

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin IV

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-U. Häring

**Kontrastmittel und Antibiotika
bedingte Interferenzen bei der
Serum-Kapillar-Zonen-Elektrophorese (CZE)**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
YASEMIN TEK
aus Sindelfingen**

2004

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichtstatter:

Professor Dr. D. Luft

2. Berichtstatter:

Professor Dr. H.-U. Häring

Meinen Eltern
in Dankbarkeit
gewidmet

Inhaltsverzeichnis	Seite
I. Inhaltsverzeichnis	I-IV
II. Einleitung	1
1. Grundlagen zur Elektrophorese	1
2. Serum-Proteinfractionen	1
2.1. Präalbumin	2
2.2. Albumin	2
2.3. α_1 -Globuline	2
2.4. α_2 -Globuline	3
2.5. β -Globuline	3
2.6. γ -Globuline	3
3. Klinische Anwendung der Serum-Proteinelektrophorese	3
3.1. Nephrotisches Syndrom	4
3.2. Monoklonale Gammopathie	4
3.3. Antikörpermangelsyndrom	4
3.4. Akute Entzündung	5
3.5. Leberzirrhose	5
4. Serum-Proteinelektrophorese auf Celluloseacetatfolien	5
4.1. Elektrophoretische Trennung der Proteine	6
4.2. Proteinfärbung	7
4.3. Beurteilung der Elektropherogramme	7
5. Kapillarzonenelektrophorese	7
5.1. Prinzip der Kapillarzonenelektrophorese	7
5.2. Der Elektroosmotische Fluss	8
5.3. Aufbau einer CZE- Apparatur	8
6. Beurteilung der Serum-Proteinelektrophorese auf CAF	10
7. Beurteilung der CZE	11

8.	Ziel der Arbeit	12
9.	Untersuchung	12
III.	Material und Methoden	13
1.	Versuchsdesign	13
2.	Analysegeräte	14
2.1.	Paragon CZE TM 2000	14
2.1.1.	Methodik zur Durchführung der Serum- Proteinelektrophorese	14
2.1.2.	Reagenzien und gerätetechnische Bedingungen	15
2.2.	Geräte zur Aufbereitung der Serumproben	16
3.	Kontrastmittel und Antibiotika	16
3.1.	Strukturformeln der Kontrastmittel	18
3.2.	Strukturformeln der Antibiotika	24
IV.	Ergebnisse	34
1.	UV-Spektren	34
2.	Verdünnungsreihen	35
2.1.	CZE- Fraktionen	35
2.2.	Minimale Störkonzentration	37
2.3.	Elektropherogramm einer reinen Serumprobe	41
2.4.	Elektropherogramme der Kontrastmittel mit jeweiliger Störung	42
2.5.	Elektropherogramme der Antibiotika mit jeweiliger Störung	48
3.	Patientenbeispiele	58
3.1.	Imeron	59
3.2.	Ultravist	60
4.	Filtrieren	61
4.1.	Conray	62
4.2.	Omnipaque	63

4.3.	Optiray	64
4.4.	Ultravist	65
4.5.	Claforan	66
4.6.	Mefoxitin	67
5.	Ergebnisse der Messungen mit Albumin	68
5.1.	Elektropherogramme eines reinen Albumingemisches	68
5.2.	Elektropherogramme der Kontrastmittel mit Albuminzusatz	69
5.3.	Elektropherogramme der Antibiotika mit Albuminzusatz	74
6.	Serum-Proteinelektrophorese auf Celluloseacetatfolien mit Kontrastmittel und Antibiotika	84
V.	Diskussion	85
1.	Grund der Untersuchung	85
2.	Auswahl des Untersuchungsgutes	86
3.	Verdünnungsreihen	87
4.	Patienten	88
5.	CZE- spezifische Interferenzen	89
6.	Proteinbindung	89
7.	Problematik	90
VI.	Zusammenfassung	92
VII.	Literaturverzeichnis	94
VIII.	Anhang	101
1.	Untersuchung auf Celluloseacetatfolien	101

1.1. Kontrastmittel	101
1.2. Antibiotika	104
IX. Danksagung	112

II. Einleitung

1. Grundlagen zur Elektrophorese:

Die elektrokinetische Wanderung geladener Moleküle und Partikel in einem elektrischen Gleichstromfeld wird als Elektrophorese bezeichnet, wenn es sich dabei um kolloidale oder hochmolekulare Teilchen handelt¹.

Dabei bewegen sich die geladenen Substanzen jeweils in die Richtung der entgegengesetzt gepolten Elektrode, man spricht von der Katha- bzw. Anaphorese². Die Bewegungsrichtung und die Wanderungsgeschwindigkeit sind zum Einen abhängig von Eigenschaften des Teilchens, wie Größe und Vorzeichen der Ladung, Gestalt, Masse, Dissoziationsgrad, zum Anderen von Umgebungsbedingungen des Ions, wie Konzentration, Ionenstärke, pH-Wert, Temperatur und Viskosität des Elektrolytmediums, sowie von Eigenschaften des umgebenden elektrischen Feldes, wie Richtung, Größe und Homogenität³.

Vor etwa 50 Jahren wurde erstmalig die Moving- Boundary- Elektrophorese von Tiselius in der Analyse des menschlichen Serums eingesetzt. Dies ist eine trägerfreie Methode, bei der die zu untersuchenden Proben in freier Lösung vorliegen. In den 50er Jahren wurden dann trägergestützte Trennmedien entwickelt und damit der Fortschritt der Zonenelektrophorese gefördert. Als Trägermaterial konnten Papier, Glaspulver, Stärke, Agarose, Polyacrylamid oder Celluloseacetat eingesetzt werden⁴.

2. Serum-Proteinfraktionen:

Das menschliche Blutplasma hat einen großen Aufgabenbereich, den es nur mit einer großen Variabilität an Molekülarten bewältigen kann. Die elektrophoretische Forschung hat einen großen Verdienst geleistet, nicht nur Albumin vom Globulin zu unterscheiden, sondern auch die einzelnen Globuline nach ihrer unterschiedlichen Beweglichkeit im elektrischen Feld zu trennen. Die Elektrophorese auf Celluloseacetatfolien bietet eine Einteilungsmöglichkeit in die Fraktionen Präalbumin, Albumin, α_1 -, α_2 -, β - sowie γ -Globulin. Wichtig für die Klinik ist die Konstanz der Größe der einzelnen Fraktionen,

die sich lediglich bei pathologischen Bedingungen verändert. Man erkennt folgende normale Proteinverteilung ⁵:

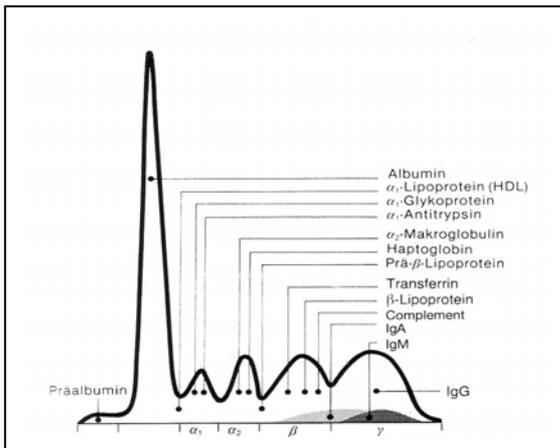


Abb. 2.1 Extinktionskurve nach Elektrophorese auf Celluloseacetat⁶

2.1. Präalbumin:

Präalbumin ist mit einer Konzentration von 0,1–0,4g/l im Serum vertreten. Hier findet man das Thyroxin bindende Präalbumin und das Retinol bindende Protein. Akute Leberzellschäden, alimentär bedingte Proteinmängel oder akute Entzündungen führen zu einer Konzentrationsverminderung⁷.

2.2. Albumin:

Aufgrund einer Konzentration von 35,2-50,4g/l (bei Erwachsenen) entspricht Albumin quantitativ dem am höchsten konzentrierten Plasmaprotein im menschlichen Körper. Es stellt ein Transportmedium für schlecht wasserlösliche Substanzen dar, bindet Bilirubin, Plasmacalcium, freie Fettsäuren, Spurenelemente, Hormone sowie Medikamente. Zusätzlich wirkt es bei der Aufrechterhaltung des onkotischen Druckes mit⁷.

2.3. α₁-Globuline:

Die Serumkonzentration der α₁-Globuline beträgt 1,3-3,9g/l (bei Erwachsenen). In dieser Fraktion befinden sich das α₁-Mikroglobulin, α₁-Lipoproteine (HDL), α₁-Glycoproteine, die Transportproteine Transcortin (zuständig für Cortisol) sowie das Thyroxin- bindende Globulin (bindet T₃ und T₄). Zusätzlich enthält diese Fraktion die Plasmainhibitoren α₁-Antitrypsin, als wichtigsten Inhibitor der Serin-Proteinase und α₁-Antichymotrypsin. Beide Inhibitoren zählen zu den positiv Akute-Phase-Proteinen⁷.

2.4. α_2 -Globuline:

Die α_2 -Globuline stellen mit 5,4–11,3g/l (bei Erwachsenen) die drittgrößte Fraktion dar. Den größten Anteil bilden das Ceruloplasmin, Antithrombin III und der C₁- Inaktivator. Antithrombin III inaktiviert Thrombin und Serinproteasen bzw. begrenzt lokal die Gerinnung. Der C₁-Esterase-Inaktivator greift ebenfalls hemmend an der Gerinnungskaskade ein. In geringeren Mengen kommen Haptoglobin und α_2 -Makroglobulin vor⁷.

2.5. β -Globuline:

Die Konzentration der β -Globulin-Fraktion liegt zwischen 5,9–12,4g/l (bei Erwachsenen). Diese Fraktion beinhaltet das Hämopexin (Transport von Häm), Transferrin, β -Lipoprotein und Komplementfaktoren⁷.

2.6. γ -Globuline:

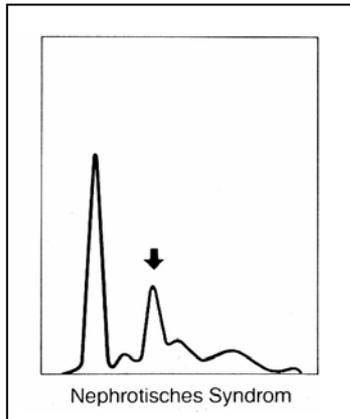
Die Konzentration der γ -Globuline beträgt 5,8–15,2g/l (bei Erwachsenen). Die Vertreter sind die Immunglobuline IgG, IgA, IgM, IgD sowie IgE. Zusätzlich kommt das C-reaktive Protein vor⁷.

3. Klinische Anwendung der Serum-Proteinelektrophorese:

Eine typische Anwendung der Serum- Proteinelektrophorese in der Medizin ist die Diagnostik von Dysproteinämien. Diese sind Veränderungen der Plasmaproteinzusammensetzung sowohl durch Konzentrationsschwankungen von Proteinen oder Proteingruppen als auch durch Neubildung reaktionsspezifischer bzw. strukturvarianter Proteine⁷.

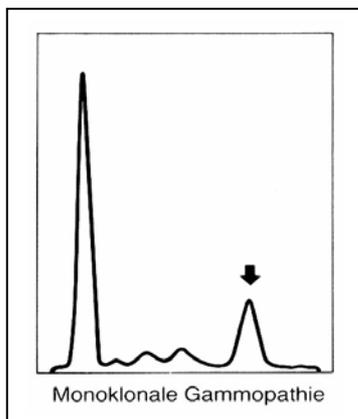
Klassischerweise stellt sich ebenfalls die Indikation bei Verdacht auf akute und chronische Entzündungen, maligne Tumoren, Lebererkrankungen, Proteinverlustsyndrome, Antikörpermangelzustände und monoklonale Gammopathien⁷.

3.1. Nephrotisches Syndrom: Das nephrotische Syndrom ist ein Proteinverlustsyndrom, das durch ein Nierenleiden verursacht wird.



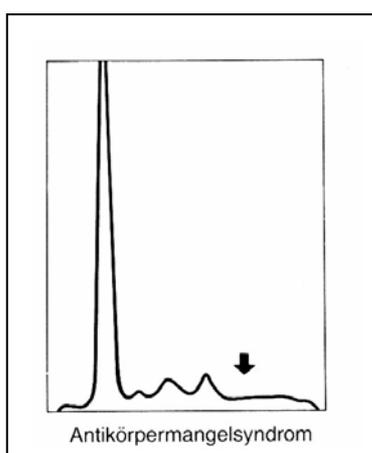
Kennzeichnend für diese Proteinbilanzstörung ist eine Erhöhung der α_2 -Globulinfraction. Die restlichen Fraktionen erfahren eine Konzentrationsabnahme. Im Verlauf sieht man im Bereich der α_1 - und γ -Fraktionen geringere Abnahmen als bei den β -Globulinen. Die Werte der α_2 -Fraktion können bis zu 65% ansteigen^{6,7}.

3.2. Monoklonale Gammopathie: Monoklonale Gammopathien bilden Extragradien



durch exzessive Bildung monoklonaler Immunglobuline und/ oder Immunglobulinbruchstücke. Extragradien sind zusätzliche Peaks im Kurvenverlauf eines Elektropherogrammes. Sind diese schmalbasig und liegen im γ - oder β -Globulinbereich werden sie als M- Gradient bezeichnet. Solchen Dysproteinämien liegen klinisch solitäre oder multiple Myelome oder der Morbus Waldenström (Makroglobulinämie) zugrunde^{6,7}.

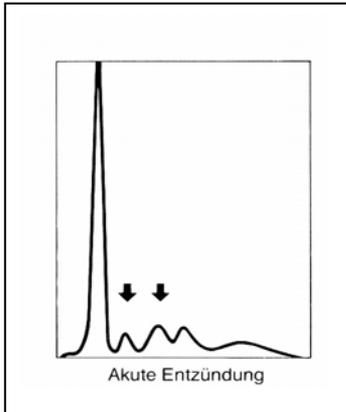
3.3. Antikörpermangelsyndrom: Primär angeborene Immundefekte wie die



Agammaglobulinämie vom „Schweizer Typ“ zeichnen sich durch das Fehlen von B- und T-Lymphozyten ab⁸. Ihre γ -Globulinwerte liegen unter 1 g/l. Bei erworbenen Dysproteinämien wie bei der chronisch- lymphatischen Leukämie oder bei Zytostatikatherapie sinkt die Konzentration der γ -Globuline unter 8 g/l. Die Albuminwerte sind je nach Situation variabel normal, vermindert oder erhöht. Durch die erhöhte Infektanfälligkeit dieser Erkrankungen, wird sekundär

ein Anstieg der α -Globuline provoziert^{6,7}.

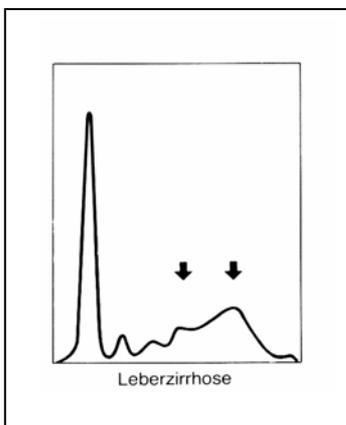
3.4. Akute Entzündung: Das elektrophoretische Bild der akuten Entzündung zeigt im Frühstadium eine Abnahme der Transthyretin- und Albumin- Werte. Die Akute- Phase Proteine, die in der α_1 - und α_2 -Globulinfraktion wandern, erfahren innerhalb der ersten



drei Tage eine Zunahme um 50 bis 300%. Der Konzentrationsanstieg der α_1 -Globulinfraktion verläuft zunächst schneller als der der α_2 -Globuline. Die Anstieg der α_2 -Globulinfraktion kann in der Regel bis zu 25% betragen. Das Transthyretin verschwindet vollständig. Fünf bis sieben Tage nach Beginn der Entzündungsreaktion steigen die Werte der β -Globulinfraktion an. Albumin stellt ein Anti-Akute- Phase- Protein dar. Seine Konzentrationsverminderung entspricht der relativen Globulinvermehrung, um die Gesamteiweißmenge im Normbereich beizubehalten^{6,7}.

Seine Konzentrationsverminderung entspricht der relativen Globulinvermehrung, um die Gesamteiweißmenge im Normbereich beizubehalten^{6,7}.

3.5 Leberzirrhose: Typisches Bild der Leberzirrhose ist Bildung einer Schulter



zwischen der β - und γ -Globulinfraktion. Die γ -Globulinwerte steigen absolut an, gleichzeitig erfährt die Kurve in dieser Fraktion eine Basisverbreiterung. Frühes Zirrhosezeichen ist die Verminderung des Transthyretins. Die Albuminmenge ist absolut vermindert und läuft zeitgleich mit dem Untergang der Leberparenchymzellen ab. Die Vorgänge führen zu einer Hypoproteinämie. Ausgeprägte Zirrhosen führen zu einer γ -

Globulinerhöhung über 35%. Die postnekrotische Zirrhose provoziert die drastischsten Konzentrationsschwankungen^{6,7}.

4. Serum-Proteinelektrophorese auf Celluloseacetatfolien:

Für die Durchführung einer Serum- Proteinelektrophorese auf Celluloseacetatfolien (CAF) werden folgende Geräte benötigt: eine Trennkammer, ein Stromversorgungsgerät sowie Zubehör zum Auftragen der Proben, Färbe- und

Entfärbungseinrichtungen und ein Auswertungsgerät⁹.

Das Vorgehen bei der Serum-Proteinelektrophorese gliedert sich in drei Abschnitte:

1. Elektrophoretische Trennung der Proteine
2. Proteinfärbung
3. Quantitative Beurteilung des Elektropherogrammes

4.1. Elektrophoretische Trennung der Proteine:

Die eingesetzten Membranfolien bestehen aus Celluloseacetat (=CA) und weisen eine schaumartige Struktur mit einem Hohlraumvolumen von 80-90% und einer Schichtdicke von 120µm auf^{10,11}. Aufgrund der günstigen Relation der mittleren Porendurchmesser (1-3µm) zum Hohlraum- (30 000- 50 000Å) und Proteindurchmesser (300Å) wird eine Siebwirkung verhindert und gleichzeitig eine Wanderung der Proteine ohne räumliche Behinderung ermöglicht^{10,12,13}.

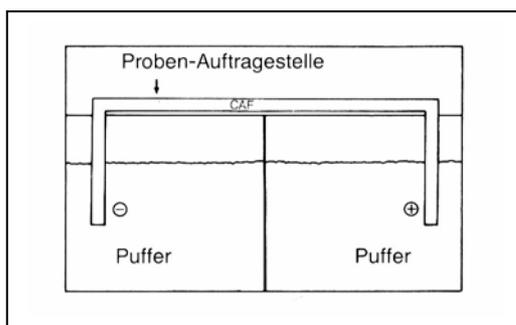


Abb. 4.1.1 Schematischer Aufbau der Trennvorrichtung für Celluloseacetatfolien-Elektrophorese¹⁶

Die CAF werden in die Elektrophoresekammern so eingehängt, dass ihre Enden mit der Pufferlösung in Berührung kommen¹⁴. Es handelt sich dabei um den barbiturathaltigen Michaelispuffer, mit einem pH-Wert von 8,6¹⁵. Die Proteinproben werden kathodenseitig nach dem Anspring- oder Eintauchverfahren mit Hilfe eines Auftragsstempels aufgebracht⁹. Das Anlegen eines Gleichstroms mit konstanter Spannung (200-250V) provoziert für etwa 20 Minuten eine Wanderung der Proteine in Richtung Anode (Kurzzeitelektrophorese)¹⁶. Es erfolgt eine bandenförmige Auftrennung in die in 2. beschriebenen fünf Proteinfractionen. Die Wanderung ist direkt proportional zu der Eigenladung der Probesubstanzen. Das bedeutet, je höher die Eigenladung, desto schneller ist die Wanderungsgeschwindigkeit⁹.

4.2. Proteinfärbung:

Nach erfolgter elektrophoretischen Auftrennung werden die Serumproteine mit spezifischen Proteinfärbstoffen in einem Färbebad angefärbt. In der Routine haben sich zwei Farbstoffe durchgesetzt: Ponceau S und Amidoschwarz 10 B. Zur Darstellung von Eiweißmengen bis zu 5µg/ ml wird auch der Farbstoff Nigrosin verwendet⁹.

Amidoschwarz 10 B, auch Naphtholblauschwarz oder Kresolblauschwarz genannt¹⁷, ist eine gesättigte Lösung mit Methanol- Eisessig im Verhältnis 9:1¹⁸. Die Färbelösung Ponceau S, mit den Synonymen Fast Ponceau 2 B oder auch Ponceau rot¹⁷, entsteht durch Mischung des Farbstoffes mit einer wässrigen Dichloressigsäure¹⁹. Nach einer Einwirkzeit von fünf bis fünfzehn Minuten wird der Farbstoff im Entfärbebad mittels Methanol- Eisessig (9:1) abgespült^{9,20}. Da beide Proteinfärbelösungen sich an die basischen Gruppen der Proteine anlagern, aber nur schwach an die CAF binden, kann der Farbstoff sehr leicht wieder ausgewaschen werden, so dass nur die fraktionierten Proteinbanden sichtbar bleiben¹⁶.

4.3. Beurteilung der Elektropherogramme:

Nachdem die Folie im Transparentbad optisch durchsichtig gemacht wird, erfolgt die quantitative Auswertung des Elektropherogrammes mittels eines Densitometers. Das Gerät ermittelt photometrisch die nebeneinander liegenden bandenförmigen Fraktionen, indem das Elektropherogramm mit konstanter Geschwindigkeit durch den Lichtweg des Auswertegerätes befördert wird. Es entsteht eine Extinktions-Orts-Kurve, die aus der optischen Dichte der jeweiligen Proteinbanden berechnet wird¹⁶.

5. Kapillaronenelektrophorese:

5.1. Prinzip der Kapillaronenelektrophorese:

Die Kapillaronenelektrophorese (CZE) ist eine Trennmethode auf nicht stabilisierten Medien. Das bedeutet, dass die Probentrennung innerhalb einer flüssigen Phase, nämlich einer mit Puffer gefüllten Quarzglas Kapillare, stattfindet. Durch das Einwirken eines elektrischen Feldes, wird die Bildung und Migration von diskreten Probezonen bewirkt. Diese Vorgänge werden durch die *elektrophoretische Mobilität* der einzelnen

Probenmoleküle und den *elektroosmotischen Fluss* (EOF) der Pufferlösung bestimmt^{21,22}.

5.2. Der Elektroosmotische Fluss:

Der EOF ist die Bewegung von Wasser und wässrigen Lösungen durch Kapillaren unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes²³. Dieser kann einen aktiven Transport von Zonen und aller anwesenden geladenen Teilchen in eine Richtung bewirken²⁴.

Die Bildung des EOF hängt von der Ladungsverteilung auf der Innenfläche der Quarzkapillare ab, die durch Dissoziation von Silanolgruppen, negative Ladungen trägt. Durch Anlagerung von Kationen aus der Pufferlösung entsteht eine Doppelschicht aus positiv und negativ geladenen Ionen, wobei sich oberflächennah eine durch Coulomb-Kräfte stabilisierte starre und oberflächenfern eine bewegliche Ionenschicht ausbildet²⁵.

Wird parallel zur Kapillaroberfläche ein elektrisches Feld angelegt, so bewegt sich die mobile Flüssigkeitssäule aus Kationen und mit ihr die Pufferlösung stempelförmig längs ihrer Achse in Richtung Kathode²⁶. Meistens ist die elektrophoretische Wanderung der Ionen durch den EOF überlagert, so dass durch die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit von Kationen und Anionen, eine Trennung in einem Analyseschritt möglich ist^{22,27}:

- Kationen sind am schnellsten, da sie dem EOF folgen;
- Anionen wandern langsamer zur Kathode, da ihre elektrophoretische Wandergeschwindigkeit kleiner als der EOF ist;
- Neutralteilchen werden nur durch EOF bewegt und damit nicht getrennt.

5.3. Aufbau einer CZE-Apparatur:

Die einfachste Trennapparatur besteht aus einem UV Detektor und zwei Elektroden, die zusammen mit den beiden Enden einer Trennkapillare in zwei Puffergefäße ragen²¹. Ein angeschlossener PC nimmt alle eingegebenen Informationen auf und koordiniert die Abläufe²².

Es werden dünne Kapillaren aus amorphem Siliciumdioxid (fused silica = geschmolzenes Quarz) mit einer Länge von 7-100cm und einem Innendurchmesser von 20-200µm eingesetzt^{28,29}. Durch den geringen Innendurchmesser sind nur noch wenige Nanoliter des Probengemisches für eine Analyse nötig. Die zu analysierende Probe wird

auf der anodischen Seite der Kapillare entweder elektrokinetisch durch Ausnützung des EOF oder hydrostatisch durch Druck oder Vakuum injiziert^{29,30}. Nach der Probenaufnahme wird das System an ein Pufferreservoir angeschlossen, so dass die Kapillare mit dem Puffer gefüllt wird²¹.

