

# Vitamines : aspects préanalytiques et intérêt de de la LC/MS/MS

Gilles Panteix  
Eurofins Biomnis

# Vitamines

- Molécules organiques indispensables en toute petite quantité à l'organisme et non synthétiser par l'organisme
- Pourquoi les doser : mise en évidence de déficit, suivi de thérapeutique ou de soins, notions de « surdosage »
- Beaucoup de molécules
- Présentes sous plusieurs formes dont une forme active au moins

# Vitamines

- Deux grands groupes
- Vitamines hydrosolubles B1 B2 B6 B8 B9 B12 (B5?) C PP

Ce sont souvent des coenzymes et peuvent nécessiter d'être activées par le métabolisme

- Vitamines liposolubles A E D K

Participent à des structures ou fonctions importantes de l'organisme présentes dans les aliments sous différentes formes ( parfois nombreuses )

# Vitamines

- Vitamine B1 thiamine

Les différentes formes thiamine /thiamine monophosphate / **thiamine pyrophosphate ( diphosphate )**

- Vitamine B2 riboflavine

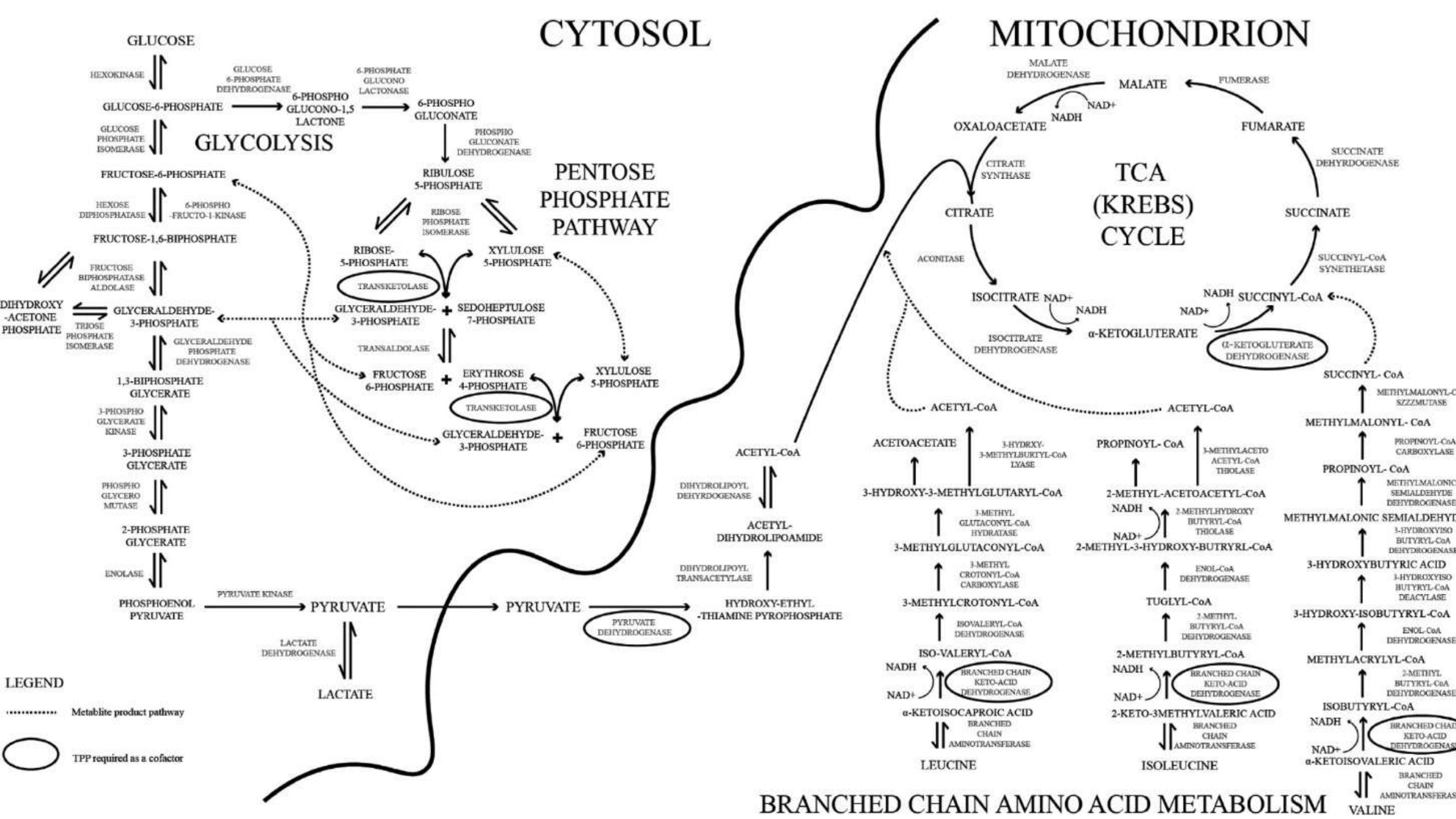
Les différentes formes riboflavine/flavine mononucléotide (FMN)/ **flavine adénine dinucléotide (FAD)**

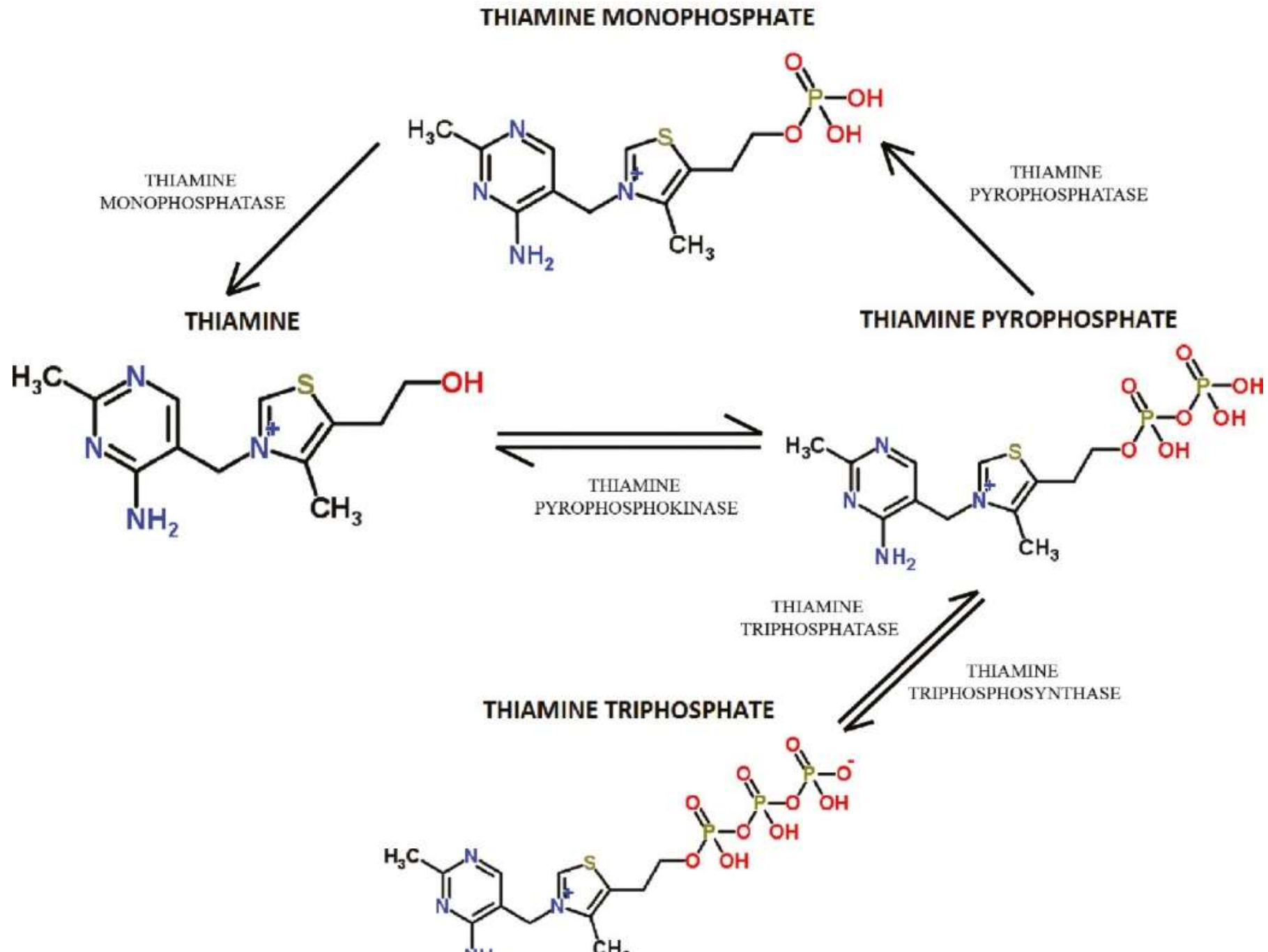
- Vitamine B6 pyridoxine

Les différentes formes pyridoxine/pyridoxal/pyridoxamine/**pyridoxal-5-phosphate**

# Exemple de la vitamine B1

- <https://www.degruyter.com/view/j/cclm.ahead-of-print/cclm-2017-0054/cclm-2017-0054.xml>





# Vitamines

Vitamine B8 ou biotine

Les différentes formes biocytine **biotine**

- Vitamines B9 ou acide folique

Folate/dihydrofolate(DHF)/**tetrahydrofolate (THF)/methyl tetrahydrofolate (MTHF)**

- Vitamine B12



# Vitamines

- Vitamine A provitamines A : carotenoides ( astaxanthine, lycopene, betacarotene, luteine, zeaxanthine, betacryptoxanthine, astaxanthine, canthaxanthine, alphacarotene ) **retinol** et ? retinoides
- Vitamine E les **alpha** beta gamma delta tocopherols et les alpha beta gamma delta tocotriénols
- Vitamine K K1 phylloquinone ou phytomenadione **forme réduite active** forme epoxy inactive les menaquinones MKn dont MK4 MK7 ( vitamine K2 ) de n = 1 à 9
- Vitamine D calciférol = D2 ergocalciférol et D3 cholécalciférol (et d'autres formes minoritaires) les calcidiols 25 OHD2 et 25OHD3 , leurs épimères C3 inactifs, le **calcitriol 1 25 diOHD forme active**, leurs métabolites 24 25 diOHD ,25 26 diOHD...

# Vitamines

En résumé ...il existe des

- Formes actives ou activées
- Formes ingérées formes circulantes et réserves
- Mais aussi les transporteurs sanguins ou autres les récepteurs les biomarqueurs...

# Dosage des Vitamines

Pourquoi ? Et que doser ?

- Déficit profond
- Déficit léger à moyen mais chronique
- Suivis de chirurgies digestives dont baryatriques, de maladies avec malabsorption ( mucoviscidose ), suivi nutritionnel.
- Surdosages intoxications rares

# Dosage des Vitamines

- Recommandation HAS
- [https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_765529/fr/obesite-prise-en-charge-chirurgicale-chez-l-adulte](https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_765529/fr/obesite-prise-en-charge-chirurgicale-chez-l-adulte)
- [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2011-10/reco2clics\\_obesite\\_adulte\\_chirurgie.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2011-10/reco2clics_obesite_adulte_chirurgie.pdf)
- [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2009-09/brochure\\_obesite\\_patient\\_220909.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2009-09/brochure_obesite_patient_220909.pdf)
- [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2010-11/obesite - prise en charge chirurgicale chez ladulte - argumentaire.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2010-11/obesite_-_prise_en_charge_chirurgicale_chez_ladulte_-_argumentaire.pdf)

# Quelques données sur les méthodes de dosage des Vitamines

- Microbiologiques ou activité enzymatique
- Méthodes immunologiques ELISA RIA plutôt sur sérum/plasma
- Méthodes séparatives :
- HPLC couplée à un détecteur UV/visible ou fluorimétrique
- U(H)PLC couplée à un détecteur UV/visible ou fluorimétrique
- LC MSMS

# Quelques données sur les méthodes de dosage des Vitamines

Avantages des méthodes séparatives :

- Doser une ou plusieurs vitamines dans une même analyse
- Différencier les différentes formes de chaque vitamine
- Bonne sensibilité et spécificité

# PREANALYTIQUE ET DEMANDES DE DOSAGE DES VITAMINES

- Préanalytique important
- Prélèvements plasma/serum ou sang total
- fragilité de certaines molécules vitamine C ! vitamine K !
- Sensibilité a la lumière vitamines A E K et D mais aussi B2
- Sensibilité à la chaleur
- Tubes gels proscrire
- Modification possible des différentes formes actives/activées vs les autres formes

# PREANALYTIQUE ET DEMANDES DE DOSAGE DES VITAMINES

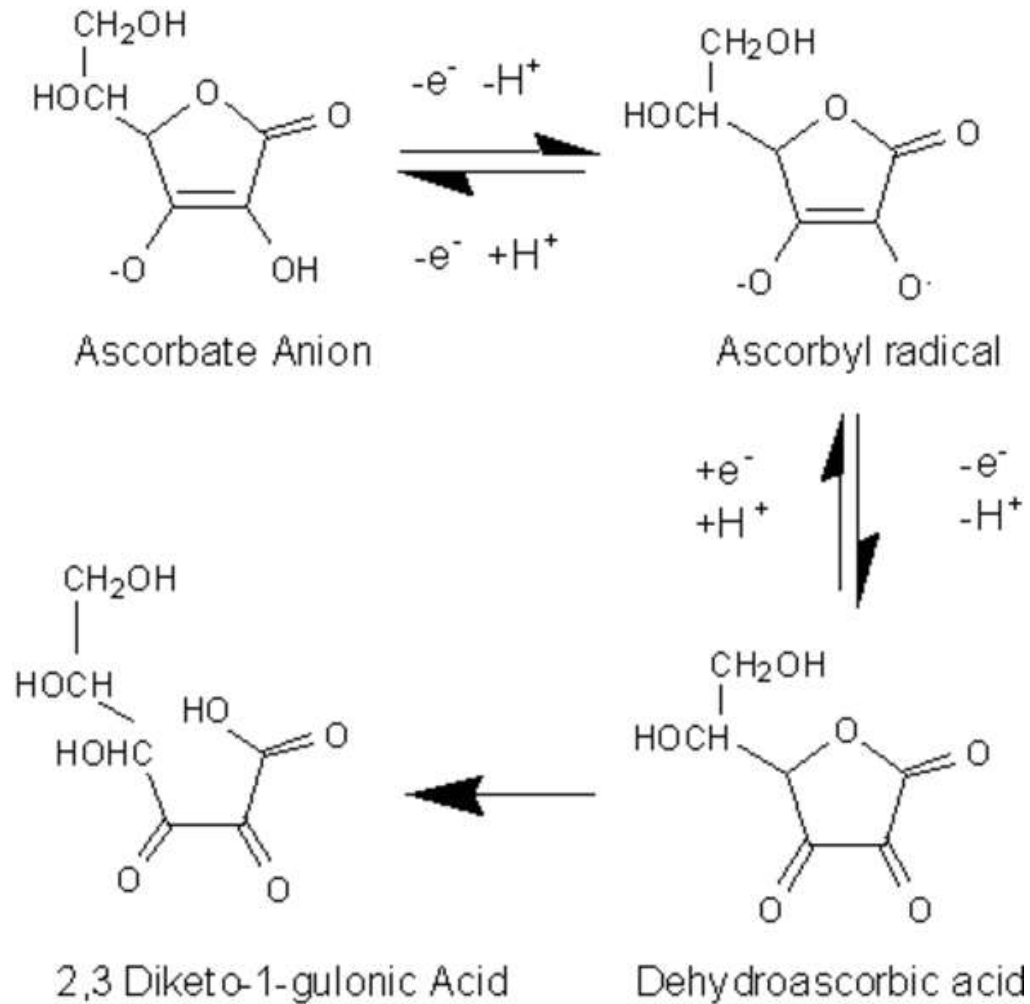
- Vitamine C
- Vitamines lipophiles
- Vitamines hydrophiles



