

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 der B₆-Vitamere: Methodenoptimierung und Referenzwerterstellung

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Edouard W. Sanson
aus St. Germain en Laye

Lübeck 2008

- | | |
|----------------------|-----------------------------|
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. med. M. Seyfarth |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. med. A. Dendorfer |

Tag der mündlichen Prüfung:	11.09.2008
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den	11.09.2008

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

Für Marc Heitner

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
VERZEICHNIS HÄUFIG VERWENDETER ABKÜRZUNGEN	4
1 EINLEITUNG	5
1.1 Biochemie und Pathobiochemie der B ₆ -Vitamere.....	5
1.1.1 Nomenklatur und chemische Struktur.....	6
1.1.2 Vorkommen	8
1.1.3 Metabolismus und Bedarf	9
1.1.4 Klinische Bedeutung.....	10
1.2 Analytik der B ₆ -Vitamere	12
1.2.1 Analytische Verfahren und ihre Prinzipien.....	12
1.2.2 Analytische Probleme der B ₆ -Vitamerbestimmung mittels HPLC	14
1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	15
2 MATERIAL UND METHODEN.....	17
2.1 Material	17
2.1.1 Seren	17
2.1.2 Chemikalien, Lösungsmittel, Vitamine.....	17
2.1.3 Geräte.....	19
2.1.4 Materialien für die Untersuchungen der Extraktion der B ₆ -Formen	20
2.1.5 Stationäre Phasen für die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	21
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Probenaufarbeitung.....	21
2.2.1.1 Eiweißpräzipitation	21
2.2.1.2 Manuelle Festphasenextraktion	22
2.2.1.3 Inline-Festphasenextraktion	26
2.2.2 Analytik	27
2.2.2.1 Dünnschichtchromatographie	27

2.2.2.2 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).....	27
2.2.2.2.1 Variation der stationären Phase	28
2.2.2.2.2 Variation der mobilen Phase.....	28
2.2.2.2.3 Interner Standard	29
2.2.2.2.4 Detektion	29
2.2.2.2.5 Säulentemperierung.....	30
2.2.2.2.6 Säulenregenerierung und -equilibrierung	30
2.2.2.2.7 Kalibrierung und Auswertung der Chromatogramme	30
2.2.2.2.8 Optimierte HPLC-Methoden zur Bestimmung der B ₆ -Formen im Serum	30
2.2.2.2.9 Analytische Charakteristika der optimierten „Routinemethode“	32
2.2.3 Ermittlung von Referenzbereichen der B ₆ -Formen.....	33
2.2.4 Pharmakokinetik der B ₆ -Formen.....	33
2.2.5 Statistische Methoden.....	34
3 ERGEBNISSE	36
3.1 Methodenoptimierung.....	36
3.1.1 Probenaufarbeitung.....	36
3.1.1.1 Manuelle Festphasenextraktion	37
3.1.1.2 Inline-Festphasenextraktion	43
3.1.1.3 Eiweißpräzipitation	46
3.1.2 Optimierung der HPLC-Analytik.....	48
3.1.2.1 Stationäre Phase.....	48
3.1.2.1.1 Auswahl geeigneter Phasen	48
3.1.2.1.2 Erprobung analytischer Trennsäulen.....	49
3.1.2.2 Mobile Phase.....	52
3.1.2.2.1 Einfluss des pH-Werts.....	52
3.1.2.2.2 Einfluss der Ionenstärke.....	53
3.1.2.2.3 Einfluss von Ionenpaar-Reagenzien.....	54
3.1.2.3 Interner Standard	55
3.1.2.4 Gradientenelution	56
3.1.2.5 Fluoreszenzdetektion	57
3.1.2.6 Säulentemperierung.....	57
3.1.2.7 Säulenregenerierung und -equilibrierung	58
3.1.3 Optimierte HPLC-Methoden zur Analytik der B ₆ -Vitamine.....	58

3.2 Praktische Anwendungen der optimierten Vitamin-B ₆ -Analytik.....	63
3.2.1 Normwertverteilung der B ₆ -Vitamere	63
3.2.1.1 Erstellung von Referenzbereichen.....	63
3.2.1.2 Untersuchung auf geschlechtsspezifische Unterschiede.....	66
3.2.1.3 Untersuchung auf altersspezifische Unterschiede	67
3.2.2 Pharmakokinetik der B ₆ -Vitamere.....	70
4 DISKUSSION	73
4.1 Methodenoptimierung.....	73
4.1.1 Probenaufarbeitung.....	73
4.1.2 HPLC-Analytik	76
4.1.3 Eigenentwicklung von HPLC-Methoden zur B ₆ -Analytik	81
4.2 Praktische Anwendung.....	85
4.2.1 Referenzbereiche verschiedener B ₆ -Formen im Serum des Menschen.....	85
4.2.2 Pharmakokinetik der B ₆ -Vitamere.....	87
5 ZUSAMMENFASSUNG	90
6 LITERATURVERZEICHNIS	91
7 TABELLENVERZEICHNIS.....	100
8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	102
9 ANHANG	104
10 DANKSAGUNG	113
11 LEBENSLAUF	114

VERZEICHNIS HÄUFIG VERWENDETER ABKÜRZUNGEN

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
ADS	Alkyl-Diol-Silica
AS	Aminosäure(n)
AUC	Area under curve
Bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HCl	Salzsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
INH	Isoniazid
ISTD	Interner Standard
KHK	Koronare Herzkrankheit
M	mol/l
Min	Minute(n)
MW	Mittelwert
4-PA	4-Pyridoxinsäure
PN	Pyridoxin
PNP	Pyridoxin-5'-phosphat
PM	Pyridoxamin
PMP	Pyridoxamin-5'-phosphat
PL	Pyridoxal
PLP	Pyridoxal-5'-phosphat
RP	Reversed phase
RP-HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography
SD	Standardabweichung
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
TEA	Triethylamin
Vit.	Vitamin

1 EINLEITUNG

Mitglieder der Molekülfamilie der B₆-Vitamer übernehmen essentielle Funktionen im Stoffwechsel der Zelle, ihre zuverlässige Bestimmung ist deshalb für die Labordiagnostik von erheblicher Bedeutung. Um die klinische Relevanz der B₆-Vitamer-Analytik zu verdeutlichen, wird im Folgenden zunächst auf die Biochemie und Pathobiochemie des Pyridoxins und seiner Metabolite eingegangen, bevor der aktuelle Stand der B₆-Vitamer-Bestimmung und die dabei auftretenden analytischen Probleme dargestellt werden. Anschließend werden die Fragestellung und das Ziel der Arbeit erläutert.

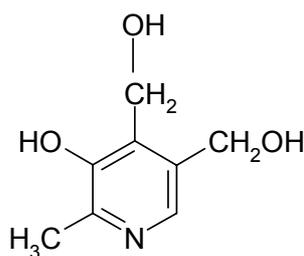
1.1 Biochemie und Pathobiochemie der B₆-Vitamer

Der Begriff Vitamin stammt aus dem Lateinischen und setzt sich zusammen aus den beiden Wörtern *vita* (= Leben) und *amin* (= stickstoffhaltig). Die ursprünglich mit dem Namen verknüpfte Erwartung, Vitamine enthielten immer Stickstoff als Bauelement, wurde später als nicht zutreffend erkannt. Vitamine sind organische Verbindungen und zählen - wie auch Mineralstoffe und Spurenelemente - zu den nicht energieliefernden Nährstoffen. Diese benötigt der menschliche Organismus zur Erhaltung lebenswichtiger Funktionen und seiner Leistungsfähigkeit (71). Da es sich bei Vitaminen um komplexe organische Moleküle handelt, kommen sie im Gegensatz zu Mineralstoffen und Spurenelementen in der unbelebten Natur nicht vor und müssen von Pflanzen, Bakterien oder Tieren synthetisiert werden. Der Mensch ist auf die alimentäre Aufnahme von Vitaminen oder Vitamin-Vorstufen angewiesen.

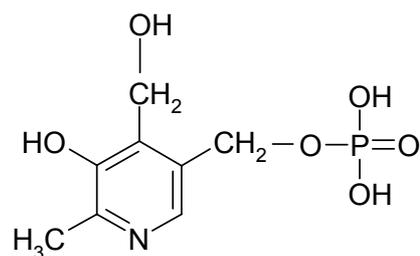
Vitamine der B-Gruppe sind wasserlösliche Verbindungen unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung. Außer den schon an ihrer Nomenklatur erkennbaren B-Vitaminen wie Vitamin B₁ (Thiamin), Vitamin B₂ (Riboflavin), Vitamin B₆ (Pyridoxin) und Vitamin B₁₂ (Cobalmin) rechnet man noch Biotin, Folsäure, Nicotinsäure und Pantothenensäure zu dieser Stoffgruppe. Aufgrund ihres unterschiedlichen chemischen Aufbaus wirken die genannten Verbindungen biologisch different und stellen somit keine einheitliche Struktur- oder Wirkstoffklasse dar. B-Vitamine kommen in der Natur niemals isoliert vor und wirken in der Regel im Verbund. Ohne die Vitamine der B-Gruppe laufen im Körper fast keine biochemischen Prozesse ab. Die Ziffernbezeichnung B₆ erklärt sich daraus, dass dieses Vitamin erst nach den Vitaminen B₃, B₄ und B₅ entdeckt und als zum B-Komplex zugehörig erkannt wurde.

1.1.1 Nomenklatur und chemische Struktur

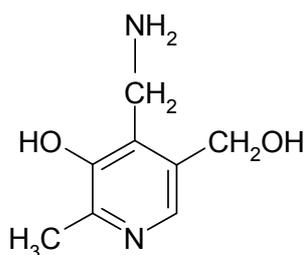
Die Bezeichnung Vitamin B₆ wird als Sammelbegriff für alle vitaminwirksamen 3-Hydroxy-2-methylpyridine verwendet. Zu dieser Gruppe gehören Pyridoxin (PN), Pyridoxal (PL) und Pyridoxamin (PM) sowie deren phosphorylierte Metabolite - Pyridoxin-5'-phosphat (PNP), Pyridoxal-5'-phosphat (PLP) und Pyridoxamin-5'-phosphat (PMP) (Abb. 1).



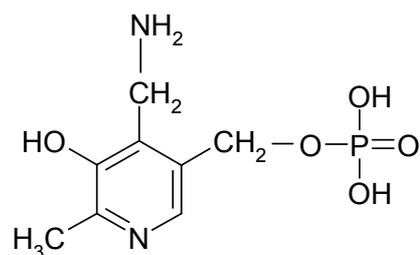
Pyridoxin (PN)



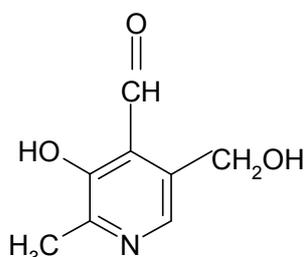
Pyridoxin-5'-phosphat (PNP)



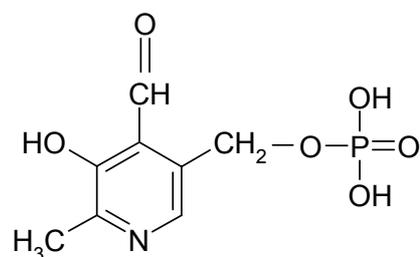
Pyridoxamin (PM)



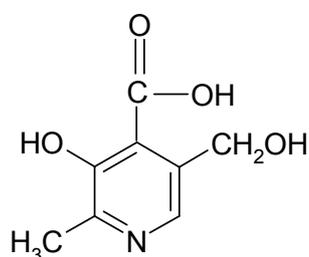
Pyridoxamin-5'-phosphat (PMP)



Pyridoxal (PL)



Pyridoxal-5'-phosphat (PLP)



4'-Pyridoxinsäure (4-PA)

Abb. 1: Strukturformeln der B₆-Vitamer Pyridoxin, Pyridoxal, Pyridoxamin, ihrer 5'-phosphate sowie des gemeinsamen Kataboliten 4-Pyridoxinsäure

Diese sechs in der Natur vorkommenden, biologisch aktiven 3-Hydroxy-2-methylpyridin-Derivate unterscheiden sich chemisch nur durch den Aufbau der Seitengruppen an den Ringpositionen 4 und 5. Sie können durch Stoffwechselforgänge ineinander umgewandelt werden und sind daher alle gleichermaßen als Vitamin B₆ wirksam. Die aktive Coenzymform ist das PLP. Die 4-Pyridoxinsäure (4-PA), das gemeinsame Abbauprodukt der biologisch aktiven B₆-Vitamer, erfüllt im menschlichen Organismus offenbar keine Stoffwechselfunktion und wird renal ausgeschieden. In saurer Lösung sind die B₆-Vitamer nahezu stabil, werden aber in neutraler und alkalischer Lösung durch Lichteinwirkung und Hitze rasch zerstört (7).

Die erste Form des Vitamin B₆ wurde 1938 isoliert. Die Verbindung wies die Struktur von 2-Methyl-3-hydroxy-4,5-bis-(hydroxymethyl)pyridin auf. Der Trivialname "Pyridoxin", der auf P. György zurückgeht, wird seitdem im allgemeinen Gebrauch als Synonym für "Vitamin B₆" verwendet. Im Jahre 1944 konnten zwei weitere 2-Methylpyridine nachgewiesen werden, die qualitativ die biologische Aktivität des Pyridoxins zeigten: der Aldehyd (das „Pyridoxal“) sowie das Amin (das "Pyridoxamin"). Einige Jahre später gelang es I. C. Gunsalus et al. zu demonstrieren, dass die phosphorylierten Formen ebenfalls dieselbe Vitaminaktivität aufweisen, da sie sich durch Stoffwechselprozesse ineinander umwandeln lassen (41).

Unter Vitamin B₆ ist die Summe aller sechs in der Natur vorkommenden, biologisch aktiven Formen von Pyridinderivaten zu verstehen. Oft wird mit Vitamin B₆ irreführend der Begriff „Pyridoxin“ gleichgesetzt, welcher richtigerweise nur die erste isolierte Form bezeichnet. Weitere Synonyme aus der älteren Literatur, die heute nicht mehr gebraucht werden, sind "Adermin", "Anti-Dermatitis-Faktor", "Anti-Akrodyniefaktor" sowie "Rattenpellagra-Schutzstoff".

Als B₆-Vitamer wird jede einzelne Form der sechs in der Natur vorkommenden Verbindungen (PL, PLP, PM, PMP, PN, PNP) des Vitamin B₆ bezeichnet. Die Bezeichnung B₆-Vitamer soll in der folgenden Arbeit als Synonym für Vitamin B₆ gebraucht werden; sie schließt somit alle sechs Derivate mit Vitaminfunktion ein. Der Begriff verdeutlicht, dass es sich hierbei nicht um eine einzelne Verbindung handelt. Der Begriff B₆-Formen schließt neben den B₆-Vitaminen weitere Pyridinderivate mit ein, welche jedoch keine Vitaminaktivität aufweisen (so z.B. die 4'-Pyridoxinsäure). Die Bezeichnung spielt bei analytischen Fragestellungen eine Rolle, bei denen die Vitaminwirksamkeit von nachrangigem Interesse ist.

In Tabelle 1 sind einige physikalisch-chemische Eigenschaften der B₆-Vitamere aufgeführt (50). Für die Analytik und Präanalytik der B₆-Vitamere sind insbesondere die unterschiedlichen Polaritäten der phosphorylierten und der freien Formen sowie ihre optischen Eigenschaften von Bedeutung, die eine ausgeprägte Lichtempfindlichkeit mit einschließen (79,50); wichtig sind ferner die Instabilität vor allem der phosphorylierten B₆-Vitamere bei Raumtemperatur und ihre relative Stabilität bei tiefen Temperaturen (66).

Tab. 1: Physikalisch-chemische Eigenschaften der B₆-Vitamere (50)

Kürzel	Summenformel	Molgewicht (g/mol)	Tageslicht-Stabilität		Fluoreszenzmaximum pH7	
			8h	15h	Excitation	Emission
PN	C ₈ H ₁₁ NO ₃	169,1	97%	90%	325	400
PL	C ₈ H ₉ NO ₃	167,2	97%	68%	320	385
PM	C ₈ H ₁₂ NO ₂	168,1	81%	57%	325	405
PNP	C ₈ H ₁₂ NO ₆ P	249,2	-	-	322	394
PLP	C ₈ H ₁₀ NO ₆ P	247,2	-	-	330	375
PMP	C ₈ H ₁₃ N ₂ O ₅ P	248,2	-	-	330	400
4-PA	C ₈ H ₉ NO ₄	183,2	-	-	325	425

1.1.2 Vorkommen

B₆-Vitamere werden von einer Vielzahl von Mikroorganismen und Pflanzen überwiegend in phosphorylierter Form synthetisiert. Sie finden sich nahezu ubiquitär in allen Nahrungsmitteln,

Tab. 2: Vitamin-B₆-Gehalt ausgewählter Nahrungsmittel (33)

Nahrungsmittel	Vitamin-B ₆ -Gehalt (mg/100g)
Huhn	0,3 – 0,6
Leber	0,9
Fisch	0,3 – 0,8
Schweinefleisch	0,3 – 0,5
Milch, Milchprodukte	< 0,1
Cerealien	0,3
Reis	0,1 – 0,5
Brot	0,1 – 0,2
Bohnen	0,1 – 0,6
Broccoli, Mais	0,2
Pilze	0,1 – 0,2
Spinat, Kartoffeln	0,3
Avocado	0,4
Tomaten	0,1
Obst	<0,1
Walnüsse	0,78
Erdnüsse	0,4

insbesondere in Fleisch, Fisch und Vollkornprodukten (Tab. 2). Ein primärer, also rein alimentär bedingter Vitamin B₆ Mangel tritt daher beim gesunden Menschen in den westlichen Industrieländern äußerst selten auf (10). Es ist allerdings zu beachten, dass die Bioverfügbarkeit von Vitamin B₆ beim gesunden Menschen zwischen 40% und 100% (im Durchschnitt 70%) stark schwanken kann (36). Eine Unterversorgung an Vitamin B₆ geht dabei häufig mit einem Defizit weiterer wasserlöslicher Vitamine einher.

1.1.3 Metabolismus und Bedarf

B₆-Vitamere werden vorwiegend als 5'-Phosphatester mit der Nahrung aufgenommen und im Darm durch Phosphatasen in ihre freie Vitaminform umgewandelt. Nach intestinaler Resorption durch passive Diffusion im gesamten Dünndarm (60), vor allem im Jejunum, wird ein Großteil der B₆-Vitamere in der Leber in die aktive Coenzymform, das Pyridoxal-5'-phosphat, überführt (61,96). Im Blut werden die B₆-Vitamere zum Teil an Albumin und Erythrozyten gebunden (so z.B. das PLP und das PL), zum Teil aber auch ungebunden (z.B. PN and 4-PA) transportiert. Bei ausreichender Versorgung beträgt der Gesamtbestand an Vitamin B₆ im menschlichen Körper ca. 100 mg. 80% der im Körper retinierten B₆-Vitamere befinden sich an die Glycogenphosphorylase gebunden in der Muskulatur. Somit ist das enzymgebundene PLP die wichtigste Speicherform des Vitamin B₆ (33).

Tab. 3: Empfohlene Zufuhr von Pyridoxin (DGE 2007, www.dge.de, Stand 01.09.2007)

Alter / Geschlecht	Vitamin B ₆ mg/d w/m
Säuglinge	
0 bis unter 4 Monate ¹	0,1
4 bis unter 12 Monate	0,3
Kinder (w / m)	
1 bis unter 4 Jahre	0,4
4 bis unter 7 Jahre	0,5
7 bis unter 10 Jahre	0,7
10 bis unter 13 Jahre	1,0 / 1,0
13 bis unter 15 Jahre	1,4 / 1,4
Jugendliche und Erwachsene (w / m)	
15 bis unter 19 Jahre	1,2 / 1,6
19 bis unter 25 Jahre	1,2 / 1,5
25 bis unter 51 Jahre	1,2 / 1,5
51 bis unter 65 Jahre	1,2 / 1,5
65 Jahre und älter	1,2 / 1,4
Schwangere ≥4. Monat	1,9
Stillende	1,9
¹ Schätzwert	

Der größte Anteil der B₆-Vitamere wird in Form von 4-PA renal eliminiert; auch andere, nicht phosphorylierte Formen können von der Niere ausgeschieden werden. Mit durchschnittlicher Kost wird in den Industrienationen genügend Vitamin B₆ aufgenommen (vergleiche Tab. 2 und 3). Risikogruppen mit unzureichender Vitamin-B₆-Versorgung sind ältere Menschen mit Resorptionsstörungen oder geringer Nahrungsaufnahme, Personen mit häufiger Einhaltung von Reduktionsdiäten, mit chronischer Urämie oder mit chronischem Alkoholmissbrauch. Weitere Risikofaktoren, die zu einem Vitamin-B₆-Defizit führen können, sind die Anwendung oraler Kontrazeptiva und Wechselwirkungen mit verschiedenen Arzneistoffen wie z.B. Isoniazid, Penicillamin oder Cycloserin (7,39).

1.1.4 Klinische Bedeutung

Pyridoxal-5'-phosphat, die Coenzymform des Vitamin B₆, ist an mehr als 100 enzymatischen Reaktionen in allen Bereichen des menschlichen Stoffwechsels beteiligt (53), insbesondere bei wesentlichen Reaktionen im Aminosäurestoffwechsel wie Transaminierungen, Decarboxylierungen und Spaltungsreaktionen. Die übrigen B₆-Vitamere verdanken ihre biologische Aktivität der möglichen Umwandlung zum PLP. Besondere Bedeutung haben die B₆-Vitamere weiterhin bei der Bildung von Serotonin und von Nicotinamid aus Tryptophan. Sie spielen außerdem eine zentrale Rolle im Porphyrin- und Lipidmetabolismus (37). Einige der Enzyme, an denen Vitamin B₆ als Cofaktor beteiligt ist, sind in Tabelle 4 aufgelistet, um die aus Mangelerscheinungen resultierenden Symptomkomplexe zu verdeutlichen:

Tab. 4: Auswahl Vitamin B₆ abhängiger Enzyme (33)

Enzym	EC-Nummer	Stoffwechselfunktion
Oxidoreduktasen		
Lysyloxidase	1.4.3.13	Kollagenbiosynthese
Transferasen		
Serinhydroxymethyltransferase	2.1.2.1	C ₁ -Körperstoffwechsel
δ-Aminolävulinsäuresynthetase	2.3.1.37	Porphyrinbiosynthese
Glykogenphosphorylase	2.4.1.1	Glykogenmobilisierung
Aspartataminotransferase	2.6.1.1	Transaminierung
Alaninaminotransferase	2.6.1.2	Transaminierung
Hydrolasen		
Kynureninase	3.7.1.3	Niacinbiosynthese
Lyasen		
Glutamatdecarboxylase	4.1.1.15	GABA-Biosynthese
Tyrosindecaboxylase	4.1.1.25	Tyraminbiosynthese
Serindehydratase	4.2.1.13	B-Elimination
Cystathionin.β-Synthase	4.2.1.22	Methioninstoffwechsel
Cystathionin.γ-Lyase	4.4.1.1	Γ-Elimination
Isomerasen		
Alaninracemase	5.1.1.1	Bakterienstoffwechsel

Ein langfristiger Mangel an Vitamin B₆ kann Allgemeinsymptome wie Dermatitis, Glossitis, Depression, Konzentrationsstörungen, Reizbarkeit und Krämpfe hervorrufen. Daneben ist eine Reihe von Erkrankungen mit erniedrigter Vitamin-B₆-Konzentration im Plasma vergesellschaftet. In jüngster Zeit wurde intensiv über die Rolle der B₆-Vitamere bei neuro- und kardiovaskulären Erkrankungen diskutiert. Durch die direkte Beteiligung von Vitamin B₆

am Umbau der toxischen Aminosäure Homocystein zu Cystein führt ein Mangel der B₆-Vitamine zu einer Konzentrationserhöhung des Homocysteins (89) und dadurch konsekutiv zu einer Erhöhung des Arterioskleroserisikos. Dieses wiederum kann eine Risikoerhöhung für koronare Herzkrankheit (KHK), periphere Gefäßerkrankung (PAVK) und Schlaganfälle (43,44,76) zur Folge haben. Eine Hyperhomocysteinämie kann durch Zufuhr von Vitamin B₆ therapiert werden (93). Unabhängig von der Plasmakonzentration des Homocysteins wurde ein isolierter Mangel an B₆-Vitaminen als Risikofaktor für koronare Herzerkrankung, transiente ischämische Attacken (TIA) und Schlaganfälle beschrieben (42,43), wobei der Pathomechanismus nicht endgültig geklärt ist (42). Zu den weiteren Krankheiten, die mit einem Vitamin-B₆-Mangel assoziiert sind, gehören in bestimmten Fällen Epilepsien bei Säuglingen und Kleinkindern (77,35), das Karpaltunnelsyndrom (30), Asthma (70), wo Vitamin B₆ zur Senkung der Schwere und Frequenz der Asthmaanfälle eingesetzt werden kann (24), das prämenstruelle Syndrom (1) sowie Suppression des Immunsystems durch verminderte Produktion von Antikörpern (19). Mangel an Vitamin B₆ kann, durch Hemmung der Hämsynthese auf der Stufe der PLP-abhängigen δ -Aminolävulinsäuresynthese, eine durch Eisenzufuhr nicht therapierbare hypochrome Anämie verursachen (46). Ferner gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Status des Vitamin B₆ und einer breiten Anzahl neurologischer Symptome wie Ataxien, Paresen, Krämpfen, chronischen Schmerzen, Kopfschmerzen, Störungen des extrapyramidalen motorischen Systems (47) sowie Entmyelinisierung peripherer Nerven (65). Ursächlich für diese Erscheinungen dürften die gestörte Myelinsynthese sowie die verringerte Bildung von Transmittersubstanzen sein (47, 94). Einige Pharmaka können zu einem insuffizienten Vitamin-B₆-Status führen. Bei der Therapie mit Isoniazid, einem Tuberkulostatikum, werden deshalb begleitend Vitamin B₆ Präparate zur Antagonisierung der möglichen Neurotoxizität gegeben (82).

Ebenfalls schädlich ist eine stark erhöhte Plasmakonzentration des Vitamin B₆. Diese kann zu peripherer Neuropathie, Verlust von monosynaptischen Extremitätenreflexen, Gangunsicherheit sowie Dysästhesien führen (25,75). Die Entwicklung motorischer Neuropathien ist ebenfalls beschrieben (64). Diese Neuropathien hängen aber normalerweise mit der Zufuhr von Megadosen des Vitamin B₆ in Form zusätzlicher Ergänzungen zusammen und sind meist reversibel, wenn die zusätzliche Vitamin-Einnahme gestoppt wird. Sensorische Neuropathien treten meist erst nach Megadosen von mehr als 500 mg/d auf (67). Eine Höchstgrenze der Vitamin-B₆-Zufuhr von 100mg/d wird daher für alle Erwachsenen empfohlen, um eine erhöhte Gefahr von schädlichen Wirkungen zu vermeiden (23).

1.2 Analytik der B₆-Vitamere

Nachfolgend wird ein Überblick der vorhandenen analytischen Prinzipien zur Bestimmung der B₆-Vitamere gegeben. Insbesondere soll auf chromatographische Verfahren, vor allem HPLC-Methoden eingegangen werden, wobei neben Unterschieden der Trennleistung auch methodenabhängige Differenzen der gemessenen Konzentrationen einzelner B₆-Vitamere aufgezeigt werden. Zur Erklärung dieser Differenzen wird die Problematik der präzisen Stuserhebung der B₆-Formen im menschlichen Organismus erläutert.

1.2.1 Analytische Verfahren und ihre Prinzipien

Zur Bestimmung des Vitamin-B₆-Status steht eine Reihe von Verfahren zur Verfügung. Diese umfassen mikrobiologische (Kulturwachstum) (3,83), biologische (z.B. kurative Tests im Hinblick auf Mangelsymptome) und chemisch-physikalische Methoden (z.B. Chromatographie, Lichtabsorption, Fluoreszenz) (18,68,92). Traditionelle Bestimmungsmethoden basieren auf der Reaktivierung von B₆-abhängigen Enzymen wie z.B. der Aspartat-Aminotransferase (16,27,38,69) oder auf dem Tryptophan-Belastungstest (21,27,74). Durchgesetzt hat sich die Messung der Konzentration von B₆-Vitaminen in Plasma, Serum oder Erythrozyten (5,8,9,11,26,28,40,45,58,73,78,86,92) oder der Konzentration des Hauptmetaboliten, der Pyridoxinsäure, im Urin (20,90) mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).

Die Entwicklung der chromatographischen B₆-Analytik verlief über Papierchromatographie (2,81,83) und konventionelle Säulenchromatographie (92) bis zur HPLC. Wie andere flüssigkeitschromatographische Verfahren (Dünnschicht-, Papier- oder Säulenchromatographie) ist auch die HPLC eine physikalisch-chemische Methode zur Auftrennung von flüssigen, in der Regel in einem Lösungsmittel gelösten Stoffgemischen durch unterschiedliche Verteilung zwischen einer mobilen und einer stationären Phase. Bei der HPLC befindet sich die stationäre (feste) Phase dicht gepackt in einer üblicherweise aus Edelstahl oder Glas bestehenden Säule. Die flüssige, mobile Phase wird - im Unterschied zur konventionellen Säulenchromatographie - maschinell unter hohem Druck durch die Säule gepumpt. Die Auftrennung der Probe hängt von der Zusammensetzung der stationären und der mobilen Phase ab; zusätzlich können Temperatur, pH, Druck oder Flussgeschwindigkeit der mobilen Phase die Auftrennung beeinflussen.

Die Separierung der Komponenten einer Probe erfolgt aufgrund unterschiedlicher Verweilzeiten, die sich bei der Elution der Substanzen von der Säule ergeben. Diese kommen durch unterschiedliche Verteilungsgleichgewichte der Substanzen zwischen der stationären und der mobilen Phase zustande. Je nach Art der Wechselwirkung einzelner Stoffe mit der stationären Phase können verschiedene Trennmechanismen (Adsorptions-, Verteilungs-, Ionenaustausch-, Ionenpaar-, Ausschluss- oder Affinitäts-Chromatographie) wirksam werden.

Der Nachweis der Analyten im Eluat erfolgt mittels eines Detektors, der hinter die analytische Trennsäule geschaltet ist. Dieser registriert Veränderungen bestimmter Eigenschaften des Eluats. Die gebräuchlichsten Detektoren messen die Absorption im UV oder Sichtbaren, die Fluoreszenzintensität oder elektrochemische Eigenschaften. Der Detektion folgt eine computergesteuerte Integration der gemessenen Signale über die Zeit (Abb. 2).

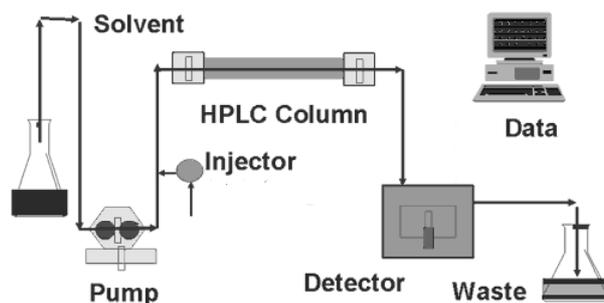


Abb. 2: Schematische Darstellung einer HPLC Anlage (<http://www.chemistry.nmsu.edu>, Stand: 08.06.2007)

Die HPLC-Analytik der B₆-Vitamere verwendet heute vorwiegend Umkehrphasenmaterial als stationäre Phase, d.h. Silikate mit kovalent gebundenen Alkylseitenketten mit einer Länge von zumeist C₈ bis C₁₈. Diese relativ unpolare stationäre Phase wird von einer eher polaren mobilen Phase unter hohem Druck durchströmt. Da die einzelnen Vitamere durch ihre Seitenketten unterschiedlich polar sind, binden sie mit unterschiedlicher Affinität an die stationäre Phase, passieren dadurch die HPLC-Säule verschieden schnell, eluieren zeitlich getrennt im Flüssigkeitsstrom und können im Idealfall einzeln detektiert werden. Allerdings erreicht keine der bis heute für die Analyse der B₆-Vitamere im menschlichen Serum oder Plasma beschriebenen Methoden diesen Idealzustand.

Dennoch werden zur direkten Quantifizierung der B₆-Vitamere in biologischen Flüssigkeiten heutzutage in den meisten Laboratorien HPLC-Methoden als Routineverfahren eingesetzt. Hierbei wird der Versorgungsstatus vielfach nur durch Bestimmung einzelner B₆-Formen wie

z.B. der PLP-Konzentration im Vollblut, Plasma oder Serum oder der 4-PA-Ausscheidung im Urin wiedergegeben. Während die PLP-Konzentration im Plasma die mittelfristige Versorgung reflektiert, beschreibt die 4-PA-Ausscheidung die unmittelbar vorangegangene Vitamin-B₆-Aufnahme (33). Das Messen einzelner B₆-Vitamer anstatt aller B₆-Formen erlaubt daher nur einen limitierten Einblick in den tatsächlichen B₆-Status.

1.2.2 Analytische Probleme der B₆-Vitamerbestimmung mittels HPLC

Die zahlreichen veröffentlichten HPLC-Methoden zur Bestimmung der B₆-Vitamer beim Menschen (5,9,11,22,28,29,40,45,58,73,78,86,92) unterscheiden sich in den verschiedenen Stufen des Analysengangs zum Teil erheblich. Neben unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien (Vollblut, Serum, Plasma, Urin) werden differente Verfahren zur Probenvorbereitung (Extraktion, Enteiweißung, Dephosphorylierung), unterschiedliche mobile und stationäre Phasen, isokratische oder Gradientenelution und verschiedene Detektionsverfahren, z.T. mit Vor- oder Nachsäulen-Derivatisierung, eingesetzt.

Eine Vielzahl von Faktoren erschwert die zuverlässige Bestimmung der B₆-Formen im menschlichen Organismus. Zum einen stellt Vitamin B₆ nicht - wie der Name es suggeriert - eine einzelne, sondern wie beschrieben sechs verschiedene Verbindungen dar. Die B₆-Formen ähneln sich zwar in der Struktur des aromatischen Ringsystems, tragen aber mit der Hydroxy-, Amino- oder Aldehydgruppe unterschiedliche Funktionen mit unterschiedlicher Polarität am Substituenten in Position 4; noch deutlicher wird der Polaritätsunterschied, sobald die Hydroxymethyl-Gruppe in Position 5 phosphoryliert vorliegt. Diese Polaritätsunterschiede machen sich bei der HPLC-Analytik derart bemerkbar, dass die vollständige Auftrennung aller B₆-Formen und ihre sichere Abtrennung von anderen Komponenten der Matrix in einer Methode mit akzeptablem Aufwand äußerst schwierig werden. Einige Verfahren vereinfachen die Messung, indem sie einzelne B₆-Formen, meist das im Blut vorherrschende B₆-Vitamer PLP, bestimmen und Rückschlüsse auf den Gesamtstatus ziehen. Verschiedene Faktoren beeinflussen allerdings die PLP-Konzentration im Serum, so z.B. die Proteinaufnahme (63), das Alter (48,72) sowie das Vorliegen einer Schwangerschaft (55). Der Zeitpunkt der letzten Vitamin B₆-Aufnahme hat ebenfalls Einfluss auf die PLP-Konzentration, da die Einstellung eines metabolischen Gleichgewichts zwischen den einzelnen B₆-Vitaminen zeitabhängig ist. Die Konzentrationen der verschiedenen B₆-Formen in den Körperflüssigkeiten des Menschen sind zudem sehr niedrig (nmol/l; vgl. Tab.

42, S. 87), so dass die zuverlässige Detektion aller B₆-Formen in physiologischer Konzentration mit den vorhandenen Verfahren kaum möglich ist.

In der Regel müssen die B₆-Formen vor der eigentlichen Analytik aus der Probenmatrix isoliert und angereichert werden. Die Effizienz der Extraktion der B₆-Vitamer aus Serum oder Plasma stellt ein weiteres Problem der B₆-Vitamer-Bestimmung dar. Zur Aufarbeitung von Serum bzw. Plasma, insbesondere bei der Proteinfällung, werden oft Lösungen mit hoher Ionenstärke angewandt. Dies hat zur Folge, dass es während der HPLC-Analytik zu unerwünschten Wechselwirkungen der extrahierten Probe mit der flüssigen und festen Phase kommt. Der durch die Aufarbeitung stark veränderte pH-Wert der Probe wirkt sich ebenfalls auf die nachfolgende chromatographische Trennung der B₆-Vitamer aus.

Die B₆-Vitamer sind instabile Verbindungen. Diese Instabilität gilt insbesondere gegenüber UV-Licht (50). Somit ergibt sich die Gefahr des Verlustes einzelner B₆-Vitameranteile während der Analyse.

Tabelle 42 (S. 87) gibt einen Überblick über die mit verschiedenen HPLC-Verfahren ermittelten Konzentrationsbereiche einzelner B₆-Formen. Auffallend ist die zum Teil erhebliche Diskrepanz der angegebenen Konzentrationsbereiche, die methodenabhängig um mehr als einen Faktor 10 voneinander abweichen können. Aufgrund der Vielzahl der in einen analytischen Trenngang zu analysierenden Verbindungen sowie deren niedriger Konzentration ergeben sich bei der Analyse von Biomatrizes mit vielen störenden Substanzen Schwierigkeiten bezüglich der Homogenität der Peaks. Die stark variierenden Konzentrationsangaben verschiedener Publikationen (Tab. 42, S. 87)) könnten auf eben solche Überlagerungen von HPLC-Peaks zurückzuführen sein.

1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ausgehend von bestehenden HPLC-Verfahren eine optimierte HPLC-Methode zur Vitamin-B₆-Bestimmung im Serum des Menschen zu entwickeln. Mit dieser sollte die quantitative Bestimmung möglichst vieler B₆-Vitamer und ihres Hauptmetaboliten, der 4-Pyridoxalsäure, in einem analytischen Gang vorgenommen werden können. Die Methode sollte bei annehmbarem Aufwand eine aussagekräftige Erhebung des Vitamin-B₆-Status aus menschlichem Serum ermöglichen, um in der klinischen Routinediagnostik eingesetzt werden zu können.

In der Phase der Optimierung des Verfahrens wurde besonderer Wert darauf gelegt, exemplarisch das Verhalten der B₆-Vitamere auf unterschiedlichen chromatographischen Festphasen zu untersuchen. Zudem sollten systematisch verschiedene Parameter der mobilen Phase auf ihren Einfluss bei der Retention der B₆-Vitamere erprobt werden. Hierzu gehören die Ionenstärke, der pH-Wert und der Zusatz von Ionenpaar-Reagenzien. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten nicht nur zur Verbesserung der HPLC-Analytik dienen, sondern möglicherweise auch Ansätze für eine schonendere Probenaufarbeitung mittels Festphasenextraktion (SPE) liefern. Um Analytverluste oder andere systematische Fehler während der Probenvorbereitung oder der Analyse kontrollieren zu können, sollte zusätzlich ein Interner Standard für die HPLC-Analytik der B₆-Vitamere eingeführt werden.

In einem zweiten Schritt wurde der Fragestellung nachgegangen, wie sich die Referenzwert - Verteilung in der gesunden Bevölkerung darstellt. Hierbei sollte auf die beschriebenen Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern und verschiedenen Altersstufen (48,72) geachtet werden. Die Erstellung von Referenzwerten mit einer optimierten Methode erscheint aufgrund der differentiellen Literaturangaben zur B₆-Vitamer-Konzentration im menschlichen Serum geboten (Kap. 1.2.1). Da in der Laborroutine gelegentlich auch Proben zu analysieren sind, die nach enteraler oder parenteraler Aufnahme von Pyridoxin gewonnen wurden, wurde die Pharmakokinetik der B₆-Vitamere unter diesen Bedingungen ebenfalls untersucht.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Seren

Für die Methodenentwicklung und -validierung wurden Restseren 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 in handelsüblichen Serum-Monovetten (Sarstedt) mittels Venenpunktion gewonnen, innerhalb von 45 Min lichtgeschützt auf Eis ins Labor transportiert und dort sofort zentrifugiert (10 Min bei 3600 g). Das Serum wurde umgehend in Sekundärgefäße überführt und bis zur Analyse verschlossen und lichtgeschützt bei -80°C gelagert. Bei dieser Temperatur sind die Proben stabil (8,40).

