

Methylmalonsäurebestimmung mittels LC/MS (LC-Massenspektrometrie) zur Feststellung des Vitamin B12-Mangels

Grundlagen

Vitamin B12 dient einerseits in Form von Methylcobalamin als Cofaktor für das Enzym Methionin-Synthase zur Umwandlung von Homocystein zu Methionin. Andererseits stellt es in Form von Adenosylcobalamin den Cofaktor für das Enzym Methylmalonyl-Coenzym-A Mutase dar, welches für die Umwandlung von Methylmalonyl-Coenzym A zu Succinylcoenzym-A verantwortlich ist.

Bei B12-Mangel steigt die Konzentration von Homocystein (Hcy) bzw. Methylmalonsäure an, ein Erfolg einer oralen bzw. parenteralen Therapie mit Vitamin B12 lässt sich mit der Bestimmung der Methylmalonsäure sicher belegen. Bereits wenige Tage nach Therapiebeginn kehrt der erhöhte Methylmalonsäurewert in den Referenzbereich zurück.

Klinisch verursacht der Vitamin B12 Mangel teilweise irreversible neurologische Veränderungen wie Polyneuropathie, funikuläre Myelose, Psychosen und Demenzen. Im weiteren Verlauf führt der Mangel zur perniziösen Anämie.

Während in der Mehrzahl der Fälle durch eine Bestimmung des Vitamin B12 und des Holotranscobalamins ein Mangel ausgeschlossen bzw. nachgewiesen werden kann, ist in einem kleineren Teil der Fälle erst durch die Bestimmung der Methylmalonsäure (MMA) eine Klassifizierung möglich.

Empfehlungen bei Verdacht auf Vitamin B12-Mangel

- Bei Verdacht auf Vitamin B12-Mangel vorerst mit der Bestimmung von B12 beginnen
 - Werte > 300 pmol/l machen einen Mangel sehr unwahrscheinlich
 - Werte < 125 pmol/l sprechen für eine(n) negative B12-Balance/B12-Mangel
- Vitamin B12-Werte zwischen 125 und 300 pmol/l liegen in der Grauzone und sind mittels Holotranscobalaminbestimmung (Holo-Tc) weiter abzuklären
 - Holo-Tc Werte > 50 pmol/l machen einen Mangel unwahrscheinlich
 - Holo-Tc Werte < 35 pmol/l sprechen für einen Mangel
- Holo-Tc Werte zwischen 35 und 50 pmol/l liegen in der Grauzone und sind mittels Methylmalonsäurebestimmung (MMA) weiter abzuklären
- MMA-Werte < 290 nmol/l machen einen Mangel unwahrscheinlich
 - MMA-Werte > 750 nmol/l sprechen für einen Mangel
 - Werte zwischen 290 und 750 nmol/l sind unklar und können wie im Abklärungsschema angegeben weiter abgeklärt werden

Abklärungsschema B12-Mangel



Auf Wunsch erfolgt die Abarbeitung des Algorithmus über ein EDV-Regelwerk automatisch.