# Préanalytique Vitamine C

- Préanalytique
- Vitamine C : un des systèmes antioxydants rapides de notre organisme et de la cellule
- Molécule donc fragile
- Face à un agent oxydant ou un système d'oxydo reduction *in vivo*
- Face à l'oxygène de l'air *in vitro*
- Sensible à l'oxygène de l'air à pH neutre ou basique, moins à pH acide
- <http://chemistry.oregonstate.edu/courses/ch130/old/VITCTEXT.htm>
- Souvent demandé en gériatrie

# Vitamine C acide ascorbique oxydation

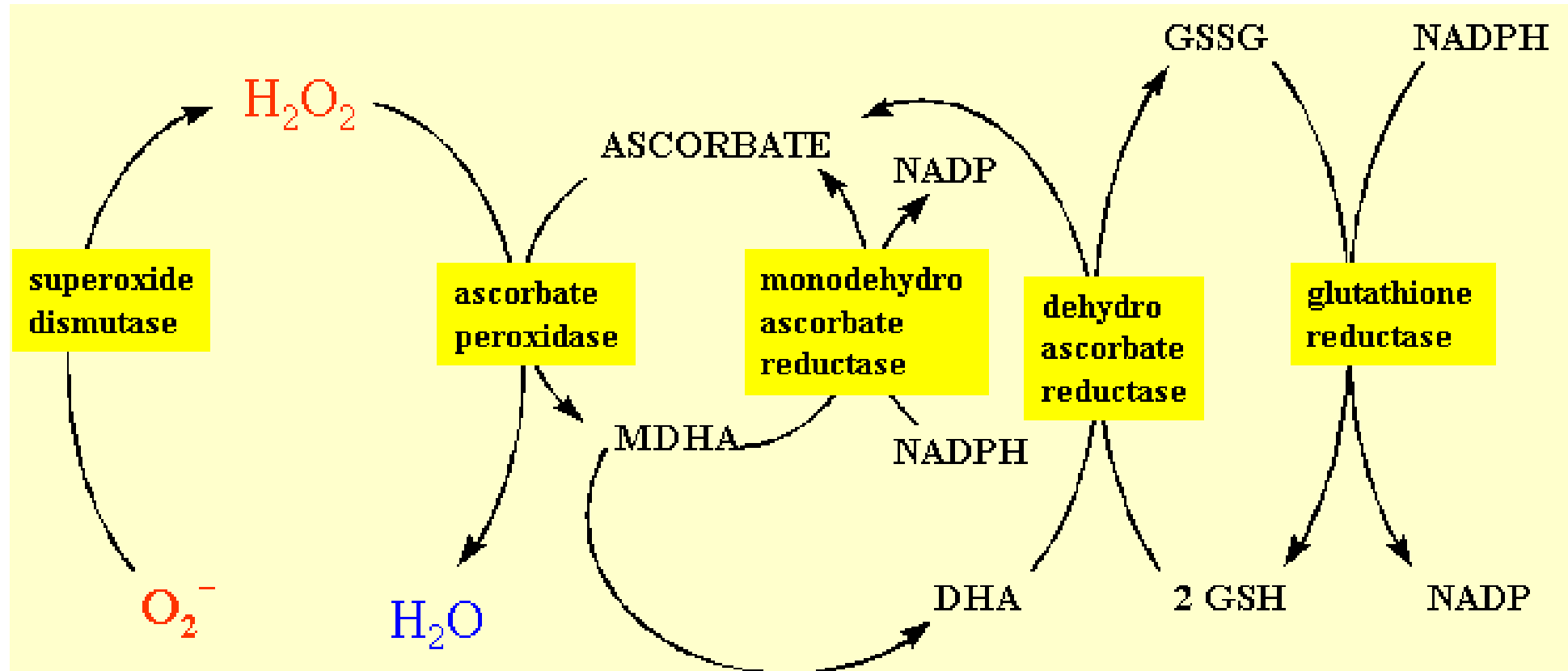


# Préanalytique Vitamine C

- Stabilisation de la molécule
- Dans l'absolu prélever sur un tube spécial EGTA glutathion et ou précipiter les protéines et acidifier rapidement congelé le surnageant et ou dériver la molécule pour la rendre plus détectable tres vite apres le prélèvement
- A défaut dans les 20 min après prélèvement centrifuger décanter remplir au maximum le tube secondaire congeler,

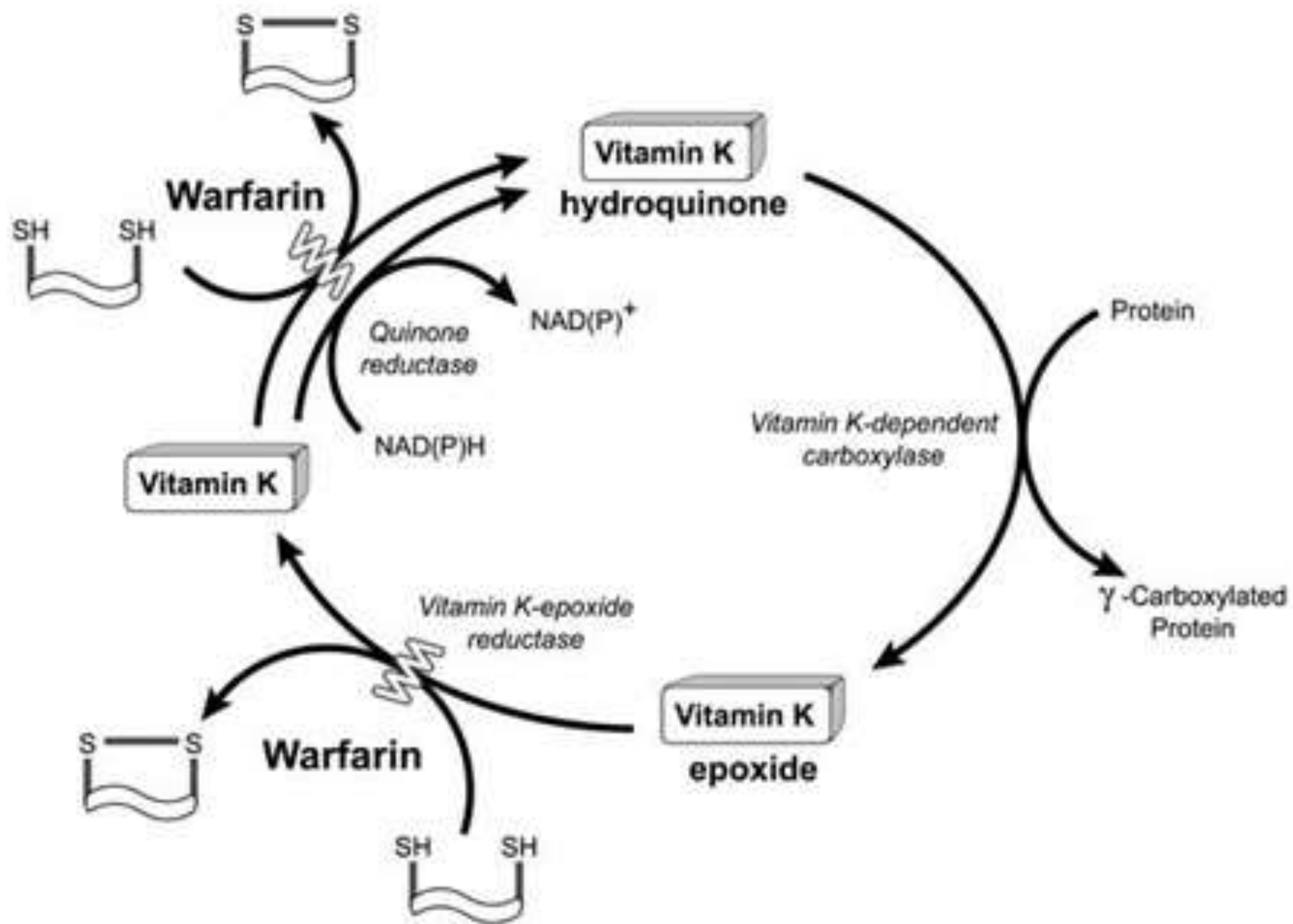
# Préanalytique Vitamine C :

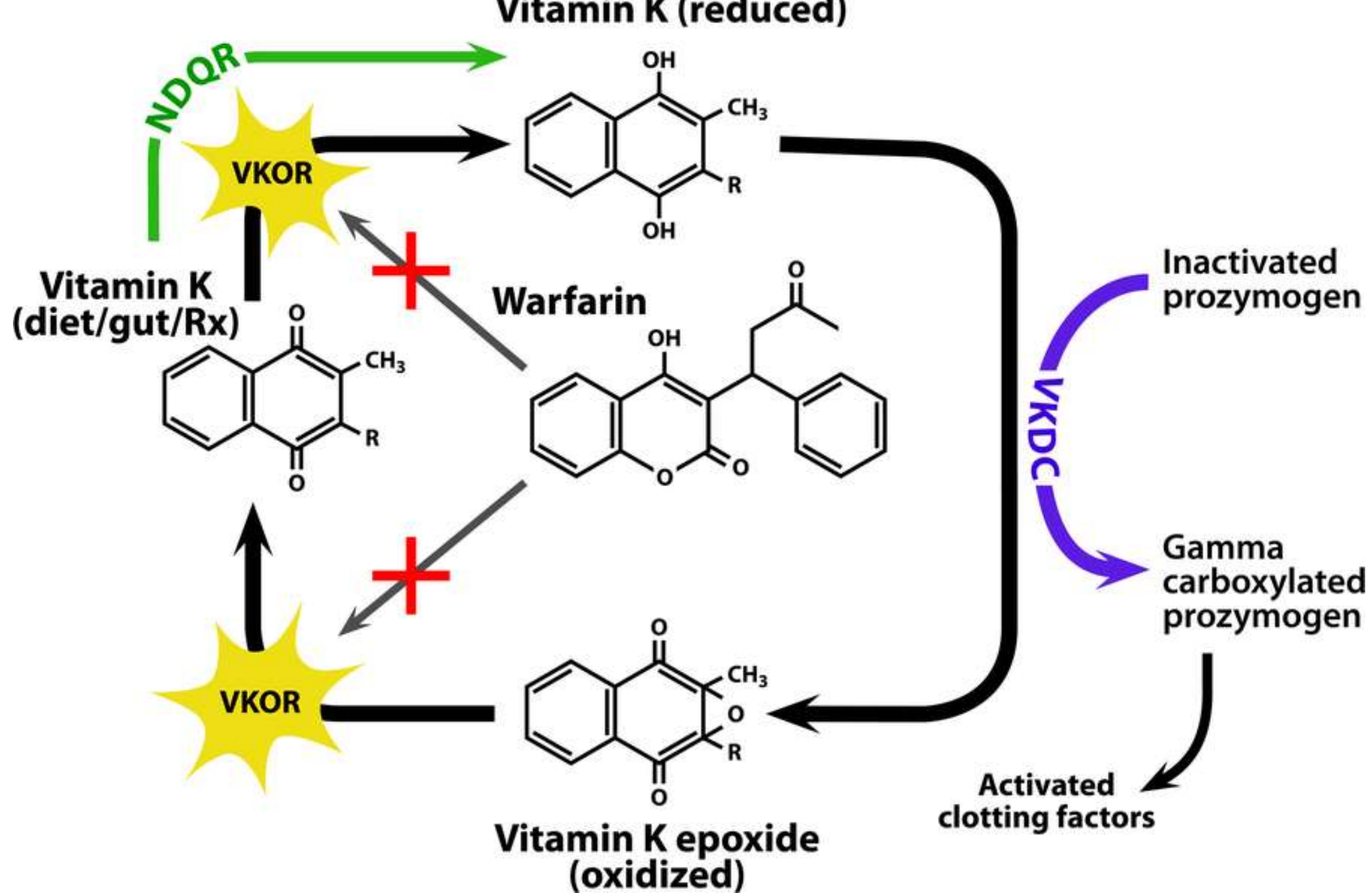
<https://www.bioscience.org/1998/v3/d/may/d1-10.htm>



# Préanalytique Vitamines K

- Vitamine K1 lipophile
- Une forme **réduite** oxydé et époxy
- Active les facteurs de la coagulation II VII IX X mais a des actions sur d'autres structures
- faibles concentrations dans le sang
- Molécule réactive donc labile
- sensible a la lumière
- Congélation rapide nécessaire du plasma
- Pas de tubes gel
- Vitamine K2 ou MQ4 et 7 peu ou pas de demande





# Préanalytique Vitamines A et rétinoïdes

- Sensibilité a la lumiere
- Proscrire les tubes avec gel
- Congélation stabilisation de la molécule et obscurité
- Beta carotene provitamine A important sensible a l'oxydation
- Carotenoides ensemble des provitamines A role débattu



# Préanalytique Vitamines E

- Alpha tocopherol principalement
- Gamma tocophérol parfois demandé
- Dosé SOUVENT avec les vitamines A dans la meme analyse chromatographique
- Sensibilité a la lumiere
- Proscrire les tubes avec gel
- Congélation stabilisation de la molécule et obscurité

# Préanalytique Vitamine D

- Les vitamines D2 D3 sont sensibles a la lumière la chaleur un peu à l'oxygene
- Les épimères et leurs métabolites ?
- A rapidement centrifuger chaine du froid et obscurité

# Demandes Vitamine D

- État de carence rachitisme
- Intoxications
- Valeurs de référence ?
- Remboursement maintenant limitée a un certain nombre de demandes
  - suspicion de rachitisme
  - suspicion d'ostéomalacie
  - suivi ambulatoire de l'adulte transplanté rénal au-delà de trois mois après transplantation
  - avant et après chirurgie baryatrique
  - évaluation et prise en charge des personnes âgées sujettes aux chutes répétées
  - respect des résumés des caractéristiques du produit(RCP) des médicaments préconisant la réalisation de l'acte 1139

# Demandes vitamines liposolubles A E D K

- Bilan et suivi de traitement **mucoviscidose** pour les quatre  
( insuffisance pancréatique malabsorption des graisses et des vitamines liposolubles traitement administrées souvent avec des extraits pancréatiques )
- Bilan coagulation ( Vitamine K ) les plus jeunes
- Bilan chirurgie digestive dont baryatrique moins que les vitamines B  
( sauf atteintes du pancréas )
- Bilan nutritionnel
- dont recherche de carence et suivi de traitement ainsi que surdosage

# Préanalytique Vitamines B1 B6 B2 B3 (ou PP ) B8

- Dosées plutôt sur sang total
- Plus stables que les précédentes
- Action possible de la lumière
- Congelés
- Pas de tubes avec gel séparateur
- Recherche de carence : prélèvement parfois fait apres ...injection de la vitamine
- Alarme ARS sur les utilisations d'anticorps marqués a la B8 ou biotine...chez des patients en recevant
- <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00927887/document>

