

Eine einfache Methode zur routinemäßigen Bestimmung von Vitamin A und Vitamin E im Serum mit HPLC*

Gerlinde Hildebrandt, G. Gilch, G. Gries
Laboratorium Prof. Dr. G. Gries, München

Zusammenfassung:

Es wird eine leicht praktizierbare, gut reproduzierbare Methode zur Bestimmung von Vitamin A (Retinol) und Vitamin E (α -Tocopherol) im Serum beschrieben. Gleichzeitig werden Referenzbereiche nach Altersgruppen und Geschlechtern getrennt, mitgeteilt.

Schlüsselwörter:

Vitamin A (Retinol) – Vitamin E (α -Tocopherol) – HPLC – Referenzbereiche für Vitamin A und E im Serum

Summary:

A description was given of an easily performable and well reproducible method for determination of the concentration of vitamin A (retinol) and vitamin E (α -tocopherol) in serum. Simultaneously the normal ranges of the several stages of life of the two sexes were composed.

Keywords:

Vitamin A (retinol) – vitamin E (α -tocopherol) – HPLC – Normal ranges of serum amount of vitamin A and vitamin E

Einleitung

Zur Analyse der Vitamine A und E im Serum bietet sich die chromatographische Trennung an reversed-phase-Säulen mit C₁₈-Ketten als reaktiven Gruppen nach Extraktion der Vitamine aus dem Serum an. Die quantitative Bestimmung kann durch direkte photometrische Messung erfolgen. Zum Nachweis der geringen Mengen der Vitamine A und E im Serum ist die HPLC (High Performance Liquid Chromatography) am ehesten geeignet.

Verfahren zur Messung der Vitamine A und E im Serum mit der HPLC-Methode wurden bereits veröffentlicht (1-5).

Bei unserer Modifikation des Verfahrens handelt es sich um eine Vereinfachung, mit der Referenzbereiche für die verschiedenen Geschlechts- und Altersgruppen ermittelt wurden.

Methodik

Reagenzien

Iso-Propanol (Li Chrosolve, Merck), Heptan-Sulfonsäure-Natriumsalz (Fa. EGA), Vitamin A (Retinol, Sigma, Bestell-Nr. 2750), Vitamin E (α -Tocopherol, Fluka, Bestell-Nr. 89550).

Standards

Vitamin A (Vit. A) – Arbeitsstandard: ca. 400 μ g/l Iso-propanol. Der Arbeitsstandard ist bei +4°C im Dunkeln mindestens 6 Monate haltbar.

Vitamin E (Vit. E) – Arbeitsstandard: ca. 10 mg/l Isopropanol. Der Arbeitsstandard ist bei +4°C im Dunkeln mindestens 3 Monate haltbar.

Probenaufbereitung

0,5 ml Serum werden auf dem Vortex-Mischer mit 1 ml Iso-Propanol 10 min scharf geschüttelt und anschließend 10 min lang bei 4000 U/min zentrifugiert. Der klare Überstand wird sofort abpipettiert und fest verschlossen dunkel aufbewahrt. Der Serumextrakt ist tiefgekühlt bei -25°C im Dunkeln mindestens 14 Tage haltbar.

HPLC-Trennung und Messung

HPLC-Einrichtung: Firma Waters.

Trennsäule: Reversed-phase C₁₈-Säule (Waters Radial Pak C₁₈: Länge 10 cm, I D 5 mm, 10 μ m-packing-material).

Vorsäule: Reversed-phase C₁₈-Säule (Waters: Länge 3 cm, I D 4 mm, 35-50 μ m-packing-material).

Eluent: 70 ml Iso-Propanol + 22 ml 0,9 mMol Heptan-sulfonsäure in Wasser + 8 ml Wasser.

Durchflußrate: 1 ml/min.

Temperatur: Raumtemperatur.

* Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. H. E. Bock zum 80. Geburtstag gewidmet

Wellenlänge: 308 nm für Vitamin A, 276 nm für Vitamin E.

Injektion: Von den Arbeitsstandards bzw. vom Serumextrakt werden je 50 µl injiziert. Vit. A wird bei einer Wellenlänge von 308 nm gemessen. Die Laufzeit beträgt ca. 5 min, dann wird auf die Wellenlänge von 276 nm von Hand oder automatisch umgeschaltet und Vit. E gemessen (Abb. 1). Die Gesamtlaufzeit beträgt ca. 10 min.

