

## **Lipid-Adjustierung von $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen im Plasma**

H. Heseker<sup>1</sup>, M. Kohlmeier<sup>2</sup> und R. Schneider<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität, Gießen

<sup>2</sup> Institut für Klinische Chemie und Biochemie des Universitätsklinikums Rudolf Virchow der FU Berlin

### **Lipid-adjustment of $\alpha$ -tocopherol concentrations in plasma**

**Zusammenfassung:** Zur Beurteilung der Vitamin-E-Versorgung des Menschen hat die Messung der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Plasma oder im Serum eine weite Verbreitung gefunden. Mit Hilfe einer geeigneten HPLC-Methode kann die analytische Bestimmung heute sehr präzise und zuverlässig vorgenommen werden. Die Bewertung der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration wird aber durch die enge positive Korrelation mit den verschiedenen Blutlipidfraktionen erschwert. Wird der Einfluß dieser Störvariablen bei der Bewertung der Meßwerte nicht durch ein Adjustierungsverfahren entsprechend berücksichtigt, kann dies beträchtliche Fehlbeurteilungen zur Folge haben. In der Vergangenheit wurden verschiedene Ansätze zur Kontrolle des Blutlipideinflusses auf  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen formuliert, die aber den Ansprüchen eines Ausgleichs nur unvollständig gerecht wurden. Am Datenmaterial der VERA-Studie (*Verbundstudie Ernährungserhebung und Risikofaktoren Analytik*) wird ein mathematisches Adjustierungsverfahren, das auf einem Regressionsansatz basiert, vorgestellt und in seinen Auswirkungen auf die Vitamin-E-Versorgungsmeßwerte überprüft. Durch diese Methode kann der Einfluß, den die Blutlipide auf die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen ausüben, relativ einfach eliminiert werden. Die auf diese Weise lipid-adjustierten  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen stehen danach für weitergehende, statistische Auswertungen zur Verfügung, ohne daß noch eine spezielle Stratifizierung erforderlich ist.

**Summary:** Measurement of  $\alpha$ -tocopherol concentrations circulating either in plasma or serum is the most common method of measuring the vitamin E status in men. The analytical determination with a suitable HPLC method produces precise and reliable results. The interpretation of the measured  $\alpha$ -tocopherol values is complicated by the strong positive correlation with different blood lipids. A considerable misinterpretation of the data will occur if these confounding factors are not taken into account by a suitable adjustment. Different methods have been described in the literature which tried to control the confounding effect of blood lipids. These methods were not completely satisfying. Therefore, a mathematical regression model, based on residuals, is introduced and applied to the data of the VERA-study (*Verbundstudie Ernährungserhebung und Risikofaktoren Analytik*) and the consequences of the lipid-adjustment of the tocopherol values are studied in further statistical procedures. Thereafter, lipid-adjusted tocopherol concentrations can be subjected to more extensive statistical evaluations without the requirement of special stratification.

**Schlüsselwörter:** Tocopherolkonzentration – Cholesterinkonzentration – Blut – Vitamin-E-Versorgung – Adjustierung

**Key words:** Tocopherol concentration – cholesterol concentration – blood – vitamin E status – lipid-adjustment

## **Einführung**

Der Einfluß verschiedener Blutlipidfraktionen auf die  $\alpha$ -Tocopherol- oder Gesamt-Tocopherolkonzentrationen im Plasma ist seit längerem bekannt und in der Literatur hinlänglich beschrieben (2, 5, 9, 11).

Vitamin E wird im Blut in den Lipoproteinen transportiert. Obgleich Vitamin E in allen Lipoproteinfaktionen vorhanden ist, sind es die LDL- und HDL-Fraktionen, die wesentlich für den Transport verantwortlich sind (4). Wird nur die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Plasma zur Beurteilung der Vitamin-E-Versorgung herangezogen, dann wird die tatsächliche Vitamin-E-Versorgung von Personen mit mittleren oder niedrigen Blutlipidkonzentrationen in der Regel deutlich unterschätzt und die von Personen mit hohen oder sehr hohen Blutlipidkonzentrationen überschätzt. Da Blutlipidkonzentrationen wiederum altersabhängig sind, werden z.B. mit zunehmendem Alter höhere  $\alpha$ -Tocopherol-Plasmakonzentrationen gemessen als bei jüngeren Menschen.