# Demande des Vitamines B1 B6 B2 B3 (ou PP ) B8 B9 B12 et C

- Bilan chirurgie digestive dont baryatrique vitamines B1 B6 voir B2
- Carences sévères cas de dénutrition rares !
- Symptômes neurologiques ( vitamines B1 B6 PP ...)
- Alcoolisme ( vitamines B1 B6 PP ...)
- Suivi nutritionnel dont sportifs
- Bilan nutritionnel des personnes âgées ( vitamines C PP...)
- Bilan nutritionnel vitamine B12 végétalien dont acide méthylmalonique
- Suivi de maladies métaboliques traitées épilepsie B6 dépendante déficit en biotinidase en holocarboxylase synthétase (multiple carboxylase deficiency) B8 ou biotine, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9350481> hyperhomocysteinémie( vitamines B6 B9 B12 ), certaines acidémies glutariques type 2 ( vitamine B2 ), certaines acidémies propioniques ( vitamine B8 ) certaines acidémies méthylmaloniques ( vitamine 12 )  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4180313/>

# DOSAGE DES VITAMINES ET LC MSMS

- Gains attendus :
- Doser plusieurs formes d'une vitamine ( Vitamine E ou vitamines B1 B6 B2) voir les provitamines ( vitamine A et ses nombreux précurseurs )
- Gain de sensibilité
- Doser deux ou plusieurs vitamines
- Gain de SPECIFICITE
- Différencier les formes actives et formes inactives ( vitamines D epimeres et isobars )
- Gain de temps d'analyse
- Plus d'analyse par série
- Gain de réactifs de consommables
- Simplification de l'extraction automatisé

# DOSAGE DES VITAMINES ET LC MSMS

- Quelques inconvenients...
- Cout de l'appareil SAV
- Pannes
- savoir faire technique
- Pour quantifier nécessité d'avoir des standards internes ( molécules à doser sous forme deutéré )



# DOSAGE DES VITAMINES LIPOSOLUBLES ET LC MSMS

# Dosage Vitamines K

## Deux méthodes

- Méthode chromatographique analytique avec détection fluorimétrique ou ampérométrique après extraction liquide liquide chromatographie préparative 3 jours de travail !
- Méthode LC MSMS avec ionisation APCI apres extraction liquide liquide simple veronique ducros CHU Grenoble

# Dosage des Vitamines D

## Dosages des vitamines « D2 D3 »

- Automates dosage D2 + D3 attention aux métabolites et épimères
- LC MSMS classique différencie 25 OH D2 et 25 OH D3 des épimères et des isobars <https://nutritionj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2891-10-46>
- voir aussi dosage de métabolites LC MSMS plus sensibles
- Dosage de calcitriol ou 1.25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sur automate dédié
- LC MSMS nécessite pour le calcitriol des doubles extractions ou des extractions puis dérivatisation ( adapté a des hauts débits )  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4050665/>
- <http://apps.thermoscientific.com/media/SID/Europe%20Region/PDF/Calcitriol.pdf>

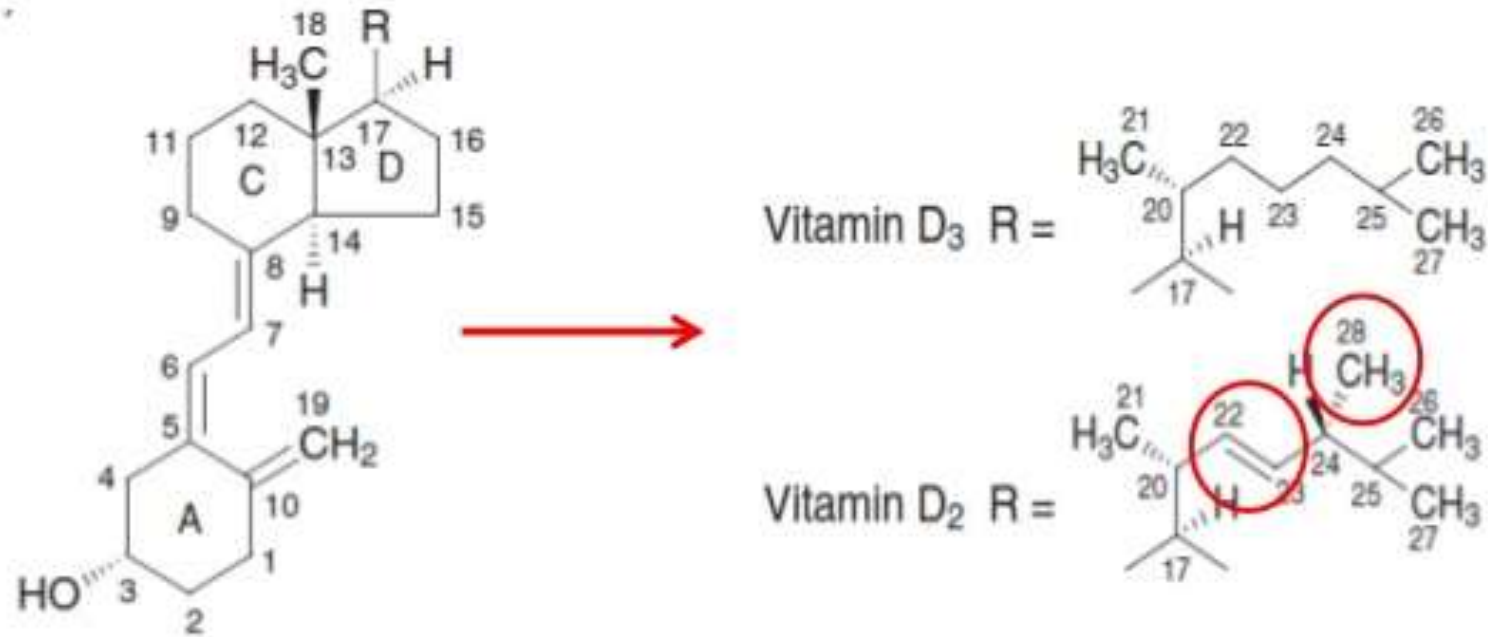
# Dosages des Vitamines D

- Beaucoup de méthodes immunologiques kits pour les 25 OH D2 et 25 OH D3
- Dosages des 25 OH D2 et 25 OH D3 par LC MSMS possible avec des kits
- Ionisation ESI ( la plus courante ) possible
- Deux stratégies
  - Beaucoup d'analyses en LC MSMS USA UK ( Hollande Allemagne +/- )
  - dosages sur automates confirmation LC MSMS si nécessaire
- Dosage du calcitriol role de la LC MSMS peu ou pas appliqué permet potentiellement de doser les formes D2 et D3 nécessite des LC MSMS haut de gamme

# Structural differences of D2 and D3

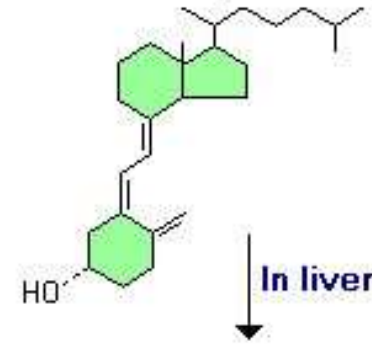
3

- In C-17 side chain, vitamin D2 has double bond and additional methyl group.

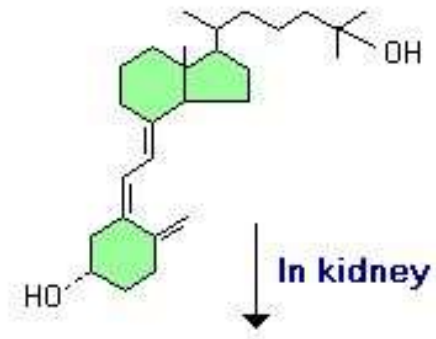




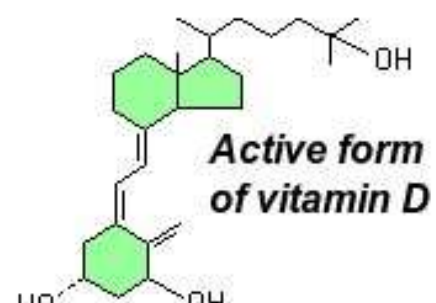
cholecalciferol (vitamin D3)

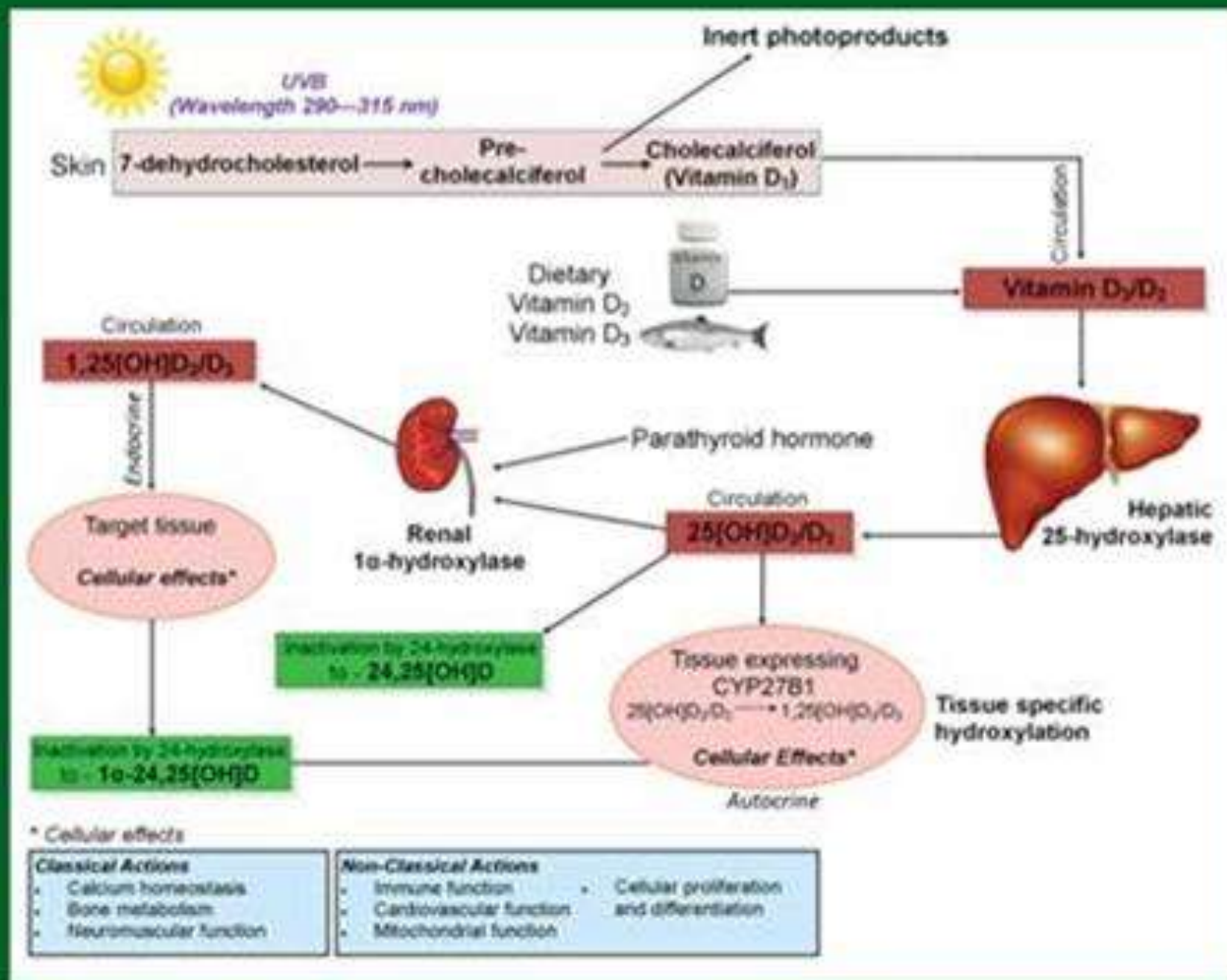


25-hydroxycholecalciferol  
(25-hydroxy vitamin D)

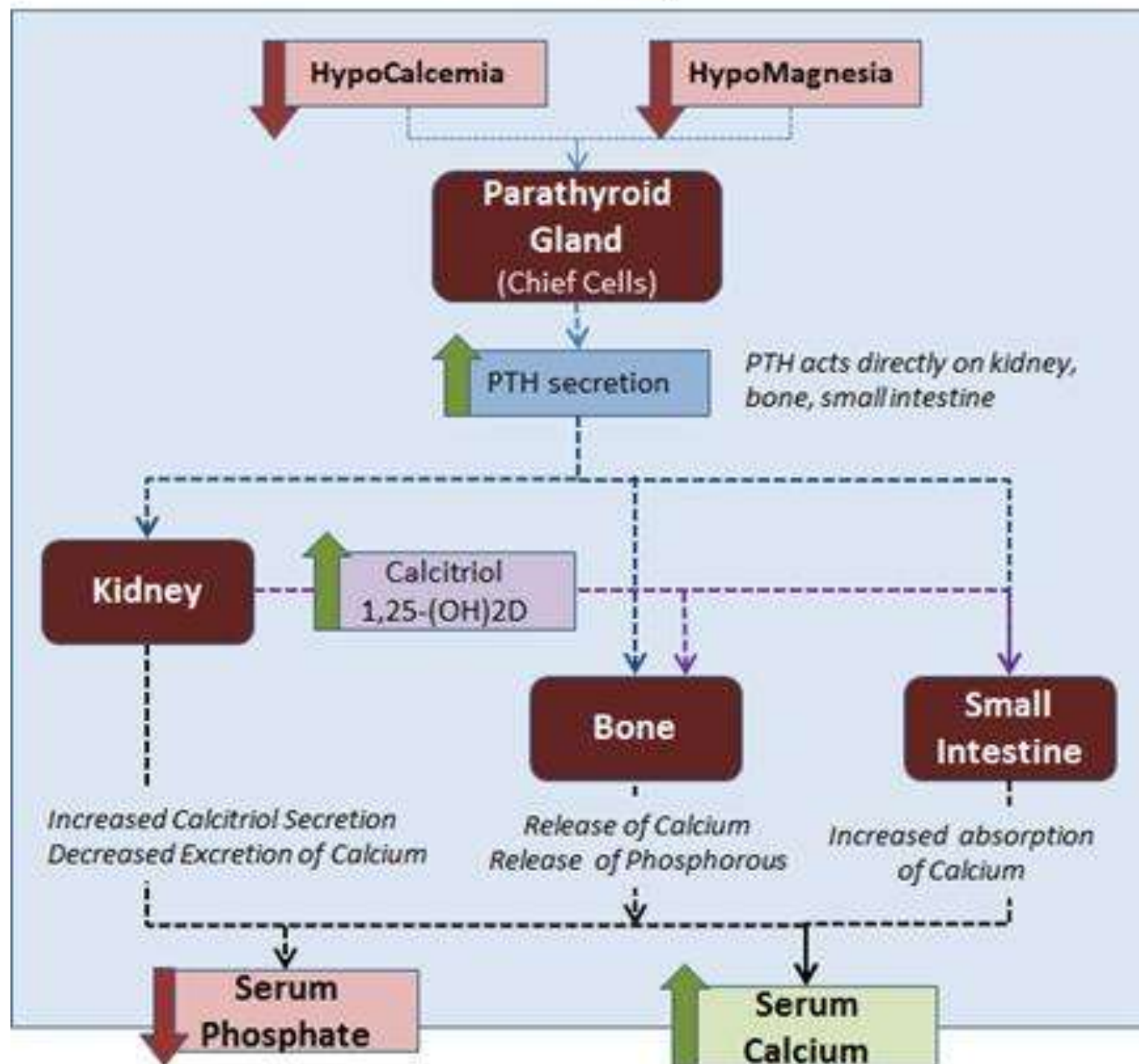


1,25-dihydroxycholecalciferol  
(1,25-dihydroxy vitamin D)

