i el principal component en la sang. Els diferents composts de vitamina B6 són absorbits a l'intestí prim, on té lloc una important fosforilació i interconversió entre les diferents vitamines, així com altres reaccions metabòliques. En el fetge es completa la fosforilació i transformació de totes les formes fosforilades a 5'-fostat de piridoxal, mitjançant una oxidació depenent de flavin-mononucleòtid (FAD). El fetge constitueix la principal font de 5'-fostat de piridoxal. Sembla que l'eritròcit té un paper important i

encara no del tot aclarit en el transport i metabolisme de la vitamina B6, ja que conté els enzims necessaris per transformar les distintes vitamines en 5'-fostat de piridoxal. L'eliminació renal és la principal via d'excreció de la vitamina B6. El 5'-fostat de piridoxal és catabolitzat en piridoxal per fosfatases no específiques, i, posteriorment oxidat a àcid 4-piridòxic el qual és excretat per l'orina (1-3).

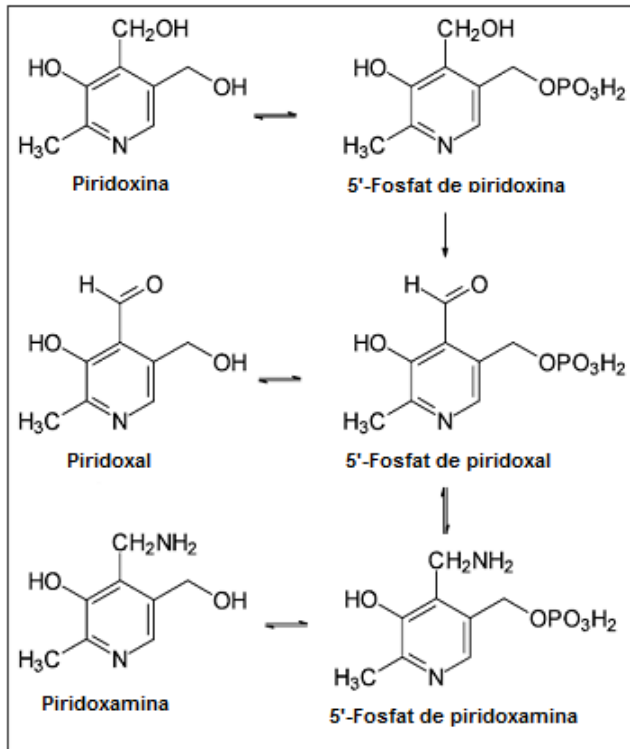


Figura 2. Estructura química dels diferents compostos que conformen la vitamina B6.

El 5'-fostat de piridoxal té un paper clau en la modulació de l'expressió gènica d'hormones esteroidals i és el cofactor o coenzim indispensable d'una àmplia varietat d'enzims —més de 100— del metabolisme intermediari com ara la glucogenfosforilasa (EC 2.4.1.1), la glutamat descarboxilasa (EC 4.1.1.15), la L-aminoàcid aromàtic-descarboxilasa (EC 4.1.1.28), la kinurenina 3-monooxigenasa (EC 1.14.13.9), la cistationina β -sintasa (EC 4.2.1.22), la cistationina γ -liasa (EC 4.4.1.1), entre altres. El valor semiològic de la concentració de substància de 5'-fostat de piridoxal en la sang rau en conèixer quin és el seu estat nutricional a l'organisme donat que un dèficit d'aquesta pot donar lloc a l'aparició de signes i símptomes clínics com crisis convulsives, mareig, lesions del sistema nerviós perifèric (atàxia, neuropatia perifèrica), dermatitis, gingivitis, depressió, fissures i ulceracions labials, anomalies endocrinològiques, anomalies metabòliques relacionades amb els aminoàcids (increment de l'excreció d'aminoàcids), hiperpigmentació, irritabilitat, arterioesclerosi, malabsorció de ferro i anèmia hipocròmica microcítica, entre altres (1-3).

En l'actualitat, aquestes magnituds biològiques es mesuren mitjançant sistemes basats en la cromatografia líquida d'alta eficàcia o HPLC (acrònim de l'anglès *high-performance liquid chromatography*) acoblada a la l'espectrometria d'absorció molecular, la fluorimetria, la voltamperometria o a l'espectrometria de masses en tàndem o MS/MS (acrònim de l'anglès *tandem mass spectrometry*) (4-10).

