



Methodenvergleich zwischen Recipe und Chromsystems Reagenzkit für Vitamin C Messung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Luciana Rocha de Assis, BMA HF 18-21 A

1. Zusammenfassung

Vitamin C im Blut ist durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) zu bestimmen. Da die Messung bei einem Ringversuch zu tief war, möchte das MCL-Labor Reagenzkits von einer anderen Firma evaluieren. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Recipe Kit-Methode mit dem Chromsystems Kit (CS) zu vergleichen, um die Analyse in der Routine einzusetzen. Vierzig Proben wurden mit beiden HPLC-Kits bestimmt und mit den Verfahren von Passing-Bablok und Bland Altman analysiert. Eine Interferenz in der Messung anderer Vitamine auf der gleichen Anlage ist zu erkennen. Die Interferenz konnte mit einer besseren Spüllösung behoben werden. Die Methoden sind gut miteinander korreliert. Das Chromsystems Kit kann in der Routine eingesetzt werden.

2. Einleitung

Ascorbinsäure ist ein wasserlösliches Vitamin und wird über die Nahrung aufgenommen. Es ist ein Antioxidans [1] und ein wichtiger Bestandteil der Kollagensynthese [2]. Quellen sind Obst und Gemüse. Eine Mangel über lange Zeit ist tödlich [3], jedoch kann dies durch die Messung im Labor frühzeitig erkannt werden. Derzeit bestimmt das MCL-Labor Vitamin C in Seren mittels dem Recipe Reagenzien-Kit, was jedoch im Ringversuch von Oktober 2020 nicht konform war. Das Labor möchte QK von einem neuen Lot kaufen. Recipe hat jedoch kein weiteres Lot zur Verfügung, dies motiviert MCL die Evaluation eines neuen Kits durchzuführen.

Das MCL-Labor misst auch Vitamin B2 auf der gleichen Anlage (Abbildung 1). Damit es in der Routine einsetzbar ist, sollte die Vitamin C Messung keine Störung bei anderen Messungen bewirken.



Abb. 1: Anlage HPLC1 von Agilent [1]