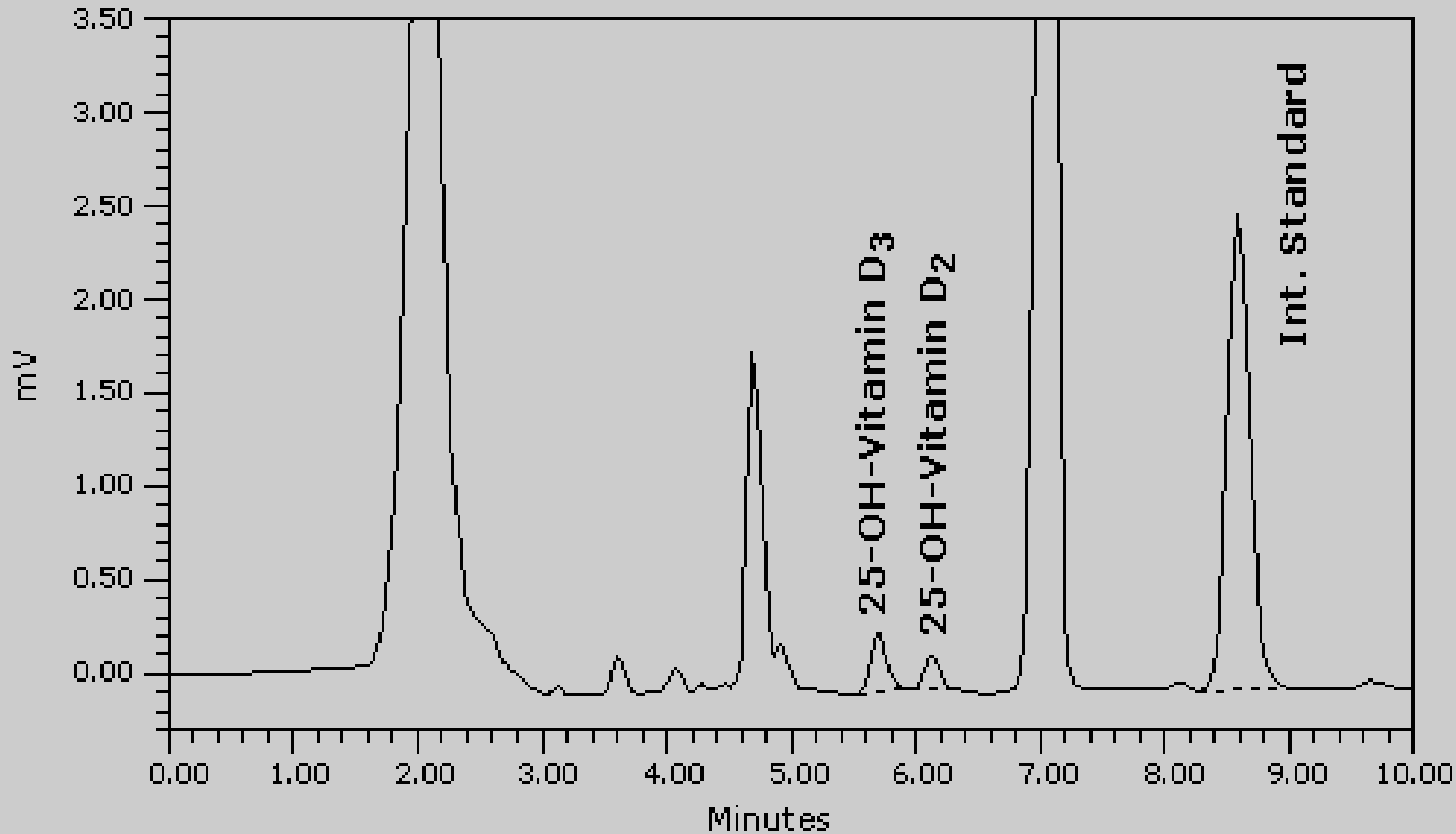


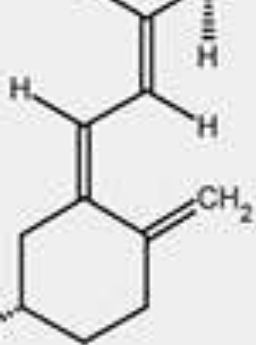


**Figure 1:** Vitamin D synthetic and metabolic pathways. Vitamin D is obtained from UVB-stimulated photosynthetic reactions or dietary intake. Following hydroxylation at carbon 25 via 25-hydroxylase and at 1 $\alpha$ -carbon by 1 $\alpha$ -hydroxylase, vitamin D becomes "active." Through interaction with the vitamin D receptor, active vitamin D regulates gene expression but also stimulates rapid signalling cascades in many tissues. See text for abbreviations. (Redrawn from Owens and Close, 2013).

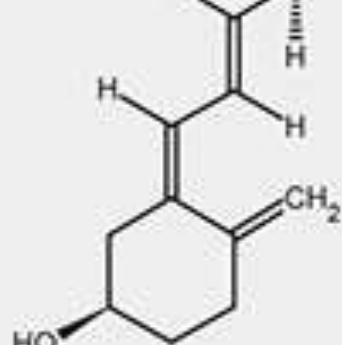




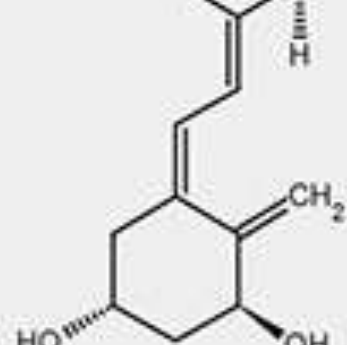




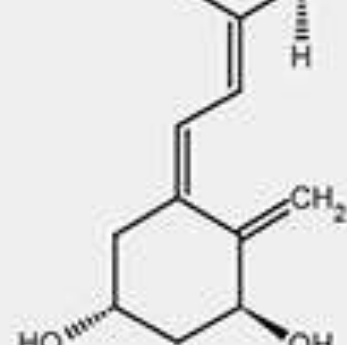
**25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>**  
 Monoisotopic Mass = 400.334131 Da  
 Molecular Formula = C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>



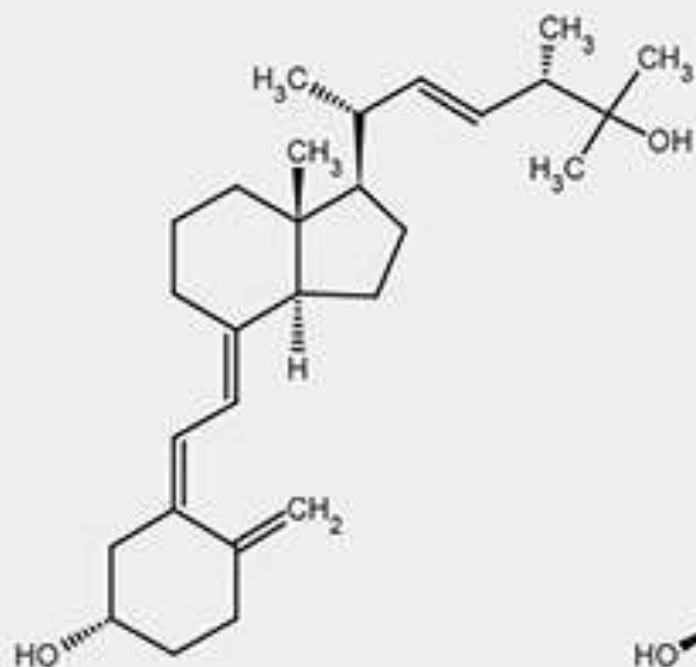
**3-*epi*-25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>**  
 Monoisotopic Mass = 400.334131 Da  
 Molecular Formula = C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>



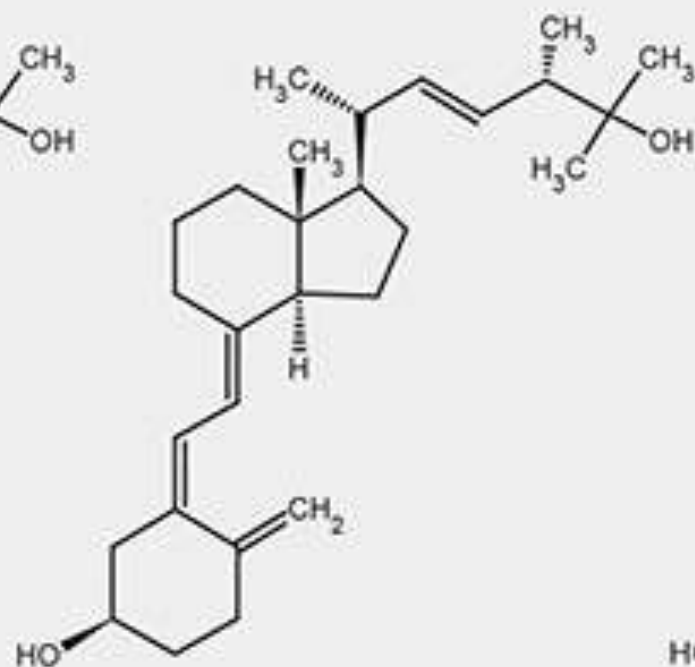
**1- $\alpha$ -25-Dihydroxyvitamin D<sub>2</sub>**  
 Monoisotopic Mass = 428.329045 Da  
 Molecular Formula = C<sub>29</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>



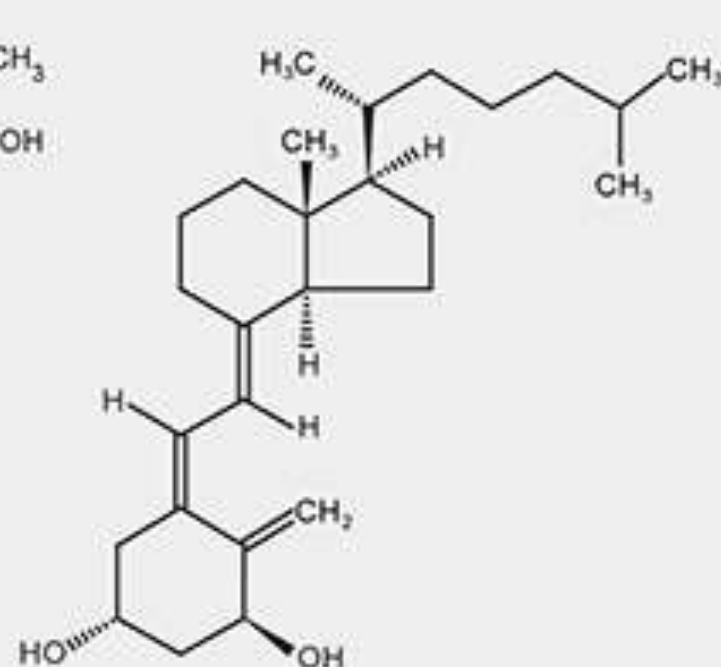
**1- $\alpha$ -25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>**  
 Monoisotopic Mass = 416.329045 Da  
 Molecular Formula = C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>



**25-Hydroxyvitamin D<sub>2</sub>**  
 Monoisotopic Mass = 412.334131 Da  
 Molecular Formula = C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>

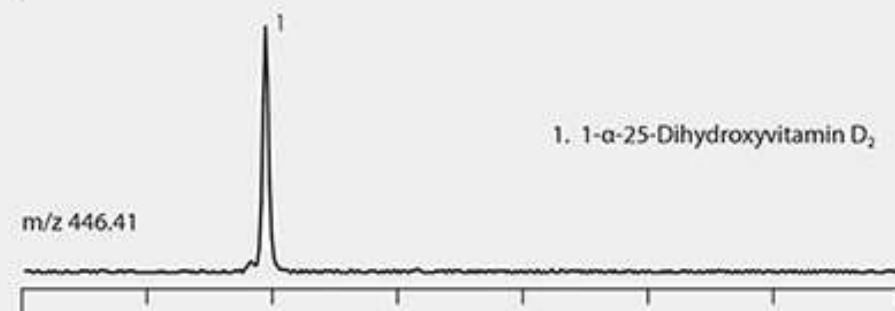
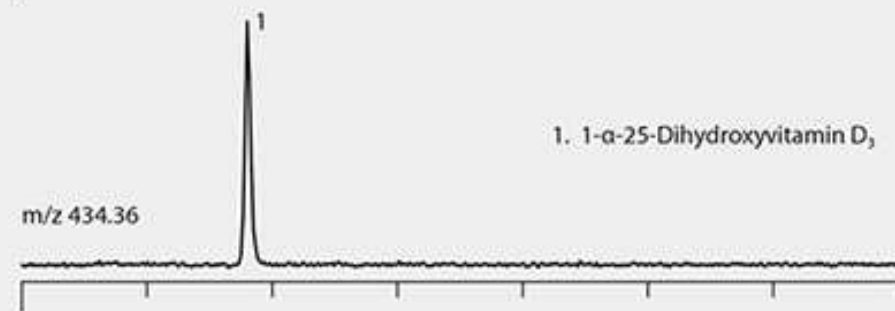
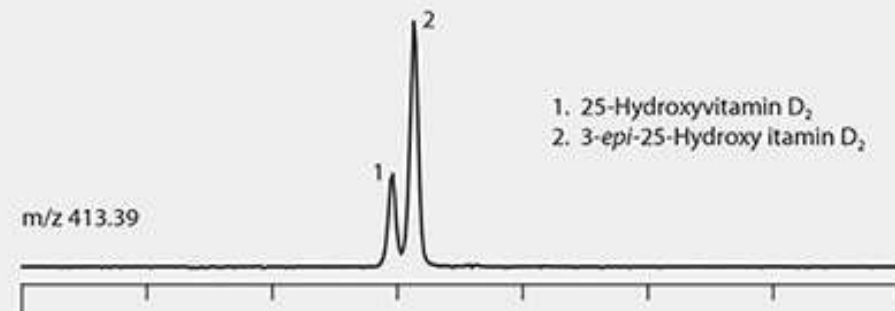
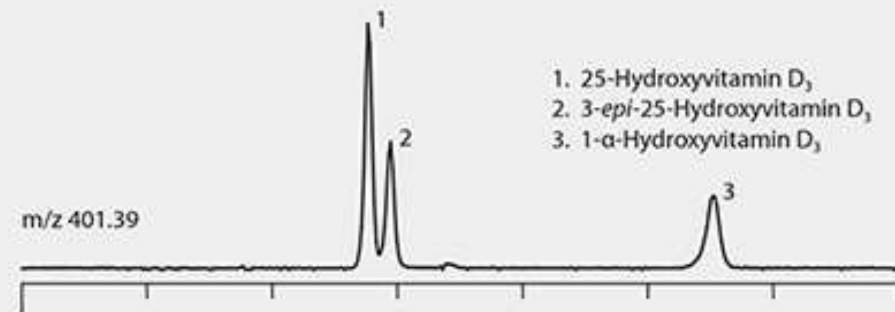


***epi*-25-Hydroxyvitamin D<sub>2</sub>**  
 Monoisotopic Mass = 412.334131 Da  
 Molecular Formula = C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>



**1- $\alpha$ -Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>**  
 Monoisotopic Mass = 400.334131 Da  
 Molecular Formula = C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>

