

Aus dem Zentrallabor Campus Lübeck
des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein
Leiter: Prof. Dr. med. M. Seyfarth
und der medizinischen Fakultät
der Universität zu Lübeck
Dekan: Prof. Dr. med. W. Solbach

HPLC-Analytik des Vitamin C: Methodenoptimierung und Referenzwerterstellung

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Cornelia Marlene Focke
aus Bremen

Lübeck 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Seyfarth
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Gunther Weitz

Tag der mündlichen Prüfung: 06.09.2010

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 06.09.2010

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Messe, was messbar ist.

(Galileo Galilei)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Einführung in die Thematik.....	8
1.1 Bedeutung des Vitamin C für den menschlichen Organismus	8
1.2 Chemie und Biochemie des Vitamin C.....	10
1.3 Vitamin C– Mangelsyndrome, ihre Ursachen und adäquate Vitamin C- Versorgung.....	12
1.4 Vitamin C in Prävention und Therapie.....	15
1.5 Unerwünschte Nebenwirkungen und Kontraindikationen.....	18
1.6 Übersicht zur bisherigen Vitamin C- Plasmaspiegelbestimmung.....	19
1.6.1 Allgemeine Einführung in die HPLC.....	20
1.6.2 Normalphasen-, Umkehrphasen-, Ionpaar- und Ionenaustausch-Chromato- graphie	21
1.6.3 Interne und externe Standards	22
1.6.4 Validierung einer HPLC-Methode.....	22
1.6.5 HPLC-Methoden zur Vitamin C-Plasmaspiegelbestimmung in der Literatur..	23
1.6.6 Methode zur Vitamin C-Plasmaspiegelbestimmung nach Liau et al.....	25
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	25
2. Material und Methoden.....	27
2.1 Geräte, Chemikalien, Untersuchungsmaterialien	27
2.1.1 Geräte	27
2.1.2 Seren, Plasmen, Liquor und Urin	27
2.1.3 Chemikalien	28
2.2 Methodenaufbau und -optimierung zur Messung des Plasma- und Serum- Vitamin C	29
2.2.1 Herstellung der mobilen Phase	29
2.2.2 Herstellung des Präzipitans und Stabilisans	29
2.2.3 Herstellung der Vitamin C-Standards und Kontrollen	29
2.2.4 Herstellung der Proben zu den Untersuchungen zum internen Standard	30
2.2.5 Probenvorbereitung	31
2.2.6 Einstellung der HPLC-Anlage	31
2.2.7 Kalibrierung und Auswertung der Chromatogramme.....	31

2.2.8 Untersuchungen zur Stabilität der Proben	31
2.2.9 Optimierte HPLC-Methoden zur Bestimmung von Ascorbinsäure in Serum und Plasma.....	32
2.2.10 Untersuchungen von Urin- und Liquor-Vitamin C	32
2.3 Methodvalidierung	33
2.3.1 Untersuchungen zur Richtigkeit	33
2.3.2 Untersuchungen zur Präzision	33
2.3.3 Untersuchungen zur Nachweis- und Bestimmungsgrenze	34
2.3.4 Untersuchungen zur Linearität der Messung	34
2.4 Methodenanwendung: Referenzwertermittlung und Untersuchungen zur Vitamin C-Kinetik	34
2.4.1 Referenzwerte	34
2.4.2 Kinetik	35
2.5 Statistische Methoden.....	35
3. Ergebnisse	37
3.1 Methodenoptimierung und -validierung	37
3.1.1 Stationäre Phase.....	37
3.1.2 Mobile Phase.....	37
3.1.3 Interner Standard.....	40
3.1.4 Richtigkeit.....	40
3.1.5 Präzision	41
3.1.6 Nachweisgrenze.....	41
3.1.7 Linearer Messbereich.....	42
3.1.8 Stabilität der Vitamin C-Proben.....	42
3.1.9 Messung von Urin- und Liquorproben.....	46
3.2 Methodenanwendung.....	47
3.2.1 Referenzwertermittlung.....	47
3.2.1.1 Untersuchung auf alterspezifische Unterschiede.....	49
3.2.1.2 Untersuchung auf geschlechtsspezifische Unterschiede.....	51
3.2.2 Vitamin C-Kinetik.....	53
4. Diskussion	56
4.1 Methodenoptimierung	56
4.2 Grenzen der Methode	58
4.3 Referenzwerte	58
4.4 Kinetik	59
4.5 Einsatzmöglichkeiten	60
4.6 Ausblick	60

5. Zusammenfassung	61
6. Anhang.....	62
Literaturverzeichnis.....	67
Danksagung.....	80
Curriculum Vitae.....	81
Selbständigkeitserklärung und Erklärung zur Bewerbung.....	82

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest	destilliertes Wasser
d	Tag
ECD	elektrochemische Detektion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HPLC	high-performance liquid chromatography
I.E.	internationale Einheiten
i.v.	intravenös
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LDL	low-density lipoprotein
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
μmol	Mikromol
mmol	Millimol
MPA	meta-Phosphorsäure
nA	nanoAmpère
nr.	Nummer
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCA	Perchlorsäure
rp HPLC	reversed-phase HPLC
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
U	Umdrehungen
UV	ultraviolett
V	Volt
VK	Variationskoeffizient

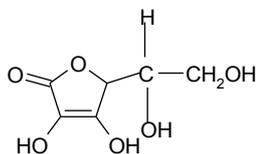
1. Einführung in die Thematik

1.1 Bedeutung des Vitamin C für den menschlichen Organismus

Das Vitamin C, die L-Ascorbinsäure, ist ein wasserlöslicher Mikronährstoff, der vom menschlichen Körper nicht synthetisiert werden kann. Während die meisten Tierespezies mit Hilfe des Enzyms Gulonolacton-Oxidase in der Lage sind, L-Ascorbinsäure aus Glucose zu erzeugen, ist der Mensch aufgrund eines Gendefektes auf die Zufuhr durch geeignete Nahrungsmittel angewiesen (Nishikimi und Yagi 1991).

Außer dem Menschen entbehren nur Primaten, Meerschweine und einige Fische und Vögel der Fähigkeit zur endogenen Ascorbinsäureversorgung. Nimmt der Mensch chronisch zu niedrige Vitamin C- Dosen zu sich, kommt es zum klinischen Bild des Skorbut (Baker et al. 1969, Baker et al. 1971, Hodges et al. 1969, Hodges et al 1971).

Sir Jack Drummond benannte 1919 den für den Menschen lebenswichtigen Antiskorbutfaktor mit dem Buchstaben C, weshalb er seitdem als Vitamin C bezeichnet wird (Drummond 1919); 1928 isolierte Szent-Györgyi erstmals die gegen Skorbut wirksame Verbindung aus Ochsen-Nebennierenrinde und Pflanzen (Szent-Györgyi 1928), die schließlich auf Grund ihrer antiskorbutischen Eigenschaft den Trivialnamen Ascorbinsäure erhielt (Szent-Györgyi 1933).



L-Ascorbinsäure

Abb. 1: Strukturformel der L-Ascorbinsäure

Neben frischen Früchten sind auch Gemüsesorten wie Kohl (Vanderslice und Higgs 1991) und Paprika reich an Vitamin C (Naidu 2003). Erhitzen, Lichtexposition oder lange Lagerung vermindern den Ascorbinsäuregehalt jedoch erheblich (Löffler und Petrides 1998).

Die intestinale Absorption des Vitamin C erfolgt beim Menschen durch aktiven, Natrium-abhängigen Transport (Stevenson 1974). Ascorbinsäure stellt das wichtigste wasserlösliche Antioxidans im Blut dar (Frei et al 1989) und ist nicht an Proteine gebunden (Dhariwal et al 1991, Levine et al 1991). Ihre Aufnahme erfolgt bei einigen Zellen wie Granulozyten und Fibroblasten durch aktiven Natrium-abhängigen Transport (Welch et al 1993 und 1995). Zusätzlich wird Dehydroascorbinsäure mit Hilfe eines

Transporters für Glucose (GLUT 1) in die Zellen geschleust, in denen sie dann durch noch unbekannte Mechanismen zu Ascorbinsäure reduziert wird (Rumsey et al 1997, Welch et al 1995). Obgleich der Anteil der oxidierten Form des Vitamin C im Blut verschwindend gering ist, besitzen alle Zellen des menschlichen Organismus GLUT 1, mit dessen Hilfe Ascorbinsäure intrazellulär angereichert wird. Da Dehydroascorbinsäure bei oxidativem Stress, z. B. in Form des „respiratory burst“ von Entzündungszellen entsteht, postulierten Nualart et al das sofortige Recycling in Ascorbinsäure durch Zellen in der Umgebung der Oxidation als „Bystander Effect“, der das Fehlen von Dehydroascorbinsäure im Blut erklären könnte (Laggner und Goldenberg 2000, Nualart et al 2003).

Bei einer Aufnahme von 77,5 mg L-Ascorbinsäure pro Tag über einen Zeitraum von 13 Tagen etabliert sich ein Körperpool von etwa 1500 mg (ca. 20 mg/kgKG). Diese Reserve kann bei nachfolgend Vitamin C-freier Ernährung klinische Zeichen des Skorbut für 1- 1 ½ Monate verhindern (Baker et al 1971). Ab einem Pool von 1500 mg wird zusätzlich aufgenommene L-Ascorbinsäure über die Nieren ausgeschieden (Hodges et al 1969, Kallner et al 1979). Dieses Phänomen wurde als Gewebesättigung gedeutet und bildet die Grundlage für die frühere US-amerikanische Empfehlung der täglichen Vitamin C-Zufuhr (recommended dietary allowance, RDA) von 60 mg/d. Bei entsprechender Substitution kann der Körperpool jedoch sogar auf 2300-2800 mg gesteigert werden (Baker et al 1966). Literaturangaben zu Referenzwerten für die Plasmakonzentration des Vitamin C liegen bei etwa 30-50 µmol/l (Lutsenko et al 2002, Hampel et al 2004, Wrieden et al 2000, Johnston et al 1998).

Die renale Elimination erfolgt durch glomeruläre Filtration und tubuläre Reabsorption. Die Rückresorption ist sättigbar und wird durch stereospezifische Natrium-abhängige Carrier für L-Ascorbinsäure vermittelt (Toggenburger et al 1981).

Auch die Leber scheint bei der Regelung des Vitamin C-Plasmaspiegels eine wichtige Rolle zu spielen: Hepatozyten sind nicht nur in der Lage, Dehydroascorbinsäure aus dem Blut aufzunehmen und intrazellulär zu Ascorbinsäure zu reduzieren; Upston et al konnten zeigen, dass Leberzellen die reduzierte Form des Vitamin C über erleichterte Diffusion wieder nach extrazellulär abgeben können (Upston et al 1999). Somit sind sie ebenso wie enzymatische und chemische Redoxsysteme, Ernährungsbedingungen und Nierenfunktion an der Vitamin C-Homöostase beteiligt.

1.2 Chemie und Biochemie des Vitamin C

Die L-Ascorbinsäure, chemisch 2-Oxogulonolacton, ist gut wasserlöslich (330g/l), hat ein Molekulargewicht von 176.1, einen sauren Charakter und ist an ihren OH-Gruppen des C₂- und C₃- Atoms sehr oxidationsempfindlich. Indem sie ihre beiden Protonen und zwei Elektronen abgibt und so zu Dehydroascorbinsäure oxidiert, ist sie in der Lage, andere Substanzen zu reduzieren.

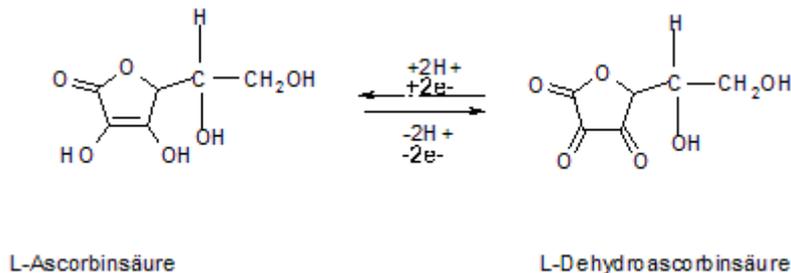


Abb. 2: Redoxsystem L-Ascorbinsäure/L-Dehydroascorbinsäure

Das Oxidationsprodukt, die L-Dehydroascorbinsäure kann durch andere Antioxidantien wie Glutathion (May et al 2003) wieder zu L-Ascorbinsäure reduziert werden; alternativ wird L-Dehydroascorbinsäure irreversibel zu 2,3-Diketogulonsäure hydrolysiert und schließlich als Oxalsäure über die Nieren ausgeschieden (Baker 1969).

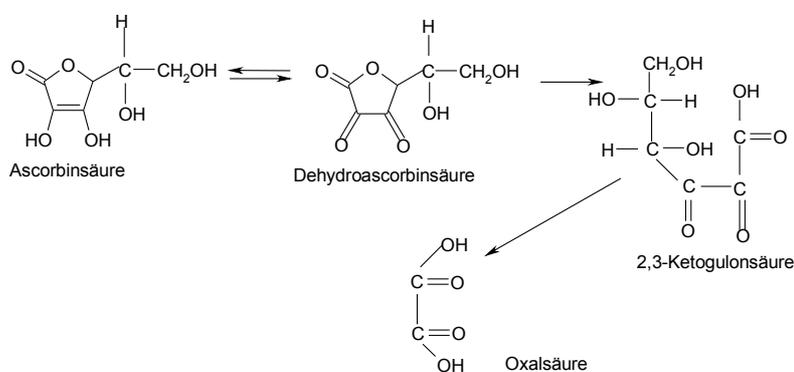


Abb. 3: irreversibler Metabolismus des Vitamin C. L-Ascorbinsäure wird zu Oxalsäure abgebaut.

Der Anteil der Dehydroascorbinsäure am Gesamt-Vitamin C im Blut wurde in früheren Arbeiten mit bis zu 40 % angegeben; neuere Studien deuten jedoch daraufhin, dass es sich dabei um ein Artefakt handelt, das bei der Probenbehandlung mit bestimmten Säuren auftritt (Koshiishi et al 1998, Sinha et al 1992).

Durch ihr starkes Reduktionsvermögen schützt die L-Ascorbinsäure das zweiwertige Eisen im aktiven Zentrum vieler Hydroxylasen sowie das zweiwertige Kupfer einiger Oxygenasen vor Oxidation und verhindert den Funktionsverlust dieser Enzyme. Vitamin C ist somit ein wichtiger Co-Faktor in Hydroxylierungsreaktionen der Kollagen-

(Peterkofsky et al 1991), Carnitin- (Rebouche 1991) und Cathecholaminsynthese (Levine et al 1991, Diliberto et al 1991) sowie im Tyrosinabbau. Ebenso ist es an der Hydroxylierung aromatischer Verbindungen und Karzinogenen beteiligt, die über Cytochrom P₄₅₀ in der Leber abgebaut werden (Löffler und Petrides 1998).

Im Gegensatz zu anderen Enzymen verlieren die Hydroxylasen der Kollagensynthese in Abwesenheit von Vitamin C ihre physiologische Funktionstüchtigkeit. Ohne den Co-Faktor Ascorbinsäure entfällt die Hydroxylierung der Lysin- und Prolinreste, die zur Stabilisierung der Kollagen-Tripelhelix notwendig ist, und es kommt zur Synthese eines minderwertigen und brüchigeren Kollagens. Blutungsneigung sowie Knochen- und Gelenkveränderungen sind die Folge und kennzeichnen das klinische Bild des L-Ascorbinsäuremangels, den Skorbut (Stryer 1995).

Eine weitere wichtige Funktion der L-Ascorbinsäure ist die Reduktion dreiwertigen Nahrungseisens zu zweiwertigem, dies erleichtert seine Resorption über die Darmschleimhaut (Mackenzie und Garrick 2005). Vitamin C fördert so die Eisenaufnahme und wird daher vielen therapeutischen Eisenpräparaten zugesetzt.

Die L-Ascorbinsäure schützt den Organismus indes auch vor reaktiven Sauerstoffmolekülen (reactive oxygen species, ROS) (Frei et al 1989 und 1988, Johnston et al 2001, Huang et al 2002, Lutsenko et al 2002). Diese können als Nebenprodukte der Atmungskette, der Cytochrom P₄₅₀-vermittelten Biotransformation und der β -Oxidation entstehen. Sie sind äußerst reaktionsfreudige Moleküle, die als oxidativer Stress Proteine, Lipide und Erbgut schädigen. Zu ihnen gehören Superoxidanion (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikal ($OH\cdot$).

Die Fähigkeit der L-Ascorbinsäure, sich durch Protonen- und Elektronenabgabe zum Ascorbatradikal zu wandeln und in dieser aggressiven Form mit anderen Radikalen zu reagieren, erklärt ihre vielbeschriebene Wirkung als Radikalfänger. Zudem ist sie in der Lage, andere Antioxidantien wie das Vitamin E in Membranen zu regenerieren, wenn diese zu Radikalen verbraucht wurden (Bisby et al 1995).

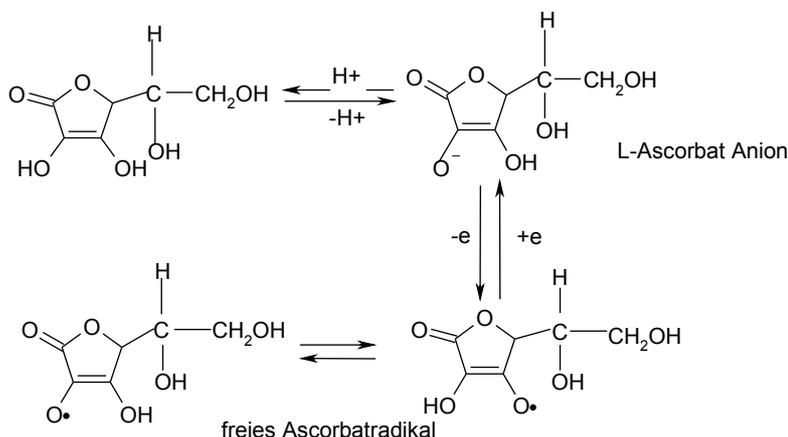


Abb. 4: Wandlung der L-Ascorbinsäure zum L-Ascorbatradikal

Obwohl ein möglicher pro-oxidativer Effekt der L-Ascorbinsäure diskutiert wird (Carr und Frei 1999, Berger et al 1997, Poulsen et al 1998, Levine et al 1998, Podmore et al 1998, Sowell et al 2004), gibt es darauf bisher nur wenige Hinweise (Podmore et al 1998, Hu et al 1997, Singh et al 1997, Lee und Blair 2001). *In vitro* kann Vitamin C in Gegenwart von freien Eisenionen oxidierend wirken (Koshiishi et al 1998); *in vivo* jedoch liegt Eisen unter physiologischen Bedingungen kaum frei vor, sondern ist an Proteine (Transferrin, Ferritin, Coeruloplasmin) gebunden. Zudem wird ein antioxidativer Effekt der Plasma-Harnsäure auf das Vitamin C angenommen (Sevanian et al 1991).

1.3 Vitamin C– Mangelsyndrome, ihre Ursachen und adäquate Vitamin C-Versorgung

Der klinisch manifeste L-Ascorbinsäuremangel ist der Skorbut. Bei einer Absenkung des L-Ascorbinsäurekörperpools auf weniger als 300 mg, die sich in sehr niedrigen L-Ascorbinsäureplasmakonzentrationen von $< 11 \mu\text{mol/l}$ widerspiegelt (Baker et al 1971, Kallner et al 1979, Hodges et al 1971), imponiert diese Hypovitaminose durch folliculäre Hyperkeratosen, Gingivitis und Blutungen in Gelenke, Herz- und Skelettmuskulatur, die zum Tode führen können. Hinzu kommen Appetitmangel, Gewichtsverlust, rasche Ermüdbarkeit und eine verschlechterte Wundheilung (Hodges et al 1969, Hodges et al. 1971, Baker et al. 1969, Baker et al 1971).

Grund für das eindrucksvolle Vollbild des Skorbut ist vor allem eine durch das Fehlen der enzymprotektiven Ascorbinsäure bedingte mangelnde Hydroxylierung des Prolins. Diese führt zur Synthese eines minderwertigen Kollagens und zu einer daraus resultierenden Gewebe- und Gefäßbrüchigkeit (Stryer 1995).

Bis Ende des 18. Jahrhunderts war der Skorbut ein gefürchtetes und weit verbreitetes Leiden, insbesondere unter Seefahrern, die sich oft wochenlang obst- und gemüsearm ernährten. Der schottische Marinearzt Dr. James Lind brachte 1753 durch einfache Experimente erstmals den Verzehr von frischen Früchten mit der Genesung einiger Skorbutkranker in Zusammenhang. Durch seine systematischen Untersuchungen wurde 40 Jahre später der Zitronensaft als unerlässlicher Bestandteil in die Rationen der britischen Seeleute aufgenommen (Bartholomew 2002).

Auch Möller und Barlow beschrieben Skorbutsymptome mit Störungen des Knochenwachstums bei Säuglingen und Kleinkindern, die lediglich mit Kuhmilch, die nur wenig Vitamin C enthält, ernährt worden waren (Rajakumar 2001).

Durch Gabe von 6,5-10 mg L-Ascorbinsäure täglich lassen sich die Symptome des Skorbut beheben und verhindern (Hodges et al 1969, Hodges et al 1971, Baker et al. 1969, Baker et al. 1971). Der Skorbut stellt eine ausgeprägte Hypovitaminose dar und tritt in westlichen Ländern nur noch selten auf. Nichtsdestotrotz ist es nach wie vor von großer Wichtigkeit, den Skorbut zu erkennen, da er unbehandelt zum Tode führt.

Häufig jedoch sind subklinische Formen, die mit unspezifischen Symptomen wie Müdigkeit, Appetitlosigkeit, Leistungs- und Abwehrschwäche einhergehen können und sich oft nur anhand von niedrigen L-Ascorbinsäureplasmaspiegeln ($< 28 \mu\text{mol/l}$) nachweisen lassen. Große Populationsstudien in den USA demonstrierten einen Vitamin C-Mangel (Plasmaspiegel von $< 11 \mu\text{mol/l}$) in 6-10 %, eine Vitamin C-Unterversorgung (Plasmaspiegel $< 28 \mu\text{mol/l}$) in 13-30 % der Bevölkerung (Johnston et al 1998, Hampl et al 2004, Wrieden et al 2000).

Die Ursachen für erniedrigte Vitamin C-Plasmaspiegel sind vielfältig. In einigen Bevölkerungsgruppen können sie auf eine ungenügende Zufuhr zurückgeführt werden, so bei Anorexie oder einseitigen, obst- und gemüsearmen Diäten, was insbesondere bei älteren Menschen der Fall sein kann (Wrieden et al 2000). Erhöhte L-Ascorbinsäureverluste sind bei dialysepflichtigen Menschen häufig (Morena et al 2002, Chazot et al 2001), während ein Mangel durch nicht gedeckten erhöhten Bedarf bei Schwangeren, Stillenden und Rauchern (Johnston et al 1998, Bruno et al 2005) auftreten kann. Vor allem chronisch entzündliche Erkrankungen wie Morbus Crohn (Wendland et al 2001, Geerling et al 1998) und rheumatoide Arthritis (Pattison et al 2003) aber auch Diabetes mellitus (Johnston et al 1998, Sargeant et al 2000) und Gefäßerkrankungen wie die periphere arterielle Verschlusskrankheit (Langlois et al 2001) oder die Koronare Herzkrankheit (Clejan et al 2002, Johnston et al 1998) können mit erniedrigten Ascorbinsäureplasmaspiegeln assoziiert sein.

Die tägliche L-Ascorbinsäuredosis für eine optimale Vitaminversorgung ist unbekannt und wird kontrovers diskutiert. Es verdichten sich die Hinweise, dass die empfohlene Vitamin C- Aufnahme von 75 mg/d für Frauen und 90 mg/d für Männer (RDA; <http://www.iom.edu/Object.File/Master/7/296/webtablevitamins.pdf>), bzw. 100 mg/d für beide Geschlechter (DGE; <http://www.dge.de/pdf/ws/ReferenceValues.pdf>) zwar durchaus ausreicht, um Anzeichen von Skorbut zu verhindern, jedoch weit unter der Dosis liegt, die möglicherweise einen Nutzen in der Prävention und Bekämpfung vieler Erkrankungen bringen könnte.

Verfechter einer präventiven und therapeutischen Vitamin C-Hochdosisgabe von mehreren Gramm pro Tag war Linus Pauling, der zwar in seinem Buch „Vitamin C und der Schnupfen“ eine besondere Wirksamkeit in verschiedenen Studien beschrieb

(Pauling 1971 und 1972), deren Ergebnisse jedoch zum Teil bis heute nicht reproduziert werden konnten.

