

19. Bredie SJH, Kimeney LA, Haan AFJ de, Demacker PNM, Stalenhoef AFH. Inherited susceptibility determines the distribution of dense low density lipoprotein subfraction profiles in familial combined hyperlipidemia. Submitted for publication
20. Hoffer MJV, Bredie SJH et al. The lipoprotein (Asn291→Ser) mutation is associated with elevated lipid levels in families with familial combined hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis* 1995, in press.

### Summary

*Application of molecular biological methods to determine genetic traits in hyperlipoproteinemias. Demacker PNM, Bredie SJH and Stalenhoef AFH. Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 28-33.*

Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 33-36

## De bepaling van niet eiwit-gebonden 1,25-dihydroxyvitamine D in plasma met behulp van symmetrische dialyse

L.M.J.W. SWINKELS<sup>1</sup>, H.J.C. van HOOFF<sup>1</sup>, H.A. ROSS<sup>2</sup> en T.J. BENRAAD<sup>1</sup>

Slechts een klein deel van de totale concentratie 1,25 dihydroxy-vitamine D3 [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] in plasma circuleert in vrije vorm. Het grootste deel is gebonden aan plasma-eiwitten, met name aan vitamine-D bindend eiwit (DBP) en albumine.

Algemeen wordt aangenomen dat de fractie niet aan eiwit gebonden, ofwel 'vrij' hormoon de biologische activiteit bepaalt. Wij beschrijven een eenvoudig uitvoerbare dialyse-methode voor de bepaling van vrij 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in plasma. In deze "symmetrische" dialyse is de snelheid waarmee getritieerd 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> door een dialysemembraan migreert een functie van de grootte van de vrije fractie van het 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in plasma. Voor deze meting is slechts weinig tracer nodig. In tegenstelling tot evenwichts-dialyse en ultrafiltratie-technieken is het voor symmetrische dialyse niet noodzakelijk de tracer uitgebreid te zuiveren. De intra-assay variatie-coëfficiënt bedraagt 4,4 %; de interassay variatie-coëfficiënt 12,9%.

*Trefwoorden: vitamine D, cholecalciferol, vrij hormoon, biologische beschikbaarheid*

Actief 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> wordt gevormd door hydroxylering van vitamine D<sub>3</sub>. Vitamine D<sub>3</sub> ontstaat onder in-

*Laboratorium voor Endocrinologie en Voortplanting<sup>1</sup> en Afdeling Inwendige Geneeskunde, Endocriene Ziekten<sup>2</sup>, Academisch Ziekenhuis Nijmegen, St. Radboud.*

Naar een voordracht voor de Werkgemeenschap Klinische Chemie i.o., juni 1995

Correspondentie: Dr. L.M.J.W. Swinkels, Laboratorium voor Endocrinologie en Voortplanting, Academisch Ziekenhuis St. Radboud, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.  
Ingekomen: 16.10.95

In biomedical research there is a fruitful cooperation between the diagnostic possibilities and the increase in theoretical knowledge. This is very clear from the research on hyperlipoproteinemias. Due to motivated pioneers, it is now possible to detect various defects in the various genes involved in lipoprotein metabolism. It was a pleasure to follow this way of increasing diagnostic power, which was stimulated by the close cooperation of clinicians, clinical chemists and molecular biologists. After at least 20 years of hard working the possibilities and the horizons of these analyses emerge. To outline the possibilities of genetic analysis in the treatment of patients and in long term intervention programmes we have summarised our research results obtained in the preceding years.

*Key-words: lipoproteins, apoproteins, genetic analysis*

vloed van licht in de huid uit 7-dehydrocholesterol. De eerste stap in de activatie van het vitamine D<sub>3</sub>, de 25-hydroxylering, geschiedt in de lever. In de nier vindt vervolgens 1-hydroxylering tot 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> plaats. Het 25-hydroxy-vitamine D<sub>3</sub> en 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> kunnen gedeactiveerd worden door 24-hydroxylering. Dit gebeurt eveneens in de nier (1).

