

**Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure  
in Humanplasma und Leukozyten mit HPLC/UV und HPLC/EC:**

**Methodenentwicklung, Validierung und Anwendung**

Vom Fachbereich Chemie und Chemietechnik  
der Universität-Gesamthochschule Paderborn

zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften  
-Dr. rer. nat.-

genehmigte  
DISSERTATION

von Diplom-Chemiker

**JÖRG STEFFAN**

aus Liesborn

Paderborn 1999

Die vorliegende Arbeit wurde im Fach Angewandte Chemie in Zusammenarbeit mit dem Sportmedizinischen Institut der Universität-GH Paderborn (Leitung: Prof. Dr. med. H. Liesen/Prof. Dr. med. M. Weiß) in der Zeit von Januar 1996 bis April 1999 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Grote angefertigt.

Referent: Prof. Dr. M. Grote

Korreferent: Prof. Dr. G. Fels

Eingereicht am: 21.04.1999

Tag der mündlichen Prüfung: 26.05.1999

### **Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit:**

- (1) J. Steffan; M. Grote; M. Weiß; *A Simple and Universal HPLC-Assay for Determination of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Biological Samples - Method Development, Validation and Application to Routine Analyses*; Abstract: „2. International Conference on Natural Antioxidants and Anticarcinogenes in Nutrition, Health and Disease“; 24. - 27.06.1998; Helsinki/FIN
- (2) J. Steffan; M. Grote; M. Weiß; *Entwicklung, Validierung und Leistungsvergleich verschiedenen HPLC-Verfahren zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Blutplasma*; Posterpräsentation: „Analytica Conference '98“, 21. -24.04.1998; München
- (3) M. Grote; J. Steffan; H. Wollersen; M. Weiß; *Valid HPLC-Determination of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Biological Samples by Focussing on Analyte Stability*; *Pharma./Medical Applications 411*: „22. International Symposium on Chromatography“, 13. - 18.09.1998, Rom/I
- (4) M. Grote; J. Steffan; H. Wollersen; M. Weiß; *Determination of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Bood by HPLC/UV and HPLC/EC: Method Development, Validation and Application*; Posterpräsentation „23. International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, HPLC '99“, 30.05. - 04.06.1999, Granada/E
- (5) J. Steffan; H. Wollersen; M. Grote; M. Weiß; *Determination of L-Ascorbic Acid and Dehydro-L-ascorbic Acid in Human Bood Plasma and Leukocytes by HPLC: Method Development, Validation and Application*; „Journal of Chromatography B, Biomedical Sciences and Applications“, in Vorbereitung

**Meinen Eltern**

Herrn Prof. Dr. M. Grote danke ich für die interessante Themenstellung, seine stete Diskussionsbereitschaft und die engagierte Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. G. Fels danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. M. Weiß (Sportmedizinisches Institut der Universität-GH Paderborn) für die fachliche Beratung in medizinischen Fragestellungen.

Ein besonderer Dank gilt den vielen Freiwilligen, die durch Ihre Blutspende die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Ferner danke ich Herrn Prof Dr. med. H. Liesen (Sportmedizinisches Institut der Universität-GH Paderborn) für die Bereitstellung von Arbeitsmitteln. Weiterhin möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Sportmedizinischen Institutes für die freundliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit danken.

Der „Kommission für Forschung und wissenschaftlichen Nachwuchs“ der Universität-GH Paderborn danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Abschließend danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Faches Angewandte Chemie, insbesondere Conny, Glenn, Heike, Ilka, Jürgen und Tatiana, die durch Ihre Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

**Inhaltsverzeichnis****Seite**

	<b>Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole.....</b>	<b>VII</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung und Aufgabenstellung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Resorption, Transport, Verteilung und Wirkungsweise von Vitamin C im menschlichen Organismus .....</b>	<b>5</b>
2.1	Resorption, Transport und Verteilung .....	5
2.2	Wirkungsweise von Vitamin C .....	8
2.2.1	Wirkung als Radikalfänger .....	8
2.2.2	Wirkung als Cofaktor bei enzymatischen Reaktionen.....	12
2.2.3	Wirkungen auf das Immunsystem und bei der Karzinogenese .....	13
2.2.4	Beeinflussung der Eisen-Resorption und Ausscheidung toxischer Metalle .....	13
<b>3</b>	<b>Entwicklung von Analyseverfahren zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma .....</b>	<b>14</b>
3.1	Analytisch relevante chemische und physikalische Eigen- schaften von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure .....	14
3.1.1	L-Ascorbinsäure .....	14
3.1.2	Dehydro-L-ascorbinsäure .....	16
3.2	Bestimmung der L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbin- säure-Konzentration in Humanplasma .....	20
3.2.1	Überblick über literaturbekannte Bestimmungsverfahren .....	20
3.2.2	Allgemeiner Analysenablauf .....	22
3.3	Methodenentwicklung zur chromatographische Bestimmung der L-Ascorbinsäure-Konzentration .....	27
3.3.1	Auswahl des chromatographischen Systems .....	27
3.3.2	Optimierung der UV-Detektionsbedingungen .....	28
3.3.3	Optimierung der EC-Detektionsbedingungen .....	29

---

---

3.4	Optimierung der Probenvorbereitung zur Bestimmung der L-Ascorbinsäure-Konzentration .....	31
3.4.1	Blutentnahme und Plasmagewinnung .....	31
3.4.2	Abtrennung der im Blutplasma enthaltenen Proteine .....	31
3.4.3	Untersuchungen zur Stabilität von L-Ascorbinsäure .....	35
3.4.3.1	Einfluß verschiedener Proteinfällungsreagenzien auf die Stabilität von L-Ascorbinsäure in Meßproben .....	35
3.4.3.2	Langzeitstabilität von L-Ascorbinsäure in Heparin-Plasma und Meßproben .....	36
3.4.3.3	Stabilität von L-Ascorbinsäure in Kalibrierlösungen .....	37
3.5	Zusammenfassende Darstellung der optimierten analytischen Bedingungen zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Humanplasma .....	39
3.6	Indirekte Bestimmung der Dehydro-L-ascorbinsäure-Konzentration .....	41
3.6.1	Stabilisierung von Dehydro-L-ascorbinsäure .....	41
3.6.2	Optimierung der Reaktionsbedingungen bei der Reduktion von Dehydro-L-ascorbinsäure .....	41
3.6.3	Reduktion von Dehydro-L-ascorbinsäure in Gegenwart von L-Ascorbinsäure .....	44
3.7	Zusammenfassung der optimierten analytischen Bedingungen zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma .....	46
<b>4</b>	<b>Validierung der HPLC/UV- und HPLC/EC-Verfahren.....</b>	<b>49</b>
4.1	Validierung des HPLC/UV-Verfahrens zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Humanplasma .....	51
4.1.1	Linearer Bereich .....	53
4.1.1.1	Überprüfung der Kalibrierfunktion .....	52
4.1.1.2	Linearer Bereich des Analysenverfahrens bei Realproben.....	55
4.1.2	Nachweisgrenze .....	58
4.1.3	Präzision .....	59
4.1.3.1	Meßpräzision .....	59
4.1.3.2	Wiederholpräzision .....	60

---

---

4.1.3.3	Tag-zu-Tag-Präzision .....	61
4.1.4	Richtigkeit .....	62
4.1.5	Wiederfindung .....	63
4.1.6	Spezifität .....	64
4.1.6.1	Spezifitäts-Test durch Vergleich der UV-Spektren .....	66
4.1.6.2	Spezifitätstest durch Peaklöschung nach Behandlung einer Analysenprobe mit Ascorbat-Oxidase (EC 1.10.3.3) .....	66
4.1.7	Robustheit .....	69
4.1.7.1	Einfluß des Packungsmaterials der Trennsäule .....	69
4.1.7.2	Einfluß des pH-Wertes der mobilen Phase .....	70
4.1.7.3	Wiederholbarkeit der Kalibrierung .....	71
4.1.8	Zusammenfassung der Validierungsergebnisse für das HPLC/UV- Verfahren zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Humanplasma .....	72
4.2	Validierung des HPLC/UV-Verfahrens zur indirekten Bestimmung von Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma .....	75
4.2.1	Linearer Bereich .....	75
4.2.2	Präzision .....	75
4.2.2.1	Präzision der Analysenergebnisse bei der Bestimmung der Dehydro-L-ascorbinsäure-Konzentration in synthetischen Proben .....	76
4.2.2.2	Realproben (Blutplasma-Matrix) .....	77
4.2.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze .....	78
4.2.4	Richtigkeit .....	80
4.2.5	Wiederfindung von Dehydro-L-ascorbinsäure .....	80
4.2.6	Spezifität und Robustheit .....	81
4.2.7	Zusammenfassung der Validierungsergebnisse für das HPLC/UV-Verfahren zur indirekten Bestimmung von Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma .....	81
4.3	Validierung des HPLC/EC-Verfahrens zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma .....	83
4.4	Vergleich und Bewertung der Leistungsfähigkeit der HPLC/UV- und HPLC/EC-Verfahren.....	85
4.4.1	Vergleich anhand der Validierungsdaten .....	85
4.4.2	Vergleich der HPLC-Verfahren mit UV- und EC-Detektion anhand einer orthogonalen Regressionsanalyse .....	89

---

---

4.5	Zusammenfassung des Analysenablauf der validierten HPLC-Verfahren zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure- und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma .....	92
4.6	Zusammenfassende Bewertung der Validierungsergebnisse .....	93
<b>5</b>	<b>Bestimmung von L-Ascorbinsäure in mononukleären Leukozyten .....</b>	<b>95</b>
5.1	Literaturbekannte Bestimmungsverfahren .....	95
5.2	Bestimmung von L-Ascorbinsäure in mononukleären Leukozyten mittels HPLC/EC .....	98
5.2.1	Vereinfachung der Probenvorbereitung .....	98
5.2.2	Ermittlung der Stabilität von L-Ascorbinsäure in den Zell-Lysat-Proben .....	100
5.2.3	Validierung des Analysenverfahrens .....	102
5.2.3.1	Meßpräzision .....	102
5.2.3.2	Wiederholpräzision .....	103
5.2.3.3	Tag-zu-Tag-Präzision .....	104
5.2.3.4	Spezifität .....	105
5.3	Bestimmung der L-Ascorbinsäurekonzentration in mononukleären Leukozyten mittels HPLC/UV .....	107
5.4	Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure in mononukleären Leukozyten .....	109
<b>6</b>	<b>Anwendung der entwickelten HPLC-Verfahren mit UV- und EC-Detektion auf Problemstellungen der klinisch-chemischen Analytik .....</b>	<b>112</b>
6.1	Nachweis von Dehydro-L-ascorbinsäure im Blutplasma gesunder Menschen und Bestimmung der Dehydro-L-ascorbinsäure/L-Ascorbinsäure-Relation .....	112
6.2	Korrelation zwischen der L-Ascorbinsäure-Konzentration im Blutplasma und in mononukleären Leukozyten .....	114

---

---

6.3	Untersuchungen zur Änderung der L-Ascorbinsäure-Konzentration im Blutplasma bei körperlicher Belastung .....	116
6.4	Abschließende Bewertung der Anwendung der HPLC-Verfahren in der klinisch-chemischen Routineanalytik .....	119
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>120</b>
<b>8</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>124</b>
8.1	Verwendete Chemikalien .....	124
8.2	L-Ascorbinsäure Bestimmung mittels HPLC .....	125
8.2.1	Bestimmung von L-Ascorbinsäure mittels HPLC/UV .....	125
8.2.2	Bestimmung von L-Ascorbinsäure mittels HPLC/EC .....	126
8.2.3	Herstellung der mobilen Phase .....	127
8.2.4	Herstellung der Kalibrierlösungen.....	127
8.3	Hämatologische Untersuchungen.....	128
8.4	Methodenentwicklung .....	128
8.4.1	Optimierung der Detektionsbedingungen .....	128
8.4.2	Optimierung der Probenvorbereitung zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Humanplasma .....	129
8.4.3	Optimierung der Bestimmung von Dehydro-L-ascorbinsäure .....	132
8.5	Validierung des HPLC/UV-Verfahrens zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Humanplasma .....	134
8.5.1	Linearer Bereich .....	135
8.5.2	Nachweis- und Bestimmungsgrenze .....	136
8.5.3	Präzision .....	136
8.5.4	Richtigkeit .....	136
8.5.5	Wiederfindung für L-Ascorbinsäure .....	137
8.5.6	Spezifität .....	137
8.5.7	Robustheit.....	138

---

---

8.6	Validierung des HPLC/UV-Verfahrens zur indirekten Bestimmung von Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma .....	139
8.6.1	Ermittlung der Analysenpräzision bei der Bestimmung der Dehydro-L-ascorbinsäure-Konzentration in synthetischen Proben .....	139
8.6.2	Wiederfindung von Dehydro-L-ascorbinsäure aus Heparin-Plasma ...	139
8.7	Validierung des HPLC/EC-Verfahrens zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma .....	140
8.8	Vergleich der HPLC/UV- und HPLC/EC-Verfahren anhand einer orthogonalen Regressionsanalyse .....	140
8.9	Bestimmung von L-Ascorbinsäure in mononukleären Leukozyten .....	140
8.9.1	Probenvorbereitung .....	140
8.9.2	Bestimmung der Kurzzeit- und Langzeitstabilität von L-Ascorbinsäure in den Zell-Lysat-Proben .....	142
8.9.3	Validierung des HPLC/EC-Verfahrens zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure im Lysat der mononukleären Leukozyten.....	142
8.9.4	Bestimmung von L-Ascorbinsäure im Lysat der mononukleären Leukozyten mittels HPLC/UV .....	143
8.10	Anwendung der HPLC-Verfahren mit UV- und EC-Detektion auf Problemstellungen der klinisch-chemischen Analytik .....	143
8.10.1	Nachweis von Dehydro-L-ascorbinsäure im Blutplasma gesunder Menschen Bestimmung der Dehydro-L-ascorbinsäure/L-Ascorbinsäure-Relation .....	143
8.10.2	Korrelation zwischen der L-Ascorbinsäure-Konzentration im Blutplasma und in mononukleären Leukozyten .....	143
8.10.3	Untersuchungen zur Änderung der L-Ascorbinsäure-Konzentration im Blutplasma bei körperlicher Belastung .....	144
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>145</b>

## **Anhang**

---

**Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole**

AA	L-Ascorbinsäure
DHAA	Dehydro-L-ascorbinsäure
DTT	Dithiothreitol
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPLC/EC	Hochleistungsflüssigchromatographie mit elektrochemischer Detektion
HPLC/UV	Hochleistungsflüssigchromatographie mit UV-Detektion
MN	Mononukleäre Leukozyten
c	Stoffmengenkonzentration
n	Anzahl der Messungen
s	Standardabweichung
$s_{rel}$	relative Standardabweichung
W	Wiederfindung
$\bar{x}$	Mittelwert
$\beta$	Massenkonzentration

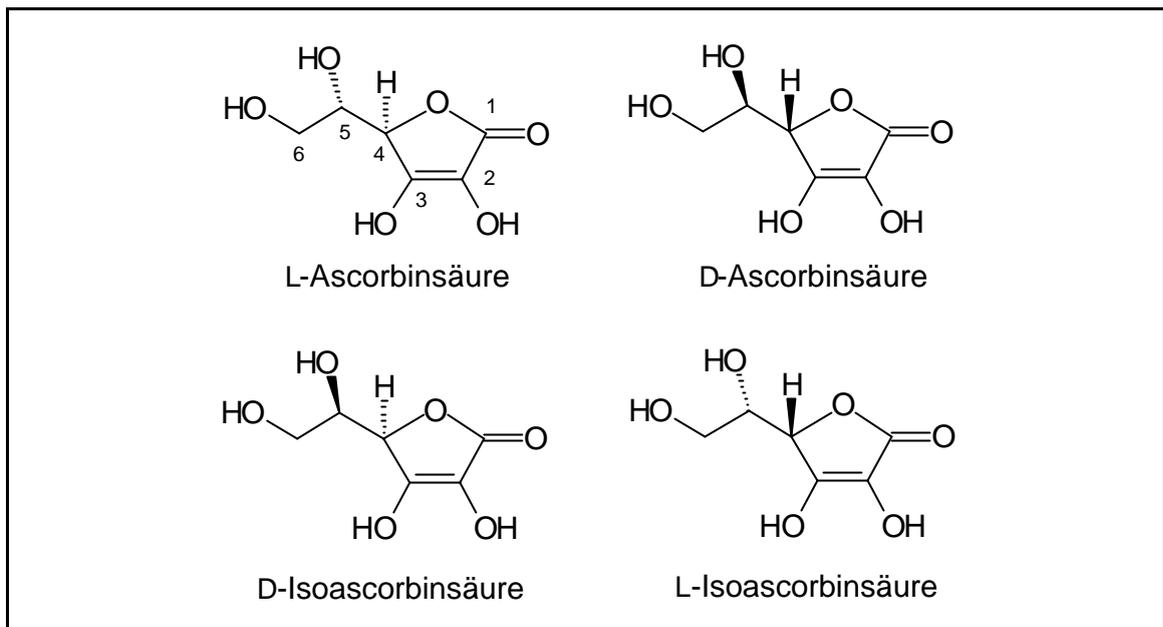
---

## 1 Einleitung und Aufgabenstellung

Unter den Vitaminen nimmt das Vitamin C eine herausragende Stellung ein, da es an zahlreichen biochemischen Prozessen im menschlichen Organismus beteiligt ist. Die Bezeichnung „Vitamin C“ gilt dabei für alle Verbindungen, die die biologische Wirkung von L-Ascorbinsäure (IUPAC-Bezeichnung: (R)-5-[(S)-Dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxy-5H-furan-2-on, s. **Abb. 1.1**) entfalten. Dazu zählt neben der L-Ascorbinsäure (AA) selbst auch ihre oxidierte Form, die Dehydro-L-ascorbinsäure (DHAA), sowie einige weitere Isomere und Derivate wie z. B. die D-Isoascorbinsäure (s. **Abb. 1.1**). Im Vergleich zu L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure zeigen diese Isomere und Derivate jedoch nur eine sehr geringe biologische Aktivität [1-3].

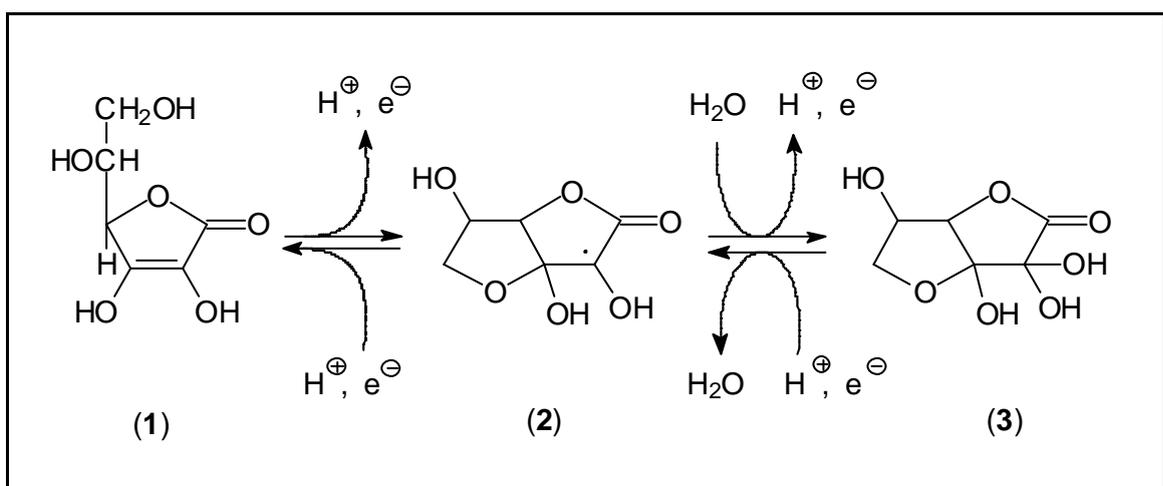
L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure bilden ein Redoxgleichgewicht, bei dem Monodehydro-L-ascorbinsäure als radikalische Zwischenstufe auftritt (s. **Abb. 1.2**). Aufgrund der reduzierenden Eigenschaften von L-Ascorbinsäure und der Bildung des Monodehydro-L-ascorbinsäure-Radikals im Verlauf der Oxidation besitzt Vitamin C -neben der seit langem bekannten antiskorbutischen Aktivität- auch eine Wirkung als Antioxidans bzw. Radikal-Fänger. L-Ascorbinsäure leistet damit einen wichtigen Beitrag zum antioxidativen Schutzsystem des menschlichen Körpers, welches diesen vor Schäden durch freie Radikale und reaktive Sauerstoff-Spezies (z. B.  $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO^{\cdot}$ ) schützt. Vitamin C spielt daher eine wichtige Rolle bei der Verhinderung der Lipidperoxidation, der Prävention von Herz-Kreislauf-Erkrankungen (z. B. Arteriosklerose), der Bildung eines Katarakts („Grauer Star“) und bei der Entstehung von Magenkarzinomen. Ferner wirkt L-Ascorbinsäure als Cofaktor verschiedener Enzyme, die an zahlreichen Hydroxylierungsreaktionen im menschlichen Körper beteiligt sind. Aufgrund seiner komplexbildenden Eigenschaften verbessert L-Ascorbinsäure die Eisen-Resorption aus der Nahrung [1, 4-7].

Zur Beurteilung des Versorgungszustandes eines Menschen mit Vitamin C wird die AA-Konzentration im Blutplasma und in den Leukozyten herangezogen. Während die AA-Konzentration im Blutplasma Aussagen über die kurzfristige Vitamin C-Versorgung eines Menschen erlaubt, wird durch die AA-Konzentration in den Leukozyten der Versorgungszustand der Gewebe, d. h. die längerfristige Versorgungssituation, wiedergegeben [1, 3, 8]. So wurden bei bestimmten Risikogruppen, wie z. B. Rauchern, älteren Menschen und



**Abb. 1.1:** Isomere der Ascorbinsäure

Patienten nach chirurgischen Eingriffen, deutlich niedrigere AA-Konzentrationen im Blutplasma und in den Leukozyten ermittelt als bei entsprechenden Vergleichsgruppen [5, 7, 9-11]. Des Weiteren ist bei der Beurteilung des Gesundheitszustandes eines Menschen das Verhältnis der Konzentrationen von Dehydro-L-ascorbinsäure zu L-Ascorbinsäure (im Folgenden als „DHAA/AA-Relation“ bezeichnet) von Bedeutung [3]. Bei Erkrankungen wie z. B. Meningitis, Tetanus und rheumatoider Arthritis soll die DHAA/AA-Relation stark zugunsten der Dehydro-L-ascorbinsäure verschoben sein [12, 13].



**Abb. 1.2:** Redoxgleichgewichte zwischen L-Ascorbinsäure (1), Monodehydro-L-ascorbinsäure (2) und Dehydro-L-ascorbinsäure (3)

Dagegen liegt sie beim Gesunden stark auf der Seite der L-Ascorbinsäure, wobei jedoch zum Teil widersprüchliche Angaben über die im Blutplasma vorkommende DHAA-Konzentration vorliegen. Nach Untersuchungsergebnissen verschiedener Autoren beträgt der DHAA-Anteil 7% bis 20 % der Gesamtascorbinsäure-Konzentration (Summe der Konzentrationen von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure) [14-18]. Im Gegensatz hierzu geben IWASE/ONO [19], DHARIWAL et al. [20] und OKAMURA [21] an, daß keine Dehydro-L-ascorbinsäure in Blutplasma gesunder Probanden nachweisbar ist.

Nach kritischer Durchsicht der Literatur sind die Ursachen für diese widersprüchlichen Angaben in methodischen Defiziten bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure zu suchen, wobei insbesondere die unzureichende Untersuchung der Analytstabilität und unvollständige Validierung der Bestimmungsverfahren zu nennen sind. Zur Ermittlung der AA- und DHAA-Konzentration in Humanplasma werden in klinisch-chemischen Routinelaboratorien häufig photometrische Bestimmungsverfahren eingesetzt [22]. Diese zeichnen sich jedoch durch eine aufwendige Probenvorbereitung, hohe Bestimmungsgrenze für L-Ascorbinsäure (3 nmol/Probe) und geringe Spezifität aus [23]. Im Gegensatz dazu werden mit HPLC-Verfahren niedrige Bestimmungsgrenzen (z. B. 1 pmol/Injektion bei der HPLC/EC) und eine hohe Spezifität erreicht [23]. Diese Verfahren werden jedoch bisher in klinisch-chemischen Routinelaboratorien nur selten eingesetzt [22]. Die methodischen Defizite in der Vitamin C-Analytik werden auch durch einen Ringversuch deutlich, bei dem die von den beteiligten Laboratorien ermittelten Meßergebnisse zum Teil große Abweichungen (>100 %) zu den Sollwerten der AA-Konzentration in den Plasma-Proben aufweisen [24]. Aus diesen Ergebnissen resultiert die Notwendigkeit einer Validierung der zur Ermittlung der AA- und DHAA-Konzentration in Humanplasma eingesetzten Bestimmungsverfahren. In den „Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien“ [25] werden zur laborinternen Qualitätskontrolle nur die Kriterien Richtigkeit und Tag-zu-Tag-Präzision sowie Ringversuche zur externen Qualitätskontrolle herangezogen. Im Vergleich dazu ist bei Analyseverfahren aus dem Bereich der Umweltanalytik (z. B. „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser- und Abwasser- und Schlammuntersuchung“ [26]) die Bestimmung zusätzlicher Validierungselemente, wie z. B. Bestimmungsnachweisgrenze und linearer Bereich, zum Nachweis der Zuverlässigkeit der Analyseergebnisse vorgeschrieben. Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit

---

wird daher die ausführliche Validierung der zu erstellenden Analysenverfahren, um damit die methodischen Defizite und somit die Ursachen für die oben angeführten widersprüchlichen Aussagen zu erkennen und gegebenenfalls zu beheben.

Daher verfolgt diese Arbeit die folgenden Ziele:

- (1) Entwicklung von HPLC/UV- und HPLC/EC-Verfahren zur quantitativen Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma und Leukozyten (Optimierung der Probenvorbereitung, chromatographischen Trennung und Detektionsbedingungen unter besonderer Berücksichtigung der Analyt-Stabilität)
  - (2) Validierung und Leistungsvergleich der optimierten Analysenverfahren anhand folgender Parameter: Linearer Bereich, Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze, Meßpräzision, Methodenpräzision, Tag-zu-Tag-Präzision, Richtigkeit, Spezifität und Robustheit
  - (3) Anwendung der HPLC-Verfahren auf ausgewählte Problemstellungen aus dem Bereich der klinisch-chemischen Routineanalytik:
    - Bestimmung der DHAA/AA-Relation im Blutplasma gesunder Probanden (Dabei ist besonders die Fragestellung, ob der DHAA-Anteil mit indirekten HPLC-Verfahren bestimmbar ist, von Interesse.)
    - Ermittlung einer Korrelation zwischen der AA-Konzentration im Blutplasma und in Leukozyten
    - Untersuchungen zur Auswirkung von Kurzzeitbelastungen auf die AA-Konzentration im Blutplasma
-

## 2 Resorption, Transport, Verteilung und Wirkungsweise von Vitamin C im menschlichen Organismus

### 2.1 Resorption, Transport und Verteilung

Da Vitamin C als essentielles Vitamin vom menschlichen Körper nicht selbst synthetisiert werden kann, muß es über die Nahrung aufgenommen werden. Die **Resorption** von L-Ascorbinsäure erfolgt zum Teil durch die Mundschleimhaut in einem passiv katalysierten Prozeß mit hoher Transportkapazität. Desgleichen wird Dehydro-L-ascorbinsäure mit Hilfe eines weiteren spezifischen Trägers, der nicht mit dem für L-Ascorbinsäure identisch ist, aufgenommen [4]. Der Hauptanteil an L-Ascorbinsäure wird jedoch über den Dünndarm durch einen aktiven Transportvorgang resorbiert. Erst bei höheren AA-Konzentrationen erfolgt die Aufnahme durch Diffusion [4]. Anschließend wird das Vitamin C mit Hilfe des Blutkreislaufes weiter transportiert, wobei es sich vor allem in Organen und Geweben mit intensivem Stoffwechsel anreichert (s. **Tab. 2.1**).

Aufgrund der Transportfunktion für Vitamin C kommt dem **Blut** eine besondere Bedeutung zu. Vollblut besteht zu ca. 55 % aus flüssigen Bestandteilen (Blut-

**Tab. 2.1:** Durchschnittliche AA-Konzentration in Organen, Geweben und Körperflüssigkeiten des gesunden erwachsenen Menschen [14, 27, 28]

<b>Organe, Gewebe bzw. Körperflüssigkeiten</b>	<b>AA-Konzentration [mg/kg]</b>
Hypophyse	400 - 500
Nebennieren	300 - 400
Augenlinsen	250 - 310
Hirn	130 - 160
Leber	100 - 160
Nieren	50 - 150
Herzmuskel	50 - 150
Skelettmuskel	30 - 40
Urin	18 - 46
Blutplasma	3 - 14

plasma) und zu ca. 45 % aus korpuskulären Bestandteilen (Blutkörperchen). Das Blutplasma enthält neben Wasser, Eiweißkörpern und Ionen auch Nahrungsstoffe, Immunkörper, Hormone sowie Enzyme. Bei den Blutkörperchen kann zwischen verschiedenen Zelltypen wie Erythrozyten (rote Blutkörperchen), Thrombozyten (Blutplättchen), Retikulozyten (Vorstufe der Erythrozyten) und Leukozyten (weiße Blutkörperchen) unterschieden werden (s. **Tab. 2.2**). Die Leukozyten lassen eine weitere Unterteilung in Granulozyten (65 % - 75 %), Lymphozyten (20 % - 30 %) und Monozyten (2 % - 6 %) zu, wobei die Lymphozyten und Monozyten unter der Bezeichnung „mononukleäre Leukozyten“ zusammengefaßt werden.

Vitamin C ist sowohl im Blutplasma als auch in den korpuskulären Bestandteilen des Blutes enthalten. Die durchschnittliche AA-Konzentration im **Blutplasma** beträgt bei gesunden erwachsenen Menschen 3 mg/L bis 14 mg/L (s. **Tab. 2.1**). Bedingt durch den pH-Wert des Blutes (pH = 7,38 bis 7,42 [29]) liegt dabei die L-Ascorbinsäure ( $pK_{a1} = 4,17$  [30]) zu >99 % als Ascorbat-Monoanion vor. Weiterhin existieren Hinweise, daß L-Ascorbinsäure in Blutplasma nicht an Proteine gebunden ist [20]. BIESALSKI et al. [4] geben jedoch einen proteingebundenen AA-Anteil von ca. 24 % an. Über die DHAA-Konzentration im Blutplasma sind, wie bereits in **Kapitel 1** beschrieben, ebenfalls unterschiedliche Aussagen in der Literatur zu finden; sie soll maximal 20 % der Gesamtascorbinsäure-Konzentration betragen.

Wie aus **Tab 2.3** deutlich wird, enthalten die **korpuskulären Bestandteile** des Blutes stark unterschiedliche AA-Konzentrationen. Während die AA-Konzentration in den Erythrozyten etwa der des Blutplasmas entspricht, ist die Konzentration in den mononukleären Leukozyten ca. um den Faktor 80 größer.

**Tab. 2.2:** Häufigkeit der verschiedenen Zelltypen im Vollblut eines gesunden erwachsenen Menschen [29]

Zelltyp	Anzahl [ $10^6$ Zellen/mL]
Erythrozyten	4200 - 6200
Thrombozyten	150 - 400
Retikulozyten	34 - 62
Leukozyten	5 - 10

**Tab. 2.3:** Durchschnittliche AA-Konzentration in verschiedenen Kompartimenten des menschlichen Blutes [8, 31, 32]

Blutkompartimente	AA-Konzentration	
	[mg/L] <sup>(1)</sup>	[µg/10 <sup>8</sup> Zellen]
Plasma	3 - 14	-
Erythrozyten	5 - 10	0,04 - 0,09
Thrombozyten	190 - 475	0,30 - 0,80
Leukozyten		
Granulozyten	150 - 260	6,90 - 11,80
Mononukleäre Leukozyten	100 - 1500	3,00 - 53,00

<sup>(1)</sup> berechnet nach Literaturangaben [8, 31, 32]

Bei der Beurteilung des Versorgungszustandes eines Menschen mit L-Ascorbinsäure sind neben den unterschiedlichen AA-Konzentrationen der Blutbestandteile auch deren unterschiedliche Anteile am Vollblut zu berücksichtigen (**Tab. 2.2**), die zudem einer großen biologischen Variabilität unterliegen.

Aufgrund der deutlich unterschiedlichen AA-Konzentrationen in den Leukozyten und Erythrozyten, wurde versucht, die Transportmechanismen für L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in diese Zellen aufzuklären. Dabei konnten folgende Transportprozesse nachgewiesen werden: Die Aufnahme von AA und DHAA in die **Erythrozyten** erfolgt jeweils durch katalysierten Transport, wobei der AA-Transporter eine hohe Spezifität aufweist [33, 34]. Der Fluß von Dehydro-L-ascorbinsäure in die Erythrozyten ist etwa zehnmals größer als der der L-Ascorbinsäure. Innerhalb der Erythrozyten wird die Dehydro-L-ascorbinsäure sofort zu L-Ascorbinsäure reduziert [33, 35].

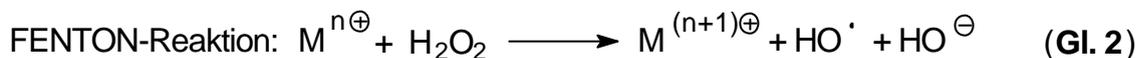
Die Aufnahme von L-Ascorbinsäure in die **Leukozyten** wurde am Beispiel der Lymphozyten [36] und neutrophilen Granulozyten (durch neutrale Farbstoffe anfärbbare Granulozyten) [37, 38] untersucht. Im Gegensatz zum AA-Transport in die Erythrozyten besteht der Mechanismus für den Transport von L-Ascorbinsäure in die Lymphozyten aus zwei Komponenten: einem katalysierten Transport, der die Anreicherung der L-Ascorbinsäure gegen den Konzentrationsgradienten ermöglicht und einem nichtkatalysierten Transportprozess, der aber nicht allein auf Diffusion zurückzuführen ist. Der AA-Transport in die neutrophilen Granulozyten erfolgt vermutlich in Form von Dehydro-L-ascorbinsäure die extrazellulär in geringen Konzentrationen gebildet und im

Inneren der Zellen sofort wieder reduziert wird. Vitamin C wird also hauptsächlich in Form von Dehydro-L-ascorbinsäure in die Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten transportiert, wobei diese im Zellinneren sofort zu L-Ascorbinsäure reduziert wird.

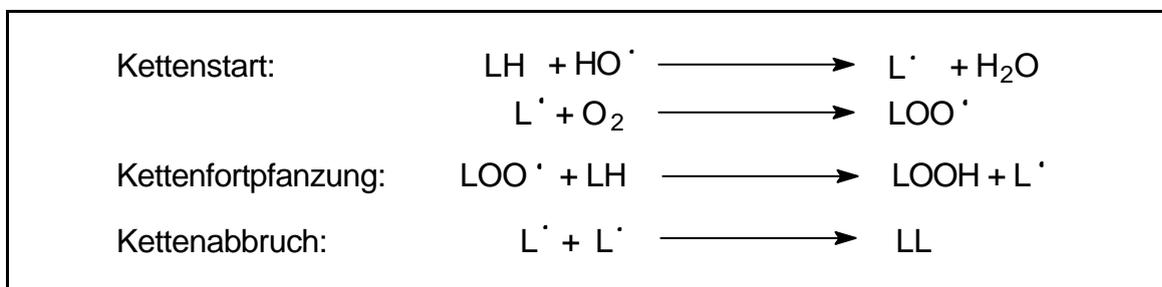
## 2.2 Wirkungsweise von Vitamin C

### 2.2.1 Wirkung als Radikalfänger

Eine der wichtigsten Aufgaben von Vitamin C im menschlichen Körper sind die Funktionen als Fänger freier Radikale und beim Abbruch radikalischer Kettenreaktionen. Unter den freien Radikalen sind besonders die reaktiven Sauerstoff-Spezies  $O_2^{\cdot -}$  (Superoxid-Radikalanion),  $HO^{\cdot}$  (Hydroxyl-Radikal) und  $^1O_2$  (Singulett-Sauerstoff) hervorzuheben [39, 40]. Diese entstehen im menschlichen Organismus z. B. durch Einwirkung energiereicher Strahlung (UV-Licht) und bei Stoffwechselprozessen in den Mitochondrien sowie Phagozyten („Freßzellen“). Das in den Mitochondrien und Phagozyten gebildete Superoxid-Radikalanion wirkt selbst toxisch, kann aber auch zur Bildung des Hydroxyl-Radikals beitragen. Dieses wiederum reagiert zu Wasserstoffperoxid, welches in Gegenwart von Übergangsmetall-Ionen durch eine FENTON-Reaktion (**Gl. 2**) erneut Hydroxyl-Radikale erzeugt [41].



Die extrem reaktiven Hydroxyl-Radikale sind in der Lage, die Lipidperoxidation (**Abb. 2.1**) zu initiieren. Diese führt zu einer **Zerstörung von Zellmembranen** und Bildung von toxischen Nebenprodukten [41]. Ferner ist die Lipidperoxidation bei der **Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen** (z. B. Arteriosklerose) von Bedeutung [42].



**Abb. 2.1:** Mechanismus der Lipidperoxidation (L = mehrfach ungesättigte Fettsäure) [41]

### **Schutz biologischer Membranen**

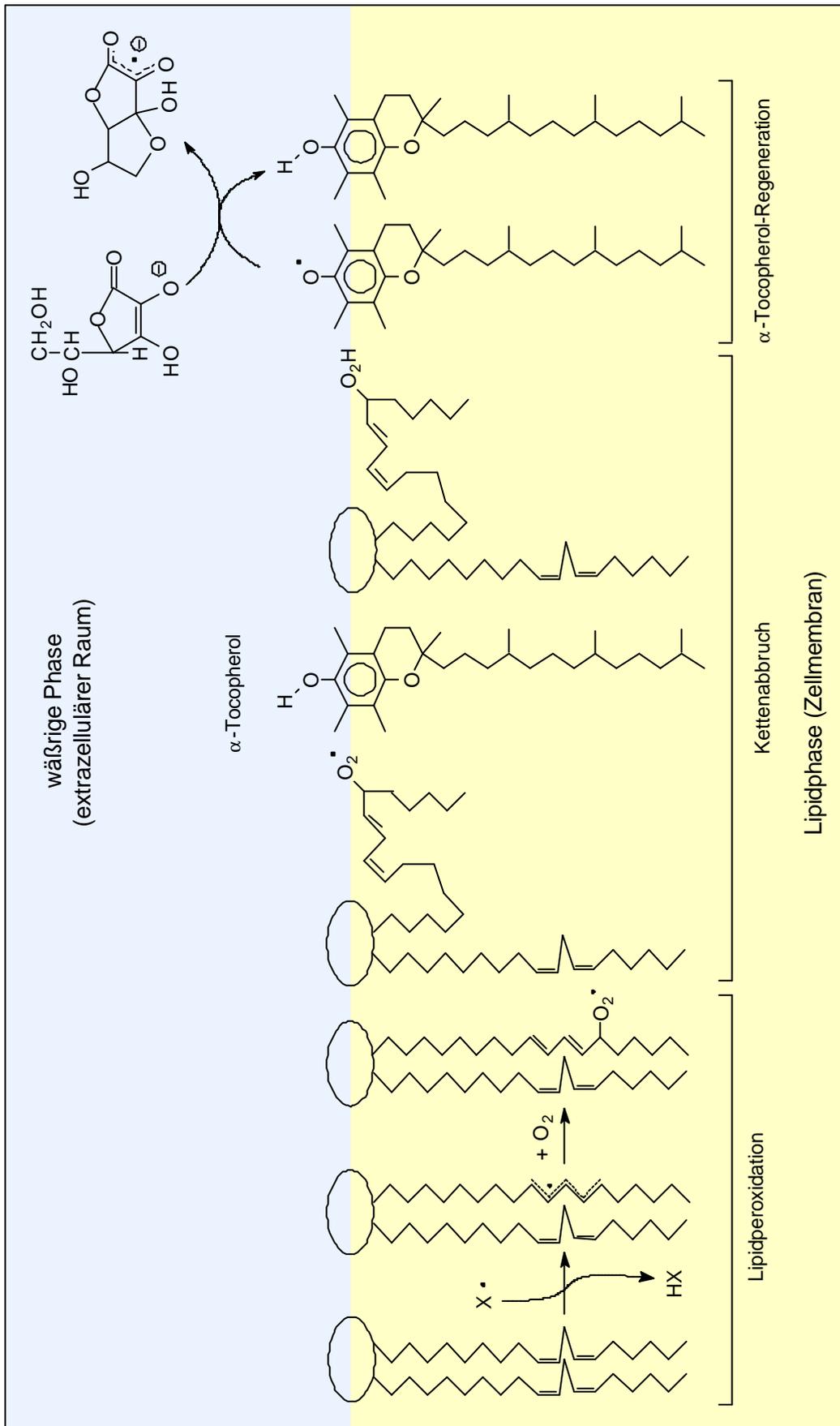
Vitamin C spielt eine wichtige Rolle beim Schutz biologischer Membranen vor Schäden durch die Lipidperoxidation. Dabei wirkt Vitamin C synergetisch mit dem fettlöslichen  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E), welches die eigentliche Rolle als Radikal-Fänger innerhalb der Zellmembran übernimmt. In **Abb. 2.2** ist schematisch ein Ausschnitt aus einer Zellmembran dargestellt. Die zur Stabilisierung der Membran enthaltenen  $\alpha$ -Tocopherol-Moleküle bewirken durch Abbruch der Radikal-Kettenreaktion bzw. Abfangen von Singulett-Sauerstoff eine Begrenzung der Lipidperoxidation. Da aber auf 1000 Moleküle der ungesättigten Fettsäuren nur 0,5 - 3 Tocopherol-Moleküle entfallen, kommt deren Regenerierung eine große Bedeutung zu. Diese Aufgabe wird von L-Ascorbinsäure übernommen, die in der wässrigen Phase außerhalb der Zellmembran gelöst ist [43].

### **Prävention von Herz-Kreislauf-Erkrankungen**

Im Rahmen verschiedener Studien zu Herz-Kreislauf-Erkrankungen konnte gezeigt werden, daß bei Patienten mit Arteriosklerose geringere AA-Konzentrationen im Blutplasma und den Leukozyten auftreten als bei gesunden Probanden einer Kontrollgruppe [1]. Die Entstehung von Arteriosklerose beginnt mit einer Störung der arteriellen Endothelfunktion. Die daraus resultierende Desintegrität der inneren Arterienwandung fördert die intra-zelluläre Lipidablagerung. Als Folgen treten Wandverdickungen, die Bildung von Plaque und sekundäre Plättchenablagerungen mit Thrombenbildung auf, die schließlich einen vollkommenen Verschuß der Arterie bewirken können. Ein plötzlicher Verschuß der Koronararterien führt so zum Herzinfarkt.

Der molekulare Mechanismus bei der Entstehung von Arteriosklerose ist noch nicht vollständig geklärt. Folgende Schritte können jedoch als gesichert angesehen werden [42]: Zur Lipidversorgung der Zellen wird ständig LDL (Low Density Lipoprotein) durch das Endothel der Arterien hindurchgeschleust und gelangt in den subendothelialen Raum, wo es durch eingewanderte Monozyten, die sich zu Makrophagen umwandeln, aufgenommen und aus der Gefäßwand eliminiert wird. Bei Überlastung dieses Vorganges (z. B. durch ein erhöhtes LDL-Angebot oder eine gesteigerte Durchlässigkeit des Endothels) kommt es aufgrund der langen Verweildauer des LDL im subendothelialen Raum zu dessen Oxidation durch freie Radikale. Oxidiertes LDL bewirkt, daß

---



**Abb.2.2:** Schematische Darstellung der Lipidperoxidation in biologischen Membranen: Kettenabbruch durch Tocopherol und dessen Regeneration durch L-Ascorbinsäure [43]



weitere Makrophagen in den subendothelialen Raum eindringen und unkontrolliert oxidiertes LDL aufnehmen. Dabei setzen die Makrophagen zunehmend Sauerstoff-Radikale frei, die weiteres LDL oxidieren und damit zur Bildung von Plaque und sekundären Endothelschäden führen. L-Ascorbinsäure wirkt hier als Radikalfänger und schützt das LDL vor der Oxidation durch freie Sauerstoff-Radikale.

Neben den antioxidativen Eigenschaften sind aber auch prooxidative Eigenschaften der L-Ascorbinsäure bekannt [44]. In Gegenwart von Übergangsmetall-Ionen (z. B. Cu(II), Fe(III)) und L-Ascorbinsäure sollte die Lipidperoxidation begünstigt werden, da durch L-Ascorbinsäure die Reduktion der Übergangsmetall-Ionen ( $M^{(n+1)+} + e^- \rightarrow M^{n+}$ ) und durch Autoxidation die Bildung von Wassertoffperoxid erfolgt. Diese Reaktionsprodukte führen durch die FENTON-Reaktion (s. **Gl. 2**) zur Bildung der extrem reaktiven Hydroxyl-Radikale, die wie beschrieben, die Oxidation von LDL bewirken. Ferner wirken die Übergangsmetall-Ionen selbst katalytisch auf die Oxidation von LDL [44]. *In vitro*-Experimente ergaben jedoch, daß in Gegenwart von Cu(II)-Ionen und L-Ascorbinsäure keine Oxidation des LDL eintritt [44]. Dieser Effekt wird auf die Unterdrückung der als Vorstufe zur Oxidation dienenden Bindung von Cu(II)-Ionen an LDL durch Dehydro-L-ascorbinsäure zurückgeführt. L-Ascorbinsäure selbst ist nicht in der Lage, die durch Übergangsmetalle begünstigte Oxidation von LDL zu verhindern. Die präventive Wirkung von Vitamin C bei der Entstehung von Arteriosklerose beruht daher auf der Radikalfänger-Wirkung von L-Ascorbinsäure und auf der Verhinderung der Übergangsmetall-katalysierten Oxidation von LDL durch Dehydro-L-ascorbinsäure.

### **Präventive Wirkung bei der Katarakt-Bildung**

Die Bildung eines Kataraktes („Grauer Star“), d. h. die Eintrübung der Augenlinse, ist auf die Oxidation und Polymerisation von Proteinen durch freie Radikale in der Augenlinse zurückzuführen. Diese werden durch die ständige Exposition gegenüber UV-Licht gebildet. Die Verhinderung der Katarakt-Bildung durch L-Ascorbinsäure beruht auf deren Funktion als Fänger freier Radikale. In der Augenlinse liegt L-Ascorbinsäure daher in sehr hohen Konzentrationen vor (s. **Tab. 2.1**). Bei Patienten mit Katarakt wurde im Vergleich zu gesunden Probanden eine um mehr als die Hälfte reduzierte AA-Konzentration in der Augenlinse festgestellt [5, 7].

---

### 2.2.2 Wirkung als Cofaktor bei enzymatischen Reaktionen

Aufgrund ihrer Funktion als Elektronendonator ist L-Ascorbinsäure als Cofaktor an zahlreichen enzymatischen Reaktionen beteiligt (s. **Tab. 2.4**). Die dabei gebildeten Substanzen übernehmen wichtige Aufgaben im menschlichen Körper, z. B. Kollagen als Stützsubstanz beim Aufbau der Gewebestrukturen von Knochen, Zähnen, Haut und Blutgefäßen, Carnitin als Trägersubstanz beim Fettsäure-Stoffwechsel und Noradrenalin als Neurotransmitter. Weiterhin ist L-Ascorbinsäure als Cofaktor am Abbau toxischer Substanzen (z. B. Ethanol, Benzol, Tetrachlormethan und polychlorierten Biphenylen) durch die in den Lebermikrosomen lokalisierten mischfunktionellen Oxidasen (z. B. Zytochrom P450) und den dabei notwendigen Hydroxylierungsreaktionen von Bedeutung. Es wird vermutet, daß L-Ascorbinsäure sowohl die Synthese des Zytochrom P450 stimuliert als auch vor dessen Inaktivierung durch Sauerstoff-Radikale schützt [4, 45].

**Tab. 2.4:** Enzymreaktionen, die L-Ascorbinsäure als Cofaktor benötigen [46]

Enzym	Funktion
Prolin-Hydroxylase (EC 1.14.11.2)	Hydroxylierung von Prolin bei der Kollagen-Synthese
Lysin-Hydroxylase (EC 1.14.11.4)	Hydroxylierung von Lysin bei der Prokollagen-Synthese
$\gamma$ -Butyrobetain-2-oxoglutarat-4-Dioxygenase (EC 1.14.11.1)	Hydroxylierung einer Vorstufe bei der Carnitin-Synthese
Trimethyllysin-2-oxoglutarat-Dioxygenase (EC 1.14.11.8)	Hydroxylierung einer Vorstufe bei der Carnitin-Synthese
Dopamin- $\beta$ -Monooxygenase (EC 1.14.17.1)	Umsetzung von Dopamin zu Noradrenalin
Peptidylglycin- $\alpha$ -amidierende Monooxygenase (EC 1.14.17.3)	C-terminale Amidierung neuroendokriner Hormone
4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (EC 1.13.11.27)	Hydroxylierung/Decarboxylierung beim Tyrosin-Metabolismus

### 2.2.3 Wirkungen auf das Immunsystem und bei der Karzinogenese

L-Ascorbinsäure wird eine stimulierende Wirkung auf das menschliche Immunsystem zugeschrieben. Diese beruht u. a. auf dem Schutz der Phagozytenmembran vor oxidativer Selbstzerstörung durch die bei der Phagozytose freigesetzten Hydroxyl-Radikale (**s. Kapitel 2.2.1**). Ferner soll L-Ascorbinsäure eine Verstärkung der Leukozyten-Aktivität bewirken [4, 7].

Die präventive Wirkung von L-Ascorbinsäure bei der Karzinogenese wird auf unterschiedliche Aktivitäten zurückgeführt, wobei die genauen Wirkmechanismen noch nicht geklärt sind [5, 7]. Dabei spielen die bereits beschriebenen Radikalfänger-Eigenschaften sowie die Stimulierung des Immunsystems und die Beteiligung an den Entgiftungsreaktionen in der Leber eine Rolle. Desweiteren gibt es Hinweise auf eine Beeinflussung des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung durch L-Ascorbinsäure. Bei der Entstehung von Magenkarzinomen konnte die präventive Wirkung von L-Ascorbinsäure durch Verhinderung der Nitrosaminbildung aus Nitrit und Aminen unter den physiologischen Bedingungen im Magen nachgewiesen werden. Bereits gebildete Nitrosamine können jedoch durch L-Ascorbinsäure nicht unschädlich gemacht werden.

### 2.2.4 Beeinflussung der Eisen-Resorption und Ausscheidung toxischer Metalle

Eisen wird als essentielles Spurenelement ausschließlich über die Nahrung aufgenommen und ist in Enzymen (z. B. den Zytochromen) sowie im Hämoglobin und Myoglobin enthalten. Die gleichzeitige Einnahme von L-Ascorbinsäure mit der Nahrung verbessert die Resorption des darin enthaltenen unkomplexierten Eisens. Dieser Effekt ist auf die reduzierenden und komplexbildenden Eigenschaften der L-Ascorbinsäure zurückzuführen; „freie“ Fe(II)-Ionen und Fe-Komplexe werden leichter resorbiert als „freies“ Fe(III) und nicht-komplexiertes Eisen [1, 7].

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, daß durch L-Ascorbinsäure die Konzentrationen toxisch wirkender Metalle (z. B. Pb, Hg, Ni, V und Cd) in den Geweben reduziert wird. Aufgrund der besseren Löslichkeit der gebildeten Komplexe gegenüber den unkomplexierten Metallen, werden diese vermehrt über die Nieren ausgeschieden [1].

### 3 Entwicklung von Analysenverfahren zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma

#### 3.1 Analytisch relevante chemische und physikalische Eigenschaften von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure

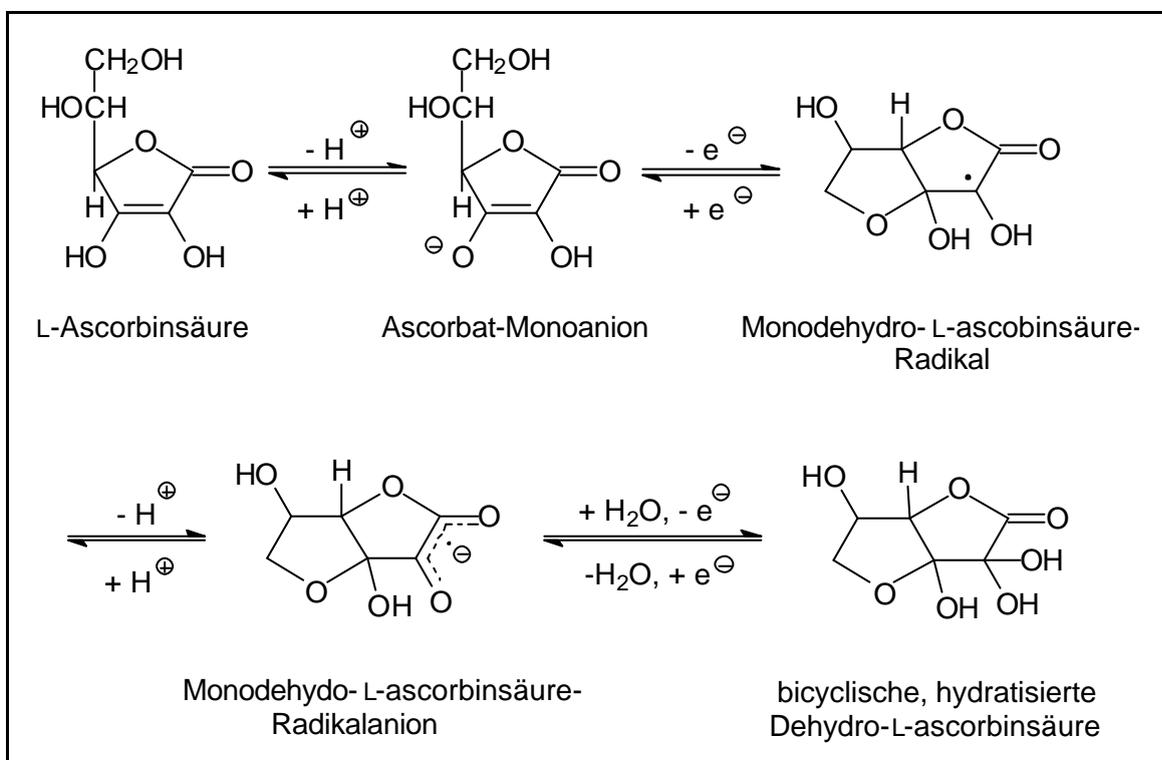
In den beiden folgenden Abschnitten werden die physikalischen und chemischen Eigenschaften der L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure erläutert, um daraus die optimalen Bedingungen zur Stabilisierung bei der Probenvorbereitung und Detektion bei der quantitative Bestimmung der beiden Komponenten ableiten zu können.

##### 3.1.1 L-Ascorbinsäure

L-Ascorbinsäure reagiert in wäßrigen Lösungen aufgrund der Dissoziation der beiden enolischen Hydroxyl-Gruppen als zweibasige Säure. Dabei ist die Hydroxyl-Gruppe am C3 (s. **Abb. 1.1**) stärker sauer ( $pK_{a1}=4,17$ ) als die am C2 ( $pK_{a2}=11,57$ ) [30]. Als Folge der Dissoziation tritt in wäßrigen Lösungen eine pH-Abhängigkeit der UV-Absorptionseigenschaften von L-Ascorbinsäure auf [45, 47]. In gepufferten, wäßrigen Lösungen liegt L-Ascorbinsäure bei pH 2,0 zu >99 % in der undissoziierten Form vor, die ein Absorptionsmaximum bei 243 nm mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von  $10.000 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$  aufweist. Im Gegensatz dazu liegt L-Ascorbinsäure bei pH 7,0 zu >99 % in Form des Monoanions vor, welches ein Absorptionsmaximum bei 265 nm mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von  $16.500 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$  zeigt. In wäßrigen, nicht gepufferten Lösungen wird mit Abnahme der AA-Konzentration von 158 mg/L auf 2 mg/L aufgrund der zunehmenden Dissoziation eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 246 nm auf 264 nm beobachtet [47]. Diese Konzentrationsabhängigkeit des Absorptionsmaximums ist in gepufferten Lösungen, bedingt durch den konstanten Dissoziationsgrad, nicht zu beobachten. Für die quantitative Bestimmung von L-Ascorbinsäure mittels UV-Detektion folgt, daß zur Vermeidung einer Änderung des Absorptionsmaximums aufgrund unterschiedlicher Konzentrationen oder geringfügiger pH-Änderungen, die Messungen in gepufferten Lösungen durchgeführt werden müssen.