2.1.2 Chemikalien, Lösungsmittel, Vitamine

- Acetonitril (J.T. Baker 8004)
- di-Kaliumhydrogenphosphat (Merck 1.05101.1000)
- Kaliumdihydrogenphosphat p.a. (Merck 1.04873.1000)
- meta-Phosphorsäure (Merck 1.00546.0500)
- Methanol (HPLC Grad), (J.T. Baker 8402)
- Natriumhydrogensulfit (39% wässrige Lösung) „Bisulfit“ (Merck 8.06356.1000)
- Natriumperchlorat Monohydrat p.a. (Merck 1.06565.0500)
- N-Methyldopamin hydrochlorid 95-98% (Sigma D-5886)
- 1-Octansulfonat (Serva 31045)
- Perchlorsäure 70% (Merck 1.00519.1000)
- o-Phosphorsäure (85%) p.a. (Merck 1.00563.1000)
- 2-Propanol (Fluka 59298)
- Toluol pa (Merck 1.08325.1000)
- Trichloressigsäure p.a. (Merck 1.00807.1000)
- Triethylamin (Merck 8.08352.0500)
- Wasser: Aqua bidest. (Quarzdestille) oder aufbereitet mit MilliQ-Anlage (Millipore)

Mit Ausnahme von Pyridoxin-5'-phosphat (PNP) waren alle beim Menschen beschriebenen B₆-Formen als chemisch reine Verbindungen kommerziell erhältlich.

- Pyridoxin (Sigma P9755)
- Pyridoxal (Sigma P9130)
- Pyridoxamin (Sigma P9380)
- Pyridoxal-5'-phosphat (Sigma P9255)
- Pyridoxamin-5'-phosphat (Fluka 82890)
- 4-Pyridoxinsäure Sigma (Sigma P9630)

Folgende im Handel erhältliche Vitamin B₆-Präparate wurden für die Kinetik-Versuche verwendet:

- Vitamin B₆-ratiopharm[®] Injektionslösung (Pyridoxinhydrochlorid 100 mg/Ampulle)
- Vitamin B₆-Hevert[®] Tabletten (Pyridoxinhydrochlorid 100 mg/Tablette)

Stammlösungen :

Für die chromatographischen Untersuchungen wurden Stammlösungen der Vitamin-B₆-Formen PLP, PMP, PL, PN, PM und 4-PA wie folgt durch Lösen der Reinsubstanzen hergestellt:

- 950 µmol/l PLP: 25 mg PLP in 100 ml Aqua bidest.
- 110 µmol/l PMP: 13,5 mg PMP in 500 ml Aqua bidest.
- 495 µmol/l PL: 10 mg PL in 100 ml Aqua bidest.
- 46 µmol/l PM: 8,1 mg PM in 500 ml Aqua bidest.
- 300 µmol/l PN: 6,0 mg PN in 100 ml Aqua bidest.
- 500 µmol/l 4-PA: 9,2 mg 4-PA in 100 ml Aqua bidest.
- 12,3 mmol/l ISTD: aus 25,0 mg N-Methyldopamin in 10 ml Essigsäure (1 mol/l)

Die Stammlösungen wurden aliquotiert und lichtgeschützt bei -80°C aufbewahrt.

Bei Bedarf wurden Aliquote der Stammlösungen aufgetaut und einzeln oder im geeigneten Mischungsverhältnis kombiniert mit Wasser auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Ein Beispiel für die Herstellung von Standardlösungen zur Kalibrierung der HPLC-Methode ist im folgenden Schema (Abb. 3) dargestellt.

6 x 1 ml Stammlösung (PLP, PMP, PN, PM, PL, 4-Pa)	+	1 ml Aqua bidest.
↓		
Arbeitslösung = 1 ml (Verdünnte Stammlösung)	+	49 ml Aqua bidest.
<hr/>		
Standard 5 = 1 ml (Arbeitslösung)	+	9 ml Aqua bidest.
↓		
Standard 4 = 1 ml (Standard 5)	+	1 ml Aqua bidest.
↓		
Standard 3 = 1 ml (Standard 4)	+	1 ml Aqua bidest.
↓		
Standard 2 = 1 ml (Standard 3)	+	1 ml Aqua bidest.
↓		
Standard 1 = 1 ml (Standard 2)	+	1 ml Aqua bidest.

Abb. 3: Ansetzen der Vitaminstandards aus Stammlösung

2.1.3 Geräte

HPLC-Geräte:

- 4-Kanal-Entgaser (Knauer)
- Ternäre Pumpe: L-6220 (Merck Hitachi)
- Mixer (Merck Hitachi)
- Autosampler: AS-4000 (Merck Hitachi)
- Säulenthermostat (Gynkotek)
- Fluoreszenz-Detektor L-7480 (Merck Hitachi)
- Interface D-6000A (Merck Hitachi)
- Handelsüblicher PC mit Bildschirm, Maus und Tastatur zur Steuerung der Anlage und Auswertung der Chromatogramme
- HPLC System Manager D-7000 Software Version 4.0 (Merck Hitachi)

Sonstige Geräte:

- pH-Meter (Mettler Delta 345)
- Vortex Mischer
- Vakuumanlage (J.T. Baker spe -24G)
- Waage (Mettler Toledo Ag 241)

2.1.4 Materialien für die Untersuchungen der Extraktion der B₆-Formen

Dünnschichtchromatographische Platten:

- HPTLC Fertigplatten Kieselgel 60 (ohne Fluoreszenzindikator) für die Nano-DC 10x10 cm (Merck) Nr. 5631
- DC-Alufolien Aluminium 150 F 254 neutral (Typ T) 20x20 cm, Schichtdicke 0,2 mm (Merck) Nr. 5551
- DC-Alufolien Kieselgel 60 (ohne Fluoreszenzindikator) 20x20 cm, Schichtdicke 0,2 mm (Merck) Nr. 5553
- Fertigfolien für die DC Alugram SIL G/UV₂₅₄ 40x80 mm, Schichtdicke 0,25 mm Kieselgel mit Fluoreszenzindikator (Macherey-Nagel) Nr. 818131

Säulen für die manuelle Festphasenextraktion (SPE):

Um eine schonende Aufarbeitung von Serumproben zu erzielen, wurde die Retention der B₆-Vitamine auf kommerziellen Festphasenextraktionssäulen getestet. Die hierzu verwendeten Materialien sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tab. 5: SPE Materialien

Hersteller	Säulenbezeichnung	Phasen	Füllmenge	Säulenreservoir
Waters Associates, Milford	SEP-PAK	C18	500 mg	-
Waters Associates, Milford	SEP-PAK	Silica	500 mg	-
Waters Associates, Milford	SEP-PAK	CN	500 mg	-
Waters Associates, Milford	SEP-PAK	Diol	500 mg	-
Waters Associates, Milford	SEP-PAK	NH ₂	500 mg	-
Phenomenex	STRATA	Tri-Func. SCX	100 mg	1 ml
Phenomenex	STRATA	X	60 mg	3 ml
Phenomenex	STRATA	X	30 mg	1 ml
Phenomenex	STRATA	C8	100 mg	1 ml
J.T.Baker	Bakerbond SPE	Phenyl (C ₆ H ₅)	500 mg	3 ml
J.T.Baker	Bakerbond SPE	C18 Octadecyl	500 mg	3 ml
J.T.Baker	Bakerbond SPE	C8 Octyl	500 mg	3 ml
J.T.Baker	Bakerbond SPE	Cyano (CN)	500 mg	3 ml
J.T.Baker	Bakerbond SPE	H ₂ O-Philic	100 mg	3 ml
J.T.Baker	Bakerbond SPE	Diol (COHCOH)	500 mg	3 ml
J.T.Baker	Bakerbond SPE	Amino (NH ₂)	500 mg	3 ml

2.1.5 Stationäre Phasen für die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Inline Probenaufbereitungssäulen:

- LiChrospher ADS (Alkyl-DIOL-Silica) C4 (Merk KGaA) No 150206
- LiChrospher ADS (Alkyl-DIOL-Silica) C8 (Merk KGaA) No 150209
- LiChrospher ADS (Alkyl-DIOL-Silica) C18 (Merk KGaA) No 150947

Vorsäulen:

- SecurityGuard Cartridges Polar-RP 4 x 3,0 mm (Phenomenex) No AJ0-6076-S
- SecurityGuard Cartridges SCX 4 x 3,0 mm (Phenomenex) No AJ0-4308-S

Analytische Trennsäulen:

- Synergi 4 µ Hydro-RP 80A, 250 x 4,60 mm (Phenomenex) No OOG-4375-E0
- Synergi 4 µ Hydro-RP 80A, 150 x 4,60 mm (Phenomenex) No OOF-4375-E0
- Luna 3 µ C8 (2) 100A, 150 x 4,60 mm (Phenomenex) No OOF-4248-E0
- Synergi 4 µ Polar- RP 80A, 150 x 4,60 mm (Phenomenex) No OOF-4336E0
- Prontosil 3 µm 120-3-C18-AQ (Bischoff) No 0000F184PS030

2.2 Methoden

2.2.1 Probenaufarbeitung

In der Arbeit wurden drei Strategien der Probenvorbereitung zur Analyse der B₆-Vitamere aus menschlichem Serum erprobt: Abtrennung der Analyte von Proteinen und anderen Komponenten der Probenmatrix mittels Säurefällung, manueller Festphasenextraktion oder automatisierter Inline-Festphasenextraktion.

2.2.1.1 Eiweißpräzipitation

Die Probenaufarbeitung erfolgte zunächst durch Säurefällung nach einer publizierten Methode (45). 500 µl Probe wurde mit 500 µl 1 mol/l kalter Perchlorsäure versetzt. Der Ansatz wurde kräftig gemischt (Vortexer) und 5 Min bei 3500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und direkt für die HPLC-Analytik eingesetzt.

In Ergänzung zu dieser Methode erfolgte eine Ausfällung überschüssiger Perchlorsäure mittels Dikaliumhydrogenphosphat [10:1].

Daneben wurden weitere Verfahren der Proteindenaturierung mit den Säuren Metaphosphorsäure und Trichloressigsäure erprobt. Hierzu wurden jeweils 500 µl Serumprobe mit 500 µl 1 mol/l Metaphosphorsäure oder Trichloressigsäure versetzt und der Einfluss der Proteinfällung auf die nachfolgende HPLC-Analytik untersucht.

Ebenfalls wurde die Möglichkeit einer kombinierten Alkohol- und Säurefällung der Serumproteine erprobt. Hierzu wurden 0,1 mol/l Perchlorsäure und Ethanol im Verhältnis [1:1] bis [4:1] eingesetzt.

2.2.1.2 Manuelle Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) ist eine Methode zur Aufbereitung flüssiger Proben mit dem Ziel der selektiven, schonenden Anreicherung des Analyten bei gleichzeitiger Abtrennung störender Matrixbestandteile. Abbildung 4 zeigt exemplarisch das Prinzip der Festphasenextraktion: Auf das Sorbens einer mit dem initialen Lösungsmittel äquilibrierten (konditionierten) kleinen Säule oder Kartusche (1) wird die Probe aufgetragen. Der langsame Fluss von Probe und Lösungsmittel durch das Packungsmaterial wird entweder durch die Gravitation oder durch einen mit einer Wasserstrahlpumpe erzeugten geringen Unterdruck erreicht. Die Analytmoleküle binden an die stationäre Phase (2), während störende Matrixkomponenten mit einem Lösungsmittel, in dem der Analyt nur schlecht oder gar nicht löslich ist, aus der Festphase ausgewaschen werden (3). Anschließend wird der Analyt mit einer geeigneten mobilen Phase vom Sorbens gelöst, eluiert und aufgefangen (4).

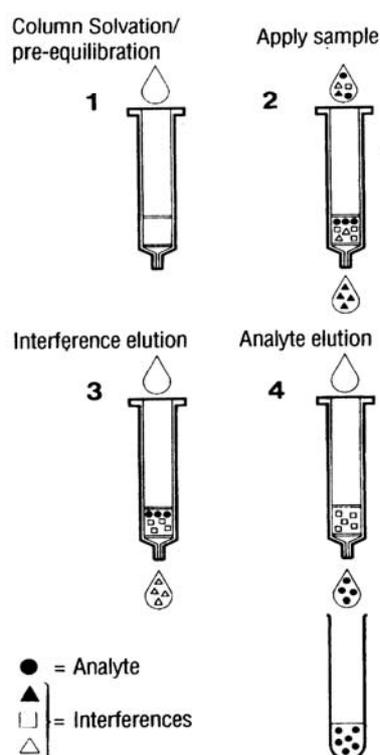


Abb. 4: Prinzip der Festphasenextraktion (www.r-biopharm.de, Stand 01.02.2006)

Für die Prüfung verschiedener SPE-Säulen bzw. -Kartuschen (Tab. 5, S. 20) auf ihre Eignung zur Extraktion der B₆-Formen wurden folgende experimentelle Bedingungen gewählt. Alle Säulen oder Kartuschen wurden auf einem Vakuum-Extraktionsgestell (Baker)

montiert und unter leichtem Wasserstrahlvakuum nach den Vorgaben des Herstellers durch Spülen mit 2 bis 3 ml organischem Lösungsmittel (Acetonitril oder Methanol), gefolgt von 2 bis 5 ml Wasser konditioniert. Auf die noch feuchte stationäre Phase wurden 100 – 300 µl Probe aufgetragen. Die Säulen bzw. Kartuschen wurden wie in Tabelle 6 - 16 angegeben eluiert, die Eluate fraktioniert aufgefangen und entweder direkt durch Auftragen auf eine DC-Platte (Kap. 2.2.2) oder nach Eindampfen unter Stickstoff und Aufnehmen im Eluenten mittels HPLC (Kap. 2.2.3) auf ihre Zusammensetzung getestet. Die exakten Versuchsbedingungen, sofern sie von der allgemeinen Vorschrift des jeweiligen Herstellers abweichen, sind nachfolgend in tabellarischer Form wiedergegeben. Um die Affinität der B₆-Vitamere zu diversen stationären Phasen möglichst unabhängig von der mobilen Phase zu untersuchen, wurden anfangs nur einfach zusammengesetzte Eluenten aus Aqua bidest. und einem organischen Lösungsmittel verwendet.

Tab. 6: Retention der B₆-Vitamere auf Bakerbond C18; C8; Phenyl; Cyano 500 mg

Versuch Nr.	Stationäre Phase	Probenauftrag / Elution
SPE 1	C18 C8 Phenyl Cyano	<ul style="list-style-type: none"> • Probenauftrag 200 µl Std 5 + ISTD [1:1] • 2x 500 µl; 2x 1 ml Aqua bidest. • 2x 500 µl Methanol

Tab. 7: Retention der B₆-Vitamere auf Bakerbond H₂O Philic 100 mg

Versuch Nr.	Stationäre Phase	Probenauftrag / Elution
SPE 2	H ₂ O Philic	<ul style="list-style-type: none"> • Probenauftrag 100 µl Std 5 + ISTD + Aqua bidest. [1:1:2] • 6x 300 µl Aqua bidest. • 1x 300 µl Acetonitril 80%

Tab. 8: Retention der B₆-Vitamere auf Strata X 30 / 60 mg

Versuch Nr.	Stationäre Phase	Probenauftrag / Elution
SPE 3	Strata X	<ul style="list-style-type: none"> • Probenauftrag 300 µl Standard 5 + 0,1 M NaCl [1:1] • 1 ml Aqua bidest.; Auffangen → 1. Röhrchen • 1ml Acetonitril (5%); Auffangen → 2. Röhrchen • 1ml Acetonitril (100%); Auffangen → 3. Röhrchen

Tab. 9: Retention der B₆-Vitamere auf C8 und C18 nach Erhöhung der Ionenstärke

Versuch Nr.	Stationäre Phase	Probenauftrag / Elution
SPE 4	C8 C18	<ul style="list-style-type: none"> • Probenauftrag 300 µl Standard 5 + 0,1 M NaCl [1:1] • 500 µl Aqua bidest.; Auffangen → 1. Röhrchen • 500 µl Acetonitril; Auffangen → 2. Röhrchen

Im folgenden Schritt wurde versucht, durch komplexere mobile Phasen unter Einsatz von Ionenpaar-Reagenzien die Retention der B₆-Vitamere an den stationären Phasen zu erhöhen. Dabei wurde dem Eluenten Oktansulfonat in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt.

Tab. 10: Elutionsreihe mit Ionenpaar-Reagenzien auf C8 und C18

Versuch Nr.	Stationäre Phase	Probenauftrag / Elution
SPE 5	C8 C18	<ul style="list-style-type: none"> • Probenauftrag 200 µl 4x Serumpool+ Standard 5 [5:1] • Aufgestocktes Serum + mobile Phasen 1,2,3 und 4 (ca. pH 2,1) [1:1] <p>Phase 1: Aqua bidest. 100%</p> <p>Phase 2: 50 mmol/l KH₂PO₄; 10 mmol/l TEA; 0,5 g/l Na-Bisulfit; 0,75 mmol/l Okt.</p> <p>Phase 3: 50 mmol/l KH₂PO₄; 10 mmol/l TEA; 0,5 g/l Na-Bisulfit; 5,0 mmol/l Okt.</p> <p>Phase 4: 50 mmol/l KH₂PO₄; 10 mmol/l TEA; 0,5 g/l Na-Bisulfit; 10,0 mmol/l Okt.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 5x 300 µl entsprechender Phase → Auffangen • 1x 300 µl entsprechender Phase + Acetonitril (100%) [1:1] → Auffangen • Eluate 10 Min zentrifugieren bei 20000 g

Tab. 11: Elutionsreihe mit Ionenpaar-Reagenzien auf Phenyl 500 mg

Versuch Nr.	Stationäre Phase	Probenauftrag / Elution
SPE 6	Phenyl	<ul style="list-style-type: none"> • Probenauftrag 200 µl 4x Serumpool+ Standard 5 [5:1] • Aufgestocktes Serum + mobile Phasen 1,2,3 und 4 (ca. pH 2,1) [1:1] <p>Phase 1: Aqua bidest. 100%</p> <p>Phase 2: 50 mmol/l KH₂PO₄; 10 mmol/l TEA; 0,5 g/l Na-Bisulfit; 0,75 mmol/l Okt.</p> <p>Phase 3: 50 mmol/l KH₂PO₄; 10 mmol/l TEA; 0,5 g/l Na-Bisulfit; 5,0 mmol/l Okt.</p> <p>Phase 4: 50 mmol/l KH₂PO₄; 10 mmol/l TEA; 0,5 g/l Na-Bisulfit; 10,0 mmol/l Okt.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 5x 300 µl entsprechender Phase → Auffangen • 1x 300 µl entsprechender Phase + Acetonitril (100%) [1:1] → Auffangen • Eluate 10 Min zentrifugieren bei 20000 g

Tab. 12: Elution der B₆-Vitamere mit Methanol (A) und Acetonitril (B) auf Phenyl 500 mg

Versuch Nr.	Stationäre Phase	Probenauftrag / Elution
SPE 7	Phenyl	<ul style="list-style-type: none"> • Probenauftrag 100 µl Standard 5 + ISTD [1:1] • 4x 300 µl Aqua bidest. • Vakuumtrocknen ca. 5 Min • A: 6x 300 µl Methanol (100%) bzw. B: 9x 300 µl Acetonitril (100%)

Tab. 13: Elution der B₆-Vitamere mit verschiedenen Lösungsmitteln auf Phenyl 500mg nach Ansäuern der Probe

Versuchs Nr.	Stationäre Phase	Probenauftrag / Elution
SPE 8	Phenyl	<ul style="list-style-type: none"> Probe (200 µl Standard 5) + Aqua bidest. [1:1] mit HCL auf pH 2,5 angesäuert 3x 500 µl Aqua bidest. 2x 500 µl Acetonitril (80%); Toluol (80%); Methanol (80%); Methanol (80%) + Triethylamin [5:1]; Toluol (80%) + Triethylamin [5:1]

Tab. 14: Elution der B₆-Vitamere mit verschiedenen Lösungsmitteln auf C18 500 mg

Versuchs Nr.	Stationäre Phase	Probenauftrag / Elution
SPE 9	C18	<ul style="list-style-type: none"> Proben (200 µl Standard 5) + ISTD [1:1] 3x 500 µl Aqua bidest. je 500 µl Methanol (80%); Acetonitril (80%); Propanol (80%) ; Methanol (80%) + Oktansulfonat 10 mmol/l [1:1]; Methanol (80%) + Triethylamin [1:1]; Toluol (80%); HPLC-Puffer + 10% Methanol (80%)

Tab. 15: Elutionsreihe 1 der B₆-Vitamere mit verschiedenen Lösungsmitteln auf Bakerbond Phenyl 500mg

Versuch Nr.	Stationäre Phase	Probenauftrag / Elution
SPE 10	Phenyl	<ul style="list-style-type: none"> Probe (200 µl Standard 5) + ISTD [1:1] 3x 500 µl Aqua bidest. Vakuumtrocknen ca. 6 Min 500 µl Aqua bidest; Methanol (80%); Acetonitril (80%) ; Propanol (80%) ; Methanol (80%) + 10mmol Oktansulfonat [1:1] ; Methanol (80%) + 10mmol Triethylamin [1:1]; Toluol (80%); HPLC Puffer + Methanol (80%) [9:1]

Tab. 16: Elutionsreihe 2 der B₆-Vitamere mit verschiedenen Lösungsmitteln auf Bakerbond Phenyl 500mg

Versuch Nr.	Stationäre Phase	Probenauftrag / Elution
SPE 11	Phenyl	<ul style="list-style-type: none"> Probe (200 µl Standard 5) + ISTD [1:1] 1x 500 µl Aqua bidest. 5x 500 µl 100% Methanol; 98% Methanol + 2% Essigsäure; 98% Methanol + 2% Ammoniumhydroxid; 98% Methanol + 2% TEA; 96% Methanol + 2% TEA + 2 % Essigsäure; 96% Methanol + 2% TEA + 2 % Ammoniumhydroxid

2.2.1.3 Inline-Festphasenextraktion

Die Inline-Festphasenextraktion ermöglicht eine in die HPLC-Analyse integrierte Probenaufbereitung. Dies geschieht durch Einbau einer Extraktionssäule vor der eigentlichen analytischen Trennsäule an der HPLC-Anlage. Auf der Extraktionssäule ist das direkte Injizieren von unbehandelten biologischen Matrices unter Umgehung der klassischen Extraktion oder Proteinfällung möglich. Dafür werden zwei chromatographische Prinzipien gekoppelt: die Umkehrphasen-Chromatographie einerseits und die Ausschluss-Chromatographie andererseits. Das Prinzip ist in Abbildung 5 dargestellt.

An der Oberfläche der Teilchen des Packungsmaterials sind elektroneutrale, hydrophile Diol-Gruppen gebunden, wohingegen die innere Schicht eine hydrophobe Verteilungsphase (C18; C8; C4) aufweist. Beim Passieren der Nativprobe können Makromoleküle (z.B. Proteine) mit einem Molekulargewicht über 15000 Dalton nicht in die Poren eindringen, verbleiben im Totvolumen der Säule und werden rasch eluiert. Niedermolekulare Probenkomponenten wie z.B. die B₆-Formen sollten hingegen an die hydrophobe Oberfläche im Zentrum der Säulenpartikel gelangen und dort länger retiniert werden können. Dies sollte optimaler Weise zur Fraktionierung der aufgegebenen Probe in eine hochmolekulare (Proteine) und eine niedermolekulare Fraktion führen, die gegebenenfalls die B₆-Formen enthält. Nach der Elution und dem Verwerfen der Proteinfraction sollte durch Schalten eines Ventils die Überführung der auf der Vorsäule retinierten Vitamere auf die nachgeschaltete analytische Trennsäule möglich sein.

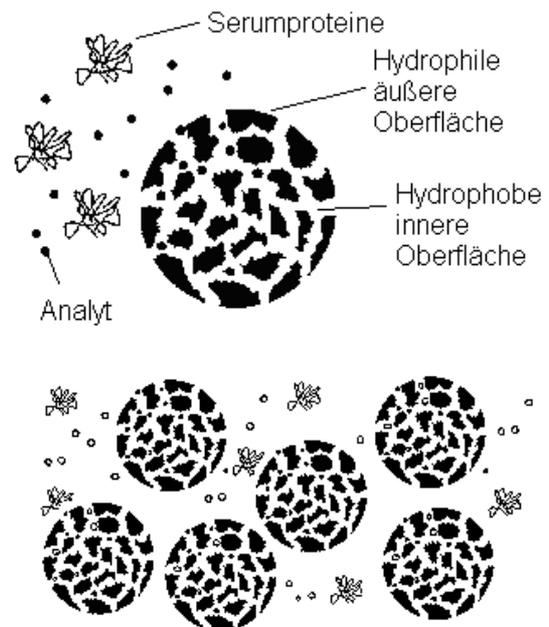


Abb. 5: Schematische Darstellung des ADS-Festphasenextraktionsmaterials

Um zu prüfen, ob sich die angestrebte Fraktionierung der Probe erreichen lässt, und gegebenenfalls die erforderliche Schaltzeit für den Fraktionierungs- und den Transferschritt zu bestimmen, wurde die Vorsäule direkt, d.h. ohne nachgeschaltete Trennsäule, an den UV-Detektor der HPLC-Anlage gekoppelt. Zunächst wurde Serum (100 µl) injiziert und das

Elutionsprofil der Probenmatrix durch Messung der Absorption bei 280 nm registriert. Als Eluent diente ein Puffer aus 2% Methanol und 98% Aqua bidest. mit 0,01 Vol% Phosphorsäure (85%), mit Triethylamin auf pH 5,0 eingestellt; die Flussrate betrug 0,8 ml/Min. Anschließend wurde das Elutionsprofil des Analyten mit dem gleichen Versuchsaufbau ermittelt.

2.2.2 Analytik

2.2.2.1 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (DC) wurde eingesetzt zum raschen und kostengünstigen qualitativen Nachweis verschiedener B₆-Formen. Hierzu wurden drei in der Literatur beschriebene DC-Methoden zur Auftrennung der B₆-Vitamere (2,59,81) auf ihre Eignung geprüft. Mit der DC-Methode nach Smith und Dietrich (81) und einer Anfärbung mit p-Nitroanilin nach Ahrens (2) wurde in Vorversuchen die Retention der B₆-Vitamere auf SPE-Säulen (Tab. 5, S. 20) überprüft, um einen Überblick über die in Frage kommenden Extraktionsmaterialien zu bekommen. Nach Betreiben der SPE-Säulen, wie in Kap. 2.2.1.2 beschrieben, wurden 10 µl des fraktioniert aufgefangenen Eluats auf die DC-Platte aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt über 1,5 Stunden in einem Lösungsmitteltank mit einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus n-Amylalkohol-Aceton-H₂O-Diethylamin (40:35:20:5).

Neben der klassischen Auftrennung der B₆-Vitamere mittels DC wurden Silica-Platten auch als Träger eingesetzt, auf denen fraktioniert aufgefangene Eluate aus den SPE-Versuchen aufgetragen und nach dem Trocknen durch Besprühung mit p-Nitroanilin sichtbar gemacht wurden. Hierbei erfolgte keine chromatographische Auftrennung der aufgetragenen Fraktionen, sondern lediglich eine Detektion von B₆-Formen im Eluat. Die unterschiedliche Färbung der einzelnen B₆-Verbindungen erlaubte dabei orientierend eine Zuordnung zur entsprechenden B₆-Form.

2.2.2.2 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Als Ausgangspunkt der Optimierung der HPLC-Analytik der B₆-Formen wurde eine 1996 von Kimura et al veröffentlichte Methode (45) gewählt. In der Originalvorschrift wird Citratplasma im Verhältnis 1:1 mit Perchlorsäure (0,8 M) gemischt, das Gemisch 5 Minuten bei 20000 g zentrifugiert und der Zentrifugationsüberstand direkt in die HPLC-Anlage injiziert. Als

stationäre Phase wird eine C18- Reversed-Phase-Säule (AQ-302 ODS RP, 150 X 4,6 mm, YMC, Kyoto, Japan), als mobile Phase ein Puffer aus 100 mmol/l KH_2PO_4 , 100 mmol/l Perchlorat, 0,5 g/l Natrium Bisulfit verwendet, mit Phosphorsäure auf pH 3 eingestellt. Dieser wird isokratisch mit einer Flussgeschwindigkeit von 1ml/Min durch die HPLC-Säule gepumpt. Die Injektionsvolumina des aufgearbeiteten Plasmas betragen 50-500 μl . Die Derivatisierung geschieht online vor der Säule durch das dem Puffer zugegebene Natrium-Bisulfit. Die Detektion erfolgt fluorimetrisch mit einer Anregungswellenlänge von 300 nm und einer Emissionswellenlänge von 400 nm. Diese Methode wurde zunächst im Labor etabliert, anschließend wurden einzelne Komponenten der Methode systematisch variiert und die Auswirkungen der Änderungen auf die Auftrennung der B_6 -Formen geprüft.

2.2.2.2.1 Variation der stationären Phase

Im Rahmen der Optimierungsversuche wurden verschiedene stationäre Phasen für die Reversed-Phase HPLC auf ihre Eignung zur Auftrennung der B_6 -Formen geprüft (Kap. 2.1.5). Neben C18-Phasen mit unterschiedlichem Endcapping (Prontosil und Synergi Hydro) kamen eine C8-Phase (Luna) und eine Phenylphase (Synergi Polar) zum Einsatz. Alle analytischen Säulen wurden mit geeigneten Vorsäulen (Kap. 2.1.5) zum Schutz gegen irreversible Kontaminationen und Verstopfen betrieben.

2.2.2.2.2 Variation der mobilen Phase

Die über die analytische Trennsäule laufende mobile Phase wurde aus drei einzelnen Lösungen (A, B, C) gemischt; die exakten Angaben zu Eluent und Gradientprofil finden sich im Ergebnisteil bei den jeweiligen Experimenten. Lösung A repräsentiert den organischen Teil des Lösungsmittels (Acetonitril oder Methanol), Lösung C besteht aus Aqua bidest, und Lösung B stellt einen Kaliumphosphatpuffer dar. Drei wesentliche Variablen des Puffers - Ionenstärke, pH und Zusatz von Ionenpaar-Reagenzien - wurden systematisch auf ihren Einfluss auf die Retention der B_6 -Vitamere untersucht.

Die mobile Phase besteht bei der Umkehrphasen-Chromatographie aus einem relativ polaren Eluenten. Zur weiteren Modifikation der Polarität können dem Wasseranteil zusätzlich Salze beigemischt werden. Der Einfluss der Ionenstärke wurde durch systematische Variation der KH_2PO_4 -Konzentration im Puffer erprobt. Hierbei wurden Konzentrationen zwischen 10mmol/l und 100 mmol/l KH_2PO_4 eingesetzt.

Die Einstellung des Puffer-pH erfolgte durch Zugabe von ortho-Phosphorsäure oder Salzsäure, dabei wurde der pH-Wert zwischen 2 und 6 variiert.

Zur gezielten Maskierung der pH-abhängigen Ladung der B₆-Vitamere wurden Ionenpaar-Reagenzien dem Eluenten zugesetzt: Triethylamin - das mit Phosphorsäure Triethylammoniumphosphat bildet – in Konzentrationen von 10 – 50 mmol/l und Natrium-Oktansulfonat in Konzentrationen von 0,2 – 5 mmol/l.

Alle mobilen Phasen wurden vor Gebrauch durch einen 0,45 µm-Filter filtriert (Millipore), um eine Verunreinigung der Säule zu verhindern. Die initiale Entgasung der Laufmittel wurde im Ultraschallbad vorgenommen, während des Laufs wurde der Eluent durch den Entgaser von restlichen gelösten Gasen befreit. Die Glasflaschen der Laufmittel sowie die Fritten der HPLC wurden regelmäßig im Ultraschallbad gereinigt.

2.2.2.2.3 Interner Standard

Desoxypyridoxin und N-Methyldopamin wurden auf ihre Eignung als Interner Standard geprüft. Hierzu wurden Stammlösungen dieser Substanzen in Wasser bzw. in Essigsäure mit Perchlorsäure verdünnt und die so hergestellten sauren Lösungen den Proben zum Ausfällen der Proteine zugesetzt.

2.2.2.2.4 Detektion

Da die Fluoreszenz der (z.T. durch Bisulfit derivatisierten) B₆-Formen (45) eine sehr empfindliche Bestimmung ermöglicht, wurde dieses Detektionsprinzip beibehalten. Es wurden aber systematisch die Anregungs- und Emissionswellenlänge variiert, um ggf. die Fluoreszenzbedingungen optimieren zu können. Hierzu wurden Standard 5 (Kap. 2.1.2) oder mit B₆-Vitaminen angereicherte Serumproben in die Küvette des Fluoreszenzdetektors gepumpt, der Fluss unterbrochen, nacheinander die Anregungswellenlängen 270, 280, 290, 300, 310 und 320 nm eingestellt, für jede Anregung die Emissionswellenlänge zwischen 360 und 450 nm variiert und die Intensität des Fluoreszenzsignals gemessen.

2.2.2.2.5 Säulentemperierung

Generell wurde die Analytik der B₆-Vitamine bei Zimmertemperatur durchgeführt (23-25°C). In einzelnen Versuchen wurde die analytische Säule mit Hilfe eines Säulenofens auf 25, 30 oder 35 °C temperiert und der Einfluss der Temperatur auf die Auftrennung der B₆-Formen geprüft.

2.2.2.2.6 Säulenregenerierung und -equilibrierung

Um serielle Untersuchungen durchführen zu können, muss im Anschluss an eine analytische Trennung die analytische Säule von Matrix- und Analytresten gereinigt und wieder mit dem Start-Eluenten equilibriert werden. Dies wurde erzielt durch das kurzfristige Anheben der Acetonitrilkonzentration auf 50% unmittelbar im Anschluss an die letzte Detektion einer B₆-Form. Zusätzlich wurde die Flussrate des Eluenten auf 0,8 ml/Min angehoben, um die Effektivität der „Säulenspülung“ zu steigern. Im Anschluss an die Regenerierung wurde die Säule für 12 Minuten mit der zu Beginn eines analytischen Trennschritts verwendeten mobilen Phase equilibriert.

2.2.2.2.7 Kalibrierung und Auswertung der Chromatogramme

Für quantitative Bestimmungen der B₆-Formen wurden die in Kapitel 2.1.2. 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 Konzentration der B₆-Formen in der untersuchten Probe erfolgten mit Hilfe einer speziellen Software (HPLC System Manager D-7000, Kap. 2.1.3).

2.2.2.2.8 Optimierte HPLC-Methoden zur Bestimmung der B₆-Formen im Serum

Aus den Optimierungsversuchen resultierten zwei HPLC-Methoden („Routinemethode“ und „Forschungsmethode“) zur Bestimmung der B₆-Formen, deren Einstellungen nachfolgend im Detail dargestellt sind. Neben der Probenaufarbeitung und den relevanten HPLC-Parametern sind auch der Zeitverlauf und die Flussraten der Gradientenelution zur exakten Reproduzierbarkeit aufgeführt.

„Routinemethode“

Probenaufarbeitung:

200 µl Serum / Standard	+	200 µl Interner Standard mit 3 mmol/l kalter Perchlorsäure verdünnt 1:20
Mischen, zentrifugieren 10 Min bei 14000g		
300 µl Überstand	+	30 µl 2mol/l KH ₂ PO ₄
Mischen und 15 Min abgedunkelt inkubieren		
10 Min bei 14000g zentrifugieren		
100 µl Überstand injizieren		

Säule: RP- HPLC Säule Prontosil 120-3-C18-AQ, 200 x 4,0 mm

Eluent A : Acetonitril

Eluent B : KH₂PO₄ 0,1 mol/l, NaClO₄ 0,1mol/l, NaHSO₃ 0,5 g/l, pH 3,0 mit Phosphorsäure

Eluent C: Aqua bidest.

Flußrate : 0,4-0,8 ml/Min

Detektion: $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 400 \text{ nm}$

Tab. 17: Gradiententabelle „Routinemethode“

Time (min)	A%	B%	C%	Flow (ml/min)
0,0	1	99	0	0,4
0,1	1	99	0	0,4
5,0	1	99	0	0,4
5,1	1	99	0	0,4
10,0	7	93	0	0,3
15,0	7	93	0	0,3
15,1	5	95	0	0,4
45,0	5	95	0	0,4
45,1	50	25	25	0,5
47,0	50	25	25	0,5
47,1	50	25	25	0,8
50,0	50	25	25	0,8
50,1	50	25	25	0,5
57,0	50	25	25	0,5
57,1	1	99	0	0,4
67,0	1	99	0	0,4
69,0	1	99	0	0,4

A: Acetonitril; B: Puffer; C: Aqua bidest.

„Forschungsmethode“

Probenaufarbeitung:

200µl Serum / Standard + 200µ 10% Metaphosphorsäure
 Mischen, zentrifugieren 10 Min bei 14000g
 100µl Überstand injizieren

Säule: Synergi 4 µ Hydro-RP 80A, 250 x 4,60 mm

Eluent A : Acetonitril

Eluent B : KH₂PO₄ 0,1 mol/l, Oktansulfonat 0,75 mmol/l, NaHSO₃ 0,5 g/l, Triethylamin 25 mmol/l pH 2,5 mit Phosphorsäure

Eluent C: Aqua bidest.

Flußrate : 0,4-0,7 ml/Min

Detektion: $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 400 \text{ nm}$

Tab. 18: Gradiententabelle „Forschungsmethode“

Time (min)	A%	B%	C%	Flow (ml/min)
0,0	1,0	99,0	0,0	0,4
5,0	1,0	99,0	0,0	0,4
5,1	1,0	99,0	0,0	0,4
15,0	7,0	93,0	0,0	0,4
15,1	7,0	93,0	0,0	0,5
35,0	7,0	93,0	0,0	0,5
35,1	50,0	25,0	25,0	0,7
37,0	50,0	25,0	25,0	1,0
40,0	50,0	25,0	25,0	1,0
40,1	50,0	25,0	25,0	1,0
47,1	1,0	99,0	0,0	1,0
57,0	1,0	99,0	0,0	0,5

A: Acetonitril; B: Puffer; C: Aqua bidest.

2.2.2.2.9 Analytische Charakteristika der optimierten „Routinemethode“

Zur Charakterisierung der analytischen Eigenschaften der für die Routineanalytik optimierten HPLC-Methode („Routinemethode“; Kap. 2.2.2.2.8) wurden die Präzisionen in der Serie und

von Tag zu Tag bestimmt. Hierzu wurden Seren mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener B₆-Formen in einem chromatographischen Lauf mehrfach analysiert bzw. in mehreren Läufen als Kontrollen mitgeführt und aus den Ergebnissen die jeweiligen Variationskoeffizienten (VK) berechnet. Als Anhalt für die Richtigkeit der Analyse wurde die Wiederfindung von Standard-Lösungen, die einzelnen Seren zugesetzt worden waren, bestimmt.

2.2.3 Ermittlung von Referenzbereichen der B₆-Formen

Um eine repräsentative Einsicht in den Vitamin-B₆-Status gesunder Erwachsener zu erhalten und gleichzeitig den Einfluss des Alters und des Geschlechts studieren zu können, wurden 110 Seren von Blutspendern des Universitätsklinikums Schleswig Holstein am Campus Lübeck untersucht. Hierzu wurden Blutproben verwendet, die prinzipiell bei Blutspendern am Campus Lübeck in regelmäßigen Abständen zur Kontrolle des Eisenhaushalts (Ferritinbestimmung) abgenommen werden. Das Serum wurde vor der Ferritinbestimmung aliquotiert und ein Aliquot bei -80°C eingefroren; nach Abschluss der Ferritinmessung, d.h. sobald sichergestellt war, dass keine Wiederholungsmessung oder Folgeuntersuchung notwendig war, wurde das Aliquot für die Bestimmung des Vitamin-B₆-Gehalts eingesetzt. Eine sichere Zuordnung des Serums zum Blutspender mit Kenntnis des Alters und des Geschlechts war hiermit gewährleistet. Da B₆-Vitamine eine besondere Licht- und Hitzelabilität aufweisen (50), wurde beim Sammeln und Transportieren der Blutproben - wie unter Kapitel 2.1.1 beschrieben - auf Lichtschutz und Kühlung besonderer Wert gelegt und die Proben im Labor umgehend abesert.

2.2.4 Pharmakokinetik der B₆-Formen

An zwei gesunden Probanden wurde die Kinetik der Vitamin-B₆-Formen nach intravenöser und oraler Gabe von Vitamin-B₆-Präparaten dargestellt. Die demographischen Daten der Probanden sind in Tabelle 19 wiedergegeben.

Tab. 19: Demographische Daten der Probanden für die Untersuchung der Kinetik von Vitamin B₆ nach oraler und intravenöser Applikation

Proband	Geschlecht	Alter	Applikationsform/Menge
A	Männlich	27	oral / 100 mg
B	Männlich	28	intravenös / 100 mg

Tab. 20: Zeitpunkte der Blutentnahmen

Proben Nr.	Zeitpunkt (t) der Blutentnahmen (h)
1	0
Vitamingabe	
2	0,25
3	0,5
4	0,75
5	1
6	1,25
7	1,5
8	1,75
9	2
10	2,25
11	2,5
12	2,75
13	3
14	3,5
15	4,0
16	4,5
17	5
18	24

Die Zeitpunkte der Blutentnahmen sind in Tabelle 20 aufgelistet. Unmittelbar vor der Applikation der B₆-Vitamere erfolgte die erste Abnahme (Probe 1 = t 0, Ausgangsstatus der Probanden ohne Vitamin B₆-Supplementation). Danach wurde versucht, durch engmaschige Blutentnahmen einen möglichst genauen Einblick in die Kinetik der B₆-Vitamere und den zeitlichen Ablauf bis zur Einstellung eines Gleichgewichts unter den B₆-Formen zu gewinnen. Während des gesamten Versuchs blieben alle Versuchsteilnehmer bis auf die Aufnahme von Wasser nüchtern, um eine Interferenz mit den Messergebnissen zu vermeiden.

