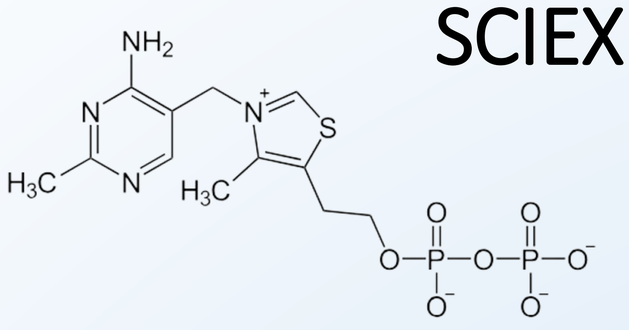
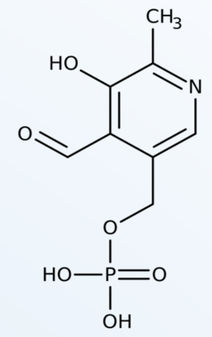
Verifizierung des Vitamin B1 und B6 Kits auf dem LC Shimadzu 40DX3 mit SCIEX Triple Quad™ 6500+ LC-MS/MS System





Julia Lutz, BMA 21-24

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Inselspital Bern, Zentrum für Labormedizin, Stoffwechseldiagnostik

1. Zusammenfassung

Durch eine erfolgreiche Methodenverifizierung von Vitamin B1 und B6 aus Vollblut nach Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) und der fachlichen Unterstützung von Dr. sc. Déborah Mathis konnte die Vitamin B1 und B6 Messung im Inselspital im ZLM der Stoffwechseldiagnostik erfolgreich implementiert werden. Die Verifizierung erfolgte durch den Einsatz des Vitamin B1 und B6 Chromsystems Kit. Fünf Leistungsmerkmale wurden überprüft. Darunter die Präzision mittels Interday, Intraday und Wiederholbarkeit, die Limit of Detection (LOD) (Nachweisgrenze) und die Lower Limit of Quantification (LLOQ) (Bestimmungsgrenze), die Linearität, den Carryover und die Richtigkeit anhand interner Qualitätskontrollen und Kalibratoren und den Ringversuchen von INSTAND. Die erreichten Akzeptanzkriterien bestätigten die erfolgreiche Vitamin B1 und B6 Messung im Inselspital.

2. Einleitung

Das Stoffwechsellabor ZLM, ist Teil des schweizerischen Referenzzentrums für angeborene Stoffwechselkrankheiten des Universitätsspitals Bern. Bisher wurden wöchentlich Plasmaproben an das Schweizerische Vitamininstitut – SNH für die Vitamin B1 und B6 Bestimmung nach Genf versendet. Nun soll in der Stoffwechseldiagnostik eine Methodenverifizierung auf dem neuen LC-MS/MS Gerät aus der Stoffwechseldiagnostik (SD) und dem Backup Forschungsgerät (Thor) durchgeführt werden. Durch die Implementierung dieser Analyse soll die Stoffwechseldiagnostik in die Lage versetzt werden, schnellere und zuverlässigere Resultate zu liefern, was wiederum die Patientenversorgung verbessert.

Thiamin (Vitamin B1) und Pyridoxin (Vitamin B6) sind wasserlösliche Vitamine, die wichtige Rollen im Stoffwechsel spielen. Thiamin ist als Thiaminpyrophosphat (TPP) am Glukosestoffwechsel, der Gehirnfunktion und Nierenfunktion beteiligt. Ein Mangel kann zu Schädigungen im Nerven- und Kreislaufsystem führen. [1]

Pyridoxin (Vitamin B6) kommt in drei Formen vor und wird zu Pyridoxalphosphat (PLP) umgewandelt. PLP ist ein Coenzym für Reaktionen im Aminosäure-, Protein- und Harnstoffwechsel. Ein Mangel kann kognitive Beeinträchtigungen, Depressionen und Herzerkrankungen verursachen. [2]

In dieser Arbeit wurden beide aktiven Formen von Vitamin B1 und Vitamin B6 als TPP und PLP gemessen.

3. Ziele und Fragestellungen

Ziel: Verifikation des Chromsystems Vitamin B1 und B6 Kits auf beiden LC Shimadzu 40DX3 mit SCIEX Triple Quad™ 6500+ LC-MS/MS Geräte (SD & Thor).