Tatsächlich aber haben Experimente an den Affenarten *Papio ursinus* und *Cercopithecus aethiops*, die wie der Mensch nicht fähig sind Vitamin C zu synthetisieren, gezeigt, dass die Tiere täglich 10-35 mg L-Ascorbinsäure/kgKG benötigten, um den Vitamin C-Plasmaspiegel zum Zeitpunkt ihrer Gefangennahme zu halten, bzw. um während der Gefangenschaft gesund zu bleiben. Diese Experimente an in freier Wildbahn gefangenen Tieren war für die Versuchsaafften allerdings mit großem physischen und psychischen Stress verbunden, der möglicherweise zu einem stark erhöhten Vitamin C-Verbrauch führte (DeKlerk et al 1973 a, DeKlerk et al 1973 b). Im Gegensatz dazu liegt die empfohlene Aufnahme beim Menschen bei etwa 0,9-1,5 mg/kgKG pro Tag (60 bzw. 100 mg/d).

Die dieser Empfehlung zugrunde liegenden Untersuchungen beziehen sich dabei auf den Vitamin C-Stoffwechsel unter oder im Anschluss an skorbutische Bedingungen (Hodges et al 1969, 1971, Baker et al 1969, 1971, Kallner et al 1979).

Neuere Studien untersuchten die Pharmakokinetik des Vitamin C genauer und demonstrierten eine Bioverfügbarkeit von 100% bei einmaliger oraler Gabe von 200 mg, eine Sättigung von Granulo-, Mono- und Lymphozyten bei 100 mg, eine Plasmasättigung bei 1 g und ein maximales Plasmaplateau bei 200 mg L-Ascorbinsäure pro Tag. Die Autoren dieser Studien halten daher eine tägliche Vitamin C-Zufuhr von 200 mg für angemessen (Levine et al 1996 und 2001).

Nach Auswertung zahlreicher Arbeiten zur Sicherheit und Verträglichkeit von Vitamin C konstatierten Hathcock et al eine unbedenkliche, tolerierbare tägliche Höchstdosis von 2000 mg bei gesunden Menschen (Hathcock et al 2005).

Bemerkenswert ist, dass Vitamin C-Plasmakonzentrationen nach oraler Zufuhr auch bei Grammdosen Werte von etwa 120 µmol/l kaum überschreiten, wohingegen sich bei intravenöser Gabe derselben Dosis 8- bis 100-fach höhere Konzentrationen im Plasma nachweisen lassen (Padayatty et al 2004). Von besonderem Interesse ist diese Tatsache in der Krebsforschung, da L-Ascorbinsäure in sehr hoher Konzentration *in vitro* zytotoxisch auf maligne Zellen wirkt (Chen et al 2005, Zhang et al 2002).

Eine andere Herangehensweise zur Bestimmung einer optimalen Vitamin C-Dosis ist die Messung von Markern, die oxidativen Stress im Organismus repräsentieren. Ein maximaler antioxidativer Effekt der L-Ascorbinsäure bei Gesunden wird bei einer oralen Zufuhr von 150 mg (Frei et al 1989) bis zu 500-1000 mg pro Tag (Johnston et al 2001) angegeben.

1.4 Vitamin C in Prävention und Therapie

Viele epidemiologische Studien deuten darauf hin, dass eine erhöhte Aufnahme von Antioxidantien mit einem verminderten Auftreten vieler chronischer Krankheiten einhergeht. Dies führt man auf den Schutz von Biomolekülen wie DNA (Fraga et al 1991), Lipiden (Retsky et al. 1993) und Proteinen (Jacques et al 1997, Hankinson et al 1992) vor oxidativen Schäden zurück.

So scheinen die in der Bildung von atherosklerotischen Plaques eine zentrale Rolle spielenden Makrophagen bevorzugt oxidierte LDL-gebundene Cholesterinester aufzunehmen. Es kommt zur massenhaften Aufnahme von oxidiertem LDL und so zur Bildung von Schaumzellen (Fogelmann et al 1980, Henriksen et al 1981). Diese lagern sich subendothelial ein (Quinn et al 1987) und wirken zytotoxisch auf die Gefäßzellen (Morel et al 1983). Antioxidantien wie das Vitamin C sind in der Lage, die Lipidperoxidation des LDL zu verhindern (Retsky et al 1993). Dies könnte erklären, weshalb in vielen Studien der Konsum hoher Vitamin C-Dosen bei Probanden zur Senkung ihrer kardiovaskulären Ereignisse wie Hirn- oder Herzinfarkt führte (Gale et al 1995, Nyssönen et al 1997, Khaw et al 2001). Auch eine Minderung der Leukozytenadhäsion am Endothel, welche insbesondere bei Rauchern zur Pathogenese der atherosklerotischen Veränderungen beiträgt, konnte unter L-Ascorbinsäuresubstitution gezeigt werden (Lehr et al 1994, Weber et al 1996). Ebenso stützen die negative Korrelation zwischen Gerinnungsfaktoren wie Fibrinogen und Faktor VII und dem Ascorbinsäurespiegel im Blut (Khaw und Woodhouse 1995) die Hypothese ihrer herz- und gefäßprotektiven Eigenschaften.

Hohe Vitamin C-Konzentrationen finden sich indes vor allem in Organen, die vermehrt oxidativem Stress ausgesetzt sind. Dazu gehört insbesondere das Auge, welches durch chronische UV-Licht- und Sauerstoffexposition gefährdet ist. Die Oxidation von Linsenproteinen, die im Alter zunimmt, während die Antioxidantienkonzentration im Auge abnimmt, wird unter anderem für Kataraktentstehung verantwortlich gemacht. Die oxidierten Proteine häufen sich an, lagern sich zusammen, fallen aus und führen zu einer zunehmenden Trübung der Linse (Taylor et al 1993). Auch die Oxidationsprodukte der L-Ascorbinsäure reagieren mit den Linsenproteinen und sind somit an ihrer Trübung beteiligt (Ortwerth et al 2003). Offenbar überwiegt aber der protektive Effekt des Vitamin C, denn in vielen Studien zeigte sich bei verstärktem Vitamin C-Konsum ein vermindertes Fortschreiten der altersbedingten Linsenveränderungen (Jacques et al 1997, Hankinson et al 1992, Taylor et al 2002, Valero et al 2002).

Auch Leukozyten enthalten im Vergleich zum Plasma bis zu 100 mal höhere L-Ascorbinsäurekonzentrationen (Washko et al 1991), die im Verlauf vieler Erkrankungen

absinken können. Neutrophile und andere Entzündungszellen enthalten reaktive Sauerstoffverbindungen, die der oxidativen Zerstörung von Mikroorganismen dienen und auch an die unmittelbare Umgebung abgegeben werden können („respiratory burst“) (Tauber und Babior 1977). Der Ausstoß dieser aggressiven Verbindungen führt bei Infektionen des oberen Respirationstraktes zur Zerstörung der infizierten Epithelien, während die meisten Erreger, wie z.B. Rhinoviren, selbst keine histologisch erkennbare Veränderung in den Wirtszellen bewirken. Der Angriff der Entzündungszellen ist demnach für die Symptome vieler Erkältungskrankheiten ausschlaggebend (Turner 1990). Unter forcierter Vitamin C-Aufnahme milderten sich in einigen Studien die Symptome und führten zu einer Abnahme der Krankheitstage (Pauling 1971); in anderen Untersuchungen konnte dagegen kein Effekt gezeigt werden (Audera et al 2001).

Obgleich viele Studien die Effekte von Vitamin C auf das Immunsystem untersuchten, gibt es bisher lediglich uneinheitliche und sich widersprechende Ergebnisse.

Neben der direkten Wirkung von L-Ascorbinsäure auf Entzündungszellen gibt es auch andere Hinweise auf ihre Einflussnahme auf das Immunsystem.

An Meerschweinchen konnten Haskell und Johnston zeigen, dass die Serumkonzentration des Komplementfaktors C1q (ein Hydroxyprolin-reiches Protein, das dem Kollagen strukturell sehr ähnlich ist) unter gewebesättigender Vitamin C-Fütterung deutlich höher war als unter skorbutischen Bedingungen (Haskell und Johnston 1991).

Eine auf 5-20 mg Vitamin C/d beschränkte Diät für 32 Tage führte bei Testpersonen zu einer signifikanten Senkung der Spättyp-Reaktion, welche ein wichtiges Maß für die allgemeine Immunkompetenz darstellt (Jacob et al 1991).

Da die Aufnahme von recyclebarer Dehydroascorbinsäure in die Zellen durch einen Glucose-Transporter vermittelt und durch hohe Blutzuckerspiegel gehemmt wird (Ngeekwong und Ng 1997, Washko et al 1991, Welch et al 1995), sind schlecht eingestellte Diabetiker besonders gefährdet, einen sogenannten „zellulären Skorbut“ zu entwickeln, bei dem die Vitamin C-Plasmakonzentrationen im Referenzbereich für Gesunde liegen können, die Zellen jedoch gleichsam erniedrigte Spiegel aufweisen (Cunningham 1998, Yamada et al 2004). Eine begleitende Vitamin C-Gabe zur Insulintherapie führte in verschiedenen Studien zu einer verbesserten Endothelfunktion (Ting et al 1996) und vermindertem oxidativem Stress bei Typ 2-Diabetikern (Evans et al 2003). Sargeant et al beschreiben in der EPIC–Norfolk-Studie sogar eine inverse Assoziation zwischen L-Ascorbinsäureplasmaspiegeln und dem HbA1c (Sargeant et al 2000).

Sehr umstritten ist die Wirkung von Vitamin C in der Krebsforschung. In einigen epidemiologischen Studien konnte eine inverse Assoziation zwischen L-Ascorbinsäurekonsum bzw. -Plasmaspiegeln und dem Risiko für die Entwicklung

maligner Erkrankungen wie Magenkarzinomen (Mayne et al 2001, You et al 2000, Yuan et al 2004) oder Harnblasenkarzinomen (Bruemmer et al 1996) gezeigt werden. Auch scheint die L-Ascorbinsäure *in vitro* auf bestimmte Krebszellen, nicht jedoch auf gesunde Zellen toxisch zu wirken (Zhang et al 2002, Chen et al 2005).

Gestützt wird die Hypothese eines protektiven Effektes durch Studien, bei denen es unter experimentell induzierter Hypovitaminosis C bei den Probanden unter anderem zu erhöhten Konzentrationen fäkaler Mutagene im Stuhl kam (Jacob et al 1991). Die Einnahme von Vitamin C bei gleichzeitiger Alkoholgabe oder bei Inhalation von Zigarettenrauch senkte den Biomarker für oxidativen Stress F2-Isoprostan im Blut (Dietrich et al 2002), bzw. im Urin (Meagher et al 1999). Möglicherweise spielt jedoch nicht nur die Reduktion von oxidativem Stress eine Rolle; zunehmend gibt es Hinweise, dass L-Ascorbinsäure auch an der Apoptoseregulation beteiligt sein könnte (Vissers et al 2001, Taper et al 2001, Catani et al 2002). Kritiker warnen allerdings vor der potentiell pro-oxidativen Wirkung der L-Ascorbinsäure und verweisen auf die Möglichkeit, dass Vitamin C unter bestimmten Umständen selbst DNA-Schäden hervorrufen kann (Lee et al 2001). Die Behandlung von Malignomen mit hochdosiertem Vitamin C bleibt in hohem Maße kontrovers (Padayatty and Levine 2000).

Die L-Ascorbinsäure sorgt des Weiteren nicht nur für eine gesteigerte Resorption des Nahrungseisens, tatsächlich erhöht sie auch die Eisenbioverfügbarkeit in den Zellen durch direkte Mobilisation aus Ferritin (Hoffmann et al 1991, Bienfait und van den Briel 1980). Eine besondere Rolle spielt daher die Vitamin C-Substitution bei Dialysepatienten mit pathologischem Eisenstoffwechsel. Zum einen werden bei der Hämodialyse große Anteile des Plasma-Vitamin C herausgefiltert und müssen anschließend substituiert werden (Morena et al 2002); zum anderen tritt bei fortgeschrittener Niereninsuffizienz häufig eine Anämie infolge ungenügender Erythropoese bei Mangel an gebildetem Erythropoetin auf, die mit Injektion von rekombinantem humanem Erythropoetin (rHuEpo) behandelt wird. Für die optimale Wirkung dieser Therapie muss im Organismus der Patienten genügend Eisen verfügbar sein, weshalb sie häufig mit Eisenpräparaten substituiert werden. Ein Problem entsteht allerdings bei bereits bestehender Eisenüberladung (> 500 µg/l Ferritin) der Patienten, bei denen das überschüssige Eisen jedoch nicht für die Erythropoese mobilisiert werden kann, so dass ein funktioneller Eisenmangel entsteht. Diese rHuEpo-Hyporesponder können zwar mit Eisenpräparaten behandelt werden, dies kann jedoch ihre Eisenüberladung verstärken. In einer Studie von Tarng und Huang konnte demonstriert werden, dass die intravenöse Applikation von 300 mg L-Ascorbinsäure dreimal wöchentlich über acht Wochen zu einem signifikanten Anstieg des Hämatokrit und zu einer Reduktion der benötigten rHuEpo-Dosis um 20 % bei diesen Patienten führte. Dahingegen resultierten in einer zwölf Wochen dauernden

konventionellen Eisentherapie keine signifikanten Änderungen dieser Parameter (Tang und Huang 1998). Auch Keven et al konnten einen positiven Effekt des Vitamin C auf die Erythropoese solcher rHuEpo-Hyporesponder feststellen (Keven et al 2005).

Von Nachteil ist dieser Effekt der gesteigerten Eisenbioverfügbarkeit durch Vitamin C jedoch bei Hämochromatosepatienten mit normaler Funktion der Erythropoese. Es sind Fälle beschrieben, bei denen durch Gabe von L-Ascorbinsäure ein oxidativer Schaden in den Geweben, vor allem am Herzen, begünstigt wurde, dies führte zu Arrhythmien und sogar Herzversagen (Nienhuis 1981). Dieser pro-oxidative Effekt des Vitamin C in Gesellschaft freier Metall-Ionen wird jedoch sehr kontrovers diskutiert und konnte in anderen Studien nicht gezeigt werden (Berger et al 1997, Chen et al 2000). Nichtsdestotrotz wird bei bestehender Hämochromatose eine Einschränkung des oralen Vitamin C-Konsums empfohlen, um die Eisenresorption im Darm gering zu halten. Aus diesem Grund und durch den vermehrten oxidativen Stress bei Eisenüberladung sind diese Patienten zur Entwicklung einer Hypovitaminosis C prädestiniert.

1.5 Unerwünschte Nebenwirkungen und Kontraindikationen

Die L-Ascorbinsäure ist bemerkenswert atoxisch und verursacht auch in exzessiven oralen oder intravenösen Dosen nur selten Nebenwirkungen, da Überschüsse des wasserlöslichen Vitamins nach Erreichen der Plasmasättigung unverändert über die Nieren ausgeschieden werden können. Eine gelegentlich beobachtete unerwünschte Wirkung nach hohen oralen Dosen ist eine (osmotisch bedingte) Diarrhoe, die durch gleichzeitige Nahrungsaufnahme verhindert werden kann. Immer wieder werden in der Literatur auch Fälle von Oxalatsteinbildung mit übermäßiger Vitamin C-Zufuhr in Verbindung gebracht (Mashour et al 2000, Massey et al 2005), da L-Ascorbinsäure zu Oxalsäure abgebaut werden kann.

Da es sich bei der L-Ascorbinsäure um ein Vitamin, also um einen essentiellen Nährstoff, handelt, ist eine absolute Kontraindikation für die Aufnahme von Vitamin C per definitionem nicht möglich. Es gibt jedoch relative Kontraindikationen, die einen zurückhaltenden oder stark eingeschränkten Verzehr gebieten. Zu diesen gehören insbesondere Patienten mit Oxalatsteinanamnese sowie Patienten mit Eisenspeichererkrankungen (s. Kap. 1.4). Eine intravasale Hämolyse wurde bei Patienten mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel beschrieben, wenn diesen Ascorbinsäure i.v. oder in einer Dosis von > 6 g oral verabreicht wurde (Levine et al 1999).

Trotz der negativen Korrelation von L-Ascorbinsäureverzehr mit der Schwere der Symptomatik vieler Erkrankungen ist zu bedenken, dass Vitamin C unter bestimmten Umständen einen unerwünschten, pro-oxidativen Effekt gezeigt hat. Daher ist eine uneingeschränkte Substitution von mehreren Gramm auch bei Gesunden kritisch zu betrachten und kann ohne neue, klare Ergebnisse in der Forschung nicht empfohlen werden (Levine et al 1999).

1.6 Übersicht zur bisherigen Vitamin C- Plasmaspiegelbestimmung

Seit der Isolierung der Ascorbinsäure 1928 durch Szent-Györgi wurden eine Reihe von Messmethoden zu ihrer Bestimmung entwickelt; diese umfassen spektrophotometrische, enzymatische (Lee et al 1997, Liu et al 1982), chromatographische (Nagy und Degrell 1989, Bode und Rose 1988, Iriyama et al 1984, Liao et al 1991, Iwase und Ono 1994, Ross 1994, Tanishima und Kita 1993, Kutnik et al 1987) und elektrochemische (Kumar et al 2006) Analyseverfahren.

Dabei stellt die Messung von Vitamin C- Konzentrationen in biologischen Flüssigkeiten hohe Anforderungen an die technische und zeitliche Bearbeitung. Da es sich bei der L-Ascorbinsäure um ein sehr instabiles Molekül handelt, das bei hohem pH, bei Raumtemperatur, unter Lichtexposition und in Gegenwart von reduzierbaren Substanzen rasch oxidiert, müssen Vitamin C-haltige Proben für eine Messung entsprechend stabilisiert und möglichst zeitnah untersucht werden (Isler et al 1988).

1.6.1 Allgemeine Einführung in die HPLC

Zu den sensitivsten analytischen Messmethoden gehört die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), ein chromatographisches Verfahren, bei dem eine flüssige oder in Flüssigkeit gelöste Probe mit Hilfe einer mobilen Phase (Eluent) über eine feste Phase (HPLC-Säule) transportiert, einzelne Komponenten der Probe über verschiedene Interaktionen mit der stationären Phase wie lipophile und Dipol-Wechselwirkungen unterschiedlich retentiert und so aufgetrennt und die Konzentrationen der getrennten Verbindungen über ein geeignetes Signal in einem Detektor gemessen werden.

Eine HPLC-Anlage besteht dementsprechend aus einem (isokratisches System) oder mehreren Lösungsmitteln (Gradientenelution), einer Pumpe, einem Probenaufgeber (Autosampler, Injektor), einer Säule und einem Detektor. Alle Komponenten sind über ein Kapillarsystem verbunden, das letztendlich in den Abfall mündet. Die Anlage verfügt

zudem über ein Interface, welches die Steuerung der Anlage und das Erfassen und Auswerten der Messdaten per Computer ermöglicht.

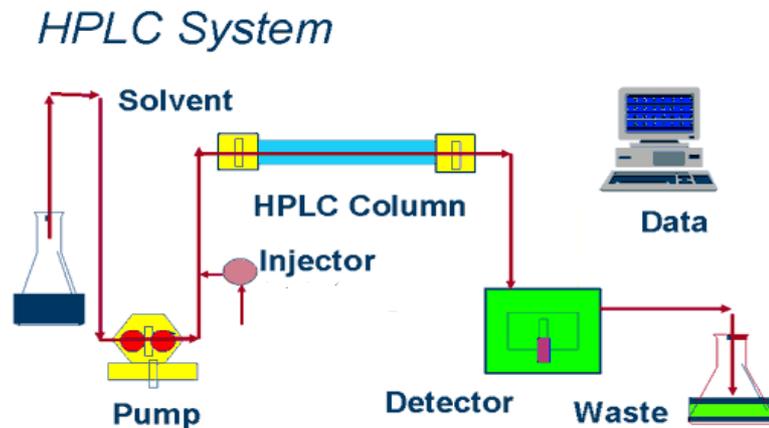


Abb. 5: Darstellung einer HPLC-Anlage mit mobiler Phase (Solvent), Pumpe (Pump), Einspritzsystem (Injector), Säule (HPLC Column), Detektor (Detector), Abfall (Waste) und angeschlossenem Computer zur Datenauswertung (Data) (http://www.chemistry.nmsu.edu/Instrumentation/Waters_HPLCSystem.gif).

Durch das unterschiedlich lange Zurückhalten der Verbindungen auf der festen Phase („Retentionszeit“) ist eine Identifizierung der Substanzen, also eine qualitative Analyse möglich.

Im Chromatogramm, der graphischen Darstellung des Detektorsignals (y-Achse) gegen die Zeit (x-Achse), erlaubt die Höhe des Ausschlages, der so genannte Peak, über Höhen- oder Flächenberechnung auch eine Konzentrationsbestimmung, also eine quantitative Analyse.

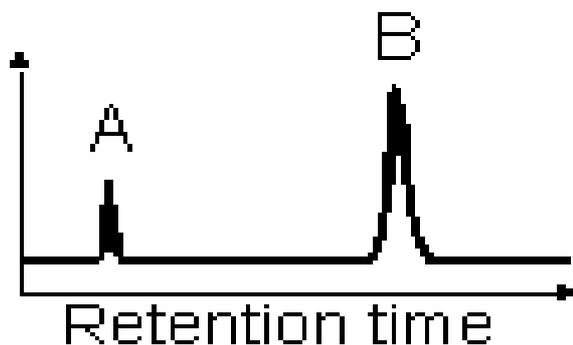


Abb.6: Beispiel eines Chromatogramms. Höhe des Ausschlages (y-Achse) ist gegen die Zeit (x-Achse) aufgetragen (Retentionszeit (Retention time)). A und B zeigen zwei unterschiedlich hohe Peaks.

1.6.2 Normalphasen-, Umkehrphasen-, Ionpaar- und Ionenaustausch-Chromatographie

Die HPLC-Säule, das Kernstück des Systems, trennt die Komponenten einer Probe auf, während die mobile Phase (der Puffer) als Lösungs- und Fließmittel dient, das die stationäre Phase mit der Probe benetzen, sie aber auch wieder vollständig von der Säule eluieren soll ohne selbst mit der Probesubstanz zu reagieren. Entsprechend den Eigenschaften der Probe wird ein Puffer verwendet, in dem sie sich löst (demnach ein hydrophiler, polarer Puffer für eine hydrophile zu messende Substanz), während die Säule als stationäre Phase die Probe möglichst kurz retenieren und von anderen Verbindungen trennen und daher konträre Eigenschaften besitzen sollte (z.B. eine apolare Säule für eine polare zu messende Verbindung).

In der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie unterscheidet man daher im Prinzip vier Unterformen: die Normalphasen-Chromatographie (hydrophile, polare Säule mit apolarem Puffer), die Umkehrphasen- oder reversed phase-Chromatographie (hydrophobe, apolare Säule mit polarem Puffer), die reversed phase-Ionenpaar-Chromatographie (bei der dem Puffer ein organisches Salz, das Ionenpaarreagenz, zugesetzt wird um ionische Substanzen aufzutrennen) und die Ionenaustausch-Chromatographie, bei der geladene, ionische Substanzen durch elektrische Wechselwirkungen mit der Säule getrennt werden (Heisz 1986).

1.6.3 Interne und externe Standards

Um unbekannte Vitamin C-Konzentrationen zuverlässig bestimmen zu können, ist eine Kalibrierung der Methode mit einem externen und einem internen Standard nötig. Bei der Kalibrierung mit externem Standard werden definierte Konzentrationen der Reinsubstanz säulenchromatographisch analysiert. Trägt man die gemessenen Peakflächen gegen die Konzentrationen auf, erhält man eine Kalibriergerade, mit deren Hilfe sich Konzentrationen der betreffenden Substanz in einer unbekannt Probe berechnen lassen. Da die Kalibrierung mit separaten Standardlösungen vor oder nach den Probeläufen vorgenommen wird, spricht man von einer externen Kalibrierung. Ein interner Standard hingegen wird der Probe zu Beginn der Aufarbeitung direkt zugesetzt. Da der interne Standard dieselben analytischen Schritte wie die Probe durchläuft, können auftretende Fehler bei der Trennung, Dosierung oder Extraktion so rechnerisch kompensiert werden, da seine Konzentration bekannt ist. Ein interner Standard sollte mit der zu messenden Probesubstanz chemisch verwandt sein und ähnliche chromatographische Eigenschaften besitzen. Ferner sollte er eine dem Analyten ähnliche Retentionszeit besitzen und nicht von anderen Peaks überlagert werden, also an einer freien Stelle des Chromatogramms erscheinen. Ebenso sollte er sich bei der Aufarbeitung ähnlich verhalten wie der Analyt und nicht mit ihm, anderen Komponenten der Probe oder in der Analyse verwendeten Verbindungen reagieren, also bei der Probenvorbereitung und unter den chromatographischen Gegebenheiten stabil sein.