Um eine Wanderung der Ionen mit ausreichend hoher Geschwindigkeit zu erzielen, müssen hohe Spannungen angelegt werden³¹. Durch das hohe Flächen/ Volumen-Verhältnis der Kapillaren wird die Wärme, die sich während der Analyse entwickelt, optimal abgeführt. Dadurch können je nach Länge der Kapillaren, Spannungen bis zu 30kV angelegt werden^{32,33}. Nach kurzer Zeit kommen dann die aufgetrennten Probenbestandteile auf ihrem Weg zur Kathode an einem Kapillarenfenster vorbei, wo eine spektroskopische Detektion stattfindet²².

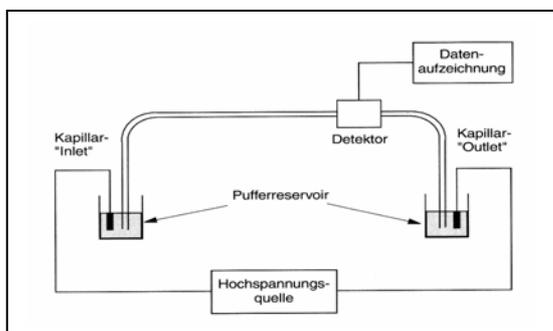


Abb. 5.3.1 Schematischer Aufbau einer CZE-Apparatur²²

Bei der CZE von Proteinen kann es durch Van-der-Waal'sche Kräfte oder Wasserstoffbrücken zu Wechselwirkungen der geladenen Probenmoleküle mit der Kapillarwand und damit zu Störungen der elektrophoretischen Trennung kommen³⁴. Es entstehen Adsorptionserscheinungen, die zu veränderten Migrationszeiten und gestörten Peakdarstellungen führen³⁵. Um diese unerwünschten Protein- Wand- Wechselwirkungen zu umgehen, kann man eine chemische Modifikation der Kapillarwand, durch Beschichtung der Innenfläche mit funktionellen Silanolgruppen oder Polymeren, durchführen oder dem Elektrophoresepuffer kationische Detergenzien, Tenside oder Alkalisalze hinzufügen³⁴.

Der Puffer dient also durch seinen pH-Wert und seine Ionenstärke nicht nur dazu den pH-Wert aufrechtzuerhalten, sondern auch die Wechselwirkungen zu unterbinden und damit den Stromfluss der Lösung aufrecht zu erhalten. Puffersysteme mit *zwitterionischen Molekülen* können sowohl an die Proteine als auch an die Kapillaroberfläche binden und deren Interaktion stören. *Alkalische Puffersysteme*

hingegen bewirken, dass die Proteine, mit einem pk-Wert im neutralen oder sauren Bereich, das gleiche Ladungszeichen wie die Kapillarwand erhalten und von dieser abgestoßen werden. Pufferlösungen mit *sauren pH-Werten* modifizieren die Kapillaroberfläche derart, dass die Silanolgruppen protoniert vorliegen und die Proteine nicht mehr adsorbieren können³⁴.

6. Beurteilung der Serum-Proteinelektrophorese auf CAF¹⁶:

Die leichte Handhabung dieser Technik ermöglicht ihren Einsatz in der Routine-Diagnostik. Vor allem im Vergleich zu anderen stabilisierten Trägermaterialien erfolgt bei kurzen Laufzeiten eine gute Auftrennung der Serumprobe. Durch Acetylierung oder Nitrierung freier Hydroxylgruppen der CAF werden Protein- Folien- Wechselwirkungen verhindert, die zusammen mit dem gleichmäßigen Hohlraumssystem der Folie eine ungestörte Wanderung der Proteine ermöglicht.

Zu beachten ist allerdings, dass durch die vielen Arbeitsschritte Fehler auftreten können, die eine optimale Auswertung des Elektropherogrammes verhindern. Ungenauigkeiten bei der Vorbereitung der Folien oder des Puffers, beim Probenauftrag sowie bei der Sichtbarmachung der Fraktionen können sukzessive die Ergebnisse verfälschen.

Diese Technik setzt fernerhin eine regelmäßige statistische Festlegung von Normwerten der einzelnen Proteinfractionen gesunder Probanden voraus, da die Ergebnisse je nach Trennbedingung, Auswerteverfahren und Farbstoff variieren. Bei der Auswertung der Ergebnisse ist im Klinikalltag zu beachten, dass die Proteine eine unterschiedliche Affinität gegenüber Farbstoffen besitzen. Im Vergleich sieht man ein höheres Farbstoffbindungsvermögen der Proteine an Amidoschwarz 10B als an Ponceau S. Die Anfärbung einer identischen Serumprobe mit beiden Farbstoffen zeigt folgende ermittelte Prozentwerte:

Tab. 6.1: Normbereiche der Proteinfractionen im Serum (prozentuale Verteilung)⁶

Anfärbung	Globuline in %				
	Albumin	α ₁ -Globulin	α ₂ -Globulin	β-Globulin	γ-Globulin
Ponceau S	55,3- 68,6	1,6– 5,8	5,9– 11,1	7,9 – 13,9	11,4–18,2
Amidoschwarz	60,6- 68,6	1,4 – 3,4	4,2 – 7,6	7,0 – 10,4	12,1 – 17,7

7. Beurteilung der CZE:

Die CZE entwickelte sich wegen ihrer schnellen und einfachen Handhabung, vor allem aber durch die automatisierte Methodik, zu den am häufigsten genutzten kapillarelektrophoretischen Verfahren im Klinikalltag³⁶. Während die herkömmlichen Verfahren aufwendig, kostenintensiv und zeitraubend sind, können durch diese voll automatisierte Technik Personal, Zeitkosten und Reagenzien gespart werden³⁷. Die Zeitersparnis bezieht sich nicht nur auf die schnelle und effiziente Probentrennung, sondern führt auch über gut reproduzierbare und genaue Ergebnisse, zu gezielteren Behandlungsplanungen und damit zu schnelleren Behandlungserfolgen^{38,39}. Der entscheidende Vorteil der CZE aber liegt darin, dass die Wiedergabegenauigkeit der Peaks optimiert ist. Grund ist die große Oberfläche der Kapillare, die ein Aufheizen des gesamten Systems verhindert und damit sowohl eine Bandenverbreiterung, als auch die Konvektion der Moleküle in der Flüssigkeit verringert⁴⁰.

Die CZE wird auch in der Detektion von Serumproteinen und monoklonalen Komponenten eingesetzt, wo sie mit hoher Präzision IgA monoklonalen Komponenten oder Leichtketten ermitteln kann, die mit den herkömmlichen Verfahren oft nicht bestimmt werden können^{41,42}. Unterschreitet eine dieser Komponenten aber eine bestimmte Minimalkonzentration, so bleibt sie auch bei der CZE unentdeckt. Hier liegt ein Nachteil der Methodik, die in solchen Fällen an die Grenzen ihres Einsatzbereiches kommt. Paraproteine in Minimalkonzentrationen können nur noch über die Immundefixation detektiert werden⁴³.

Als weitere Fehlerquelle sieht man Veränderungen an Elektropherogrammen, die Medikamentenzusätze im Untersuchungsserum enthalten. Es werden Störungen in Form von zusätzlichen Peaks sichtbar, die sonst z.B. auf Agarosegel- Elektropherogrammen nicht auftreten⁴⁴. Interferenzen dieser Art wurden zunächst bei den Kontrastmitteln Telebrix®, Omnipaque® und Urografin® erkannt, die jeweils in der α_2 -Globulin-Fraktion einen zusätzlichen Peak provozieren^{45,46}. Charakteristika dieser Wirkstoffe sind, dass sie alle bei 214nm absorbieren, in hohen Konzentrationen im Blut vorkommen und zwei bis sechs Tage nach Applikation nicht mehr nachweisbar sind⁴⁷.

8. Ziel der Arbeit:

Mit der vorliegenden Arbeit sollen Kontrastmittel und Antibiotika auf Störungen bei der Kapillarzonenelektrophorese untersucht werden. Hierfür müssen die Medikamente folgende Bedingungen erfüllen:

1. Die Substanzen bzw. Medikamente müssen einen hohen Spiegel im Blut aufweisen, was nur bei intravenöser Gabe erreicht wird.
2. Um eine Störung zu verursachen, müssen sie bei einer Wellenlänge von 214nm absorbieren, die der Wellenlänge zur Bestimmung der Proteine entspricht. Als Beispiel solcher Medikamente wurden weitere Röntgenkontrastmittel und verschiedene Antibiotika ausgesucht.

9. Untersuchung:

In der vorliegenden Arbeit wurden 12 Kontrastmittel und 20 Antibiotika untersucht. Dazu wurden Serumproben mit den entsprechenden Substanzen versetzt. Die Konzentration wurde so gewählt, dass sie der zu erwartenden Peak-Konzentration in vivo entsprechen. Aus diesen wurden Verdünnungsreihen hergestellt, um die minimale Störkonzentration zu bestimmen.

III. Material und Methoden

1. Versuchsdesign:

Das Tischanalysegerät Paragon CZETM2000 (Beckman) wurde in dieser Studie auf Interferenzen, verursacht durch Kontrastmittel und Antibiotika, bei der Analyse von Serumproteinen getestet. Der Einsatz des Gerätes erfolgte im Zentrallabor der Universitätsklinik Tübingen. Die Antibiotika- und Kontrastmittellösungen wurden zunächst entsprechend den Angaben der Hersteller aufgelöst, mit Aqua destillata Verdünnungsreihen erstellt und mit einem Pool-Serum verdünnt. Die verdünnten Serumproben und eine reine Pool-Serum-Probe wurden danach am Paragon CZETM 2000 gemessen. Zur Bestimmung der Absorptionsbereiche der Wirkstoffe und damit zur Überprüfung, ob die Substanzen bei einer Wellenlänge von 214nm absorbieren und somit die Interferenzen provozieren, wurde für jede Substanz ein UV-Spektrum angefertigt. Der erste Analysedurchgang erfolgte zusammen mit dem Gerätepuffer, der die Bedingungen des Gerätes simulieren sollte, der zweite Durchgang fand mit Wasser versetzten Proben statt. Anschließend wurde getestet, ob die Störungsursache durch Filtration eliminiert werden kann. Dafür wurden 150µl der verdünnten Probe mit 50µl Pool- Serum gemischt und aus einem kleinen Probengefäß in Filter (MW 5000) überführt, die bei 17°C und 15 000 Umdrehungen über fünf Minuten zentrifugiert wurden. Der Vorgang wurde nach Beimischung von 100µl 0,9% NaCl wiederholt. Nach nochmaligem Hinzufügen von 100µl 0,9% NaCl wurde die so entstandene Lösung am Paragon CZETM2000 gemessen. Um die Möglichkeit der Bindung der Substanzen an Albumin auszuschließen, wurden zu 150µl eines Albumingemisches jeweils 50µl der reinen Substanz beigemischt und abermals am Paragon CZETM2000 gemessen.

2. Analysegeräte:

2.1. Paragon CZE™2000:

Das Paragon CZE™2000, entwickelt von Beckman Instruments GmbH, ist ein vollautomatisches Tischanalysegerät. Dieses Gerät bietet die Möglichkeit sowohl eine Immunfixationselektrophorese durch Subtraktion (IFE/s), als auch eine Serumproteinelektrophorese (SPE) durchzuführen.

Das System besteht aus einem Transfer-, Probenkarussell- und Hydropneumatische Modul. Weitere Systemkomponenten stellen die Bedienerkonsole (Hewlett Packard Vectra Computer) mit der dazugehörigen Paragon CZE 2000-Software und Hardware dar.



2.1.1. Methodik zur Durchführung der Serum-Proteinelektrophorese:

Die Serum-Proteinelektrophorese des Paragon CZE™2000 erfolgt nach dem Prinzip der Kapillarzonenelektrophorese.

Eine Untersuchungsfolge beginnt mit der Vorbereitung der einzelnen Kapillaren. Diese werden zunächst mit einer Reinigungslösung gereinigt. Die Serumproben werden in Probengefäßen in die Sektoren, die sich im Probenkarussell befinden, eingesetzt. Es stehen zehn solcher Sektoren zur Verfügung, die jeweils sieben Probengefäße aufnehmen können. Die Proben werden automatisch aus den Probengefäßen entnommen und in ein Kunststoff-Segment mit sieben Vertiefungen überführt, wo sie ebenfalls automatisch verdünnt werden.

Zur Probenauftrennung wird das Segment durch einen Roboterarm unter sieben Kapillaren befördert. Nachdem jede Kapillare mit einer frischen Pufferlösung vorkonditioniert wurde, werden 60µl der verdünnten Proben in die Kapillaren angesaugt. Die Probenauftrennung erfolgt in den sieben Kapillaren gleichzeitig und wird bei einer Spannung von 9000V durchgeführt. Durch den entstehenden EOF und die elektrophoretische Mobilität der einzelnen Proteine, werden die Moleküle aufgetrennt und nacheinander an einem optischen Fenster kurz vor der Kathode vorbeigeschwemmt. Ein UV-Siliciumdetektor misst daraufhin die Absorption bei einer Wellenlänge von 214nm, die entsprechend zur Menge der vorhandenen Peptidbindungen proportional ist.

Das Datenerfassungsmodul empfängt die Daten und leitet diese an die Bedienerkonsole weiter. Dort werden die Daten aus der innerhalb einer spezifizierten Zeitspanne aufgezeichneten Absorption berechnet und zur Erstellung eines Elektropherogrammes verwendet. Die gemessenen Fraktionen entsprechen denen der herkömmlichen elektrophoretischen Verfahren. Die auf WindowsTM basierende Software berechnet automatisch den relativen Prozentanteil der jeweiligen Fraktionen. Nach jedem Analysendurchlauf wird ein Bericht ausgedruckt, der folgende Informationen erhält:

- Elektropherogramm
- Name der Fraktionen mit relativer %-Angabe und Konzentration [g/dl]
- Referenzbereiche mit relativer %-Angabe und Konzentration [g/dl]
- Ergebnisse, die außerhalb des Referenzbereiches liegen werden automatisch mit Plus-Symbolen gekennzeichnet

2.1.2. Reagenzien und gerätetechnische Bedingungen:

Reinigungslösung: Capillary Electrophoresis Rinse Solution; P/N 44 63 10

Puffer: Capillary Electrophoresis Buffer-100; P/N 44 62 80 (Boratpuffer; pH 10,3)

Temperaturregelung: 18-24°C

Probenkapazität: 70 Proben pro Lauf

Probenvolumina: 60µl

Durchsatz: 42 Serum- Proteinelektrophoresen in einer Stunde

2.2. Geräte zur Aufarbeitung der Serumproben:

CAF- Elektrophorese	Olympus Hite Fractoscan Junior (Serien-Nr.343)
Filter	Pall Filtron (5 000 MW)

3. Kontrastmittel und Antibiotika

Es wurden zwölf Kontrastmittel und 20 Antibiotika untersucht. Kriterien zur Auswahl der Substanzen waren, dass sie sowohl intravenös verabreicht werden, als auch eine Säureamidbindung in ihrer Strukturformel enthalten. Aufgrund der Peptidbindungen absorbieren die Wirkstoffe ebenfalls wie die Serumproteine bei einer Wellenlänge von 214nm. Somit werden sie bei der Untersuchung mit dem Paragon CZETM mitberücksichtigt und zu den Proteinen mitgerechnet. Durch die intravenöse Verabreichung wird erreicht, dass diese Substanzen im Serum in höheren Konzentrationen vorkommen.

Die untersuchten Stoffe sind:

<u>Kontrastmittel:</u>	Conray 60 (Mallinckrodt Medical)
	Imeron 300 (Byk Gulden)
	Isovist 300 (Schering)
	Magnevist (Schering)
	Multihance (Byk Gulden)
	Omnipaque 350 (Schering)
	Optiray 300 (Tyco Healthcare)
	Peritrast (Dr. Franz Köhler Chemie GmbH)
	Solutrast 300 (Byk Gulden)
	Telebrix Gastro (Guerbet)
	Ultravist 300 (Schering)
	Urografin 76% (Schering)

Antibiotika: Baypen 4g (Bayer)
Ciprobay 400 (Bayer)
Claforan 2,0g (Hoechst Marion Roussel)
Erythrocin i.v. 0,5g (Heumann Pharma)
Fortum 1,0g (Glaxo Wellcome)
Metronidazol (Ratiopharm)
Mefoxitin 1,0g (MSD)
Penicillin (Grünenthal)
Pipril 4g (Lederle)
Refobacin 80mg (Merck)
Rifa Parenteral 600mg (Grünenthal)
Rocephin zur Infusion 2g (Roche)
Sobelin 300 (Pharmacia & Upjohn)
Spizef 1,0g (Takeda Pharma)
Staphylex 1,0g (SmithKline Beecham Pharma)
Tarivid i.v. 200mg (Hoechst Marion Roussel)
Tavanic i.v. 500mg (Hoechst Marion Roussel)
Vancomycin CP Lilly 500 (Lilly)
Vibravenös SF (Pfizer)
Zinazef 1500 (Glaxo Wellcome)