1. Können die Messresultate vom Chromsystems Vitamin B1-und B6 Kit auf dem LC-MS/MS Stoffwechsel Gerät (SD) und dem gleichen LC-MS/MS Gerät aus der Forschung (Thor) die Akzeptanzkriterien einer Methodenverifizierung erfüllen?

Zu erreichende Akzeptanzkriterien:

- Präzision-Interday: Variationskoeffizient ≤15%
- Präzision-Intraday: Variationskoeffizient ≤15%
- Wiederholbarkeit: Variationskoeffizient ≤15%
- LLOQ: Variationskoeffizient ≤20%
- Linearität: $r^2 \geq 0.985$
- Carryover: Area von Cal 0 nach Cal 6 ≤20% Abweichung
- Richtigkeit interne Qualitätskontrollen: ±20% Abweichung zum Zielwert
- Ringversuche INSTAND: Die gemessenen Werte müssen innerhalb der vorgegebenen Grenzwerte bzw. erlaubten Abweichungen vom Referenzwert liegen.

4. Methodik und Material

Es wurde das Vitamin B1 und B6 Kit von Chromsystems eingesetzt, welches Qualitätskontrollen, Kalibratoren, Internen Standard und die entsprechenden Reagenzien besitzt.

Alle Proben wurden auf dem LC-40DX gekoppelt mit dem Triple Quad™ 6500+ Massenspektrometer gemessen. Das Prinzip beruht auf einer HPLC-Analyse mit anschliessender Quantifizierung mittels Massenspektrometer. Die Analyten werden als erstes aufgetrennt und danach durch Ionisierung in verschiedene Quadrupolen überführt wo sie selektiert und schliesslich an einem Detektor gemessen werden.

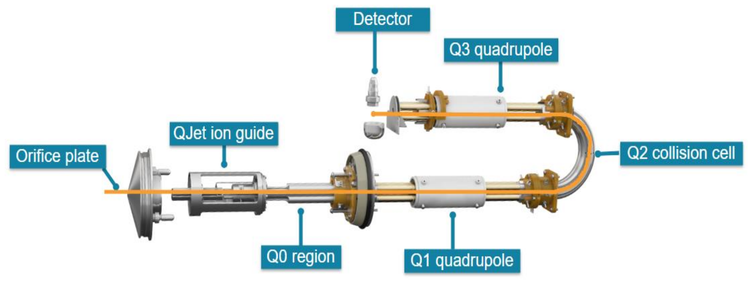


Abb. 1: Aufbau Triple Quadrupol Massenspektrometer (*Online Course | SCIEX Now Learning Hub*, o. J.)

5. Ergebnisse/ Resultate

Die beiden LC-MS/MS Geräte erfüllten bei der Messung der Qualitätskontrollen und Kalibratoren des Chromsystems Vitamin B1 und B6 Kit alle überprüfbaren Leistungsmerkmale und entsprachen den festgelegten Akzeptanzkriterien.

6. Diskussion

Die durchgeführte Methodenverifizierung liefert überzeugende Ergebnisse, die durch Excel-Tabellen, erreichte Akzeptanzkriterien und bestandene INSTAND-Ringversuche belegt wurden. Die Methode zeichnet sich durch eine hohe Präzision und Reproduzierbarkeit aus, mit einem Variationskoeffizienten von ≤15% für Präzision-Interday, Intraday und Wiederholbarkeit. Die LLOQ-Werte für TPP und PLP zeigen eine präzise Quantifizierbarkeit bei sehr niedrigen Konzentrationen. Die breite Linearität gewährleistet zuverlässige Ergebnisse über einen großen Konzentrationsbereich. Der erfolgreiche Carryover-Test bestätigt, dass Probenverschleppungen vermieden werden. Die hohe Richtigkeit in der internen Qualitätskontrolle und den Ringversuchen unterstreicht die Genauigkeit der Messergebnisse. Ein wesentlicher Beitrag zum Erfolg der Verifizierung war der Einsatz eines deuterierten Internal Standards, der eine genaue und zuverlässige Quantifizierung der Zielanalyten ermöglichte. Insgesamt belegen diese Ergebnisse die Zuverlässigkeit und Präzision der Methode für die angestrebte Analytik.

Referenzen

[1] Begley, T. P. (1996, S. 177)
[2] Lykstad, J., & Sharma, S. (2023)

Abbildung

Abb. 1 O*nline Course | SCIEX Now Learning Hub*. (o. J.).