Conditions as in Figure 2.  
5 mM ammonium formate



0 2 4 6  
Min

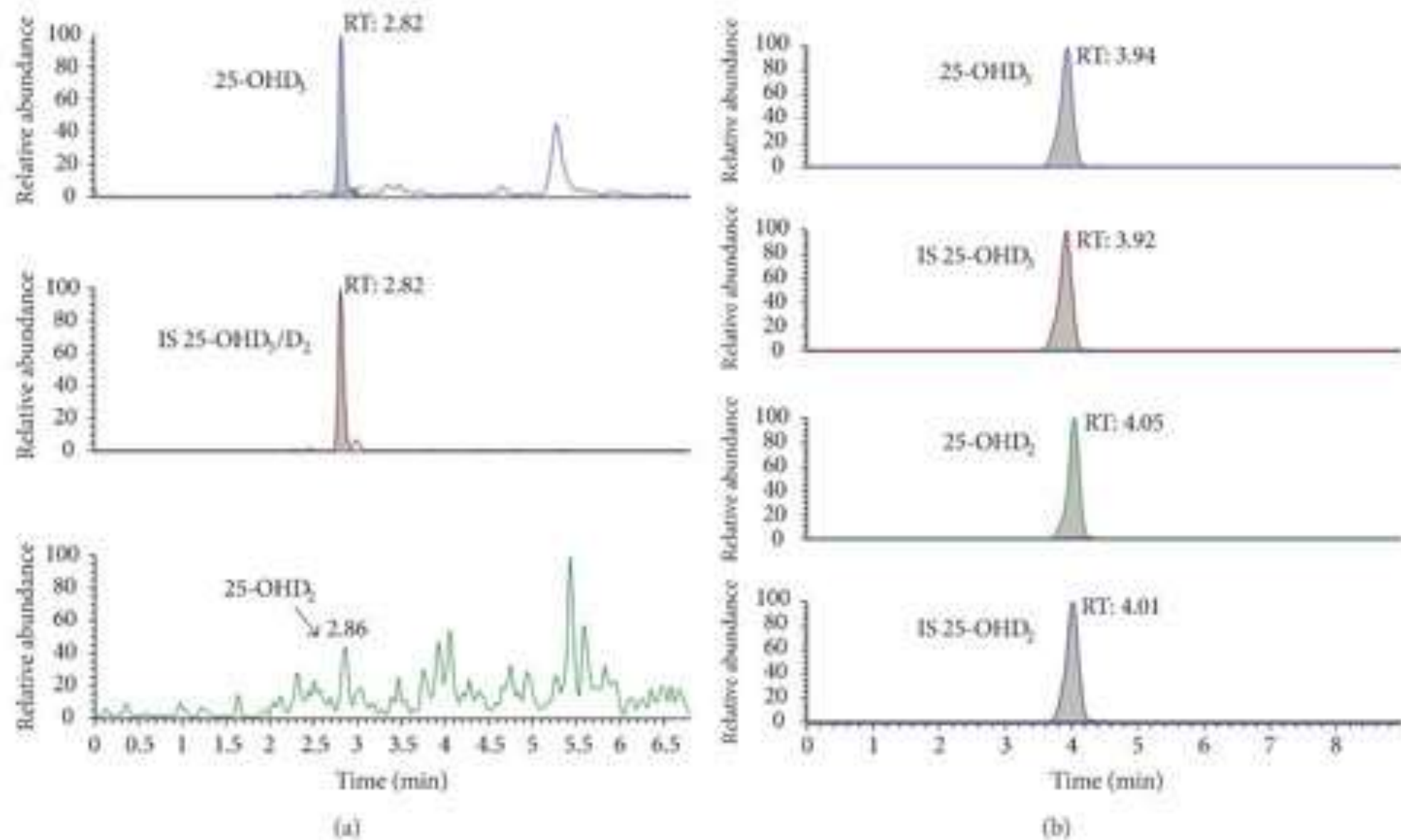
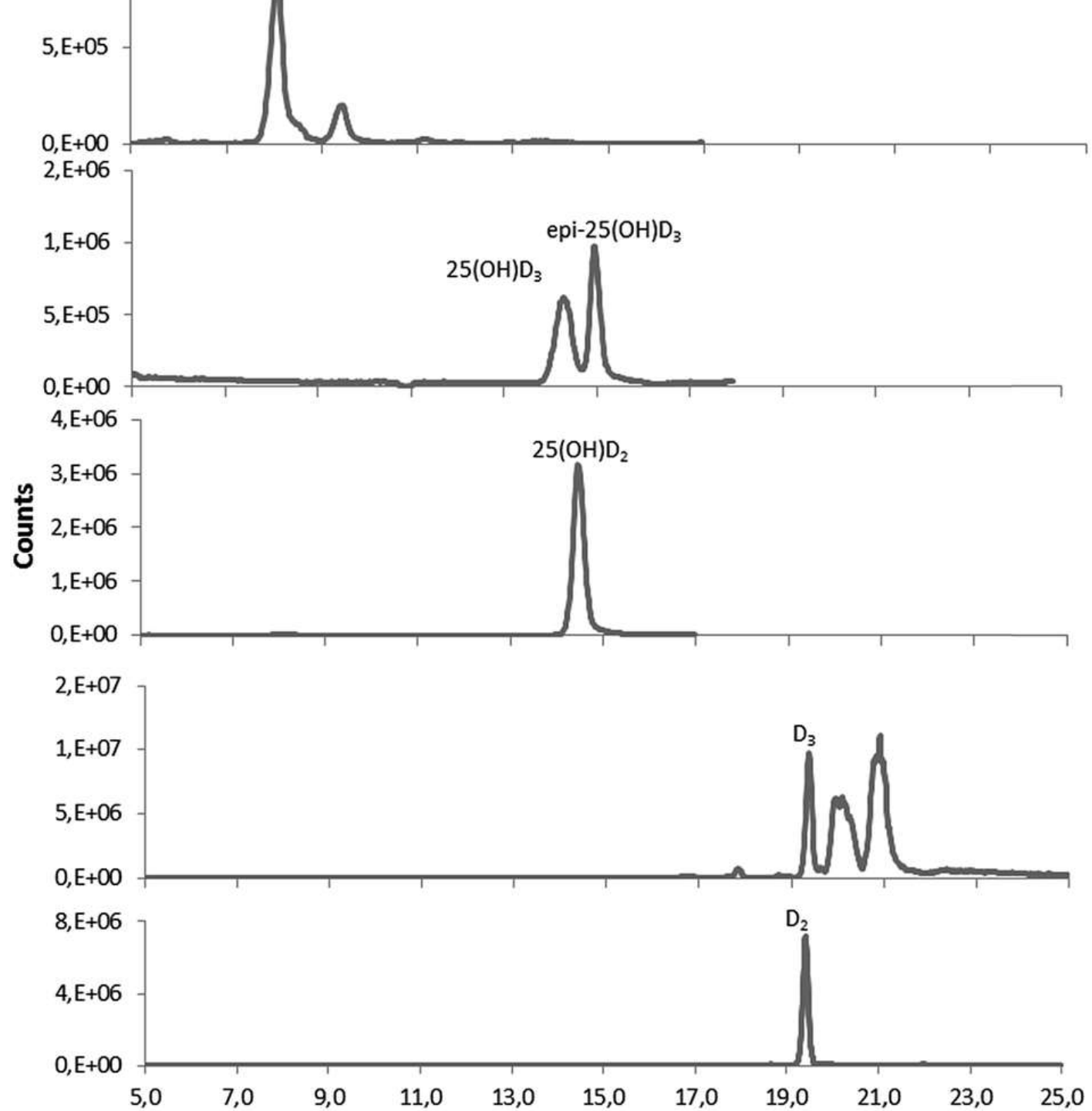
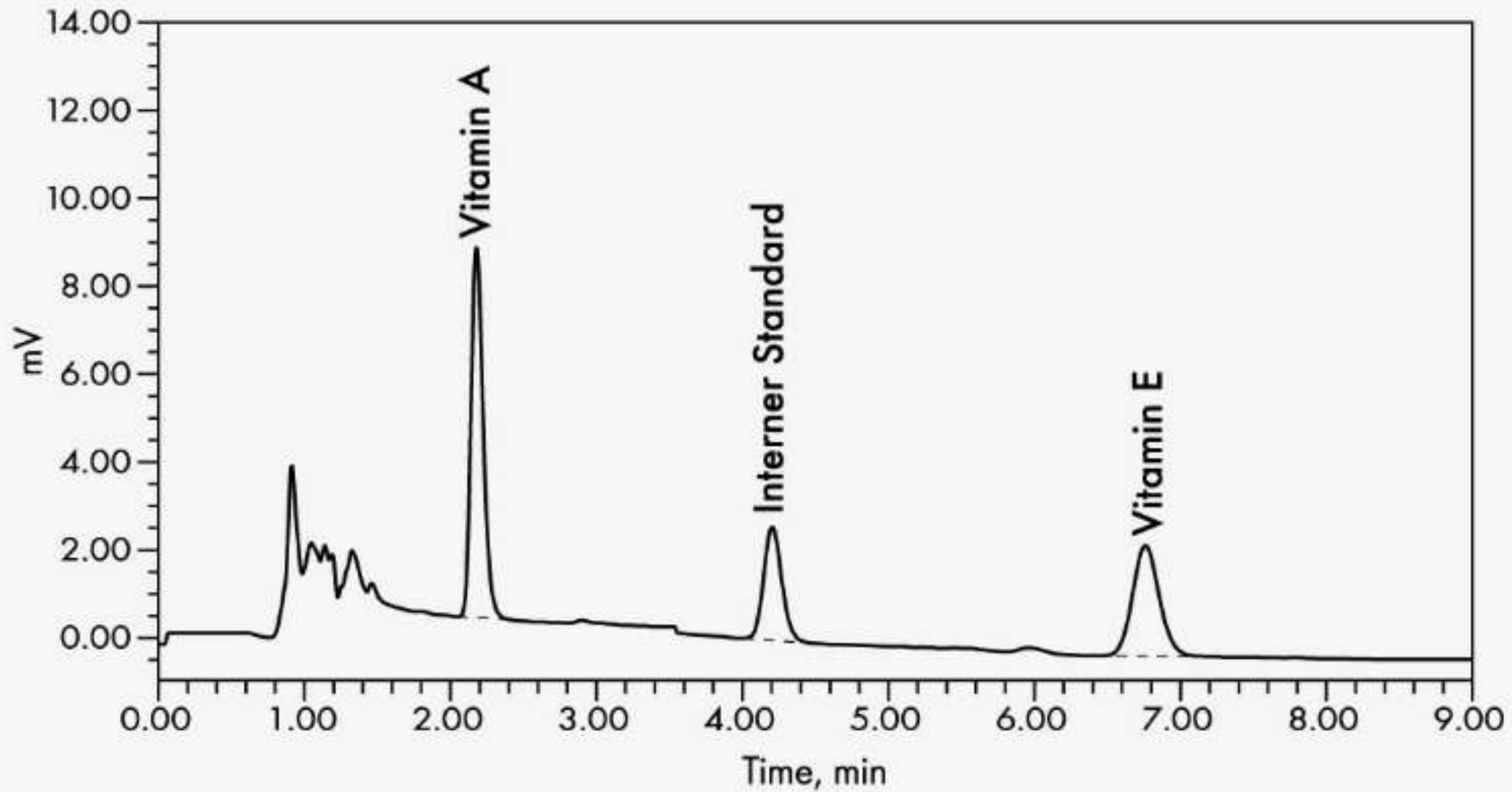


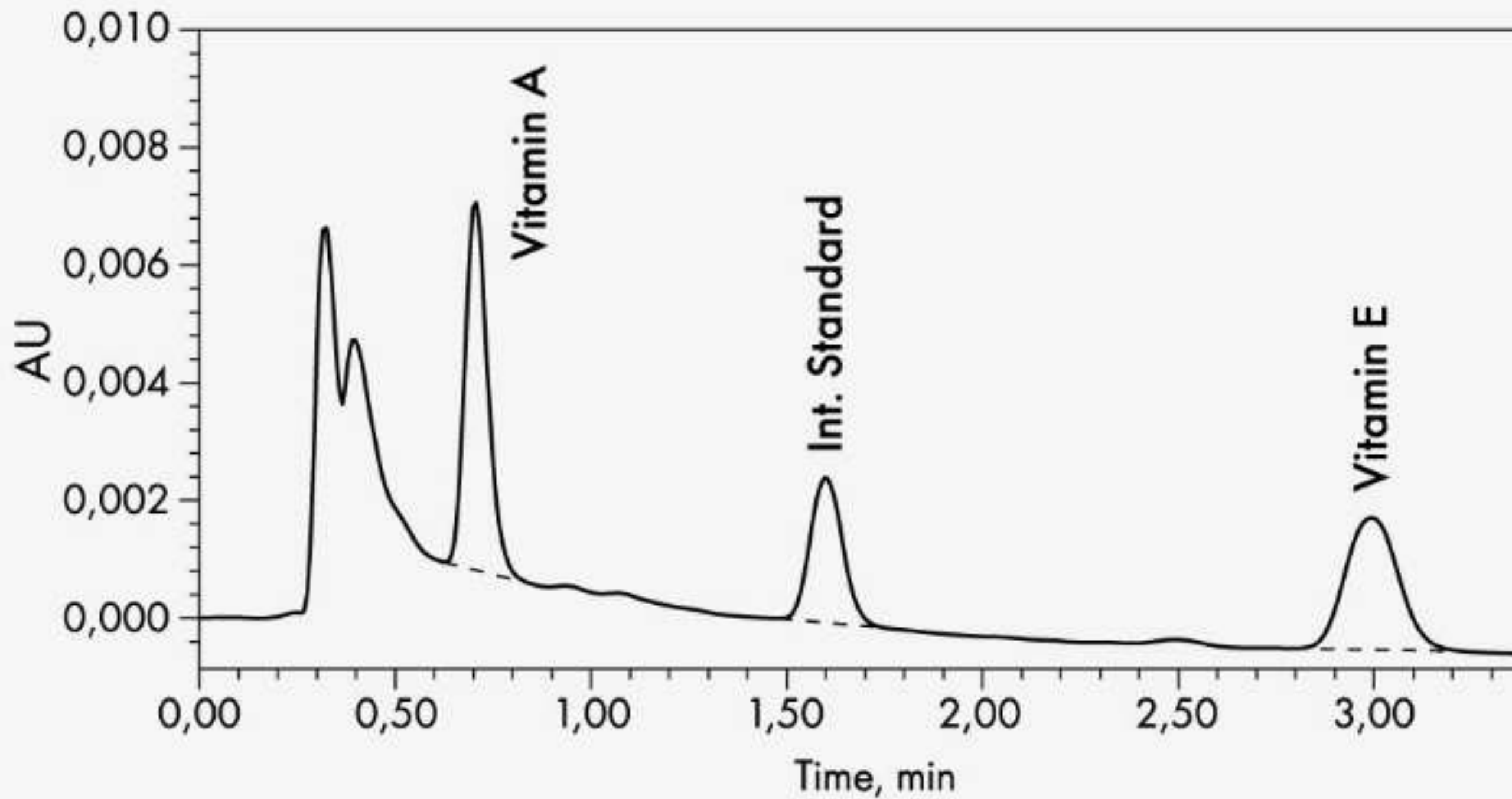
FIGURE 1: Typical SRM chromatograms of a serum sample (23.4 ng/mL 25-OHD<sub>3</sub> and 25-OHD<sub>2</sub> not detectable) assayed using the Chromsystems kit. The retention time of 25-OHD<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> is 2.8 minutes (a). Typical SRM chromatogram of a serum sample (21.8 ng/mL 25-OHD<sub>3</sub> and 25-OHD<sub>2</sub> 1.6 ng/mL) assayed using the PerkinElmer kit. The retention time is 4.0 min (b).