2.2.5 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 Kolmogorov-Smirnov-Tests hinsichtlich ihrer Normalverteilung überprüft. Je nachdem ob die getesteten Variablen eine Normalverteilung aufwiesen (Kolmogorov-Smirnov-Test: $p \geq 0,05$) oder keine Normalverteilung berechnet wurde (Kolmogorov-Smirnov-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 der H-Test nach Kruskal und Wallis eingesetzt, während beim Vergleich von mehr als 2 unabhängigen, normalverteilten Stichproben die einfaktorielle ANOVA (analysis of variance) Anwendung fand. Zur weiteren Differenzierung, welche Parameter der ANOVA sich unterschieden, wurde bei signifikantem Ergebnis der ANOVA als post hoc Test der Bonferroni-Test mit jeweils multipler t-Testung durchgeführt.

Die Korrelation zwischen 2 Parametern wurde durch den Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet.

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 einzelnen B_6 -Formen aus dem Gesamtkollektiv 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

Ausgehend von einer publizierten HPLC-Methode zur Bestimmung von PLP, PL und 4-PA im menschlichen Plasma (45) wurden im ersten Teil der Arbeit Teilschritte des Analysengangs systematisch überprüft, um eine Optimierung des Verfahrens zu erreichen. Im zweiten Schritt wurde dann die optimierte HPLC-Methodik eingesetzt, um Referenzbereiche der Serumkonzentration einzelner B₆-Formen und Konzentrationsänderungen nach exogener Zufuhr von Pyridoxin zu ermitteln.

3.1 Methodenoptimierung

Als Ausgangspunkt für die HPLC-Analytik der B₆-Vitamere wurde die RP-HPLC Methode von Kimura et al. (45) gewählt (Kapitel 2.2.2.2). In den Versuchen zur Optimierung dieser Methode wurden die Komponenten ‚Probenaufarbeitung‘, ‚stationäre Phase‘ und ‚mobile Phase‘ separat variiert, um ihren Beitrag zur Auftrennung der B₆-Formen besser einschätzen zu können.

3.1.1 Probenaufarbeitung

Komplexe, stark proteinhaltige biologische Flüssigkeiten wie Serum können in der Regel nicht direkt auf eine HPLC-Säule aufgetragen werden, weil die Proteinbindung des Analyten mit der chromatographischen Auftrennung interferiert und die Probenmatrix die Säule verstopfen kann. Deshalb werden solche Untersuchungsmaterialien vor der chromatographischen Analyse aufbereitet, um niedermolekulare Analyte wie z.B. die B₆-Formen von hochmolekularen Proteinen abzutrennen. In der Methode von Kimura et al. (45) erfolgt diese Abtrennung durch Ausfällen der Proteine mit Perchlorsäure. Es wurde zunächst geprüft, ob andere Verfahren zur Probenvorbereitung die HPLC-Analytik der B₆-Vitamere verbessern können.

Hierzu wurden drei Strategien erprobt:

1. Die manuell betriebene Festphasen-Extraktion (Offline- Festphasen-Extraktion).
2. Eine automatisierte, integrierte Festphasen-Extraktion mittels ADS-Säulen (Inline-Festphasen-Extraktion).
3. Variationen der Proteinfällung.

3.1.1.1 Manuelle Festphasenextraktion

Um möglichst viele Materialien zur Festphasen-Extraktion erproben zu können, wurde eine Vorauswahl der in Tabelle 5 (S. 20) aufgelisteten Extraktionssäulen durchgeführt. Hierbei wurden die SPE-Säulen nach Anleitung des Herstellers angewendet und zur Untersuchung der fraktioniert aufgefängenen Extrakte DC-Platten benutzt (Kap. 2.2.2.1). In Vorversuchen

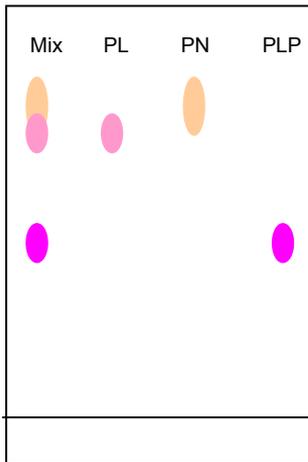


Abb. 6: DC-Auftrennung der B₆-Vitamere nach *Smith et al.* (81)

hatte sich die DC-Methode nach Smith und Dietrich (81) als besonders geeignet zur Auftrennung der B₆-Vitamere erwiesen. Diese Methode verwendet eine stationäre Phase aus Silica-Gel und eine mobile Phase aus n-Amylalkohol-Aceton-H₂O-Diethylamin (40:35:20:5 v/v). Zur Detektion der Analyten wurde anschließend die DC-Platte mit einer p-Nitroanilin-Lösung besprüht (2). Wie in Abbildung 6 exemplarisch gezeigt, kam es beim Besprühen zu einer unterschiedlichen Anfärbung der einzelnen B₆-Formen. Die visuelle Differenzierung der B₆-Vitamere anhand ihrer „Farbe“ ermöglichte eine einfache, rasche und kostengünstige Methode zur Abschätzung der Retentions- und Trennleistung der verschiedenen SPE-Säulen. Wie in Abbildung 7

schematisch gezeigt, wurden hierzu Eluate der Festphasenextraktion fraktioniert aufgefängene, die Fraktionen möglichst konzentriert auf die DC-Platte aufgetragen und diese nach dem Trocknen mit dem Färbereagenz besprüht (Abb. 8 und 9; S. 38).

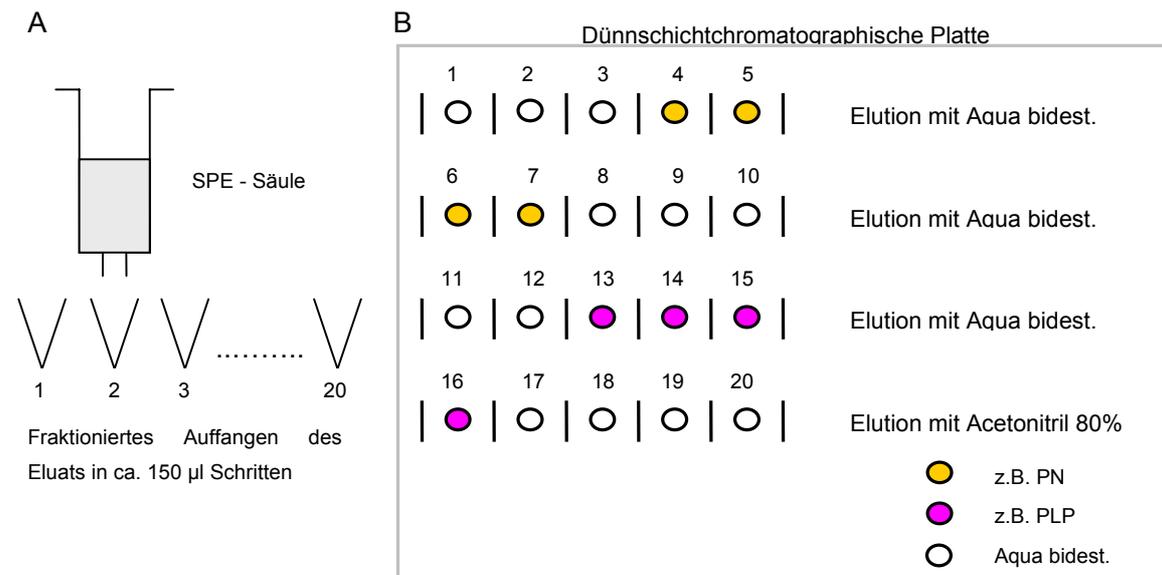


Abb. 7: Schema: Darstellung von fraktioniert aufgefängendem Eluat einer SPE-Säule (A) auf einer DC Platte (B). Die Ziffern (1-20) stellen die einzelnen Eluate dar.

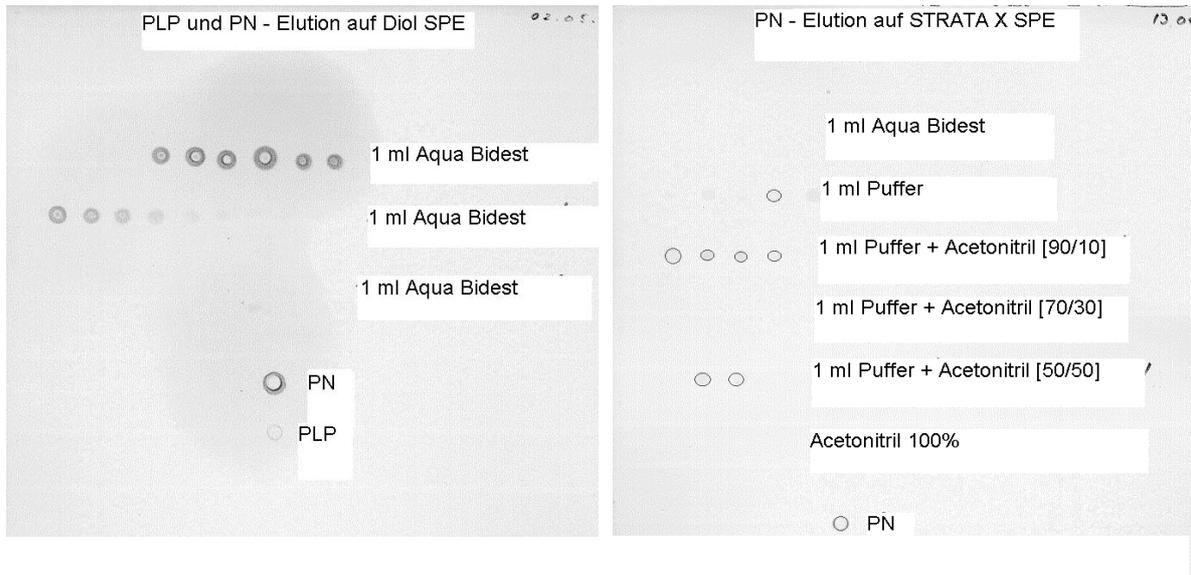


Abb. 8: Beispiel einer zur Retention der B₆-Vitamerer ungeeigneten SPE-Säule (frühe Elution)

Abb. 9: Beispiel einer zur Retention der B₆-Vitamerer möglicherweise geeigneten SPE-Säule

Folgende Materialien der in Tabelle 5 (S. 20) aufgeführten SPE-Säulen haben in den Vorversuchen mit Auftrag auf DC-Platten und nachfolgender Färbung eine (geringe) Retardierung der aufgetragenen B₆-Formen gezeigt: C8; C18; Strata X; H₂O-Phylic; Phenyl; Cyano. Um eine präzisere Beurteilung der Leistung dieser SPE-Säulen zu erzielen, wurden die Versuche wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben durchgeführt und die Eluate anschließend mittels HPLC untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Eigenentwicklung einer HPLC-Methode (Abb. 10) eingesetzt, welche alle B₆-Formen in kurzer Zeit zu detektieren vermag.

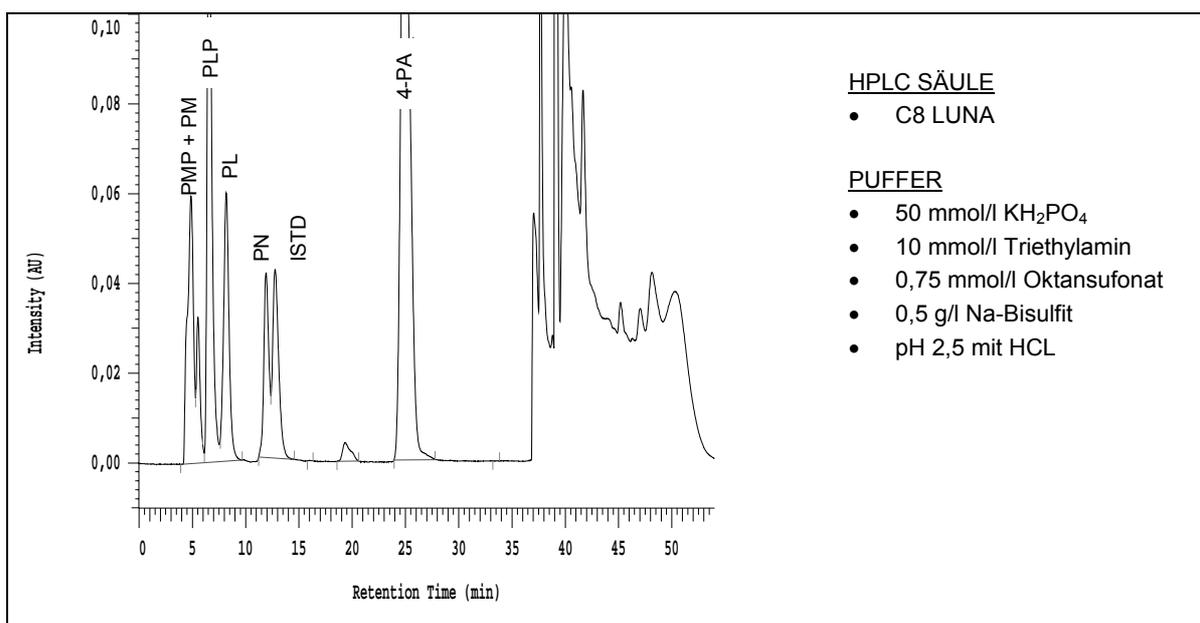


Abb. 10: Auftrennen von Vitaminstandards mittels HPLC (Gewählte Methode für SPE Fraktionsanalyse)

Eine Basislinientrennung der einzelnen B₆-Vitamere, wie sie zur exakten Ermittlung der Konzentration notwendig wäre, wird allerdings nicht erzielt. Ermöglicht wird jedoch eine Peak-Zuordnung aller B₆-Formen (Kap. 3.1.2.3.1) in einem analytischen Trennschritt (<30 min).

Nachfolgend sind die Ergebnisse der in Kapitel 2.2.1.2 detailliert beschriebenen Versuche aufgeführt (vgl. Versuchsnummer). Wegen der Vielzahl der bei den Versuchen anfallenden Chromatogramme ist das Verhalten der B₆-Vitamere auf den jeweiligen SPE-Säulen in tabellarischer Form zusammengefasst (Tab. 21-31).

Bei den ersten Versuchen erfolgte die Elution der SPE-Säulen mit Aqua bidest. und einem organischen Lösungsmittel. Damit konnte zunächst die Stärke der Bindung der B₆-Vitamere an das jeweilige SPE-Material ohne Einflussfaktoren aus der mobilen Phase bestimmt werden. Die Eluate wurden jeweils in ca. 250 µl Fraktionen aufgefangen und mittels HPLC analysiert.

Tab. 21: Retention der B₆-Formen auf Bakerbond C18; C8; Phenyl; Cyano-SPE

Versuchs Nr.	Stationäre Phase	Ergebnis
SPE 1	C18	<ul style="list-style-type: none"> Die B₆-Vitamere wurden bereits nach Elution mit 500 µl Aqua bidest. im Eluat detektiert Nach Elution mit ca. 2000 µl Aqua bidest. waren keine B₆-Vitamere mehr im Eluat nachweisbar Die phosphorylierten Formen wurden früher eluiert als die nicht-phosphorylierten B₆-Vitamere 4-PA wurde stärker retiniert und erst nach Elution mit 1500 µl Aqua bidest. eluiert Im Eluat mit Methanol wurden keine B₆-Formen mehr detektiert
	C8	<ul style="list-style-type: none"> Beginn der Elution aller B₆-Formen nach 500 µl Aqua bidest. Nach Elution mit ca. 1250 µl Aqua bidest. waren keine B₆-Formen im Eluat mehr nachweisbar Kein messbarer Unterschied in der Retentionszeit der einzelnen B₆-Formen im Vergleich zur C18 Säule Im Eluat mit Methanol wurden keine B₆-Formen mehr nachgewiesen
	Phenyl	<ul style="list-style-type: none"> Erst nach 1000 µl Wasser wurden einige B₆-Formen eluiert, insbesondere phosphorylierte B₆-Vitamere und 4-PA Elution aller B₆-Formen in geringer Konzentration auch nach Elution mit 4000 µl Aqua bidest. Im Eluat mit Methanol wurden keine B₆-Formen mehr detektiert
	Cyano	<ul style="list-style-type: none"> Alle B₆-Vitamere wurden in der ersten Fraktion detektiert Nach Elution mit 1000 µl Wasser waren die B₆-Vitamere vollständig eluiert 4-PA wurde etwas länger retiniert und war erst nach 2000 µl komplett eluiert

Tab. 22: Retention der B₆-Formen auf Bakerbond H₂O Philic SPE

Versuchs Nr.	Stationäre Phase	Ergebnis
SPE 2	H ₂ O Philic	<ul style="list-style-type: none"> • Beginn der Elution der B₆-Formen bereits nach Spülung mit 500 µl Wasser • Nach Elution mit 1000 µl waren die B₆-Vitamere vollständig eluiert • Kaum Retention der B₆-Vitamere auf dem Material

In Tabelle 23 sind die Retentionseigenschaften der B₆-Formen auf Strata X Material gezeigt. Die Strata X Säule besteht aus einem oberflächenmodifizierten Styrol-Divinylbenzol-Polymer, welches eine gleichzeitige Extraktion von polaren und unpolaren Analyten ermöglicht.

Tab. 23: Retention der B₆-Formen auf Strata X SPE

Versuchs Nr.	Stationäre Phase	Ergebnis
SPE 3	Strata X	<ul style="list-style-type: none"> • Nahezu komplette Elution der B₆-Formen, insbesondere der nicht-phosphorylierten Formen, bereits in der ersten aufgefangenen Fraktion • Insgesamt sehr schlechte Retention der B₆-Vitamere

Die Auswirkungen einer Erhöhung der Ionenstärke in der aufgetragenen Probenlösung auf die Retention der B₆-Vitamere auf den Phasen C8 und C18 ist in Tabelle 24 aufgeführt.

Tab. 24: Retention der B₆-Formen auf C8 SPE nach Erhöhung der Ionenstärke

Versuchs Nr.	Stationäre Phase	Ergebnis
SPE 4	C8 C18	<ul style="list-style-type: none"> • Elution der B₆-Vitamere bereits mit Aqua bidest. • Keine Veränderung der Retentionszeit durch Erhöhung der Ionenstärke, Vergleiche Versuch SPE 1 • Vollständige Elution mit Acetonitril

Nachfolgend wird der Einfluss der Ionenpaar-Reagenzien Oktansulfonat und Triethylamin auf die Retention der Vitamin-B₆-Formen an verschiedenen SPE-Materialien dokumentiert. Die Versuche wurden mit Aqua bidest. sowie mobilen Phasen mit steigender Konzentration von Oktansulfonat durchgeführt (Tab. 25 und 26).

Tab. 25: Elutionsreihe mit Ionenpaar-Reagenzien auf C8 und C18 SPE

Versuchs Nr.	Stationäre Phase	Ergebnis
SPE 5	C8 C18	<p><u>Mobile Phase 1</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Alle B₆-Formen wurden nahezu vollständig nach 600 µl eluiert <p><u>Mobile Phase 2</u></p> <ul style="list-style-type: none"> B₆-Vitameren wurden länger retardiert und erst nach 900 µl vollständig eluiert Der Beginn der B₆-Vitamerelution ließ sich durch Ionenpaar-Reagenzien kaum verzögern mit Ausnahme von 4-PA, das deutlich länger retiniert und nach 1500 µl detektiert Vollständige Elution von 4-PA erst mit Acetonitril <p><u>Mobile Phase 3</u></p> <ul style="list-style-type: none"> B₆-Formen werden durch die Erhöhung des Oktansulfonats etwas länger retiniert als mit der mobilen Phase 2 <p>Hier jedoch ebenfalls keine Verzögerung des Elutionsbeginns der B₆-Formen</p> <p><u>Mobile Phase 4</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Keine Verlängerung der Retentionszeiten im Vergleich zur mobilen Phase 3

Tab. 26: Elutionsreihe mit Ionenpaar-Reagenzien auf Phenyl SPE

Versuchs Nr.	Stationäre Phase	Ergebnis
SPE 6	Phenyl	<p><u>Mobile Phase 1</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Wiederfindung aller B₆-Vitameren in geringer Konzentration nach Elution mit 500 µl Aqua bidest. Keine weitere Elution der B₆-Formen nach zusätzlichem Spülen mit Aqua bidest. Erneute Elution der B₆-Vitameren von der SPE-Säule nach Spülung mit Acetonitril Jedoch keine vollständige Elution mit Acetonitril möglich <p><u>Mobile Phase 2</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Keine unterschiedliche Retention der B₆-Vitameren durch Oktansulfonat <p><u>Mobile Phase 3</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Diskret frühere Ablösung der nicht phosphorylierten B₆-Formen <p><u>Mobile Phase 4</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Bessere Lösung der nicht phosphorylierten B₆-Formen in 2. Fraktion durch hohe Oktansulfonatkonzentration (10 mmol/l);

Tab. 27: Elution der B₆-Vitameren mit Methanol und Acetonitril auf Phenyl SPE

Versuchs Nr.	Stationäre Phase	Ergebnis
SPE 7	Phenyl	<ul style="list-style-type: none"> B₆-Formen sind in jedem Elutionsschritt mit Aqua bidest. in minimaler Konzentration zu finden Eine komplette Elution der B₆-Vitameren von der SPE-Säule ist auch mit sechs Waschschritten (6x300 µl Methanol) nicht möglich Acetonitril als organisches Lösungsmittel anstatt Methanol bringt keine bessere Lösung der B₆-Formen von der Phenyl SPE-Säule Trotz 9x300 µl Elutionsschritten gelingt die Elution der B₆-Formen von der Vorsäule nicht

In den folgenden Versuchen wurde die Elutionskraft der organischen Lösungsmittel Methanol und Acetonitril auf der Phenyl-Phase verglichen. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 28-31 dargestellt.

Tab. 28: Elution der B₆-Formen mit verschiedenen Lösungsmitteln auf Phenyl SPE nach Ansäuern der Probe

Versuchs Nr.	Stationäre Phase	Ergebnis
SPE 8	Phenyl	<ul style="list-style-type: none"> Durch die Elution mit Aqua bidest. wird ein minimaler Anteil aller B₆-Formen in jeder Fraktion detektiert Durch Elution mit Methanol oder Acetonitril werden die B₆-Formen nicht von der SPE-Säule eluiert Toluol ermöglicht eine geringe Elution der auf der SPE-Säule gebundenen B₆-Formen Eine Elution mit Methanol+Triethylamin ermöglicht ebenfalls eine geringe Elution der B₆-Formen, insbesondere der nicht-phosphorylierten Formen sowie der 4-PA → Annahme, dass mehr als 80% der aufgetragenen B₆-Vitamine noch auf der Säule gebunden sind Trotz sehr potenter Eluenten ist ein großer Anteil der B₆-Formen nicht von der SPE-Säule zu eluieren

Tab. 29: Elution der B₆-Formen mit verschiedenen Lösungsmitteln auf C18 SPE

Versuchs Nr.	Stationäre Phase	Ergebnis
SPE 9	C18	<ul style="list-style-type: none"> Analog dem Versuch „SPE 1“ werden die B₆-Formen nach Elution mit 500 µl Aqua bidest. von der SPE-Säule gespült Nach Elution mit 1500 µl Aqua bidest. sind im Eluat alle B₆-Formen nur noch in geringen Konzentrationen zu finden Lösung des größten Anteils der B₆-Formen von der Säule mit reinen Aqua bidest. Spülschritten Mit den organischen Lösungsmitteln ist eine Elution der verbleibenden B₆-Formen möglich. Hierbei haben Acetonitril und Toluol die größte Elutionskraft. Methanol und Propanol können nicht die verbleibenden B₆-Formen in einem Elutionsschritt mit 500 µl eluieren Die Elutionsstärke von Methanol/Triethylamin ist der von Methanol allein nicht überlegen

Tab. 30: Elutionsreihe 1 der B₆-Formen mit verschiedenen Lösungsmitteln auf Phenyl SPE

Versuchs Nr.	Stationäre Phase	Ergebnis
SPE 10	Phenyl	<ul style="list-style-type: none"> Minimale Elution der phosphorylierten B₆-Vitamine mit Aqua bidest. nach 1000 µl, ansonsten keine Elution der B₆-Formen mit Aqua bidest. (siehe Versuch „SPE 1“) Elution geringer Mengen aller B₆-Vitamine mit Toluol und Acetonitril Elution der 4-PA nur mittels Toluol möglich Keine Elution der B₆-Formen mit Methanol möglich Keine vollständige Elution der B₆-Formen in wenigen Elutionsschritten mit den erprobten organischen Lösungsmitteln möglich

Tab. 31: Elutionsreihe 2 der B₆-Formen mit verschiedenen Lösungen auf Phenyl SPE

Versuchs Nr.	Stationäre Phase	Ergebnis
SPE 11	Phenyl	<ul style="list-style-type: none"> • geringe Elution der Vitamere über alle Fraktionen • keine komplette Elution von der Vorsäule • Retention auf der Vorsäule wird durch die Essigsäure verstärkt • etwas bessere Lösung der B₆-Vitamere als bei reiner Methanol Elution • verhältnismäßig gute Lösung der Vitamere von der Vorsäule • TEA antagonisiert den Effekt der Essigsäure → verstärkte Elution als bei reinem Methanol • verhältnismäßig gute Lösung der Vitamere von der Vorsäule

Zusammenfassend erlaubte keine der untersuchten SPE-Säulen und keine der getesteten Elutionslösungen eine zufriedenstellende manuelle Festphasenextraktion aller B₆-Formen.

3.1.1.2 Inline-Festphasenextraktion

Bei der HPLC-integrierten Festphasenextraktion erfolgt die Probenaufarbeitung durch die „Inline“-Schaltung einer geeigneten Extraktionssäule vor der analytischen HPLC-Säule. Proteine und andere Matrixbestandteile sollen von der Vorsäule gespült und verworfen werden, bevor die B₆-Formen von der Vorsäule auf die analytische Säule transferiert werden. Um die erforderliche Schaltzeit für diesen Fraktionierungs- und Transferschritt zu erfassen, wurde zunächst die Vorsäule direkt an den UV-Detektor gekoppelt. Nach Injektion der Probe wurde das Elutionsprofil der Probenmatrix registriert. Anschließend wurde auch das Elutionsprofil des Analyten durch direkte Kopplung an den UV-Detektor analysiert. Die Elution des Analyten erfolgte hierbei mit der für die Matrixelution verwendeten mobilen Phase und Flussrate (Kap. 2.2.1.3). Zielsetzung war es, die B₆-Vitamere so lange an der Vorsäule adsorbiert zu halten, bis die Elution der Probenmatrix sicher abgeschlossen ist (Abb. 11).

Die Elutionszeiten der Serumproteine sowie die Retentionszeiten der B₆-Vitamere wurden zunächst auf einer RP 18 ADS Säule ermittelt. Wie in Abbildung 12 dargestellt, dauert die vollständige Elution der Probenmatrix (t_M) ca. 2,3 Min. Die Elution der B₆-Formen (t_A) beginnt bei etwa 0,2 Min und ist nach ca. 5 Min abgeschlossen (Abb. 13), d.h. die Bedingungen für eine effiziente Inline-Extraktion wurden nicht erfüllt. RP 4 und RP 8 ADS Vorsäulen wurden ebenfalls erprobt. Auch mit diesen Säulen ließ sich unter den geschilderten experimentellen Bedingungen keine effektive Inline-Extraktion aller B₆-Formen erzielen.

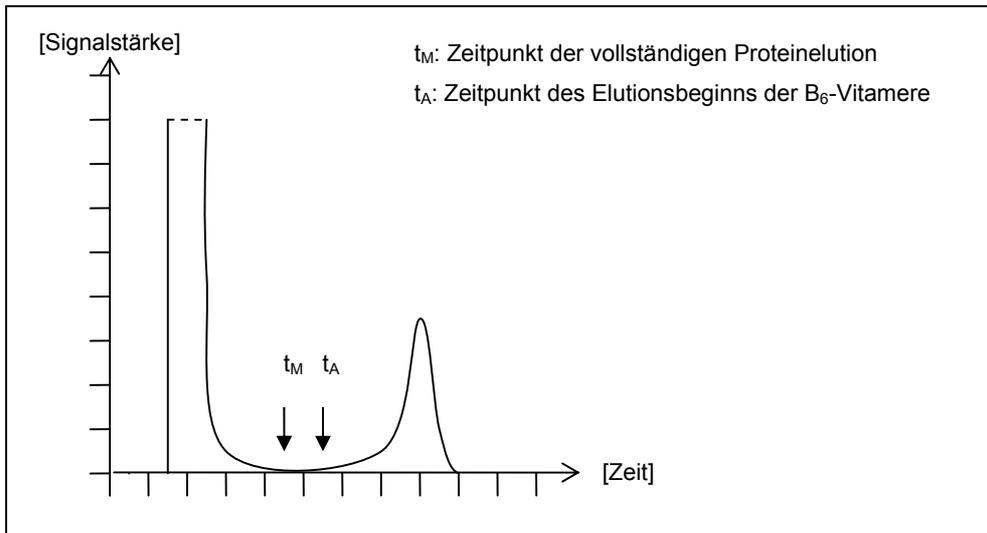


Abb. 11: Voraussetzung für eine Ventilschaltung bei Online-Probenaufarbeitung ($t_M < t_A$)

Zusätzlich zur Erprobung verschiedener Festphasen wurden auch die Pufferbedingungen systematisch mit dem Ziel variiert, die B₆-Formen mindestens bis zur abgeschlossenen Elution der Probenmatrix (d.h. für mindestens 2,3 Min, siehe Abb. 12) auf der Vorsäule zu retinieren. Hierzu wurden Ionenpaar-Reagenzien - insbesondere Oktansulfonat - zur Verlängerung der Retentionszeiten eingesetzt. Die Oktansulfonat-Konzentration in der Pufferlösung wurde dabei stufenweise erhöht (Tab. 32; Abb. 14, S. 45). Wesentliche Ergebnisse der Versuchsreihen sind in den nachfolgenden Tabellen wiedergegeben (Tab. 32-34, S. 45). Wie dort zu sehen ist, ließ sich trotz Variation des Puffers die notwendige vollständige Abtrennung der Proteine vor Elution der B₆-Formen ($t_A > t_M$) nicht erreichen.

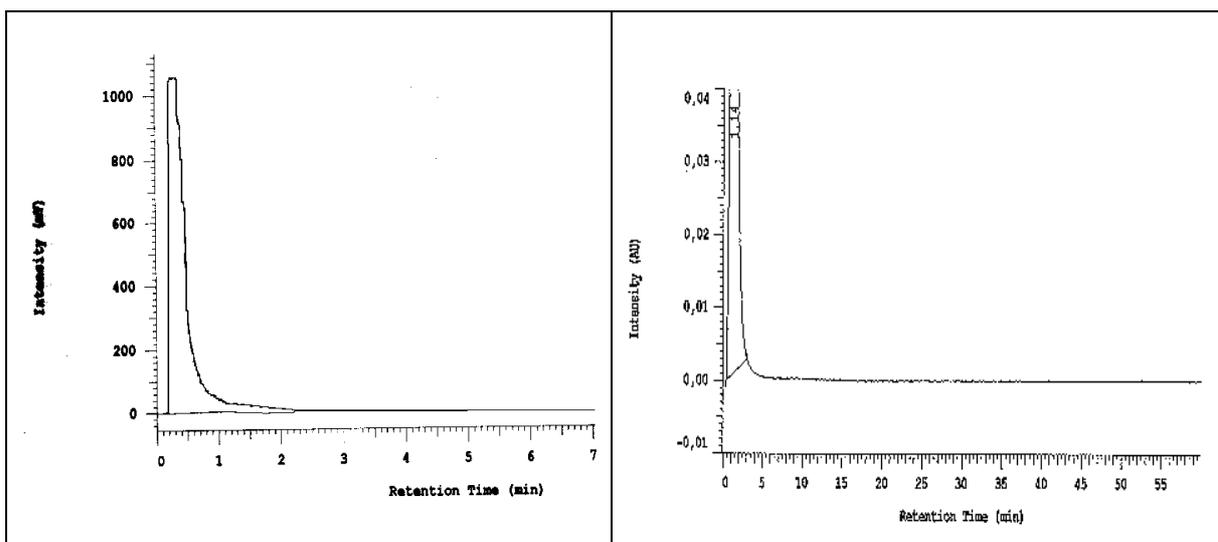


Abb. 12: Retention der Probenmatrix (u.a. Serumproteine) auf der RP-ADS 18 Inline-Säule (Zeitskalierung in 1-Min-Schritten)

Abb. 13: Retention der B₆-Vitamere auf der RP-ADS 18 Inline-Säule (Zeitskalierung in 5-Min-Schritten)

Tab. 32: Änderung der Retentionszeit auf ADS C18 Säule durch zunehmende Konzentration von Oktansulfonat

Versuchsdurchführung	Puffer Vorsäule	Ergebnis
<ul style="list-style-type: none"> Standard 5 im Verhältnis 1:1 mit Puffer 1, 2 und 3 gemischt Injektion 100 µl auf ADS Säule ohne nachgeschaltete analytische Trennsäule Direkte Registrierung der Elutionszeit der B₆-Vitamere von der ADS Vorsäule 	PUFFER 1: 25 mmol/l KH ₂ PO ₄ ; pH 2,5 mit HCL; <u>Oktansulfonat 1,0 mmol/l</u>	<ul style="list-style-type: none"> Die Elution der B₆-Vitamere erfolgt vollständig zwischen 1-7 min Die steigende Konzentration von Oktansulfonat brachte keine nennenswerte Änderung des Elutionsbeginns
	PUFFER 2: 25 mmol/l KH ₂ PO ₄ ; pH 2,5 mit HCL; <u>Oktansulfonat 5,0 mmol/l</u>	
	PUFFER 3: 25 mmol/l KH ₂ PO ₄ ; pH 2,5 mit HCL; <u>Oktansulfonat 10,0 mmol/l</u>	

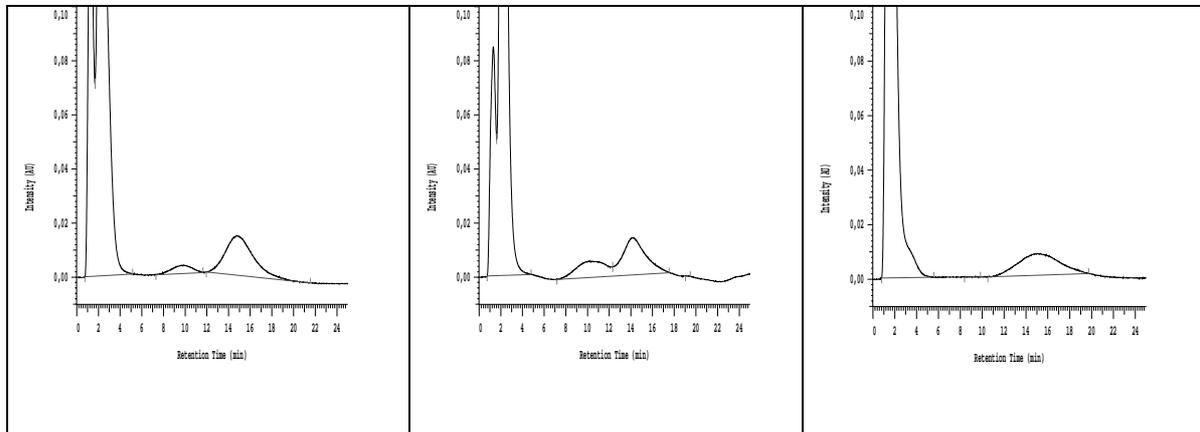


Abb.14: Änderung der Retentionszeit auf ADS C18 Säule durch zunehmende Konzentration von Oktansulfonat

Tab. 33: Vergleich der Retentionszeit auf ADS C8 Säule mit und ohne Oktansulfonat

Versuchsdurchführung	Puffer Vorsäule	Ergebnis
<ul style="list-style-type: none"> Standard 5 im Verhältnis 1:1 mit Aqua bidest. oder Puffer gemischt Injektion 100 µl auf ADS Säule ohne nachgeschaltete analytische Trennsäule Direkte Registrierung der Elutionszeit der B₆-Vitamere von der ADS Vorsäule 	Aqua bidest.	<ul style="list-style-type: none"> B₆-Vitamere werden unabhängig von Ionenpaar-Reagenzien zwischen 1-5 Min eluiert Retentionszeit nach Elution der B₆-Vitamere auf ADS Säule mit Aqua bidest. oder Puffer fast identisch
	PUFFER: 25 mmol/l KH ₂ PO ₄ ; pH 2,5 mit HCL; <u>Oktansulfonat 10,0 mmol/l</u>	

Tab. 34: Retentionszeit auf ADS C4 Säule mit Oktansulfonat

Versuchsdurchführung	Puffer Vorsäule	Ergebnis
<ul style="list-style-type: none"> Standard 5 im Verhältnis 1:1 mit Puffer gemischt Injektion 100 µl auf ADS Säule ohne nachgeschaltete analytische Trennsäule Direkte Registrierung der Elutionszeit der B₆-Vitamere von der ADS Vorsäule 	PUFFER: 25 mmol/l KH ₂ PO ₄ ; pH 2,5 mit HCL; <u>Oktansulfonat 10,0 mmol/l</u>	<ul style="list-style-type: none"> B₆-Vitamere werden ebenfalls beginnend mit der 1. Min eluiert Identische Elution zur C8 Vorsäule

3.1.1.3 Eiweißpräzipitation

Zur Enteiweißung der Serumproben wurde neben der klassischen Säurefällung der Einsatz von Alkohol erprobt. Ziel war es, nach der Aufarbeitung ein Probenmilieu zu erreichen, das dem des HPLC-Puffers hinsichtlich der Ionenstärke und des pH möglichst nahe kommt. Ausgangspunkt der Untersuchungen war die Publikation von Kimura et al (Kap. 3.1), nach der die Ausfällung der Serumproteine mittels Perchlorsäure erfolgt. Entsprechend wurden 200 µl Serum mit 200 µl 1 mol/l kalter Perchlorsäure versetzt. Dabei kam es infolge der Denaturierung der Serumproteine zu einer deutlichen Trübung. Die Probe wurde kräftig mit dem Vortexer gemischt und 10 Minuten bei 20800 g zentrifugiert. Zur Neutralisierung der überschüssigen Perchlorsäure wurden - in Ergänzung zur Kimura-Methode - 300 µl Überstand abpipettiert und mit 30 µl K_2HPO_4 (2 mol/l) versetzt. Die Probe wurde erneut gemischt, 15 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 20800 g zentrifugiert. Der erhaltene klare Überstand wurde für die weitere Analyse in Eppendorfgefäße pipettiert und lichtgeschützt und gekühlt aufbewahrt. Abbildung 15 fasst die Teilschritte der modifizierten Probenaufarbeitung zusammen.

200 µl	Standard / Kontrolle / Probe	+	Interner Standard mit 1 mol/l kalter Perchlorsäure verdünnt (1:10)
- mischen, zentrifugieren 10 Min bei 20800 g			
300 µl	Überstand	+	30 µl K_2HPO_4 (2 mol/l)
- mischen, anschließend 15 Min im Dunkeln inkubieren			
- 10 Min bei 20800 g zentrifugieren			
- den Überstand abpipettieren in Eppendorfgefäß			
- 100 µl injizieren			

Abb. 15: Modifizierte Probenaufarbeitung

Die Auswirkungen der modifizierten Probenaufarbeitung auf die Auftrennung von Vitamin B₆-Standards mittels HPLC-Analytik zeigen die Abbildungen 16 und 17 (S. 47). Im Vergleich zur direkten Auftrennung der wässrigen Standards (Abb. 16) kommt es nach Probenvorbereitung zu deutlichen Änderungen der Retentionszeiten und zu deformierten Peaks einzelner B₆-Formen (Abb. 17).