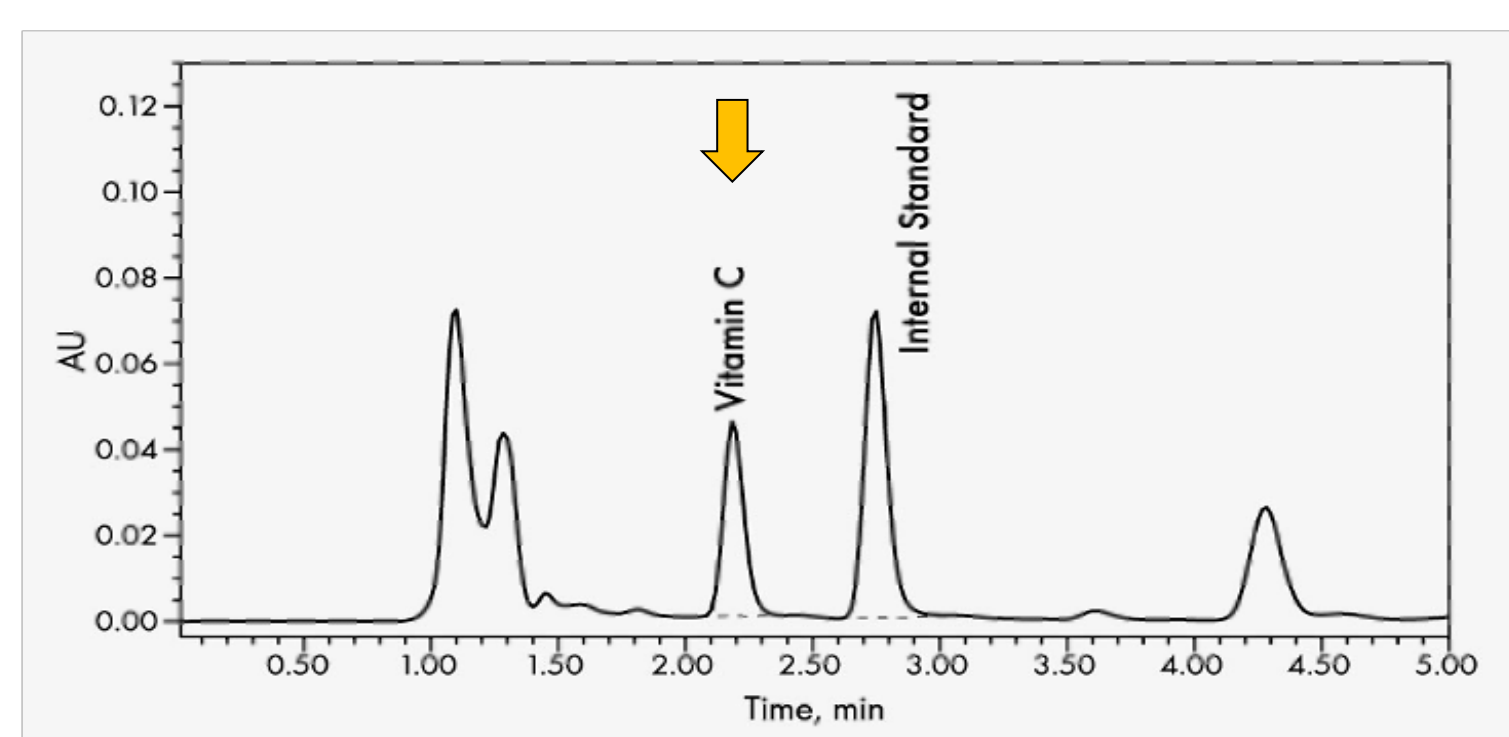


Abb. 2: Chromatogramm Beispiel von Vitamin C Messung mittels HPLC [2]

3. Ziele und Fragestellungen

Ziel:

Reagenzvergleich von Recipe gegen Chromsystems für Vitamin C Bestimmung mittels HPLC Analytik, um die Analyse in der Routine umzustellen.

Fragestellung:

Korrelieren die Messwerte der beiden Methoden (Kit Recipe gegen Kit Chromsystems) nach den vom Labor MCL definierten Kriterien, damit die Analyse in der Routine eingesetzt werden kann?

4. Material, Methodik, Vorgehen

40 Proben wurden mit beiden Methoden bestimmt, Recipe und Chromsystems. Die Methoden unterscheiden sich im Vorgehen für Probenextraktion bei der Proteinausfällung (Recipe hat einen Inkubationsschritt, der bei CS fehlt), und in der Programmierung von dem Lauf, wie zum Beispiel Flussrate (1,3ml/min bei Recipe gegen 1,5ml/min bei CS) und Wellenlänge für den Detektor (243nm bei Recipe gegen 245nm bei CS). Unterschiede in Reagenzien, Eluate und Säule sind nicht bekannt da diese von den Herstellern als Firmengeheimnis deklariert sind. Ein Beispiel eines Chromatogramms von CS ist in Abbildung 2 dargestellt. Nach der Bestimmung einer Serie wurde die Anlage mit Methanol 20% gespült.

Die Daten wurden zum Vergleich der 2 Methoden mit Passing-Bablok und Bland Altman statistisch ausgewertet.

5. Ergebnisse/ Resultate

In den Verfahren Bland-Altman und Passing-Bablok haben die Methoden CS und Recipe einen Korrelationskoeffizienten von 0,996. Die Abbildung 3 zeigt die Regressionsgerade nach Passing-Bablok zu $y = -0,1858 + 0,9723 x$. Das 95% Konfidenzintervall für "Intercept" liegt für Vitamin C zwischen -1,413 und 0,3792. Das 95% Konfidenzintervall für die "Slope" beträgt 0,9466 bis 1,002.

In Bland-Altman's Regression (Abbildung 4) 95% Sicherheitsintervall von "Limit of Agreement" liegt zwischen -7.8 bis 5.3 $\mu\text{mol/l}$.