---

Der Mechanismus der Oxidation von L-Ascorbinsäure in wässrigen Lösungen ist in **Abb. 3.1** schematisch dargestellt. Dabei erfolgt zunächst durch Deprotonierung die Bildung des Ascorbat-Monoanions, wonach dieses unter Verlust eines Elektrons in das Monodehydro-L-ascorbinsäure-Radikal übergeht. Mit einem  $pK_a$ -Wert von -0,45 ist dieses stärker sauer als die L-Ascorbinsäure selbst. Nach dem Verlust eines weiteren Protons wird das Radikal zum Radikalanion, welches resonanzstabilisiert und deshalb relativ reaktionsträge ist. Anschließend bilden die Radikalanionen Dimere, welche durch Disproportionierung in je ein AA- und DHAA-Molekül zerfallen. In wässrigen Lösungen bildet sich dabei sofort das bicyclische, hydratisierte Hemiacetal der Dehydro-L-ascorbinsäure [3, 48].



**Abb. 3.1:** Mechanismus der Oxidation von L-Ascorbinsäure zu Dehydro-L-ascorbinsäure in wässrigen Lösungen [3, 48]

Aufgrund der Beteiligung von Protonen am Redoxgleichgewicht zwischen L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure, ist das Redoxpotential vom pH-Wert der betrachteten Lösung abhängig. Diese Abhängigkeit wird durch die NERNST-Gleichung beschrieben, welche sich unter den Annahmen gleicher Aktivitäten von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure und einer gleich-

bleibenden Aktivität für Wasser zu

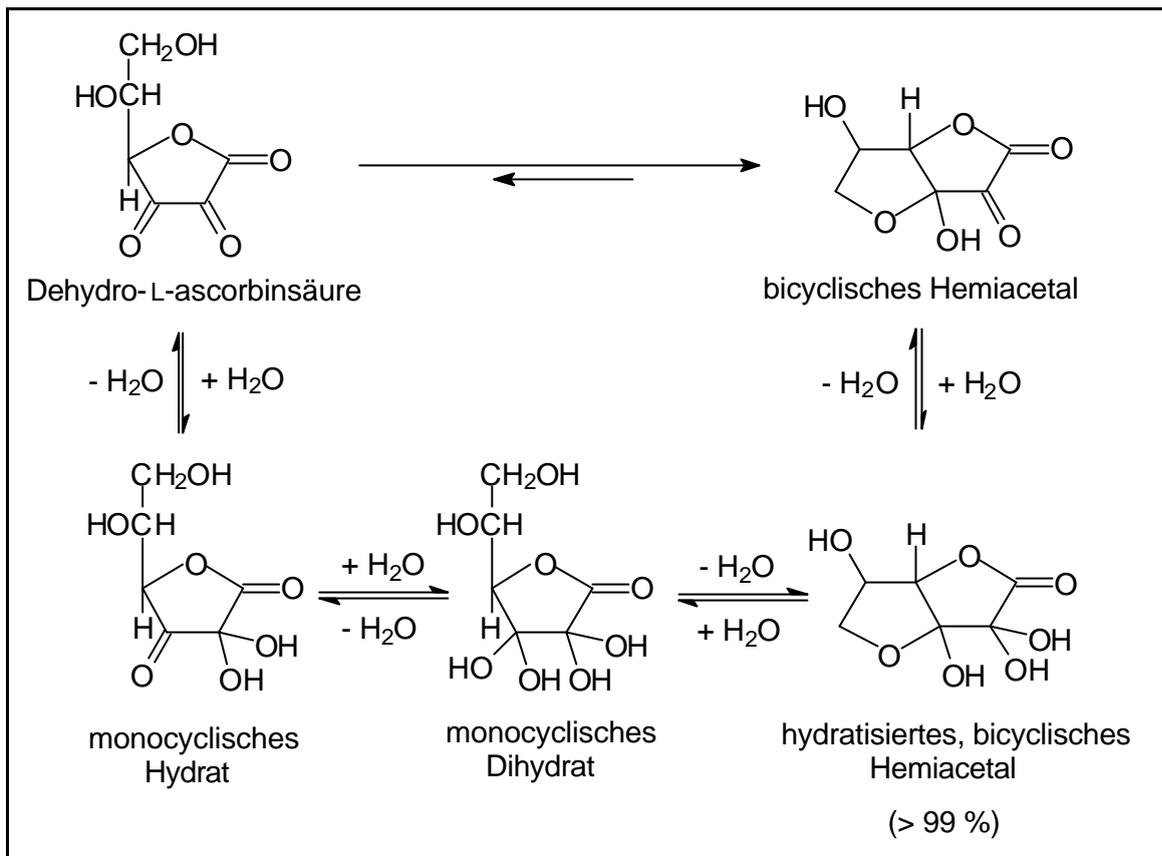
$$E = E_0 - 0,059 \text{ pH} \quad (\text{Gl. 3})$$

vereinfachen läßt. Für das Redoxpotential ( $E$ ) der Oxidation von L-Ascorbinsäure zu Dehydro-L-ascorbinsäure wird in der Literatur ein Wert von  $-0,06 \text{ V}$  bei  $\text{pH } 7$  angegeben [23, 49]. Mit Hilfe von **Gl. 3** läßt sich daraus das Standardredoxpotential ( $E_0$ ) berechnen, welches  $+0,35 \text{ V}$  ( $\text{pH} = 0$ ) beträgt. Aufgrund des niedrigeren Redoxpotentials verläuft die Oxidation von L-Ascorbinsäure in neutralen und alkalischen Lösungen schneller als in sauren Lösungen. Die Lage des Redoxpotentials ist besonders bei der elektrochemischen Detektion der L-Ascorbinsäure von Bedeutung. Dabei entspricht das Redoxpotential dem unteren Grenzwert des Arbeitspotentials, d. h. bei einem noch geringeren Potential ist keine Detektion der L-Ascorbinsäure möglich, da keine elektrochemische Reaktion stattfindet. Mit Hilfe von **Gl. 3** und dem Standardredoxpotential von  $+0,35 \text{ V}$  kann für einen vorgegebenen pH-Wert, z. B. in der mobilen Phase bei der HPLC/EC, die untere Grenze des einzustellenden Arbeitspotentials berechnet werden.

Die leichte Oxidierbarkeit von L-Ascorbinsäure ist ferner für deren Instabilität in wäßrigen Lösungen verantwortlich. Die Zerfallsgeschwindigkeit nimmt dabei mit steigender Temperatur und abnehmender AA-Konzentration zu. In Gegenwart von Spuren verschiedener Übergangsmetalle (z. B. Fe(III), Cu(II)) sowie unter der Einwirkung von Tageslicht (UV-Strahlung) wird die Oxidation von L-Ascorbinsäure zu Dehydro-L-ascorbinsäure katalysiert [50-52]. Zur Stabilisierung der in den Analysenproben enthaltenen L-Ascorbinsäure sollten diese daher möglichst frei von Übergangsmetall-Spuren sein, einen möglichst niedrigen pH-Wert aufweisen und bei möglichst niedrigen Temperaturen sowie unter Lichtausschluß gelagert werden.

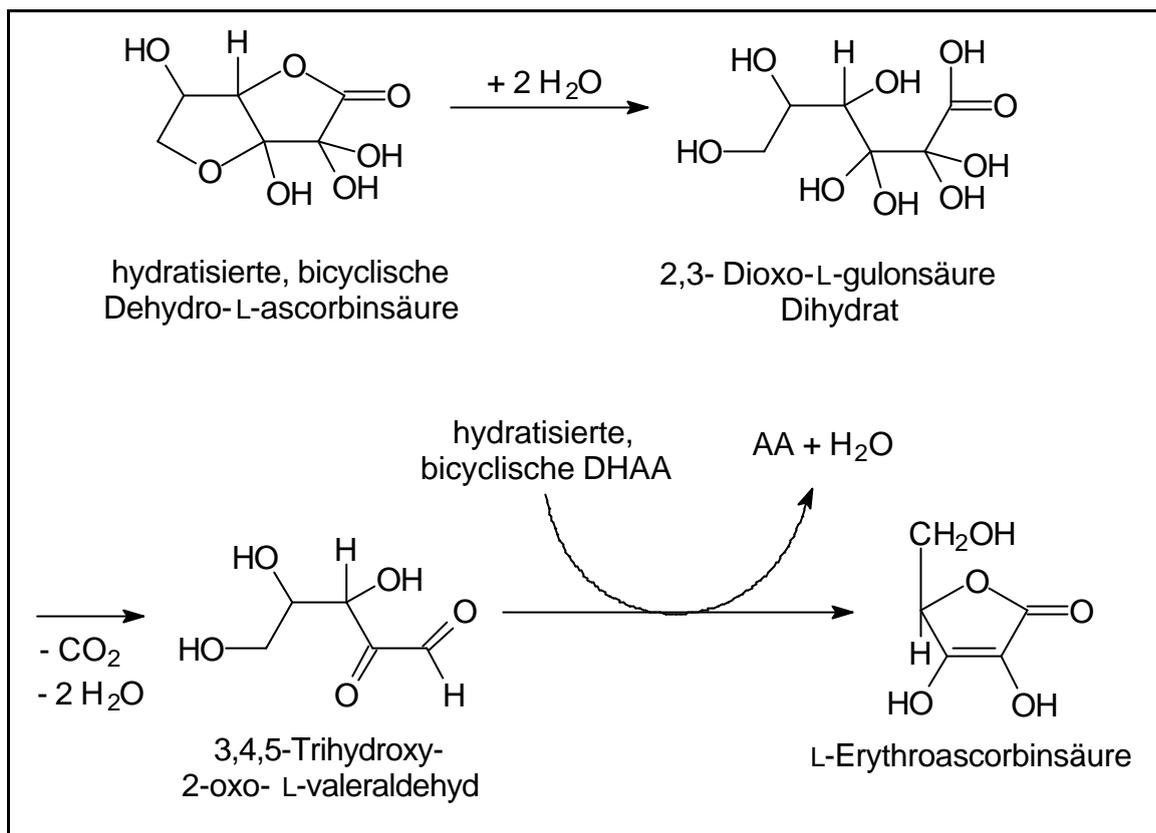
### 3.1.2 Dehydro-L-ascorbinsäure

Kristalline Dehydro-L-ascorbinsäure löst sich in Wasser unter Bildung von Hydraten und Hemiacetalen, wobei sie zu über 99 % in Form des bicyclischen, hydratisierten Hemiacetals (s. **Abb. 3.2**) vorliegt [53]. Mit einem  $\text{pK}_a$ -Wert von ca. 8 zeigt Dehydro-L-ascorbinsäure im Gegensatz zu L-Ascorbinsäure keine sauren Eigenschaften [54].



**Abb. 3.2:** Gleichgewichte zwischen den verschiedenen hydratisierten, monocyclischen und bicyclischen Formen der Dehydro-L-ascorbinsäure in wäßrigen Lösungen [2]

Der Zerfall von Dehydro-L-ascorbinsäure in wäßrigen Lösungen beginnt mit einem irreversiblen Schritt unter Hydrolyse des Lactonringes (s. **Abb. 3.3**). Das dabei gebildete 2,3-Diketogulonsäure-Dihydrat wird unter Decarboxylierung zu 3,4,5-Trihydroxy-2-oxo-L-valeraldehyd umgesetzt. Dieser wird anschließend zu L-Erythroascorbinsäure oxidiert, wobei gleichzeitig Dehydro-L-ascorbinsäure zu L-Ascorbinsäure reduziert wird [55-57]. Die Halbwertszeit für den Dehydro-L-ascorbinsäure-Zerfall in wäßrigen Lösungen beträgt bei pH 7,3 und 37 °C ca. 20 min [14]. Eine Temperaturerniedrigung sowie ein niedrigerer pH-Wert wirken sich stabilisierend auf die in den Lösungen enthaltene Dehydro-L-ascorbinsäure aus. Im Gegensatz zum Zerfall von L-Ascorbinsäure nimmt bei wäßrigen DHAA-Lösungen die Zerfallsgeschwindigkeit mit steigender Konzentration zu. Phosphat-Ionen, die im Blutplasma und Zytosol enthalten sind, wirken katalytisch auf den DHAA-Zerfall. Luftsauerstoff hat keinen Einfluß auf die Zerfallsgeschwindigkeit der Dehydro-L-ascorbinsäure [55, 58-60]. Bei der quantitativen Bestimmung von DHAA sollten die Analysenproben daher einen



**Abb 3.3:** Zerfall von Dehydro-L-ascorbinsäure in wäßriger Lösung [55, 57]

möglichst niedrigen pH-Wert aufweisen und bei niedrigen Temperaturen gelagert werden.

Das UV-Absorptionsspektrum der Dehydro-L-ascorbinsäure weist eine Absorptionsbande bei ca. 220 nm mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von  $720 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$  auf [45, 61]. Der geringe molare Extinktionskoeffizient ist die Ursache für die hohe Nachweisgrenze bei der UV-Detektion der Dehydro-L-ascorbinsäure:  $60 \text{ nmol}/20\mu\text{L}$ , d. h.  $500 \text{ mg/L}$  [62]. Damit ist eine Bestimmung der DHAA-Konzentration im Blutplasma (maximal ca.  $3,5 \text{ mg/L}$ , s. **Kapitel 2.1**) mittels UV-Detektion nicht möglich.

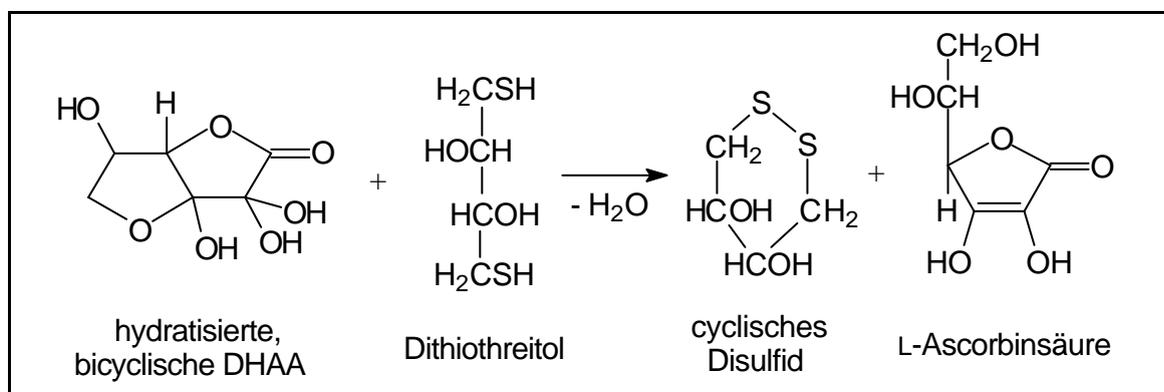
Die Reduktion von Dehydro-L-ascorbinsäure zu L-Ascorbinsäure sollte prinzipiell elektrochemisch oder durch den Zusatz geeigneter Reduktionsmittel möglich sein. Mit Hilfe polarographischer und cyclovoltametrischer Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, daß die elektrochemische Reduktion von Dehydro-L-ascorbinsäure nur gelingt, wenn diese in der nicht-hydratisierten Form (s. **Abb. 3.2**) vorliegt [63, 64]. Dagegen ist die hydratisierte, bicyclische

Form der Dehydro-L-ascorbinsäure, die sich beim Auflösen der kristallinen Substanz und der elektrochemischen Oxidation von AA in wässrigen Lösungen bildet, elektrochemisch inaktiv. Eine direkte Bestimmung von Dehydro-L-ascorbinsäure unter reduzierenden Bedingungen mittels elektrochemischer Detektion ist damit ebenfalls nicht möglich.

Die direkte Bestimmung der DHAA-Konzentration im Blutplasma erfolgt daher nach Umsetzung zu fluoreszierenden Derivaten [23]. Dabei sind aber aufwendige Probenvorbereitungsschritte oder spezielle Einrichtungen zur Online-Derivatisierung notwendig. Die Bestimmung der DHAA-Konzentration erfolgt daher häufig indirekt nach Reduktion durch Reagenzien mit geeignetem Redoxpotential (s. **Tab. 3.1**) [65-70]. In **Abb. 3.4** ist die Reaktionsgleichung für die Reduktion von Dehydro-L-ascorbinsäure mit Dithiothreitol dargestellt, bei der das Redoxgleichgewicht durch Bildung des cyclischen, sechsgliedrigen Disulfids stark auf die Seite der Reaktionsprodukte verschoben ist [21].

**Tab. 3.1:** Redoxpotentiale für das Redoxsystem L-Ascorbinsäure/Dehydro-L-ascorbinsäure und geeignete Reduktionsmittel bei pH 7 [71]

Redoxsystem/Reduktionsmittel	Redoxpotential [V]	Temperatur [°C]
DHAA → AA	+0,06	25-30
Cystin → <b>Cystein</b>	-0,33	25
Glutathion-Disulfid → <b>Glutathion</b>	-0,33	25
<b>Dithiothreitol</b> (oxid. → red.)	-0,33	30



**Abb. 3.4:** Reduktion von Dehydro-L-ascorbinsäure mit Dithiothreitol

## 3.2 Bestimmung der L-Ascorbinsäure- und Dehydro-L-ascorbinsäure-Konzentration in Humanplasma

### 3.2.1 Überblick über literaturbekannte Bestimmungsverfahren

Bei der Bestimmung der AA- und DHAA-Konzentration in Blutplasma werden unterschiedliche methodische Varianten eingesetzt, wobei häufig ein Summenparameter ermittelt wird, welcher die Gesamtkonzentrationen an L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure erfaßt. Dazu wird das Redoxgleichgewicht der beiden Komponenten mit einem geeigneten Reagenz entweder vollständig auf die Seite der L-Ascorbinsäure oder auf die Seite der Dehydro-L-ascorbinsäure verschoben und die Gesamtkonzentration mit einem entsprechenden Analysenverfahren bestimmt. Wie bereits in **Kapitel 1** erläutert, sind aber vielfach die Konzentrationen der einzelnen Komponenten von Interesse. Dabei erfolgt zunächst die direkte Bestimmung einer der beiden Komponenten. Anschließend wird in einem weiteren Aliquot der Probe, nach Zusatz eines Oxidations- bzw. Reduktionsmittels, die Summe der AA- und DHAA-Konzentration ermittelt. Die Konzentration der zweiten Komponente ergibt sich indirekt aus der Differenz der beiden Meßwerte.

Zur quantitativen Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure können volumetrische, spektrophotometrische, fluorimetrische und enzymatische Analysenverfahren eingesetzt werden [23, 72, 73]. Diese sind jedoch durch aufwendige Arbeitsabläufe, eine geringe Spezifität und hohe Bestimmungsgrenzen (z. B. 3 nmol/Probe bei spektrophotometrischen Verfahren, s. **Kapitel 1**) gekennzeichnet. Daher wurden hochleistungsflüssigchromatographische Verfahren entwickelt, die sich durch eine niedrigere Bestimmungsgrenze, kürzere Analysendauer und höhere Spezifität auszeichnen [23]. Dabei werden vor allem Verfahren mit Fluoreszenz-, elektrochemischer (EC-) oder UV-Detektion eingesetzt. Die **Fluoreszenzdetektion** eignet sich zur direkten Bestimmung von Dehydro-L-ascorbinsäure nach Umsetzung mit 1,2-Diaminobenzol [13, 74] oder 1,2-Diamino-4,5-dimethylbenzol [15, 18] zu den entsprechenden fluoreszierenden Derivaten (Nachweisgrenze: 17 pmol/Injektion [75]). Zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure muß diese zunächst zu Dehydro-L-ascorbinsäure oxidiert werden, bevor eine Derivatisierung möglich ist (Nachweisgrenze: 90 pmol/Injektion [75]). Die dabei notwendigen Reaktionsschritte sind jedoch sehr aufwendig, und es existieren unterschiedliche Angaben über die Effektivität der verschiedenen Derivatisierungsreagenzien [18, 75].

Bei den **HPLC/EC-Verfahren** zur Bestimmung der AA-Konzentration stellt die Wahl der mobilen Phase ein besonderes Problem dar. Zum einen muß diese die chromatographische Trennung der L-Ascorbinsäure von anderen Matrixbestandteilen gewährleisten und zum anderen eine ausreichende elektrische Leitfähigkeit für die elektrochemische Detektion aufweisen. Des Weiteren kann durch Verunreinigungen auf der Elektrodenoberfläche die Empfindlichkeit der Methode stark beeinträchtigt werden. Die reproduzierbare Konditionierung der Elektrodenoberfläche ist eines der größten Probleme bei der EC-Detektion. HPLC/EC-Verfahren können in amperometrische und coulometrische Verfahren unterteilt werden. Mit Hilfe der coulometrischen Detektion ist die direkte Ermittlung der AA-Konzentration und die indirekte Bestimmung der DHAA-Konzentration (in Form von L-Ascorbinsäure) bis zu einer Bestimmungsgrenze von jeweils 0,1 pmol/Injektion möglich [20, 76, 77]. Die extrem hohe Empfindlichkeit der coulometrischen Detektion erfordert jedoch den Einsatz ultrareiner Chemikalien bei der Probenvorbereitung und Chromatographie. Weiterhin ist zu beachten, daß 2,3-Dimercapto-1-propanol, welches zur Reduktion von Dehydro-L-ascorbinsäure eingesetzt wird, durch Extraktion mit Ethylether entfernt werden muß, bevor der Gehalt der Probe chromatographisch bestimmt werden kann. Bei HPLC-Verfahren mit amperometrischer Detektion [19, 78, 79] beträgt die Bestimmungsgrenze für L-Ascorbinsäure 1 pmol/Injektion und ist damit um den Faktor 10 höher als bei der coulometrischen Detektion. Dehydro-L-ascorbinsäure wird nach Reduktion zu L-Ascorbinsäure indirekt bestimmt [19, 80]. Dabei beträgt die Bestimmungsgrenze für Dehydro-L-ascorbinsäure 100 pmol/L [80].

Häufig werden **HPLC/UV-Verfahren** zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure eingesetzt. Dabei liegt die Bestimmungsgrenze für L-Ascorbinsäure bei 10 pmol/Injektion [69, 79, 81-83]. Die Bestimmung von Dehydro-L-ascorbinsäure erfolgt auch hier indirekt nach Reduktion zu L-Ascorbinsäure [69, 79, 84]. In der Literatur werden jedoch keine Werte für die Nachweis- oder Bestimmungsgrenze bei der indirekten Bestimmung von Dehydro-L-ascorbinsäure angegeben.

---

### 3.2.2 Allgemeiner Analysenablauf

Den literaturbekannten HPLC-Verfahren zur direkten Bestimmung von L-Ascorbinsäure und indirekten Bestimmung von Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma kann folgender allgemeingültiger Analysenablauf entnommen werden:

- (1) Blutentnahme
- (2) Gewinnung des Blutplasmas
- (3) Reduktion des DHAA-Anteils
- (4) Fällung der Plasmaproteine
- (5) Stabilisierung der L-Ascorbinsäure
- (6) Chromatographische Bestimmung der AA- bzw. Gesamtascorbinsäure-Konzentration
- (7) Berechnung der DHAA-Konzentration

#### Blumentnahme

Um nach der Blutentnahme die Gerinnung (Koagulation) der Blutproben zu verhindern, ist der Einsatz von Antikoagulanzen notwendig. Dazu werden in der Literatur sowohl die Verwendung von Heparin [19, 20, 75, 81, 85] als auch der Einsatz von EDTA [67, 79, 86, 87] beschrieben. Heparin, ein Glucuronsäure-O-sulfat-mucopolysaccharid, verhindert die Blutgerinnung, da es unter anderem die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin und dessen Wirkung auf Fibrinogen sowie die Agglomeration der Thrombozyten hemmt [29]. EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) komplexiert die an der Blutgerinnung beteiligten Ca(II)-Ionen und verhindert so die Koagulation der Blutproben [29]. Die Verwendung von EDTA soll gegenüber dem Einsatz von Heparin den Vorteil haben, daß neben den Ca(II)-Ionen auch Spuren von Übergangsmetall-Ionen durch Komplexbildung gebunden werden. Dadurch kann die katalytische Wirkung der Übergangsmetall-Ionen auf die Oxidation der in den Proben enthaltenen L-Ascorbinsäure vermindert (s. **Kapitel 3.1.1**) und ein zusätzlicher Stabilisierungseffekt erzielt werden.

Bei der Entnahme der Blutproben ist ferner die Verhinderung der Hämolyse von besonderer Bedeutung. Die Hämolyse setzt Fe(II)-Ionen aus dem Hämoglobin frei, die durch Oxidation mit vorhandenem Sauerstoff in Fe(III)-Ionen übergehen können und die Oxidation der L-Ascorbinsäure katalysieren (s. **Kapitel 3.1.1**). Des Weiteren führt das Austreten von Zellflüssigkeit aus den

---

Erythrozyten zu einer Vergrößerung des Flüssigkeitsvolumens und damit zur Abnahme der Analyt-Konzentrationen im Blutplasma [88]. Das Quetschen des Fingers bei der für epidemiologische Studien häufig eingesetzten Blutentnahme aus der Fingerspitze kann leicht zur Hämolyse und so zu fehlerhaften Ergebnissen führen [15]. Die Blutentnahme sollte daher ausschließlich aus der gestauten Unterarmvene erfolgen.

### **Plasmagewinnung**

Die Abtrennung der festen Blutkompartimente erfolgt durch Zentrifugieren in einer Kühlzentrifuge bei einer Temperatur von 4 °C. Die Kühlung der Blutproben in der Zentrifuge ist notwendig, da sich die Blutproben durch die hohe Rotationsgeschwindigkeit während des Zentrifugierens erwärmen und der Zerfall der L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure beschleunigt würde.

### **Reduktion des Dehydro-L-ascorbinsäure-Anteils**

Zur Reduktion des DHAA-Anteils werden bei literaturbekannten Analyseverfahren z. B. Natriumborhydrid [65], L-Cystein [66], Glutathion [67], D,L-Homocystein [68, 79, 89], Dithiothreitol [69, 70, 90, 91] und 2,3-Dimercapto-1-propanol [20] eingesetzt. Da diese Reduktionsreaktionen pH-abhängig sind und optimal bei einem pH-Wert von ca. 7 durchgeführt werden, erfolgt die Zugabe des Reduktionsmittels zum Blutplasma (pH-Wert ca. 7,4; s. **Kapitel 2.1**) vor Ausfällung der Proteine durch Säurezusatz.

### **Abtrennung der im Blutplasma enthaltenen Proteine**

Die Abtrennung der im Blutplasma enthaltenen Proteine (ca. 75 g/L [29]) vor der HPLC-Analyse ist notwendig, da sie durch höhere Anteile von organischen Lösungsmitteln in der mobilen Phase ausgefällt oder durch Restsilanol-Gruppen an der Oberfläche der unpolaren, stationären Phase unspezifisch gebunden werden können. Diese Vorgänge führen im HPLC-System zu einer irreversiblen Schädigung der Trennsäule, einem Druckanstieg sowie Kapazitäts- und Selektivitätsverlust [92]. Zur Abtrennung der Proteine aus den Plasmaproben sind verschiedene Methoden anwendbar, die im folgenden kurz charakterisiert werden.

Die klassische Methode zur Abtrennung von Proteinen aus Blutplasma beruht auf deren **Fällung durch Zusatz von organischen Lösungsmitteln oder Säuren**. Dabei werden z. B. Methanol [20, 93], Trichloressigsäure [74, 84, 94], Perchlorsäure [69, 87], Metaphosphorsäure [75, 78, 85] und Säuremischungen

---

wie Perchlorsäure/Metaphosphorsäure [79] oder Metaphosphorsäure/Thioglycolsäure [82] eingesetzt. Die Fällung der Plasmaproteine durch Säurezusatz beruht auf dem Prinzip der Bindung von Säure-Anionen an die kationischen Seitengruppen und Peptidbindungen der Proteine. Dabei kommt es durch die stark unpolaren Säurerest-Gruppen zu einer Änderung des Löslichkeitsverhaltens der Proteine. Diese sind dann nicht mehr wasserlöslich und fallen als gelblich-weißer Niederschlag aus, der durch Zentrifugation abgetrennt werden kann [88]. Die Vorteile dieser Methode sind die leichte Durchführbarkeit und die geringen Kosten für die eingesetzten Chemikalien. Durch das Ansäuern kann möglicherweise auch eine Stabilisierung der in den Proben enthaltenen L-Ascorbinsäure erzielt werden (s. **Kapitel 3.1.1**). Zu den Nachteilen zählt die möglicherweise unvollständige Fällung der Proteine sowie die Gefahr der Adsorption von L-Ascorbinsäure am Protein-Niederschlag. Die Verdünnung der Analysenproben durch den Zusatz des Fällungsreagenzes führt zu einer Erhöhung der Nachweisgrenze und Verringerung der Empfindlichkeit entsprechender Analysenverfahren.

Eine weitere Methode zur Abtrennung der Proteine aus den Plasma-Proben ist die **Festphasen-Extraktion**. Dabei werden im Idealfall die Analyt-Moleküle selektiv und quantitativ an einer festen, stationären Phase sorbiert, während die Proteine und andere Begleitkomponenten nicht zurückgehalten werden. Im nachfolgenden Elutionsschritt werden die Analyt-Moleküle mit einem möglichst geringen Volumen eines Elutionsmittels desorbiert, so daß eine Anreicherung der Analyte möglich ist. Die Festphasen-Extraktion zeichnet sich ferner durch einen geringen Zeit- und Chemikalienbedarf sowie durch die leichte Automatisierbarkeit aus. Zur Probenvorbereitung bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure sind Verfahren unter Verwendung von Hydroxyapatit [19] und Anionen-Austauschern [75] als feste stationäre Phasen beschrieben.

Die **Ultrafiltration** kann ebenfalls zur Abtrennung von Plasmaproteinen eingesetzt werden [95]. Hierbei beruht die Abtrennung der Proteine auf dem Ausschlußprinzip: Moleküle ab einem bestimmten Molekulargewicht und einer gewissen Größe werden durch die Filtermembran zurückgehalten. Daher werden diese Filter auch als Molekulargewicht-Ausschluß-Filter (MWCO-Filter, **m**olecular **w**eight **c**ut **o**ff-Filter) bezeichnet. Der Einsatz der MWCO-Filter bietet gegenüber den anderen Verfahren den Vorteil, daß keine Chemikalien zugesetzt werden müssen und kein Verdünnungseffekt auftritt. Nachteilig sind die hohen Kosten, die relativ lange Zentrifugationsdauer (ca. 30 min) sowie

---

eine mögliche Adsorption der Analyte an der Filtermembran.

Neben der Abtrennung der Plasmaproteine vor der chromatographischen Bestimmung besteht die Möglichkeit der **direkten Injektion von Plasmaproben in ein HPLC-System**. Dieses Verfahren ist aber an die Verwendung eines speziellen Packungsmaterials (Polyethylenglycol-Copolymer [14, 96]) als stationäre Phase gebunden. Dieses ist so beschaffen, daß Proteine keine Wechselwirkungen mit ihm eingehen und sofort eluiert werden, während es bei kleineren Molekülen wie L-Ascorbinsäure zur Retardierung und Abtrennung von der Probenmatrix kommt. Der Einsatz dieser stationären Phasen erfordert einen hohen finanziellen Aufwand und ist nur für spezielle Anwendungen geeignet. Die Verwendung von „Restricted Access-Phasen“ (unpolare Phasen mit begrenzter Oberflächenzugänglichkeit [97, 98]) zur direkten Injektion von Plasmaproben ist nicht möglich, da L-Ascorbinsäure zu starke polare Eigenschaften besitzt, um auf dem unpolaren Packungsmaterial retardiert zu werden [99].

### **Stabilisierung der in den Proben enthaltenen L-Ascorbinsäure**

Die geringe Stabilität von L-Ascorbinsäure in wäßrigen Lösungen ist eine der Ursachen für die bereits beschriebenen Probleme bei der quantitativen Bestimmung (s. **Kapitel 3.1**). Aufgrund ihrer Eigenschaften ist die Stabilisierung von L-Ascorbinsäure durch Erniedrigung des pH-Wertes (Erhöhung des Redoxpotentials) und Komplexierung von Übergangsmetall-Ionen (Verminderung der katalytischen Wirkung auf die Oxidation) möglich (s. **Kapitel 3.1.1**). Dabei können zur Verringerung des pH-Wertes auch die zur Proteinfällung geeigneten Säuren und Säuremischungen eingesetzt werden. Als Komplexierungsreagenz wird bei literaturbekannten Verfahren EDTA eingesetzt [20, 78]. Eine zusätzliche Stabilisierung der L-Ascorbinsäure sollte durch Temperaturerniedrigung und Lichtausschluß erreicht werden können. Der Zusatz von Reduktionsmittel wie z. B. Glutathion [67] oder Homocystein [89] zur Stabilisierung von L-Ascorbinsäure ist nur dann möglich, wenn keine differenzierte Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure erfolgen soll. Ansonsten besteht die Gefahr, daß ein Teil der in den Proben enthaltenen Dehydro-L-ascorbinsäure zu L-Ascorbinsäure reduziert und das Ergebnis der quantitativen Bestimmung verfälscht wird.

---

### **Chromatographische Bestimmung der L-Ascorbinsäure- und Gesamtascorbinsäure-Konzentration**

Zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure mittels HPLC werden unabhängig vom Detektor-Typ hauptsächlich die Reversed-Phase-Ionenpaar-Chromatographie und die Ionenaustausch-Chromatographie eingesetzt. Bei der Reversed-Phase Ionenpaar-Chromatographie werden komplex zusammengesetzte mobile Phasen eingesetzt [20, 85, 91]. Diese bestehen aus Wasser, anorganischem Puffer, organischem Modifier, Ionenpaar- und Stabilisierungsreagenz. Die Herstellung dieser komplex zusammengesetzten mobilen Phasen ist sehr zeitaufwendig und mit hohen Kosten verbunden, da hochreine Chemikalien eingesetzt werden müssen. Bei der Ionenaustausch-Chromatographie finden häufig Amino-Säulen (mit protonierten funktionellen Gruppen) Verwendung [13, 100-102]. Diese besitzen jedoch eine geringere Lebensdauer als konventionelle Reversed-Phase-Säulen. Daher wurden chromatographische Systeme entwickelt, bei denen als Säulenpackung Reversed-Phase-Materialien und als mobile Phase Phosphat-Puffer mit einem pH-Wert zwischen 2,0 und 2,6 eingesetzt werden [68, 79, 81, 103]. Nachteilig bei diesen Verfahren ist, daß entweder keine Basislinientrennung der L-Ascorbinsäure vom Lösemittel-Peak erfolgt und damit keine zuverlässige Quantifizierung der L-Ascorbinsäure möglich ist [79, 103], oder die lange Retentionszeit von L-Ascorbinsäure ( $t_R = 9,9$  min, [81] bzw.  $t_R = 15,6$  min [68]), die zu einer langen Analysendauer führt.

### **Indirekte Bestimmung der Dehydro-L-ascorbinsäure-Konzentration**

Bei der indirekten Bestimmung der DHAA-Konzentration durch Differenzbildung muß vorausgesetzt werden, daß die ermittelte Konzentrationsdifferenz ausschließlich auf Dehydro-L-ascorbinsäure zurückzuführen ist. Die Präzision der DHAA-Bestimmung ist von der Präzision für die AA- und Gesamtascorbinsäure-Bestimmung abhängig. Der Zusammenhang zwischen diesen Größen wird durch das Fehlerfortpflanzungsgesetz beschrieben (s. **Kapitel 4.2.2**). Daraus ergibt sich, daß die Präzision für die Bestimmung der DHAA-Konzentration stets geringer als die der Einzelbestimmungen ist.

Da jeder dieser Schritte einen großen Einfluß auf die Genauigkeit der Analysenergebnisse hat, ist bei der in dieser Arbeit durchgeführten Methodentwicklung die Optimierung jedes einzelnen Teilschrittes der Analyse erforderlich. Hierbei wird mit der Überprüfung der chromatographischen Bestimmung von L-Ascorbinsäure begonnen, da nur so eine genaue Kontrolle

der Probenvorbereitung möglich ist. Dabei werden zunächst anhand von synthetischen Proben ein geeignetes chromatographisches System sowie die optimalen Bedingungen für die UV- und EC-Detektion ermittelt. Anschließend erfolgt die Überprüfung der Probenvorbereitungsschritte. Hierbei wird die Effektivität der Proteinabtrennung durch Proteinfällung nach Zusatz von Säuren bzw. Methanol und die Ultrafiltration miteinander verglichen. Die Ermittlung der Stabilität von L-Ascorbinsäure bei unterschiedlichen Temperaturen (5 °C bzw. -80 °C) erfolgt in Meßproben, Heparin-Plasma und Kalibrierlösungen. Abschließend werden unter Verwendung synthetischer Proben, die Reduktionsbedingungen für Dehydro-L-ascorbinsäure optimiert.

### 3.3 Methodenentwicklung zur chromatographischen Bestimmung der L-Ascorbinsäure-Konzentration

#### 3.3.1 Auswahl des chromatographischen Systems

Zur Bestimmung der AA-Konzentration in Blutplasma soll ein chromatographisches System eingesetzt werden, welches sich sowohl für die UV- als auch für die EC-Detektion eignet und durch einfache Herstellung der mobilen Phase sowie gute Wiederholbarkeit der Analyseergebnisse auszeichnet. Diese Anforderungen werden insbesondere von der Reversed-Phase-Chromatographie erfüllt, so daß ein chromatographisches System bestehend aus einer Standard-Trennsäule (125 × 4 mm) gepackt mit Merck LiChrospher<sup>®</sup> RP-18, 5µm und einem Phosphat-Puffer pH 2,0 als mobiler Phase erprobt wurde. Die Verwendung des Phosphat-Puffers pH 2,0 gewährleistet, daß die L-Ascorbinsäure zu über 99 % in der undissoziierten Form vorliegt und damit die Retardierung auf dem Reversed-Phase-Säulenmaterial möglich ist (s. **Kapitel 3.1.1**). Gegenüber dem Einsatz von ungepufferten mobilen Phasen (z. B. 0,01 mol/L Perchlorsäure; pH = 2,0 [104]) hat die Verwendung des Phosphat-Puffers weiterhin den Vorteil, daß sich der pH-Wert reproduzierbar einstellen läßt. Dies ist besonders bei der quantitativen Bestimmung von L-Ascorbinsäure wichtig, da sowohl die Lage des UV-Absorptionsmaximums als auch das Redoxpotential der L-Ascorbinsäure pH-abhängig sind (s. **Kapitel 3.1.1**). Der pH-Wert der mobilen Phase von 2,0 führt weiterhin zu einer Stabilisierung der L-Ascorbinsäure während der analytischen Trennung. Er entspricht ferner der unteren Grenze des Arbeitsbereiches von Reversed-

Phase-Materialien, da bei einem noch niedrigeren pH-Wert eine rasche Hydrolyse der Octadecyl-Gruppen eintreten würde. Um bei Verwendung dieses Puffers bereits eine geringfügige Hydrolyse der Octadecyl-Gruppen des C<sub>18</sub>-Packungsmaterials der Trennsäule zu begrenzen, wird eine Sättigungssäule mit dem gleichen Packungsmaterial aber für analytische Zwecke nicht mehr ausreichender Trennleistung, zwischen Pumpe und Probenaufgabeventil installiert. Dadurch kann eine Sättigung der mobilen Phase mit den Octadecyl-Resten erzielt und die Hydrolyse des C<sub>18</sub>-Packungsmaterials der Trennsäule weitgehend verhindert werden. Die Verwendung eines säurestabilen C<sub>18</sub>-Materials (z. B. Nucleosil® C<sub>18</sub> AB, Macherey & Nagel) ist nicht möglich, da von dieser Säule L-Ascorbinsäure zusammen mit dem Lösemittel-Peak eluiert wird. Typische Chromatogramme eines Standards und einer Humanplasma-Probe sind in **Abb. 4.3** (S. 67) dargestellt.

Mit dem Phosphat-Puffer pH 2,0 kann im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen HPLC-Verfahren (z. B. Ionenpaar-Chromatographie, mobile Phase: 25 mmol/L Myristyltrimethylammoniumbromid, 50 mmol/L Natriumhydroxid, 60 mmol/L Essigsäure, 100 mg/L Homocystein, 200 mg/L EDTA und 7,5 % (v/v) Acetonitril [85]) eine einfach zusammengesetzte mobile Phase bei der chromatographischen Bestimmung von L-Ascorbinsäure angewendet werden. Gleichzeitig wird die Basislinientrennung der L-Ascorbinsäure vom Lösemittel-Peak und damit eine zuverlässige Quantifizierung erreicht. Da die Retentionszeit für L-Ascorbinsäure bei dem gewählten chromatographischen System 1,9 min bis 2,0 min gegenüber 9,9 min bzw. 15,6 min bei den literaturbekannten Verfahren [81, 68] beträgt, ergibt sich eine deutliche Verkürzung der Analysendauer.

### 3.3.2 Optimierung der UV-Detektionsbedingungen

Bei der UV-Detektion wird zur optimalen Erfassung des Analyten (maximale Empfindlichkeit, niedrigste Nachweisgrenze) die Quantifizierung am UV-Absorptionsmaximum der Substanz angestrebt. Zur Ermittlung der optimalen Detektionswellenlänge für die Bestimmung von L-Ascorbinsäure erfolgt die UV-spektrometrische Charakterisierung einer Lösung von L-Ascorbinsäure in der mobilen Phase (Phosphat-Puffer pH 2,0). Diese ergibt in Übereinstimmung mit der Literatur ein Absorptionsmaximum bei 243 nm (s. **Kapitel 3.1.1**). Das UV-Absorptionsspektrum des Phosphat-Puffers zeigt in diesem Bereich eine sehr gute UV-Durchlässigkeit ( $E < 0,01$ ). Die Verwendung eines UV-Detektors bei

---

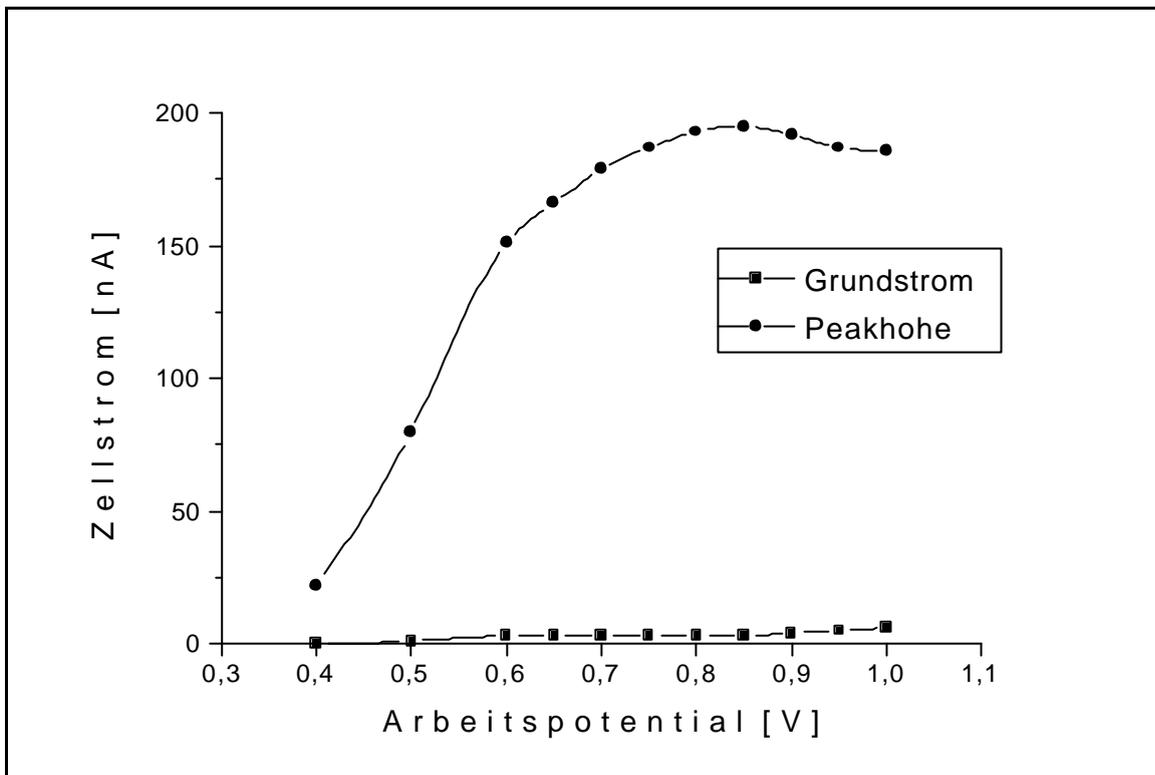
einer Detektionswellenlänge von 243 nm ermöglicht somit die optimale Bestimmung der L-Ascorbinsäure.

### 3.3.3 Optimierung der EC-Detektionsbedingungen

Die EC-Detektion der L-Ascorbinsäure erfolgt mit Hilfe eines ampero-metrischen Detektors. Dabei sollen die Detektionsbedingungen für L-Ascorbinsäure hinsichtlich des Elektrodenmaterials der Arbeitselektrode und des Arbeitspotentials optimiert werden. Als Arbeitselektroden stehen eine Gold- und eine Glassy Carbon-Elektrode zur Verfügung. Bei Injektion einer AA-Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/L bei Potentialen von +0,6 V bzw. +0,9 V und unter Verwendung der Gold- bzw. Glassy Carbon-Elektrode wird die Signalhöhe und das Grundrauschen ermittelt. Es zeigt sich, daß beim Einsatz der Gold-Elektrode hohe Grundströme (ca. 30 nA bei +0,6 V) auftreten, während der AA-Peak eine Höhe von 40 nA erreicht und im Tailing des Lösemittel-Peaks liegt. Eine Auswertung der Meßsignale ist somit nicht möglich. Bei Verwendung der Glassy Carbon-Elektrode werden nur geringe Grundströme (ca. 3 nA bei +0,6 V) und stets basisliniengetrennte AA-Peaks (Höhe: ca. 150 nA bei +0,6 V) erhalten, so daß bei allen folgenden Versuchen diese Arbeitselektrode eingesetzt wird.

Das optimale Arbeitspotential ist erreicht, wenn ein möglichst großes Meßsignal bei einem geringen Grundstrom erzielt wird. Bei der Wahl des Arbeitspotentials ist zu beachten, daß dieses größer als das Redoxpotential des Analyten ( $E = +0,23$  V für L-Ascorbinsäure bei pH 2, s. **Kapitel 3.1.1**) sein muß, damit es prinzipiell zu einer elektrochemischen Reaktion kommen kann. Das Arbeitspotential sollte aber auch möglichst niedrig gewählt werden, damit nur wenige Matrixbestandteile miterfaßt werden und so eine ausreichende Selektivität des Verfahrens gewährleistet ist. Zur Optimierung des Arbeitspotentials werden jeweils 20 µL einer 1 mg/L AA-Lösung bei Potentialen zwischen +0,4 V und +1 V injiziert. Die dabei auftretenden Grundströme und die Signalhöhen für den AA-Peak sind in **Abb. 3.5** gegen das Arbeitspotential aufgetragen. Wie aus **Abb. 3.5** ersichtlich ist, beträgt das optimale Arbeitspotential +0,85 V, da bei diesem Wert die größte Signalhöhe bei gleichzeitig möglichst geringem Grundstrom ermittelt wurde. In der Literatur werden für das optimale Redoxpotential bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure, in guter Übereinstimmung mit dem hier ermittelten Ergebnis, Werte von +0,7 V (pH = 2,2 [68]) und +0,8 V (pH = 2,0 [103] bzw. pH = 3,1 [91]) angegeben. Alle

folgenden Untersuchungen mit EC-Detektion werden daher unter Verwendung der Glassy Carbon-Arbeits Elektrode bei einem Arbeitspotential von +0,85 V durchgeführt. Der Phosphat-Puffer pH 2 ist daher neben dem Einsatz bei der UV-Detektion auch für den Einsatz bei der EC-Detektion geeignet.



**Abb. 3.5:** Signalthöhe und Grundstrom in Abhängigkeit vom Arbeitspotential der amperometrischen Detektion von L-Ascorbinsäure (Glassy Carbon-Arbeits Elektrode, Injektion von 20  $\mu$ L einer 1 mg/L AA-Lösung)

### 3.4 Optimierung der Probenvorbereitung zur Bestimmung der L-Ascorbinsäure-Konzentration

#### 3.4.1 Blutentnahme und Plasmagewinnung

Bei der Blutentnahme aus einer gestauten Vene des Unterarmes werden evakuierte Blutentnahme-Röhrchen eingesetzt, die den Kontakt der Blutprobe mit Luftsauerstoff und damit eine beschleunigte Oxidation der in den Proben enthaltenen L-Ascorbinsäure verhindern. Anschließend werden die Blutproben bis zur weiteren Aufarbeitung in ein Eisbad (0 °C) gestellt, um dem Zerfall der L-Ascorbinsäure entgegen zu wirken. Als Antikoagulanzen wird Heparin eingesetzt, da die Verwendung von EDTA bei der chromatographischen Bestimmung der AA-Konzentration mittels UV-Detektion zu einer Überlagerung des EDTA-Peaks mit dem AA-Peak führt und somit die Auswertung der Chromatogramme beeinflusst.

Die Abtrennung der festen Blutkompartimente erfolgt durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 3000g in einer Kühlzentrifuge (4 °C), um den Zerfall der Analyt-Moleküle zu vermindern.

#### 3.4.2 Abtrennung der im Blutplasma enthaltenen Proteine

Um zu ermitteln, welche der in **Kapitel 3.2.2** beschriebenen Möglichkeiten am besten zur Proteinabtrennung geeignet ist, werden für folgende Verfahren die Effektivität der Proteinabtrennung und die Wiederfindung von L-Ascorbinsäure nach Abtrennung der Proteine bestimmt:

- (1) Ausfällen der Proteine durch Zusatz von:
    - Methanol
    - 6 % (w/w) Perchlorsäure
    - 10 % (w/w) Metaphosphorsäure
    - 10 % (w/w) Trichloressigsäure
    - 57 % (w/w) Sulfosalicylsäure
    - 6 % (w/w) Perchlorsäure/2 % (w/w) Metaphosphorsäure-Mischung
  - (2) Ultrafiltration mit MWCO-Filtern  
(Ausschlußgrößen: 5 kD, 10 kD, 20 kD und 100 kD)
-

Die Untersuchungen werden in zwei Meßreihen durchgeführt (1. Meßreihe: Vergleich der Fällungsreagenzien, 2. Meßreihe: Vergleich der MWCO-Filter), wobei für die 1. Meßreihe ein Plasma-Pool aus sechs verschiedenen Blutplasma-Proben eingesetzt wird. Die Abtrennung der enthaltenen Plasma-Proteine erfolgt durch Zusatz der verschiedenen Reagenzien zu Aliquoten des Plasma-Pools. Zur Untersuchung der Effektivität der Ultrafiltration bei der Proteinabtrennung werden bei 2 Plasma-Proben jeweils MWCO-Filter mit den Ausschlußgrößen 5 kD, 10 kD, 20 kD und 100 kD eingesetzt. In den dabei erhaltenen enteweißten Plasma-Proben wird die AA-Konzentration mittels HPLC/UV bestimmt. Zum Vergleich der Wiederfindungen an L-Ascorbinsäure wird dabei die größte ermittelte AA-Konzentration gleich 100 % gesetzt und alle anderen Angaben darauf bezogen (s. **Tab. 3.2** und **Tab. 3.3**). Weiterhin wird untersucht, ob die eingesetzten Fällungsreagenzien prinzipiell zu Störungen (z. B. Peaküberlagerungen) bei der Bestimmung der L-Ascorbinsäure mittels HPLC/UV und HPLC/EC führen.

Die Bestimmung der Protein-Konzentration erfolgt photometrisch nach der Methode von BRADFORD [105]. Dabei ist zu beachten, daß die Bestimmungen nur relative Aussagen bezüglich des eingesetzten Kalibrierproteins (hier Rinderserum-Albumin) ermöglichen, da der zur Bestimmung eingesetzte Farbstoff (Coomasie Brilliant Blue-G250) eine unterschiedliche Affinität zu verschiedenen Proteinen aufweist [106, 107]. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in **Tab. 3.2** und **Tab. 3.3** zusammengestellt.

Wie **Tab. 3.2** und **Tab. 3.3** zu entnehmen ist, sind nur Perchlorsäure, die Perchlorsäure/Metaphosphorsäure-Mischung, sowie die MWCO-Filter mit Ausschlußgrößen von 20 kD und 100 kD zur Proteinabtrennung bei der L-Ascorbinsäure-Bestimmung einsetzbar. Alle anderen Fällungsreagenzien sind aufgrund unvollständiger Proteinabtrennung, zu geringer AA-Wiederfindung oder Störungen bei der UV-Detektion nicht zur Proteinabtrennung geeignet. Die ermittelten Werte für die Effektivität der Proteinabtrennung der verschiedenen Fällungsreagenzien bzw. -techniken stimmen gut mit den von BLANCHARD [92] publizierten Untersuchungsergebnissen überein.

### **Hinweise auf einen proteingebundenen L-Ascorbinsäure-Anteil**

Die in **Tab. 3.3** dargestellten Ergebnisse für den Einsatz verschiedener Molekulargewicht-Ausschluß-Filter bei der Proteinabtrennung zeigen eine deutliche Abnahme der AA-Wiederfindung mit abnehmender Ausschlußgröße

---

**Tab. 3.2:** Vergleich verschiedener Fällungsreagenzien zur Proteinabtrennung bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Humanplasma mittels HPLC/UV und HPLC/EC

Fällungsreagenz/ -methode	W(AA) <sup>(1)</sup> [%]	w(Protein) <sup>(2)</sup> [%]	Anmerkungen
6 % (w/w) HClO <sub>4</sub>	100	≤0,4	für UV- und EC-Detektion geeignet
10 % (w/w) Trichloressigsäure	95	≤0,4	Peaküberlagerung bei UV-Detektion
6 % (w/w) HClO <sub>4</sub> , 2 % (w/w) HPO <sub>3</sub>	94	≤0,4	für UV- und EC-Detektion geeignet
57 % (w/w) Sulfosalicylsäure	75	≤0,4	Peaküberlagerung bei UV-Detektion, Wiederfindung zu gering
2 % (w/w) HPO <sub>3</sub>	n. b. <sup>(3)</sup>	2,0	Proteinfällung unvollständig
Methanol	n. b.	ca. 30	Proteinfällung unvollständig

(1) L-Ascorbinsäure-Wiederfindung nach Proteinabtrennung bezogen auf den größten ermittelten Wert für die L-Ascorbinsäure-Konzentration in den Meßproben (12,9 mg/L)

(2) relativer Proteingehalt der Meßprobe bezogen auf die Proteinkonzentration im Plasma-Pool (68 mg/L Protein)

(3) nicht bestimmt

(100 kD: AA-Wiederfindung 100 %, 5 kD: AA-Wiederfindung 66 %). Dieser Effekt könnte auf die Adsorption von L-Ascorbinsäure an der Filtermembran oder Assoziation von L-Ascorbinsäure an Plasma-Proteine zurückzuführen sein. Um zu überprüfen, ob ein Teil der L-Ascorbinsäure an der Filtermembran adsorbiert wird, werden Blindversuche mit synthetischen Proben (10 mg/L L-Ascorbinsäure in isotonische Kochsalzlösung) und verschiedenen Molekulargewicht-Ausschluß-Filtern (Ausschlußgrößen: 5 kD, 10 kD, 20 kD, 100 kD) durchgeführt. Die Wiederfindungen für L-Ascorbinsäure im Filtrat liegen bei allen Versuchen zwischen 94 % und 98 %, so daß die beschriebenen Minder-

**Tab. 3.3:** Vergleich verschiedener Molekulargewicht-Ausschluß-Filter zur Proteinabtrennung bei der AA-Bestimmung in Humanplasma mittels HPLC/UV und HPLC/EC (Mittelwerte aus 2 Plasmaproben mit 12,89 mg/L bzw. 16,83 mg/L L-Ascorbinsäure und 65,5 g/L bzw. 80,5 g/L Plasma-Protein)

Ausschlußgröße der MWCO-Filter [kD]	W(AA) [%]	w(Protein) [%]	Anmerkungen
100	100	≤0,4	für UV- und EC-Detektion geeignet
20	85	≤0,4	für UV- und EC-Detektion geeignet
10	80	≤0,4	L-Ascorbinsäure- Wiederfindung zu gering
5	66	≤0,4	L-Ascorbinsäure- Wiederfindung zu gering

befunde an L-Ascorbinsäure (ca. 30 %) nicht auf die Adsorption des Analyten an der Filtermembran zurückgeführt werden können. Die Ursache für die Minderbefunde liegt daher wahrscheinlich in einer Assoziation von Anteilen der L-Ascorbinsäure an Plasma-Proteine. Der mit Hilfe der MWCO-Filter (Ausschlußgröße 5 kD) ermittelte Anteil proteingebundener L-Ascorbinsäure beträgt ca. 30 %, welches gut mit Angaben von BIESALSKI et al. (24 % [4]) übereinstimmt. Für eine mögliche Bindung der L-Ascorbinsäure an Plasma-proteine spricht ferner die Beobachtung, daß L-Ascorbinsäure mit den häufig in Proteinen auftretenden Disulfid-Gruppen wie z. B. Glutathion-Disulfid und Cystin Komplexe bilden kann [108]. Diese Ergebnisse widersprechen jedoch den Angaben anderer Autoren, die durch Ultrafiltration und HPCL/EC-Detektion der L-Ascorbinsäure keine Anbindung des Analyten an Plasmaproteine feststellen können [20].