In der Vergangenheit wurden bereits verschiedene Ansätze formuliert, um den Einfluß der Blutlipide auf die Tocopherolkonzentrationen zu kontrollieren (1, 3). Ein Verfahren, das weite Verbreitung gefunden hat, geht von der Messung der Gesamtlipidkonzentration im Plasma aus und bezieht die Tocopherolmeßwerte ( $\alpha$ -Tocopherol- oder Gesamt-Tocopherolkonzentration) auf den Gesamtlipidgehalt im Serum ( $\mu\text{mol Tocopherol/g Gesamtlipide}$ ) (7, 14). Ohne eine Berücksichtigung des Einflusses dieser Störvariablen auf den Vitamin-E-Versorgungsparameter treten unweigerlich erhebliche Fehlbeurteilungen auf. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein mathematisches Verfahren vorzustellen, mit dessen Hilfe der Störeinfluß der Blutlipide eliminiert werden kann. Am Datenmaterial der VERA-Studie soll das auf einer Regressionsmethode basierende Verfahren angewendet und die Auswirkung auf die adjustierten Vitamin-E-Versorgungsmeßwerte untersucht werden.

## **Material und Methoden**

In den Jahren 1987/88 wurde eine für die (alte) Bundesrepublik Deutschland repräsentative Querschnittsstudie, an der 2006 Personen (862 Männer und 1144 Frauen) im Alter von 18–88 Jahren teilnahmen, durchgeführt (6, 10). In den unter Nüchternbedingungen gewonnenen Blutproben wurden u.a. die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration und verschiedene Serumlipidparameter gemessen. Die untersuchten Personen lebten in Privathaushalten und waren frei von schweren chronischen Erkrankungen. Die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration wurde mittels einer HPLC-Methode analysiert (15). Cholesterin und Triglyceride im Serum wurden mit enzymatisch-colorimetrischen Methoden (CHOD-PAP bzw. GPO-PAP) gemessen. Lipoproteine im Serum wurden mittels einer Mikro-Ultrazentrifugation und anschließender Präzipitation analysiert. Detaillierte Methodenbeschreibungen sind dem Methodenhandbuch der VERA-Studie zu entnehmen (13). Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm paket SPSS<sup>x</sup> auf dem Großrechner des Gießener Hochschulrechenzentrums durchgeführt.

## **Ergebnisse und Diskussion**

Die mittleren Plasma- $\alpha$ -Tocopherol- und Serum-Lipidkonzentrationen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Signifikante Geschlechtsunterschiede wurden nicht beobachtet. Die zwischen den verschiedenen Plasmalipidfraktionen und den  $\alpha$ -Tocopherolmeßwerten berechneten Korrelationskoeffizienten (Männer: 0,66; Frauen: 0,73) zeigen, daß die Gesamt-Cholesterinkonzentration im Serum den stärksten Einfluß auf die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration ausübt (Tab. 2). Auch eine Korrelation der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration

Tab. 1. Plasma- $\alpha$ -Tocopherol- und Serumlipidkonzentrationen Daten der VERA-Studie, Mittelwert und Standardabweichung

Variable	insgesamt (n=1943)	Frauen (n=1092)	Männer (n=851)
Pl.- $\alpha$ -Tocopherol [ $\mu\text{mol/L}$ ]	30,6 $\pm$ 8,4	30,6 $\pm$ 9,0	30,7 $\pm$ 10,0
Serum-Cholesterin [mg/dL]	213,4 $\pm$ 45,9	215 $\pm$ 46,6	213,9 $\pm$ 45,9
Serum-Triglyceride [mg/dL]	113,4 $\pm$ 83,9	102,4 $\pm$ 71,3	127,8 $\pm$ 96,0

