

Développement et optimisation d'une méthode de dosage par HPLC-UV de la vitamine D plasmatique et de ses métabolites

Development and optimization of an HPLC-UV method for the assay of plasma vitamin D and its metabolites

BELLEILI Mehdi^{1,2}, GOURI Adel³, DOUAOUI Abdelkader⁴, SOUDANI Wafa⁵, LAALAOUNA Abdeljalil⁶

¹ Laboratoire de chimie analytique, Faculté de médecine, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.

² Laboratoire de développement et de contrôle des préparations pharmaceutiques hospitalières, Faculté de médecine, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.

³ Service de Biochimie Clinique, Faculté de médecine, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.

⁴ Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de médecine, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.

⁵ Laboratoire de Chimie thérapeutique, Faculté de médecine, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.

⁶ Laboratoire de Chimie Analytique, Université Mentouri 3, Constantine, Algérie.

Auteur correspondant : GOURI Adel Email : adel.gouri@univ-annaba.dz

Reçu le 27 janvier 2025 / Accepté le 03 février 2026 / Publié le 28 février 2026

Résumé

Introduction : La vitamine D et ses métabolites sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Leur dosage précis est essentiel pour évaluer le statut vitaminique. Les méthodes immunologiques couramment employées présentent des limitations, notamment une variabilité inter-méthodes significative. **L'objectif de cette étude est de développer et optimiser une méthode de dosage par chromatographie liquide haute performance avec détection UV pour la quantification simultanée de la vitamine D₂, D₃, 25(OH)D₂ et 25(OH)D₃ dans le plasma humain.**

Méthodes : Une méthode HPLC-UV a été mise au point sur colonne C18, avec une phase mobile acétonitrile/méthanol/eau (700:250:50), un débit de 1 mL/min et une détection à 265 nm. La préparation des échantillons plasmatiques a combiné une déprotéinisation suivie d'une extraction en phase solide (SPE) sur cartouche C18.

Résultats : La méthode permet une séparation complète des quatre analytes en 11,01 min (débit de 1,0 mL/min) avec une bonne résolution des pics, notamment pour les paires critiques 25(OH)D₂/25(OH)D₃ (R_{S12} = 2,606) et vitamine D₂/vitamine D₃ (R_{S34} = 2,021). La reproductibilité était conforme aux critères préétablis, avec une précision intra-série < 5 % et inter-série < 10 % (sur 3 jours et 2 répétitions par point). Aucune interférence endogène notable n'a été observée aux temps de rétention des analytes.

Conclusion : Une méthode HPLC-UV simple, robuste et adaptée à un usage de routine a été développée pour le dosage de la vitamine D et de ses principaux métabolites plasmatiques. Une validation complète reste nécessaire avant son implantation en routine clinique.

Mots-clés : Vitamine D, HPLC-UV, dosage plasmatique, métabolites, extraction en phase solide.

Abstract

Introduction: Vitamin D and its metabolites are involved in numerous physiological and pathological processes. Their accurate measurement is essential for assessing vitamin status. Commonly used immunoassays present limitations, including significant inter-method variability.

The aim of this study is to develop and optimize a high-performance liquid chromatography method with UV detection for the simultaneous quantification of vitamin D₂, D₃, 25(OH)D₂, and 25(OH)D₃ in human plasma.

Methods: An HPLC-UV method was developed using a C18 column, a mobile phase of acetonitrile/methanol/water (700:250:50), a flow rate of 1 mL/min, and detection at 265 nm. Plasma sample preparation combined deproteinization followed by solid-phase extraction (SPE) on a C18 cartridge.

Results: The method achieved complete separation of the four analytes within 11.01 min (flow rate 1.0 mL/min) with good peak resolution, particularly for the critical pairs 25(OH)D₂/25(OH)D₃ (R_{S12} = 2.606) and vitamin D₂/vitamin D₃ (R_{S34} = 2.021). Reproducibility met the pre-established criteria, with intra-series precision < 5% and inter-series precision < 10% (over 3 days, 2 replicates per level). No notable endogenous interference was observed at the retention times of the analytes.

Conclusion: A simple, robust HPLC-UV method suitable for routine use was developed for the assay of vitamin D and its main plasma metabolites. Full validation is required before its implementation in clinical routine.

Keywords: Vitamin D, HPLC-UV, plasma assay, metabolites, solid-phase extraction.

Introduction

La vitamine D est une prohormone stéroïde liposoluble jouant un rôle essentiel dans de nombreux processus physiologiques, notamment la régulation du métabolisme phosphocalcique et la modulation de l'expression de centaines de gènes (plus de 800 gènes rapportés selon les synthèses récentes) (1). On distingue deux formes principales de vitamine D selon l'origine : la vitamine D₂ (ergocalciférol), d'origine végétale, et la vitamine D₃ (cholécalficérol), d'origine animale (2,3). Après leur synthèse ou apport, ces vitamines subissent deux hydroxylations en cascade pour devenir biologiquement actives : une première hydroxylation hépatique en 25-hydroxyvitamine D [25(OH)D], puis une seconde, principalement rénale, en 1,25-dihydroxyvitamine D [1,25(OH)₂D]. (2,3) La 1,25(OH)₂D étant présente à de très faibles concentrations circulantes et ayant une demi-vie courte, c'est la 25(OH)D, forme circulante majoritaire, plus stable et à demi-vie plus longue (2–3 semaines), qui est généralement mesurée pour évaluer le statut vitaminique D d'un individu. (2,3) Un statut adéquat en vitamine D est indispensable pour le maintien de la santé osseuse et fait l'objet d'un intérêt continu pour ses implications extra-osseuses potentielles ; inversement, une carence est associée au risque de rachitisme, d'ostéomalacie et d'ostéoporose (2,4).

Le dosage précis de la 25(OH)D revêt donc une importance clinique majeure pour diagnostiquer une insuffisance ou carence en vitamine D et pour guider une éventuelle supplémentation thérapeutique. (2,4) De nombreuses méthodes de mesure de la vitamine D ont été développées. Historiquement, les dosages immunologiques (RIA, ELISA, plateformes automatisées par chimiluminescence, etc.) ont été les plus utilisés en routine. Toutefois, ces immunodosages présentent des variations inter-méthodes et des limites de spécificité (notamment vis-à-vis de la 25(OH)D₂ et de certains isomères/épimères tels que la 3-epi-25(OH)D₃), susceptibles d'altérer la comparabilité des résultats. (3,6,7) Dans ce contexte, les efforts de standardisation internationale (VDSP/VDSCP) visent à améliorer l'exactitude et l'harmonisation des mesures de la 25(OH)D, en s'appuyant sur des procédures de référence (5,8).