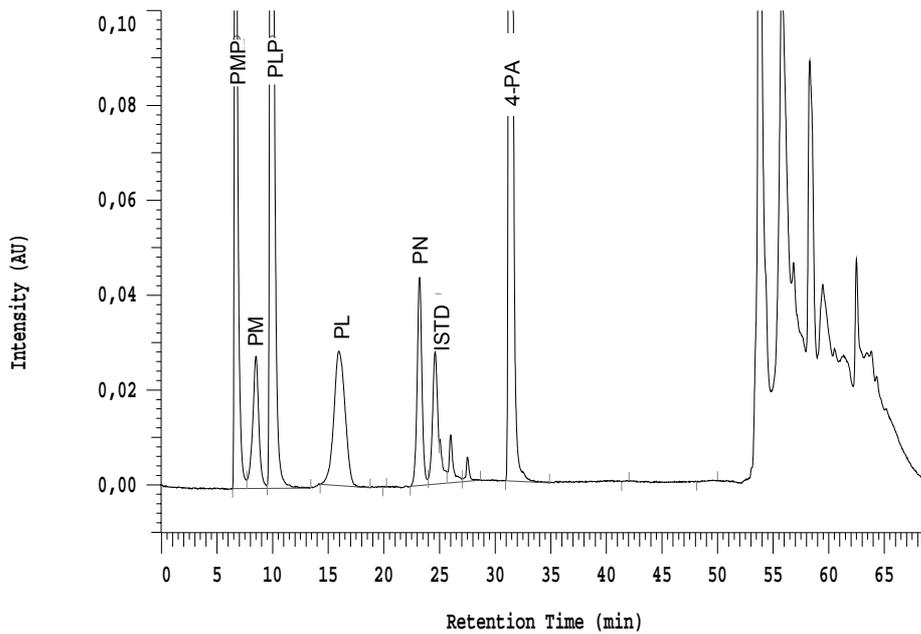


Abb. 16: Auftrennung von chemisch reinen Standards ohne Probenaufarbeitung
Säule: Synergi Hydro RP18 (250 cm); Puffer: 50 mmol/l KH_2PO_4 ; 1,0 mol/l TEA; pH 2,5

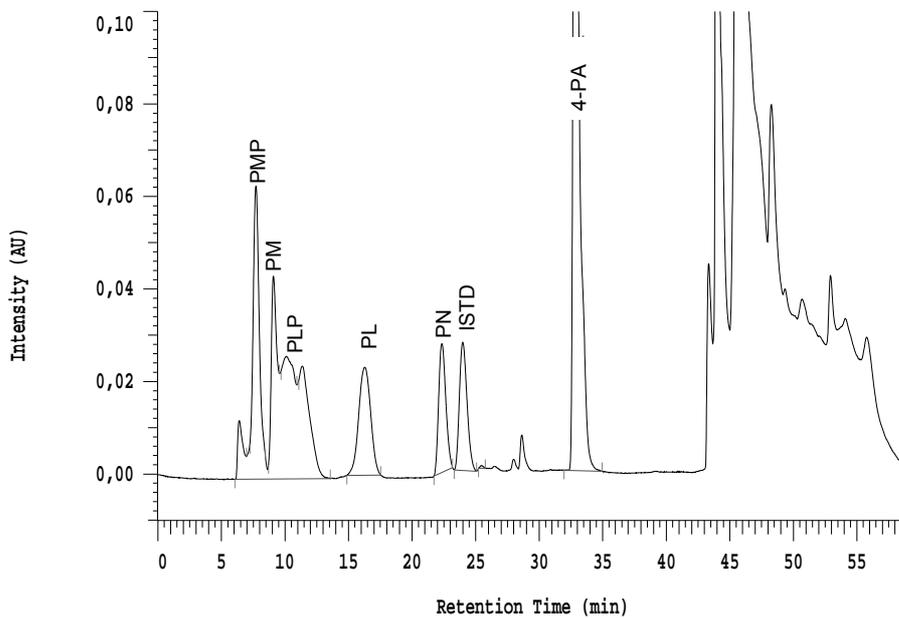


Abb. 17: Auftrennung von chemisch reinen Standards mit Probenaufarbeitung
Säule: Synergi Hydro RP18 (250 cm); Puffer: 50 mmol/l KH_2PO_4 ; 1,0 mol/l TEA; pH 2,5

Der Ersatz der Perchlorsäure durch Metaphosphorsäure zur Proteinpäzipitation führte zu ähnlichen Ergebnissen, wobei Veränderungen der Basislinie oder Verzerrungen der Peakformen (,fronting' oder ,tailing') seltener auftraten.

Beim Einsatz von Alkohol zur Reduzierung der Ionenstärke bei der Säurefällung kam es zu einer deutlich unruhigeren Basislinie, die die Auswertung der in besonders niedriger Konzentration vorkommenden B₆-Vitamere unmöglich machte. Aus diesem Grund wurde auf weitere Versuche zur Proteindenaturierung mittels Alkohol verzichtet.

3.1.2 Optimierung der HPLC-Analytik

Die Versuche zur Verbesserung der chromatographischen Auftrennung der B₆-Vitamere erfolgten in verschiedenen Schritten. Zunächst galt es, geeignete stationäre Phasen ausfindig zu machen. Auf diesen erfolgte sodann eine systematische Erprobung von unterschiedlicher mobilen Phasen und deren Auswirkungen auf die Retention der B₆-Vitamere. Um das Bindungsverhalten der B₆-Formen nachzuvollziehen und Störfaktoren möglichst zu unterdrücken, wurde zunächst mit Lösungen chemisch reiner Standards der B₆-Formen experimentiert. Aufbauend auf den gewonnenen Erkenntnissen sollten dann Matrixeffekte und Störfaktoren, die bei der Untersuchung von Serumproben auftreten können, analysiert und gegebenenfalls korrigiert werden. Dies sind z.B. Peak-Überlagerungen durch weitere Serumkomponenten oder Veränderungen des chromatographischen Laufs, die sich durch Änderungen von pH und Ionenstärke im Rahmen der Probenaufarbeitung ergeben. Weiterhin sollten Parameter, welche einen Einfluss auf die Auftrennung und die Detektion haben können (Temperatur, Fließmittelzusammensetzung, Druck, Anregungs- und Emissionswellenlänge bei der Fluoreszenzdetektion), optimiert werden.

3.1.2.1 Stationäre Phase

3.1.2.1.1 Auswahl geeigneter Phasen

Die Auswahl der HPLC-Säulen (Kap. 2.1.5) beruhte auf zwei Aspekten. Grundlage war zum einen eine Analyse der in der neueren Literatur beschriebenen Methoden. Einen Überblick der dort benutzten Säulenmaterialien gibt Tabelle 40 (S. 77); wie der Auflistung zu entnehmen ist, handelt es sich größtenteils um Umkehrphasenmaterialien in Form von C18-Phasen auf Silica-Basis. Zum anderen wurden für die Auswahl Ergebnisse aus den Festphasen-Extraktionsversuchen verwertet. Dabei hatte sich die Phenyl-Phase als potent zur Retention der B₆-Vitamere erwiesen (Kap. 3.1.1.1).

3.1.2.1.2 Erprobung analytischer Trennsäulen

Nachfolgend ist eine Auswahl an Chromatogrammen der mit jeweils gleichem Puffer getesteten HPLC-Säulen aufgeführt. Hierbei wird die zum Teil stark unterschiedliche Trennleistung der verschiedenen Säulen bei ansonsten gleichen Bedingungen verdeutlicht.

Unter den vereinfachten Bedingungen der Säulenaustestung mit reinen Standardlösungen zeigten die Prontosil- und die Synergi-Hydro-RP-Säule die besten Trennergebnisse der B₆-Vitamere. Deshalb wurden diese Säulen in den folgenden Versuchen besonders intensiv weiter untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 18 bis 23 dargestellt.

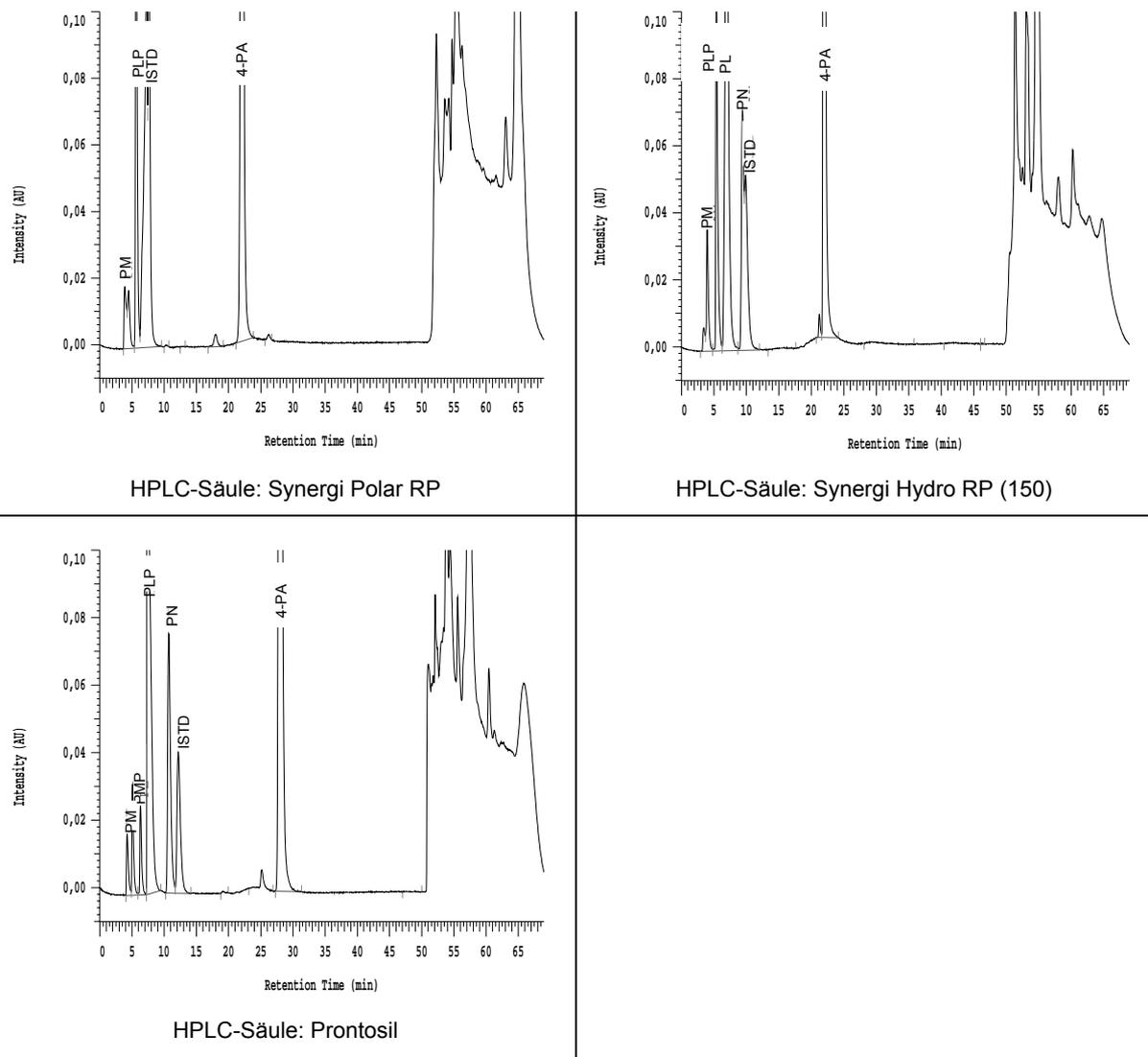
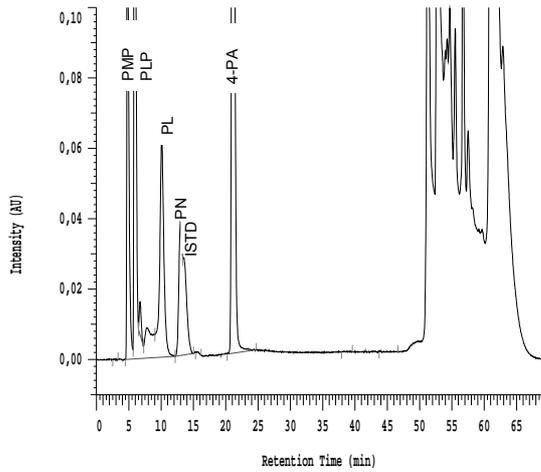
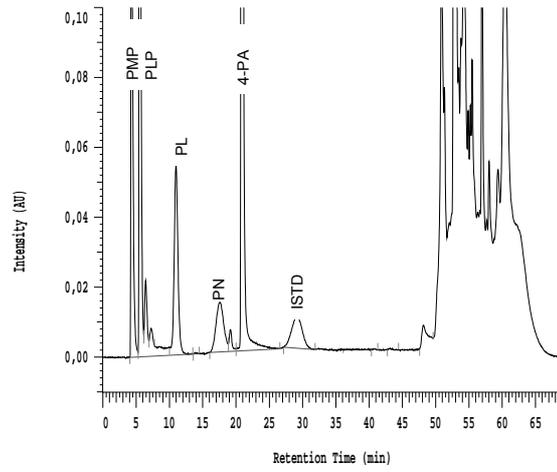


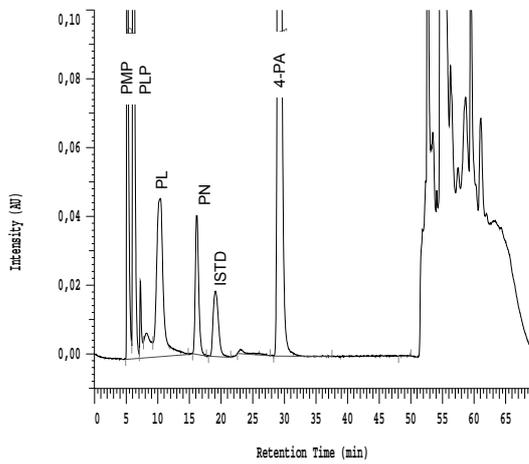
Abb. 18: Säulenvergleich 1 - Puffer: 25mmol KH₂PO₄/ 25mmol/l TEA/ pH 3,0/ Na-Bisulfit 0,5g/l



HPLC-Säule: Synergi Polar RP

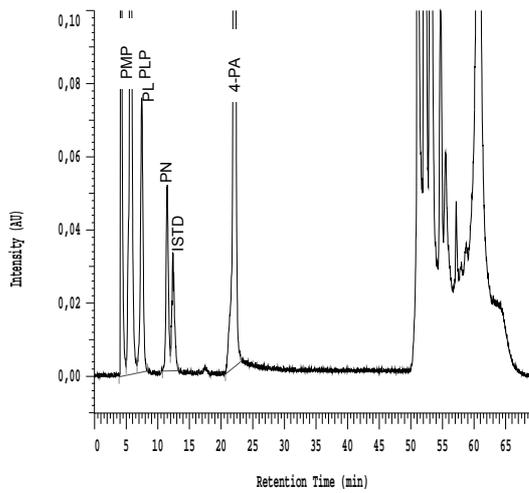


HPLC-Säule: Synergi Hydro RP (150)

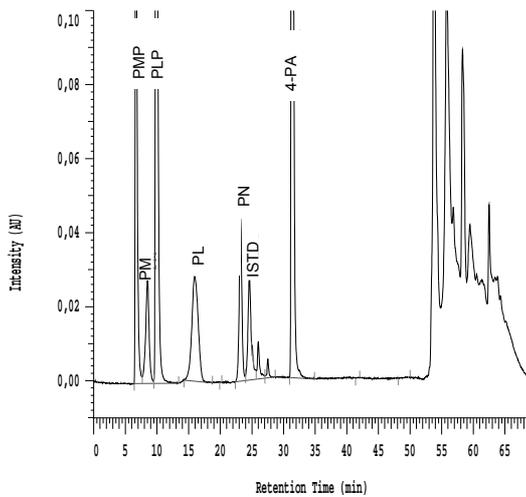


HPLC-Säule: Prontosil

Abb. 19: Säulenvergleich 2 - Puffer: 10mmol/l KH₂PO₄/ 10mmol/l TEA/ Oktan. 2,0mmol/l/ pH 2,5/ Na-Bisulf 0,5g/l

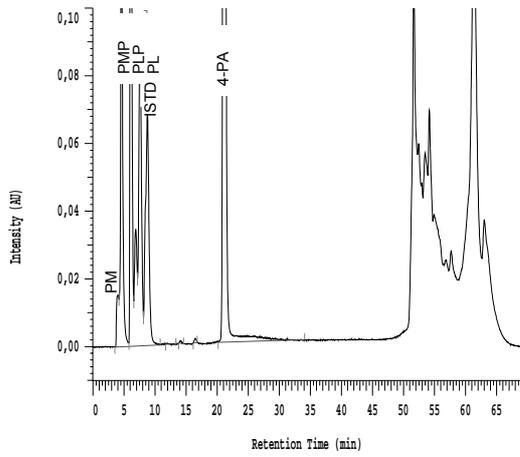


HPLC-Säule: Luna C8

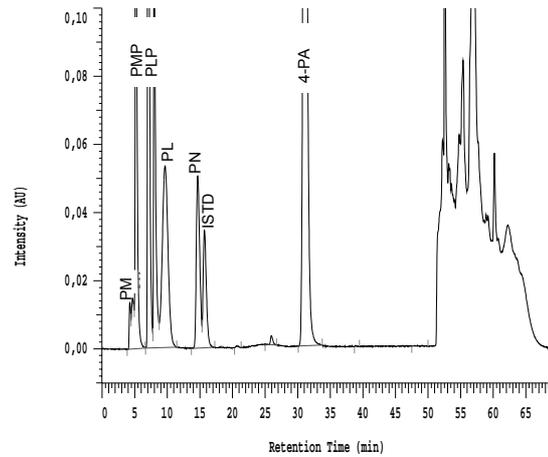


HPLC-Säule: Synergi Hydro RP (250)

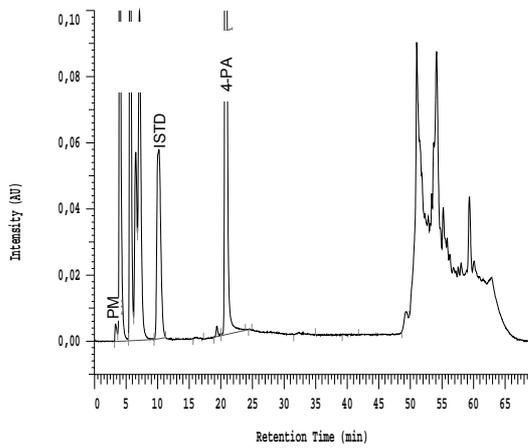
Abb. 20: Säulenvergleich 3 -Puffer: 50mmol/l KH₂PO₄/ 10mmol/l TEA/ Oktan. 0,75mmol/l/ pH 2,5/ Na-Bisulf 0,5g/l



HPLC-Säule: Polar RP

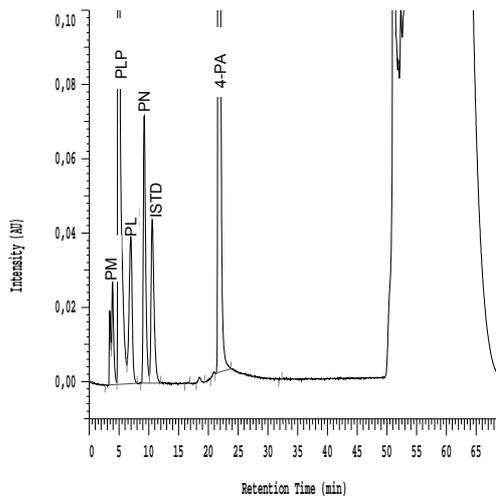


HPLC-Säule: Prontosil

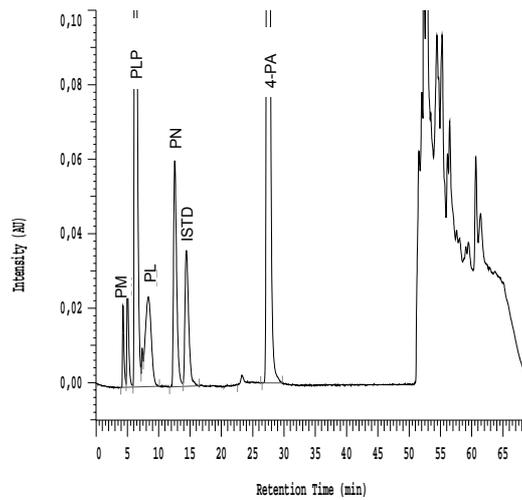


HPLC-Säule: Synergi Hydro RP (150)

Abb. 21: Säulenvergleich 4 - Puffer: 10mmol/l KH₂PO₄/ 10mmol/l TEA/ pH 2,5/ Na-Bisulfid 0,5g/l



HPLC-Säule: Synergi Hydro RP (150)



HPLC-Säule: Prontosil

Abb. 22 Säulenvergleich 5 - Puffer: 25mmol/l KH₂PO₄/ 10mmol/l TEA/ pH 2,5/ Na-Bisulfid 0,5g/l

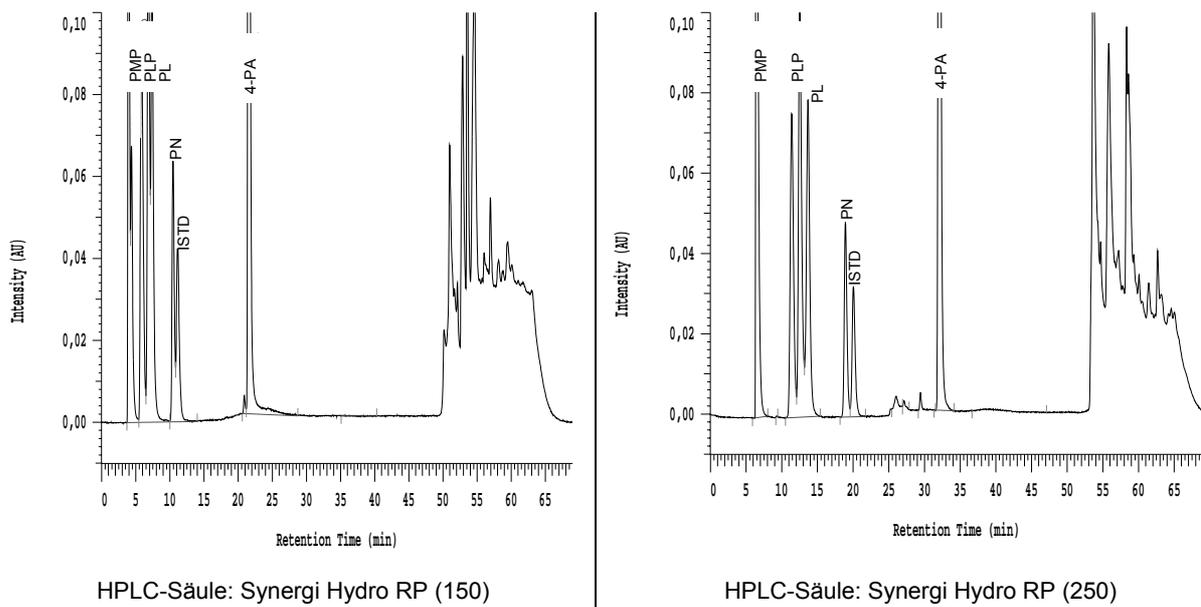


Abb. 23: Säulenvergleich 6 - Puffer: 25mmol/l KH₂PO₄/ 25mmol/l TEA/ 0,5mmol/l Oktan./ pH 2,5/ Na-Bisulfit 0,5g/l

Zur Verbesserung der Auftrennung der einzelnen Vitamere wurde eine längere Version der Synergi-Hydro-RP-Säule (250mm) verwendet (Abb. 23).

3.1.2.2 Mobile Phase

3.1.2.2.1 Einfluss des pH-Werts

Der pH-Wert des Laufmittels, der das Milieu sowohl in der Probe als auch auf der analytischen Trennsäule einstellt, ist für die Retention der B₆-Vitamere an der stationären Phase von großer Bedeutung. Abbildung 24 (S.53) zeigt den Einfluss verschiedener pH-Werte auf die Separierung der B₆-Vitamere an einer ProntoSil C18-Säule; es ist deutlich zu erkennen, dass im sauren Milieu die beste Auftrennung der B₆-Vitamere erreicht wird. Analoge Änderungen des pH-Wertes führten bei den anderen erprobten Säulen zu vergleichbaren Ergebnissen. Deshalb wurde ein niedriger pH-Wert bei den weiteren Optimierungsversuchen beibehalten.

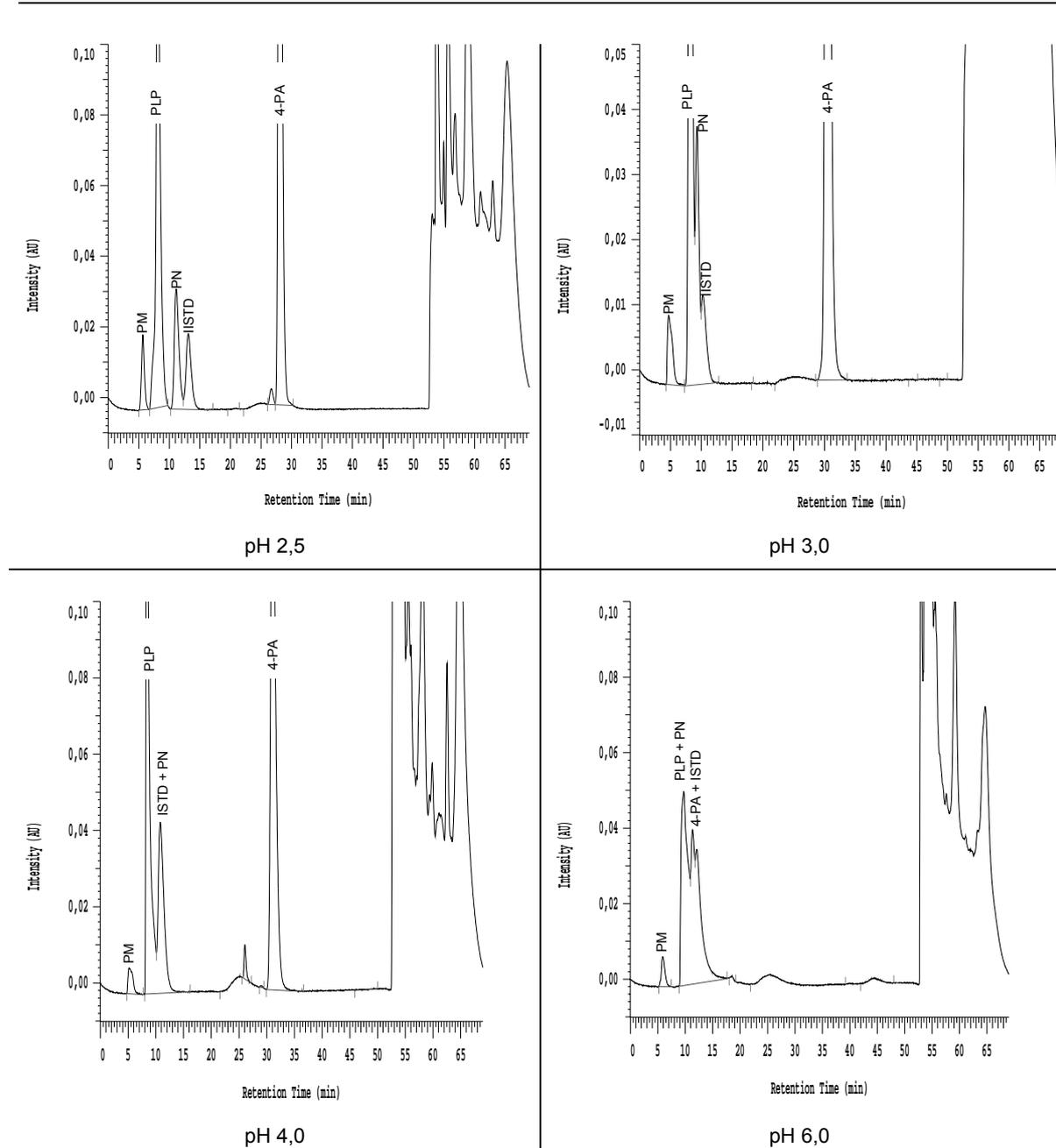


Abb. 24: Einfluss des pH-Wertes auf das Elutionsprofil - Säule: Prontosil / Puffer: 0,02 mmol/l TEA; 0,5 g/l Na-Bisulfit

3.1.2.2.2 Einfluss der Ionenstärke

Die Ionenstärke des Puffers wird maßgeblich durch seine Kaliumdihydrogenphosphat-Konzentration bestimmt. Es zeigte sich, dass durch Erniedrigung der Konzentration bessere Trennungen erzielt werden; außerdem wird das Auskristallisieren von Salzen auf der Säule

vermieden. Bei Kaliumdihydrogenphosphat-Konzentrationen unter 10 mmol/l kam es jedoch, bedingt durch eine Verkürzung der Retentionszeiten, zu einem Zusammenlaufen der nicht-phosphorylierten B₆-Vitamere. Die folgende Abbildung (Abb. 25) zeigt beispielhaft Auswirkungen veränderter Ionenkonzentrationen des Laufmittels auf die Retardierung der B₆-Vitamere an einer Prontosil C18 HPLC-Säule.

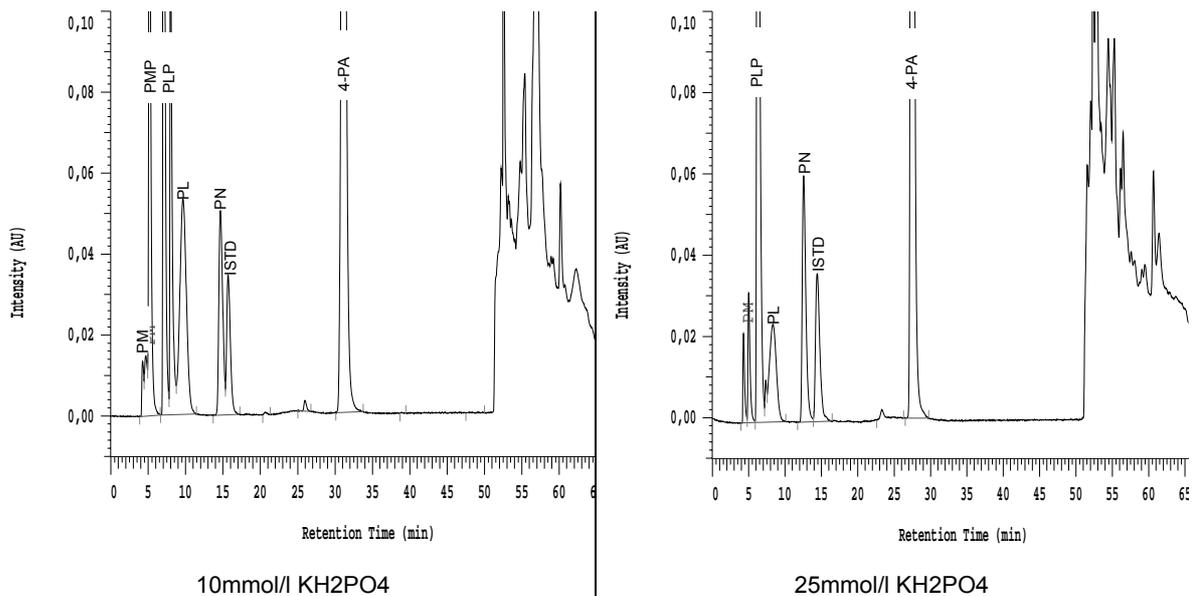


Abb. 25: Einfluss der Ionenstärke - Säule: Prontosil / Puffer: 10mmol/l TEA/ pH 2,5/ Na-Bisulfit 0,5g/l

3.1.2.2.3 Einfluss von Ionenpaar-Reagenzien

Nachfolgend ist der Einfluss der Ionenpaar-Reagenzien Triethylamin und Oktansulfonat auf die Retentionszeiten der B₆-Vitamere exemplarisch am Beispiel der Synergi Hydro RP Säule dargestellt. Abbildung 26 (S. 55) zeigt, dass durch Zusatz von Triethylamin die Retention der polaren B₆-Formen und deren Auftrennung verbessert wurde. Die unpolaren Vitamere PN, PL und der Interne Standard eluierten dagegen wesentlich früher.

Durch Zusatz von Oktansulfonat wurde vor allem eine Verbesserung der Retention der unpolaren B₆-Vitamere erzielt (Abb. 27, S. 55).

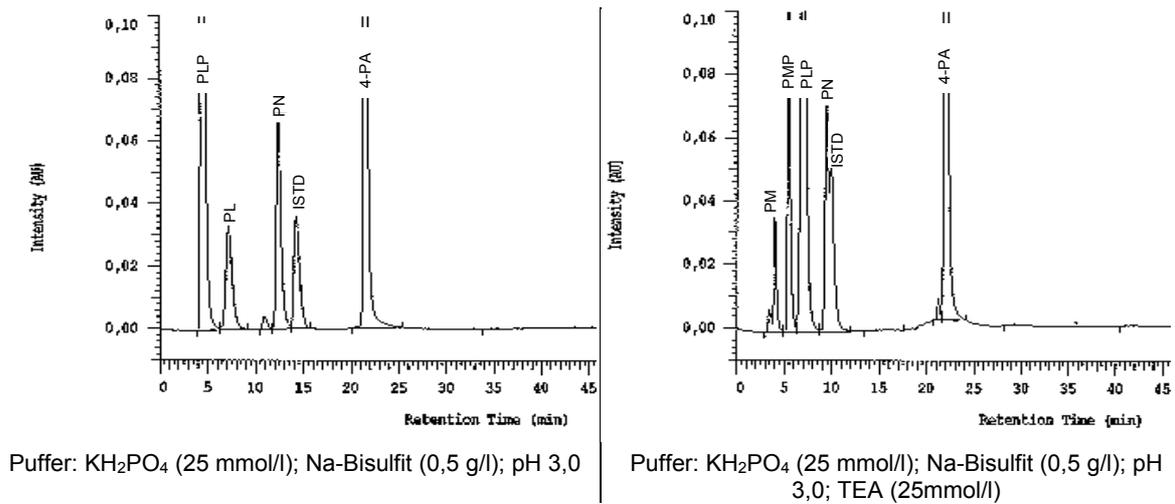


Abb. 26: Einfluss von Triethylamin (TEA) - Säule: Synergi Hydro RP Säule (250)

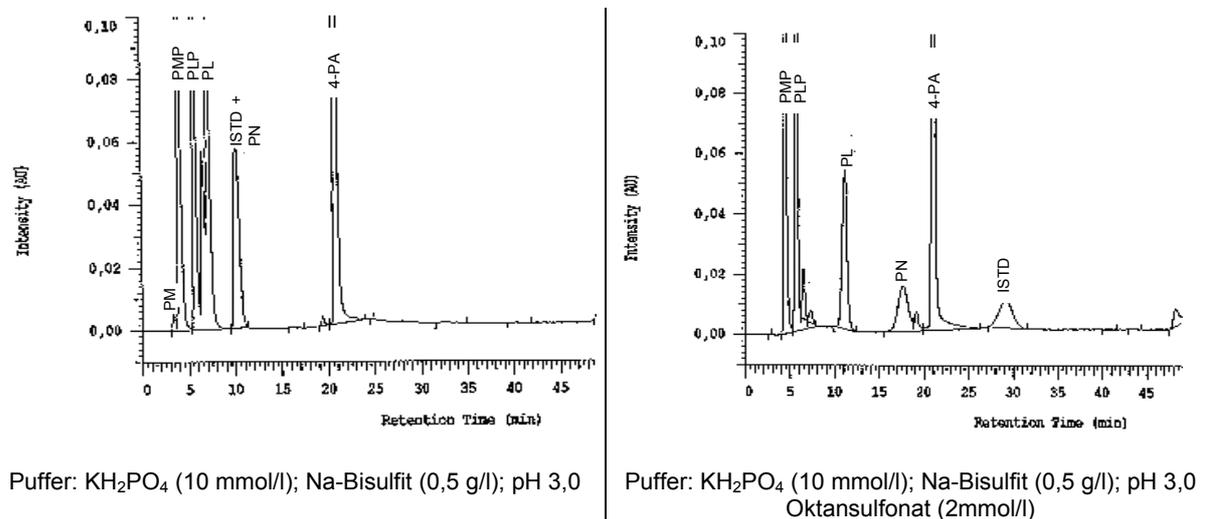


Abb. 27: Einfluss von Oktansulfonat - Säule: Synergi Hydro RP Säule (250)

3.1.2.3 Interner Standard

In einigen Publikationen wird Desoxyipyridoxin als Interner Standard eingesetzt (56,78). In den eigenen Untersuchungen erwies sich das käufliche Präparat aufgrund erheblicher Verunreinigungen (u.a. enthielt es PN) jedoch als ungeeignet. Stattdessen wurde das den B₆-Vitaminen chemisch ähnliche n-Methyldopamin (Abb. 28, S. 56) als Interner Standard erprobt. Dieses ließ sich regelmäßig und zuverlässig detektieren. Die Elution des n-Methyldopamins erfolgte in der zweiten Hälfte des Chromatogramms. Die Elution des Internen Standards in der für die Routinediagnostik entwickelten Methode in Relation zu den B₆-Formen ist in Abbildung 31 (S. 59) dargestellt.

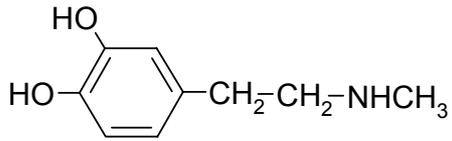


Abb. 28: Interner Standard (n-Methyldopamin)

3.1.2.4 Gradientenelution

Der von Kimura et al beschriebenen Methode liegt eine isokratische Elution zugrunde (45).

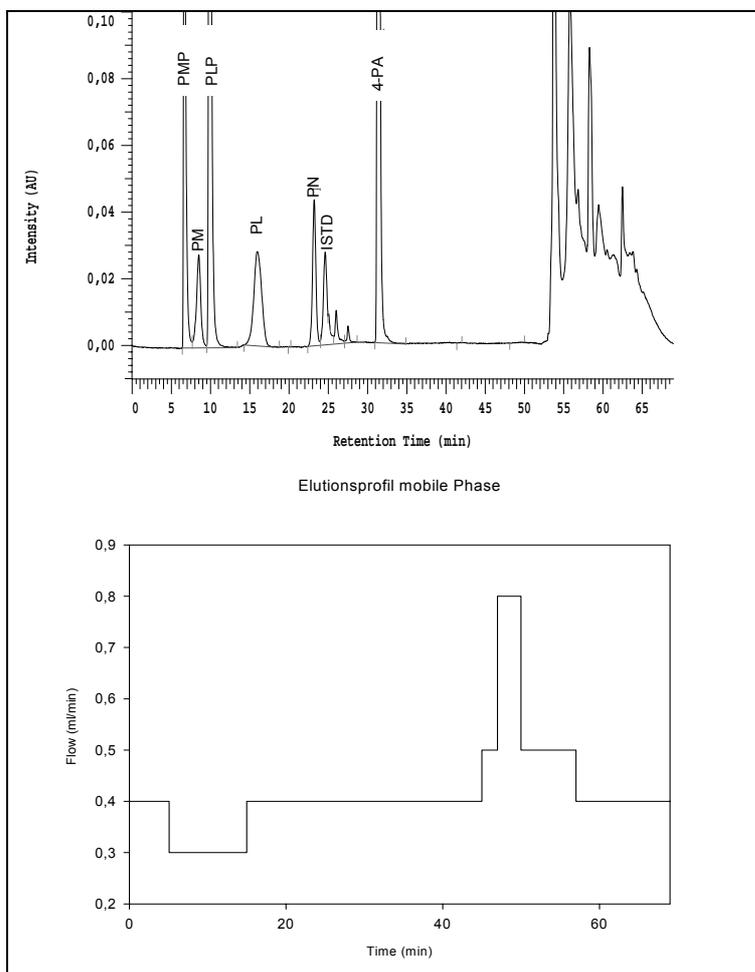


Abb. 29: Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase über den chromatographischen Lauf

Im Hinblick auf die Komplexität der Vitamin-B₆-Analytik wurde in der eigenen Arbeit als Elutionsprofil eine Gradientenelution gewählt. Auf diese Weise konnte die Fließmittelzusammensetzung sowie die Flussgeschwindigkeit (Abb. 29) an die jeweiligen chromatographischen Erfordernisse angepasst werden. Bei den sich ähnelnden B₆-Formen konnte dadurch ein Beitrag zur besseren Peakabtrennung erzielt werden. Die Analysezeit zwischen stark differierenden Substanzen wurde hingegen verkürzt, sodass sich die Gesamtzeit der Analyse reduzierte.

3.1.2.5 Fluoreszenzdetektion

Zur Ermittlung der optimalen Wellenlänge bei der Fluoreszenzdetektion der B₆-Formen wurde anhand von Standard 5 sowie von nativem Serum mit hohen Konzentrationen der B₆-Vitamere nach dem intensivsten Fluoreszenzsignal gesucht (methodische Details siehe Kap. 2.2.2.2.4). Dabei stellte sich für die Anregung eine Wellenlänge von 290 nm als günstig heraus, die optimale Emissionswellenlänge betrug 400 nm (Abb. 30).