Tab. 2. Korrelation verschiedener Serumlipidkonzentrationen mit der Plasma- $\alpha$ -Tocopherolkonzentration. Korrelationskoeffizienten nach Spearman

Variable	Geschlecht	corr.coeff.	p
Gesamt-Cholesterin	m	0,66	0,00
	w	0,73	0,00
HDL-Cholesterin	m	-0,13	0,00
	w	0,03	0,20
LDL-Cholesterin	m	0,53	0,00
	w	0,64	0,00
VLDL-Cholesterin	m	0,53	0,00
	w	0,49	0,00
Gesamt-Triglyceride	m	0,51	0,00
	w	0,48	0,00
HDL-Triglyceride	m	0,29	0,00
	w	0,28	0,00
LDL-Triglyceride	m	0,59	0,00
	w	0,52	0,00
VLDL-Triglyceride	m	0,46	0,00
	w	0,41	0,00
Summe aus Cholesterin und Triglyceriden	m	0,69	0,00
	w	0,69	0,00

mit der geschätzten Gesamtlipidkonzentration (Abb. 1), die näherungsweise aus der Summe der Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen im Serum geschätzt wurde, ergab einen ähnlich starken Zusammenhang.

Die durchgeführte multiple Regressionsanalyse zeigt, daß die verschiedenen Cholesterinfaktionen einen stärkeren Einfluß auf die Plasma- $\alpha$ -Tocopherolkonzentration ausüben als die Triglyceridfraktionen (Tab. 3). Da außerdem die verschiedenen Lipoproteinfaktionen miteinander korrelieren, wird der Variationseinfluß, welchen die Triglyceride auf die Tocopherolspiegel ausüben, bereits durch die Cholesterinfaktion weitgehend erklärt. Eine alleinige Berücksichtigung der Gesamt-Cholesterinkonzentration im Serum erscheint daher für die korrekte Bewertung der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration ausreichend zu sein. Die erforderliche Angleichung kann durch einen einfachen Bezug auf die Gesamtcholesterin- bzw. Gesamtlipidkonzentration oder durch die hier darge-

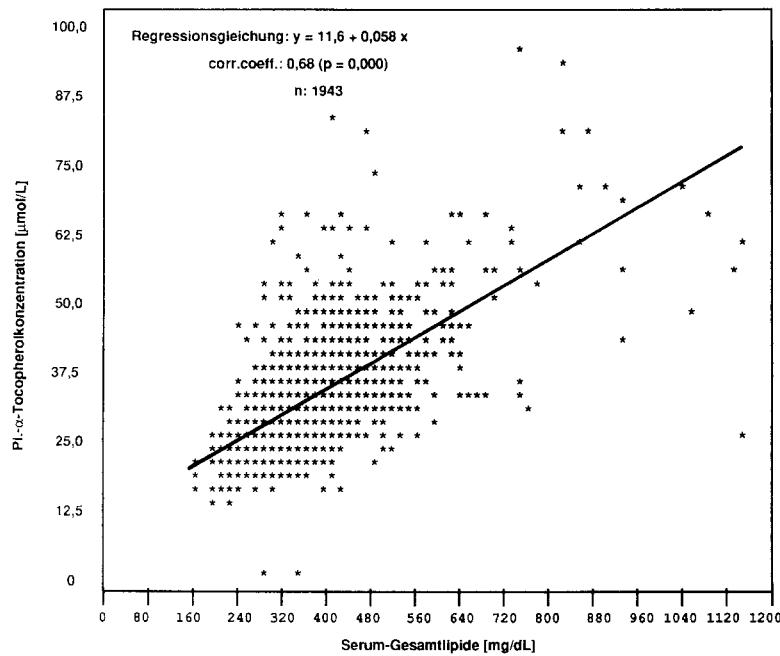


Abb. 1. Korrelation der Gesamtlipid- mit den  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen im Plasma

Tab. 3. Multiple Regressionsanalyse (Methode: stepwise): Prädiktoren und multiples r der Plasma- $\alpha$ -Tocopherolkonzentration