Au cours des dernières décennies, les techniques séparatives par chromatographie ont pris une avance considérable. La chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) est largement considérée comme une méthode de référence compte tenu de sa spécificité, de sa capacité à quantifier séparément la 25(OH)D₂ et la 25(OH)D₃, et de sa moindre sensibilité aux interférences analytiques (3,6,8). Néanmoins, la mise en œuvre de la LC-MS/MS est coûteuse et techniquement exigeante, ce qui limite son accessibilité dans certains laboratoires (3,6). À l'inverse, la chromatographie liquide haute performance avec détection UV (HPLC-UV) constitue une alternative plus simple et moins onéreuse pour quantifier la vitamine D et ses métabolites, avec une sensibilité généralement inférieure à celle de la LC-MS/MS (6,9). Actuellement, on observe une transition progressive des immunodosages vers les méthodes chromatographiques dans de nombreux centres afin d'améliorer la fiabilité et la comparabilité des résultats (3,5,8).

L'objectif de cette étude est de développer et optimiser une méthode de dosage par chromatographie liquide haute performance avec détection UV (HPLC-UV) pour la quantification simultanée de la vitamine D₂, D₃, 25(OH)D₂ et 25(OH)D₃ dans le plasma humain.

Matériel et méthodes

Réactifs, standards et appareillage

Les standards analytiques certifiés de cholécalficérol (vitamine D₃, CAS 67-97-0) et d'ergocalciférol (vitamine D₂, CAS 50-14-6) (Sigma-Aldrich), ainsi qu'un calibrateur de 25-hydroxyvitamine D (mélange 25(OH)D₂+25(OH)D₃, 46,5 ng/mL ; Shenzhen New Industries Biomedical Engineering) ont été utilisés pour l'étalonnage. Le propionate de testostérone Ph. Eur. (CAS 57-85-2 ; Pharmacie Luc Allard, Belgique) a été employé comme standard interne. Les solutions mères ont été préparées dans le méthanol et stockées à –20 °C à l'abri de la lumière, puis diluées extemporanément selon les besoins expérimentaux.

Les solvants d'extraction et d'élution (méthanol, acétonitrile, propan-2-ol et éthanol absolu) étaient de grade HPLC (Sigma-Aldrich). Les réactifs de traitement de matrice incluaient le chlorure de magnésium hexahydraté (CAS 779-18-6 ; VWR), le tungstate de sodium dihydraté (CAS 13472-45-2 ; HETAKO) et l'acide trichloroacétique (CAS 76-03-9 ; VWR). L'eau utilisée pour la préparation des solutions et de la phase mobile était de qualité analytique (eau distillée). L'ensemble des manipulations a été conduit à température ambiante en limitant l'exposition à la lumière directe afin de prévenir la dégradation photo-induite de la vitamine D et de ses métabolites.

L'extraction en phase solide (SPE) a été réalisée sur des cartouches Chromabond® C18 ec (end-capped) (Macherey-Nagel ; 3 mL), constituées de silice greffée C18, caractérisées par une teneur en carbone de 14 %, une taille de pores de 60 Å, une taille de particules de 45 µm et une surface spécifique d'environ 500 m²/g.

L'analyse chromatographique a été réalisée sur un système HPLC équipé d'une pompe binaire, d'un auto-échantillonneur thermostatable et d'un four à colonne, avec une détection UV-Visible à barrette de diodes (DAD). La séparation a été effectuée sur une colonne C18 (250 × 4,6 mm ; 5 µm), en élution isocratique avec une phase mobile acétonitrile/méthanol/eau (70:25:5, v/v/v), à un débit de 1,0 mL/min, avec thermostatage de la colonne à 40 °C et des échantillons à 5 °C ; le volume d'injection était de 100 µL et la détection réalisée à 265 nm. Ce choix instrumental (phase C18, détection UV, gamme ng/mL, logique de validation) s'inscrit dans la continuité des approches HPLC-UV publiées pour la mesure de la 25(OH)D, notamment dans des travaux récents visant la standardisation et la validation d'un dosage HPLC-UV de la 25(OH)D₃ plasmatique (10).

Matrice biologique, échantillons et principes de préparation

Des plasmas humains issus de prélèvements héparinés ont été utilisés après consentement éclairé. La matrice de travail comprenait notamment du plasma frais congelé (PFC) provenant du Centre de Transfusion Sanguine (CTS) du CHU Ibn Rochd (Annaba, Algérie), utilisé pour la préparation des échantillons d'étalonnage et de validation (séries d'étalonnage et séries de validation). Les échantillons ont été manipulés à l'abri de la lumière du jour et, lorsque nécessaire, conservés à basse température afin de limiter toute dégradation des analytes lipophiles sensibles à l'UV. Trois protocoles de préparation des échantillons plasmatiques ont été évalués afin d'obtenir un extrait **clair, reproductible et compatible avec la détection UV**.

- **Déprotéinisation (précipitation des protéines) :** Étant donné que la majeure partie de la 25(OH)D circulante est liée à la protéine de liaison de la vitamine D (VDBP) et aux lipoprotéines, une étape de dissociation complète de ces protéines est indispensable pour mesurer la vitamine D avec exactitude. Nous avons adopté un protocole de déprotéinisation inspiré des travaux de Cooper et collègues (initialement développés pour la vitamine E). Concrètement, 500 µL de plasma ont été mélangés avec 100 µL d'une solution aqueuse contenant 0,4 mol/L de MgCl₂ et 0,3 mol/L de tungstate de sodium. Ce mélange ionique provoque la précipitation sélective des β-globulines, notamment de la VDBP, ainsi que des lipoprotéines de haute densité (VLDL). L'échantillon est vortexé pendant 30 secondes, puis 500 µL d'acide trichloroacétique (TCA 10 %) sont ajoutés pour précipiter l'ensemble des protéines. Après un nouveau mélange, l'échantillon est centrifugé à 14 000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant limpide obtenu, contenant la vitamine D libérée de ses protéines porteuses, est soigneusement recueilli. Ce surnageant peut être directement analysé par HPLC-UV ou faire l'objet d'étapes d'extraction complémentaires. Nous avons vérifié que cette étape de déprotéinisation assure une dissociation efficace de la 25(OH)D de la VDBP, minimisant ainsi les effets de matrice et maximisant le rendement d'extraction.
- **Extraction liquide-liquide (ELL) :** Pour tester l'efficacité d'une extraction organique classique, un aliquote du surnageant déprotéinisé a subi une ELL. Le surnageant (1,0 mL) a été extrait par ajout de 5 mL de cyclohexane, suivi d'un vigoureux mélange pendant 1 minute. Après décantation (centrifugation 5 min à 3000 g), la phase organique (cyclohexane) a été recueillie puis évaporée à sec sous un flux d'azote tiède. Le résidu a été repris dans 200 µL de phase mobile et injecté en HPLC. Ce protocole ELL est