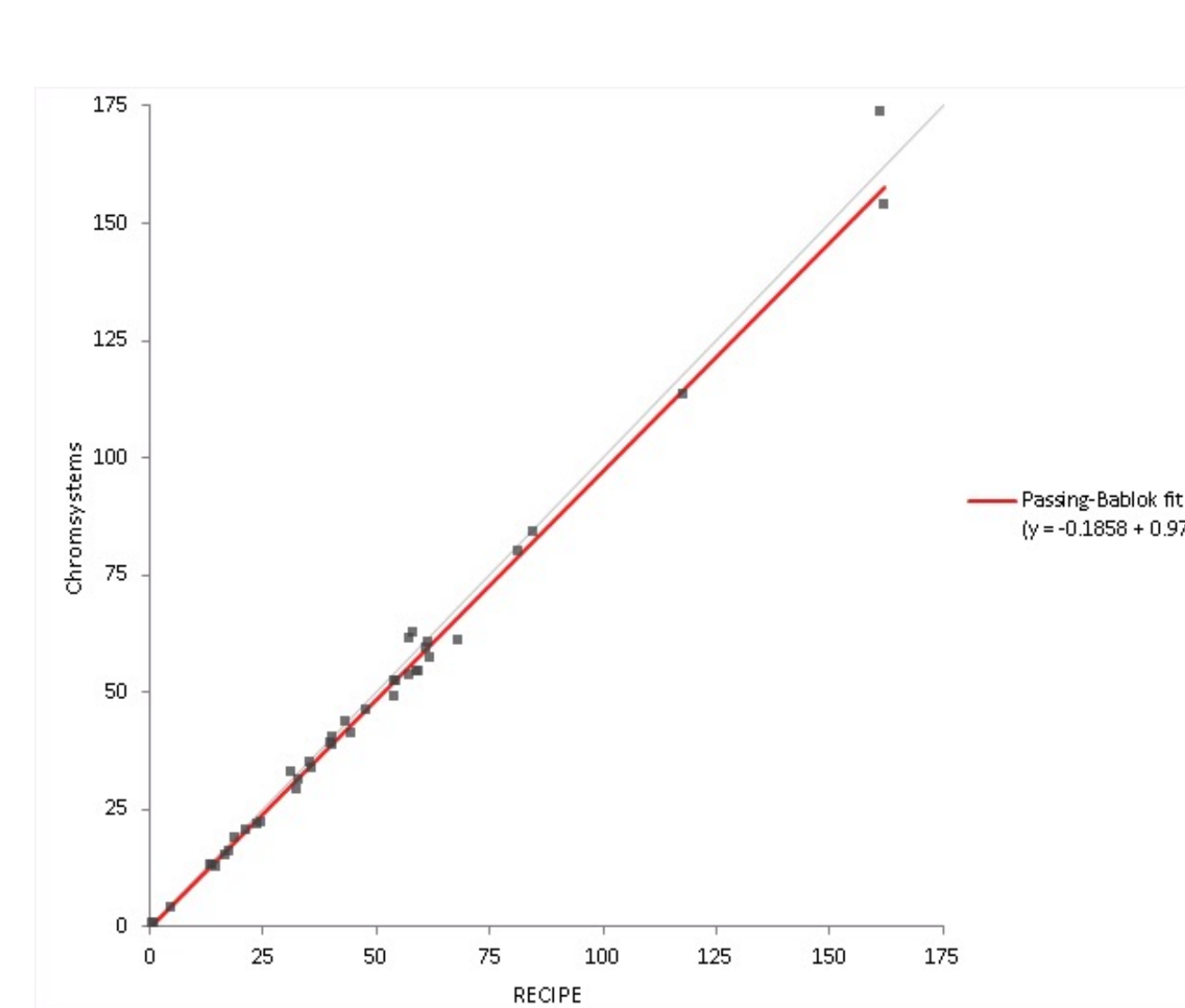


Abb. 3: Passing-Bablok Regressionsgerade von Methodenvergleich Recipe gegen Chromsystems. [3]

