

25-OH-Vitamin D Hormon için Tandem Kütle Spektrometrede Yöntem Geçerli Kılma Çalışması ve Bu Yöntemin Farklı Yöntemlerle Karşılaştırılması

[Method validation of tandem mass spectrometry for 25-Hydroxyvitamin D₃ and comparison of this method with other methods]

Birsen Sahillioğlu¹
Muhittin A. Serdar²,
Neslihan Erkal³,
Gönül Erden¹,
Fatih Bakır¹,
Mustafa Metin Yıldırımkaaya¹,
Serhat Işık¹,
Ufuk Özügüz¹

¹Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara, Türkiye

²Gülhane Askeri Tıp Fakültesi, Ankara, Türkiye

³Zekai Tahir Burak Kadın Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara, Türkiye

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Birsen Sahillioğlu

Tıbbi Biyokimya Uzmanı
Bitlis Tatvan Devlet Hastanesi
Tel: 0 505 873 96 02/ 0 434 827 63 23
Faks: 0 434 827 76 99
drbirsenzo@yahoo.com

Kayıt Tarihi : 28 Mayıs 2010 ; Kabul Tarihi : 12 Ekim 2010

[Registered : 28 May 2010 ; Accepted : 12 October 2010]

ÖZET

Amaç: 25-hidroksivitamin D₃'ün ölçülmesi vitamin D durumunun belirlenmesinde klinik bir belirleyici olarak kabul edilmiştir. 25-OH-vitamin D'nin klinik olarak doğru ölçülmesi çok büyük önem arz etmektedir. Bunun için bir standardizasyon gerekmektedir ve tandem kütle spektrometre (LC-MS/MS) yöntemi haricindeki yöntemler sadece toplam D vitamini miktarını verirler ve daha az hassastırlar. LC-MS/MS vitamin D değerlerini ölçmek için altın standart bir yöntemdir. Bu çalışmada buradan yola çıkılarak LC-MS/MS cihazında yeni bir yöntem geliştirilmiş, geçerli kılınmış ve bu yöntem HPLC, RIA, Kemiluminesans yöntemleriyle karşılaştırılmıştır.

Gereç ve yöntemler: D₃'ün rutin tesbitinde kararlı-izotop-işaretili internal standard (IS) ile beraber isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spektrometre (ID-LC-MS/MS) kullanılmıştır. Buradan elde edilen değerler HPLC, RIA ve kemiluminesans yöntemleriyle karşılaştırılmıştır.

Bulgular: 25-hidroksivitamin D₃ için 6.5, 24 ve 43 ng/mL derişimlerinde gün içi CV (Belirsizlik katsayısı) sırasıyla 5.3%, 5.5% ve 5.6% olarak bulunmuştur. 25-hidroksivitamin D₃ için mevcut yöntemin deteksiyon limiti <3,75 ng/mL olarak tesbit edildi. Yöntemin total çalışma zamanı 4 dakikadır. Yöntem karşılaştırması çalışmasında LC-MS/MS ile en iyi uyumu HPLC yöntemi gösterdi ve denklemi $y = 4.3822 + 1.0124 x$ ($R^2 = 0.96$) olarak hesaplandı.

Sonuçlar: LC-MS/MS yöntemine dayalı olarak RIA ve kemiluminesans yöntemlerinin rutin klinik çalışmalarda doğruluğunun yeterli olmadığı tesbit edildi. Altın standart yöntem olan LC-MS/MS ile en iyi uyumu HPLC yönteminin gösterdiği saptandı.

Anahtar Kelimeler: 25-hidroksivitamin D₃, tandem kütle spektrometre, yöntem karşılaştırması

ABSTRACT

Objective: Measurement of circulating 25-hydroxyvitamin D₃ is accepted as the clinical indicator of vitamin D status. It is very important of valid measurement of 25-hydroxyvitamin D₃ as clinical. Therefore there is need a standardization for measurement. Methods except tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) measure total vitamin D and are less sensitive. LC-MS/MS is gold standard method for measuring vitamin D values. On this account we have invented a new method and evaluated this method to measure the imprecision and the accuracy and compared it with other systems.

Materials and Methods: We used isotope-dilution LC-MS/MS (ID-LC-MS/MS) for determination of D₃ with a stable-isotope-labeled internal standard. The values we obtained by ID-LC-MS/MS compared with HPLC, RIA and chemiluminescence methods.

Results: The interassay CVs for 25-hydroxyvitamin D₃ were 5.3%, 5.5% and 5.6% at 6.5, 24 and 43 ng/mL, respectively. The detection limit of the present method was <3.75 ng/mL for 25-hydroxyvitamin D₃. Total run time was 4 min. Method comparison between HPLC and LC-MS/MS showed a good correlation: $y = 4.3822 + 1.0124 x$ ($R^2 = 0.96$).

Conclusions: We conclude that methods based on LC-MS/MS should be preferred in routine clinical work. We got the best results with HPLC according to the gold standard method, LC-MS/MS.

Key Words: 25-hydroxyvitamin D₃, tandem mass spectrometry, method comparison

Giriş

Yöntem değerlendirme çalışmasında amaç, laboratuvarlarda uygulanması düşünülen yeni bir yöntemde mevcut olabilecek analitik hataların oranını belirlemektir. Bunlar rastgele hata (RH), sistematik hata (SH) ve toplam hatadır (TH). Bu hataları saptamak için hazırlanmış olan deney protokollerine uyularak deneyler yapılır. Rastgele hata için; tekrarlanabilirlik deneyleri, sistematik hata için; interferans, geri kazanım ve yöntem karşılaştırma deneyleri yapılır. Deneysel olarak hesaplanan hata o derişimde izin verilebilen hata düzeyinden küçük bulunduğu takdirde yeni yöntemin performansının yeterli olduğuna karar verilir [1, 2].