volontairement simple (un seul solvant non polaire) et sert de comparaison avec la stratégie d'extraction en phase solide décrite ci-dessous.

- **Extraction en phase solide (SPE) sur phase C18** : Sur la base de la revue bibliographique, la combinaison précipitation protéique + SPE a été identifiée comme une approche prometteuse pour purifier les échantillons de vitamine D. Nous avons donc développé une SPE en phase inverse C18 pour traiter le surnageant déprotéinisé. Les cartouches C18 ont été conditionnées successivement avec 2 mL de Méthanol puis 2 mL d'eau ultrapure (débit 2 gouttes/s). Ensuite, 1 mL de surnageant issu de la déprotéinisation a été déposé sur la cartouche (débit contrôlé 1 goutte/2 s). La cartouche a été ensuite lavée avec 2 mL d'eau ultrapure, puis 2 mL d'un mélange Méthanol/Eau (70:30, v/v) pour éliminer les composés polaires résiduels. L'élution des analytes de vitamine D retenus sur la phase C18 a été réalisée en ajoutant 1 mL de Méthanol pur (débit 1 goutte/s). L'éluat méthanolique contenant la vitamine D₂, la D₃ et leurs métabolites 25(OH)D a été évaporé à sec sous azote, puis repris dans 200 µL de phase mobile avant injection en HPLC. Ce protocole SPE permet d'obtenir un extrait concentré et purifié, en éliminant la majorité des interférents hydrophiles. Il offre ainsi une meilleure qualité chromatographique qu'une simple déprotéinisation.

Étalonnage

L'étalonnage a été réalisé sur une gamme de 5 à 100 ng/mL, en comparant une calibration en solvant pur (MeOH) et une calibration en milieu matriciel (plasma appauvri en 25(OH)D, issu d'un patient carencé), afin d'explorer un éventuel effet matrice sur la réponse UV et/ou sur l'extraction. Les échantillons patients et les contrôles ont été traités selon le schéma sélectionné (déprotéinisation puis extraction, en pratique prioritairement SPE) avant injection.

Validation analytique

La méthode développée a été soumise à une validation analytique préliminaire conformément aux recommandations internationales en vigueur en bioanalyse (EMA, ICH, FDA), en évaluant les paramètres essentiels de performance tels que la linéarité, la sensibilité (limite de détection [LOD] et limite de quantification [LOQ]), la précision (intra- et inter-série), l'exactitude (biais), le rendement d'extraction, la spécificité vis-à-vis des interférences endogènes et la stabilité des extraits.

Les résultats obtenus ont mis en évidence une excellente linéarité pour l'ensemble des analytes étudiés ; 25(OH)D₂, 25(OH)D₃, vitamine D₂ et vitamine D₃ ; avec un coefficient de corrélation r^2 supérieur à 0,99 sur une plage de concentrations allant de 5 à 100 ng/mL. Les limites de détection étaient de 2 ng/mL pour les formes hydroxylées et de 1,5 ng/mL pour les formes natives, tandis que les LOQ étaient respectivement de 5 ng/mL et 4 ng/mL. La précision intra-série (CV) était inférieure à 5 %, et la précision inter-série restait inférieure à 10 % pour tous les composés. Le biais, indicateur d'exactitude, variait entre -5 % et +8 % pour les formes hydroxylées, et entre -6 % et +7,25 % pour les formes natives.

La spécificité a été démontrée par l'absence d'interférences endogènes observées aux temps de rétention des analytes cibles. Le rendement d'extraction moyen pour les métabolites 25(OH)D₂ et 25(OH)D₃ était de 85 %. Par ailleurs, les formes natives D₂ et D₃ présentaient un rendement optimal lorsqu'elles étaient extraites par une méthode en phase solide, atteignant respectivement 100,96 % et 101,35 %, traduisant une récupération quasi-quantitative.

La stabilité des extraits a été également vérifiée dans différentes conditions. Les extraits secs se sont révélés stables pendant 48 heures lorsqu'ils étaient conservés à +4 °C. Une fois reconstitués dans la phase mobile, les extraits contenant les métabolites hydroxylés conservaient une stabilité analytique durant 8 heures à température ambiante, tandis que les extraits de vitamines D₂ et D₃ restaient stables pendant au moins 5 heures, sans perte significative de signal (< 5 %). (**Tableau1**)

Résultats

Différentes configurations chromatographiques ont été explorées afin d'aboutir aux conditions optimales requises pour le dosage simultané de la vitamine D₂, de la vitamine D₃, de la 25(OH)D₂ et de la 25(OH)D₃ par

HPLC-UV. Plusieurs colonnes C18 disponibles au laboratoire (Kromasil®, Symmetry® et Pinnacle DB®) ont été évaluées ; la colonne Pinnacle DB® C18 a été retenue, car la meilleure séparation entre la 25(OH)D₂ et la 25(OH)D₃, deux métabolites structurellement très proches, y a été observée. Des phases mobiles en gradient (variation de la fraction aqueuse de 5 % à 20 % au cours de l'élution) ont également été testées, sans amélioration significative par rapport à une élution isocratique faiblement aqueuse. Le mélange ternaire ACN/MeOH/eau à teneur élevée en solvants organiques (75 % au total) a été sélectionné, car un compromis satisfaisant entre temps de rétention et résolution a été obtenu.