Parameter	b (SE)	p
<b>Männer:</b>		
Konstante:	5,51	
VLDL-Cholesterin	0,26 (0,017)	0,000
LDL-Cholesterin	0,08 (0,007)	0,000
HDL-Cholesterin	0,10 (0,026)	0,000
LDL-Triglyceride	0,07 (0,026)	0,006
		multiples r = 0,72
<b>Frauen</b>		
Konstante:	2,25	
LDL-Cholesterin	0,10 (0,005)	0,000
VLDL-Cholesterin	0,25 (0,017)	0,000
HDL-Cholesterin	0,16 (0,018)	0,000
LDL-Triglyceride	0,06 (0,022)	0,055
		multiples r = 0,74

stellte Regressionsmethode erfolgen. Da weder die gemessenen absoluten Plasmakonzentrationen (Tab. 1) noch die Regressionsanalysen Geschlechtsunterschiede aufweisen, ist in der weiteren Betrachtung eine Stratifizierung nach Geschlecht nicht erforderlich.

### Standardisierung durch den Bezug auf die Gesamtlipide

Die häufig eingesetzte Standardisierung der  $\alpha$ -Tocopherolspiegel durch Berechnen eines Tocopherol-Gesamtlipid-Quotienten (1) führt dazu, daß neue, unerwünschte Verzerrungen entstehen und ein linearer Zusammenhang zwischen Serum-Gesamtlipiden und lipid-standardisierten  $\alpha$ -Tocopherolspiegeln nicht mehr zu beobachten ist (Abb. 2). Während bei nicht standardisierten Tocopherolkonzentrationen niedrige Vitamin-E-Versorgungs-Meßwerte überwiegend bei niedrigen Blutlipiden zu beobachten sind, werden durch den Gesamtlipidbezug vorwiegend bei Personen mit mittleren oder höheren Blutlipiden niedrige Vitamin-E-Meßwerte errechnet.

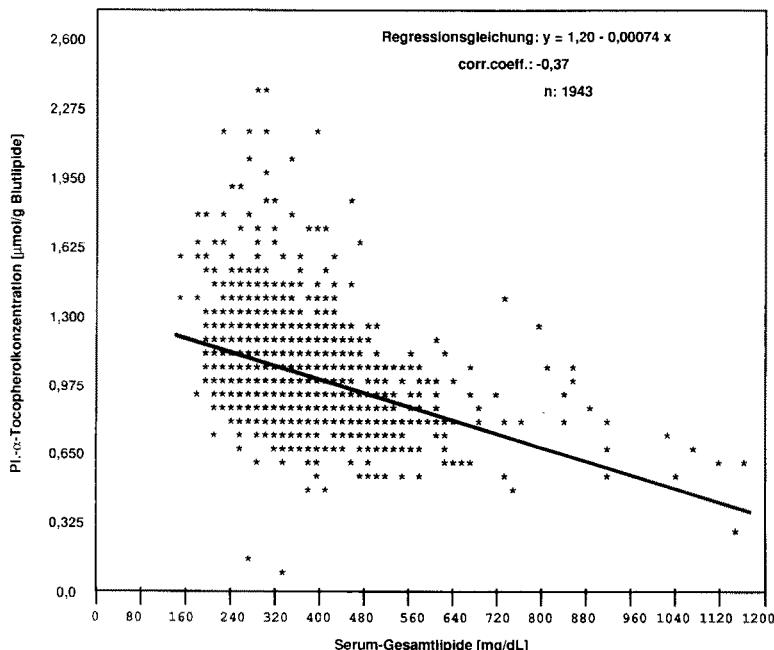


Abb. 2. Korrelation der Gesamtlipid- mit den lipid-standardisierten  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen ( $\mu\text{mol/g Gesamtlipide}$ )