Bir ön hormon olan D vitamininin kolekalsiferol (D_3 vitamini) ve ergokalsiferol (D_2 vitamini) olmak üzere iki kaynağı vardır. Kolekalsiferol 290-310 nm dalga boyundaki ultraviyole ışınlarının etkisiyle deride hayvansal kaynaklı olan 7- dehidrokolesterolden yapılır ve bu endojen üretim D vitamininin temel kaynağıdır. Bu dönüşüm deri pigmentasyonu arttıkça azalırken ultraviyole ışınına maruz kalma miktarı ile doğru orantılı olarak artar. Ergokalsiferol ise bitkisel sterol olan ergosterolün irradiasyonu ile oluşur ve daha çok süt ürünlerinin güçlendirilmesi amacıyla kullanılır. Vitamin D_3 ve D_2 benzer yolla metabolize olduklarından ortak bir isimle, D vitamini olarak isimlendirilebilir [3].

25-OH-vitamin D ($25(OH)D$)'nin klinik olarak doğru ölçülmesi çok büyük önem arz etmektedir. Bunun için bir standartlaştırma gerekmektedir ve tandem kütle spektrometre (LC-MS/MS) yöntemi haricindeki yöntemler High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Radyoimmunoassay (RIA), Kemiluminesans yöntemleridir ve sadece toplam D vitamini miktarını verirler ve daha az duyarlıdır. LC-MS/MS vitamin D değerlerini ölçmek için altın standart bir yöntemdir. Buna ek olarak immunoassay ölçüm yöntemleri vitamin D miktarını D_2 vitamini ile olan çapraz tepkimelerin azalması nedeniyle yanlış ölçülebilirler. Bu da özellikle tedavilerinde D_2 vitamini kullanılan hastalarda önemlidir. LC/MS/MS yöntemi ise D_2 ve D_3 vitamini miktarlarını ayrı ayrı tespit edebilen nicel yöntemdir. Böylelikle vitamin dozajı çok daha doğru bir şekilde tespit edilebilmektedir. Bu çalışmada buradan yola çıkılarak LC/MS/MS cihazında yeni bir yöntem geliştirilmiş, yöntem geçerli kılma çalışması yapılmış ve bu yöntem HPLC, RIA, Kemiluminesans yöntemleriyle karşılaştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

25(OH)D hormon testi için, API 3200 kütle spektrometrede LC/MS/MS ölçüm yöntemi için yöntem değerlendirme çalışması yapılmıştır. Bu yöntem HPLC, RIA, Kemiluminesans ölçüm yöntemleri ile karşılaştırıldı. Çalışmaya 50 erkek ve 50 kadından oluşan 100 tane sağlıklı gönüllü alındı. Bu kişilerin bilinen bir hastalığı yoktu ve herhangi bir ilaç tedavisi almıyorlardı. Bütün hastalara Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi etik kurul araştırma projesi bilgi ve taahhüt formu

ile rıza formu imzalatılmış, etik komiteden onay alınmıştır (06/05/2009-17).

Laboratuvarımıza 15 Eylül 2008-15 Mart 2009 tarihleri arasında 25(OH)D ölçümü için başvuran toplam 100 kişiden sabah 08.30 – 09.00 arası oturur pozisyonda antekübital venden düz tüplere üçer tüp kan örnekleri alındı. 1600 g'de 5 dk santrifüj edildi. Her bir serum örneği 4 ayrı örnek kabına ayrıldı, çalışma gününe kadar -80 C'de saklandı.

Her yöntemle, 2 paralel numune çalışıldı ve ortalamaları alındı. Elde edilen verilerin tanımlanmasında aritmetik ortalama (AO), standart sapma (SD) kullanıldı. SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for windows 10.0 ve MedCalc istatistik programı kullanıldı.

HPLC, RIA, kemiluminesans yöntemiyle elde edilen değerler Y eksenine, LC/MS/MS yöntemi ile elde edilen değerler X eksenine yerleştirilerek doğrusal regresyon grafikleri çizilerek regresyon analizleri yapıldı.

LC/MS/MS ölçüm yöntemi

Bu yöntem 25-OH-vitamin D_3 ($25(OH)D_3$) ve 25-OH-vitamin D_2 ($25(OH)D_2$) vitaminlerinin serum veya plazmada ekstraksiyondan sonra kantitatif olarak ölçülmesine dayanır. API 3200 tandem kütle spektrometresi 5kV voltajında ve 350°C sıcaklığında çözünürlükle çalışan TurboIonSpray elektrospray kaynaklı bir pozitif modda kullanıldı. Analitlerin tesbiti için MRM modu kullanıldı. Her analit için bir MRM (multiple-reaction monitoring) geçişi ve iç standart izlendi. $25(OH)D_3$ için m/z 383.4/211.1; $25(OH)D_2$ için 395.4/209.1; [2H6]-25(OH) D_3 (internal standart) için 407.2/389.4 MRM modu kullanıldı.