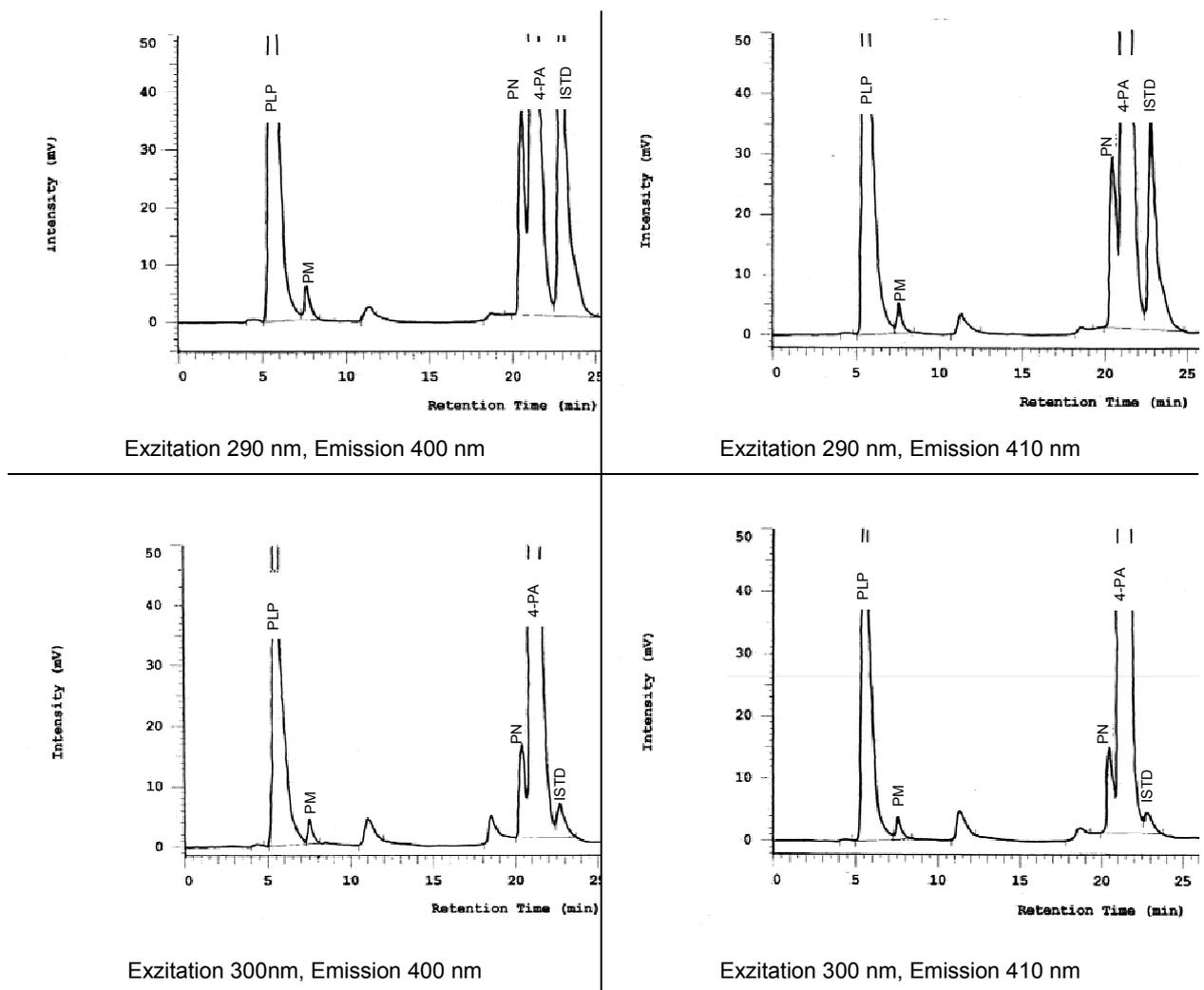


Abb. 30: Exemplarische Ergebnisse der Optimierungsversuche zur Fluoreszenzdetektion der B₆-Vitamere

3.1.2.6 Säulentemperatur

Um die Reproduzierbarkeit der chromatographischen Trennung zu verbessern, wurde der Effekt der Temperatur zwischen 15°C und 35°C untersucht. Bei Temperaturen >30°C wurde

eine signifikante Abnahme der Retentionszeiten der nicht phosphorylierten B₆-Vitamere beobachtet, die zu einer Überlagerung dieser Fraktionen durch andere Serumkomponenten führte. Das Absenken der Säulentemperatur hatte dagegen kaum Auswirkungen auf das Chromatogramm. Deshalb wurden alle weiteren Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.1.2.7 Säulenregenerierung und -equilibrierung

Im Anschluss an die Elution der letzten B₆-Form wurde ein Schritt zur Reinigung der HPLC-Säule integriert. Hierzu wurde der Anteil an Acetonitril im Laufmittel über 12 Minuten auf 50 % erhöht, wobei die Flussgeschwindigkeit über einen Zeitraum von 3 Minuten auf einen Spitzenwert von 0,8 ml/Min angehoben wurde. Nach Abschluss der Säulenreinigung wurden zur Equilibrierung der Säule die Zusammensetzung des Eluenten sowie die Flussrate für einen Zeitraum von 10 Minuten auf die Startparameter zurückgestellt. Hiermit konnte für die nachfolgende Analyse wieder eine stabile Basislinie erreicht werden.

3.1.3 Optimierte HPLC-Methoden zur Analytik der B₆-Vitamere

Auf der Grundlage der beschriebenen Versuche wurden zwei Methoden zur HPLC-Analytik der B₆-Vitamere aus menschlichem Serum entwickelt. Die nachfolgend vorgestellte „Routinemethode“ dient zur Bestimmung der B₆-Vitamere in der klinischen Routinediagnostik. Um die bei besonderen Fragestellungen mit der „Routinemethode“ nicht detektierbaren oder quantifizierbaren B₆-Formen bestimmen zu können, wurde ergänzend eine weitere Methode („Forschungsmethode“) aufgebaut.

„Routinemethode“

Diese wurde ausgehend von der von Kimura et al. beschriebenen Methode (45) entwickelt. Dabei wurden die Säurefällung modifiziert (Kap. 3.1.1.3), n-Methyldopamin als Interner Standard eingeführt (Kap. 3.1.2.3), eine komplexe Gradientenelution aufgebaut (Kap. 3.1.2.4) und ein Reinigungs- und Equilibrierungsschritt eingeführt (Kap. 3.1.2.7), um die automatisierte, serielle Analyse von Proben im Routinebetrieb zu ermöglichen.

Die „Routinemethode“ (methodische Details siehe Kap. 2.2.2.2.8) wurde und wird im Zentrallabor des UK S-H am Campus Lübeck für die Routineanalytik des Vitamin-B₆-Status im Patientenserum eingesetzt. Folgende Vitamere können mit dieser Methode detektiert werden: PLP, PM, PN und 4-PA (Abb. 31). Problematisch bleibt die Auftrennung der in sehr

geringer Konzentration vorkommenden B₆-Vitaminen. Dies gilt insbesondere für das Pyridoxin, welches sich in den meisten Proben lediglich als sehr kleiner Peak detektieren lässt. Hierdurch besteht die Gefahr von Messfehlern aufgrund von Überlagerungen des PN-Peaks durch Fremdstoffe aus dem Serum. Die „Routinemethode“ ermöglicht prinzipiell die Detektion von PL; da der Peak jedoch extrem breitbasig abgetrennt wird, ist eine Auswertung aufgrund von Überlagerungen durch störende Matrixkomponenten in der Regel nicht möglich.

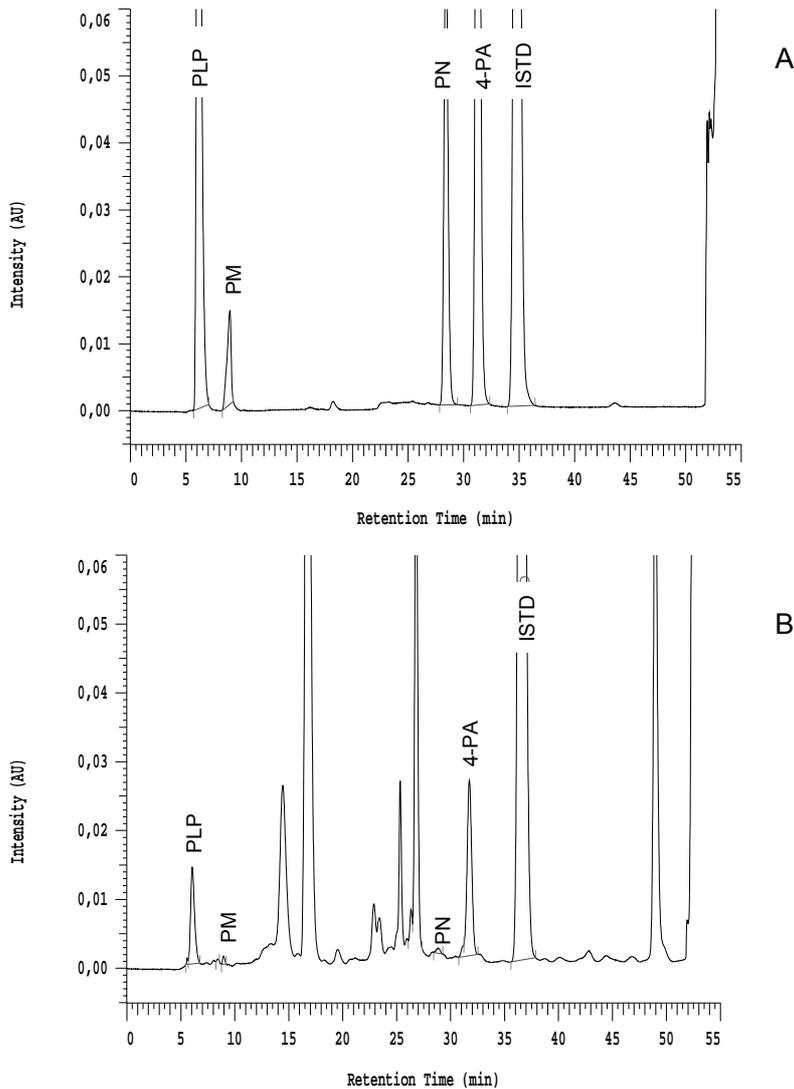


Abb. 31: Auftrennung von Vitamin B₆ Standards (A) und Serum (B) mit der „Routinemethode“

Zur Charakterisierung der analytischen Leistungsfähigkeit der optimierten „Routinemethode“ zur Bestimmung der B₆-Formen wurden mit Kontrollen eigener Herstellung die Impräzision in der Serie und von Serie zu Serie, mit einer kommerziellen Kontrolle, die allerdings nur für PLP Zielwerte angab, die Impräzision von Serie zu Serie und die Unrichtigkeit bestimmt. Außerdem wurde die Wiederfindung von B₆-Standards gemessen, die einigen Seren

zugesetzt worden waren. Die Variationskoeffizienten (VK) der Bestimmung verschiedener B₆-Formen in einer Serie sind in Tabelle 35 wiedergegeben; dabei erfolgte die Untersuchung von 2 Seren nach der Probenaufbereitung in Mehrfachbestimmung (n=17 und n=15). Für die vergleichsweise hoch konzentrierten Verbindungen PLP (36 bzw. 96 nmol/l) oder 4-PA (ca. 20 nmol/l) ergaben sich VK-Werte unter 2 %, während für das niedrig konzentrierte PM (2,5 und 2,7 nmol/l) VK-Werte von 4 und 15 % und für PN, dessen Konzentration an der Nachweisgrenze (0,54 und 0,32 nmol/l) lag, VK-Werte von 15 und 23 % ermittelt wurden. Als Nachweisgrenze (ca. 0,3 nmol/l) wurde die 3-fache Standardabweichung des Rauschens der Basislinie in der Umgebung des PN-Peaks gewertet.

Tab. 35: Intra-Assay-Variationskoeffizienten der „Routinemethode“ bei zwei in Serie gemessenen Kontrollen

Kontrolle 1	PLP	PM	PN	4-PA	Kontrolle 2	PLP	PM	PN	4-PA
	(nmol/l)	(nmol/l)	(nmol/l)	(nmol/l)		(nmol/l)	(nmol/l)	(nmol/l)	(nmol/l)
n=	17	17	17	17	n=	15	15	15	15
MW	35,7	2,46	0,54	19,1	MW	96,0	2,74	0,32	20,4
SD	0,50	0,38	0,08	0,32	SD	1,53	0,10	0,07	0,31
VK(%)	1,4	15,3	15,3	1,7	VK(%)	1,6	3,6	23,3	1,5

Die Variationskoeffizienten von Serie zu Serie wurden mit kommerziellen Kontrollen bestimmt; sie konnten nur für PLP, PM und 4-PA zuverlässig ermittelt werden, da der PN-Peak in manchen HPLC-Läufen von Matrixkomponenten überlagert war. Die Ergebnisse aus 14 Messreihen sind in Tabelle 36 wiedergegeben.

Tab. 36: Inter-Assay-Variationskoeffizienten der „Routinemethode“ aus 14 unabhängigen Messreihen (2006)

Kontrolle 1	PLP	PM	PN	4-PA	Kontrolle 2	PLP	PM	PN	4-PA
	(nmol/l)	(nmol/l)	(nmol/l)	(nmol/l)		(nmol/l)	(nmol/l)	(nmol/l)	(nmol/l)
n=	14	14	12	14	n=	14	14	9	14
MW	33,8	5,24	0,79	17,5	MW	96,0	4,29	0,72	20,4
SD	2,72	1,46	0,37	1,97	SD	1,53	1,31	0,49	0,31
VK(%)	8,1	27,8	46,5	11,2	VK(%)	1,6	30,6	67,4	1,5

Für diese Kontrollen waren Zielwerte der PLP-Konzentration deklariert (34,1 und 83,0 nmol/l). Aus diesen Zielwerten und den Mittelwerten der Kontrollproben-Einzelmessungen errechneten sich Unrichtigkeiten der „Routinemethode“ von -0,96 und -0,31 %. Wiederfindungen von Standardlösungen, die einzelnen Seren (n = 5) vor der Probenaufbereitung zugesetzt worden waren, lagen zwischen 93 und 105 % für PLP, 90 und 104 % für PM, 87 und 99 % für PN und 94 und 102 % für 4-PA.

„Forschungsmethode“

Das in der Arbeit als „Forschungsmethode“ aufgeführte HPLC-Verfahren (Kap. 2.2.2.8) kann in Ergänzung zu der „Routinemethode“ bei differenzierter Fragestellung eine Aussage über den Status der B₆-Formen PMP und PL geben. Die Proteinpräzipitation im Rahmen der Probenaufarbeitung erfolgte im Unterschied zur „Routinemethode“ mit Metaphosphorsäure. Die Auftrennung der B₆-Formen wurde mittels eines komplexen Puffers bestehend aus den Ionenpaar-Reagenzien Triethylamin und Oktansulfonat erzielt. Hierdurch wurde die Belastung der analytischen Säule deutlich erhöht und ihre Standzeit verringert. Die verkürzte Lebensdauer der HPLC-Säule und damit verbundene Änderungen der Retentionszeiten schränkten die Praktikabilität der „Forschungsmethode“ für größere Probenkollektive ein.

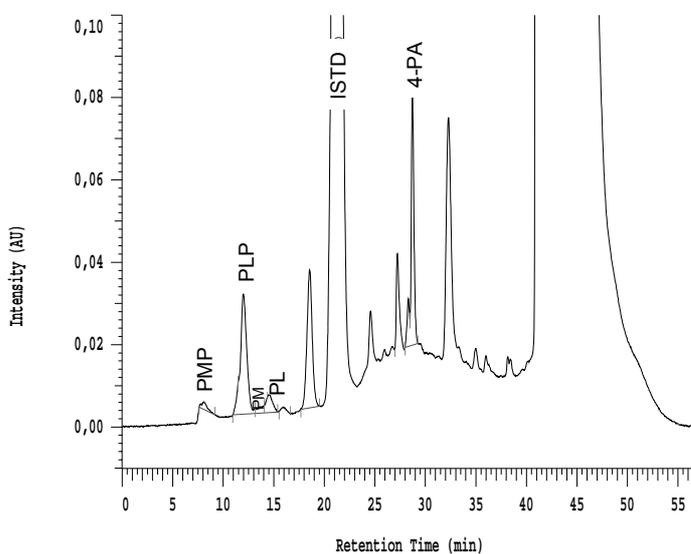


Abb. 32: Auftrennung von Serum mit der „Forschungsmethode“

Abbildung 32 zeigt die Auftrennung der B₆-Formen und des Internen Standards am Beispiel eines Patientenserums. Da die „Forschungsmethode“ nicht für die Routineanalytik von Patientenserum entwickelt wurde, kommt sie nur seltener zum Einsatz. Dies findet seinen Niederschlag in einer im Vergleich zur „Routinemethode“ geringeren Zahl von Kontrollmessungen. Tabelle 37 fasst die Ergebnisse von Messungen der Präzision in der Serie zusammen.

Tab. 37: Intra-Assay-Variationskoeffizienten der „Forschungsmethode“ bei zwei in Serie gemessenen Kontrollen

Kontrolle 1	PLP	PMP	PL	4-PA	Kontrolle 2	PLP	PMP	PL	4-PA
	(nmol/l)	(nmol/l)	(nmol/l)	(nmol/l)		(nmol/l)	(nmol/l)	(nmol/l)	(nmol/l)
n=	12	12	12	12	n=	12	12	12	12
MW	29,1	1,6	22,5	24,4	MW	77,5	1,6	106,5	17,8
SD	2,8	0,3	3,8	4,7	SD	4,9	0,2	7,6	3,6
VK(%)	9,6	18,7	16,9	19,2	VK(%)	6,3	12,5	7,1	20,2

Anhand eines größeren Probenkollektivs (Kap. 2.2.3) wurde für einzelne B₆-Formen die Korrelation der Ergebnisse von „Forschungs- und Routinemethode“ untersucht (Abb. 33 und 34).

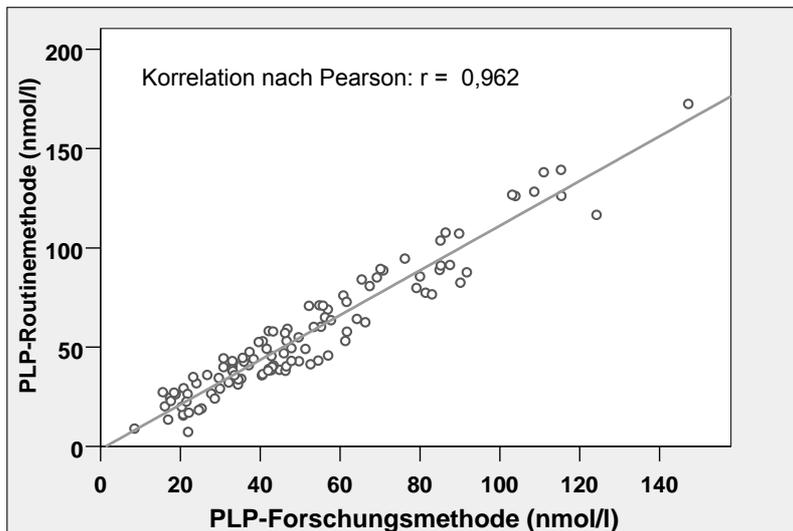


Abb. 33: Korrelation zwischen den PLP-Messwerten der „Routinemethode“ und der „Forschungsmethode“

Zwischen den beiden Messmethoden besteht hinsichtlich der PLP Messungen ($n=110$) eine sehr hohe Korrelation ($r=0,96$), hinsichtlich der 4-PA Messungen ($n=110$) eine hohe Korrelation ($r=0,81$).

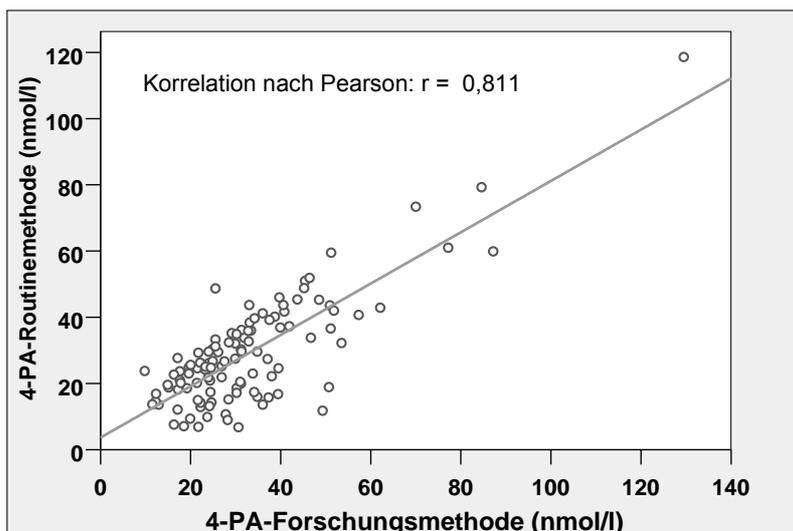


Abb. 34: Korrelation zwischen den 4-PA-Messwerten der „Routinemethode“ und der „Forschungsmethode“

3.2 Praktische Anwendungen der optimierten Vitamin-B₆-Analytik

3.2.1 Normwertverteilung der B₆-Vitamere

Angaben der Literatur zufolge variiert der Gesamtstatus der B₆-Vitamere sowie der einzelnen Formen geschlechts- und altersspezifisch (Kap. 1.2.2). Daraus leitete sich die Forderung ab, für die Erstellung von Referenzbereichen einen repräsentativen Querschnitt der Bevölkerung zu untersuchen.

Zur Ermittlung der Normwertverteilung in der Bevölkerung wurde anhand von Seren eines Kollektivs von 110 Blutspendern am UK S-H Campus Lübeck der Status der B₆-Formen mit beiden in der Arbeit entwickelten Methoden analysiert (Kap. 3.1.3). Der Frage nach geschlechts- oder altersabhängigen Differenzen der Referenzbereiche einzelner B₆-Vitamere wurde ebenfalls nachgegangen.

3.2.1.1 Erstellung von Referenzbereichen

In der vorliegenden Arbeit war der Altersbereich auf Erwachsene beschränkt, Kinder wurden nicht untersucht. Abbildung 35 zeigt die Altersverteilung des untersuchten Kollektivs (n=110).

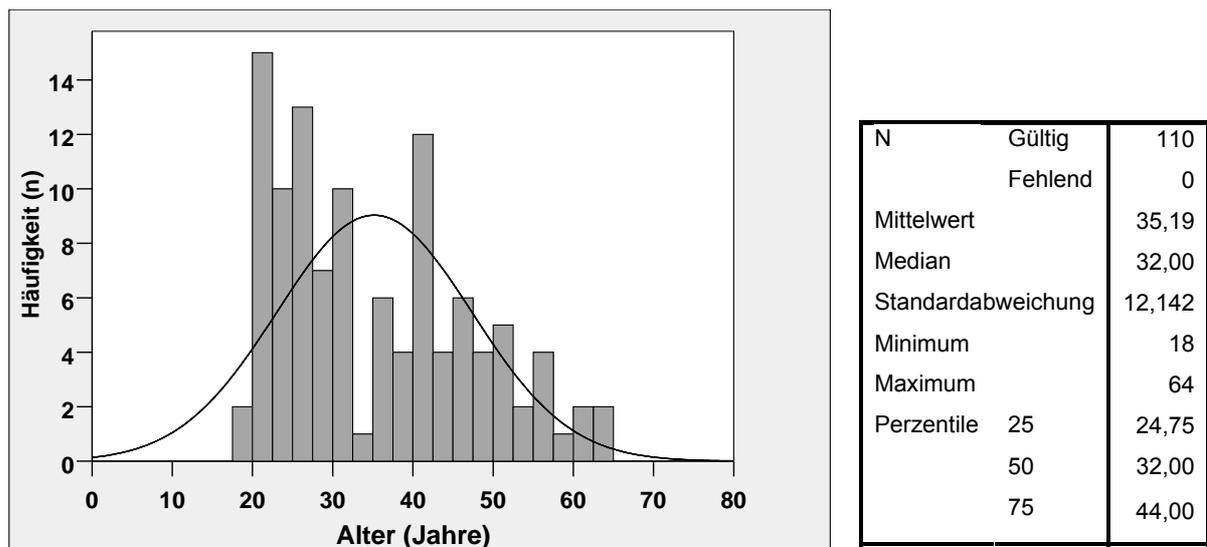
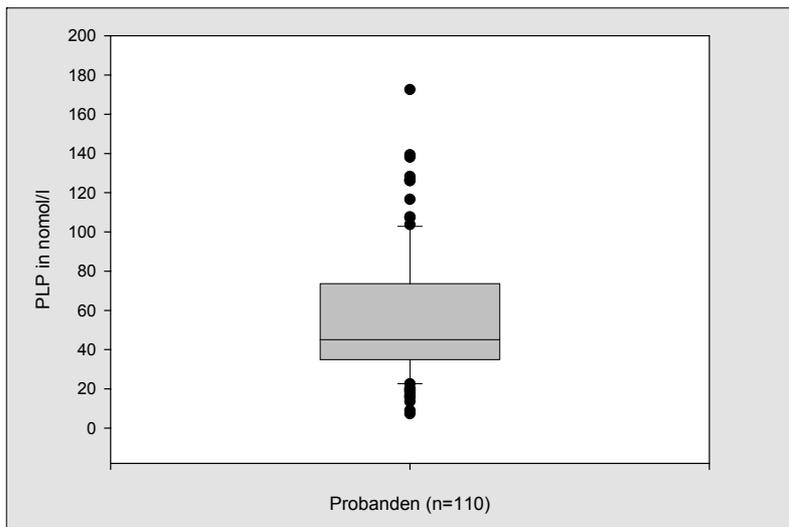


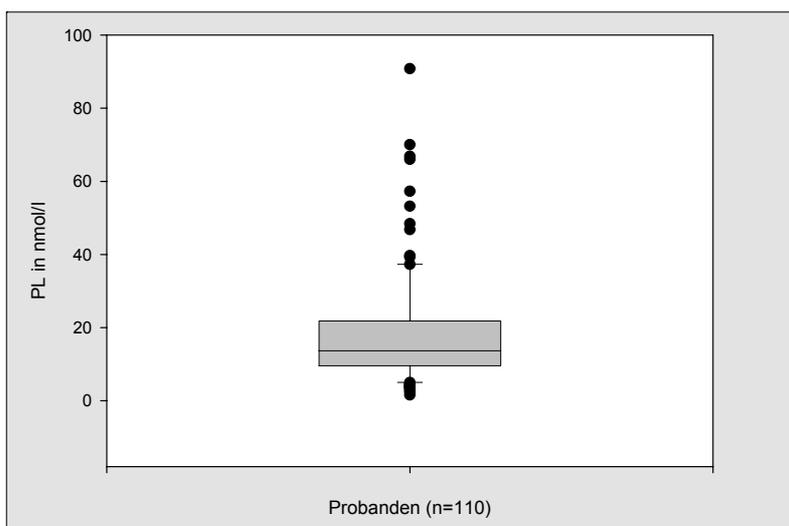
Abb. 35: Altersverteilung der Probanden

Die Konzentrationsverteilung verschiedener B₆-Vitamere im Serum sowie die entsprechenden statistischen Kenngrößen sind in Form von Boxplots in den Abbildungen 36 – 39 dargestellt. Die B₆-Vitamere PN sowie PMP sind mit beiden Methoden detektierbar, jedoch aufgrund der niedrigen Serumkonzentration (größtenteils Messwerte <1 nmol/l) nicht exakt quantifizierbar. Eine zuverlässige statistische Auswertung der Messwerte für diese B₆-Vitamere war daher nicht möglich.



N	Gültig	110
	Fehlend	0
Mittelwert		55,7682
Median		45,0500
Standardabweichung		31,97455
Minimum		7,30
Maximum		172,50
Perzentile	25	34,8750
	50	45,0500
	75	73,6000

Abb. 36: PLP bei Gesamtzahl der Probanden (n=110) ; Messung mit der „Routinemethode“



N	Gültig	110
	Fehlend	0
Mittelwert		18,856
Median		13,700
Standardabweichung		15,5757
Minimum		1,6
Maximum		90,8
Perzentile	25	9,575
	50	13,700
	75	21,800

Abb. 37: PL bei Gesamtanzahl der Probanden (n=110); Messung mit der „Forschungsmethode“

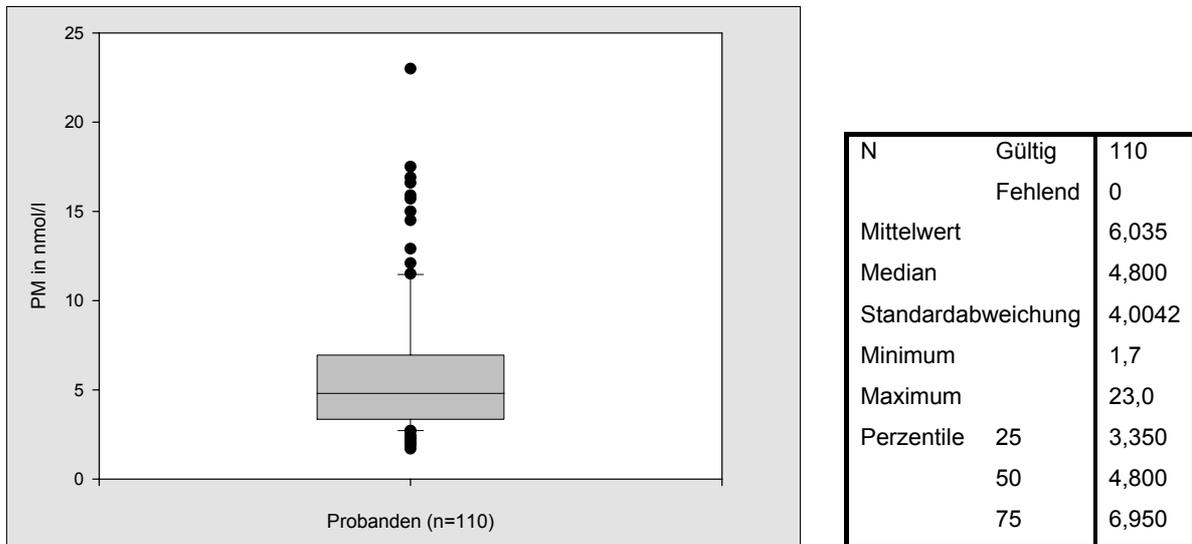


Abb. 38: PM bei Gesamtanzahl der Probanden (n=110), Messung mit der „Routinemethode“

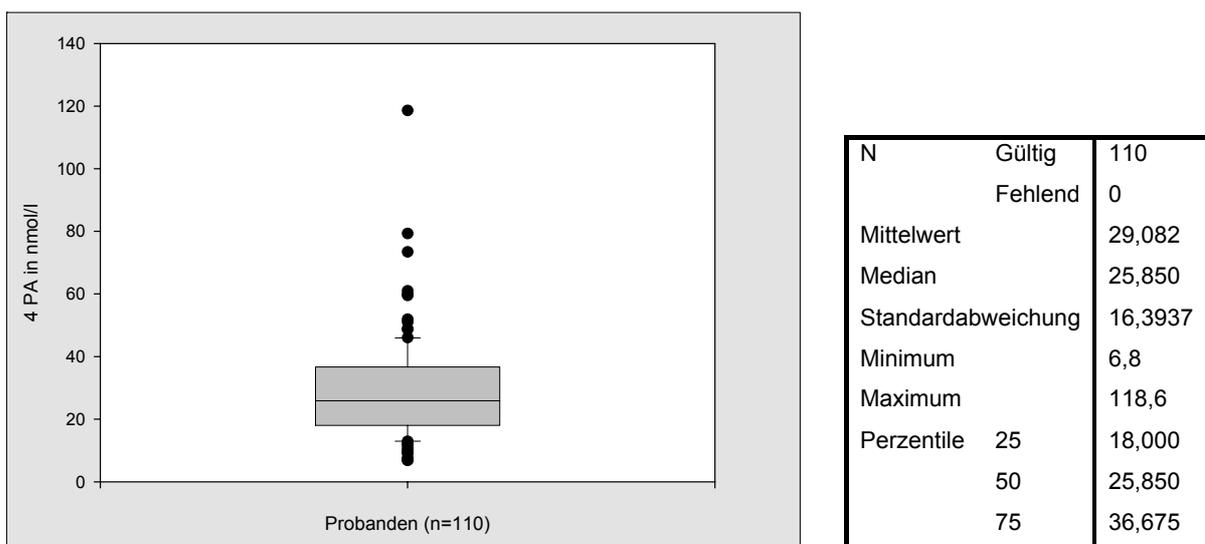


Abb. 39: 4-PA bei Gesamtanzahl der Probanden (n=110); Messung mit der „Routinemethode“

Mittels Kolmogorov-Smirnov-Test wurde überprüft, ob die Messwerte normal verteilt sind. Eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung ($p < 0,05$) zeigten die Konzentrationen von PL und PM; in diesen Fällen wurden für die betreffende Variablen nicht-parametrische Tests benutzt. PLP und 4-PA wiesen dagegen eine Normalverteilung auf.

Aus der physiologischen Streubreite der gemessenen Konzentrationen wurden Referenzintervalle der B₆-Formen abgeleitet. Als Referenzbereichsgrenzen wurden die 2,5er und die

97,5er Perzentile gewählt. Das mit der „Routinemethode“ nicht quantifizierbare B₆-Vitamin PL wurde mit der „Forschungsmethode“ bestimmt. Für die nur unzureichend quantifizierbaren B₆-Vitamine PN und PMP (Messwerte überwiegend <1 nmol/l) konnten keine zuverlässigen Referenzbereiche erstellt werden. Die Resultate sind in Tabelle 38 zusammengefasst.

Tab. 38: Normwertintervall verschiedener B₆-Formen

B ₆ -Form	PLP	PL	PM	4-PA
Proben (n)	110	110	110	110
Perzentil 2,5	12,49 nmol/l	2,79 nmol/l	1,98 nmol/l	7,04 nmol/l
Perzentil 97,5	138,37 nmol/l	67,52 nmol/l	17,04 nmol/l	74,73 nmol/l

3.2.1.2 Untersuchung auf geschlechtsspezifische Unterschiede

In Abbildung 40 ist die Verteilung der Geschlechter im untersuchten Kollektiv (n=110) dargestellt. Bei den Mittelwertvergleichen liegen unabhängige Stichproben vor. Beim Vergleich von 2 unabhängigen, nicht normalverteilten Stichproben (PL und PM) wurde der Mann-Whitney-U-Test, beim Vergleich von 2 unabhängigen, normalverteilten Stichproben der t-Test verwendet (PLP und 4-PA).

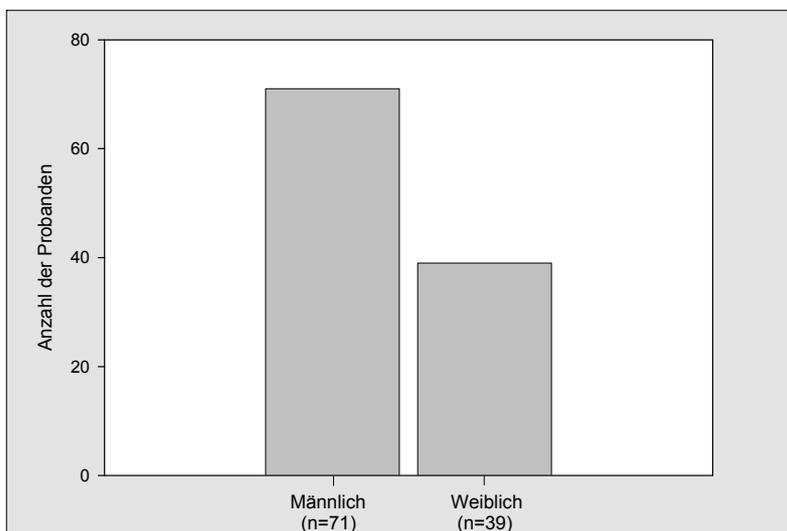


Abb. 40: Geschlechtsverteilung des Gesamtkollektivs

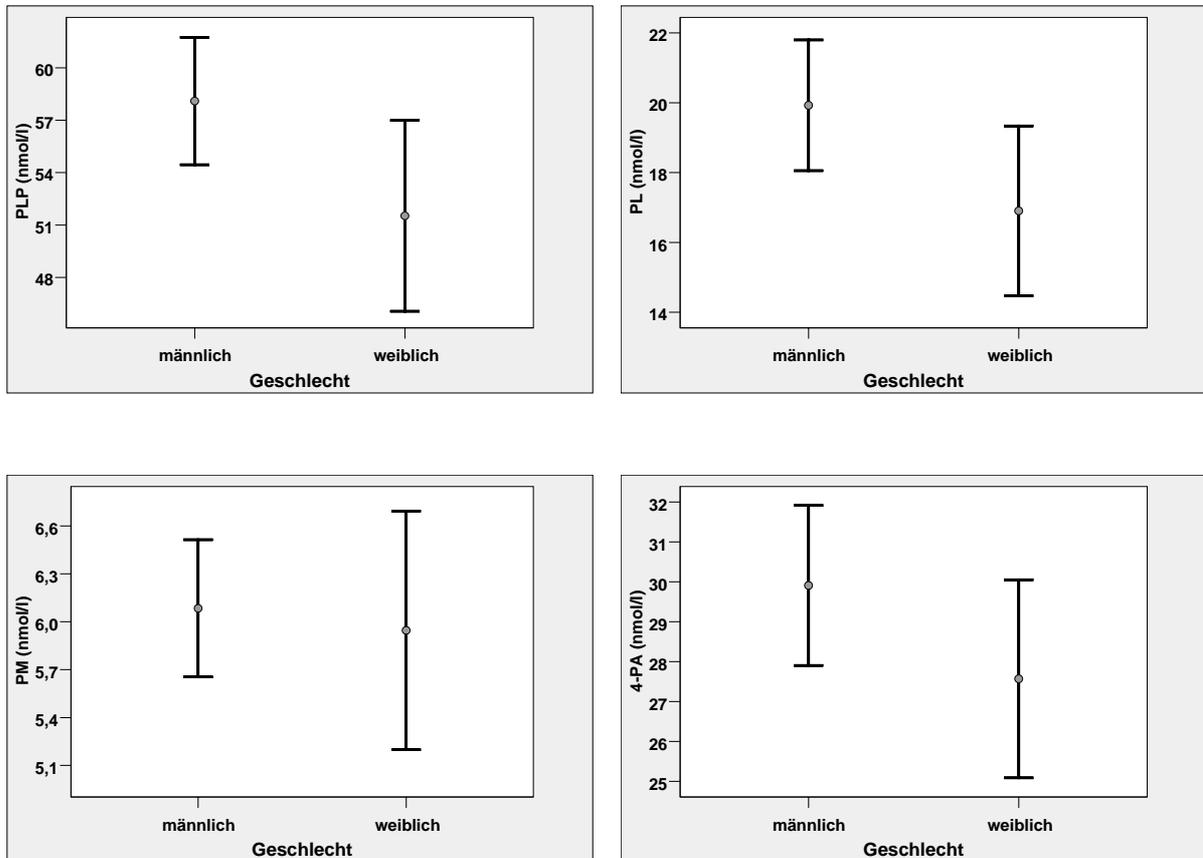


Abb. 41: Vergleich der B₆-Vitamer-Serumkonzentration in beiden Geschlechtergruppen

Zwischen den Geschlechtern konnten keine signifikante Unterschiede der PLP-Konzentration ($p=0,209$), der PL-Konzentration ($p=0,106$) und der PM Konzentration ($p=0,322$) sowie der 4-PA Konzentration ($p=0,466$) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 41 dargestellt.

3.2.1.3 Untersuchung auf altersspezifische Unterschiede

Zur Beurteilung möglicher altersabhängiger Unterschiede der Serumkonzentration der B₆-Formen wurde das Gesamtkollektiv in drei Altersgruppen unterteilt (Abb. 42). Beim Vergleich der mehr als 2 unabhängigen, normalverteilten Stichproben wurde die einfaktorische ANOVA (analysis of variance) verwendet. Bei mehr als 2 unabhängigen, nicht normalverteilten Stichproben wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis angewendet.