### Adjustierung durch eine Regressionsmethode

Bei diesem mathematischen Verfahren wird zunächst die Regressionsgleichung mit der Gesamt-Cholesterinkonzentration ( $x$ ) als unabhängiger und der  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration ( $y$ ) als abhängiger Variablen erstellt (Abb. 3) (16). Danach werden die Residuen (*Abstand des gemessenen y-Wertes von dem Schätzwert auf der Geraden*) berechnet. Da die Residuen den Mittelwert *null* haben und auch negative Werte einnehmen können, stellen die berechneten Residuen keine anschaulichen Plasma- $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen dar. Dies kann aber durch die Addition einer Konstanten erreicht werden. Eine logische Konstante ist z.B. die Tocopherolkonzentration, die bei der mittleren Cholesterinkonzentration beobachtet wird.

Wenn die modell-theoretischen Voraussetzungen (z.B. Normalverteilung) für eine Regressionsanalyse gegeben sind, besteht zwischen den adjustierten  $\alpha$ -Tocopherolmeß-

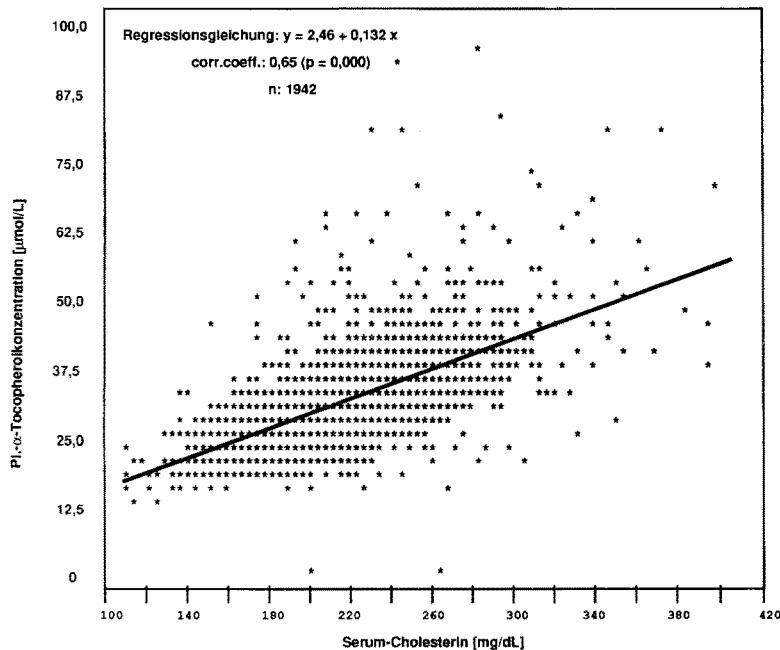


Abb. 3. Korrelation der Cholesterin- mit den  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen im Plasma

werten und dem Cholesterinspiegel kein Zusammenhang mehr (Abb. 4). Sind mehrere Einflußgrößen (hier z.B. Lipoproteinfaktionen) gleichzeitig zu betrachten, kann auch eine multiple Regressionsanalyse zur Berechnung der Residuen durchgeführt werden. Sind bestimmte modell-theoretische Voraussetzungen nicht gegeben (z.B. schiefe Verteilung der Meßwerte), ist vor der Adjustierung eine entsprechende Transformation durchzuführen. In vielen Fällen reicht hierzu eine logarithmische Transformation aus. Ein genereller Vorteil der auf diese Weise adjustierten Meßwerte ist, daß diese ohne große Einschränkung in weiteren statistischen Analysen ausgewertet werden können.

Eine Adjustierung ist nur sinnvoll, wenn auch bestimmte physiologische Bedingungen gegeben sind. Der physiologische Mechanismus, der hinter der beobachteten Beziehung steht – in diesem Fall der Transport des  $\alpha$ -Tocopherol in den Lipoproteinen –, sollte bekannt sein. Eine Adjustierung wäre nicht sinnvoll, wenn die Korrelation z.B. auf eine cholesterinsenkende Wirkung von Vitamin E zurückzuführen wäre. Hier gibt es Hinweise, daß die Vitamin-E-Versorgung die Plasma-Cholesterinspiegel nicht signifikant beeinflußt (17). Auch scheinen sich unterschiedlich hohe Lipoproteinkonzentrationen nicht auf die Vitamin-E-Versorgung in den Zielgeweben auszuwirken (12).