Ayırma işlemi için Shimadzu Prominence LC ünitesi ve 2.1 mm ve 50 mm (5 µm) Phenomenex Luna C8 ters faz kolonu kullanıldı. Hareketli faz için iki farklı çözücü kullanıldı. Hareketli faz A olarak su ve hareketli faz B olarak ise içerisine % 1 oranında formik asit eklenmiş asetonitril kullanıldı. Akış hızı 300 µL/dk olarak ayarlandı ve her numune için 50 µL örnek enjekte edildi. Analitleri kolondan elue etmek için metanol gradienti kullanıldı. İlk 3 dakika hareketli fazın %70'i A'dan %30'u B'den alınacak şekilde ayarlandı. Bu 25-hidroksi metabolitlerinin kolonda tutulması için yapıldı. Sonraki 1 dakikada eluent A'nın derişimi %95'e çıkartıldı ve 1 dakika boyunca bu derişim sabit tutuldu. Sonraki 2 dakikada ise hareketli fazın %70'i A'dan %30'u B'den alınacak şekilde ayarlandı. Her örnek toplam çalışma zamanı 4 dakika idi. Örnekleri hazırlamak için ilk olarak tüplere 200 µl serum (kalibratör, kontrol ve hasta serumu) ve 75 µl iç standard konuldu. Daha sonra üzerlerine 1000 µl asetonitril (ACN) ilave edildi ve numuneler 30 saniye vorteks ile karıştırıldıktan sonra +4 °C'de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tüpler 13000 devir/dak'da 5 dakika santrifüj edildi. Tüplerin üzerinde kalan süpernatant barosilikat tüplere aktratıldı ve azot ile uçuruldu. Daha sonra örnekler 100 µl %50'lik ACN ile çözüldü ve numuneler 15 saniye vortekslendi. Tüpteki örneklerin tamamı insertlere aktarıldı ve bu insertler viallere konularak cihaza enjeksiyon için verildi.

Bulgular

Yöntem Geçerli Kılma

Doğrusallık çalışması için, Sigma Aldrich tarafından sağlanan içinde 480 ng/mL 25(OH)D₃ bulunan standard çözeltisi kullanıldı. Seyreltmeler için PBS (Phosphate Buffer Solution) çözeltisine albümin katılarak hazırlanan seyreltici kullanıldı. 480 ng/ml 25(OH)D₃ içeren örnekten 240, 120, 60, 30, 15, 7.5, 3.75 ve 1.8 ng/ml'lik seyreltmeler hazırlandı. Hacimsel seyreltmelerin doğru yapılması çok önemli olduğu için 480 ng/ml'lik örnekten seyreltilerek hazırlandı ve her örnek iki paralel çalışılarak sonuçların ortalaması alındı. 25(OH)D₃ için doğrusal aralık 1.8-480 ng/ml arasında bulundu ve denklemi $y = 1.0009x - 0.9647$ ($R^2 = 0.9991$) idi. Ayrıca klinik tanıda önemli olan 1.8-15 ng/ml derişim aralığı için de doğrusal bir eğri elde edildi ve denklemi $y = 1.0653x - 0.7331$ ($R^2 = 0.9997$) idi (Şekil.1).

Kütle spektrometresinde gözlenebilir sınıırı (LOD) sinyal/gürültü oranından 3 kat büyük olarak tanımlanırken tayin alt sınıırı (LOQ) ise sinyal/gürültü oranından 10 kat büyük olarak tanımlanmaktadır. Tekrarlanabilirlik çalışmasında (n=10) 4 ng/mL 25(OH)D₃ içeren en düşük kalibratör analiz edildiğinde sinyal/gürültü oranı >13 olarak bulundu ve nedenle LOQ 4,8 ng/mL olarak seçildi.

Kesinlik (tekrarlanabilirlik) çalışması için öncelikle gün içi tekrarlanabilirlik değerlendirildi. Daha sonra günler arası tekrarlanabilirlik çalışması yapıldı. Üretici firma tarafından sağlanan üç farklı karar seviyesinde kontrol serumu kullanıldı. Kontrol serumları 7 örnek kabına ayrıldı. Günler arası değişkenliği göstermek için her 3 seviyeli kontrol serumu aynı çalışma içinde arka arkaya 7 kez çalışıldı. Günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasında ise 3 farklı düzeyde 25(OH)D₃ içeren kontrol serumu kullanıldı. Her seviyedeki kontrol serumu örnekleri herbiri ayrı ayrı 10 kısma ayrıldı ve -20°C'de saklandı. 10 gün boyunca her gün her 3 seviyedeki örnekler çalışıldı. Yöntemimizin çalışma içi kesinlik deneyinde 1.seviye kontrol 25(OH)D₃ değerleri için CV %5.3, 2.seviye kontrol 25(OH)D₃ değerleri için % CV (değişkenlik katsayısı) 5.5, 3.seviye kontrol 25(OH)D₃ değerleri için CV %5.6 olarak bulundu (Tablo 1). Günler arası kesin-

lik deneyinde 1.seviye kontrol 25(OH)D₃ değerleri için CV %3,2, 2.seviye kontrol 25(OH)D₃ değerleri için CV %4.6, 3.seviye kontrol 25(OH)D₃ değerleri için CV %2.8 olarak bulundu (Tablo 2).

Geri kazanım çalışması için 6.95 ng/ml 25 (OH)D₃ içeren serum havuzu örneğine depo çözeltiden 3 farklı derişimde 25 (OH)D₃ eklendi ve her bir örnek iki kez ölçüldükten sonra ortalamaları alındı. Her bir havuzdan 900 µl serum örnekleri alındı. Matrisin etkisini bozmaması için (örnek hacminin % 10'unu geçmeyecek şekilde) seyreltmelerde kullanılacak toplam hacim 100 µl alındı ve son hacim 1000 µl tutuldu. Geri kazanım deneyinde ise %94-%98 arasında değerler bulundu (Tablo 3).