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> speelt een belangrijke rol in de calcium-homeostase en botstofwisseling. Het stimuleert de calcium-opname door de darm en remt de 1-hydroxylering van 25-hydroxy-vitamine D<sub>3</sub> in de nier. Evenals steroid- en schildklierhormonen circuleert 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in plasma gebonden aan een specifiek transport eiwit, het DBP, en aan albumine. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> heeft een lagere affiniteit voor DBP dan 25-hydroxy-vitamine D<sub>3</sub> (2). Vieth (3) berekende dat slechts 0,1% van het totale 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in plasma in vrije vorm circuleert.

Algemeen wordt aangenomen dat juist de concentratie van het niet-aan-eiwit-gebonden, "vrij" hormoon bepalend is voor de biologische activiteit (4). De radioreceptorassay voor de bepaling van 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> is onvoldoende gevoelig om de concentratie vrij 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> direct te meten. Men is aangewezen op de indirecte benadering, d.w.z. het meten van de vrije fractie (de verhouding vrij/totaal) 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> na toevoeging van een kleine hoeveelheid getritieerd 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Door vermenigvuldiging van de vrije fractie met de totale concentratie kan de vrije concentratie berekend worden.

Voor zover ons bekend bestaat er slechts één publikatie waarin een methode voor de bepaling van vrij 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> wordt beschreven (5). Deze bepaling in onverdund plasma is afgeleid van de centrifugale ultrafiltratie methode van Hammond et al (6). Koenig et al (7) stelde met deze methode vast, dat de vrije

fractie  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in plasma bij patiënten met nefrose, die DBP verliezen, groter is dan bij gezonde personen. Bij patiënten met vitamine D intoxicatie en een ernstige hypercalciëmie vonden Pettifor et al (8) een verhoogde spiegel van het vrij  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  bij een normale totale spiegel van dit hormoon.

Om een aantal later te bespreken redenen kan de centrifugale ultrafiltratie-methode vals verhoogde waarden opleveren.

Wij beschrijven een eenvoudig uitvoerbare en reproduceerbare dialyse-methode voor de bepaling van vrij  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in plasma. In deze symmetrische dialyse is de snelheid waarmee getritieerd  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  door een dialysemembraan migreert een functie van de grootte van de vrije fractie van het  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in plasma. Symmetrische dialyse werd eerder met succes toegepast voor de bepaling van vrij schildklierhormoon (9), vrij testosteron (10) en vrij progesteron en cortisol (11).

De meting van vrij  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zal in ons laboratorium onder andere toegepast worden in het onderzoek naar de vitamine D status bij postmenopauzale vrouwen tijdens hormoonsuppletie-therapie (12). Bij deze groep vrouwen is de spiegel van het DBP verhoogd zodat te verwachten is dat de concentratie van het vrij  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  een betere indruk geeft van de vitamine D status dan de totale concentratie van het  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .

## MATERIALEN en METHODEN

### Bepaling van de totale concentratie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

De totale concentratie  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in plasma werd gemeten met behulp van een radioreceptor assay na extractie en papierchromatografie van de monsters (13). De laagst aantoonbare concentratie met deze bepaling was 4 pmol/l. De intra-assay variatie-coëfficiënt was 10,5%. De inter-assay variatie-coëfficiënt was 11,5%. Bij gezonde volwassen vrijwilligers werden  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  spiegels gemeten van 80-200 pmol/l.

### Dialyse apparatuur

Voor de dialyse experimenten werd een "Dianorm" dialyse apparaat gebruikt (Dianorm GmbH, München, Duitsland). Met behulp van dit apparaat kunnen 20 dialysecellen, elk met een werkvolume van 2 x 1,0 ml, met constante snelheid geroteerd worden. Er werden Diachema dialyse-membranen (exclusie grens 10000 Dalton) gebruikt. Deze membranen werden vóór gebruik gespoeld in 50 mmol/l fosfaatbuffer, 0,1 mol/l NaCl met een pH van 7,40 (PBS).

### Evenwichts-dialyse

De vrije fractie  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in HSA referentiepreparaten werd vastgesteld met behulp van indirecte evenwichts-dialyse na toevoeging en equilibratie van een kleine hoeveelheid getritieerd  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Aan albumine (2, 4, 10 en 20% w/v in PBS) (OHRA 20/21, Behringwerke AG, Marburg, Duitsland) werd 2,0 KBq- $1,25$ -[26,27] $^3\text{H}$ -( $\text{OH})_2\text{D}_3$ , (NET 626, 6,3 TBq/mmol, NEN, Dupont de Nemours, Nederland) toegevoegd. Deze oplossing werd vervolgens gedialyseerd

tegen 1,0 ml PBS gedurende 4 uur bij 37 °C. De tracer werd vooraf gezuiverd met behulp van hogedruk vloeistofchromatografie (HPLC). De  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -piek bevat 93% van de totale radioactiviteit.