Berechnung

Die Registrierung und Auswertung erfolgt mit dem Data Modul der Firma Waters. Die jeweiligen Peakflächen der Arbeitsstandards werden in Relation zu den entsprechenden Peakflächen der Serumprobe gesetzt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Serumkonzentration durch die Fällung mit Iso-Propanol auf ein Drittel reduziert wurde.

Die Serumkonzentration (SK) berechnet sich wie folgt:

$$SK = \frac{\text{Peakfl. d. Serumextr.} \times 3 \times \text{Konz. d. Arbeitsstand.}}{\text{Peakfläche d. Arbeitsstandards}}$$

Ergebnisse

Wiederfindung

Um die Wiederfindungsrate zu ermitteln, wurde das gleiche Serum in 21 Analysen einmal ohne Aufstockung und einmal mit bekannter Aufstockung von Vit. A bzw. Vit. E gemessen. Ein Serum mit einem Gehalt von 1052 µg/l Vit. A wurde mit 900 µg/l Vit. A aufgestockt. Die Analy-

sen ergaben im Mittel eine Wiederfindungsrate von 94,3% d. h. es wurden im Mittel 849,2 µg/l (Aufstockung 900 µg/l) mit einer Standardabweichung von 35,1 µg/l gefunden.

Ein Serum mit einem Gehalt von 13,9 mg/l Vit. E wurde mit 27 mg/l Vit. E aufgestockt. Die Analysen ergaben im Mittel eine Wiederfindungsrate von 97,3%, d. h. es wurden im Mittel 26,4 mg/l (Aufstockung 27 mg/l) mit einer Standardabweichung von 0,55 mg/l gefunden.

Präzision in der Serie

Zur Ermittlung der Präzision in der Serie wurde ein Serum mehrfach analysiert. In 35 Bestimmungen ergab sich für Vit. A bei einem Mittelwert von 688 µg/l und einer Standardabweichung von 36 µg/l ein Variationskoeffizient (VK) von 3,5%.

In 38 Bestimmungen ergab sich für Vit. E bei einem Mittelwert von 469 mg/l und einer Standardabweichung von 0,17 mg/l ein VK von 3,6%.

Präzision von Tag zu Tag

Für die Präzision von Tag zu Tag wurde in einem Poolserum durch 21 Analysen bei Vit. A ein VK von 4,7% ermittelt (Mittelwert 1052 µg/l, Standardabweichung 50,46 µg/l). Durch 21 Analysen von Vit. E wurde für die Präzision von Tag zu Tag ein VK von 1,92% ermittelt (Mittelwert 13,91 mg/l, Standardabweichung 0,269 mg/l).

Der Vit. A-Standard wurde über einen Zeitraum von 6 Monaten gemessen. Es zeigten sich im gesamten Zeitraum keine Abweichungen der Analyseergebnisse. Deshalb ist der Arbeitsstandard mindestens ein halbes Jahr verwendbar.

Der Vit. E-Standard wurde über einen Zeitraum von 3 Monaten gemessen. Auch hier zeigten sich keine Abweichungen. Der Vit. E-Arbeitsstandard ist deshalb mindestens ein Vierteljahr haltbar.

Referenzbereiche

Mit der beschriebenen Methode haben wir die Blutspiegel von Vit. A und Vit. E bei gesunden männlichen und weiblichen Probanden unterschiedlichen Alters bestimmt. Beim Vit. A (Tab. 1) stieg die Konzentration bei beiden Geschlechtern bis zur Gruppe der 36–60jährigen an, um dann in höherem Alter leicht abzufallen.

Bei den weiblichen Probanden lagen die Werte in allen Altersgruppen, mit Ausnahme der Gruppe der 0–15jährigen, niedriger als bei den entsprechenden männlichen Gruppen.

Beim Vit. E (Tab. 2) stiegen die Serumkonzentrationen mit zunehmendem Alter etwas an. Mit Ausnahme der Gruppe der jüngsten Probanden (0–15 Jahre) lagen die Werte bei den männlichen Personen etwas höher als bei den entsprechenden weiblichen Gruppen.