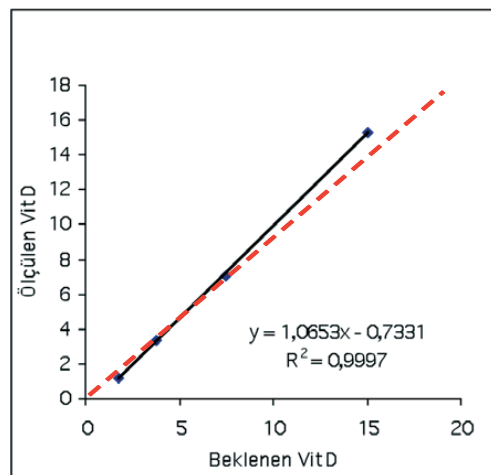
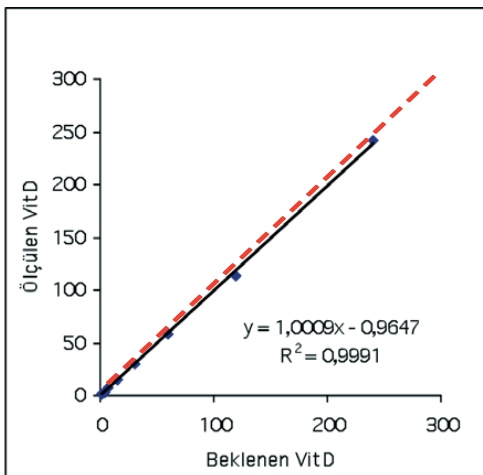
Dört yöntemle elde edilen 25(OH)D ölçüm sonuçları, istatistiksel olarak değerlendirildi. Aralarındaki ilişkiyi incelemek amacıyla regresyon analizi yapıldı ve bu ilişki korelasyon katsayısı olarak ifade edildi. Her dört ölçüm sisteminden elde edilen değerler Pearson korelasyon analizi ile değerlendirildi ve dört yöntem arasında anlamlı bir fark saptandı ($p < 0.05$).

25(OH)D değerlerine ait AO, SD, minimum ve maksimum değerler Tablo 4'de verilmektedir.

25(OH)D sonuçlarının referans yöntem ve HPLC yöntemi arasındaki dağılımı Şekil 2'de gösterildiği gibidir. Bu iki yöntem için yapılan regresyon analizi sonucu; $R^2 = 0.965$, $a = 4.382$, $b = 1.012$ bulundu. Eğrinin denklemini ise $y = a + bx$ denkleminde yerine koyduğumuzda ise $y = 4.382 + 1.012x$ ($R^2 = 0.965$) olarak bulundu. HPLC yöntemi ile LC/MS/MS yöntemi sonuçlarının istatistiksel olarak farklı olmadığı kanıtlandı ($t = -0.865$, $p = 0.3891$).

25(OH)D sonuçlarının referans yöntem ve RIA yöntemi arasındaki dağılım Şekil 3'de gösterildiği gibidir. Bu iki yöntem için yapılan regresyon analizi sonucu $R^2 = 0.836$, $a = 6.257$, $b = 0.593$ bulundu. Eğrinin denklemini ise $y = a + bx$ denkleminde yerine koyduğumuzda ise $y = 6.257 + 0.593x$ ($R^2 = 0.836$) olarak bulundu. RIA yöntemi ile LC/MS/MS yöntemi sonuçlarının istatistiksel olarak farklı olmadığı kanıtlandı ($t = 3.485$, $p = 0.0007$).

25(OH)D sonuçlarının referans yöntem ve Kemiluminesans yöntemi arasındaki dağılım Şekil 4'de gösterildiği gibidir. Bu iki yöntem için yapılan regresyon analizi sonucu; $R^2 = 0.814$, $a = 5.532$, $b = 0.716$ bulundu. Eğrinin denklemini



Şekil 1. A. 25(OH)D₃ vitamini için 1.8-480 ng/ml için linearite grafiği. B. 25(OH)D₃ vitamini için 1.8-15 ng/ml için linearite grafiği

Tablo 1. Çalışma içi kesinlik deneyinde, standart için elde edilen 25-OH-Vitamin D₃ değerleri ve çalışma içi kesinlik deneyi sonuçları

Düzye	Ortalama(ng/ml)	SD	%CV
1	6.2	1.118	5.3
2	24.45	1.366	5.5
3	43.42	2.458	5.6

Tablo 2. Günler arası kesinlik deneyinden elde edilen veriler

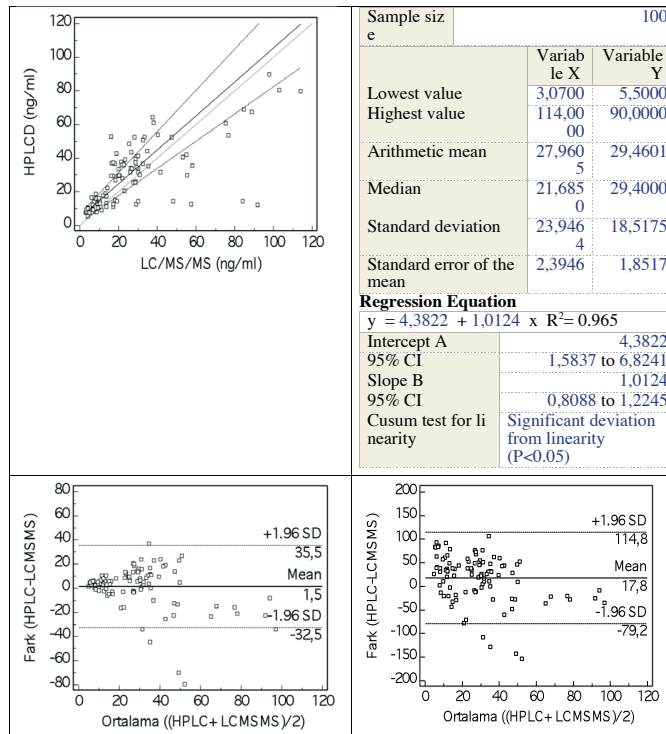
Düzye	Ortalama(ng/ml)	SD	%CV
1	6.4	1.203	3.2
2	25.53	1.192	4.6
3	45.35	1.220	2.8

