

Bijlage

Commentaar bij een afwijkende vitamine D uitslag.

<50 nmol/l: Vitamine D beneden de streefwaarde. Advies suppletie, bijv. Devaron dd. 800 IE gedurende 6-8 wk, daarna controle vitamine D.

<10 nmol/l: Vitamine D sterk verlaagd, ernstig vitamine-gebrek. Suppletie is geïndiceerd, overweeg verwijzing interne geneeskunde.

Referenties

1. Pearce SH, Cheetham TD. Diagnosis and management of vitamin D deficiency. *BMJ*. 2010; 340: b5664.
2. Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest*. 2006; 116: 1-11.
3. Garland CF, French CB, Baggerly LL, Heaney RP. Vitamin D supplement doses and serum 25-hydroxyvitamin D in the range associated with cancer prevention. *Anticancer Res*. 2011; 31: 607-611.
4. Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr*. 2006; 84: 18-28.
5. Gezondheidsraad. Naar een toereikende inname van vitamine D. Den Haag: Gezondheidsraad, 2008; publicatienr. 2008/15. ISBN: 978-90-5549-729-4, pdf verkrijgbaar via: <http://www.gr.nl/pdf.php?ID=1752>.
6. Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, Del Valle HB. Dietary reference intakes for Calcium and vitamin D. 2011. ISBN: 978-0-309-16394-1.
7. Van Geldrop WJ, Lucassen PLBJ, Smithuis LOMJ. Een probleemgeoriënteerd aanvraagformulier voor laboratoriumonderzoek. Effecten op het aanvraaggedrag van huisartsen. *Huisarts Wet*. 1992; 35: 192-196.
8. Zitterman A. Vitamine D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? *Br J Nutrition* 2003; 89: 552-572.
9. GGD Zuid-Limburg. Een gezonde kijk op Limburg. Regionale Volksgezondheid Toekomst Verkenning 2010. ISBN: 978-90-8157-04-1-1.
10. Jansen EHJM, Ujcic-Voortman JK, Uitenbroek DG. Vitamine D status van de bevolking van Amsterdam. Bilthoven: RIVM; 2007.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2011; 36: 260-262

Methylmalonzuurmeting in serum en urine met behulp van LC-tandem massaspectrometrie

J.M.W. van den OUWELAND, A.M. BEIJERS en H.W. van DAAL

Diagnostiek naar de vitamine B12 status geschiedt doorgaans door meting van de totale hoeveelheid B12 in bloed. Van de totale hoeveelheid circulerend B12 in bloed is slechts een kleine fractie (6-20%) aan transcobalamine gebonden en beschikbaar voor synthesereacties op celniveau (actief B12). Voor het overige deel is het aan haptocorrine gebonden en wordt het gebruikt voor transport en opslag (inactief B12). Dit gegeven maakt dat de meting van totaal vitamine B12 (referentie-interval 150-700 pmol/l) de nodige sensitiviteit en specificiteit mist. Zo kan de totale vitamine B12 concentratie normaal zijn (>150 pmol/l) terwijl het actief B12 te laag is. Omgekeerd kan het totale vitamine B12 verlaagd blijken ten gevolge van een lagere B12 verzadiging aan het haptocorrine, zonder dat er sprake is van een functioneel tekort.

Klinisch Chemisch Laboratorium, Canisius Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen

E-mail: j.v.d.ouweland@cwz.nl

Afkortingen: MMA, methylmalonzuur; LC-MS/MS: vloeistof chromatografie-tandem massa spectrometrie; AcN: acetonitrile; MeOH: methanol; AP-EI: Atmospheric Pressure Electro-spray Ionisation; IS: internal standard.