### Bepaling van vrij $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ met behulp van symmetrische dialyse

Voor de bepaling van de dialysesnelheid van monsters met behulp van symmetrische dialyse werd aan beide zijden van de dialyse-membraan een identiek plasma-monster gebracht. Aan het plasma aan één zijde van het membraan werd getritieerd  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  toegevoegd. De snelheid waarmee het radioactief gemerkt  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  van het ene dialysecompartiment naar het andere migreert, is gerelateerd aan de grootte van de vrije fractie van het  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  volgens de formule:

$$2(\text{AD}/V) \times f = -1/t \ln[(c_1 - c_2)/(c_1 + c_2)] \quad [1]$$

waarin:

$\text{AD}/V$  = de cel permeabiliteitsconstante

$A$  = membraan oppervlak

$D$  = membraan diffusieconstante

$V$  = monstervolume in het dialysesysteem

$t$  = dialysetijd (uren)

$c_1$  = concentratie van radioactiviteit in dialysecompartiment 1

$c_2$  = concentratie van radioactiviteit in dialysecompartiment 2.

De tracer-distributie ( $I$ ) in het systeem wordt aangegeven met:  $I = (c_1 - c_2)/(c_1 + c_2)$ ; de dialysesnelheid met  $U = (-1/t) \times \ln(I)$ , zodat  $U = 2(\text{AD}/V) \times f$ .

Uit deze formule volgt dat de tracerverdeling  $\ln(I)$  een lineaire functie is in de tijd ( $t$ ). Bovendien is de dialysesnelheid ( $U$ ) recht evenredig met de vrije fractie.

De vrije fractie  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ( $f_x$ ) van een monster kan bepaald worden door vergelijking van de dialysesnelheid van dit monster ( $U_x$ ) met de dialysesnelheid van een referentiemonster ( $U_r$ ) met bekende vrije fractie ( $f_r$ ), volgens de vergelijking is:  $f_x = (U_x/U_r) \times f_r$ .

Het referentiepreparaat bestond uit 1,0% w/v HSA in PBS. In elk experiment werd de dialysesnelheid van een dergelijk referentiepreparaat in duplo bepaald. Hiertoe werd één compartiment van de dialysecel gevuld met de HSA-oplossing en het andere compartiment met dezelfde oplossing waarin 0,15 kBq  $^3\text{H}$ - $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  opgenomen werd. Dialyse vond plaats in een waterbad bij 37 °C gedurende 16 uur.

Op overeenkomstige wijze werd de dialysesnelheid van monsters gemeten. Vóór dialyse werden de plasma-monsters 15 maal verdund in PBS. Door verdunning van het plasma wordt de vrije fractie overeenkomstig groter zodanig dat binnen een tijdsbestek van  $\pm 16$  uur 20-30% van de tracer vanuit het oorspronkelijke compartiment gemigreerd is. De vrije fractie van het oorspronkelijke, niet verdunde plasma werd herleid volgens formule (14):

$$f_o = 1/[(1/f - 1) \times V_r/V_o + 1] \quad [2]$$

waarin:

$f_0$  = de vrije fractie van het onverdunde monster  
 $f$  = de vrije fractie bepaald met symmetrische dialyse in verdund plasma  
 $V_1$  = het totaalvolume van het dialyse-systeem  
 $V_0$  = het oorspronkelijk volume van het plasma.

De vrije concentratie werd berekend door de vrije fractie ( $f_0$ ) te vermenigvuldigen met de totale concentratie 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in plasma.

## RESULTATEN

Uit formule [1] volgt dat de tracerverdeling  $-\ln(I)$  na symmetrische dialyse recht evenredig is met de dialysetijd ( $t$ ). In figuur 1 is het experimenteel vastgestelde verband tussen de tracerverdeling en de dialysetijd weergegeven na symmetrische dialyse van een oplossing van 1,0% HSA gedurende verschillende tijden. De helling van deze lijn is recht evenredig met de vrije fractie 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> van de HSA-oplossing.