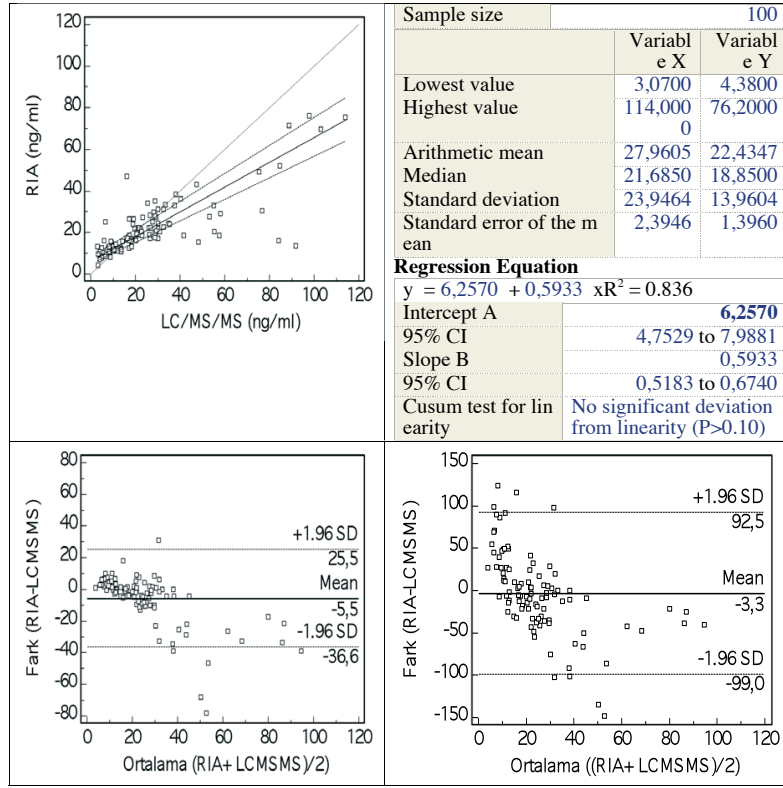
Tablo 3. 6.95 ng/mL derişiminde yapılan geri elde çalışması

	1.tüp (baseline)	2.tüp	3.tüp	4.tüp
Eklenen	0	12	24	48
Okunan	6.95	18.3	30.7	52.7
Geri elde	-	11.35	23.75	45.75
% Geri elde		%94	%98	%95

Tablo 4. HPLC, RIA, Kemiluminesans ve LC/MS/MS yöntemleriyle çalışılan serum örneklerine ait veriler

	LC/MS/MS	HPLC	RIA	Kemiluminesans
AO (ng/ml)	19.12	21.23	19.27	22.13
SD (ng/ml)	10.11	10.01	8.464	11.40
Minimum (ng/ml)	3.29	5.5	4.38	4.47
Maksimum (ng/ml)	40.34	44	38.29	45.9

**Şekil 2.** A. Vitamin D sonuçlarının referans yöntem ve HPLC yöntemi arasındaki dağılımı. B. Vitamin D sonuçlarının dağılımının sayısal değerleri. C. Vitamin D sonuçlarının referans yöntem ve HPLC yöntemi arasındaki Bland Altman grafiği D. Referans yöntem ve HPLC yöntemi arasındaki Vitamin D sonuçlarının % ortalama ile hesaplanmış Blant Altman grafiği.



Şekil 3. A. Vitamin D sonuçlarının referans yöntem ve RIA yöntemi arasındaki dağılımı. B. Vitamin D sonuçlarının dağılımının sayısal değerleri. C. Vitamin D sonuçlarının referans yöntem ve RIA yöntemi arasındaki Bland Altman grafiği D. Referans yöntem ve RIA yöntemi arasındaki Vitamin D sonuçlarının % ortalama ile hesaplanmış Blant Altman grafiği.

ise $y = a + bx$ denkleminde yerine koyduğumuzda ise $y = 5.532 + 0.716x$ ($R^2 = 0.814$) olarak bulundu. Kemiluminesans yöntemi ile LC/MS/MS sonuçlarının istatistiksel olarak farklı olmadığı kanıtlandı ($t = 2.545$, $p = 0.0125$).

Tartışma

Son 30 yıldır kalsiyum homeostazisinin değerlendirilmesinde 25(OH)D metabolitlerinin ölçülmesi önem kazanmıştır. Fakat daha güncel olarak vitamin D metabolitlerinin ölçülmesi endokrin olmayan bazı fonksiyonların tanımlanmasında da kullanılmaktadır [4,5]. Bu nedenle vitamin D durumunun belirlenmesinde hem endojen hem de eksojen vitamin D metabolitlerinin eşit şekilde ölçülmesi gerekmektedir.

25(OH)D ölçümünde ilk kullanılan ölçüm 1971'de bildirilen vitamin D bağlayıcı protein (DBP)'in bağlayıcı olduğu kompetitif protein bağlama yöntemidir [6]. Yöntemin avantajı DBP'nin 25(OH)D₂ ile 25(OH)D₃'ü eşit olarak tanımasıdır. Yöntemin kısıtlılığı ise ölçümde 24,25(OH)₂D, 25,26(OH)₂D, 23 lactone gibi diğer polar vitamin D metabolitlerini de kapsamı ve 10 gün gibi uzun inkübasyon süresinin olmasıdır. Ancak Silisik asit kromatografisinin kullanıldığı yarışmalı protein bağlama yöntemi geliştirilerek inkübasyon süresi 1 saate düşürülmüştür [6-8].