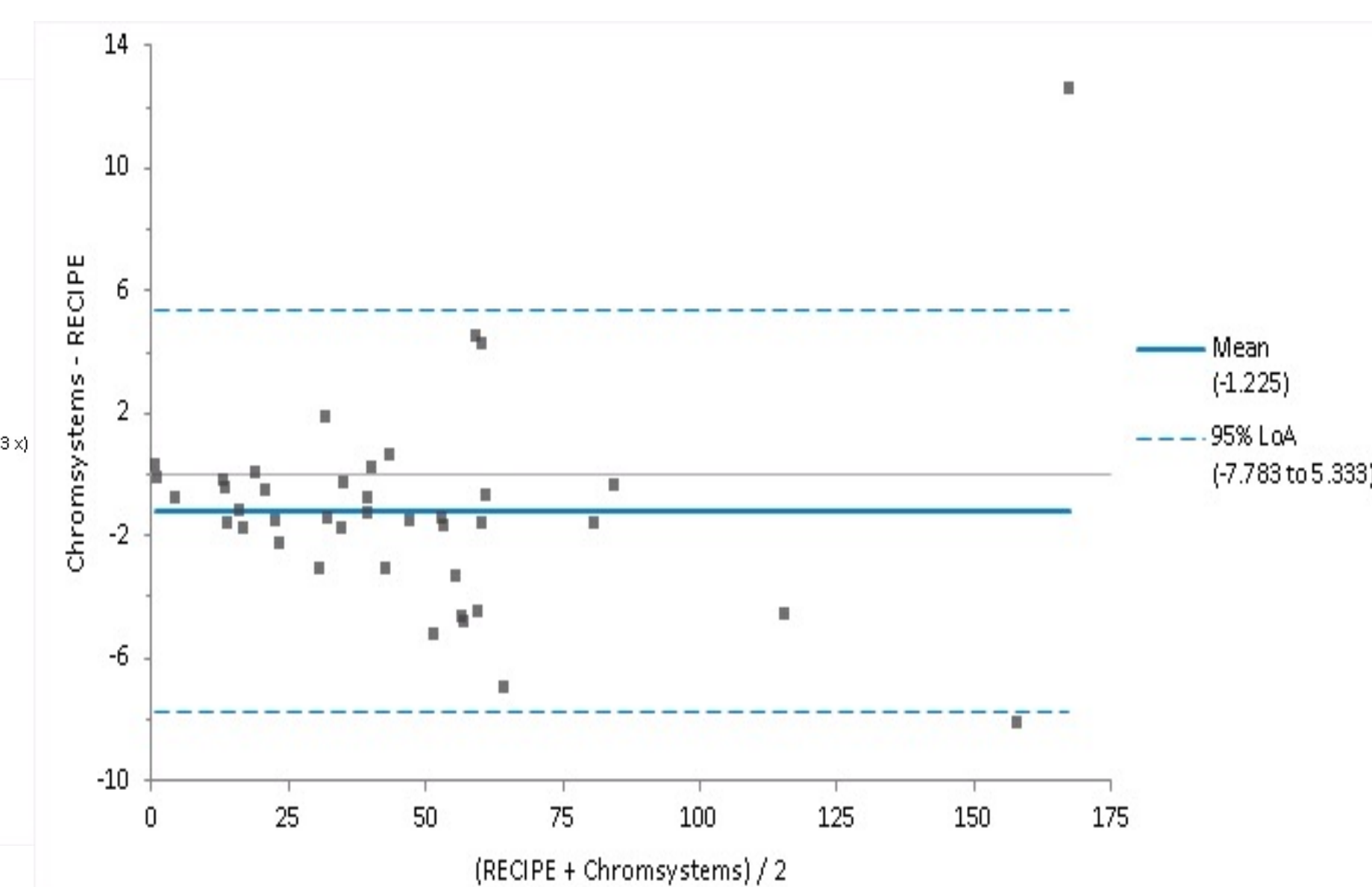


Abb. 4: Bland-Altman-Diagramm von Methodenvergleich Recipe gegen Chromsystems. [4]

Eine Interferenz nach der CS Methode bei darauffolgender Messung von Vitamin B2 in der gleichen Anlage wurde bemerkt. Die Detektion zeigt eine Verschiebung der Retentionszeit in jeder Messung (Abbildung 5).