Bei der Proteinfällung mittels Perchlorsäure, Trichloressigsäure und Perchlorsäure/Metaphosphorsäure-Mischung werden, bei vergleichbarer Effektivität der Proteinabtrennung, quantitative Wiederfindungen für L-Ascorbinsäure in den entweißten Plasma-Proben erreicht. Bei Zugabe der Säuren findet offenbar

aufgrund der Wechselwirkungen zwischen Säure-Anionen und Proteinketten die Verdrängung der ionisch oder über Wasserstoff-Brücken-Bindungen an die Proteine gebundenen AA-Anteils statt. Die im Blutplasma enthaltene L-Ascorbinsäure wird daher, nach der Proteinfällung mit den oben genannten Säuren, vollständig erfaßt.

### 3.4.3 Untersuchungen zur Stabilität von L-Ascorbinsäure

Da die zur Proteinfällung eingesetzte Perchlorsäure bzw. Perchlorsäure/Metaphosphorsäure-Mischung zusätzlich einen stabilisierenden Effekt auf die L-Ascorbinsäure in den Meßproben ausüben sollte (s. **Kapitel 3.1.1**), wird zunächst die Stabilität der L-Ascorbinsäure in den Meßproben bei 4 °C ermittelt. Um Aussagen hinsichtlich der Probenlagerung für den Einsatz der Verfahren im klinisch-chemischen Routinebetrieb treffen zu können, werden Untersuchungen zur Langzeitstabilität von L-Ascorbinsäure in Heparin-Plasma und Meßproben bei -80 °C durchgeführt. Außerdem wird die Stabilität von L-Ascorbinsäure in Kalibrierlösungen ermittelt. Bei den durchgeführten Untersuchungen wird jeweils bestimmt, über welchen Zeitraum die genannten Proben ohne signifikante Änderung der AA-Konzentration gelagert werden können. Eine signifikante Änderung der AA-Konzentration liegt vor, wenn der Konzentrationsunterschied zwischen Beginn und Ende des Untersuchungszeitraumes größer als der 2,8fache Wert der Meßpräzision bei der AA-Bestimmung ist. Diese Definition wurde in Anlehnung an den Begriff des „kritischen Wiederholgrenzbetrags“ ( $r = 2,8 s_W$ ;  $s_W$ : Wiederholpräzision [109]) gewählt, der den Grenzwert angibt, unterhalb dessen die Differenz zwischen zwei einzelnen Meßergebnissen mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von 95 % nicht unterschieden werden kann [109].

#### 3.4.3.1 Einfluß verschiedener Proteinfällungsreagenzien auf die Stabilität von L-Ascorbinsäure in Meßproben

Um den Einfluß der Perchlorsäure bzw. Perchlorsäure/Metaphosphorsäure-Mischung auf die Stabilität von L-Ascorbinsäure in den Meßproben zu ermitteln, werden jeweils drei enteweißte Plasmaproben bei einer Temperatur von 2 °C bis 5 °C aufbewahrt und im Abstand von jeweils 6 min (Perchlorsäure) bzw. 1 h (Perchlorsäure/Metaphosphorsäure-Mischung) die AA-Konzentration mittels HPLC/UV bestimmt. Dabei ergibt sich mit der oben genannten Definition aus

---

der Meßpräzision für die AA-Bestimmung ( $s_{\text{rel}} \leq 3,0 \%$ , s. **Kapitel 4.1.3.1**) ein maximal zulässiger Grenzwert von 8,4 % als Kriterium für nicht-signifikante Konzentrationsänderungen. Bei den mit Perchlorsäure enteiweißten Proben ist bereits nach 1 h eine Abnahme der AA-Konzentration um ca. 14 % festzustellen. Da dieser Wert deutlich größer als der zulässige Grenzwert ist, kann Perchlorsäure nicht zur Stabilisierung der L-Ascorbinsäure in enteiweißten Plasma-Proben eingesetzt werden. Dagegen ist bei den mit der Säuremischung enteiweißten Proben auch nach 9 h nur eine relative Konzentrationsänderung von unter 4 % zu verzeichnen, so daß unter den genannten Bedingungen die Perchlorsäure/Metaphosphorsäure-Mischung als Stabilisierungsreagenz für L-Ascorbinsäure eingesetzt werden kann. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen anderer Autoren, die ebenfalls bei ausschließlicher Verwendung von Perchlorsäure als Stabilisierungsreagenz eine unzureichende Stabilität der L-Ascorbinsäure aufzeigen konnten [79, 100]. Die deutlich größere Stabilität der L-Ascorbinsäure in der Perchlorsäure/Metaphosphorsäure-Mischung könnte auf die komplexbildenden Eigenschaften der Metaphosphorsäure zurückzuführen sein. Dadurch werden vermutlich Spuren von Übergangsmetall-Ionen gebunden, die die Oxidation von L-Ascorbinsäure katalysieren (s. **Kapitel 3.1.1**). Die Verwendung einer 10%igen (w/w) Metaphosphorsäure-Lösung zur Proteinfällung und Stabilisierung von L-Ascorbinsäure bei deren Bestimmung in Humanplasma ist aufgrund der zu geringen Effektivität der Proteinabtrennung nicht möglich (s. **Kapitel 3.2.2.2**). Bei allen folgenden Versuchen wird daher die Perchlorsäure/Metaphosphorsäure-Mischung zur Ausfällung der Plasma-Proteine und Stabilisierung der L-Ascorbinsäure in den Meßproben eingesetzt.

#### **3.4.3.2 Langzeitstabilität von L-Ascorbinsäure in Heparin-Plasma und Meßproben**

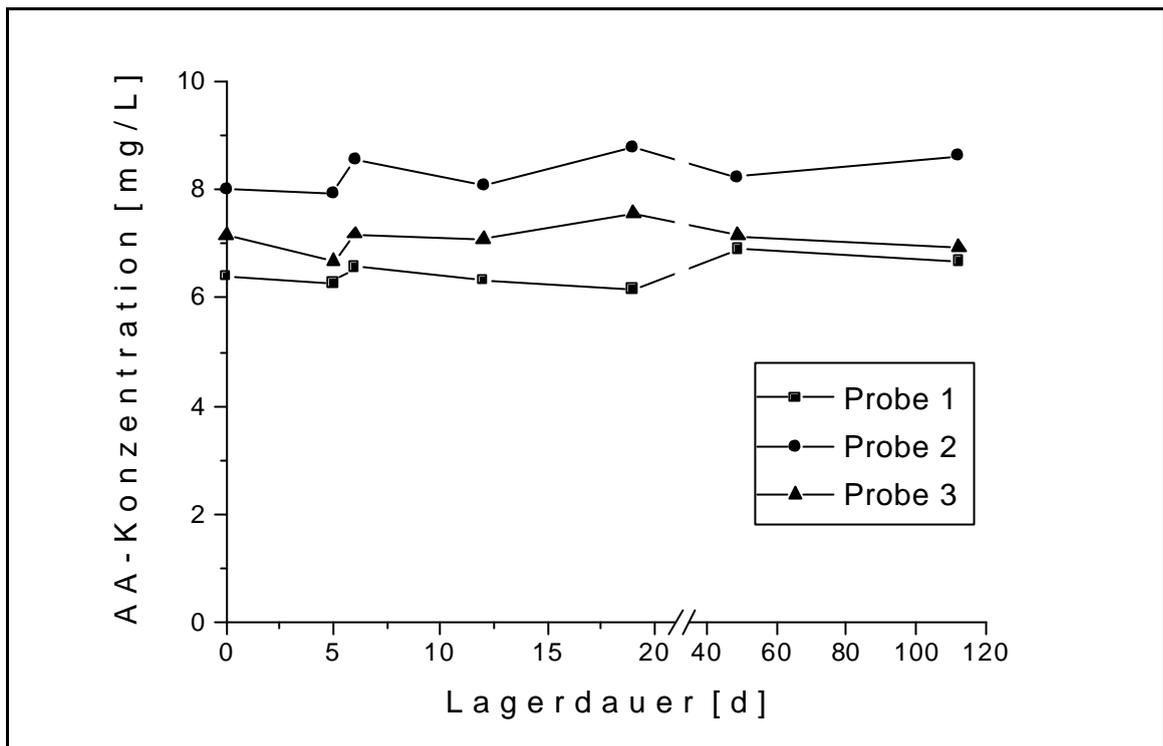
Bei der Ermittlung der Langzeitstabilität von L-Ascorbinsäure werden sowohl Meßproben (Proteinfällungsreagenz: Perchlorsäure/Metaphosphorsäure-Mischung) als auch nichtentweißte Plasmaproben (Heparin-Plasma) untersucht, die bei einer Temperatur von  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Die AA-Konzentrationen der Proben werden mit Hilfe der HPLC/UV im Abstand von mehreren Tagen bestimmt. Wie in **Kapitel 3.4.2.1** erläutert, beträgt der maximal zulässige Wert für nichtsignifikante Konzentrationsänderungen 8,4 % der AA-Ausgangskonzentration. In **Abb. 3.6** und **Abb. 3.7** ist jeweils die AA-Konzentration in den Meßproben bzw. in Heparin-Plasma in Abhängigkeit der

---

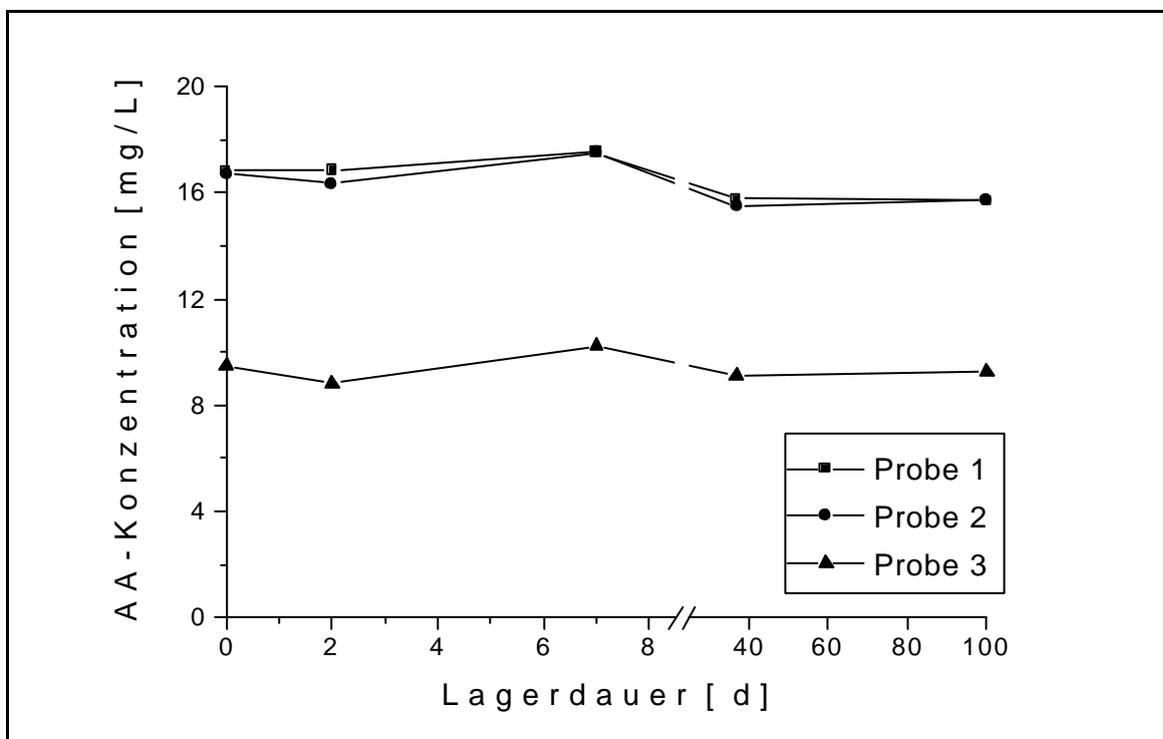
Lagerdauer dargestellt. Bei den in **Abb. 3.6** dargestellten Werten für die AA-Konzentration in den Meßproben treten nach einem Zeitraum von 112 d Konzentrationsänderungen von maximal 7,8 % auf. Im Vergleich mit dem Grenzwert von 8,4 % sind diese als nichtsignifikant einzustufen. In den Heparin-Plasma-Proben (s. **Abb. 3.7**) treten bei einer Lagerdauer von 100 d bei -80 °C ebenfalls keine signifikante Konzentrationsänderung (ermittelter Wert: 7 %) auf. L-Ascorbinsäure ist daher sowohl in Heparin-Plasma als auch in den Meßproben bei -80 °C über einen Zeitraum von mindestens 100 Tagen stabil. Die gute Lagerfähigkeit von Heparin-Plasma bei -80 °C ist beim Einsatz des Verfahrens in der klinisch-chemischen Routineanalytik von Vorteil, wenn die Plasmaproben nicht sofort aufgearbeitet werden können und bis zu einem späteren Zeitpunkt zwischengelagert werden müssen.

#### 3.4.3.3 Stabilität von L-Ascorbinsäure in Kalibrierlösungen

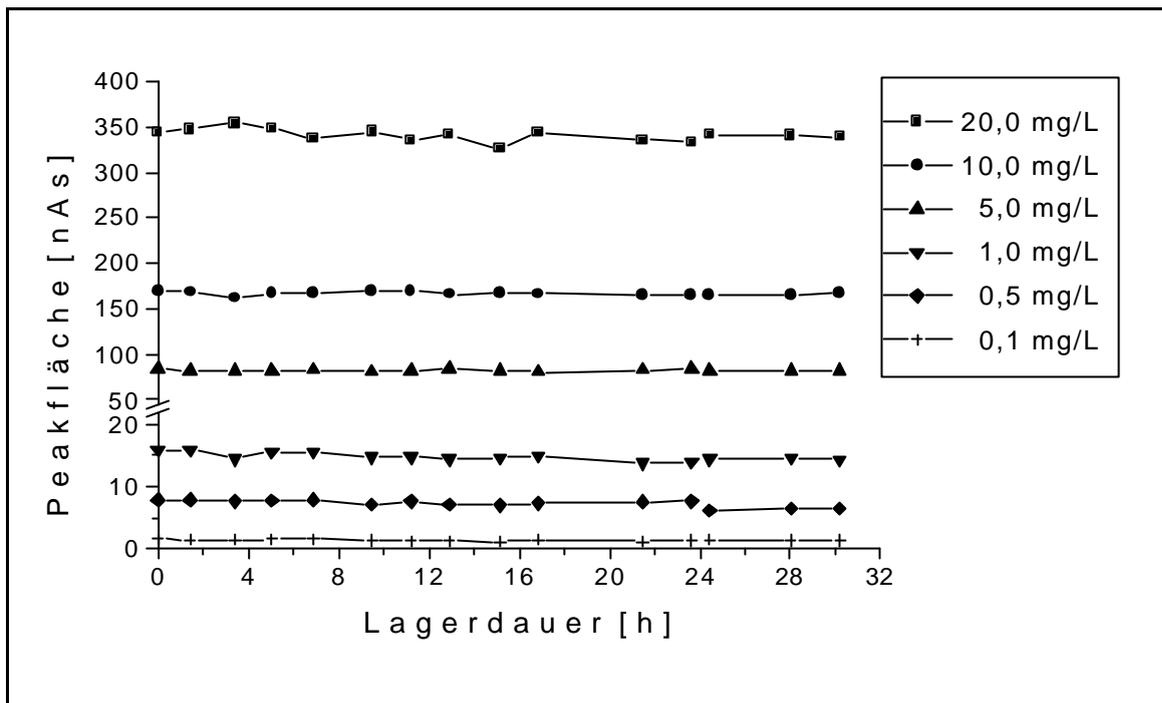
Neben der ausreichenden Stabilität der L-Ascorbinsäure in Realproben muß auch die Stabilität des Analyten in den Kalibrierlösungen gewährleistet sein. Dabei wird ein Konzentrationsbereich von 0,1 mg/L bis 20 mg/L L-Ascorbinsäure untersucht, der dem angestrebten maximalen Meßbereich für die Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Blutplasma entspricht. Zur Stabilisierung der in den Kalibrierlösungen enthaltenen L-Ascorbinsäure wird die Perchlorsäure/Metaphosphorsäure-Mischung als Stabilisierungsreagenz eingesetzt. Die Konzentrationen an Perchlorsäure (3 % (w/w)) und Metaphosphorsäure (1 % (w/w)) werden so gewählt, daß sie denen in den entweißten Plasma-Proben entsprechen. Die Kalibrierlösungen werden bei 2 °C bis 5 °C gelagert und die L-Ascorbinsäure-Konzentration über einen Zeitraum von 30 h in Abständen von ca. 1,5 h mit Hilfe der HPLC/EC bestimmt. In **Abb. 3.8** ist die L-Ascorbinsäure-Konzentration in den verschiedenen Kalibrierlösungen (repräsentiert durch die Peakfläche) in Abhängigkeit von der Lagerdauer aufgetragen. In einem Zeitraum von bis zu 7 h tritt dabei keine signifikante Konzentrationsänderung auf. Bei längerer Lagerung (über 7 h) wird jedoch eine signifikante Abnahme der AA-Konzentration beobachtet, so daß die Kalibrierlösungen täglich neu angesetzt werden müssen.



**Abb. 3.6:** Langzeitstabilität von L-Ascorbinsäure in Meßproben bei -80 °C (Proteinfällung mittels Perchlorsäure/Metaphosphorsäure-Mischung)



**Abb. 3.7:** Langzeitstabilität von L-Ascorbinsäure in Heparin-Plasma bei -80 °C



**Abb. 3.8:** Stabilität von L-Ascorbinsäure in Kalibrierlösungen mit verschiedenen AA-Konzentrationen bei 2 °C bis 5 °C (Stabilisierungsreagenz: Perchlorsäure/Metaphosphorsäure-Mischung)

### 3.5 Zusammenfassende Darstellung der optimierten analytischen Bedingungen zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Humanplasma

Die Überprüfung jedes einzelnen Teilschrittes der Probenvorbereitung und chromatographischen Bestimmung hat die folgenden optimierten analytischen Bedingungen für die Quantifizierung von L-Ascorbinsäure in Humanplasma ergeben:

Die **Entnahme der Blutproben** erfolgt mit evakuierten Blutentnahme-Röhrchen, wonach die Blutproben bis zur Probenvorbereitung in einem Eisbad (0 °C) aufbewahrt werden. Zur **Plasmagewinnung** durch Zentrifugation wird eine Kühlzentrifuge eingesetzt. Durch den Ausschluß von Luftsauerstoff und die Kühlung der Blutproben wird bereits sofort nach der Blutentnahme und im weiteren Verlauf der Probenvorbereitung eine Stabilisierung der L-Ascorbinsäure in den Blut- bzw. Plasma-Proben erreicht.

Anschließend erfolgt die **Abtrennung der im Blutplasma enthaltenen Proteine** durch Zugabe einer Perchlorsäure/Metaphosphorsäure-Mischung, wobei ein Fällungsgrad von >99,6 % erreicht wird. Außerdem hat sich die Perchlorsäure/Metaphosphorsäure-Mischung als geeignetes **Stabilisierungsreagenz** für L-Ascorbinsäure in den Meßproben erwiesen. Dabei ist eine Lagerung der Meßproben bis zu 8 h bei 2 °C bis 5 °C bzw. 100 Tagen bei -80°C ohne Änderung der ursprünglichen AA-Konzentration möglich. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen anderer Autoren [79, 100], die ebenfalls eine Perchlorsäure/Metaphosphorsäure-Mischung zur Stabilisierung der L-Ascorbinsäure einsetzen.

Bei der abschließenden **chromatographischen Bestimmung der L-Ascorbinsäure** hat sich ein chromatographisches System bestehend aus einer 125 × 4 mm Trennsäule, gepackt mit LiChrospher® RP-18, und einem 45 mmol/L Phosphatpuffer pH 2 als optimal erwiesen. Damit konnte im Vergleich zu den komplex zusammengesetzten mobilen Phasen bei der Reversed-Phase Ionenpaar-Chromatographie [20, 85, 91] eine mobile Phase mit einfacher Zusammensetzung zur chromatographischen Bestimmung von L-Ascorbinsäure eingesetzt werden. Weiterhin führt das optimierte chromatographische System zu einer Verkürzung der Analysendauer ( $t_R(\text{L-Ascorbinsäure}) = 2,0 \text{ min}$ ) gegenüber literaturbekannten Verfahren ( $t_R(\text{L-Ascorbinsäure}) = 15,6 \text{ min}$  [68]). Bei den hier entwickelten Verfahren erfolgt eine zuverlässige Quantifizierung der L-Ascorbinsäure aufgrund der Basislinientrennung des Analyt-Peaks von Matrixbestandteilen und dem Lösemittel-Peak. Die Ermittlung der AA-Konzentration erfolgt vorteilhaft durch UV-Detektion bei einer Detektionswellenlänge von 243 nm bzw. EC-Detektion bei einem Arbeitspotential von +0,85 V gegen Ag/AgCl. Das hier verwendete chromatographische System kann sowohl bei der UV- als auch bei der EC-Detektion eingesetzt werden.

---

### **3.6 Indirekte Bestimmung der Dehydro-L-ascorbinsäure-Konzentration**

Da eine direkte Bestimmung der DHAA-Konzentration mittels UV- oder EC-Detektion nicht möglich ist (s. **Kapitel 3.1.2**), soll die Konzentration des Analyten indirekt bestimmt werden. Dazu wird zunächst die AA-Konzentration in den Plasma-Proben ermittelt. Anschließend erfolgt nach Zugabe eines Reduktionsmittels die Bestimmung der Gesamtascorbinsäure-Konzentration. Die DHAA-Konzentration entspricht dann der Differenz dieser beiden Meßwerte.

Zur zuverlässigen Bestimmung der DHAA-Konzentration in Blutproben ist zunächst die Stabilisierung der darin enthaltenen Dehydro-L-ascorbinsäure notwendig. Durch Untersuchungen an wäßrigen DHAA-Lösungen soll die Effektivität verschiedener Reagenzien bei der Reduktion von Dehydro-L-ascorbinsäure ermittelt werden. Ferner wird anhand von wäßrigen DHAA-Lösungen die optimale Reaktionsdauer sowie die Vollständigkeit und Wiederholbarkeit der Reduktionsreaktion überprüft. Abschließend erfolgt die Ermittlung der Wiederholbarkeit für die Reduktion des DHAA-Anteils in synthetischen AA/DHAA -Mischungen.

#### **3.6.1 Stabilisierung von Dehydro-L-ascorbinsäure**

Bei Körpertemperatur (37 °C) verläuft der Zerfall von Dehydro-L-ascorbinsäure in Heparin-Plasma sehr schnell (Halbwertszeit ca. 2 min [14]), so daß nach der Blutentnahme sofort Maßnahmen zu deren Stabilisierung notwendig sind. Aufgrund der publizierten Untersuchungsergebnisse zum Zerfall von Dehydro-L-ascorbinsäure in synthetischen Proben sollte eine Stabilisierung in Blutproben durch Temperaturniedrigung möglich sein (s. **Kapitel 3.1.2**).

#### **3.6.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen bei der Reduktion von Dehydro-L-ascorbinsäure**

Um zu ermitteln, welches Reagenz unter den bereits erarbeiteten Bedingungen am besten zur Reduktion von Dehydro-L-ascorbinsäure geeignet ist, soll die Reduktionswirkung von Dithiothreitol, L-Cystein, D,L-Homocystein und 2,3-Dimercapto-1-propanol verglichen werden. Dazu werden wäßrige DHAA-

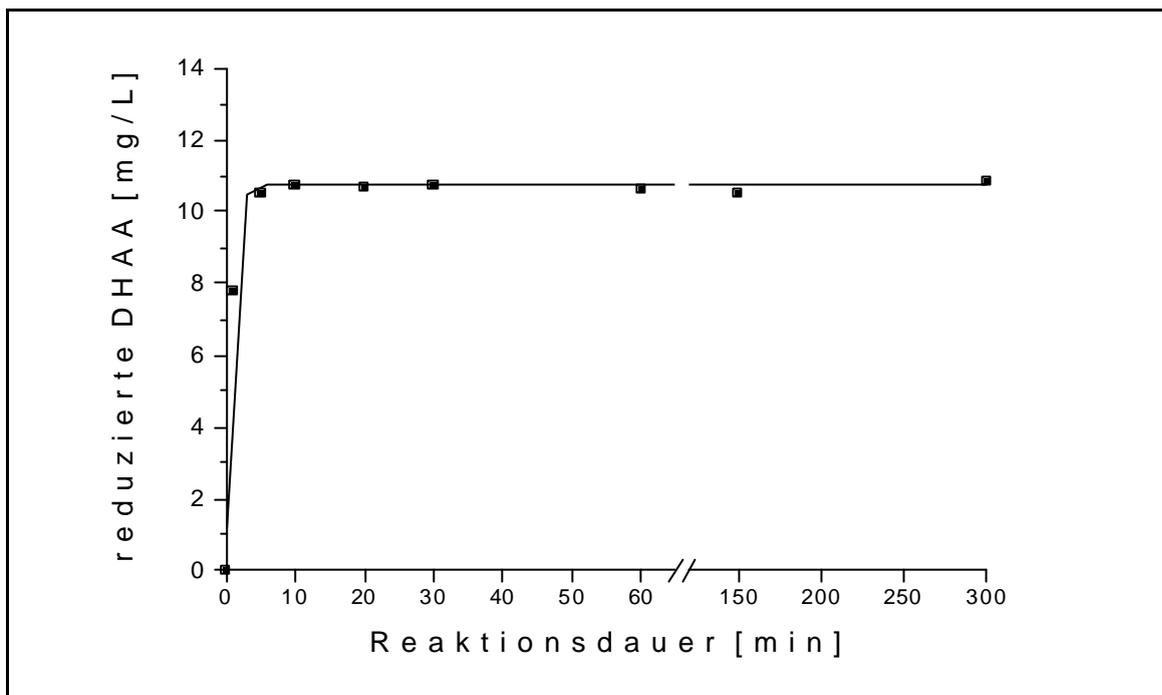
Lösungen ( $\beta(\text{DHAA}) = 5 \text{ mg/L}$ ) mit einem 50-fachen molaren Überschuß einer Lösung des jeweiligen Reduktionsmittels in einem Phosphat-Puffer mit pH 7 - 7,5 versetzt. Nach 10 min wird die gebildete L-Ascorbinsäure mit Hilfe der HPLC/UV bestimmt. Dabei wird auch überprüft, ob die Reduktionsmittel zu Peaküberlagerungen mit dem AA-Peak führen. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in **Tab. 3.4** zusammengefaßt.

**Tab.3.4:** Überprüfung verschiedener Reagenzien zur Reduktion von Dehydro-L-ascorbinsäure in wäßrigen Lösungen ( $\beta(\text{DHAA}) = 5 \text{ mg/L}$ , 50facher molarer Überschuß des jeweiligen Reduktionsmittels, Reaktionsdauer: 10 min bei pH 7 bis pH 7,5 und Raumtemperatur), n. b. = nicht bestimmt

Reduktionsmittel	Umsatz	Anmerkungen
Dithiothreitol	102 %	keine Peaküberlagerung
L-Cystein	5 %	geringer Umsatz auch nach 30 min
D,L-Homocystein	n. b.	Peaküberlagerung
2,3-Dimercapto-1-propanol	n. b.	wegen extremer Geruchsbelästigung für Routinezwecke nicht einsetzbar

Bei der Reduktion von Dehydro-L-ascorbinsäure mit Dithiothreitol (DTT) wird nach 10 min ein quantitativer Umsatz (102 %) erreicht. Bei der chromatographischen Bestimmung der AA-Konzentration ( $t_R = 2,0 \text{ min}$ ) tritt keine Peaküberlagerung durch Dithiothreitol ( $t_R = 10,3 \text{ min}$ ) auf. Der Einsatz von L-Cystein und D,L-Homocystein ist aufgrund des sehr geringen Umsatzes bei der Reduktion (bei L-Cystein ca. 5 %) bzw. einer Überlagerung des AA-Peaks ( $t_R = 2,0 \text{ min}$ ) mit dem D,L-Homocystein-Peak ( $t_R = 2,0 \text{ min}$ ) nicht möglich. 2,3-Dimercapto-1-propanol ist aufgrund der extremen Geruchsbelästigung nicht zur Reduktion von Dehydro-L-ascorbinsäure bei Routineuntersuchungen geeignet. Weiterhin erfolgt die Elution des 2,3-Dimercapto-1-propanols erst nach 13,2 min, welches im Vergleich zum Einsatz von Dithiothreitol ( $t_R = 10,3 \text{ min}$ ) eine Verlängerung der Analysendauer um ein Drittel zur Folge hätte. Im Gegensatz zu Literaturergebnissen (s. **Kapitel 3.1.2** und **3.2.2**), ist daher unter den hier gewählten Bedingungen nur mit Dithiothreitol eine schnelle und quantitative Reduktion der Dehydro-L-ascorbinsäure möglich.

Zur **Bestimmung der optimalen Reaktionsdauer** (vollständiger Umsatz nach möglichst kurzer Zeit) wird die Zeitabhängigkeit der Umsetzung von Dehydro-L-ascorbinsäure ( $\beta$ (DHAA) ca. 10 mg/L) mit Dithiothreitol bestimmt (s. **Abb 3.9**). Dabei zeigt sich, daß die Reduktion bereits nach 10 min quantitativ ist und der ermittelte Wert für die AA-Konzentration für mindestens 5 h stabil bleibt.



**Abb 3.9:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von L-Ascorbinsäure bei Reduktion von Dehydro-L-ascorbinsäure ( $\beta$ (DHAA) = 11,4 mg/L) mit einem 25-fachen molaren Überschuß an Dithiothreitol (pH 7 - 7,5; Raumtemperatur)

Weiterhin wird die **Vollständigkeit und Wiederholbarkeit der Reduktion** bei unterschiedlichen DHAA-Konzentrationen untersucht. Dafür werden jeweils zehn Proben von DHAA-Lösungen mit Massenkonzentrationen von 5 mg/L; 2,5 mg/L und 1,25 mg/L eingesetzt. Diese werden mit Dithiothreitol-Lösung versetzt und nach 10 min Reaktionsdauer die AA-Konzentration mittels HPLC/UV bestimmt (Ergebnisse s. **Tab. 3.4**). Die ermittelten Wiederfindungen (100,0 % bis 102,2 %) und entsprechenden relativen Standardabweichungen ( $s_{\text{rel}} = 2,3 \%$  bis  $3,8 \%$ ,  $n = 10$ ) belegen eine quantitative und wiederholbare Reduktion der Dehydro-L-ascorbinsäure in wäßrigen Lösungen.

**Tab. 3.4:** Wiederfindungen für Dehydro-L-ascorbinsäure bei deren Reduktion durch Dithiothreitol in verschiedenen konzentrierten, wäßrigen DHAA-Lösungen (Reaktionsdauer 10 min, pH 7 - 7,5, Raumtemperatur)

$\beta$ (DHAA) [mg/L]	W [%]	s (n = 10) [%]	s <sub>rel</sub> (n = 10) [%]
5,00	100,0	2,3	2,3
2,50	102,2	2,8	2,7
1,25	101,8	3,9	3,8

### 3.6.3 Reduktion von Dehydro-L-ascorbinsäure in Gegenwart von L-Ascorbinsäure

Ziel dieser Untersuchungen ist die Überprüfung der Vollständigkeit und Wiederholbarkeit der Reduktion des DHAA-Anteils in synthetischen Proben, deren AA- und DHAA-Konzentrationen etwa denen der späteren, realen Analysenproben entsprechen. Dazu werden synthetische Proben eingesetzt, die 5 mg/L L-Ascorbinsäure und 1,25 mg/L bzw. 2,5 mg/L Dehydro-L-ascorbinsäure (entspricht 16 % (w/w) bzw. 33 % (w/w) DHAA-Anteil an der Gesamtascorbinsäure-Konzentration) enthalten. Der DHAA-Anteil wird im Vergleich zu den im Blutplasma erwarteten Werten (maximal 20 %, s. **Kapitel 2.1**) relativ hoch angesetzt, um bei der Differenzbildung einen möglichst großen Meßeffect zu erzielen. Die synthetischen Proben werden, wie zuvor beschrieben, mit Dithiothreitol-Lösung versetzt und die gebildete L-Ascorbinsäure nach 10 min Reaktionsdauer chromatographisch mit Hilfe der UV-Detektion bestimmt. Wie **Tab. 3.5** entnommen werden kann, ist die Wiederfindung für Dehydro-L-ascorbinsäure in beiden AA/DHAA-Mischungen quantitativ (106 % bzw. 108 %). Die hohen Werte für die relative Standardabweichung der Wiederfindung (18 % bzw. 10 %) beruhen auf der Tatsache, daß die Bestimmung der vergleichsweise niedrigen DHAA-Konzentration durch Differenzbildung zwischen zwei relativ großen Werten für die AA- und Gesamtascorbinsäure-Konzentration erfolgt (Fehlerfortpflanzungsgesetz, s. **Kapitel 4.2.2**). Erwartungsgemäß fällt bei höheren DHAA-Anteilen die relative Standardabweichung niedriger aus als bei geringeren DHAA-Anteilen ( $s_{rel} = 10$  % bei 33 % (w/w) DHAA gegenüber  $s_{rel} = 18$  % bei 16 % (w/w) DHAA).

**Tab. 3.5:** Wiederfindung von Dehydro-L-ascorbinsäure bei der Reduktion von synthetischen AA/DHAA-Mischungen (Reduktionsmittel: Dithiothreitol, n = 8)

<b>DHAA-Anteil: 16 % (w/w) der Gesamtascorbinsäure-Konzentration</b>				
	<b>b(AA)</b> <b>[mg/L]</b>	<b>b(DHAA)</b> <b>[mg/L]</b>	<b>b(AA+DHAA)</b> <b>[mg/L]</b>	<b>W(DHAA)</b> <b>[%]</b>
$\bar{x}$	4,86	0,97	5,88	105,5
<b>s</b>	0,08	0,01	0,14	18,7
<b>s<sub>rel</sub> [%]</b>	1,7	1,0	2,4	17,7

<b>DHAA-Anteil: 33 % (w/w) der Gesamtascorbinsäure-Konzentration</b>				
	<b>b(AA)</b> <b>[mg/L]</b>	<b>b(DHAA)</b> <b>[mg/L]</b>	<b>b(AA+DHAA)</b> <b>[mg/L]</b>	<b>W(DHAA)</b> <b>[%]</b>
$\bar{x}$	4,69	2,36	7,24	108,0
<b>s</b>	0,29	0,05	0,09	10,8
<b>s<sub>rel</sub> [%]</b>	6,1	2,0	1,2	10,0

Zusammenfassend ergibt sich, daß Dehydro-L-ascorbinsäure indirekt, d. h. nach Reduktion zu L-Ascorbinsäure, chromatographisch bestimmt werden kann. Dabei zeichnet sich die Reduktion mit Dithiothreitol durch einen schnellen und quantitativen Verlauf aus. Ferner führt der Zusatz des Reduktionsmittels nicht zu Peaküberlagerungen bei der anschließenden chromatographischen Bestimmung der Gesamtascorbinsäure-Konzentration. Aufgrund der geringen Konzentrationsunterschiede vor und nach Zugabe des Reduktionsmittels ergibt sich für die relative Standardabweichung der DHAA-Konzentration ein vergleichsweise hoher Wert.

### 3.7 Zusammenfassung der optimierten analytischen Bedingungen zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma

Die in den **Kapiteln 3.3 bis 3.6** beschriebenen Arbeitsschritte lassen sich zu einem Verbundverfahren zusammenfassen, dessen Ablauf in **Abb 3.10** schematisch dargestellt ist und im folgenden kurz erläutert wird:

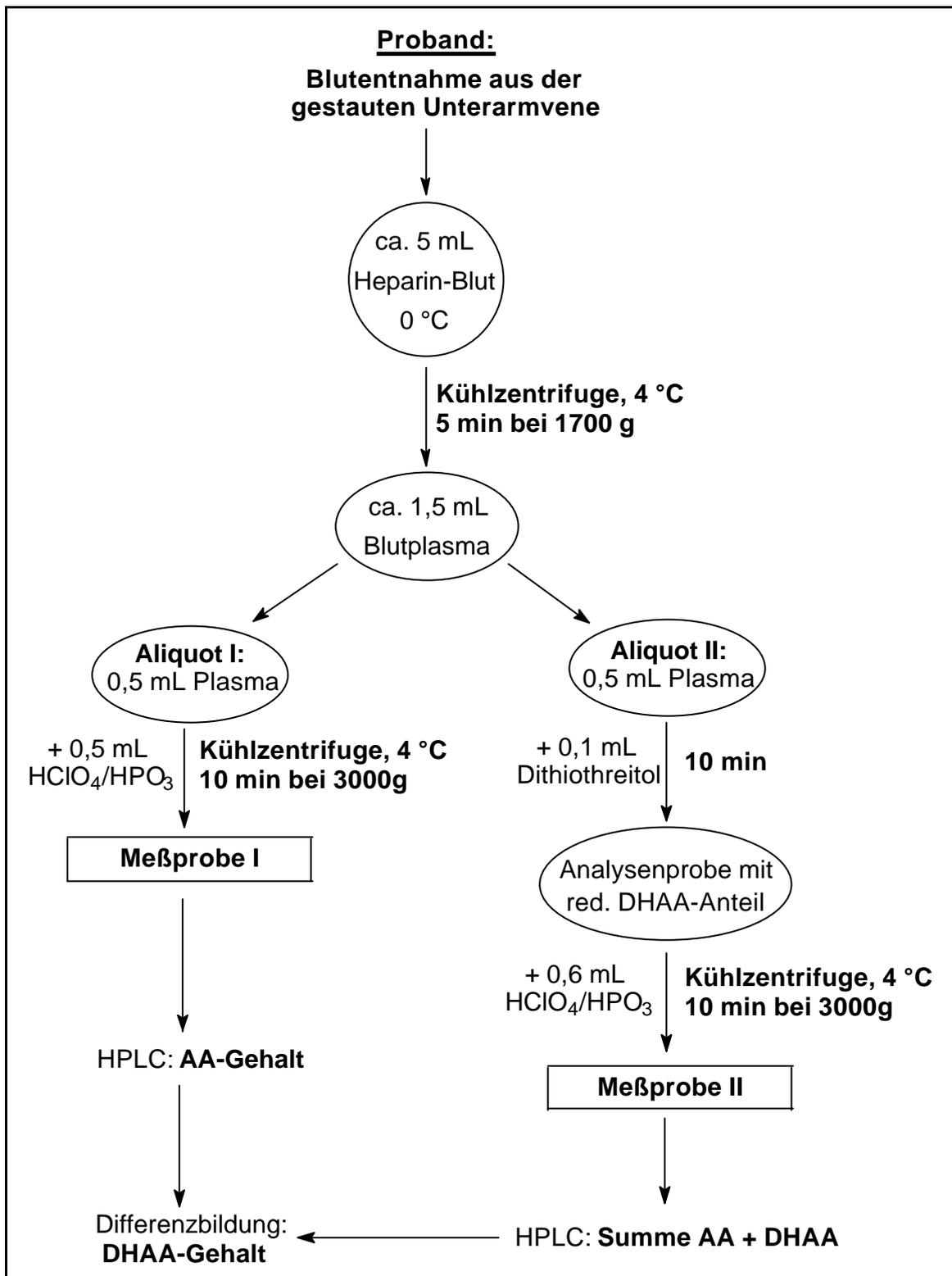
- (1) Die Entnahme der Blutprobe erfolgt aus der gestauten Unterarmvene mit Hilfe eines evakuierten Blutentnahme-Röhrchens, welches den Kontakt der Probe mit Luftsauerstoff und damit die Oxidation der L-Ascorbinsäure verhindert. Die Blutprobe wird bis zur weiteren Probenvorbereitung in einem Eisbad (0 °C) gelagert um dem Zerfall der L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure entgegenzuwirken.
  - (2) Zur Abtrennung der festen Blutbestandteile wird eine Kühlzentrifuge (4 °C) eingesetzt, wobei die Kühlung dem Zerfall der Analyte entgegen wirkt.
  - (3) Für den Fall, daß auch Dehydro-L-ascorbinsäure bestimmt werden soll, wird die Plasma-Probe in zwei Aliquote (I und II) aufgeteilt.
  - (4) **Aliquot I:** Zur Bestimmung der AA-Konzentration erfolgt sofort die Ausfällung der Plasmaproteine.  
  
**Aliquot II:** Zur Reduktion des DHAA-Anteils wird Dithiothreitol zugegeben. Bei pH 7 bis pH 7,5 wird eine quantitative Reduktion bereits nach 10 min Reaktionsdauer erreicht.
  - (5) **Aliquot I und II:** Zur Fällung der Plasmaproteine hat sich die Verwendung eine Säure-Mischung die 6 % (w/w) Perchlorsäure und 2 % (w/w) Metaphosphorsäure enthält, bewährt. Der Zusatz des Fällungsreagenzes im Volumenverhältnis 1 +1 führt gleichzeitig zu einer Stabilisierung der in den Proben enthaltenen L-Ascorbinsäure, da das Redoxpotential so stark erhöht wird, daß eine Oxidation durch Luftsauerstoff nicht mehr erfolgen kann.
  - (6) Zur Quantifizierung wird ein chromatographisches System aus einer Standardtrennsäule (125 mm × 4 mm) gepackt mit einem C18-Material und einem 45 mmol/L Phosphat-Puffer pH 2 eingesetzt. Die Bestimmung erfolgt
-

wahlweise mittels UV-Detektion bei einer Detektionswellenlänge von 243 nm oder EC-Detektion (Glassy Carbon-Arbeitselektrode) bei einem Arbeitspotential von +0,85 V gegen Ag/AgCl. Dabei wird aus der Meßprobe I die AA-Konzentration und aus Meßprobe II die Gesamtascorbinsäure-Konzentration erhalten.

- (7) Die DHAA-Konzentration ergibt sich anschließend indirekt aus der Differenz der Konzentrationen in den Meßproben I und II.

Um bei der angestrebten Anwendung des entwickelten Verbundverfahrens in der klinisch-chemischen Routineanalytik eine möglichst große Anzahl von Analysenproben bearbeiten zu können, wird der Teilschritt der chromatographischen AA-Bestimmung automatisiert. Dabei wird ein automatischer Probengeber eingesetzt, der die Meßproben in das HPLC-System injiziert. Dieser Automatisierungsschritt zeichnet sich gegenüber der Probeninjektion von Hand allgemein durch eine höhere Meßpräzision und die rationelle Bearbeitung einer großen Anzahl von Meßproben im Rahmen von Routineuntersuchungen aus. Um dem Zerfall der L-Ascorbinsäure in den Meßproben entgegenzuwirken, werden diese auf Temperaturen von 2 °C bis 5 °C gekühlt und durch eine lichtundurchlässige Abdeckung vor der Einwirkung von Tageslicht abgeschirmt.

---



**Abb. 3.10:** Schematischer Arbeitsablauf des optimierten Verbundverfahrens zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma mittels HPLC/UV (Detektionswellenlänge: 243 nm) oder HPLC/EC (Arbeitspotential: +0,85 V gegen Ag/AgCl)

## 4 Validierung der HPLC/UV- und HPLC/EC-Verfahren

Da klinisch-chemische Untersuchungen ein wichtiger Bestandteil bei der Diagnose, Prognose, Therapie und Verlaufsbeurteilung von Erkrankungen sind [110], ist die Validierung, d. h. die Dokumentation der Zuverlässigkeit der dabei eingesetzten Analysenverfahren, von besonderer Bedeutung. Es ist allerdings darauf hinzuweisen, daß die hier verwendete Definition des Begriffes „Validität“ von der in der klinischen Chemie gebräuchlichen Definition abweicht. In der klinischen Chemie wird unter „Validität klinisch-chemischer Befunde“ die statistische Sicherheit eines Analysenverfahrens verstanden, mit dem aus dem Auftreten eines bestimmten Analyseergebnisses auf das Vorliegen einer vermuteten Krankheit geschlossen werden kann [110].

Bei der Validierung eines Analysenverfahrens ist die Bestimmung folgender Validierungselemente üblich [111, 112]:

- Linearer Bereich
- Richtigkeit und Präzision
- Nachweis- und Bestimmungsgrenze
- Wiederfindung
- Spezifität
- Robustheit

In den „Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien“ von 1988 [25] werden bei Routineverfahren nur die Bestimmung der Präzision und Richtigkeit zur laborinternen Qualitätskontrolle und die Durchführung von Ringversuchen zur externen Qualitätskontrolle vorgeschrieben. Im Rahmen eines Entwurfes von 1996 [113] ist die Erweiterung der Qualitätskontrolle um die Bestimmung der „Stabilität des Meßsystems“ und der „systematischen Meßabweichungen“ vorgesehen. Die Richtlinien enthalten jedoch keine Angaben zur Ermittlung weiterer Validierungsdaten sowie zum Umfang und zur Durchführung einer Validierung bei neu entwickelten, klinisch-chemischen Analysenverfahren. Diesbezüglich existieren zur Zeit auch keine weiteren verbindlichen Regelungen.

Wie bereits in **Kapitel 1** angedeutet, besteht die Vermutung, daß die Ursache für die widersprüchlichen Angaben im Zusammenhang mit Vitamin C zum Teil auf unvollständige Angaben zur Validierung bzw. einen zu geringen Stich-

---

probenumfang ( $n \leq 5$ ) bei den angegebenen Validierungsdaten [14, 15, 19, 69, 75, 78, 82] zurückzuführen ist. Weiterhin werden bei der Ermittlung der einzelnen Validierungselemente häufig unterschiedliche mathematische Modelle angewendet, so daß die Vergleichbarkeit der Validierungsdaten stark eingeschränkt ist. Bei HPLC-Verfahren kann z. B. die Nachweisgrenze nach DIN 32 645 [114] aus der Kalibrierfunktion oder nach der IUPAC-Nomenklatur für die Chromatographie [115] aus dem Wert für das Grundrauschen der Basislinie, berechnet werden. Dabei liefert jedes Verfahren andere Ergebnisse, wobei jedoch keines als „richtiger“ angesehen werden kann, da beide Modelle gleichermaßen gerechtfertigt sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Validierung der entwickelten Bestimmungsverfahren in Anlehnung an folgende Richtlinien und Normen durchgeführt.

- *Validation of analytical procedures*, Commission of the European Communities, Committee for Proprietary Medical Products, Note for Guidance (1994)
- *Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien*, Deutsches Ärzteblatt **85** (1988) 1-16
- DIN 38 402, Teil 51, *Kalibrierung von Analysenverfahren, Auswertung von Analyseergebnissen und lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngrößen* (1986)
- DIN 32 645, *Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze: Ermittlung unter Wiederholbedingungen, Begriffe, Verfahren, Auswertung* (1994)

Teilweise können diese Regelungen nur als Anhaltspunkte dienen, da z. B. die DIN 38 402, Teil 51 für Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchungen entwickelt wurde, die nicht ohne weiteres auf den Bereich der klinisch-chemischen Analytik übertragen werden kann.

Nachfolgend wird zunächst die Validierung des HPLC/UV-Verfahrens zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma beschrieben. Im Anschluß werden die Ergebnisse der Validierung des HPLC/EC-Verfahrens dargestellt und dessen Leistungsfähigkeit mit der des HPLC/UV-Verfahrens verglichen.

---

## 4.1 Validierung des HPLC/UV-Verfahrens zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Humanplasma

### 4.1.1 Linearer Bereich

Da es sich bei der HPLC um ein kalibrierbedürftiges Analysenverfahren handelt, muß der funktionale Zusammenhang zwischen Analyt-Konzentration und Meßsignal (Peak-Fläche) ermittelt werden. Der Konzentrationsbereich, in dem das Meßsignal direkt proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe ist, wird als linearer Bereich des Analysenverfahrens bezeichnet [116]. Dabei bedeutet "direkt proportional" nicht unbedingt eine mathematisch lineare Abhängigkeit; es können auch Funktionen höheren Grades auftreten [117]. Die Überprüfung des funktionalen Zusammenhanges zwischen Peakfläche und AA-Konzentration erfolgt in Anlehnung an DIN 38 402, Teil 51 [118]. Danach müssen für den Arbeitsbereich eines Analysenverfahrens folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

- Abdeckung des Konzentrationsbereiches für spätere Anwendungen
- linearer Zusammenhang zwischen Meßsignal und Analyt-Konzentration
- konstante Analysenpräzision über den gesamten Arbeitsbereich (Homogenität der Varianzen)
- signifikante Unterscheidbarkeit der Meßwerte vom Blindwert, d. h. die Meßwerte müssen größer oder gleich der Bestimmungsgrenze des Verfahrens sein

Daher wird bei der Ermittlung des linearen Bereiches für das HPLC/UV-Verfahren wie folgt vorgegangen:

- (1) Wahl eines vorläufigen Arbeitsbereiches
- (2) Aufnahme der Meßdaten und Prüfung auf Linearität des funktionalen Zusammenhanges zwischen dem Meßsignal und der Analyt-Konzentration (Anpassungstest nach MANDEL [119])
- (3) Prüfung der Meßdaten auf Homogenität der Varianzen
- (4) Ermittlung der Bestimmungsgrenze nach DIN 32 645 [114] zur Absicherung der unteren Grenze des Arbeitsbereiches

Bei Inhomogenität der Varianzen oder Unlinearität ist der Arbeitsbereich zu verkleinern, bis die genannten Bedingungen erfüllt sind, oder es müssen

---

aufwendigere Kalibriermodelle (z. B. eine Regressionsfunktion 2. Grades oder gewichtete Regressionsrechnungen) angewendet werden [117, 118]. Die Ermittlung der Bestimmungsgrenze nach DIN 32 645 [114] zur Absicherung der unteren Grenze des Arbeitsbereiches kann nur erfolgen, wenn ein linearer Zusammenhang zwischen Meßsignal und Analyt-Konzentration sowie Homogenität der Varianzen gegeben ist. Anderenfalls muß auf alternative Verfahren (z. B. nach EURACHEM/D [120]) zurückgegriffen werden.

Zur Ermittlung des linearen Arbeitsbereiches für das HPLC/UV-Verfahren, wird zunächst anhand von synthetischen Proben nach den oben genannten Kriterien die Kalibrierfunktion überprüft. Anschließend erfolgt die Überprüfung des funktionalen Zusammenhanges zwischen der Peakfläche und AA-Konzentration bei Realproben (Blutplasma-Matrix).

#### 4.1.1.1 Überprüfung der Kalibrierfunktion

Die **Wahl des vorläufigen Arbeitsbereichs** für das HPLC/UV-Verfahren erfolgt im Hinblick auf den in der Literatur für die AA-Konzentration im Blutplasma angegebenen Wertebereich von 3 mg/L bis 14 mg/L [8]. Das im Verlauf der Probenvorbereitung zugesetzte Proteinfällungsreagenz führt zu einer Verdünnung der Plasmaproben im Verhältnis 1 + 1 (s. **Kapitel 3.7**), so daß die AA-Konzentration in den Meßproben 1,5 mg/L bis 7 mg/L beträgt. Um auch Abweichungen von dem in der Literatur angegebenen Wertebereich mit erfassen zu können, wird ein vorläufiger Arbeitsbereich von 0,2 mg/L bis 20 mg/L L-Ascorbinsäure gewählt.

Zur **Ermittlung der Kalibrierfunktion** werden Kalibrierlösungen mit 0,2 mg/L; 0,5 mg/L; 1 mg/L; 2 mg/L; 5 mg/L; 10 mg/L und 20 mg/L L-Ascorbinsäure (Stabilisierungsreagenz: 3 % (w/w) Perchlorsäure, 1 % (w/w) Metaphosphorsäure) eingesetzt. Die Lösungen werden jeweils zehnfach mittels HPLC/UV analysiert und die Mittelwerte, Standardabweichungen und relative Standardabweichungen für die Fläche des AA-Peaks berechnet (Ergebnisse s. **Tab. 4.1**).

Um zu prüfen, ob die erhaltenen Meßdaten einer linearen Kalibrierfunktion entsprechen, wird ein **Anpassungstest nach MANDEL** durchgeführt (Erläuterung der statistischen Berechnungen s. **Anhang**). Dabei werden aus den Meßdaten in **Tab. 4.1** die Kalibrierfunktionen 1. und 2. Grades sowie die

**Tab. 4.1:** Mittelwerte, Standardabweichungen und relative Standardabweichungen für die Peakfläche bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Kalibrierlösungen mittels HPLC/UV

b(AA) [mg/L]	Peakfläche $\bar{x}$ [mVs]	s (n = 10) [mVs]	s <sub>rel</sub> (n = 10) [%]
0,2	4,825	0,469	9,7
0,5	13,689	0,613	4,5
1,0	27,104	0,599	2,2
2,0	53,497	0,911	1,7
5,0	138,596	1,057	0,8
10,0	278,861	2,048	0,7
20,0	563,988	1,675	0,3

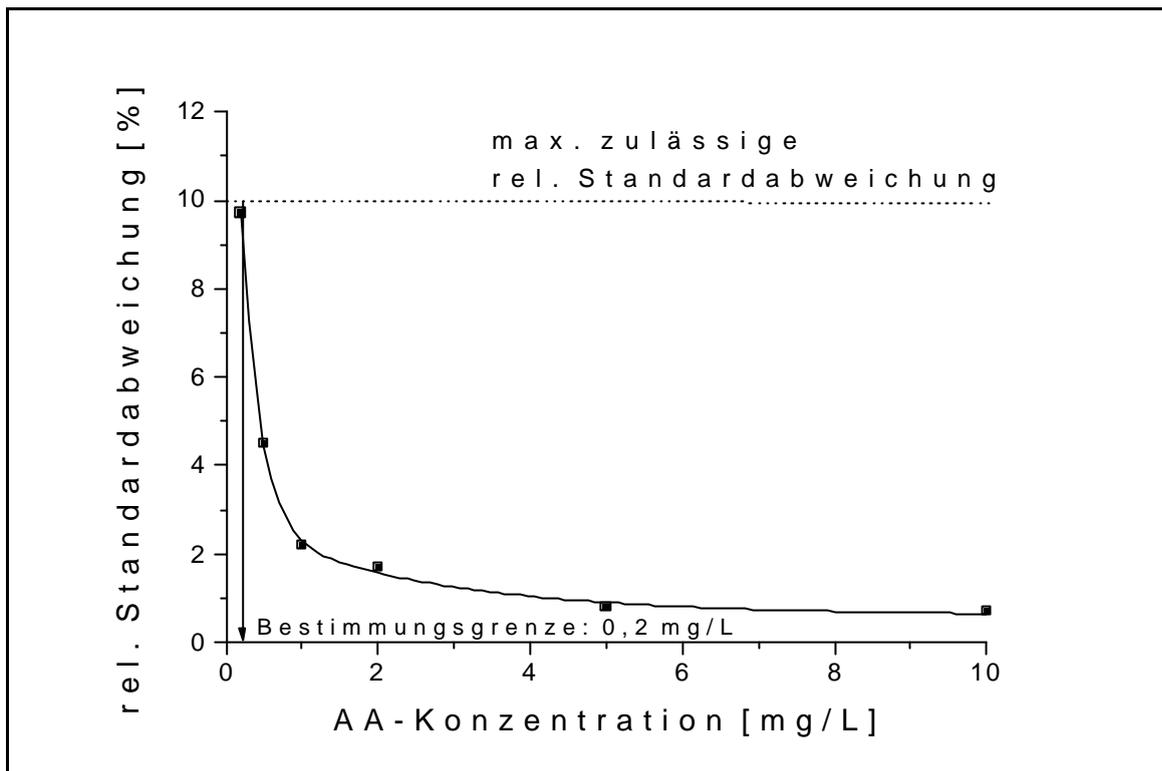
jeweiligen Reststandardabweichungen berechnet (s. **Tab. 4.2**). Anschließend wird die Verringerung der Reststandardabweichung, die sich aufgrund der Wahl des Regressionsmodells 2. Grades gegenüber dem 1. Grades ergibt, auf Signifikanz geprüft. Da der hier berechnete Prüfwert PW kleiner als der Tabellenwert  $F(f_1 = 1, f_2 = N - 3, P = 99 \%)$  ist, wird durch die Kalibrierfunktion 2. Grades keine signifikant bessere Anpassung erreicht; die Kalibrierfunktion ist somit linear (berechneter Korrelationskoeffizient: 0,9999).

Zur **Überprüfung der Varianzhomogenität** werden aus jeweils zehn Meßwerten für die niedrigste und höchste Konzentration des vorläufigen Arbeitsbereiches die Varianzen  $s_1^2$  und  $s_N^2$  gebildet und einem F-Test unterworfen (ausführliche Erläuterung der statistischen Berechnungen s. **Anhang**). Für die in **Tab. 4.1** dargestellten Meßwerte ergibt sich bei einem Meßbereich von 0,2 mg/L bis 20 mg/L L-Ascorbinsäure eine Inhomogenität der Varianzen. Durch Einschränkung des Meßbereiches auf z. B. 0,2 mg/L bis 10 mg/L ist keine Homogenität der Varianzen erreichbar, so daß zur Beschreibung des funktionalen Zusammenhanges zwischen Peakfläche und AA-Konzentration gewichtete Regressionsmodelle herangezogen werden müßten. Dies würde aber im Routinebetrieb einen nicht akzeptablen Rechenaufwand bedeuten und wird daher hier nicht durchgeführt. Die mit Hilfe des HPLC/UV-Verfahrens bestimmten Meßwerte zeigen daher eine Konzentrationsabhängigkeit der Meßpräzision.