3.1. Strukturformeln der Kontrastmittel:

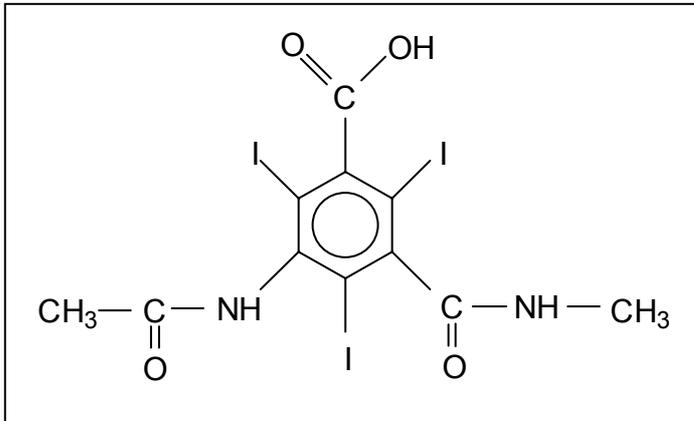


Abb. 3.1.1 Conray 60 (Mallinckrodt Medical)⁴⁸

Wirkstoff: Iotalaminsäure

Serumhalbwertszeit: 80min

Tageshöchstdosis: 6g

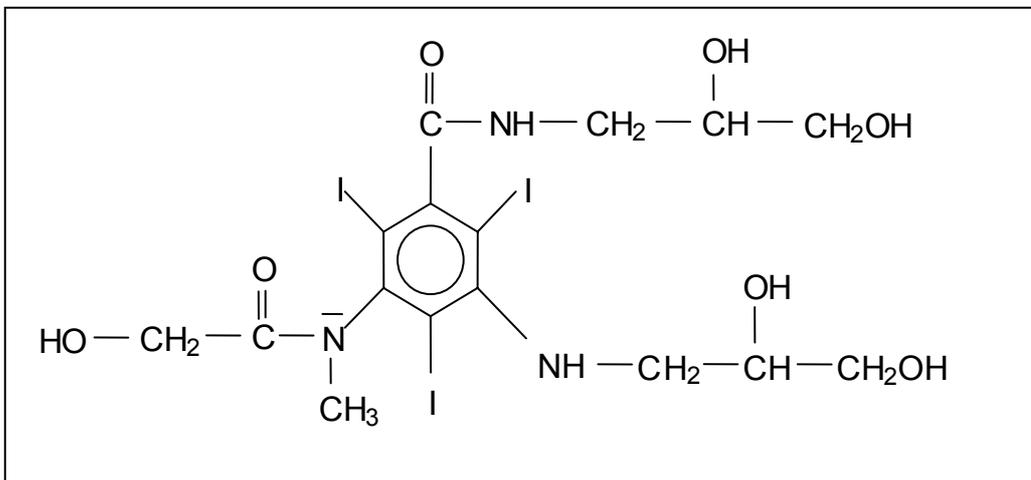


Abb. 3.1.2 Imeron 300 (Byk Gulden)⁴⁹

Wirkstoff: Iomeprol

Serumhalbwertszeit: 109 +/- 20min

Tageshöchstdosis: 163,3g

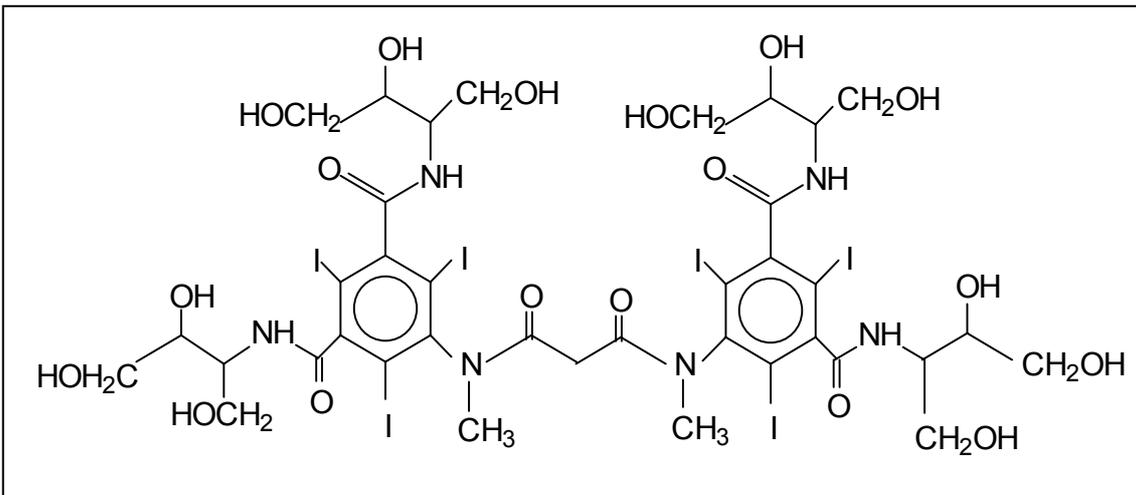


Abb. 3.1.3 Iovist 300 (Schering)⁵⁰

Wirkstoff: Iotrolan

Serumhalbwertszeit: keine Daten vorhanden

Tageshöchstdosis: 4,5g

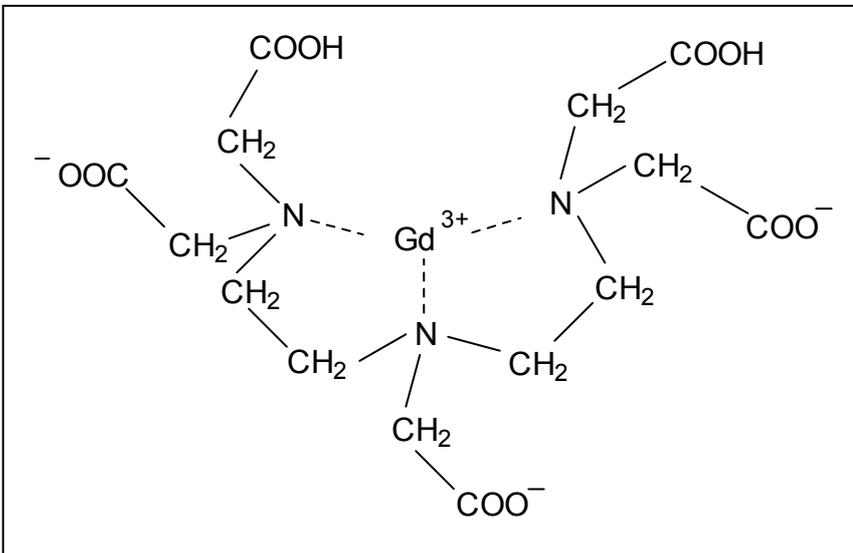


Abb. 3.1.4 Magnevist (Schering)⁵¹

Wirkstoff: Gadopentetsäure

Serumhalbwertszeit: 90min

Tageshöchstdosis: 19,7g

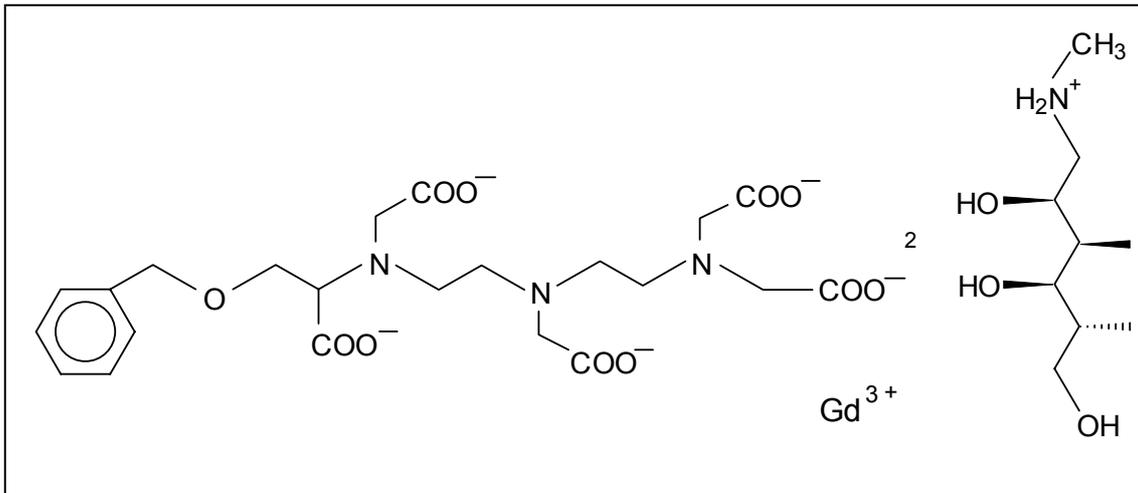


Abb. 3.1.5 Multihance (BYK Gulden)⁵²

Wirkstoff: Gadolinin

Serumhalbwertszeit: 5–7min

Tageshöchstosis: 2,3g

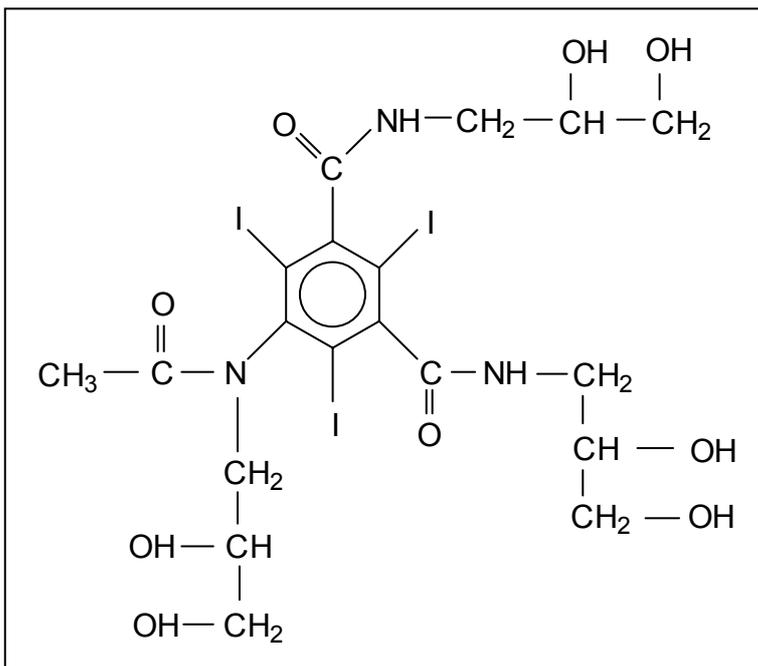


Abb.3.1.6 Omipaque 350 (Schering)⁵³

Wirkstoff: Iohexol

Serumhalbwertszeit: 120-180min

Tageshöchstosis: 75,5g

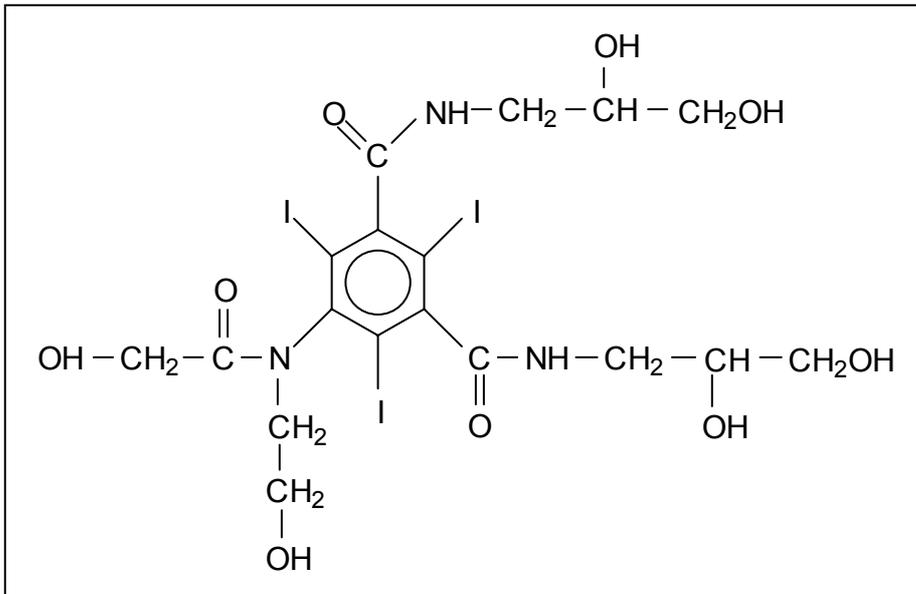
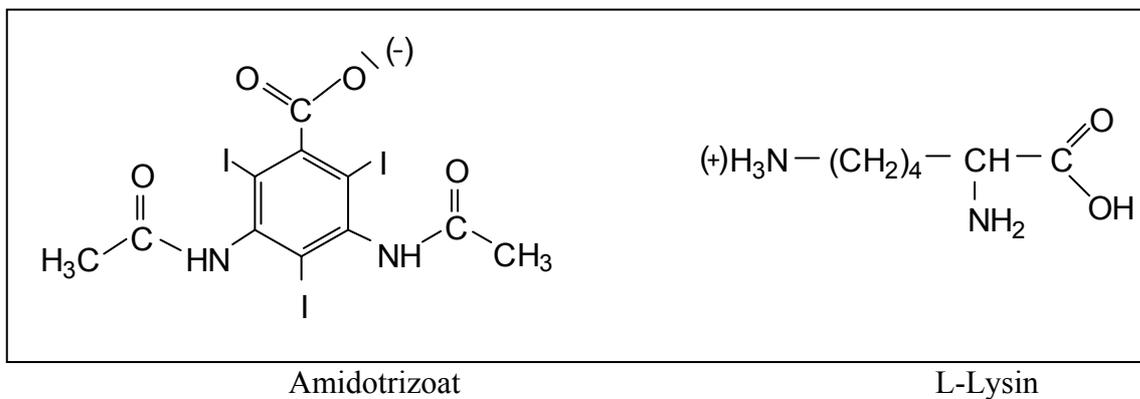