#### *Auswirkungen der Adjustierung*

Die Cholesterin- und Tocopherolmeßwerte korrelieren eng miteinander, so daß die Adjustierung gleichzeitig die Streuung bzw. die Varianz der beobachteten  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen reduziert. Immerhin kann 42 % ( $r^2$ ) der Tocopherolmeßwert-Streuung durch den Variationseinfluß der Cholesterinspiegel erklärt werden. Die Häufigkeitsverteilung der adjustierten Meßwerte ist daher deutlich schmäler und steiler (Abb. 5).

Durch die starke Altersabhängigkeit der Cholesterinspiegel werden mit zunehmen-

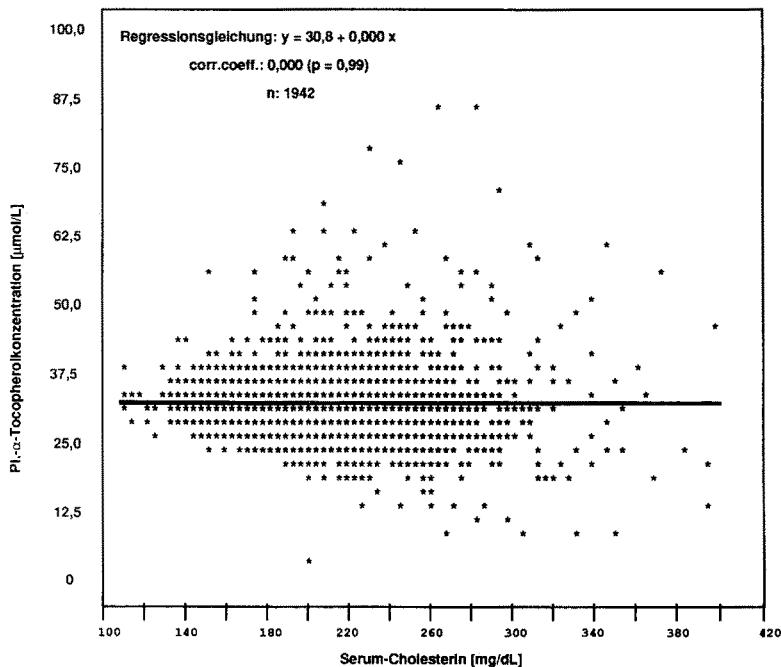


Abb. 4. Korrelation der Cholesterin- mit den adjustierten  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen im Plasma

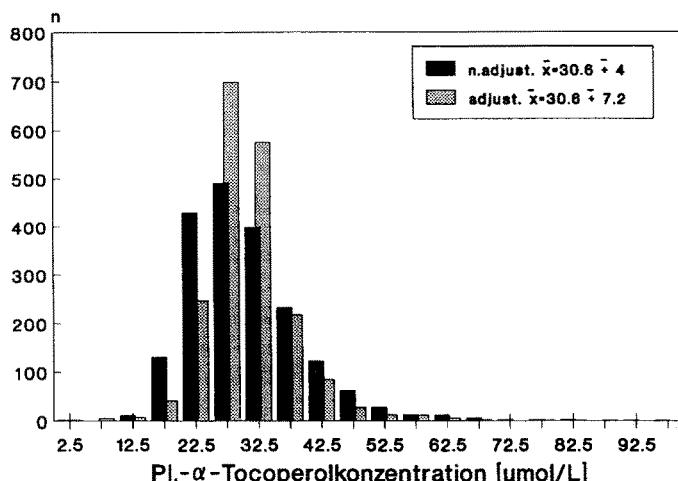


Abb. 5. Vergleich der Häufigkeitsverteilung der gemessenen und der adjustierten  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen im Plasma

dem Alter höhere  $\alpha$ -Tocopherol-Plasmakonzentrationen beobachtet (Tab. 4). Die Cholesterin-Adjustierung reduziert deutlich diese Altersunterschiede. Die Bewertung der Vitamin-E-Versorgung in der Bundesrepublik Deutschland durch nicht adjustierte Plasma- $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen führt zu einer relativ hohen Prävalenz niedriger Meßwerte in den jüngeren Altersgruppen. Eine Bewertung der Vitamin-E-Versorgung durch adjustierte Meßwerte zeigt diese Altersunterschiede nicht (Abb. 6).