**Tab. 4.2:** Ergebnisse des Linearitätstests nach MANDEL (s. **Anhang**) für die Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Kalibrierstandards (0,2 mg/L bis 20 mg/L) mittels HPLC/UV

	Kalibrierfunktion	
	1. Grades $y = a + b x$	2. Grades $y = a + b x + c x^2$
Konstante a [mVs]	-1,6917	-0,7525
Konstante b [mVs/(mg/L)]	28,2274	27,6634
Konstante c [mVs/(mg/L) <sup>2</sup> ]	entfällt	0,0288
Reststandardabweichung [mVs]	1,3605	0,6934
Prüfwert (PW)		15,3
F( $f_1=1, f_2=N-3, P=99\%$ )		21,2

Aufgrund der Inhomogenität der Varianzen kann die **Absicherung der unteren Arbeitsgrenze** nicht durch Ermittlung der Bestimmungsgrenze nach DIN 32 645 [114] erfolgen, so daß ein graphisches Verfahren nach EURACHEM/D [120] eingesetzt wird. Unter der **Bestimmungsgrenze** eines Analyseverfahrens wird die niedrigste Konzentration eines Analyten in einer Probe verstanden, die mit einer bestimmten Präzision und Richtigkeit bestimmt werden kann [116]. Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze wird anhand von Mehrfachanalysen der Probenlösungen einer Verdünnungsreihe die kleinste Konzentration ermittelt, für die die relative Standardabweichung einen vorher festgelegten Wert nicht überschreitet. Für die Bestimmung von L-Ascorbinsäure in den synthetischen Proben wird, entsprechend einem Vorschlag von KROMIDAS et al. [111], eine maximal zulässige Meßpräzision von 10 % festgelegt. In **Abb 4.1** sind die relativen Standardabweichungen als Funktion der AA-Konzentration dargestellt (Meßwerte s. **Tab. 4.1**). Mit der maximal zulässigen Meßpräzision von 10 % ergibt sich eine Bestimmungsgrenze von 0,2 mg/L. Der Arbeitsbereich des HPLC/UV-Verfahrens zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Kalibrierlösungen ist daher bis zu einer unteren Grenze von 0,2 mg/L statistisch abgesichert.



**Abb. 4.1:** Graphische Ermittlung der Bestimmungsgrenze für L-Ascorbinsäure bei der HPLC mit UV-Detektion nach EURACHEM/D [120]

#### 4.1.1.2 Linearer Bereich des Analyseverfahrens bei Realproben

Da die AA-Bestimmung in Humanplasma erfolgen soll, muß auch die lineare Abhängigkeit des Meßsignals von der AA-Konzentration in Realproben überprüft werden. Um eine den Realproben entsprechende Probenmatrix für die Herstellung der Konzentrationsreihe zu erhalten, wird in einem Plasma-Pool durch Zugabe des Enzyms Ascorbat-Oxidase (EC 1.10.3.3) die vollständige Oxidation der nativen L-Ascorbinsäure bewirkt. Anschließend werden die Plasma-Proteine und das Enzym durch Ausfällen mit der Perchlorsäure/Metaphosphorsäure-Mischung und Zentrifugieren abgetrennt; die dabei erhaltene Probenlösung wird in zehn Aliquote aufgeteilt. Durch Aufstocken mit wäßrigen AA-Lösungen werden Proben erhalten, deren AA-Konzentrationen (0,2 mg/L bis 20 mg/L) äquidistant über den gesamten Arbeitsbereich verteilt ist. Damit wird eine gleichmäßige Bewertung des späteren Arbeitsbereiches möglich. Die bei der chromatographischen Bestimmung der AA-Konzentration erhaltenen Ergebnisse sind in **Tab. 4.4** dargestellt.

**Tab. 4.4:** Mittelwerte, Standardabweichungen und relative Standardabweichungen für die Peakfläche bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure in aufgestockten Blutplasma-Proben mittels HPLC/UV

b(AA) [mg/L]	Peakfläche $\bar{x}$ [mVs]	s (n = 10) [mVs]	s <sub>rel</sub> (n = 10) [%]
0,2	7,44	0,78	10,7
2,4	65,10	1,20	1,8
4,6	124,50	2,94	2,4
6,8	187,02	1,56	0,8
9,0	247,20	3,42	1,4
11,2	312,60	2,88	0,9
13,4	371,76	1,98	0,5
15,6	445,68	2,22	0,5
17,8	505,26	3,48	0,7
20,0	563,22	5,46	1,0

Mit Hilfe des Anpassungstests nach MANDEL (s. **Anhang**) kann ein linearer Zusammenhang (berechneter Korrelationskoeffizient: 0,9998) zwischen Peakfläche und AA-Konzentration nachgewiesen werden (s. **Tab. 4.5**). Der Varianzhomogenitäts-Test (s. **Anhang**) ergibt, daß keine Homogenität der Varianzen gegeben ist und somit eine Konzentrationsabhängigkeit der Meßpräzision vorliegt. Die Absicherung der unteren Grenze des Arbeitsbereiches erfolgt daher wie in **Kapitel 4.1.1.1** beschrieben, durch Ermittlung der Bestimmungsgrenze nach EURACHEM/D [120]. Da bei der oben beschriebenen Konzentrationsreihe eine äquidistante Verteilung der Konzentrationswerte über den gesamten Arbeitsbereich vorliegt, wird der für die Ermittlung der Bestimmungsgrenze wichtige untere Konzentrationsbereich nicht ausreichend repräsentiert, so daß nur eine Abschätzung der Bestimmungsgrenze möglich ist. Daher wird zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze eine zweite Konzentrationsreihe mit folgenden AA-Konzentrationen angesetzt: 0,2 mg/L; 0,5 mg/L; 1,0 mg/L; 2,0 mg/L; 5,0 mg/L und 10 mg/L. Die Bestimmung der Meßpräzision ergibt die in **Tab. 4.6** dargestellten Werte. Daraus ergibt sich eine **Bestimmungsgrenze** von 0,2 mg/L (1,1 µmol/L) bzw. 4,0 ng/Injektion (22,7 pmol/Injektion) für L-Ascorbinsäure in Realproben. Ein Vergleich mit Literaturwerten ist nicht möglich, da Angaben zur Bestimmungsgrenze für die UV-Detektion von L-Ascorbinsäure bisher nicht publiziert wurden [81, 82, 85, 93].

**Tab. 4.5:** Ergebnisse des Linearitätstest nach MANDEL (s. **Anhang**) für die AA-Bestimmung in Proben mit Blutplasma-Matrix mittels HPLC/UV

	funktionaler Zusammenhang	
	1. Grades $y = a + b x$	2. Grades $y = a + b x + c x^2$
Konstante a [mVs]	-3,8470	-0,0107
Konstante b [mVs/(mg/L)]	28,3985	27,1502
Konstante c [mVs/(mg/L) <sup>2</sup> ]	entfällt	0,0618
Reststandardabweichung [mVs]	4,2740	0,1324
Prüfwert (PW)		3,34
F( $f_1=1, f_2=N-3, P=99\%$ )		12,25

**Tab. 4.6:** Meßpräzision als Grundlage zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze für L-Ascorbinsäure in Realproben (Blutplasma-Matrix)

b(AA) [mg/L]	s <sub>rel</sub> [%] (n = 10)
0,2	10,9
0,5	7,3
1,0	4,2
2,0	2,7
5,0	1,4
10,0	1,0

Die Überprüfung des funktionalen Zusammenhanges zwischen Meßsignal und Analyt-Konzentration hat also für das HPLC/UV-Verfahren zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Humanplasma einen linearen Bereich von 0,2 mg/L bis 20 mg/L für Kalibrierlösungen und Realproben (Blutplasma-Matrix) ergeben. Dabei entspricht die untere Grenze des Arbeitsbereiches der Bestimmungsgrenze des HPLC/UV-Verfahrens und gewährleistet so eine sichere Quantifizierung der L-Ascorbinsäure bis zu Konzentrationen von 0,2 mg/L.

### 4.1.2 Nachweisgrenze

Unter der Nachweisgrenze eines Analyseverfahrens wird die niedrigste Konzentration eines Analyten in der Probe verstanden, die noch detektierbar aber nicht unbedingt quantifizierbar ist [116]. Die Bestimmung der Nachweisgrenze eines Analyseverfahrens kann, wie die Ermittlung der Bestimmungsgrenze nach DIN 32 645 [114], rechnerisch aus den Daten der Kalibrierfunktion erfolgen. Zur Anwendung dieses Rechenverfahrens müssen die ermittelten Meßergebnisse folgende Voraussetzungen erfüllen:

- (1) Die Meßwerte der Kalibrierproben und der Blindproben müssen voneinander unabhängig und normalverteilt sein.
- (2) Im Bereich zwischen Leerwert und höchstem Kalibrierwert besteht Homogenität der Varianzen.
- (3) Zwischen dem Meßsignal und der Analyt-Konzentration besteht ein linearer Zusammenhang.

Bei den in **Tab. 4.4** dargestellten Meßwerten zur Ermittlung des funktionalen Zusammenhanges zwischen Meßsignal und AA-Konzentration ist die Homogenität der Varianzen nicht gegeben (s. **Kapitel 4.1.1.2**), so daß die Ermittlung der Nachweisgrenze nicht nach DIN 32 645 [114] möglich ist. Zur Bestimmung dieses Validierungsparameters wird daher die Definition der Nachweisgrenze aus den IUPAC-Richtlinien zur Nomenklatur in der Chromatographie [115] herangezogen. Dabei ist die Nachweisgrenze definiert als der 2-fache Wert des Grundrauschens für das Detektorsignal. Für die UV-Detektion erfolgt die Ermittlung des Grundrauschens anhand von 20 willkürlich ausgewählten Chromatogrammen von Humanplasma-Proben. Der Wert von  $\leq 0,1$  mV entspricht einer AA-Konzentration von 0,03 mg/L. Die Nachweisgrenze des HPLC/UV-Verfahrens zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Humanplasma beträgt damit 0,06 mg/L (0,34  $\mu$ mol/L) bzw. 1,20 ng/Injektion (6,80 pmol/Injektion). In der Literatur werden Werte von 6,8 pmol/Injektion bis 11,4 pmol/Injektion für die Nachweisgrenze der AA-Bestimmung mittels HPLC/UV angegeben [79-81, 93]. Damit kann das entwickelte HPLC/UV-Verfahren bezüglich der Nachweisgrenze als gleichwertig zu literaturbekannten Verfahren bewertet werden.

---

### 4.1.3 Präzision

Die Präzision der Analyseergebnisse ist ein Maß für die bei n-facher Wiederholung ( $n \geq 6$ ) einer Analyse auftretenden zufälligen Fehler. Dabei wird je nach Art und Weise der Wiederholung zwischen verschiedenen Arten der Präzision unterschieden [111, 117]. Die **Meßpräzision** wird durch wiederholte Durchführung des Meßvorganges bestimmt und beschreibt somit die durch das Analysengerät bedingten Fehler. Unter **Methodenpräzision** wird die zufällige Streuung der Analyseergebnisse bei Durchführung des gesamten Analyseverfahrens verstanden. Die Ermittlung der Wiederholpräzision erfolgt durch wiederholte Ausführung der Analysen in einem Labor durch einen Prüfer an einem Gerät. Bei Ausführung der Analysen durch verschiedene Laboratorien und Prüfer an verschiedenen Geräten wird von **Vergleichspräzision** gesprochen. Die Angabe der **Tag-zu-Tag-Präzision** beschreibt die Streuung der Analyseergebnisse bei Untersuchung der Proben unter sonst gleichen Bedingungen, aber an verschiedenen Tagen.

#### 4.1.3.1 Meßpräzision

Die Meßpräzision des HPLC-Verfahrens mit UV-Detektion wird durch jeweils zehnfache Injektion von sechs verschiedenen Plasmaproben ermittelt. Die Probenvorbereitung erfolgt dabei wie in **Kapitel 3.7** beschrieben. Bei der Bestimmung der AA-Konzentration werden die in **Tab. 4.5** aufgeführten Ergebnisse erhalten.

**Tab. 4.5:** Meßpräzision bei der Bestimmung der AA-Konzentration in Humanplasma mittels HPLC/UV

Probe	$\bar{x}$ [mg/L]	s (n = 10) [mg/L]	s <sub>rel</sub> (n = 10) [%]
1	16,84	0,36	2,1
2	16,74	0,34	2,0
3	9,48	0,10	1,1
4	16,12	0,36	2,2
5	5,94	0,18	3,0
6	13,54	0,20	1,5

Für die Meßpräzision ergeben sich relative Standardabweichungen zwischen 1,1 % und 3,0 %. Der BARYA und HERNANZ [69, 121] angegebene Wert für die Meßpräzision bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure mit HPLC/UV beträgt  $s_{\text{rel}} = 5,4 \%$  ( $n = 10$ ). Damit besitzt das hier vorgestellte Analyseverfahren eine höhere Meßpräzision.

#### 4.1.3.2 Wiederholpräzision

Die Wiederholpräzision wird durch jeweils zehnfache Durchführung der gesamten Analyse (Probenvorbereitung und Bestimmung mittels HPLC/UV) von zwölf verschiedenen Plasmaproben ermittelt (s. **Kapitel 3.7**). Dabei werden relative Standardabweichungen von 0,9 % bis 5,2 % erhalten (s. **Tab. 4.6**). Diese Werte liegen etwas höher als die der Meßpräzision (1,1 % bis 3,0 %, s. **Kapitel 4.1.3.1**). Dieser Effekt ist auf zufällige Fehler bei der Probenvorbereitung zurückzuführen. In der Literatur werden Werte für die Wiederholpräzision von 0,6 % bis 7 % angegeben [81, 82, 84, 85].

**Tab. 4.6:** Wiederholpräzision bei der Bestimmung der AA-Konzentration in Humanplasma mittels HPLC/UV

Probe	$\bar{x}$ [mg/L]	s (n = 10) [mg/L]	$s_{\text{rel}}$ (n = 10) [%]
1	9,14	0,36	3,9
2	14,52	0,60	4,1
3	14,26	0,36	2,5
4	6,30	0,32	5,1
5	8,08	0,12	1,5
6	8,94	0,08	0,9
7	22,04	0,70	3,2
8	17,48	0,20	1,1
9	14,32	0,51	3,6
10	8,44	0,44	5,2
11	18,74	0,39	2,1
12	16,15	0,66	4,1

### 4.1.3.3 Tag-zu-Tag-Präzision

Die Tag-zu-Tag-Präzision der Analysenergebnisse wird aufgrund der „Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien“ [25] als Merkmal zur laborinternen Qualitätskontrolle herangezogen. Die dabei einzuhaltende relative Standardabweichung der Analysenergebnisse ist vom Referenzwertebereich des betrachteten Parameters abhängig. Für Untersuchungsergebnisse, die für medizinische Zwecke eingesetzt werden sollen, darf die Standardabweichung der Analysenergebnisse von Tag zu Tag nicht mehr als 1/12 der Breite des Referenzwertebereichs betragen [25]. Da für die AA-Konzentration in Humanplasma kein Referenzwertebereich definiert ist, wird der in der Literatur angegebene Konzentrationsbereich von 3 mg/L bis 14 mg/L [8, 74] als Berechnungsgrundlage festgelegt. Damit ergibt sich eine maximal zulässige Tag-zu-Tag-Präzision von 6,5 %. Um zu überprüfen, ob das entwickelte HPLC/UV-Verfahren dieser Anforderung genügt, wurden aus den Meßwerten zur Untersuchung der Langzeitstabilität (s. **Kapitel 3.4.2.2**) die relativen Standardabweichungen bestimmt (Ergebnisse s. **Tab. 4.7**). Dabei ist zu beachten, daß bei den Heparin-Plasma-Proben die zufälligen Fehler der Probenvorbereitung

**Tab. 4.7:** Tag-zu-Tag-Präzision der Analysenergebnisse bei der Bestimmung der AA-Konzentration in Humanplasma mittels HPLC/UV

<b>Probenart: Heparin-Plasma</b>			
<b>Probe</b>	$\bar{x}$ <b>[mg/L]</b>	<b>s (n = 5)</b> <b>[mg/L]</b>	<b>s<sub>rel</sub> (n = 5)</b> <b>[%]</b>
1	16,54	0,78	4,7
2	16,36	0,82	5,0
3	9,38	0,53	5,7

<b>Probenart: enteiweißtes Plasma</b>			
<b>Probe</b>	$\bar{x}$ <b>[mg/L]</b>	<b>s (n = 7)</b> <b>[mg/L]</b>	<b>s<sub>rel</sub> (n = 7)</b> <b>[%]</b>
1	12,95	0,52	4,0
2	16,64	0,67	4,0
3	14,22	0,54	3,8

und chromatographischen Bestimmung in den Wert der Standardabweichung mit einfließen, während die Standardabweichung für die AA-Konzentration bei den enteweißten Plasma-Proben nur die zufälligen Fehler der chromatographischen Bestimmung berücksichtigt. Da für beide Meßreihen die ermittelten Werte für die Tag-zu-Tag-Präzision bei  $\leq 5,7$  % liegen, genügt das HPLC/UV-Verfahren den Anforderungen der Richtlinien der Bundesärztekammer [25]. In der Literatur werden für die Tag-zu-Tag-Präzision Werte von 1 % bis 6 % angegeben [81, 82, 84, 85], welche in guter Übereinstimmung mit den eigenen Untersuchungsergebnissen stehen.

#### 4.1.4 Richtigkeit

Die Richtigkeit von Analyseergebnissen ist ein Maß für die Abweichung des Meßwertes vom Bezugswert (Sollwert) und repräsentiert somit die systematischen Fehler des Analysenverfahrens [117]. Die Richtigkeit der Analyseergebnisse wird daher auch in den „Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien“ [25] zur laborinternen Qualitätskontrolle herangezogen. Dabei darf die Abweichung des Analyseergebnisses vom Sollwert nicht mehr als das dreifache der Tag-zu-Tag-Präzision der Analyseergebnisse betragen. Mit einem Wert von 6,5 % für die Tag-zu-Tag-Präzision ergibt sich für das HPLC/UV-Verfahren eine maximal zulässige Abweichung der Analyseergebnisse vom Sollwert von 20 %. Zur Ermittlung der Richtigkeit des entwickelten HPLC/UV-Verfahrens werden kommerziell erhältliche Kontroll-Standards für die Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Humanplasma eingesetzt. Nach der Rekonstituierung dieser gefriergetrockneten Proben werden diese dem gesamten Analysenablauf (s. **Kapitel 3.7**) unterworfen. Die Ergebnisse der chromatographischen Bestimmung sind in **Tab. 4.8** dargestellt. Für die UV-Detektion läßt sich eine sehr gute Übereinstimmung der Meßwerte mit den Sollwerten feststellen (Abweichungen vom Sollwert: -3,3 % bis -5,6 %), so daß die vorgeschriebene Anforderung bezüglich der Richtigkeit durch das entwickelte HPLC/UV-Verfahren erfüllt wird.

Als zusätzliche Hinweise für die Richtigkeit des Bestimmungsverfahrens können die Ergebnisse der Wiederfindungsstudien (s. **Kapitel 4.1.5**) und der Überprüfung der Spezifität des Analysenverfahrens (s. **Kapitel 4.1.6**) herangezogen werden [111]. Diese bestätigen zusätzlich die sehr guten Ergebnisse der Bestimmung der AA-Konzentrationen in den Kontrollstandards.

**Tab. 4.8:** Ergebnisse der Untersuchungen von kommerziell erhältlichen Kontrollstandards zur AA-Bestimmung in Humanplasma mittels HPLC/UV

	Kontrolle K 1	Kontrolle K 2
<b>Sollwert<sup>(1)</sup> b(AA) [mg/L]</b>	3,62	12,95
<b>maximal zulässiger Streubereich<sup>(2)</sup> b(AA) [mg/L]</b>	2,90 - 4,34	10,36 - 15,54
<b>Meßwert<sup>(3)</sup> b(AA) [mg/L]</b>	3,50	12,23
<b>Abweichung des Meßwertes vom wahren Wert [%]</b>	-3,3	-5,6

<sup>(1)</sup> Angaben des Herstellers (Immundiagnostik GmbH, Bensheim)

<sup>(2)</sup> berechnet aus dem wahren Wert und der maximal zulässigen Abweichung (20 %) der Meßwerte vom wahren Wert

<sup>(3)</sup> Mittelwert aus jeweils einer Doppelbestimmung

#### 4.1.5 Wiederfindung

Die Bestimmung der Wiederfindung ist notwendig, da diese ebenfalls einen wichtigen Hinweis zur Richtigkeit der Analysenergebnisse liefert [111]. Anhand von Untersuchungen zur Wiederfindung der Analyte kann ermittelt werden, ob es im Verlauf der Probenvorbereitung zu Verlusten an den zu analysierenden Substanzen kommt. Bei der Bestimmung der Wiederfindung für L-Ascorbinsäure werden zehn Vollblut-Proben mit jeweils drei verschiedenen AA-Lösungen aufgestockt. Durch die Verwendung von Vollblut für die Aufstockversuche, ist die Überprüfung der gesamten Probenvorbereitung auf eventuelle Substanzverluste möglich. Dabei müssen die Aufstocklösungen in isotonischer Kochsalzlösung (0,9 % (w/w) NaCl) angesetzt werden, um bei der Zugabe zum Vollblut die Hämolyse zu verhindern. Bei der Berechnung der Wiederfindung muß beachtet werden, daß sich die aufgestockte L-Ascorbinsäure nur im Blutplasma verteilt und somit der Hämatokrit-Wert (Anteil der festen Blutkompartimente am Vollblut) berücksichtigt werden muß. Die in **Tab. 4.9** dargestellten Ergebnisse der Untersuchungen weisen einen Mittelwert der Wiederfindungen von 100,8 % (n = 29) sowie eine Standardabweichung und relative Standardabweichung von jeweils 4,2 % auf. Aufgrund der quantitativen Wiederfindung und der geringen Standardabweichung kann davon ausgegangen werden, daß im Verlaufe der Probenvorbereitung keine Verluste an L-Ascorbinsäure auftreten. Dieses Ergebnis unterstützt die in **Kapitel 4.1.4** ermittelten Werte für die Richtigkeit des HPLC/UV-Verfahrens.

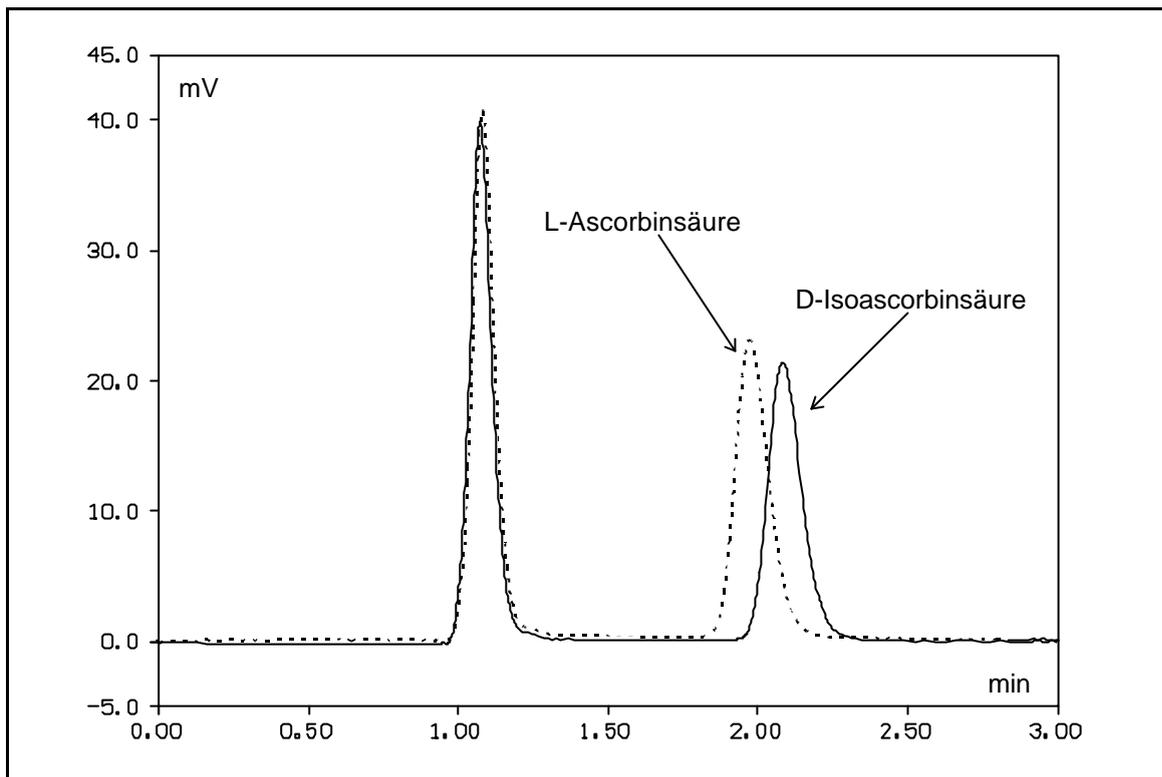
**Tab. 4.9:** Wiederfindungen für L-Ascorbinsäure beim Aufstocken von Vollblut (Konzentrationsbestimmung mittels HPLC/UV)

Probe	Ausgangs- konzentration [mg AA/1 mL Vollblut]	Hämatokrit -Wert [%]	Wiederfindung [%]		
			6 mg AA aufgestockt	9 mg AA aufgestockt	12 mg AA aufgestockt
1	4,15	46	105,0	98,7	97,2
2	8,25	42	108,7	101,4	99,0
3	3,89	47	100,7	(84,8) <sup>(1)</sup>	96,6
4	5,85	48	105,5	97,0	96,3
5	5,89	45	104,3	100,1	97,0
6	9,34	37	107,5	100,4	102,9
7	5,12	47	100,7	100,7	94,7
8	9,15	44	101,4	95,9	95,9
9	5,44	47	104,1	100,1	99,0
10	8,78	45	110,8	105,1	95,7

<sup>(1)</sup> Ausreißer, eliminiert durch GRUBBS-Test (statistische Berechnungen s. **Anhang**)

#### 4.1.6 Spezifität

Ein Analysenverfahren arbeitet spezifisch, wenn es in der Lage ist, die zu bestimmende Substanz ohne Verfälschung durch andere in der Probe enthaltene Komponenten zu erfassen [111]. Die Überprüfung der Spezifität eines chromatographischen Bestimmungsverfahrens ist besonders wichtig, da die Identifizierung der Analyte in der Regel ausschließlich über deren Retentionszeiten erfolgt. Dabei besteht vor allem bei der Analyse biologischer Proben die Gefahr, daß ein Analyt-Peak von Begleitkomponenten mit gleicher Retentionszeit überlagert wird und somit eine Verfälschung der Analyseergebnisse eintritt. Bei der chromatographischen Bestimmung von L-Ascorbinsäure mittels UV-Detektion kommt es z. B. in Gegenwart von D-Isoascorbinsäure zu Peaküberlagerungen in den Chromatogrammen ( $t_R(\text{AA}) = 1,97 \text{ min}$ ;  $t_R(\text{D-Isoascorbinsäure}) = 2,07 \text{ min}$ , s. **Abb. 4.2**).



**Abb. 4.2:** Vergleich der Chromatogramme von L-Ascorbinsäure- und D-Isoascorbinsäure-Lösungen (Massenkonzentration jeweils 6 mg/L in 3 % (w/w) Perchlorsäure/1 % (w/w) Metaphosphorsäure, UV-Detektion bei 243 nm)

Mit der Nahrung aufgenommene D-Isoascorbinsäure<sup>(1)</sup> (s. **Abb. 1.1**) ist anschließend im Blutplasma nachweisbar [86]. Die große strukturelle Ähnlichkeit von D-Isoascorbinsäure und L-Ascorbinsäure führt nicht nur zu Peaküberlagerungen bei der chromatographischen Bestimmung der L-Ascorbinsäurekonzentration, sondern auch zu Störungen bei den Spezifitätstests für das HPLC/UV-Verfahren. Diese Störungen können jedoch vermieden werden, wenn die Blutentnahme in nüchternem Zustand erfolgt, da 14 h nach Einnahme einer D-Isoascorbinsäure-haltigen Mahlzeit diese nicht mehr im Blutplasma nachweisbar ist [32, 86]. Bei literaturbekannten Bestimmungsverfahren sind die beschriebenen Störungen durch D-Isoascorbinsäure bis jetzt gar nicht oder nur unzureichend berücksichtigt worden [81, 86, 124].

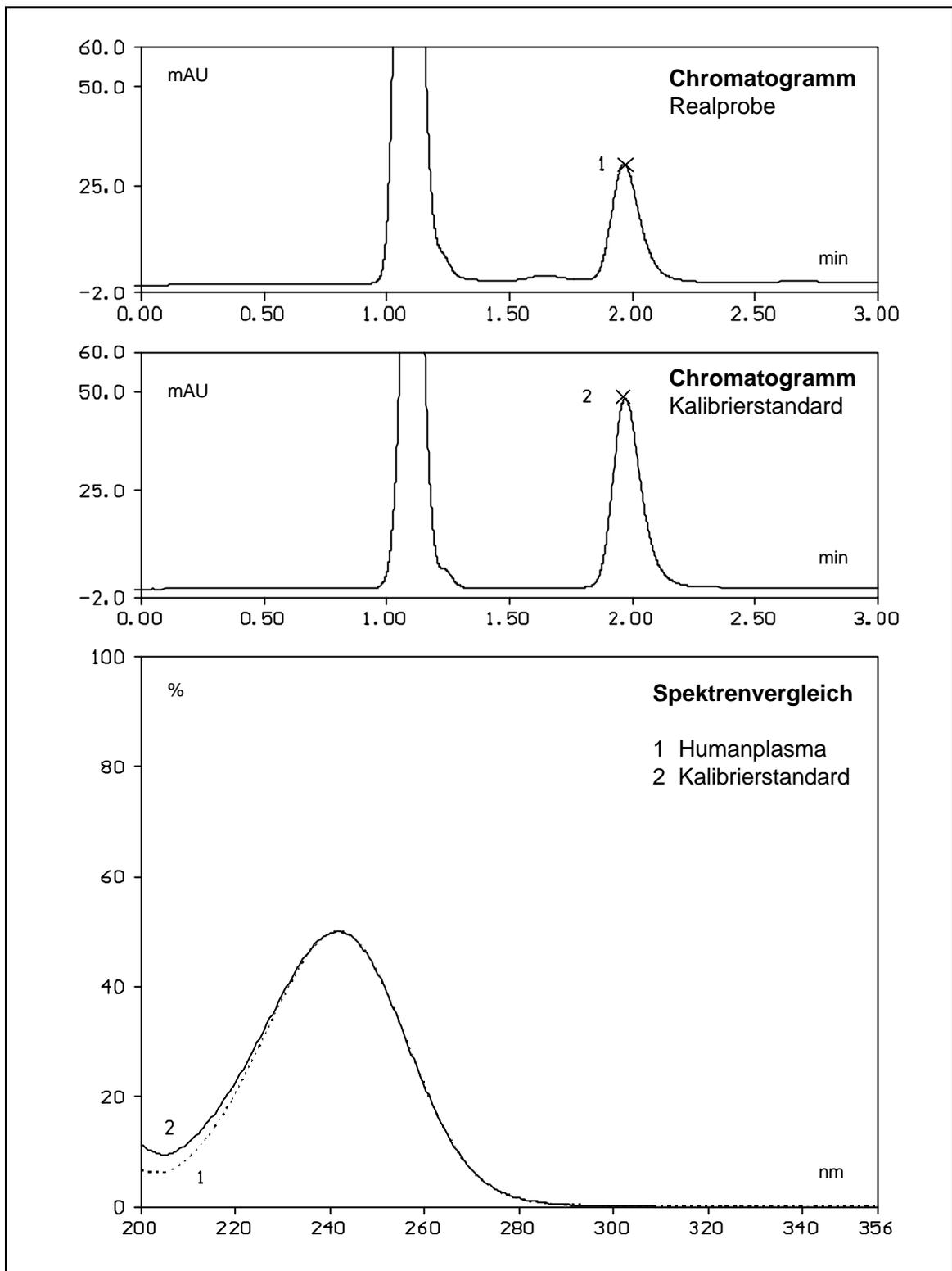
<sup>(1)</sup> Aufgrund ihrer reduzierenden Eigenschaften und einfachen technischen Darstellung wird D-Isoascorbinsäure häufig als Antioxidans in Fleischwaren und Getränken sowie zur Verhinderung der Nitrosamin-Bildung in Pökelfleisch eingesetzt [3, 68, 86]. Im Gegensatz zu L-Ascorbinsäure besitzt D-Isoascorbinsäure jedoch nur eine vernachlässigbar geringe biologische Aktivität [122, 123].

#### 4.1.6.1 Spezifitäts-Test durch Vergleich der UV-Spektren

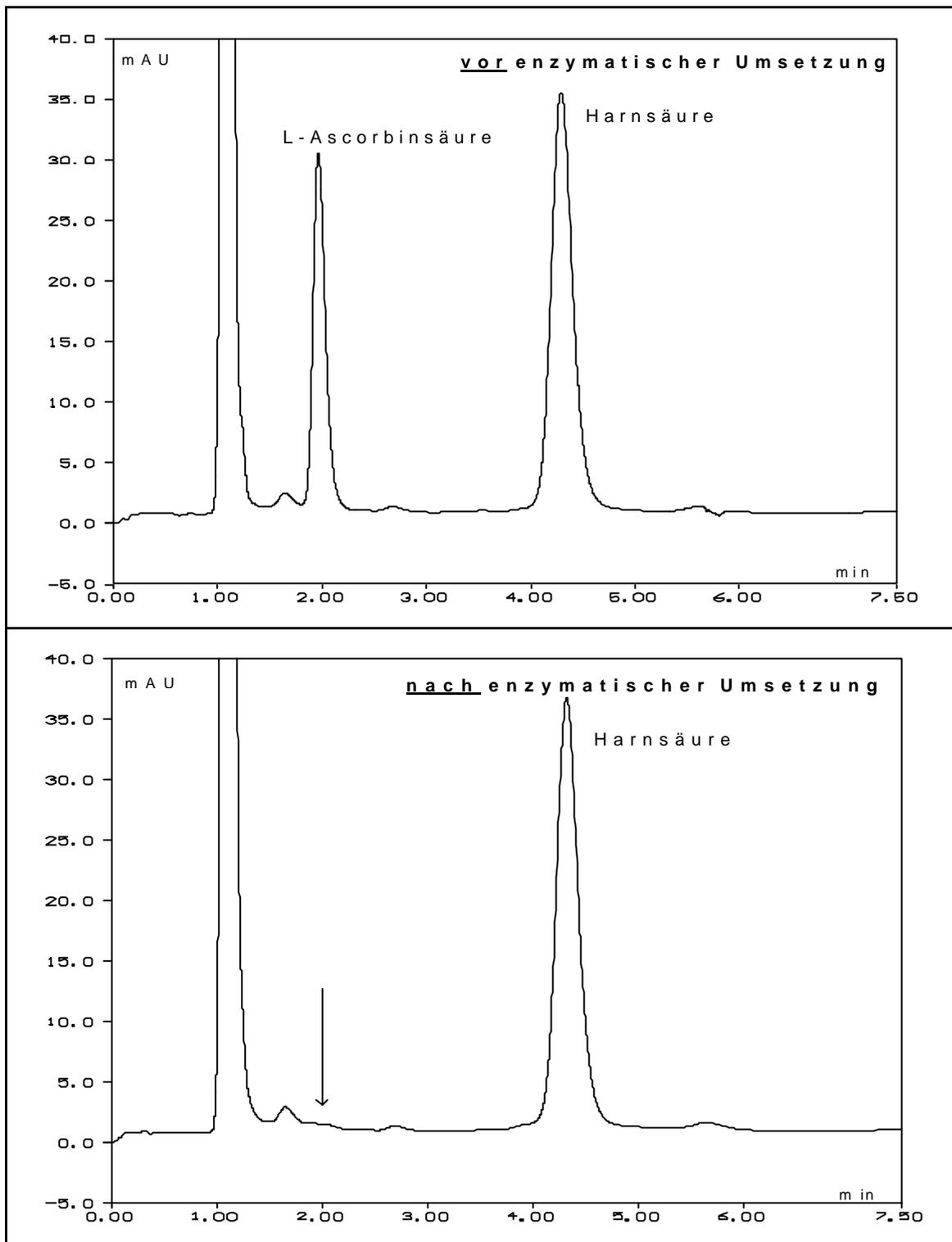
Die Spezifität eines HPLC-Verfahrens mit UV-Detektion kann durch den Vergleich der UV-Spektren des Analyt-Peaks in einer Kalibrierprobe und einer Realprobe erfolgen. Dazu werden jeweils die Chromatogramme einer Kalibrierprobe (Lösemittel: 3 % (w/w) Perchlorsäure, 1 % (w/w) Metaphosphorsäure) und einer Humanplasma-Probe (Probenvorbereitung s. **Kapitel 3.7**) mit Hilfe eines Dioden-Array-Detektors aufgenommen. Die dabei erhaltenen Chromatogramme sowie die normierten UV-Spektren sind in **Abb. 4.3** dargestellt. Die normierte Darstellung der UV-Spektren ist erforderlich, um bei deren Vergleich z. B. unterschiedliche Extinktionswerte am Absorptionsmaximum die durch unterschiedliche Analyt-Konzentrationen in den Proben bedingt sind, auszuschließen. Zur Charakterisierung der Übereinstimmung der beiden UV-Spektren kann der Match-Faktor [125] herangezogen werden. Ein Match-Faktor von 0 bedeutet völlig verschiedene, ein Match-Faktor von 1000 völlig identische UV-Spektren. Für die in **Abb. 4.3** dargestellten UV-Spektren beträgt der Match-Faktor 996. Somit ist eine sehr gute Übereinstimmung der UV-Spektren des L-Ascorbinsäure-Peaks und damit ein deutlicher Hinweis auf die Spezifität des Analysenverfahrens gegeben.

#### 4.1.6.2 Spezifitäts-Test durch Peaklöschung nach Behandlung einer Analysenprobe mit Ascorbat-Oxidase (EC 1.10.3.3)

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis der Spezifität eines chromatographischen Analysenverfahrens ist die Löschung des Analyt-Peaks nach Behandlung der Analysenprobe mit einem Enzym, welches den spezifischen Abbau des betreffenden Analyten bewirkt. Für den Spezifitäts-Test bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure kann hierzu Ascorbat-Oxidase (EC 1.10.3.3) eingesetzt werden [81, 85, 124]. In **Abb. 4.4** sind die Chromatogramme vor und nach Zugabe des Enzyms zu einer Humanplasma-Probe gegenübergestellt. Das Fehlen des L-Ascorbinsäure-Peaks im Chromatogramm der mit dem Enzym behandelten Probe ist ein weiterer Hinweis auf die Selektivität des HPLC/UV-Verfahrens.



**Abb. 4.3:** Spezifitätstest durch Vergleich der UV-Spektren des L-Ascorbinsäure-Peaks eines Kalibrierstandards und einer Humanplasma-Probe. Chromatographische Bedingungen: UV-Detektion bei 243 nm, LiChrospher® RP 18, 5 µm, 125 × 4 mm, 45 mmol/L Phosphat-Puffer pH 2, Fluß: 1 mL/min



**Abb. 4.4:** Gegenüberstellung der Chromatogramme einer Humanplasma-Probe vor und nach der Umsetzung mit Ascorbinsäure-Oxidase (EC 1.10.3.3), Chromatographische Bedingungen: UV-Detektion bei 243 nm, LiChrospher® RP 18, 5 µm, 125 × 4 mm, 45 mmol/L Phosphat-Puffer pH = 2, Fluß: 1 mL/min

### 4.1.7 Robustheit

Ein Analyseverfahren ist robust, wenn durch Änderungen der Testbedingungen das Analyseergebnis nicht oder nur unwesentlich verfälscht wird [111, 116]. Um die Robustheit des HPLC/UV-Verfahrens zu ermitteln, wird der Einfluß des Packungsmaterials der Trennsäule und des pH-Wertes der mobilen Phase auf die Chromatogramme untersucht. Ferner wird die Wiederholbarkeit der Kalibrierung bestimmt.

#### 4.1.7.1 Einfluß des Packungsmaterials der Trennsäule

Um den Einfluß des Packungsmaterials der Trennsäule auf das Retentionsverhalten der L-Ascorbinsäure zu testen, wird die Retentionszeit von L-Ascorbinsäure bei Verwendung verschiedener Reversed-Phase-C<sub>18</sub>-Packungsmaterialien (s. **Tab. 4.10**) bestimmt. Des Weiteren wird auch der Einfluß von Vorsäulen auf die Retentionszeit der L-Ascorbinsäure untersucht. Die Verwendung von Vorsäulen soll bei der Analyse von Realproben ein Verstopfen der Trennsäule durch geringste Verunreinigungen der Probe (z. B. unvollständig ausgefällte Proteine) verhindern. Als Probenlösung wird eine wäßrige 5 mg/L AA-Lösung eingesetzt, die etwa der durchschnittlichen AA-Konzentration einer Meßprobe entspricht (s. **Kapitel 4.1.1.1**). Jede Probe wird zehnmal injiziert und die Mittelwerte, Standardabweichungen sowie relativen Standardabweichungen für die Retentionszeit der L-Ascorbinsäure berechnet. Die Ergebnisse in **Tab. 4.10** zeigen, daß die verschiedenen Packungsmaterialien sowie die Verwendung einer Vorsäule keinen wesentlichen Einfluß auf das Retentionsverhalten der L-Ascorbinsäure unter den gewählten chromatographischen Bedingungen ausüben.

**Tab. 4.11:** Einfluß des Packungsmaterials der Trennsäule auf die Retentionszeit von L-Ascorbinsäure

Packungsmaterial	Säulendimension [mm]	Vorsäule <sup>(1)</sup>	t <sub>R</sub> (AA) <sup>(2)</sup> [min]
Merck LiChrospher® Si 100 RP 15, 5 µm	125 × 4	Nein	1,97
Merck LiChrospher® Si 100 RP 18, 5 µm	125 × 4	Ja	1,92
Macherey & Nagel Nucleosil® 100 - 5 C <sub>18</sub>	125 × 4	Ja	2,08
Merck Purospher® RP 18 e, 5 µm	125 × 3 <sup>(3)</sup>	Ja	1,95

<sup>(1)</sup> Als Vorsäule wurde eine 4 mm × 4 mm Säule gepackt mit Merck LiChrospher® Si 100 RP 18, 5 µm eingesetzt.

<sup>(2)</sup> Angabe als Mittelwerte aus 10 Messungen, wobei die relative Standardabweichung jeweils unter 0,5 % lag

<sup>(3)</sup> Bei Verwendung dieser Säule wurde der Fluß der mobilen Phase auf 0,5 mL/min reduziert.

#### 4.1.7.2 Einfluß des pH-Wertes der mobilen Phase

Da der pH-Wert der mobilen Phase einen Einfluß auf das Retentionsverhalten und die UV-Absorptionseigenschaften der L-Ascorbinsäure hat (s. **Kapitel 3.1.1**), wird für den Einsatz des 45 mmol/l Phosphat-Puffers pH 2,0 und eines 20 mmol/L Phosphat-Puffers pH 2,4 die Retentionszeit sowie die Peak-Fläche für L-Ascorbinsäure bestimmt. Dazu wird eine wäßrige 5 mg/L AA-Lösung jeweils zehnmal injiziert und für die genannten Parameter der Mittelwert, die Standardabweichung sowie die relative Standardabweichung berechnet. Die Ergebnisse sind in **Tab. 4.11** zusammengefaßt. Ein Vergleich der Mittelwerte durch einen t-Test (P = 99 % [117]) ergibt für die Retentionszeiten einen signifikanten Unterschied; für die Peakflächen kann jedoch kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Dies bedeutet, daß bei Verwendung des 20 mmol/L Phosphat-Puffers pH 2,4 gegenüber dem 45 mmol/L Phosphat-Puffer pH 2,0 eine unterschiedliche Retentionszeit auftritt, wodurch die Quantifizierung der L-Ascorbinsäure jedoch nicht beeinflusst wird. Da die Standardabweichungen für die Peakflächen keinen signifikanten Unterschied aufweisen (F-Test, P = 99 %), hat der pH-Wert im untersuchten Bereich keinen Einfluß auf die Präzision der Analyseergebnisse.

**Tab. 4.12:** Vergleich verschiedener Kenngrößen des AA-Peaks bei Verwendung unterschiedlicher Phosphat-Puffer zur chromatographischen Bestimmung von L-Ascorbinsäure ( $\beta(\text{AA}) = 5 \text{ mg/L}$ ,  $n = 10$ )

		45 mmol/L Phosphat-Puffer pH 2,0	20 mmol/L Phosphat-Puffer pH 2,4
<b>Retentionszeit</b>	$\bar{x}$ [min]	1,987	2,013
	s [min]	0,003	0,002
	$s_{\text{rel}}$ [%]	0,14	0,08
<b>Peak-Fläche</b>	$\bar{x}$ [mVmin]	2,32	2,37
	s [mVmin]	0,09	0,04
	$s_{\text{rel}}$ [%]	4,00	1,49

#### 4.1.7.1 Wiederholbarkeit der Kalibrierung

Um die Wiederholbarkeit der Kalibrierung zu überprüfen, werden für die Flächenwerte der AA-Peaks und die daraus berechneten Konstanten der Kalibrierfunktion die Tag-zu-Tag-Präzision bestimmt. Dazu werden an 10 Tagen die durch jeweils fünffache Injektion der Kalibrierlösungen mit 1,2 mg/L und 12 mg/L L-Ascorbinsäure ermittelten Kalibrierdaten ausgewertet. Die daraus berechneten Mittelwerte und relativen Standardabweichungen (Meßpräzision) für die Peakfläche sowie die erhaltenen Konstanten der Kalibrierfunktionen sind in **Tab. 4.13** zusammengefaßt. Wie **Tab. 4.13** entnommen werden kann, liegt die täglich ermittelte Meßpräzision für Kalibrierlösungen mit 1,2 mg/L bei  $s_{\text{rel}} \leq 2,7 \%$  bzw. bei  $s_{\text{rel}} \leq 1 \%$  für 12 mg/L. Die Mittelwerte der Peakflächen weisen jeweils eine hohe Wiederholpräzision über 10 Tage auf ( $s_{\text{rel}} = 2,8 \%$  bei 1,2 mg/L bzw.  $s_{\text{rel}} = 1,8 \%$  bei 12 mg/L). Dagegen liegt die Wiederholpräzision für den täglich berechneten Ordinaten-Abschnitt a der Kalibrierfunktion bei  $s_{\text{rel}} = 55,4 \%$ . Dieser hohe Wert kann durch den geringen Betrag des Ordinatenabschnitts erklärt werden, der im Vergleich zur Geradensteigung b (Wiederholpräzision 1,8 %) vernachlässigbar klein ist. Die Kalibrierung zeichnet sich somit durch eine gute Tag-zu-Tag-Präzision aus.

**Tab. 4.13:** Wiederholbarkeit der Kalibrierung bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure mittels HPLC/UV

Tag	Peakfläche (n = 5)				y = a + bx	
	$\bar{x}$ (1.2 mg/L) [mVs]	$s_{1.2, rel}$ [%]	$\bar{x}$ (12 mg/L) [mVs]	$s_{12, rel}$ [%]	a [mVs]	b [mVs/(mg/L)]
1	32,720	1,9	341,384	0,2	-1,5760	28,5800
4	34,276	2,7	359,066	0,4	-1,8118	30,0731
8	34,344	1,8	355,789	0,1	-1,3721	29,7634
15	34,005	1,6	361,889	0,9	-2,4266	30,3596
21	33,782	2,4	361,229	0,4	-2,6010	30,3192
22	34,961	2,5	362,092	0,4	-1,3869	30,2899
24	35,614	1,6	360,127	0,3	-0,4430	30,0475
29	35,648	1,5	358,570	0,3	-0,2322	29,9002
31	35,275	1,5	362,510	0,6	-1,0844	30,2995
$\bar{x}$	<b>34,514</b>		<b>358,073</b>		<b>-1,4371</b>	<b>29,9592</b>
<b>s</b>	<b>0,960</b>		<b>6,610</b>		<b>-0,7956</b>	<b>0,5568</b>
<b>s<sub>rel</sub> [%]</b>	<b>2,8</b>		<b>1,8</b>		<b>55,4</b>	<b>1,9</b>

#### 4.1.8 Zusammenfassung der Validierungsergebnisse für das HPLC/UV-Verfahren zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Humanplasma

Im Rahmen der Validierung des HPLC/UV-Verfahrens ergibt sich für den späteren Arbeitsbereich (0,2 mg/L bis 20 mg/L L-Ascorbinsäure) eine **lineare Abhängigkeit der Peakfläche von der AA-Konzentration**. Die untere Grenze des Arbeitsbereiches wird durch die **Bestimmungsgrenze** des Verfahrens festgelegt. Diese beträgt für das HPLC/UV-Verfahren 0,2 mg/L (22,7 pmol/Injektion) L-Ascorbinsäure. Die **Nachweisgrenze** wird entsprechend der IUPAC-Nomenklatur für die Chromatographie [115] als zweifacher Wert des Grundrauschens ermittelt und liegt bei 0,06 mg/L (6,8 pmol/Injektion). Dieser Wert stimmt gut mit Angaben anderer Autoren überein [79-81, 93].

Zur Charakterisierung der Präzision der Analysenergebnisse werden die Meß- und Wiederholpräzision sowie der Tag-zu-Tag-Präzision herangezogen. Dabei werden für die **Meßpräzision** Werte zwischen 1,1 % und 3,0 % sowie für die

**Wiederholpräzision** Werte zwischen 0,9 % und 5,2 % ermittelt. Diese Ergebnisse entsprechen den Untersuchungsergebnissen bei literaturbekannten Verfahren [81, 82, 84, 85]. Die **Tag-zu-Tag-Präzision** wird nach den Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien [25] zur laborinternen Qualitätskontrolle herangezogen und darf bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Humanplasma einen Wert von  $s_{\text{rel}} = 6,5 \%$  nicht überschreiten. Der für die Tag-zu-Tag-Präzision ermittelte Wert beträgt  $s_{\text{rel}} \leq 5,7 \%$ , so daß das entwickelte Analysenverfahren den Anforderungen der Richtlinien entspricht.

Die **Richtigkeit** der Analysenergebnisse werden nach den oben genannten Richtlinien ebenfalls zur laborinternen Qualitätskontrolle herangezogen. Bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Humanplasma darf eine Abweichung von maximal 20 % des Sollwertes auftreten. Da die anhand von kommerziell erhältlichen Kontrollstandards ermittelten Abweichungen -3,3 % und -5,6 % betragen, entspricht das Analysenverfahren den Richtlinien der Bundesärztekammer. Die **Wiederfindung** für L-Ascorbinsäure aus Vollblut erfolgt quantitativ ( $W = 100,8 \%$ ,  $s_{\text{rel}} = 4,2 \%$ ,  $n = 29$ ) und liefert einen zusätzlichen Hinweis auf die Richtigkeit des HPLC/UV-Verfahrens.

Zur Überprüfung der **Spezifität** des Analysenverfahrens werden die UV-Spektren des AA-Peaks in den Chromatogrammen einer Kalibrierlösung und einer Realprobe (Blutplasma-Matrix) miteinander verglichen. Dabei ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung der UV-Spektren. Weiterhin erfolgt ein Spezifitätstest durch Umsetzung der in einer Blutplasma-Probe enthaltenen nativen L-Ascorbinsäure mit dem Enzym Ascorbat-Oxidase (EC 1.10.3.3). Der fehlende AA-Peak im Chromatogramm der Probe nach der Umsetzung mit dem Enzym ist ein weiterer Hinweis auf die Spezifität des HPLC/UV-Verfahrens. Diese Spezifitätstests werden genau wie das Analysenverfahren selbst durch D-Isoascorbinsäure gestört. Diese Störungen lassen sich aber umgehen, indem die Blutentnahme im nüchternen Zustand (14 h nach Einnahme der letzten Mahlzeit) erfolgt, da dann eventuell mit der Nahrung aufgenommene D-Isoascorbinsäure nicht mehr im Blutplasma nachweisbar ist [86].

Die **Robustheit** des Analysenverfahrens wird anhand von Veränderungen verschiedener Parameter bei der chromatographischen Bestimmung der AA-Konzentration untersucht. Der Einsatz verschiedener Reversed-Phase-C18-Packungsmaterialien und die Kombination der Trennsäule mit einer Vorsäule beeinflussen das Retentionsverhalten der L-Ascorbinsäure nur unwesentlich.

Die ermittelten Retentionszeiten liegen jeweils im Bereich von 1,9 min bis 2,1 min. Die Änderung des pH-Wert der mobilen Phase von pH 2,0 auf pH 2,4 hat ebenfalls nur einen geringen Einfluß auf die Retentionszeit der L-Ascorbinsäure. Auf die Peakfläche, die zur Quantifizierung der L-Ascorbinsäure eingesetzt wird, wirkt sich die beschriebene Änderung des pH-Wertes nicht aus. Bei der Bestimmung der Wiederholpräzision für die Kalibrierung des HPLC/UV-Verfahrens ergeben sich für die Peakflächen relative Standardabweichungen die unter 3 % liegen.

Ein zusammenfassende Bewertung des neuen HPLC/UV-Verfahrens im Vergleich zu den bereits publizierten Verfahren ist nicht möglich, da keine oder nur unvollständige Validierungsdaten angegeben sind und zum Teil unterschiedliche mathematische Modelle bei der Bestimmung der Validierungselemente eingesetzt werden (s. Einleitung **Kapitel 4**). Das hier vorgestellte HPLC/UV-Verfahren zeichnet sich dagegen durch die umfassende Validierung aus, wodurch eine qualitative Bewertung der damit erzielten Analyseergebnisse möglich ist.

---

## 4.2 Validierung des HPLC/UV-Verfahrens zur indirekten Bestimmung von Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma

### 4.2.1 Linearer Bereich

Die Überprüfung des linearen Bereiches des HPLC/UV-Verfahrens zur Bestimmung von Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma ist nicht notwendig, da deren Quantifizierung nach Reduktion zu L-Ascorbinsäure erfolgt und diese nach den in **Kapitel 3.6** und **Kapitel 4.2.5** beschriebenen Untersuchungsergebnissen quantitativ verläuft. Der Nachweis einer linearen Abhängigkeit zwischen Meßsignal und AA-Konzentration (0,2 mg/L bis 20 mg/L) wurde bereits in **Kapitel 4.1.1** beschrieben.

### 4.2.2 Präzision

Aufgrund der indirekten Bestimmung der DHAA-Konzentration sollte die Präzision der Analyseergebnisse mit Hilfe des Fehlerfortpflanzungsgesetzes aus den Werten für die Präzision bei der Bestimmung der Gesamtascorbinsäure- und AA-Konzentration berechnet werden können. Dabei ergibt sich für die Präzision der DHAA-Bestimmung:

$$s_{DHAA} = \sqrt{s_{DHAA+AA}^2 + s_{AA}^2} \quad (\text{Gl. 4.1})$$

$s_{DHAA}$  : Standardabweichung der Bestimmung von Dehydro-L-ascorbinsäure

$s_{DHAA+AA}$  : Standardabweichung bei der Bestimmung der Gesamtascorbinsäure-Konzentration

$s_{AA}$  : Standardabweichung der Bestimmung von L-Ascorbinsäure

Wie **Gl. 4.1** entnommen werden kann, ist die Standardabweichung für die Bestimmung der DHAA-Konzentration stets größer als die Standardabweichungen bei der Bestimmung der AA- bzw. Gesamtascorbinsäure-Konzentration. Durch den relativ geringen DHAA-Anteil von maximal 20 % der Gesamtascorbinsäure-Konzentration (s. **Kapitel 1**) ergibt sich im Vergleich zur

---

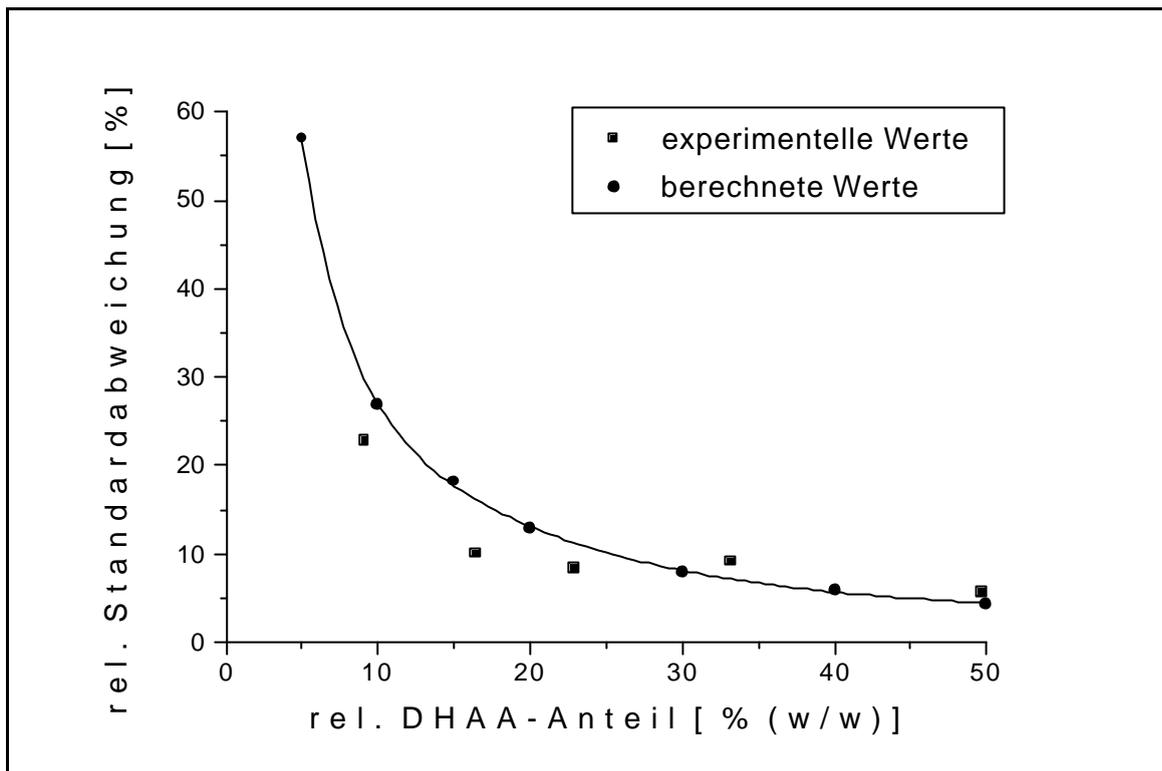
AA-Bestimmung ein großer Wert für die relative Standardabweichung bei der Bestimmung der DHAA-Konzentration.