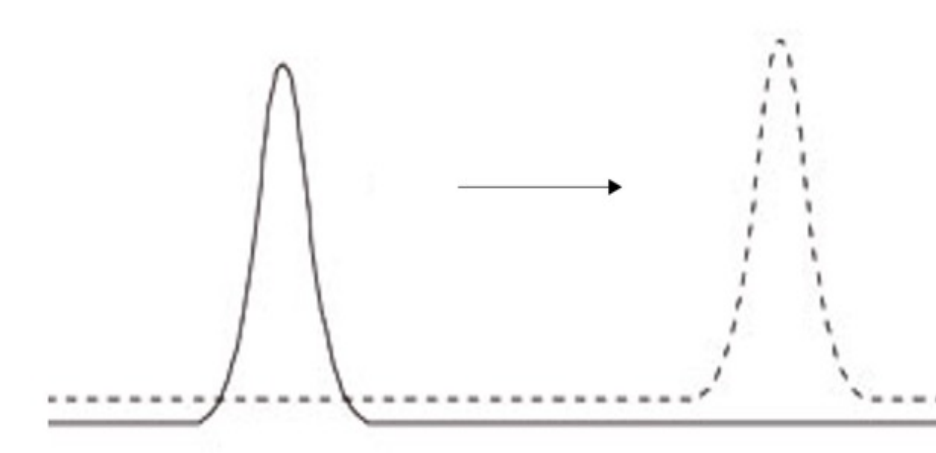


Abb. 5: Retentionszeit Drift. [5]

6. Diskussion

Das Konfidenzintervall von Passing-Bablok enthält 0 für «Intercept» und 1 für «Slope», somit kann gefolgert werden, dass die Methoden von Recipe und CS gut korrelieren. Noch mehr aussagekräftig ist die Analyse von Bland-Altman. Diese zeigt auch dass beide Methoden gut korrelieren.

Die Interferenz in Vitamin B2 Messung konnte mit einem anderen Spülverfahren behoben werden. Dieses Verfahren verwendet anstatt Methanol 20%, eine Mischung von Methanol, Isopropanol, Acetonitril und dest. Wasser (je 25%) zur Reinigung nach einer Messserie.

Die Methode von CS wird diejenige von Recipe in der MCL-Routine ersetzen. Ein Outlook wäre zu analysieren ob es notwendig ist die Spülverfahren von den 3 anderen Anlagen des MCL Labors auch anzupassen.

Quellenverzeichnis

- [1] Bendich, A., Machlin, L. J., Scandurra, O., Burton, G. W., & Wayner, D. D. M. (1986). The antioxidant role of vitamin C. *Advances in Free Radical Biology & Medicine*, 2(2), 419-444.
- [2] Peterkofsky, B. (1991) Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 54(6), 1135-1140.
- [3] Olmedo, J. M., Yiannias, J. A., Windgassen, E. B., & Gornet, M. K. (2006) Scurvy: a disease almost forgotten. *International Journal of Dermatology*, 45, 909-913.

Abbildungsverzeichnis

- [1] Assis, L. R. (2021). *Anlage HPLC 1 von Agilent*. Bern: Eigene Abbildung.
- [2] Packungsbeileger, Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Arbeitsvorschrift für die HPLC-Bestimmung: Vitamin C im Plasma/Serum, 2015
- [3] Assis, L. R. (2021). *Passing-Bablok Regressionsgerade von Methodenvergleich Recipe gegen Chromsystems*. Bern: Eigene Abbildung.
- [4] Assis, L. R. (2021). *Bland-Altman-Diagramm von Methodenvergleich Recipe gegen Chromsystems*. Bern: Eigene Abbildung
- [5] McNair, H. (2021) Changes in Retention Time. Abgerufen von <http://www.chromedia.org/chromedia> - adaptiert