# Dosages des Vitamines A et E

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26924585>
- <https://>
- [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5085750](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5085750)
- Bon potentiel des LC MSMS mais fortes concurrences des méthodes UPLC détecteurs absorption UV/fluorimétrie qui permettent des résultats
- Publications portant sur les différentes formes de la vitamine E ( 8 ! ) et vitamine A et les nombreux provitamines A LC MSMS et UPLC

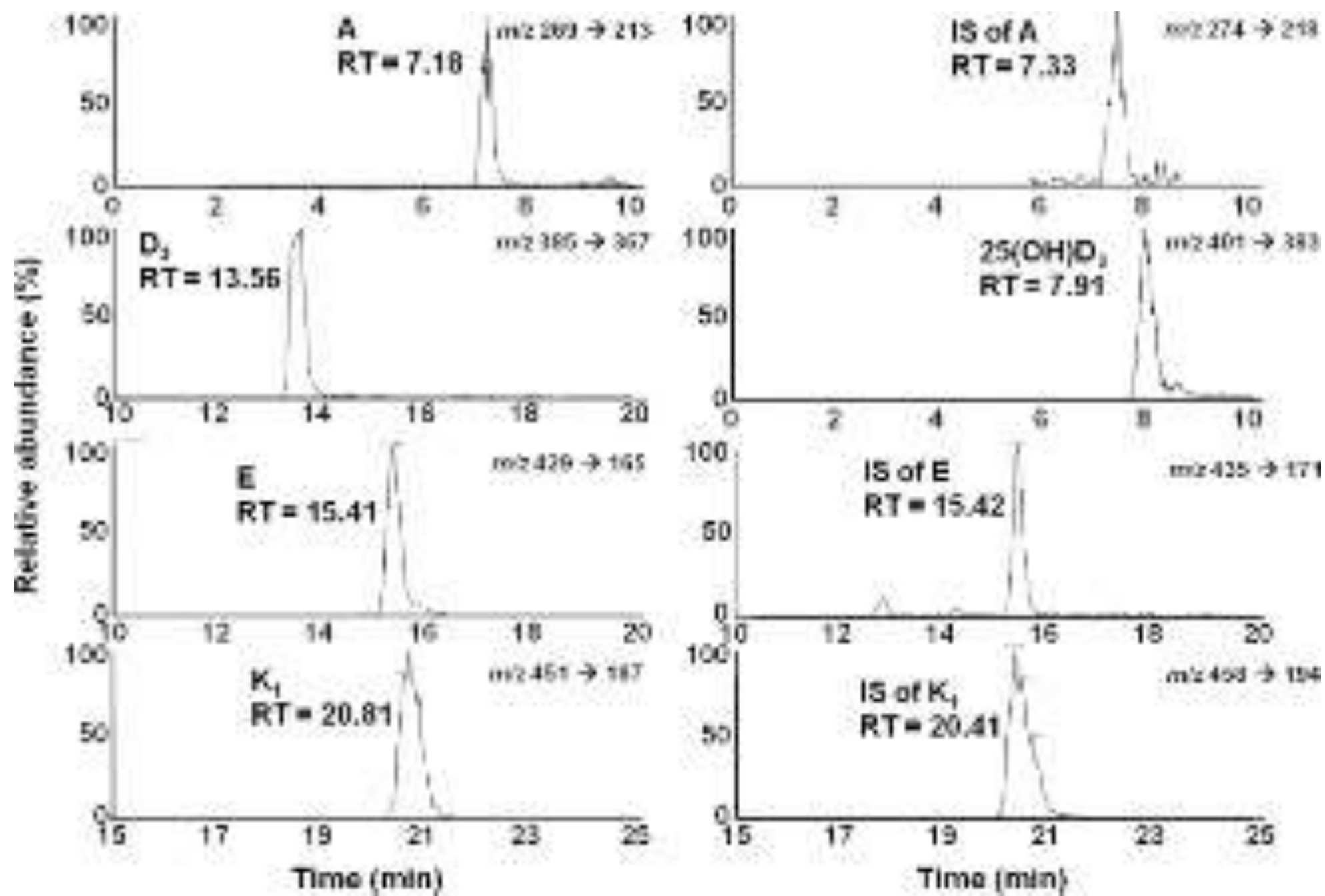


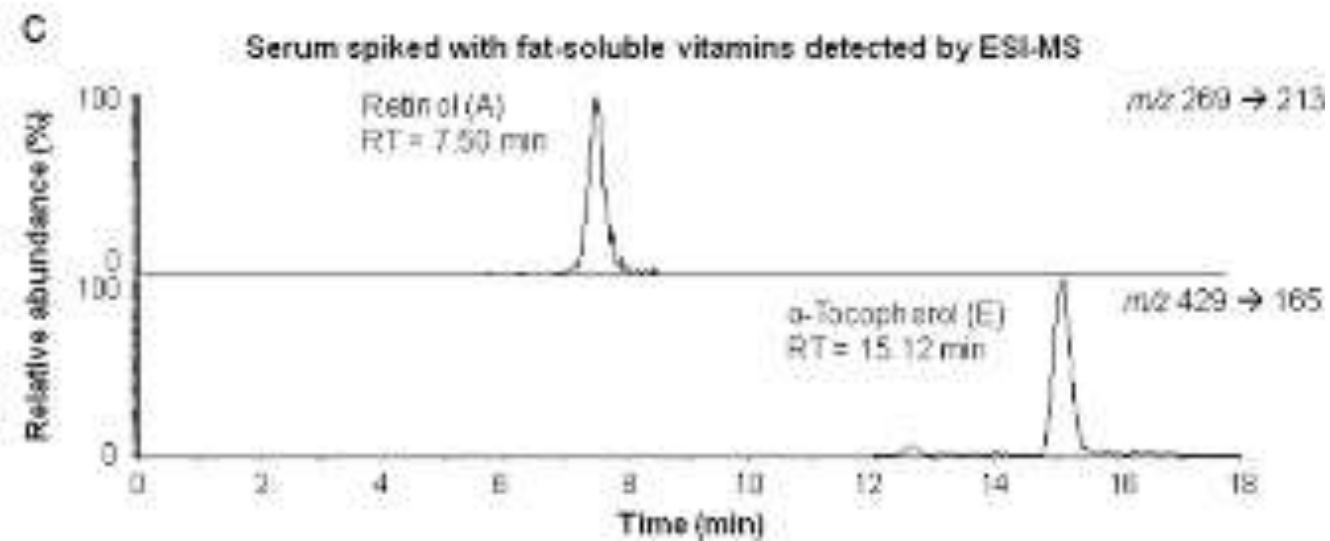
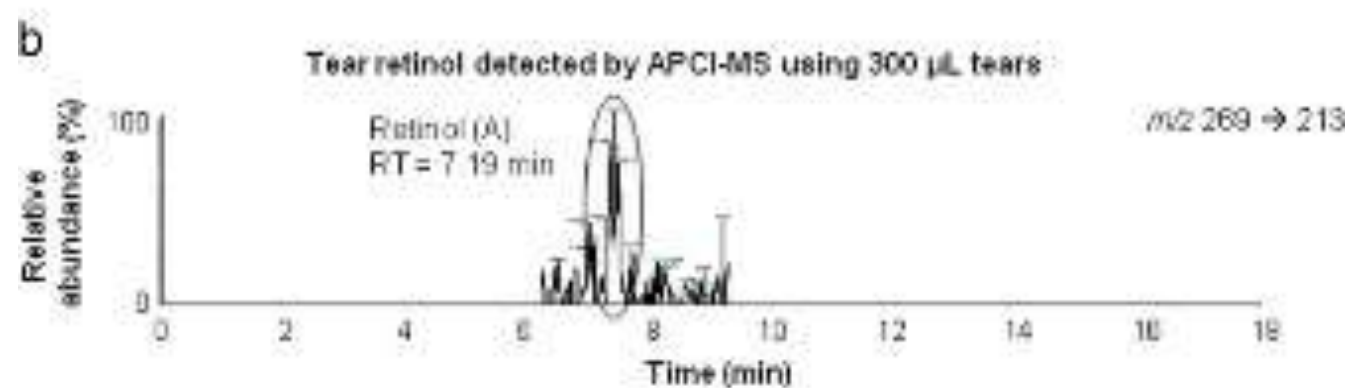
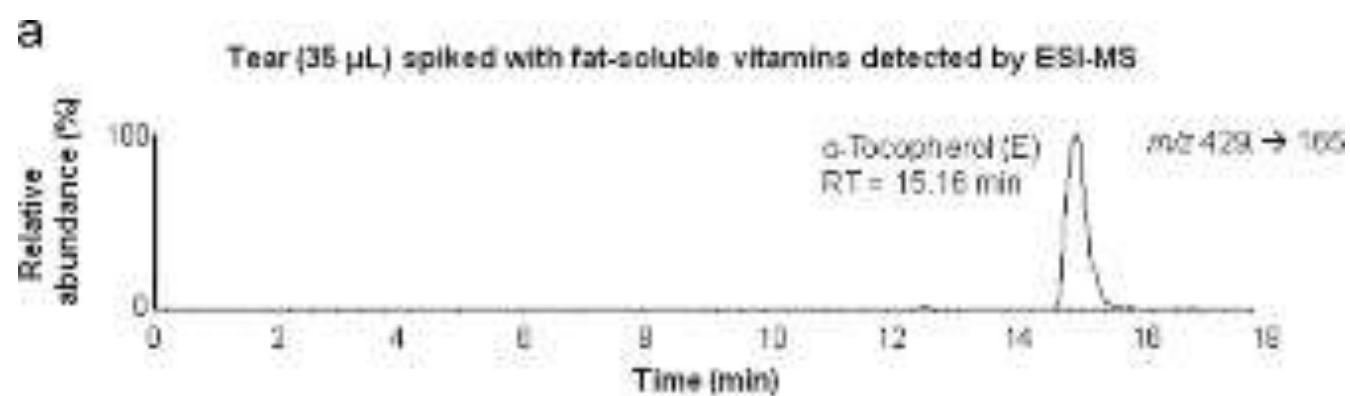




# LC MSMS vitamines liposolubles serum

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5328915/>



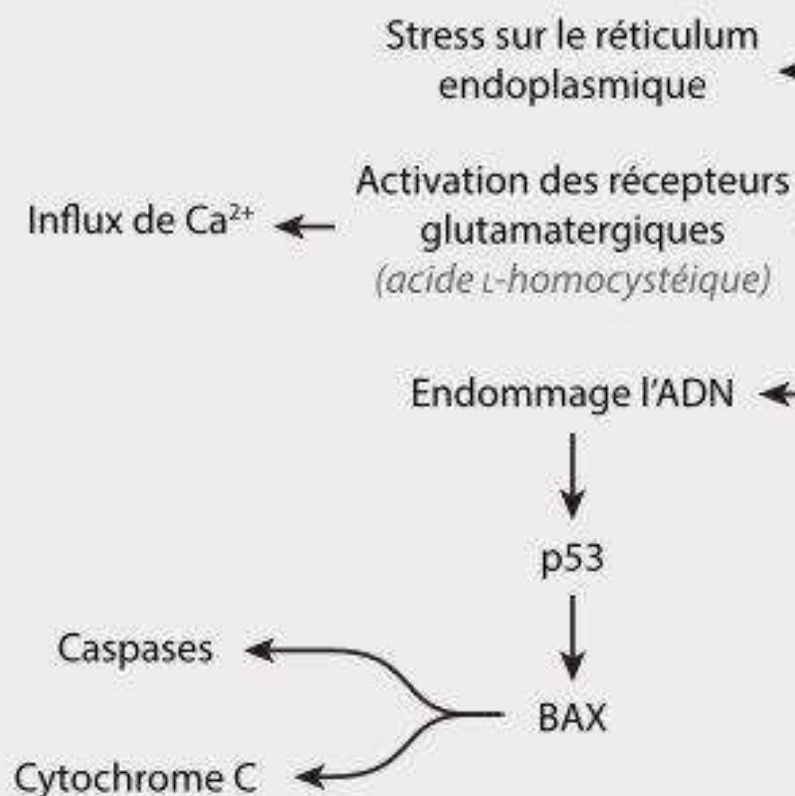


# DOSAGE DES VITAMINES HYDROSOLUBLES ET LC MSMS

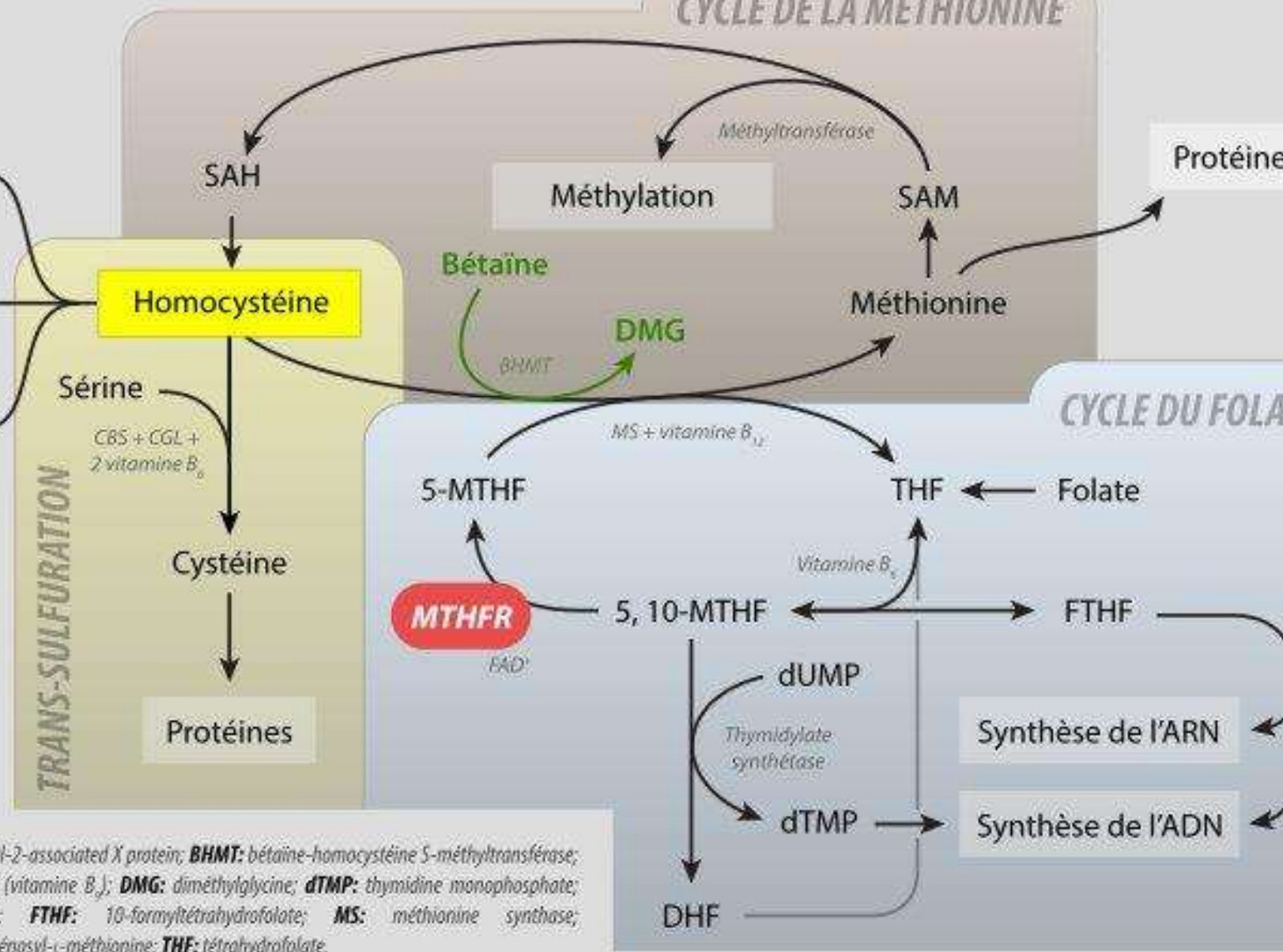
# vitamine B 12

- Les différentes formes de la vitamines B 12 par LC MSMS
- Dosages dans les aliments
- Dosages environnementaux l'eau de mer !