L'objectiu d'aquest treball és dur a terme un estudi de verificació del sistema de mesura Acquity-FLR[®] de Waters

(Milford, Estats Units), que empra l'HPLC acoblada a la fluorimetria com a principi de mesura, per al mesurament simultani de la concentració de substància de difosfat de tiamina i 5'-fosfat de piridoxal en la sang.

2. Materials i mètodes

2.1. Productes químics i reactius

El metanol de qualitat HPLC és proporcionat per Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), mentre que l'aigua de qualitat HPLC és subministrada per Merck Biosciences (Darmstadt, Alemanya).

S'utilitza l'equip de reactius *Vitamin B1 and B6 Reagent kit for HPLC analysis* (referència: 52000) de Chromsystems[®] (Gräfelfing, Alemanya). Cada equip conté: dues ampolles d'1 L de fase mòbil, un material de calibratge, una ampolla de 30 mL amb una solució precipitant de proteïnes, una ampolla de 25 mL amb una solució neutralitzant, 2 vials d'1 mL amb una primera solució de derivatització, una ampolla de 15 mL que conté una segona solució de derivatització, una ampolla de 10 mL amb un tampó estabilitzant, una ampolla de 10 mL d'estàndard intern i una bossa amb 100 tubs opacs tipus Eppendorf d'1,5 mL.

S'empen els materials de control de matriu sanguínia *Vitamins B1/B6 Whole Blood Control Bi-Levek I+II* (referència: 0164) de Chromsystems[®].

El material de calibratge i els materials de control es preparen seguint les instruccions i recomanacions descrites pel fabricant dels mateixos.

2.2. Mostres de pacients

Les mostres de sang de pacients s'obtenen mitjançant punció venosa i es recullen en tubs de 3 mL que contenen EDTA-K₃ com a anticoagulant (Vacuette, Kremsmünster, Àustria). Les mostres són preservades de la llum i emmagatzemades a -20 °C fins al seu processament.

2.3. Preparació de les mostres

La preparació de les mostres consisteix en una precipitació de proteïnes i una posterior derivatització de la mostra. En un tub tipus Eppendorf opac d'1,5 mL, s'afegeixen 200 μ L de cada calibrador, control o mostra de sang, 100 μ L de la solució d'estàndard intern i 300 μ L de la solució precipitant de proteïnes. La mescla s'agita durant 30 s en un agitador tipus vòrtex i se centrifuga durant 5 min a 9000 g. En un altre tub tipus Eppendorf, s'afegeixen 250 μ L del sobrenedant resultant de la centrifugació anterior, 250 μ L de la solució neutralitzant, 100 μ L d'una solució de derivatització —preparada prèviament a afegint 50 μ L de la solució de derivatització 1 i 1000 μ L de la solució de derivatització 2 incloses en l'equip de reactius— i s'agita durant 5 s en un agitador vòrtex. Immediatament després d'una incubació a 60 °C durant 25 min de la barreja resultant en un bany termostàtic, s'addicionen 100 μ L del tampó estabilitzant, s'agita la barreja en un vòrtex durant 5 s i es manté durant 10 min a (2-8) °C. Finalment, es realitza una centrifugació a 9000 g durant 2 min i el sobrenedant es transfereix a un vial cromatogràfic de vidre específic per al seu processament.

2.4. Sistema de mesura

S'empra un sistema Acquity[®] UPLC[®] acoblat a un detector fluorimètric Acquity[®] FLR[®], ambdós de Waters.

2.5. Condicions cromatogràfiques

La separació cromatogràfica dels components de la mostra es porta a terme a 30 °C utilitzant una columna analítica *Cortecs C18 2,1 x 75 mm; 1,6 μ m* de Waters a la qual se li ha incorporat

un suport que conté un filtre de 2,0 µm i una precolumna *Cortecs C18 VanGuard Pre-column 2,1 x 5 mm; 1,6 µm* (Waters). Les mostres tractades es mantenen a 15 °C a l'interior del mostrejador. Es treballa a un flux de 0,5 mL/min emprant un gradient lineal de les fases mòbils (Taula 1). El volum d'injecció de la mostra és de 5 µL.