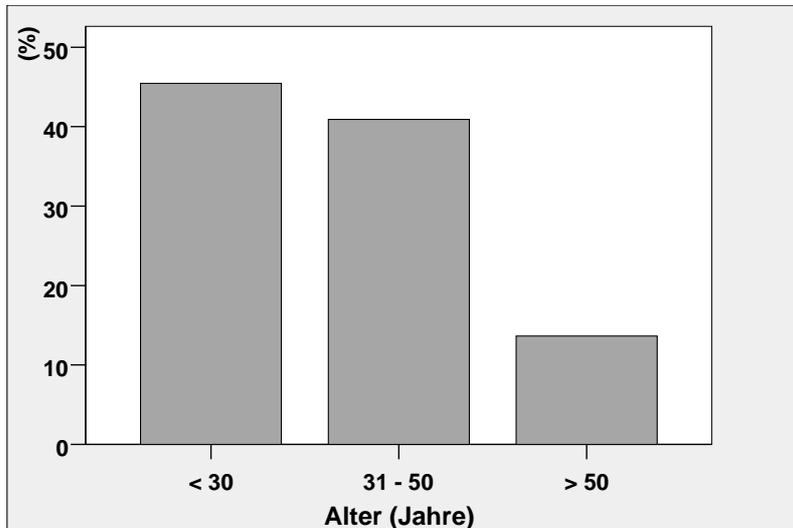


Abb. 42: Altersgruppierung des Gesamtkollektivs (n=110)

Jüngere Patienten (< 30 Jahre) zeigten die höchsten und ältere Patienten (> 50 Jahre) die niedrigsten PLP-Werte. Dabei lässt sich im vorliegenden Kollektiv eine signifikante Altersabhängigkeit der PLP-Konzentration berechnen ($p=0,006$).

Zeigt die ANOVA ein signifikantes Ergebnis, besteht mindestens ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Diese zeigt jedoch nicht, wo der Unterschied liegt oder ob sogar mehrere signifikante Unterschiede bestehen. Daher wurde jede Gruppe mit jeder verglichen. Bei dieser multiplen Testung besteht immer ein Risiko eines falsch positiven Ergebnisses, d.h., dass fälschlicherweise ein signifikanter Unterschied zwischen zwei Stichproben angenommen wird, der jedoch nur zufallsbedingt ist. Der Bonferroni-Test (Tab. 39) korrigiert durch Berechnung einer Signifikanz für die gesamte Testreihe das Risiko von falsch positiven Ergebnissen.

Tab. 39: Untersuchung altersabhängiger Unterschiede der PLP-Konzentration mittels Bonferroni-Test

	(I) Alter (Jahre)	(J) Alter (Jahre)	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
Bonferroni	< 30	31 - 50	0,233	-3,550	23,017
		> 50	0,024	2,140	40,202
	31 - 50	< 30	0,233	-23,017	3,550
		> 50	0,455	-7,836	30,711
	> 50	< 30	0,024	-40,202	-2,140
		31 - 50	0,455	-30,711	7,836

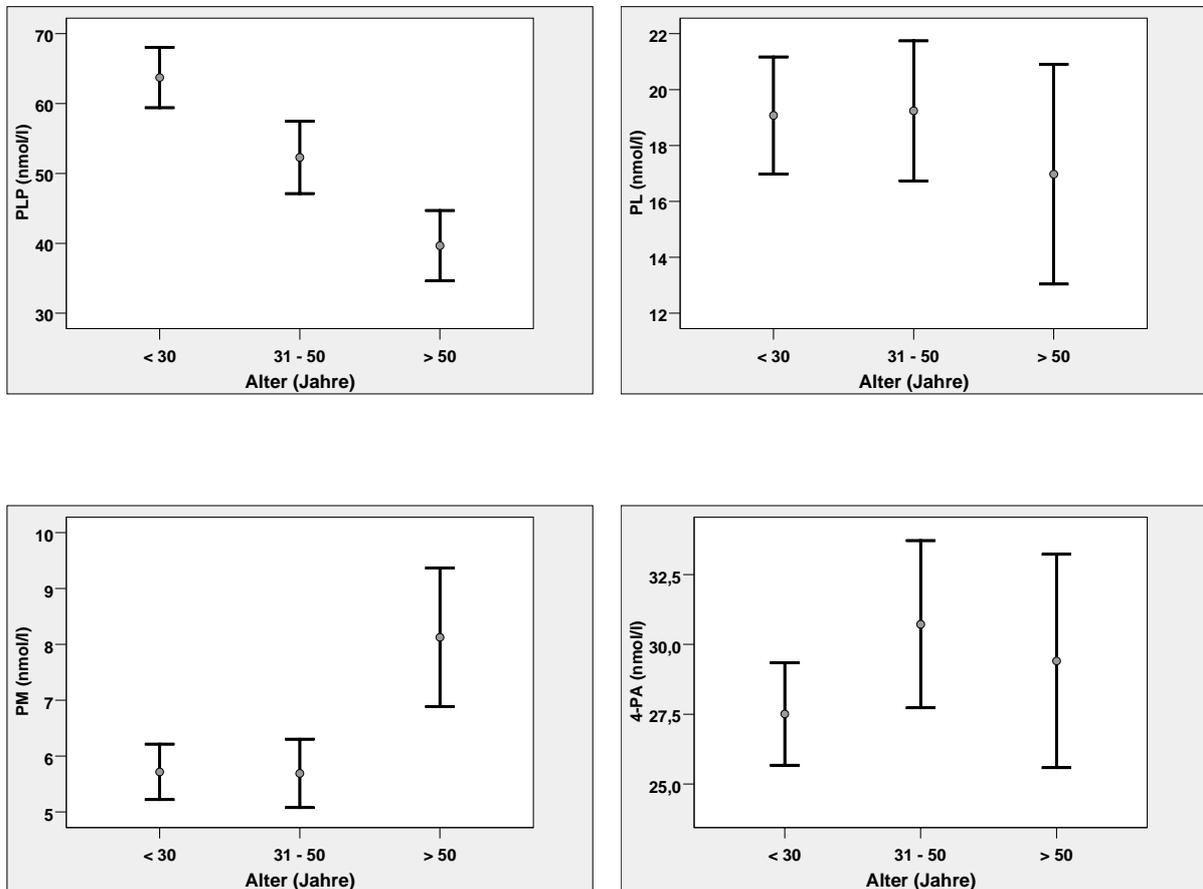


Abb. 43: Vergleich der B₆-Vitamer-Serumkonzentration in verschiedenen Altersgruppen

Zwischen den Patienten mit einem Alter > 50 vs. < 30 Jahren lassen sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der PLP-Konzentration nachweisen (Tab. 39; $p=0,02$). Bei Patienten, die älter als 50 Jahre alt waren, konnten tendenziell höhere PM-Konzentrationen nachgewiesen werden, wobei keine statistische Signifikanz bestand ($p=0,08$).

Kein signifikanter Unterschied zwischen den Altersgruppen konnte bezüglich der PL-Konzentration ($p=0,70$) oder der 4-PA-Konzentration ($p=0,637$) nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 43 dargestellt.

3.2.2 Pharmakokinetik der B₆-Vitamere

Nachfolgend sind die Ergebnisse der kinetischen Versuche der Probanden (Tab. 19, S. 33) wiedergegeben. Die Kinetik nach oraler Einnahme bzw. intravenöser Applikation wurde bei beiden Probanden mit der in der Arbeit entwickelten „Routinemethode“ (Kapitel 3.1.3) bestimmt. Zur Ermittlung der mit dieser Methode nicht detektierbaren B₆-Formen wurde ergänzend die „Forschungsmethode“ (Kapitel 3.1.3) eingesetzt.

Abbildung 44 (S. 71) zeigt die Kinetik der B₆-Vitamere nach oraler Einnahme von 100 mg Pyridoxin bei einem 27-jährigen männlichen, gesunden Probanden über 24 Stunden. In Abbildung 45 (S. 72) wird die Pharmakokinetik nach intravenöser Applikation von 100 mg Pyridoxin bei einem 28-jährigen männlichen gesunden Probanden gezeigt.

Auffallend ist ein rascher Anstieg der Konzentration aller B₆-Vitamere sowohl nach oraler als auch nach intravenöser Applikation von Pyridoxin. Auch wurden frühzeitig hohe Konzentrationen des Hauptmetaboliten, der 4-Pyridoxinsäure, gemessen. Nach oraler Zufuhr wurden ähnliche Maximalwerte festgestellt wie nach intravenöser Gabe. Im Gegensatz zu den anderen B₆-Formen, deren Konzentration sich nach 24 Std. dem Ausgangswert nähert, bleiben die Werte von PLP und PM auch nach dieser Zeit deutlich erhöht.

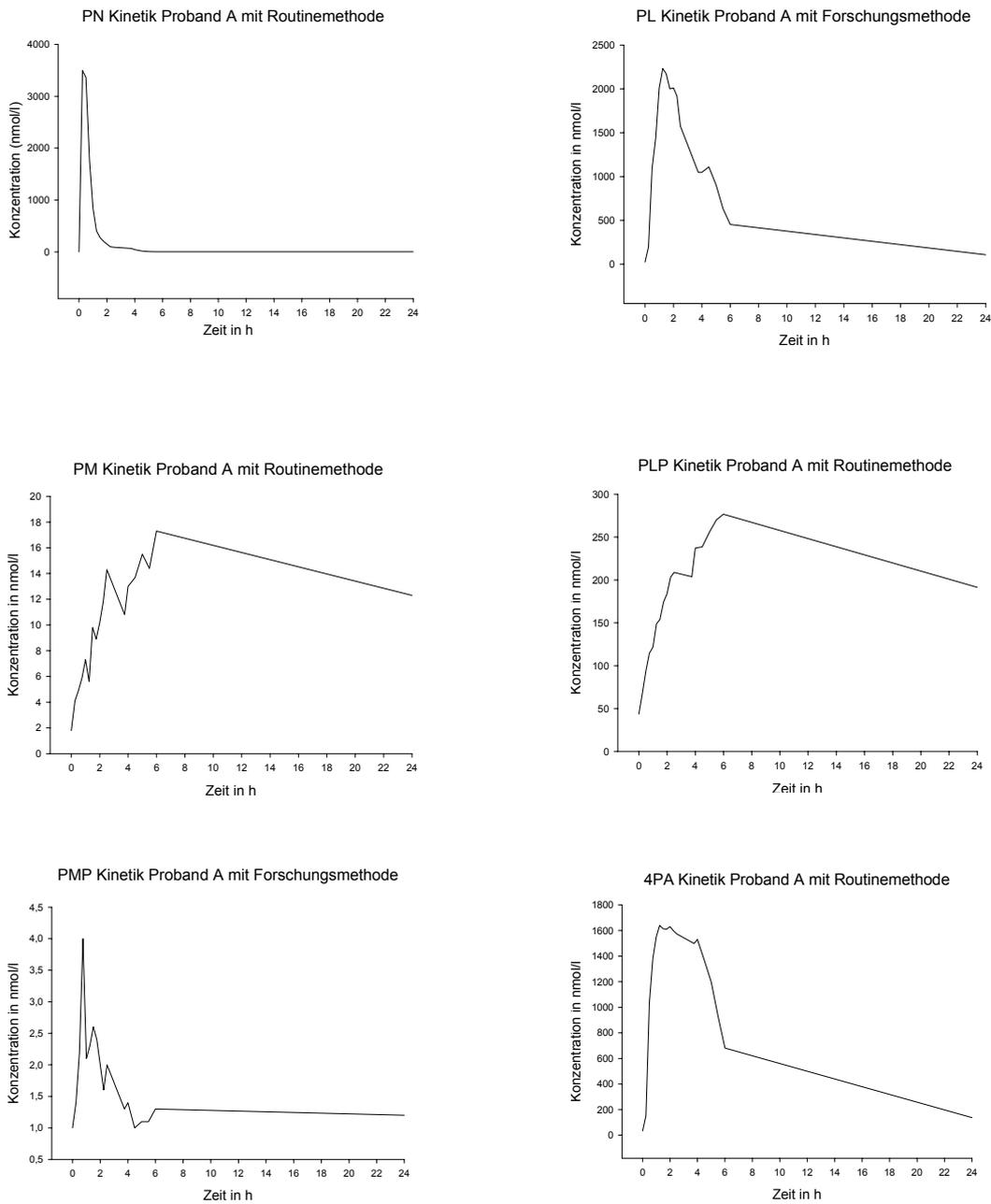


Abb. 44: Kinetik der einzelnen B₆-Formen bei Proband A nach oraler Einnahme von 100 mg Pyridoxin

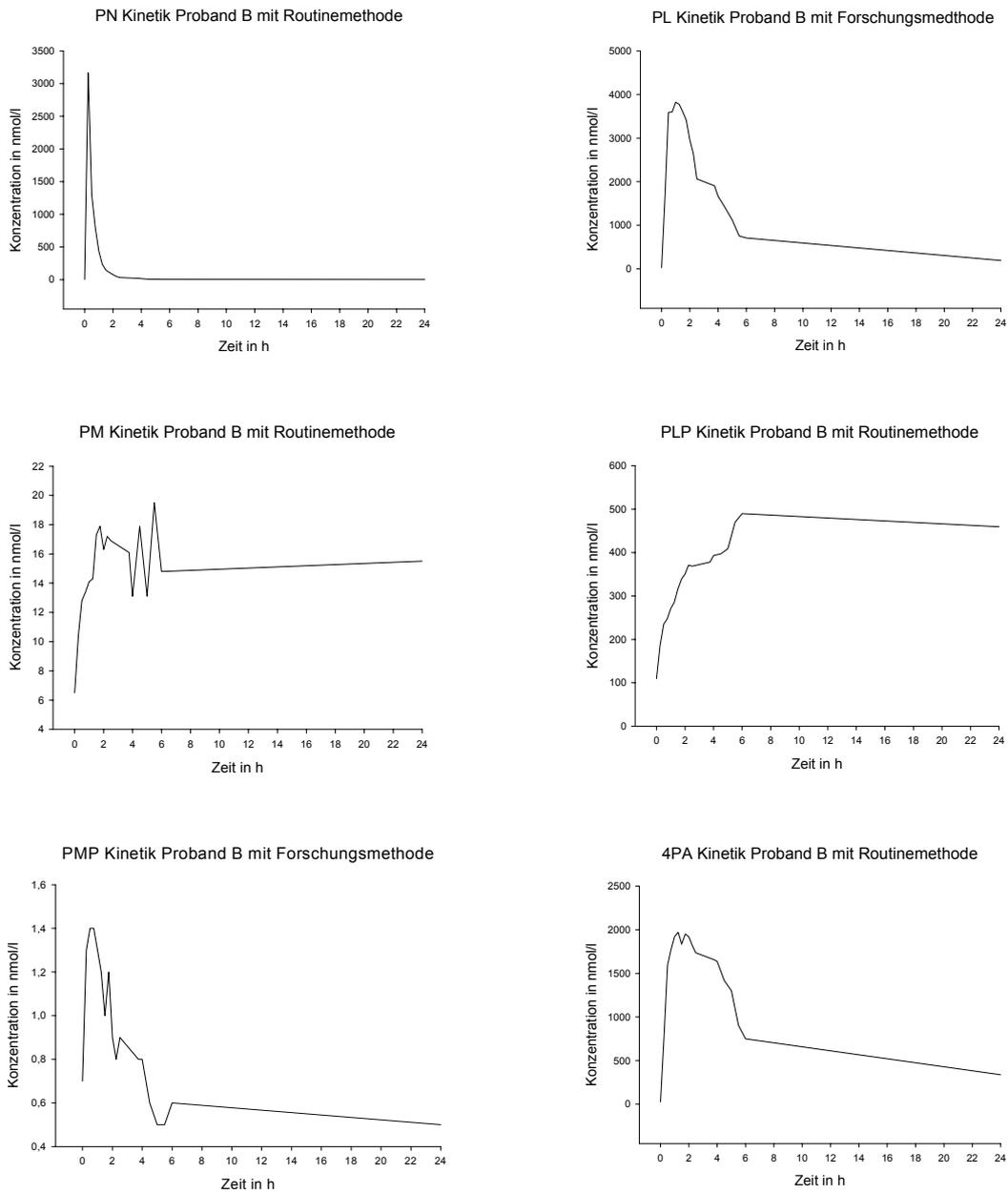


Abb. 45: Pharmakokinetik der B₆-Formen bei Proband B nach intravenöser Zufuhr von 100 mg Pyridoxin

4 DISKUSSION

In der Literatur sind verschiedene HPLC-Methoden zur Bestimmung der B₆-Vitamere aus wässrigen Standardlösungen oder biologischen Matrices beschrieben (5,9,11,26,28,40,45,58,73,78,86,92). Keine dieser Methoden ermöglicht die Bestimmung aller B₆-Formen im menschlichen Serum in einem Analysengang. Außerdem weisen deutlich methodenabhängige, z.T. stark differierende Referenzbereiche der B₆-Formen, die mit diesen HPLC-Methoden ermittelt wurden (Kap.1.2.1), auf inhärente Störungen der Analytik hin. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die HPLC-Methodik zur Bestimmung der B₆-Formen im Serum zu optimieren. Für den Einsatz in der Routinediagnostik sollten mit dieser optimierten Methode auch die Referenzwertangaben der Literatur überprüft werden.

4.1 Methodenoptimierung

4.1.1 Probenaufarbeitung

Grundsätzlich existieren verschiedene Strategien zur Aufarbeitung nativer Serumproben vor der Analyse (Kap. 2.2.1). Je komplexer die Probenzusammensetzung, desto höher sind die Anforderungen an die Effizienz der Probenaufarbeitung. Niedrige Analytkonzentrationen im Serum, ausgeprägte chemische Unterschiede der gleichzeitig zu bestimmenden Verbindungen (freie, ungeladene und phosphorylierte, geladene B₆-Vitamere) sowie ein hoher Anteil potenziell störender Matrixkomponenten unterschiedlicher Zusammensetzung führen bei der B₆-Analytik zu entsprechenden Anforderungen an die Aufarbeitung von Serumproben. Drei Strategien zur Probenvorbereitung aus Serum wurden in dieser Arbeit erprobt (Kap. 2.2.1).

Die chemische Aufarbeitung durch Proteinpräzipitation ist die traditionelle Methode der Probenvorbereitung in der HPLC-Analytik der B₆-Vitamere (5,9,11,13,22,26,28,34,40,45,53,62,73,78,86,92). Sie hat jedoch den Nachteil, dass durch die Zugabe des Fällungsmittels die Konzentration des Analyten im Überstand der Fällung geringer ist als in der Nativprobe. Ferner wird durch die Fällung das chemische Milieu der Probe stark verändert. Bei den im humanen Serum in sehr geringer Konzentration (nmol/l) vorkommenden B₆-Vitaminen stellt dies insofern ein Problem dar, als die Veränderung von pH und Ionenstärke zu erheblichen Störungen der anschließenden sensiblen HPLC-Analytik führen kann (Abb. 24-25, S. 53 f.).

Perchlorsäure, welche häufig zur Probenaufarbeitung eingesetzt wird (26,28,45), bestätigte sich in den eigenen Versuchen als sehr effizientes Fällungsmittel der Serumproteine. Neben dieser auch von Kimura et al. (45) benutzten Fällungsmethode wurden auch weitere beschriebene Methoden mittels Trichloressigsäure (8,13,34,40,58) sowie Metaphosphorsäure (11,73,78) auf ihren Effekt auf die nachfolgende Analytik hin untersucht. Weiterhin wurde versucht, die Proteinfällung mit Alkohol als Alternative zur Säurefällung durchzuführen. Methanol fällt jedoch deutlich weniger Eiweiß aus und birgt deshalb die Gefahr einer „Verstopfung“ der Säule durch Restproteine in der aufgearbeiteten Probe. Eine Alkoholfällung wurde daher nur in Kombination mit verdünnter Perchlorsäure angewandt. Der Zusatz von Alkohol bei der Eiweißpräzipitation führte neben einer allgemeinen Verkürzung der Retentionszeiten vor allem zu einer instabileren Basislinie. Insbesondere bei den aufgrund ihrer niedrigen Konzentration schwer detektierbaren B₆-Formen erschwerte dies die präzise Auswertung des Chromatogramms.

Als einfaches Verfahren zur Proteinpräzipitation mit annehmbaren Auswirkungen auf die nachfolgende Analytik zeigte sich eine Probenaufarbeitung mittels 10%iger Metaphosphorsäure (11,73,78). Die Metaphosphorsäure erwies sich jedoch bei Lagerung als instabil, was sich durch veränderte Retentionszeiten störend auf den chromatographischen Lauf auswirkte. Aus Gründen der Praktikabilität wird sie daher nur für die „Forschungsmethode“ und nicht für die Routinediagnostik angewandt. Die zur Eiweißfällung an sich sehr geeignete Perchlorsäure nimmt einen starken Einfluss auf die Retentionszeiten im chromatographischen Trennschritt. Eine Optimierung der Ergebnisse konnte durch das Neutralisieren und Ausfällen der Säure mittels Dikaliumhydrogenphosphat erzielt werden (Kap. 3.1.1.3). Die so optimierte Probenaufarbeitung wird nunmehr als Standard bei der in dieser Arbeit entwickelten „Routinemethode“ (Kap. 2.2.2.2.8) eingesetzt.

Eine weitere gebräuchliche Strategie zur Serumaufarbeitung ist die Festphasenextraktion (SPE). Diese kann entweder manuell (Kap. 2.2.1.2) oder in einer vollautomatisierten Inline-Version durchgeführt werden (Kap. 2.2.1.3). Bei der manuellen Durchführung werden unter Verwendung einzelner SPE-Säulen die Analyten extrahiert. Da für jede Probe eine neue Extraktionssäule benutzt wird, werden Verschleppungsphänomene vermieden. Es wurde ein Sorbens gesucht, welches trotz geringen Volumens die chemisch stark variierenden B₆-Formen derart retardieren kann, dass eine sichere Trennung der B₆-Formen von der Serummatrix ermöglicht wird. Ausgehend von der Tatsache, dass sich bei der HPLC-Analytik der B₆-Formen Reversed Phase C18 Materialien bewährt haben (11,26,28,40,45,73), wurden

zunächst verschiedene SPE-Säulen mit stationären Phasen ähnlicher Eigenschaften erprobt. Dies waren zum einen weitere umkehrchromatographische Materialien (C4 oder C8), aber auch C18 Phasen verschiedener Hersteller. Letztere unterschieden sich in der Partikelgröße, im molekularen Aufbau und in der Füllmenge. Daneben wurde eine Auswahl weiterer Packungsmaterialien aus einer Vielzahl der auf dem Markt zu beziehenden chromatographischen Phasen getroffen (Tab. 5, S. 20).

Zunächst wurde versucht, die Retentionskraft der festen Phasen ohne Variation der mobilen Phase zu ermitteln. Dabei wurden die manuellen Extraktionssäulen mit Vitamin B₆-Standards als Probe und Aqua bidest. als mobiler Phase betrieben. Alle Phasen außer der Phenyl-Phase konnten die B₆-Formen entweder nur partiell oder kaum retinieren (Kap. 3.1.1.1). Um die Retentionszeit möglicherweise zu verlängern, wurden dann bei den klassischen Umkehrphasen C8 und C18 der mobilen Phase die Ionenpaar-Reagenzien Triethylamin und Oktansulfonat zugesetzt. Dabei zeigte sich, dass durch eine sukzessive Erhöhung der Oktansulfonatkonzentration bis zu einer Konzentration von 5 mmol/l die Retention der B₆-Formen gesteigert werden kann (Kap. 3.1.1.2). Die Retention ist jedoch nicht ausreichend, um eine Abtrennung von der Serummatrix sicherzustellen. Bedenkt man den häufigen Einsatz von C8- und C18-Säulen in der HPLC-Analytik der B₆-Vitamine (11,36,28,40,45), ist die niedrige Retentionsleistung dieser Phasen bei den SPE-Versuchen erstaunlich und am ehesten auf das geringe Sorbentienvolumen der SPE-Säulen zurückzuführen. Allerdings kommt es auch bei der HPLC-Analytik trotz wesentlich längerer Säule zu einer raschen Elution der polaren B₆-Formen (Abb. 31, S. 59). In der Literatur ist keine Methode zur Probenaufarbeitung mittels Festphasenextraktion und anschließender Analytik einzelner B₆-Formen beschrieben.

Als Ausnahme bei den SPE-Versuchen zeigte sich das Phenyl-Material. Hier wiesen jedoch die B₆-Vitamine eine so hohe Affinität zum Säulenmaterial auf, dass sie sich nur schwer und uneinheitlich wieder eluieren ließen. Bei der Elution mit Aqua bidest. und Acetonitril kam es lediglich zu einer unvollständigen Ablösung der phosphorylierten B₆-Vitamine (Kap. 3.1.1.1). Trotz Einsatzes potenter Lösungsmittel (Tab. 28-30, S. 42) konnte nur ein geringer Anteil der aufgetragenen Menge im Eluat wiedergefunden werden. Die Kombination der Lösungsmittel mit verschiedenen modifizierten Puffern führte ebenfalls nicht dazu, dass sich der Verlust an B₆-Formen auf ein vertretbares Maß reduzieren ließ (Tab. 31, S. 43). So stellte sich auch diese Phase zur Vitamin B₆-Extraktion als ungeeignet heraus.

Die Inline-Festphasenextraktion mit ADS-Säulen kombiniert die konventionelle Umkehrphasen-Chromatographie mit der Ausschlusschromatographie (Kap. 2.2.1.3). Diese Art der Probenaufarbeitung ist bislang in der Literatur für die Analytik der B₆-Vitamere noch nicht beschrieben. Während nach dem Probenauftrag die Matrix- und Waschlösung dem Abfall zugeführt wird, sollen die Analyten nach Umschalten eines Ventilmechanismus auf die Hauptsäule eluiert und dort aufgetrennt werden (84). Schwächen dieses Aufbaus sind die Verschleppung von Proben sowie die mögliche Verschmutzung der Extraktionssäule durch Matrixkomponenten. Zunächst wurde ermittelt, wie lange die Elution der Serum-Proteine von der ADS-Säule dauert (Kap. 3.1.1.2). Nach abgeschlossener Proteinelution (ca. 2,5 Min) sollten durch den Umschaltmechanismus die auf der Vorsäule retinierten Probenkomponenten zur Analytik auf die HPLC-Säule überführt werden. Erste Versuche unter Einsatz von Aqua bidest. führten zu einer sofortigen Elution der B₆-Vitamere. Auch der Zusatz von steigenden Oktansulfonat-Konzentrationen im Puffer brachte nur eine minimale Verzögerung der Elution mit sich. Bereits nach einer Minute löste sich ein wesentlicher Anteil der B₆-Vitamere von der ADS-Säule. Eine ausreichende Retardierung der B₆-Formen gegenüber den Serumproteinen konnte also mit der Inline-Festphasenextraktion nicht gewährleistet werden (Kap. 3.1.1.2). Würde der Umschaltmechanismus nach der abgeschlossenen Elution der Serumproteine aktiviert werden, wäre dies mit einem nicht vertretbaren Verlust der ohnehin in sehr geringer Konzentration vorkommenden B₆-Formen verbunden. Umgekehrt würde ein zu frühes Umschalten Serumproteine auf die HPLC-Säule leiten. Die Folge wäre ein rascher Verschleiß der analytischen Trennsäule. Sowohl die Reproduzierbarkeit als auch die Lebensdauer der HPLC-Säule wären hiermit stark eingeschränkt. Somit konnte mit den kommerziell verfügbaren ADS-Säulen das Prinzip der automatisierten Inline-Extraktion für den eigenen Methodenaufbau nicht genutzt werden.

4.1.2 HPLC-Analytik

Als Grundlage für die in dieser Arbeit entwickelte „Routinemethode“ diente eine im Jahr 1996 publizierte Methode von Kimura et al. (45). Bei dieser Methode erfolgt die Aufarbeitung von Serum mittels Perchlorsäure. Die anschließende Auftrennung der B₆-Formen wird nach Vorsäulenderivatisierung isokratisch auf einer Reversed-Phase Säule durchgeführt (Kap. 3.1). Trennleistung der Methode ist die Detektion von zwei der sechs bekannten B₆-Vitaminen: Pyridoxal und Pyridoxal-5'-Phosphat. Darüber hinaus wird die Bestimmung des Abbauproduktes aller B₆-Vitamere, der 4-Pyridoxinsäure, erreicht. Positiv zu bewerten ist, dass eines der von der Kimura-Methode detektierbaren B₆-Vitamere das biologisch aktive

und somit beim Menschen bedeutsamste B₆-Vitamin PLP ist. Allerdings werden von den Autoren Angaben für eine präzise Wiederfindung nur für das gemessene PLP (96%, n=3) und das Abbauprodukt 4-PA (102%, n=3) gemacht, nicht jedoch für das PL.

Die von Kimura et. al. gemessene PLP-Konzentration liegt mit einem Durchschnitt von 18,6±9,6 nmol/l (n=3) deutlich unter den sonst in der Literatur angegebenen Referenzbereichen (vergleiche Tab. 45; 17,20,22,28,29,32,36,40,54,56,78,80,92), was daran liegen kann, dass kein interner Standard für die Wiederfindungskorrektur verwendet wird.

Bei der Optimierung der chromatographischen Methode wurde besonderer Wert auf die systematische Überprüfung der Variablen der Analytik und ihrer Interaktion gelegt (Kap. 2.2.2.2). Grundlage für die Auswahl der zu erprobenden HPLC-Säulen waren die in der Literatur dominierenden Materialien (Tab. 40) sowie die Ergebnisse der eigenen Vorversuche mit den diversen Festphasenextraktionssäulen (Kap. 3.1.2.1.1).

Tab. 40: Analytische Trennsäulen der in jüngerer Zeit beschriebenen HPLC-Methoden

Autor	Erscheinungsjahr	Analytische Trennsäule
<i>Rybak et al. (73)</i>	2004	Hypersil BDS 5µ C18 150x3mm
<i>Talwar et al. (86)</i>	2003	Luna C18 4,6x250mm 5µm
<i>Bisp et al. (11)</i>	2002	Hypersil 3µ C18 (ODS) 150x4,6mm
<i>Deitrick et al. (26)</i>	2001	Aquasil C18 150x4,6mm 5µm
<i>Kimura et al. (45)</i>	1996	ODS reversed-phase column (150x4,6mm)
<i>Sharma et al. (78)</i>	1992	Ultramex C18 150x4,6mm 3µm
<i>Edwards et al. (28)</i>	1991	TSK ODS 120T 5µm 4,6x250mm RP-HPLC
<i>Hollins et al. (40)</i>	1986	Waters µBondapak C18 RP 300x4,0mm 10µm

Die Synergi Hydro Säule enthält eine C-18 Phase mit polarem Endcapping und ermöglicht eine hydrophobe und hydrophile Umkehrphasenretention. Die ausgeprägte Retention hydrophober Verbindungen mit besonderer polarer Selektivität ist eine Haupteigenschaft der Säule; aufgrund dieser für die eigene Fragestellung interessanten Eigenschaften wurden zwei Säulenlängen (150 und 250 mm) erprobt.

Die Synergi Polar Säule besteht aus einer über Etherbrücken gebundenen Phenylphase mit speziellem hydrophilen Endcapping. Das Material ermöglicht eine Umkehrphasenselektivität mit Retention von polaren und aromatischen Verbindungen.

Eine hohe Stabilität bei extremen pH-Werten zeichnet die Luna C8-Säule aus. Die sich hierdurch ergebende hohe Flexibilität begründet ihre Eignung für die Methodenentwicklung.

Die Prontosil Säule besteht aus einer C18 AQ-Phase mit speziellem Endcapping. Die Vorteile dieser stationären Phase zeigen sich laut Hersteller vor allem bei Applikationen, bei denen sehr polare Analyten getrennt werden sollen. Typischerweise wird die Säule z.B. zur Trennung von wasserlöslichen Vitaminen und organischen Säuren eingesetzt.

Um die Retentionseigenschaften der B₆-Vitamere möglichst ohne störende Matrixeinflüsse auf den ausgewählten fünf Säulen untersuchen zu können, wurden zunächst chemisch reine Vitamin B₆-Standards verwendet. Als besonders schwieriges Trennproblem stellte sich die Basislinien-Abtrennung der früh eluierenden phosphorylierten B₆-Formen dar.

Durch Veränderung der Ladung hat der pH-Wert der Probe einen erheblichen Einfluss auf die Auftrennung der B₆-Vitamere. Die Angaben über den pH-Wert des Puffers bei der Analytik des Vitamin B₆ schwanken in der Literatur zwischen pH 2 und pH 6,5 (11,28,40,45,62,86,91). In der eigenen Arbeit wurden mobile Phasen im sauren Bereich zwischen pH 2 und pH 6 erprobt. Ein saurer Puffer hat gegenüber einem neutralen oder alkalischen Puffer den Vorteil, dass die B₆-Vitamere im sauren Milieu stabiler sind. Dies gilt insbesondere für die phosphorylierten Formen (4). Die untere pH-Grenze des Puffers ergibt sich durch die begrenzte Stabilität des Säulenmaterials im sauren Bereich. Wie in Abbildung 24 (S. 53) exemplarisch gezeigt, bewirkt ein niedriger pH-Wert eine unterschiedliche Retardierung der B₆-Formen (Kap. 3.1.2.2.1). Die negativen Ladungen der Phosphatgruppe werden bei niedrigem pH-Wert der Probe mit Protonen abgesättigt, was eine bessere Bindung der entsprechenden B₆-Formen an die stationäre Phase bewirkt. Hierdurch wird die „Basislinien-Abtrennung“ der einzelnen Vitamere begünstigt. Umgekehrt führt ein hoher pH-Wert zu einer deutlich schlechteren Auftrennung der B₆-Formen. Bereits ab einem pH-Wert von 3 ist eine Abgrenzung der einzelnen Vitamere nicht möglich (Abb. 24, S. 53). Da vielfach die Säulenstabilität bis pH 2 angegeben wird, wurde ein pH-Wert von 2,5 für die weiteren Versuche zugrunde gelegt.

Wegen ihres Einflusses auf die Polarität der mobilen Phase und somit auf die Adsorptions- und Verteilungsvorgänge kann eine Variation der Ionenstärke die Retention der B₆-Vitamere beeinflussen. Die Ionenstärke des Puffers wurde wesentlich durch das zugegebene KH₂PO₄ bestimmt. Dabei wurden für die Versuche Konzentrationen zwischen 10 und 100 mmol/l erprobt. Wie in Kapitel 3.1.2.2.2 gezeigt, kam es mit steigender Konzentration auf den RP-HPLC Säulen zu einer Verkürzung der Retentionszeiten der B₆-Formen (Abb. 25, S. 54). Ein wesentlicher Einfluss auf die Peakmorphologie wurde nicht beobachtet. Bei Konzentrationen

über 50 mmol/l kam es zu einem Zusammenlaufen insbesondere der phosphorylierten Formen. Daher wurden zur Einstellung der Ionenstärke KH_2PO_4 -Konzentrationen zwischen 10 mmol/l und 50 mmol/l verwendet.

Eine gezielte Unterdrückung der Ladung der B_6 -Vitamere kann mittels Ionenpaar-Reagenzien als Zusatz im Puffer erfolgen. Dabei lagert sich eine geeignete Substanz an die geladenen Gruppen der zu analysierenden Verbindung an. Im Ergebnis entsteht ein größeres unpolares Molekül, welches von der RP-Säule länger retiniert werden kann. Für die Analytik der B_6 -Vitamere konnten sich die Oktan-1-Sulfonsäure sowie das Triethylamin durchsetzen (11,40,78,95). In den Optimierungsversuchen wurde die Wirkung dieser beiden Substanzen zur Verlängerung der Retentionszeiten systematisch untersucht.

Unter Verwendung von Triethylamin kam es im Bereich zwischen 10 und 25 mmol/l nur zu einer diskreten Veränderung der Retentionsdauer der B_6 -Vitamere. Allerdings konnte in der Frühphase des Chromatogramms eine bessere Abtrennung der B_6 -Formen voneinander erzielt werden. In Konzentrationen über 25 mmol/l war keine Optimierung der Auftrennung zu verzeichnen. Konzentrationen von über 50 mmol/l führten zu einer Vereinheitlichung der Retentionszeiten der B_6 -Vitamere und des eingeführten Internen Standards (Kap. 3.1.2.2.3). Oktansulfonat zeigte sich dagegen als sehr potentes Reagenz, um die Retentionszeiten der nichtphosphorylierten B_6 -Vitamere zu verlängern. Aufgrund dieser Wirkung ist der Gebrauch von Oktansulfonat bereits in mehreren Methoden beschrieben (11,40,78). Auch die Elution des in dieser Arbeit eingeführten Internen Standards konnte durch das Oktansulfonat deutlich verzögert werden (Kap. 3.1.2.2.3).

Der Einfluss der Säulentemperatur auf die chromatographische Auftrennung der B_6 -Formen wurde ebenfalls geprüft (Kap. 3.1.2.6). Insbesondere in nichtklimatisierten Räumen kann es in Abhängigkeit der Jahreszeit zu einer Temperaturschwankung um bis zu 15°C kommen. Die Kontrolle der Säulentemperatur kann für eine reproduzierbare Trennung der sensiblen Vitamin B_6 -Analytik daher von Bedeutung sein. So wurde in einer kürzlich publizierten Methode die Temperatur der analytischen Trennsäule mit 22°C eingestellt (8). Bei den eigenen Untersuchungen erwiesen sich aber nur Temperaturen oberhalb von 30 °C als nachteilig. Hierbei kam es zu einer Veränderung der Retentionszeiten. Deshalb wurde Raumtemperatur (20-25 °C) für die weitere Methodenoptimierung beibehalten.

Durch Variation der fluorimetrischen Parameter Anregungs- und Emissionswellenlänge konnte eine Verbesserung der Detektion erreicht werden (Kap. 3.1.2.5). Zur Verstärkung der

PLP-Fluoreszenz wurde das in mehreren Methoden erfolgreich eingesetzte Natriumbisulfid dem Elutionspuffer beigemischt (5,11,26,28,78,40,45,92). Die optimierten Wellenlängen wurden in die in der Arbeit entwickelten Methoden integriert. Eine Gegenüberstellung der eigenen Ergebnisse zu Angaben aus der Literatur (5,9,11,26,28,45,73,78) sind in Tabelle 41 zu finden.

Tab. 41: Fluoreszenzeinstellungen ausgewählter Methoden

Quelle	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge
Bates et al. (9)	325 nm	418 nm
Bisp et al. (11) / Sharma et al. (78)	328 nm	393 nm
Agoudelis et al. (5)	290 nm	389 nm
Deitrick et al. (26) / Kimura et al. (45)	300 nm	400 nm
Edwards et al. (28)	325 nm	400 nm
Ryback et al. (73)	325 nm	425 nm
Eigene Ergebnisse	290 nm	400 nm

Um die chemisch differenten Vitamin B₆-Verbindungen in einem einzigen analytischen Vorgang auftrennen zu können, wurde als weitere Optimierung der Methode eine Gradientenelution eingeführt (Kap. 3.1.2.4). Die entscheidenden Vorteile der Gradientenelution sind eine höhere Flexibilität der Methode, die Möglichkeit einer Verkürzung von Analysezeiten bei stark retardierten Substanzen sowie die Bewältigung von Trennproblemen, die isokratisch nicht zu lösen sind (11). Der Gradient wurde so gewählt, dass zu Beginn der chromatographischen Analyse ein hoher Anteil des Puffers mit sehr niedrigen Konzentrationen von organischem Lösungsmittel mit niedriger Flussrate lief. Hierdurch ließen sich die auf der stationären Phase nur schwach zurückgehaltenen polaren Verbindungen besser auftrennen. In der späteren Phase der Analyse konnte ein höherer Anteil an organischem Lösungsmittel die Elution der auf der Säule stärker retinierten B₆-Formen beschleunigen (Abb. 29; S. 56; Tab. 17, S. 31).

Da in der Routinediagnostik Proben seriell analysiert werden sollten, wurde hinter jedem einzelnen Trennungsgang ein Schritt zur Reinigung und Equilibrierung der Säule eingeführt (Kap. 3.1.2.7). Dies sollte zum einen einen Rückstand von B₆-Formen sicher ausschließen und Verschleppungsphänomene verhindern. Weiterhin wurde dadurch dem Akkumulieren von Störsubstanzen und Pufferelementen auf der analytischen Trennsäule entgegengewirkt. Insbesondere galt es bei Einsatz von Ionenpaar-Reagenzien, diese von der Säule zu waschen. Verschleppungsphänomene und Säulenverunreinigungen würden Untersuchungen in Reihe, die in der klinischen Routine durchgeführt werden müssen, unmöglich machen.

Insbesondere Oktansulfonat erwies sich als Substanz, die schwierig von der Säule zu entfernen ist. Die Reinigung wurde erreicht, indem über einen Zeitraum von 12 Minuten der Anteil des organischen Lösungsmittels auf 50% erhöht und die Flussrate auf bis zu 0,8 ml/Min gesteigert wurde (Tab. 17-18, S. 31 f.).

Zum anderen sollte die Säule vor jedem neuen Analyseschritt wieder vollständig equilibriert sein. Dies ist vor dem Hintergrund wichtig, dass die phosphorylierten B₆-Vitamere rasch nach Beginn der Analyse detektiert werden (5,11,28,26,73,78). Eine unruhige Basislinie würde die Auswertung erheblich stören. Wie in Tabelle 17 (S. 31) zu sehen ist, konnte durch eine Zurückstellung der Parameter der mobilen Phase auf die Ausgangswerte nach 12 Minuten am Ende dieses Equilibrierungsschrittes eine stabile Basislinie erreicht werden.