Anhand von synthetischen Proben soll zunächst überprüft werden, ob die nach **Gl. 4.1** berechneten relativen Standardabweichungen für die DHAA-Konzentration mit experimentell ermittelten Werten übereinstimmen. Danach wird das Fehlerfortpflanzungsgesetz zur Berechnung der Analysenpräzision bei der Bestimmung von Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma eingesetzt.

#### **4.2.2.1 Präzision der Analyseergebnisse bei der Bestimmung der Dehydro-L-ascorbinsäure-Konzentration in synthetischen Proben**

In synthetischen Proben beträgt die relative Standardabweichung für die Bestimmung der AA-Konzentration  $\leq 2$  % (Konzentrationsbereich: 1 mg/L bis 20 mg/L, s. **Tab. 4.1**). Mit der vereinfachenden Annahme, daß dieser Maximalwert konzentrationsunabhängig ist, wird die relative Standardabweichung der DHAA-Konzentration bei unterschiedlichen DHAA-Anteilen an der Gesamtascorbinsäure-Konzentration berechnet (**Gl. 4.1**,  $s_{DHAA, rel} = s_{AA, rel} = 2$  %). Zur experimentellen Überprüfung dieser Werte werden bei jeweils zehn synthetischen Proben die 5 mg/L L-Ascorbinsäure und 0,5 mg/L; 1,0 mg/L; 1,5 mg/L; 2,5 mg/L oder 5,0 mg/L Dehydro-L-ascorbinsäure enthalten die DHAA-Konzentrationen, wie in **Kapitel 3.7** beschrieben, mittels HPLC/UV bestimmt. In **Abb. 4.5** sind die Ergebnisse der Berechnungen sowie die experimentell ermittelten Werte für die relative Standardabweichung der DHAA-Konzentration graphisch dargestellt. Es ergibt sich eine gute Übereinstimmung der berechneten mit den experimentell ermittelten relativen Standardabweichungen. Damit ist nachgewiesen, daß bei der Bestimmung der Dehydro-L-ascorbinsäure in synthetischen Proben die durch das Fehlerfortpflanzungsgesetz berechneten Präzisionswerte die experimentell ermittelten Werte richtig wiedergibt.

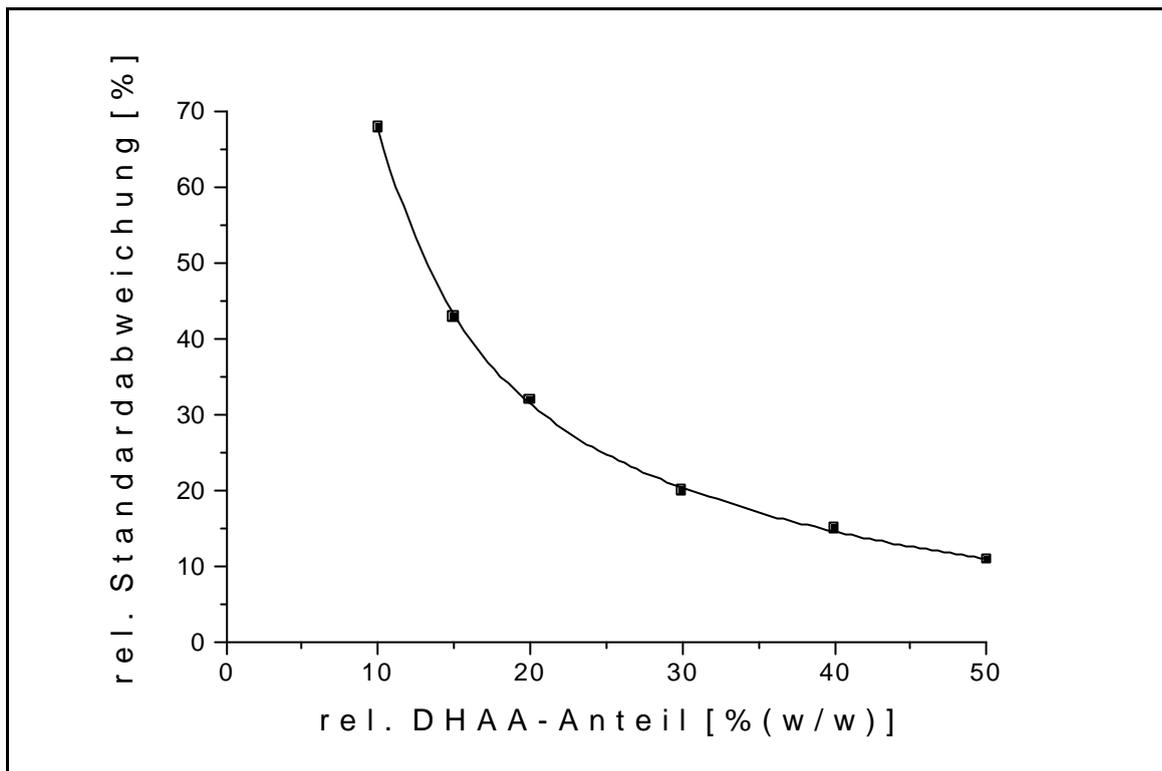
---



**Abb. 4.5:** Berechnete und experimentell ermittelte relative Standardabweichungen für die Bestimmung der DHAA-Konzentration in synthetischen Proben.

#### 4.2.2.2 Realproben (Blutplasma-Matrix)

Für die Bestimmung der AA-Konzentration in Humanplasma beträgt die Wiederholpräzision  $\leq 5\%$  (s. **Tab. 4.7**). Daraus läßt sich mit Hilfe von **Gl. 4.1** und unter der vereinfachenden Annahme der Konzentrationsunabhängigkeit dieses Wertes die in **Abb. 4.6** dargestellte Abhängigkeit der relativen Standardabweichung vom relativen DHAA-Anteil an der Gesamtascorbinsäure-Konzentration in Humanplasma berechnen. Aus **Abb. 4.6** wird deutlich, daß die Analysenwerte bei der Bestimmung von Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma im physiologisch interessanten Konzentrationsbereich (DHAA-Anteil  $\leq 20\%$  der Gesamtascorbinsäure-Konzentration, s. **Kapitel 2.1**) eine relative Standardabweichung von  $\geq 30\%$  aufweisen. Dieser Wert ist im Vergleich zur relativen Standardabweichung bei der AA-Bestimmung um den Faktor sechs größer. Die Ursache hierfür liegt in der Eingangs dieses Kapitels geschilderten besonderen Problematik bei der indirekten Bestimmung der DHAA-Konzentration (Fehlerfortpflanzungsgesetz).



**Abb. 4.6:** Berechnete relative Standardabweichung für die Bestimmung der DHAA-Konzentration in Humanplasma

In den Veröffentlichungen zur indirekten Bestimmung der DHAA-Konzentration in Humanplasma wird auf diese Problematik selten oder überhaupt nicht hingewiesen. Es werden auch keine konkreten Angaben zu den erreichbaren Werte für die Analysenpräzision [23, 62, 69, 84] getroffen. Die in diesen Publikationen angegebenen Werte für die DHAA-Konzentrationen besitzen daher nur eine geringe Aussagekraft.

### 4.2.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Als **Nachweisgrenze** bei der indirekten Bestimmung von Dehydro-L-ascorbinsäure wird die Wiederholgrenze (2,8facher Wert der Wiederholpräzision, s. **Kapitel 3.4.2**) festgelegt. Mit einer Wiederholpräzision von  $\leq 5\%$  (s. **Tab. 4.7**) ergibt sich für die Bestimmung der DHAA-Konzentration mit Hilfe der UV-Detektion ein nachweisbarer Anteil von 14 % (w/w) der Gesamtascorbinsäure-Konzentration.

Die **Bestimmungsgrenze** für die Ermittlung der DHAA-Konzentration kann, wie bei der Bestimmung der AA-Konzentration (s. **Kapitel 4.1.1.1**), nach

EURACHEM/D [120] erfolgen. Dabei kann als Datengrundlage der in **Abb. 4.6** dargestellte Funktionsverlauf dienen. In Anbetracht der zuvor beschriebenen Problematik der indirekten Bestimmung wird als maximal zulässige relative Standardabweichung ein Wert von 30 % festgelegt. Damit ergibt sich für die Ermittlung der DHAA-Konzentration ein bestimmbarer Anteil von 20 % (w/w) an der Gesamascorbinsäure-Konzentration.

Aus den ermittelten Werten für den nachweisbaren und bestimmbaren DHAA-Anteil folgt, daß, im Hinblick auf die in der Literatur angegebenen DHAA-Anteile an der Gesamascorbinsäure-Konzentration im Blutplasma eines gesunden Menschen (0 % bis 20 %, s. **Kapitel 2.1**), mit Hilfe des hier vorgestellten HPLC/UV-Verfahrens nur ein qualitativer Nachweis der Dehydro-L-ascorbinsäure im Sinne einer Ja/Nein-Entscheidung erfolgen kann. Im Fall von Erkrankungen, wie z. B. Tetanus, Meningitis oder rheumatoider Arthritis, bei denen DHAA-Anteile von bis zu 80 % der Gesamascorbinsäure-Konzentration auftretenden [12, 13], wären diese jedoch auch mit Hilfe dieses HPLC/UV-Verfahrens quantifizierbar. Um quantitative Aussagen über die DHAA-Konzentration im Blutplasma eines gesunden Menschen treffen zu können, müssen Analysemethoden mit einer höheren Wiederholpräzision (eventuell HPLC/EC) eingesetzt werden.

In Veröffentlichungen zur indirekten Bestimmung von Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma werden keine Angaben über die erreichten Nachweis- oder Bestimmungsgrenzen getroffen [69, 84], so daß ein Vergleich mit dem hier vorgestellten Verfahren nicht möglich ist. Aus den von NYSSÖNEN et al. [84] publizierten Werten der Wiederholpräzision für die AA-Bestimmung in Humanplasma ( $s_{\text{rel}} = 2,5 \%$ ) läßt sich nach der in **Kapitel 3.4.2** genannten Definition für die Wiederholgrenze ein nachweisbarer DHAA-Anteil von 7 % an der Gesamascorbinsäure-Konzentration berechnen. Der von den Autoren angegebene DHAA-Anteil von 1,6 % an der Gesamascorbinsäure-Konzentration ist daher auf zufällige Unterschiede bei der Bestimmung der AA- und Gesamascorbinsäure-Konzentration zurückzuführen. Diese Tatsache ist in der genannten Veröffentlichung jedoch nicht berücksichtigt worden. Daher sind Zweifel an der Zuverlässigkeit der Literaturangaben gerechtfertigt, so daß eine kritische Überprüfung der publizierten Angaben zur DHAA-Konzentration im Blutplasma gesunder Probanden (s. **Kapitel 1**) erforderlich ist.

---

#### 4.2.4 Richtigkeit

Da Kontrollproben für die Bestimmung von Dehydro-L-ascorbinsäure kommerziell nicht erhältlich sind, erfolgt die Ermittlung der Richtigkeit des Analysenverfahrens aufgrund der Ergebnisse der Wiederfindungsstudien.

#### 4.2.5 Wiederfindung von Dehydro-L-ascorbinsäure

Der Bestimmung der Wiederfindung von Dehydro-L-ascorbinsäure kommt aufgrund ihrer großen Instabilität (s. **Kapitel 3.1.2** und **Kapitel 3.6.1**) eine besondere Bedeutung zu. Um den Einfluß aller Probenvorbereitungsschritte auf die Wiederfindung bestimmen zu können, müßten Aufstockversuche mit Vollblut durchgeführt werden. Aus verschiedenen Publikationen ist jedoch bekannt, daß Dehydro-L-ascorbinsäure sehr schnell durch die im Vollblut enthaltenen Erythrozyten und Leukozyten aufgenommen wird (s. **Kapitel 2.1** und [33, 35, 126-128]). Dabei dürften die Erythrozyten aufgrund der großen Anzahl der im Vollblut enthaltenen Zellen (ca.  $5 \times 10^9$  Zellen/mL, Leukozyten ca.  $7 \times 10^6$  Zellen/mL, s. **Tab. 2.2**) den größten Beitrag zur Verringerung der DHAA-Konzentration leisten. Ferner erfolgt die Aufnahme von Dehydro-L-ascorbinsäure durch Erythrozyten etwa zehnmal schneller als die von L-Ascorbinsäure [35]. Aufgrund dieser Hinweise wird auf eine Bestimmung der Wiederfindung von Dehydro-L-ascorbinsäure aus Vollblut verzichtet und diese durch Dotierung von Blutplasma-Proben ermittelt.

Bei Zugabe von 4,2 µg Dehydro-L-ascorbinsäure zu 1 mL Blutplasma und anschließender Reduktion mittels Dithiothreitol (Reaktionsdauer: 10 min, s. **Kapitel 3.7**) werden jedoch nur Wiederfindungen zwischen 43 % und 73 % erzielt. Als Erklärung für die niedrigen Wiederfindungen ist der rasche Zerfall der Dehydro-L-ascorbinsäure in den Plasmaproben (s. **Kapitel 3.1.2**) zu sehen. Daher erfolgt in einer zweiten Versuchsreihe die Zugabe des Reduktionsmittels vor Zugabe der DHAA-Lösung. Die bei Dotierung von 3,5 µg Dehydro-L-ascorbinsäure zu 500 µL Blutplasma ermittelten Wiederfindungen sind in **Tab. 4.14** zusammengefaßt. Der Mittelwert für die Wiederfindung beträgt 101,0 % mit einer relativen Standardabweichung von 4,6 % (n = 9). Bei der Bestimmung in Blutplasma muß daher die Zugabe des Reduktionsmittels sofort nach Abnahme der Blutprobe erfolgen und nicht erst nach Abtrennung der festen Blutkompartimente, wie in **Kapitel 3.7** beschrieben.

**Tab. 4.14:** Wiederfindung für Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma durch Reduktion mit Dithiothreitol und Bestimmung mittels HPLC/UV (Aufstockung der Proben mit jeweils 3,5 µg Dehydro-L-ascorbinsäure)

Probe	b(AA) [mg/L]	m(AA)/Probe [µg]	w(DHAA) [% (w/w)]	W(DHAA) [%]
1	19,96	9,98	26,0	107,9
2	11,41	5,70	38,0	102,8
3	6,40	3,20	52,2	93,6
4	7,97	3,99	46,7	100,7
5	13,75	6,88	33,7	98,7
6	16,78	8,39	29,4	100,9
7	15,35	7,68	31,3	97,0
8	15,09	7,55	31,7	107,5
9	14,02	7,01	33,3	100,3

#### 4.2.6 Spezifität und Robustheit

Eine Überprüfung der Spezifität und Robustheit des HPLC/UV-Verfahrens wird nicht durchgeführt, da Dehydro-L-ascorbinsäure in Form von L-Ascorbinsäure quantifiziert wird und die Spezifität und Robustheit des HPLC/UV-Verfahrens in Bezug auf L-Ascorbinsäure bereits nachgewiesen wurde (s. **Kapitel 4.1.6** und **Kapitel 4.1.7**).

#### 4.2.7 Zusammenfassung der Validierungsergebnisse für das HPLC/UV-Verfahren zur indirekten Bestimmung von Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma

Aufgrund der indirekten Bestimmung von Dehydro-L-ascorbinsäure nach Reduktion zu L-Ascorbinsäure werden bei der Validierung dieses Verfahrens nur die Validierungselemente überprüft, bei denen die zusätzlichen Probenvorbereitungsschritte zur Bestimmung der Dehydro-L-ascorbinsäure einen Einfluß auf das Analyseergebnis haben. Auf die Bestimmung des linearen Bereiches, die Überprüfung der Spezifität und Robustheit des Analysenverfahrens wird verzichtet, da diese Validierungselemente bereits bei der Validierung des HPLC/UV-Verfahrens zur Bestimmung der AA-Konzentration ermittelt wurden.

Die **Präzision** der Analyseergebnisse bei der indirekten Bestimmung der DHAA-Konzentration wird entscheidend durch die Präzision bei der Ermittlung der AA- und Gesamascorbinsäure-Konzentration bestimmt. Durch Anwendung des Fehlerfortpflanzungsgesetzes ergibt sich für die Präzision der DHAA-Bestimmung stets ein größerer Wert als bei der Bestimmung der AA- und Gesamascorbinsäure-Konzentration. Für die relative Standardabweichung bei der Bestimmung der DHAA-Konzentration ergibt sich ferner ein vergleichsweise großer Wert, da nur eine geringe DHAA-Konzentration (maximal 20 % (w/w) der Gesamascorbinsäure-Konzentration) vorliegt.

Die Berechnung des **nachweisbaren DHAA-Anteils** an der Gesamascorbinsäure-Konzentration als 2,8facher Wert der Wiederholpräzision für die Bestimmung der AA-Konzentration ergibt einen Wert von 14 % (w/w). Die Ermittlung des **bestimmbaren DHAA-Anteils** an der Gesamascorbinsäure-Konzentration (maximal zulässige Präzision:  $s_{\text{rel}} = 30 \%$ ) ergibt einen Wert von 20 % (w/w).

Die **Richtigkeit** der Analyseergebnisse wird durch Ermittlung der **Wiederfindung** für Dehydro-L-ascorbinsäure überprüft. Dabei können keine Aufstockversuche mit Vollblut durchgeführt werden, da die darin enthaltenen Erythrozyten und Leukozyten durch Resorption der Dehydro-L-ascorbinsäure zu einer schnellen Konzentrationsabnahme im Blutplasma führen. Aufstockversuche mit Blutplasma ergeben eine quantitative Wiederfindung ( $W = 101,0 \%$ ,  $s_{\text{rel}} = 4,6 \%$ ,  $n = 9$ ). Aufgrund der Instabilität der Dehydro-L-ascorbinsäure muß dabei die Zugabe des Reduktionsmittels vor der Zugabe der DHAA-Lösung erfolgen.

Ein Vergleich der Validierungsdaten mit Literaturangaben ist nicht möglich, da in den Publikation zur Bestimmung von Dehydro-L-ascorbinsäure mittels HPLC/UV [69, 84] keine Angaben zu Validierungsdaten enthalten sind.

Den hier ermittelten Validierungsdaten, insbesondere des nachweisbaren und bestimmmbaren DHAA-Anteils, läßt sich entnehmen, daß das HPLC/UV-Verfahren nur für einen quantitativen Nachweis (im Sinne einer Ja/Nein-Entscheidung) der Dehydro-L-ascorbinsäure in Blutplasma von gesunden Probanden geeignet ist. Literaturangaben über den DHAA-Anteil im Blutplasma gesunder Probanden, die indirekt mittels HPLC/UV ermittelt wurden, erfordern aufgrund dieser Erfahrungen eine kritische Überprüfung. Im Blutplasma von Patienten mit Meningitis, Tetanus oder rheumatoider Arthritis sollte jedoch auch der DHAA-Anteil an der Gesamascorbinsäure-Konzentration quantifizierbar sein.

### 4.3 Validierung des HPLC/EC-Verfahrens zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma

Die Validierungsdaten des HPLC/EC-Verfahrens zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma werden, bis auf die nachfolgend beschriebenen Ausnahmen, analog der Validierung der HPLC/UV-Verfahren ermittelt [129].

Zur Bestimmung des **linearen Bereiches** des HPLC/EC-Verfahrens wird Blutplasma zur Herstellung der Konzentrationsreihe eingesetzt, bei dem die Oxidation der nativen L-Ascorbinsäure nicht mit Ascorbat-Oxidase (EC 1.10.3.3) (s. **Kapitel 4.1.1.2**) sondern durch Oxidation mit Luftsauerstoff bei einer Temperatur von 55 °C erfolgt. Diese Vorgehensweise ist erforderlich, da bei aufgestockten Proben, die zuvor mit Ascorbat-Oxidase behandelt wurden, nicht erklärbare Probleme bei der AA-Wiederfindung auftraten. Beim Erwärmen der Proben auf 55 °C tritt eine teilweise Denaturierung der Plasmaproteine ein, die jedoch nicht weiter störend ist, da die Proteine vor der chromatographischen Bestimmung der AA-Konzentration abgetrennt werden. Der funktionale Zusammenhang zwischen Meßsignal und Analyt-Konzentration wird in einem Konzentrationsbereich von 0,001 mg/L bis 10 mg/L L-Ascorbin-säure überprüft. Aufgrund der sehr guten Wiederholbarkeit der Bestimmungen (Meßpräzision  $\leq 3,0$  %, s. **Tab. 4.16**) werden bei jeder Konzentration nur fünf Messungen durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in **Tab 4.15** zusammengefaßt. Dabei können im Konzentrationsbereich unter 0,001 mg/L keine Untersuchungen durchgeführt werden, da dann die Peaks nicht mehr von der Auswerte-Software erkannt werden.

Aufgrund der hohen Präzision der Messungen bei 0,001 mg/L ( $s_{rel} = 5,2$  %,  $n = 5$ ) und bedingt durch die Tatsache, daß die Peaks der geringeren Analyt-Konzentrationen nicht mehr auswertbar sind, wird für die Bestimmung von L-Ascorbinsäure mittels HPLC/EC der Wert von 0,001 mg/L (5,6 nmol/L) bzw. 0,02 ng/Injektion (0,1 pmol/Injektion) als **Nachweisgrenze** festgelegt. In der Literatur [19, 28, 91, 103, 130] werden Werte von 0,05 pmol/Injektion bis 28 pmol/Injektion für die Nachweisgrenze angegeben. Dabei ist der große Wertebereich nicht nur auf die unterschiedliche Leistungsfähigkeit der Bestimmungsverfahren, sondern auch auf die bereits erwähnten, unterschiedlichen mathematischen Modelle bei der Bestimmung der Nachweis-

grenze zurückzuführen. Dadurch ist nur eine eingeschränkte Vergleichbarkeit des hier ermittelten Wertes mit den Literaturangaben möglich. Der im Rahmen dieser Arbeit für die Nachweisgrenze bei der AA-Bestimmung ermittelte Wert von 0,1 pmol/Injektion liegt im Vergleich zu den Literaturwerten im unteren Bereich, so daß das hier vorgestellte Verfahren vergleichsweise nachweisstark ist.

**Tab 4.15:** Mittelwerte, Standardabweichungen und relative Standardabweichungen für die Peakfläche bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure in afgestockten Blutplasma-Proben mittels HPLC/EC

b(AA) [mg/L]	Peakfläche $\bar{x}$ [nA min]	s (n = 5) [nA min]	s <sub>rel</sub> (n = 5) [%]
0,001	0,189	0,010	5,2
0,005	0,408	0,002	0,6
0,01	0,312	0,005	1,6
0,05	0,927	0,012	1,3
0,1	1,802	0,027	1,5
0,5	8,661	0,061	0,7
1,0	17,185	0,137	0,8
5,0	89,741	0,808	0,9
10,0	174,478	1,221	0,7

Nach KROMIDAS et al. [111] und MEYER [131] ergibt sich die **Bestimmungsgrenze** bei HPLC-Verfahren als fünffacher Wert der Nachweisgrenze. Bei dem hier vorgestellten HPLC/EC-Verfahren sollte daher die Bestimmungsgrenze 0,005 mg/L L-Ascorbinsäure betragen. Aufgrund der Meßwerte in **Tab. 4.15** ist jedoch im Konzentrationsbereich von 0,001 mg/L bis 0,005 mg/L keine lineare Abhängigkeit der Peakfläche von der AA-Konzentration zu erkennen, so daß die Bestimmungsgrenze und damit gleichzeitig die untere Grenze des Arbeitsbereiches auf 0,01 mg/L (56 nmol/L) bzw. 0,2 ng/Injektion (1,1 pmol/Injektion) festgelegt wird. Auch bei den Werten für die Bestimmungsgrenze sind, wie für die Nachweisgrenze, in der Literatur stark unterschiedliche Werte zu finden. Die in den Publikationen für die Bestimmungsgrenze von L-Ascorbinsäure in Humanplasma angegebenen Werte liegen im Bereich von 0,05 pmol/Injektion bis 142 pmol/Injektion [28, 78, 96, 101, 132]. Ein Vergleich des hier ermittelten Wertes mit den Literaturangaben ist, wie beim Vergleich der Bestimmungsgrenzen, nur eingeschränkt möglich. Der im Rahmen dieser Arbeit bestimmte

Wert von 1,1 pmol/Injektion liegt ebenfalls im unteren Bereich der Literaturangaben, wodurch das entwickelte HPLC/EC-Verfahren die quantitative Bestimmung der L-Ascorbinsäure bis zu vergleichsweise niedrigen Konzentrationen ermöglicht.

Im Bereich von 0,01 mg/L bis 10 mg/L wird durch lineare Regression folgende Geradengleichung für die Abhängigkeit der Peakfläche von der AA-Konzentration ermittelt:

$$y = 0,1692 \text{ mg/L} + 17,5223 \text{ nA min/(mg/L)} \cdot x \quad (\text{Gl. 4.2})$$

Der Korrelationskoeffizient von  $r = 0,9999$  zeigt, daß eine sehr gute Annäherung der Ausgleichsgeraden an die Meßwerte erreicht werden kann.

Die im Rahmen eigener Untersuchungen für die Wiederholpräzision ermittelten Werte von  $s_{\text{rel}} = 0,6 \%$  bis  $s_{\text{rel}} = 2,5 \%$  entsprechen den von KUTNIK et al. [132] und FOOT et al. [133] angegebenen Werten ( $s_{\text{rel}} = 1,9 \%$  bis  $s_{\text{rel}} = 3,2 \%$ ). Damit ist das hier vorgestellte Verfahren bezüglich der Wiederholpräzision als gleichwertig zu bereits publizierten Bestimmungsverfahren einzustufen.

Ein Vergleich der Werte für die weiteren Validierungselemente mit Angaben in der Literatur ist nicht möglich, da viele Verfahren überhaupt nicht [78, 87, 96, 130] oder nur unvollständig [19, 79, 91, 101, 103, 133, 134] validiert wurden und somit keine Vergleichswerte existieren.

## 4.4 Vergleich und Bewertung der Leistungsfähigkeit der HPLC/UV- und HPLC/EC-Verfahren

### 4.4.1 Vergleich anhand der Validierungsdaten

Durch Gegenüberstellung der ermittelten Validierungsdaten für das HPLC/UV- und das HPLC/EC-Verfahren (s. **Tab. 4.16**) soll die Leistungsfähigkeit der beiden Analysenverfahren verglichen werden.

Bei der Überprüfung des funktionalen Zusammenhanges zwischen Meßsignal und AA-Konzentration ergibt sich für das HPLC/EC-Verfahren ein deutlich größerer **linearer Bereich** (0,01 mg/L bis 20 mg/L) als für das HPLC/UV-Verfahren (0,2 mg/L bis 20 mg/L). Der größere lineare Bereich bei der EC-Detektion im Vergleich zur UV-Detektion ist eine Folge der niedrigeren

---

Bestimmungsgrenze bei der EC-Detektion.

Die **Bestimmungsgrenze** des HPLC/EC-Verfahrens (1,1 pmol/Injektion) ist etwa um den Faktor 20 geringer als bei der HPLC mit UV-Detektion (23 pmol/Injektion). Dadurch kann das HPLC/EC-Verfahren vorzugsweise bei der Bestimmung der L-Ascorbinsäure im Konzentrationsbereich unter 1 mg/L bzw. bei kleinen Probemengen eingesetzt werden. Zur Bestimmung der AA-Konzentration in Humanplasma (3 mg/L bis 14 mg/L, s. **Tab. 2.1**) sind beide Verfahren geeignet. Die **Nachweisgrenze** bei der EC-Detektion (0,1 pmol/Injektion) ist ebenfalls geringer als bei der UV-Detektion (6,8 pmol/Injektion). Der nachweisbare bzw. bestimmbare DHAA-Anteil ist bei der UV-Detektion etwa jeweils doppelt so hoch wie bei der EC-Detektion (z. B. Bestimmungsgrenze: 20 % (w/w) Anteil an der Gesamtascorbinsäure-Konzentration bei der UV-Detektion im Vergleich zu 12 % (w/w) bei der EC-Detektion). Diese Unterschiede sind auf die höhere Wiederholpräzision bei der Bestimmung der AA-Konzentration mittels UV-Detektion zurückzuführen. Die Anwendung des Fehlerfortpflanzungsgesetzes und die relativ geringe DHAA-Konzentration führt zu diesem hohen Wert für die relative Analysenpräzision bei der DHAA-Bestimmung.

Die **Richtigkeit** der Analysenergebnisse bei der AA-Bestimmung, d. h. die Abweichung der Meßwerte vom Sollwert, entspricht bei beiden Analyseverfahren den „Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien“ (maximal zulässige Abweichung vom wahren Wert bis zu 20 % [25]). Beim Vergleich der dabei erhaltenen Meßwerte (s. **Tab 4.16**) fällt die größere Abweichung ( $\leq 20$  %) der mittels EC-Detektion bestimmten Werten im Verhältnis zu den mittels UV-Detektion erhaltenen Meßwerten ( $\leq 6$  %) auf. Diese Ergebnisse können auf einen Matrixeffekt (Verwendung von aufgestockten, lyophilisierten Plasmaproben anstelle von Realproben, s. auch **Kapitel 4.4.2**) zurückzuführen sein, der sich bei der EC-Detektion stärker auswirkt als bei der UV-Detektion. Zur Ermittlung der Richtigkeit bei der Bestimmung der DHAA-Konzentration erfolgt die Überprüfung der Wiederfindung.

Ein Vergleich der Validierungsdaten für die **Meß- bzw. Wiederholpräzision** bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure zeigt, daß die EC-Detektion etwas präzisere Analysenergebnisse ergibt (z. B. beträgt die Meßpräzision bei der UV-Detektion  $\leq 3$  % und bei der EC-Detektion  $\leq 2,1$  %).

---

Die **Wiederfindung** für Dehydro-L-ascorbinsäure aus Blutplasma ist sowohl bei dem HPLC/UV- als auch bei dem HPLC/EC-Verfahren quantitativ (101,0 % bzw. 107,8 %). Die Wiederfindung für L-Ascorbinsäure aus Vollblut ist ebenfalls für beide Analysenverfahren quantitativ (100,8 % für das HPLC/UV- und 98 % für das HPLC/EC-Verfahren). Die für die Wiederfindungen ermittelten relativen Standardabweichungen sind gering und liegen alle in der gleichen Größenordnung (4 % bis 8 %). Dadurch ist außerdem die Vollständigkeit und Wiederholbarkeit der Reduktion des DHAA-Anteils in den Blutproben gesichert.

Die **Spezifität** der UV- und EC-Detektion bezüglich L-Ascorbinsäure wird durch Peaklöschung nach Umsetzung der nativen L-Ascorbinsäure in einer Humanplasma-Probe durch Ascorbat-Oxidase (EC 1.10.3.3.) überprüft. Dabei wird in beiden Fällen nach Umsetzung der L-Ascorbinsäure kein AA-Peak mehr erhalten. Bei dem HPLC/UV-Verfahren wird zusätzlich ein Vergleich der UV-Spektren des AA-Peaks in Chromatogrammen einer Kalibrierlösung und einer Humanplasma-Probe durchgeführt. Dieser ergibt eine nahezu vollständige Übereinstimmung der beiden UV-Absorptionsspektren. Diese Untersuchungsergebnisse geben deutliche Hinweise auf die erforderliche Spezifität der Analysenverfahren.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die validierten HPLC/UV- und HPLC/EC-Verfahren aufgrund ihrer hohen Zuverlässigkeit zur Bestimmung der AA-Konzentration in Humanplasma eingesetzt werden können. Bedingt durch die etwas höheren Präzision der Meßergebnisse beim HPLC/EC-Verfahren, kann dieses vorzugsweise zur Bestimmung der DHAA-Konzentration in Blutplasma eingesetzt werden. Bei der Bestimmung der L-Ascorbinsäure in Proben mit geringer Konzentration ( $\beta(\text{AA}) \leq 1 \text{ mg/L}$ ) oder bei geringen Probemengen ist das HPLC/EC-Verfahrens bedingt durch dessen niedrigere Bestimmungsgrenze gegenüber dem HPLC-Verfahren mit UV-Detektion vorzuziehen.

---

**Tab. 4.16:** Gegenüberstellung der Validierungsdaten der HPLC-Verfahren mit UV-Detektion (243 nm) und EC-Detektion (+ 0,85 V gegen Ag/AgCl)

	UV-Detektion	EC-Detektion
<b>Linearer Bereich AA [mg/L]</b>	0,2 bis 20	0,01 bis 20
<b>Nachweisgrenze AA [pmol/Injektion]</b>	6,8	0,1
<b>nachweisbarer DHAA-Anteil [%]</b>	14	7
<b>Bestimmungsgrenze AA [pmol/Injektion]</b>	23	1,1
<b>bestimmbare DHAA-Anteil [%]</b>	20	12
<b>Richtigkeit AA<sup>(1)</sup> [%]</b>	-3,3 bis -5,6	+ 8,7 bis +20,7
<b>Meßpräzision (AA) s<sub>rel</sub> (n = 10) [%]</b>	1,1 bis 3,0	0,8 bis 2,1
<b>Wiederholpräzision (AA) s<sub>rel</sub> (n = 10) [%]</b>	0,9 bis 5,2	0,6 bis 2,5
<b>Präzision von Tag zu Tag (AA) s<sub>rel</sub> (n = 5) [%]</b>	5,7	nicht bestimmt
<b>Wiederfindung AA<sup>(2)</sup></b>		
$\bar{x}$ (n = 29 bzw. 30) [%]	100,8	98,0
s <sub>rel</sub> (n = 29 bzw. 30) [%]	4,2	6,5
<b>Wiederfindung DHAA<sup>(3)</sup></b>		
$\bar{x}$ (n = 9 bzw. 6) [%]	101,0	107,8
s <sub>rel</sub> (n = 9 bzw. 6) [%]	4,6	7,9
<b>Spezifität bezüglich AA</b>		
UV-Spektren-Vergleich	gegeben	-
Ascorbat-Oxidase	gegeben	gegeben
<b>Robustheit der chromatographischen AA-Bestimmung</b>	gegeben	nicht bestimmt

<sup>(1)</sup> lyophilisierte Kontrollproben<sup>(2)</sup> bestimmt aus Vollblut<sup>(3)</sup> bestimmt aus Heparin-Plasma

#### 4.4.2 Vergleich der HPLC-Verfahren mit UV- und EC-Detektion anhand einer orthogonalen Regressionsanalyse

Um einen direkten Vergleich der HPLC-Verfahren mit UV- und EC-Detektion zu ermöglichen, wird anhand der Meßergebnisse von 18 Humanplasma-Proben eine orthogonale Regressionsanalyse durchgeführt. Im Gegensatz zur einfachen linearen Regressionsanalyse, bei der die Werte des einen Analyseverfahrens als „richtiger“ angesehen und die Regressionsgerade so berechnet wird, daß die Meßpunkte in vertikaler Richtung möglichst wenig von ihr abweichen, wird bei der orthogonalen Regression keines der beiden Verfahren als „richtiger“ angesehen. Die Regressionsgerade muß daher so berechnet werden, daß sie sowohl in horizontaler als auch in vertikaler Richtung so wenig wie möglich von den Meßpunkten abweicht [135]. Zur Durchführung der orthogonalen Regressionsanalyse wird die parallele Durchführung von Doppelbestimmungen von mindestens 30 verschiedenen Analysenproben empfohlen. Aus den dabei erhaltenen Meßdaten werden, wie im **Anhang** ausführlich beschrieben, die Koeffizienten der Regressionsgeraden berechnet. Zusätzlich werden Kenngrößen ermittelt, die die konstant-systematischen, proportional-systematischen und zufälligen Abweichungen der Analyseergebnisse der beiden Detektionsarten beschreiben [135].

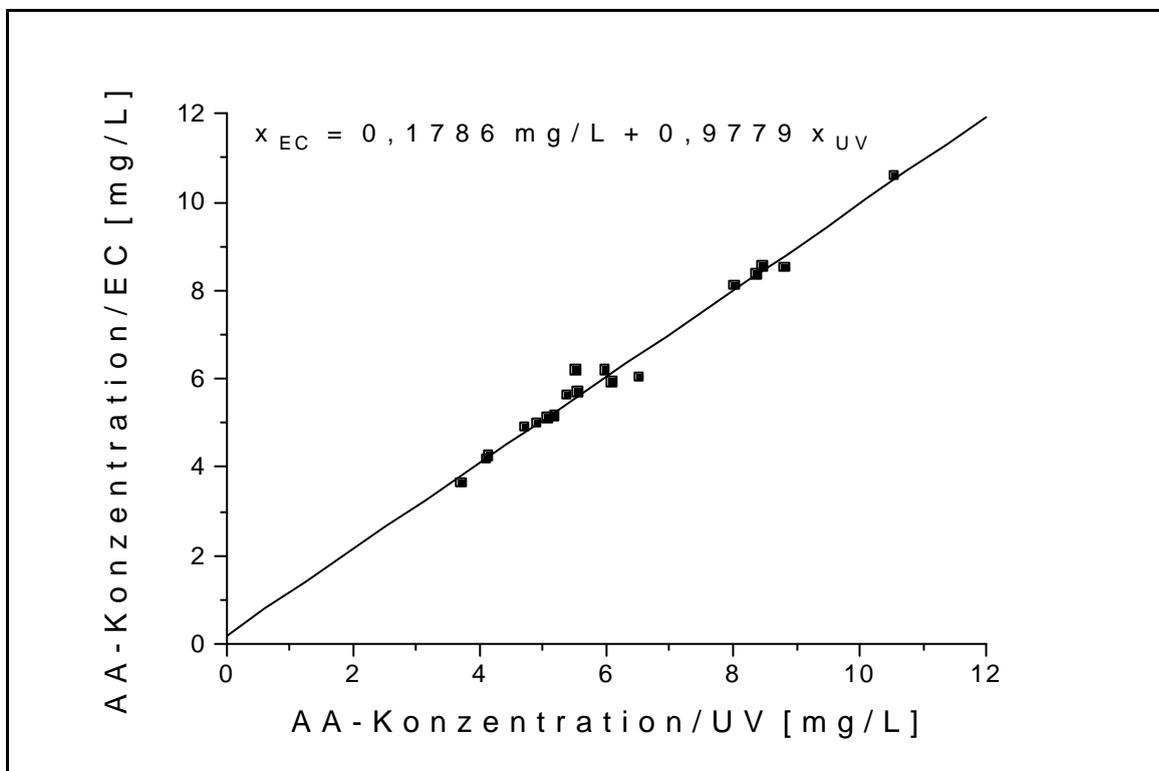
Aufgrund der guten Wiederholbarkeit der mittels HPLC/UV und HPLC/EC bestimmten Analyseergebnisse, wird die orthogonale Regressionsanalyse hier anhand von Einfachbestimmungen der AA-Konzentration von 18 Blutplasma-Proben durchgeführt. Aus den dabei ermittelten Datensätzen (s. **Tab. 4.17**) werden die in **Tab. 4.18** aufgeführten Kenngrößen zur Charakterisierung der Regressionsgeraden (Geradengleichung:  $x_{EC} = a + bx_{UV}$ ) berechnet. Eine graphische Darstellung der Meßwerte sowie der Regressionsgeraden erfolgt in **Abb. 4.8**.

**Tab. 4.17:** Mittelwerte und Standardabweichungen bei der Bestimmung der AA-Konzentration in Humanplasma-Proben mittel HPLC/UV und HPLC/EC (n = 18)

	$\bar{x}$ [mg/L]	s [mg/L]
HPLC/UV	6,180	1,901
HPLC/EC	6,222	1,859

**Tab. 4.18:** Kenngrößen der orthogonalen Regressionsanalyse (Geradengleichung:  $x_{EC} = a + bx_{UV}$ ) für die AA-Bestimmung in 18 Plasmaproben mittels HPLC/UV und HPLC/EC

<b>Ordinaten-Abschnitt der Regressionsgeraden (a)</b>	0,1786 mg/L
<b>Steigung der Regressionsgeraden (b)</b>	0,9779
<b>Differenz der Mittelwerte (bias)</b>	0,042 mg/L
<b>Konstant-systematische Abweichungen (<math>bias_{rel}</math>)</b>	0,68 %
<b>Proportional-systemat. Abweichungen (<math>F_{P, rel}</math>)</b>	2,21 %
<b>Standardabweichung der Differenzen (<math>s_D</math>)</b>	0,243 mg/L
<b>zufällige Fehler (Präzision, <math>s_{D, rel}</math>)</b>	3,93 %



**Abb. 4.7:** Orthogonale Regressionsanalyse für Analysenergebnisse bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Blutplasma-Proben mittels HPLC/UV und HPLC/EC

Im Idealfall, d. h. bei völliger Übereinstimmung der Analysenergebnisse, wird eine Ursprungsgerade mit dem Ordinaten-Abschnitt  $a = 0$  und der Steigung  $b = 1$  erhalten. Die berechnete Regressionsgerade verläuft jedoch nicht durch den Ursprung. Der ermittelte Wert für den Ordinaten-Abschnitt beträgt  $a = 0,1786$  mg/L (s. **Tab. 4.18**) und ist im Vergleich zu den gemessenen AA-

Konzentrationen ( $\bar{x} = 6,2$  mg/L) vernachlässigbar klein. Der für die Steigung ermittelte Wert ( $b = 0,9779$ ) ist geringfügig kleiner als der Idealwert 1, d. h., die Ergebnisse der EC-Detektion sind im Mittel um 2,2 % kleiner als die der UV-Detektion. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Ergebnissen bei der Überprüfung der Richtigkeit im Rahmen der Validierung des HPLC/EC-Verfahrens, wobei relativ großen Abweichungen (bis 20 %, s. Tab. **4.16**) bei den Messungen mit dem HPLC/EC-Verfahren auftreten. Die bei der orthogonalen Regressionsanalyse anhand von Realproben ermittelten geringen Unterschiede zwischen den Analyseergebnissen der HPLC/UV- und HPLC/EC-Verfahren bestätigen jedoch den in **Kapitel 4.4.1** angeführten Matrixeffekt bei aufgestockten, lyophilisierten Proben als Erklärung für die dort aufgetretenen großen Abweichungen vom Sollwert der Proben.

Aufgrund der sehr geringen Werte für die konstant-systematischen, proportional-systematischen und zufälligen Fehler (jeweils <4 %, s. **Tab. 4.18**), kann die Bestimmung der AA-Konzentration in Humanplasma sowohl mittels UV-Detektion als auch mittels EC-Detektion in vergleichbar „genauer“ Weise erfolgen.

---

#### 4.5 Zusammenfassung des Analysenablaufs der validierten HPLC-Verfahren zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma

Aufgrund der bei der Validierung der HPLC/UV- und HPLC/EC-Verfahren zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma erzielten Ergebnisse, ergeben sich gegenüber dem in **Kapitel 3.7** beschriebenen Analysenablauf einige Änderungen für die Durchführung der Bestimmungen. Der Ablauf des validierten Analysenverfahrens ist in **Abb. 4.8** schematisch dargestellt. Danach sind zur Bestimmung der AA- und DHAA-Konzentration im Blutplasma eines Probanden folgende Arbeitsschritte notwendig:

- (1) **Blutentnahme** aus der gestauten Vene des Unterarmes. Dabei werden zwei Blutproben entnommen:  
**Probe I:** Bestimmung der AA-Konzentration  
**Probe II:** Reduktion des DHAA-Anteils und Bestimmung der Gesamtascorbinsäure-Konzentration  
Die Blutentnahme erfolgt bei nüchternen Probanden (14 h nach Einnahme der letzten Mahlzeit), um Verfälschungen des Analyseergebnisses durch mit der Nahrung aufgenommene D-Isoascorbinsäure zu vermeiden.
  - (2) Der Arbeitsablauf zur **Bestimmung der AA-Konzentration** in **Probe I** ist unverändert gegenüber der Beschreibung in **Kapitel 3.7** und wird daher hier nicht weiter erläutert.
  - (3) Zur **Reduktion des DHAA-Anteils** in **Probe II** wird diese unmittelbar nach der Entnahme mit Dithiothreitol-Lösung versetzt. Um dabei die Hämolyse zu verhindern, wird das Reduktionsmittel in einer isotonischen Kochsalzlösung (0,9 % (w/w) NaCl) angesetzt. Die Reduktion des DHAA-Anteils unmittelbar nach Entnahme der Blutprobe verhindert die Resorption des Analyten durch die Erythrozyten und Leukozyten und damit eine Verringerung der nativen DHAA-Konzentration im Blutplasma.
  - (4) Die **Abtrennung der festen Blutkompartimente** erfolgt durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 1700 g in einer Kühlzentrifuge (4 °C). Durch die relativ kurze Dauer des Vorgangs und die Kühlung der Blutproben in der Zentrifuge wird dem Zerfall der L-Ascorbinsäure in der Analysenprobe entgegengewirkt.
-

- (5) Zur **Fällung der Plasma-Proteine** werden die Blutplasma-Proben im Volumenverhältnis 1 + 1 mit einer Perchlorsäure/Metaphosphorsäure-Mischung versetzt und die ausgefallenen Proteine durch Zentrifugieren in einer Kühlzentrifuge (4 °C) abgetrennt.
- (6) Zur **Bestimmung der Gesamtascorbinsäure-Konzentration** kann wahlweise die HPLC mit UV- oder EC-Detektion eingesetzt werden.

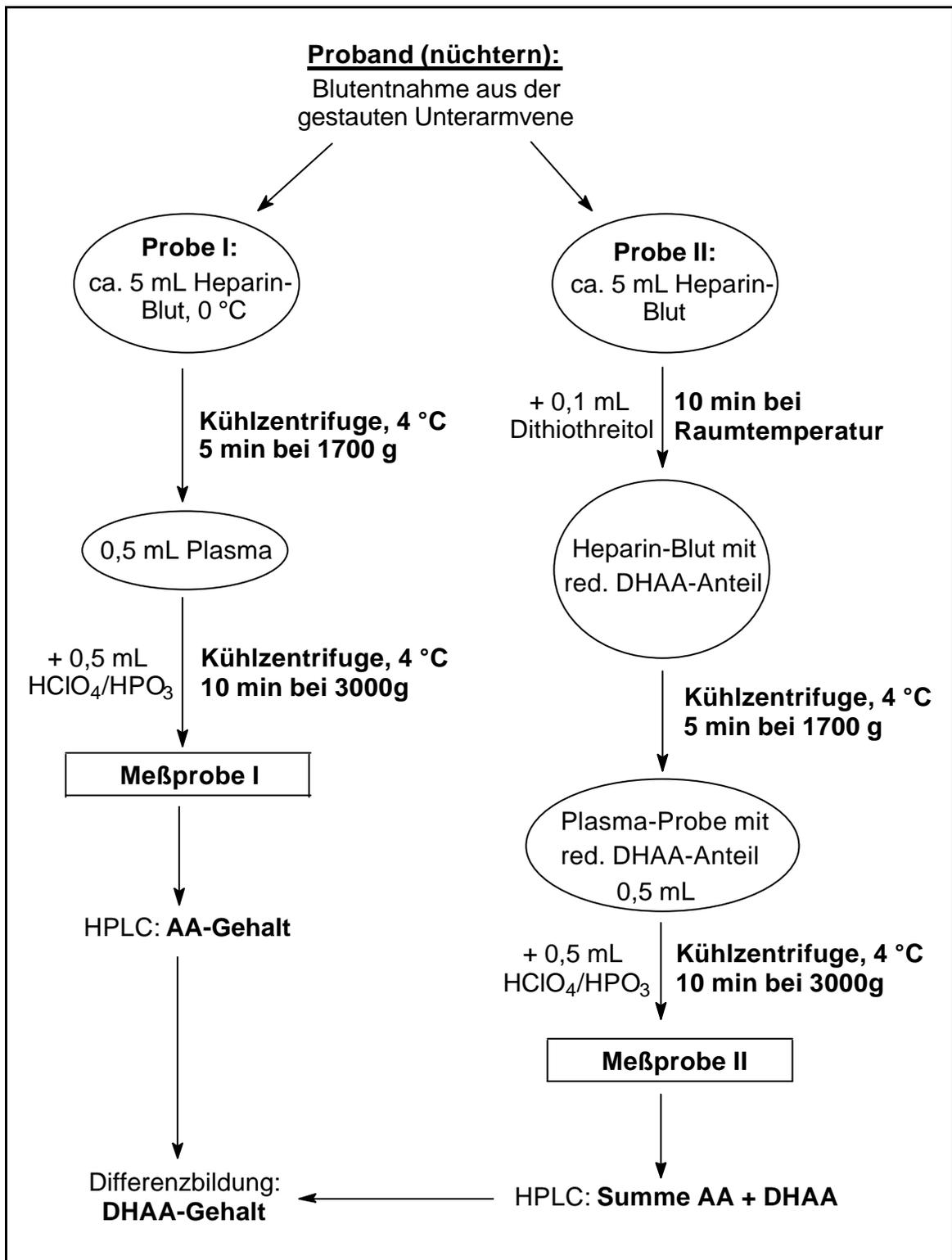
#### 4.6 Zusammenfassende Bewertung der Validierungsergebnisse

Im Rahmen einer zusammenfassenden Bewertung der Validierungsergebnisse für die HPLC/UV- und HPLC/EC-Verfahren können folgende Ergebnisse genannt werden.

Die erarbeiteten Analysenverfahren sind zur Bestimmung der AA-Konzentration in Humanplasma geeignet. Gegenüber den nicht oder nur unvollständig validierten, literaturbekannten Bestimmungsverfahren kann durch die Validierung die Zuverlässigkeit der entwickelten Analysenverfahren gezeigt werden. Ein direkter Vergleich der Analyseergebnisse mittels orthogonaler Regressionsanalyse ergibt, daß sowohl das HPLC/UV- als auch das HPLC/EC-Verfahren vergleichbare Analyseergebnisse liefert.

Bei der Bestimmung der DHAA-Konzentration in Humanplasma wurde im Vergleich zu bereits publizierten Analysenverfahren die fehlende oder unvollständige Validierung als Ursache für die widersprüchlichen Angaben über den im Blutplasma eines gesunden Menschen auftretenden DHAA-Anteil erkannt. Ferner läßt sich aufgrund der ermittelten Werte für den bestimmbaren und nachweisbaren DHAA-Anteil feststellen, daß zur Quantifizierung der Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma gesunder Probanden indirekte Verfahren nicht geeignet sind und auf direkte Verfahren (z. B. Umsetzung zu fluoreszierenden Derivaten [14, 18, 75]) zurückgegriffen werden muß. Die dabei aufwendigere Probenvorbereitung und der Einsatz von Einrichtungen zur Online-Derivatisierung lassen aufgrund der höheren Präzision bei den Analyseergebnissen den Mehraufwand als gerechtfertigt erscheinen. Die in der Literatur angegebenen Werte für die DHAA-Konzentration im Blutplasma bedürfen daher einer kritischen Überprüfung durch validierte Bestimmungsverfahren.

---



**Abb. 4.8:** Schematischer Ablauf des validierten Analyseverfahrens zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma.

## 5 Bestimmung von L-Ascorbinsäure in mononukleären Leukozyten

Wie bereits in **Kapitel 1** erwähnt, repräsentiert der AA-Gehalt in den Leukozyten die langfristige Versorgungssituation eines Menschen mit Vitamin C. Die Bestimmung der AA-Konzentration erfolgt dabei häufig in einer Zellfraktion („buffy coat layer“) die neben den Leukozyten (Granulozyten und mononukleären Leukozyten) auch noch einen Teil der im Vollblut enthaltenen Thrombozyten enthält. Da die relativen Anteile dieser Zelltypen einer großen biologischen Variabilität unterliegen und stark unterschiedliche AA-Konzentrationen aufweisen (s. **Kapitel 2.1**), ist die Beurteilung der langfristigen Vitamin C-Versorgung eines Menschen aufgrund der „buffy coat layer“-AA-Konzentration äußerst schwierig. Die Bestimmung der AA-Konzentration sollte daher in den mononukleären Leukozyten (MN) erfolgen [11, 31, 136-138].

### 5.1 Literaturbekannte Bestimmungsverfahren

Den literaturbekannten Verfahren zur Bestimmung der L-Ascorbinsäure-Konzentration in MN kann folgender allgemein gültiger Analysenablauf entnommen werden:

- (1) Blutentnahme
- (2) Isolierung der MN
- (3) Bestimmung der Anzahl isolierter MN
- (4) Gewinnung des Zell-Lysats
- (5) Abtrennung der Proteine und Stabilisierung der AA in den Zell-Lysat-Proben
- (6) Bestimmung der AA-Konzentration

Bei der **Blutentnahme** werden konventionelle Blutentnahme-Röhrchen eingesetzt. Vor der Isolierung der MN wird das Vollblut z. B. mit isotonischer Kochsalzlösung verdünnt [139]. Bei allen Arbeitsschritten wird mit Gefäßen und Pipetten aus Kunststoff gearbeitet, um eine Zerstörung der Zellmembranen zu verhindern [28, 31].

Die **Isolierung der mononukleären Leukozyten** erfolgt durch Dichtegradienten-Zentrifugation. Dabei wird zur Trennung der einzelnen Zell-Typen

deren unterschiedliche Dichte und die daraus resultierende Verteilung der Zellen in einem diskontinuierlichen oder kontinuierlichen Dichtegradienten ausgenutzt [31, 32, 136, 139, 140]. Zur Herstellung des Dichtegradienten werden Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Percoll® (Silica-Partikel beschichtet mit Polyvinylpyrrolidon) oder Ficoll®-Hypaque® (Polysaccharid-Natriumdiatrizoat-Mischung) eingesetzt [32, 139-141]. Diese Verfahren sind sehr arbeitsaufwendig, da zahlreiche Pipettier- und Verdünnungsschritte zum Aufbau des Dichtegradienten notwendig sind. Bei allen Arbeitsschritten muß ferner darauf geachtet werden, daß sich die Grenzflächen der einzelnen Schichten nicht vermischen, um eine zuverlässige Isolierung der MN zu gewährleisten. Nach dem Zentrifugieren werden die MN mit einer Pipette entnommen und in einem nachfolgenden **Waschschritt** mit PBS-Lösung (**p**hosphate **b**uffered **s**aline; Phosphat-gepufferte, isotonische Kochsalzlösung; pH 7,4) von eventuell anhaftenden Verunreinigungen befreit [140].

Anschließend wird in der Zell-Suspension die **Anzahl der isolierten Zellen** bestimmt. Dabei werden elektronische Zählgeräte eingesetzt, welche aufgrund der Widerstandsänderung beim Durchtritt der Zellen durch ein elektrisches Feld, die Anzahl und Art der Zellen bestimmen (Impedanz-Prinzip) [110].

Zur **Gewinnung des Zell-Lysats** werden die Zellmembranen der MN z. B. durch Ultraschall-Einwirkung [138], Zusatz von Metaphosphorsäure [136] oder Trichloressigsäure [94] und Homogenisieren mit einem Glasstab [31, 142] zerstört.

Bei der **Abtrennung der im Zell-Lysat enthaltenen Proteine und zur Stabilisierung der L-Ascorbinsäure** werden Metaphosphorsäure [136], Trichloressigsäure [11, 31, 138, 142] sowie Metaphosphorsäure/EDTA- [28, 32] und Methanol/EDTA-Mischungen [127], eingesetzt. Das Prinzip der Proteinabtrennung und Stabilisierung der L-Ascorbinsäure in Analysenproben wurde bereits in **Kapitel 3.2.2** erläutert. Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt wird die Meßprobe erhalten.

