

Christoph Seger<sup>1</sup>

# Vitamin D mit Massenspektrometrie – ein notwendiger Mehraufwand?

**Die Analyse von 25-OH Vitamin D mit der LC-MS/MS-Technik stellt im Vergleich zu automatisierten Ligandenbindungs-Assays einen erheblichen technologischen Mehraufwand an das klinische Labor. Die Vorteile dieser Technologie überwiegen aber ihre Nachteile; speziell in Zentren der tertiären Versorgung ist ihr Einsatz in der Routine oder zumindest die Bereithaltung für die zeitnahe Überprüfung von Ligandenbindungsassay-Ergebnissen unerlässlich.**

Seit jeher ist die Laboratoriumsmedizin durch den Wunsch nach Innovation geprägt. Mögliche neue diagnostische Marker sind ebenso Handlungsziel wie neueste technologische Entwicklungen, welche eine verbesserte Analytik und damit einen vielschichtigen Mehrwert für Labor und Zuweiser versprechen. In diesem Sinne stellt die moderne Analytik von Vitamin-D-Metaboliten – allen voran 25-Hydroxy-Vitamin-D (25OHD) – ein hervorragendes Fallbeispiel im medizinischen Labor dar, welches in den nächsten Absätzen beleuchtet werden soll [1]. Im Zentrum der Betrachtung wird die Rolle der Massenspektrometrie stehen – eine Technologie, welche sich in den vergangenen zwei Jahrzehnten in diesem Umfeld gut etabliert hat [2].

In den letzten Jahren hat eine grosse Zahl von retrospektiven Datenauswertungen den Anschein erweckt, als ob das Absinken des 25OHD Plasma-Spiegels weit unter den Referenzbereich (Vitamin-D-Mangel) [3] nicht nur mit einer Vielzahl von Erkrankungen (z.B. aus dem Kreis der kardiovaskulären Erkrankungen, der Autoimmun-Erkrankungen, des Diabetes, diverse Krebs-Erkrankungen) assoziiert sei, sondern diese auch kausal bedinge. Es ist ein Kreis von Behauptungen, deren Verifikation in der Fachwelt bis dato umstritten bleibt und in diversen Meta-Analysen nicht oder nur unzureichend bestätigt werden konnte [4–11]. Einzig die Rolle von 25OHD als Marker für die Knochengesundheit ist ausreichend verifiziert [12]. Der oftmals genutzte Begriff 25OHD steht dabei für drei Analyten: 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (25OHD<sub>3</sub>, Derivat des Cholecalciferols), 25-Hyd-

roxy-Vitamin-D<sub>2</sub> (25OHD<sub>2</sub>, Derivat des Ergosterols) und 3-epi-25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (3-epi-25OHD<sub>3</sub>), einem Cholecalciferol-Derivat des frühkindlichen Lebens. Alle drei Metabolite stellen für die Analytik von «Gesamt-25OHD» Herausforderungen und Limitationen dar. Im Zusammenhang mit der Knochengesundheit darf auf keinen Fall unerwähnt bleiben, dass grosse Teile der Bevölkerung in den gemässigten Breiten die avisierten Zielspiegel (75–100 nmol/l für die optimale Knochengesundheit bzw. 50 nmol/l für die Prävention von Osteomalazie/Rachitis [13–15]) selbst im Sommer nicht erreicht [16–18].

In dieser Situation – weiterführende Studien sind dringend erforderlich, um die oben genannten Behauptungen einer Verifikation zu unterziehen – ist es unabdingbar, möglichst richtige und genaue Messeinrichtungen zur Verfügung zu halten.

## Messplattformen

Auf Grund der oben genannten Assoziationsstudien ist es in den vergangenen Jahren zu einem erheblichen Anstieg des 25OHD-Auftragsvolumens gekommen; Steigerungsraten von mehreren hundert Prozent in relativ kurzen Zeitspannen waren zu beobachten. Es ist nicht verwunderlich, dass diese veränderte Auftragslage die IVD-Industrie vor ungewöhnliche Probleme gestellt hat. Einerseits mussten in kurzer Zeit neue Liganden-Bindungs-Assays (LBAs) etabliert werden, andererseits hat der unerwartet hohe Reagenzienverbrauch zu ungewohnt raschem Turnover von Antikörper-Chargen geführt. Mittlerweile sind fast nur noch automatisierte LBA-Testsysteme in Verwendung; als Bindungspartner für 25OHD dient entweder ein Antikörper oder das Vitamin-D-Binding-Protein

(VDPB). Parallel zu dieser Entwicklung kam es im Bereich der chromatographischen Analytik (HPLC) zu einer Intensivierung der Bemühungen, valide HPLC-MS/MS (HPLC-Tandem-Massenspektrometrie Kopplung) Messplattformen zu etablieren. Dies hat zu einer regen Publikationstätigkeit geführt, eine Vielzahl von individuellen, nur lokal definierten Messplattformen, wurde etabliert [19]. Nach einigen Jahren kam es in der Folge zur Etablierung von IVD-CE-zertifizierten HPLC-MS/MS Assays.