Abb.3.1.7 Optiray 300 (Tyco Healthcare)⁵⁴

Wirkstoff: Ioversol

Serumhalbwertszeit: 118min

Tageshöchstdosis: 63,6g



Amidotrizoat

L-Lysin

Abb.3.1.8 Peritrast (Dr. Franz Köhler Chemie GmbH)⁵⁵

Wirkstoff: L-Lysin-Amidotrizoate

Serumhalbwertszeit: 100min

Tageshöchstdosis: 42g

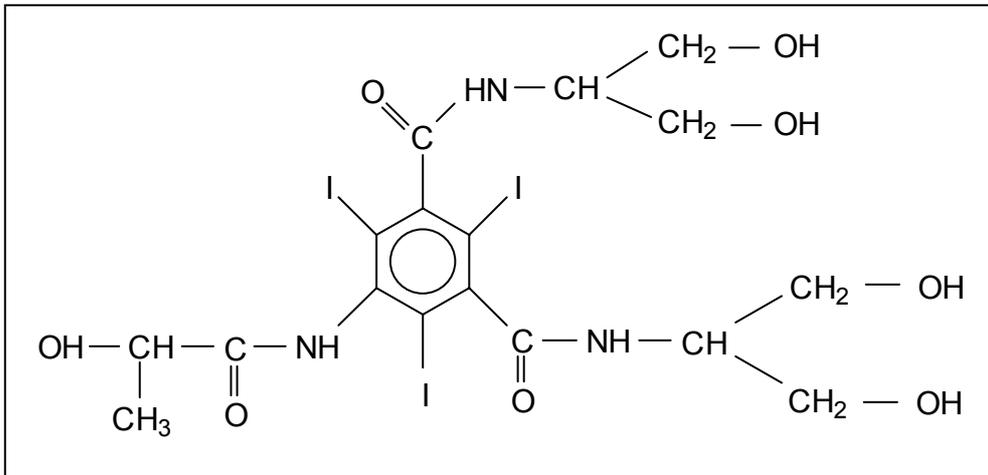


Abb.3.1.9 Solutrast 300 (BYK Gulden)⁵⁶

Wirkstoff: Iopamidol

Serumhalbwertszeit: 120min

Tageshöchstdosis: 61,24g

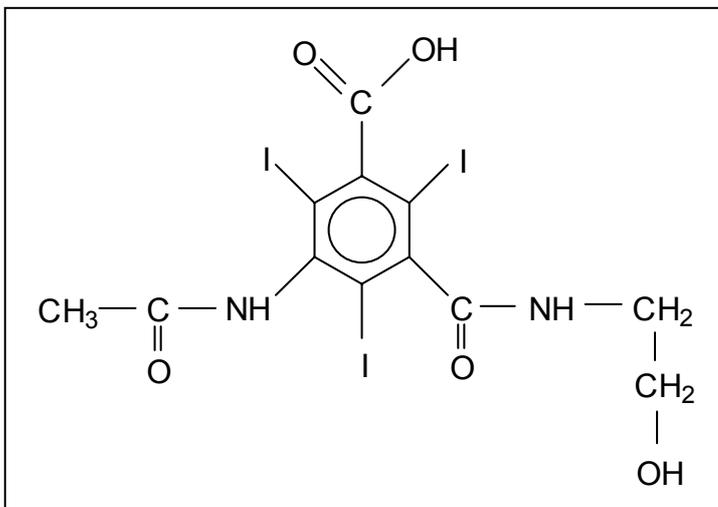


Abb.3.1.10 Telebrix Gastro (Guerbet)⁵⁷

Wirkstoff: Ioxataminsäure

Serumhalbwertszeit: keine Daten vorhanden

Tageshöchstdosis: 66g

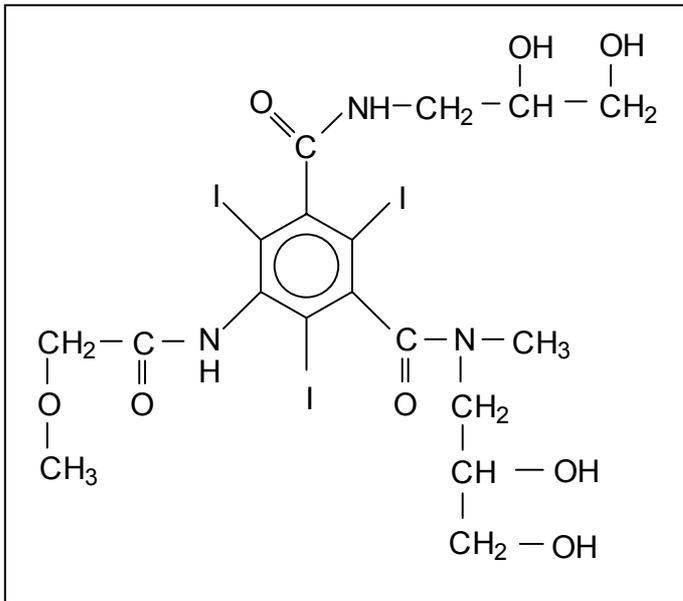


Abb.3.1.11 Ultravist 300 (Schering)⁵⁸

Wirkstoff: Iopromid

Serumhalbwertszeit: 3min

Tageshöchstdosis: 105g

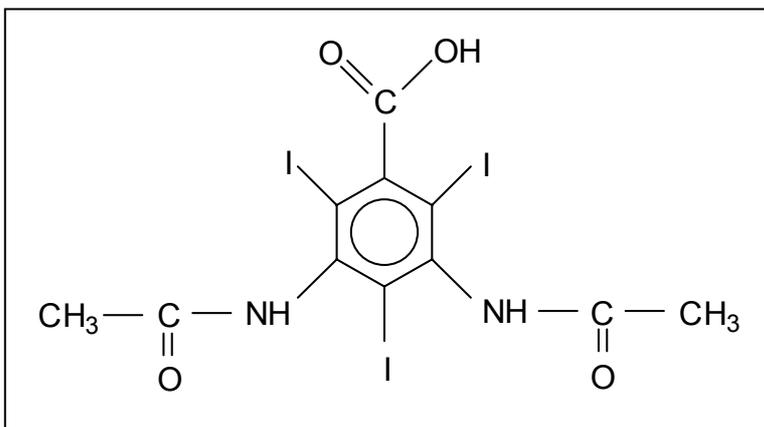


Abb.3.1.12 Urografin 76% (Schering)⁵⁹

Wirkstoff: Amidotrizoesäure

Serumhalbwertszeit: 180min

Tageshöchstdosis: 15,2g

3.2. Strukturformeln der Antibiotika:

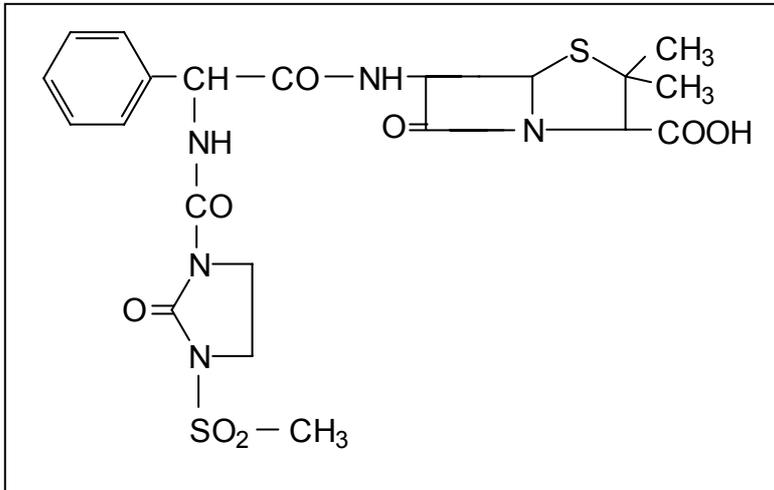


Abb.3.2.1 Baypen 4g (Bayer)⁶⁰

Wirkstoff: Mezlocillin

Maximale Serumkonzentration: keine Daten vorhanden

Serumhalbwertszeit: 50-70min

Mittlere Tagesdosis: 6-15g

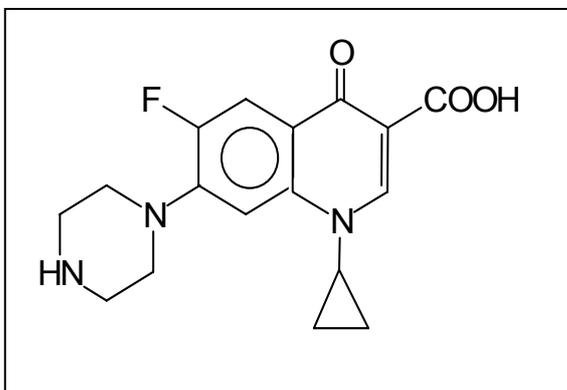


Abb.3.2.2 Ciprobay 400 (Bayer)⁶¹

Wirkstoff: Ciprofloxacin

Maximale Serumkonzentration: 4,6mg/l

Serumhalbwertszeit: 180-300min

Mittlere Tagesdosis: 0,5-1g

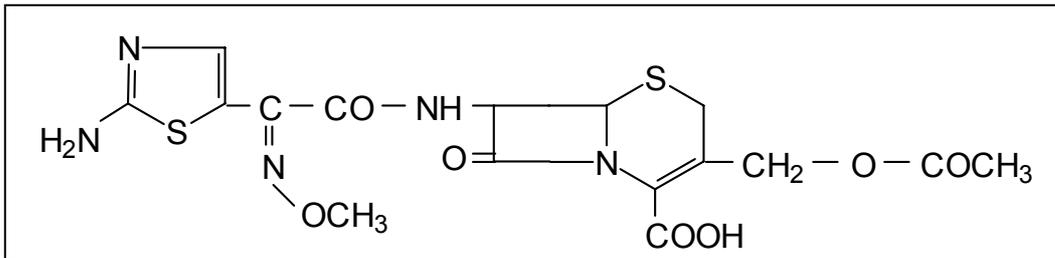


Abb.3.2.3 Claforan 2,0g (Hoechst Marion Roussel)⁶²

Wirkstoff: Cefotaxim

Maximale Serumkonzentration: 167-214mg/l

Serumhalbwertszeit: 50-80min

Mittlere Tagesdosis: 3-6g

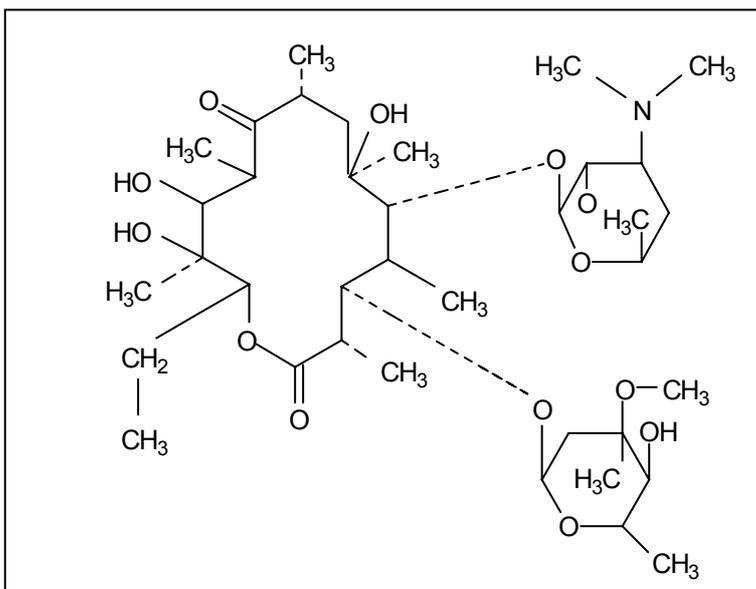


Abb.3.2.4 Erythrocin i.v. 0,5g (Heumann Pharma)⁶³

Wirkstoff: Erythromycin lactobionat

Maximale Serumkonzentration: 1,458 +/- 1,045mg/l

Serumhalbwertszeit: 90-180min

Mittlere Tagesdosis: 2g

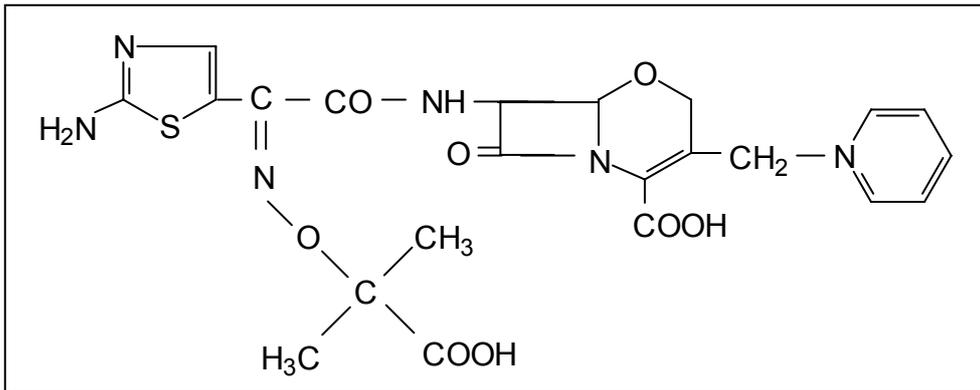


Abb.3.2.5 Fortum 1,0g (Glaxo Wellcome)⁶⁴

Wirkstoff: Ceftazidim

Maximale Serumkonzentration: 83mg/l

Serumhalbwertszeit: 108min

Mittlere Tagesdosis: 2-6g

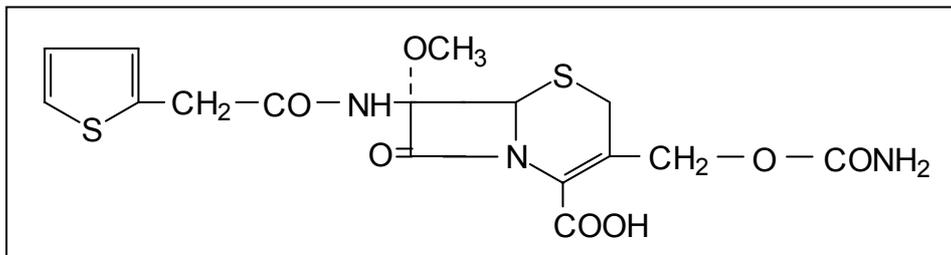


Abb.3.2.7 Mefoxitin 1,0g (MSD)⁶⁵

Wirkstoff: Cefoxitin

Maximale Serumkonzentration: 125mg/l

Serumhalbwertszeit: 60min

Mittlere Tagesdosis: 3-6g

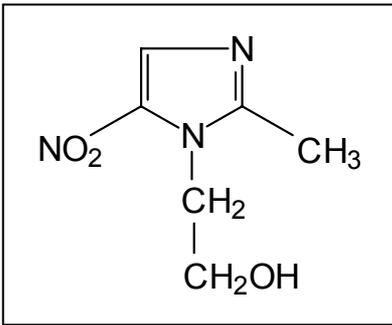


Abb.3.2.6 Metronidazol (Ratiopharm)^{66,67}

Wirkstoff: Metronidazol

Maximale Serumkonzentration: 20-40mg/l

Serumhalbwertszeit: 360-480min

Mittlere Tagesdosis: 0,8-1g

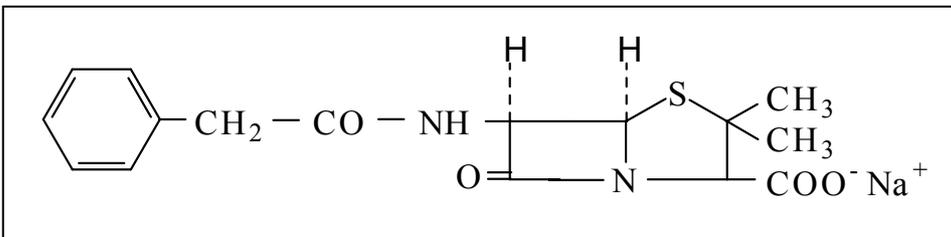


Abb.3.2.8 Penicillin (Grünenthal)⁶⁸

Wirkstoff: Benzylpenicillin- Na

Maximale Serumkonzentration: 42mg/l

Serumhalbwertszeit: 30-40min

Mittlere Tagesdosis: 0,6-3g

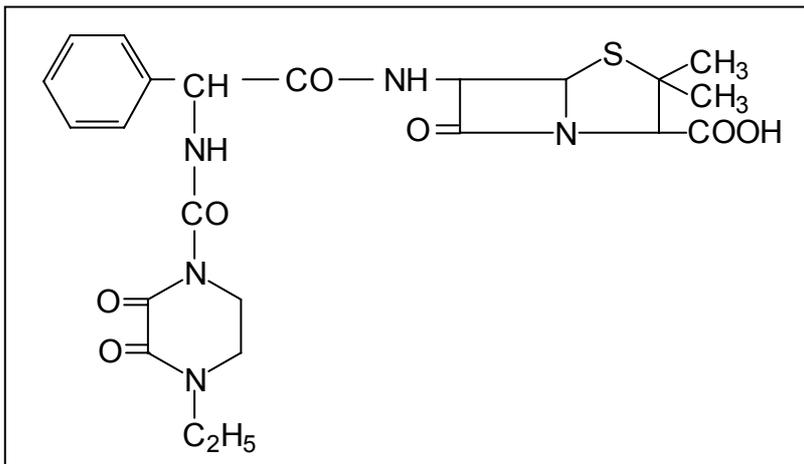


Abb.3.2.9 Pipril 4g (Lederle)⁶⁹

Wirkstoff: Piperacillin

Maximale Serumkonzentration: 1g/l

Serumhalbwertszeit: 50-70min

Mittlere Tagesdosis: 7-14g

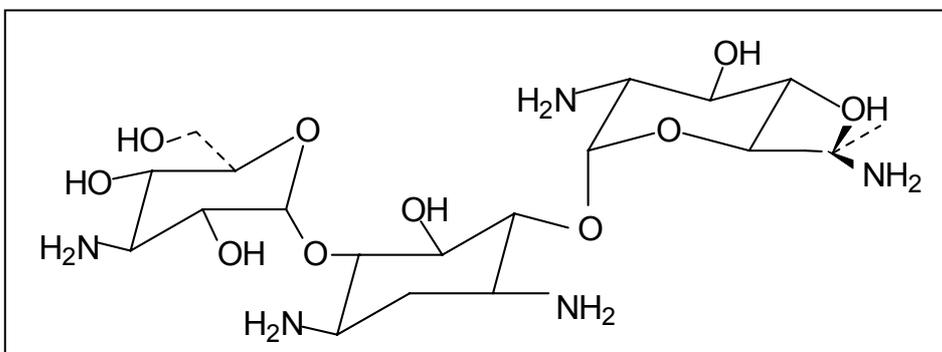


Abb.3.2.10 Refobacin 80mg (Merck)⁷⁰

Wirkstoff: Gentamicin

Maximale Serumkonzentration: 3,5-6,4mg/l

Serumhalbwertszeit: 120-180min

Mittlere Tagesdosis: 0,36g

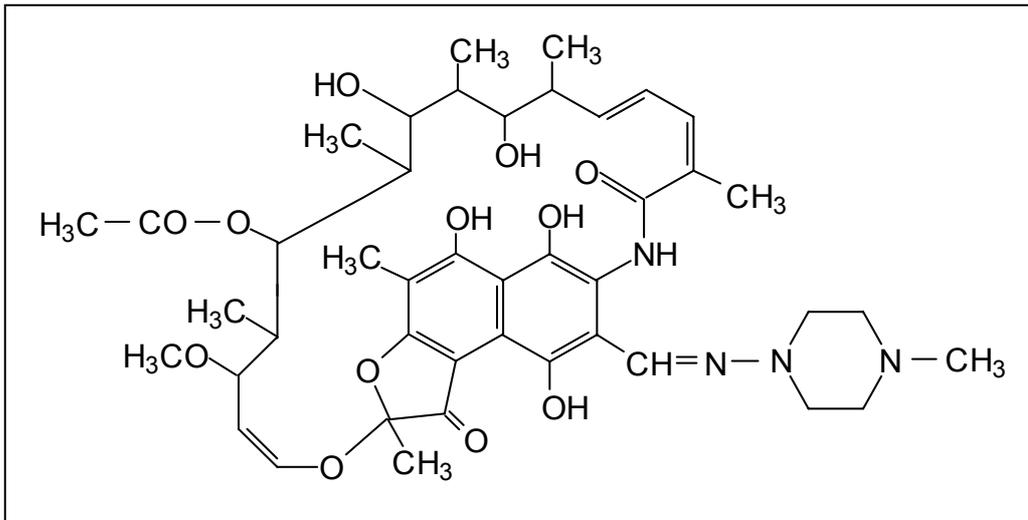


Abb.3.2.11 Rifa parenteral 600mg (Grünenthal)⁷¹

Wirkstoff: Rifampicin

Maximale Serumkonzentration: 5-13mg/l

Serumhalbwertszeit: 138-258min

Mittlere Tagesdosis: 0,7g

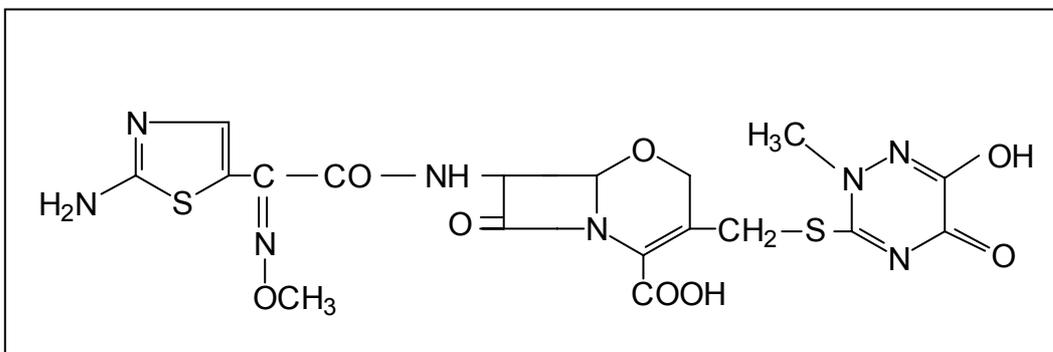


Abb.3.2.12 Rocephin zur Infusion 2g (Roche)⁷²

Wirkstoff: Ceftriaxon

Maximale Serumkonzentration: 300mg/l

Serumhalbwertszeit: 480min

Mittlere Tagesdosis: 1-2g

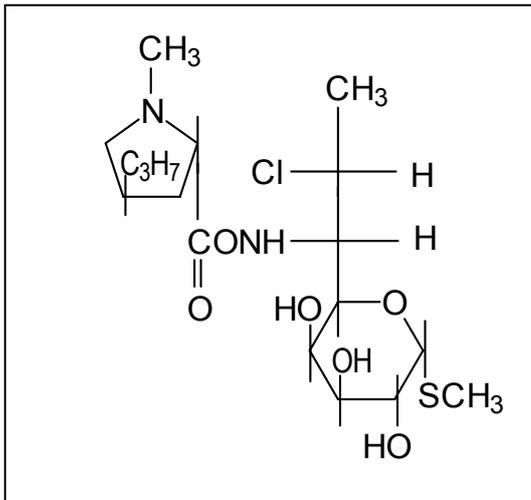


Abb.3.2.13 Sobelin 300 (Pharmacia & Upjohn)⁷³

Wirkstoff: Clindamycin

Maximale Serumkonzentration: 12-18mg/l

Serumhalbwertszeit: 180min

Mittlere Tagesdosis: 0,15-0,45g

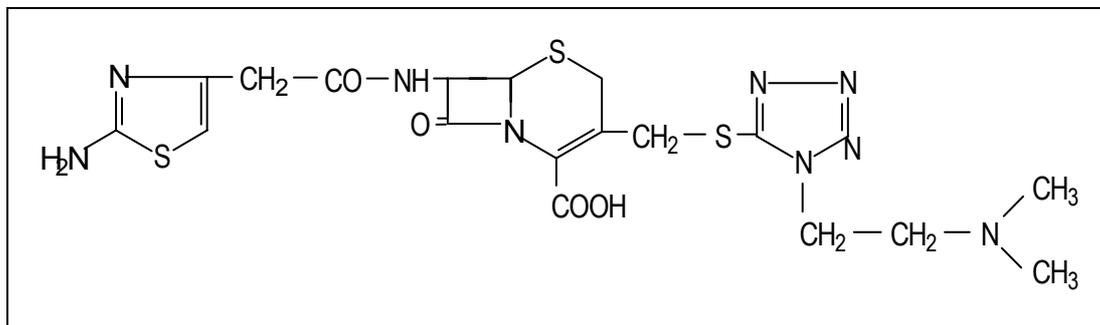


Abb.3.2.15 Spizef 1,0g (Takeda Pharma)⁷⁴

Wirkstoff: Cefotiam

Maximale Serumkonzentration: 58mg/l

Serumhalbwertszeit: 120min

Mittlere Tagesdosis: 3-6g

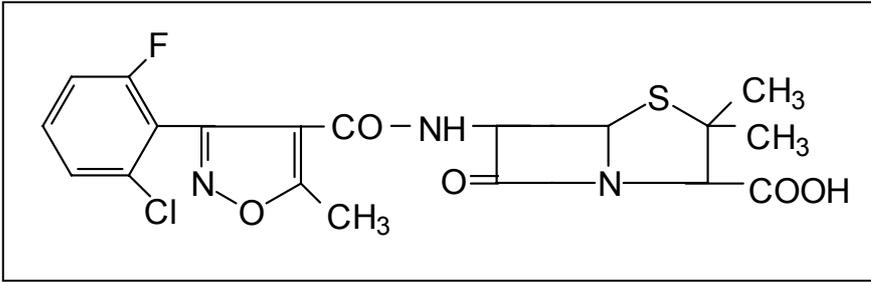


Abb.3.2.14 Staphylex 1,0g (SmithKline Beecham Pharma)⁷⁵

Wirkstoff: Flucloxacillin

Maximale Serumkonzentration: 244mg/l

Serumhalbwertszeit: 45-65min

Mittlere Tagesdosis: 3g

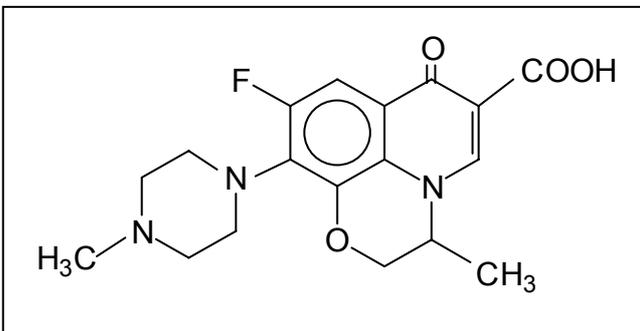


Abb.3.2.16 Tarivid i.v. 200mg (Hoechst Marion Roussel)⁷⁶

Wirkstoff: Ofloxacin

Maximale Serumkonzentration: 5,2mg/l

Serumhalbwertszeit: 285min

Mittlere Tagesdosis: 0,1-0,2g

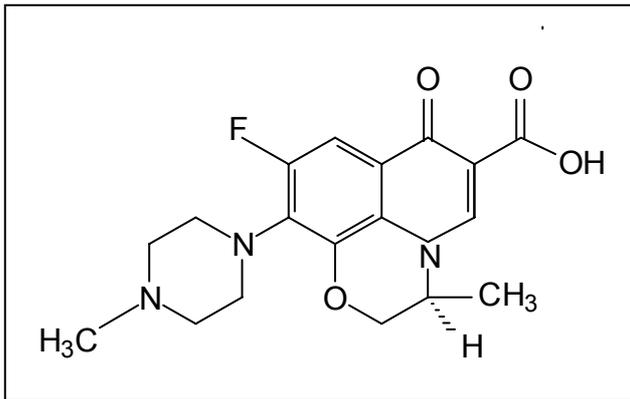


Abb.3.2.17 Tavanic i.v. 500mg (Hoechst Marion Roussel)⁷⁷

Wirkstoff: Levofloxacin

Maximale Serumkonzentration: 6,4mg/l

Serumhalbwertszeit: 360-480min

Mittlere Tagesdosis: 0,25- 0,5g

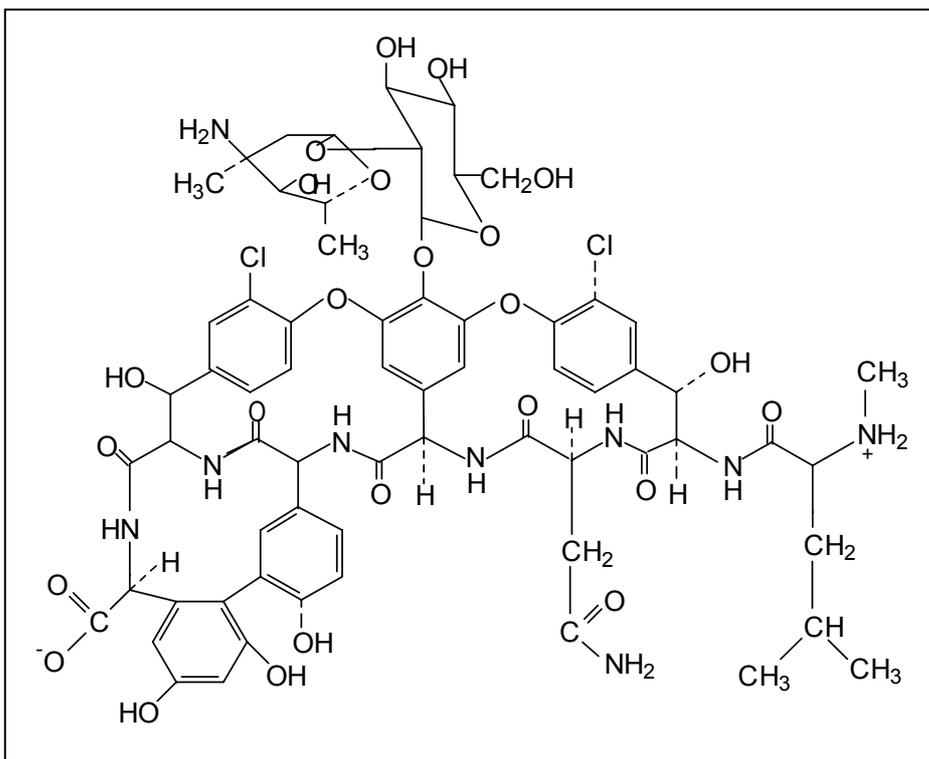


Abb.3.2.18 Vancomycin CP Lilly 500 (Lilly)⁷⁸

Wirkstoff: Vancomycin-hydrochlorid

Maximale Serumkonzentration: 32mg/l

Serumhalbwertszeit: 420min

Mittlere Tagesdosis: 0,5-1g

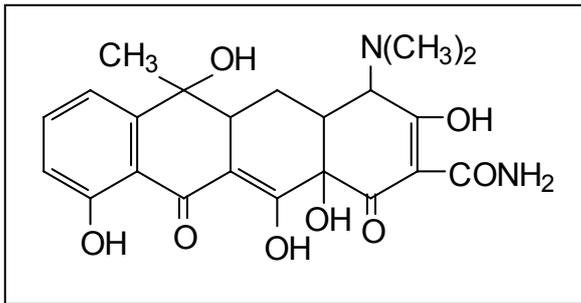


Abb.3.2.19 Vibramenös SF (Pfizer)⁷⁹

Wirkstoff: Doxicyclin

Maximale Serumkonzentration: 3-5,7mg/l

Serumhalbwertszeit: 960-1080min

Mittlere Tagesdosis: 0,1-0,2g

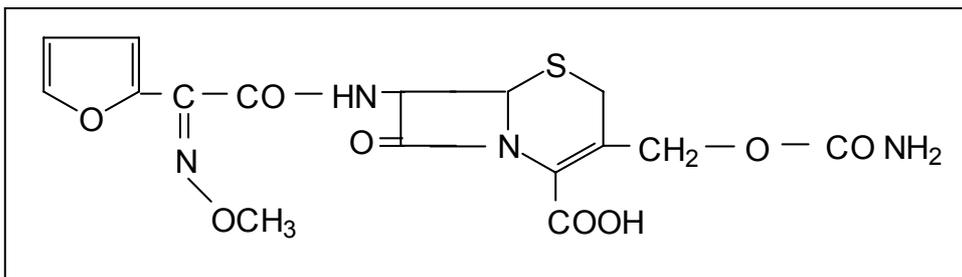


Abb.3.2.20 Zinazef 1500 (Glaxo Wellcome)⁸⁰

Wirkstoff: Cefuroxim

Maximale Serumkonzentration: 151mg/l

Serumhalbwertszeit: 70-120min

Mittlere Tagesdosis: 0,75-1,5g

IV. Ergebnisse

1. UV-Spektren:

Die UV-Spektren der in der Arbeit untersuchten Medikamente zeigen, dass die jeweiligen Wirkstoffe bei 214nm absorbieren. Damit kommen sie als Störungsquelle während der kapillarelektrophoretischen Detektion mit dem Paragon CZE 2000 in Frage (siehe Tabelle 1.1 und 1.2). Sie erzeugen Detektionsergebnisse mit erhöhten Konzentrationsangaben. Diese entstehen dadurch, dass im strukturellen Aufbau der einzelnen Wirkstoffe Peptidbindungen vorhanden sind (siehe in Material und Methoden). Diese werden wie die Peptidbindungen der Serumproteine erkannt und in die Konzentrationsberechnungen des Systems integriert.

Tab. 1.1: Absorptionsmaxima der Kontrastmittel im Puffer

Präparat	Absorptions- maximum (nm) im Puffer*	214nm (%)
Conray 60	239	59
Imeron 300	244	64
Isovist 300	244	77
Magnevist	209	90
Omnipaque 350	244	70
Optiray 300	245	69
Peritrast	237	52
Telebrix Gastro	240	56
Ultravist 300	241	62
Urografin 76%	238	57

* Puffer = CZE Puffer (siehe Material und Methoden)

Tab. 1.2: Absorptionsmaxima der Antibiotika im Puffer

Präparat	Absorptions- maximum (nm) im Puffer*	214nm(%)
Baypen 4g	212	92
Ciprobay 400	268 ; 244 ; 202	77
Claforan 2,0g	234 ; 203	87
Erythrocin i.v. 0,5g	209	93
Fortum 1,0g	253 ; 199	88
Mefoxitin 1,0g	234 ; 199	66
Metronidazol Ratiopharm	318; 205	36
Penicillin	205	71
Pipril 4g	202	78
Refobacin 80mg	199	17
RIFA Parenteral 600mg	330; 236 ; 197	83
Rocephin zur Infusion 2g	239 ; 272	70
Sobelin 300	200	33
Spizef 1,0g	259; 203	77
Staphylex 1,0g	207	85
Tarivid i.v. 200	332 ; 286 ; 230 ; 197	57
Tavanic i.v. 500mg	332; 287 ; 228	52
Vancomycin CP Lilly 500	241	78
Vibravenös SF	203	55
Zinazef 1500mg	278	56

* Puffer = CZE Puffer (siehe Material und Methoden)

2. Verdünnungsreihen:

2.1. CZE-Fraktionen:

Vergleicht man die Ergebnisse der Testseren, die mit Medikamenten versetzt sind mit reinen Pool-Serum-Proben ohne Zusatz, stellt man im ersten Fall erhöhte Konzentrationsangaben für bestimmte Serumproteine fest. Diese Veränderung stellt sich in Form von Kurvenabschnitten mit erhöhten Peaks dar. Das Gerät analysiert also bei Anwesenheit eines dieser Medikamente höhere Serumproteinkonzentrationen als bei den gleichen Seren ohne Zusätze. Diese Störungen treten aber nicht in allen Fraktionen gleichmäßig auf, sondern jedes Medikament bewirkt jeweils in einer bestimmten ihm zugehörigen Fraktion ein verfälschtes Ergebnis (siehe Tabelle 2.1.1 und 2.1.2):

Störungen in der α_2 -Fraktion ergeben sich bei Conray 60, Omnipaque 350, Peritrast, Telebrix Gastro, Ultravist 300 und Urografin 76%, Ciprobay 400, Claforan 2,0g, Mefoxitin 1,0g, Staphylex, Tarivid, Tavanic i.v. 500mg und Zinazef 1500mg. Imeron 300, Optiray 300 und Solutrast 300, Baypen, Fortum, Pipril 4g, Spizef 1,0g, Tarivid und Tavanic i.v. 500mg bedingen erhöhte Peaks in der β -Fraktion. Isovist 300, Pipril, Rocephin zur Infusion 2g, Sobelin 300 und Vibravenös SF stören in der Pre-Albumin bzw. Albumin-Fraktion. Einen erhöhten Peak in der γ -Fraktion verursacht RIFA Parenteral 600mg. Keinerlei Interferenzen im Detektionsablauf entstehen bei Magnevist, Multihance, Erythrocin i.v. 0,5g, Metronidazol Ratiopharm, Refobacin 80mg und Vibravenös SF. Penicillin bewirkt eine gestörte Detektion in der α_1 -Fraktion, zusätzlich sind Kurvenveränderungen in der Albumin-Fraktion zu erkennen. Abgesehen von diesen Phänomenen konnten bei der Serumkapillarzonenelektrophorese keine weiteren Störungen erkannt werden.

Tab. 2.1.1: Kontrastmittel mit ihren Wirkstoffen und deren Störungen in den Fraktionen

Präparat	Wirkstoff	CZE-Fraktion
Conray 60	Iotalaminsäure	α_2
Imeron 300	Iomeprol	β
Isovist 300	Iotrolan	pre-/ Alb
Magnevist	Gadopentetsäure	n
Multihance	Gadolinin	n
Omipaque 350	Iohexol	α_2
Optiray 300	Ioversol	β
Peritrast	L-Lysin-Amidotrizoate	α_2
Solutrast 300	Iopamidol	α_2/ β
Telebrix Gastro	Ioxotalaminsäure	α_2
Ultravist 300	Iopromid	α_2
Urografin 76%	Amidotrizoessäure	α_2

n = keine Störung

Tab. 2.1.2: Antibiotika mit ihren Wirkstoffen und deren Störungen in den Fraktion

Präparat	Wirkstoff	CZE-Fraktion
Baypen 4g	Mezlocillin	β
Ciprobay 400	Ciprofloxacin	α_2
Claforan 2,0g	Cefotaxim	α_2/ β
Erythrocin i.v.0,5g	Erythromycin lactobionat	n
Fortum 1,0g	Ceftazidim	β
Mefoxitin 1,0g	Cefoxitin	α_2
Metronidazol Ratiopharm	Metronidazol	n
Penicillin	Benzylpenicillin	α_1
Pipril 4g	Piperacillin	pre- Alb/ β
Refobacin 80mg	Gentamicin	n
RIFA Parenteral 600mg	Rifampicin	γ
Rocephin zur Infusion 2g	Ceftriaxon	pre-/ Alb
Sobelin 300	Clindamycin	pre-/ Alb
Spizef 1,0g	Cefotiam	β
Staphylex 1,0g	Flucloxacillin	α_2
Tarivid i.v. 200	Ofloxacin	α_2/ β
Tavanic i.v. 500mg	Levofloxacin	α_2/ β
Vancomycin CP Lilly 500	Vancomycin-hydrochlorid	α_2
Vibravenös SF	Doxicyclin	n
Zinazef 1500mg	Cefuroxim	α_2

n = keine Störung

2.2. Minimale Störkonzentration:

Geringe Mengen eines Antibiotikums oder Kontrastmittels im Blut müssen nicht unbedingt zu Störungen führen. Jeder Stoff muss eine für sich bestimmte Konzentrationsschwelle überschreiten. Diese Grenze ist erforderlich, damit der jeweilige Wirkstoff vom Analysegerät erfasst wird. Die minimale Konzentration gibt diejenige Konzentration an, bei der es im Laufe der Verdünnungsreihe erstmals zu Peakveränderungen kommt (siehe Tabelle 2.2.1 und 2.2.2). Vergleicht man diese Konzentration mit der Konzentration, die unmittelbar nach intravenöser Applikation des Präparates herrscht, erkennt man bei allen Kontrastmitteln, außer bei Isovist 300 und Ultravist 300, dass die minimale Konzentration unter der Anfangskonzentration liegt. Das bedeutet also, dass jede Applikation dieser Substanzen in klinisch relevanten Konzentrationen, Detektionsstörungen im Sinne von Peakvergrößerungen hervorruft. Bei Isovist 300 und Ultravist 300 können Störungen erst auftreten, wenn bei

entsprechenden Untersuchungen höhere Konzentrationen erzielt werden. Magnevist und Multihance weisen keinerlei Interferenzen und somit Störungen bei der Detektion auf.

Tab. 2.2.1: Kontrastmittel mit Anfangskonzentration nach intravenöser

*Applikation und minimale Konzentration, die eine Störung bewirkt
(keine Daten zur maximalen Dosierung verfügbar)*

Präparat	Anfangs- konzentration (mg/ml)	Minimale Konzentration (mg/l)
Conray 60	300	94
Imeron 300	300	150
Isovist 300	641	801
Magnevist	---	Keine Störung
Multihance	---	Keine Störung
Omnipaque 350	700	250
Optiray 300	509	318
Peritrast	300	150
Solutrast 300	612	255
Telebrix Gastro	660	275
Ultravist 300	623	779
Urografin 76%	760	238

Der Vergleich der Anfangskonzentrationen mit der minimalen Konzentration der getesteten Antibiotika zeigt, dass nur bei Claforan 2,0g schon bei der kleinsten Dosis mit einer Störung zu rechnen ist (siehe Tabelle 2.2.2).

Die maximale Dosierung entspricht der maximal erlaubten Dosis, die der Patient während der Therapie des Antibiotikums erhalten darf. Diese Dosis liegt bei den Präparaten Ciprobay 400, Fortum 1,0g, Mefoxitin 1,0g, Penicillin, RIFA Parenteral 600mg, Sobelin 300, Staphylex 1,0g, Tarivid i.v. 200, Tavanic i.v. 500mg, Vancomycin 500, Vibravenös SF und Zinazef 1500 unterhalb der geforderten minimalen Störkonzentration. Diese Medikamente können also in der klinischen Anwendung in der Regel nicht zu Interferenzen führen. Erythrocin i.v. 0,5g, Metronidazol und Refobacin 80mg bewirken keine Peakvergrößerungen.