Diskussion

Die beschriebene Methode ist relativ einfach. Sie bedarf zur Durchführung nur einer Grundausrüstung zur HPLC für isokratische Verfahren. Die Präzisionen von Tag zu Tag mit einem VK von 4,79% für Vit. A und 1,92% für Vit. E liegen etwas besser, als die in der Serie. Die Proben für

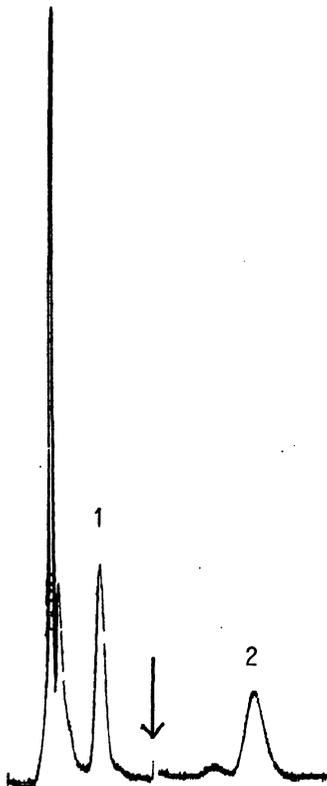


Abb. 1: Chromatogramm eines Serumextrakts, bei 1 Retinol (Vitamin A); bei 2 α -Tocopherol (Vitamin E); bei \uparrow Umschaltung der Wellenlänge von 308 nm auf 276 nm am Photometer

Tab. 1: Serum-Vitamin A (Retinol) Werte bei gesunden Probanden in µg/l, getrennt nach Alter und Geschlecht

Alter in Jahren	Geschlecht	Anzahl n	Mittelwert \bar{x} µg/l	SD
0-15	männlich	40	459,3	173
	weiblich	40	512,8	164
16-35	männlich	27	849,8	195
	weiblich	30	705,0	187
36-60	männlich	29	973,6	174
	weiblich	26	867,4	126
61-90	männlich	28	936,9	169
	weiblich	25	747,5	184

Tab. 2: Serum-Vitamin E (α -Tocopherol). Werte bei gesunden Probanden getrennt nach Alter und Geschlecht

Alter in Jahren	Geschlecht	Anzahl n	Mittelwert \bar{x} in mg/l	SD
0-15	männlich	35	7,83	1,69
	weiblich	42	7,93	2,02
16-35	männlich	29	8,81	2,34
	weiblich	30	8,35	1,66
36-60	männlich	25	10,90	2,15
	weiblich	26	10,55	2,05
61-90	männlich	26	12,12	2,08
	weiblich	27	11,12	2,21

die Analysen von Tag zu Tag wurden jeweils unmittelbar vor der Untersuchung aufgetaut, während die Proben in der Serie bis zur nacheinander erfolgenden Verarbeitung bei Zimmertemperatur standen. Wahrscheinlich ist die höhere Streuung hierdurch bedingt. Auch die Wiederfindung nach Aufstockung war bei beiden Vitaminen mit 94,3% bei Vit. A und 97,8% bei Vit. E befriedigend.

Für beide Vitamine wurden alters- und geschlechtsabhängige Referenzbereiche errechnet. Während die Vit. E-Konzentration bei beiden Geschlechtern mit zunehmendem Alter ansteigt, nehmen die Vit. A-Werte nur bis zu den Altersgruppen von 36-60 Jahren zu, um dann bei den über 60-jährigen wieder etwas abzufallen.

Mit einer fluorimetrischen Methode fand Haga (6) im Mittel 12 mg/l Vit. E im Serum. Im Nabelschnurblut lagen die Werte im Mittel unter 4 mg/l. Mit einer HPLC-Methode wies Driskell (7) in drei verschiedenen Serumpools in der ersten Probe 12,8, in der zweiten Probe 7,25 und in der Dritten im Mittel 12,9 mg/l nach. Vatassery (8) fand mit HPLC bei erwachsenen Probanden im Mittel $9,9 \pm 0,49$ mg/l α -Tocopherol. Diese Werte stimmen, soweit vergleichbar, größenordnungsmäßig mit unseren Werten überein. Kleine Abweichungen sind methodisch bedingt.