## Vor- und Nachteile der Ligandenbindungsassays

Die Automatisierbarkeit von LBAs inklusive der Möglichkeit aus Primärröhrchen arbeiten zu können, macht diese scheinbar unverzichtbar für Hochdurchsatz-Routine-Laboratorien. Ringversuchs-Ergebnisse (z.B. DEQAS Ringversuch [www.deqas.org](http://www.deqas.org)) und Herstellerangaben zeigen, dass die Präzision derartiger Assays gut ist. Die Unrichtigkeit der Messungen zu Zielwerten (Methoden-Bias) hingegen ist in Hinsicht auf die Zielvorgaben für den – aus der biologischen Variabilität ableitbaren gewünschten Gesamtfehler – der Messung mitunter problematisch [20].

LBAs weisen eine Reihe von generellen Nachteilen auf, die es in ihrer Anwendung zu beachten gilt. Während bei extraktiven Verfahren die 25OHD-Freisetzung aus der Proteinbindung durch eine Fällungsreaktion bewerkstelligt wird (z.B. «Extraktions-EIA») [21], muss in automatisierten 25OHD-Assays diese Freisetzung *in situ* durch Verdrängungsreaktionen bewerkstelligt werden. Es konnte gezeigt werden, dass dieser analytische Ansatz bei Patienten-Subpopulationen mit veränderten Bindeprotein-Spiegeln (z.B. bei eingeschränkter Nierenfunktion) oder bei unterschiedli-

<sup>1</sup> Priv. Doz. Dr. rer. nat. Christoph Seger, Zentralinstitut für med. u. chem. Labordiagnostik, Universitätskliniken Landeskrankenhaus Innsbruck

cher Bindungsstärke zu falsch niedrigen 25OHD-Spiegeln führen kann [22,23]. Für die longitudinale Stabilität von Ligandenbindungssays konnte im Rahmen der NHANES-Studie bereits vor mehreren Jahren gezeigt werden, dass inkonsistente Antikörper-Chargen zu Unrichtigkeiten führen können, die die biologische Variabilität überdecken können [24]. Das dritte zentrale Problem der Ligandenbindungssays ist Möglichkeit der «Kreuzreaktivität», d.h. der diagnostische Antikörper reagiert nicht nur mit dem Ziel-Analyten, sondern auch mit anderen Stoffen, z.B. Abbauprodukten des Analyten. Es kommt daher – von der individuellen Verstoffwechslung abhängig – zu möglicherweise überhöhten Ergebnissen [25]. Eine besondere Stellung nimmt hier 24,25-Di-OH-Vitamin D<sub>3</sub> ein, da dieser Katabolit in der Regel quantitativ (d.h. Kreuzreaktivität 100% oder höher!) miterfasst wird [26,27]. Eine weitere Besonderheit von LBAs stellt da generelle Unvermögen dar, zwischen 25OHD<sub>3</sub> und 25OHD<sub>2</sub> zu unterscheiden, d.h. üblicherweise wird seitens der Hersteller angegeben, dass Gesamt-25OHD bestimmt wird. Dies ist nur eingeschränkt richtig, da Studien mit Nativ-Proben klar gezeigt haben, dass LBAs teilweise einen von 100% deutlich nach unten abweichenden Anteil von 25OHD<sub>2</sub> der Quantifikation zuführen können [28,29].

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass bei LBAs diese unterschiedlichsten Fehlertypen zu mitunter gravierenden Ergebnisabweichungen zur HPLC-MS/MS führen [30–32], welche – trotz ihrer eigenen methodischen Limitationen – gerne als analytischer Goldstandard in diesem Arbeitsgebiet angesehen wird.

### Vor- und Nachteile der HPLC-MS/MS

Da Protein-Fällungen in der HPLC-MS/MS die Standard-Probenvorbereitung darstellen, ist oben genannte Abhängigkeit von Bindeprotein-Konzentrationen nicht zu befürchten. Auch kann es zu keiner Inkonsistenz biologischer Reagenzien (z.B. Antikörper) kommen; daher scheiden diese Fehlerquellen aus. Dies bedeutet aber nicht, dass LC-MS- und LC-UV-basierte 25OHD-Assays ohne weiteres richtig messen [33]. Ganz im Gegenteil, die Massenspektrometrie kennt eine Reihe von groben Fehler-

