

**BESTIMMUNG VON
L-ASCORBINSÄURE UND DEHYDRO-L-ASCORBINSÄURE
IN HUMANPLASMA UND LEUKOZYTEN MIT HPLC/UV UND HPLC/EC:
METHODENENTWICKLUNG, VALIDIERUNG UND ANWENDUNG**

Dipl.-Chem. Jörg Steffan, Angewandte Chemie, FB 13 Chemie und Chemietechnik

Der Gehalt an L-Ascorbinsäure (AA) und Dehydro-L-ascorbinsäure (DHAA) im Blutplasma und in Leukozyten liefert gemeinsam mit anderen Parametern wichtige Hinweise zum Antioxidantien-Status eines Menschen. Bei zahlreichen literaturbekannten Verfahren zur Bestimmung dieser Komponenten ist deren Stabilität in den Proben nur unzureichend berücksichtigt und keine ausreichende Validierung der Bestimmungsverfahren durchgeführt worden. Daher existieren widersprüchliche Angaben, wie z. B. über die Konzentration von DHAA in Humanplasma oder die biologische Wirkung von AA.

Zur Überprüfung und Behebung der methodischen Defizite wurden im Rahmen dieser Arbeit HPLC-Verfahren zur Quantifizierung von AA und DHAA entwickelt, wobei eine direkte Bestimmung der AA-Konzentration und indirekte Bestimmung der DHAA-Konzentration, nach Reduktion zu AA, erfolgte. Durch eine systematische Optimierung aller Probenvorbereitungsschritte (Probennahme, Stabilisierung der Analyte, Proteinabtrennung, Reduktion des DHAA-Anteils) wurde erreicht, daß im Verlauf der Analyse eine signifikante Veränderung der nativen AA- und DHAA-Konzentrationen ausgeschlossen ist. Die Analysenproben können ferner bei -80 °C über einen Zeitraum von mindestens 100 Tagen ohne Änderung der AA-Konzentration gelagert werden. Zur Quantifizierung der Analyte haben sich HPLC-Verfahren (RP-18 Trennsäule, Phosphat-Puffer pH 2) mit UV-Detektion bei 243 nm bzw. EC-Detektion bei +0,85 V vs. Ag/AgCl als optimal erwiesen. Aufgrund der hohen Zuverlässigkeit der Analysenergebnisse, die durch die ermittelten Validierungsdaten (Linearer Bereich, Nachweis-/Bestimmungsgrenze, Meß-/Wiederholpräzision, Tag-zu-Tag-Präzision, Richtigkeit, Spezifität, Robustheit) dokumentiert werden, können beide Verfahren zur Routinebestimmung von AA in Humanplasma eingesetzt werden. Ferner entspricht das entwickelte HPLC/UV-Verfahren bezüglich Tag-zu-Tag-Präzision und Richtigkeit den „Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien“. Aus den hohen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für DHAA ist zu schließen, daß die indirekten Bestimmungsverfahren nicht zur Ermittlung der DHAA-Konzentration im Blutplasma gesunder Menschen geeignet sind. Die Anwendung der Analysenverfahren in der klinisch-chemischen Analytik wurde u. a. im Rahmen einer Studie zum Einfluß körperlicher Belastungen auf die Blutplasma-AA-Konzentration und in Untersuchungen zum Nachweis einer möglichen Korrelation zwischen der AA-Konzentration im Blutplasma und in den mononukleären Leukozyten gezeigt. Durch die Untersuchungen 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.

**DETERMINATION OF
L-ASCORBIC ACID AND DEHYDRO-L-ASCORBIC ACID
IN HUMAN BLOOD PLASMA AND LEUKOCYTES BY HPLC/UV AND
HPLC/EC: METHOD DEVELOPMENT, VALIDATION AND APPLICATION**

Dipl.-Chem. Jörg Steffan, Angewandte Chemie, FB 13 Chemie und Chemietechnik

L-Ascorbic acid (AA) and dehydro-L-ascorbic acid (DHAA) concentrations in human blood plasma and leukocytes seem to reflect the antioxidant status of an individual. Thus, a large number of assays for quantitative determination of these components in biological samples have been published. However, many procedures suffer from inattention to analyte stability and insufficient method validation, which in part may be responsible for some of the confusing information about vitamin C (e. g. DHAA concentration in human blood plasma).

In order to overcome these problems, in this work HPLC-assays by means of UV- and EC-detection have been developed to determine directly AA and indirectly DHAA (after reduction to AA). During method development sample preparation, analyte stability and HPLC conditions have been carefully investigated and optimized. Samples can be stored 100 days at -80 °C without change of the AA concentration. The optimal HPLC-conditions found (RP-18 stationary phase, aqueous phosphate buffer, pH 2, flow: 1 mL/min) allow the direct determination of AA by both UV-detection (243 nm) and amperometric detection (glassy carbon working electrode, +0.85 V vs. Ag/AgCl). The excellent reliability of the analytical results have been shown by validation data (linear range, limit of detection/quantification, precision of the measurement, within-run precision, between-day precision, accuracy of the mean, specificity, ruggedness). The obtained validation data regarding between-day precision and accuracy of the mean are in accordance with values stipulated by the „Federal medical council guidelines for quality assessment of quantitative laboratory determination“. Therefore, both assays can be used for routine determination of AA in human blood plasma. Corresponding to the high limit of detection and quantification for DHAA, statistically significant amounts of DHAA cannot be detected in blood plasma of healthy individuals. The application of the assays in clinical routine analyses has been demonstrated in a study on oxidative stress caused by short term physical activity and also, the proof of correlation between AA levels found in blood plasma and mononuclear leukocytes. In conclusion, validation has been shown to be a proper tool in disclosing and eliminating assay drawbacks, leading to reliable analytical data for the validated assays.