In de vorm van adenosylcobalamine is vitamine B12 een cofactor bij de omzetting van L-methylmalonyl-CoA naar succinyl-CoA door het methylmalonyl-CoA-mutase. Methylmalonzuur (MMA) wordt beschouwd als de meest gevoelige en specifieke marker voor de vitamine B12 status op cellulair niveau (1-3). Een verhoogde MMA in serum duidt op een functionele vitamine B12 deficiëntie. Bij patiënten met een duidelijk verminderde nierfunctie valt een bepaling MMA in urine te overwegen (4-6). Hierbij wordt de MMA concentratie uitgedrukt per mmol kreatinine om verdunningseffecten van de urine te corrigeren. MMA concentraties in serum zijn een honderdvoud lager dan die in urine en vereisen een gevoelige meetmethode. Veelal wordt een derivatisering toegepast (met bepaling van het n-butyl ester derivaat) om de benodigde gevoeligheid te verkrijgen (4-6), al zijn er recent methoden beschreven die zonder derivatisering voldoende gevoeligheid halen (7, 8). Het voordeel van een MMA bepaling in serum is dat deze uit dezelfde serumbuis kan worden nabepaald die voor de meting van vitamine B12 is gebruikt. We beschrijven hier een vloeistof chromatografie-tandem massa spectrometrie (LC-MS/MS) methode voor de bepaling van on-gederivatiseerd MMA in serum en urine.

Materiaal en Methoden

Monsterbereiding

Aan 100 µl patiëntenserum of urine wordt 50 µl van een interne standaard (IS, 30 µmol/l methyl-D3-malonzuur, Sigma) en 1 ml van een acetonitril-methanol mengsel (AcN/MeOH 80/20 v/v) toegevoegd. Na mengen en afdraaien (7 min, 16.000 g, 4 °C) wordt het supernatant in glazen buizen overgegoten en hierna onder stikstof drooggedampt bij 50 °C. Vervolgens wordt het residu opgelost in 300 µl bidemi met mierzuur (3%) en in vials overgebracht.

LC-MS/MS systeem

Chromatografische scheiding vindt plaats met een Acquity HSS-T3 kolom (1,8 µm, 2,1 mm x 100 mm; Waters Milford, MA, USA) op een ACQUITY UPLC systeem (Waters). Mobiele fases A and B bestaan respectievelijk uit bidemi met 1% (v/v) mierzuur en MeOH met 0,3% (v/v) mierzuur. Gradiënt bestaat uit initieel 2% B met tussen 0 en 3,0 min een lineaire toename tot 90% B. Van 3,7 tot 5 min wederom 2% B. Injectie volume is 20 µl, flow rate is 0,2 ml/min. Kwantificering is op basis van selectieve reactie monitoring op een Waters Quattro Premier tandem massa spectrometer met transities (m/z) 116,97→73,0 voor MMA en 119,95→76,10 voor de IS. Voor data acquisitie wordt Masslynx v4.1 software (Waters) gebruikt.

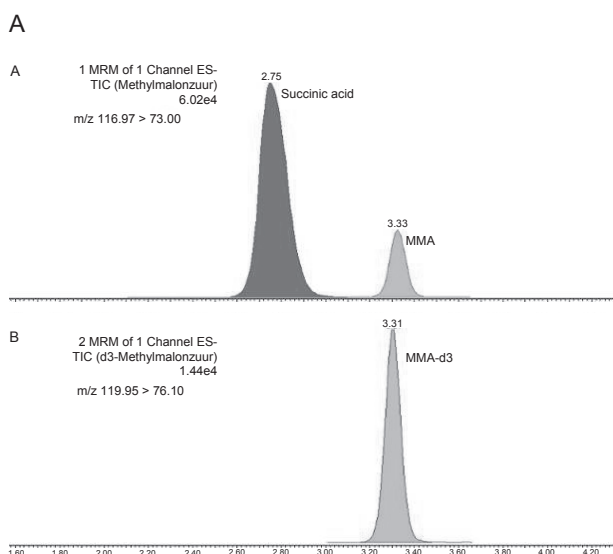
Methode validatie

Voor berekening van de binnen de serie en de totale variatie werd gebruikt gemaakt van het CSLI EP-10 protocol, gebruikmakend van een drietal serumpools met concentraties 0,177, 0,680 en 1,192 µmol/l. De juistheid van de bepaling werd onderzocht door het meten in duplo van een drietal commerciële serum calibratoren met concentraties 0,21, 0,80 en 1,46 µmol/l (Recipe). Voor de vaststelling van de analyte recovery werden aan 10 urinemonsters (basale MMA waarden