Unter Verwendung von internem und externem Standard wird eine HPLC-Methode kalibriert, indem unterschiedliche Konzentrationen eines externen Standards zusammen mit einer festen Konzentration eines internen Standards in einem definierten Volumen in die HPLC-Anlage injiziert und dort analysiert werden.

Die aufwändige Kalibration und Auswertung mit internem Standard wird immer dann benutzt, wenn eine hohe Richtigkeit der Messung verlangt wird und wenn eine Probenvorbereitung mit möglichen Verlusten verbunden ist (Heisz 1986, Bliesner 2006).

1.6.4 Validierung einer HPLC-Methode

Vor der Routineanwendung einer HPLC-Methode müssen ihre Leistungsparameter ermittelt, beschrieben und überprüft werden. Zu diesen gehören u. a. : Selektivität bzw. Spezifität, Mess- bzw. Linearitätsbereich, Nachweisgrenze (Detection Limit) und Bestimmungsgrenze (Quantification Limit), Präzision (Reproduzierbarkeit) und Wiederholbarkeit, Richtigkeit (Wiederfindung), Robustheit.

Die Selektivität ist ein Maß dafür, wie gut ein Analyt in einer komplexen Probe ohne Störungen durch andere Analyte oder die Probenmatrix gemessen werden kann. Eine Methode, die vollkommen selektiv für einen Zielanalyten ist, bezeichnet man als spezifisch.

Der Messbereich ist der Konzentrationsbereich, in dem der Analyt mit akzeptabler Richtigkeit und Präzision gemessen werden kann. Er sollte normalerweise den Konzentrationsbereich abdecken, der in den entsprechenden Proben zu erwarten ist.

Die Linearität wird mit Proben oder Standards ermittelt, deren Konzentrationen den geforderten Arbeitsbereich der Methode umfassen. Bei nichtlinearen Zusammenhängen zwischen Detektorsignal und Analytkonzentration sind entsprechende Algorithmen zu definieren.

Die Empfindlichkeit ist der kleinste Unterschied der Analytenkonzentration, der mit der Methode bestimmbar ist, und wird durch die Steigung der Kalibrationskurve dargestellt.

Die Nachweisgrenze (Detection Limit) ist die niedrigste Konzentration, die sich noch vom Nullwert signifikant unterscheidet. Bei der HPLC ist dies der Fall, wenn das Signal (der Peak) etwa 2-3 mal größer ist als das Basislinienrauschen.

Die Präzision (Reproduzierbarkeit) einer Methode ist die Angabe der Übereinstimmung von unabhängigen Messergebnissen innerhalb einer Methode, die als Variationskoeffizient oder Standardabweichung in der Serie angegeben und durch wiederholte Injektion aus einer Probe ermittelt wird.

Für die Wiederholbarkeit werden Mittelwerte aus kleinen Serien in kurzen Zeitabständen (Tagen) miteinander verglichen (identisches Material, Gerät, Labor etc.).

Die Richtigkeit (Wiederfindung) einer Methode ist die Übereinstimmung mit dem wahren Wert und kann nur mit Hilfe von Referenzstandards ermittelt werden. Die Wiederfindung ist dann die Abweichung in Prozent vom wahren Analytenwert.

Die Robustheit beschreibt die Anwendbarkeit einer Methode unter anderen Bedingungen, z.B. in anderen Labors mit anderen Anlagen und ihre Anfälligkeit für Störungen. Eine Methode gilt dann als robust, wenn ihre Ergebnisse durch kleine Störungen wie pH des Puffers oder Temperatur nicht beeinträchtigt werden (Heisz 1986, Bliesner 2006).

1.6.5 HPLC-Methoden zur Vitamin C-Plasmaspiegelbestimmung in der Literatur

In der Literatur werden verschiedene Verfahren zur Vitamin C-Analyse mittels HPLC beschrieben, die sich in Komplexität, Schnelligkeit der Analyse, Detektionsart, Sensitivität und Möglichkeiten der Stabilisierung der Proben deutlich unterscheiden.

Insbesondere die reversed phase- und die Ionenaustauscher-Chromatographie dominieren in den letzten 15 Jahren die Erfassung von L-Ascorbinsäurekonzentrationen

in biologischen Flüssigkeiten. Die beiden üblichen Detektionsarten sind dabei die UV- und die elektrochemische Detektion.

Sowohl die Ionenaustauscher- als auch die reversed-phase-HPLC wird häufig in Kombination mit Phosphatpuffern bei einem sauren Puffer-pH verwendet. In wässriger Lösung ist das Vitamin C eine zweibasige Säure, mit $pK_{a1} = 4,17$ am C2- und $pK_{a2} = 11,57$ am C3-Atom. Als Folge der Dissoziation tritt in wässriger Lösung eine pH-Abhängigkeit ihrer elektrochemischen und UV-Absorptions-Eigenschaften auf. Bei einem pH von 2 liegt die L-Ascorbinsäure demzufolge zu >99 % als undissoziierte Form mit einem Absorptionsmaximum bei 243 nm; bei pH 7 dagegen liegt sie zu >99 % als Monoanion mit einem Absorptionsmaximum bei 265 nm vor (Isler et al 1988). Auch die elektrochemische Detektion, die auf dem Messen von Redoxprozessen beruht, wird durch den pH-Wert beeinflusst. Aus diesem Grund finden sich in der Literatur große Unterschiede hinsichtlich des Puffer-pH und der Detektionsart. Während einige Methoden sich bei höheren pH-Werten zwischen 4 und 6,8 (Iwase und Ono 1994, Ross 1994, Tanishima und Kita 1993, Kutnik et al 1987) in Kombination mit UV Messungen bei 262 nm und elektrochemischer Detektion bei + 0,3 V bis + 0,50 V bewegen, verwenden andere pH-Werte unter 3,5 (Nagy und Degrell 1989, Bode und Rose 1988, Iriyama et al 1984, Liao et al 1991) mit Messungen bei 245 nm bzw. zwischen + 0,70 V und + 0,8 V.

Zwar besitzen die meisten in der Literatur beschriebenen Methoden ähnliche Kenndaten bezüglich ihrer Sensitivität, Präzision, Nachweisgrenze, Linearität und Richtigkeit, jedoch sind diese Angaben meist unvollständig (Nagy und Degrell 1989, Bode und Rose 1988, Ross 1994, Hatch und Sevanian 1984, Iriyama et al 1984, Liao et al 1991, Tanishima und Kita 1993). Auch beziehen nur wenige Methoden einen internen Standard in die Messung ein (Kutnik et al 1987, Iwase und Ono 1994).

Weiterhin beschäftigen sich nur wenige Arbeiten ausführlicher mit der Haltbarkeit der Vitamin C-Proben, obwohl die Ascorbinsäure als Antioxidans für ihre Instabilität bekannt ist. Zu den Faktoren, welche die Stabilität positiv beeinflussen, gehören dabei insbesondere ein saures Milieu, Lichtschutz, niedrige Temperatur und der Zusatz eines stabilisierenden Agens.

Oft wird nur eine Haltbarkeit der Proben von wenigen Tagen beschrieben (Iriyama et al 1984, Bode und Rose 1988, Liao et al, Tanishima und Kita 1993, Iwase und Ono 1994), wobei die Proben häufig nur bei einer bestimmten Temperatur (Raumtemperatur, 4 ° C oder Minusgraden) untersucht wurden.

Die üblichsten Stabilisatoren sind dabei EDTA und meta-Phosphorsäure (MPA), wobei das EDTA meist direkt bei der Probengewinnung über Blutabnahmeröhrchen hinzugegeben wird. Doch auch der Einfluss des Untersuchungsmaterials wird häufig nur unzureichend überprüft. Die meisten Methoden verwenden hierfür entweder EDTA- (Liao

et al 1991, Kutnik et al 1987) oder Heparin-Plasma (Iwase und Ono 1994, Ross 1994), aber auch Serum findet in einigen Fällen Anwendung (Iriyama et al 1984, Hatch und Sevanian 1984).

Zudem wurden in den meisten Fällen keine methodenspezifischen Referenzwerte ermittelt. Wenn jedoch Referenzwerte erstellt wurden, so häufig mit einer geringen Anzahl von Probanden, keiner Angabe zum Geschlecht sowie mit einer bestimmten Altersgruppe. Kutnik et al erwähnen beispielsweise nur sechs gesunde Probanden (Kutnik et al 1987), während Tanishima und Kita 20 männliche und 20 weibliche Probanden im Alter von 19 bis 28 Jahren angeben (Tanishima und Kita 1993).

Die Möglichkeit, die vorhandene Methode auch für andere biologische Flüssigkeiten wie Liquor cerebrospinalis oder Urin einzusetzen, wird ebenfalls nur in wenigen Studien in Betracht gezogen (Bode und Rose 1988, Hatch und Sevanian 1984).

1.6.6 Methode zur Vitamin C-Plasmaspiegelbestimmung nach Liau et al.

Von Liau et al wurde eine praktikable Methode zur Messung von Plasma-Ascorbinsäure mit UV- bzw. elektrochemischer Detektion beschrieben. Als mobile Phase wurde 20 mM Ammoniumdihydrogenphosphat mit 0,015 % MPA, als stationäre Phase eine Partisphere 5 C18 (110 x 4.7 mm) Säule mit einer Vorsäule (GuardCartridge) verwendet. Das Stabilisans und Präzipitans war ein Gemisch aus 10 % Perchlorsäure und 1 % meta-Phosphorsäure. Bei einer Messzeit von 5 min betrug die Retentionszeit des Vitamin C etwa 2 min. Den Angaben der Autoren zufolge waren die Vitamin C-Standards bei -20°C drei Tage, Vitamin C - Plasmaproben versetzt mit einem Stabilisator waren bei -20°C sechs Tage stabil (Liau et al 1991).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die von Liau et al beschriebene HPLC-Methode zur Plasma-Ascorbinsäuremessung sollte zuerst reproduziert und dann den Bedürfnissen und Gegebenheiten des Zentrallabors angepasst werden.

Ziel dieser Arbeit war eine Optimierung der HPLC-Messmethode für Plasma-Vitamin C nach Liau et al insbesondere durch:

- Verbesserung der Auflösung
- Charakterisierung der Nachweisgrenze, der Linearität, der Präzision und der Richtigkeit der Messungen
- Einführung eines internen Standards

- Systematische Untersuchung zur Stabilität der Proben in verschiedenen Medien
- Erstellen von Referenzwerten für verschiedene Altersgruppen
- Untersuchung der Vitamin C-Kinetik an gesunden Probanden

Zusätzlich sollte überprüft werden, ob sich die optimierte Methode grundsätzlich auch für die Bestimmung von Vitamin C in anderen biologischen Flüssigkeiten, insbesondere in Urin und Liquor cerebrospinalis, eignet.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte, Untersuchungsmaterialien, Chemikalien

2.1.1 Geräte

HPLC-System:

- L-6220 Intelligent Pump (Merck Hitachi)
- D-6000A Interface (Merck Hitachi)
- AS-2000A Autosampler (Merck Hitachi)
- Degasser (Knauer)
- L-4250 UV-VIS Detector (Merck Hitachi)
- Amperometric Detector L-3500A (Merck Recipe)

HPLC-Säule und Vorsäule:

- Synergi 4µm Hydro-RP 80A 150 x 4,6 mm (Phenomenex 00F-4375-E0)
- SecurityGuard Guard Cartridges Kit, AQ-C18 Cartridge 4 x 3,0 mm (Phenomenex AJ0-7511)

HPLC-Software:

- Model D-7000 Chromatography Data Station Software HPLC System Manager (Merck)

Filtrationsanlage:

- Vakuum-Filtrationsvorrichtung (Millipore)
- Cellulose Acetate Filter 0,2 µm Porengröße (Sartorius AG 11107-47-N)

Sonstige Geräte:

- pH-Meter (Mettler Delta 345)
- Vortex Mischer
- Waage (Mettler Toledo Ag 241)
- Ultraschallbad

2.1.2 Seren, Plasmen, Liquor und Urin

Seren und Plasmen:

Für die Methodenentwicklung und -validierung wurden Restseren und –plasmen, -urine und -liquores aus der Routineanalytik des Zentrallabors des Universitätsklinikums

Schleswig-Holstein am Campus Lübeck eingesetzt, die nach vollständiger Bearbeitung des Untersuchungsauftrages zur Entsorgung freigegeben worden waren. Für die Ermittlung der Referenzbereiche und die pharmakokinetischen Untersuchungen wurde Vollblut von Blutspendern eingesetzt, das für eine routinemäßige Ferritinbestimmung in handelsüblichen Serum-, Heparinplasma- oder EDTA-Plasma-Monovetten (Sarstedt) mittels Venenpunktion gewonnen wurden. Aliquote des Plasmas wurden innerhalb von 45 Min lichtgeschützt auf Eis ins Labor transportiert und dort sofort zentrifugiert (10 min bei 3600 g). Das Serum bzw. Plasma wurde umgehend in Sekundärgefäße überführt, mit meta-Phosphorsäure enteiweißt und stabilisiert und bis zur Analyse verschlossen und lichtgeschützt bei -80 °C gelagert. Bei dieser Temperatur und Behandlung sind die Proben einige Tage stabil (Liau et al. 1993). Ebenso wurde auch Spontanurin mit einem meta-Phosphorsäure-Perchlorsäure-Gemisch stabilisiert und bis zur Analyse verschlossen und lichtgeschützt bei -80 °C gelagert. Um Vitamin C- freies Plasma zu erhalten, wurden Reste bereits vollständig bearbeiteter Plasmaproben aus dem Routinebetrieb des Zentrallabors gesammelt und mehr als vier Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen. Um mögliche Ascorbinsäure-Restkonzentrationen im Plasma zu erfassen, wurde eine Leerprobe des Plasmas mitgemessen.

2.1.3 Chemikalien

- meta-Phosphorsäure, p.a. (Merck KGaA 100546)
- Ammoniumdihydrogenphosphat, p.a. (Merck KGaA 101207)
- Perchlorsäure 70-72%, p.a. (Merck KGaA 100519)
- L(+)-Ascorbinsäure, p.A. (Mallinckrodt Baker 1018)
- 3-Amino-4-hydroxybenzoesäure (Fluka AG 08110)
- Acetonitril HPLC grade (J.T. Baker 8004)
- N-Methyl-Dopamin (Fluka AG H3132)
- Gulonsäure- γ -lacton (Fluka AG 49120)
- 1,4-Dihydroxybenzol (Hydrochinon) (Merck KGaA 8223330)
- DL-p-Hydroxyphenylmilchsäure (Sigma-Aldrich H3253)
- 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure (Sigma-Aldrich 53650)
- 3-Hydroxy-4-Methoxybenzoesäure (Isovanillinsäure) (Sigma-Aldrich 220108)
- Orthophosphorsäure p.a. (Merck KGaA 100573)

Vitamin C Präparate:

- L-Ascorbinsäure 500 mg Tabletten (Wörwag Pharma 0652234)
- L-Ascorbinsäure Injektionslösung, Ampulle 500 mg/ 5 ml (Wörwag Pharma 3568847)

Vitamin C-Kontrollen:

- Vitamin C Plasma Control Level I + II, lyophilised (Chromsystems GmbH 0074)

2.2 Methodenaufbau und -optimierung zur Messung des Plasma- und Serum-Vitamin C

2.2.1 Herstellung der mobilen Phase

Für den HPLC-Puffer (20 mM Ammoniumdihydrogenphosphat mit 0,015 % meta-Phosphorsäure) wurden 2,3 g Ammoniumdihydrogenphosphat und 0,15 g Metaphosphorsäure abgewogen, in 900 ml Aqua dest gelöst, mit Hilfe von Orthophosphorsäure auf den gewünschten pH eingestellt und dann mit Aqua bidest auf 1000 ml aufgefüllt.

Die mobile Phase wurde mit einer Millipore-Anlage vakuumfiltriert und anschließend 10 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Um den Einfluss des pH-Werts auf die Retentionszeit der L-Ascorbinsäure und die chromatographische Auflösung der HPLC-Methode mit elektrochemischer und UV-Detektion zu studieren, wurde die mobile Phase auf folgende pH-Werte eingestellt: 2,55; 2,65; 2,95; 3,10.

2.2.2 Herstellung des Präzipitans und Stabilisans:

Zur Enteiweissung und Stabilisierung der Proben wurde eine wässrige Lösung aus 10 % Perchlorsäure mit 1 % meta-Phosphorsäure hergestellt: 5 g meta-Phosphorsäure wurden zu 71,43 ml 70 %-iger Perchlorsäure gegeben, das Gemisch mit Aqua dest auf 500 ml aufgefüllt.

2.2.3 Herstellung der Vitamin C-Standards und –Kontrollen:

10 mg L-Ascorbinsäure wurden abgewogen und nach Liau et al in 10 ml mobiler Phase gelöst, um die Stammlösung eines Vitamin-C-Standards zu erhalten. Diese wurde im Verhältnis 1:50 mit einem Gemisch aus 1 % meta-Phosphorsäure und 10 % Perchlorsäure (MPA/PCA) (► Standard 5) verdünnt. Anschließend wurde Standard 5 1:2 (► Standard 4), Standard 4 1:2 (► Standard 3), Standard 3 ebenso 1:2 (► Standard 2) und Standard 2 1:5 (► Standard 1) mit MPA/PCA verdünnt.

10 ml Stammlösung. (Ascorbinsäure)			
↓			
Arbeitslösung = 20 µl (Verdünnte Stammlösung)	+	980 µl MPA/PCA	
↓			
Standard 5 =	100 µl (Arbeitslösung)	+	100µl MPA/PCA
↓			
Standard 4 =	100 µl (Standard 5)	+	100 µl MPA/PCA
Standard 3 =	100 µl (Standard 4)	+	100 µl MPA/PCA
Standard 2	100 µl (Standard 3)	+	100 µl MPA/PCA
Standard 1	100 µl (Standard 2)	+	400 µl MPA/PCA

Abb. 7 : Ansetzen der Vitaminstandards aus Stammlösung

Alternativ wurden 10 mg Ascorbinsäurepulver in 10 ml Vitamin C-freiem Plasma gelöst. Die Stammlösung wurde nach demselben Schema zu den Standards 1-5 mit Vitamin C freiem Plasma verdünnt.

Die Vitamin C-Standards wurden wie Vitamin C-Plasma- oder Serumproben aufgearbeitet.

Die Herstellung der Kontrollen erfolgte analog zur Herstellung der Vitamin C-Standards mit variablen L-Ascorbinsäurekonzentrationen.

2.2.4 Herstellung der Proben zu den Untersuchungen zum internen Standard:

Auf der Suche nach einem internen Standard wurden für die Messungen in je 10 ml mobiler Phase gelöst:

- 0,8 mg N-Methyl-Dopamin
- 0,8 mg Gulonsäure-γ-lacton
- 0,8 mg Hydrochinon
- 0,6 mg 3-Amino-4-hydroxybenzoesäure
- 0,7 mg DL-p-Hydroxyphenylmilchsäure
- 0,8 mg β-4-Hydroxy-3 Methoxyphenylmilchsäure
- 0,9 mg 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure
- 1,4 mg Isovanillinsäure

Die einzelnen Verbindungen wurden jeweils zusammen mit Vitamin C-Standards per UV-Detektion bei Wellenlängen von 245, 255, 265 und 275 nm, per ECD bei 0,7 V gemessen.

2.2.5 Probenvorbereitung:

Frische Blutproben in Serum-, EDTA-Plasma- oder Lithium-Heparinplasma-Monovetten®, wurden bei 3600 g 10 Minuten zentrifugiert.

100 µl des Überstandes wurden mit 100 µl 1 %-iger MPA und 10 %-iger PCA versetzt und entweder direkt zur Analyse weiterbearbeitet oder bis zum Zeitpunkt der Messung bei -20° C eingefroren.

Für die Analyse wurden die mit MPA/PCA stabilisierten und ausgefällten Proben sowie 30 µl des internen Standards in lichtgeschützte Eppendorfgefäße überführt und 20 Minuten bei 4° C inkubiert. Anschließend wurde 200 µl der mobilen Phase zugegeben und das Gemisch 3 Minuten bei 12 000 g zentrifugiert. 10 µl des Überstandes wurden in das HPLC-System injiziert.

2.2.6 Einstellungen der HPLC-Anlage:

Die Messung der Proben erfolgte bei 245 nm (UV-Detektion) bzw. 0,70 V (ECD), die Flussrate betrug 1 ml/min bei 100 % Elutionspuffer.

2.2.7 Kalibrierung und Auswertung der Chromatogramme

Für quantitative Bestimmungen der Vitamin C-Proben wurden die in Kapitel 2.2.3. beschriebenen Standardlösungen als Kalibratoren eingesetzt und mit dem gleichen Volumen wie die unbekanntes Proben injiziert. Die Integration der Chromatogramme, die Korrektur der Flächenintegrale durch das Flächenintegral des Internen Standards, die Berechnung der Kalibrierfunktion sowie die Ermittlung der Ascorbinsäurekonzentration in der untersuchten Probe erfolgten mit Hilfe einer speziellen Software (HPLC System Manager D-7000, Kap. 2.1.1).

2.2.8 Untersuchungen zur Stabilität der Blutproben:

Für die Untersuchungen zur optimalen Behandlung der Vitamin C-Proben wurden einer gesunden Testperson jeweils ein Serumröhrchen, ein Lithium-Heparinröhrchen und zwei EDTA-Röhrchen abgenommen. Die Proben wurden sofort bei 3600 g zentrifugiert und anschließend wie folgt aliquotiert:

Jeweils zwei braune Eppendorfgefäße à 100 µl Serum-, EDTA- oder Lithiumheparinplasma-Probe wurden bei Raumtemperatur, bei 4°C oder bei -20°C gelagert. Zu einem der beiden Gefäße wurde dabei sofort 100µl 1% MPA + 10% PCA zur Stabilisierung gegeben. Nach sechs, 24 und 48 Stunden wurde jeweils eine Probe pro Lagerungstemperatur aufbereitet und gemessen, des weiteren nach sieben, 14, 21, 28 und 35 Tagen.

Um L-Ascorbinsäureverluste während des Messvorganges zu vermeiden, wurden die Proben zeitversetzt bereitet, so dass sie bis zur Messung nur 15-30 min in der Anlage zubrachten. Die mobile Phase und die L-Ascorbinsäurestandards wurden am Tag jeder Messreihe frisch hergestellt.

2.2.9 Optimierte HPLC-Methoden zur Bestimmung von Ascorbinsäure in Serum und Plasma

Probenvorbereitung:

100 µl Serum / Standard	+	100 µl MPA/PCA
	+	30 µl interner Standard
	20 min bei 4 ° C inkubieren	
200 µl Probe	+	200 µl Eluent
	3 min bei 12000g zentrifugieren	
	10 µl Überstand in die HPLC injizieren	

Abb. 8: Probenvorbereitung in der optimierten Methode.

Säule: RP-HPLC-Säule Synergi 4µm Hydro-RP 80A 150 x 4,6 mm
 Eluent: $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{HPO}_3)_n$, pH 2,55 (UV), pH 2,95 (ECD)
 Interner Standard: 3-Amino-4-hydroxybenzoesäure (UV), Hydrochinon (ECD)
 Flussrate : 1 ml/min
 Detektion (UV): 245 nm
 Detektion (ECD): 0,70 V

2.2.10 Untersuchungen von Urin- und Liquor-Vitamin C:

Überschüssige Liquorproben aus der Routine des Zentrallabors wurden gesammelt und mindestens drei Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen. Ein Teil des Liquors wurde daraufhin mit Vitamin C aufgestockt, ein anderer Teil wurde unbehandelt belassen. Beide Aliquote wurden wie Serum- oder Plasmaproben aufgearbeitet und in der HPLC mit UV-Detektion gemessen.

Urinproben einer gesunden Testperson wurden vor und nach der oralen Gabe von 500 mg Vitamin C asserviert und ebenfalls wie Plasmaproben aufgearbeitet.

2.3. Methodvalidierung

Zur Validierung der HPLC-Methode wurden der Messbereich, die Nachweis- und Bestimmungsgrenze, die Präzision, die Linearität und die Richtigkeit der Messung untersucht.