La séparation chromatographique a été jugée satisfaisante, avec des résolutions (R_s) globalement supérieures ou égales à 1,9 pour les deux paires critiques (25(OH)D₂/25(OH)D₃ et vitamine D₂/vitamine D₃). L'optimum du plan d'expérience a donné $R_{s12} = 2,296$ et $R_{s34} = 1,961$ ($t_a = 10,42$ min). Expérimentalement, un débit de 1,2 mL/min a permis de réduire le temps d'analyse ($t_a = 9,10$ min) avec des R_s comparables, tandis qu'un débit de 1,0 mL/min a fourni les meilleures résolutions ($R_{s12} = 2,606$; $R_{s34} = 2,021$, $t_a = 11,01$ min). Cette dernière condition a donc été retenue pour la suite des analyses.

Sous les conditions retenues, des temps de rétention d'environ 3,5 min pour la vitamine D₃, 3,6 min pour la vitamine D₂, 5,2 min pour la 25(OH)D₃ et 5,5 min pour la 25(OH)D₂ ont été observés, pour une durée totale d'analyse de 10 minutes. Une élution distincte des formes 25-hydroxylées D₂ vs D₃ a ainsi été constatée, en cohérence avec leurs différences de polarité. Les profils chromatographiques obtenus aux différentes étapes du développement sont présentés dans les **Figures 1 à 4**.

Un chromatogramme de référence a d'abord été obtenu à partir d'un mélange standard des quatre analytes préparés dans le méthanol (100 ng/mL chacun). Des pics bien résolus aux temps de rétention attendus ont été observés, sans interférences détectables à 265 nm (**Figure 1**). Ces résultats ont confirmé l'adéquation des paramètres chromatographiques retenus pour la séparation simultanée des analytes cibles.

Après fixation des conditions chromatographiques, l'applicabilité de la méthode en matrice biologique a été évaluée sur des plasmas appauvris en 25(OH)D, enrichis par des quantités connues de vitamines D₂/D₃ et de 25(OH)D₂/D₃, puis traités selon le protocole de préparation. Après déprotéinisation seule, des pics nets correspondant aux analytes ajoutés ont été observés, avec un rapport signal/bruit satisfaisant et sans interférence majeure au voisinage des temps de rétention (**Figure 2**). La superposition qualitative des profils obtenus en matrice plasmatique avec ceux observés en solution simple (Figure 1) a suggéré une bonne compatibilité de la méthode avec le plasma, au moins dans les conditions d'enrichissement testées.

La déprotéinisation a ensuite été comparée à une extraction liquide-liquide (ELL) au cyclohexane appliqué au surnageant déprotéinisé. Un profil chromatographique globalement similaire à celui observé après déprotéinisation seule a été retrouvé, sans amélioration nette de la ligne de base ni du rapport signal/bruit (**Figure 3**). L'ELL n'a donc pas été considérée comme apportant un bénéfice analytique déterminant dans ces conditions, tout en introduisant des contraintes pratiques supplémentaires (étape manuelle, évaporation d'un solvant inflammable) et un rendement global légèrement inférieur (=75 %, selon les mesures internes). Le recours à l'ELL a ainsi été limité aux comparaisons méthodologiques.

Enfin, l'extraction en phase solide (SPE) sur cartouche C18, appliquée au surnageant obtenu après déprotéinisation, a montré un bénéfice visible sur la qualité analytique. Une ligne de base plus stable et des pics plus symétriques ont été observés, traduisant une élimination additionnelle de composés endogènes résiduels. Une amélioration d'environ un facteur 2 du rapport signal/bruit a été notée par rapport à la déprotéinisation seule (**Figure 4 vs Figure 2**), associée à une réduction du bruit de fond. En conséquence, le protocole combiné déprotéinisation + SPE a été retenu comme procédure finale pour la suite de la validation, afin de maximiser la robustesse du dosage en présence de matrices potentiellement complexes.

Discussion

La méthode chromatographique HPLC-UV développée dans notre étude a permis d'obtenir une séparation chromatographique optimale des formes vitaminiques ciblées. L'optimisation systématique de la phase mobile

et de la colonne chromatographique (C18 de 5 μ m, 250 mm) a conduit à une résolution distincte de chaque analyte (vitamine D₂, D₃, 25(OH)D₂ et 25(OH)D₃), caractérisée par des temps de rétention bien différenciés. Cette capacité à quantifier simultanément les formes D₂ et D₃ constitue un avantage significatif par rapport aux méthodes conventionnelles (15,16). L'utilisation d'un détecteur UV à longueur d'onde spécifique (265 nm) permet d'optimiser la réponse analytique des vitamines D tout en minimisant le bruit de fond instrumental (15,17). L'évaluation globale de la résolution chromatographique démontre une performance satisfaisante pour un dosage analytique sélectif, avec des pics symétriques bien résolus et des lignes de base stables. Des approches chromatographiques innovantes, notamment l'utilisation de la chromatographie en phase inverse non aqueuse (NARP-HPLC), ont également été décrites pour améliorer la sélectivité lors de l'analyse des vitamines liposolubles, y compris la vitamine D, selon les matrices (18).

En termes de sensibilité analytique, la méthode présente une excellente linéarité ($R^2 > 0,998$) sur l'ensemble de la plage de concentration étudiée. Les limites pratiques de détection (LOD) et de quantification (LOQ) rapportées pour des approches HPLC-UV récentes se situent classiquement dans l'ordre de quelques ng/mL, compatibles avec les besoins de routine pour la 25(OH)D dans de nombreux contextes (15,17). Toutefois, la sensibilité reste inférieure à celle des méthodes LC-MS/MS de référence, en particulier lorsqu'elles sont optimisées (préparation d'échantillon, dérivation, micro-/narrow-bore LC), qui permettent d'atteindre des seuils de quantification plus bas et une meilleure capacité de discrimination de composés proches (19,20). Cette différence illustre la limitation intrinsèque de la détection UV pour la quantification des traces, notamment en présence d'analogues/épimères tels que la 3-epi-25(OH)D₃, dont l'impact sur la performance est documenté dans les évaluations inter-laboratoires (19,21). Des stratégies de miniaturisation et d'optimisation LC-MS/MS (micro-LC, étapes de piégeage « trapping ») ont été proposées pour abaisser les limites analytiques et améliorer le rendement global (22,23).