Tab. 2.2.2: Antibiotika mit Anfangskonzentration nach intravenöser Applikation und minimale Konzentration, die eine Störung bewirkt; maximal mögliche Tagesdosierung während Therapie (gemittelte Konzentration; Daten aus (Fachinformation))

Präparat	Anfangs- konzentration (mg/ml)	Minimale konzentration (mg/l)	Maximale Dosierung (mg/l)
Baypen 4g	100	156	558
Ciprobay 400	2	250	4,6
Claforan 2,0g	200	125	167-214
Erythrocin i.v. 0,5g	35	Keine Störung	$1,2 \cdot 10^{-3}$
Fortum 1,0g	100	278	83
Mefoxitin 1,0g	100	313	125
Metronidazol	5	Keine Störung	15
Penicillin	50	125	45
Pipril 4g	80	533	1000
Refobacin 80mg	66	Keine Störung	3,5- 6,4
RIFA Parenteral 600mg	1,2	600	5-13
Rocephin zur Infusion 2g	50	125	300
Sobelin 300	150	375	12-18
Spizef 1,0g	100	417	58
Staphxlex 1,0g	20	200	130
Tarivid i.v. 200	2	50	5,2
Tavanic i.v. 500mg	5	63	6,4
Vancomycin 500	4,5	50	32
Vibravenös SF	20	Keine Störung	3-5,7
Zinazef 1500	75	313	151

Tab.2.2.3: Kontrastmittel und ihre Verdünnungskonzentration, bei der sich Störungen gezeigt haben

Präparat	Konzentration
Conray 60	1:3200
Imeron 300	1:2000
Isovist 300	1:800
Magnevist	---
Multihance	---
Omnipaque 350	1:2800
Optiray 300	1:1600
Peritrast	1:2000
Solutrast 300	1:2400
Telebrix Gastro	1:2400
Ultravist 300	1:800
Urografin 76%	1:3200

Tab.2.2.4: Antibiotika und ihre Verdünnungskonzentration, bei der sich Störungen gezeigt haben

Präparat	Konzentration
Baypen 4g	1:640
Ciprobay 400	1:8
Claforan 2,0g	1:1600
Erythrocin i.v. 0,5g	---
Forum 1,0g	1:360
Mefoxitin 1,0g	1:320
Metronidazol Ratiopharm	---
Penicillin	1:400
Pipril 4g	1:150
Refobacin 80mg	---
RIFA Parenteral 600mg	1:4
Rocephin zur Infusion 2g	1:400
Sobelin 300	1:400
Spizef 1,0g	1:240
Staphylex 1,0g	1:100
Tarivid i.v. 200	1:40
Tavanic i.v. 500mg	1:80
Vancomycin CP Lilly 500	1:80
Vibravenös SF	---
Zinazef 1500mg	1:240

2.3. Elektropherogramm einer reinen Serumprobe:

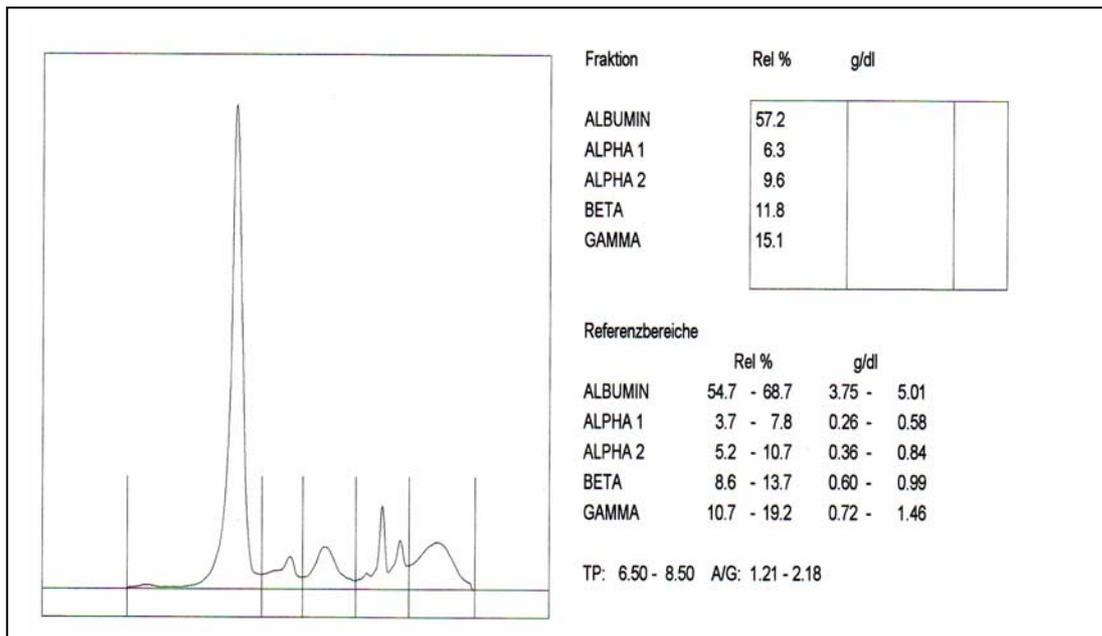


Abb. 2.3.1 Reine Serumprobe
 ohne Zusatz von Medikamenten
 Keine Störung

2.4. Elektropherogramme der Kontrastmittel mit jeweiliger Störung:

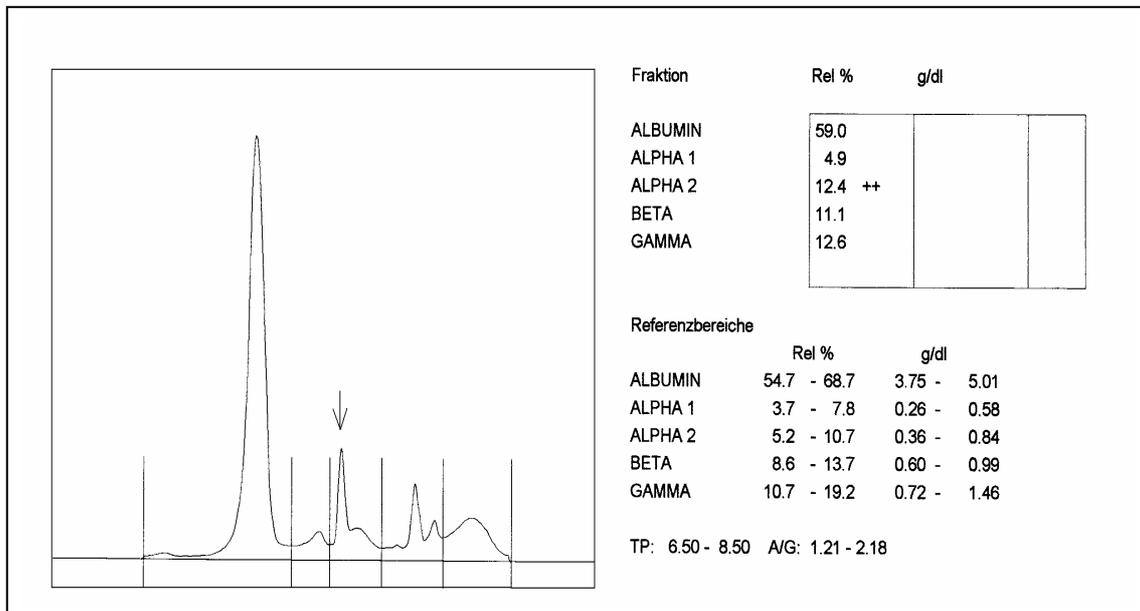


Abb. 2.4.1 Conray 60
 1:50 Verdünnung (150µl Serum + 50µl Röntgenkontrastmittel)
 Störung in α_2 -Fraktion

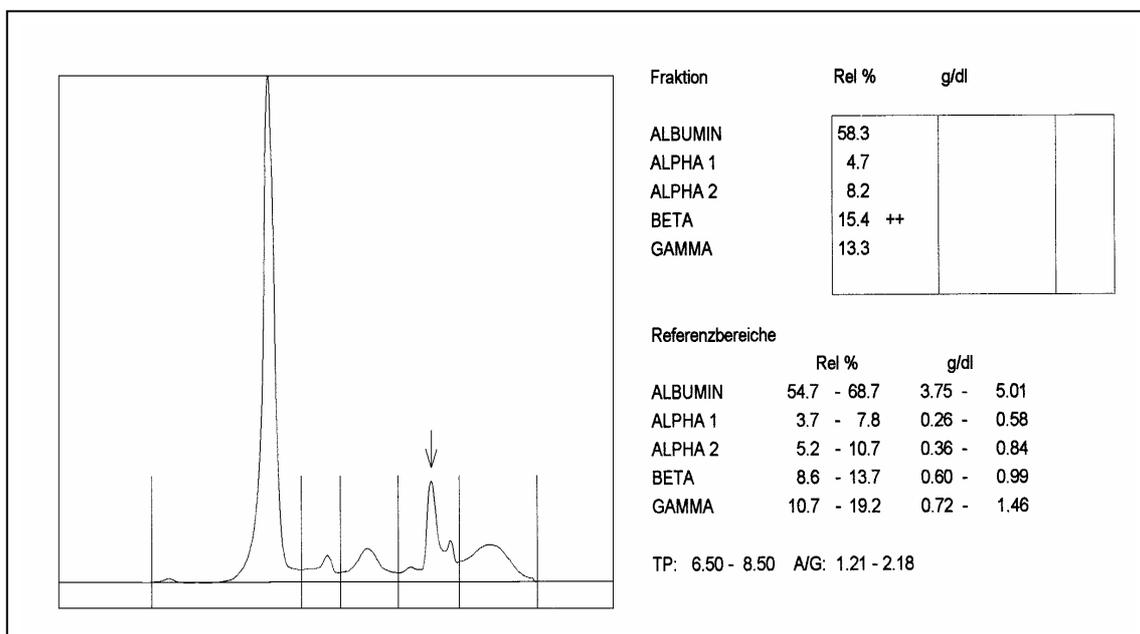


Abb. 2.4.2 Imeron 300
 1:50 Verdünnung (150µl Serum + 50µl Röntgenkontrastmittel)
 Störung in β -Fraktion

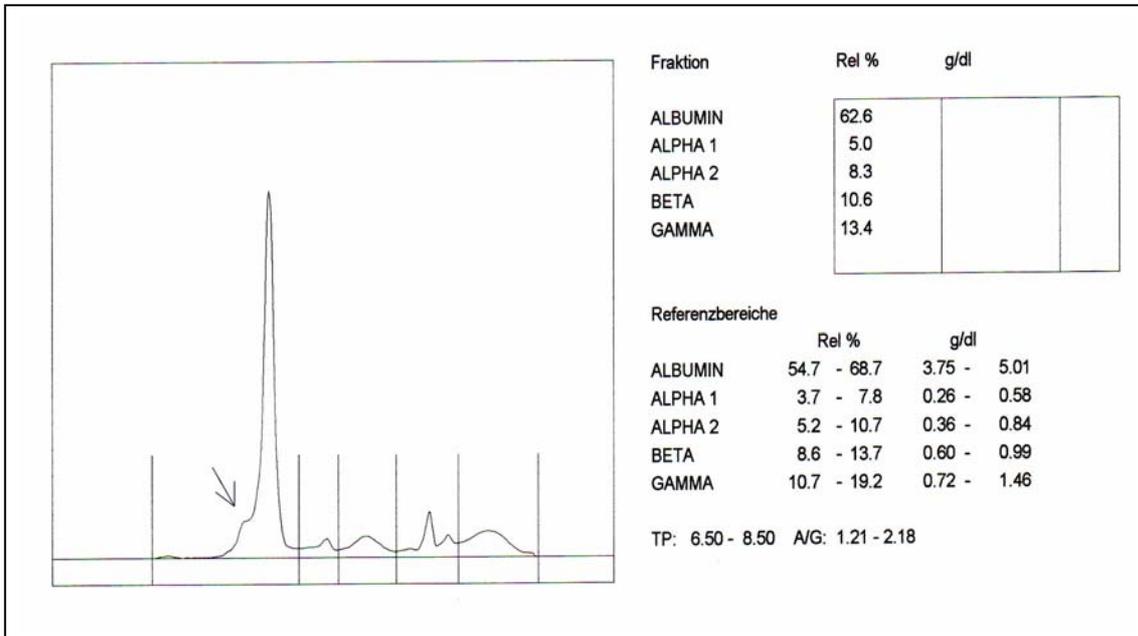


Abb. 2.4.3 Isovist 300
 1:100 Verdünnung (150µl Serum + 50µl Röntgenkontrastmittel)
 Störung in Pre-/ Albumin-Fraktion

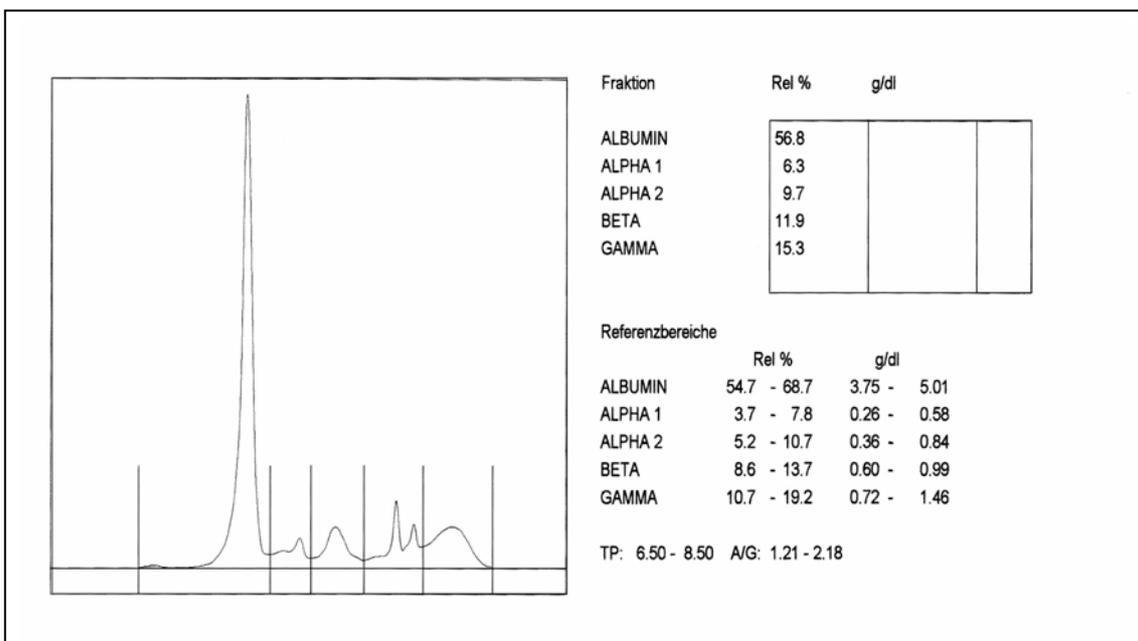


Abb. 2.4.4 Magnevist
 1:50 Verdünnung (150µl Serum+ 50µl Kontrastmittel)
 Keine Störung

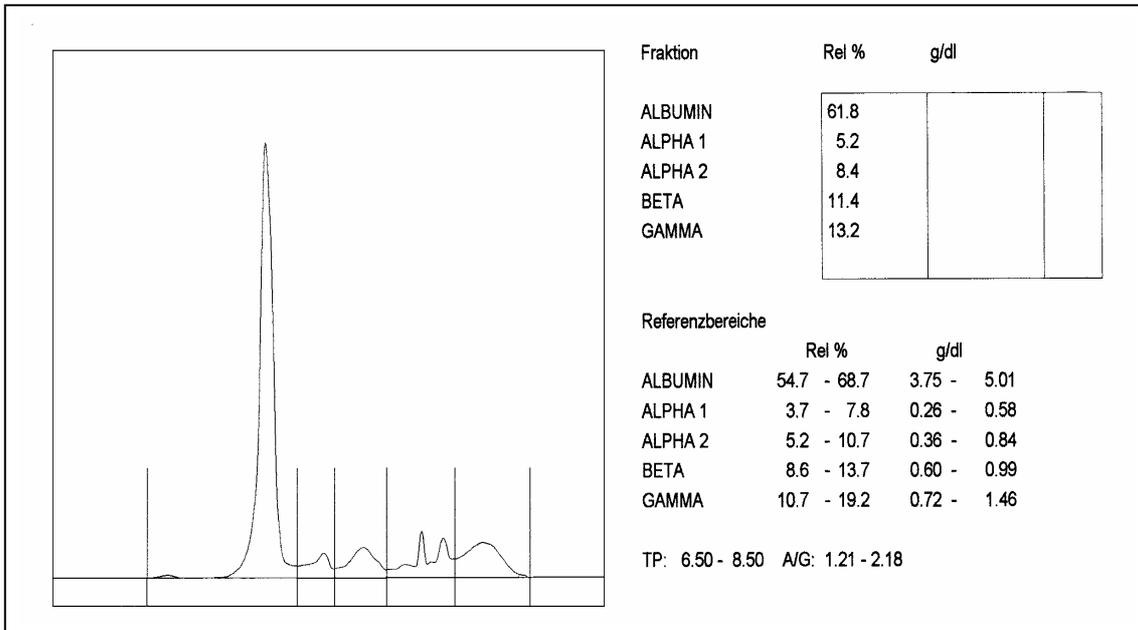


Abb. 2.4.5 Multihance
 1:5 Verdünnung (150µl Serum +50µl Kontrastmittel)
 Keine Störung

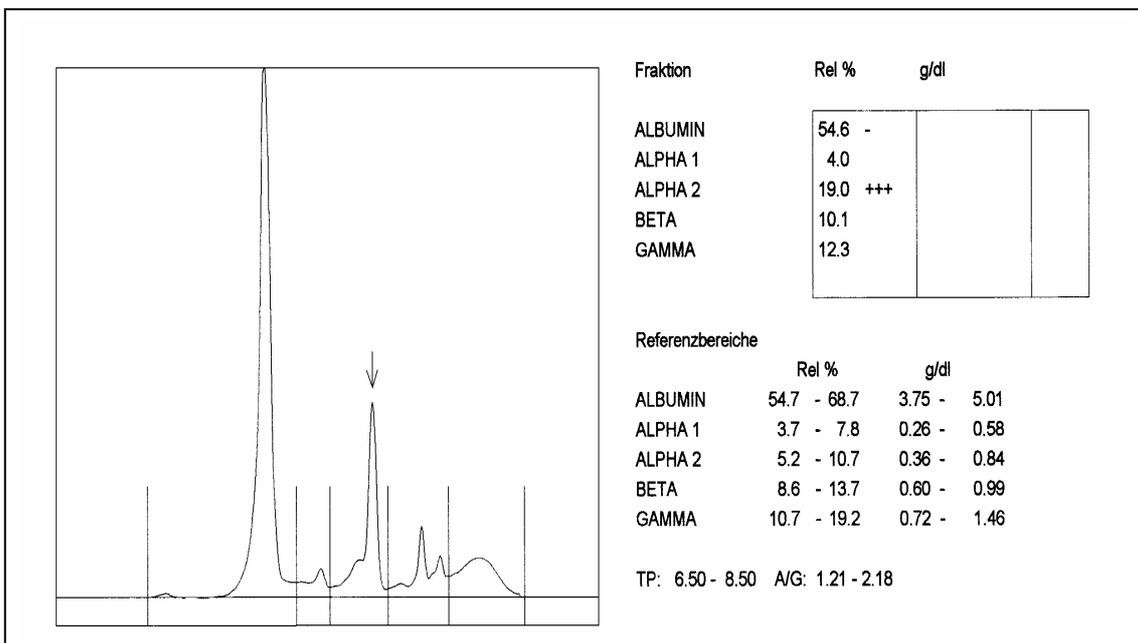


Abb. 2.4.6 Omnipaque 350
 1:50 Verdünnung (150µl Serum + 50µl Röntgenkontrastmittel)
 Störung in α_2 -Fraktion

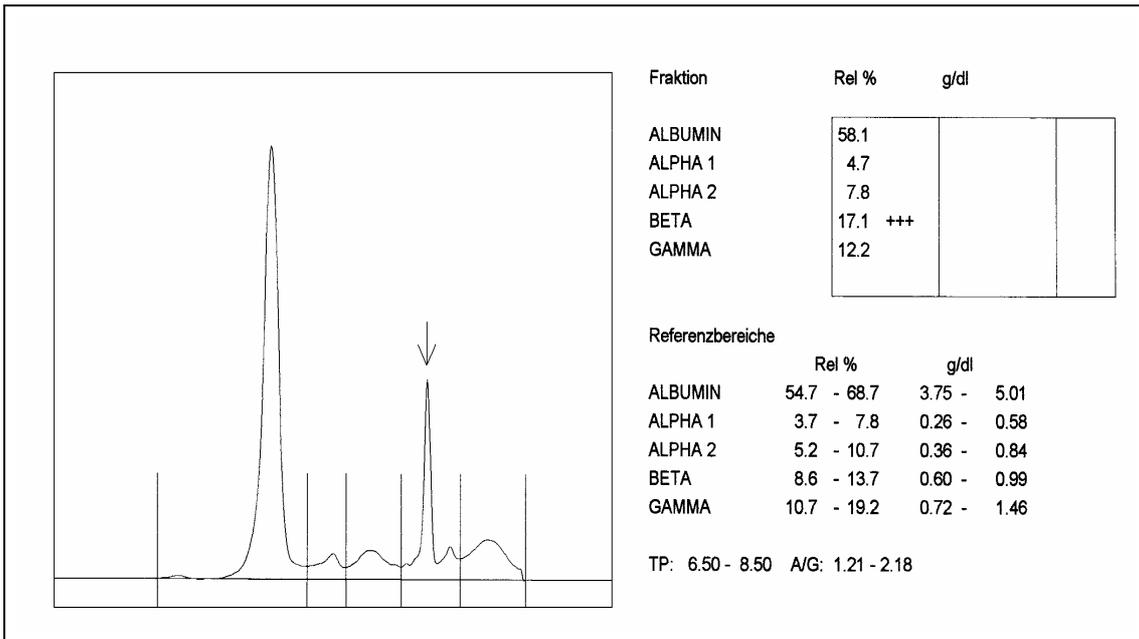


Abb. 2.4.7 Optiray 300
 1:40 Verdünnung (150µl Serum + 50µl Röntgenkontrastmittel)
 Störung in β-Fraktion

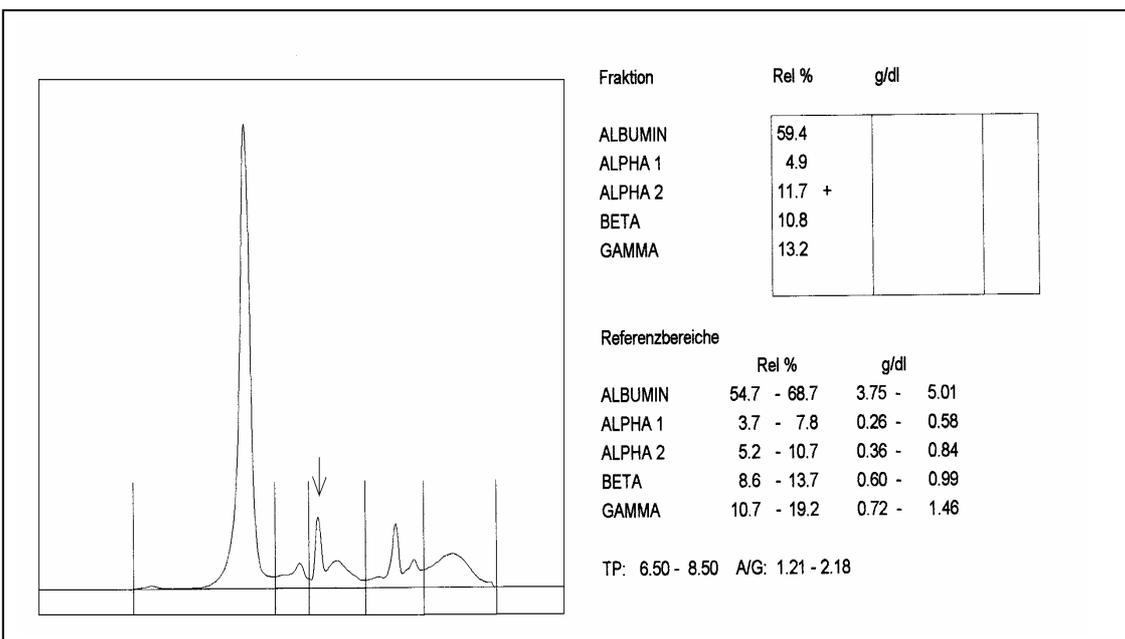


Abb. 2.4.8 Peritrast
 1:40 Verdünnung (150µl Serum + 50µl Röntgenkontrastmittel)
 Störung in α₂-Fraktion