## Dysfonction synaptique et mort cellulaire



## CYCLE DE LA MÉTHIONINE



**5-MTHF**: 5-méthyltétrahydrofolate; **5, 10-MTHF**: 5, 10-méthylène-tetrahydrofolate; **BAX**: Bcl-2-associated X protein; **BHMT**: bétaïne-homocystéine S-méthyltransférase; **CBS**: cystathionine béta synthase; **CGL**: cystathionine gamma lyase; **DHF**: dihydrofolate (vitamine  $\text{B}_9$ ); **DMG**: diméthylglycine; **dTMP**: thymidine monophosphate; **dUMP**: déoxyuridine monophosphate; **FAD**: flavine adénine dinucléotide; **FTHF**: 10-formyl-tetrahydrofolate; **MS**: méthionine synthase; **MTHFR**: méthylène-tetrahydrofolate réductase; **SAH**: S-adenosyl-L-homocystéine; **SAM**: S-adenosyl-L-méthionine; **THF**: tétrahydrofolate.

# Folates et dérivés

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21593502>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28768831>
- Utilisation et comparaison de la LC MSMS avec les méthodes immunochimiques
- Possibilité de doser une forme « active » le méthyltetrahydrofolate (MTHF) voir des formes intermédiaires
- Attention aux formes isobars

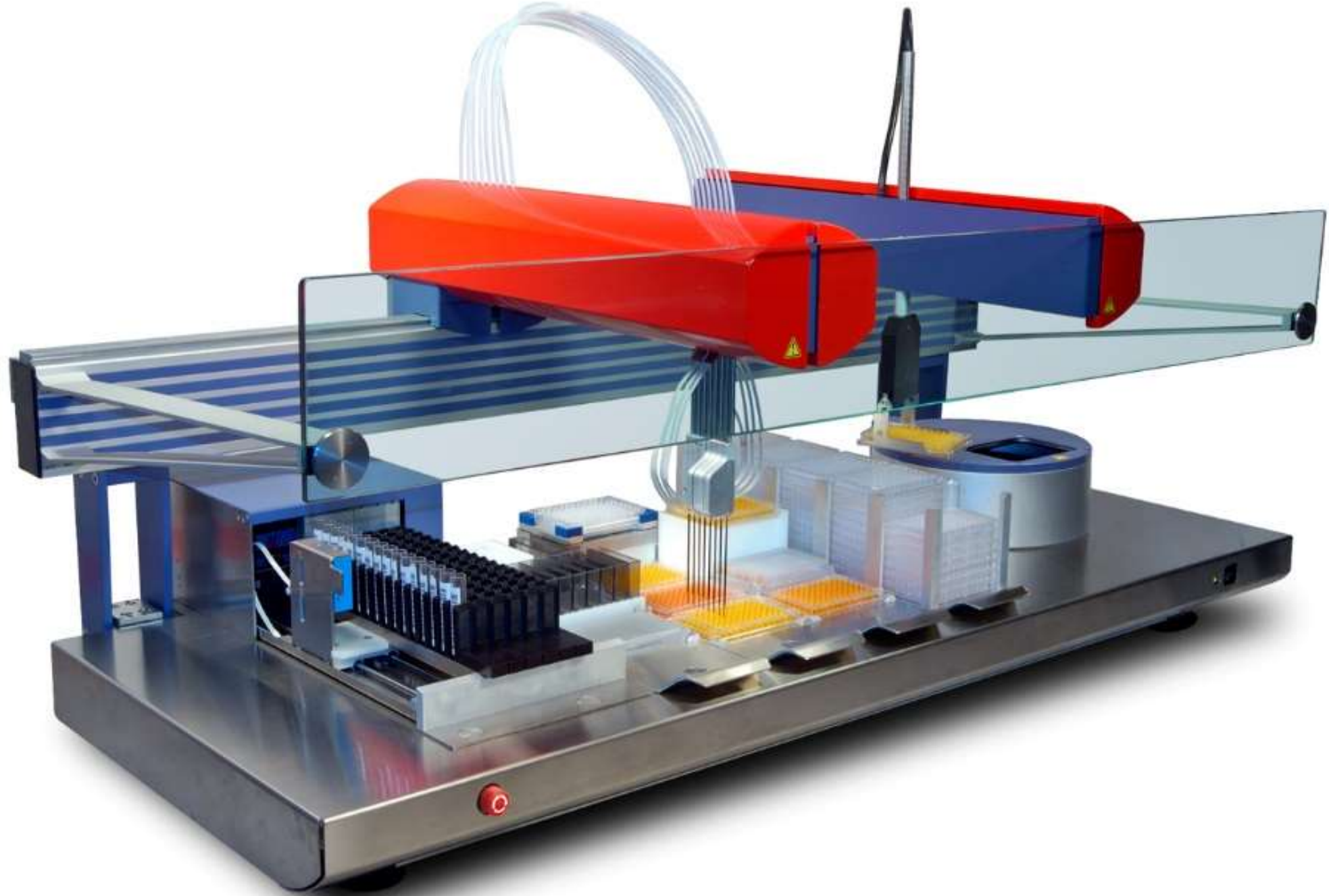
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23173171>

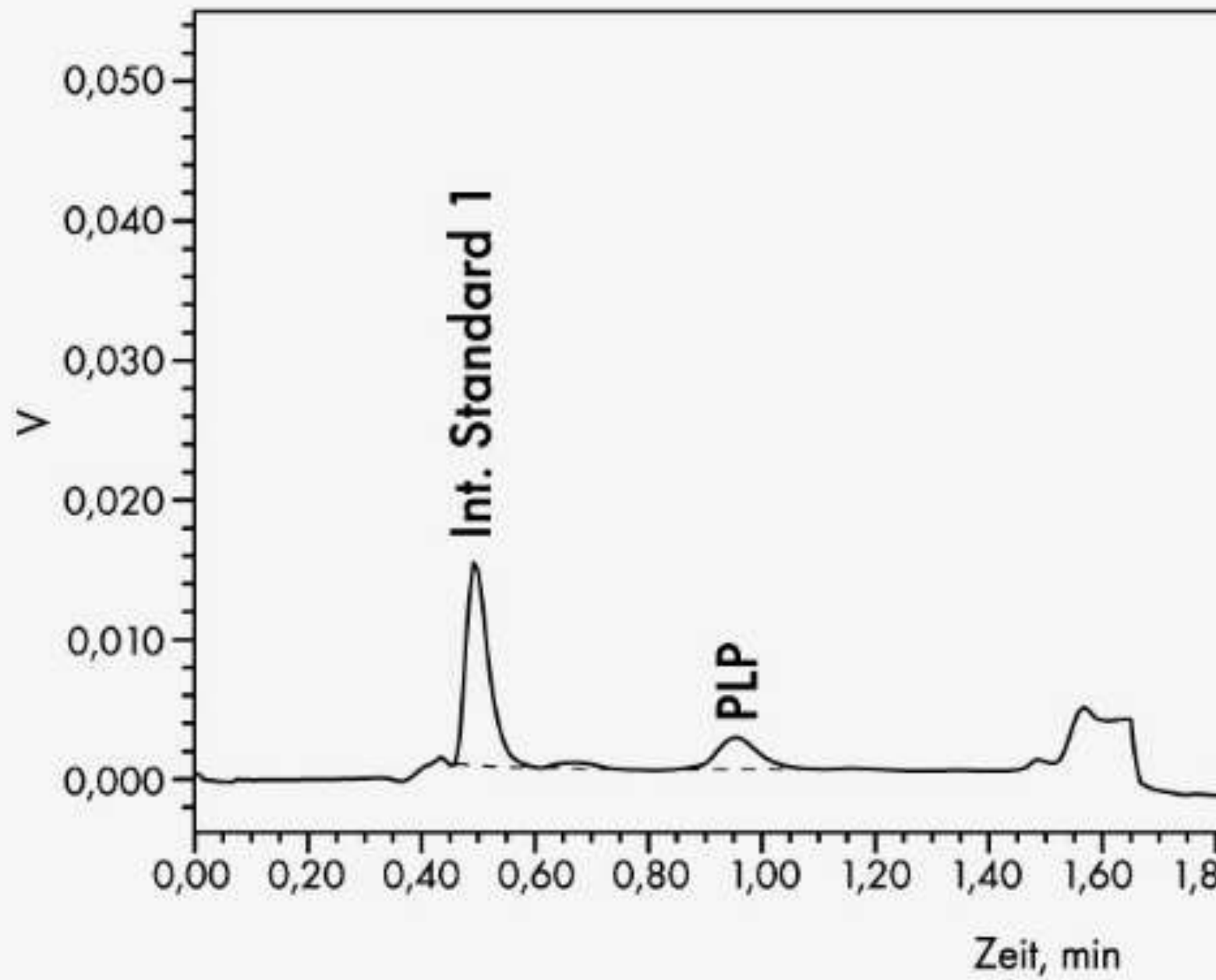
- Attention a la stabilité de la forme « active »  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25332487>

# Vitamines B1 B6 B2

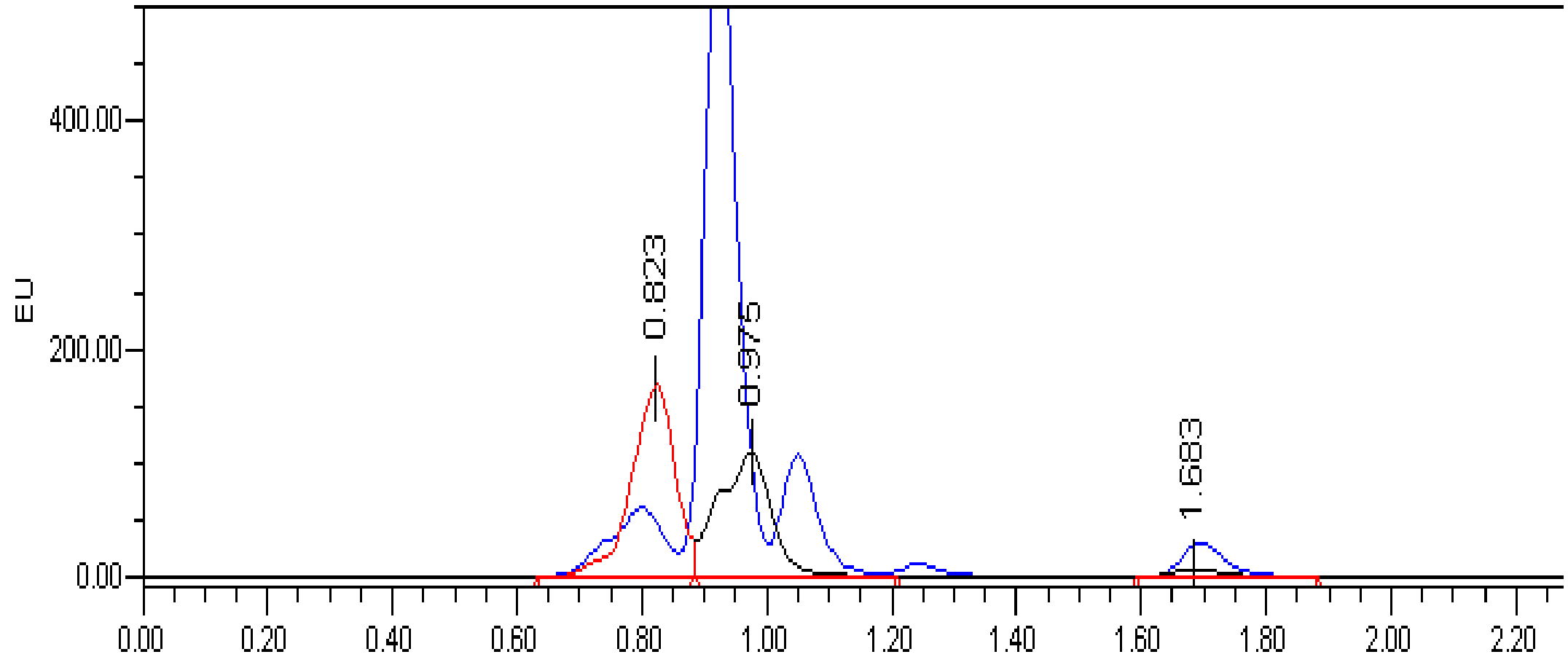
- Forte implantation des méthodes HPLC UHPLC apres dérivatisation
- Assez peu de publications par LC MSMS dans le sang
- J Puts et al, Simultaneous Determination of Underivatized Vitamin B1 and B6 in Whole Blood by Reversed Phase Ultra High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0132018 July 2, 2015  
Dosage des seules formes actives 2,5 min
- Midttun O et al, Multianalyte Quantification of Vitamin B6 and B2 Species in the Nanomolar Range in Human Plasma by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry *Clinical Chemistry* 2005 51:7 1206–1216
- Dosage des 7 formes de la vitamine B6 et des 3 formes de la vitamine B2