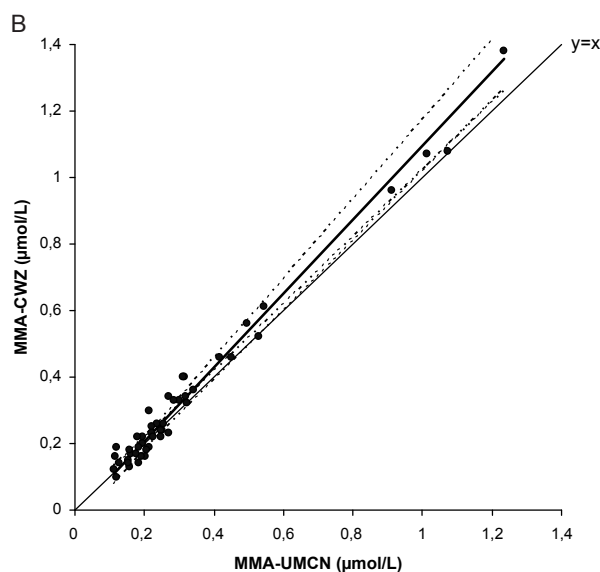
4,37-20,93 µmol/l) twee verschillende concentraties MMA (1,84 en 9,22 µmol/l) toegevoegd. De detectielimiet (LOD) en functionele sensitiviteit (LOQ) werden gebaseerd op een signaal/ruis verhouding van respectievelijk 3 en 10. Lineariteit is onderzocht door een verdunningsreeks te maken van een hoog (1,78 µmol/l) en laag (0,19 µmol/l) patiëntenserum. De LC-MS/MS methode is vergeleken met een andere LC-MS/MS assay (UMCN) (7) in 48 serummonsters. Een beperkt aantal urinemonsters (n=5) zijn ter vergelijking op een HPLC methode (AML, Antwerpen, België) bepaald. MMA referentiewaarden in urine zijn met non-parametrische analyse bepaald in 104 willekeurige urinemonsters. Voor referentiewaarden in serum, zie (9). Onderzoek is gedaan naar de houdbaarheid van serum (n=3) en urine (n=2) monsters over een periode van vier dagen bij kamertemperatuur (RT) en 4 °C.

Resultaten en discussie

MMA is met een retentietijd (Rt) van 3,3 min volledig gescheiden van het isobare succinylzuur (Rt 2,7 min) bij een totale runtijd van 5 min (figuur 1A). Reproduceerbaarheid is goed met intra- and interassay variaties <6% over een range van 0,17-1,19 µmol/l. LOD en LOQ zijn respectievelijk 0,03 en 0,10 µmol/l en zijn vergelijkbaar met andere LC-MS/MS methoden met (4) en zonder additionele derivatisering (7, 8). Analyte recoveries variëren van 86 tot 115% (gem. 95%) en vallen binnen de 80-120% norm. De serum MMA bepaling is lineair tussen 0,19 en 1,78 µmol/l ($y=0,018x - 0,003$; $r^2=0,999$ lineaire regressie analyse) op basis van het verdunningsexperiment. Uit de recovery studies blijkt de bepaling lineair tot tenminste 30 µmol/L. Omdat MMA referentiemateriaal ontbreekt is voor de juistheid gebruik gemaakt van een vergelijk met een andere LC-MS/MS methode en zijn commerciële serum calibratoren als patiëntenmonster gemeten. Beide LC-MS/MS methoden komen goed met elkaar overeen in een vergelijk van patiëntensera



Figuur 1A. LC-MS/MS chromatogram voor MMA. A) patiënt serum B) MMA-d3 standaard. De retentietijd van MMA en MMA-d3 (lichtgrijs) is 3,3 min en van isomeer succinylzuur (donkergrijs) is 2,7 min.



