

# Détermination du 5-méthyltetrahydrofolate dans le sang total par chromatographie liquide

Michèle Aké<sup>a,\*</sup>, Désiré Goin Bi Traye<sup>a</sup>, Christophe Amin N'Cho<sup>a</sup>, François Nicaise Bony<sup>a</sup>, Gildas Komenan Gbassi<sup>a</sup>, Anglade Kla Malan<sup>a</sup>

## RÉSUMÉ

Vu l'importance clinique de la vitamine B9 et son rôle au niveau de nombreux désordres métaboliques, sa détermination et en particulier celle de l'une des formes prédominantes, le 5-méthyltetrahydrofolate s'avère nécessaire. La présente étude décrit une méthode par chromatographie liquide qui permet la détermination du 5-méthyltetrahydrofolate dans le sang total. Des prélèvements de sang total ont été soumis à une étape de déprotéinisation dans une solution d'acide ascorbique à +37°C, puis soumis à une extraction par partition liquide-liquide. L'extrait est ensuite soumis à l'analyse par chromatographie en phase inverse suivie d'une détection fluorimétrique. Le 5-méthyltetrahydrofolate est élué en 9 minutes. Différents paramètres de conformité et essais de validation ont été appliqués pour apprécier la fiabilité de la méthode proposée. Les résultats des calculs des paramètres de conformité sont satisfaisants et indiquent que le système chromatographique est adapté pour l'analyse du 5-méthyltetrahydrofolate dans le sang total. Les résultats des essais de précision étaient inférieurs à 2 % pour la répétabilité de l'analyse chromatographique et inférieurs à 5 % pour les essais de fidélité intermédiaire. Le pourcentage moyen de récupération était de 92,50 %. Les limites de détection et de quantification étaient respectivement égales à 8 et 10 nmol/l. La méthode proposée permet une détermination du 5-méthyltetrahydrofolate dans le sang total avec une fiabilité satisfaisante.

**5-méthyltetrahydrofolate – chromatographie liquide – sang total – paramètres de conformité – validation.**

## 1. Introduction

La vitamine B9 ou acide folique et ses dérivés appelés folates sont des composés essentiels au corps humain. Ils présentent non seulement un intérêt nutritionnel mais sont

<sup>a</sup> Département de chimie analytique, chimie minérale et générale, technologie alimentaire

Unité de formation et de recherche en sciences pharmaceutiques et biologiques

Université de Cocody

06 B.P. 2256 Abidjan 06 – Côte-d'Ivoire

\* Correspondance

mdake@aviso.ci

article reçu le 17 août, accepté le 29 septembre 2008.

© 2008 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

## SUMMARY

### Liquid chromatographic determination of 5-methyltetrahydrofolate in whole blood

Given the clinical importance of vitamin B9 and its role in many disorders, its determination and particularly of one of its predominant circulating form: 5-methyltetrahydrofolate is a necessity. The present study describes a liquid chromatography method that allows determination of 5-methyltetrahydrofolate in whole blood. Defrosted whole blood samples were deproteinized in an ascorbic acid solution at + 37°C, then submitted to a liquid-liquid partition extraction. The extract is then analyzed by reversed phase liquid chromatography followed by fluorimetric detection within 9 minutes. Different system suitability parameters and validation procedure tests were applied to evaluate the reliability of the proposed method. System suitability parameters were satisfactory for the intended application. Precision results for 5-methyltetrahydrofolate were better than 2 % for chromatographic analysis and better than 5 % for the entire procedure and interassay. Average recovery results was 92.50 %. Limits of detection and quantification were respectively 8 and 10 nmol/l. The proposed liquid chromatography method determines 5-methyltetrahydrofolate in whole blood with a satisfactory reliability.

**5-methyltetrahydrofolate – liquid chromatography – whole blood – system suitability tests – validation.**

également connus comme coenzyme dans la synthèse de substances essentielles telles que l'acide désoxyribonucléique (ADN) [1], d'où le rôle joué dans la croissance normale des cellules humaines. L'acide folique est également impliqué dans la conversion de l'homocystéine, ce qui explique ses effets positifs sur la réduction de l'apparition des maladies cardiovasculaires, la régulation de l'humeur, du sommeil et de l'appétit [2, 3, 4]. Une carence sévère en folates est à l'origine de nombreuses pathologies parmi lesquelles l'anémie mégaloblastique macrocytaire et les défauts du tube neural tels que le dysraphisme spinal encore appelé *Spina bifida* [5, 6, 7, 8].

De ce fait, la détermination de la vitamine B9 et plus particulièrement du 5-méthyltetrahydrofolate (5-MTHF) est une nécessité pour évaluer le statut en vitamine B9 des populations. La littérature rapporte plusieurs méthodes d'analyse telles que les méthodes immunologiques, spectrales et chromatographiques souvent couplées à la spectrométrie de masse [9, 10, 11, 12, 13, 14]. En Côte-d'Ivoire, une étude préliminaire réalisée en 2005 a proposé une méthode d'analyse du 5-MTHF par chromatographie liquide après une extraction sur phase solide [15]. Quoique sensible, cette méthode ne pouvait être appliquée en routine pour l'étude de grandes séries d'échantillons. À la suite de ces observations, nous proposons dans la présente étude une autre méthode d'analyse, fiable et plus facile à mettre en œuvre, par chromatographie liquide après partition liquide/liquide.