Zur **Quantifizierung der L-Ascorbinsäure** in den Meßproben werden vielfach photometrische [11, 31, 137] oder HPLC-Verfahren [32, 28, 127, 136, 143, 144] eingesetzt. Da die Analysenprinzipien diese Bestimmungsverfahren denen bei der Quantifizierung von L-Ascorbinsäure in Humanplasma entsprechen, können die in **Kapitel 3.2.1** genannten Vor- und Nachteile der Verfahren auch auf die Bestimmung von L-Ascorbinsäure in MN übertragen werden. Bedingt durch die

---

im Vergleich zur EC-Detektion höhere Bestimmungsgrenze (s. **Kapitel 3.2.1**) werden HPLC/UV-Verfahren [144] nur sehr selten zur Bestimmung der AA-Konzentration in MN eingesetzt.

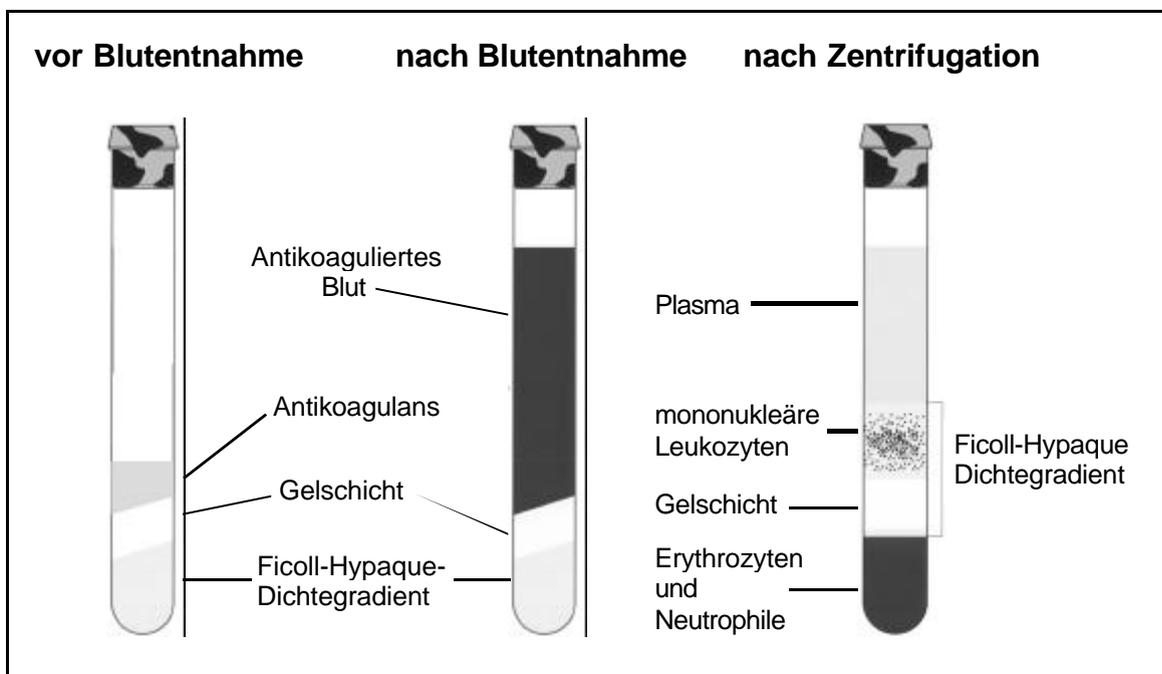
Aufgrund der sehr aufwendigen Probenvorbereitung bei den literaturbekannten Analysenverfahren wurde daher im Rahmen dieser Arbeit eine Vereinfachung der Zell-Isolierung angestrebt. Außerdem sollte überprüft werden, ob das zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Blutplasma eingesetzte HPLC/EC-Verfahren auch zur AA-Bestimmung in MN geeignet ist. Zum Nachweis der Zuverlässigkeit des Analysenverfahrens wurde anschließend eine Validierung durchgeführt. Abschließend wurde untersucht, ob auch die HPLC mit UV-Detektion zur Quantifizierung der L-Ascorbinsäure im Zell-Lysat der MN geeignet ist.

---

## 5.2 Bestimmung von L-Ascorbinsäure in mononukleären Leukozyten mittels HPLC/EC

### 5.2.1 Vereinfachung der Probenvorbereitung

Zur Isolierung der MN wurden spezielle Blutentnahme-Röhrchen eingesetzt, die ohne aufwendige Probenvorbereitung die Abtrennung der MN aus Vollblut ermöglichen. Der Aufbau und das Funktionsprinzip dieser kommerziell erhältlichen, gebrauchsfertigen Blutentnahme-Röhrchen (Vacutainer® CPT™, Beckton/Dickinson, Franklin Lakes/NY, USA) ist in **Abb. 5.1** dargestellt und wird im folgenden kurz erläutert.



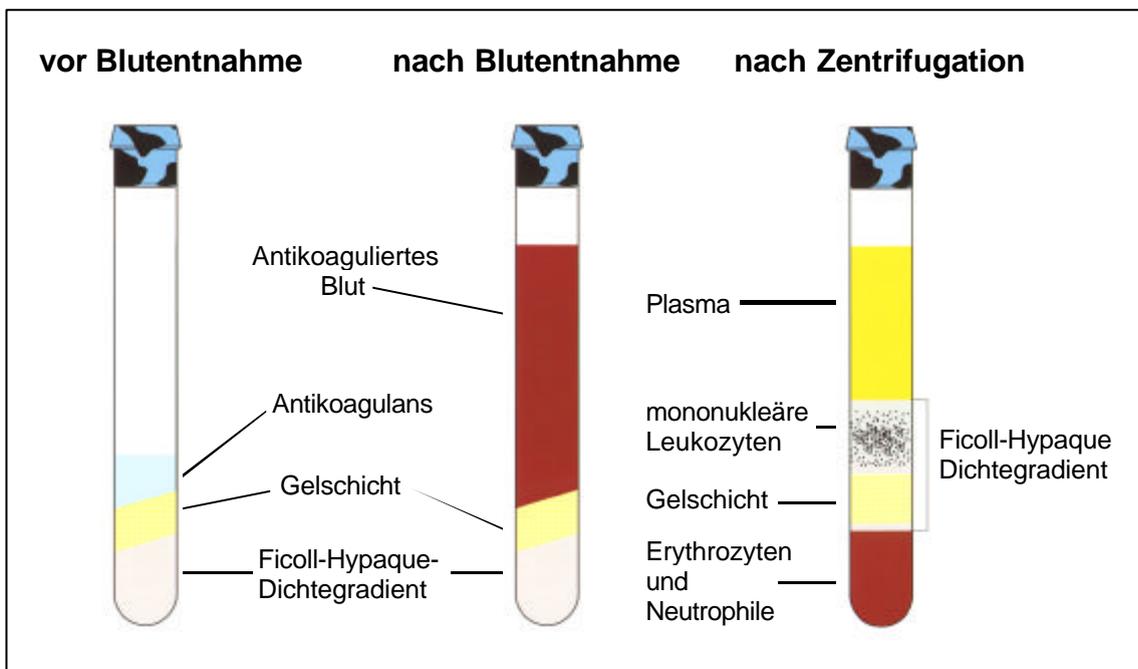
**Abb. 5.1:** Vacutainer® CPT™-Blutentnahme-Röhrchen zur Isolierung der mononukleären Leukozyten aus Vollblut

Die Blutentnahme (ca. 8 mL) erfolgt direkt mit Hilfe der evakuierten Vacutainer® CPT™-Röhrchen. Diese enthalten Heparin als Antikoagulant, eine Ficoll®-Hypaque®-Lösung zur Herstellung des Dichtegradienten, sowie eine Polyester-Gelschicht zur Verhinderung einer Rückvermischung der MN mit den Erythrozyten nach der Zentrifugation [145]. Die Abtrennung der MN von den anderen Blutkompartimenten erfolgt durch Dichtegradienten-Zentrifugation. Nach dem Zentrifugieren bilden die MN eine trübe Phase oberhalb der

## 5.2 Bestimmung von L-Ascorbinsäure in mononukleären Leukozyten mittels HPLC/EC

### 5.2.1 Vereinfachung der Probenvorbereitung

Zur Isolierung der MN wurden spezielle Blutentnahme-Röhrchen eingesetzt, die ohne aufwendige Probenvorbereitung die Abtrennung der MN aus Vollblut ermöglichen. Der Aufbau und das Funktionsprinzip dieser kommerziell erhältlichen, gebrauchsfertigen Blutentnahme-Röhrchen (Vacutainer® CPT™, Beckton/Dickinson, Franklin Lakes/NY, USA) ist in **Abb. 5.1** dargestellt und wird im folgenden kurz erläutert.



**Abb. 5.1:** Vacutainer® CPT™-Blutentnahme-Röhrchen zur Isolierung der mononukleären Leukozyten aus Vollblut

Die Blutentnahme (ca. 8 mL) erfolgt direkt mit Hilfe der evakuierten Vacutainer® CPT™-Röhrchen. Diese enthalten Heparin als Antikoagulans, eine Ficoll®-Hypaque®-Lösung zur Herstellung des Dichtegradienten, sowie eine Polyester-Gelschicht zur Verhinderung einer Rückvermischung der MN mit den Erythrozyten nach der Zentrifugation [145]. Die Abtrennung der MN von den anderen Blutkompartimenten erfolgt durch Dichtegradienten-Zentrifugation. Nach dem Zentrifugieren bilden die MN eine trübe Phase oberhalb der

---



Gelschicht und werden mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt. Anschließend werden die Zellen mit PBS-Lösung gewaschen. Die Verwendung dieses Systems hat gegenüber den in der Literatur beschriebenen Verfahren (s. **Kapitel 5.1**) den Vorteil, daß eine Verdünnung der Blutproben sowie Überschichtungs- und Pipettierschritte entfallen. Somit ist eine kürzere Analysendauer gegeben, und es sind weniger Fehlerquellen zugegen, was zu einer höheren Zuverlässigkeit der Analyseergebnisse führen sollten. Die Anzahl der isolierten MN wird anschließend durch ein halbautomatisches hämatologisches Meßgerät in einem 20 µL Aliquot der Zell-Suspension (Gesamtvolumen: 1 mL) bestimmt. Durch Zugabe von bidest. Wasser und unter Ultraschalleinwirkung werden die Zellmembranen der isolierten Zellen zerstört, so daß das Zell-Lysat erhalten wird. Dieses wird zur Fällung der Proteine und zur Stabilisierung der AA mit einer 6 % (w/w) Perchlorsäure/2 % (w/w) Metaphosphorsäure-Mischung versetzt. Nach dem Zentrifugieren kann die klare Lösung nun zur Bestimmung der AA-Konzentration mittels HPLC/EC (s. **Abschnitt 3.1.2**) eingesetzt werden. Ein typisches Chromatogramm ist in **Abb. 5.4** dargestellt. Im Vergleich zu Chromatogrammen von Blutplasma-Proben (vergl. **Abb. 4.3**) zeichnen sich die Chromatogramme des Lysats der MN durch die fehlenden Peaks der Begleitkomponenten aus. Daher kann bei der Bestimmung der AA-Konzentration im Zell-Lysat mit einer höheren Präzision der Analyseergebnisse im Vergleich zur Bestimmung in Humanplasma gerechnet werden.

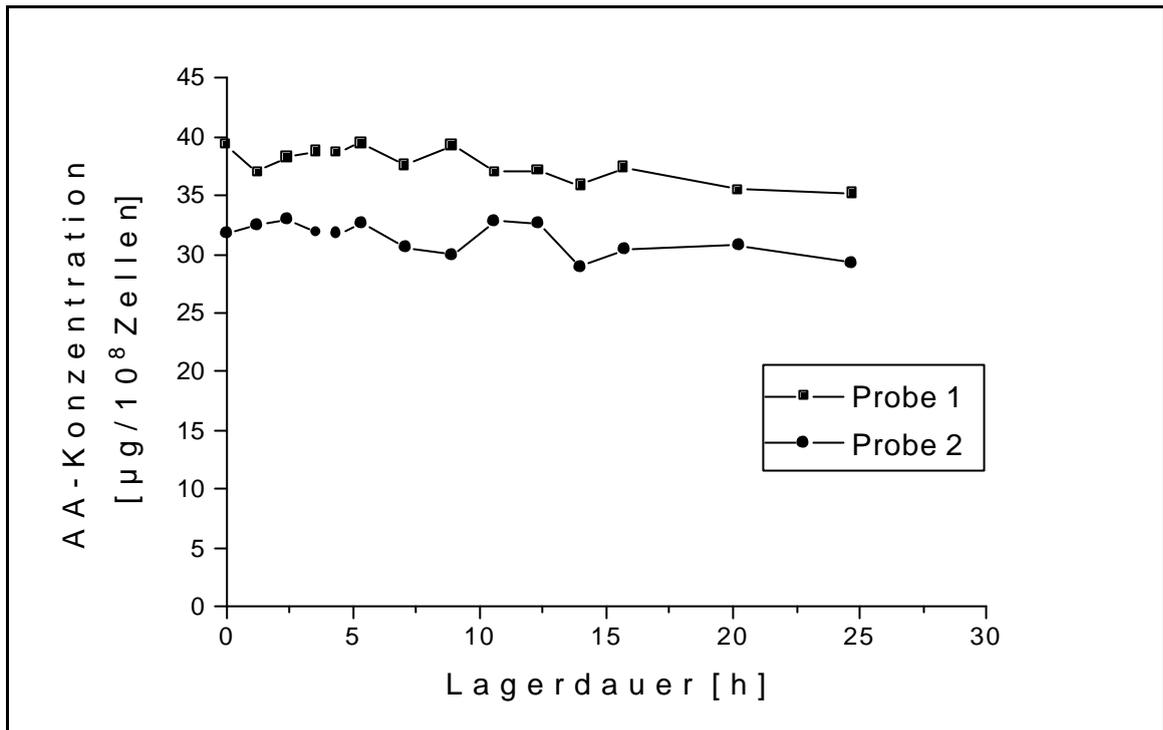
---

## 5.2.2 Ermittlung der Stabilität von L-Ascorbinsäure in den Zell-Lysat-Proben

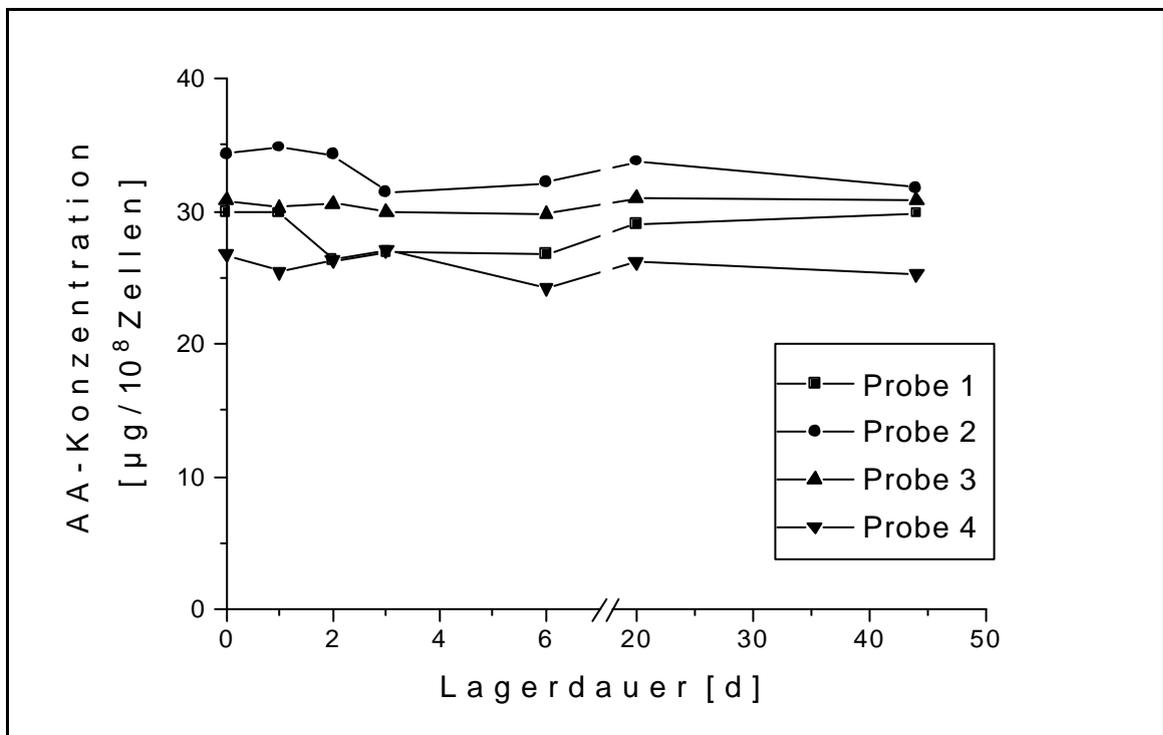
Die Bestimmung der Stabilität von L-Ascorbinsäure im Lysat der NM erfolgt im Hinblick auf die kurzfristige Lagerung der Proben bei 5 °C und bezüglich der längerfristigen Lagerung der Proben bei -80 °C. Dabei wird als Stabilitätskriterium, wie in **Kapitel 3.4.2.1** beschrieben, eine maximal zulässige, relative Konzentrationsänderung von 8,4 % der AA-Ausgangskonzentration festgelegt.

Zur Ermittlung der **Kurzzeitstabilität** werden zwei Zell-Lysat-Proben bei einer Temperatur von 5 °C über einen Zeitraum von 25 h aufbewahrt. Im Abstand von jeweils 2 h wurde der AA-Gehalt in den Proben mittels HPLC/EC bestimmt. Die Ergebnisse in **Abb. 5.2** zeigen, daß bis zu einer Lagerdauer von 12 h keine signifikante Abnahme der L-Ascorbinsäure-Konzentration zu beobachten ist (ermittelte Konzentrationsänderung  $\leq 5,6$  %). Bei einer Lagerdauer von mehr als 12 h ist eine Konzentrationsabnahme von über 8,4 % zu verzeichnen, so daß die Zell-Lysat-Proben bei 5 °C maximal 12 h aufbewahrt werden können. Dieser Zeitraum ist ausreichend, um bei einer größeren Anzahl von Zell-Lysat-Proben einen automatischen Probengeber zur Probeninjektion im Rahmen der chromatographischen AA-Bestimmung einsetzen zu können.

Außerdem wird die **Langzeitstabilität** von L-Ascorbinsäure in vier verschiedenen Zell-Lysat-Proben bei -80 °C und Lagerung über einen Zeitraum von 44 d untersucht. Die AA-Konzentration der Proben wird in unterschiedlichen Abständen von mehreren Tagen mit Hilfe der HPLC/EC bestimmt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in **Abb. 5.3** dargestellt. Da über den gesamten Untersuchungszeitraum keine signifikante Änderung der AA-Konzentration beobachtet wird (ermittelte Konzentrationsänderung  $\leq 7,5$  %), ist die Lagerung der Lysat-Proben NM bei -80 °C für mindestens 44 d möglich.



**Abb. 5.2:** Kurzzeitstabilität von L-Ascorbinsäure im Lysat der mononukleären Leukozyten bei 5 °C



**Abb. 5.3:** Langzeitstabilität von L-Ascorbinsäure im Lysat der mononukleären Leukozyten bei -80 °C

### 5.2.3 Validierung des Analysenverfahrens

Um die Zuverlässigkeit des entwickelten Analysenverfahrens zur Bestimmung der L-Ascorbinsäure in NM zu dokumentieren, wird dieses einer Validierung unterworfen. Dabei werden die Meßpräzision, Wiederholpräzision, Tag-zu-Tag-Präzision und Spezifität des Verfahrens bezüglich L-Ascorbinsäure ermittelt. Eine Bestimmung der Validierungselemente linearer Bereich sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenze wird nicht durchgeführt, da diese Größen bereits bei der Validierung des HPLC/EC-Verfahrens zur Bestimmung des AA-Konzentration in Humanplasma bestimmt wurden (s. **Tab. 4.15**) und aufgrund der guten chromatographischen Trennung nur ein vernachlässigbar geringer Effekt durch die unterschiedlichen Probenmatrices auf diese Parameter zu erwarten ist. Die Richtigkeit des Analysenverfahrens kann nicht anhand von Kontrollstandards bestimmt werden, da entsprechende Proben nicht erhältlich sind. Ein Aufstocken der L-Ascorbinsäure-Konzentration in den MN ist nicht möglich, da keine definierte Menge an L-Ascorbinsäure in das Innere der Zellen gebracht werden kann. Die Ermittlung der Wiederfindung für L-Ascorbinsäure zur Überprüfung der Probenvorbereitung ist damit nicht möglich.

#### 5.2.3.1 Meßpräzision

Zur Bestimmung der Meßpräzision wird die AA-Konzentration in sechs verschiedenen Zell-Lysat-Proben jeweils zehnmal mittels HPLC/EC bestimmt. Die dabei ermittelten Werte (s. **Tab. 5.1**) wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf eine Anzahl von  $10^8$  MN bezogen. Für die Meßpräzision der L-Ascorbinsäure-Bestimmung in MN ergeben sich Werte zwischen 0,6 % und 1,1 %. Wie erwartet, liegen diese Werte in der gleichen Größenordnung wie die bei der AA-Bestimmung in Humanplasma (0,8 % bis 2,1 %, s. **Kapitel 4.1.3.1**). Die etwas höhere Meßpräzision bei der L-Ascorbinsäure-Bestimmung in NM läßt sich durch das Fehlen der Peaks von Nebenbestandteilen im Vergleich zu den Chromatogrammen von Humanplasma-Proben erklären (vergl. **Abb. 5.4** und **Abb. 4.3**). Da in Publikationen [32, 127, 136, 143] keine Angaben für die Meßpräzision enthalten sind, ist ein Vergleich der ermittelten Werte mit Literaturdaten nicht möglich. Der von MAIANI et al. [8], EVANS et al. [31] und KUTNIK et al. [32] angegebene Bereich für die AA-Konzentration in MN beträgt  $3 \mu\text{g}/10^8$  Zellen bis  $53 \mu\text{g}/10^8$  Zellen. Im Vergleich dazu wurden durch eigene Untersuchungen Werte zwischen  $37 \mu\text{g}/10^8$  Zellen und  $57 \mu\text{g}/10^8$  Zellen ermittelt. Diese Werte liegen damit im Bereich der Literaturdaten.

---

**Tab. 5.1:** Meßpräzision bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure im Zell-Lysat der mononukleären Leukozyten mit Hilfe der HPLC/EC

Probe	AA-Konzentration in MN $\bar{x}$ [ $\mu\text{g}/10^8$ Zellen]	s (n = 10) [ $\mu\text{g}/10^8$ Zellen]	s <sub>rel</sub> (n = 10) [%]
1	48,31	0,29	0,6
2	40,49	0,36	0,9
3	48,43	0,53	1,1
4	47,92	0,53	1,1
5	37,37	0,37	1,0
6	57,17	0,40	0,7

### 5.2.3.2 Wiederholpräzision

Zur Ermittlung der Wiederholpräzision werden sechs Probanden jeweils zehn Blutproben entnommen, getrennt aufgearbeitet und die L-Ascorbinsäure-Konzentration im Lysat der NM chromatographisch bestimmt (EC-Detektion). Der Zusammenfassung der Meßwerte in **Tab. 5.2** ist zu entnehmen, daß die Werte für die Wiederholpräzision zwischen 4,8 % und 9,3 % liegen. Im Vergleich zur AA-Bestimmung in Humanplasma unter Wiederholbedingungen ( $s_{\text{rel}} = 0,6 \%$  bis  $2,5 \%$ ;  $n = 10$ , s. **Kapitel 4.1.3.2**) und zur Meßpräzision bei der AA-Bestimmung in NM ( $s_{\text{rel}} = 0,6 \%$  bis  $1,1 \%$ ;  $n = 10$ , s. **Kapitel 5.2.3.1**) sind dies relativ hohe Werte. Die Ursache für diese relativ hohen Standardabweichungen liegen in der Verknüpfung der Fehler bei der Berechnung der Analyseergebnisse durch das Fehlerfortpflanzungsgesetz. Dabei sind folgende Fehler zu berücksichtigen:

- (1) Fehler bei der Bestimmung der Anzahl isolierter MN
  - Meßpräzision des halbautomatischen hämatologischen Meßgerätes:  
 $s_{\text{rel}} \approx 2 \%$  [146]
  - unterschiedliche Reinheit<sup>(1)</sup> der isolierten MN:  
 $94,6 \%$  ( $s = 1,5 \%$ ;  $s_{\text{rel}} = 1,6 \%$ ;  $n = 9$ ) [145]
  - Probenahmefehler durch unzureichende Homogenität der Zellsuspension
- (2) Fehler bei der Einstellung des Zell-Lysat-Volumens
- (3) Fehler der chromatographischen Bestimmung der AA-Konzentration:  
Meßpräzision des HPLC/EC-Verfahrens:  $s_{\text{rel}} \approx 1 \%$  (s. **Abschnitt 5.2.3.1**)

**Tab. 5.2:** Wiederholpräzision für die Bestimmung von L-Ascorbinsäure im Lysat mononukleärer Leukozyten mittels HPLC/EC

Probe	AA-Konzentration in NM $\bar{x}$ [mg/10 <sup>8</sup> Zellen]	s (n = 10) [mg/10 <sup>8</sup> Zellen]	s <sub>rel</sub> (n = 10) [%]
1	34,97 <sup>(2)</sup>	2,59 <sup>(2)</sup>	7,4 <sup>(2)</sup>
2	32,10	1,48	4,6
3	33,65	2,39	7,1
4	22,21 <sup>(2)</sup>	1,07 <sup>(2)</sup>	4,8 <sup>(2)</sup>
5	50,16	4,66	9,3
6	35,45	3,08	8,7

Ein Vergleich der hier ermittelten Werte mit Angaben in der Literatur ist ebenfalls nicht möglich, da keine veröffentlichten Werte für die Wiederholpräzision bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure in MN gefunden wurden.

Der hohe Wert von 9 % für die Wiederholpräzision führt bei der Anwendung des Verfahrens im Rahmen von Differenzbestimmungen zu einem sehr großen Analysenfehler für den Differenzbetrag. Unter Anwendung des Fehlerfortpflanzungsgesetzes (**Gl. 4.1**, S. 75) ergibt sich für eine relative Differenz der AA-Konzentrationen von z. B. 20 % ein relativer Fehler des Analyseergebnisses von 58 %. Die Größe des Fehlers nimmt bei noch geringeren Konzentrationsunterschieden weiter zu, so daß eventuell auftretende Änderungen der AA-Konzentration in NM bei Studien (z. B. vor und nach Belastung eines Probanden) nur sehr schwer nachweisbar sind. Die Ergebnisse solcher Untersuchungen besitzen daher nur eine geringe Aussagekraft.

### 5.2.3.3 Tag-zu-Tag-Präzision

Die Tag-zu-Tag-Präzision der Analysenergebnisse wird anhand der Meßwerte berechnet, die bei der Bestimmung der Stabilität von L-Ascorbinsäure in den Lysat-Proben (s. **Abschnitt 5.2.2**) ermittelt wurden. Dabei ergeben sich für die relative Standardabweichung Werte von 1,5 % bis 5,8 % (s. **Tab. 5.3**).

<sup>(1)</sup> Die Reinheit der isolierten mononukleären Leukozyten wird angegeben als prozentualer Anteil der Lymphozyten und Monozyten an der Gesamtzahl der isolierten Zellen [145].

<sup>(2)</sup> Ermittlung der Werte erfolgte aus n = 9 Messungen, da jeweils ein Meßwert durch den GRUBBS-Ausreißertest (s. **Anhang**) eliminiert wurde

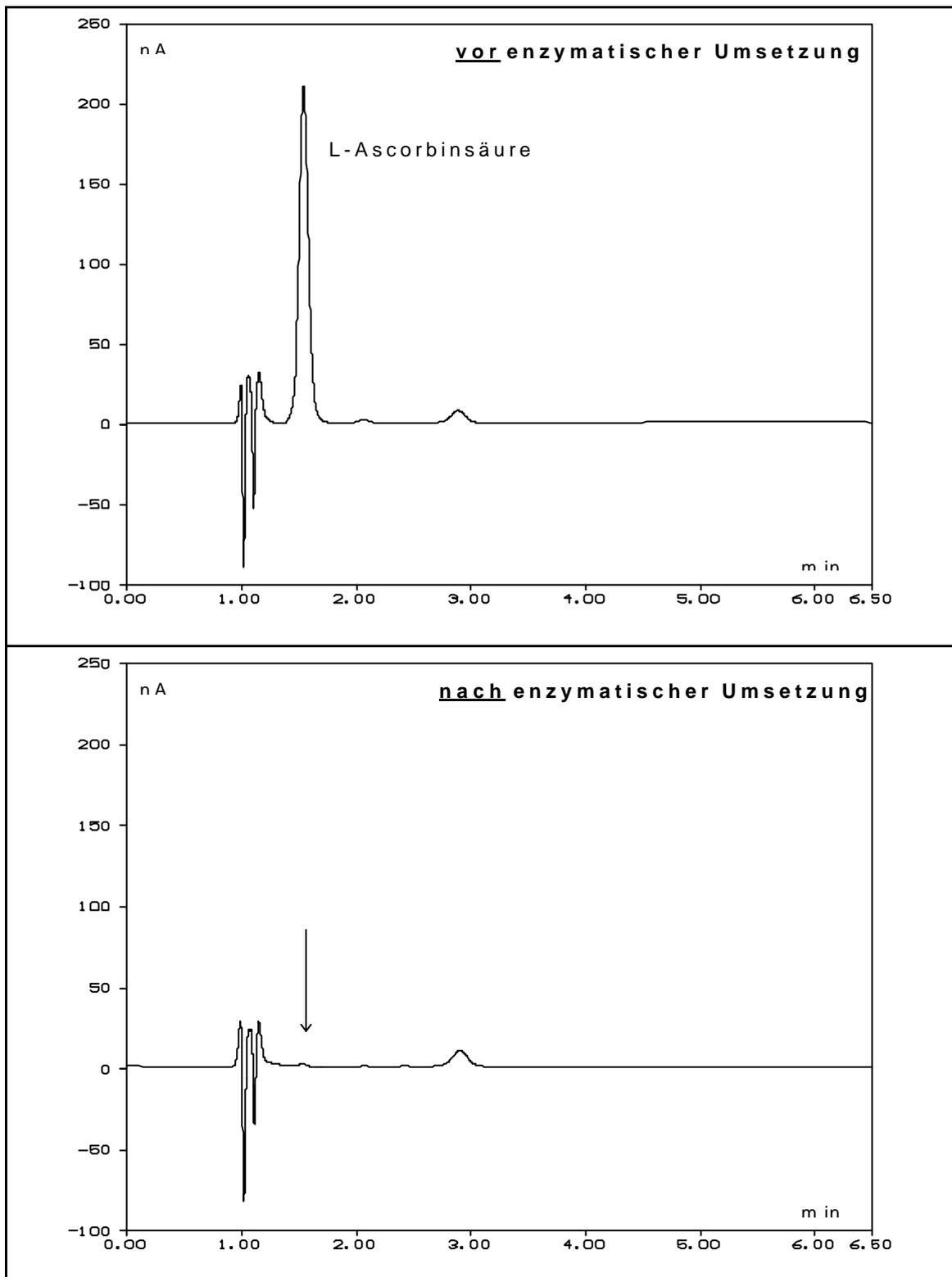
**Tab. 5.3:** Tag-zu-Tag-Präzision der Analysenergebnisse bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure im Lysat mononukleärer Leukozyten mittels HPLC/EC

Probe	AA-Konzentration in MN $\bar{x}$ [ $\mu\text{g}/10^8$ Zellen]	s (n = 7) [ $\mu\text{g}/10^8$ Zellen]	s <sub>rel</sub> (n = 7) [%]
1	28,40	1,65	5,8
2	33,25	1,39	4,2
3	30,51	0,47	1,5
4	25,92	0,96	3,7

Die Tag-zu-Tag-Präzision der Analysenergebnisse wird nach den "Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien" [25] zu laborinternen Qualitätskontrolle herangezogen. Anhand dieser Richtlinien läßt sich aus den Literaturangaben für den Wertebereich der L-Ascorbinsäure-Konzentration in den MN der maximal zulässige Wert für die Analysenpräzision berechnen. Da die Angaben über die L-Ascorbinsäure-Konzentration in den MN stark variieren (3  $\mu\text{g}/10^8$  Zellen bis 53  $\mu\text{g}/10^8$  Zellen [8, 31, 32]) ist keine sinnvolle Angabe einer maximal zulässigen Tag-zu-Tag-Präzision möglich.

#### 5.2.3.4 Spezifität

Zur Überprüfung der Spezifität des HPLC/EC-Verfahrens bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure im Lysat der MN erfolgt ein Vergleich der Chromatogramme vor und nach Umsetzung der nativen L-Ascorbinsäure mit Ascorbat-Oxidase (EC 1.10.3.3) (s. **Abb. 5.4**). Der fehlende AA-Peak im Chromatogramm nach der Umsetzung mit dem Enzym ist ein Hinweis auf die Spezifität des HPLC/EC-Verfahrens. Wie bereits in **Abschnitt 4.1.6.3** beschrieben, wird jedoch auch D-Isoascorbinsäure von Ascorbat-Oxidase (EC 1.10.3.3) oxidiert, so daß durch den beschriebenen Test eine Störung durch D-Isoascorbinsäure nicht ausgeschlossen werden kann. Da es in der Literatur keinen Hinweis auf das Vorkommen von D-Isoascorbinsäure in MN gibt, ist die Spezifität des HPLC/EC-Verfahrens trotzdem gewährleistet.



**Abb. 5.4:** Spezifitätstest durch Peaklöschung nach Umsetzung mit Ascorbat-Oxidase (EC 1.10.3.3) bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure in mononukleären Leukozyten mittels HPLC/EC (Arbeitspotential: +0,85 V gegen Ag/AgCl).

### 5.3 Bestimmung der L-Ascorbinsäure-Konzentration in mononukleären Leukozyten mittels HPLC/UV

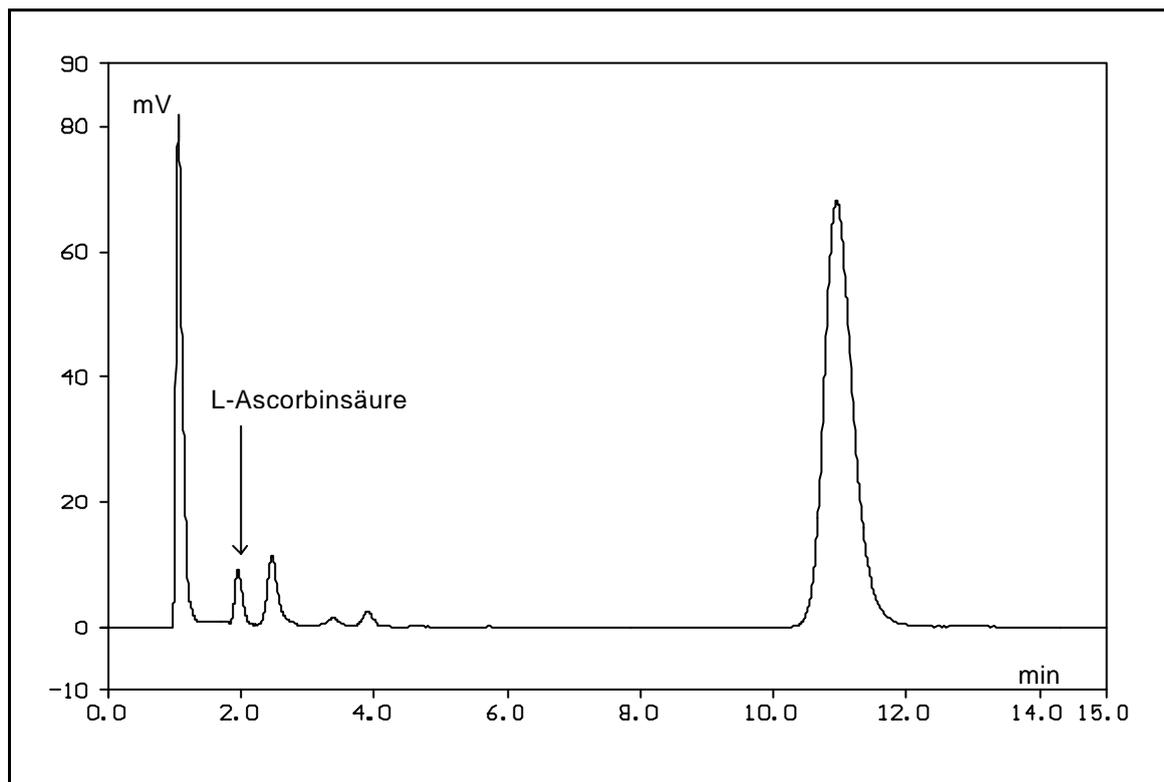
Die Bestimmung von L-Ascorbinsäure in MN mittels HPLC/UV wird aufgrund der relativ hohen Bestimmungsgrenze bei der UV-Detektion (10 pmol/Injektion [23]) und der geringen Anzahl der im Blut enthaltenen MN nur selten durchgeführt. Bei der Entwicklung und Validierung des Analysenverfahrens zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure in den MN mittels EC-Detektion (s. **Kapitel 5.1**) wurden jedoch Hinweise erhalten, daß die Quantifizierung der L-Ascorbinsäure im Zell-Lysat auch durch UV-Detektion möglich sein sollte. So wurden aus einer Blutprobe (ca. 8 mL Vollblut) etwa  $6 \times 10^6$  MN mit einem durchschnittlichen AA-Gehalt von  $35 \mu\text{g}/10^8$  Zellen isoliert. Daraus ergibt sich für ein Zell-Lysat-Volumen von 1 mL eine AA-Konzentration von 2,1 mg/L. Dieser Wert liegt deutlich oberhalb der für das HPLC/UV-Verfahren ermittelten Bestimmungsgrenze von 0,2 mg/L (23 pmol/20  $\mu\text{L}$ , s. **Abschnitt 4.1.1.2**), so daß eine Quantifizierung der L-Ascorbinsäure im Lysat der MN auch mit der UV-Detektion möglich sein sollte.

Um die Anwendbarkeit des HPLC/UV-Verfahrens zu demonstrieren, werden sechs verschiedene Zell-Lysate analysiert. Die Ergebnisse in **Tab. 5.5** zeigen erwartungsgemäß, daß die Meßwerte für die AA-Konzentration deutlich oberhalb der Bestimmungsgrenze des HPLC/UV-Verfahrens liegen. Die ermittelten Meßwerte für die AA-Konzentration ( $17 \mu\text{g}/10^8$  Zellen und  $50 \mu\text{g}/10^8$  Zellen) entsprechen ferner dem von MAIANI et al. [8], EVANS et al. [31] und KUTNIK et al. [32] angegebenen Wertebereich ( $3 \mu\text{g}/10^8$  Zellen bis  $53 \mu\text{g}/10^8$  Zellen).

Ein typisches Chromatogramm für die Bestimmung von L-Ascorbinsäure in den MN ist in **Abb. 5.5** wiedergegeben. Dabei treten im Vergleich zur EC-Detektion (s. **Abb. 5.4**) die Peaks einiger Begleitkomponenten ( $t_{r,1} = 2,46$  min;  $t_{r,2} = 3,37$  min;  $t_{r,3} = 3,91$  min;  $t_{r,4} = 10,95$  min) auf. Diese stören die Bestimmung der AA ( $t_{r(\text{AA})} = 1,96$  min) jedoch nicht, da die Substanzen deutlich getrennt eluiert werden.

**Tab. 5.5:** Bestimmung der AA-Konzentration in den mononukleären Leukozyten mittels HPLC/EC

Probe	Anzahl der isolierten MN [10 <sup>6</sup> Zellen]	AA-Konzentration	
		Zell-Lysat [mg/L]	MN [µg/10 <sup>8</sup> Zellen]
1	8,0	3,94	49,25
2	8,1	1,70	20,99
3	11,7	2,25	19,23
4	5,8	1,20	20,69
5	4,3	2,19	50,93
6	3,4	0,59	17,35

**Abb. 5.5:** Typisches Chromatogramm bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure in mononukleären Leukozyten mittels HPLC/UV (Detektionswellenlänge: 243 nm)

## 5.4 Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure in mononukleären Leukozyten

Bei der Bestimmung der L-Ascorbinsäure-Konzentration in MN werden zur Isolierung der Zellen die gebrauchsfertigen, kommerziell erhältlichen Vacutainer® CPT™-Röhrchen eingesetzt. Diese bieten gegenüber den herkömmlichen Isolierungstechniken den Vorteil der einfacheren Handhabung und schnelleren Bearbeitung der Proben, da Pipettier- und Verdünnungsschritte entfallen. Die Übertragung der Analysenbedingungen zur chromatographischen Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Humanplasma auf die AA-Bestimmung im Lysat der mononukleären Leukozyten ist ohne Einschränkungen möglich. Die Quantifizierung kann wahlweise mittels UV-Detektor bei einer Detektionswellenlänge von 243 nm oder mittels EC-Detektor bei einem Arbeitspotential von +0,85 V gegen Ag/AgCl erfolgen. Der gesamte Analysenablauf ist in **Abb. 5.6** schematisch dargestellt.

Zur Charakterisierung der Zuverlässigkeit des in **Abb. 5.6** dargestellten Analysenverfahrens (Quantifizierung der L-Ascorbinsäure: HPLC mit EC-Detektion) wurden folgende Validierungsdaten ermittelt:

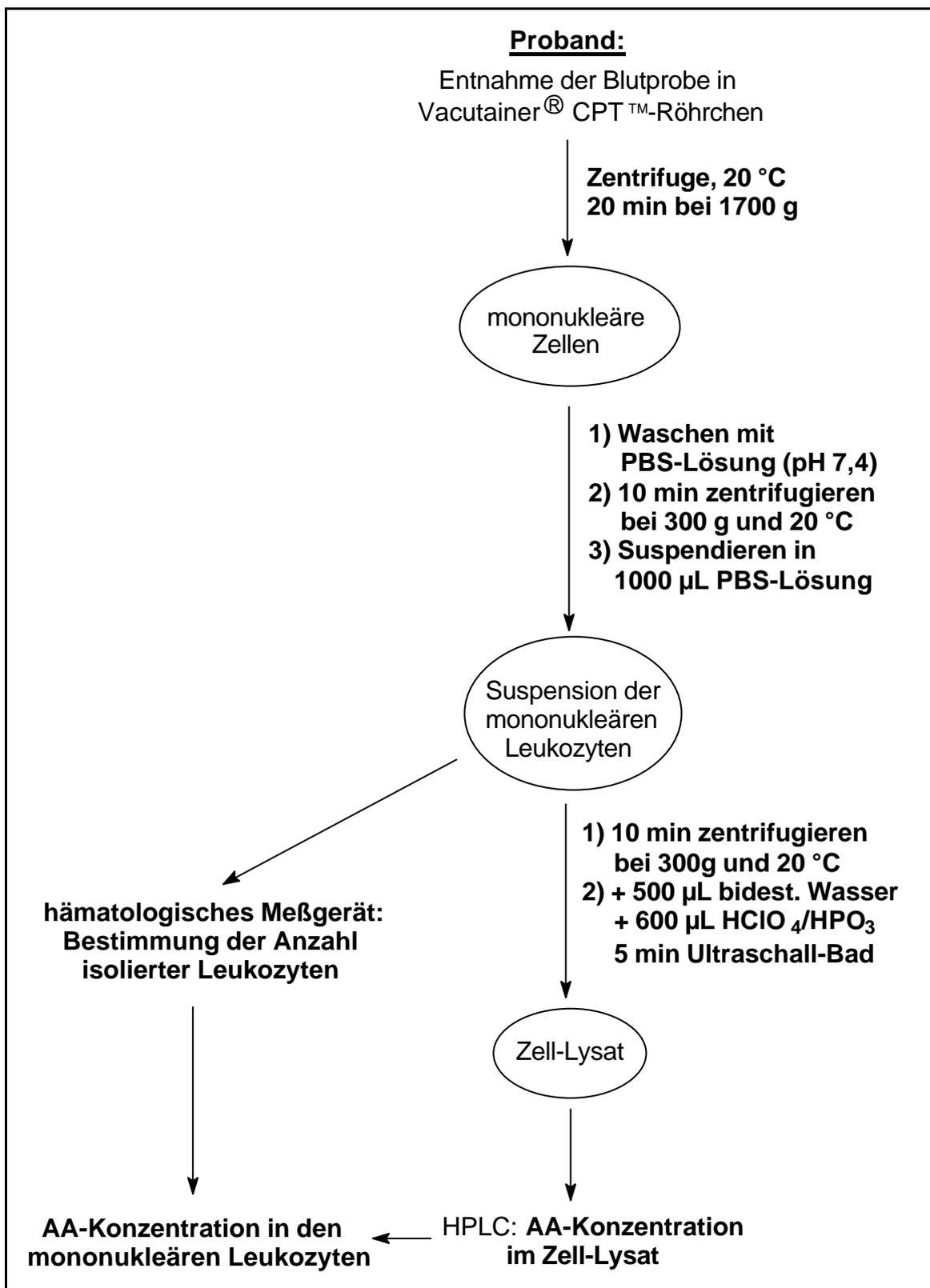
Meßpräzision  $\leq 1,1$  %, Wiederholpräzision  $\leq 9,3$  % sowie eine Tag-zu-Tag-Präzision von  $\leq 5,8$  %. Der hohe Wert für die Wiederholpräzision von  $s_{rel} \leq 9,3$  % führt bei Differenzmessungen (z. B. Bestimmung der L-Ascorbinsäure-Konzentration in MN vor und nach Einnahme einer definierten L-Ascorbinsäure-Menge) zu einer sehr großen statistischen Unsicherheit für den Differenzbetrag, so daß signifikante Änderungen der AA-Konzentration nur schwer nachweisbar sind. Aufgrund der fehlenden Validierungsdaten bei literaturbekannten Verfahren müssen Aussagen über unterschiedliche L-Ascorbinsäure-Konzentrationen in MN (z. B. [11, 136]) kritisch beurteilt werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß diese auf zufällige Fehler bei der Analysendurchführung zurückzuführen sind.

Weiterhin ist die erforderliche Spezifität der HPLC/UV- und HPLC/EC-Verfahren gegenüber L-Ascorbinsäure gegeben. Die Stabilität der in den Proben enthaltenen L-Ascorbinsäure ist für mindestens 12 h bei 5 °C und mindestens 44 d bei -80 °C gewährleistet, so daß eine Anwendung des entwickelten

Analysenverfahrens bei klinisch-chemischen Routineuntersuchungen möglich ist. Die im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen ermittelten AA-Konzentrationen in den mononukleären Leukozyten liegen mit  $37 \mu\text{g}/10^8$  Zellen bis  $58 \mu\text{g}/10^8$  Zellen innerhalb der Literaturangaben ( $3 \mu\text{g}/10^8$  Zellen bis  $53 \mu\text{g}/10^8$  Zellen [8, 31, 32]). Ein Vergleich der hier erzielten Validierungsdaten mit Angaben aus der Literatur ist nicht möglich, da die Publikationen keine derartigen Daten enthalten.

Ferner kann gezeigt werden, daß die Quantifizierung der L-Ascorbinsäure im Lysat der MN auch mittels HPLC/UV erfolgen kann. Die dabei ermittelten Werte ( $17 \mu\text{g}/10^8$  Zellen und  $50 \mu\text{g}/10^8$  Zellen) stimmen gut mit Angaben von MAIANI et al. [8], EVANS et al. [31] und KUTNIK et al. [32] überein.

---



**Abb. 5.6:** Schematischer Analysenablauf zur Bestimmung von L-Ascorbin-säure in mononukleären Leukozyten. Die Quantifizierung kann dabei wahlweise mittels HPLC/EC oder HPLC/UV erfolgen.

## 6 Anwendung der HPLC-Verfahren mit UV- und EC-Detektion auf Problemstellungen der klinisch-chemischen Analytik

Um die Anwendung der entwickelten HPLC/UV- und HPLC/EC-Verfahren in der klinisch-chemischen Analytik demonstrieren zu können, wurden exemplarisch folgende Problemstellungen untersucht:

- (1) Nachweis von Dehydro-L-ascorbinsäure im Blutplasma gesunder Menschen und Bestimmung der DHAA/AA-Relation
- (2) Überprüfung einer möglichen Korrelation zwischen der AA-Konzentration in Blutplasma und mononukleären Leukozyten
- (3) Untersuchungen zur Änderung der Blutplasma-AA-Konzentration bei körperlicher Belastung

### 6.1 Nachweis von Dehydro-L-ascorbinsäure im Blutplasma gesunder Menschen und Bestimmung der Dehydro-L-ascorbinsäure/L-Ascorbinsäure-Relation

Wie bereits in **Kapitel 1** erläutert, kommt es bei bestimmten Erkrankungen (z. B. Meningitis, Tetanus und rheumatoide Arthritis) zu einem Anstieg der DHAA/AA-Relation im Blutplasma. Dabei werden für die DHAA/AA-Relation Werte von 0,8 bis 4 ermittelt [12, 13]. Über den Wert für diese Relation im Blutplasma bei gesunden Menschen existieren jedoch widersprüchliche Angaben (Wertebereich: 0 bis 0,25; s. **Kapitel 1**). Daher soll mit Hilfe des validierten HPLC/UV-Verfahrens überprüft werden, ob und in welchen Konzentrationen DHAA im Blutplasma gesunder Probanden nachweisbar ist.

Dazu werden zwölf gesunden Probanden<sup>(1)</sup> jeweils zwei Blutproben entnommen und entsprechend der Standardarbeitsanweisung (s. **Anhang**) beschrieben aufgearbeitet. Abschließend wird die AA- sowie die Gesamt-ascorbinsäure-Konzentration mittels HPLC/UV bestimmt und die DHAA/AA-Relation berechnet. Die Ergebnisse sind in **Tab. 6.1** zusammengefaßt.

---

<sup>(1)</sup> Als „gesund“ gelten in diesem Falle Probanden, die nach eigenen Angaben an keinen früheren oder akuten Lebererkrankungen sowie sonstigen akuten Erkrankungen leiden.

---

**Tab. 6.1:** Bestimmung der DHAA/AA-Relation im Blutplasma gesunder Probanden mittels HPLC/UV

Probe	Konzentration im Plasma			DHAA/AA-Relation
	AA [mg/L]	AA + DHAA [mg/L]	DHAA [mg/L]	
1	11,60	11,85	0,25	0,022
2	18,34	18,71	0,37	0,020
3	14,29	14,35	0,06	0,004
4	12,51	13,41	0,90	0,072
5	11,19	11,85	0,66	0,059
6	13,09	13,74	0,65	0,050
7	13,34	14,53	1,19	0,089
8	13,55	13,84	0,29	0,021
9	15,76	16,74	0,98	0,062
10	15,83	16,01	0,18	0,011
11	13,97	14,55	0,58	0,042
12	6,59	6,00	-0,59	-0,090

Wie **Tab. 6.1** entnommen werden kann, ergeben sich für die DHAA/AA-Relation im Blutplasma gesunder Menschen Zahlenwerte, die unterhalb von 0,09 liegen. Im Rahmen der Validierung des HPLC/UV-Verfahrens (s. **Kapitel 4.2.3**) wurde für den nachweisbaren DHAA-Anteil ein relativer Wert von 14 % der Gesamtascorbinsäure-Konzentration ermittelt, welches einer DHAA/AA-Relation von 0,16 entspricht. Da die hier ermittelten Werte für die DHAA/AA-Relation den nachweisbaren DHAA-Anteil deutlich unterschreiten, sind die erhaltenen Ergebnisse nur auf zufällige Unterschiede zwischen den Meßwerten zurückzuführen. Im Blutplasma gesunder Probanden ist damit DHAA mit der angewendeten indirekten Methode nicht nachweisbar. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Untersuchungsergebnissen von IWASE/ONO [19], DHARIWAL et al. [20] und OKAMURA [21]. Dabei wird die Bestimmung der DHAA-Konzentration ebenfalls indirekt (nach Reduktion zu L-Ascorbinsäure und Quantifizierung mittels HPLC/EC [19, 20] bzw. Photometrie [21]) durchgeführt.

Die in der Literatur für den gesunden Menschen genannten Werte der DHAA/AA-Relation von 0,08 bis 0,25 [14-18] könnten somit auf eine teilweise

Oxidation der in den Proben enthaltenen L-Ascorbinsäure durch unzureichende Stabilisierung während der Probenvorbereitung und Lagerung zurückzuführen sein [23]. KOSHIISHI und IMANARI [14] führen jedoch die Beobachtung, daß Dehydro-L-scorbinsäure nicht im Blutplasma gesunder Menschen nachweisbar ist, auf deren Zerfall bei der Probenvorbereitung, insbesondere der Proteinfällung durch Metaphosphorsäure, Trichloressigsäure und Perchlorsäure, zurück. Gegen diese Vermutung sprechen jedoch eigene Untersuchungen zur Wiederfindung von Dehydro-L-ascorbinsäure (s. **Kapitel 4.2.5**), die keinen Einfluß des Fällungsreagenzes (6 % (w/w) Perchlorsäure, 2 % (w/w) Metaphosphorsäure) erkennen lassen. Eine abschließende Klärung dieser Problematik ist somit nach dem aktuellen Stand der Literatur und den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen nicht möglich.

## 6.2 Korrelation zwischen der L-Ascorbinsäure-Konzentration im Blutplasma und in mononukleären Leukozyten

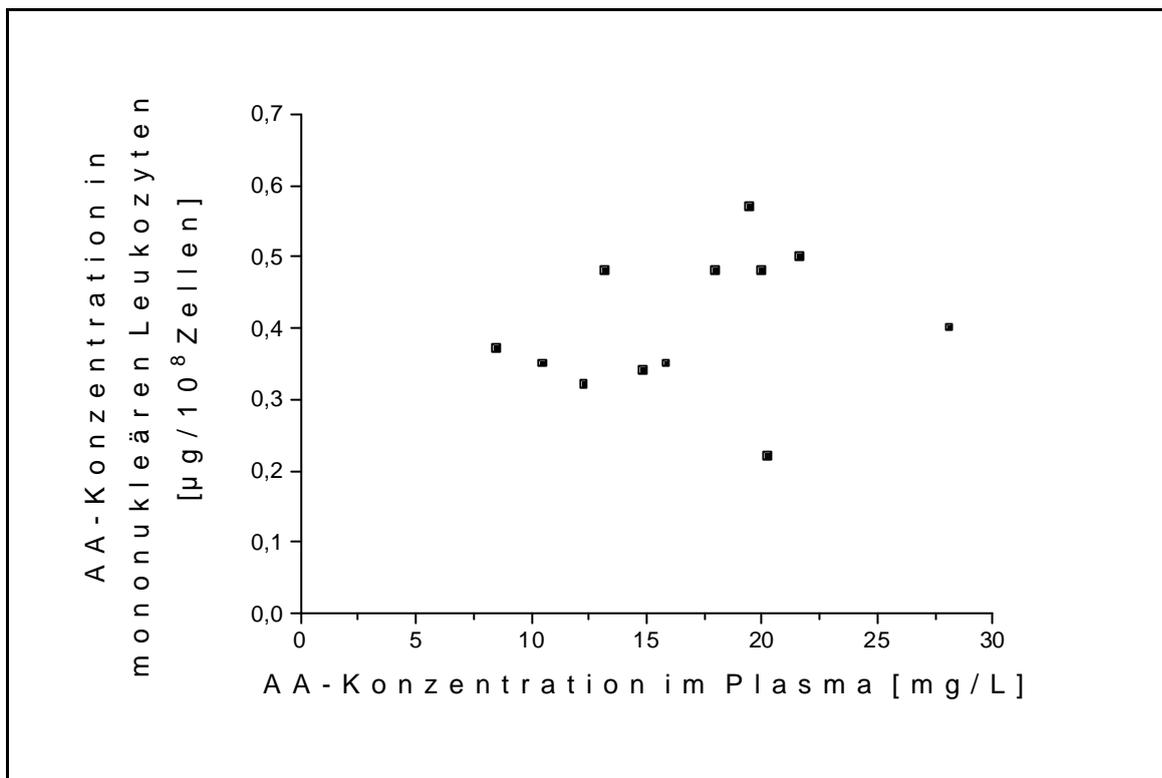
Neben der Korrelation der AA-Konzentration in den Leukozyten mit der Vitamin C-Versorgung eines Menschen (s. **Kapitel 1** und **Kapitel 5**) wurde auch zwischen der AA-Konzentration in den Leukozyten („buffy coat layer“-Zellfraktion) und im Blutplasma eine Abhängigkeit festgestellt [84, 147]. Es zeigte sich, daß bei Zunahme der AA-Konzentration im Blutplasma auch die AA-Konzentration in den Leukozyten ansteigt. Bei diesen Untersuchungen wurden jedoch folgende Faktoren nicht berücksichtigt:

- Die „buffy coat layer“-Zellfraktion besteht aus verschiedenen Zell-Typen: Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten.
- Diese enthalten unterschiedliche AA-Konzentrationen (s. **Tab. 2.3**).
- Die Zellen unterliegen einer großen biologischen Variabilität bezüglich der relativen Anteile der Zell-Typen in den Blutproben (s. **Kapitel 2.1**).