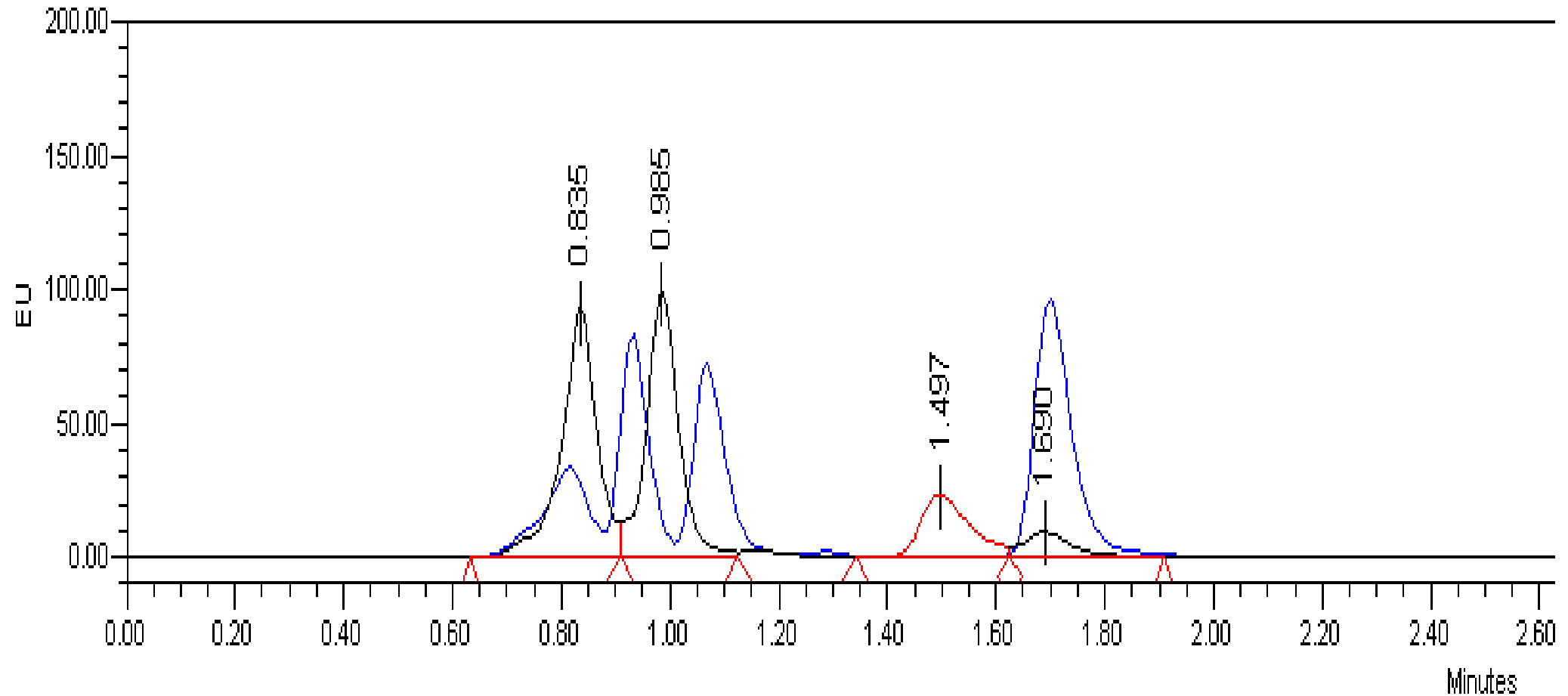


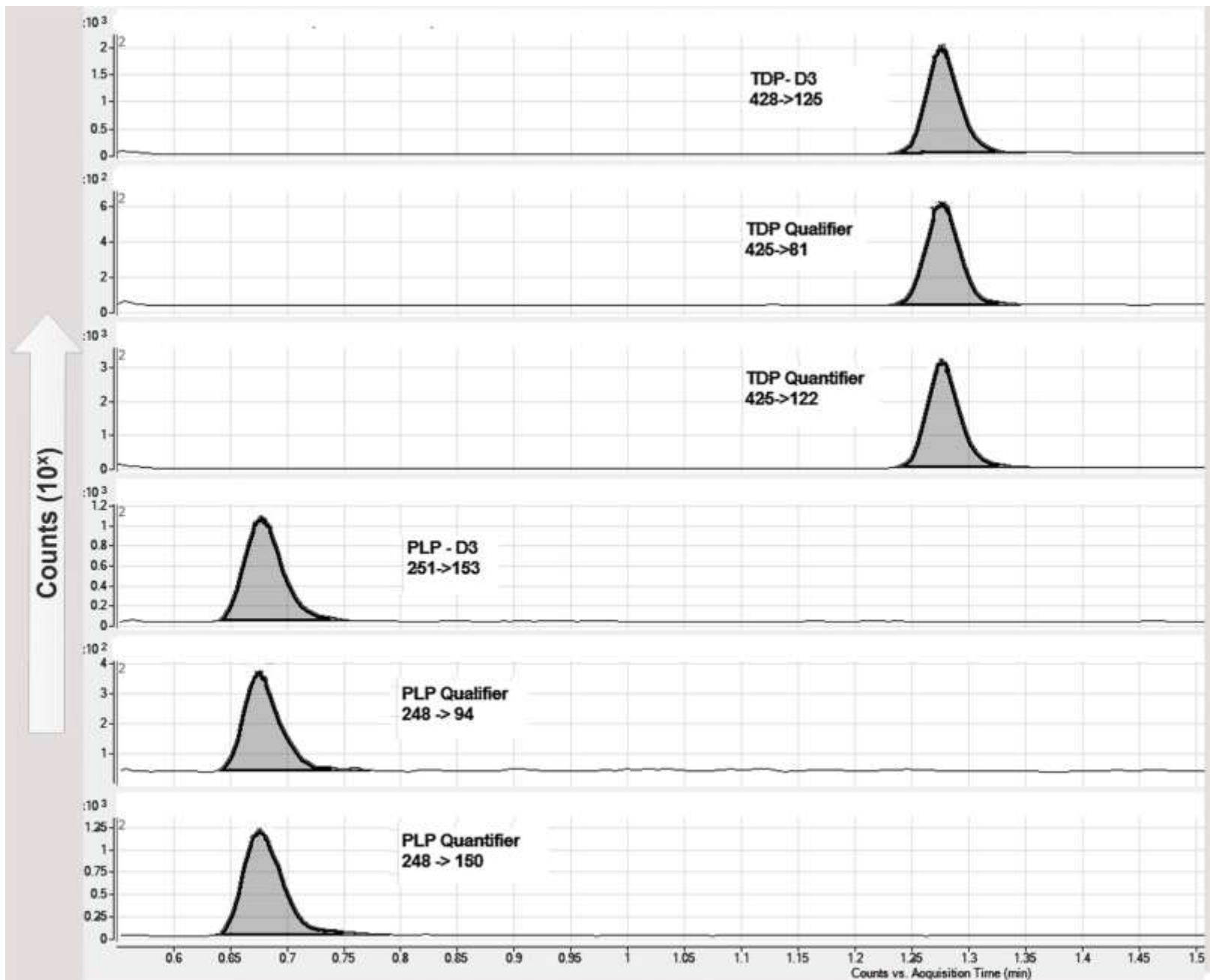
# patient taux élevé de vitamine B6 essai de gradient



555 Minutes, 149.0826 EU

# patient taux élevé de vitamine B1 essai de gradient

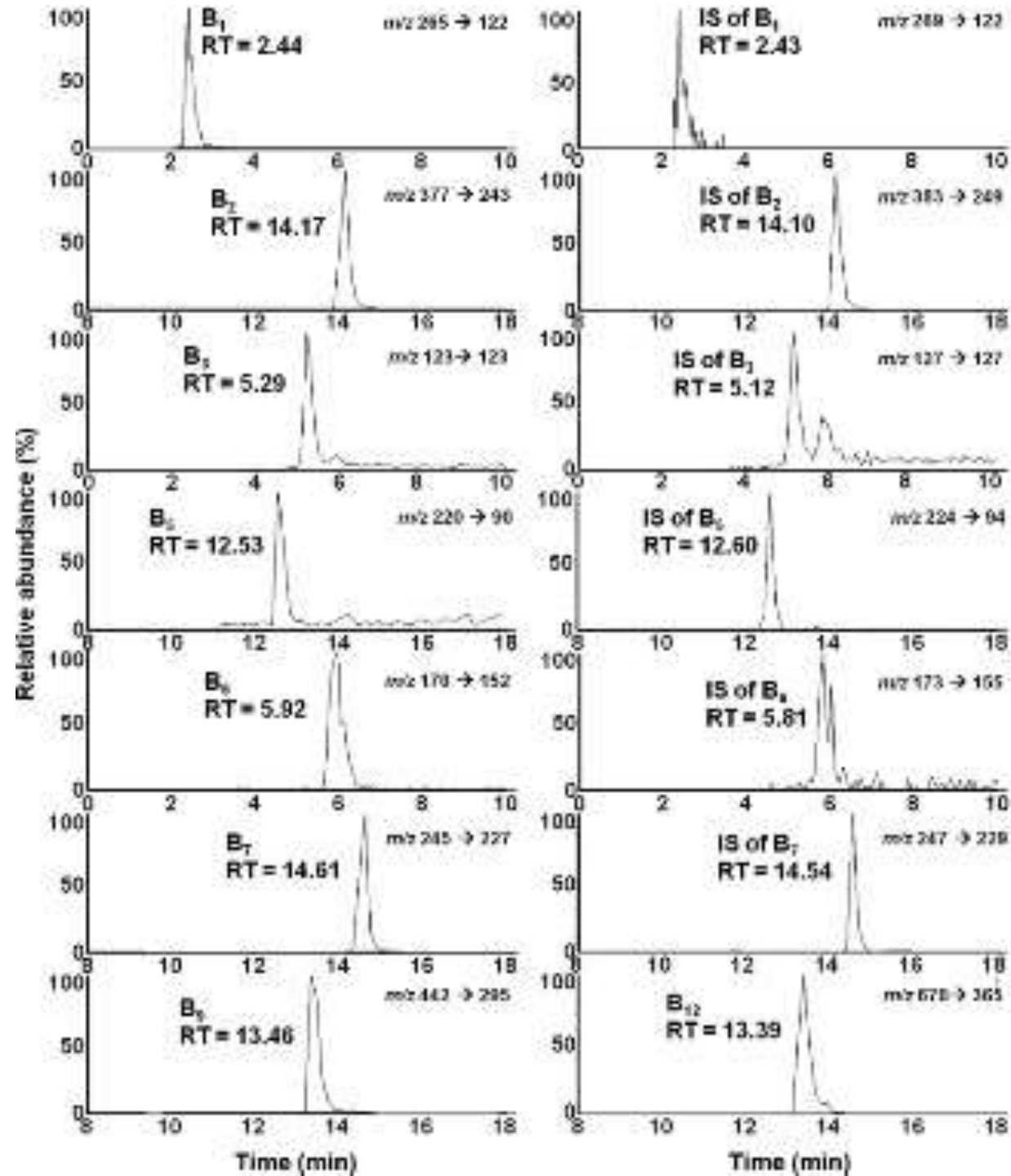


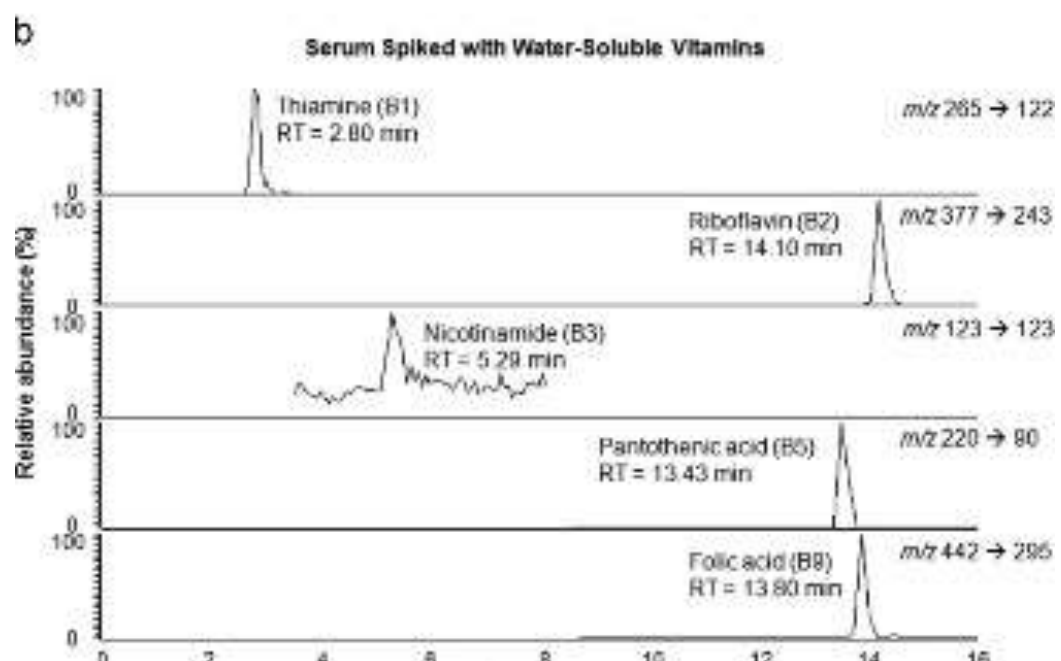
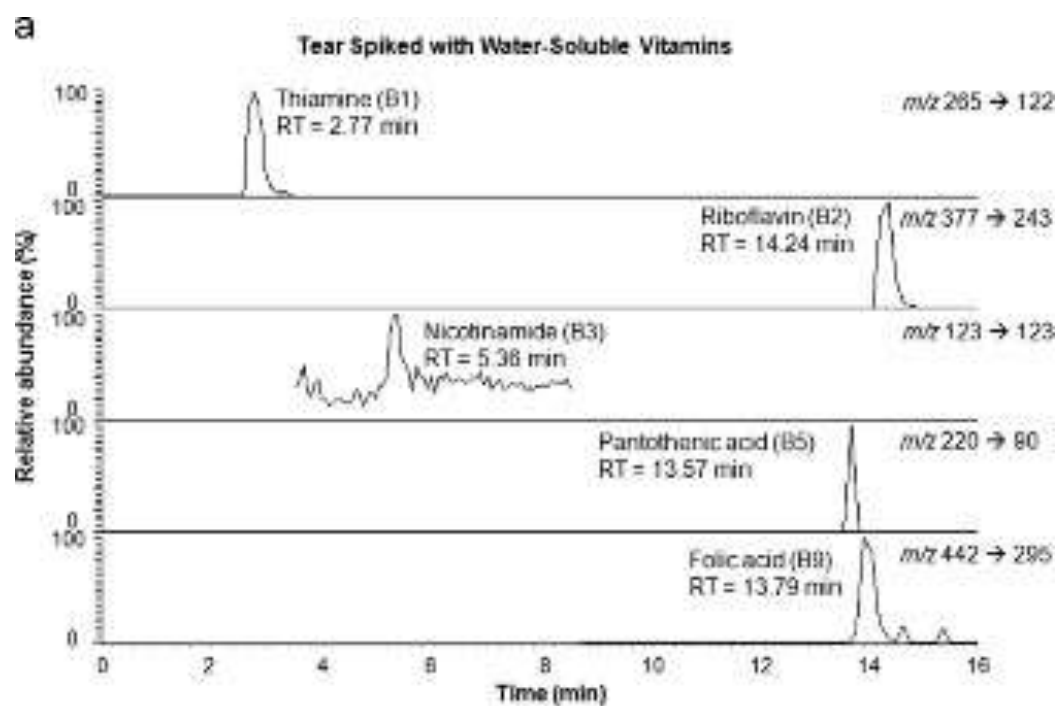


**Acquisition Time (min)**

# LC MSMS vitamines hydrosolubles serum

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5328915/>







# LC MSMS et vitamines

- spécificité sensibilité
- Evite extraction complexe ( temps réactifs )
- Temps d'analyses courts favorisé par les performances des colonnes séparatives ( greffage , granulometrie < 2  $\mu\text{m}$  )
- Les stratégies
  - Dosages de beaucoup de vitamines
  - Dosages des seules formes actives de 2 voir 3 vitamines temps d'analyse très courts ex : TPP et PLP 2 min  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28846867>
  - Dosages des formes actives et les plus importantes formes

## Exemple des épilepsies B6 (pyridoxine ) dépendantes et pyridoxamine 5' Phosphate dépendantes

- Déficit en antiquitine Epilepsie pyridoxine dépendante mutation gene *ALDH7A1* ou *PROSC*. Mutation sur *ALDH7A1* dosage de marqueurs spécifiques alpha aminoadipique semi aldéhyde ( $\alpha$ -AASA) et acide pipécolique. traitement par pyridoxine

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1486/>

- Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase deficiency mutation gene *PNPO*. Traitement par Pyridoxal 5'-phosphate (PLP)  
<http://omim.org/entry/610090>