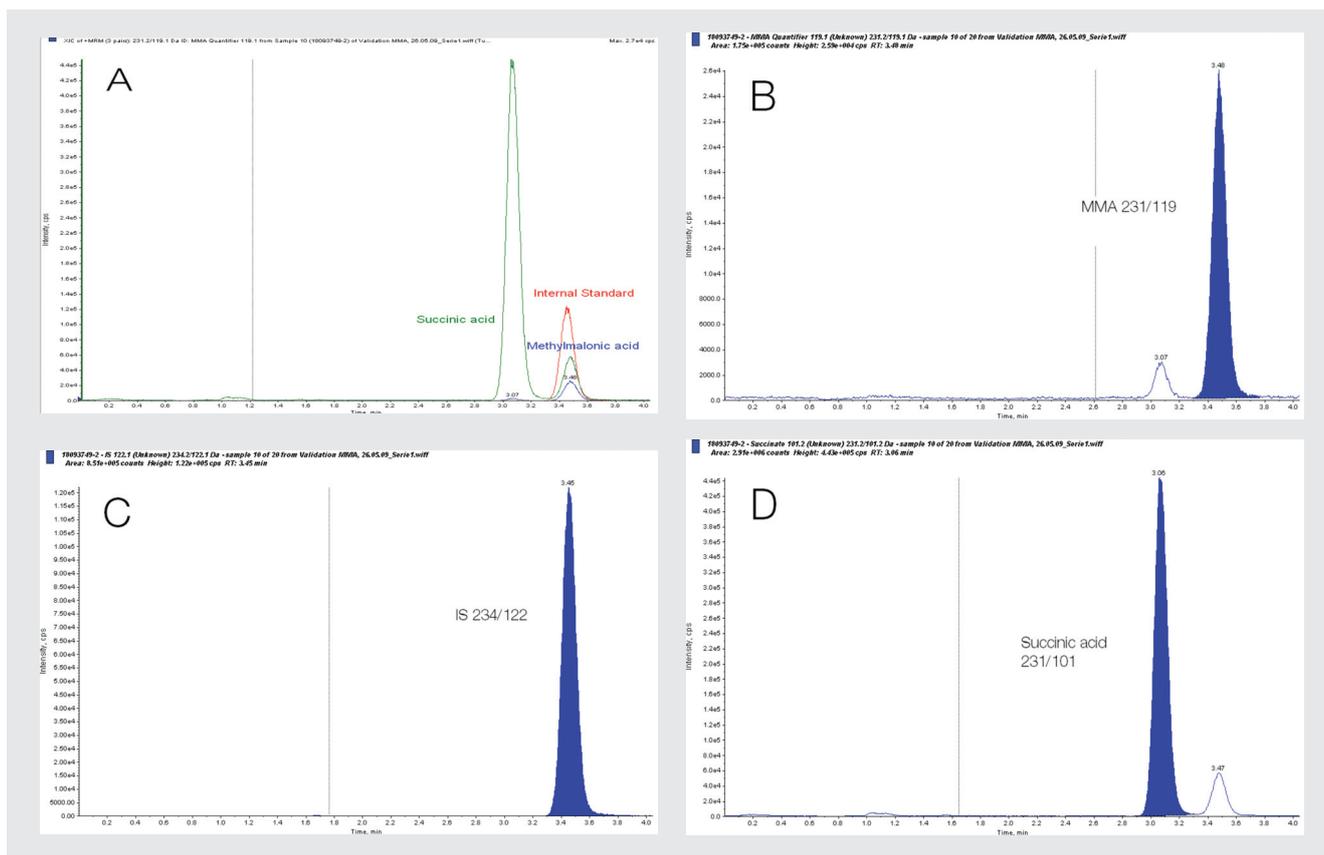
Analytik

Die Bestimmung der MMA erfolgt vorwiegend mittels einer zeitaufwändigen gaschromatographisch-massenspektrometrischen Methode (GC-MS). Massenspektrometrische Untersuchungsverfahren zeichnen sich durch hohe Selektivität aus, die dafür benötigten Instrumente sind sehr teuer und haben wegen des gleichzeitig nötigen Know-hows bislang nur sehr begrenzten Einsatz in die Routinediagnostik gefunden.

Nach umfangreicher Entwicklung kann das labormedizinische zentrum Dr Risch eine schnelle, ausreichend empfindliche und hochspezifische Methode zur Quantifizierung der Methylmalonsäure in Serum (oder auch Plasma) und Urin mittels LC/MS/MS (Liquid Chromatography Tandem-Massenspektrometrie) anbieten.

XIC (Extracted Ion Chromatogram) und Testspezifikationen siehe Rückseite.

Ionenstromchromatogramm (XIC)



Nach Zugabe eines deuterierten Standards und nach einer Festphasenextraktion werden die organischen Säuren von Matrixbestandteilen getrennt. Eine anschließende Derivatisierung erhöht die Selektivität der Methode und erlaubt es den Analyt hochspezifisch zu quantifizieren. Eine chromatographische Trennung gewährleistet zudem die vollständige Separation von Methylmalonsäure und des physiologisch vorkommenden Isomers Succinsäure. Zur Quantifizierung zieht man das extrahierte Ionenstromchromatogramm (XIC) heran. Die Abbildung A zeigt drei MRM-Übergänge; Abbildung B,C und D zeigt die Übergänge jeweils einzeln.

Testspezifikationen

Material: Serum (Alternativmaterial EDTA-, Heparinplasma);
 Urin
 Menge: 500 µl
 Methode: LC/MS/MS
 Frequenz: 2x pro Woche

Verantwortlich für den Inhalt

PD Dr. med. Lorenz Risch, MPH
 Dr. phil. II Manfred Zerlauth, FAMH Klinische Chemie,
 Hämatologie und Immunologie
 Martina Fanzun, Dipl. Chemikerin FH/NDS