	Temps total (min)	Fase mòbil A (%)	Fase mòbil B (%)	Flux (mL/min)
Inicial	0,0	100	0	0,5
2	0,2	100	0	0,5
3	1,0	0	100	0,5
4	2,8	0	100	0,5
5	3,0	100	0	0,5

Taula 1. Gradient de treball aplicat per al mesurament de la concentració de difosfat de tiamina i 5'-fosfat de piridoxal en la sang.

2.6. Condicions del detector fluorimètric

Les longituds d'ona de treball d'excitació i d'emissió utilitzades per al difosfat de tiamina són 367 nm i 435 nm, respectivament, mentre que per al 5'-fosfat de piridoxal i l'estàndard intern aquestes són 320 nm i 415 nm. Des de l'inici de la cromatografia fins al minut 1,2 el detector fluorimètric treballa a unes longituds d'ona de 320 nm i 415 nm, minut a partir del qual es canvia a les longituds d'ona de 367 nm i 435 nm.

2.7. Estudi de verificació

L'estudi de verificació està basat en la *Guia per a la verificació dels sistemes de mesura de magnituds biològiques per a l'acreditació segons la norma ISO 15189* del Comitè d'Harmonització de l'ICS (11). Dins d'aquest estudi s'avaluen la imprecisió intraserial (CV_{INTRA}), la imprecisió interdiària (CV_{INTER}) i el biaix relatiu (δ_r). Per altra banda, també s'estima l'error de mesura relatiu (E_m).

2.7.1. Estudi de la imprecisió intraserial

Es processen 10 vegades, en una única sèrie i en un mateix dia, els dos materials de control de matriu sanguínia. Es calcula la imprecisió intraserial mitjançant la fórmula:

$$CV_{INTRA} (\%) = \frac{s_{INTRA}}{\bar{x}_{INTRA}} \cdot 100$$

on CV_{INTRA} , s_{INTRA} i \bar{x}_{INTRA} són el coeficient de variació intraserial, la desviació estàndard intraserial i la mitjana aritmètica intraserial, respectivament.

2.7.2. Estudi de la imprecisió i biaix interdiaris

Es processen 17 vegades, en 17 dies repartits en cinc mesos, els dos materials de control de matriu sanguínia. Es calculen la mitjana (\bar{x}_{INTER}), la desviació estàndard (s_{INTER}) i el coeficient de variació (CV_{INTER}) per cadascun dels materials de control mitjançant l'equació:

$$CV_{INTER} (\%) = \frac{s_{INTER}}{\bar{x}_{INTER}} \cdot 100$$

Es calcula el biaix interdiari (δ_r) relatiu emprant l'equació:

$$\delta_r (\%) = \frac{(\bar{x}_{INTER} - \mu)}{\mu} \cdot 100$$

on μ és el valor convencional assignat pel fabricant del material de control per un procediment basat en l'HPLC acoblat a la fluorimetria.

2.7.3. Estudi de l'error de mesura

S'estima l'error de mesura relatiu utilitzant dos materials de control de matriu plasmàtica que pertanyen al programa d'avaluació externa de la qualitat (PAEQ) RfB-VT de l'Institut de Referència per als Laboratoris Clínics de d'Alemanya (RfB).

Els materials de control es processen, aleatòriament i conjuntament amb les mostres dels pacients. Es calcula l'error de mesura relatiu (E_m) mitjançant l'equació:

$$E_m = \frac{(x - \mu)}{\mu} \cdot 100$$

on x és el valor mesurat obtingut i μ , el valor convencional. Com a μ , s'empen les medianes dels valors consensuals grupals dels diferents laboratoris participants al PAEQ que utilitzen la HPLC-FLR com a principi de mesura.

3. Resultats

En les condicions cromatogràfiques descrites en aquest estudi, el temps de retenció per a l'estàndard intern, el 5'-fosfat de piridoxal i el difosfat de tiamina són 0,52 min, 0,75 min i 1,51 min, respectivament (Figura 3).