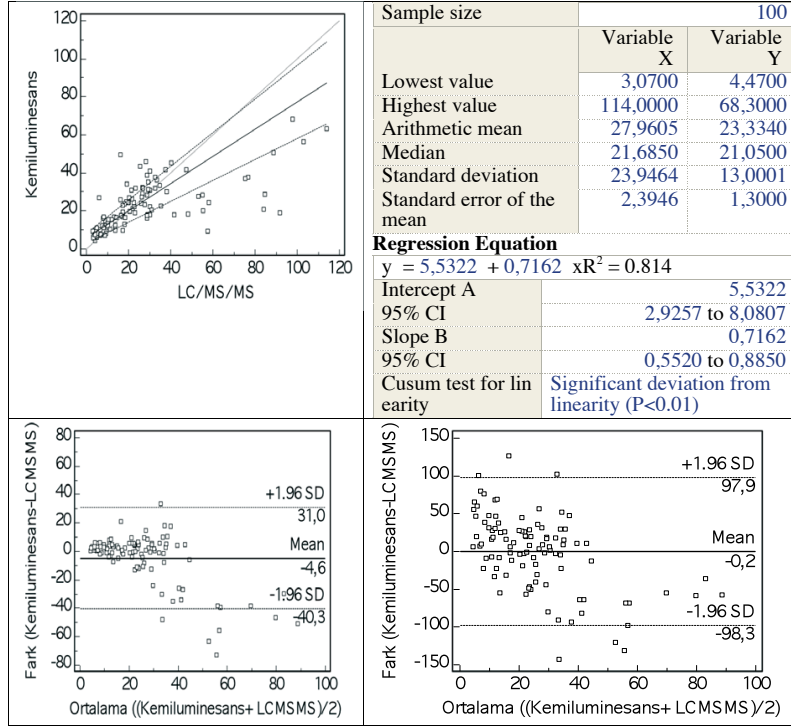
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi 1977'de geliştirilmiştir. Bu yöntemde UV absorpsiyon yolu ile ölçüm yapılmaktadır. İnterferans veren lipidleri ve vitamin D metabolitlerini uzaklaştırılması, 25(OH)D₂ ve 25(OH)D₃'i ölçebilmesi en önemli avantaj-

larıdır. Ancak bu yöntem iyi bir donanım ve deneyim gerektirmektedir [6,8].

RIA (Diasorin) yöntemi 1985'de geliştirilmiştir. Bu yöntem için örnek saflaştırması gerekli olmamaktadır. Bu yöntemin uygulaması kolay ve sonuçları HPLC ölçümü ile uyumludur. yarışmalı protein bağlama ölçümdeki gibi 25(OH)D₂ ile 25(OH)D₃'ü eşit oranda tanımakta ve diğer polar vitamin D metabolitlerini de kapsamaktadır. Bu nedenden dolayı 25(OH)D ölçümleri %10-20 fazla bulunmaktadır. RIA (IDS) yöntemi ise 25(OH)D₃'e %100, 25(OH)D₂'ye %75 spesifiktir [6, 8, 9].

ELISA yöntemi RIA ve Kompetitif protein bağlama ölçümdeki gibi diğer polar vitamin D metabolitlerini de kapsamaktadır (24,25(OH)₂D, 25,26(OH)₂D, 23 lactone) [6]. Kemiluminesans yöntemi 25(OH)D₂ ve 25(OH)D₃ için eşit oranda özgündür, ancak bu yöntemin maliyeti yüksektir [6]. Sıvı Kromatografi Tandem Kütle Spektroskopisi (LC-MS/MS) 25(OH)D₂ ve 25(OH)D₃'ü nicel olarak ölçen bir yöntemdir.

25(OH)D ölçümü için immunolojik tekniklerin ve kromatografik yöntemlerin kullanıldığı laboratuvar yöntemleri son zamanlarda tekrar gözden geçirilmektedir. Birçok yazar 25(OH)D ölçümünde uluslararası bir standartlaştırma gerekliliğini savunmakta ve bunun için RIA yönteminin klinik değerlendirme için gerekliliğini bildirmektedir [10]. Oysa LC/MS/MS yöntemi radyoaktif materyallerin kullanılmadığı bir yöntemdir ve son derece gerçek sonuçlar vermektedir. Günümüzde MS yöntemi daha çok araştırma amaçlı çalışmalarda kullanılmaktadır ve rutin laboratuvarlarda yaygın



Şekil 2. A. Vitamin D sonuçlarının referans yöntem ve HPLC yöntemi arasındaki dağılımı. B. Vitamin D sonuçlarının dağılımının sayısal değerleri. C. Vitamin D sonuçlarının referans yöntem ve HPLC yöntemi arasındaki Bland Altman grafiği D. Referans yöntem ve HPLC yöntemi arasındaki Vitamin D sonuçlarının % ortalama ile hesaplanmış Blant Altman grafiği.

olmayan bir yöntemdir. GC-MS (Gas chromatography mass spectroscopy) plazmadaki vitamin D metabolitlerinin analizinde araştırma amaçlı kullanılmaktadır fakat analiz karmaşıklığı bu yöntemin gündelik kullanıma geçmesini engellemiştir [11]. LC-MS/MS ile ilgili son değerlendirmeler bu yöntemi bilindik immünassay yönteme alternatif bir teknik olarak önermektedir ve bu yöntemin duyarlılık ve özgünlüğünün bir çok analit için yüksek olduğunu belirtmektedir. Bu nedenle 25(OH)D₃ ölçülmesinde referans yöntem olarak gösterilmektedir [12]. Buradan yola çıkarak tarafımızca vitamin D₂ ve vitamin D₃'ün 25-hidroksi metabolitlerinin rutin olarak ölçülmesinde alternatif bir yöntem geliştirildi. Bu yöntemde küçük miktarlarda numune (100 µL) yeterli olmaktadır. Ayrıca numune hazırlık aşaması kolay ve otomatik olabilmektedir. Bu yöntemle 24 saatte 210 hasta çalışılabilirken Zoe Maunsel ve arkadaşlarının yöntemiyle 180 numune çalışılabilir ve ayrıca bu yöntemden daha pratik olarak uygulanabilmektedir [13]. Biz yöntemimizi tam olarak geçerli kıldık ve rutin tanısal kullanıma soktuk. Bu yöntemle 100 sağlıklı gönüllünün 25(OH) D₃ ve 25(OH) D₂ değerlerini ölçtük ve rutinde kullanımları olan RIA, HPLC ve Kemilüminesans yöntemleriyle karşılaştırdık.