2.3.1 Untersuchungen zur Richtigkeit:

Die Richtigkeit der Messung wurde mit Hilfe von Doppelbestimmungen zweier durch Einwaage selbst hergestellter Kontrollen ermittelt.

Kontrolle 1 hatte dabei eine rechnerische Vitamin C Konzentration von 14,47 µmol/l, Kontrolle 2 eine Konzentration von 57,91 µmol/l. Zusätzlich wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen eines kommerziellen Anbieters (Chromsystems) von Kontrollen gemessen. Die Sollwerte der Chromsystemskontrollen betragen 35,6 µmol/l (Bereich 28,5-42,7 µmol/l, Kontrolle Chrom 1) bzw. 124,6 µmol/l (Bereich 99,2-149 µmol/l, Kontrolle Chrom 2).

Aus den erhaltenen Messwerten wurde der Mittelwert und die Unrichtigkeit berechnet.

Die Unrichtigkeit wurde mit Hilfe der folgenden Formel errechnet:

$$\text{Unrichtigkeit (\%)} = \left(\frac{\text{Messwert} - \text{Zielwert}}{\text{Zielwert}} \right) \times 100$$

2.3.2 Untersuchungen zur Präzision:

Zur Ermittlung der Präzision in Serie wurden drei unterschiedliche Vitamin C-Konzentrationen (14, 58 und 100 µmol/l) im Plasma jeweils mindestens zehn Mal in einer Messreihe gemessen.

Um die Tag-zu-Tag-Präzision zu ermitteln, wurden zwei unterschiedliche Vitamin C-Konzentrationen (95 µmol/l in Serum; 112 µmol/l in Lithium-Heparinplasma) an drei aufeinander folgenden Tagen gemessen.

Aus den erhaltenen Werten wurden Mittelwert, Standardabweichung und der Variationskoeffizient berechnet. Der Variationskoeffizient (VK) wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{VK (\%)} = \left(\frac{\text{Standardabweichung}}{\text{Mittelwert}} \right) \times 100$$

2.3.3 Untersuchungen zur Nachweis- und Bestimmungsgrenze:

Die Nachweisgrenze wurde durch 20-malige Messung einer Blindprobe ohne nachweisbare Vitamin C-Konzentration bestimmt. Dazu wurde eine Plasmaprobe verwendet, die 5 Tage bei Raumtemperatur ohne besonderen Lichtschutz gelagert worden war. Aus den gemessenen Konzentrationen innerhalb der Retentionszeit der L-Ascorbinsäure (Rauschen der Basislinie) wurden Mittelwert und Standardabweichung des Blindwertes berechnet. Die Nachweisgrenze wurde mit der Formel

$$\text{Nachweisgrenze} = X_b + 3 \cdot SD_b$$

berechnet, wobei X_b für den Mittelwert, SD_b für die Standardabweichung des Blindwertes steht.

Die Bestimmungsgrenze wurde ebenfalls mit Hilfe des Blindwertes nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Bestimmungsgrenze} = X_b + 9 \cdot SD_b$$

2.3.4 Untersuchungen zur Linearität der Ascorbinsäuremessung:

Zur Untersuchung der Linearität der Vitamin C-Messung wurde eine Stammlösung mit einer Vitamin-C-Konzentration von 700 $\mu\text{mol/l}$ hergestellt, die in 10 Schritten jeweils 1:1 mit ascorbinsäurefreiem Poolplasma verdünnt wurde. Nach Analyse der verdünnten Proben wurden die Peakflächen und die daraus berechneten Konzentrationen verglichen.

2.4 Methodenanwendung: Referenzwertermittlung und Untersuchungen zur Vitamin C-Kinetik

2.4.1 Referenzwerte:

Für die Referenzwertermittlung wurden Proben von Blutspendern verwendet, da diese aufgrund fehlender Krankheitsanzeichen, der negativen Serologie, des unauffälligen Blutbildes, physiologischer Leberenzyme, des körperlichen Status und der Anamnese mit hoher Wahrscheinlichkeit als gesund gelten dürfen.

Für die Erstellung der Referenzwerte wurden daher Serumproben von 150 Blutspendern verwendet, denen mit ihrer Zustimmung zur Kontrolle der Ferritinkonzentration im Zentrallabor Blut frisch abgenommenen worden war. Unmittelbar anschließend an die Blutentnahme wurden Aliquote für die Ascorbinsäurebestimmung sofort auf Eis gelegt und lichtgeschützt aufbewahrt. Innerhalb von 45 Minuten wurden die Proben zentrifugiert, präzipitiert, stabilisiert und bis zur Messung bei -20°C eingefroren.

Das Spenderkollektiv umfasste 55 Frauen und 95 Männer im Alter von 18 bis 67 Jahren.

2.4.2 Zeitverlauf der Ascorbinsäure-Konzentrationen nach exogener Zufuhr von Vitamin C

Um die Vitamin C-Kinetik im menschlichen Organismus zu untersuchen, wurde zwei gesunden Versuchspersonen (eine männlich, 28 Jahre; eine weiblich, 27 Jahre) nüchtern Blut abgenommen (t 0), anschließend wurde der einen 500 mg unmittelbar vor der Gabe in Leitungswasser gelöster L-Ascorbinsäure oral zugeführt, dem anderen Probanden wurde eine Injektionslösung mit 500 mg langsam i.v. gespritzt. 30 Minuten nach der Vitamin C-Gabe wurde erneut eine Blutprobe entnommen (t 30), ebenso nach 60 (t 60), 90 (t 90), 120 (t 120), 180 (t 180), 240 (t 240), 300 (t 300) Minuten sowie nach 24 Stunden (t 24h).

2.5 Statistische Methoden

Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe von SPSS für Windows, Version 14.0 (SPSS Inc., U.S.A.) durchgeführt. Die Darstellung der kontinuierlichen Variablen erfolgte als Mittelwerte, während als Streumaß die Standardabweichungen gewählt wurden.

Die kontinuierlichen Variablen wurden mittels des Shapiro-Wilk-Tests hinsichtlich ihrer Normalverteilung überprüft. Je nachdem ob die getesteten Variablen eine Normalverteilung aufwiesen (Shapiro-Wilk-Test: $p \geq 0,05$) oder keine Normalverteilung berechnet wurde (Shapiro-Wilk-Test: $p < 0,05$), wurden bei den Mittelwertvergleichen Tests für normalverteilte Stichproben und nichtparametrische Tests für nicht normalverteilte Stichproben herangezogen.

Beim Vergleich von 2 unabhängigen, normalverteilten Stichproben wurde der t-Test verwendet, während bei nicht normalverteilten Stichproben der Mann-Whitney-U-Test als nichtparametrisches Verfahren durchgeführt wurde.

Beim Vergleich von mehr als 2 unabhängigen, nicht normalverteilten Stichproben wurde eine multiple Wilcoxon-Testung durchgeführt.

Bei allen durchgeführten Tests erfolgte eine zweiseitige Signifikanzüberprüfung, wobei für alle statistischen Tests ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant angenommen wurde.

Zur graphischen Darstellung der Vitamin C-Konzentration des Gesamtkollektivs wurden Box-and-Whisker-Plots mit SigmaPlot Version 9.0 (Systat Software Inc.) erstellt. Die Box wird vom ersten und dritten Quartil begrenzt und umfasst 50% der Werte. Die innere Linie repräsentiert den Median. Die Whiskers erstrecken sich bis zum kleinsten und größten Wert, sofern diese keine Ausreißer sind. Ausreißer werden mit einem Punkt markiert.

Die graphischen Darstellungen der geschlechts- und altersabhängigen Unterschiede wurden mit SPSS Version 14.0.1 erstellt. Zur Veranschaulichung der Mittelwerte wurden Fehlerbalken verwendet, wobei als Streumaß aufgrund der großen Streubreite die Standardfehler aufgeführt wurden. Die kategorisierten Daten wurden graphisch mit Hilfe von Balkendiagrammen dargestellt.

3. Ergebnisse

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine publizierte HPLC-Methode zur Vitamin-C-Bestimmung (Liau et al 1993) im Labor etabliert; diese Methode wurde anschließend optimiert und analytisch validiert.

3.1 Methodenoptimierung und -validierung

3.1.1 Stationäre Phase

In der von Liau et al. publizierten Originalmethode wurde eine konventionelle 5 µm C18 Reversed-Phase-Säule in Kartuschenform (110 x 4,7 mm) mit Vorsäule eingesetzt (Liau et al. 1993). In der eigenen Arbeit wurde stattdessen eine Synergi 4µm Hydro-RP 80A 150 x 4,6 mm Säule als stationäre Phase eingesetzt, die eine bessere Auftrennung relativ hydrophiler Verbindungen wie der Ascorbinsäure erwarten ließ. Insgesamt wurden in der Arbeit 1428 Vitamin C-Proben untersucht. Nach 594 Probeninjektionen traten Probleme bezüglich Systemdruck und Auflösung auf, so dass die HPLC-Säule ersetzt werden musste. Zusätzlich wurde der neuen Säule eine Vorsäule (GuardCartridge) vorgeschaltet, um sie besser vor Verunreinigungen, z.B. durch Proteine der Probenmatrix, zu schützen. Die neue Säule mit GuardCartridge zeigte auch nach 834 Probeninjektionen keinerlei Funktionseinbußen.

3.1.2 Mobile Phase

In der Originalvorschrift nach Liau et al wurde ein Puffer der folgenden Zusammensetzung verwendet: 20 mM Ammoniumdihydrogenphosphat mit 0,015 % meta-Phosphorsäure. Mit diesem Puffer ergab sich sowohl in der UV- als auch in der elektrochemischen Detektion eine Retentionszeit von etwa 2 min für L-Ascorbinsäure bei einer Gesamtmesszeit von fünf Minuten. Der Vitamin C- Peak in der UV-Detektion erschien unmittelbar nach dem Injektionspeak und wurde von ihm nicht vollständig abgetrennt. Dies machte eine korrekte Vitamin C-Konzentrationsberechnung unmöglich (s. Abb. 9).

Durch das Einstellen des Puffer-pH auf 2,55 für die UV-Detektion, bzw. pH 2,95 für die ECD verlängerte sich die Retentionszeit des Vitamin C auf etwa 2,6 min, wodurch eine vollständige Abtrennung von vorangehenden Peaks erreicht werden konnte. Die Messzeit erhöhte sich wegen der unterschiedlichen Retentionszeiten der internen Standards von fünf auf sieben in der UV-Detektion und auf neun Minuten in der elektrochemischen Detektion.

Sample Name: S5 -80

Vial Number: 17

Volume: 10,0 ul

Vial Type: STD5

Injection from this vial: 1 of 1

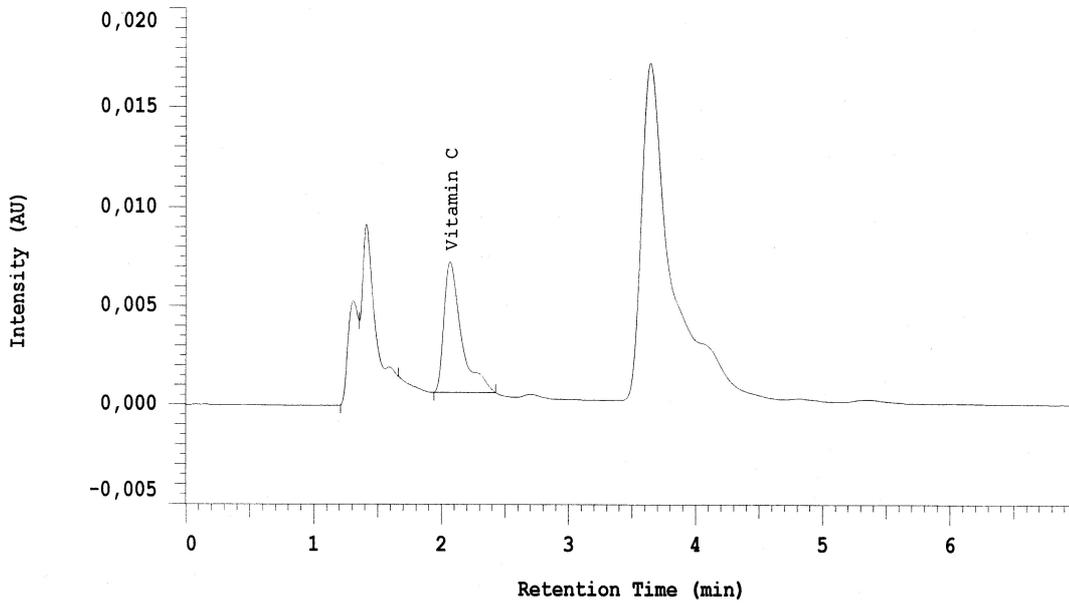


Abb. 9: Chromatogramm der Vitamin C-Messung mit UV-Detektion nach Liau et al

Sample Name: 114

Vial Number: 4

Volume: 10,0 ul

Vial Type: UNK

Injection from this vial: 2 of 2

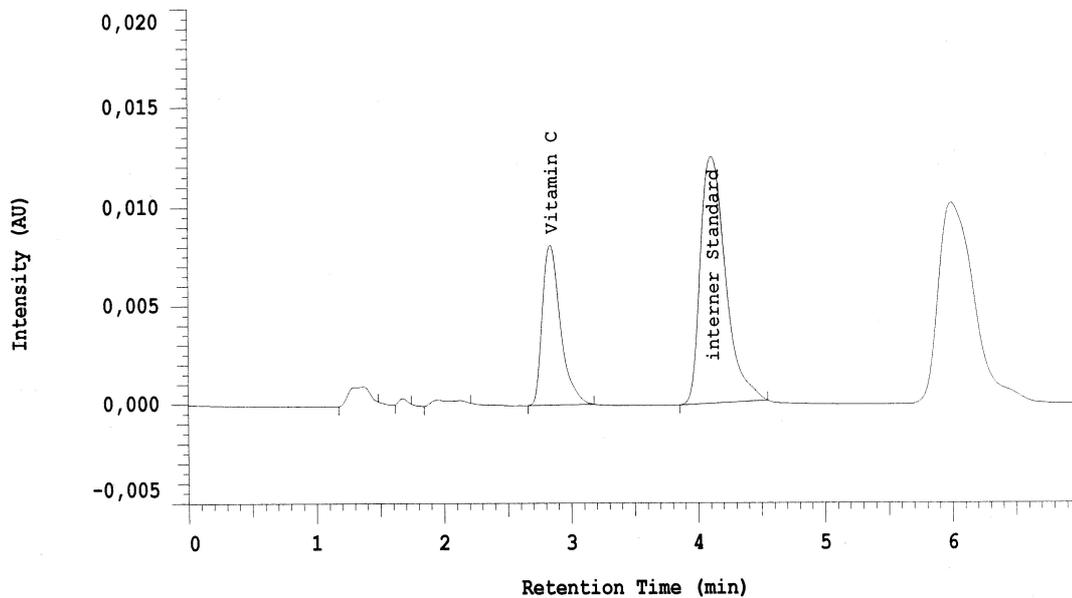


Abb. 10: Chromatogramm der Vitamin C-Messung mit UV-Detektion nach Optimierung des Puffer-pH und Einführung eines internen Standards.

Sample Name: S4

Vial Number: 4

Volume: 10,0 ul

Vial Type: STD4

Injection from this vial: 1 of 1

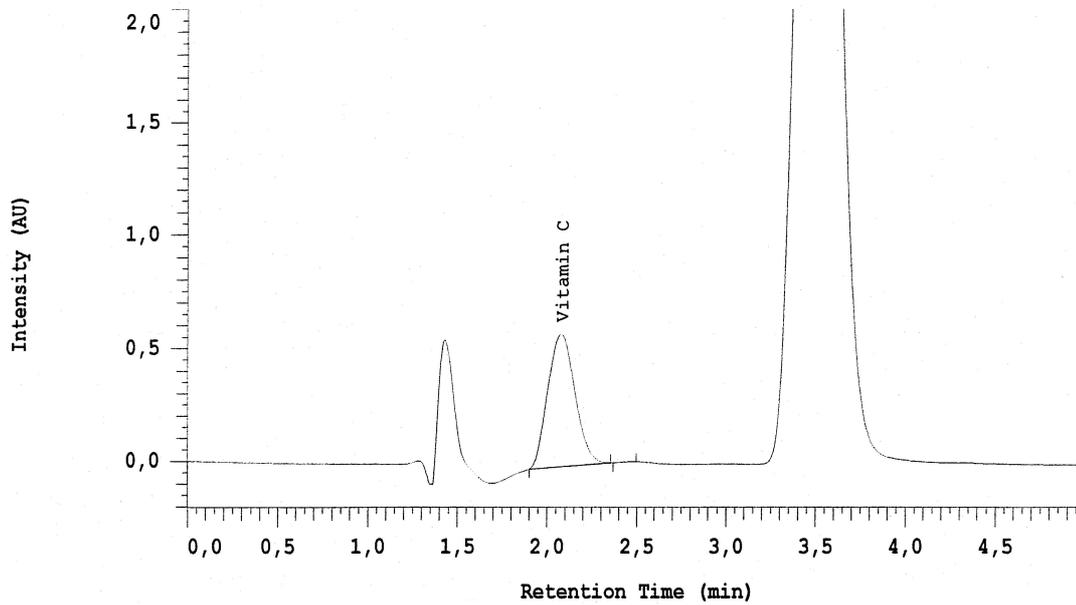


Abb. 11: Chromatogramm der Vitamin C Messung mit ECD nach Liau et al

Sample Name: S3

Vial Number: 3

Volume: 10,0 ul

Vial Type: STD3

Injection from this vial: 1 of 1

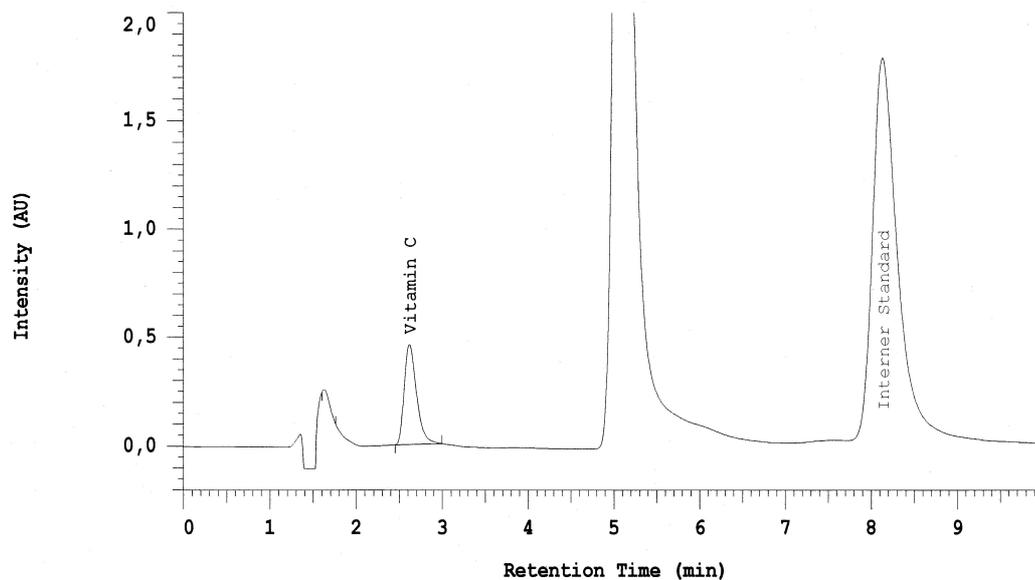


Abb. 12: Chromatogramm der Vitamin C Messung mit ECD nach Liau et al und nach Optimierung des Puffer-pH und Einführung eines internen Standards.

Eine Messung der Ascorbinsäure bei einem Puffer-pH von 2,65 in der UV-Detektion ergab sich eine Retentionszeit von 2,6 min, bei einem Puffer-pH von 3,1 in der ECD auf 2,7 min; die Auflösung wurde dabei im Vergleich zu den Puffer-pHs von 2,55 (UV) und 2,95 (ECD) nicht wesentlich verbessert, die gesamte Messzeit verlängerte sich bei pH 3,1 in der ECD auf 10 min. Für die weiteren Untersuchungen wurde bei der UV-Detektion ein Puffer mit einem pH 2,55 verwendet.

3.1.3 Interner Standard

Die Methode von Liao et al. verwendete keine internen Standard. In den eigenen Untersuchungen wurden deshalb einige der Ascorbinsäure chemisch verwandte Verbindungen auf ihre Eignung als interner Standard getestet. Die Zugabe von 0,8 mg N-Methyl-Dopamin, 0,8 mg Gulonsäure- γ -lacton, 0,7 mg DL-p-Hydroxyphenylmilchsäure, 0,8 β -4-Hydroxy-3-Methoxyphenylmilchsäure, 0,9 mg 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure und 1,4 mg Isovanillinsäure zu den Serumproben führten zu keinem sichtbaren Peak in den sieben Minuten der Messzeit, weder mit UV-Detektion bei 245, 255, 265 oder 275 nm, noch mit elektrochemischer Detektion bei 0,7 V.

Nach Zugabe von 0,6 mg 3-Amino-4-hydroxybenzoesäure wurde ein Peak mit einer Retentionszeit von 3,4 min in der UV-Detektion bei 245 nm sichtbar (s. Abb. 10). Nach Zugabe von 0,8 mg Hydrochinon erschien bei einer Retentionszeit von 6,3 min in der ECD bei 0,7 V ein Peak (s. Abb. 12). Beide Verbindungen zeigten einen einheitlichen symmetrischen Peak mit Beginn von der und Rückkehr zur Nulllinie.

Bei der ECD entstanden im Anschluss Probleme in der technischen Durchführbarkeit. Allein das häufige Auf- und Abbauen der Referenzelektrode führte zum Defekt mehrerer sensibler Bauteile in der Messzelle, die in Folge mehrfach ausgetauscht werden mussten. Für Routinearbeiten erschien die ECD daher zu aufwändig und anfällig gegenüber technischen Fehlern. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Versuche nur noch mit UV-Detektor durchgeführt.

3.1.4 Richtigkeit

Zwei kommerziell erhältliche Vitamin C-Kontrollen der Firma Chromsystems wurden als unabhängige Referenz verwendet. Die angegebenen Sollwerte der Kontrollen Chrom 1 und 2, die gemessenen Werte und die statistischen Charakteristika der Messungen sind in Tabelle 1 und 2 zusammengefasst.

Sollwert	35,6 µmol/l (28,5-42,7 µmol/l)
Gemessen (X)	32,6 µmol/l
Unrichtigkeit (%)	8,4

Tab. 1: Chrom1

Sollwert	124,6 µmol/l (99,2-149 µmol/l)
Gemessen (X)	117,4 µmol/l
Unrichtigkeit (%)	5,7

Tab. 2: Chrom2

Weiterhin wurden zwei selbst hergestellte Vitamin C-Plasma-Kontrollen jeweils zweimal gemessen. Die aus der Einwaage von Vitamin C errechneten Sollwerte der Kontrollen 1 und 2, die gemessenen Werte und die gefundene Unrichtigkeit sind in den Tabelle 3 und 4 zusammengefasst.

Sollwert	14,47
Gemessen (X)	14,458
X	14,468
S	0,0141
Unrichtigkeit (%)	0,01

Tab. 3: Werte der Kontrolle 1

Sollwert	57,91
Gemessen (X)	57,93
X	57,92
S	0,0113
Unrichtigkeit (%)	0,02

Tab. 4: Werte der Kontrolle 2

3.1.5 Präzision

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde durch Bestimmung der Präzision in der Serie und von Tag zu Tag ermittelt.

Für die Bestimmung der Unpräzision in der Serie wurden die Kontrollen S2 (14 µmol/l) und S4 (58 µmol/l) jeweils 20 mal, die Kontrolle S5 (100 µmol/l) zehn mal gemessen.

Der Variationskoeffizient in den Serienversuchen lag bei 0,7 % für die Kontrolle S2, bei 0,05 % für die Kontrolle S4 und bei 0,7 % für die Kontrolle S5.

Die Präzision von Tag zu Tag wurde mit Hilfe einer Plasmakontrolle (Mittelwert: 103 µmol/l) und einer Serumkontrolle (Mittelwert: 91 µmol/l) ermittelt, die an drei aufeinander folgenden Tagen gleichartig vorbereitet und gemessen wurden.

Für die Tag-zu-Tag-Präzision lag der Variationskoeffizient für die Plasmakontrolle bei 8,2 %, für die Serumkontrolle bei 4,2 %.