## 2. Méthodologie

### 2.1. Échantillons

Les échantillons de sang total ont été prélevés chez des sujets volontaires recrutés au Laboratoire de biologie de l'Institut national de Santé publique. Les échantillons ont été recueillis sur des tubes Vacutainer contenant de l'EDTA dipotassique (Becton Dickinson, New Jersey, États-Unis) puis conservés à -60 °C jusqu'au moment de l'analyse.

### 2.2. Appareillage

Balance de précision : Toledo PB 303-S.  
Bain d'eau à température réglable : Jouan.  
Centrifugeuse : Jouan E 82.  
Chromatographe liquide : Shimadzu équipé d'une pompe LC-6A munie d'une vanne d'injection type Rheodyne 7010 avec une boucle de 20 µl, un détecteur UV programmable Shimadzu (SPD-6A) et un enregistreur intégrateur Shimadzu Chromatopac CR-6A.

### 2.3. Réactifs

Tous les réactifs utilisés sont de qualité analytique : eau bidistillée, acide acétique glacial, acide ascorbique, hydrogénéphosphate de potassium, acide orthophosphorique, 2-mercaptoéthanol, méthanol pour chromatographie liquide.

Les solutions de travail ont été préparées de la manière suivante :

1. solution tampon d'hydrogénéphosphate de potassium pH = 7,1 (0,01M) contenant 57 mmol/l d'acide ascorbique (solution I) ;
2. solution tampon d'hydrogénéphosphate de potassium pH = 8,5 (0,2M) contenant 30 mmol/l de mercaptoéthanol (solution II) ;
3. solution aqueuse d'acide acétique à 0,6 % ;
4. solutions d'hydroxyde de sodium (0,2 N and 5 N).

Le produit de référence est de l'acide 5-méthyltetrahydrofolique (5-MTHF) (Sigma Aldrich, référence M O132). La solution mère de référence (400 µmol/l) est préparée en dissolvant 2 mg de 5-MTHF dans 10 ml de solution I. Les solutions diluées de 5-MTHF sont préparées après dilution extemporanée de la solution mère de référence à l'aide de la solution I.

### 2.4. Protocole opératoire

Il repose sur celui proposé antérieurement par Lu *et al.* [12]. Il comprend une étape d'extraction par partition liquide/liquide, suivie de l'analyse par chromatographie liquide en phase inverse.

#### 2.4.1. Extraction

Placer dans un tube à essai, 100 µl de sang total décongelé à température ambiante et 300 µl de solution d'acide ascorbique. Agiter pendant 30 secondes puis placer le tube dans un bain-marie à 37 °C ( $\pm$  1 °C) pendant 60 minutes. Ajouter 0,6 ml de solution II. Agiter le mélange puis le placer au bain-marie à 100 °C ( $\pm$  5 °C). Retirer le tube à essai, l'agiter à nouveau pendant 30 secondes et le centrifuger à 3500 tours par minutes pendant 15 minutes. Prélever 200 µl de surnageant, qui constituent l'extrait qui sera soumis à l'analyse chromatographique.

#### 2.4.2. Analyse chromatographique

Le développement de la méthode proposée est fondé sur les modifications de la phase mobile et différents essais ont été réalisés pour déterminer celle qui est la plus adaptée pour la détermination du 5-MTHF dans le sang total.

- Série d'essais n° 1 : méthode décrite par Lu *et al.* [12]
  - Phase stationnaire : C18 (150 X 4,6 mm, 5 µm).
  - Phase mobile : méthanol/acide ascorbique à 0,6 % (14:86, v/v).
  - Débit : 1 ml/min.
  - Détection fluorimétrique :  $\lambda_{exc}$  = 295 nm,  $\lambda_{em}$  = 360 nm.
- Nos essais concernent des modifications apportées à la phase mobile et au débit de manière à les optimiser. En revanche, la phase stationnaire et les conditions de détection fluorimétrique demeurent identiques à celles rapportées par Lu *et al.* [12].
- Série d'essais n° 2
  - Phase mobile : méthanol/acide ascorbique 0,6 % (25:75, v/v).
  - Débit : 1 ml/min.
- Série d'essais n° 3
  - Phase mobile : méthanol/acide ascorbique 0,6 % (20:80, v/v).
  - Débit : 1 ml/min.
- Série d'essais n° 4
  - Phase mobile : méthanol/acide ascorbique 0,6 % (20:80, v/v).
  - Débit : 1,2 ml/min.

#### 2.4.3. Paramètres de conformité du système et procédure de validation

Nous avons calculé les paramètres de conformité suivants : nombre de plateaux théoriques (N), asymétrie (As), facteur de capacité (k) et résolution (Rs), afin d'évaluer la qualité du système chromatographique retenu [16]. Différents essais de validation ont été réalisés pour évaluer la fiabilité de la méthode choisie [17, 18].

- La linéarité de la procédure pour des valeurs comprises entre 62,5 et 1 000 nmol/l a été déterminée.
- La précision a été estimée à différents niveaux :
  - la répétabilité de l'analyse chromatographique a été réalisée à trois niveaux de concentration différents de la solution de référence (125, 250 et 500 nmol/l) et d'un échantillon

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/7661675>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/7661675>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)