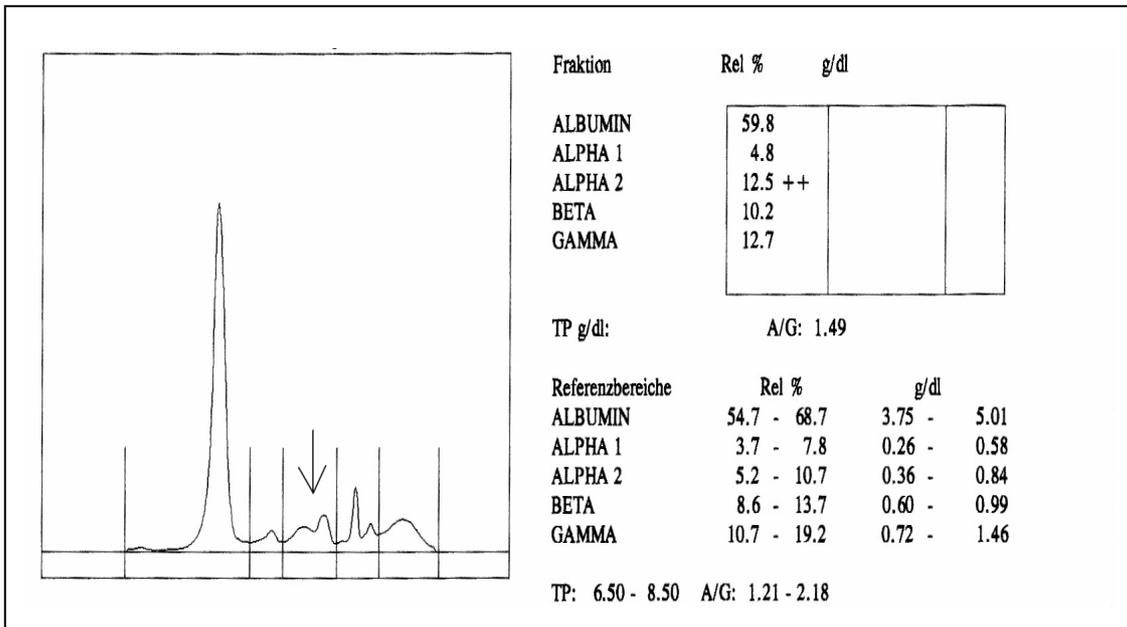


Abb. 2.4.9 Solustrast 300
1:100 Verdünnung (150µl Serum + 50µl Röntgenkontrastmittel)
Störung in α_2/β -Fraktion

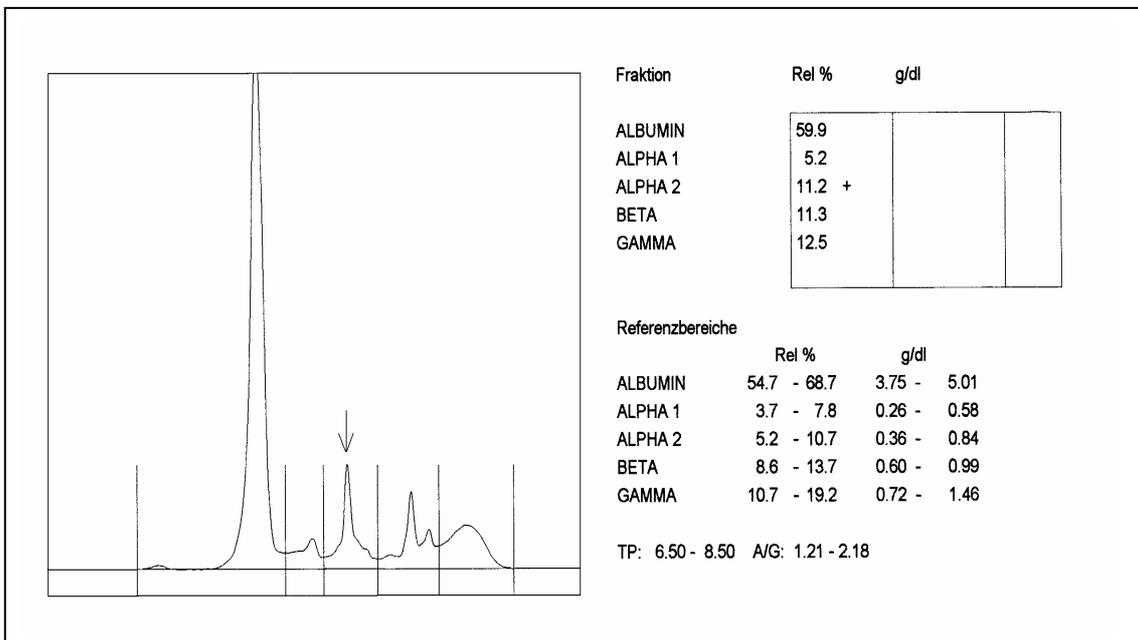


Abb. 2.4.10 Telebrix Gastro
1:100 Verdünnung (150µl Serum + 50µl Röntgenkontrastmittel)
Störung in α_2 -Fraktion

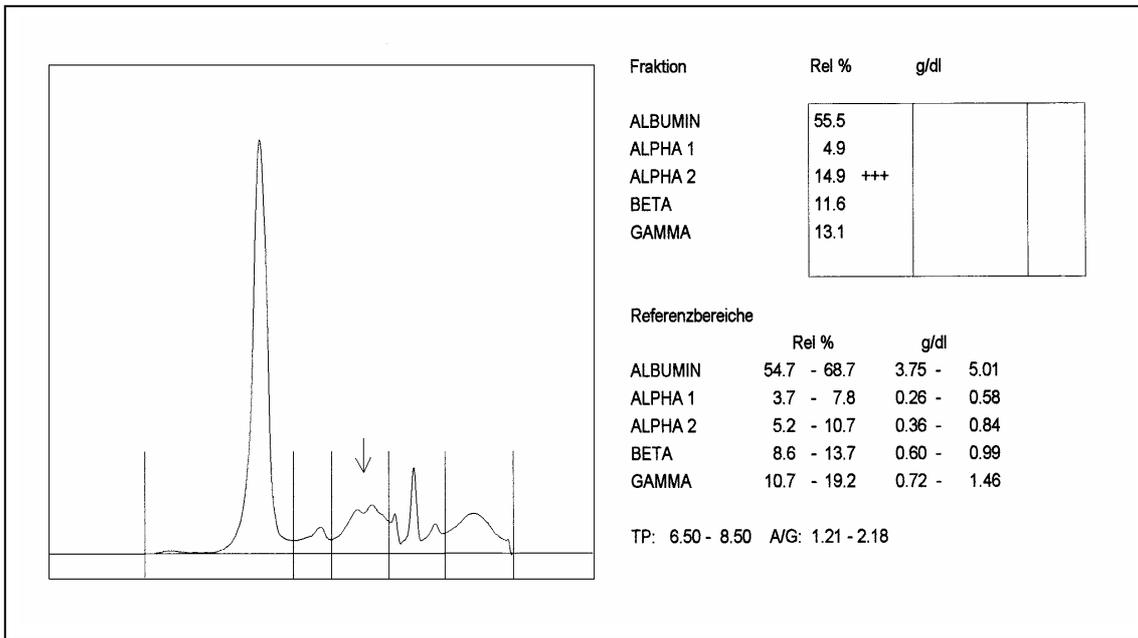


Abb. 2.4.11 Ultravist 300
 1:50 Verdünnung (150µl Serum + 50µl Röntgenkontrastmittel)
 Störung in α_2 -Fraktion

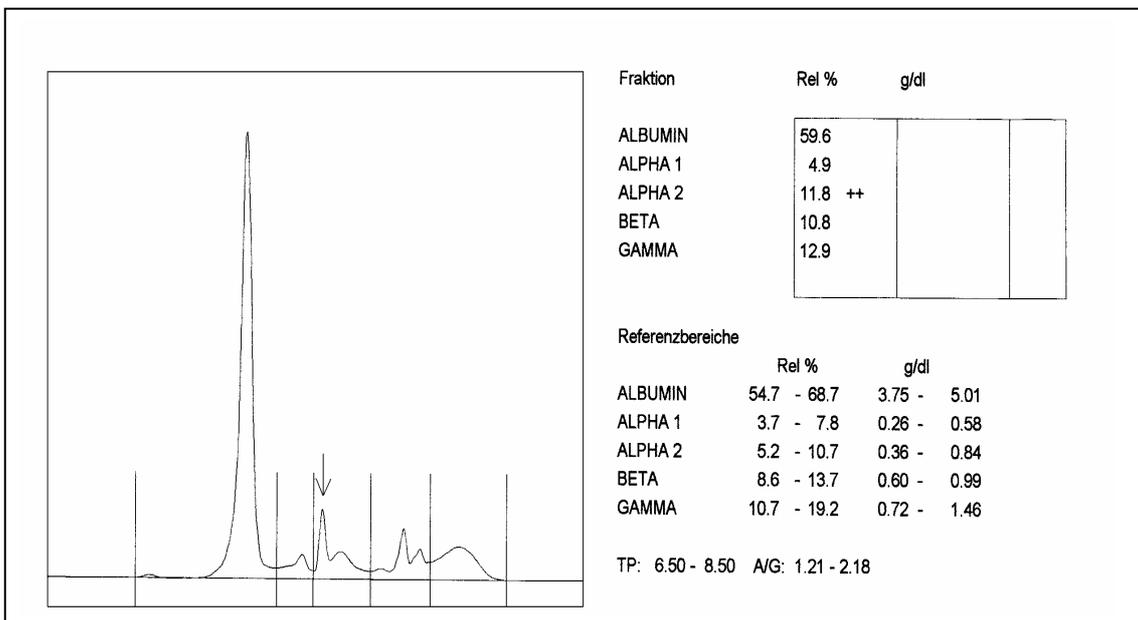


Abb. 2.4.12 Urografin 76%
 1:100 Verdünnung (150µl Serum + 50µl Röntgenkontrastmittel)
 Störung in α_2 -Fraktion

2.5. Elektropherogramme der Antibiotika mit jeweiliger Störung:

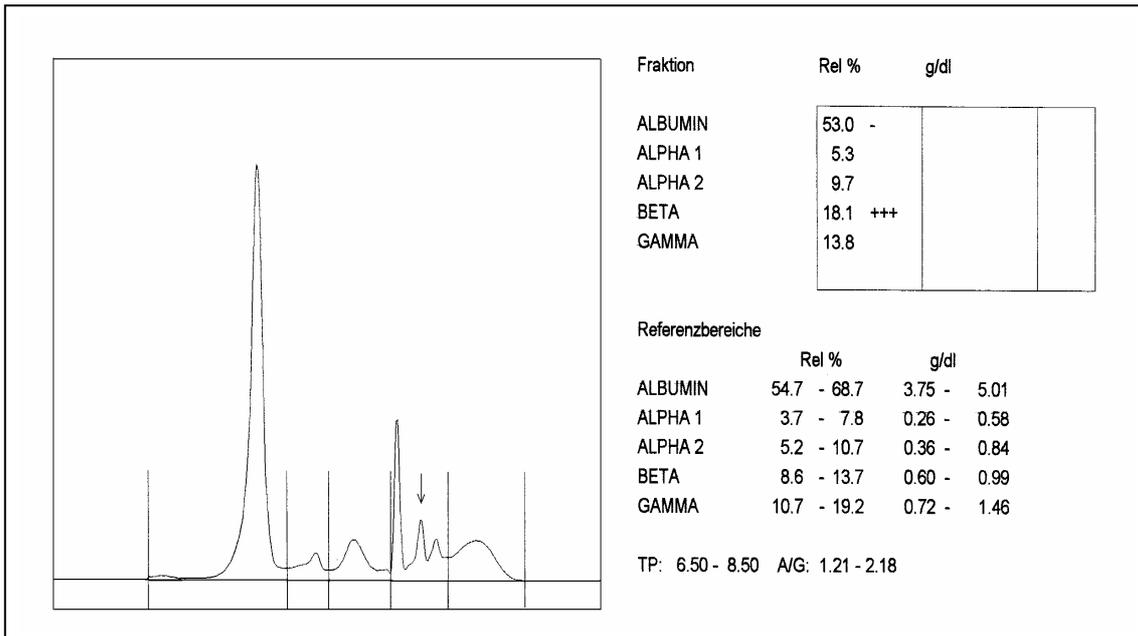


Abb. 2.5.1 Baypen
1:10 Verdünnung (150µl Serum + 50µl Antibiotikum)
Störung in β -Fraktion

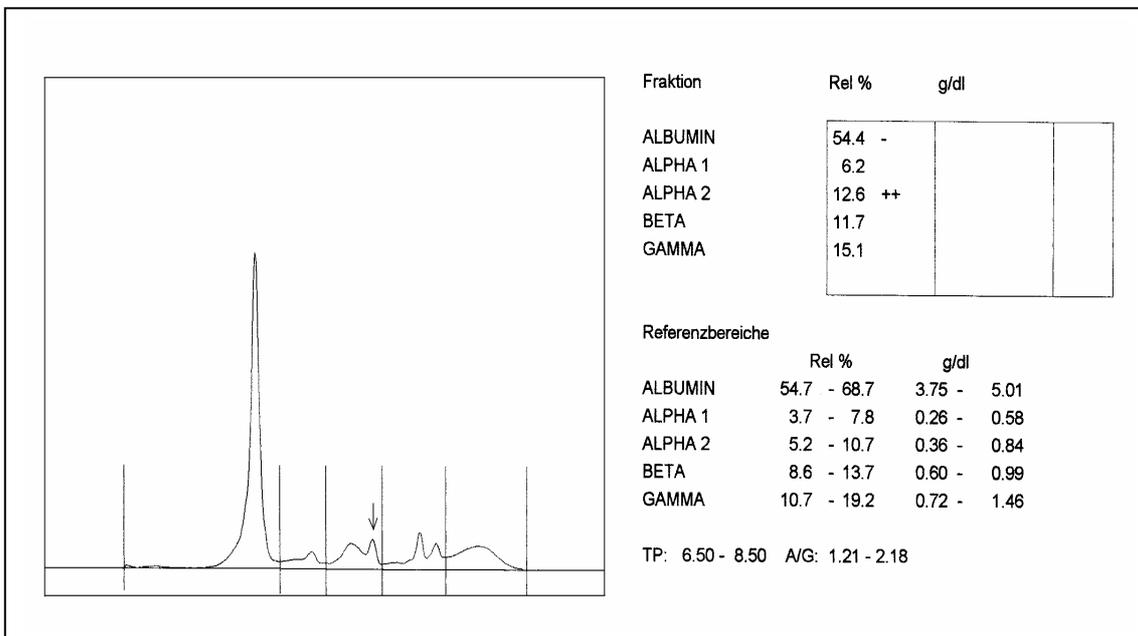


Abb. 2.5.2 Ciprobay 400
Keine Verdünnung (100µl Serum + 100µl Antibiotikum)
Störung in α_2 -Fraktion

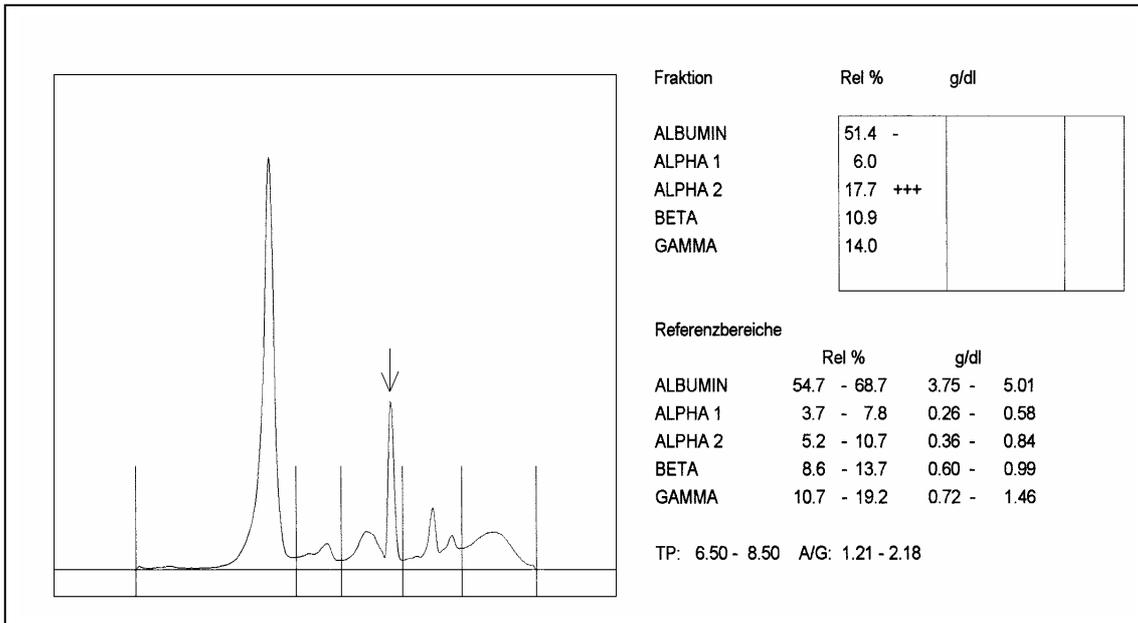


Abb. 2.5.3 Claforan 2,0g
 1:10 Verdünnung (150 µl Serum + 50µl Antibiotikum)
 Störung in α_2 -/ β -Fraktion

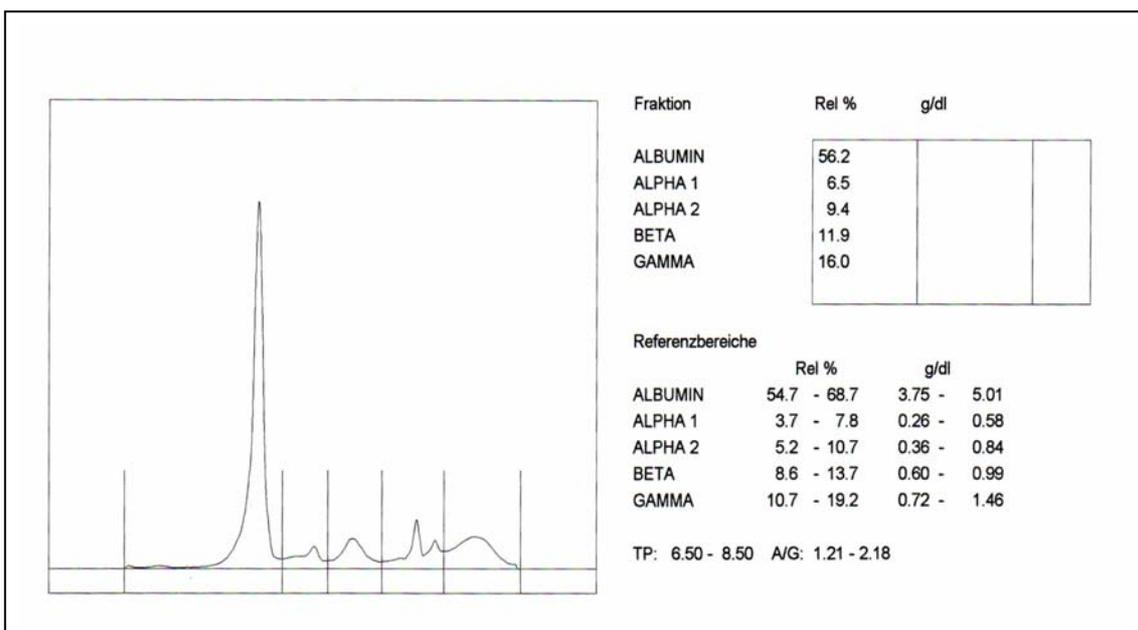


Abb. 2.5.4 Erythrocin i.v. 0,5g
 Keine Verdünnung (150µl Serum + 50µl Antibiotikum)
 Keine Störung

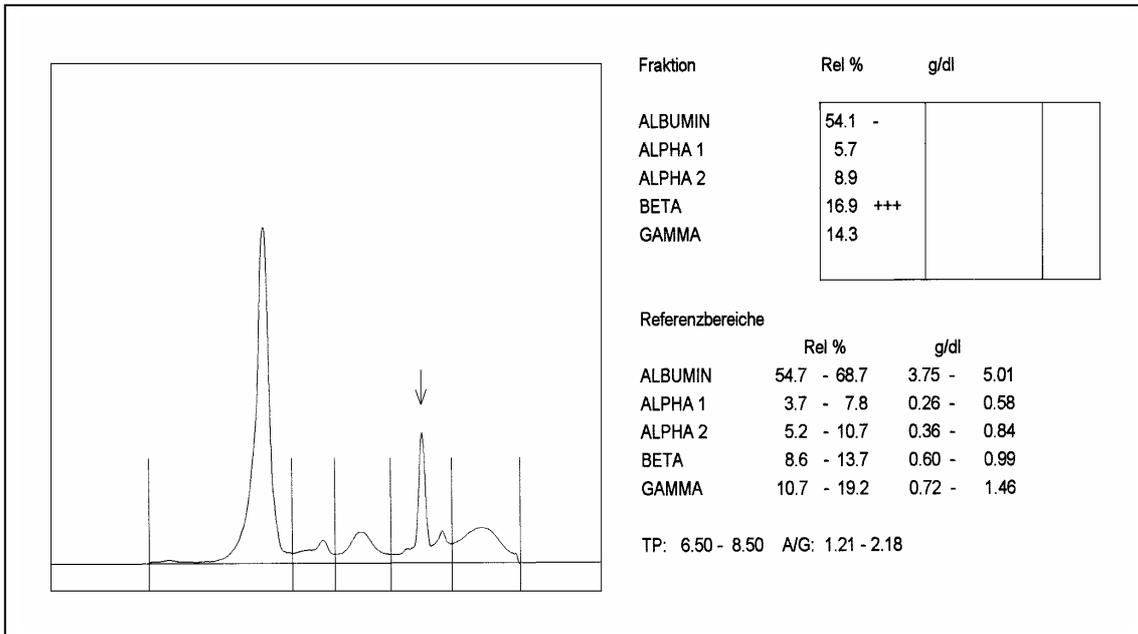


Abb. 2.5.5 Fortum 1,0g
1:10 Verdünnung (150µl Serum + 50µl Antibiotikum)
Störung in β -Fraktion

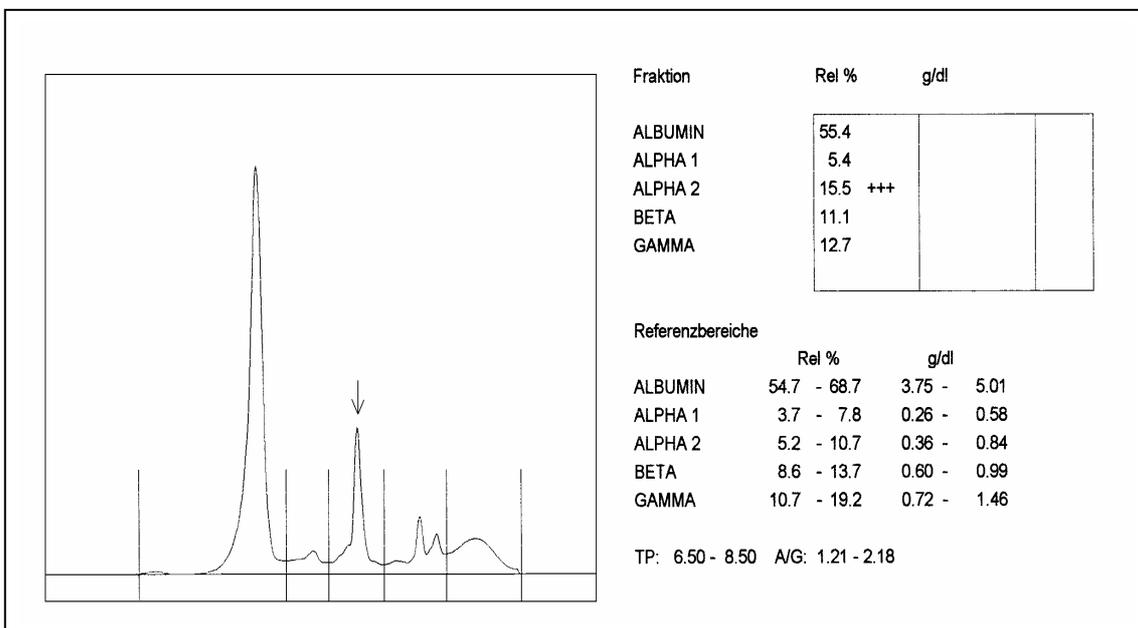


Abb. 2.5.6 Mefoxitin 1,0g
1:4 Verdünnung (150µl Serum + 50µl Antibiotikum)
Störung in α_2 -Fraktion