3.1.6 Nachweisgrenze

Eine Vitamin C-freie Plasmaprobe wurde als Blindprobe 20 Mal gemessen. Rechnerisch ergab sich eine Nachweisgrenze von 0,55 µmol/l und eine Bestimmungsgrenze von 2,22 µmol/l.

3.1.7 Linearer Messbereich

Zur Kalibration der HPLC-Methode zur Vitamin-C-Bestimmung wurden die gemessenen Peakflächen gegen die bekannten Vitamin C-Konzentrationen der Kalibratoren aufgetragen. Die so erhaltene Kalibrierfunktion wurde visuell auf Ausreißer und Linearität untersucht. Die Messung war linear von 2 -700 $\mu\text{mol/l}$ (Abb. 13). Proben mit höherer Vitamin-C-Konzentration wurden im Verhältnis 1 : 9 mit mobiler Phase verdünnt und dann erneut gemessen.

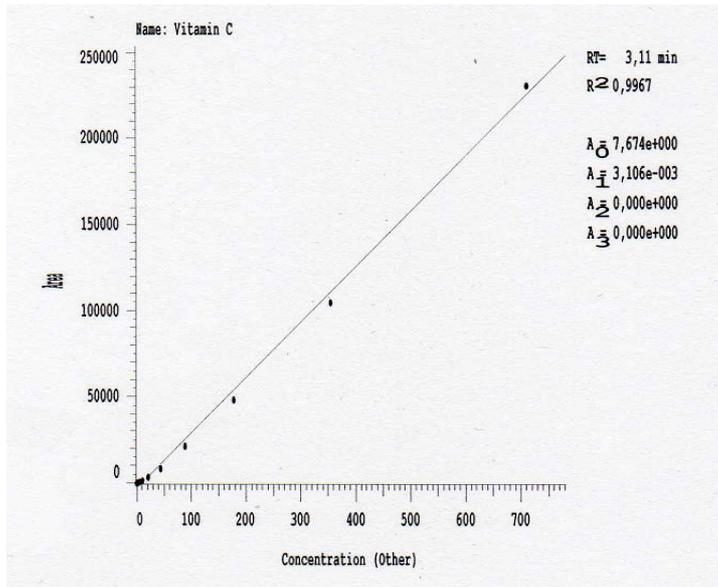


Abb. 13: Kalibriergerade mit Verhältnis von Vitamin C-Konzentration (x) zu Peakfläche (y)

3.1.8 Stabilität der Vitamin C-Proben

In Serum und Lithium-Heparinplasma zeigte sich bei Raumtemperatur ein Ascorbinsäureverlust von weniger als 10 % innerhalb von 24 h. EDTA-Plasma hingegen zeigte trotz Stabilisans und Lagerung bei -20°C bereits nach 24 h einen Vitamin C-Verlust von über 50 %, bei Raumtemperatur oder 4°C sogar 90 % in der Probe.

Vitamin C-Konzentration in EDTA-Plasma bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen

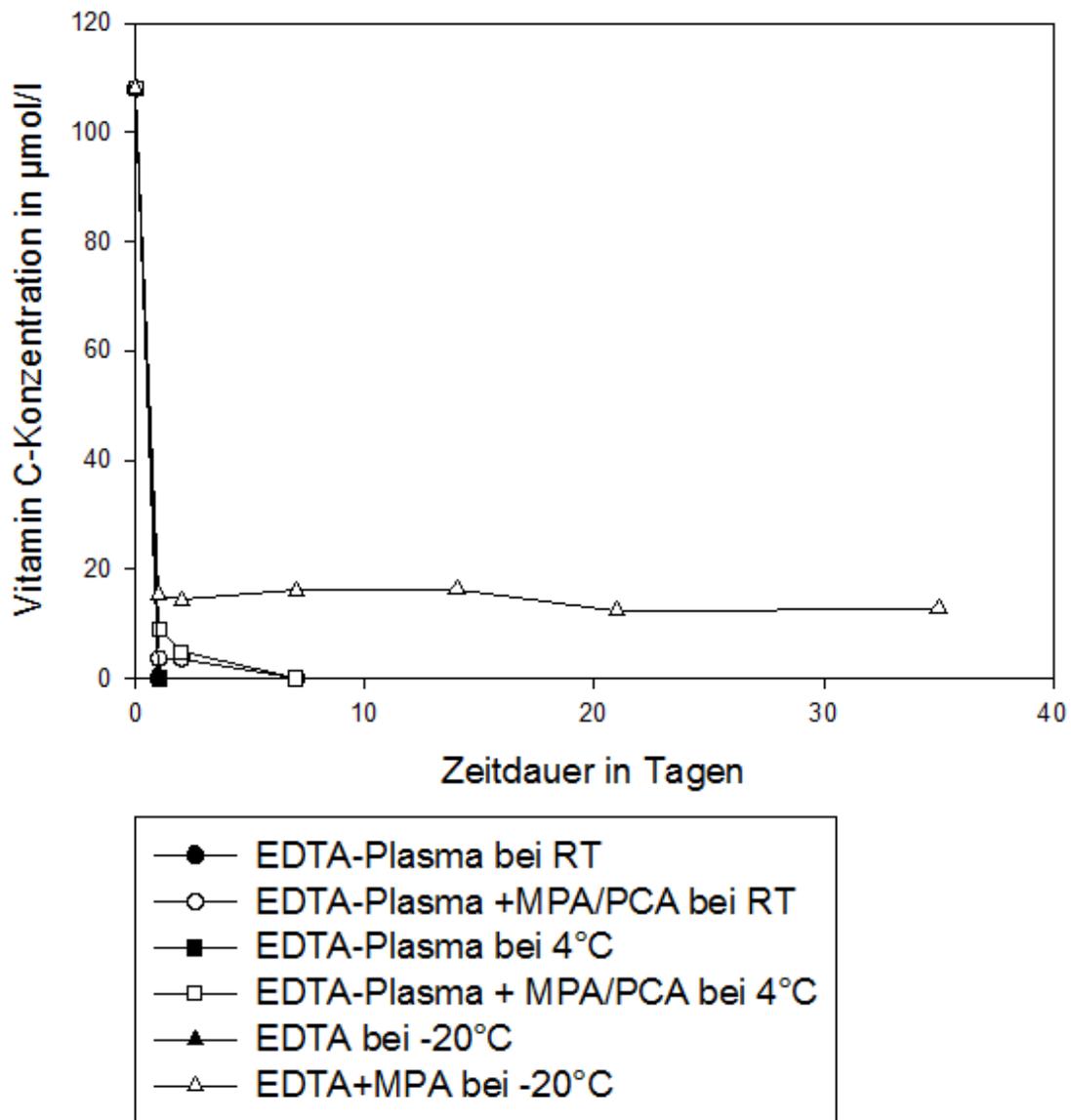


Abb. 14: Einfluss unterschiedlicher Lagerungsbedingungen auf die Stabilität der Vitamin C-Konzentration in EDTA-Plasma (RT = Raumtemperatur).

Vitamin C-Konzentrationen in Li-Heparinplasma bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen

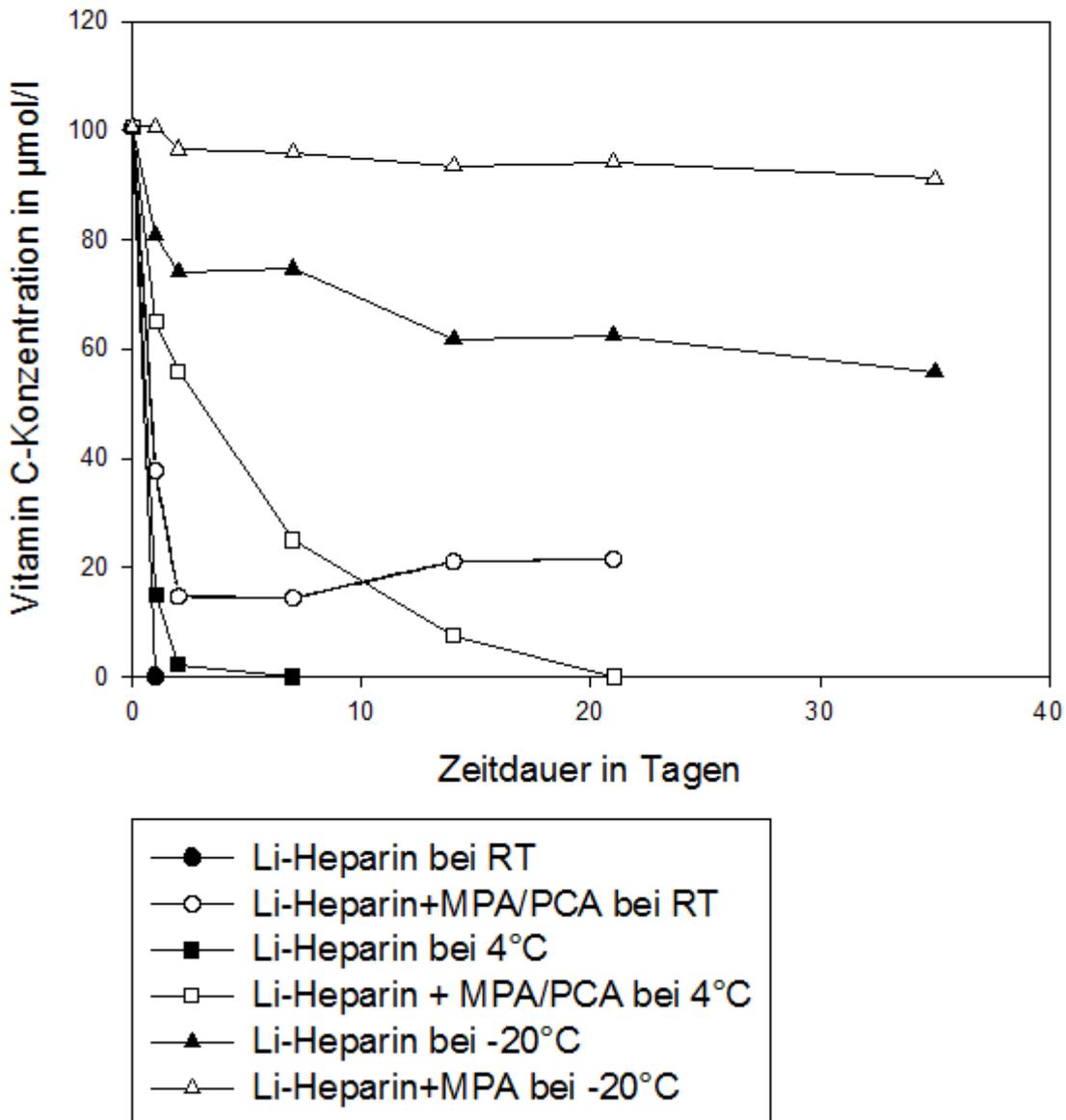


Abb. 15: Einfluss unterschiedlicher Lagerungsbedingungen auf die Stabilität der Vitamin C-Konzentration in Lithium-Heparin-Plasma (RT = Raumtemperatur).

Ascorbinsäure war am stabilsten in Serum und Lithium-Heparinplasma. Durch Zugabe des beschriebenen Stabilisans mit meta-Phosphorsäure und Einfrieren der Probe bei -20°C , war Vitamin C mindestens 35 Tage ohne signifikante Verluste lagerbar.

Vitamin C-Konzentration in Serum bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen

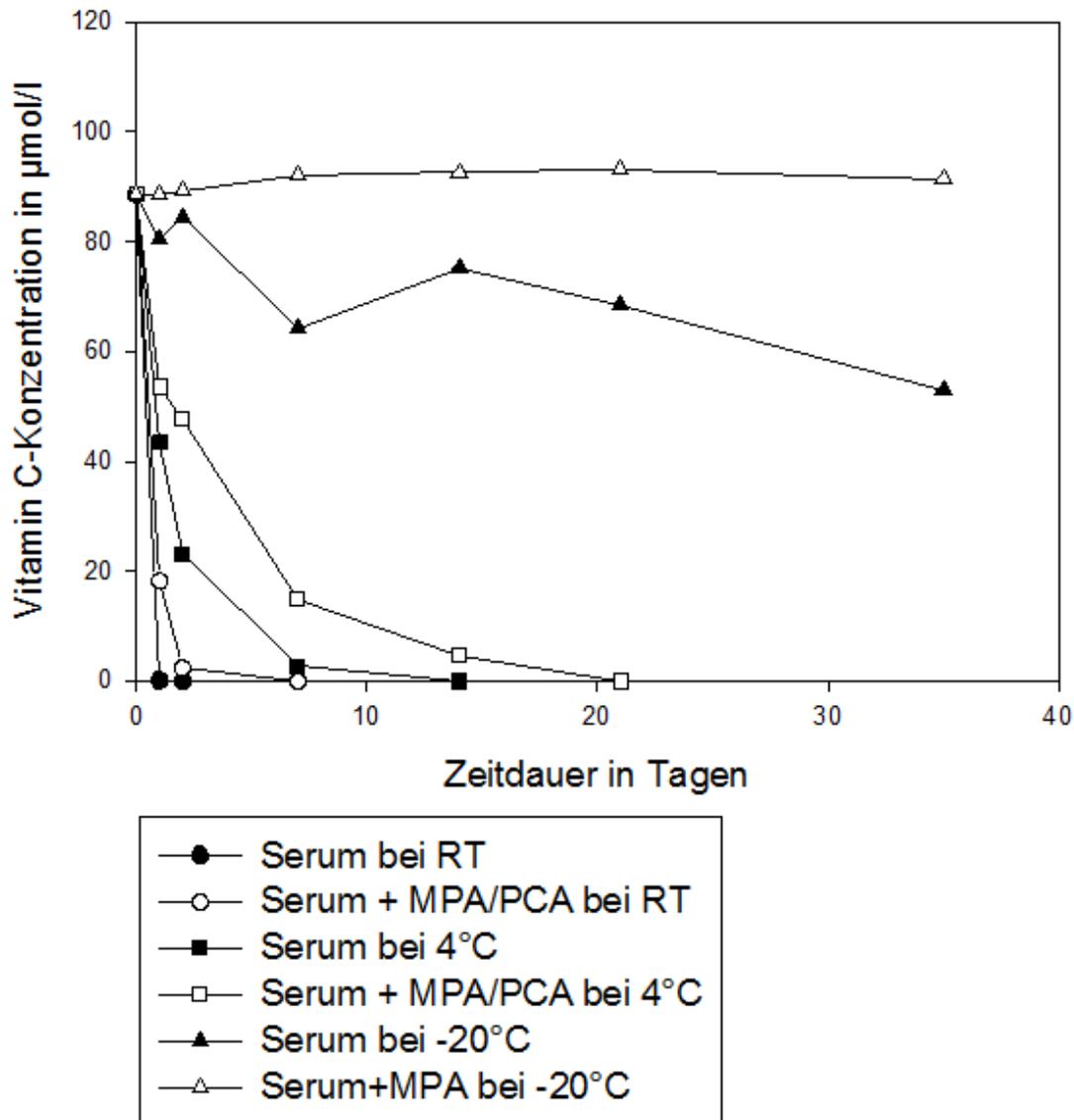


Abb. 16: Einfluss unterschiedlicher Lagerungsbedingungen auf die Stabilität der Vitamin C-Konzentration in Serum (RT = Raumtemperatur).

Ohne den Zusatz von meta-Phosphorsäure hingegen sank die Ascorbinsäurekonzentration nach wenigen Tagen auf weniger als die Hälfte der ursprünglichen Konzentration.

Bei 4° C und bei Raumtemperatur waren nach 21 Tagen keine Ascorbinsäure in der Probe mehr messbar. Allein im Heparin-Plasma war nach drei Wochen noch etwa 20 %

der anfänglichen Konzentration nachweisbar, wenn der Probe meta-Phosphorsäure zugegeben worden war.

3.1.9 Messung von Urin- und Liquorproben

Die Messung von Ascorbinsäurekonzentrationen war sowohl in Liquor- wie auch in Urinproben möglich. Probenvorbereitung und Methode waren identisch zur Aufarbeitung von Plasma- und Serumproben.

Das Vitamin C hatte in der Liquorprobe eine Retentionszeit von 2,9 min und zeigte sich als sauberer Peak ohne Überlagerung durch andere Verbindungen. Auch der interne Standard 3-Amino-4-hydroxybenzoesäure wurde nach einer Retentionszeit von 4 min störungsfrei sichtbar.

Sample Name: Liquor St (57,9 $\mu\text{mol/l}$)

Vial Number: 2
Volume: 10,0 μl

Vial Type: UNK
Injection from this vial: 1 of 1

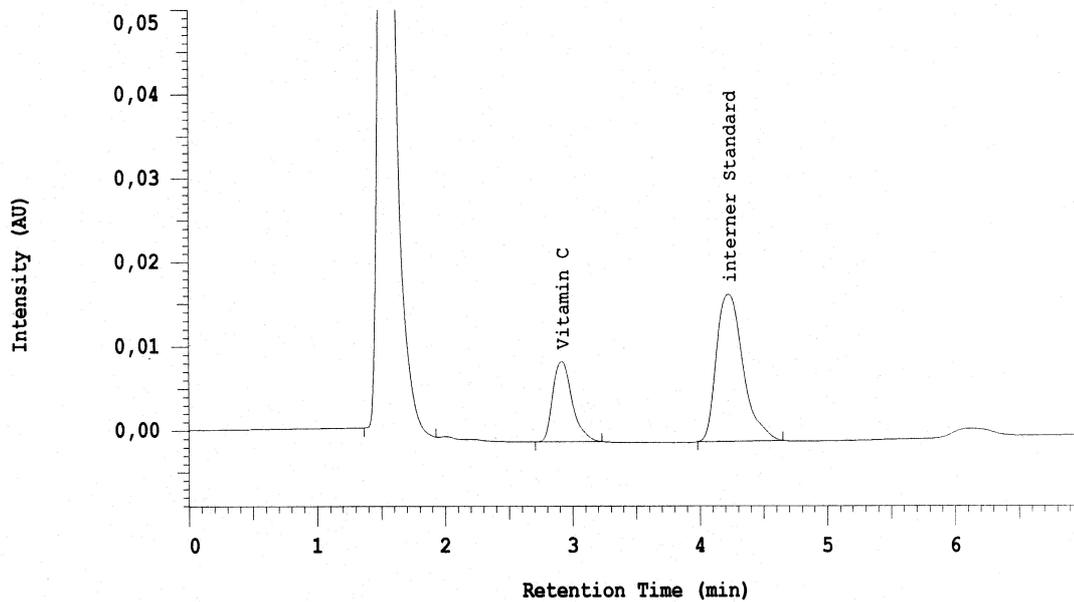


Abb. 17: Chromatogramm einer Vitamin C-Messung in Liquor cerebrospinalis mit 3-Amino-4-hydroxybenzoesäure als internem Standard.

Auch in Urinproben zeigte sich ein deutlicher Vitamin C-Peak, mit einer Retentionszeit von 2,7 min. 3-Amino-4-hydroxybenzoesäure hingegen schien durch einen anderen Peak überlagert zu werden und konnte in seiner Konzentration nicht klar erfasst werden.

Sample Name: Urin St (57,9 $\mu\text{mol/l}$)

Vial Number: 5

Volume: 10,0 μl

Vial Type: UNK

Injection from this vial: 1 of 1

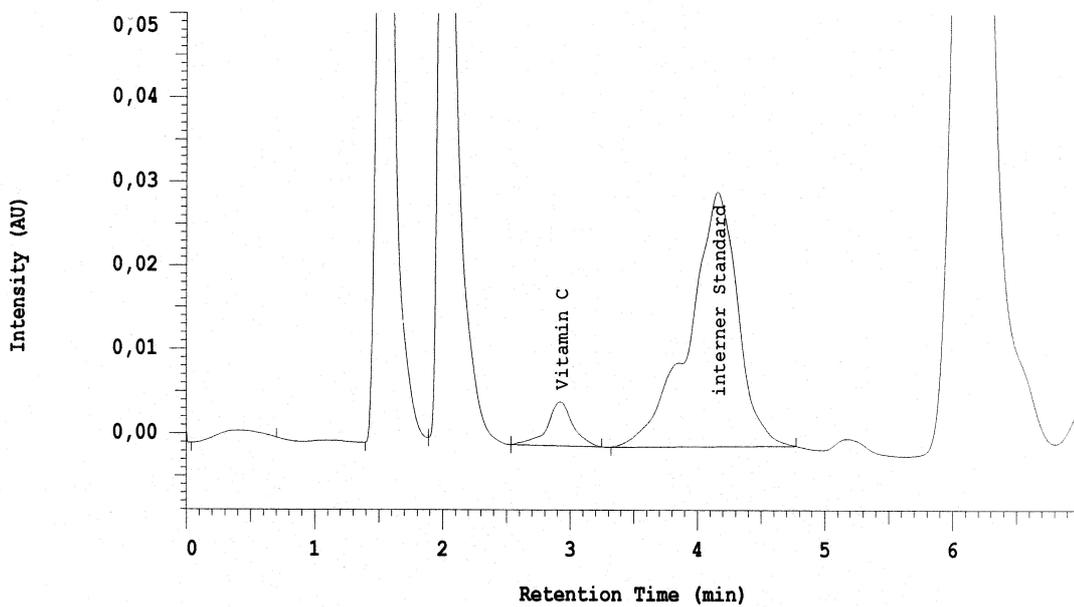
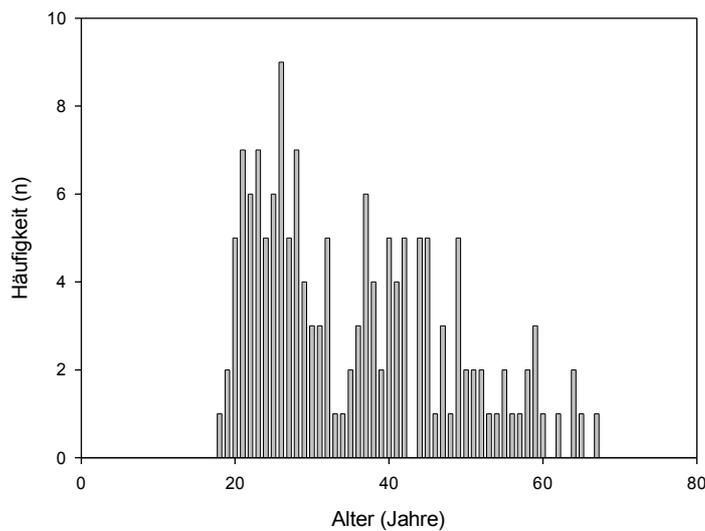


Abb. 18: Chromatogramm einer Vitamin C-Messung in Urin mit 3-Amino-4-hydroxybenzoesäure als internem Standard.

3.2 Methodenanwendung

3.2.1 Referenzwertermittlung

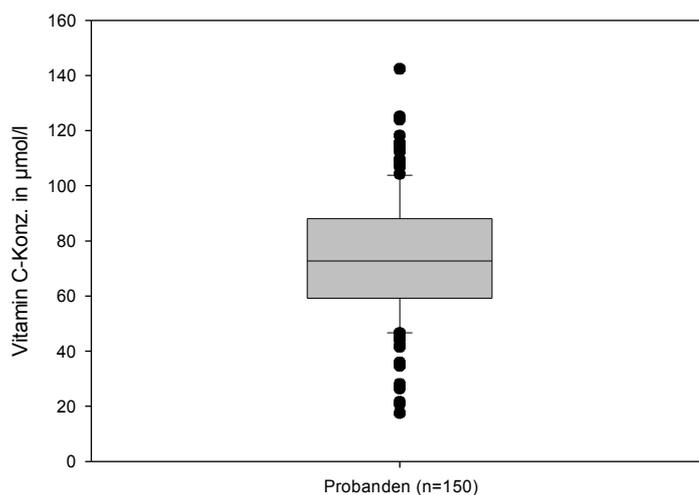
Zur Erstellung der Referenzbereiche wurden Seren von insgesamt 150 Blutspendern im Alter von 18 bis 67 Jahren untersucht; davon waren 55 weiblich und 95 männlich. Abbildung 19 zeigt die Altersverteilung des untersuchten Kollektivs.



N	Gültig	150
	Fehlend	0
Mittelwert		35,6133
Median		32,5000
Standardabweichung		12,3445
Minimum		18,00
Maximum		67,00
Perzentile	25	25,0000
	50	32,5000
	75	44,2500

Abb.19: Altersverteilung der Probanden

Mittels Shapiro-Wilk-Test wurde überprüft, ob die Messwerte der Vitamin C-Konzentration des Probandenkollektivs normalverteilt sind. Die Daten zeigten keine signifikante Abweichung ($p < 0,05$) von der Normalverteilung. Aus der Streubreite der gemessenen Vitamin C-Konzentrationen wurden Referenzintervalle abgeleitet.