LC/MS/MS için yapmış olduğumuz yöntem geçerli kılma çalışmasında 25(OH)D₃ için doğrusal aralığı 1.8-480 ng/ml arasında bulduk. Ayrıca klinik tanıda önemli olan 1.8-15 ng/ml derişim aralığı için de doğrusal bir eğri elde ettik. Zoe M. ve arkadaşlarının yapmış olduğu yöntem geçerli kılma çalışmasında ise doğrusal aralık 1.6-102.5 ng/ml olarak bulunmuştur [13]. Amy K. ve arkadaşları-

nın yapmış olduğu yöntem geçerli kılma çalışmasında ise doğrusal aralık 1.0-100.0 ng/ml olarak bulunmuştur [14]. Yöntemimizin doğrusallık çalışmasında determinasyon katsayısı (R^2) 0.9991 olarak bulunurken, Michael V. ve arkadaşlarının doğrusallık çalışmasında bu değer 0.9996 olarak bulunmuştur [15].

Geri kazanım deneyinde ise biz değeri %94-%98 arasında bulduk. Zoe M. Ve arkadaşlarının yapmış olduğu geri kazanım deneyinde ise bu değer %91-%110 olarak bulunmuştur [13]. Amy K. ve arkadaşlarının yapmış olduğu geri kazanım deneyinde ise %86-%92 arasında bulunmuştur [14]. Tsugawa N. ve arkadaşlarının çalışmalarında ise % 103.8 olarak bulunmuştur [16].

Yöntemimizin kesinlik çalışmasında ise 6.5, 24.45 ve 43.42 (ng/ml) derişimleri için gün içi CV değerleri sırasıyla %5.3, %5.5 ve %5.6 olarak bulunurken, günler arası CV değerleri sırasıyla %3,2, %4.6 ve %2.8 olarak bulundu. Zoe M. Ve arkadaşlarının yapmış olduğu kesinlik çalışmasında gün içi CV değerleri 6.4, 14 ve 30 (ng/ml) derişimleri için sırasıyla %6.2, %3.5 ve %5.2 olarak bulunurken, günler arası CV değerleri 22 ve 35 (ng/ml) derişimleri için sırasıyla %5.1 ve %5.6 olarak bulunmuştur [13]. Amy K. ve arkadaşlarının yapmış olduğu kesinlik çalışmasında gün içi CV değerleri %6.0-%8.0 olarak bulunurken, günler arası CV değerleri %7.7-%9.8 olarak bulunmuştur [14]. Michael V. ve arkadaşlarının yapmış olduğu kesinlik çalışmasında ise gün içi CV değerleri 5.8 ng/ml derişimi için %12, 26.5 ng/ml derişimi için % 7.8 olarak bulunmuştur [15]. Tsugawa N. ve arkadaşlarının çalışmalarında ise gün içi CV değeri % 5.7, günler arası CV değeri ise % 2.5 olarak bulunmuştur [16].

Dört yöntemle elde edilen 25(OH)D₃ ölçüm sonuçları, istatistiksel olarak değerlendirildi. Her dört ölçüm sisteminden elde edilen değerler Pearson korelasyon analizi ile değerlendirildi ve dört yöntem arasında anlamlı bir fark saptandı (p<0.05). Referans yöntem LC/MS/MS yöntemi ile diğer yöntemleri karşılaştırdığımızda HPLC yönteminin sonuçlarının LC/MS/MS ile benzer olduğu tesbit edilirken diğer yöntemler olan RIA ve kemiluminesans ile farklı olduğu tesbit edildi.

Bizim çalışmamızda HPLC yöntemini LC/MS/MS referans yöntemi ile karşılaştırdığımızda y-kestirim değerini 4.38, eğim değerini 1.012 (%95 güven aralığı 0.80-1.22) olarak bulduk. Gary L. ve arkadaşlarının yapmış olduğu yöntem karşılaştırmasında ise y-kestirim değeri -4.82, eğim değeri ise 1.01 olarak bulunmuştur [17]. Her iki yöntemle sonuçların birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Gary L. ve arkadaşları ise vitamin D metabolitlerinin doğru ölçülmesinde LC/MS/MS ve HPLC yöntemlerinin tercih edilmesi gerektiğini savunmaktadır [17].

RIA yöntemini LC/MS/MS referans yöntemi ile karşılaştırdığımızda y-kestirim değerini 6.25, eğim değerini 0.59 (%95 güven aralığı 0.51-0.67) olarak bulduk. Amy K. ve arkadaşlarının yapmış olduğu yöntem karşılaştırmasında ise referans yöntem olarak RIA alınmış ve LC/MS/MS ile karşılaştırıldığında y-kestirim değeri -1.74, eğim değeri ise 0.97 (%95 güven aralığı 0.88-1.05) olarak bulunmuştur [14]. Alan H. Terry ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise referans yöntem olarak yine RIA alınmış ve LC/MS/MS ile karşılaştırıldığında y-kestirim değeri -8.96, eğim değeri ise 0.76 olarak bulunmuştur [18]. Michael V. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise referans yöntem olarak yine LC/MS/MS alınmış ve RIA ile karşılaştırıldığında y-kestirim değeri -4.0, eğim değeri ise 1.25 olarak bulunmuştur [15]. Bizim sonuçlarımız ve bu çalışmaların sonuçları RIA'nın ölçümlerinin LC/MS/MS'ten daha fazla olduğunu göstermektedir. Bu da RIA'nın vitamin D'nin diğer metabolitleri ile çapraz reaksiyon verdiğini göstermektedir ve RIA total vitamin D'yi ölçerken LC/MS/MS yalnızca 25(OH)D₃'ü ölçmektedir.