Daher wurde von EVANS et al. [31] die Korrelation der AA-Konzentration in den Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten mit der Plasma-AA-Konzentration untersucht, wobei sich positive Korrelationen mit der Granulozyten- und Thrombozyten-AA-Konzentration ergaben. Zwischen der AA-Konzentration in den MN und der Plasma-AA-Konzentration kann dagegen keine Korrelation festgestellt werden. Die beschriebenen Untersuchungen wurden jedoch photometrisch mit Hilfe der Dinitrophenylhydrazin-Methode durchgeführt, die aufgrund ihrer zahlreichen methodischen Defizite (s. **Kapitel 3.2.1**) keine zuverlässige Quantifizierung der AA ermöglicht.

---

Um die Ergebnisse der Untersuchungen von EVANS et al. [31] bezüglich der fehlenden Korrelation zwischen der AA-Konzentration in den mononukleären Leukozyten und der Plasma-AA-Konzentration zu überprüfen, werden vergleichbare Untersuchungen mit dem eigenen validierten HPLC/EC-Verfahren durchgeführt. Dazu werden neben der Bestimmung der AA-Konzentration im Lysat der mononukleären Leukozyten (Analyseablauf s. **Abb. 5.6**) gleichzeitig die Plasma-AA-Konzentrationen bestimmt (Standardarbeitsanweisung s. **Anhang**). Zur Überprüfung der Korrelierbarkeit der beiden Parameter sind diese in **Abb 6.1** gegeneinander aufgetragen.



**Abb 6.1:** Korrelation zwischen der AA-Konzentration in mononukleären Leukozyten und der AA-Konzentration im Blutplasma

Weiterhin wird auf Basis der Meßdaten eine lineare Regressionsrechnung durchgeführt. Diese ergibt für den funktionalen Zusammenhang zwischen der Plasma-AA-Konzentration und der AA-Konzentration in den mononukleären Leukozyten folgende Geradengleichung:

$$y = 0,3293 \mu\text{g}/10^8 \text{ Zellen} + 0,0045 \mu\text{g}/(10^8 \text{ Zellen (mg/L)}) \cdot x \quad (\text{Gl. 6})$$

Korrelationskoeffizient:  $r = 0,2492$

Der sehr geringe Korrelationskoeffizient von  $r = 0,2492$  zeigt, daß offensichtlich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der AA-Konzentration im Blutplasma und in mononukleären Leukozyten besteht. Somit kann das Untersuchungsergebnis von EVANS et al. [31] bestätigt werden.

### **6.3 Untersuchungen zur Änderung der L-Ascorbinsäure-Konzentration im Blutplasma bei körperlicher Belastung**

Durch den bei intensiver körperlicher Belastung (z. B. Sport) erhöhten Stoffwechsel kommt es im Organismus zwangsläufig auch zu einer höheren Sauerstoffaufnahme und damit zur vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies und freien Radikalen. Wie bereits in **Kapitel 2.2.1** erläutert, ist L-Ascorbinsäure in der Lage, die Bildung dieser reaktiven Moleküle zu hemmen und damit den Organismus vor oxidativem Streß zu schützen. Das Ausmaß der Bildung freier Radikale und reaktiver Sauerstoffspezies bei körperlicher Belastung hängt u. a. von folgenden Faktoren ab [4]:

- (1) Intensität und Dauer der Belastung (besonders Ausdauerübungen führen zu einem erhöhten mitochondrialen Sauerstoffverbrauch)
- (2) Art der Belastung (isometrische und konzentrische Muskelkontraktion sind von einem hohen Sauerstoff-Verbrauch gekennzeichnet)
- (3) Trainingszustand und "antioxidative Kapazität" des Probanden

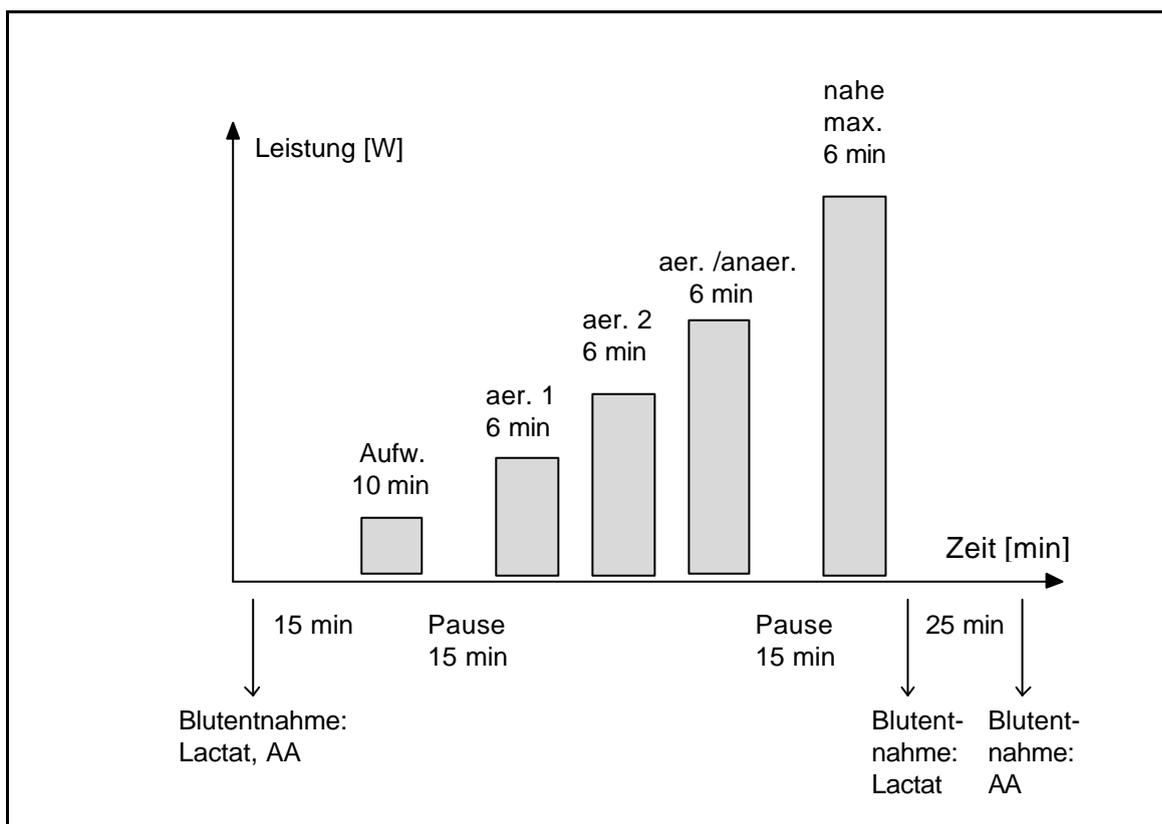
Untersuchungen zum Einfluß körperlicher Belastung auf die AA-Konzentration im Blutplasma haben ergeben, daß es bei Ausdauersportlern direkt nach Absolvierung eines Halbmarathon- bzw. Marathon-Laufes nicht, wie erwartet, zu einer Abnahme der Blutplasma-AA-Konzentration kommt, sondern daß diese kurzfristig um 34 % bzw. 40 % zunimmt [148, 149]. Dieser Anstieg der AA-Konzentration wird mit der Aktivierung der antioxidativen Schutzfunktion des Körpers und der damit verbundenen Freisetzung von AA aus dem Körper-Pool begründet [148]. Ab einem Zeitraum von ca. 24 h nach Ende der Belastungssituation erreicht die AA-Konzentration im Blutplasma wieder ihren Ausgangswert [149].

Im Gegensatz zu den Untersuchungen bei Ausdauerbelastungen sind bisher keine Studien zum Einfluß von Kurzzeitbelastungen auf die AA-Konzentration im Blutplasma bekannt. Daher werden in Zusammenarbeit mit dem "Sportmedizinischen Institut" der Universität-Gesamthochschule Paderborn Fahrrad-Ergometer-Tests durchgeführt, bei denen der Zusammenhang

---

zwischen Kurzzeitbelastungen und der Plasma-AA-Konzentration ermittelt wird.

An der Studie beteiligten sich 15 Sportstudenten, die als sportlich trainiert (ca. 10 h Ausdauertraining/Woche) und -aufgrund des jeweils ermittelten Blutbildes (s. **Kapitel 8.3**)- als gesund eingestuft wurden. Das Belastungsschema des von den Probanden absolvierten Fahrrad-Ergometer-Trainings ist in **Abb 6.2** dargestellt. Zur Charakterisierung der auftretenden Belastungen werden die Plasma-Lactat-Konzentration und die Herzfrequenz ermittelt. Dabei erfolgt die Bestimmung der Lactat-Konzentration mit einem vollenzymatischen UV-Test und die Ermittlung der Herzfrequenz mit einem EKG-Gerät. Die erste Blutentnahme (Ohr-Kapillarblut zur Lactat-Bestimmung sowie Venen-Blut zur Bestimmung der AA-Konzentration) und Bestimmung der Herzfrequenz erfolgt 15 min vor Beginn des Belastungstrainings. Dieses wird von einer zehninütigen Aufwärmphase mit nachfolgender Pause (Dauer: 15 min) eingeleitet. Anschließend erfolgt eine stufenweise Steigerung der zu erbringenden Trainingsleistung, bis ein Leistungsniveau erreicht wird, welches



**Abb. 6.2:** Belastungsschema des Fahrrad-Ergometer-Test bei den Untersuchungen zum Einfluß von Kurzzeitbelastungen auf die AA-Konzentration im Blutplasma

nahe der in Voruntersuchungen ermittelten maximalen Leistungsfähigkeit jedes einzelnen Athleten liegt. Dabei werden von den Probanden Leistungen sowohl im aeroben als auch anaeroben Bereich gefordert. Sofort nach Beendigung des Trainings erfolgt die zweite Blutentnahme zur Bestimmung der Plasma-Lactat-Konzentration und Kontrolle der Herzfrequenz. Aus Gründen des Studiendesigns erfolgt die Blutentnahme zur Bestimmung der AA-Konzentration 25 min nach Ende der Belastung. Zur Quantifizierung der L-Ascorbinsäure wird das validierte HPLC/UV-Verfahren (Arbeitsablauf s. **Abb. 4.9**) eingesetzt.

Durch die körperliche Belastung kommt es zu einem Flüssigkeitsverlust, der zu einer Abnahme des Plasmavolumens und zu einer scheinbaren Erhöhung der Nachbelastungswerte führt. Die Korrektur der Meßwerte nach Belastung wird mit Hilfe des Korrekturfaktors nach DILL und COSTILL (s. **Anhang**) durchgeführt. Die bei den Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse sind in **Tab. 6.2** zusammengefaßt.

**Tab. 6.2:** Anthropometrische Daten der Probanden und ermittelte Meßwerte beim Fahrrad-Ergometer-Training (n = 15)

	vor Belastung		nach Belastung	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
Alter [a]	26	4	-	-
Körpergröße [cm]	179	6	-	-
Körpergewicht [kg]	72,6	4,8	-	-
Herzfrequenz [ $\text{min}^{-1}$ ]	67	12	174 <sup>(1)</sup>	10 <sup>(1)</sup>
Plasma-Lactat-Konzentration <sup>(2)</sup> [mmol/L]	1,4	0,3	6,6 <sup>(1)</sup>	0,9 <sup>(1)</sup>
Plasma-AA-Konzentration <sup>(3)</sup> [mg/L]	14,0	2,7	13,8 <sup>(4)</sup>	2,3 <sup>(4)</sup>

<sup>(1)</sup> direkt nach Ende der Belastung

<sup>(2)</sup> Bestimmt in Ohr-Kapillar-Blut

<sup>(3)</sup> Bestimmt in Venen-Blut

<sup>(4)</sup> 25 min nach Belastungsende

Der Vergleich der ermittelten Plasma-AA-Konzentrationen vor und nach Belastung ergibt keine signifikante Konzentrationsänderung (t-Test für gepaarte Stichproben;  $p < 0,05$ ; s. **Kapitel 8.10.3**). Die Werte der Herzfrequenz zeigen, daß keine maximale Ausbelastung der Athleten erfolgt ist. Aus den ermittelten Lactat-Werten kann auf eine mittlere Lactat-Azidose geschlossen werden, d. h., es erfolgte keine maximale Belastung. Die Ursache für das Ausbleiben der

erwarteten Zunahme der AA-Konzentration im Blutplasma könnte in einer zu kurzen aeroben Belastungssituation liegen, die nicht ausreicht, um die antioxidative Schutzfunktion des Körpers zu aktivieren. Es sind daher weitere Untersuchungen, z. B. über die Belastungsarten, die zu einer Aktivierung der antioxidativen Schutzfunktion führen, notwendig.

#### **6.4 Abschließende Bewertung der Anwendung der HPLC-Verfahren in der klinisch-chemischen Routineanalytik**

Die Anwendung der optimierten und validierten HPLC/UV und HPLC/EC-Verfahren zur Bestimmung der AA-Konzentration im Blutplasma und in MN hat gezeigt, daß diese eine routinemäßige Quantifizierung der L-Ascorbinsäure ermöglichen. Bei der indirekten Bestimmung der DHAA-Konzentration in den Blutplasma-Proben sind die Analyseergebnisse, aufgrund der Anwendung des Fehlerfortpflanzungsgesetzes, mit einer großen statistischen Unsicherheit behaftet. Dies führt zu einem hohen Wert für den nachweisbaren DHAA-Anteil (14 % der Gesamtascorbinsäure-Konzentration), so daß diese indirekten Verfahren zum Nachweis von Dehydro-L-ascorbinsäure und deren Quantifizierung bei gesunden Probanden nicht geeignet sind. Die Angaben zur DHAA-Konzentration in Veröffentlichungen bei denen eine indirekte Bestimmung der Dehydro-L-ascorbinsäure erfolgte, z. B. [69, 84], sind daher als statistisch unzureichend abgesichert einzustufen. Zur Bestimmung der DHAA-Konzentration ist in diesem Fall ist die Anwendung direkter Verfahren, z. B. nach Derivatisierung mit 1,2-Diaminobenzol [14], vorzuziehen. Der Nachteil des größeren Aufwandes bei der Probenvorbereitung bzw. Online-Bestimmung wird durch den geringeren Analysenfehler aufgehoben.

---

## 7 Zusammenfassung und Ausblick

L-Ascorbinsäure (AA) und Dehydro-L-ascorbinsäure (DHAA) sind die beiden wichtigsten biologisch aktiven Formen des Vitamin C im menschlichen Körper. Ihre Konzentrationen im Blutplasma und in Leukozyten liefern gemeinsam mit anderen Parametern wichtige Hinweise zum Antioxidantien-Status eines Menschen der durch Streßfaktoren wie z. B. Krankheiten beeinträchtigt werden kann. In der Literatur existieren jedoch zum Teil widersprüchliche Angaben, z. B. über die DHAA-Konzentration im Blutplasma gesunder Menschen und die biologische Wirkung der L-Ascorbinsäure. Ursache hierfür sind zum Teil methodische Defizite bei der quantitativen Bestimmung der Komponenten, die aus der unzureichenden Berücksichtigung der Analytstabilität und unvollständigen Validierung der Analysenverfahren resultieren. Diese Arbeit verfolgt daher folgende Ziele:

- Entwicklung und Optimierung von HPLC/UV- und HPLC/EC-Verfahren zur Quantifizierung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma und mononukleären Leukozyten unter besonderer Berücksichtigung der Analyt-Stabilität
- Umfassende Validierung und Leistungsvergleich der Analysenverfahren
- Anwendung der validierten Analysenverfahren auf ausgewählte klinisch-chemische Problemstellungen

Das im Rahmen dieser Untersuchungen angewendete Analysenprinzip basiert auf der **direkten Bestimmung der L-Ascorbinsäure** und der **indirekten Bestimmung der Dehydro-L-ascorbinsäure** durch Differenzbildung zwischen der AA- und Gesamtascorbinsäure-Konzentration. Dabei erfolgt zur Bestimmung der Gesamtascorbinsäure-Konzentration die Reaktion des DHAA-Anteils zu L-Ascorbinsäure. Die systematische Optimierung aller Proben-vorbereitungsschritte führt zu dem in **Abb. 4.8** (s. S. 94) schematisch dargestellten Analysenablauf. Dabei wird durch den Zusatz einer 6 % (w/w) Perchlorsäure/2 % (w/w) Metaphosphorsäure-Mischung eine Stabilisierung der in den Proben enthaltenen L-Ascorbinsäure erreicht, so daß eine Lagerung der Proben über mindestens 9 h bei Temperaturen von 4 °C und 100 Tage bei -80 °C möglich ist. Zur quantitativen Bestimmung der AA- und Gesamtascorbinsäure-Konzentration hat sich die Reversed-Phase Chromatographie mit einem chromatographischen System bestehend aus einer RP-18 Trennsäule und einem Phosphat-Puffer pH 2,0 als optimal erwiesen. Die Detektion erfolgt mit

---

einem UV- (Detektionswellenlänge: 243 nm) oder EC-Detektor (Arbeitspotential: +0,85 V gegen Ag/AgCl, Glassy-Carbon Arbeitselektrode). Gegenüber literaturbekannten HPLC-Verfahren wird dadurch eine Vereinfachung der Zusammensetzung der mobilen Phase sowie eine Verkürzung der Analysendauer um zwei Drittel auf ca. 6 min bei gleichzeitig guter Wiederholbarkeit der chromatographischen Bestimmung und guter Trennleistung erreicht.

Zur laborinternen Qualitätskontrolle ist nach den „Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien“ nur die Bestimmung der Tag-zu-Tag-Präzision und Richtigkeit erforderlich. Bei der hier durchgeführten umfassenden **Validierung der optimierten HPLC/UV- und HPLC/EC-Verfahren** erfolgt zusätzlich die Bestimmung der Validierungselemente Linearer Bereich, Nachweis-/Bestimmungsgrenze, Meß-/Wiederholpräzision, Spezifität und Robustheit. Aufgrund der dabei erhaltenen Validierungsdaten (s. **Tab. 4.16**, S. 88) ist die zuverlässige Bestimmung der Blutplasma-AA-Konzentration im Rahmen von klinisch-chemischen Routineuntersuchungen möglich. Die Analysenergebnisse des HPLC/UV-Verfahrens zur direkten Bestimmung der AA-Konzentration entsprechen bezüglich der Richtigkeit und Tag-zu-Tag-Präzision den „Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien“. Für die Bestimmung der AA-Konzentration gilt, daß die Abweichungen der Analysenergebnisse vom Sollwert einer Kontroll-Probe nicht mehr als 20 % und die Tag-zu-Tag-Präzision der Analysenergebnisse maximal 6,5 % betragen dürfen. Ein direkter Vergleich der HPLC/UV- und HPLC/EC-Verfahren durch orthogonale Regressionsanalyse von 18 Parallelbestimmungen in Humanplasma zeigt, daß beide Verfahren gleichwertige Analysenergebnisse liefern. Bei dem HPLC/EC-Verfahren ist jedoch die Bestimmungsgrenze für L-Ascorbinsäure (1,1 pmol/Injektion) um den Faktor 20 niedriger als bei der HPLC mit UV-Detektion (23 pmol/Injektion). Dadurch kann das HPLC/EC-Verfahren vorzugsweise bei der Bestimmung der L-Ascorbinsäure im Konzentrationsbereich unter 1 mg/L bzw. bei kleinen Probemengen eingesetzt werden. Zur externen Qualitätskontrolle ist die Teilnahme an Ringversuchen geplant.

Den Validierungsergebnissen für die DHAA-Bestimmung kann entnommen werden, daß der DHAA-Anteil an der Gesamascorbinsäure-Konzentration mindestens 12 % bzw. 20 % betragen muß, um mit Hilfe der HPLC/EC bzw. HPLC/UV indirekt bestimmbar zu sein. Diese Werte entsprechen den in der Literatur angegebenen oberen Grenzwerten des Konzentrationsbereichs für den

---

DHAA-Anteil. Daher sind die entwickelten indirekten HPLC-Verfahren nicht zur Quantifizierung der im Blutplasma gesunder Menschen auftretenden DHAA-Konzentrationen geeignet. Aufgrund dieser Ergebnisse und der fehlenden Validierungsdaten bei literaturbekannten Verfahren sind die von anderen Autoren veröffentlichten Untersuchungsergebnisse als nicht zuverlässig anzusehen. Zur Bestimmung der DHAA-Konzentration sollten daher direkte Verfahren (z.B. Fluoreszenzdetektion nach Derivatisierung mit 1,2-Diaminobenzol oder HPLC/MS) eingesetzt werden. Der gegenüber indirekten Verfahren teilweise höhere Aufwand bei der Probenvorbereitung muß, wegen des geringeren Analysenfehlers und der dadurch bedingten niedrigeren Nachweis- und Bestimmungsgrenze bei direkten Verfahren, in Kauf genommen werden.

Die erarbeiteten Analysenbedingungen für die AA-Bestimmung in Humanplasma wurden auch erfolgreich auf die **Bestimmung der L-Ascorbinsäure-Konzentration in mononukleären Leukozyten** übertragen. Dabei wird durch den Einsatz von Vacutainer® CPT™-Blutentnahme-Röhrchen eine Vereinfachung der Zell-Isolierung gegenüber konventionellen Verfahren erzielt. Die Stabilisierung der in den Zell-Lysat-Proben enthaltenen L-Ascorbinsäure wird wie bei der Stabilisierung in Blutplasma-Proben mit 6 % (w/w) Perchlorsäure/ 2 % (w/w) Metaphosphorsäure erreicht. Zur Quantifizierung der L-Ascorbinsäure sind sowohl die HPLC/UV als auch die HPLC/EC einsetzbar.

Die **Anwendung der HPLC-Verfahren in der Routineanalytik** wird anhand verschiedener Beispiele aus dem Bereich der klinisch-chemischen Analytik demonstriert. Durch Bestimmung der AA-Konzentration in mononukleären Leukozyten und Blutplasma kann gezeigt werden, daß keine Korrelation zwischen diesen Parametern besteht. Damit können die von EVANS et al. [31] in früheren Untersuchungen mit weitaus weniger zuverlässigen Analyseverfahren (Photometrie) ermittelten Untersuchungsergebnisse bestätigt werden. Im Rahmen einer Studie zum Einfluß von Kurzzeitbelastungen auf die AA-Konzentration im Blutplasma, die in Zusammenarbeit mit dem „Sportmedizinische Institut“ der Universität-GH Paderborn durchgeführt wurde, sind keine signifikanten Veränderungen der Blutplasma-AA-Konzentration durch die auftretenden Belastungen nachweisbar. Durch weitere Untersuchungen sollte versucht werden, einen Grenzwert für die Dauer und Intensität einer Belastung zu ermitteln, bei dem es durch Aktivierung des antioxidativen Schutzsystems zu einer Änderung der Blutplasma-AA-Konzentration kommt. Damit wären

---

Aussagen über den bei körperlicher Belastung auftretenden Mehrbedarf an L-Ascorbinsäure möglich.

Insgesamt gesehen, ist mit den hier entwickelten, optimierten und validierten HPLC/UV und HPLC/EC-Verfahren eine zuverlässige, direkte Bestimmung der AA-Konzentration im Blutplasma und in den mononukleären Leukozyten möglich. Die genannten Verfahren sind jedoch nicht zur indirekten Bestimmung der Blutplasma-DHAA-Konzentration bei gesunden Probanden einsetzbar. Durch die umfassende Validierung wurden also die Ursachen für die widersprüchlichen Literaturangaben aufgedeckt und methodische Defizite behoben, so daß der im Vergleich zur klinisch-chemischen Routineanalytik betriebene hohe Aufwand für die Validierung der Analysenverfahren gerechtfertigt ist.

---

## 8 Experimenteller Teil

### 8.1 Verwendete Chemikalien

Die im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen eingesetzten Chemikalien sind im folgenden alphabetisch geordnet aufgeführt. Der Substanzgehalt der Chemikalien ist jeweils in Massenprozent angegeben.

Argon (4.6, Messer-Griesheim, Krefeld)  
Ascorbat-Oxidase (EC 1.10.3.3) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)  
L-(+)-Ascorbinsäure (p. a., 99,7 %, Merck, Darmstadt)  
Brom (reinst, >99 %, Merck, Darmstadt)  
L-(+)-Cystein (für die Biochemie, 99,5 %, Merck, Darmstadt)  
Dikaliumhydrogenphosphat-3-Hydrat (p. a., >99 %, Merck, Darmstadt)  
2,3-Dimercapto-1-propanol (purum, >97 %, Fluka, Buchs/CH)  
Dinatriumhydrogenphosphat (p. a., >99 %, Merck, Darmstadt)  
1,4-Dithiothreitol (für biochemische Zwecke, >99 %, Merck, Darmstadt)  
Helium (4.6, Messer-Griesheim, Krefeld)  
D,L-Homocystein (purum, >97 %, Fluka, Buchs/CH)  
D-Isoascorbinsäure (98 %, Sigma-Aldrich, Deisenhofen)  
Kaliumchlorid (p. a., Janssen Chimica, Beese/B)  
Kaliumdihydrogenphosphat (p. a., >99,5 %, Merck, Darmstadt)  
Metaphosphorsäure (p. a., 40-50 %, Merck, Darmstadt)  
Methanol (Prepsolv<sup>®</sup>, >99,8 %, Merck, Darmstadt)  
Natriumchlorid (p. a., 99,5 %, Merck, Darmstadt)  
Natriumdihydrogenphosphat-1-Hydrat (p. a., 99-102 %, Merck, Darmstadt)  
Orthophosphorsäure (p. a., 85 %, Merck, Darmstadt)  
Perchlorsäure (p. a., 60 %, Merck, Darmstadt)  
Rinderserum-Albumin (für biochemische Zwecke, >97 %, Merck, Darmstadt)  
Salpetersäure (p. a., 65 %, Merck, Darmstadt)  
5-Sulfosalicylsäure-2-Hydrat (p. a., 99-101 %, Merck, Darmstadt)  
Trichloressigsäure (p. a., 99,5 %, Merck, Darmstadt)  
Wasser (bidestilliert mit Destamat, Heraeus, Hanau)

---

## 8.2 L-Ascorbinsäure-Bestimmung mittels HPLC

### 8.2.1 Bestimmung von L-Ascorbinsäure mittels HPLC/UV

Zur Konzentrationsbestimmung von L-Ascorbinsäure mittels UV-Detektion wird eine aus folgenden Komponenten bestehende HPLC-Anlage eingesetzt. Alle Messungen werden ohne Thermostatisierung bei Raumtemperatur durchgeführt.

Pumpe: 655A-12 Liquid Chromatograph (Merck/Hitachi, Darmstadt)  
L-5000 LC Controller (Merck/Hitachi, Darmstadt)

Mobile Phase: 45 mmol/L Phosphat-Puffer, pH = 2,0  
Fluß: 1 mL/min

Probenaufgabe: Rheodyne 7125 (Rheodyne, Cotati, CA/USA)  
20 µL Probenschleife  
oder:  
655A-40 Autosampler (Merck/Hitachi, Darmstadt)  
mit Kühlung (Eigenbau) auf 2 °C bis 4 °C  
Injektionsvolumen: 20 µL

Analytische Säule: LiChroCART® 125 × 4 mm (Merck, Darmstadt)  
gefüllt mit LiChrospher® Si 100 RP 18, 5 µm  
(Merck, Darmstadt)

Detektor: 655A-22 Variable Wavelength UV Monitor  
(Merck/Hitachi, Darmstadt)  
Detektionswellenlänge: 243 nm

Auswertung: Gynkosoftware Chromatographie-Datensystem, Version 5.50  
(Gynkotek HPLC, Germering)  
Peakflächenmethode

Da die Verwendung eines Phosphat-Puffers mit pH 2 zur Hydrolyse der Octadecyl-Reste des RP-18 Packungsmaterials der Trennsäule führen kann, wird zwischen Pumpe und Probenaufgabesystem eine Sättigungssäule (LiChroCART® 125 × 4 mm gefüllt mit LiChrospher® Si 100 RP 18, 5 µm, Merck, Darmstadt) installiert.

---

### 8.2.2 Bestimmung von L-Ascorbinsäure mittels HPLC/EC

Die Bestimmung der L-Ascorbinsäure-Konzentration mittels elektrochemischer Detektion wird mit der folgenden Gerätekonfiguration durchgeführt.

Pumpe:	P 580 A (Gynkotec HPLC, Germering)
Degaser:	Degasys DG-1310 (Gynkotec HPLC, Germering)
Mobile Phase:	45 mmol/L Phosphat-Puffer, pH = 2,0 Fluß: 1 mL/min
Autosampler:	GINA 50 T (Gynkotec HPLC, Germering) Kühlung auf 5 °C Injektionsvolumen: 20 µL
Analytische Säule:	LiChroCART® 125 × 4 mm (Merck, Darmstadt) gefüllt mit LiChrospher® Si 100 RP 18, 5 µm (Merck, Darmstadt) thermostatisiert bei 30 °C
Detektor:	DECADE (Antec, Leyden/NL) VT-03 Zelle mit 50 µm Spacer, Glassy-Carbon-Arbeits Elektrode Arbeitspotential: +0.85 V gegen Ag/AgCl Arbeitsbereich: 5 µA, Filter: 0,5 s thermostatisiert bei 30 °C
Auswertung:	Gynkosoft Chromatographie-Datensystem, Version 5.50 (Gynkotec HPLC, Germering) Peakflächenmethode

Die HPLC-Anlage wird vor erstmaliger Durchführung der Analysen und anschließend nach jeweils ca. 1000 Bestimmungen, durch Spülen mit 15%iger (w/w) Salpetersäure, passiviert. Zur Verminderung der Hydrolyse von Octadecyl-Resten der stationären Phase der Trennsäule wird eine Sättigungs-säule, wie in **Kapitel 8.2.1** beschrieben, installiert.

---

### 8.2.3 Herstellung der mobilen Phase

Als mobile Phase wird ein 45 mmol/L Phosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 2,0 eingesetzt. Zur Herstellung des Puffers werden 1,38 g (10 mmol) Natrium-dihydrogenphosphat-1-Hydrat in 1000 mL bidest. Wasser gelöst und mit ca. 23 mL 14%iger (w/w) Orthophosphorsäure (ca. 35 mmol) auf pH 2,0 eingestellt. Die Pufferlösung wird anschließend zur Abtrennung fester Bestandteile durch einen 0,45 µm Filter (Typ HA, Millipore, Bedford, MA/USA) filtriert. Um die Bildung mikrobieller Verunreinigungen zu verhindern, wird die mobile Phase täglich neu angesetzt. Bei Messungen mit UV-Detektion erfolgt das Entgasen durch zehnmütiges Einleiten von Helium; in Falle der EC-Detektion wird mit einem Online-Entgasungsgeräte gearbeitet, um stets eine optimal entgaste mobile Phase zu erhalten.

Zur Bestimmung des pH-Wertes wird ein Digital-pH-Meter 646 der Firma Knick unter Verwendung einer Einstabmeßkette N 61 (Schott, Mainz) eingesetzt. Das pH-Meter wird täglich mit gebrauchsfertigen Pufferlösungen pH 7,0 und 2,0 (Merck, Darmstadt) kalibriert. Alle Lösungen werden während der Messung gerührt.

### 8.2.4 Herstellung der Kalibrierlösungen

Aufgrund der Instabilität wäßriger L-Ascorbinsäure-Lösungen werden die Kalibrierlösungen täglich frisch angesetzt. Dabei wird zur Stabilisierung der L-Ascorbinsäure eine Säure-Mischung, die 3 % (w/w) Perchlorsäure und 1 % (w/w) Metaphosphorsäure enthält, eingesetzt. Zur Herstellung dieser Säure-Mischung werden 7,5 g Metaphosphorsäure (40-50 % (w/w)) mit 3%iger (w/w) Perchlorsäure zu 300 g ergänzt. Die zur Kalibrierung benötigten Lösungen werden anschließend durch Auflösen der entsprechenden Mengen an L-Ascorbinsäure in der Säure-Mischung erhalten.

---

### 8.3 Hämatologische Untersuchungen

Zur Bestimmung der Blutbilder erfolgt die Entnahme einer Blutprobe mit EDTA als Antikoagulans. Dabei werden Blutentnahme-Röhrchen vom Typ Monoject® (5 mL, 7,2 mg EDTA(K<sub>3</sub>), Sherwood, Ballymoney/GB) eingesetzt. Anschließend werden die Blutproben mit einem Auto Dilutor AD 241 (TOA Medical Electronics, Kobe/J) verdünnt. Die Bestimmung der Blutbilder erfolgt mit Hilfe eines halbautomatischen hämatologischen Meßgerätes Sysmex™ CC-180 (TOA Medical Electronics, Kobe/J). Bei allen Arbeitsschritten wird stets nach den vom Gerätehersteller angegebenen Vorschriften gearbeitet. Das hämatologische Meßgerät erlaubt die Bestimmung folgender Parameter:

- Anzahl der Leukozyten
- Anzahl der Erythrozyten
- Anzahl der Thrombozyten
- Hämatokrit-Wert
- Hämoglobin-Konzentration
- Hämoglobin-Gehalt eines einzelnen Erythrozyten
- mittleres Erythrozyteneinzelvolumen
- mittlere Hämoglobin-Konzentration des Einzelerthrozyten

### 8.4 Methodenentwicklung

#### 8.4.1 Optimierung der Detektionsbedingungen

##### Aufnahme von UV-Absorptionsspektren

Zur Charakterisierung der UV-Absorptionseigenschaften von L-Ascorbinsäure und der mobilen Phase (45 mmol/L Phosphat-Puffer pH 2,0; Herstellung s. **Kapitel 8.2.3**) werden mit Hilfe eines UV/VIS-Spektralphotometers (Lambda 15, Perkin-Elmer, Überlingen) das UV/VIS-Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich 190 nm bis 300 nm aufgenommen und mit Hilfe der PECSS Software (Perkin-Elmer, Überlingen) ausgewertet. Die eingesetzte L-Ascorbinsäure-Lösung hat eine Konzentration von 17,6 mg/L (0,1 mmol/L) und wird gegen den Phosphat-Puffer vermessen. Das UV-Absorptionsspektrum des Phosphat-Puffers wird mit bidest. Wasser als Vergleich aufgenommen.

---

### Optimierung der EC-Detektion

Die Optimierung der EC-Detektion erfolgt bezüglich des Materials der Arbeitselektrode und des Arbeitspotentials. Als **Arbeitselektroden** werden eine Glassy Carbon- und eine Gold-Elektrode (Antec, Leyden/NL) erprobt. Es wird jeweils eine 1 mg/L (5,7 mmol/L) L-Ascorbinsäure-Lösung in 3 % (w/w) Perchlorsäure/1 % (w/w) Metaphosphorsäure bei einem Arbeitspotential von +0,6 V und +0,9 V gegen Ag/AgCl vermessen.

Zur Bestimmung des optimalen **Arbeitspotentials** wird dieses zwischen +0,4 V und +1,0 V in 0,1 V bzw. 0,05 V Schritten variiert und eine 1 mg/L (5,7 mmol/L) L-Ascorbinsäure-Lösung injiziert. Im Anschluß an eine Potentialänderung wird jeweils 30 min bis zur Konstanz des Grundstromes abgewartet.

#### 8.4.2 Optimierung der Probenvorbereitung zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Humanplasma

Die **Blutentnahme** erfolgt ausschließlich durch Ärzte des „Sportmedizinischen Instituts“ der Universität-Gesamthochschule Paderborn. Dabei wird den Probanden Blut aus der gestauten Vene des Unterarmes entnommen. Bei den Probanden handelt es sich um Männer und Frauen im Alter von 22 bis 56 Jahren, die nach eigenen Angaben an keinen früheren oder akuten Lebererkrankungen sowie sonstigen Erkrankungen leiden. Es wird nicht zwischen Rauchern und Nichtrauchern differenziert. Zur Entnahme der Blutproben dient ein Blutentnahme-Set bestehend aus dem Micro-FLO<sup>®</sup> Infusions- und Transfusions-Set (Kanüle: 21G, Durchmesser: 0,8 mm, LDKS OVERSAN, Mailand/I), Vacutainer<sup>®</sup> Brand Luer Adapter (Becton/Dickinson, Meylan Cedex/F) und Blutentnahme-Röhrchen vom Typ Monoject<sup>™</sup> (Sherwood, Ballymoney/GB). Es werden Blutentnahme-Röhrchen mit einem Fassungsvermögen von 5 mL bzw. 10 mL eingesetzt, die jeweils 143 USP Lithium-Heparin als Antikoagulans enthalten. Nach der Blutentnahme wird der Inhalt der Röhrchen durch Schwenken durchmischt und die Blutproben bis zur weiteren Aufarbeitung in Eiswasser (0 °C) gelagert. Aufgrund der geringen Stabilität von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure, wird die weitere Probenaufarbeitung stets so schnell wie möglich durchgeführt.

Die **Gewinnung des Blutplasmas** erfolgt durch fünfminütiges Zentrifugieren der Monoject<sup>™</sup> Blutentnahme-Röhrchen bei 1700 g und 4 °C (Kühlzentrifuge: Rotanda/R, Hettich, Tuttlingen).

Zur **Optimierung der Proteinabtrennung** werden die Ultrafiltration und Proteinfällung durch Reagenzienzusatz erprobt. In den Plasmaproben und den erhaltenen Meßproben wird die AA-Konzentration, wie in der Standardarbeitsanweisung im **Anhang** beschrieben, bestimmt. Die Effektivität der Proteinabtrennung erfolgt durch Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Methode von BRADFORD [105].

Bei der **Proteinbestimmung nach BRADFORD** [105] wird eine kommerziell erhältliche Lösung des Farbstoffes Coomasie Brilliant Blue-G250 (Roti<sup>®</sup>-Quant, Roth, Karlsruhe) eingesetzt, die vor Gebrauch im Verhältnis 1 + 4 (200 mL Roti<sup>®</sup>-Quant Lösung + 800 mL bidest. Wasser) verdünnt wird. Zur Konzentrationsbestimmung wird ein UV/VIS-Spektralphotometer vom Typ Lambda 11 (Perkin-Elmer, Überlingen) bei einer Wellenlänge von 595 nm eingesetzt. Die Kalibrierung erfolgt mit Hilfe von Rinderserum-Albumin-Lösungen (0,1 mg/L; 0,2 mg/L; 0,4 mg/L; 0,6 mg/L; 0,8 mg/L und 1,0 mg/L Rinderserum-Albumin in bidest. Wasser). Es werden jeweils 5 mL der verdünnten Farbstofflösung mit 100 µL Probenlösung versetzt und nach intensivem Schütteln sowie 15 min Reaktionsdauer gegen einen Blindwert aus 5 mL verdünnter Farbstofflösung und 100 µL bidest. Wasser vermessen. Proben, deren Proteingehalt außerhalb des Kalibrierbereiches liegen, werden entsprechend mit bidest. Wasser verdünnt. Aufgrund der unterschiedlichen Affinität von Coomasie Brilliant Blue-G250 zu verschiedenen Proteinen erlaubt dieser Test nur vergleichende Bestimmungen bezüglich des zur Kalibrierung eingesetzten Rinderserum-Albumins [106, 107].

Im Rahmen der Erprobung der **Ultrafiltration** zur Proteinabtrennung, werden Molekulargewicht-Ausschluß-Filter vom Typ Centrisart<sup>®</sup> I (Sartorius, Göttingen) mit Ausschlußgrößen von 5 kD, 10 kD, 20 kD und 100 kD eingesetzt. Die Filter werden mit 1 mL Blutplasma gefüllt und 5 min bei 1000g und anschließend 20 min bei 2000 g und 4 °C zentrifugiert (Kühlzentrifuge: 3K-2, Sigma, Osterode).

Zur Optimierung der **Proteinabtrennung durch Ausfällen** werden die in **Tab. 8.1** aufgeführten Fällungsreagenzien erprobt. Nach Zusatz der Reagenzien werden die Mischungen intensiv geschüttelt und der käsige-weiße Niederschlag durch zehnmütiges Zentrifugieren bei 3000 g und 4 °C (Kühlzentrifuge: Rotanda/R, Hettich, Tuttlingen) abgetrennt.

---

**Tab. 8.1:** Erprobte Fällungsreagenzien zur Abtrennung der Blutplasma-Proteine

<b>Fällungsreagenz, Gehalt (w/w)</b>	<b>Volumenverhältnisse [µL] Fällungsreagenz + Blutplasma</b>
Methanol	500 + 1000
57 % Sulfosalicylsäure	930 + 70
10 % Trichloressigsäure	500 + 500
10 % Metaphosphorsäure	500 + 500
6 % Perchlorsäure	500 + 500
6 % Perchlorsäure/2 % Metaphosphorsäure	500 + 500

### Untersuchungen zur Stabilität von L-Ascorbinsäure

Die **Bestimmung der Kurzzeitstabilität von L-Ascorbinsäure in Meßproben** erfolgt im Hinblick auf die Verwendung von 6 % (w/w) Perchlorsäure bzw. 6 % (w/w) Perchlorsäure/2 % (w/w) Metaphosphorsäure als Proteinfällungs- und Stabilisierungsreagenz. Dazu werden in jeweils zehn 0,5 mL Blutplasma-Proben die Proteine durch Zugabe der entsprechenden Reagenzien abgetrennt und die so erhaltenen klaren Lösungen in Proben-Gläschen (11 × 32 mm, 8002-CV-H/i3µ, Glastechnik Gräfenroda, Gräfenroda) abgefüllt. Diese werden bis zur Bestimmung der AA-Konzentration mittels HPLC/UV (s. **Kapitel 8.2.1**) bei einer Temperatur von 2 °C bis 5 °C aufbewahrt. Bei den mit Perchlorsäure versetzten Proben wird die AA-Konzentration im Abstand von 6 min über einen Zeitraum von einer Stunde bestimmt; bei den mit der Säuremischung versetzten Proben im Abstand von 1,5 h über 9 h.

Zur **Bestimmung der Langzeitstabilität von L-Ascorbinsäure in Meßproben** werden in jeweils sieben Blutplasma-Proben zu je 0,5 mL die Proteine durch Ausfällen mit 6 % (w/w) Perchlorsäure/2 % (w/w) Metaphosphorsäure abgetrennt. Die erhaltenen Lösungen werden in 1,5 mL Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) bei -80 °C gelagert und vor der Bestimmung der AA-Konzentration mittels HPLC/UV (s. **Kapitel 8.2.1**) bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Gehaltsbestimmungen erfolgen zu Beginn und 5 d, 6 d, 12 d, 19 d, 49 d sowie 112 d nach Beginn der Versuchsreihe.

Die **Heparin-Plasma-Proben** werden in Volumina zu je 0,5 mL in PP-Probenröhrchen mit einem Fassungsvermögen von 4 mL (Sarstedt, Nümbrecht) bei -80 °C gelagert und nach 2 d, 7 d, 37 d und 100 d bei Raumtemperatur

aufgetaut. Zur Abtrennung der Proteine werden die Plasma-Proben mit 0,5 mL 6 % (w/w) Perchlorsäure/2 % (w/w) Metaphosphorsäure versetzt und die AA-Konzentration mittels HPLC/UV (s. **Kapitel 8.2.1**) bestimmt.

Für die Untersuchungen zur **Stabilität der L-Ascorbinsäure in Kalibrierlösungen** wird eine Konzentrationsreihe mit 0,1 mg/L; 0,5 mg/L; 1,0 mg/L; 5,0 mg/L; 10 mg/L und 20 mg/L L-Ascorbinsäure angesetzt. Diese werden durch Verdünnen einer 1000 mg/L L-Ascorbinsäure-Stammlösung mit 3 % (w/w) Perchlorsäure/1 % (w/w) Metaphosphorsäure hergestellt. Die Proben werden in Probengläschen bei 5 °C gelagert und die L-Ascorbinsäure-Konzentration wird in Abständen von 1,5 h über einen Zeitraum von 30 h mittels HPLC/EC (s. **Kapitel 8.2.2**) bestimmt.

### 8.4.3 Optimierung der Bestimmung von Dehydro-L-ascorbinsäure

#### Darstellung von Dehydro-L-ascorbinsäure-Lösungen

Aufgrund der hohen Instabilität der Dehydro-L-ascorbinsäure in wäßrigen Lösungen werden diese stets unmittelbar vor Versuchsdurchführung angesetzt. Dazu wird die entsprechende Menge an L-Ascorbinsäure in bidest. Wasser gelöst und solange gesättigtes Brom-Wasser zugetropft, bis die gelbliche Farbe erhalten bleibt. Anschließend wird durch Einleiten von Argon das überschüssige Brom ausgetrieben, so daß die Lösung wieder farblos wird. Die erhaltene DHAA-Lösung wird im Meßkolben bis zur Kalibriermarke aufgefüllt und der genaue Gehalt an Dehydro-L-ascorbinsäure nach Reduktion zu L-Ascorbinsäure mit Hilfe der HPLC/UV (**Kapitel 8.2.1.**) bestimmt.

#### Auswahl eines geeigneten Reduktionsmittels zur Reduktion von Dehydro-L-ascorbinsäure

Um zu Erproben, welches Reduktionsmittel am besten für die Reduktion von Dehydro-L-ascorbinsäure geeignet ist, werden die in **Tab. 8.2** aufgeführten Reduktionsmittel überprüft. Die eingesetzten Lösungen werden aus der entsprechenden Menge an Reinsubstanz gelöst in bidest. Wasser und Einstellen eines pH-Wertes von 7 bis 7,5 mittels 1 mol/L Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung hergestellt.

---

**Tab. 8.2:** Zur Reduktion von Dehydro-L-ascorbinsäure eingesetzte Reagenzien

<b>Reduktionsmittel</b>	<b>Stoffmengen- Konzentration [mmol/L]</b>	<b>Massen- Konzentration [g/L]</b>
L-Cystein	8,4	1,02
D,L-Homocystein	8,4	1,14
2,3-Dimercapto-1-propanol	8,4	1,04
Dithiothreitol	8,4	1,48

Zur Reduktion der Dehydro-L-ascorbinsäure werden jeweils 0,5 mL einer 5 mg/L (28  $\mu$ mol/L) DHAA-Lösung mit 0,1 mL einer Lösung des jeweiligen Reduktionsmittels versetzt (50-facher molarer Überschuß des Reduktionsmittels). Nach 10 min Reaktionsdauer bei Raumtemperatur wird zur Stabilisierung der gebildeten L-Ascorbinsäure 0,6 mL der 6 % (w/w) Perchlorsäure/2 % (w/w) Metaphosphorsäure-Mischung zugesetzt und die AA-Konzentration mittels HPLC/UV (s. **Kapitel 8.2.1**) bestimmt.

#### **Zeitlicher Verlauf der Reduktion von Dehydro-L-ascorbinsäure mit Dithiothreitol**

Um den zeitlichen Verlauf der Reduktion von Dehydro-L-ascorbinsäure mit Dithiothreitol zu ermitteln, werden 0,5 mL einer DHAA-Lösung ( $\beta$ (DHAA) ca. 10 mg/L) mit 0,1 mL einer Dithiothreitol-Lösung ( $\beta$ (DTT) = 1,45 g/L) versetzt. Im Abstand von 1 min; 5 min; 10 min; 20 min; 30 min; 60 min; 150 min und 300 min wird zur Stabilisierung der gebildeten L-Ascorbinsäure 0,6 mL der 6 % (w/w) Perchlorsäure/2 % (w/w) Metaphosphorsäure-Mischung zugesetzt und die AA-Konzentration der Proben mittels HPLC/UV (s. **Kapitel 8.2.1**) bestimmt.

#### **Überprüfung der Vollständigkeit der Reduktion von Dehydro-L-ascorbinsäure mit Dithiothreitol**

Die Überprüfung der Vollständigkeit der Reduktion von Dehydro-L-ascorbinsäure mit Dithiothreitol erfolgt anhand von wäßrigen Lösungen mit 5,0 mg/L; 2,5 mg/L und 1,25 mg/L Dehydro-L-ascorbinsäure. Zur Reduktion der Dehydro-L-ascorbinsäure werden jeweils 0,5 mL der genannten Lösungen mit 0,1 mL einer 1,45 g/L Dithiothreitol-Lösung versetzt. Nach einer Reaktionsdauer von 10 min werden zur Stabilisierung der gebildeten L-Ascorbinsäure 0,6 mL der 6 % (w/w) Perchlorsäure/2 % (w/w) Metaphosphorsäure-Mischung zugesetzt

und die AA-Konzentration mittels HPLC/UV (s. **Kapitel 8.2.1**) bestimmt. Um die Wiederholbarkeit der Reduktion zu demonstrieren, werden bei jeder Konzentration zehn Versuche durchgeführt.

### **Reduktion des Dehydro-L-ascorbinsäure-Anteils in Gegenwart von L-Ascorbinsäure**

Zur Durchführung der Untersuchungen werden Probelösungen mit einem relativen DHAA-Anteil von 16 % (w/w) und 33 % (w/w) an der Gesamtascorbinsäure-Konzentration eingesetzt. Die Probelösung mit einem DHAA-Anteil von 16 % (w/w) wird erhalten, indem 10 mL einer wässrigen AA-Lösung ( $\beta(\text{AA}) = 10 \text{ mg/L}$ ) mit 1 mL einer wässrigen DHAA-Lösung ( $\beta(\text{DHAA}) = 20 \text{ mg/L}$ ) im 20 mL Meßkolben bis zur Kalibriermarke aufgefüllt werden. Desgleichen wird eine Probelösung mit einem DHAA-Anteil von 33 % (w/w) an der Gesamtascorbinsäure-Konzentration erhalten, indem 10 mL einer wässrigen AA-Lösung ( $\beta(\text{AA}) = 10 \text{ mg/L}$ ) mit 5 mL einer wässrigen DHAA-Lösung ( $\beta(\text{DHAA}) = 10 \text{ mg/L}$ ) im 20 mL Meßkolben bis zur Kalibriermarke aufgefüllt werden. Zur Reduktion des DHAA-Anteils werden 0,5 mL Probenlösungen mit 0,1 mL Dithiothreitol-Lösung ( $\beta(\text{DTT}) = 1,45 \text{ g/L}$ ) versetzt. Nach einer Reaktionsdauer von 10 min werden zur Stabilisierung der gebildeten L-Ascorbinsäure 0,6 mL der 6 % (w/w) Perchlorsäure/2 % (w/w) Metaphosphorsäure-Mischung zugesetzt und die AA-Konzentration mittels HPLC/UV (s. **Kapitel 8.2.1**) bestimmt. Um die Wiederholbarkeit der Versuchsergebnisse zu überprüfen, werden jeweils acht Proben untersucht.

## **8.5 Validierung des HPLC/UV-Verfahrens zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Humanplasma**

Bei allen in diesem Abschnitt beschriebenen Untersuchungen erfolgt die Bestimmung der AA-Konzentration mit Hilfe der in **Kapitel 8.2.1** beschriebenen HPLC-Anlage mit UV-Detektor.

---

### 8.5.1 Linearer Bereich

#### Überprüfung der Kalibrierfunktion

Die Überprüfung des funktionalen Zusammenhanges zwischen Meßsignal und L-Ascorbinsäure-Konzentration erfolgt durch jeweils zehnfache Injektion von wäßrigen AA-Lösungen mit Konzentrationen von 0,2 mg/L; 0,5 mg/L; 1,0 mg/L; 2,0 mg/L; 5,0 mg/L; 10 mg/L und 20 mg/L L-Ascorbinsäure. Die Konzentrationsreihe wird durch Verdünnen einer 1000 mg/L AA-Lösung in 3 % (w/w) Perchlorsäure/1 % (w/w) Metaphosphorsäure mit der Säuremischung hergestellt.

#### Linearer Bereich des Analysenverfahrens bei Realproben

Die Überprüfung des linearen Bereiches des Analysenverfahrens bei Realproben erfolgt durch jeweils zehnfache Injektion von aufgestockten Proben mit Blutplasma-Matrix. Diese werden aus 900 µL „L-Ascorbinsäure-freier“ Probenlösung und 100 µL einer AA-Lösung hergestellt.

Als AA-Lösungen werden Lösungen mit 2 mg/L; 24 mg/L; 46 mg/L; 68 mg/L; 90 mg/L; 112 mg/L; 134 mg/L; 156 mg/L; 178 mg/L und 200 mg/L L-Ascorbinsäure in 3 % (w/w) Perchlorsäure/1 % (w/w) Metaphosphorsäure angesetzt.

Die „L-Ascorbinsäure-freie“ Probenlösung wird durch Umsetzung der nativen L-Ascorbinsäure mit Ascorbat-Oxidase (EC 1.10.3.3) erhalten. Dazu wird das Enzym (250 U) in 5 mL Phosphat-Puffer pH = 5,6 gelöst. Die Pufferlösung besteht aus 95 mL Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung ( $c = 67 \text{ mmol/L}$ ) die mit ca. 5 mL Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung ( $c = 67 \text{ mmol/L}$ ) auf pH 5,6 eingestellt wird. Zur Umsetzung der L-Ascorbinsäure mit der Ascorbat-Oxidase werden 0,5 mL Blutplasma mit 0,1 mL der Enzym-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend werden die Plasmaproteine sowie das Enzym durch Zusatz von 0,6 mL 6 % (w/w) Perchlorsäure/2 % (w/w) Metaphosphorsäure ausgefällt.

---

### 8.5.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die **Nachweisgrenze** des HPLC/UV-Verfahrens wird nach IUPAC [115] als AA-Konzentration bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von 2 : 1 bestimmt. Das Rauschen wurde in 20 Chromatogrammen von Realproben einer Meßserie (Blutplasma-Matrix, Probenvorbereitung s. Standardarbeitsanweisung im **Anhang**) bestimmt.

Zur Ermittlung der **Bestimmungsgrenze** nach EURACHEM/D [120] werden die Proben einer Konzentrationsreihe mit 0,2 mg/L; 0,35 mg/L; 0,5 mg/L; 1 mg/L; 2 mg/L; 3,5 mg/L; 5 mg/L und 10 mg/L L-Ascorbinsäure in einer Blutplasma-Matrix (Herstellung s. **Kapitel 8.5.1**) eingesetzt. Jede Probe wird zehnfach in das HPLC-System injiziert und der Peakflächenwert ermittelt.

### 8.5.3 Präzision

Bei der Bestimmung der **Meßpräzision** werden die Blutproben von sechs Probanden wie in der Standardarbeitsanweisung im **Anhang** beschrieben aufgearbeitet und jeweils zehnmal zur Bestimmung der AA-Konzentration injiziert.

Zur Bestimmung der **Wiederholpräzision** wird zwölf Probanden Blut abgenommen, welches nach der Gewinnung des Plasmas in zehn Proben zu 500 µL aufgeteilt und wie in der Standardarbeitsanweisung im **Anhang** erläutert, weiter aufgearbeitet wird. Jede Analysenprobe wird zur Bestimmung der AA-Konzentration als Einfachbestimmung vermessen.

### 8.5.4 Richtigkeit

Zur Kontrolle der Richtigkeit des entwickelten Analysenverfahrens werden käuflich zu erwerbende lyophilisierte Humanplasma-Kontrollproben (Immunodiagnostik GmbH, Bensheim) mit 250 µL bidest. Wasser rekonstituiert (20 min bei Raumtemperatur). Anschließend werden die Kontrollen, wie in der Standardarbeitsanweisung im **Anhang** beschrieben, weiter aufgearbeitet und die AA-Konzentration bestimmt.

---

### 8.5.5 Wiederfindung für L-Ascorbinsäure

Im Rahmen der Wiederfindungsstudien wird die Wiederfindung für L-Ascorbinsäure durch Aufstocken von Vollblut bestimmt. Zur Verhinderung der Hämolyse werden die 60 mg/L, 90 mg/L und 120 mg/L AA-Aufstocklösungen in isotonischer Kochsalz-Lösung (0,9 % (w/w) NaCl) angesetzt. Die Bestimmung der genauen AA-Konzentration erfolgt mittels HPLC/UV (s. **Kapitel 8.2.1**). Bei den Aufstockversuchen werden zu jeweils 1 mL Vollblut 0,1 mL der Aufstocklösung pipettiert und durch vorsichtiges Schwenken vermischt. Da bei der Bestimmung der Wiederfindung auch die Volumenanteile der festen Blutkompartimente berücksichtigt werden müssen, ist zusätzlich die Bestimmung des Hämatokrit-Wertes (s. **Kapitel 8.3**) notwendig. Die weitere Probenvorbereitung erfolgt wie in der Standardarbeitsanweisung im **Anhang** beschrieben. Zur Überprüfung der Wiederholbarkeit werden mit jeder Aufstocklösung zehn Versuche durchgeführt.

### 8.5.6 Spezifität

Die Prüfung auf Spezifität des Analysenverfahrens erfolgt im Falle der UV-Detektion durch Vergleich der UV-Spektren, die aus den mit Hilfe eines Dioden-Array-Detektors (UVD 320 S, Gynkotek HPLC, Germering) aufgenommenen Chromatogrammen einer Realprobe (Probenvorbereitung s. Standardarbeitsanweisung, **Anhang**) und einer Kalibrierlösung (Herstellung s. **Kapitel 8.2.4**) erhaltenen werden.

Des Weiteren wird die Spezifität des Verfahrens durch Peaklöschung nach Behandlung der Heparin-Plasma-Probe mit Ascorbat-Oxidase (EC 1.10.3.3) überprüft. Dazu werden 500 µL einer Blutplasma-Probe mit 100 µL Ascorbat-Oxidase-Lösung (s. **Kapitel 8.5.1**) versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend erfolgt die weitere Aufarbeitung der Probe und die chromatographische Bestimmung wie in der Standardarbeitsanweisung im **Anhang** beschrieben.