Van een aantal oplossingen van HSA met een verschillende concentratie (resp. 1, 2, 5 en 10%) werd de dialysesnelheid ( $U$ ) gemeten. Van HSA-oplossingen van 2, 4, 10 en 20% werd de vrije fractie 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vastgesteld met behulp van indirecte evenwichts-dialyse. Na dialyse van deze oplossingen tegen een gelijk volume PBS heeft de gemeten vrije fractie betrekking op de werkelijke vrije fractie van oplossingen van 1, 2, 5 en 10%. Er bestaat een lineair verband tussen de dialysesnelheid en de vrije fractie 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in deze HSA oplossingen.

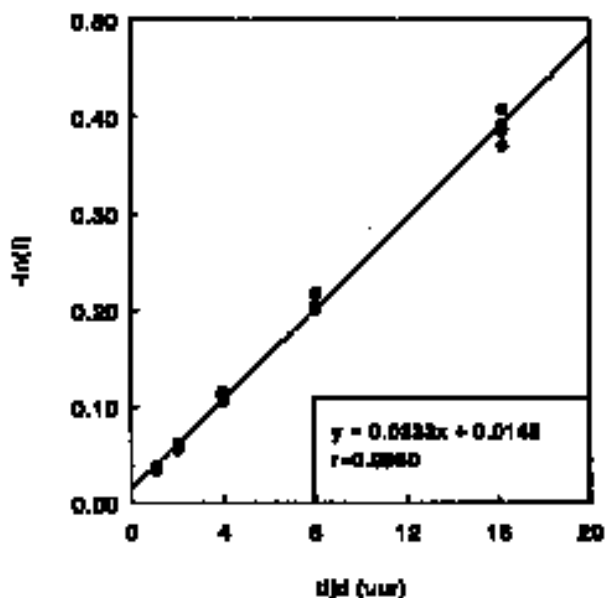
De intra-assay variatie-coëfficiënt van de meting van de vrije fractie met symmetrische dialyse bedroeg 4,4%. De interassay variatie-coëfficiënt was 12,9%. Bij een beperkt aantal gezonde vrijwilligers ( $n=9$ ) werd met behulp van de symmetrische dialyse een gemiddelde vrije fractie van  $0,046 \pm 0,003\%$  gemeten. De totale concentratie 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in plasma

bedroeg  $132 \pm 28$  pmol/l. De vrije concentratie was  $60 \pm 11$  fmol/l.

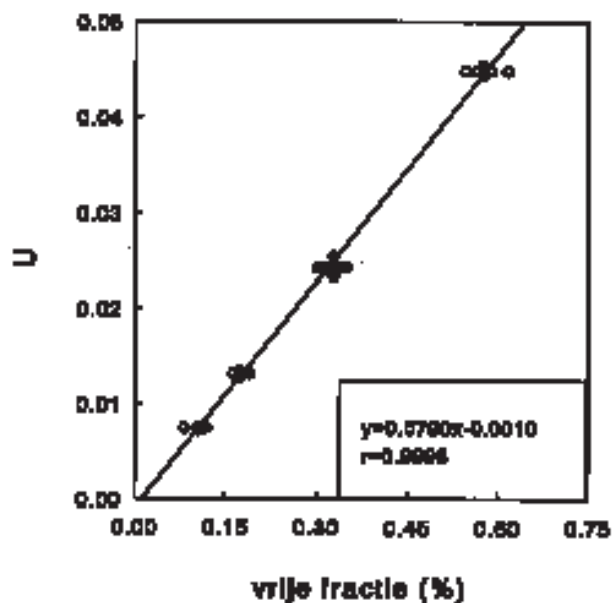
## DISCUSSIE

De vrije fractie 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in plasma is laag en de totale concentratie gering. Bovendien is de radioreceptorassay voor 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> relatief ongevoelig. Hierdoor is de directe bepaling van de concentratie vrij 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in dialysaat na evenwichts-dialyse of in ultrafiltraat na (centrifugale) ultrafiltratie niet mogelijk. Men is aangewezen op een indirecte benadering voor het vaststellen van de vrije fractie 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