möglichkeiten, die nur durch adäquates Methoden-Design und stringente Überwachung in der Routine vermieden werden können [34]. In erster Linie ist hier der «Matrix-Effekt» zu nennen, ein hoch dynamischer Prozess im Rahmen der Analyt-Ionisierung. Residuale Matrixbestandteile die mit den Zielanalyten gleichzeitig die HPLC verlassen, können im Interface zur MS/MS, der «Ionen-Quelle» zur Signal-Unterdrückung oder (seltener) -Verstärkung führen. Kann dieser Effekt nicht durch die Mitführung geeigneter interner Standards (üblicherweise stabil-isotopen markierte Analyten) ausgeglichen werden, kann es zu grob falschen Ergebnissen kommen. Die zweite Limitation der MS/MS-Detektion liegt in der intrinsischen Unmöglichkeit, gleich schwere (isobare) Moleküle in der MS/MS zu trennen. Wird im Rahmen der Methodenentwicklung das mögliche Auftreten eines isobaren Moleküls nicht berücksichtigt oder zu spät entdeckt, kommt es zur Spiegelüberschätzung.

Während in der 25OHD-Analytik Matrixeffekte in der Routine bei gut validierten Testsystemen nur noch in Ausnahmefällen auftreten sollten, sind isobare Interferenzen ubiquitär. Kann das im frühkindlichen Organismus auftretende 3-epi-25OHD<sub>3</sub> nicht in der HPLC von 25OHD<sub>3</sub> abgetrennt werden, führt dies in diesem Kollektiv zu einer mitunter gravierenden Spiegelüberschätzung [35,36], deren Bedeutung aber bei Erwachsenen und Kindern ab dem 3. Lebensjahr nicht gegeben ist [37].

Ein weiteres Problem stellt die Heterogenität der im Feld befindlichen HPLC-MS/MS Installationen und das damit verbundene potentielle Problem mangelnder Assay-Vergleichbarkeit im Ringversuch und in der Routine dar. Ein entscheidender Schritt weg von dieser unbefriedigenden Situation war die Erkenntnis, dass ein beachtlicher Fehleranteil in der Verwendung selbst hergestellter und nicht auf Referenzmaterialien rückzuführender Kalibratoren geschuldet war [38]. Konsequenterweise wurde daher in den letzten Jahren durch das NIH (National Institute of Health, USA) eine Initiative zur Etablierung von Referenzmethoden, Referenzmaterialien und Referenzlaboratorien gegründet (Vitamin D Standardization Program, VDSP) [39,40], das zur Etablierung der oben genannten analy-

## La détermination du taux de vitamine D avec la spectrométrie de masse – une dépense supplémentaire justifiée?

Par rapport aux analyses automatisées des liaisons de ligands, l'analyse de la vitamine D 25 (OH) au moyen de la technique de la LC-MS/MS impose, en matière d'équipement technologique, une dépense supplémentaire importante au laboratoire clinique. Pourtant, les avantages de cette technologie dépassent ses inconvénients et leur intégration dans le quotidien des centres de soins tertiaires, en particulier, est indispensable. L'analytique moderne des métabolites de la vitamine D – surtout de 25-hydroxyvitamine-D (25 OH-D) – en apporte une excellente illustration pour le laboratoire médical. La spectrométrie de masse, une technologie qui s'est bien implantée dans ce domaine au cours des deux dernières décennies, occupe un rôle central. Les connaissances acquises en matière de conception de méthodes, d'analyse des sources d'erreurs et de traçabilité analytique servent de modèle pour l'établissement futur d'une analytique fiable en endocrinologie. S'agissant de 25 OH-D, il faut s'attendre à ce que se manifestent de plus en plus de preuves de l'échec des analyses des liaisons de ligands dans la détermination individuelle du taux de vitamine D.

tischen Instrumente geführt hat. Mittlerweile sind daher 25OHD-Messungen in der klinischen Routine als rückführbar (traceable) im Sinne metrologischen Denkens zu bezeichnen [41].

### Ausblick

Die lange und intensive Beschäftigung der Klinischen Chemie mit der 25OHD-Analytik ist ein Meilenstein im Verständnis für die Rolle der HPLC-MS/MS in der endokrinologischen Forschung und Routine. Die erarbeiteten Erkenntnisse in Methodendesign, Fehlerquellenanalyse und analytischer Rückführbarkeit sind beispielgebend für die zukünftige Etablierung zuverlässiger endokrinologischer Analytik; sie gehen weit über den Wunsch, 25OHD-Spiegel korrekt zu erfassen, hinaus. Bei 25OHD darf erwartet werden, dass immer mehr Evidenz für das Versagen von LBAs bei der individuellen Beurteilung der Vitamin-D-Versorgung zu Tage treten wird. Die HPLC-MS/MS wird – die notwendige Automatisierung vorausgesetzt, immer mehr in die Routinemessung von 25OHD vordringen und LBAs verdrängen.

Korrespondenz:  
Christoph.Seger@uki.at & seger\_lab@gmx.at

### Referenzen

Sie finden die vollständigen Referenzen online unter: [www.sulm.ch/d/pipette](http://www.sulm.ch/d/pipette) → Aktuelle Ausgabe (Nr. 3-2015).