Die bisher mitgeteilten Referenzwerte bei Vit. A lassen sich schlechter vergleichen als bei Vit. E, weil sie sowohl mit photometrischen, fluorimetrischen als auch HPLC-Methoden erarbeitet wurden. Die photometrisch (Antimon-III-chlorid-Methode) gewonnenen Werte liegen deutlich höher, weil hierbei außer Vit. A auch dessen Ester erfaßt werden. Der Mittelwert gesunder Erwachsener betrug 1633 µg/l (9). Mit fluorimetrischer Methodik gewonnene Werte sind größenordnungsmäßig eher mit den durch HPLC gewonnenen vergleichbar. Im Mittel wurden bei Normalpersonen und Schwangeren ohne Komplikationen 640 ± 149 µg/l gefunden (10). Untersuchungen an Studenten ergaben einen Mittelwert von 510 ± 151 µg/l. Die Werte der männlichen Studenten lagen bei 536 ± 145 µg/l; bei weiblichen ohne orale Antikonzeptive-Behandlung bei 433 ± 104 µg/l. Bei Studentinnen mit Antikonzeptive-Behandlung waren die Werte mit 580 ± 136 µg/l deutlich höher. Bei Kindern wurden mit 305 ± 85 µg/l niedrigere Werte gefunden (4). Auch bei uns liegen die Werte bei Kindern niedriger als bei Erwachsenen. Dagegen sind bei uns die Werte der weiblichen Probanden in allen Altersklassen niedriger als die der Männer. Ob dieser Unterschied lediglich auf einen geringeren Anteil an Frauen ohne Antikonzeptive zurückzuführen ist, bleibt offen. Antikonzeptive könnten ohnehin nur in den entsprechenden Altersgruppen eine Rolle spielen.

Schrifttum:

1. DE RUYTER M. G. M., DE LEENHEER, A. P.: Determination of Serum Retinol (Vitamin A) by High-Speed Liquid Chromatography. Clin. Chem. 22, 1593-1595 (1976).
2. SANZINI, E., BELLOMONTE, G.: Determinazione simultanea delle vitamine A ed E nei prodotti dietetici mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione. Acta Vitaminol. Enzymol. 4, 347-352 (1982).
3. DRISKELL, W. J., NEESE, J. W., BRYANT, C. C., BASHOR, M. M.: Measurement of Vitamin A and Vitamin E in human serum by high-performance-liquid-chromatography. J. Chromatogr. 231, 439-444 (1982).
4. BIESALSKI, H. K., EHRENTHAL, W., GROSS, M., HAFNER, G., HARTH, O.: Rapid Determination of Retinol (Vitamin A) in Serum by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC). Internat. J. Vit. Nutr. Res. 53, 130-137 (1983).
5. EHRENTHAL, W., PRELLWITZ, W.: Vortrag: Symposium über Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie, Travemünde (1982).
6. HAGA, P., EK, J., KRAN, S.: Plasma tocopherol levels and vitamin E/ β -lipoprotein relationship during pregnancy and in cord blood. Amer. J. Clin. Nutr. 36, 1200-1204 (1982).
7. DRISKELL, W. J., BASHOR, M. M., TURLEY, C. P., BREWSTER, M. A.: Simultaneous Determination of Retinol and α -Tocopherol in Serum of Plasma by Liquid Chromatography. Clin. Chem. 29, 708-712 (1983).
8. VATASSERY, G. T., KEZOWSKI, A. M., ECKFELDT, J. H.: Vitamin E concentrations in human blood plasma and platelets. Amer. J. Clin. Nutr. 37, 1020-1024 (1983).
9. DE KROES, S., SMEENK, G.: Serum Vitamin A Levels and Pruritus in patients on Hemodialysis. Dermatologia 166, 199-202 (1983).
10. PARKINSON, C. E., TAN, J. C. Y.: Vitamin A concentration in amniotic fluid and maternal serum related to neural-tube defects. Brit. J. Obstetr. Gynec. 89, 935-939 (1982).

Anschrift der Verfasser:

Prof. Dr. G. Gries
Perfallstr. 1
D-8000 München 80