Voor zover ons bekend is slechts één methode voor de bepaling van vrij 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> beschreven. Deze centrifugale ultrafiltratie, gebaseerd op de methode van Hammond et al (6), kent echter een aantal nadelen. Deze bepaling vereist zeer zuivere tracer; verontreiniging van de tracer met 0,1% kan al leiden tot overschatting van de vrije concentratie met 100%. Met name in onverdund plasma is het effect van uiterst geringe tracerverontreiniging derhalve zeer groot. Er wordt slechts weinig ultrafiltraat geproduceerd zodat grote hoeveelheden, zeer kostbare, tracer nodig zijn. De hoeveelheid die gebruikt wordt is zelfs groter dan de endogene concentratie, waardoor evenwichtsverschuivingen kunnen optreden, met als gevolg vals verhoogde vrij 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-waarden. Niettegenstaande deze grote hoeveelheden tracer laat de precisie te wensen over. Er werd een intra-assay variatie-coëfficiënt van 13% en een inter-assay variatie-coëfficiënt van 25% gerapporteerd (5). Door de centrifugale kracht kan eiwittek door het dialysemembraan optreden waardoor eveneens de vrije fractie overschat wordt.



**Figuur 1.** De tracerverdeling ( $-\ln(I)$ ) over beide dialysecompartimenten na symmetrische dialyse bij 37 °C is recht evenredig met de dialysetijd. Voor dit experiment werd gebruik gemaakt van een 1,0% w/v HSA-oplossing.



**Figuur 2.** De dialysesnelheid ( $U$ ) is recht evenredig met de vrije fractie 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> na symmetrische dialyse bij 37 °C. De vrije fractie in oplossingen van verschillende concentraties van HSA in 0,1M fosfaatbuffer, 0,1M NaCl, pH 7,4 werd bepaald met behulp van indirecte evenwichts-dialyse en HPLC gezuiverd <sup>3</sup>H-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

In figuur 1 en 2 wordt het theoretische model (vergelijking 1) experimenteel geverifieerd. Uit figuur 1 blijkt dat de tracerverdeling een functie is van de dialysetijd. In figuur 2 wordt aangetoond dat de dialysesnelheid recht evenredig is met de grootte van de vrije fractie. Deze laatste relatie werd vastgelegd door de dialysesnelheid van HSA-oplossingen te meten. De vrije fractie van deze HSA-oplossingen werd gemeten met behulp van indirecte evenwichtsdialyse. Hiervoor was het noodzakelijk het getitreeerde 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> met behulp van hogedruk vloeistofchromatografie te zuiveren. Aanvankelijk werd getracht het systeem te ijken met directe evenwichtsdialyse, algemeen beschouwd als de "gouden standaard". De hoeveelheid 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> die toegevoegd moet worden om een direct meetbare vrije concentratie te verkrijgen is echter zo groot dat deze niet meer oplost. Het ijken met behulp van indirecte evenwichtsdialyse en HSA-oplossingen geschiedt onder optimale omstandigheden zodat de meting toch betrouwbare resultaten oplevert.

Met behulp van de symmetrische dialyse worden een aantal nadelen, verbonden aan centrifugale ultrafiltratie omzeild. Het symmetrische dialyse-proces wordt beëindigd op een zodanig gekozen moment dat ongeveer 20-30% van de tracer vanuit het originele compartiment gemigreerd is. Naast de grotere precisie die hierdoor bereikt wordt is het voordeel hiervan dat de tracer niet gezuiverd hoeft te worden. Bovendien kan volstaan worden met een veel geringere hoeveelheid tracer: er is ongeveer 20 maal minder nodig dan voor centrifugale ultrafiltratie.

De intra- en interassay variatie-coëfficiënten van de symmetrische dialyse methode (respectievelijk 4,4% en 12,9%) zijn lager dan die van de centrifugale ultrafiltratie.

De vrije fractie 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> bij gezonde vrijwilligers, vastgesteld met behulp van symmetrische dialyse, is iets lager dan de waarden gerapporteerd door Vieth (3). Deze werden verkregen op basis van een experimenteel vastgestelde relatie tussen de bindingscapaciteit van het DBP en de vrije fractie van het 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Onze waarden zijn een factor tien lager dan die gemeten door Bikle et al (5) en Koenig et al (7). Deze discrepantie laat zich verklaren uit bovengenoemde nadelen verbonden aan de centrifugale ultrafiltratie methode.