Gesamtkollektiv	Vit. C in µmol/l
Mittelwert	74,01
Median	72,67
SD	22,17
Minimum	17,6
Maximum	142,45
Quantil 2,5	25,11
Quantil 97,5	119,83

Abb.20: Serum-Vitamin C-Konzentration des Gesamtkollektivs

Die ermittelten Messwerte wurden zu Mittelwert, Median und Standardabweichung zusammengefasst. Die Referenzwerte wurden auf der Grundlage des 2,5% - 97,5%

Quantils ($X_{2,5} - X_{97,5}$) definiert. Darüber hinaus wurden Minimum und Maximum berechnet. Die Konzentrationsverteilung der Ascorbinsäure im Serum sowie die entsprechenden statistischen Kenngrößen sind in Form von Boxplots in Abbildung 20 dargestellt.

3.2.1.1 Untersuchung auf alterspezifische Unterschiede

Zur Beurteilung möglicher altersabhängiger Unterschiede der Vitamin C-Serumkonzentration wurde das Gesamtkollektiv in drei Altersgruppen unterteilt (siehe Abb. 21).

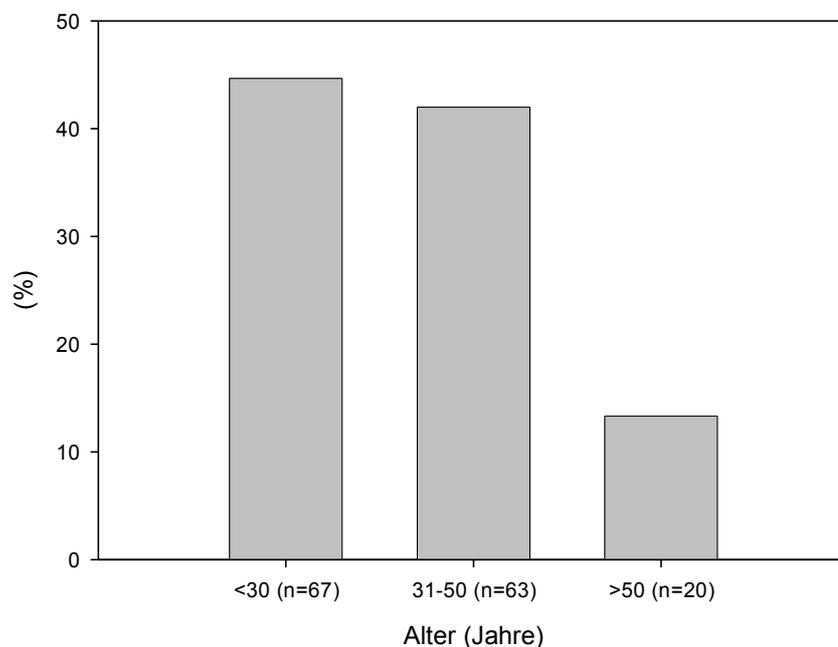


Abb. 21: Altersgruppierung des Gesamtkollektivs (n=150)

Um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen erfassen zu können, wurde jede Gruppe mit jeder verglichen. Mittels Shapiro-Wilk-Test wurde überprüft, ob eine normale Alters- und Konzentrationsverteilung in den einzelnen Gruppen vorliegt. Eine normale Altersverteilung lag nur in den Gruppen 18-30 Jahre und 51-67 Jahre vor ($p > 0,05$).

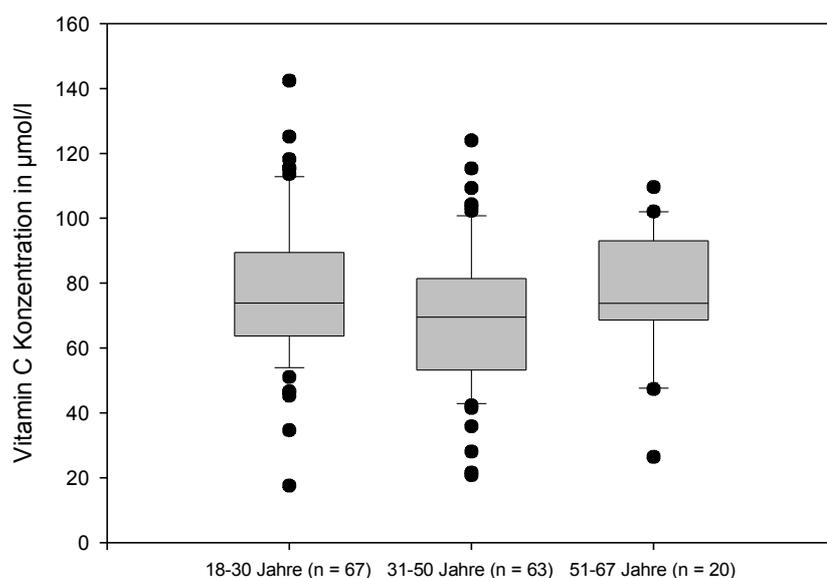


Abb. 22: Serum-Vitamin C-Konzentration des Gesamtkollektivs nach Altersgruppen

Die Messwerte der Vitamin C-Konzentration waren in allen drei Gruppen normalverteilt. Da jedoch große Unterschiede bezüglich der Probandenzahl in den einzelnen Gruppen bestanden (siehe Abb. 22), wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test dem t-Test als robusteres Testverfahren vorgezogen.

Zwischen den in den drei Altersgruppen Ascorbinsäurekonzentrationen konnten bei multipler Wilcoxon-Testung keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (Tab. 5).

	Alter (Jahre)	Alter (Jahre)	p-Wert
Wilcoxon	< 30	31 - 50	0,056
	31-50	> 50	0,121
	< 30	> 50	0,686

Tab. 5: Ergebnisse der multiplen Wilcoxon-Testung der gemessenen Vitamin C-Konzentration

3.2.1.2 Untersuchung auf geschlechtsspezifische Unterschiede

In Abbildung 23 ist die Geschlechterverteilung im untersuchten Kollektiv dargestellt.

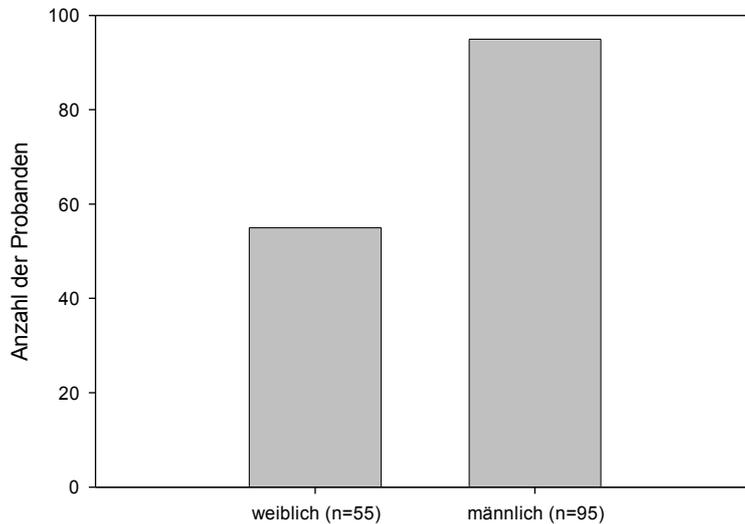


Abb. 23: Geschlechterverteilung des Gesamtkollektivs (n=150).

Es wurden bei der Untersuchung auf geschlechtsspezifische Unterschiede die Vitamin C-Serumkonzentrationen der männlichen Probanden mit denen der weiblichen verglichen.

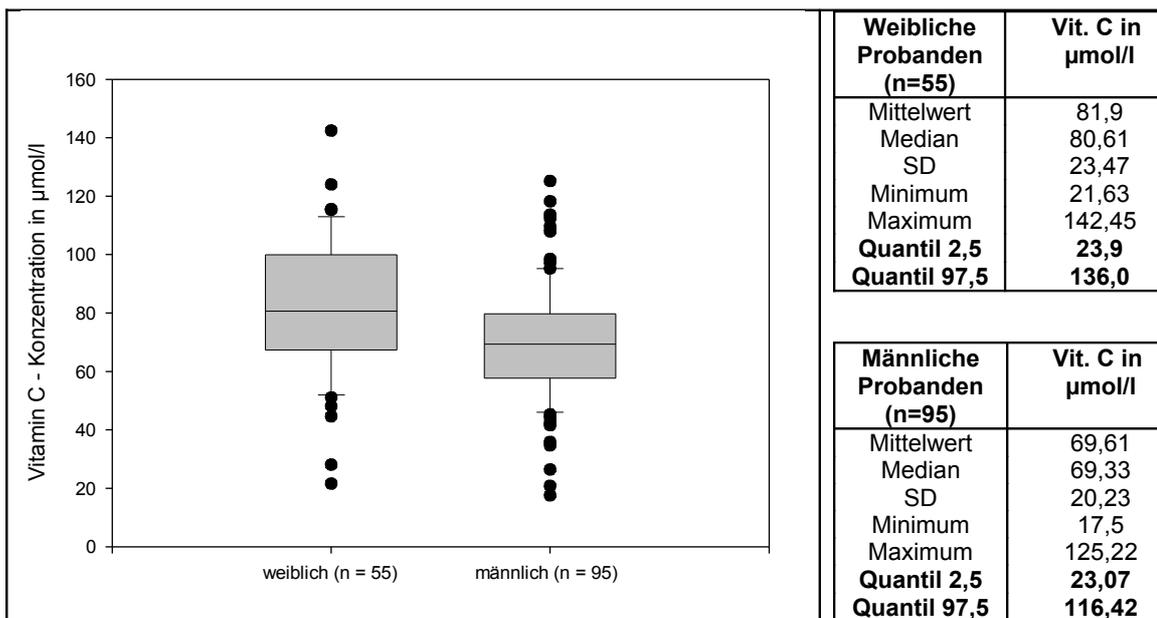


Abb. 24: Serum-Vitamin C-Konzentration getrennt nach Geschlecht und ermittelte geschlechtsspezifische Referenzwerte

Im Shapiro-Wilk-Test zeigte sich eine Normalverteilung der Messwerte, daher wurde der t-Test verwendet.

Frauen zeigten signifikant höhere Serum-Ascorbinsäurekonzentrationen als Männer ($p = 0,001$).

Zusätzlich wurden die Vitamin C-Konzentrationen von Frauen und Männern zwischen 18 und 50 Jahren und Frauen und Männern zwischen 51 und 67 Jahren miteinander verglichen. Zwar lag im Shapiro-Wilk-Test eine Normalverteilung der Messwerte in allen Gruppen vor, da jedoch insbesondere die ältere Gruppe (Altersgruppe 51-67 Jahre, bestehend aus zehn männlichen und vier weiblichen Probanden) im Vergleich zur jüngeren Gruppe nur sehr wenige Probanden beinhaltete, wurde der Mann-Whitney-U-Test als robusteres Testverfahren statt des t-Testes gewählt.

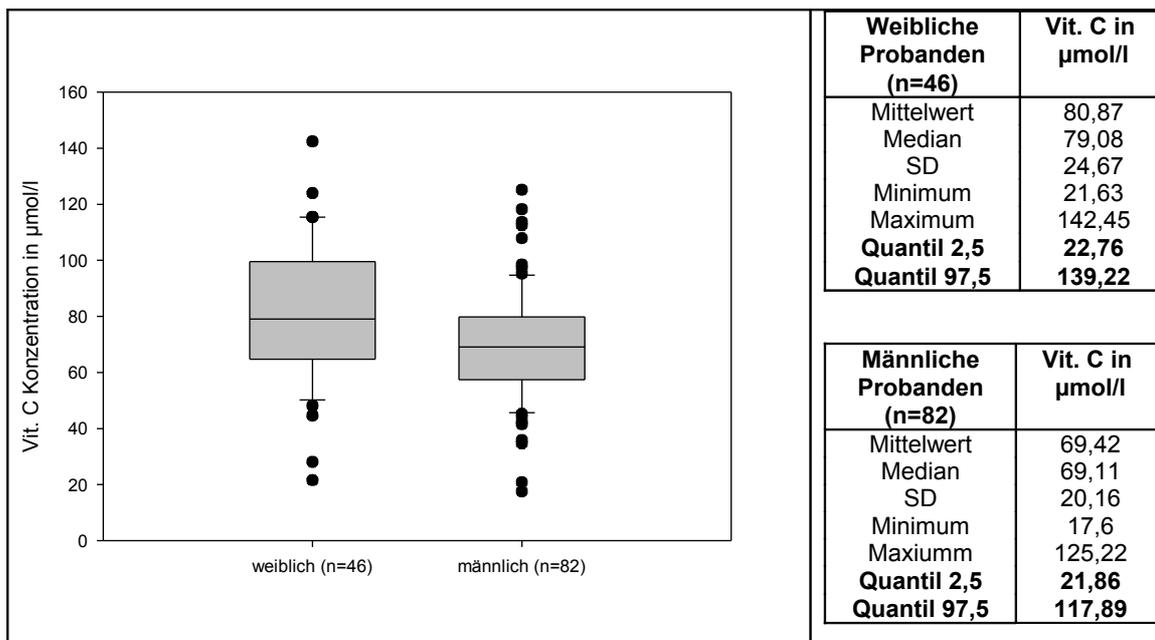


Abb. 25: Serum-Vitamin C-Konzentrationen und ermittelte Referenzwerte getrennt nach Geschlecht in der Altersgruppe 18-50 Jahre

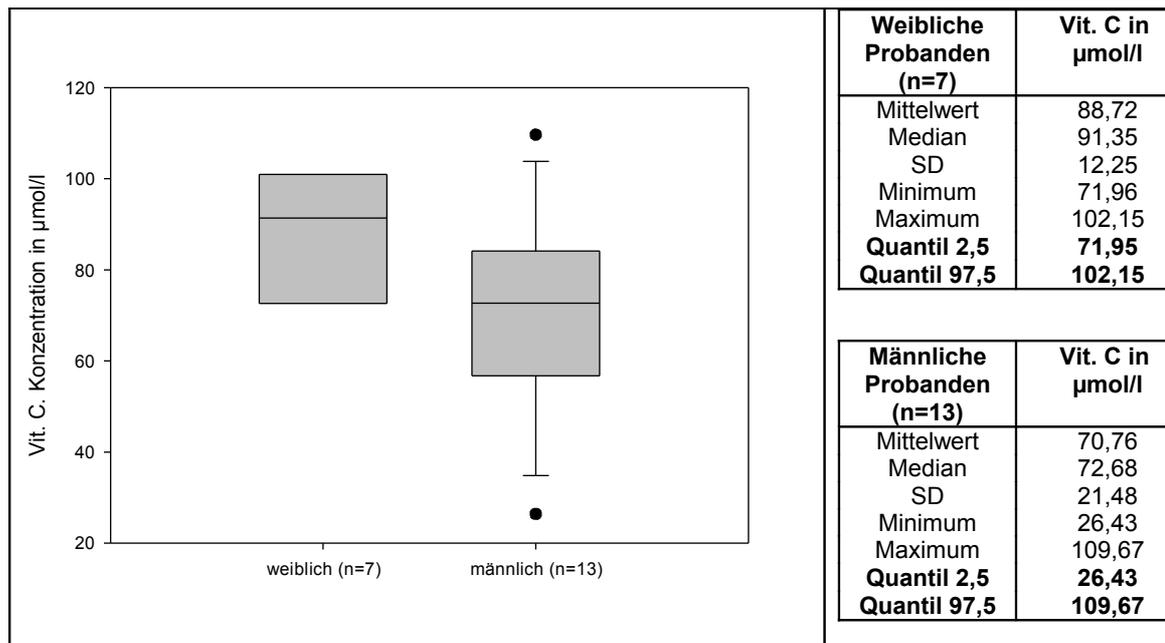


Abb. 26: Serum-Vitamin C-Konzentrationen und ermittelte Referenzwerte getrennt nach Geschlecht in der Altersgruppe 51-67 Jahre

Signifikante Unterschiede in der Serum-Ascorbinsäurekonzentration fanden sich zwischen den Geschlechtern nur in der Altersgruppe 18-50 Jahre ($p = 0,005$), zwischen den Vitamin C-Konzentrationen von Männern und Frauen >50 Jahre konnten keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,081$) nachgewiesen werden (s. Abb. 25 und 26).

3.2.2 Vitamin C-Kinetik

Zur Untersuchung der Ascorbinsäurekinetik wurde einer gesunden männlichen Versuchsperson (28 Jahre) 500 mg Ascorbinsäure oral verabreicht, einer gesunden weiblichen Probandin (27 Jahre) wurden 500 mg Ascorbinsäure intravenös appliziert. Nach oraler Einnahme von 500 mg Vitamin C stieg der Ascorbinsäure-Plasmaspiegel langsam und kontinuierlich an und erreichte ein Maximum von etwa 130 $\mu\text{mol/l}$ nach etwa 75 Minuten. Der weitere Verlauf der Vitamin C-Konzentration bis zu 5 Stunden nach Einnahme bewegte sich im Bereich 100-120 $\mu\text{mol/l}$.

Vitamin C Kinetik 500 mg p.o.

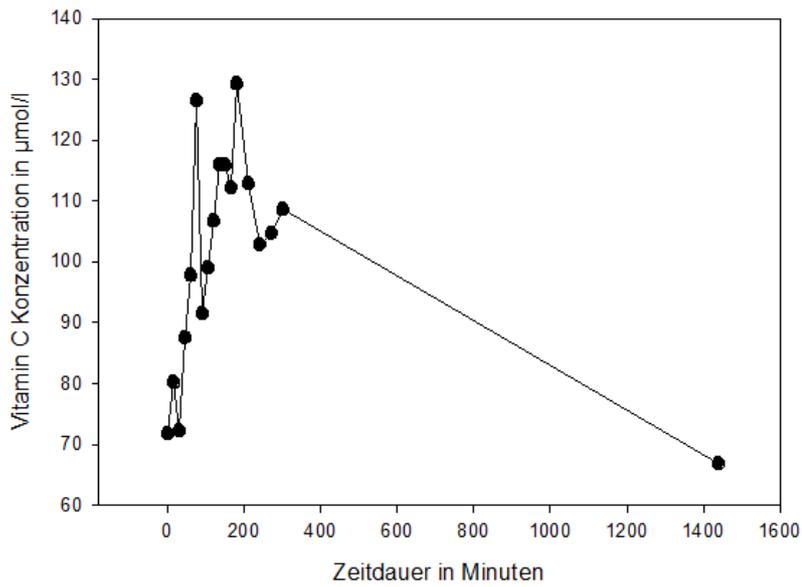


Abb. 27: Vitamin C-Plasmakonzentrationsverlauf nach oraler Einnahme von 500 mg Ascorbinsäure.

Vitamin C Kinetik 500 mg i.v.

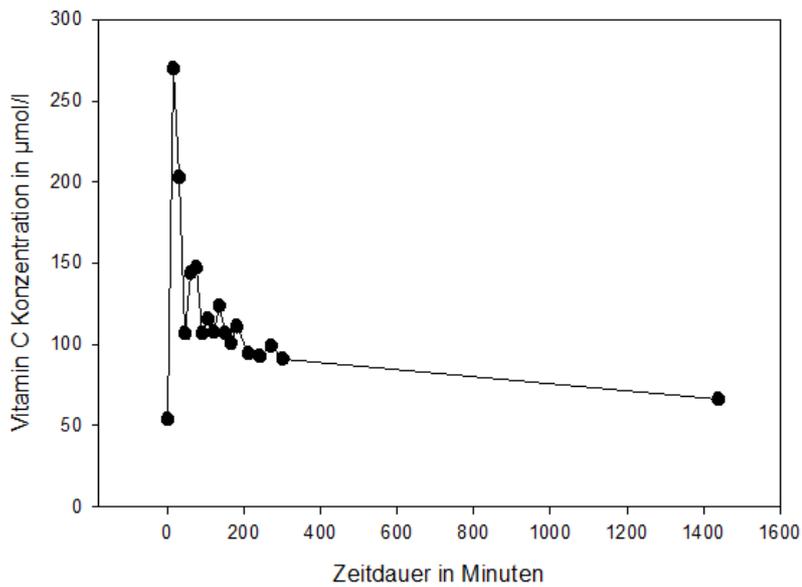


Abb. 28: Verlauf der Vitamin C-Plasmakonzentration nach intravenöser Gabe von 500 mg Ascorbinsäure.

Nach intravenöser Applikation von Ascorbinsäure zeigte sich nach 15 Minuten ein schneller Anstieg der Vitamin C-Plasmakonzentration auf 270 µmol/l. Es folgte ein

rascher Abfall innerhalb von 45 Minuten auf ein Konzentrationsplateau von 100-120 $\mu\text{mol/l}$.

4. Diskussion

In der Literatur sind viele chromatographische Methoden zur Messung der Ascorbinsäure im Blut beschrieben, jedoch sind Angaben bezüglich der Validierung, die Grundlage reproduzierbarer Ergebnisse, häufig unvollständig (Bode und Rose 1988, Hatch und Sevanian 1984, Liao et al 1993). Obwohl die leichte Oxidierbarkeit der Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure hinreichend bekannt ist, verzichteten viele Autoren auf systematische Untersuchungen zur Stabilität der Vitamin C-Konzentrationen in den Proben (Iriyama et al 1994, Hatch und Sevanian 1984, Tanishima und Kita 1993, Ross 1994). Auch geschlechtsspezifische Referenzwerte werden häufig nicht oder nur mit einer sehr geringen Probandenanzahl ermittelt (Iwase und Ono 1994, Liao et al 1993, Nagi und Degrell 1989, Ross 1994). In der eigenen Arbeit wurde der Versuch unternommen, diese Defizite anlässlich der Etablierung und Optimierung einer HPLC-Methode zur Bestimmung von Vitamin C im Zentrallabor des UK S-H am Campus Lübeck zu beheben.

4.1 Methodenoptimierung

Liao et al beschreiben in ihrer Methode eine ungenügende Abtrennung des Vitamin C-Peak vom Injektionspeak in der elektrochemischen Detektion wie in der UV-Detektion (Liao et al 1991), was eine korrekte Konzentrationsbestimmung erschwert. Dies konnte durch Senkung des Puffer-pH von 2,95 auf 2,55 in der UV-Detektion verbessert werden, da die Retentionszeit der Ascorbinsäure hierdurch deutlich verlängert wurde (von 2 min auf 2,6 min).

Als interner Standard wurde 3-Amino-4-hydroxybenzoesäure (Retentionszeit 3,4 min) für die UV-Detektion, bzw. Hydrochinon (Retentionszeit 6,3 min) für die ECD eingesetzt. Die anderen Substanzen zeigten in den sieben Minuten der Messung keinerlei erkennbaren Peak oder eluierten bereits im Totvolumen von der Säule und konnten somit von anderen Verbindungen nicht abgetrennt werden.

Die Richtigkeit der Messung von Vitamin C-Proben wurde in der Originalarbeit mit >100 % angegeben, was bedeutet, dass höhere Konzentrationen erfasst wurden, als eigentlich in der Probe enthalten waren. Durch die Verwendung von Vitamin C-freiem Serum als Verdünnungsmedium der Standards in der vorliegenden Arbeit statt des ursprünglich verwendeten Puffers ergab sich eine Unrichtigkeit von 0,013 % für die Kontrolle 1 und 0,017 % für die Kontrolle 2. Die Wiederfindung (berechnet als Prozentsatz des Mittelwert der gemessenen Konzentration vom Sollwert) betrug dabei für die Kontrolle 1 99,91 %, für die Kontrolle 2 100,03 %.

Bezüglich der Impräzision in Serie wurden mit Variationskoeffizienten von 0,7 %, bzw. 0,05 % bei mittleren Konzentrationen von 14, 58 und 100 µmol/l gute Ergebnisse erzielt. Die Ergebnisse der Tag-zu-Tag-Impräzision lagen mit 4,2 % für Serumproben und 8,2 % für Plasmaproben in einem Bereich, den auch andere Autoren beschreiben (Chung et al 2001, Tanishima et al 1992).

Auch die von Liao et al angegebene Nachweisgrenze von 120 ng/ml deckt sich gut mit den eigenen Ergebnissen von 96,8 ng/ml (0,55 µmol/l), die Bestimmungsgrenze lag bei 2,22 µmol/l. Die Linearität der Messung, bei Liao et al mit 2-113 µmol/l angegeben (Liao et al 1993), in der vorliegenden Arbeit aber mit 2-700 µmol/l ermittelt, deckt die relevanten Grenzwerte für moderaten (< 28 µmol/l) und deutlichen (< 11 µmol/l) Vitamin C-Mangel ebenso ab wie die Referenzbereiche im Plasma (25-120 µmol/l). Auch höhere Plasmakonzentrationen, wie sie bei intravenöser Gabe von üblichen L-Ascorbinsäuredosen auftreten können, sind in diesen Bereich einzuordnen (Padayatty et al 2000). Somit konnte die Linearität der Messung im benötigten Messbereich bestätigt werden.