Tab. 4. Vergleich der gemessenen und der adjustierten Plasma- $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen [ $\mu\text{mol/L}$ ] nach Alter und Geschlecht ( $\bar{x} \pm s$ )

	18-24	25-34	35-44	45-54	55-64	$\geq 65$ Jahre	Altersgruppe
<b>Männer:</b>							
nicht adjustiert	$25,1 \pm 7,5$	$27,3 \pm 6,6$	$31,6 \pm 11,1$	$32,6 \pm 10,9$	$33,4 \pm 8,9$	$35,6 \pm 11,8$	
adjustiert	$29,7 \pm 5,0$	$29,8 \pm 5,2$	$31,1 \pm 9,6$	$31,8 \pm 9,1$	$31,0 \pm 7,8$	$33,5 \pm 7,8$	
<b>Frauen:</b>							
nicht adjustiert	$25,8 \pm 6,4$	$26,9 \pm 6,3$	$28,7 \pm 8,0$	$33,1 \pm 9,1$	$35,7 \pm 9,5$	$36,7 \pm 9,5$	
adjustiert	$29,5 \pm 4,7$	$29,6 \pm 4,9$	$30,4 \pm 6,3$	$30,3 \pm 7,8$	$31,2 \pm 7,6$	$32,3 \pm 7,4$	

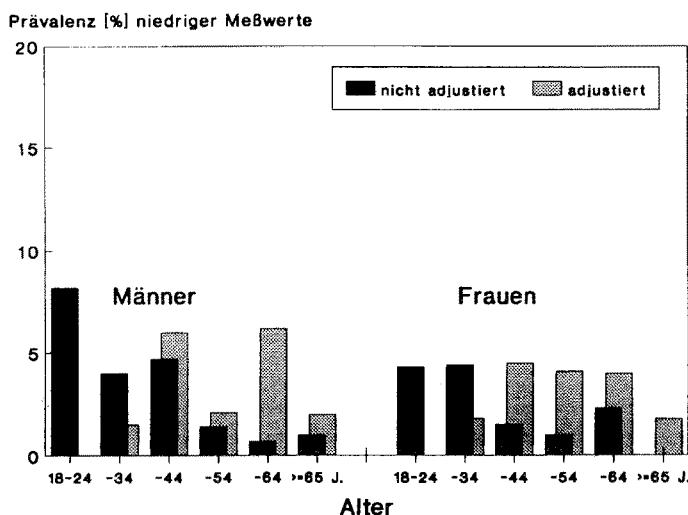


Abb. 6. Vergleich der Prävalenzen niedriger  $\alpha$ -Tocopherolkonzentrationen im Plasma (gemessen vs adjustiert)

## Schlußfolgerungen

Ein Anstieg der Cholesterinkonzentration im Plasma führt zu einer Verschiebung der bestehenden Homöostase zwischen den Vitamin-E-retinierenden Geweben und dem Blutplasma. Wird dieser nicht zufuhrbedingte Einfluß auf die Vitamin-E-Versorgungsmeßgröße „Plasma- $\alpha$ -Tocopherolkonzentration“ nicht berücksichtigt, sind Fehlinterpretationen die Folge. Die vorgestellte Adjustierung hat den Vorteil, daß mit den adjustierten Werten ohne große Einschränkung weitere statistische Analysen durchgeführt werden können. Diese Regressionsmethode kann auch in vielen anderen Fällen eingesetzt werden, wenn unerwünschte Störeinflüsse die Interpretation von Meßwerten empfindlich beeinflussen.