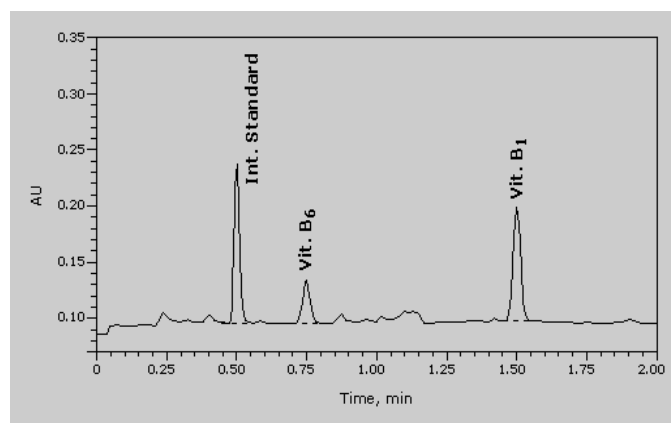


Figura 3. Cromatograma obtingut després de processar una mostra d'un pacient a una concentració de 5'-fosfat de piridoxal (Vit. B₆) de 54,2 nmol/L i de 149 nmol/L de difosfat de tiamina (Vit. B₁). Int. Standard = estàndard intern.

El temps d'anàlisi (interval que transcorre entre dos injeccions consecutives) és 4,0 minuts. El temps de processament per a 15 mostres, incloent el temps necessari per a la seva preparació, és 60 min.

Els valors d'imprecisió intraserial, imprecisió interdiària i biaix relatiu es mostren a la Taula 2.

El sistema de mesura es considera verificat donat que els diferents valors d'imprecisió i biaix relatiu obtinguts, per ambdues magnituds biològiques, són inferiors o iguals a 1,2 vegades els declarats pel fabricant de l'equip de reactius (11) ($CV_{INTRA} = 6,0 \%$, $CV_{INTER} = 7,2 \%$ i $\delta_r = \pm 12,0 \%$).

Els E_m són $-18,3 \%$ ($\mu = 4,71$ nmol/L) i $-9,9 \%$ ($\mu = 89,3$ nmol/L) per a la concentració de difosfat de tiamina y $5,2 \%$ ($\mu = 48,1$ nmol/L) i $9,5 \%$ ($\mu = 408,6$ nmol/L), per a la concentració de 5'-fosfat de piridoxal.

En cap cas, els valors del CV , la δ_r i l' E_m obtinguts superen els requisits metrollògics establerts al nostre laboratori ($CV \leq 15 \%$, $\delta_r \leq \pm 15 \%$ i $E_r \leq \pm 30 \%$).

Magnitud	Control	n_{INTRA}	\bar{x}_{INTRA}	CV_{INTRA} (%)	n_{INTER}	\bar{x}_{INTER}	CV_{INTER} (%)	δ (%)
San—Difosfat de tiamina; c.subst. [nmol/L]	1	10	53,3	5,5	17	54,8	7,1	-10,0
	2	10	208	4,1	17	214	5,2	-8,5
San—5'-Fosfat de piridoxal; c.subst. [nmol/L]	1	10	42,9	5,1	17	44,2	6,9	-10,7
	2	10	101	3,2	17	98,9	4,4	-8,4

Taula 2. Valors d'imprecisió intraserial, imprecisió interdiària i biaix relatiu.

\bar{x}_{INTRA} , mitjana intraserial; n_{INTRA} , nombre de materials de control processats en una mateixa sèrie i dia; \bar{x}_{INTER} , mitjana interdiària; n_{INTER} , nombre de materials de control processats en dies diferents.

4. Discussió i conclusions

El difosfat de tiamina i el 5'-fosfat de piridoxal són dues vitamines hidrosolubles essencials que participen en nombrosos processos biològics. Un dèficit de les mateixes, pot donar lloc a diverses malalties. Aquesta situació fa que s'hagi de controlar quin és el seu estat nutricional a l'organisme mitjançant el mesurament de les seves concentracions en diversos líquids biològics. De tots els sistemes de mesura emprats en l'actualitat, els basats en la HPLC acoblada a la fluorimetria són el més àmpliament utilitzats.