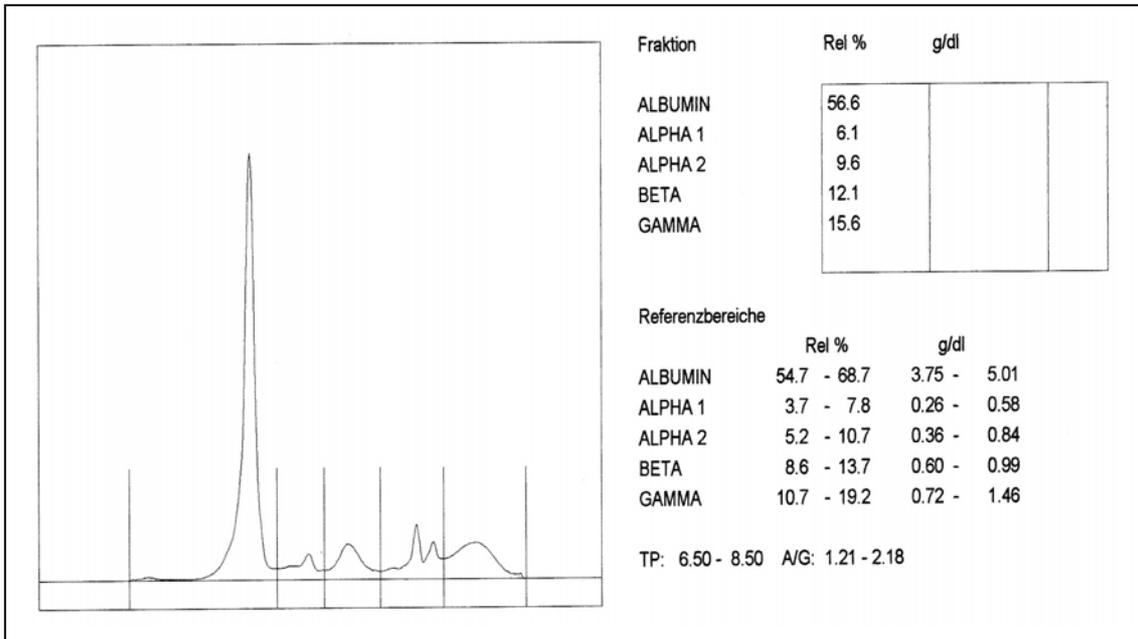


Abb. 2.5.7 Metronidazol Ratiopharm
Keine Verdünnung (150µl Serum + 50µl Antibiotikum)
Keine Störung

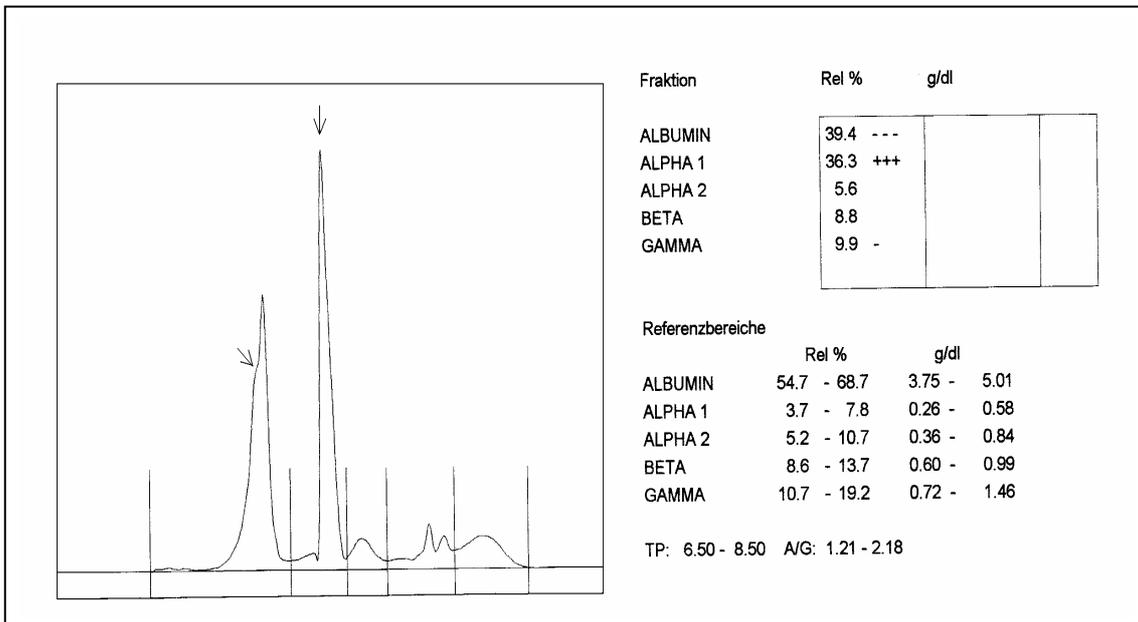


Abb. 2.5.8 Penicillin
Keine Verdünnung (150µl Serum + 50µl Antibiotikum)
Störung in α_1 -Fraktion, Bindung an Albumin

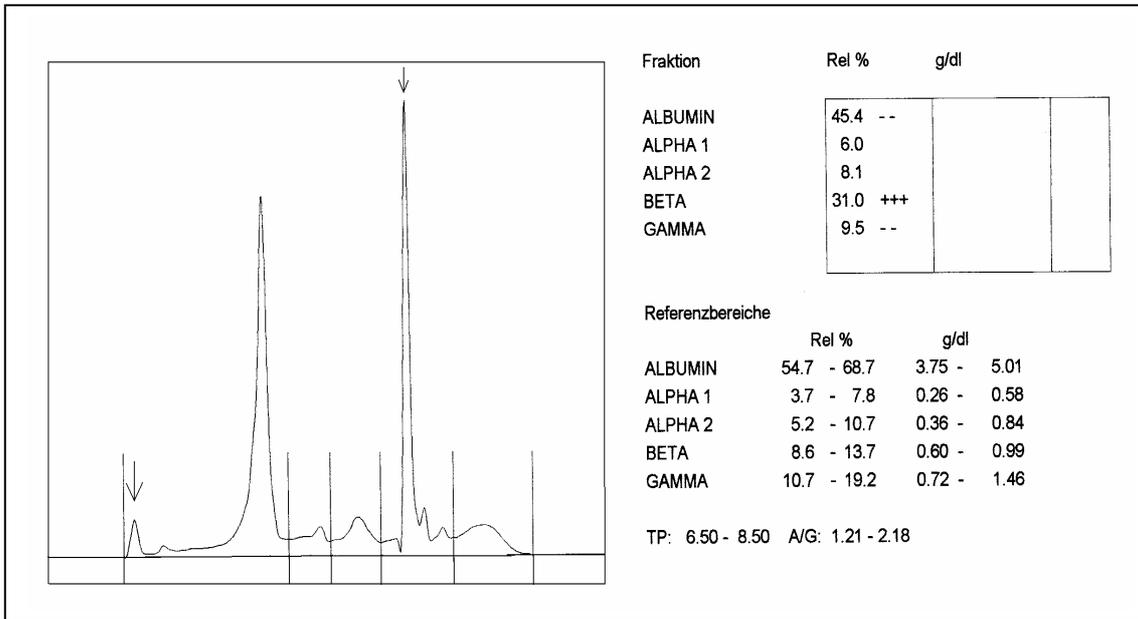


Abb. 2.5.9 Pipril 4g
Keine Verdünnung (150µl Serum + 50µl Antibiotikum)
Störung in Prealbumin / β-Fraktion

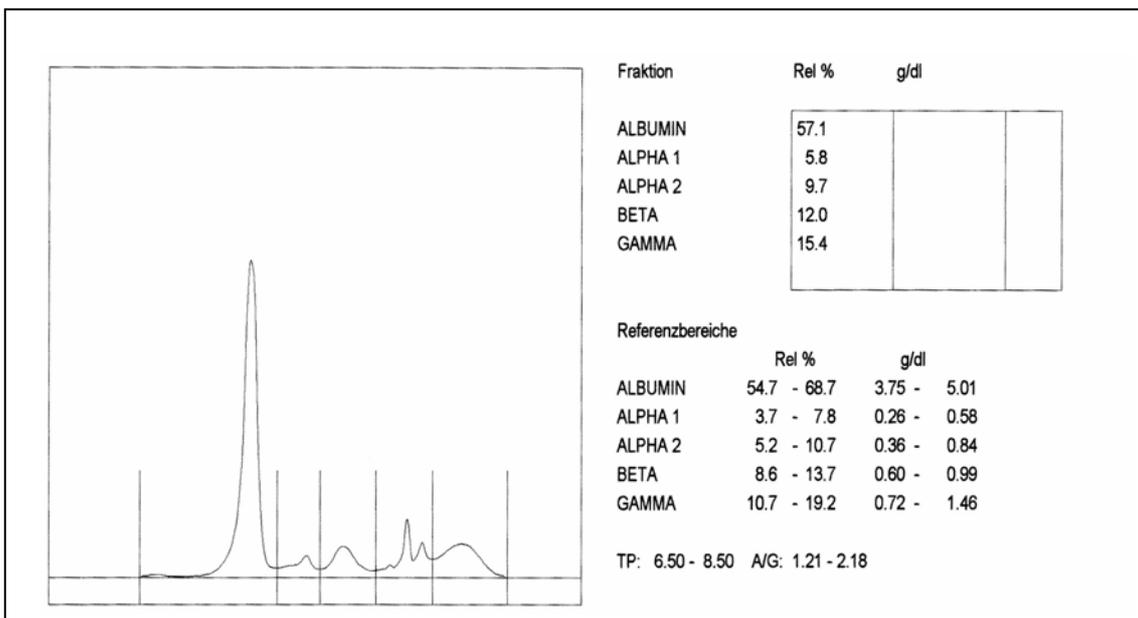


Abb. 2.5.10 Refobacin 80mg
Keine Verdünnung (100µl Serum + 100µl Antibiotikum)
Keine Störung

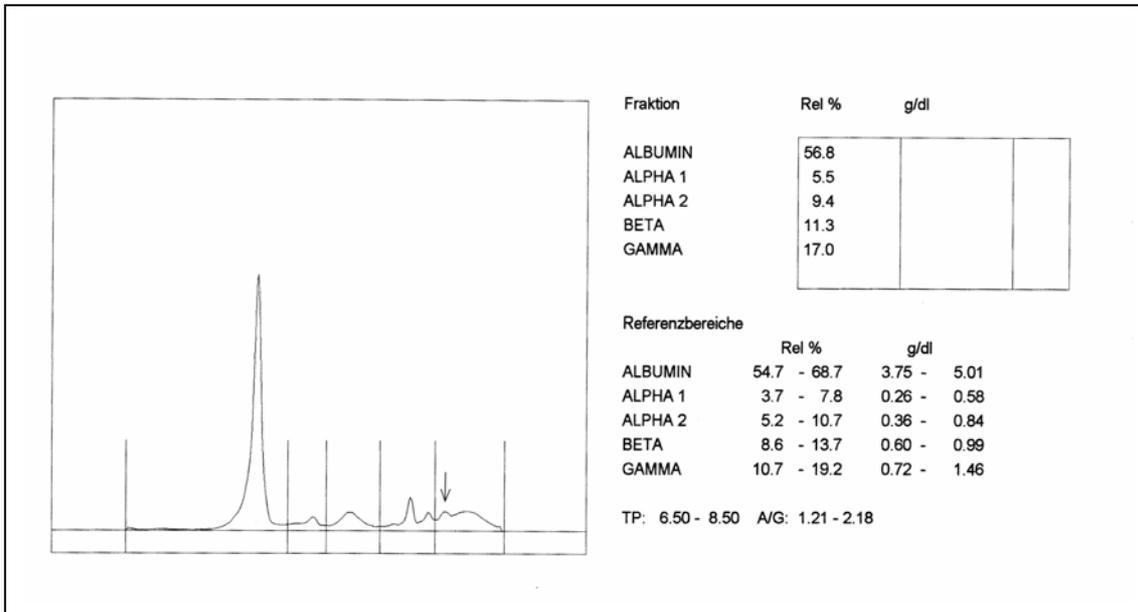


Abb. 2.5.11: RIFA Parenteral 600mg
Keine Verdünnung (150µl Serum + 50µl Antibiotikum)
Störung in der γ-Fraktion

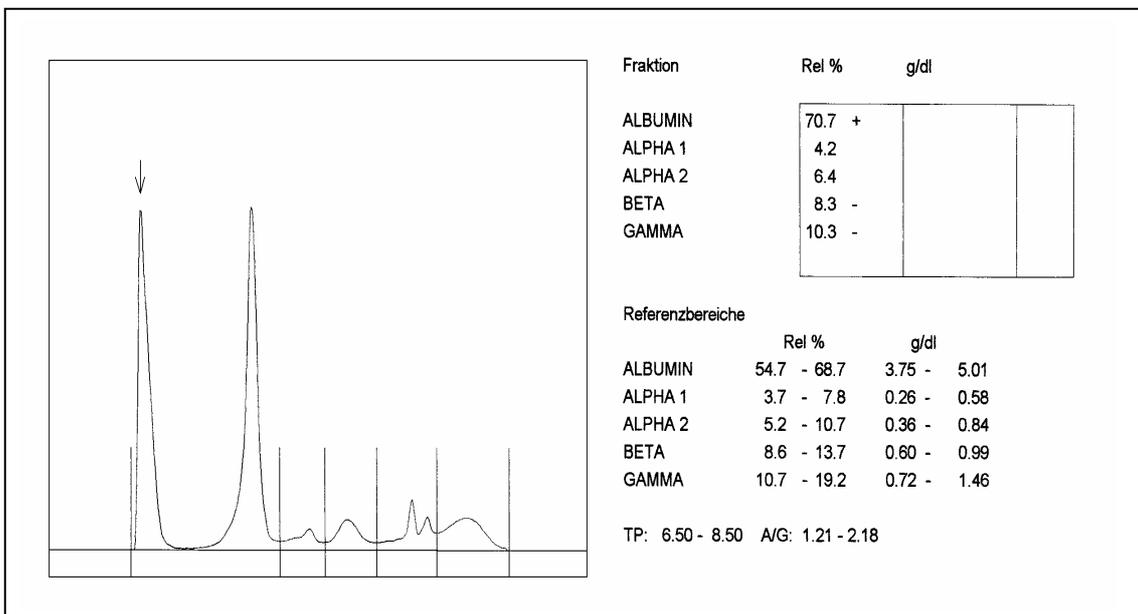


Abb. 2.5.12 Rocephin zur Infusion 2g
Keine Verdünnung (150µl Serum + 50µl Antibiotikum)
Störung in Pre-/ Albumin-Fraktion

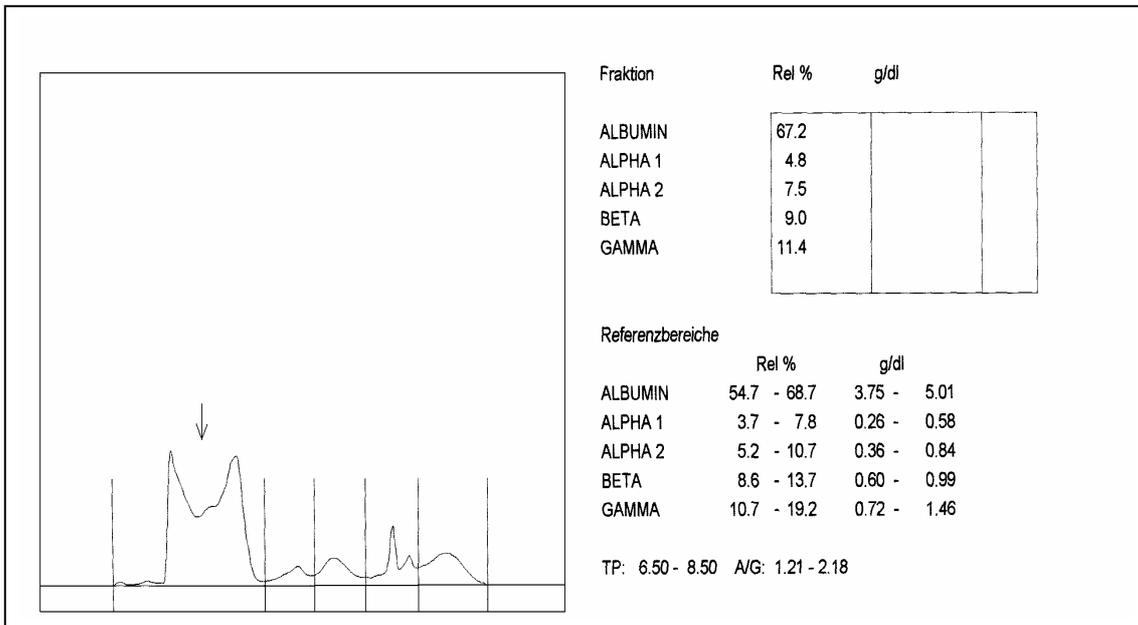


Abb. 2.5.13 Sobelin 300
Keine Verdünnung (150µl Serum + 50µl Antibiotikum)
Störung in Pre-/ Albumin-Fraktion

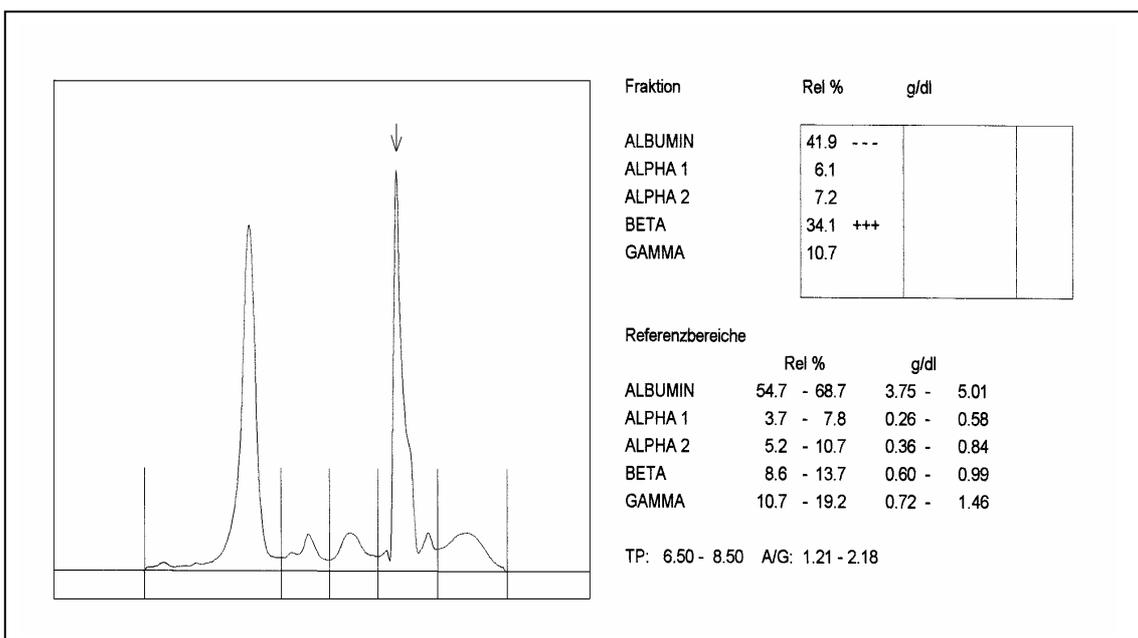


Abb. 2.5.14 Spizef 1,0g
Keine Verdünnung (150µl Serum + 50µl Antibiotikum)
Störung in β-Fraktion

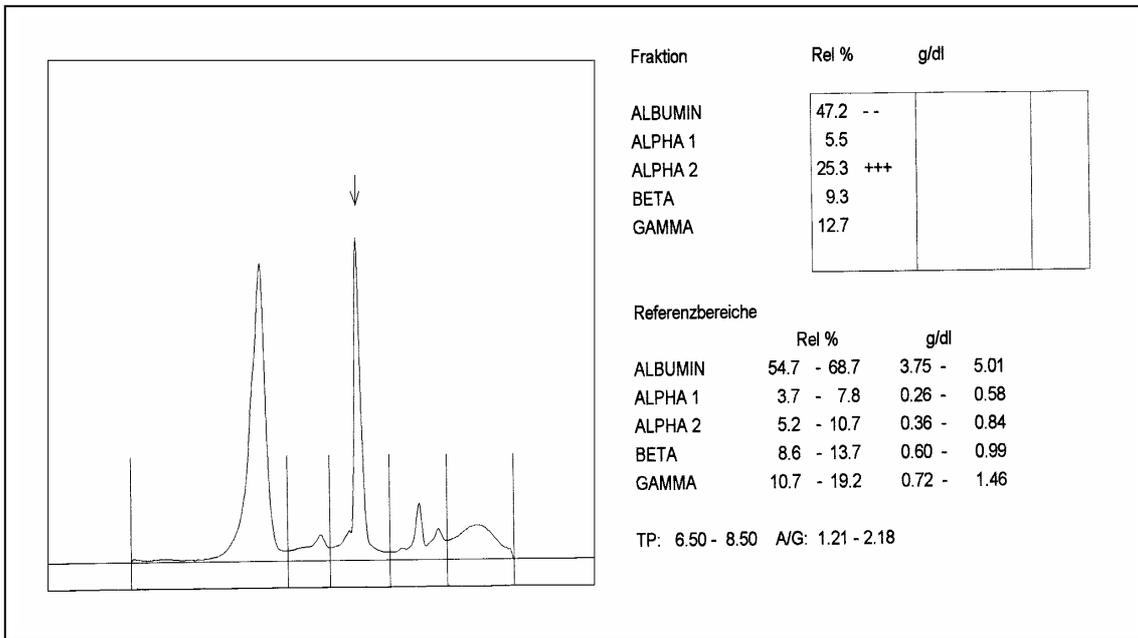


Abb. 2.5.15 Staphylex 1,0g
Keine Verdünnung (150µl Serum + 50µl Antibiotikum)
Störung in α_2 -Fraktion

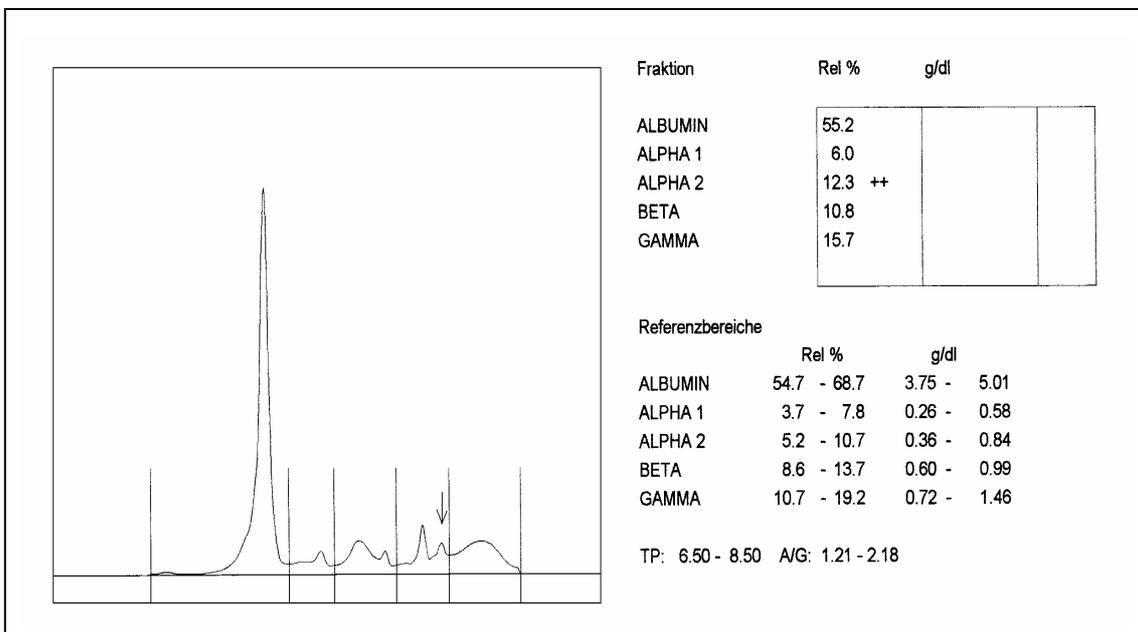


Abb. 2.5.16 Tarivid i.v. 200
Keine Verdünnung (150µl Serum + 50µl Antibiotikum)
Störung in α_2 -/ β -Fraktion