La reproductibilité intrajournalière et inter-journalière a été évaluée selon les référentiels usuels de validation, avec des coefficients de variation (CV) généralement inférieurs à 6–7% pour les analytes, et des taux de récupération dans la fourchette attendue pour un dosage en biologie médicale (15,17). Ces performances sont cohérentes avec les spécifications analytiques et les exigences de standardisation promues par le Vitamin D Standardization Program (VDSP), qui met l'accent sur la maîtrise de l'imprécision et du biais (21,24). Par ailleurs, l'évaluation externe de la qualité via des dispositifs dédiés, en particulier DEQAS, est aujourd'hui considérée comme un levier majeur pour objectiver la fiabilité des dosages et comparer les méthodes à des cibles d'exactitude attribuées (25–27).

La spécificité analytique a été confirmée par l'absence d'interférences notables dans les matrices plasmatiques. La chromatographie liquide fournit une identification spécifique à chaque composé, ce qui constitue un avantage méthodologique par rapport à certains immunodosages, susceptibles de variations de réponse en présence de 25(OH)D₂ ou d'autres métabolites, phénomène bien documenté dans les études de standardisation et d'évaluation de performance (16,21,28). L'importance clinique de cette distinction est particulièrement pertinente dans les populations supplémentées en vitamine D₂, où des écarts de recouvrement peuvent contribuer à des biais de classification du statut vitaminique (21,28).

L'évaluation de la robustesse a montré que de faibles variations des paramètres chromatographiques (température de colonne, débit) modifient peu les temps de rétention, sans altération significative du signal quantitatif global, ce qui est attendu pour une méthode destinée à la routine (15,17). Des optimisations instrumentales (p. ex. colonnes à particules plus fines, systèmes UHPLC) peuvent améliorer la résolution tout en réduisant les temps d'analyse, sous réserve de validation (23,29).

Comparativement à la LC-MS/MS, considérée comme méthode de référence pour la 25(OH)D, l'HPLC-UV présente des compromis caractéristiques. La LC-MS/MS offre une spécificité et une capacité de séparation supérieures (incluant la prise en compte de l'empreinte des épimères), mais requiert un investissement instrumental et une expertise plus élevée (19–21,30). À l'inverse, l'HPLC-UV sans dérivation représente

une alternative plus accessible, fondée sur des équipements fréquemment disponibles en milieu hospitalier et des coûts opérationnels relativement plus faibles (15,16). Les progrès récents vers des plateformes LC-MS/MS plus automatisées et standardisables tendent toutefois à réduire certaines barrières d'implémentation (31,32). Les performances analytiques obtenues s'inscrivent dans la fourchette des méthodes HPLC-UV publiées, tandis que les méthodes LC-MS/MS et les approches intégrant des profils métaboliques étendus (24,25(OH)₂D et autres métabolites) représentent l'état de l'art pour une caractérisation plus fine du statut vitaminique D (19,33,34).

Plusieurs limites techniques méritent d'être soulignées. L'absence d'étalon interne robuste peut exposer la méthode à des variations pré-analytiques (extraction, injection). D'autres limitations incluent la sensibilité réduite pour des concentrations très basses et l'impossibilité d'explorer certains métabolites minoritaires sans stratégie analytique dédiée (15,16,33). Des améliorations potentielles incluent l'automatisation de l'extraction (SPE), la migration vers l'UHPLC, ou l'adoption d'approches LC-MS/MS lorsque la question clinique/épidémiologique l'exige (22,31,32).

Sur le plan clinique, cette méthode présente des avantages pratiques : coût d'implémentation réduit, accessibilité matérielle, consommables standards, et adéquation au débit d'un laboratoire clinique, tout en conservant l'intérêt de distinguer D₂ et D₃ dans certains scénarios de supplémentation (15,16,21). Il est toutefois admis que l'interprétation des concentrations de 25(OH)D dépend aussi des recommandations, des populations et de la standardisation des mesures, points soulignés dans des travaux méthodologiques et des positions récentes (35,36).

La standardisation et l'harmonisation inter-laboratoires demeurent des enjeux majeurs. Le VDSP et les schémas d'EQA (DEQAS) ont construit un cadre opérationnel reposant sur des procédures de référence et sur l'attribution de valeurs cibles d'exactitude, afin d'améliorer la comparabilité inter-méthodes et inter-laboratoires (21,25–27,37). Les évaluations sur matériaux de référence (p. ex. SRM) et la commutabilité constituent des points clés pour sécuriser l'étalonnage et l'interprétation des résultats (30,38,39). En pratique, l'alignement sur ces cadres de standardisation est déterminant pour produire des données cliniques et épidémiologiques cohérentes (21,36).

Cette étude présente certaines limites. Elle a principalement évalué la performance analytique de la méthode HPLC-UV et ne permet pas encore de documenter de façon complète certaines performances d'intérêt clinique. En particulier, la concordance de classification autour des seuils décisionnels cliniques (carence/insuffisance/suffisance). Une étape complémentaire est donc nécessaire, incluant des analyses d'accord et de classification (Bland–Altman, Passing–Bablok, concordance clinique), afin d'étendre la validation vers l'usage clinique.

Conclusion : La méthode HPLC-UV optimisée démontre une pertinence indéniable en biologie médicale. Elle combine des performances analytiques acceptables (linéarité, précision, spécificité) avec une mise en œuvre économique et opérationnellement simple. Bien que sa sensibilité soit inférieure à celle de la LC-MS/MS, elle constitue une alternative pragmatique pour des laboratoires à ressources limitées, sous réserve d'une validation rigoureuse et d'une participation active aux programmes d'assurance qualité externes, ainsi que d'un alignement sur les référentiels de standardisation.