Kemiluminesans yöntemini LC/MS/MS referans yöntemi ile karşılaştırdığımızda y-kestirim değerini 5.53, eğim değerini 0.71 (%95 güven aralığı 0.55-0.88) olarak bulduk. Alan H. Terry ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise referans yöntem olarak kemiluminesans alınmış ve LC/MS/MS ile karşılaştırıldığında y-kestirim değeri -2.97, eğim değeri ise 1.22 olarak bulunmuştur [18]. Bu iki sonuç da kemiluminesans yönteminin LC/MS/MS yönteminden yüksek sonuçlar verdiğini göstermektedir. Bu da kemiluminesans yöntemin total 25(OH)D'yi ölçmesinden kaynaklanmaktadır.

Sonuç olarak LC/MS/MS'te bizim geliştirdiğimiz yöntem hem pratik hem de vitamin D metabolitlerini ayrı ayrı doğru bir şekilde ve uygun bir maliyette ölçebilmektedir. Bu nedenle bu yöntemin rutin laboratuvarlarda kullanımının yaygınlaştırılması yalnız vitamin D için değil diğer analitlerin de bu yöntemle doğru bir şekilde ölçülebilmesinden dolayı önerilmektedir. Fakat bu yöntemle yapılan ölçümler iyi bir deneyim gerektirdiğinden laboratuvar yöneticilerinin bu konudaki yeterli eğitimi sağlamaları gerekmektedir.

Kaynaklar

- [1] Holick MF. (2004) Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 80(6): 1678S-88S.
- [2] Holick MF. (2006) Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest.* 116:2062-2072.
- [3] Koo WWK, Tsang RC. Calcium and Magnesium Homeostasis. In: MacDonald MH, Seshia MMK, Mullet MD, eds. (2005) *Avery's Neonatology Pathophysiology & Management of the Newborn*, 6th edition. Philadelphia: Lippincott W&W. 847-875.
- [4] Holick MF. (2004) Vitamin D. Importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr.* 79:362-71.
- [5] Zittermann A. (2003) Vitamin D in preventative medicine: are we ignoring the evidence? *Br J Nutr.* 89:552-72.
- [6] Zerwekh JE (2004) The Measurement of vitamin D: analytical aspects. 41: 272-281.
- [7] Holick MF. (2009) Vitamin D Status: Measurement, Interpretation and Clinical Application. *Ann Epidemiol.* 19(2):73-8.
- [8] Horst RL, Hollis BW. Vitamin D assays and their clinical utility. In: Holick MF, ed. *Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications*. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 1999: 239-271.
- [9] Hollis B. (2004) The determination of circulating 25-hydroxyvitamin D: no easy task. *J Clin Endocrinol Metab.* 89: 3149-51.
- [10] Binkley N, Krueger D, Cowgill CS, Plum L, Lake E, Hansen KE, et al. (2004) Assay variation confounds the diagnosis of hypovitaminosis D: a call for standardisation. *J Clin Endocrinol Metab.* 89: 3152-7.
- [11] Coldwell RD, Trafford DJ, Varley MJ, Kirk DN, Makin HL. (1989) Measurement of 25-hydroxyvitamin D₂, 25-hydroxyvitamin D₃, 24,25-dihydroxyvitamin D₂ and 25,26-dihydroxyvitamin D₃ in a single plasma sample by mass fragmentography. *Clin Chim Acta.* 180: 157-68.
- [12] Vogeser M, Kyriatsoulis A, Huber E, Kobold U. (2004) Candidate reference method for the quantification of circulating 25-hydroxyvitamin D₃ by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 50:1415-7.
- [13] Zoe M, Dennis JW, Sandra JR. (2005) Routine Isotope-Dilution Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Assay for Simultaneous Measurement of the 25-Hydroxy Metabolites of Vitamins D₂ and D₃. *Clin Chem.* 51:9, 1683-1690.
- [14] Amy KS, Thomas JL, Deborah EB, Sayed MHS. (2006) Quantification of Serum 25-Hydroxyvitamin D₂ and D₃ Using HPLC-Tandem Mass Spectrometry and Examination of Reference Intervals for Diagnosis of Vitamin D Deficiency. *Am J Clin Pathol.* 125:914-920.
- [15] Michael V, Apostolos K, Erasmus H, Uwe K. (2004) Candidate Reference Method for the Quantification of Circulating 25-Hydroxyvitamin D₃ by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Clin Chem.* 50:8, 1414-1417.
- [16] Naoko T, Yoshitomo S, Maya K, and Toshio O. (2005) Determination of 25-Hydroxyvitamin D in Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 77:3001-7
- [17] Lensmeyer GL, Wiebe DA, Binkley N, Drezner MK. (2006) HPLC method for 25-hydroxyvitamin D measurement: comparison with contemporary assays. *Clin Chem.* 52:6, 1120-1126.
- [18] Terry AH, Sandrock T, Meikle AW. (2005) Measurement of 25-hydroxyvitamin D by the Nichols ADVANTAGE, DiaSorin LIAISON, DiaSorin RIA, and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 51:8, 1565-1566.