Figuur 1B. Methode vergelijk MMA in serum (n=48) met Passing & Bablok regressie analyse. X-as: LC-MS/MS methode UMCN; Y-as: LC-MS/MS methode CWZ.

(Passing en Bablok (P&B) regressie: slope 1,11 (95% betrouwbaarheidsinterval (CI): 1,05-1,19), intercept – 0,01 (95%CI: -0,04-0,00); $r=0,992$; $n=48$) (figuur 1B). Het verschil in MMA referentiewaarden (0,34 $\mu\text{mol/l}$ CWZ (9) versus 0,32 $\mu\text{mol/l}$ UMCN) is in lijn met het 10% verschil tussen beide methoden. Meting in drievoud van de serum calibratoren gaf recoveries van 89% (0,21 $\mu\text{mol/l}$), 99% (0,80 $\mu\text{mol/l}$) en 107% (1,46 $\mu\text{mol/l}$). Resultaten van het methodevergelijk tussen de LC-MS/MS en de HPLC methode in een beperkt aantal urinemonsters ($n=5$) laten zien dat de LC-MS/MS lagere waarden geeft (P&B regressie: slope 0,79, intercept –3,11; $r=0,993$; $n=5$). Referentiewaarden (2,5-97,5 percentiel) voor urine MMA zijn 0,5-3,3 mmol/mol kreatinine en deze komen goed overeen met bevindingen uit de literatuur (6, 10). Serum en urinemonsters zijn ten minste vier dagen houdbaar bij zowel RT als 4 °C en maken gekoelde of ingevroren verzending onnodig.

Conclusie

We hebben een snelle, accurate, gevoelige en robuuste LC-MS/MS methode ontwikkeld voor MMA meting in serum en urine. MMA kan eenvoudig worden nabepaald uit sera dat reeds gebruikt is voor de meting van vitamine B12. Ons laboratorium is dan ook doende de MMA bepaling als standaard reflexmeting in te voeren bij onderzoek naar vitamine B12 deficiëntie.

Referenties

1. Snow CF. Laboratory diagnosis of vitamin B12 and folate deficiency – a guide for the primary care physician. *Arch Intern Med.* 1999; 159: 1289-1298.
2. Savage DG, Lindebaum J, Stabler SP, Allen RH. Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. *Am J Med.* 1994; 96: 239-246.
3. Wiersinga WJ, de Rooij SEJA, Huijmans JGM, Fischer JC, Hoekstra JBL. De diagnostiek van vitamine-B12-deficiëntie herzien. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2005; 149: 2789-2794.
4. Kushnir MM, Komaromy-Hiller G, Shushan B, Urry FM, Roberts WL. Analysis of dicarboxylic acids by tandem mass spectrometry. High through-put quantitative measurement of methylmalonic acid in serum, plasma and urine. *Clin Chem.* 2001; 47: 1993-2002.
5. Magera MJ, Helgeson JK, Matern D, Rinaldo P. Methylmalonic acid measured in plasma and urine by stable-isotope dilution and electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2000; 46: 1804-1810.
6. Kirchhoff F, Lorenzl S, Vogeser M. An on-line solid phase extraction procedure for the routine quantification of urinary methylmalonic acid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med.* 2010; 48: 1647-1650.
7. Blom HJ, van Rooij A, Hogeveen M. A simple high-throughput method for the determination of plasma methylmalonic acid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med.* 2007; 45: 646-650.
8. Hempen C, Wanschers H, van der Sluis Veer G. A fast liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of total homocysteine and methylmalonic acid. *Anal Bioanal Chem.* 2008; 391: 263-270.
9. van den Ouweland JM, Beijers AM, van Daal HW. Diagnostische opbrengst van standaard reflexmeting op serum methylmalonzuur voor het vaststellen van een functioneel vitamine B12 tekort. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk.* 2011; 36: 263-264.
10. Roberts WL, McMillin GA, Burtis CA, Bruns DE. Reference information for the clinical laboratory. In *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 4th Ed 2006; p2286.