Remerciements

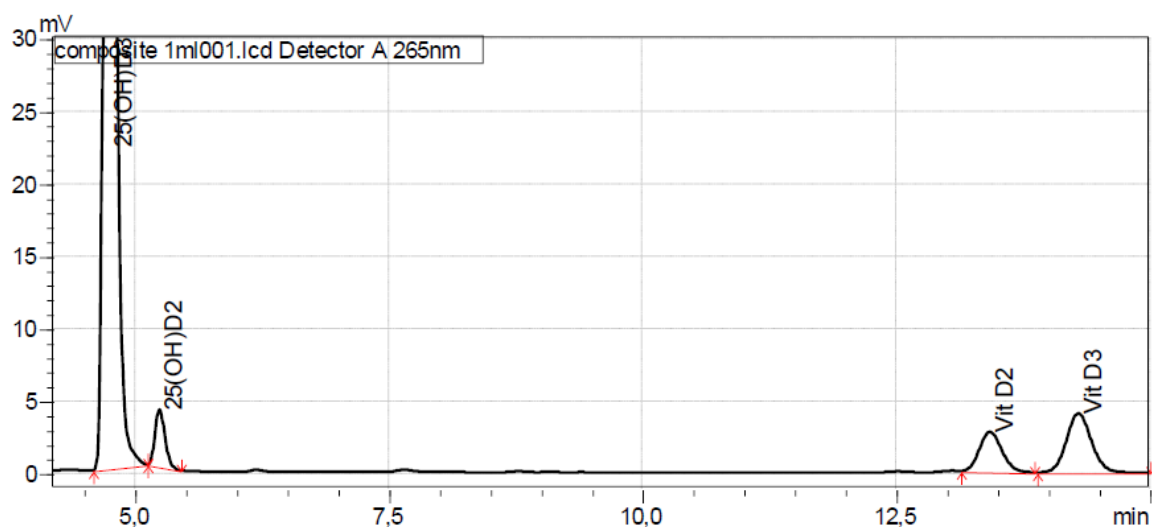
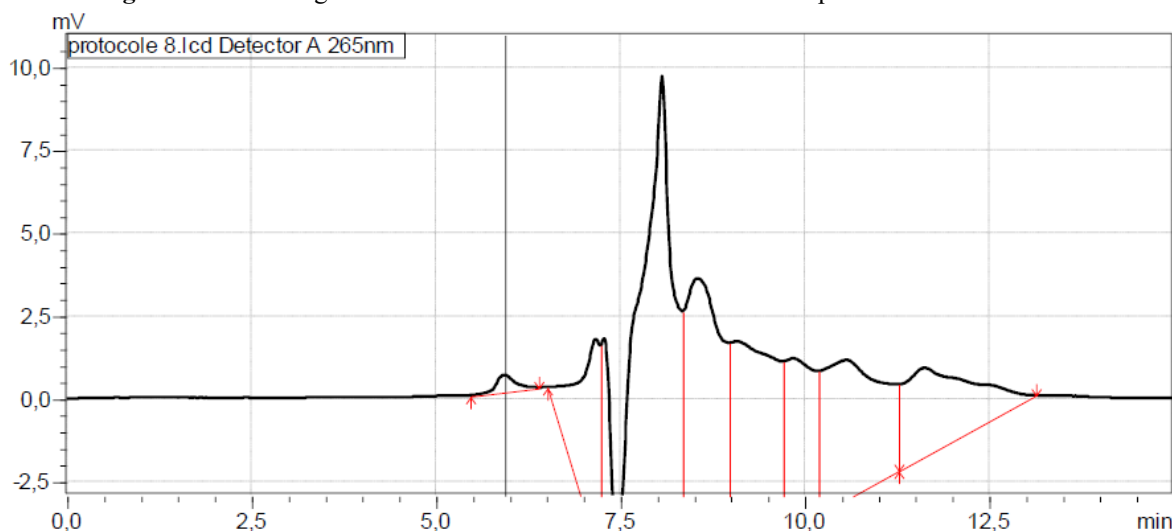
Aucun

Déclaration d'intérêts

Aucun

Tableau 1. Paramètres de validation analytique de la méthode de dosage de la vitamine D et de ses métabolites

	25(OH)D ₂	25(OH)D ₃	Vitamine D ₂	Vitamine D ₃
Spécificité	(+)	(+)	(+)	(+)
r²	> 0,99	> 0,99	> 0,99	> 0,99
LOD	2 ng/ml	2 ng/ml	1,5 ng/ml	1,5 ng/ml
LOQ	5 ng/ml	5 ng/ml	4 ng/ml	4 ng/ml
Nombre de séries	3 jours	3 jours	3 jours	3 jours
Nombre de répétition/point	2	2	2	2
Précision inter -série	< 10%	< 10%	< 10%	< 10%
Précision intra -série	< 5%	< 5%	< 5%	< 5%
Biais (exactitude)	[-5 - +8]	[-5 - +8]	[-6 - +7,25]	[-6 - +7,25]
Rendement d'extraction	85%	85%	100,96%	101,35%
Stabilité des extraits secs	48H	48H	48H	48H
Stabilité des extraits reconstitués	8H	8H	5H	5H

**Figure 1.** Chromatogramme de la vitamine D et de ses métabolites par la méthode HPLC-UV.**Figure 2.** Chromatogramme de l'extrait après déprotéinisation.

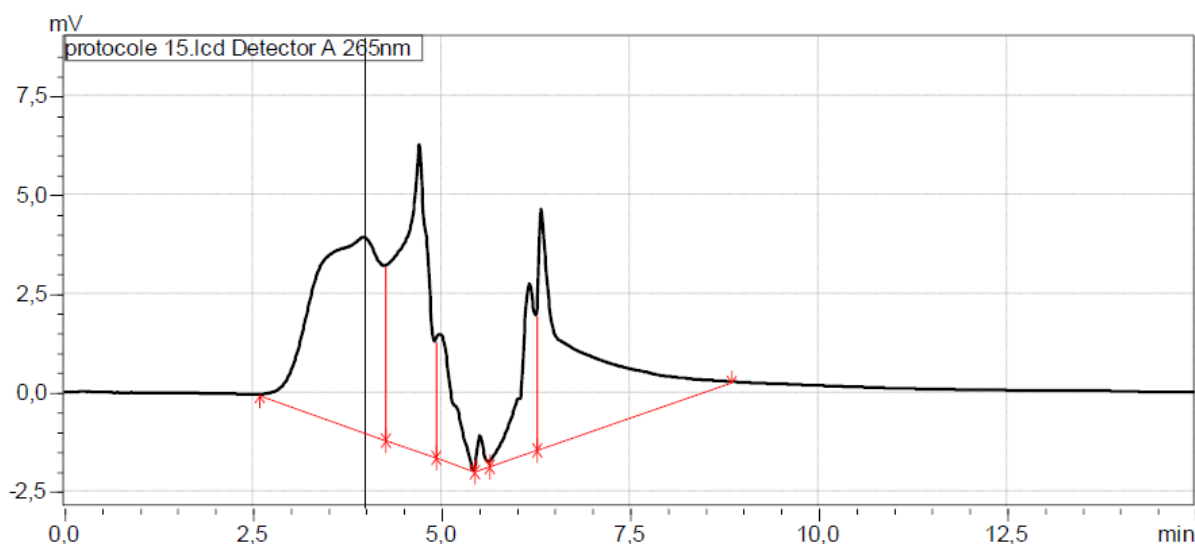


Figure 3. Chromatogramme de l'extrait cyclohexanique.