Zur Überprüfung der Störungen durch D-Isoascorbinsäure wird eine Lösung mit 6 mg/L (34 mmol/L) D-Isoascorbinsäure in 3 % (w/w) Perchlorsäure/1 % (w/w) Metaphosphorsäure eingesetzt und in das HPLC-System injiziert.

---

## 8.5.6 Robustheit

### Einfluß des Packungsmaterials der Trennsäule

Bei der Überprüfung der Retentionseigenschaften von L-Ascorbinsäure in Abhängigkeit des Packungsmaterials der Trennsäulen, werden neben dem in **Kapitel 8.3.1** beschriebenen Packungsmaterial folgende Packungsmaterialien eingesetzt:

- (1) LiChroCART<sup>®</sup>-Kartusche 125 × 3 mm (Merck, Darmstadt) gefüllt mit Purospher<sup>®</sup> RP 18 endcapped, 5 µm (Merck, Darmstadt)

Bei Verwendung dieser Trennsäule wird der Fluß der mobilen Phase auf 0,5 mL/min reduziert. Damit wird eine vergleichbare lineare Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase in den Trennsäulen mit ID 3 mm und ID 4 mm gewährleistet.

- (2) ChromCart<sup>®</sup>-Kartusche 125 × 4 mm (Macherey & Nagel, Düren) gefüllt mit Nucleosil<sup>®</sup> 100 - 5 C<sub>18</sub> (Macherey & Nagel, Düren)
- (3) Vorsäule: LiChroCART<sup>®</sup>-Kartusche 4 × 4 mm (Merck, Darmstadt) gefüllt mit LiChrospher<sup>®</sup> Si 100 RP 18, 5 µm (Merck, Darmstadt)

Zur Bestimmung der Retentionszeit von L-Ascorbinsäure wird eine 5 mg/L (28,4 mmol/L) AA-Lösung in 3 % (w/w) Perchlorsäure/1 % (w/w) Metaphosphorsäure jeweils zehnfach injiziert.

### Einfluß des pH-Wertes der mobilen Phase

Um den Einfluß der mobilen Phase auf das Retentionsverhalten und die quantitative Bestimmung der L-Ascorbinsäure zu überprüfen wird im Vergleich zu dem 45 mmol/L Phosphat-Puffer pH 2 (Herstellung s. **Kapitel 8.2.3**) ein 20 mmol/L Phosphat-Puffer mit pH 2,4 eingesetzt. Dieser wird wie folgt hergestellt:

In einem 250 mL Becherglas werden 1,38 g (10 mmol) Natriumdihydrogenphosphat-1-Hydrat in ca. 100 mL bidest. Wasser gelöst und mit Orthophosphorsäure auf pH 2,0 eingestellt. Anschließend wird die Pufferlösung in einen 1000 mL Meßkolben überführt und mit bidest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Zur Abtrennung fester Verunreinigungen wird die mobile Phase durch einen 0,45 µm Filter (Typ HA, Millipore, Bedford, MA/USA) filtriert. Weiterhin wird die Pufferlösung vor dem Einsatz durch zehnmütiges Einleiten von Helium entgast.

## 8.6 Validierung des HPLC/UV-Verfahrens zur indirekten Bestimmung von Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma

### 8.6.1 Ermittlung der Analysenpräzision bei der Bestimmung der Dehydro-L-ascorbinsäure-Konzentration in synthetischen Proben

Die experimentelle Überprüfung der berechneten Analysenpräzision bei der Bestimmung der DHAA-Konzentration erfolgt anhand von synthetischen Proben mit unterschiedlichem DHAA-Anteilen an der Gesamtascorbinsäure-Konzentration (s. **Tab. 8.3**). Der genaue Gehalt der AA- und DHAA-Lösungen wird mittels UV-Detektion bestimmt. Zur Reduktion des DHAA-Anteils in den Proben werden 500  $\mu\text{L}$  der Probenlösung mit 100  $\mu\text{L}$  Dithiothreitol-Lösung ( $\beta(\text{DTT}) = 1,48 \text{ g/L}$ ) versetzt und nach 10 min Reaktionsdauer die Gesamtascorbinsäure-Konzentration mittels HPLC/UV bestimmt. Um die Wiederholbarkeit der Versuche zu zeigen, werden für jede Probe zehn Bestimmungen durchgeführt.

**Tab. 8.3:** Konzentration an L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in den eingesetzten, synthetischen Proben

AA-Konzentration [mg/L]	DHAA-Konzentration [mg/L]	AA + DHAA-Konzentration [mg/L]	DHAA-Anteil an der Gesamtascorbinsäure-Konzentration [%]
5,0	0,5	5,5	9,1
5,0	1,0	6,0	16,7
5,0	1,5	6,5	23,1
5,0	2,5	7,5	33,3
5,0	5,0	10,0	50,0

### 8.6.2 Wiederfindung von Dehydro-L-ascorbinsäure aus Heparin-Plasma

Bei der Bestimmung der Wiederfindung von Dehydro-L-ascorbinsäure aus Heparin-Plasma wird zu 500  $\mu\text{L}$  Blutplasma jeweils 100  $\mu\text{L}$  einer 1,48 g/L Dithiothreitol-Lösung und anschließend 100  $\mu\text{L}$  einer ca. 35 mg/L DHAA-Lösung gegeben. Nach 10 min Reaktionsdauer werden die Plasma-Proteine mit 6 % (w/w) Perchlorsäure/1 % (w/w) Metaphosphorsäure ausgefällt. Die Wiederholbarkeit der Messungen wird anhand von neun verschiedenen Heparin-Plasma-Proben bestimmt.

## 8.7 Validierung des HPLC/EC-Verfahrens zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma

Die Versuchsdurchführung bei der Validierung des HPLC/EC-Verfahrens zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma entspricht bis auf folgende Ausnahme, der Versuchsdurchführung bei der Validierung des HPLC/UV-Verfahrens (s. **Kapitel 8.5** und **Kapitel 8.6**).

Bei der Ermittlung des linearen Bereiches sowie der Nachweis- und Bestimmungsgrenze des Analysenverfahrens erfolgt die Gewinnung des „L-Ascorbinsäure-freien“ Blutplasmas durch Erwärmen der Plasmaprobe (ca. 8 mL) in einem Wasserbad (55 °C) für 5 h. Danach wird die Plasmaprobe in sechs Aliquote zu je 1 mL aufgeteilt und mit jeweils 0,1 mL verschiedener AA-Lösungen (0,011 mg/L; 0,055 mg/L, 0,11 mg/L; 0,55 mg/L, 1,1 mg/L; 5,5 mg/L; 11,0 mg/L; 55,0 mg/L; 110 mg/L) versetzt. Anschließend werden durch Zugabe von 6 % (w/w) Perchlorsäure/2 % (w/w) Metaphosphorsäure die Proteine ausgefällt und die AA-Konzentration mittels HPLC/EC (s. **Kapitel 8.2.2**) bestimmt.

## 8.8 Vergleich der HPLC/UV- und HPLC/EC-Verfahren anhand einer orthogonalen Regressionsanalyse

Zum Vergleich der beiden Detektionsarten werden die Blutplasma-Proben von 18 Probanden wie in der Standardarbeitsanweisung im **Anhang** beschrieben aufgearbeitet und anschließend die AA-Konzentration mittels HPLC/UV (s. **Kapitel 8.2.1**) sowie HPLC/EC (s. **Kapitel 8.2.2**) bestimmt.

## 8.9 Bestimmung von L-Ascorbinsäure in mononukleären Leukozyten

### 8.9.1 Probenvorbereitung

Die **Entnahme der Blutproben** erfolgt aus der gestauten Unterarmvene mit Hilfe eines Blutentnahme-Sets und Vacutainer<sup>®</sup> CPT<sup>™</sup>-Röhrchen (Becton/Dickinson, Franklin Lakes, NY/USA). Um einer Beschädigung der mononukleären Leukozyten bei der Blutentnahme vorzubeugen, erfolgt diese mittels Kanülen (Venofix<sup>®</sup>, 19 G/1,1 × 20 mm mit flexiblem Entnahmeschlauch und Luer-Ansatzstück, B. Braun, Melsungen) die einen größeren Innendurchmesser

---

aufweisen, als die bei der Entnahme von Blutproben zur Plasmagewinnung verwendeten Kanülen (vergl. **Kapitel 8.4.2**). Die Blutproben werden nach der Entnahme durch Umschwenken der Röhrchen homogenisiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

Die **Isolierung der mononukleären Leukozyten** erfolgt durch Dichtegradienten-Zentrifugation in den Vacutainer® CPT™-Röhrchen. Die Proben werden dazu in einer Zentrifuge (Rotixa/P, Hettich, Tuttlingen), die mit einem Ausschwingrotor versehen ist, für 20 min bei 1700 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die MN sammeln sich dabei als milchig-trübes Zellband oberhalb der Gelschicht an. Für den nun folgenden Waschschrift werden die Zellen in Zentrifugenröhrchen die ca. 12 mL PBS-Lösung (**phosphate buffered saline** pH 7,4; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) enthalten, überführt. Anschließend wird die Zell-Suspensionen in einer Zentrifuge (Rotixa/P, Hettich, Tuttlingen) für 10 min bei 300 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Um eine vorzeitige Zerstörung der Zellen zu verhindern, werden alle Arbeitsschritte mit größter Sorgfalt durchgeführt. Ein Umschwenken der Zentrifugengläschen muß unterbleiben, da die Zellen an den Wandungen anhaften können. Die überstehende Waschflüssigkeit wird abdekanntiert und die gewaschenen Zellen können in insgesamt 1 mL PBS-Lösung suspendiert werden. Abschließend erfolgt die Bestimmung der Anzahl der isolierten mononukleären Leukozyten in einem 20 µL Aliquot der Zellsuspension durch ein halbautomatisches hämatologisches Meßgerät (s. **Kapitel 8.3**).

Zur **Gewinnung des Zell-Lysates** der MN werden die Zellen zunächst 10 min bei 300 g zentrifugiert (Rotixa/P, Hettich, Tuttlingen) und nachfolgend die überstehende Pufferlösung bis auf 100 µL abpipettiert. Durch Zugabe von 500 µL bidest. Wasser und 600 µL einer 6 % (w/w) Perchlorsäure/2 % (w/w) Metaphosphorsäure-Mischung sowie fünfminütige Einwirkung von Ultraschall (Ultraschallbad Branson 200, Branson, Soest/NL) werden die Zellen zerstört und das Zell-Lysat erhalten. Die zugesetzte Säuremischung bewirkt eine Stabilisierung der freigesetzten L-Ascorbinsäure und eine Fällung der in der Probe enthaltenen Proteine. Anschließend werden die ausgefällten Proteine und die Zellfragmente durch zehnmütiges Zentrifugieren bei 3000 g und 4 °C in einer Kühlzentrifuge (Rotanda/R, Hettich, Tuttlingen) abgetrennt. Der erhaltene klare farblose Überstand kann für die chromatographische Bestimmung der AA-Konzentration eingesetzt werden.

---

Die **chromatographische Bestimmung der AA-Konzentration** im Lysat der mononukleären Leukozyten erfolgt mit Hilfe der HPLC/UV (s. **Kapitel 8.2.1**) bzw. HPLC/EC (s. **Kapitel 8.2.2**).

### **8.9.2 Bestimmung der Kurzzeit- und Langzeitstabilität von L-Ascorbinsäure in den Zell-Lysat-Proben**

Um die **Kurzzeitstabilität** der L-Ascorbinsäure in Zell-Lysat-Proben ermitteln zu können, werden die Blutproben von zwei Probanden wie in **Kapitel 8.9.1** beschrieben aufgearbeitet und für 9 h bei 5 °C gelagert. Die Bestimmung der AA-Konzentration erfolgt mittels HPLC/EC im Abstand von 1,2 h.

Die **Langzeitstabilität** der L-Ascorbinsäure in den Lysat-Proben der MN wird anhand von vier Blutproben ermittelt, die wie in **Kapitel 8.9.1** beschrieben aufbereitet werden. Das Zell-Lysat wird jeweils in sieben Aliquote aufgeteilt die bei -80 °C über einen Zeitraum von 44 d gelagert werden. Zur Konzentrationsbestimmung der L-Ascorbinsäure werden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und mit Hilfe der HPLC/EC quantifiziert.

### **8.9.3 Validierung des HPLC/EC-Verfahrens zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure im Lysat der mononukleären Leukozyten**

Zur Ermittlung der Validierungselemente Meßpräzision und Wiederholpräzision der Analyseergebnisse werden Zell-Lysat-Proben eingesetzt, die wie in **Kapitel 8.9.1** erläutert, aufgearbeitet werden. Die AA-Konzentration wird anschließend mittels HPLC/EC (s. **Kapitel 8.2.2**) bestimmt. Die **Meßpräzision** wird durch jeweils zehnfache Injektion der Lysat-Proben von sechs Probanden ermittelt. Zur Bestimmung der **Wiederholpräzision** wird für die Blutproben von sechs Probanden der gesamte Analysenablauf jeweils zehnmal durchgeführt.

Um eine mögliche Korrelation zwischen dem AA-Gehalt in den mononukleären Leukozyten und der Plasma-AA-Konzentration nachzuweisen, werden bei allen Probanden zusätzlich jeweils eine Blutprobe zur Bestimmung der AA-Konzentration in Blutplasma entnommen und wie in der Standardarbeitsanweisung im **Anhang** beschrieben, aufgearbeitet. Die AA-Konzentration im Blutplasma wird chromatographisch mittels UV-Detektion bestimmt.

---

Zum Nachweis der **Spezifität** des Analysenverfahrens, werden einer Zell-Lysat-Probe vor Zusatz des Stabilisierungsreagenzes 0,5 mL einer Ascorbat-Oxidase-Lösung (s. **Kapitel 8.5.6**) zugesetzt. Nach einer Reaktionsdauer von 10 min bei Raumtemperatur wird die Probe, wie in **Kapitel 8.9.1** beschrieben, weiter aufgearbeitet und chromatographisch mittels EC-Detektion untersucht.

#### **8.9.4 Bestimmung von L-Ascorbinsäure im Lysat der mononukleären Leukozyten mittels HPLC/UV**

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit der UV-Detektion bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure im Lysat der MN werden die Blutproben von sechs Probanden wie in **Kapitel 8.9.1** dargestellt, aufgearbeitet. Die Quantifizierung erfolgt mit der in **Kapitel 8.2.1** vorgestellten HPLC-Apparatur mit UV-Detektor.

### **8.10 Anwendung der HPLC-Verfahren mit UV- und EC-Detektion auf Problemstellungen der klinisch-chemischen Analytik**

#### **8.10.1 Nachweis von Dehydro-L-ascorbinsäure im Blutplasma gesunder Menschen und Bestimmung der DHAA/AA-Relation**

Der Nachweis von Dehydro-L-ascorbinsäure und die Bestimmung der DHAA/AA-Relation im Blutplasma erfolgt bei zwölf gesunden Probanden (Auswahlkriterien s. **Kapitel 8.4.2**). Es werden jeweils zwei Blutproben entnommen und die AA- sowie Gesamtascorbinsäure-Konzentration wie in der Standardarbeitsanweisung im **Anhang** erläutert, aufgearbeitet und mittels HPLC/UV bestimmt.

#### **8.10.2 Korrelation zwischen der L-Ascorbinsäure-Konzentration im Blutplasma und in den mononukleären Leukozyten**

Zur Überprüfung der Korrelierbarkeit der AA-Konzentration im Blutplasma mit der AA-Konzentration in den mononukleären Leukozyten werden bei den in **Kapitel 8.9.3** beschriebenen Konzentrationsbestimmungen in den MN gleichzeitig die AA-Konzentration im Blutplasma mit Hilfe der HPLC/UV bestimmt (Standardarbeitsanweisung s. **Anhang**).

---

### 8.10.3 Untersuchungen zur Änderung der L-Ascorbinsäure-Konzentration im Blutplasma bei körperlicher Belastung

Das Probanden-Kollektiv für diese Untersuchungen besteht aus 15 männlichen Sportstudenten, die aufgrund eines wöchentlichen Ausdauertrainings von ca. 10 Stunden als sportlich trainiert eingestuft werden können. Zur Überprüfung des Gesundheitszustandes wird für jeden Probanden das Blutbild bestimmt (s. **Kapitel 8.3**). Das vom „Sportmedizinischen Institut“ der Universität-Gesamthochschule Paderborn entwickelte Belastungsschema für das Fahrrad-Ergometer-Training ist bereits in **Kapitel 6.3** ausführlich erläutert worden. Zur Charakterisierung der dabei auftretenden Belastungen werden neben der AA-Konzentration auch die Blutplasma-Lactat-Werte sowie die Herzfrequenz bestimmt. Der Vergleich der Vor- und Nachbelastungswerte auf signifikante Unterschiede erfolgt durch einen t-Test für abhängige (gepaarte) Stichproben (SPSS-Software Version 7.52, SPSS Incorporated, Chicago/USA).

Die **Bestimmung der L-Ascorbinsäure-Konzentration im Blutplasma** wird gemäß der Standardarbeitsanweisung im **Anhang** durchgeführt. Die Quantifizierung der L-Ascorbinsäure erfolgte mittels HPLC/UV.

Zur **Bestimmung der Herzfrequenz** wird ein EKG-Gerät vom Typ Cardiovit CS-6/12 (Schiller, Baar/CH) eingesetzt.

Die **Bestimmung der Blutplasma-Lactat-Konzentration** erfolgt aus Kapillarblut, welches aus einem hyperämischen Ohrläppchen entnommen wird. Zur Hyperämisierung wird das Ohrläppchen mit Finalgon-Salbe (Thomae, Biberach a. d. Riss) eingerieben. Die Lactat-Bestimmungen werden mittels vollenzymatischem UV-Test (Boehringer, Mannheim, Best.-Nr. 1178750) in einem EPOS-Analyser 5060 (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt.

---

## 9 Literaturverzeichnis

- [1] U. Moser, A. Bendich, *Handbook of Vitamins* (L. J. Machlin, Hrsg.), 2. Aufl., Marcel Dekker, New York 1991, S. 195-232.
  - [2] O. Isler, G. Brubacher, J. Kiss, *Vitamin C*, in: *Vitamine II: Wasserlösliche Vitamine* (O. Isler, G. Brubacher, S. Ghisla und B. Kräutler, Hrsg.), 1. Aufl., G. Thieme Verlag, Stuttgart 1988, S. 396-444.
  - [3] W. Friedrich, *Handbuch der Vitamine*, 1. Aufl., Urban & Schwarzenberg, München 1987, S. 597-639.
  - [4] H. K. Biesalski, J. Schrezenmeir, P. Weber, H. E. Weiß (Hrsg.), *Vitamine*, 1. Aufl., G. Thieme Verlag, Stuttgart 1997.
  - [5] P. Weber, A. Bendich, W. Schalch, *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* **66** (1996), S. 19-30.
  - [6] A. Bendich, L. Langseth, *Journal of the American College of Nutrition* **14** (1995), S. 124-36.
  - [7] S. K. Gaby, A. Bendich, V. N., Machlin, L. J. Singh, *Vitamin Intake and Health*, 1. Aufl., Marcel Dekker, New York 1991, S. 103-61.
  - [8] G. Maiani, E. Azzini, A. Ferro-Luzzi, *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* **63** (1993), S. 289-95.
  - [9] A. J. A. Wright, S. Southon, A. L. Bailey, S. Maisey, P. M. Finglas, R. A. Fulcher, *British Journal of Nutrition* **74** (1995), S. 453-75.
  - [10] H. Hesecker, R. Schneider, *European Journal of Clinical Nutrition* **48** (1994), S. 118-27.
  - [11] C. J. Schorah, N. Habibzadeh, M. Hancock, R. F. G. J. King, *Annals of Clinical Biochemistry* **23** (1986), S. 566-70.
  - [12] I. Stone, *The healing factor Vitamin C against disease*, 1. Aufl., Grosset and Dunlap, New York 1977.
  - [13] J. Lunec, D. R. Blake, *Free Radical Research* **1** (1985), S. 31-39.
  - [14] I. Koshiishi, T. Imanari, *Analytical Chemistry* **69** (1997), S. 216-20.
  - [15] F. Tessier, I. Birlouez-Aragon, C. Tjani, J.-C. Guillard, *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* **66** (1996), S. 166-70.
  - [16] J. Barabas, E. Nagy, I. Degrell, *Archives of Gerontology and Geriatrics* **21** (1995), S. 43-8.
  - [17] J. T. Vanderslice, D. J. Higgs, G. Beecher, H. E. Higgs, J. Bouma, *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* **62** (1992), S. 101-2.
  - [18] A. Lopez-Anaya, M. Mayersohn, *Clinical Chemistry* **33** (1987), S. 1874-8.
-

- [19] H. Iwase, I. Ono, *Journal of Chromatography B* **655** (1994), S. 195-200.
- [20] K. R. Dhariwal, W. O. Hartzell, M. Levine, *American Journal of Clinical Nutrition* **54** (1991), S. 712-6.
- [21] M. Okamura, *Clinica Chimica Acta* **103** (1980), S. 259-68.
- [22] M. Grote, *persönliche Mitteilung*.
- [23] P. W. Washko, R. W. Welch, K. R. Dhariwal, Y. Wang, M. Levine, *Analytical Biochemistry* **204** (1992), S. 1-14.
- [24] C. J. Bates, *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* **64** (1994), S. 283-7.
- [25] Bundesärztekammer, Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien, *Deutsches Ärzteblatt* **85** (1988), S. 1-16.
- [26] *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung*, Beuth Verlag, Berlin.
- [27] D. Hornig, *Annals of the New York Academy of Sciences* **258** (1975), S. 103.
- [28] S. T. Omaye, E. E. Schaus, M. A. Kutnink, W. C. Hawkes, *Annals of the New York Academy of Sciences* **498** (1987), S. 389-401.
- [29] W. Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch*, 257. Aufl., de Gruyter, Berlin 1994.
- [30] G. M. Jaffe, *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 3. Aufl., Bd. 24, Wiley, New York 1984
- [31] R. M. Evans, L. Currie, A. Campbell, *British Journal of Nutrition* **47** (1982), S. 473-82.
- [32] M. A. Kutnink, W. C. Hawkes, E. E. Schaus, S. T. Omaye, *Analytical Biochemistry* **166** (1987), S. 424-30.
- [33] U. Himmelreich, K. N. Drew, A. S. Serianni, P. W. Kuchel, *Biochemistry* **37** (1998), S. 7578-88.
- [34] J. Bianchi, R. C. Rose, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **181** (1986), S. 333-7.
- [35] J. M. May, Z. Qu, R. R. Whitesell, *Biochemistry* **34** (1995), S. 12721-8.
- [36] P. Bergsten, R. Yu, J. Kehrl, M. Levine, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **317** (1995), S. 208-214.
- [37] P. Washko, D. Rotrosen, M. Levine, *American Journal for Clinical Nutrition* **54** (1991), S. 1221S-7S.
- [38] P. W. Washko, Y. Wang, M. Levine, *The Journal of Biological Chemistry* **268** (1993), S. 15531-5.
-

- [39] O. Heine, B. Dufaux, A. Kothe, U. Prinz, R. Rost, *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* **46** (1995), S. 482-93.
- [40] E. F. Elstner, *Der Sauerstoff*, 1. Aufl., BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim 1990.
- [41] R. G. Cutler, J. Bertram, L. Packer, A. Mori (Hrsg.), *Oxidative Stress and Aging*, 1. Aufl., Birkhäuser, Basel 1995.
- [42] G. Hellige, P. G. Spieckermann, T. F. Lüscher, *Informationen zum Thema Herz-Kreislauf* (Frankfurt (Main) Cassella-Riedel Pharma GmbH, Hrsg.).
- [43] H. K. Biesalski, P. Grimm, *Taschenatlas der Ernährung*, 1. Aufl., Thieme, Stuttgart 1999.
- [44] K. L. Retsky, M. W. Freeman, B. Frei, *The Journal of Biological Chemistry* **268** (1993), S. 1304-9.
- [45] M. B. Davies, J. Austin, D. A. Partridge, *Vitamin C: Its Chemistry and Biochemistry*, in: *Royal Society of Chemistry Paperbacks*, Cambridge 1991.
- [46] M. Levine, *New England Journal of Medicine* **314** (1986), S. 892-902.
- [47] Y. Ogata, Y. Kosugi, *Tetrahedron* **26** (1970), S. 4711-6.
- [48] H. Sapper, A. Pleyer-Weber, W. Lohmann, *Zeitschrift für Naturforschung* **37c** (1982), S. 129-31.
- [49] H. Sapper, S.-O. Kang, H.-H. Paul, W. Lohmann, *Zeitschrift für Naturforschung* **37c** (1982), S. 942-6.
- [50] A. Agrawal, I. Rao, C. Gupta, S. K. Mishra, Sharma P. D., P. Parasher, *Ascorbic acid - a potential reducing agent in aqueous solution*, in: *Topics in Chemistry Series 1: Chemical Kinetics & Reaction Mechanism* (K. S. Gupta, Hrsg.), RBSA Publishers, Jaipur 1991, S. 315-47.
- [51] G. R. Buettner, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **16** (1988), S. 27-40.
- [52] K. Niemelä, *Journal of Chromatography* **399** (1987), S. 235-43.
- [53] B. M., Ward, J. B. Tolbert, *Ascorbic acid: Chemistry, Metabolism and Uses*, in: *Advances in Chemistry Series* (P. A. Seib, B. M. Tolbert, Hrsg.), Bd. 200, American Chemical Society, Washington D. C. 1982, S. 101-23.
- [54] E. G. Ball, *Journal of Biological Chemistry* **118** (1937), S. 219.
- [55] C.-H. Jung, W. W. Wells, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **355** (1998), S. 9-14.
-

- [56] E. Kimoto, S. Terada, T. Yamaguchi, *Methods in Enzymology* **297** (1997), S. 3-12.
- [57] S.-O. Kang, H. Sapper, W. Lohmann, *Zeitschrift für Naturforschung* **37 c** (1982), S. 1064.
- [58] A. M. Bode, L. Cunningham, R. C. Rose, *Clinical Chemistry* **36** (1990), S. 1807-9.
- [59] J. Velisek, J. Davidek, G. Janicek, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **37** (1972), S. 1465-70.
- [60] K. A. Bogdanski, H. V. Bogdanska, *Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences, Classe 2* **3** (1955) Nr. 41-4.
- [61] L. W. Doner, K. B. Hicks, *Methods in Enzymology* **122** (1986), S. 3-10.
- [62] R. C. Rose, D. L. Nahrwold, *Analytical Biochemistry* **114** (1981) S. 140-5.
- [63] S. P. Perone, W. J. Kretlow, *Analytical Chemistry* **38** (1966), S. 1760-3.
- [64] S. Ono, M. Takagi, T. Wasa, *Journal of the American Chemical Society* **75** (1953), S. 4369-70.
- [65] T. Ito, M. Hisashi, Y. Yasui, M. Matsui, T. Sakai, K. Yamauchi, *Journal of Chromatography B* **667** (1995), S. 355-7.
- [66] H. Iwase, I. Ono, *Journal of Chromatography A* **654** (1993), S. 215-20.
- [67] M. R. H. Löwik, J. Schrijver, M. Wedel, *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* **61** (1991), S. 43-5.
- [68] W. A. Behrens, R. Madere, *Journal of Liquid Chromatography* **17** (1994), S. 2445-55.
- [69] G. Barja, A. Hernanz, *Methods in Enzymology* **234** (1994), S. 331-7.
- [70] R. S. Harapanhalli, R. W. Howell, D. V. Rao, *Journal of Chromatography, Biomedical Applications* **614** (1993), S. 233-43.
- [71] S. Lewin, *Vitamin C: Its Molecular Biology and Medical Potential*, 1. Aufl., Academic Press, London 1976.
- [72] L. A. Pachla, D. L. Reynolds, P. T. Kissinger, *Journal-Association of Official Analytical Chemists* **68** (1985), S. 1-12.
- [73] J. R. Cooke, R. E. D. Moxon, *The Detection and Measurement of Vitamin C*, in: *Vitamin C (Ascorbic Acid)* (J. N. Counsell und D. H. Horing, Hrsg.), , Applied Science Publishers, London 1981, S. 167.
- [74] A. J. Speek, J. Schrijver, W. H. P. Schreurs, *Journal of Chromatography, Biomedical Applications* **305** (1984), S. 53-60.
- [75] M. Capellmann, H. M. Bolt, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **342** (1992), S. 462-6.
-

- [76] K. R. Dhariwal, P. W. Washko, M. Levine, *Analytical Biochemistry* **189** (1990), S. 18-20.
- [77] P. W. Washko, W. O. Hartzell, M. Levine, *Analytical Biochemistry* **181** (1989), S. 276-82.
- [78] K. Umegaki, K. Inoue, N. Takeuchi, M. Higuchi, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **40** (1994), S. 73-9.
- [79] L. S. Liau, B. L. Lee, A. L. New, C. N. Ong, *Journal of Chromatography, Biomedical Applications* **612** (1993), S. 63-70.
- [80] S. A. Margolis, T. P. Davis, *Clinical Chemistry* **34** (1988), S. 2217-23.
- [81] M. Manoharan, P. O. Schwille, *Journal of Chromatography B* **654** (1994), S. 134-139.
- [82] K. Tanishima, M. Kita, *Journal of Chromatography, Biomedical Applications* **613** (1993), S. 275-80.
- [83] T. Huang, P. T. Kissinger, *Current Separations* **9** (1989), S. 20-23.
- [84] K. Nyssönen, S. Pikkarainen, M. Parviainen, K. Heinonen, I. Mononen, *Journal of Liquid Chromatography* **11** (1988), S. 1717-28.
- [85] M. A. Ross, *Journal of Chromatography B* **657** (1994), S. 197-200.
- [86] H. E. Sauberlich, S. M. Wood, T. Tamura, L. E. Freeberg, *American Journal of Clinical Nutrition* **54** (1991), S. 1319S-22S.
- [87] W. Lee, K. A. Davis, R. L. Rettmer, R. F. Labbe, *American Journal of Clinical Nutrition* **48** (1988), S. 286-90.
- [88] R. J. Henry, D. C. Cannon, J. W. Winkelman, *Clinical Chemistry*, 2. Aufl., Harper & Row, Publishers, Hagerstown 1974.
- [89] C. J. Bates, *Clinica Chimica Acta* **205** (1992), S. 249-52.
- [90] S. A. Margolis, R. C. Paule, R. G. Ziegler, *Clinical Chemistry* **36** (1990), S. 1750-5.
- [91] E. Nagy, I. Degrell, *Journal of Chromatography, Biomedical Applications* **497** (1989), S. 276-81.
- [92] J. Blanchard, *Journal of Chromatography, Biomedical Applications* **226** (1981), S. 455-60.
- [93] M. Patriarca, A. Menditto, G. Morisi, *Journal of Liquid Chromatography* **14** (1991), S. 297-312.
- [94] C. S. Tsao, S. L. Salimi, *Journal of Chromatography* **224** (1981), S. 477-80.
- [95] D. J. Green, R. L. Perlman, *Clinical Chemistry* **26** (1980), S. 796-7.
- [96] M. Yoshiura, K. Iriyama, *Journal of Liquid Chromatography* **9** (1986), S. 177-88.
-

- [97] K.-S. Boos, *Merck Spectrum* **13** (1996), S. 26-7.
- [98] D. Lubda, G. Wielnd, G. Battermann, M. Müller, K.-S. Boos, *LaborPraxis* **20** (1996), S. 44-9.
- [99] Privatmitteilung.
- [100] H. Vuorela, R. Hinkkanen, R. Hiltunen, *Acta Pharmaceutica Fennica* **95** (1986), S. 141-9.
- [101] W. D. Mason, *Methodology for Analytical Toxicology* **3** (1985), S. 35-40.
- [102] L. L. Hatch, A. Sevanian, *Analytical Biochemistry* **138** (1984), S. 324-8.
- [103] K. Iriyama, M. Yoshiura, T. Iwamoto, Y. Ozaki, *Analytical Biochemistry* **141** (1984), S. 238-43.
- [104] M. Grote, S. Ahlfänger, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry (in Vorbereitung)*.
- [105] M. M. Bradford, *Analytical Biochemistry* **72** (1976), S. 248-54.
- [106] H. J. Chial, A. G. Splittgerber, *Analytical Biochemistry* **213** (1993), S. 362-9.
- [107] S. J. Compton, C. G. Jones, *Analytical Biochemistry* **151** (1985), S. 369-74.
- [108] J. E. Fleming, K. G. Bensch, J. Schreiber, W. Lohmann, *Zeitschrift für Naturforschung* **38c** (1983), S. 859-61.
- [109] C. Gertz, *Methodenvalidierung und Bewertung von Analyseergebnissen*, in: *Qualität im analytischen Labor* (S. Kromidas, Hrsg.), 1. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim 1995, S. 181-206.
- [110] H. Greiling, A. M. Gressner, *Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie*, 3. Aufl., Schattauer, Stuttgart 1995.
- [111] S. Kromidas, R. Klinkner, R. Mertens, *Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium* **43** (1995), S. 669-76.
- [112] S. Kromidas, *Nachrichten aus Chemie Technik und Laboratorium* **44** (1996), S. S 34-S 36.
- [113] Entwurf „Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien, Teil I: Qualitätssicherung der Analysendurchführung mit chemischen, physikalisch-chemischen und biochemischen Methoden“ (1996).
- [114] Deutsches Institut für Normung e. V., DIN 32645, *Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, Ermittlung unter Wiederholbedingungen, Begriffe, Verfahren, Auswertung* (1994).
- [115] IUPAC, *Pure and Applied Chemistry* **65** (1993), S. 819-72.
-

- [116] *Validation of analytical procedures*, in: *Committee for Proprietary Medical Products, Note for Guidance* (Commission of the European Communities, Hrsg.), Brüssel 1994.
- [117] W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert, *Qualitätssicherung in der analytischen Chemie*, 1. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim 1992.
- [118] Deutsches Institut für Normung e. V., *DIN 38402, Teil 51: Kalibrierung von Analysenverfahren, Auswertung von Analyseergebnissen und lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngrößen*, 16. Aufl., Berlin 1986.
- [119] J. Mandel, *The Statistical Analysis of Experimental Data*, 1. Aufl., Wiley, New York 1964.
- [120] Arbeitskreis EURACHEM/D, Gesellschaft deutscher Chemiker, *Richtlinien zur Interpretation der Normenserie EN 45 000 und ISO Guide 25*, Frankfurt am Main.
- [121] A. Hernanz, *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* **26** (1988), S. 459-61.
- [122] J. Fabianek, H. Hepr, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **125** (1967), S. 462-5.
- [123] O. Pelletier, C. Godin, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **47** (1969), S. 985-91.
- [124] G. Barja de Quiroga, M. Lopez-Torres, R. Perez-Campo, C. Rojas, *Analytical Biochemistry* **199** (1991), S. 81-5.
- [125] Gynkotek HPLC, *Handbuch zum Gynkosoftware Chromatographie-Datensystem PCD, Version 5.50*, Germering 1998.
- [126] R. C. Rose, *Biochimica et Biophysica Acta* **947** (1988), S. 335-66.
- [127] P. Bergsten, G. Amitai, J. Kehrl, K. R. Dhariwal, H. G. Klein, M. Levine, *The Journal of Biological Chemistry* **265** (1990), S. 2584-7.
- [128] P. Washko, D. Rotrosen, M. Levine, *The Journal of Biological Chemistry* **264** (1989) Nr. 32, S. 18996-19002.
- [129] M. Grote, H. Wollersen, J. Steffan, M. Weiß, unveröffentlicht
- [130] K. Iriyama, M. Yoshiura, T. Iwamoto, *Journal of Liquid Chromatography* **8** (1985), S. 333-44.
- [131] V. R. Meyer, *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, 7.. Aufl., Salle + Sauerländer, Frankfurt a. M. 1992.
- [132] m. A. Kutnink, J. H. Skala, H. E. Sauberlich, Omaye S. T., *Journal of Liquid Chromatography* **8** (1985), S. 31-46.
-

- [133] E. A. Foot, I. D. R. Fry, B. J. Starkey, *Annals of Clinical Biochemistry* **42** (Suppl 1) (1987), S. S1-225-S1-226.
- [134] W. A. Behrens, R. Madere, *Analytical Biochemistry* **165** (1987), S. 102-7.
- [135] W. Funk, V. Dammann, C. Vonderheid, G. Oehlmann, *Statistische Methoden in der Wasseranalytik*, 1. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim 1985.
- [136] D. J. VanderJagt, P. J. Garry, H. N. Bhagavan, *American Journal of Clinical Nutrition* **49** (1989), S. 511-6.
- [137] R. M. Evans, L. Currie, A. Campbell, *Annals of Clinical Biochemistry* **17** (1982), S. 253-5.
- [138] E. C. Attwood, E. D. Robey, J. Ross, F. Bradley, J.J. Kramer, *Clinica Chimica Acta* **54** (1974), S. 95-105.
- [139] D. English, B. R. Andersen, *Journal of Immunological Methods* **5** (1974), S. 249-52.
- [140] J. Giudicelli, P. J. M. Philip, P. Delque, P. Sudaka, *Journal of Immunological Methods* **54** (1982), S. 43-46.
- [141] J. A. Metcalf, J. I. Galin et al., *Laboratory Manual of Neutrophil Function*, Raven Press, New York 1986, S. 3-5.
- [142] S. H. Loh., C. W. M. Wilson, *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* **41** (1971), S. 90-8.
- [143] W. Lee, P. Hamernyik, M. Hutchinson, V. A. Raisys, R. F. Labbé, *Clinical Chemistry* **28** (1982), S. 2165-9.
- [144] L. Liebes, R. Krigel, S. Kuo, D., Pelle, E. Nevrla, R. Silber, *Proceedings of National Academy of Sciences* **78** (1981), S. 6481-6484.
- [145] Becton Dickinson Vacutainer Systems, *Report No. R-88-99-QC-195*, Franklin Lake/NY, USA.
- [146] Bedienungsanleitung Sysmex™ CC-180, TOA Medical Electronics, Kobe/J.
- [147] H. S. Loh, C. W. M. Wilson, *British Medical Journal* **3** (1971), S. 733-5.
- [148] I. Popov, G. Lewin, *Erfahrungsheilkunde* (1996), S. 434-41.
- [149] G. G. Duthie, Robertson J. D., R. J. Maughan, Morrice P. C., *Archives of Biochemistry and Biophysics* **282** (1990), S. 78-83.
- [150] D. B. Dill, D. L. Costill, *Journal of Applied Physiology* **37** (1974), S. 247-8.
-

## Anhang

### I Anpassungstest nach MANDEL

Die rechnerische Überprüfung der Linearität einer Kalibrierfunktion kann mit Hilfe des Anpassungstests nach MANDEL [119] erfolgen. Dabei wird durch Vergleichen der Kalibrierfunktionen 1. und 2. Grades die Verringerung der Reststandardabweichung, die sich aufgrund der Wahl des Regressionsmodells 2. Ordnung gegenüber dem 1. Ordnung ergibt, auf Signifikanz geprüft (F-Test). Zur Durchführung des Tests werden 6 bis 10 Proben einer Konzentrationsreihe vermessen, deren Konzentrationen möglichst äquidistant über den gewählten Arbeitsbereich verteilt liegen [118].

Zunächst werden aus den erhaltenen Meßwerten

die lineare Kalibrierfunktion  $y = a + bx$  **(GI. A1.1)**

sowie die Reststandardabweichung  $s_{y1} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - a + bx_i)^2}{N - 2}}$  **(GI. A1.2)**

die quadratische Kalibrierfunktion  $y = a + bx + cx^2$  **(GI. A1.3)**

sowie die Reststandardabweichung  $s_{y2} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - a + bx_i + cx_i^2)^2}{N - 3}}$  **(GI. A1.4)**

berechnet. Aus den Reststandardabweichungen  $s_{y1}$  und  $s_{y2}$  wird die Differenz der Varianzen  $DS^2$  ermittelt:

$$DS^2 = (N - 2) s_{y1}^2 - (N - 3) s_{y2}^2 \quad \text{mit dem Freiheitsgrad } f = 1 \quad \textbf{(GI. A1.5)}$$

Anschließend wird der Prüfwert  $PW$  berechnet

$$PW = \frac{DS^2}{s_{y2}^2} \quad \textbf{(GI. A1.6)}$$

und mit dem Tabellenwert  $F(f_1 = 1, f_2 = N - 3, P = 99 \%)$  verglichen.

---

Dabei können folgende Fälle auftreten [118]:

$PW \approx F$ : Durch die Kalibrierfunktion 2. Grades wird keine signifikant bessere Anpassung erreicht; d. h. die Kalibrierfunktion ist linear.

$PW > F$ : Der Arbeitsbereich muß soweit eingeengt werden bis  $PW \approx F$  oder die Kalibrierfunktion muß nach einem Regressionsmodell höherer Ordnung berechnet werden.

## II Test auf Homogenität der Varianzen

Zur Überprüfung der Varianzhomogenität [117, 118] erfolgen zunächst jeweils 10 Messungen mit Standardproben der niedrigsten ( $x_I$ ) und der höchsten ( $x_N$ ) Konzentration des gewählten Arbeitsbereiches. Anschließend werden für beide Datensätze aus den Standardabweichungen  $s_I$  und  $s_N$  die Varianzen  $s_I^2$  und  $s_N^2$  gebildet und einem F-Test unterworfen. Der Prüfwert  $PW$  wird hierzu wie folgt berechnet:

$$PW = \frac{s_I^2}{s_N^2} \quad \text{wenn } s_I^2 > s_N^2 \quad (\text{Gl. A2.1})$$

oder

$$PW = \frac{s_N^2}{s_I^2} \quad \text{wenn } s_I^2 < s_N^2 \quad (\text{Gl. A2.2})$$

Der berechnete Prüfwert  $PW$  wird mit dem Wert  $F(f_1 = f_2 = n - 1, P = 99 \%)$  aus der F-Werte-Tabelle verglichen.

Dabei können folgende Fälle auftreten [118, 117]:

$PW < F$ : kein signifikanter Unterschied zwischen den Varianzen  $s_I^2$  und  $s_N^2$  feststellbar (Homogenität der Varianzen)

$PW \geq F$ : Unterschied zwischen den Varianzen  $s_I^2$  und  $s_N^2$  signifikant (Inhomogenität der Varianzen), d. h. der Arbeitsbereich muß verkleinert werden, bis  $PW < F$  gilt, oder es müssen gewichtete Regressionsmodelle angewendet werden.

---

### III Ausreißertest nach GRUBBS

Zur Aufdeckung einzelner Ausreißerwerte in einer Analysenserie werden zunächst der Mittelwert  $\bar{x}$  und die Standardabweichung  $s$  der Analysendaten berechnet. Durch Einsetzen in **Gl. A3.1** wird für den Analysenwert  $x^*$  mit der größten Differenz zum Mittelwert überprüft, ob es sich um einen Ausreißer handelt [117]:

$$PW = \frac{|x^* - \bar{x}|}{s} \quad (\text{Gl. A3.1})$$

Das Test-Ergebnis ist wie folgt zu bewerten [117]:

$PW \leq rM(f, P = 90\%)$ : kein Ausreißer

$rM(f, P = 90\%) < PW \leq rM(f, P = 95\%)$ : wahrscheinlich Ausreißer

$PW > rM(f, P = 90\%)$ : Ausreißer

### IV Orthogonale Regressionsanalyse

Zur Gleichwertigkeitsuntersuchung zweier Analysenverfahren kann eine orthogonale Regressionsanalyse durchgeführt werden [135]. Dabei werden im Verlauf der Auswertung verschiedene Kenngrößen berechnet, die quantitativ die Gleichwertigkeit der beiden Verfahren beschreiben. Im Rahmen dieser Untersuchungen sollen mit beiden Analysenverfahren (die im folgenden durch die Indices 1 und 2 gekennzeichnet sind) mindestens 30 Doppelbestimmungen durchgeführt werden. Für die dabei erhaltenen Datensätze werden zunächst die Mittelwerte  $\bar{x}_1$  und  $\bar{x}_2$  sowie die Standardabweichungen  $s_1$  und  $s_2$  berechnet. Daraus lassen sich die Koeffizienten der Regressionsgeraden ( $x_2 = a + bx_1$ ) berechnen.

Steigung:  $b = \frac{s_2}{s_1} \quad (\text{Gl. A4.1})$

Ordinatenabschnitt:  $a = \bar{x}_2 - b\bar{x}_1 \quad (\text{Gl. A4.2})$

---

Die Differenz der Mittelwerte  $\bar{x}_1$  und  $\bar{x}_2$  wird als „bias“ bezeichnet.

$$\text{bias} \quad \bar{D} = \bar{x}_2 - \bar{x}_1 \quad (\text{Gl. A4.3})$$

Durch die Berechnung der relativen Differenz der Mittelwerte ( $\text{bias}_{rel}$ ) kann eine Aussage über die konstant-systematischen Abweichungen getroffen werden. Diese sind unabhängig von der Konzentration der zu analysierenden Komponente.

$$\text{bias}_{rel} \quad \bar{D}_{rel} = \frac{\bar{D}}{x_1} 100\% \quad (\text{Gl. A4.4})$$

Darüber hinaus wird für jedes Wertepaar die Differenz der beiden Meßwerte

$$D_i = x_{2i} - x_{1i} \quad (\text{Gl. A4.5})$$

und im Anschluß die Standardabweichung der Differenzen  $s_D$  sowie die relative Standardabweichung der Differenzen  $s_{D,rel}$  als Präzisionsmaß berechnet:

$$s_D = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (D_i - \bar{D})^2}{(N-1)}} \quad (\text{Gl. A4.6})$$

$$s_{D,rel} = \frac{s_D}{x_1} 100\% \quad (\text{Gl. A4.7})$$

Die relative proportional-systematische Abweichung  $F_{p,rel}$  der Analyseergebnisse der beiden Detektionsmethoden berechnet sich nach:

$$F_{p,rel} = |1 - b| 100\% \quad (\text{Gl. A4.8})$$

Bei proportional-systematischen Abweichungen ist die Größe des Fehlers von der Konzentration der zu analysierenden Komponente abhängig.

---

## V Plasmavolumenkorrektur nach DILL und COSTILL

Zur Korrektur von Nachbelastungswerten aufgrund der Änderung des Plasmavolumens durch körperliche Aktivität kann für einen Probanden ein Korrekturfaktor berechnet werden, der diese scheinbare Konzentrationszunahme berücksichtigt [150]. Diese Plasmavolumen-Korrektur nach DILL und COSTILL ist jedoch nur erforderlich, wenn sich die Vor- und Nachbelastungswerte für die Hämoglobin-Konzentration und den Hämatokrit-Wert signifikant unterscheiden. Daher müssen bei einem Probanden-Kollektiv zunächst die Mittelwerte der Hämoglobin-Konzentrationen und der Hämatokrit-Werte durch einen t-Test für abhängige (gepaarte) Stichproben verglichen werden. Im Fall von signifikanten Unterschieden wird der Korrekturfaktor  $KF$  nach **Gl. A5.1** berechnet.

$$KF = \frac{(100 - Hk_b) Hb_a}{(100 - Hk_a) Hb_b} \quad (\text{Gl. A5.1})$$

Dabei bedeuten:

- $Hk_b$ : Hämatokrit-Wert nach Belastung [%]
- $Hb_a$ : Hämoglobin-Konzentration vor Belastung [g/L]
- $Hk_a$ : Hämatokrit-Wert vor Belastung [%]
- $Hb_b$ : Hämoglobin-Konzentration nach Belastung [g/L]

Anschließend werden die Nachbelastungswerte mit diesem Korrekturfaktor multipliziert.

---

## **VI Standardarbeitsanweisung zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma mit HPLC/UV und HPLC/EC**

### **(1) Zweck und Anwendungsbereich**

Das nachfolgend beschriebene Analysenverfahren dient zur Bestimmung der L-Ascorbinsäure- und Dehydro-L-ascorbinsäure-Konzentration in Humanplasma.

### **(2) Analysenprinzip**

Die Bestimmung der L-Ascorbinsäure (AA) erfolgt direkt, wogegen die Dehydro-L-ascorbinsäure (DHAA) indirekt, aus der Differenz zwischen der Gesamtascorbinsäure- (Summe aus AA- und DHAA-Konzentration) und der L-Ascorbinsäure-Konzentration bestimmt wird. Zur Ermittlung der AA- und Gesamtascorbinsäure-Konzentration wird die HPLC/UV bei einer Detektionswellenlänge von 243 nm oder die HPLC/EC bei einem Arbeitspotential von +0,85 V gegen Ag/AgCl eingesetzt.

### **(3) Reagenzien**

L-Ascorbinsäure (p. a.)  
Dikaliumhydrogenphosphat-3-Hydrat (p. a.)  
1,4-Dithiothreitol (<99 %)  
Helium (4.6)  
Metaphosphorsäure (40 % bis 50 % (w/w))  
Natriumchlorid (p. a.)  
Natriumdihydrogenphosphat-1-Hydrat (p. a.)  
Orthophosphorsäure(85 % (w/w), p. a.)  
Perchlorsäure (65 % (w/w), p. a.)  
Salpetersäure (65 % (w/w), p. a.)  
Wasser (bidestilliert)

---

### **(3.1) Fällungsreagenz**

Zur Herstellung des Fällungsreagenzes werden 2 g Metaphosphorsäure mit 6 % (w/w) Perchlorsäure zu 40 g ergänzt. Die erhaltene 6 % (w/w) Perchlorsäure/2 % (w/w) Metaphosphorsäure-Mischung kann aufgrund der Hydrolyse der Metaphosphorsäure maximal 2 Tage bei 5 °C aufbewahrt werden.

### **(3.2) Dithiothreitol-Lösung**

In einem 25 mL Meßkolben werden 170 mg Dithiothreitol in 20 mL isotonischer Kochsalzlösung (0,9 % (w/w) NaCl) gelöst und mit 1 mol/L Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung auf pH 7,0 bis pH 7,5 eingestellt. Durch Auffüllen mit isotonischer Kochsalzlösung wird eine 6,8 g/L (0,044 mol/L) Dithiothreitol-Lösung erhalten, die bei 4 °C maximal 14 Tage aufbewahrt werden kann.

### **(3.3) Mobile Phase**

Zur Herstellung der mobilen Phase werden 1,38 g Natriumdihydrogenphosphat-1-Hydrat in 1000 mL bidest. Wasser gelöst und mit ca. 23 mL 14%iger (w/w) Orthophosphorsäure auf pH 2,0 eingestellt. Der erhaltene 0,045 mol/L Phosphat-Puffer pH 2 wird anschließend durch ein 0,45 µm Filter filtriert. Die Entgasung der mobilen Phase erfolgt vor Beginn einer Analysenserie durch zehninütiges Einleiten von Helium oder durch ein Online-Entgasungsgerät. Um die Bildung mikrobieller Verunreinigungen zu verhindern, wird die mobile Phase täglich neu angesetzt.

### **(3.4) Kalibrierlösungen**

Zur Herstellung der 1200 mg/L AA-Stammlösung werden in einem 50 mL Meßkolben 60 mg L-Ascorbinsäure in 3 % (w/w) Perchlorsäure/1% (w/w) Metaphosphorsäure-Mischung gelöst. Anschließend wird mit der Säuremischung bis zur Kalibriermarke aufgefüllt.

Die Kalibrierlösungen mit 1,2 mg/L und 12 mg/L L-Ascorbinsäure wird durch Verdünnen der 1200 mg/L AA-Stammlösung mit einer 3 % (w/w) Perchlorsäure/1 % (w/w) Metaphosphorsäure-Mischung erhalten.

Zur Herstellung der Säure-Mischung werden 7,5 g Metaphosphorsäure mit 3%iger (w/w) Perchlorsäure zu 300 g ergänzt. Aufgrund der Instabilität von L-Ascorbinsäure und der Hydrolyse der Metaphosphorsäure werden alle Lösungen täglich neu hergestellt.

---

#### **(4) Geräte**

- Evakuierte 5 mL Blutentnahme-Röhrchen mit 143 USP Lithium-Heparin
- Kühlzentrifuge mit Ausschwingrotor
- HPLC-Anlage mit isokratischer Pumpe und wahlweise UV-Detektor (Detektionswellenlänge: 243 nm) oder EC-Detektor mit Glassy-Carbon Arbeitselektrode (Arbeitspotential: +0,85 V gegen Ag/AgCl).

#### **(5) Durchführung der Analysen**

##### **(5.1) Probenvorbereitung zur Bestimmung der L-Ascorbinsäure-Konzentration**

Die Entnahme der Blutproben erfolgt bei nüchternen Probanden aus einer gestauten Vene des Unterarmes. Unmittelbar nach der Entnahme wird die Blutprobe in ein Eisbad (0 °C) gestellt.

Zur Gewinnung des Blutplasmas wird die Blutprobe 5 min bei 1700 g in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C zentrifugiert.

Um die im Blutplasma enthaltenen Proteine auszufällen, werden 0,5 mL des Blutplasmas mit 0,5 mL kaltem (4 °C) Fällungsreagenz versetzt und 10 s intensiv vermischt. Anschließend wird durch zehnmütiges Zentrifugieren bei 3000 g in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C der Protein-Niederschlag abgetrennt. Die überstehende klare Lösung kann zur Bestimmung der L-Ascorbinsäure-Konzentration sowohl mit HPLC/UV als auch HPLC/EC eingesetzt werden.

##### **(5.2) Probenvorbereitung zur Bestimmung der Gesamascorbinsäure-Konzentration**

Die Entnahme der Blutproben erfolgt bei nüchternen Probanden aus einer gestauten Vene des Unterarmes. Unmittelbar nach der Entnahme wird die Probe zur Reduktion des DHAA-Anteils mit 0,1 mL der Dithiothreitol-Lösung versetzt (Einwegspritze, Volumen: 1 mL, Teilung: 0,01 mL) und 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 1700 g in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C das Blutplasma erhalten.

---

Zur Fällung der im Blutplasma enthaltenen Proteine werden 0,5 mL des Blutplasmas mit 0,5 mL kaltem (4 °C) Fällungsreagenz versetzt und 10 s intensiv vermischt. Anschließend wird durch zehnmütiges Zentrifugieren bei 3000 g in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C der Protein-Niederschlag abgetrennt. Die überstehende klare Lösung kann zur Bestimmung der Gesamascorbinsäure-Konzentration mittels HPLC/UV oder HPLC/EC eingesetzt werden.

### **(5.3) Chromatographische Bestimmung der L-Ascorbinsäure- und Gesamascorbinsäure Konzentration**

Zur Bestimmung der AA- und Gesamascorbinsäure-Konzentration wird eine HPLC-Anlage mit folgenden Spezifikationen eingesetzt:

Isokratische Pumpe: Fluß: 1 mL/min

Probenaufgabesystem: Injektionsventil oder kühlbarer Autosampler (4 °C),  
Injektionsvolumen: 20 µL

Trennsäule: 125 mm x 4 mm,  
Packungsmaterial: LiChrospher® Si 100 RP-18, 5 µm  
(Merck, Darmstadt)

Detektor: UV-Detektor (Detektionswellenlänge: 243 nm)  
oder  
EC-Detektor (Arbeitspotential: +0,85 V gegen Ag/AgCl,  
Glassy-Carbon Arbeitselektrode)

Bei Einsatz des UV-Detektors können die Bestimmungen bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Bei Verwendung des EC-Detektors werden Trennsäule und Meßzelle auf 30 °C temperiert. Weiterhin wird vor erstmaliger Durchführung der Analysen und anschließend nach jeweils ca. 1000 Bestimmungen die HPLC-Anlage durch Spülen mit 15%iger (w/w) Salpetersäure passiviert.

Da die Verwendung des 0,045 mol/L Phosphat-Puffers pH 2 zur Hydrolyse der Octadecyl-Reste des RP-18 Packungsmaterials der Trennsäule führen kann, wird zwischen Pumpe und Probenaufgabesystem eine Sättigungssäule installiert.

Die Kalibrierung der HPLC-Anlage erfolgt täglich durch jeweils fünffache Injektion der Kalibrierlösungen mit 1,2 mg/L und 12 mg/L-L-Ascorbinsäure.

---



---

# Lebenslauf

## Jörg Steffan

---

Geburtsdatum: 05. Mai 1970  
Geburtsort: Lippstadt  
Familienstand: ledig

## Schulbildung

---

1980 - 1986      Geschwister-Scholl-Realschule, Wadersloh  
Abschluß: Fachoberschulreife

1989 - 1990      Städtische Kollegschule Senne, Bielefeld  
Abschluß: Fachhochschulreife

## Berufsausbildung

---

1986 - 1989      Ausbildung zum Chemielaboranten,  
Universität-GH Paderborn

## Zivildienst

---

1991 - 1992      Evangelisches Krankenhaus Lippstadt

## Studium

---

10/1990 - 12/1995      Chemie-Studium, Universität-GH Paderborn,  
Abschluß: Diplom-Chemiker

1/1996 - 5/1999      Anfertigung der Dissertation im Fach „Angewandte  
Chemie“, Universität-GH Paderborn

Lehrbeauftragter im Fach „Instrumentelle Analytik“

---