Der Interne Standard dient als relative Bezugsgröße und wird in bekannter Konzentration jeder Probe sowie jedem Kalibrierstandard zugesetzt. Wenn der Interne Standard seine Konzentration verändert, wird angenommen, dass sich die Konzentration des Analyten in gleicher Weise verändert. Er sollte ähnliche physikalische und chemische Eigenschaften, aber eine unterschiedliche Retentionszeit zu den B₆-Formen aufweisen. Ferner sollte die Verbindung nicht im menschlichen Stoffwechsel vorkommen. In der Literatur wird Desoxypridoxin als Interner Standard beschrieben (56,78), welches sich jedoch in den eigenen Untersuchungen als ungeeignet erwies (Kap. 3.1.2.3). Stattdessen wurde erstmalig n-Methyldopamin (C₉H₁₃NO₂) als Interner Standard erprobt. Dieses zeigt mit seinem aromatischen Ring und den sauerstoff- und stickstoffhaltigen Substituenten einen ähnlichen Aufbau wie die B₆-Vitamere (Abb. 28, S. 56); außerdem tritt es im Stoffwechsel des Menschen nicht in relevanten Konzentrationen auf. Es ließ sich nach Zugabe zu den Proben bei jedem analytischen Lauf detektieren. Selbst unter den für die Detektion der B₆-Formen eingestellten Emissions- und Extinktionswellenlängen (Kap. 3.1.2.5) konnte das n-Methyldopamin als klar abgrenzbarer Peak aufgezeichnet werden (Abb. 31, S. 59). Durch die Einführung des Internen Standards konnte ein wesentlicher Fortschritt in der Qualitätssicherung bei der Analytik der B₆-Vitamere erzielt werden (Kap. 3.1.2.3).

4.1.3 Eigenentwicklung von HPLC-Methoden zur B₆-Analytik

Zu Beginn einer HPLC-Methodenentwicklung ist nicht nur eine einzige stationäre Phase, sondern eine Reihe verschiedener Sorbentien auf ihre prinzipielle Eignung zu testen. Gewisse Vorteile in der Selektivität zwischen ähnlichen Phasen können nicht vollständig im

Voraus abgeschätzt werden. Der erste Faktor, der die Auswahl des zu testenden Sorbens beeinflusst, ist die physikalisch-chemische Eigenschaft des zu isolierenden Analyten. Die die Natur des Analyten beherrschende funktionelle Gruppe bestimmt die Möglichkeiten der Wechselwirkung mit der stationären Phase. Auch die Probenmatrix ist bei der Wahl des Sorbens von Bedeutung. Im Falle der B₆-Vitamere und ihrem Hauptmetaboliten, der 4-Pyridoxinsäure, besteht die Schwierigkeit darin, dass das Sorbens eine ausreichend starke Bindungskraft zu den sich chemisch stark unterscheidenden Verbindungen aufweisen muss.

In der als Ausgangspunkt der eigenen Untersuchungen gewählten Methode nach Kimura war für die chromatographische Auftrennung und Detektion von PL und PLP eine einfache, isokratische RP-HPLC mit fluorimetrischer Detektion beschrieben worden (45). Aufgrund der Ergebnisse der Methodenoptimierung ließ sich eine Reihe von Verbesserungen erreichen - angefangen bei der Probenvorbereitung bis hin zur Anpassung der Anregungswellenlänge (Kap. 3.1). Im Ergebnis führten diese Veränderungen zu einer besseren Auftrennung der Analyte. Das Ziel, alle B₆-Formen im menschlichen Serum mit einer chromatographischen Methode zu erfassen, konnte allerdings nicht erreicht werden (Abb. 46).

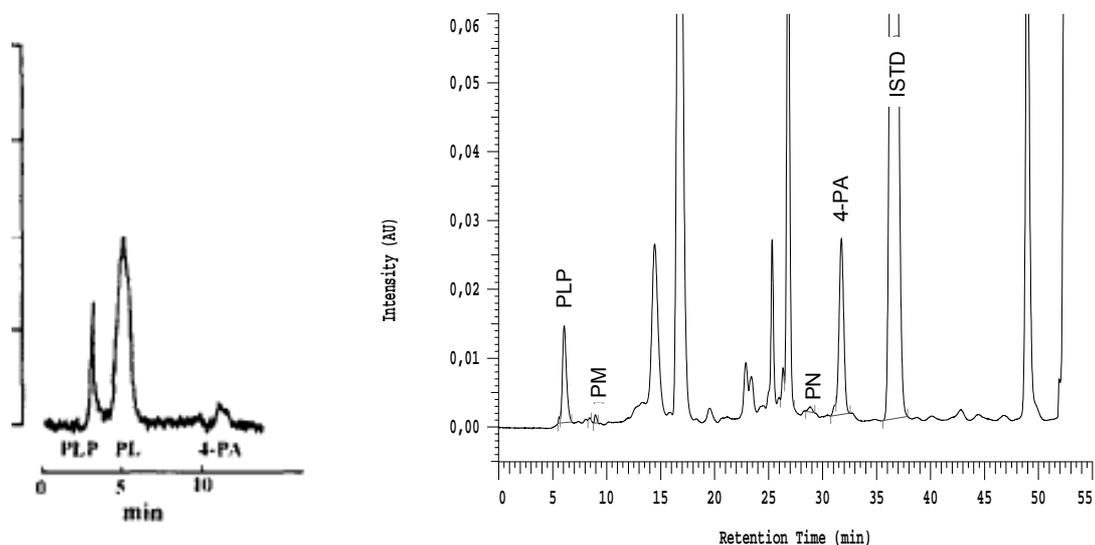


Abb. 46: Elutionsprofil der B₆-Vitamere aus Plasma/Serum nach Kimura et al. (45) und der eigenen Methode

Aus den Ergebnissen der Optimierungsversuche ist zunächst festzuhalten, dass es gelungen ist, alle B₆-Vitamere und deren Hauptmetaboliten als chemisch reine Standards in wässriger Lösung in einem analytischen Schritt bestimmen zu können (Abb. 16, S. 47).

Bei der Auftrennung von Serum wird die Analytik jedoch durch mehrere Faktoren erschwert. Zum einen verändert die Proteinpräzipitation das Probenmilieu durch Beeinflussung des pH-

Werts und der Ionenstärke derart, dass dies erhebliche Auswirkungen auf die nachfolgende chromatographische Analytik hat (Abb. 16-17, S. 47). Das Umgehen dieses Problems durch eine Proteinextraktion mittels SPE-Säulen gelang aufgrund der Heterogenität der B₆-Vitamer nicht (Kap. 3.1.1.1). Zum anderen wird die Detektion der B₆-Vitamer aufgrund im Serum vorkommender, nach der Probenaufarbeitung verbleibender Matrixbestandteile durch Peaküberlagerungen gestört. Dies gilt speziell für die im Serum in besonders niedriger Konzentration vorkommenden B₆-Formen (PM, PN, PMP).

Aufbauend auf den Optimierungsversuchen wurden die beiden in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Methoden zur Analytik der B₆-Vitamer aus menschlichem Serum entwickelt.

Bei der „Routinemethode“ (Kap. 2.2.2.2.8) erfolgt die Probenaufarbeitung durch die in Abbildung 15 (S. 46) dargestellte Eiweißpräzipitation mittels Perchlorsäure. Anschließend werden die B₆-Vitamer auf einer C18-Säule mit einem sauren Phosphatpuffer unter Anwendung einer Gradientenelution aufgetrennt. Mit dieser Methode lassen sich neben dem biologisch aktiven B₆-Vitamin PLP auch PM, PN sowie der Hauptmetabolit, die 4-Pyridoxinsäure detektieren. Zudem gelingt auch die Abtrennung des neu eingeführten Internen Standards, des n-Methyldopamins (Abb. 31, S. 59). Die Methode erfolgt ohne den Einsatz von Ionenpaar-Reagenzien. Letzteres führt zu einer deutlichen Steigerung der Säulenhaltbarkeit. Zum Schutz der analytischen Trennsäule wird eine kurze Vorsäule eingesetzt. Das PL wird als breitbasiger Peak abgetrennt, der aufgrund von überlagernden Störsubstanzen aus dem Serum nicht auswertbar ist. Die phosphorylierten B₆-Vitamer zeigen in der „Routinemethode“ nahezu die gleiche Retentionszeit und werden somit als ein Peak detektiert. Dies bedeutet, dass der gemessene PLP-Wert sich eigentlich aus PLP und PMP zusammensetzt. Aus den Ergebnissen der „Forschungsmethode“ ist allerdings davon auszugehen, dass die Konzentration des PMP im Serum sehr niedrig ist (Tab. 42, S. 87).

Aufgrund ihrer Robustheit und ihrer analytischen Zuverlässigkeit (Kap. 3.1.3) hat sich die „Routinemethode“ (Kap. 2.2.2.2.8) für die klinische Diagnostik bewährt. Das Verfahren wird nunmehr als neue Methode zur Bestimmung von Vitamin B₆ aus Serum im Zentrallabor Campus Lübeck des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein angewandt.

Bei der in der Arbeit als „Forschungsmethode“ bezeichneten HPLC-Methode erfolgt die Auftrennung der B₆-Formen auf einer langen C18-Säule unter Einsatz von Ionenpaar-Reagenzien im Puffer nach Probenaufarbeitung mittels Metaphosphorsäure. Ebenfalls wurde

eine Gradientenelution zur Erhöhung der Methodenflexibilität angewandt (Kap. 2.2.2.2.8). Nach Messung von ca. 150 Proben mit der „Forschungsmethode“ wurden diskrete Retentionszeitänderungen der B₆-Vitamere beobachtet. Dies hat zur Folge, dass einige Vitamere bei der Auftrennung nicht mehr scharf abgegrenzt werden können. Die Methode ist daher nicht für die tägliche klinische Routine geeignet, sondern stellt eine Ergänzung zur „Routinemethode“ für die spezielle Analytik einzelner B₆-Vitamere dar. So ermöglicht diese Methode die zusätzliche Quantifizierung von PL und PMP. Deren Bestimmung kann zum Beispiel bei differenzierten Fragestellungen im Rahmen von Forschungsvorhaben notwendig sein.

Der Vergleich der gemessenen Vitamin B₆-Konzentration zwischen der „Routine“- und der „Forschungsmethode“ zeigte, dass die „Forschungsmethode“ eine hohe Korrelation mit der validierten „Routinemethode“ bezüglich der PLP- und zum geringeren Teil der 4-PA-Konzentrationen aufweist (Abb. 33-34, S. 62).

In der Literatur sind bereits HPLC-Verfahren beschrieben worden, die alle bekannten B₆-Formen - jedoch in unphysiologischen Konzentrationen - aus wässrigen Standards detektieren können (5,11,28). Eine solche Detektion sowie die des eingeführten Internen Standards (n-Methyldopamin) ist in dieser Arbeit ebenfalls gelungen (Abb. 16, S. 47). Wie gezeigt werden konnte, besteht die Schwierigkeit jedoch darin, die B₆-Formen in der Serum-Matrix und in den dort vorkommenden teilweise sehr geringen Konzentrationen nachzuweisen. Bei der Analyse von Serumproben stellt die Probenaufarbeitung ein weiteres Problem dar. Die bisher für die klinische Routineanalyse entwickelten Verfahren können meist nur wenige B₆-Vitamere in physiologischer Konzentration nachweisen. So werden oft nur die in verhältnismäßig hohen Konzentrationen vorkommenden B₆-Formen PLP und 4-PA gemessen (9,45,86). Mit dem zuletzt beschriebenen HPLC-Verfahren von Bisp et al. aus dem Jahr 2002 (11) können neben PLP und 4-PA auch PL und teilweise PN detektiert werden. Im Vergleich zu den bereits publizierten Methoden lassen sich mit der in dieser Arbeit entwickelten „Routinemethode“ vier der im menschlichen Serum vorkommenden B₆-Formen detektieren.

4.2 Praktische Anwendung

4.2.1 Referenzbereiche verschiedener B₆-Formen im Serum des Menschen

Die Ermittlung des Versorgungszustands mit Vitamin B₆ wird dadurch erschwert, dass der Status von Alter, Geschlecht, Hormonspiegel, Proteinzufuhr und der Aufnahme anderer B-Vitamine abhängig ist (48,55,63,72). Zudem sind die Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen hinsichtlich der Plasma- oder Serumkonzentrationen nur bedingt miteinander vergleichbar, was methodische Ursachen haben dürfte. Wie in Kapitel 1.2.1 dargelegt wurde, differieren die Ergebnisse teilweise um den Faktor 10.

Zur Erstellung der Referenzbereiche wurde das in dieser Arbeit entwickelte und als „Routinemethode“ bezeichnete HPLC-Verfahren angewandt (Kap. 2.2.2.2.8). Das untersuchte Kollektiv setzte sich aus 110 Blutspendern aus dem Lübecker Umland zusammen. Aufgrund regelmäßiger Untersuchungen der Blutspender kann davon ausgegangen werden, dass sich diese in einem guten Gesundheitszustand befanden. Allerdings lagen keine Angaben zum Lebensstil der Probanden, insbesondere zu Ernährungsgewohnheiten, der Einnahme von Vitaminpräparaten oder zur sportlichen Aktivität vor.

Neben der generellen Etablierung von Referenzbereichen für das Zentrallabor sollte untersucht werden, ob sich eine alters- oder geschlechtsabhängige Varianz bestätigen lässt. Der Referenzbereich wurde aufgrund der hohen physiologischen Schwankungsbreite der Werte durch das 2,5%er und 97,5%er Quantil begrenzt (Kap.3.2.1.1). Die in der eigenen Arbeit ermittelten Referenzbereiche der B₆-Formen sind in Tabelle 38 (S. 66) dargestellt. Auffallend ist eine weite Streuung des Normbereiches, welche auf den weiten physiologischen Schwankungsbreiten der Indizes beruht. Eine Erklärung hierfür könnten unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten sein. Wie in Tabelle 2 (S. 8) aufgeführt, variiert der Gehalt an Vitamin B₆ in den einzelnen Nahrungsmitteln erheblich. Zudem ist der aktuelle Status abhängig vom Zeitpunkt der letzten Nahrungsaufnahme (8). Weiterhin sind in der heutigen Zeit Ernährungsergänzungen wie Vitaminpräparate in einem großen Teil der Bevölkerung beliebt, so dass mit Extremwerten zu rechnen war (Abb. 36-39, S. 64 f.).

Im untersuchten Kollektiv konnten keine signifikanten Unterschiede der PLP-, PL-, PM- und 4-PA-Konzentrationen zwischen den beiden Geschlechtern nachgewiesen werden (Kap.

3.2.1.2). Ein altersabhängiger Konzentrationsunterschied konnte für das PLP gezeigt werden. So war die gemessene Serumkonzentration von PLP in der Gruppe der unter Dreißigjährigen signifikant höher als in der über Fünfzigjährigen (Tab. 39, S. 68). Erniedrigte PLP-Konzentrationen in der Altersgruppe über 65-Jähriger sind auch in der Untersuchung von Bates et al. (9) beschrieben. Bezüglich des PM konnten mit steigendem Alter tendenziell höhere Serumkonzentrationen nachgewiesen werden (Kap. 3.2.1.3). Diese Tendenz ist allerdings nicht signifikant. Andere Autoren beschreiben, dass der Vitamin B₆-Metabolismus bei älteren Personen unverändert ist. So war zum Beispiel in einer Studie von Ferroli und Trumbo die 4-PA Konzentration in zwei Altersgruppen (20 bis 30-Jährige vs. 60 bis 70-Jährige) nicht unterschiedlich (31). Die Bestimmung des Hauptmetaboliten erscheint aufgrund der starken Abhängigkeit von einer exogenen Zufuhr und der Nierenfunktion jedoch ungeeignet, um Rückschlüsse auf den langfristigen Vitamin B₆-Status zu geben (8,9,33).

In der Tabelle 42 (S. 87) findet sich eine Gegenüberstellung der eigenen Ergebnisse zu den in Kapitel 1.2.2 aufgeführten Messwerten anderer publizierter Methoden.

Hierbei zeigen sich im eigenen Kollektiv insbesondere deutlich niedrigere PN- und PMP-Werte. Nach den in der Arbeit gewonnen Erkenntnissen besteht ein hohes Risiko der Fehlbestimmung der oben genannten B₆-Vitameren durch Störsubstanzen mit nahezu identischen Retentionszeiten. Ursächlich hierfür ist ihre wesentlich geringere Konzentration im menschlichem Serum/Plasma. So ist eine eindeutige Abgrenzung der detektierten Peaks zu anderen Matrixbestandteilen nicht immer sicher möglich. Neben methodenabhängigen Unterschieden und den jeweiligen Schwierigkeiten in der Chromatogrammauswertung spielt die Größe des untersuchten Kollektivs eine bedeutende Rolle. Extreme Abweichungen der angegebenen Konzentrationen einzelner Publikationen könnten daher hierauf zurückzuführen sein (z.B. 36,45,56,92).

Bei den im Serum in höherer Konzentration vorkommenden B₆-Formen wie z.B. PLP finden sich hingegen deutlich geringere Unterschiede der gemessenen Werte (22,28,32,40,56). Die Gefahr einer versehentlichen Fehlbestimmung durch überlagernde Matrixsubstanzen ist bei diesen Wertebereichen wesentlich kleiner.

Tab. 42: Mit HPLC-Methoden ermittelte B₆-Vitamer-Konzentrationen in Serum / Plasma (MW ± SD)

Quelle	Jahr	Anzahl Proben	PLP (nmol/l)	PL (nmol/l)	PMP (nmol/l)	PM (nmol/l)	PNP (nmol/l)	PN (nmol/l)	4-PA (nmol/l)
<i>Vanderlice (92)</i>	1980	2	74±35	-	31±10	6±8	-	180±51	-
<i>Lumeng (56)</i>	1980	6	60±10	15±5	2±1	8±3	-	30±10	40±18
<i>Chauhan (17)</i>	1981	27	72±11	251±51	15±3	164±38	-	-	-
<i>Coburn (22)</i>	1983	38	57±26	23±10	8±8	3±2,4	-	19±33	49±19
<i>Gregory (36)</i>	1985	1	167	19	12	16	-	37	-
<i>Hollins (40)</i>	1986	10	62±34	5,4±8,9	-	-	-	-	25±9
<i>Fonda (32)</i>	1989	10	58,7±7,5	5,7±0,8	-	-	-	-	25,8±2,4
<i>Edwards (28)</i>	1989	21	69±28	-	-	-	-	-	-
<i>Edwards (29)</i>	1990	10	73±34	10±17	-	-	-	-	16±11
<i>Chrisley (20)</i>	1991	28	88±18	-	-	-	-	-	-
<i>Sharma (78)</i>	1992	8	80±21	90±10	7±3	4,5±2	-	12±3	75±20
<i>Kimura (45)</i>	1996	3	19±9	6,3±1,4	-	-	-	-	3,9±3,0
<i>Siri (80)</i>	1998	88	29,2±1,3	-	-	-	-	-	-
Diese Arbeit	2007	110	55,8±32	18,9±15*	<1,0***	6±4		1,1**	29,1±16,4

* Werte mit „Forschungsmethode“ ermittelt

** Werte, die < 1,0 gemessen worden sind, sind als 0,5 nmol/l in die Berechnung des Mittelwerts eingegangen.

4.2.2 Pharmakokinetik der B₆-Vitamere

Um einen detaillierten Einblick in die Kinetik der B₆-Vitamere nach oraler oder parenteraler Aufnahme zu erlangen, wurde deren Konzentration im Plasma bis zur sechsten Stunde alle 15 Minuten untersucht. Nach 24 Stunden wurde ein abschließender Wert ermittelt. Zu Beginn des Versuches wurde der Basalwert bei den nüchternen Probanden bestimmt (Kap. 2.2.4). Nach oraler Einnahme von 100 mg Pyridoxinhydrochlorid erreichte die Konzentration von Pyridoxin im Plasma bereits nach 15 Minuten einen maximalen Wert von ca. 3500 nmol/l. Der bei dem Probanden gemessene Nüchternwert von Pyridoxin lag bei 0,2 nmol/l. Nach Erreichen des Maximalniveaus kam es zu einem stetigen Abfallen der Konzentration. Nach 24 Stunden wurde die PN-Konzentration mit 0,4 nmol/l gemessen. Das rasche Erreichen der maximalen Konzentration spricht für eine schnelle Aufnahme des Vitamers über die Magenschleimhaut. Diese Resorption erfolgt ausschließlich durch Diffusion (98).

Durch die vorherbeschriebene Möglichkeit der Konversion der Vitamere ineinander (Kap. 1.1.1) wurde ein Konzentrationsmaximum beim PL mit ca. 2200 nmol/l bereits nach 75 Minuten

erreicht (Ausgangswert 23,8 nmol/l). Beim PLP wurde das Maximalniveau von ca. 280 nmol/l nach 6 Stunden gemessen (Ausgangswert 43,7 nmol/l).

Im Gegensatz zu Pyridoxin waren die Konzentrationen der anderen B₆-Vitameren nach 24 Stunden noch deutlich erhöht (PL 107,6 nmol/l; PLP 191,3 nmol/l). Durch Einsatz der „Forschungsmethode“ gelang die Bestimmung des PM und des PMP. Auch hierbei erfolgte ein deutlicher Anstieg der Konzentrationen nach Einnahme von Pyridoxin. Das Konzentrationsmaximum wurde bei PM mit 17,3 nmol/l nach 6 Stunden gemessen (Ausgangswert 1,8 nmol/l). Das PMP erreichte nach 45 Minuten einen maximalen Wert von 4,0.

Die als Abbauprodukt der B₆-Vitameren bekannte 4-Pyridoxalsäure stieg ebenfalls rasch nach Einnahme des Pyridoxins und erreichte bereits nach 30 Minuten eine Verdreißigfachung des Basalwerts von 35,5 nmol/l. Zwischen der ersten und vierten Stunde stagnierte der Wert auf hohem Niveau um die 1400 nmol/l, um danach stetig abzufallen. Nach 24 Stunden wurde eine Konzentration von 167,7 nmol/l gemessen. Daraus lässt sich schließen, daß ein Großteil des in der hier eingenommenen Menge an Vitamin B₆ rasch ausgeschieden wird.

Im Vergleich zur oralen Applikation bei Proband A konnte nach intravenöser Zufuhr der gleichen Menge an Pyridoxin bei Proband B folgendes beobachtet werden: Die Maximalkonzentration vom applizierten PN wurde nach 15 Minuten mit ca. 3200 nmol/l gemessen, wobei davon auszugehen ist, dass das tatsächliche Maximum im Serum unmittelbar nach intravenöser Gabe erreicht wurde. Bei den anderen Vitameren wurden zwar zu früheren Zeitpunkten hohe Konzentrationen gemessen. Die Maximalwerte der Vitameren PL, PMP, PM und PLP wurden jedoch mit einem Unterschied bis zu 15 Minuten nahezu zum gleichen Zeitpunkt gemessen. Auffallend ist weiterhin der rasche Anstieg des Abbauprodukts 4-PA, insbesondere bei der intravenösen Applikation.

Im Gegensatz zu den anderen Vitameren ist beim PLP ein deutlich langsamerer Anstieg der Serumkonzentration zu beobachten. So wurde die Maximalkonzentration erst nach 6 Stunden gemessen. Der genaue Zeitpunkt des Maximalwerts wurde nicht ermittelt, liegt jedoch nach den Messungen zwischen der sechsten und 24. Stunde nach Vitamineinnahme. Daneben konnte festgestellt werden, dass die Konzentrationen der phosphorylierten B₆-Vitameren sich durch Einnahme von Pyridoxin nicht in der Weise beeinflussen lassen wie die der nicht-phosphorylierten Formen. So stieg die Konzentration von PL bei Proband A um ca. das 20fache des Ausgangswertes, die von PLP lediglich um ca. das 6fache.

In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die orale und intravenöse Zufuhr von Pyridoxin zu einem raschen Konzentrationsanstieg aller B₆-Formen führte. Zudem ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Pharmakokinetik nach oraler und intravenöser Applikation (Abb. 44-45, S. 71 f.). Die beschriebene Pharmakokinetik von PN, PLP, PL und 4-PA nach oraler Einnahme von PN stimmt weitgehend mit den Angaben der Literatur überein (85). Auch dort führte die Zufuhr von Pyridoxin zu einem raschen Anstieg der B₆-Vitamer-Konzentrationen. Daneben zeigte sich ebenfalls eine schnelle Konzentrationszunahme des Hauptmetaboliten, der 4-Pyridoxinsäure.

Die Kenntnis der Pharmakokinetik des Pyridoxins ist u.a. von besonderer Bedeutung für die Interpretation der Ergebnisse der B₆-Analytik bei Patienten; typische Konstellationen wie die starke Erhöhung des gemeinsamen Metaboliten (4-PA) lassen auf eine der Blutentnahme vorausgegangene exogene Zufuhr von Pyridoxin schließen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Vitamin B₆ umfasst eine Gruppe von sechs 3-Hydroxy-2-Methylpyridinen, die untereinander im metabolischen Gleichgewicht stehen und daher gleiche biologische Aktivität zeigen: Pyridoxin (PN), Pyridoxal (PL) und Pyridoxamin (PM) sowie ihre 5'-Phosphatester. Hauptmetabolit der B₆-Vitamere ist die 4-Pyridoxinsäure. Die klinische Relevanz der B₆-Vitamere ergibt sich aus ihrer Funktion als Coenzym in über hundert enzymatischen Reaktionen des Metabolismus. Der Vitamin-B₆-Status beim Menschen wird heute überwiegend durch Bestimmung einer oder mehrerer B₆-Formen im Serum mittels HPLC erfasst. Keine der bestehenden Methoden ermöglicht allerdings die zuverlässige Quantifizierung aller B₆-Formen; stellvertretend wird meist die Konzentration des Coenzym Pyridoxalphosphat (PLP) angegeben. In der Literatur variieren die Referenzbereiche der B₆-Vitamere methodenabhängig erheblich.

Ausgehend von einer publizierten HPLC-Methode wurden die für die Analytik relevanten Variablen einschließlich der Probenvorbereitung systematisch überprüft. Neben der traditionellen Eiweißpräzipitation wurden auch die manuelle und die automatisierte Festphasenextraktion der B₆-Formen aus Serum getestet, aber als wenig effizient wieder verworfen. Die Untersuchungen führten zum Aufbau einer optimierten HPLC-Methode, die nach Zugabe von Perchlorsäure, Internem Standard und Dikaliumhydrogenphosphat zum Serum den Zentrifugationsüberstand an einer modifizierten C18-Säule mit einer Gradientenelution auftrennt. Die Detektion der B₆-Formen erfolgt fluorimetrisch. Während der PN-Peak oft durch Matrixbestandteile überlagert und deshalb nicht auszuwerten war, konnten mit dieser Methode PLP, PM und 4-PA regelmäßig im Serum des Menschen bestimmt werden. Die Methode eignet sich für die Stuserhebung des Vitamin B₆ in der klinischen Routinediagnostik und wird erfolgreich in der Praxis eingesetzt. Für die Bestimmung weiterer B₆-Vitamere wurde ergänzend eine zweite HPLC-Methode etabliert, die sich in der Probenvorbereitung und in der Zusammensetzung des Elutionsmittels von der „Routinemethode“ unterscheidet, aber auch weniger robust ist als diese. Mit beiden Methoden wurden in einem umfangreichen Kollektiv Erwachsener beiderlei Geschlechts Referenzbereiche der Serum-Konzentrationen der B₆-Formen erstellt. Außerdem wurde die Pharmakokinetik der B₆-Formen nach Gabe von Pyridoxin untersucht.

Aufgrund erheblicher chemischer Unterschiede zwischen freien und phosphorylierten B₆-Vitaminen sowie extrem niedriger Konzentrationen einzelner Vertreter dieser Substanzklasse bleibt die zuverlässige HPLC-Analytik aller B₆-Formen im Serum des Menschen eine Herausforderung.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *Abraham GE, Hargrove T.* Effect of vitamin B₆ on premenstrual symptomatology in women with premenstrual tension syndromes: a double blind crossover study
Infertility 1980; 3:155-165
- [2] *Ahrens H, Korytnyk W.* Pyridoxine chemistry. XXI. Thin-layer chromatography and thin-layer electrophoresis of compounds in the vitamin B₆ group
Analytical Biochemistry 1969; 30(3):413-420
- [3] *Anderson BB, Peart MB, Fulford-Jones CE.* The measurement of serum Pyridoxal by a microbiological assay using *Lactobacillus casei*
Journal of Clinical Pathology 1970; 23(3):232-242
- [4] *Ang CY.* Stability of three forms of vitamin B₆ to laboratory light conditions
Journal – Association of Official Analytical Chemists 1979; 62(5):1170-1173
- [5] *Argoudelis CJ.* Simple isocratic high-performance liquid chromatographic method for the determination of all seven vitamin B₆-related compounds.
Journal of Chromatography A 1997; 790:83-91
- [6] *Bailey AL, Wright AJ, Southon S.* High performance liquid chromatography method for the determination of Pyridoxal-5-phosphate in human plasma: how appropriate are cut-off values for vitamin B₆ deficiency?
European Journal of Clinical Nutrition 1999; 53(6):448-455
- [7] *Bässler KH.* Vitamine
Steinkopf Verlag, Darmstadt; 3. Auflage 1989
- [8] *Bates CJ.* Vitamin analysis
Annals of Clinical Biochemistry 1997; 34: 599-626
- [9] *Bates CJ, Pentiova KD, Matthews N, Macdonald A.* A simple, sensitive and reproducible assay for pyridoxal 5'-phosphate and 4-pyridoxic acid in human plasma.
Clinical Chimica Acta 1999; 280:101-111
- [10] *Bender DA.* Vitamin B₆ requirements and recommendation
European Journal of Clinical Nutrition 1989; 43(5):289-309
- [11] *Bisp MR, Bor MV, Heinsvig eM, Kall MA, Nexø E.* Determination of vitamin B₆ vitamers and pyridoxic acid in plasma: development and evaluation of a high-performance liquid chromatographic assay.
Analytical Biochemistry 2002; 305(1):82-89

-
- [12] *Bor MV, Refsum H, Bisp MR, Bleie O, Schneede J, Nordrehaug JE, Ueland PM, Nygard OK, Nexo E.* Plasma vitamin B₆ vitamers before and after oral vitamin B₆ treatment: a randomized placebo-controlled study. *Clinical Chemistry* 2003; 49(1):96-99
- [13] *Borsch C.* Optimierte HPLC-Analytik zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit von freiem und gebundenem Vitamin B₆ in physiologischen Konzentrationen beim Menschen Dissertation (Agrarwissenschaft, Ökotoxikologie und Umweltmanagement) Giessen 2002
- [14] *Camp VM, Chipponi J, Faraj BA.* Radioenzymatic assay for direct measurement of plasma pyridoxal 5'-phosphate *Clinical Chemistry* 1983; 29(4):642-644
- [15] *Cattaneo M, Lombardi R, Lecchi A, Bucciarelli P, Mannucci PM.* Low plasma levels of vitamin B₆ are independently associated with a heightened risk of deep-vein thrombosis. *Circulation* 2001; 104:2442-2446
- [16] *Chabner B, Livingston D.* A simple enzymic assay for pyridoxal phosphate *Analytical Biochemistry* 1970; 34(2):413-423
- [17] *Chauhan MS, Dakshinamurti K.* Fluorometric assay of B6 vitamers in biological material *Clinical Chimica Acta* 1981; 109(2):159-167
- [18] *Chen D, De Castro L, Valcárcel M.* Flow-through sensing device based on derivative synchronous fluorescence measurements for the multi-determination of B₆ vitamers *Analytica Chimica Acta* 1992; 261:269-274
- [19] *Cheslock KE, McCully MT.* Response of human beings to a low-vitamin B₆ diet *Journal of Nutrition* 1960; 70:507-513
- [20] *Chisley BM, McNair HM, Driskell JA.* Separation and quantification of the B₆ vitamers in plasma and 4- pyridoxic acid in urine of adolescent girls by reversed-phase high-performance liquid chromatography *Journal of Chromatography* 1991; 563:369-378
- [21] *Cinnamon AD, Beaton JR.* Biochemical Assessment of Vitamin B₆ Status in Man *American Journal of Clinical Nutrition* 1970; 23(6):696-702
- [22] *Coburn SP, Mahuren JD.* A versatile cation-exchange procedure of measuring the seven major forms of vitamin B6 in biological samples *Analytical Biochemistry* 1983; 129(2):310-317
- [23] *Cohen M, Bendich A.* Safety of pyridoxine- a review of human and animal studies *Toxicology Letters* 1986; 34(2-3):129-139

-
- [24] *Collip PJ, Goldzier S, Weiss N, Soleyman Y, Snyder R.* Pyridoxine treatment of childhood bronchial asthma
Annals of Allergy 1975; 35(2):93-97
- [25] *Dalton K, Dalton MJ.* Characteristics of pyridoxine overdose neuropathy syndrome
Acta Neurologica Scandinavica 1987; 76(1):8-11
- [26] *Deitrick CL, Katholi RE, Huddleston DJ, Hardiek K, Burrus L.* Clinical adaptation of a high-performance liquid chromatographic method for the assay of pyridoxal 5'-phosphate in human plasma
Journal of Chromatography B 2001; 751:383-387
- [27] *Driskell JA.* Vitamin B₆ requirements of humans
Nutrition Research 1994; 14:293-324
- [28] *Edwards P, Liu PKS, Rose GA.* A simple liquid-chromatographic method for measuring vitamin B₆ compounds in plasma
Clinical Chemistry 1989; 35(2):241-245
- [29] *Edwards P, Liu PKS, Rose GA.* Liquid chromatographic studies of vitamin B₆ in man
Clinical Chimica Acta 1990; 190:67-80
- [30] *Ellis J, Folkers K, Levy M, Takemura K, Shizukuishi S, Ulrich R, Harrison P.* Therapy with vitamin B₆ with and without surgery for treatment of patients having the idiopathic carpal tunnel syndrome
Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology 1981; 33:331-4
- [31] *Ferrolli CE, Trumbo PR.* Bioavailability of vitamin B₆ in young and older men
American Journal of Clinical Nutrition 1994 ; 60:68-71
- [32] *Fonda ML, Brown SG, Pendleton MW.* Concentration of vitamin B₆ and activities of enzymes of B₆ metabolism in the blood of alcoholic and non-alcoholic men
Alcoholism, Clinical and Experimental Research 1989; 13(6):804-809
- [33] *Frank J.* Vitamine, Spurenelemente, Mineralstoffe, Biesalski H, Köhrle J, Schüman K
Thieme Verlag, Stuttgart; 1. Auflage 2002 S. 70-74
- [34] *Göbert A.* Untersuchung zum Vitamin-B₆-Stoffwechsel bei Gesunden und Patienten mit Nierenerkrankungen.
Dissertation (Biologisch-Pharmazeutische Fakultät) Jena 2005
- [35] *Goutieres F, Aicardi J.* Atypical presentations of pyridoxine-dependent seizures: a treatable cause of intractable epilepsy in infants
Annals of Neurology 1985; 17(2):117-120
- [36] *Gregory JF, Kirk JR.* The bioavailability of vitamin B₆ in foods
Nutrition Reviews 1981; 39(1):1-8

-
- [37] *Greiling H, Gressner AM.* Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie Schattauer Verlag, Stuttgart; 3. Auflage 1995
- [38] *Han Q, Xu, M, Tang L, Tan X, Tan X, Tan Y, Hoffman RM.* Homogeneous, nonradioactive, enzymatic assay for plasma pyridoxal 5'-phosphate *Clinical Chemistry* 2002; 48:1560-1564
- [39] *Harrisons.* Innere Medizin McGraw-Hill Übersetzung der 14. Auflage 1999; 1 Band 575-576
- [40] *Hollins B, Henderson JM.* Analysis of B6 vitamers in plasma by reversed-phase column liquid chromatography *Journal of Chromatography* 1986; 380(1):67-75
- [41] *International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry and Molecular Biology.* Nomenclature for Vitamins B-6 and Related Compounds *European Journal Biochemistry*, 1973; 40(2):325-327
- [42] *Kelly PJ, Shih VE, Kistler JP, Barron M, Lee H, Mandell R, Furie KL.* Low Vitamin B₆ but not Homocystein is associated with increased risk of stroke and transient ischemic attack in the era of folic acid grain fortification *Stroke* 2003; 34:51-54
- [43] *Killian R, Arheart K, Refsum H, Brattström L, Boers G, Ueland P, Rubba P, Palma-Reis R, Meleady R, Daly L, Witteman J, Graham I.* Low circulating Folate and Vitamin B₆ concentrations. Risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease *Circulation* 1998; 97:437-443
- [44] *Killian R, Mayer EL, Miller DP, Green R, van Lente F, Gupta A, Kottke-Marchant K, Savon SR, Selhub J, Nissen SE, Kutner M Topol EJ, Jacobson DW.* Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal phosphate. Common and independent reversible risk factors for coronary artery disease *Circulation* 1995; 92:2825-2830
- [45] *Kimura M, Kanehira K, Katsuhiko Y.* Highly sensitive and simple liquid chromatographic determination in Plasma of B₆ vitamers, especially pyridoxal 5'-phosphate *Journal of Chromatography A* 1996; 722:295-301
- [46] *Kikuchi G, Kumar A, Talmage P; Shemin D.* The enzymatic synthesis of delta-aminolevulinic acid *Journal of Biological Chemistry* 1958; 233(5):1214-1219

-
- [47] *Kurtz DJ, Levy H, Kanfer JN.* Cerebral lipids and amino acids in the vitamin B₆ deficient suckling rat
Journal of Nutrition 1972;102(2):291-298
- [48] *Lee CM, Leklem JE.* Differences in vitamin B-6 status indicator responses between young and middle-aged women fed constant diets with two levels of vitamin B-6
American Journal of Clinical Nutrition 1985; 42(2):226-234
- [49] *Leinert J, Simon I, Hoetzel D.* Methoden und deren Wertung zur Bestimmung des Vitamin-B₆-Versorgungszustandes beim Menschen
International Journal for Vitamin and Nutrition Research 1983; 53:166-178
- [50] *Leklem JE.* Vitamin B₆
Handbook of Vitamins / Lawrence J. Machlin (second edition) 1991:341-392
- [51] *Leklem JE.* Vitamin B₆: a status report
Journal of Nutrition 1990; 120 (sup 11):1503-1507
- [52] *Lin PT, Cheng CH, Liaw YP, Lee BJ, Lee TW, Huang YC.* Low pyridoxal 5'-phosphate is associated with increased risk of coronary artery disease.
Nutrition 2006; 22(11-12):1146-1151
- [53] *Linder MC.* Nutritional biochemistry and metabolism (with clinical applications)
Elsevier, New York; Second edition 1991
- [54] *Löwik MRH, Schrijver J, van den Berg H, Hulshof KFAM, Wedel M, Ockhuizen T.* Effect of dietary fiber on the vitamin B6 status among vegetarian and nonvegetarian elderly
Journal of the American College of Nutrition 1990; 9(3):241-249
- [55] *Lumeng L, Clearly RE, LI TK.* Effect of oral contraceptives on the plasma concentration of pyridoxal phosphate
American Journal of Clinical Nutrition 1974; 27(4):326-333
- [56] *Lumeng L, Lui A, LI TK.* Plasma content of B6 vitamers and its relationship to hepatic vitamin B6 metabolism
Journal of Clinical Investigation 1980; 66(4):688-695
- [57] *Machlin LJ.* Handbook of Vitamins
Marcel Dekker INC, New York; Second Edition 1991
- [58] *Mahuren JD, Coburn SP.* Determination of 5-pyridoxic acid, 5-pyridoxic acid lactone, and other vitamin B₆ compounds by cation-exchange high-performance liquid chromatography.
Methods in Enzymology 1997; 280:22-29