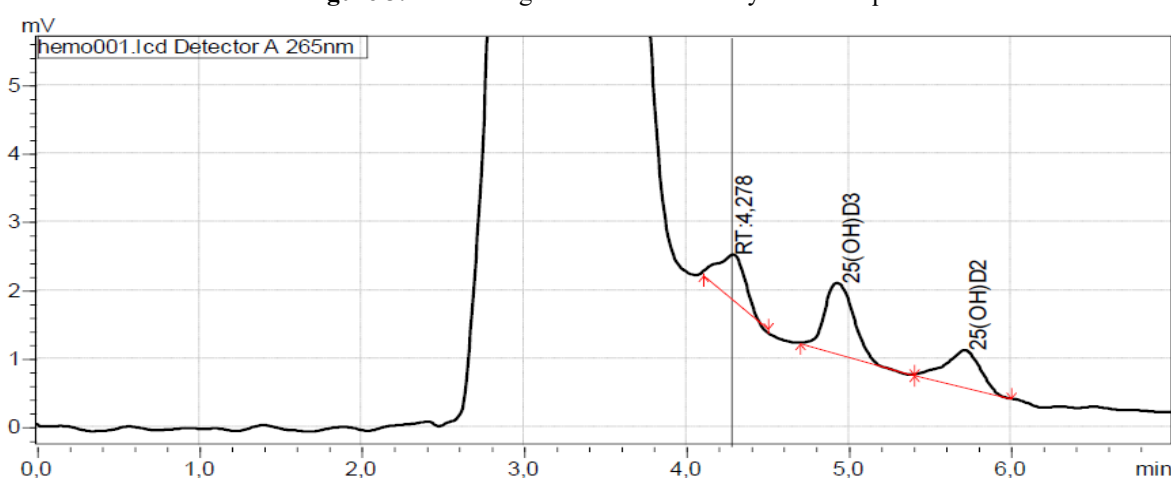


Figure 4. Chromatogramme de l'extrait obtenu par SPE.

Références

1. Voltan G, Cannito M, Ferrarese M, Ceccato F, Camozzi V. Vitamin D: An overview of gene regulation, ranging from metabolism to genomic effects. **Genes (Basel)**. 2023;14(9):1691. doi:10.3390/genes14091691.
2. Giustina A, Bilezikian JP, Adler RA, *et al.* Consensus statement on vitamin D status assessment and supplementation: whys, whens, and hows. **Endocr Rev**. 2024;45(5):625-654. doi:10.1210/endrev/bnae009.
3. Dirks NF, Cavalier E, Heijboer AC. Vitamin D: marker, measurand and measurement. **Endocr Connect**. 2023;12(4):e220269. doi:10.1530/EC-22-0269.
4. Demay MB, Pittas AG, Bikle DD, *et al.* Vitamin D for the prevention of disease: an Endocrine Society clinical practice guideline. **J Clin Endocrinol Metab**. 2024;109(8):1907-1947. doi:10.1210/clinem/dgae290.
5. Sempos CT, Binkley N. 25-hydroxyvitamin D assay standardisation and vitamin D guidelines paralysis. **Public Health Nutr**. 2020;23(7):1153-1164. doi:10.1017/S1368980019004604.
6. Tripathi A, Ansari MS, Dandekar P, Jain R. Analytical methods for 25-hydroxyvitamin D: advantages and limitations of the existing assays. **J Nutr Biochem**. 2022;109:109123. doi:10.1016/j.jnutbio.2022.109123.
7. Lee JH, Seo JD, Lee K, *et al.* Multicenter comparison of analytical interferences of 25-OH vitamin D immunoassay and mass spectrometry methods by endogenous interferents and cross-reactivity with 3-epi-25-OH-vitamin D3. **Pract Lab Med**. 2023;38:e00347. doi:10.1016/j.plabm.2023.e00347.
8. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vitamin D Standardization-Certification Program (VDSCP): vitamin D reference laboratory (reference measurement procedures) [Internet]. Atlanta (GA): CDC; 2024 Apr 24 [cited 2026 Feb 13].
9. Demtschuk M, Heinz P. Systematic review of HPLC methods using UV detection for quantification of vitamin E in human plasma. **LabMed**. 2026;3(1):4. doi:10.3390/labmed3010004.
10. Tijerina A, Garza A, López A, Cavazos N, Romo A, Heya MS, *et al.* An HPLC-UV method to assess human plasma 25(OH)D3. **Nutrients**. 2024;16(14):2304. doi:10.3390/nu16142304.