## Danksagung

Die VERA-Studie wurde durch den Bundesminister für Forschung und Technologie gefördert (Förderkennzeichen: 0 704 752 und 0 704 754). Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

## Literatur

1. Bates CJ, Thurnham DI (1991) Biochemical markers of nutrient intake. In: Margetts BM, Nelson M (Hrsg): Design concepts in nutritional epidemiology. Oxford University Press, New York, S 192–265
2. Behrens WA, Thompson JN, Madère R (1982) Distribution of  $\alpha$ -tocopherol in human plasma lipoproteins. Am J Clin Nutr 35:691–696
3. Brubacher G, Stähelin HB, Vuilleumier JP (1974) Beziehung zwischen  $\beta$ -Lipoproteidgehalt des Serums und Plasma-Vitamin-E-Gehalt. Internat Z Vit Ern Forsch 44:521–526
4. Burton GW, Traber M (1990) Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. Ann Rev Nutr 10:357–382
5. Davies T, Kelleher J, Losowsky MS (1969) Interrelation of serum lipoprotein and tocopherol levels. Clin Chim Acta 24:431–436
6. Heseker H, Schneider R, Moch KJ, Kohlmeier M, Kübler W (1992) Vitaminversorgung Erwachsener in der Bundesrepublik Deutschland. In: Kübler W et al (Hrsg) VERA-Schriftenreihe. Band IV. Wissenschaftlicher Fachverlag Dr Fleck, Niederkleen
7. Horwitt MK, Harvey CC, Dahm CH, Searcy MT (1972) Relationship between tocopherol and serum lipid levels for determination of nutritional adequacy. Ann NY Acad Sci 203:223–236
8. Hunter D (1990) Biochemical indicators of dietary intake. In: Willett W (Hrsg) Nutritional epidemiology. Oxford University Press, New York, S 143–216
9. Kübler W (1986) Versorgung mit fettlöslichen Vitaminen und mit Vitamin C. In: Schlierf G (Hrsg) Ernährung und Alter. Wissenschaftliche Verlagsanstalt, Stuttgart, S 48–58
10. Kübler W, Hüppé R, Matiaske B, Rosenbauer J, Anders HJ (1990) Was verzehrt der Bundesbürger? Was sind die Folgen? Ernährungs-Umschau 37:102–107
11. Machlin LJ (1984) Vitamin E. In: Machlin LJ (Hrsg) Handbook of vitamins. Marcel Dekker, New York, S 99–145
12. Sokol RJ, Heubi JE, Iannaccone ST, Bove KE, Balistreri WF (1984) Vitamin E deficiency with normal serum vitamin E concentrations in children with chronic cholestasis. N Engl J Med 310:1209–1212
13. Speitling A, Hüppé R, Kohlmeier M, Matiaske B, Stelte W, Thefeld W, Wetzel S (1992) Methodenhandbuch der Verbundstudie Ernährungserhebung und Risikofaktoren Analytik. In: Kübler W et al (Hrsg) VERA-Schriftenreihe. Band I. Wissenschaftlicher Fachverlag Dr Fleck, Niederkleen
14. Thurnham DI, Davies JA, Crump BJ, Situnayake RD, Davis M (1986) The use of different lipids to express serum tocopherol:lipid ratios for the measurement of vitamin E status. Ann Clin Biochem 23:514–520
15. Vuilleumier JP, Keller HE, Gysel D, Hunziker F (1983) Clinical chemical methods for the routine assessment of the vitamin status in human populations. Internat J Vit Nutr Res 53:265–272
16. Willett WC (1990) Nutritional epidemiology. Oxford University Press, New York, S 245–271

17. Willett WC, Stampfer MJ, Underwood BA, Taylor JO, Hennekens CH (1983) Vitamins A, E, and carotene: effects of supplementation on their plasma levels. Am J Clin Nutr 38:559–566

Eingegangen 6. Januar 1993  
akzeptiert 14. März 1993

Für die Verfasser:

PD Dr. Helmut Heseker, Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität,  
Goethestr. 55, 35390 Gießen