Per altra banda, quan els sistemes de mesura i reactius són subministrats íntegrament per la indústria de diagnòstic *in vitro* cal tenir en compte que aquests productes estan sotmesos a la directiva 98/79 de la Comissió Europea sobre els productes sanitaris per al diagnòstic *in vitro*, que estableix que els fabricants han de validar els sistemes de mesura que fabriquen i subministren amb la marca "CE" (12). Aquest aspecte és clau a l'hora d'establir les obligacions del laboratori clínic per garantir, mitjançant proves objectives, que un sistema de mesura satisfà els requisits especificats (13). No obstant, en el procés de transport o instal·lació es poden produir desviacions respecte de les condicions en què el fabricant va fer la validació del sistema de mesura, fet que obliga al laboratori clínic a haver de realitzar un estudi de verificació (11).

El procediment de mesura utilitzat per al mesurament de la concentració de substància de difosfat de tiamina i 5'-fosfat de piridoxal en la sang està basat en les recomanacions del fabricant de l'equip de reactius amb marcat "CE", motiu pel qual ens va conduir a realitzar un estudi de verificació enlloc d'un de validació.

L'estudi de la verificació ha posat de manifest que el sistema de mesura Acquity-FLR[®] presenta imprecisions, biaixos i errors de mesura acceptables per al nostre laboratori clínic.

En conclusió, tenint en compte les propietats metrollògiques del sistema de mesura avaluat, aquest seria apte per dur a terme el mesurament simultani de la concentració de difosfat de tiamina i 5'-fosfat de piridoxal en la sang.

5. Bibliografia

- Fuentes Arderiu X, Castiñeiras Lacambra MJ, Queraltó Compañó JM. *Bioquímica clínica y Patología Molecular*. Barcelona: Editorial Reverté; 1998 [ISBN 84-291-1856-X] (B-9339-1998).
- Illera Martín M, Ellera del Portal J, Illera del Portal JC. *Vitaminas y minerales*. Madrid: Editorial Complutense; 2000. [ISBN 84-7491-590-2] (M-44.908-2000).
- Deulofeu Piquet R, Vilaseca MA, Pastor Ferrer MC, dirs. *Vitaminas Hidrosolubles*. Barcelona: Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; 2005 [ISBN 84-89975-19-1] (B-18.732-2005).
- Monferrer-Pons L, Capella-Peiró ME, Gil-Agustí M, Esteve-Romero J. Micellar liquid chromatography determination of B vitamins with direct injection and ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr A* 2003; 984:223-31.
- Chatzimichalakis PV, Samanidou VF, Verpoorte R, Papadoyannis IN. Development of a validated HPLC method for the determination of B-complex vitamins in pharmaceuticals and biological fluids after solid phase extraction. *J Sep Sci* 2004;27:1181-8.
- Ghorbani AR, Momenbeik F, Khorasani JH, Amini MK. Simultaneous micellar liquid chromatographic analysis of seven water-soluble vitamins: optimization using super-modified simplex. *Anal Bioanal Chem* 2004;379(3):439-44.
- Yin C, Cao Y, Ding S, Wang Y. Rapid determination of water- and fat-soluble vitamins with microemulsion electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A* 2008;1193(1-2):172-7.
- Giorgi MG, Howland K, Martin C, Bonner AB. A novel HPLC method for the concurrent analysis and quantitation of seven water-soluble vitamins in biological fluids (plasma and urine): a validation study and application. *ScientificWorldJournal* 2012;2012:359721.
- Ghassabian S, Griffiths L, Smith MT. A novel fully validated LC-MS/MS method for quantification of pyridoxal-5'-phosphate concentrations in samples of human whole blood. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2015;1000:77-83.
- Puts J, de Groot M, Haex M, Jakobs B. Simultaneous determination of underivatized vitamin B1 and B6 in whole blood by reversed phase ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *PLoS One* 2015;10(7):e0132018.
- Miró Balagué J, Fuentes Arderiu X, Jordi Baiges A, Martínez Casademont M, Pastor Ferrer C, Pérez Remón B, *et al.* Guia per a la verificació dels sistemes de mesura de magnituds biològiques per a l'acreditació segons la norma ISO 15189. *In vitro veritas* 2009;10: <<http://www.acclcat.cat/continguts/ivv113.pdf>> (consulta: 2016-03-10).
- European Parliament, Council of European Union. Directive 98/79 of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on *in vitro* diagnostic medical devices. *Official Journal of European Communities* 1998;(7.12.98):L331/1-L331/37.
- International Organization for Standardization. *Medical laboratories —particular requirements for quality and competence*. ISO 15189. Geneva: ISO; 2012.