Anders als vielfach angenommen (Kutnik et al 1987, Liao et al 1991, Iwase und Ono 1994, Ross 1994), konnte in unserem Stabilitätsexperiment keine verbesserte Haltbarkeit durch Zusatz von EDTA demonstriert werden. Tatsächlich zeigte sich ein rapider Abfall der Vitamin C-Konzentration bei Raumtemperatur, bei 4° C sowie bei -20° C, mit und ohne Zusatz von MPA.

Kutnik et al und Nagy und Degrell dokumentierten eine verlustfreie Lagerung der Vitamin C-haltigen Proben durch Zusatz von meta-Phosphorsäure in EDTA-Plasma bei -20° bzw. -34 ° C über den Zeitraum von drei Wochen (Kutnik et al 1987, Nagy und Degrell 1989). Im Gegensatz dazu geben andere Autoren eine Haltbarkeit von nur wenigen Tagen an (Iriyama et al 1984, Bode und Rose 1988, Liao et al 1991, Tanashima und Kita 1994, Iwase und Ono 1994). Auch eine Stabilität der Proben von mehreren Jahren wird beschrieben, beispielsweise durch Lyophilisation (Margolis und Duewer 1996) oder Einfrieren bei -196° C (Jenab et al 2005), was jedoch mit hohem technischem Aufwand verbunden ist.

Den eigenen Untersuchungen zufolge (Abb. 15 und 16) ist die Zugabe von meta-Phosphorsäure in der vorliegenden optimierten Methode ein praktikabler und zuverlässiger Weg zur Stabilisierung der Vitamin-C-Proben in Serum und Lithiumheparinplasma.

4.2 Grenzen der Methode

Die vorliegende Methode dient der Bestimmung von Ascorbinsäurekonzentrationen in Plasma und Serum, eine Messung von Dehydroascorbinsäure oder anderen Vitamin C-

Derivaten ist hingegen nicht möglich. In neueren Studien wurde darauf hingewiesen, dass Dehydroascorbinsäure in humanem Plasma nur in Spuren vorkommt und in größeren Konzentrationen ein Artefakt ist, das durch die Probenbehandlung mit bestimmten Säuren auftritt. Von den am häufigsten verwendeten Säuren bei der Reversed-Phase HPLC-Messung des Vitamin C sorgt nur die meta-Phosphorsäure für ein geringeres Auftreten von Dehydroascorbinsäure nach der Stabilisation (Koshiishi et al 1998), weshalb sie auch in der optimierten Methode verwendet wird.

Da der Transport des Vitamin C in die Zelle durch hohe Glucosekonzentrationen im Blut gehemmt wird, können durch Messung der Plasmaascorbinsäurekonzentration nur bedingt Aussagen zum Vitamin C-Status von Patienten gemacht werden, die über längere Zeiträume an Hyperglykämie leiden. Während bei normoglykämischen Menschen die zellulären Ascorbinsäurekonzentrationen eng mit den Plasmakonzentrationen korrelieren, kann bei chronisch hyperglykämischen Personen die Plasma-Ascorbinsäurekonzentration im Normbereich liegen, die Konzentration in den Zellen dagegen stark vermindert sein. Bei Auftreten eines solchen zellulären Skorbutus entsteht bei alleiniger Bestimmung der Plasmakonzentration demnach eine diagnostische Lücke (Cunningham 1998, Yamada et al 2004).

4.3 Referenzwerte

Mit der optimierten Methode wurden geschlechtsspezifische Referenzwerte für ein Blutspenderkollektiv (95 männliche, 55 weibliche Probanden) im Alter von 18-67 Jahren erstellt. Es zeigten sich dabei signifikant höhere Vitamin C-Plasmakonzentrationen bei Frauen als bei Männern, eine Beobachtung, die auch in anderen Arbeiten gemacht wurde (Brook und Grimshaw 1968, Wrieden et al 2000). In der Altersgruppe von 51-67 Jahren war der Unterschied der Plasmakonzentration zwischen den Geschlechtern nicht mehr signifikant.

Allgemein sind die ermittelten Referenzwerte von 24-136 $\mu\text{mol/l}$ für Frauen und 23–116 $\mu\text{mol/l}$ für Männer im Vergleich mit den in der Literatur angegebenen Werten von 30-50 $\mu\text{mol/l}$ (Lutsenko et al 2002, Hampel et al 2004, Wrieden et al 2000, Johnston et al 1998) relativ hoch. Dies könnte zum einen an der Probandenauswahl liegen; es wurden gesunde Blutspender einer bestimmten Altersgruppe untersucht. Hinzuzufügen ist auch, dass es sich nicht um eine Nüchternprobenabnahme handelte, was jedoch in anderen Studien ebenso der Fall war (Myint et al 2008, Wrieden et al 2000, Brook et al 1968). Zusätzlich erfolgte eine sorgfältige, zeitnahe Probenaufarbeitung mit dem Vitamin C angemessenen Stabilisierungsmaßnahmen; die Lagerung der Proben bis zur Aufarbeitung erfolgte auf Eis und lichtgeschützt. Zum anderen wurden die Vitamin C-

Konzentrationen mit Hilfe der vorliegenden optimierten Methode mit hoher Präzision und Richtigkeit erfasst.

4.4 Kinetik

Wie erwartet und in der Literatur beschrieben, waren durch intravenöse Gabe von Vitamin C höhere Plasmakonzentrationen erreichbar als durch orale Verabreichung.

Riordan et al und Padayatty et al beschreiben mögliche Werte von über 10000 $\mu\text{mol/l}$ (185 mg/dl), eine Konzentration, die durch orale Aufnahme nicht erreicht werden kann (Riordan et al 1995, Padayatty et al 2004). In den vorliegenden Versuchen konnte unmittelbar nach der Verabreichung von 500 mg i.v. eine maximale Konzentration von 270 $\mu\text{mol/l}$ erfasst werden. Danach sank die Vitamin C-Konzentration im Plasma innerhalb einer Stunde auf einen relativ (gleich bleibenden) konstanten Wert von etwa 100 $\mu\text{mol/l}$ ab.

Während sich die Vitamin C-Kinetik bei intravenöser Applikation durch einen raschen Anstieg sowie einen raschen Abfall der Konzentration im Plasma auszeichnete, stieg die Konzentration nach oraler Gabe langsamer an. Erst nach 75 Minuten erreichte sie ihre maximale Konzentration bei 127 $\mu\text{mol/l}$ und sank dann ebenfalls auf ein Konzentrationsplateau von etwa 100 $\mu\text{mol/l}$.

Die Beobachtungen von Levine et al, die ein Konzentrationsmaximum unmittelbar nach intravenöser Gabe mit nachfolgendem Abfall auf ein Konzentrationsplateau innerhalb der ersten zwei Stunden beschreiben, sind ebenso gut mit den vorliegenden Ergebnissen vereinbar wie die Beobachtung, dass das Konzentrationsplateau bei oraler Gabe erst nach eineinhalb bis zwei Stunden nach Applikation erreicht wird.

Dabei interpretieren Levine et al das Plasmaplateau als Ausdruck der zellulären Vitamin-C-Sättigung, für die bereits eine Dosis von 100 mg ausreichend ist. Erst eine Vitamin C Aufnahme von über 100 mg/d führte in ihren Versuchen zu einer renalen Ausscheidung. Gleichzeitig beschreiben sie einen linearen Konzentrationsanstieg bis zum Erreichen eines Plasmaplateaus sowie eine Bioverfügbarkeit von 100 % bei einmaliger Gabe von 200 mg Ascorbinsäure pro Tag. Bei Einzeldosen von 500 mg oder mehr sank die Bioverfügbarkeit und der überwiegende Anteil wurde renal eliminiert (Levine et al 1996, 2001).

4.5 Einsatzmöglichkeiten

Die für das Zentrallabor optimierte Methode zur Bestimmung des Plasma-Vitamin C eignet sich insbesondere für die Forschung, kann jedoch auch in der klinischen Routine Anwendung finden. Obgleich der manifeste Vitamin C-Mangel in Mitteleuropa und

Nordamerika selten geworden ist, werden in der Literatur immer wieder schwere Fälle beschrieben, deren Ursache meist über lange Zeit nicht erkannt wurde (Fain et al 1998, Cohen und Paeglow 2001). Da viele Skorbutsymptome unspezifisch sind und häufig, vor allem bei multimorbiden Patienten, anderen Erkrankungen zugeordnet werden, kann eine Messung der Ascorbinsäurekonzentration im Plasma hilfreich sein.

Auch der Ascorbinsäurespiegel von Hämochromatose-Patienten, die ihren Vitamin C-Konsum einschränken, um die enterale Eisenaufnahme gering zu halten, kann überprüft und bei akutem Mangel durch intravenöse Applikation angehoben werden.

Eine Messung von Vitamin C-Plasmaspiegeln kann auch bei Dialysepatienten sinnvoll sein, da einerseits durch die Hämofiltration Ascorbinsäure verloren gehen und andererseits überschüssiges Vitamin C nicht über die Nieren ausgeschieden werden kann (Chazot et al 2001, Morena et al 2002). Deicher et al weisen darauf hin, dass Hämodialysepatienten mit niedrigen Vitamin C - Plasmaspiegeln ein deutlich erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität besitzen. In ihrer Arbeit beschreiben sie ein 3,9-fach erhöhtes Risiko für Dialysepatienten mit Ascorbinsäurespiegeln $< 32 \mu\text{mol/l}$ einen Hirn- oder Herzinfarkt zu erleiden gegenüber solchen mit Vitamin C-Plasmakonzentrationen $> 60 \mu\text{mol/l}$ (Deicher et al 2005).

4.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die von Liao et al beschriebene Methode zur Messung von Ascorbinsäure im Plasma bezüglich ihrer Leistungsparameter für Routine und Forschung optimiert. Weitere Versuche sind nötig, um die Stabilität der Proben bei Langzeit-Lagerung zu charakterisieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mit der vorgestellten Methode prinzipiell neben der Konzentrationsbestimmung in Serum und Plasma auch eine Messung der Vitamin-C-Konzentration in Urin- und Liquorproben möglich ist; systematische Analysen der Ascorbinsäurekonzentrationen in diesen und anderen biologischen Flüssigkeiten wurden aber nicht durchgeführt. Nicht zuletzt wäre ein Erstellen von pädiatrischen und geriatrischen Referenzwerten und von Nüchternreferenzwerten interessant.

5. Zusammenfassung

L-Ascorbinsäure spielt eine facettenreiche Rolle im menschlichen Organismus; ihr Nutzen in Prävention und Therapie vieler Erkrankungen ist derzeit noch wenig verstanden und aktuell Gegenstand der Forschung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die von Liao et al beschriebene RP-HPLC-Methode mit UV-Detektion zur Messung von Ascorbinsäurespiegeln im Plasma optimiert und an die Gegebenheiten des Zentrallabors angepasst. Verwendet wurde eine Synergi 4u Hydro-RP C18 150 x 4,6 mm Säule und eine mobile Phase aus 20 mM Ammoniumdihydrogen-Phosphat und 0,015 % meta-Phosphorsäure bei einem pH von 2,55, mit 3-Amino-4-hydroxybenzoesäure als internem Standard. Serum- oder Lithium-Heparin-Proben wurden mit einem Gemisch aus 10 % meta-Phosphorsäure und 1 % Perchlorsäure stabilisiert und (ausgefällt) deproteiniert. Die insgesamt siebenminütige HPLC-Messung erfolgte per UV-Detektion bei 245 nm, bei einer Flussrate von 1ml/min. Die Retentionszeit der Ascorbinsäure betrug dabei 2,9 min, die des internen Standards 3,4 min. Die optimierte Methode hat eine Nachweisgrenze von 96 ng/ml. Die Unrichtigkeit der Messung lag konzentrationsabhängig zwischen 0,03 % und 0,08 %. Der Variationskoeffizient der Impräzision in Serie betrug konzentrationsabhängig 0,05–0,7 %, in der Tag-zu-Tag-Impräzision 4,2 % für Serumproben, 8,2 % für Plasmaproben. Die Messung von Ascorbinsäurekonzentrationen war linear von 2-700 µmol/l. Die vorliegende Methode könnte prinzipiell auch für Liquor- und Urinuntersuchungen modifiziert werden. Mit 10 % meta-Phosphorsäure und 1 % Perchlorsäure versetzte und bei -20 °C eingefrorene Serum- oder Lithium-Heparin-Proben konnten 35 Tage ohne Konzentrationsverluste gelagert werden. Zur Referenzwerterstellung wurden Serumproben von 150 Blutspendern zwischen 18 und 67 Jahren (m: 95, w: 55) analysiert. Der ermittelte Vitamin C-Plasma-Referenzbereich betrug 25–120 µmol/l. Frauen hatten dabei signifikant höhere Vitamin C-Plasmaspiegel (24-136 µmol/l) als Männer (23–116 µmol/l). In pharmakokinetischen Untersuchungen zeigten sich deutlich höhere erreichbare Ascorbinsäure-Plasmakonzentrationen nach intravenöser Applikation von 500 mg Vitamin C als nach oraler Gabe der selben Dosis.

6. Anhang

Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$	Peakfläche
709,703	230897
354,851	105001
177,425	48452
88,712	21659
44,356	8848
22,178	4307
11,089	2024
5,544	1047
2,772	818
1,386	442
0,693	524
0,346	363
0,173	425

Tab. 6: Tabelle der Werte zur Linearität der Messung

Kontrolle S2 Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$	Kontrolle S4 Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$	Kontrolle S5 Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$	Leerprobe Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$
14,08	59,48	99,11	-0,483367
14,07	58,12	101,24	-0,0470181
14,16	59,38	100,48	-0,837217
14,12	58,58	99,69	-0,912409
14,05	58,92	98,84	-0,241109
14,15	58,2	99,92	-0,245376
14,07	58,33	100,01	-0,743339
14,12	57,49	99,78	-0,121922
14,02	58,02	99,37	-0,23529
14,13	58,12	99,91	0,153667
14,01	58,11		-0,130809
14,16	58,11		-0,174128
14,04	58,09		-0,04584
13,85	58,14		-0,24801
13,98	58,13		-0,389037
13,88	58,22		-0,376494
14,0	58,29		-0,308737
13,96	58,53		-0,277186
13,8	58,02		0,004963
13,96	57,94		-0,075

Tab. 7: Tabelle mit den ermittelten Werten der mehrfachen Messung der Kontrollen S2,4 und 5 zur Bestimmung der Präzision in Serie sowie Werte der Leerprobe zur Bestimmung der Nachweisgrenze

Zeit in Stunden	Heparinplasma Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$	Serum Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$
--------------------	--	---

0	112,927	95,4968
24	100,699	88,62
48	96,56	89,225

Tab 8: Tabelle der ermittelten Werte zur Tag-zu-Tag-Präzision

Zeit in Tagen	RT Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$	RT+MPA Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$	4°C Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$	4°C+MPA Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$	-20°C Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$	-20°C+MPA Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$
0	108,086	108,086	108,086	108,086	108,086	108,086
1	0	3,65138	0	9,0948	0	15,1899
2		3,65125		4,88897		14,2616
7		0		0		16,0286
14						16,3061
21						12,481
35						12,7222

Tab. 9: Tabelle mit den ermittelten Werten des Stabilitätsversuches mit EDTA-Plasma unter unterschiedlichen Lagerungsbedingungen.

Zeit in Tagen	RT Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$	RT+MPA Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$	4°C Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$	4°C+MPA Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$	-20°C Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$	-20°C+MPA Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$
0	100,699	100,699	100,699	100,699	100,699	100,699
1	0	37,7431	15,0983	65,0466	80,8759	100,699
2		14,6849	2,11743	55,9566	74,1167	96,5643
7		14,3465	0	25,0166	74,6697	95,8965
14		21,0735		7,46957	61,7514	93,6447
21		21,5084		0	62,4434	94,3262
35		0			55,69	91,186

Tab. 10: Tabelle mit den ermittelten Werten des Stabilitätsversuches mit Heparin-Plasma unter unterschiedlichen Lagerungsbedingungen.

Zeit in Tagen	RT Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$	RT+MPA Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$	4°C Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$	4°C+MPA Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$	-20°C Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$	-20°C+MPA Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$
0	88,6262	88,6262	88,6262	88,6262	88,6262	88,6262
1	0,118893	18,2007	43,4039	53,5836	80,3886	88,6262
2	0	2,35319	23,1259	47,7853	84,4726	89,225
7		0	2,67573	14,9399	64,2102	92,1515
14			0	4,67359	75,1112	92,628
21				0	68,4656	93,2474
35					52,9476	91,3441

Tab. 11: Tabelle mit den ermittelten Werten des Stabilitätsversuches mit Serum unter unterschiedlichen Lagerungsbedingungen.

Proband	Geschlecht	Alter	Vit C Konz 1 ($\mu\text{mol/l}$)
1	M	49	95,2584
2	M	24	113,702
3	M	31	20,8279
4	W	24	85,2393

5	M	21	81,7217
6	M	29	86,776
7	W	31	93,3501
8	W	25	107,003
9	M	64	72,8391
10	W	59	91,3597
11	M	51	88,5922
12	M	22	63,8208
13	M	25	66,1654
14	M	25	46,671
15	M	38	44,1697
16	M	22	58,7676
17	W	40	104,35
18	M	23	58,2787
19	M	27	45,3159
20	W	40	51,0859
21	M	21	112,496
22	W	56	93,645
23	M	36	67,612
24	W	41	53,2278
25	W	39	76,1189
26	M	41	79,7575
27	W	37	28,1184
28	M	45	58,9321
29	M	42	46,5881
30	M	54	109,667
31	M	60	79,639
32	M	26	107,964
33	M	44	82,77
34	W	53	88,4054
35	W	23	100,589
36	M	21	72,3297
37	M	25	125,222
38	M	28	77,708
39	M	44	60,3236
40	W	30	65,3809
41	M	26	77,5053
42	W	23	142,446
43	M	20	118,239
44	M	45	83,3364
45	M	42	90,1709
46	M	21	98,5052
47	M	57	71,8177
48	W	32	21,6286
49	M	22	73,1191
50	W	18	76,8081
51	W	49	64,9667
52	W	32	44,6305
53	M	50	76,6075
54	W	44	102,296
55	M	55	26,4348
56	M	24	65,7664
57	M	20	72,768
58	M	28	93,4234
59	W	32	69,256
60	W	44	48,1483
61	M	42	47,9069
62	M	55	47,4147
63	M	49	73,9383
64	M	39	86,7035
65	W	47	103,771
66	W	29	96,0497
67	W	51	72,6409

68	M	22	67,2476
69	M	28	68,7298
70	M	38	66,3394
71	M	52	49,8292
72	M	64	74,6985
73	M	26	34,7106
74	M	37	41,5936
75	M	41	67,9941
76	W	31	109,355
77	W	27	84,411
78	W	20	80,6188
79	W	37	75,04
80	W	19	70,271
81	W	29	63,5737
82	W	21	86,1339
83	M	20	87,0655
84	W	25	99,2783
85	M	36	97,249
86	M	47	52,7442
87	M	24	70,262
88	M	26	67,2358
89	W	21	55,1932
90	M	45	72,3438
91	M	30	56,8466
92	W	40	59,8768
93	M	42	53,7187
94	M	45	79,5653
95	M	27	65,0673
96	M	20	63,1192
97	M	37	53,009
98	M	33	68,9168
99	W	23	76,0358
100	M	30	57,6392
101	W	41	115,39
102	M	23	58,2115
103	M	26	66,4722
104	M	62	63,6288
105	M	40	54,5247
106	W	32	72,6649
107	W	23	115,456
108	W	49	63,9378
109	M	28	51,0924
110	M	52	95,1135
111	M	26	17,597
112	W	34	124,031
113	M	28	60,8468
114	W	65	102,151
115	M	19	80,1244
116	W	22	115,562
117	M	25	73,0239
118	M	26	79,4352
119	W	38	69,8152
120	M	45	55,501
121	W	35	71,2183
122	M	42	69,3344
123	M	26	70,3179
124	M	28	91,4565
125	M	29	84,282
126	M	28	74,6484
127	W	24	93,9512
128	W	46	92,117
129	W	48	57,9609
130	W	22	88,8226

131	M	26	46,4886
132	W	60	71,9579
133	M	35	72,8121
134	M	49	42,3
135	M	27	69,6577
136	M	60	67,6405
137	W	44	75,542
138	M	27	58,9669
139	M	36	71,3347
140	M	21	69,3111
141	W	23	78,6532
142	M	38	92,1295
143	W	32	75,4566
144	W	67	100,938
145	M	37	78,1376
146	W	50	79,513
147	W	47	80,9995
148	M	37	46,6889
149	M	40	35,8882
150	M	59	72,68

Tab. 12: Tabelle der ermittelten Referenzwerte mit Angabe von Alter und Geschlecht der Probanden

	Proband 1	Proband 2
	(i.v.) Vitamin	(p.o.)
Zeit in min	C in $\mu\text{mol/l}$	Vitamin C in $\mu\text{mol/l}$
0	53,658	71,7715
15	269,79	80,1384
30	202,756	72,1683
45	106,454	87,6044
60	144,122	97,7626
75	147,055	126,554
90	106,655	91,5061
105	115,511	99,0137
120	107,531	106,706
135	123,803	116,079
150	106,543	115,899
165	100,657	112,234
180	110,727	129,282
210	94,3017	112,87
240	92,63	102,912
270	99,2265	104,715
300	91,1674	108,617
1440	66,78	68,0469

Tab. 13: Tabelle mit den Werten der Probanden 1 (500 mg Vitamin C i.v.) und 2 (500 mg Vitamin C p.o.) zur Untersuchung der Vitamin C-Pharmakokinetik

Literaturverzeichnis

Audera C, Patulny R V, Sander B H, Douglas R M: Mega-dose vitamin C in treatment of the common cold: a randomised controlled trial. *MJA* 175, 359-62 (2001).

Baker E M, Hodges R E, Hood J, Sauberlich H E, March S C: Metabolism of 14C- and 3H-labeled L-ascorbic acid in human scurvy. *Am J Clin Nutr* 24, 444-54 (1971).

Baker E M, Hodges R E, Hood J, Sauberlich H E, March S C: Metabolism of ascorbic-L-14C acid in experimental human scurvy. *Am J Clin Nutr* 22, 549-58 (1969).

Baker E M, Saari J C, Tolbert B M: Ascorbic acid metabolism in man. *Am J Clin Nutr* 19, 371-8 (1966).

Bartholomew M: James Lind's Treatise of the Scurvy (1753). *Postgrad Med J* 78, 695-6 (2002).

Berger TM, Polidori M C, Dabbagh A, Evans P J, Halliwell B, Morrow J D, Roberts L J, Frei B: Antioxidant Activity of Vitamin C in Iron-overloaded Human Plasma. *J Biol Chem* 272, 15656-60 (1997).

Bienfait H F und van den Briel M L: Rapid mobilization of ferritin iron by ascorbate in the presence of oxygen. *Biochim Biophys Acta* 631, 507-10 (1980).

Bisby R H und Parker A W: Reaction of ascorbate with the α -tocopheroxyl radical in micellar and bilayer membrane systems. *Arch Biochem Biophys* 317, 170-8 (1995).

Bliesner DM: Validating chromatographic methods: a practical guide. 1. Auflage, S. 10-12, John Wiley & Sons Inc., New Jersey (2006).

Brook M und Grimshaw JJ: Vitamin C concentration of plasma and leukocytes as related to smoking habit, age, and sex of humans. *Am J Clin Nutr* 21, 1254-8 (1968).

Bruemmer B, White E, Vaughan T L, Cheney C L: Nutrient intake in relation to bladder cancer among middle-aged men and women. *Am J Epidemiol* 144, 485-95 (1996).

Bruno R S, Ramakrishnan R, Montine T J, Bray T M, Traber M G: α -Tocopherol disappearance is faster in cigarette smokers and is inversely related to their ascorbic acid status. *Am J Clin Nutr* 81, 95-103 (2005).

Carr A und Frei B: Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB* 13, 1007-24 (1999).

Carr A C und Frei B: Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *Am J Clin Nutr* 69, 1086-1107 (1999).