11. International Council for Harmonisation (ICH). **ICH Harmonised Guideline M10: Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis**. Step 4; 2022 May 24.
12. European Medicines Agency. **Guideline on bioanalytical method validation**. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev.1 Corr.2. London: EMA; 2011 (rev 2015).
13. U.S. Food and Drug Administration. **Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry**. Silver Spring (MD): FDA; 2018 May.
14. U.S. Food and Drug Administration. **M10 Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis: Guidance for Industry**. Silver Spring (MD): FDA; 2022 Nov.
15. Hymøller L, Jensen SK. Vitamin D analysis in plasma by high performance liquid chromatography (HPLC) with C(30) reversed phase column and UV detection—easy and acetonitrile-free. **J Chromatogr A**. 2011;1218(14):1835-1841. doi:10.1016/j.chroma.2011.02.004.
16. Gallelli L. Vitamin D measurement: comparison of analytical methods (including chromatography) and clinical implications. **J Clin Med**. 2019;8(6):895. doi:10.3390/jcm8060895.
17. Temova-Rakuša Ž, *et al*. A precise, accurate and rapid HPLC-UV method for simultaneous determination of fat-soluble vitamins including vitamin D3; validated according to ICH-type criteria. **Acta Chim Slov**. 2017;64(3):523-529. doi:10.17344/acs.2016.2856.
18. Varfaj I, Mancinelli AC, Migni A, Mercolini L, Castellini C, Galli F, *et al*. A cost-effective nonaqueous reversed-phase high-performance liquid chromatography method to measure vitamin D3 in hen's egg yolk. **J Sep Sci**. 2025;48(1):e70087. doi:10.1002/jssc.202401496.
19. Wise SA, *et al*. VDSP Intercomparison Study 2 (Part 1): LC-MS/MS assays and impact of 3-epi-25(OH)D3 on performance. **Anal Bioanal Chem**. 2022;414(1):333-349. doi:10.1007/s00216-021-03576-1.
20. Sempos CT, *et al*. Assessment of serum total 25(OH)D assays for DEQAS materials distributed at ambient vs frozen conditions. **Anal Bioanal Chem**. 2022;414(2):1015-1028. doi:10.1007/s00216-021-03630-y.
21. Wise SA, Camara JE, Sempos CT, *et al*. Vitamin D Standardization Program (VDSP) intralaboratory study for the assessment of 25-hydroxyvitamin D assay variability and bias. **J Steroid Biochem Mol Biol**. 2021;212:105917. doi:10.1016/j.jsbmb.2021.105917.
22. Qu F, Zhang M, Weinstock-Guttman B, Zivadinov R, Qu J, Zhu X, Ramanathan M. An ultra-sensitive and high-throughput trapping-micro-LC-MS method for quantification of circulating vitamin D metabolites and application in multiple sclerosis patients. **Sci Rep**. 2024;14(1):5545. doi:10.1038/s41598-024-55939-0.
23. Temwani K, *et al*. Advances in miniaturized liquid chromatography for the detection of organic pollutants in food, environmental, and biological samples. **Separations**. 2025;12(11):242. doi:10.3390/separations12110242.
24. Carter GD, Berry JL, Gunter E, *et al*. Proficiency testing of 25-hydroxyvitamin D (25-OHD) assays. **J Steroid Biochem Mol Biol**. 2010;121(1-2):176-179. doi:10.1016/j.jsbmb.2010.03.033.
25. Burdette CQ, Camara JE, Nalin F, *et al*. Establishing an accuracy basis for DEQAS using NIST ID-LC-MS/MS targets. **J AOAC Int**. 2017;100(5):1277-1287. doi:10.5740/jaoacint.17-0306.
26. Briggs L, Whitewood J, Williams EL, *et al*. Analytical variation concerning total 25-hydroxyvitamin D measurement, where are we now? A DEQAS review of current assay performance. **J Steroid Biochem Mol Biol**. 2023;231:106328. doi:10.1016/j.jsbmb.2023.106328.
27. Garnett E, *et al*. Ability of immunoassays to detect and quantify 25(OH)D2 and implications for total 25(OH)D reporting. **Pract Lab Med**. 2019;17:e00130. doi:10.1016/j.plabm.2019.e00130.
28. Cavalier E, Fraser CG, Bhattoa HP, Heijboer AC, *et al*. Analytical performance specifications for the measurement uncertainty of 24,25-dihydroxyvitamin D examinations. **Clin Chem Lab Med**. 2023;61(9):1561-1566. doi:10.1515/cclm-2023-0176.
29. Wise SA, *et al*. Commutability assessment of new standard reference materials across immunoassays and LC-MS/MS for 25(OH)D. **Anal Bioanal Chem**. 2025;417:2539-2561. doi:10.1007/s00216-025-05361-6.
30. Junger S, Hoene M, Shipkova M, Danzl G, Schöberl C, Peter A, *et al*. Automated LC-MS/MS: ready for the clinical routine laboratory? **J Mass Spectrom Adv Clin Lab**. 2023;30:1-9. doi:10.1016/j.jmsacl.2023.07.001.
31. Benton SC, Tetteh GK, Needham SJ, Makin HLJ, Sitch AJ, Roberts NB. Evaluation of the 25-hydroxy vitamin D assay on a fully automated liquid chromatography mass spectrometry system, the Thermo Scientific Cascadion SM Clinical Analyzer with the Cascadion 25-hydroxy vitamin D assay in a routine clinical laboratory. **Clin Biochem**. 2020;83:77-82. doi:10.1016/j.clinbiochem.2020.06.008.
32. Schorr P, Stokes CS, Volmer DA, *et al*. Streamlined vitamin D metabolite fingerprinting analysis using isotope-coded multiplexing MS with cost-effective one-pot double derivatization. **ACS Omega**. 2024;9(51):50660-50670. doi:10.1021/acsomega.4c08675.
33. Binkley N, Dawson-Hughes B, Durazo-Arvizu R, *et al*. Vitamin D measurement standardization: the way out of the chaos. **J Steroid Biochem Mol Biol**. 2017;173:117-121. doi:10.1016/j.jsbmb.2016.12.002.

34. Giustina A, Adler RA, Binkley N, Bollerslev J, Bouillon R, Dawson-Hughes B, *et al.* Controversies in vitamin D: a statement from the 2nd International Conference on Controversies in Vitamin D. **Rev Endocr Metab Disord.** 2020;21(1):89-116. doi:10.1007/s11154-019-09532-w.
35. Sempos CT, Binkley N. 25-hydroxyvitamin D assay standardisation and vitamin D guidelines paralysis. **Public Health Nutr.** 2020;23(7):1153-1164. doi:10.1017/S1368980019004604.
36. Dabre R, *et al.* Simultaneous separation and analysis of water- and fat-soluble vitamins on multi-modal reversed-phase weak anion exchange material by HPLC-UV. **J Sep Sci.** 2011;34(7):761-772. doi:10.1002/jssc.201000793.
37. Carter GD. Accuracy of 25-hydroxyvitamin D assays: confronting the issues. **Curr Drug Targets.** 2011;12(1):19-28. doi:10.2174/138945011793591608.
38. Camara JE, Wise SA, Hoofnagle AN, Williams EL, *et al.* Assessment of serum total 25-hydroxyvitamin D assay commutability of Standard Reference Materials and College of American Pathologists Accuracy-Based Vitamin D (ABVD) Scheme and Vitamin D External Quality Assessment Scheme (DEQAS) materials: Vitamin D Standardization Program (VDSP) Commutability Study 2. **Anal Bioanal Chem.** 2021;413(20):5067-5084. doi:10.1007/s00216-021-03470-w.
39. Carter GD, Jones JC, Berry JL. The anomalous behaviour of exogenous 25-hydroxyvitamin D in competitive binding assays. **J Steroid Biochem Mol Biol.** 2007;103(3-5):480-482. doi:10.1016/j.jsbmb.2006.11.007.