-
- [59] *McCoy EE, Colombini C, Strynadka K.* High-voltage electrophoresis and thin-layer chromatographic separation of vitamin B₆ compounds
Methods in Enzymology 1979; 62:410-415
- [60] *Mehansho H, Hamm MV, Henderson LM.* Transport and metabolism of pyridoxal and pyridoxal phosphate in the small intestine of the rat
Journal of Nutrition 1979; 109(9):1542-1551
- [61] *Merill AH Jr, Henderson JM.* Vitamin B₆ metabolism by human liver
Annals of the New York Academy of Sciences 1990; 585:110-7
- [62] *Millart H, Lamiable D.* Determination of pyridoxal 5'-phosphate in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography combined with spectrofluorimetric detection of 4-pyridoxic acid 5'-phosphate as a derivative
Analyst 1989; 114:1225-1228
- [63] *Miller LT, Leklem JE, Shultz TD.* The effect of dietary protein on the metabolism of vitamin B-6 in humans
Journal of Nutrition 1985; 115(12):1663-1672
- [64] *Morra M, Phillipszoon HD, D'Andrea G, Cananci AR, L'Erario R, Milone FF.* Sensory and motor neuropathy caused by excessive ingestion of vitamin B6: a case report
Functional Neurology 1993; 8(6):429-432
- [65] *Morre DM, Kirksey A, Das GD.* Effects of vitamin B₆ deficiency on the developing central nervous systems of the rat myelination
Journal of Nutrition 1978; 108(8):1260-1265
- [66] *Naoi M, Ichinose H, Takakashi T, Nagatsu T.* Sensitive assay for determination of Pyridoxal-5'-phosphate in enzymes using high-performance liquid chromatography after derivatization with cyanide
Journal of Chromatography 1988; 436(1):209-214
- [67] *Parry GJ, Bredesen DE.* Sensory neuropathy with low-dose pyridoxine
Neurology 1985; 35:1466-1468
- [68] *Petidier A, Rubio S, Gomez-Henz A, Valcárcel M.* Simultaneous and direct determination of pyridoxal, Pyridoxal 5'-phosphate, and pyridoxic acid in serum by derivative synchronous fluorescence spectroscopy
Analytical Biochemistry 1986; 157:212-220
- [69] *Phan APH, Ngo TT, Len, Lenhoff HM.* Tyrosine decarboxylase spectrophotometric assay and application in determining Pyridoxal 5'-phosphate
Applied Biochemistry and Biotechnology 1983; 8:127-133

-
- [70] *Reynolds RD, Natta CL.* Depressed plasma pyridoxal phosphate concentrations in adult asthmatics
American Journal of Clinical Nutrition 1985; 41(4):684-688
- [71] *Römpp H, Falbe J, Regitz M.* Römpp Lexikon Chemie
Thieme Verlag, Stuttgart; 10. Auflage 1997
- [72] *Rose CS, Gyorgy P, Butler M, Andres R, Norris AH, Shock NW, Tobin J, Brin M, Spiegel H.* Age differences in vitamin B-6 status of 617 men
American Journal of Clinical Nutrition 1976; 29:847-853
- [73] *Rybak ME, Pfeiffer CM.* Clinical analysis of vitamin B₆: Determination of pyridoxal 5'-phosphate and 4-pyridoxic acid in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with chlorite postcolumn derivatisation
Analytical Biochemistry 2004; 333:336-344
- [74] *Sauberlich HE, Canham JE, Baker EM, Raica N, Herman YF.* Biochemical assessment of the nutritional status of vitamin B₆ in the human
American Journal of Clinical Nutrition 1972; 25(6):629-642
- [75] *Schaumburg H, Kaplan J, Windebank A, Vick N, Rasmus S, Pleasure D, Brown MJ.* Sensory neuropathy from pyridoxine abuse: a new megavitamin syndrome
New England Journal of Medicine 1983; 309:445-448
- [76] *Schwammenthal Y, Tanne D.* Homocysteine, B-Vitamin supplementation, and stroke prevention: from observational to interventional trials.
Lancet Neurology 2004; 3:493-495
- [77] *Scriver CR.* Vitamin B₆ dependency and infant convulsions
Pediatrics 1960; 13:140-145
- [78] *Sharma SK, Dakshinamurti K.* Determination of vitamin B₆ vitamers and pyridoxic acid in biological samples
Journal of Chromatography 1992; 578:45-51
- [79] *Shephard GS, Labadarios D.* Degradation of Vitamin B₆ standard solutions
Clinical Chimica Acta 1986; 160(3):307-311
- [80] *Siri PW, Verhoef P, Kok FJ.* Vitamin B₆, B₁₂ and Folate: Association with plasma total homocysteine and risk of coronary atherosclerosis
Journal of the American College of Nutrition 1998; 17:435-441
- [81] *Smith MA, Dietrich LS.* Preparative thin-layer chromatography for the separation of the various forms of vitamin B₆ in Tissues
Biochimica et Biophysica Acta 1971; 230:262-270

-
- [82] *Snider DE Jr.* Pyridoxine supplementation during isoniazid therapy
Tubercle 1980 Dec;61(4):191-6
- [83] *Snyder JQ, Wender SH.* The separation and determination of pyridoxin, pyridoxal and pyridoxamine by paper chromatography and microbiological assay
Archives of Biochemistry and Biophysics 1953; 46(2):465-469
- [84] *Souverain S, Rudaz S, Veuthey J-L.* Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis
Journal of Chromatography B 2004; 801:141-156
- [85] *Speitling A.* Wirkung akut und chronisch hochdosierter Vitamin B₆-Gaben. Biokinetische Untersuchungen am Menschen.
Wissenschaftlicher Fachverlag Dr. Fleck, Niederkleen 1991
- [86] *Talwar D, Quasi T, McMillan DC, Kinsells J, Williamson C, O'Reilly D.* Optimisation and validation of a sensitive high-performance liquid chromatography assay for routine measurement of pyridoxal 5-phosphate in human plasma and red cells using pre-column semicarbazide derivatisation
Journal of Chromatography B 2003; 792:333-343
- [87] *Tolonen M, Schrijver J, Westermarck T, Halme M, Tuominen SEJ, Frilander M, Sarna S.*
Vitamin B₆ status of Finnish elderly. Comparison with Dutch younger adults and elderly. The effect of supplementation
International Journal for Vitamin and Nutrition Research 1988; 58:73-77
- [88] *Tsuge H.* Determination of vitamin B₆ vitamers and metabolites in a biological sample.
Methods in Enzymology 1997; 280:3-12
- [89] *Ubbink JB, Vermaak WJH, van der Merwe A, Becker PJ.* Vitamin B₁₂, Vitamin B₆, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia
American Journal of Clinical Nutrition 1993; 57:47-53
- [90] *Ubbink JB, Serfontain WJ, Becker PJ, de Villiers LS.* Determination of urinary 4-pyridoxic acid levels as 4-pyridoxic acid lactone using high-performance liquid chromatography
American Journal of Clinical Nutrition 1986; 44 (5):698-703
- [91] *Ubbink JB, Serfontain WJ, de Villiers LS.* Stability of pyridoxal-5'-phosphate semicarbazone : applications in plasma vitamin B₆ analysis and population surveys of vitamin B₆ nutritional status
Journal of Chromatography 1985; 129:947-950

-
- [92] *Vanderslice JT, Maire CE.* Liquid chromatographic separation and quantification of B6 vitamins at plasma concentration levels
Journal of Chromatography 1980; 196(1):176-179
- [93] *Vermeulen EGJ, Stehouwer CDA, Twisk JWR, van den Berg M, de Jong SC, Mackaay AJC, van Campen CMC, Visser FC, Jakobs CAJM, Bulterijs EJ, Rauwerda JA.* Effect of homocysteine-lowering treatment with folic acid plus vitamin B₆ on progression of subclinical atherosclerosis: a randomised, placebo-controlled trial
Lancet 2000; 355:517-522
- [94] *Wasynczuk A, Kirksey A, Morre DM.* Effect of maternal vitamin B₆ deficiency on specific regions of the developing rat brain: amino acid metabolism
Journal of Nutrition 1983; 113:735-745
- [95] *Williams AK.* High-Performance chromatography of vitamin B6
Methods in Enzymology 1979; 62:415-422
- [96] *Wozenski JR, Leklem JE, Miller LT.* The metabolism of small doses of vitamin B₆ in men
Journal of Nutrition 1980; 110:275-85
- [97] *Zempleni J.* Pharmacokinetics of vitamin B₆ supplements in humans
Journal of the American College of Nutrition 1995; 14(6):579-586
- [98] *Zöllner N.* Klinische Bedeutung von Vitamin B₁, B₆, B₁₂ in der Schmerztherapie
Klinische Wochenschrift 1988; 66:274-276

7 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Physikalisch-chemische Eigenschaften der B ₆ -Vitamere.....	8
Tab. 2: Vitamin-B ₆ -Gehalt ausgewählter Nahrungsmittel.....	8
Tab. 3: Empfohlene Zufuhr von Pyridoxin.....	9
Tab. 4: Auswahl Vitamin B ₆ abhängiger Enzyme	10
Tab. 5: SPE Materialien	20
Tab. 6: Retention der B ₆ -Vitamere auf Bakerbond C18; C8; Phenyl; Cyano 500 mg.....	23
Tab. 7: Retention der B ₆ -Vitamere auf Bakerbond H ₂ O Philic 100 mg	23
Tab. 8: Retention der B ₆ -Vitamere auf Strata X 30 / 60 mg	23
Tab. 9: Retention der B ₆ -Vitamere auf C8 und C18 nach Erhöhung der Ionenstärke	24
Tab. 10: Elutionsreihe mit Ionenpaar-Reagenzien auf C8 und C18.....	24
Tab. 11: Elutionsreihe mit Ionenpaar-Reagenzien auf Phenyl 500 mg.....	24
Tab. 12: Elution der B ₆ -Vitamere mit Methanol (A) und Acetonitril (B) auf Phenyl 500 mg....	24
Tab. 13: Elution der B ₆ -Vitamere mit verschiedenen Lösungsmitteln auf Phenyl 500 mg	25
Tab. 14: Elution der B ₆ -Vitamere mit verschiedenen Lösungsmitteln auf C18 500 mg	25
Tab. 15: Elutionsreihe 1 der B ₆ -Vitamere mit verschiedenen Lösungsmitteln auf Phenyl.....	25
Tab. 16: Elutionsreihe 2 der B ₆ -Vitamere mit verschiedenen Lösungsmitteln auf Phenyl.....	25
Tab. 17: Gradiententabelle „Routinemethode“	31
Tab. 18: Gradiententabelle „Forschungsmethode“	32
Tab. 19: Demographische Daten der Probanden für die Untersuchung der Kinetik	33
Tab. 20: Zeitpunkte der Blutentnahmen.....	34
Tab. 21: Retention der B ₆ -Formen auf Bakerbond C18; C8; Phenyl; Cyano-SPE	39
Tab. 22: Retention der B ₆ -Formen auf Bakerbond H ₂ O Philic SPE	40
Tab. 23: Retention der B ₆ -Formen auf Strata X SPE	40
Tab. 24: Retention der B ₆ -Formen auf C8 SPE nach Erhöhung der Ionenstärke	40
Tab. 25: Elutionsreihe mit Ionenpaar-Reagenzien auf C8 und C18 SPE	41
Tab. 26: Elutionsreihe mit Ionenpaar-Reagenzien auf Phenyl SPE.....	41
Tab. 27: Elution der B ₆ -Vitamere mit Methanol und Acetonitril auf Phenyl SPE.....	41
Tab. 29: Elution der B ₆ -Formen mit verschiedenen Lösungsmitteln auf C18 SPE.....	42
Tab. 28: Elution der B ₆ -Formen mit verschiedenen Lösungsmitteln auf Phenyl.....	42
Tab. 30: Elutionsreihe 1 der B ₆ -Formen mit verschiedenen Lösungsmitteln auf Phenyl.....	42
Tab. 31: Elutionsreihe 2 der B ₆ -Formen mit verschiedenen Lösungsmitteln auf Phenyl.....	43
Tab. 32: Änderung der Retentionszeit auf ADS C18 Säule durch Oktansulfonat.....	45

Tab. 33: Vergleich der Retentionszeit auf ADS C8 Säule mit und ohne Oktansulfonat	45
Tab. 34: Retentionszeit auf ADS C4 Säule mit Oktansulfonat	45
Tab. 35: Intra-Assay-Variationskoeffizienten der „Routinemethode“	60
Tab. 36: Inter-Assay-Variationskoeffizienten der „Routinemethode“	60
Tab. 37: Intra-Assay-Variationskoeffizienten der „Forschungsmethode“	61
Tab. 38: Normwertintervall verschiedener B ₆ -Formen	66
Tab. 39: Untersuchung altersabhängiger Unterschiede der PLP-Konzentration	68
Tab. 40: Analytische Trennsäulen der in jüngerer Zeit beschriebenen HPLC-Methoden	77
Tab. 41: Fluoreszenzeinstellungen ausgewählter Methoden.....	80
Tab. 42: Mit HPLC-Methoden ermittelte B ₆ -Vitamer-Konzentrationen in Serum / Plasma	87

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Strukturformeln der B ₆ -Vitamere	6
Abb. 2: Schematische Darstellung einer HPLC Anlage	13
Abb. 3: Ansetzen der Vitaminstandards aus Stammlösung	19
Abb. 4: Prinzip der Festphasenextraktion	22
Abb. 5: Schematische Darstellung des ADS-Festphasenextraktionsmaterials	26
Abb. 6: DC-Auftrennung der B ₆ -Vitamere nach <i>Smith et al.</i> (81)	37
Abb. 7: Schema: Fraktioniert aufgefangenes Eluat einer SPE-Säule auf einer DC Platte	37
Abb. 8: Beispiel einer zur Retention der B ₆ -Vitamere ungeeigneten SPE-Säule	38
Abb. 9: Beispiel einer zur Retention der B ₆ -Vitamere geeigneten SPE-Säule	38
Abb. 10: Auftrennen von Vitaminstandards mittels HPLC	38
Abb. 11: Voraussetzung für eine Ventilschaltung bei Online-Probenaufarbeitung	44
Abb. 12: Retention der Probenmatrix (u.a. Serumproteine) auf der RP-ADS 18 Inline-Säule	44
Abb. 13: Retention der B ₆ -Vitamere auf RP-ADS 18 Inline-Säule	44
Abb. 14: Änderung der Retentionszeit auf ADS C18 Säule durch Oktansulfonat	45
Abb. 15: Modifizierte Probenaufarbeitung	46
Abb. 16: Auftrennung von chemisch reinen Standards ohne Probenaufarbeitung	47
Abb. 17: Auftrennung von chemisch reinen Standards mit Probenaufarbeitung	47
Abb. 18: Säulenvergleich 1	49
Abb. 19: Säulenvergleich 2	50
Abb. 20: Säulenvergleich 3	50
Abb. 21: Säulenvergleich 4	51
Abb. 22 Säulenvergleich 5	51
Abb. 23: Säulenvergleich 6	52
Abb. 24: Einfluss des pH-Wertes auf das Elutionsprofil	53
Abb. 25: Einfluss der Ionenstärke	54
Abb. 26: Einfluss von Triethylamin	55
Abb. 27: Einfluss von Oktansulfonat	55
Abb. 28: Interner Standard (n-Methyldopamin)	56
Abb. 29: Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase über den chromatographischen Lauf	56
Abb. 30: Exemplarische Ergebnisse der Optimierungsversuche zur Fluoreszenzdetektion	57
Abb. 31: Auftrennung von Vitamin B ₆ Standards und Serum mit der „Routinemethode“	59
Abb. 32: Auftrennung von Serum mit der „Forschungsmethode“	61

Abb. 33: Korrelation PLP–Messwerte: „Routinemethode“ und „Forschungsmethode“	62
Abb. 34: Korrelation 4-PA–Messwerte: „Routinemethode“ und „Forschungsmethode“	62
Abb. 35: Altersverteilung der Probanden	63
Abb. 36: PLP (n=110) ; Messung mit der „Routinemethode“	64
Abb. 37: PL (n=110); Messung mit der „Forschungsmethode“	64
Abb. 38: PM (n=110), Messung mit der „Routinemethode“	65
Abb. 39: 4-PA (n=110); Messung mit der „Routinemethode“	65
Abb. 40: Geschlechtsverteilung des Gesamtkollektivs	66
Abb. 41: Vergleich der B ₆ -Vitamer-Serumkonzentration in beiden Geschlechtergruppen	67
Abb. 42: Altersgruppierung des Gesamtkollektivs (n=110)	68
Abb. 43: Vergleich der B ₆ -Vitamer-Serumkonzentration in verschiedenen Altersgruppen	69
Abb. 44: Kinetik der einzelnen B ₆ -Formen bei Proband A nach oraler Einnahme	71
Abb. 45: Pharmakokinetik der B ₆ -Formen bei Proband B nach intravenöser Zufuhr	72
Abb. 46: Elutionsprofil der B ₆ -Vitamere aus Plasma/Serum nach Kimura et al. (45) und der eigenen Methode	82

9 ANHANG

Tabelle: Meßergebnisse der B₆-Vitamine des Probandenkollektivs für Normalwerte mit der „Routine-Methode“

Proband	Alter	Geschlecht	PN (nmol/l)	PL (nmol/l)	PM (nmol/l)	PLP (nmol/l)	PMP (nmol/l)	4-PA (nmol/l)
1	49	M	< 1		8,9	43,2		118,6
2	24	M	1,6		3,5	34,1		16,0
3	31	M	1,2		9,2	35,8		33,8
4	24	W	2,5		5,3	38,6		12,9
5	21	M	6,7		6,9	116,6		23,0
6	29	M	1,4		10,2	15,6		6,9
7	31	W	3,5		4,5	82,5		42,9
8	25	W	1,9		4,1	38,4		9,4
9	64	M	2,9		5,1	34,5		43,6
10	59	W	3,4		5,0	31,2		14,3
11	51	M	1,3		15,9	53,1		61,0
12	22	M	6,2		3,9	26,6		10,7
13	25	M	< 1		10,3	38,1		20,0
14	25	M	< 1		11,0	16,1		9,0
15	38	M	< 1		4,9	45,8		18,9
16	22	M	< 1		2,8	87,7		40,7
17	40	W	< 1		5,8	19,1		16,8
18	23	M	< 1		12,9	29,1		9,9
19	27	M	1,4		9,1	39,0		11,8
20	40	W	< 1		3,6	42,9		15,8
21	21	M	< 1		2,4	77,4		21,9
22	56	W	< 1		11,1	13,5		13,2
23	36	M	1,7		5,3	40,8		17,4
24	41	W	< 1		5,7	18,3		14,2
25	39	W	< 1		2,3	46,9		18,6
26	41	M	< 1		3,1	126,2		79,3
27	37	W	< 1		1,7	20,2		6,8
28	45	M	< 1		5,9	36,4		13,6
29	42	M	< 1		15,0	40,3		59,9
30	54	M	< 1		3,1	32,2		17,2
31	60	M	< 1		3,9	43,1		27,4
32	26	M	1,9		5,2	76,6		37,3
33	44	M	< 1		4,0	40,0		22,2
34	53	W	2,1		5,7	33,7		20,5

Proband	Alter	Geschlecht	PN (nmol/l)	PL (nmol/l)	PM (nmol/l)	PLP (nmol/l)	PMP (nmol/l)	4-PA (nmol/l)
35	23	W	1,2		2,0	45,5		36,6
36	21	M	< 1		3,2	57,8		29,6
37	25	M	1,3		6,3	88,9		41,7
38	28	M	1,9		8,3	41,4		32,2
39	44	M	< 1		3,1	49,1		20,9
40	30	W	< 1		2,4	49,5		42,0
41	26	M	< 1		5,9	38,2		15,2
42	23	W	< 1		4,6	85,6		24,6
43	20	M	< 1		6,2	62,5		17,4
44	45	M	< 1		1,9	40,9		18,8
45	42	M	< 1		4,6	64,2		15,0
46	21	M	< 1		5,0	91,4		27,5
47	57	M	< 1		16,9	24,1		7,1
48	32	W	1,2		15,7	7,3		7,6
49	22	M	1,7		2,1	91,1		25,3
50	18	W	1,0		2,3	47,6		13,6
51	49	W	< 1		5,4	42,7		36,9
52	32	W	< 1		2,8	24,6		18,6
53	50	M	1,0		3,0	49,2		26,7
54	44	W	1,7		3,4	172,5		45,4
55	55	M	< 1		12,1	40,0		24,6
56	24	M	< 1		4,8	69,0		30,4
57	20	M	< 1		3,0	79,8		45,3
58	28	M	1,1		4,0	128,3		46,0
59	32	W	1,0		6,2	60,3		23,7
60	44	W	3,4		11,5	22,9		20,2
61	42	M	1,0		4,8	76,0		30,3
62	55	M	< 1		9,5	58,1		29,7
63	49	M	<1		3,5	53,0		27,7
64	39	M	< 1		4,6	126,1		36,0
65	47	W	< 1		4,5	42,4		26,1
66	29	W	< 1		3,9	71,1		33,8
67	51	W	1,6		14,5	70,9		51,0
68	22	M	< 1		4,9	103,7		29,5
69	28	M	< 1		4,8	107,7		32,7
70	38	M	< 1		4,2	31,8		19,6
71	52	M	< 1		4,4	85,1		36,2
72	64	M	1,9		3,2	26,3		38,4

Proband	Alter	Geschlecht	PN (nmol/l)	PL (nmol/l)	PM (nmol/l)	PLP (nmol/l)	PMP (nmol/l)	4-PA (nmol/l)
73	26	M	< 1		3,0	94,6		26,8
74	37	M	< 1		3,2	39,9		24,9
75	41	M	1,0		4,8	60,2		39,7
76	31	W	< 1		4,6	107,2		51,9
77	27	W	1,4		16,6	43,0		24,2
78	20	W	< 1		2,8	59,2		29,6
79	37	W	1,3		10,4	88,7		59,5
80	19	W	1,3		3,5	27,3		23,8
81	29	W	< 1		4,2	70,8		35,2
82	21	W	< 1		3,0	44,0		41,2
83	20	M	< 1		2,7	80,8		23,0
84	25	W	< 1		3,0	36,0		14,6
85	36	M	1,8		7,5	44,6		25,6
86	47	M	< 1		3,5	38,8		33,3
87	24	M	1,9		7,1	65,0		48,8
88	26	M	< 1		9,2	72,8		48,7
89	21	W	4,3		6,7	52,6		16,9
90	45	M	< 1		3,9	138,1		43,7
91	30	M	< 1		4,7	57,9		26,3
92	40	W	< 1		2,0	29,3		22,7
93	42	M	< 1		2,9	17,0		12,1
94	45	M	1,3		10,5	63,6		29,3
95	27	M	< 1		2,7	35,0		21,0
96	20	M	1,0		4,9	89,4		31,2
97	37	M	< 1		4,4	27,1		18,2
98	33	M	< 1		3,8	53,1		40,2
99	23	W	< 1		5,9	84,1		20,2
100	30	M	3,9		17,5	37,9		34,9
101	41	W	2,1		23,0	35,8		39,2
102	23	M	< 1		5,9	57,1		21,8
103	26	M	11,4		7,2	126,8		35,9
104	62	M	< 1		6,5	26,4		32,1
105	40	M	< 1		3,7	44,4		32,4
106	32	W	1,0		5,6	9,0		13,7
107	23	W	< 1		3,4	139,3		73,4
108	49	W	< 1		3,2	55,0		43,7
109	28	M	1,4		10,6	19,9		25,1
110	52	M	< 1		5,0	22,6		24,8

Tabelle: Meßergebnisse der B₆-Vitamine des Probandenkollektivs für Normalwerte mit der „Forschungs-Methode“

Proband	Alter	Geschlecht	PN (nmol/l)	PL (nmol/l)	PM (nmol/l)	PLP (nmol/l)	PMP (nmol/l)	4-PA (nmol/l)
1	49	M	< 1	57,3	2,0	54,5	< 1	129,5
2	24	M	< 1	20,2	1,0	35,2	1,8	34,8
3	31	M	< 1	19,6	< 1	40,4	< 1	46,7
4	24	W	< 1	16,4	< 1	44,8	1,2	22,2
5	21	M	< 1	37,3	2,7	124,2	< 1	33,8
6	29	M	< 1	3,5	5,6	20,7	< 1	21,7
7	31	W		39,7	1,0	90,1	< 1	62,1
8	25	W		13,5	< 1	42,7	< 1	19,9
9	64	M		15,7	2,3	29,6	1,7	50,9
10	59	W	< 1	12,2		34,4	1,0	24,6
11	51	M	< 1	66,8	13,7	61,3	< 1	77,2
12	22	M		8,3	< 1	27,7	1,1	27,8
13	25	M		7,1		46,3	< 1	31,2
14	25	M		4,4	< 1	20,7	< 1	28,2
15	38	M		13,6	< 1	57,0	1,1	50,7
16	22	M		18,0	2,3	91,7	1,0	57,3
17	40	W		6,9	< 1	25,3	1,1	39,4
18	23	M		5,3	< 1	29,9	< 1	23,7
19	27	M		5,2	< 1	42,1	< 1	49,3
20	40	W		10,7	< 1	49,7	1,1	37,3
21	21	M	< 1	19,6	2,5	81,4	< 1	26,9
22	56	W		1,6	< 1	16,9	1,4	24,2
23	36	M		5,2		43,3	1,0	34,1
24	41	W		2,4	< 1	24,6	< 1	22,2
25	39	W	< 1	15,0	1,6	45,9	1,0	30,2
26	41	M		39,3	6,5	115,4	1,3	84,6
27	37	W	< 1	3,5	1,0	16,1	1,0	30,6
28	45	M		10,2	1,5	40,6	< 1	36,0
29	42	M		46,8	2,7	46,5	1,0	87,2
30	54	M	1,1	7,5	1,6	32,1	< 1	30,2
31	60	M		13,7	< 1	47,8	< 1	37,1
32	26	M		20,0	2,8	83,0	1,1	41,9
33	44	M		15,3	1,2	43,0	< 1	38,0
34	53	W		12,9	1,4	34,5	< 1	31,0
35	23	W	1,7	20,4	1,2	42,8	1,0	51,1
36	21	M		18,5	2,3	61,7	1,2	34,8

Proband	Alter	Geschlecht	PN (nmol/l)	PL (nmol/l)	PM (nmol/l)	PLP (nmol/l)	PMP (nmol/l)	4-PA (nmol/l)
37	25	M		28,7	4,6	84,9	1,2	40,8
38	28	M		23,4	1,5	52,6	3,3	53,5
39	44	M		8,7	2,4	51,3	1,6	24,3
40	30	W		22,8	2,0	47,8	< 1	51,8
41	26	M		10,6	1,7	42,0	1,0	28,4
42	23	W		31,5	2,5	80,0	1,3	39,5
43	20	M		18,9	2,5	66,3	1,2	24,4
44	45	M		14,5	1,7	37,1	< 1	15,1
45	42	M		13,7	3,8	64,2	< 1	21,6
46	21	M		36,4	4,7	87,5	1,4	29,9
47	57	M		7,4	1,9	28,6	2,7	18,5
48	32	W		8,7	< 1	21,9	< 1	16,3
49	22	M	2,0	28,4	5,5	85,2	1,0	26,9
50	18	W	< 1	9,3	2,2	37,3	1,2	12,9
51	49	W	< 1	21,1	6,2	35,9	1,0	39,9
52	32	W	2,2	8,1	< 1	17,4	1,0	19,2
53	50	M	3,9	12,7	3,5	41,6	< 1	27,5
54	44	W		66,0	2,8	147,2	< 1	43,7
55	55	M		21,9	2,8	33,0	< 1	21,5
56	24	M	< 1	19,8	4,0	56,9	< 1	24,9
57	20	M	< 1	90,8	4,3	79,1	< 1	48,5
58	28	M	< 1	53,2	2,4	108,6	< 1	39,7
59	32	W		35,5	< 1	55,2	1,0	17,6
60	44	W		9,5	1,3	17,6	1,0	21,4
61	42	M		13,9	2,1	60,8	1,3	31,2
62	55	M		15,1	1,3	42,1	< 1	31,3
63	49	M	3,7	12,4	2,8	40,6	< 1	17,1
64	39	M	7,9	34,6	1,8	103,9	< 1	33,4
65	47	W		14,4	2,0	33,2	< 1	24,0
66	29	W	5,2	13,1	2,3	54,8	< 1	31,9
67	51	W		29,4	1,5	55,7	1,0	45,4
68	22	M	4,4	35,4	1,7	85,1	< 1	26,1
69	28	M	6,1	37,2	1,6	86,4	1,0	32,9
70	38	M		4,0	< 1	24,0	< 1	14,9
71	52	M		14,6	2,5	69,2	< 1	31,3
72	64	M		11,0	1,5	18,8	< 1	33,1
73	26	M	1,1	12,2	3,4	76,2	< 1	24,9
74	37	M		9,6	1,8	30,8	< 1	19,6

Proband	Alter	Geschlecht	PN (nmol/l)	PL (nmol/l)	PM (nmol/l)	PLP (nmol/l)	PMP (nmol/l)	4-PA (nmol/l)
75	41	M		13,9	3,6	53,4	1,1	34,2
76	31	W		70,0	2,7	89,8	< 1	46,4
77	27	W	6,7	12,2	3,0	33,0	< 1	23,2
78	20	W	2,0	11,3	2,6	46,8	< 1	24,0
79	37	W		33,4	5,0	70,8	< 1	51,2
80	19	W	1,1	3,8	< 1	15,6	< 1	9,8
81	29	W		9,7	1,7	52,2	1,0	29,1
82	21	W	5,0	12,6	2,7	38,3	< 1	36,0
83	20	M	1,3	29,4	< 1	67,4	< 1	19,6
84	25	W	1,1	4,5	< 1	26,7	< 1	12,2
85	36	M		11,4	1,9	35,6	< 1	20,0
86	47	M		13,3	1,2	32,9	< 1	25,5
87	24	M		18,9	2,4	56,2	< 1	45,2
88	26	M		27,3	2,6	61,6	< 1	25,5
89	21	W	6,9	11,7	2,1	39,6	< 1	12,3
90	45	M	4,5	48,4	1,3	111,0	< 1	33,0
91	30	M		14,7	1,5	43,2	1,2	22,1
92	40	W	< 1	7,9	< 1	20,8	< 1	16,3
93	42	M		10,8	1,1	22,1	< 1	17,1
94	45	M		21,8	2,4	57,7	1,8	21,7
95	27	M	2,3	9,5	< 1	23,2	1,1	17,6
96	20	M		12,6	2,4	70,1	< 1	25,5
97	37	M		4,1	< 1	18,4	< 1	17,2
98	33	M		20,3	2,3	46,6	< 1	38,7
99	23	W		10,9	< 1	65,4	< 1	17,8
100	30	M	1,9	16,7	< 1	33,1	< 1	30,2
101	41	W		11,4	< 1	33,5	< 1	37,5
102	23	M		5,0	< 1	46,2	< 1	23,9
103	26	M	1,8	21,3	< 1	103,1	< 1	32,8
104	62	M		16,2	1,3	21,8	< 1	29,9
105	40	M		12,7	1,2	30,8	< 1	28,5
106	32	W		2,9	< 1	8,5	< 1	11,5
107	23	W	5,4	21,8	< 1	115,3	< 1	70,0
108	49	W		10,6	< 1	49,6	< 1	40,6
109	28	M		10,5	< 1	20,3	< 1	23,3
110	52	M		8,6	< 1	21,5	< 1	24,5

Pharmakokinetik der B₆-Vitamere Proband A mit "Routinemethode"

Zeit (h)	PN (nmol/l)	PL (nmol/l)	PM (nmol/l)	PLP (nmol/l)	PMP (nmol/l)	4-PA (nmol/l)
0	0,2	23,8	2,3	43,7	-	33,4
0,25	3496,1	194,7	-	67,5	-	152,8
0,5	3360,8	1092,5	-	94,2	-	1037,2
0,75	1749,2	1439,8	-	114,5	-	1380,3
1	836,5	2008,4	-	121,8	-	1553,1
1,25	403,9	2232,6	-	148,7	-	1639,7
1,5	277,0	2170,6	-	154,0	-	1615,1
1,75	201,1	2000,5	-	174,1	-	1611,1
2	147,6	2011,2	-	183,8	-	1630,9
2,25	96,3	1919,1	-	203,2	-	1597,8
2,5	87,9	1575,5	-	208,8	-	1573,9
3,75	66,5	1047,4	-	203,7	-	1498,8
4	42,2	1047,5	-	237,1	-	1530,5
4,5	14,7	1110,9	-	238,6	-	1367,9
5	5,7	903,2	-	255,7	-	1196,6
5,5	2,5	633,9	-	270,1	-	931,1
6	1,1	453,1	-	276,7	-	681,1
24	0,4	107,6	2,3	191,3	-	137,5

Pharmakokinetik der B₆-Vitamere Proband A mit „Forschungsmethode“

Zeit (h)	PN (nmol/l)	PL (nmol/l)	PM (nmol/l)	PLP (nmol/l)	PMP (nmol/l)	4-PA (nmol/l)
0	< 1,0	13,7	1,8	39,6	1,0	38,5
0,25	3365,5	144,2	4,1	53,4	1,4	161,8
0,5	3246,1	902,2	4,9	73,6	2,2	1020,8
0,75	1693,4	1321,5	5,9	87,3	4,0	1264,5
1	840,2	1667,4	7,3	96,8	2,1	1413,0
1,25	415,9	1930,1	5,6	114,6	2,3	1476,1
1,5	296,2	1831,2	9,8	115,8	2,6	1479,0
1,75	219,7	1714,2	8,9	137,8	2,4	1464,5
2	172,5	1721,1	10,2	146,3	2,0	1488,1
2,25	107,6	1615,6	11,8	157,1	1,6	1481,3
2,5	90,3	1318,5	14,3	158,2	2,0	1431,4
3,75	61,7	1223,1	10,8	143,6	1,3	1400,6
4	35,0	1158,7	13,0	156,1	1,4	1378,1
4,5	1,4	907,2	13,7	163,9	1,0	1262,5
5	< 1,0	719,7	15,5	181,9	1,1	1154,6
5,5	< 1,0	548,9	14,4	193,9	1,1	954,0
6	< 1,0	400,6	17,3	198,7	1,3	695,6
24	< 1,0	65,1	12,3	148,0	1,2	167,7

Pharmakokinetik der B₆-Vitamere Proband B mit „Routinemethode“

Zeit (h)	PN (nmol/l)	PL (nmol/l)	PM (nmol/l)	PLP (nmol/l)	PMP (nmol/l)	4-PA (nmol/l)
0	1,2	29,2	1,9	109,5	-	26,3
0,25	3165,5	1704,2	-	185,7	-	777,2
0,5	1302,0	3587,3	-	235,0	-	1593,6
0,75	804,0	3601,0	-	247,1	-	1774,7
1	442,4	3821,9	-	271,1	-	1921,2
1,25	234,5	3771,4	-	285,6	-	1969,8
1,5	146,2	3602,9	-	316,6	-	1837,2
1,75	109,2	3412,7	-	338,8	-	1950,8
2	77,3	2960,3	-	350,5	-	1918,2
2,25	47,5	2645,2	-	370,9	-	1820,8
2,5	31,7	2064,9	-	368,4	-	1734,1
3,75	18,8	1906,0	-	377,9	-	1658,0
4	16,0	1668,9	-	393,0	-	1637,6
4,5	6,5	1406,1	-	396,9	-	1419,3
5	6,2	1123,3	-	408,9	-	1299,4
5,5	3,4	756,1	-	469,8	-	905,2
6	2,9	711,8	-	489,3	-	749,0
24	0,5	195,6	2,3	459,3	-	337,3

Pharmakokinetik der B₆-Vitamere Proband B mit „Forschungsmethode“

Zeit (h)	PN (nmol/l)	PL (nmol/l)	PM (nmol/l)	PLP (nmol/l)	PMP (nmol/l)	4-PA (nmol/l)
0	< 1	< 1	6,5	74,6	0,7	45,1
0,25	2951,4	1439,0	10,4	113,6	1,3	772,3
0,5	1188,2	3142,0	12,8	129,6	1,4	1450,4
0,75	703,7	3746,7	13,4	131,4	1,4	1605,4
1	360,8	3249,9	14,1	137,5	1,3	1670,6
1,25	180,3	3087,8	14,3	140,2	1,2	1704,6
1,5	115,1	3087,5	17,3	177,7	1,0	1694,0
1,75	93,8	2826,2	17,9	192,7	1,2	1679,9
2	23,6	2448,0	16,3	196,3	0,9	1664,2
2,25	< 1,0	2126,9	17,2	192,4	0,8	1620,5
2,5	< 1,0	1617,5	16,9	190,1	0,9	1601,1
3,75	< 1,0	1436,5	16,1	194,7	0,8	1515,8
4	< 1,0	1337,9	13,1	200,4	0,8	1524,5
4,5	< 1,0	999,1	17,9	205,8	0,6	1336,1
5	< 1,0	838,2	13,1	223,6	0,5	1233,4
5,5	< 1,0	535,8	19,5	239,6	0,5	837,2
6	< 1,0	474,1	14,8	256,1	0,6	667,0
24	< 1,0	157,0	15,5	271,9	0,5	337,5

Messung in Serie mit „Routinemethode“ zur Bestimmung der Präzision

Kontrolle 1	PLP (nmol/l)	PM (nmol/l)	PN (nmol/l)	4-PA (nmol/l)
Messung Nr.				
1	35,2	2,70	0,63	19,5
2	35,3	2,37	0,65	19,1
3	35,6	2,22	0,51	19,0
4	35,7	2,11	0,49	20,0
5	35,9	2,01	0,65	19,0
6	36,4	2,33	0,71	19,2
7	35,2	2,39	0,54	18,8
8	34,9	2,11	0,43	18,7
9	35,9	2,64	0,55	19,3
10	36,1	2,51	0,60	19,0
11	36,4	1,59	0,52	19,1
12	35,0	2,67	0,46	19,0
13	35,6	2,72	0,52	18,7
14	36,6	2,75	0,51	19,1
15	35,5	3,03	0,54	19,4
16	36,0	2,85	0,51	18,9

Kontrolle 2	PLP (nmol/l)	PM (nmol/l)	PN (nmol/l)	4-PA (nmol/l)
Messung Nr.				
1	95,6	2,76	0,37	20,5
2	95,5	2,67	0,30	20,2
3	98,1	2,88	0,38	20,7
4	94,8	2,79	0,26	20,0
5	95,5	2,80	0,38	19,9
6	95,9	2,72	0,37	20,7
7	97,2	2,70	0,36	21,0
8	96,6	2,71	0,48	20,4
9	96,3	2,68	0,25	20,7
10	96,4	2,67	0,22	20,6
11	95,9	2,48	0,30	20,5
12	96,7	2,77	0,25	20,5
13	96,9	2,85	0,22	20,1
14	96,7	2,87	0,30	20,0
15	91,3	2,75	0,28	20,5

10 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. M. Seyfarth für die Überlassung des Dissertationsthemas, das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit sowie für die Bereitstellung hervorragender Rahmenbedingungen.

Bei Herrn Dr. rer. nat. L. Dibbelt möchte ich mich ganz herzlich für die exzellente fachliche Betreuung sowie die Durchsicht der Arbeit bedanken. Seine freundliche und unermüdliche Unterstützung hat erheblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Er ist mir mit seiner Art des wissenschaftlichen Arbeitens und seiner kritischen, klaren Gedankenführung ein Vorbild.

Ein herzlicher Dank gilt Frau Spieß und Frau Stark, die mir bei der Arbeit im Labor und bei allen Fragen gerne und geduldig geholfen haben.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Edouard W. Sanson
Geburtsdatum / -ort: 01. Juni 1978 / St. Germain en Laye, Frankreich
Nationalitäten: Deutsch / Französisch
Familienstand: Ledig

Schul Ausbildung

1979 - 1982 Mexiko City
1982 - 1983 École Maternelle et Primaire, Maisons Laffitte, Frankreich
1983 - 1985 British International Primary School, Stockholm
1985 - 1988 Lycée Francais St. Louis, Stockholm
1988 - 1989 Frankfurt International School, Oberursel
1989 - 1997 Kippenberg Gymnasium, Bremen
23.06. 1997 Abitur

Zivildienst

1997 - 1998 Sanitäter im Patiententransport / Krankenwagen
Zentralkrankenhaus St. Jürgen Strasse Bremen

Studium

1998 - 2005 Studium der Humanmedizin
1998 - 2000 Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
14.09. 2000 Physikum
2000 - 2004 Medizinische Universität zu Lübeck
14.08. 2001 1. Staatsexamen
23.03. 2004 2. Staatsexamen
2004 - 2005 Georg-August-Universität Göttingen
20.04. 2005 3. Staatsexamen
29.04. 2005 Approbation als Arzt

Praktisches Jahr

Innere Medizin: St. Joseph-Stift Bremen (Prof. Dr. med. S. Teyssen)
Neurologie: Klinikum Bremen-Ost (Prof. Dr. med. G. Schwendemann)
Chirurgie: Mount Sinai School of Medicine, New York (Dr. R.J. Grossi M.D.)

Dissertation

02/2002- -01/2006 Experimenteller Teil der Dissertationsarbeit „HPLC Analytik der B₆-Vitamere: Methodenoptimierung und Referenzwerterstellung“ im Zentrallabor des UK S-H Campus Lübeck (Prof. Dr. med. M. Seyfarth)

Beruf

Seit 01.02.2006 Assistenzarzt am Universitätsklinikum der RWTH Aachen
Medizinische Klinik III (Prof. Dr. med. Chr. Trautwein)