Catani M V, Costanzo A, Savini I, Levrero M, De Laurenzi V, Wang J Y J, Melino G, Avigliano L: Ascorbate up-regulates MLH1 (Mut homologue-1) and p73: implications for the cellular response to DNA damage. *Biochem J* 364, 441-7 (2002).

Clejan S, Japa S, Clemetson C, Hasabnis S S, David O, Talano J V: Blood histamine is associated with coronary artery disease, cardiac events and severity of inflammation and atherosclerosis. *J Cell Mol Med* 6 (4), 538-92 (2002).

Chazot C, Laurent G, Charra B, Blanc C, VoVan C, Jean G, Vanel T, Terrat J C, Ruffet M: Malnutrition in long-term haemodialysis survivors. *Nephrol Dial Transplant* 16, 61-9 (2001).

Chen K, Suh J, Carr A C, Morrow J D, Zeind J, Frei B: Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, E1406-12 (2000)

Chen Q, Espey M G, Krishna M C, Mitchell J B, Corpe C P, Buettner G R, Shacter E, Levine M: Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 13604-9 (2005).

Chung W Y, Chung J K O, Szeto Y T, Tomlinson B, Benzie I F F: Plasma ascorbic acid: measurement, stability and clinical utility revisited. *Clin Biochem* 34, 623-7 (2001).

Cohen S A und Paeglow R J: Scurvy: an unusual cause of anaemia. *JABFP* 14, 314-6 (2001).

Cunningham J J: The glucose/insulin system and vitamin C: implications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr* 17, 105-8 (1998).

Curhan G C, Willett W C, Speizer F E, Stampfer M F: Intake of vitamins B6 and C and the risk of kidney stones in women. *J Am Soc Nephrol* 10, 840-5 (1999).

Deicher R, Ziai F, Bieglmayer C, Schillinger M, Hörl W H: Low total vitamin C plasma level is a risk factor for cardiovascular morbidity and mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 16, 1811-8 (2005).

De Klerk W A, Du Plessis J P, Van Der Watt J J, De Jager A, Laubscher N F: Vitamin C requirements of the vervet monkey (*Cercopithecus aethiops*) under experimental conditions. *S Afr Med J* 47, 705-8 (1973 a).

DeKlerk W A, Kotzé J P, Weight M J, Menne I V, Matthews M J A, McDonald T: The influence of various dietary ascorbic acid levels on serum ascorbic acid and cholesterol values of the baboon (*Papio ursinus*) during captivity. *S Afr Med J* 47, 1503-6 (1973 b).

Dhariwal K, Hartzell W O, Levins M: Ascorbic acid and dehydroascorbic acid measurements in human plasma and serum. *Am J Clin Nutr* 54, 712-6 (1991).

Drummond J C: Note on the role of the antiscorbutic factor in nutrition. *Biochem J* 13 77-80 (1919).

Evans M, Anderson R A, Smith J C, Khan N, Graham J M, Thomas A W, Morris K, Deely A, Frenneaux M P, Davies J S, Rees A: Effects of insulin lispro and chronic vitamin C therapy on postprandial lipaemia, oxidative stress and endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 33, 231-8 (2003).

Fain O, Mathieu E, Thomas M : Scurvy in patients with cancer. *BMJ* 316, 1661-2 (1998).

Fogelmann A M, Shechter I, Seager J, Hokom M, Child J S, Edwards P A : Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 2214-8 (1980).

Fraga C G, Motchnik P A, Shigenaga M K, Helbock H J, Jacob R A, Ames B N : Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 11003-6 (1991).

Frei B, England L, Ames B N: Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 6377-81 (1989).

Frei B, Stocker R, Ames B: Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 9748-52 (1988).

Gale C R, Martyn C N, Winter P D, Cooper C : Vitamin C and risk of death from stroke and coronary heart disease in cohort of elderly people. *BMJ* 310, 1563-6 (1995).

Geerling B J, Badart-Smook A, Stockbrügger R W, Brummer R-J: Comprehensive nutritional status in patients with long-standing Crohn disease currently in remission. *Am J Clin Nutr* 67, 919-26 (1998).

Hampel J S, Taylor C A, Johnston C S: Vitamin C deficiency and depletion in the United States: The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988 to 1994. *Am J Public Health* 94, 870-5 (2004).

Hankinson A E, Stampfer M J, Seddon J M, Colditz G A, Rosner B, Speizer F E, Willett W C : Nutrient intake and cataract extraction in women : a prospective study. *BMJ* 305, 335-9 (1992).

Haskell B E, Johnston C S : Complement component C1q activity and ascorbic acid nutriture in guinea pigs. *Am J Clin Nutr* 54, 1228S-30S (1991).

Heisz O: Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie, Hüthig-Verlag, Heidelberg S.18-30, 82-146 (1987).

Henriksen T, Mahoney E M, Steinberg D: Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 6499-503 (1981).

Hodges R E, Baker E M, Hood J, Sauberlich H E, March S C: Experimental scurvy in man. *Am J Clin Nutr* 22, 535-48 (1969).

Hodges R E, Hood J, Canham J E, Sauberlich H E, Baker E M: Clinical manifestations of ascorbic acid deficiency in man. *Am J Clin Nutr* 24, 432-43 (1971).

Hoffmann K E, Yanelli K, Bridges K R: Ascorbic acid and iron metabolism: alterations in lysosomal function. *Am J Clin Nutr* 54, 1188S-92S (1991).

Huang H-Y, Appel L J, Croft K D, Miller E R, Mori T A, Puddey I B: Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 76, 549-55 (2002).

Isler O, Brubacher G, Kiss J: Vitamin C. In: Isler O, Brubacher G, Ghisla S, Kräutler B, Bacher A, Kiss J, Müller F: Vitamine. 2. Wasserlösliche Vitamine. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1.Aufl., 396-435, 1988.

Iwase H und Ono I: Determination of ascorbic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection using a hydroxyapatite cartridge for precolumn deproteinization. *J Chrom B* 655, 195-200 (1994).

Jacob R A, Kelley D S, Pianalto F S, Swendseid M E, Henning S M, Zhang J Z, Ames B N, Fraga C G, Peters J H: Immunocompetence and oxidant defense during ascorbate depletion of healthy men. *Am J Clin Nutr* 54, 1302S-9S (1991).

Jacques P F, Taylor A, Hankinson S E, Willett W C, Mahnken B, Lee Y, Vaid K, Lahav M: Long-term vitamin C supplement use and prevalence of early age-related lens opacities. *Am J Clin Nutr* 66, 911-6 (1997).

Jenab M, Bingham S, Ferrari P, Friesen M D, Al-Delaimy W K, Luben R, Wareham N, Khaw K-T, Riboli E: long-term cryoconservation and stability of vitamin C in serum samples of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 1837-40 (2005).

Johnston C S and Cox S K: Plasma-saturating intakes of vitamin C confer maximal antioxidant protection to plasma. *J Am Coll Nutr* 20 (6), 623-7 (2001).

Johnston C S and Thompson L L: Vitamin C status of an outpatient population. *J Am Coll Nutr* 17 (4), 366-70 (1998).

Kallner A, Hartmann D, Hornig D: Steady-state turnover and body pool of ascorbic acid in man. *Am J Clin Nutr* 32, 530-9 (1979).

Keven K, Kutlay S, Nergizoglu G, Ertürk S: Randomized crossover study of the effect of vitamin C on EPO response in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 41 (6), 1233-9 (2003).

Khaw K T and Woodhouse P: Interrelation of vitamin C, infection, hemostatic factors and cardiovascular disease. *BMJ* 310, 1559-66 (1995).

Khaw K T, Bingham S, Welch A, Luben R, Wareham N, Oakes S, Day N: Relation between plasma ascorbic acid and mortality in men and women in EPIC-Norfolk prospective study: a prospective population study. *Lancet* 357, 657-63 (2001).

Koshiishi I, Mamura Yoshie, Liu J, Imanari T: Evaluation of an acidic deproteinization for the measurement of ascorbate and dehydroascorbate in plasma samples. *Clin Chem* 44:4, 863-8 (1998).

Kumar S S and Narayanan S S: Amperometric sensor for the determination of ascorbic acid based on cobalt hexacyanoferrate modified electrode fabricated through a new route. *Clin Pharm Bull* 54, 963-7 (2006).

Kutnik, M A, Hawkes W C, Schaus E E, Omaye S T: An Internal Standard Method for the Unattended High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Ascorbic Acid in Blood Components. *Anal Biochem* 166, 424-30 (1987).

Kushi L H, Folsom A R, Prineas R J, Mink P J, Wu Y, Bostick R M: Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Engl J Med* 334, 1156-62 (1996).

Laggner H and Goldenberg H: Interaction of respiratory burst and uptake of dehydroascorbic acid in differentiated HL-60 cells. *Biochem J* 345, 195-200 (2000).

Langlois M, Duprez D, Dlanghe J, De Buyzere M, Clement D L: Serum vitamin C concentration is low on peripheral arterial disease and is associated with inflammation and severity of atherosclerosis. *Circulation* 103, 1863-8 (2001).

Lee S H, Oe T, Blair I A: Vitamin C- Induced Decomposition of Lipid Hydroperoxides to endogenous Genotoxins. *Science* 292, 2083-86 (2001).

Lehr H-A, Frei B, Arfors K-E: Vitamin C prevents cigarette smoke-induced leukocyte aggregation and adhesion to endothelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 7688-92 (1994).

Levine M, Conry-Cantilena C, Wang Y, Welch R W, Washko P W, Dhariwal K R, Park J B, Lazarev A, Graumlich J F, King J, Cantilena L R: Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: Evidence for a recommended dietary allowance. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 3704-9 (1996).

Levine M, Daruwala R C, Park J B, Rumsey S C, Wang Y: Does vitamin C have a pro-oxidant effect? *Nature* 395, 231 (1998).

Levine M, Dhariwal K R, Washko P W, Butler J D, Welch R W, Wang Y, Bergstein P: Ascorbic acid and in situ kinetics: a new approach to vitamin requirements. *Am J Clin Nutr* 54, 1157S-62S (1991).

Levine M, Rumsey S C, Daruwala R, Park J B, Wang Y: Criteria and recommendations for vitamin C intake. *JAMA* 281, 1415-23 (1999).

Levine M, Wang Y, Padayatty S J, Morrow J: A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women. *Proc Nat Acad Sci* 98, 9842-6 (2001).

Liau L S, Lee B L, New A L, Ong C N: Determination of plasma ascorbic acid by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and electrochemical detection. *J Chrom Biomed Appl* 612, 63-70 (1993).

Liu T Z, Chin N, Kiser M D, Bigler W N: Specific spectrophotometry of ascorbic acid in serum and plasma by use of ascorbate oxidase. *Clin Chem* 28, 2225-8 (1982).

Löffler und Petrides: Biochemie und Pathobiochemie. 7. Auflage, 737-38, Springer Verlag Berlin Heidelberg.

Lutsenko E A, Cárcamo J M, Golde D W: Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. *J Biol Chem* 277, 16895-99 (2002).

Mackenzie B und Garrick M D: Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289: G981-86 (2005).

Marcus S L, Petrylak D P, Dutcher J P, Paietta E, Ciobanu N, Strauman J, Wiernik P H, Hutner S H, Frank O, Baker H: Hypovitaminosis C in patients treated with high-dose interleukin 2 and lymphokine-activated killer cells. *Am J Clin Nutr* 54, 1292S-7S (1991).

Margolis S A und Duewer D L: Measurement of ascorbic acid in human plasma and serum: stability, intralaboratory repeatability an interlaboratory reproducibility. *Clin Chem* 42/8, 1257-62 (1996).

Mashour S, Turner J F, Merrell R: Acute renal failure, oxalosis and vitamin C supplementation. *Chest* 118, 561-3 (2000).

Massey L K, Liebman M, Kynast-Gales S A: Ascorbate increases human oxaluria and kidney stone risk. *J Nutr* 135, 1673-7 (2005).

May J M, Qu Z, Neel D R, Li X: Recycling of vitamin C from its oxidized form by human endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1640, 153-61 (2003).

Mayne S T, Risch H A, Dubrow R, Chow W-H, Gammon M D, Vaughan T L, Farrow D C, Schoenberg J B, Stanford J L, Ahsan H, West A B, Rotterdam H, Blot W J, Fraumeni J F: Nutrient intake and risk of subtypes of esophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10, 1055-62 (2001).

Meagher E A, Barry O P, Burke A, Lucey M R, Lawson J A, Rokach J, FitzGerald G A: Alcohol-induced generation of lipid peroxidation products in humans. *J Clin Invest* 104, 805-13 (1999).

Morel D W, Hessler J R, Chisolm G M: Low desity lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J Lipid Res* 24, 1070-6 (1983).

Morena M, Cristol J-P, Bosc J-Y, Tetta C, Forret G, Leger C-L, Delcourt C, Papoz L, Descomps B, Canaud B: Connective and diffusive losses of vitamin C during haemofiltration session: a contributive factor to oxidative stress in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 17, 422-7 (2002).

Myint P K, Luben R N, Welch A A, Bingham S A, Wareham N J, Khaw K-T: Plasma vitamin C concentrations predict risk of incident stroke over 10 y in 20649 participants in the European Prospective Investigation into Cancer-Norfolk prospective population study. *Am J Clin Nutr* 87, 64-9 (2008).

Naidu K A: Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J* 2, 7-17 (2003).

Nishiki M und Yagi K: Molecular basis for the deficiency in humans of gulonolactone oxidase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis. *Am J Clin Nutr* 54, 1203S-8S (1991).

Nualart F J, Rivas C I, Montecinos V P, Godoy A S, Guaiquil V H, Golde D W, Vera J C: Recycling of vitamin C by a bystander effect. *J Biol Chem* 278, 101128-33 (2003).

Ngkeekwong F C und Ng L L: Two distinct uptake mechanisms for ascorbate and dehydroascorbate in human lymphoblasts and their interaction with glucose. *Biochem J* 324, 225-30 (1997).

Nyyssönen K, Parviainen M T, Salonen R, Tuomiletho J, Salonen J T: Vitamin C deficiency and risk of myocardial infarction: prospective population study of men from eastern Finland. *BMJ* 314, 634-8 (1997).

Orthwerth B J, Chemoglanskiy V, Mossine V V, Olesen P R: The effect of UVA light on the anaerobic oxidation of ascorbic acid and the glycation of lens proteins. *Invest Ophthalmol V Sci* 44, 3094-102 (2003).

Padayatty S J und Levine M: Reevaluation of ascorbate in cancer treatment: emerging evidence, open minds and serendipity. *J Am Coll Nutr* 19, 423-5 (2000).

Padayatty S J, Sun H, Wang Y, Riordan H D, Hewitt S M, Katz A, Wesley R A, Levine M: Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. *Ann Intern Med* 140, 533-7 (2004).

Pattison D J, Silman A J, Goodson N J, Lunt M, Bunn D, Luben R, Welch A, Bingham S, Khaw K-T, Day N, Symmons D P M: Vitamin C and the risk of developing inflammatory polyarthritis: prospective nested case-control study. *Ann Rheum Dis* 63, 843-7 (2004).

Pauling L: The significance of the evidence about ascorbic acid and the common cold. *Proc Nat Acad Sci USA* 68, 2678-81 (1971).

Pauling L: Vitamin C und der Schnupfen. Verlag Chemie GmbH Weinheim, S. 45-57, S. 87-115 (1972).

Podmore I D, Griffiths H R, Herbert K E, Mistry N, Mistry P, Lunec J: Does vitamin C have a pro-oxidant effect? *Nature* 395, 232 (1998).

Poulsen H E, Weimann A, Salonen J T, Nyssönen K, Loft S, Cadet J, Douki T, Ravanat J-L: Does vitamin C have a pro-oxidant effect? *Nature* 395, 231-2 (1998).

Quinn M T, Parthasarathy S, Fong L G, Steinberg D: Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 2995-8 (1987).

Rajakumar K: Infantile scurvy: a historical perspective. *Pediatrics* 108, E74 (2001).

Retsky K L, Freeman M W, Frei B: Ascorbic acid oxidation product(s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification: anti- rather than prooxidant activity of vitamin C in the presence of transition metal ions. *J Biol Chem* 268, 1304-9 (1993).

Riordan NH, Riordan HD, Meng X, Li Y, Jackson JA: Intravenous ascorbate as a tumor cytotoxic chemotherapeutic agent. *Med Hypothes* 44, 207-13 (1995).

Ross M A: Determination of ascorbic acid and uric acid in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chrom B* 657, 197-200 (1994).

Rumsey S C, Kwon O, Xu G W, Burant C F, Simpson I, Levine M: Glucose transporter isoform GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *J Biol Chem* 272, 18982-9 (1997).

Sargeant L A, Wareham N J, Bingham S, Day N E, Luben R N, Oakes S, Welch A W, Khaw K-T: Vitamin C and hyperglycemia in the European Prospective Investigation Into Cancer-Norfolk (EPIC Norfolk) Study. *Diabetes Care* 23, 726-32 (2000).

Sevanian A, Davies K J A, Hochstein P: Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am J Clin Nutr* 54, 1129S-34S (1991).

Sherry S und Ralli E P: Further studies on the effect of insulin on the metabolism of vitamin C. *J Clin Invest*, 27, 217-25 (1948).

Sowell J, Balz F, Stevens J F: Vitamin C conjugates of genotoxic lipid peroxidation products: structural characterization and detection in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 17964-9 (2004).

Stevenson N R: Active transport of L-ascorbic acid in the human ileum. *Gastroenterology* 67, 952-6 (1974).

Stryer, L: *Biochemistry*. 4th edition, 452-55, W. H. Freeman and Company, New York, 1995

Szent-Györgi A: Observations on the function of peroxidase systems and the chemistry of the adrenal cortex. Description of a new carbohydrate derivative. *Biochem J* 22, 1387-1409 (1928).

Szent-Györgi A, Haworth W N: Identification of vitamin C. *Nature* 131 225-6 (1933).

Tanashima K und Kita M: High-performance liquid chromatographic determination of plasma ascorbic acid in relationship to health care. *J Chromatogr* 613, 275-80 (1993).

Taper H S, Jamison J M, Gilloteaux J, Gwin C A, Gordon T, Summers J L: In vivo reactivation of DNases in implanted prostate tumors after administration of a vitamin C/K3 combination. *J Histochem Cytochem* 49, 109-19 (2001).

Tarng D-C und Huang T-P: A parallel, comparative study of intravenous iron versus intravenous ascorbic acid for erythropoetin-hyporesponsive anaemia in haemodialysis patients with iron overload. *Nephrol Dial Transplant* 13, 2867-72 (1998).

Tauber A I , Babior B M: Evidence for hydroxyl radical production by human neutrophils. *J Clin Invest* 60, 374-9 (1977).

Taylor A, Jacques P F, Chylack Jr L T, Hankinson S E, Khu P M, Rogers G, Friend J, Tung W, Wolfe J K, Padhye N, Willett W C: Long-term intake of vitamins and carotenoids and odds of early age-related cortical and posterior subcapsular lens opacities. *Am J Clin Nutr* 75, 540-9 (2002).

Taylor A, Jacques P F, Dorey D K: Oxidation and aging: impact on vision. *Toxicol Ind Health* 9, 349-71 (1993).

Ting H H, Timimi F K, Boles K S, Creager S J, Ganz P, Creager M A: Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 97, 22-8 (1996).

Toggenburger G, Häusermann M, Mütsch B, Genoni G, Kessler M, Weber F, Hornig D, O'Neill B, Semenza G: Na⁺ dependent, potential-sensitive L-ascorbate transport across the brush border membrane vesicles from kidney cortex. *Biochim Biophys Acta* 646, 433-43 (1981).

Turner R B: The role of neutrophils in the pathogenesis of rhinovirus infections. *Pediatr Infect Dis J* 9, 832-5 (1990).

Upston J M, Karjalainen A, Bygrave F L, Stocker R: Efflux of hepatic ascorbate: a potential contributor to the maintenance of plasma vitamin C. *Biochem J* 342, 49-56 (1999).

Valero M P, Fletcher A E, De Stavola B L, Vioque J, Alepuz V C: Vitamin C is associated with reduced risk of cataract in a mediterranean population. *J Nutr* 132, 1299-306 (2002).

Vanderslice J T und Higgs D J: Vitamin C content of foods: sample variability. *Am J Clin Nutr* 54, 1323S-7S (1991).

Vissers M C M, Lee W-G, Hampton M B: Regulation of apoptosis by vitamin C. *J Biol Chem* 276, 46835-40 (2001).

Washko P, Rotrosen D, Levine M: Ascorbic acid in human neutrophils. *Am J Clin Nutr* 54, 1221S-7S (1991).

Weber C, Erl W, Weber K, Weber P C: Increased adhesiveness of isolated monocytes to endothelium is prevented by vitamin C intake in smokers. *Circulation* 93, 1488-92 (1996).

Welch R W, Bergsten P, Butler J D, Levine M: Ascorbic acid accumulation and transport in human fibroblasts. *Biochem J* 294, 505-10 (1993).

Welch R W, Wang Y, Crossman A, Park J B, Kirks K L, Levine Mark: Accumulation of vitamin C (ascorbate) and its oxidized metabolite dehydroascorbic acid occurs by separate mechanisms. *J Biol Chem* 270, 12584-92 (1995).

Wendland B E, Aghdassi E, Tam C, Carrier J, Steinhart A H, Wolmann S L, Baron D, Allard J P: Lipid peroxidation and plasma micronutrients in Crohn disease. *Am J Clin Nutr* 74, 259-64 (2001).

Wrieden W L, Hannah M K, Bolton-Smith C, Tavendale R, Morrison C, Tunstall-Pedoe H: Plasma vitamin C and food choice in the third Glasgow MONICA population survey. *J Epidemiol Comm Health* 54, 355-60 (2000).

Yamada H, Yamada K, Waki M, Umegaki K: Lymphocyte and plasma vitamin C levels in type 2 diabetes patients with and without complications. *Diabetes Care* 27, 2491-2 (2004).

You W-C, Zhang L, Gail M H, Chang Y-S, Liu W-D, Ma J-L, Li J-Y, Jin M-L, Hu Y-R, Yang C-S, Blaser M J, Correa P, Blot W J, Fraumeni J F, Xu G-W: Gastric dysplasia and gastric cancer: *Helicobacter pylori*, serum vitamin C, and other risk factors. *J Nat Cancer Inst* 92, 1607-12 (2000).

Yuan J-M, Ross R K, Gao Y-T, Qu Y-H, Chu X-D, Yu M C: Prediagnostic levels of serum micronutrients in relation to risk of gastric cancer in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13, 1772-80 (2004).

Zhang Z-W, Abdullahi M, Farthing M J G: Effect of physiological concentrations of vitamin C on gastric cancer cells and Helicobacter pylori. Gut 50, 165-9 (2002).

<http://www.dge.de/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=4&page=11>
(Eingesehen am 3.5.2007)

<http://www.dge.de/pdf/ws/ReferenceValues.pdf> (Eingesehen am 24.4.2008)

<http://www.iom.edu/Object.File/Master/7/296/webtablevitamins.pdf> (Eingesehen am 24.4.2008).

Danksagung

Ich danke Prof. Michael Seyfarth für die Überlassung des Themas und die zur Verfügung gestellten Mittel, Dr. Leif Dibbelt für seine kontinuierliche und inspirierende Betreuung sowie Fr. Ellen Spies für die technische Einweisung und ihre angenehme Gesellschaft. Außerdem danke ich meiner Familie für ihre stets bedingungslose Unterstützung.

Curriculum Vitae

Name: Cornelia Marlene Focke
Persönliche Daten: geb. am 11.12.1978 in Bremen

Schulbildung:

1985-89 Grundsule an der Stader Straße, Bremen
1989-91 Orientierungsstufe Brokstraße, Bremen
1991-98 Altes Gymnasium, Bremen

Studium der Humanmedizin:

1998-2000 Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
2000-05 Universität zu Lübeck

2001	Physikum
2002	Erstes Staatsexamen
2004	Zweites Staatsexamen
2004-05	Praktisches Jahr mit dem Wahlfach Pathologie
2005	Drittes Staatsexamen und Approbation als Ärztin

Beruflicher Werdegang:

2006-08	Assistenzärztin im Institut für Pathologie, Praxis Fischer & Partner, Wilhelmshaven (Prof. G. Fischer)
2008-09	Assistenzärztin am Gerhard Domagk-Institut für Pathologie der Universität Münster (Prof. W. Böcker)
seit 10/2009	Assistenzärztin für Pathologie am Bonhoeffer-Klinikum Neubrandenburg (Dr. T. Decker)



Selbständigkeitserklärung und Erklärung zur Bewerbung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Anwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Lübeck, den 06.09.2010

(Cornelia Focke)