De symmetrische dialyse methode biedt de mogelijkheid routinematig op reproduceerbare wijze vrij 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> te meten. De resultaten van metingen met deze methode zullen mogelijk meer licht werpen op de biologische activiteit van 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in plasma.

#### Literatuur

1. Bouillon R, Okamura WH, Norman AW. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev* 1995; 16:200-257.
2. Bouillon R, Balen H van. Transport of vitamin D: significance of free and total concentrations of the vitamin D metabolites. *Calcif Tissue Int* 1981; 33: 451-453.
3. Vieth R. Simple method for determining specific binding capacity of vitamin D-binding protein and its use to calculate the concentration of "free" 1,25-dihydroxyvitamin D. *Clin Chem* 1994; 40: 435-441.
4. Ekins R. Measurement of free hormones in blood. *Endocr Rev* 1990; 11: 5-46.
5. Bikle DD, Gee E, Galloran B, Haddad JG. Free 1,25-dihydroxyvitamin D levels in serum from normal subjects, pregnant subjects and subjects with liver disease. *J Clin Invest* 1984; 74: 1966-1971.
6. Hammond GL, Nisker JA, Jones LA, Siiteri PK. Estimation of the percentage of free steroid in undiluted serum by centrifugal ultrafiltration-dialysis. *J Biol Chem* 1980; 255: 5023-5026.
7. Koenig KG, Lindberg JS, Zerwekh JE, Padaling PK, Cushner HM, Copley JB. Free and total 1,25-dihydroxyvitamin D levels in subjects with renal disease. *Kidney Int* 1992; 41: 161-165.
8. Pettifor JM, Bikle DB, Cavaleros M, Zachen D, Kamdar MC, Ross FP. Serum levels of free 1,25-dihydroxyvitamin D in vitamin D toxicity. *Ann Int Med* 1995; 122: 511-513.
9. Ross HA. A dialysis rate method for the measurement of free iodothyronine and steroid hormones in blood. *Experientia* 1978; 34: 538-539.
10. Swinkels LMJW, Ross HA, Benraad TJ. A symmetric dialysis method for the determination of free testosterone in human plasma. *Clin Chim Acta* 1987; 165: 341-349.
11. Willcox DL, McColm SC, Arthur PG, Yovich JL. The application of rate dialysis to the determination of free steroids. *Anal Biochem* 1983; 135: 304-311.
12. Hoof HJC van, Mooren MJ van der, Swinkels LMJW, Rolland R, Benraad ThJ. Hormone replacement therapy increases serum 1,25-dihydroxyvitamin D: a 2-year prospective study. *Calcif Tissue Int* 1994; 55: 417-419.
13. Hoof HJC van, Swinkels LMJW, Stevenhagen JJ van, Berg H van den, Ross HA, Benraad TJ. Advantages of paper chromatography as a preparative step in the assay of 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Chrom* 1993; 621: 33-39.
14. Ross HA. Symmetric and equilibrium dialysis for the measurement of free iodothyronine and steroid hormones in blood. PhD thesis 1980. University of Nijmegen, The Netherlands.

#### Summary

*Determination of non-protein bound plasma 1,25-dihydroxyvitamin D by symmetric dialysis. Swinkels LMJW, Hoof HJC van, Ross HA and Benraad TJ. Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 33-36.*

Only a small fraction of the total concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] in plasma exists in the free form. The main part is bound to plasma proteins, mainly vitamin-D binding protein (DBP) and albumin.

It is generally accepted that the fraction of non-protein bound, free hormone reflects the biologically available hormone. We describe a dialysis method for the determination of plasma free 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> which is relatively easy to perform. In this 'symmetric' dialysis method the rate of transfer of tritiated 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> through a dialysis membrane is directly related to the free fraction of plasma 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. This method does not require extensive tracer purification which is necessary in indirect equilibrium dialysis and centrifugal ultrafiltration. Moreover it uses much less tracer. The intra-assay coefficient of variation is 4.4%; the interassay coefficient of variation 12.9%.

*Key-words: vitamin D; cholecalciferol; free hormones; bio-availability.*