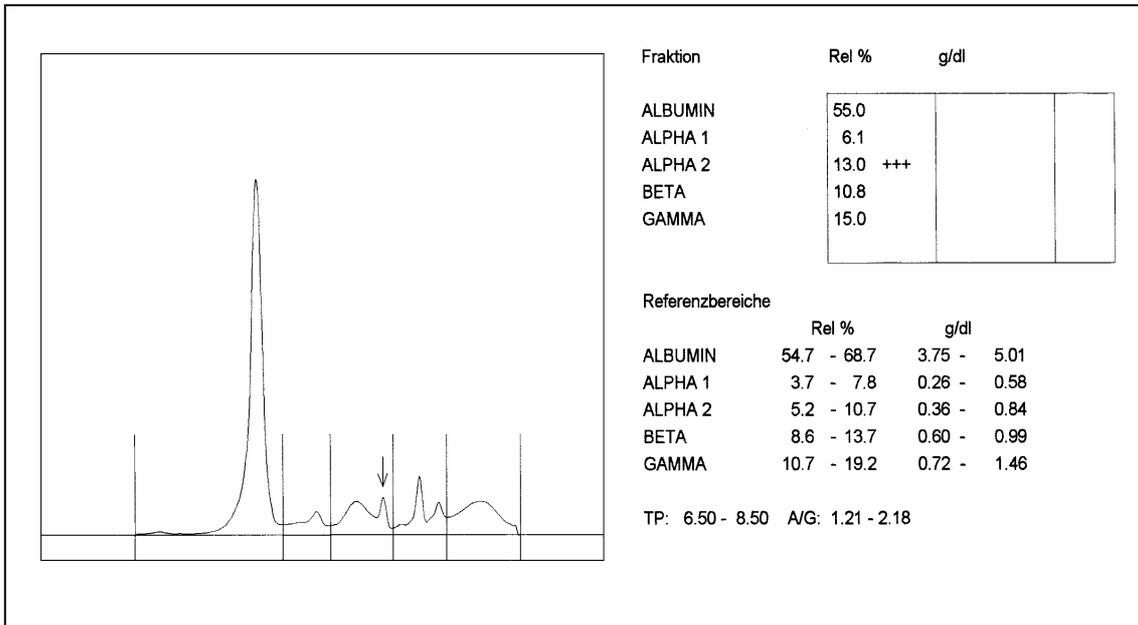


Abb. 2.5.17 Tavanic i.v. 500mg
Keine Verdünnung (150µl Serum + 50µl Antibiotikum)
Störung in α_2 -/ β -Fraktion

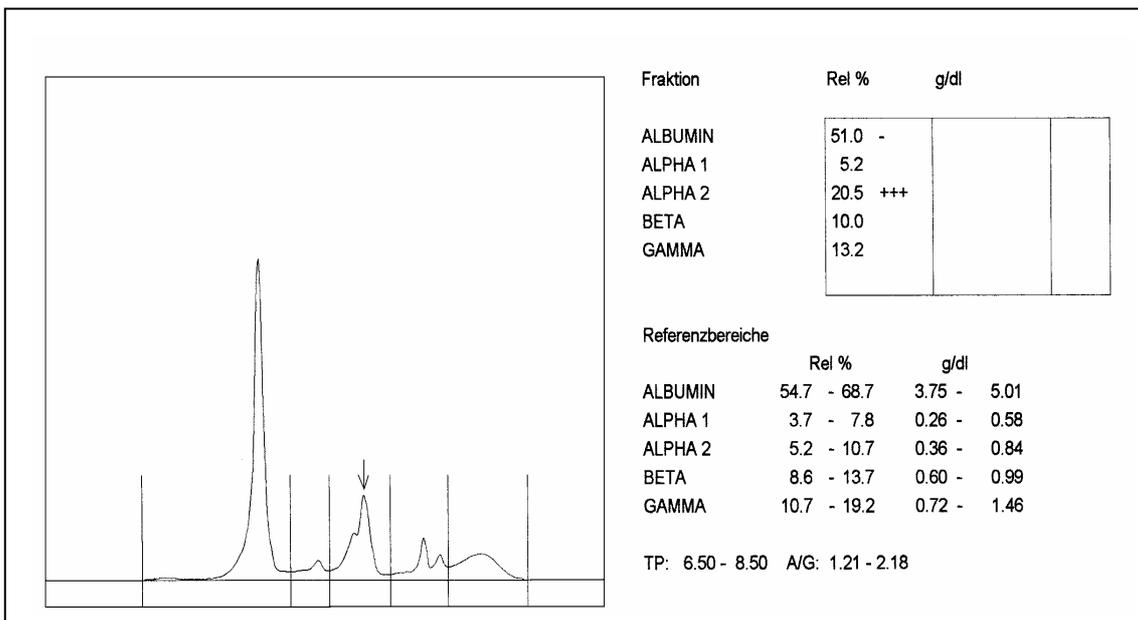


Abb. 2.5.18 Vancomycin 500
Keine Störung (100µl Serum + 100µl Antibiotikum)
Störung in α_1 -Fraktion

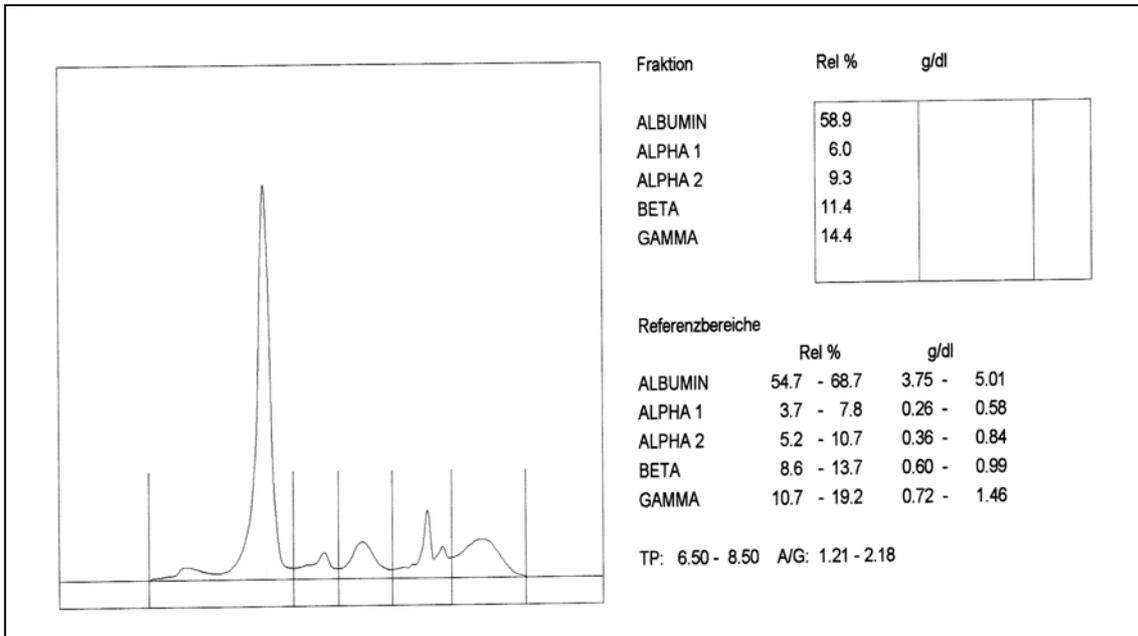


Abb. 2.5.19 Vibravenös SF
 1:4 Verdünnung (150µl Serum + 50µl Antibiotikum)
 Keine Störung

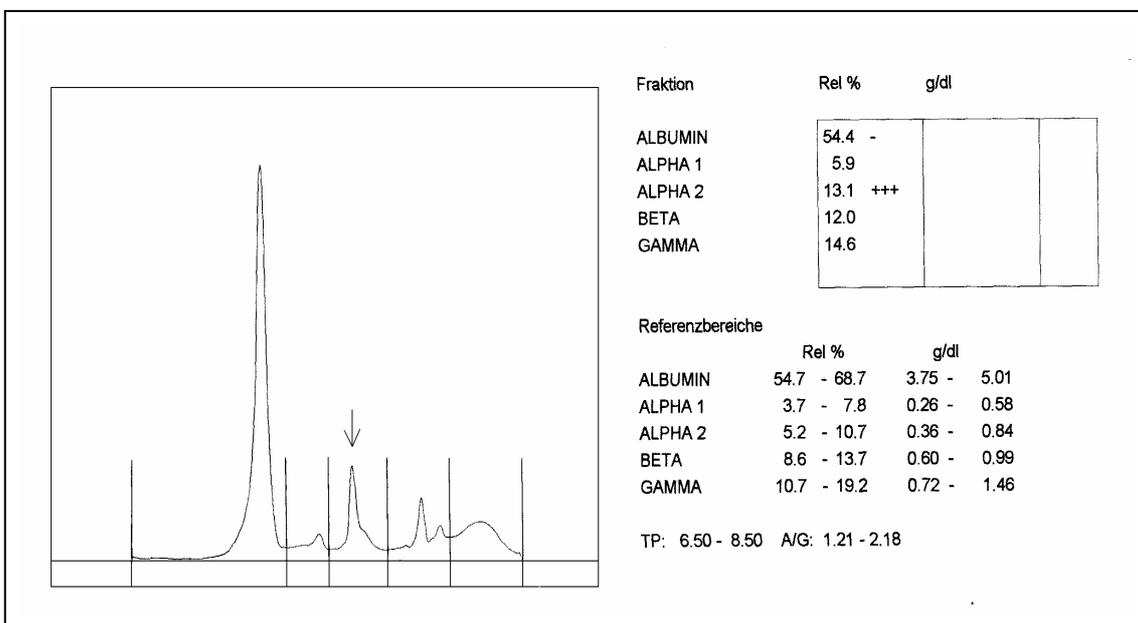


Abb. 2.5.20 Zinazef 1500
 1:10 Verdünnung (150µl Serum + 50µl Antibiotikum)
 Störung in α_2 -Fraktion

3. Patientenbeispiele

Die Untersuchung an Patientenseren wurde von der Ethik- Kommission zur wissenschaftlich fundierten Qualitätskontrolle der Routinediagnostik genehmigt.

Diese Untersuchungen bestätigen die „in vitro“ ermittelten Ergebnisse.

Reine Patientenseren ohne Zusatz von in der Arbeit untersuchten Medikamenten zeigen keinerlei pathologisch auffälligen Kurvenabschnitte.

Elektropherogramme der gleichen Patientenseren nach Gabe eines dieser Medikamente weisen die gleichen Störungsphänomene wie in den vorherigen Untersuchungen auf.

Die Dosisverabreichung erfolgte intravenös. Die Probenentnahme erfolgte direkt nach vollständigem Durchlauf der Infusion. Vor der Entnahme wurde eine Spülung mit einer 0,9% NaCl-Lösung durchgeführt, um so Konzentrationsspitzenwerte während der Detektion zu verhindern. Die Auswertung dieser Elektropherogramme zeigt Kurvenveränderungen in Form von erhöhten Peaks.

Als Beispiele sind Imeron 300 (Abb. 4.1.) und Ultravist 300 (Abb. 4.2.) aufgeführt.

Imeron 300 zeigt (Abb. 4.1.2) eine veränderte β -Fraktion mit deutlichem Zuwachs der Konzentrationsangaben.

Ultravist 300 zeigt bereits in der reinen Serumprobe leichte Kurvenveränderungen in der γ -Fraktion, was auf eine vorher bestehende erhöhte Konzentration dieser Fraktionproteine hinweist. Nach Applikation des Röntgenkontrastmittels sieht man einen Konzentrationszuwachs in der α_2 -Fraktion (Abb. 4.2.2).

3.1. Imeron:

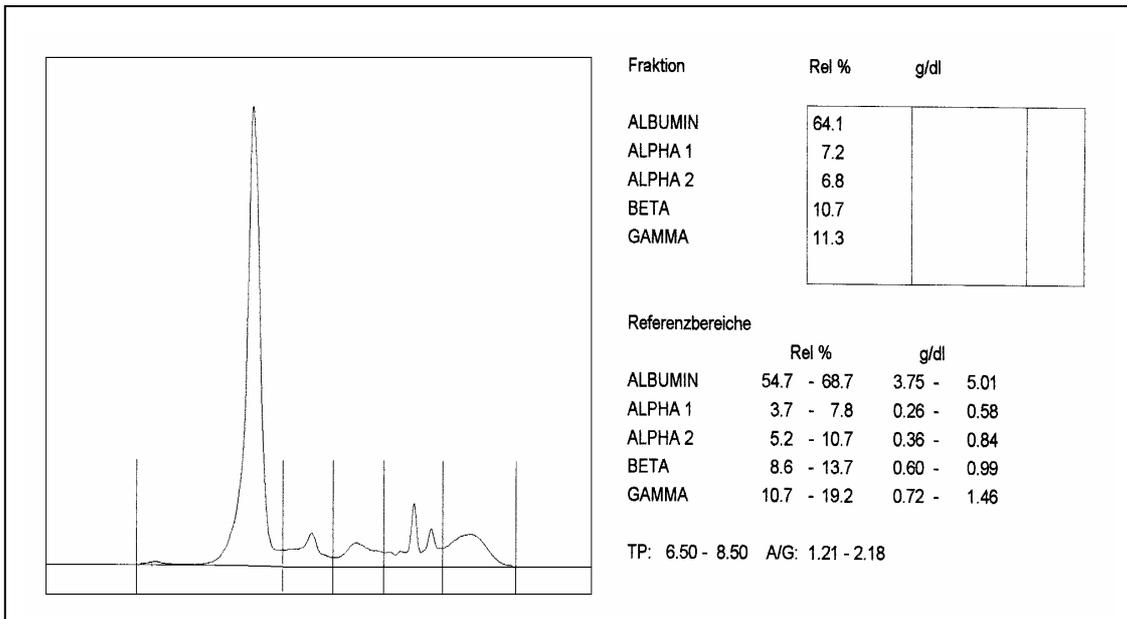


Abb. 3.1.1 Imeron 300 vor Gabe
Keine Störung

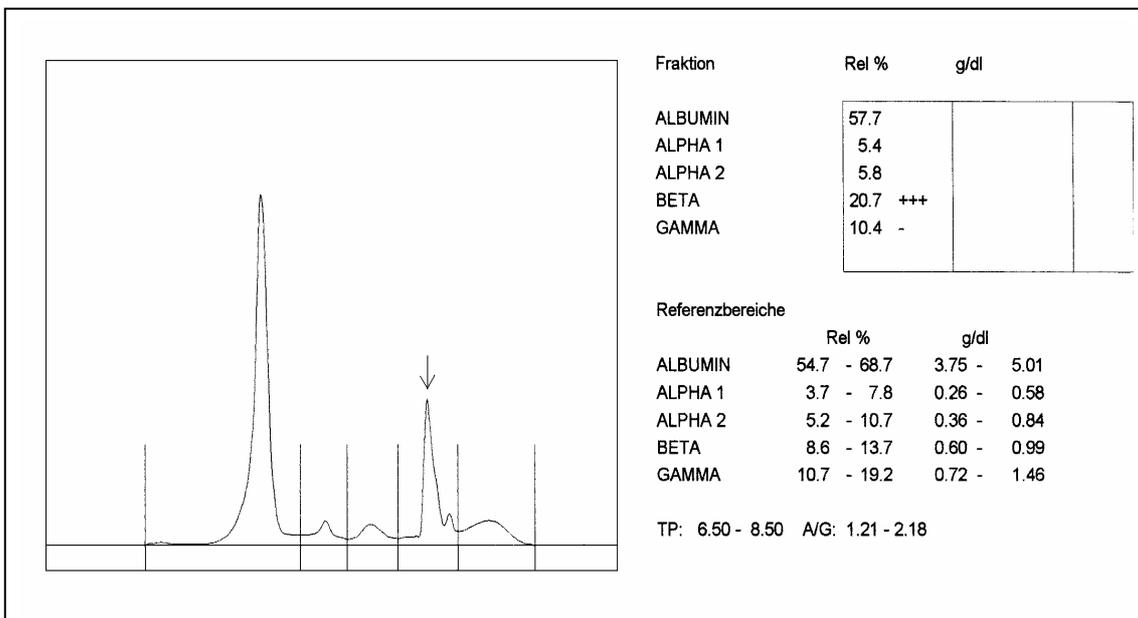


Abb. 3.1.2 Imeron 300 nach Gabe
Störung in β -Fraktion
Applizierte Menge: 120ml

3.2. Ultravist:

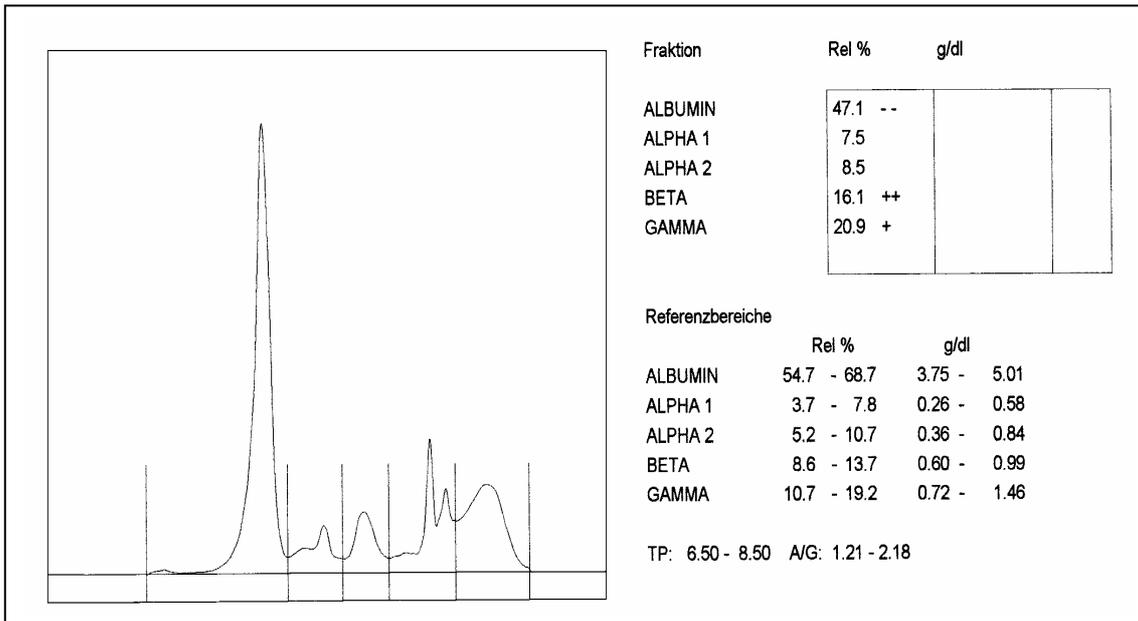


Abb. 3.2.1 Ultravist 300 vor Gabe
Keine Störung

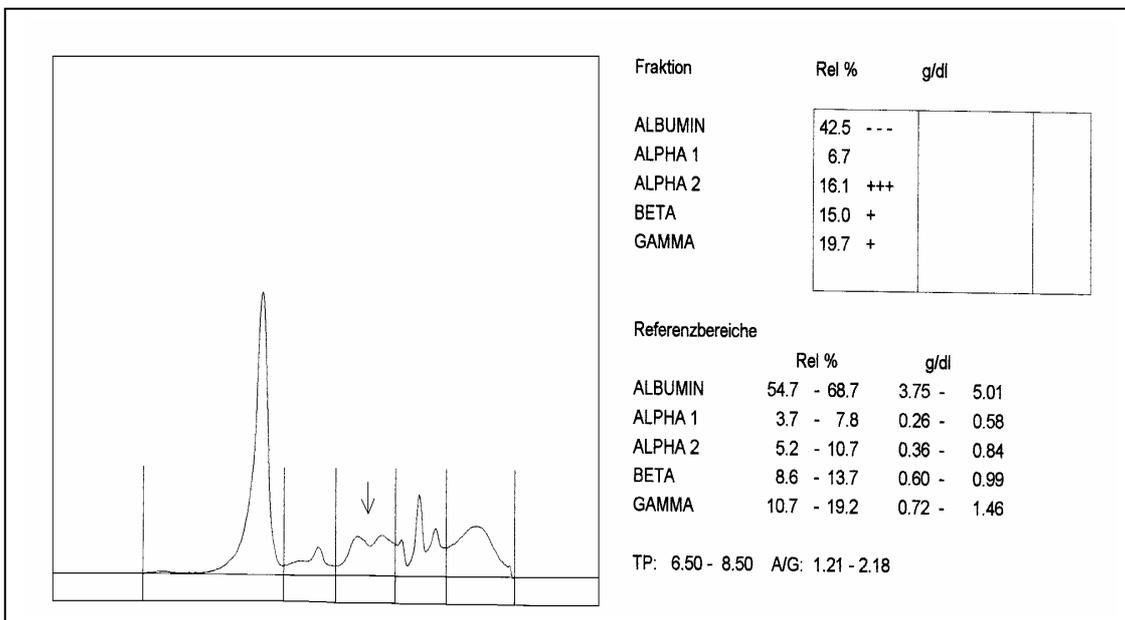


Abb. 3.2.2 Ultravist 300 nach Gabe
Störung in α_2 -Fraktion
Applizierte Menge: 120ml

4. Filtrieren

Wenn man die Serumproben mit Medikamentenzusatz filtriert (siehe Material und Methoden), kann man zwar eine deutliche Reduktion der störenden Wirkstoffe erreichen, aber ihre vollständige Elimination ist nicht möglich. Restbestände werden in den jeweiligen Fraktionen als persistierende, geringfügig erhöhte Peaks erkannt. Die Reduktion der Konzentrationen kann auch in den vom Paragon CZE erstellten Tabellen verglichen werden. Die Höhe des absorbierten Anteils wird in relativem Prozent wiedergegeben.

Folgend sind Conray 60, Omnipaque, Optiray 300 und Ultravist 300 als Vertreter für Kontrastmittel, Claforan 2,0g und Mefoxitin 1,0g für Antibiotika aufgeführt. Bei Conray 60 und Omnipaque treten nach Filtration Restbestände der Wirkstoffe im Testserum auf, wobei Conray 60 um 3,6% und Omnipaque um 1,9% vom Normbereich entfernt (siehe Abb. 4.1.2 und 4.2.2) sind. Die Seren mit Optiray 300, Ultravist 300, Claforan 2,0g und Mefoxitin 1,0g konnten vollständig von den jeweiligen Wirkstoffen befreit werden, so dass ihre Konzentrationswerte nach Filtration im Normbereich liegen.

4.1. Conray:

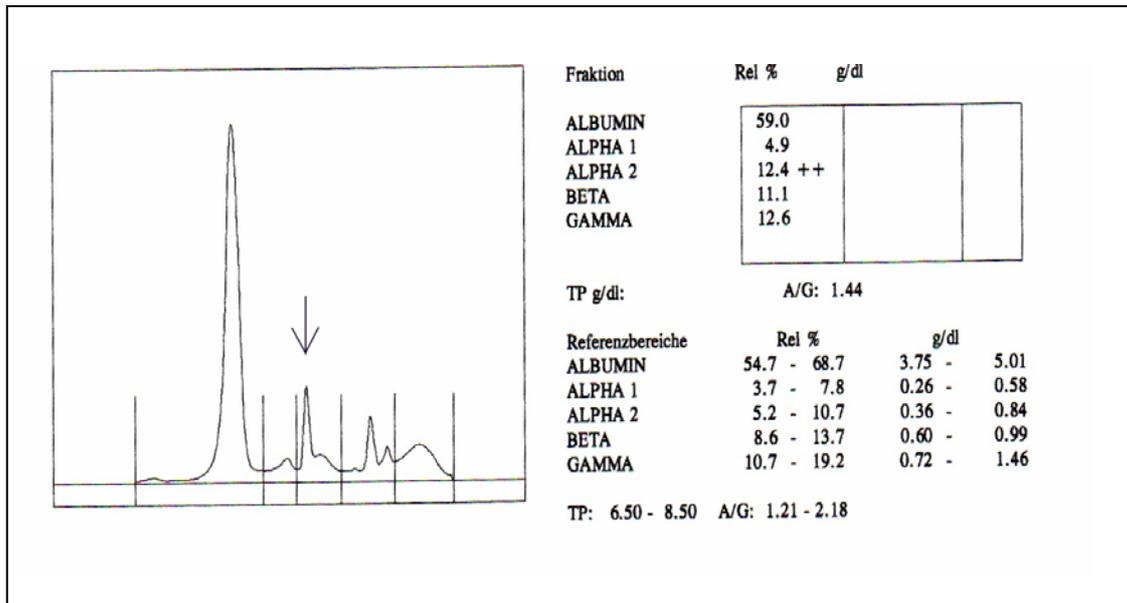


Abb. 4.1.1 Conray 60 ohne Filter
1: 50 Verdünnung
Störung in α_2 -Fraktion

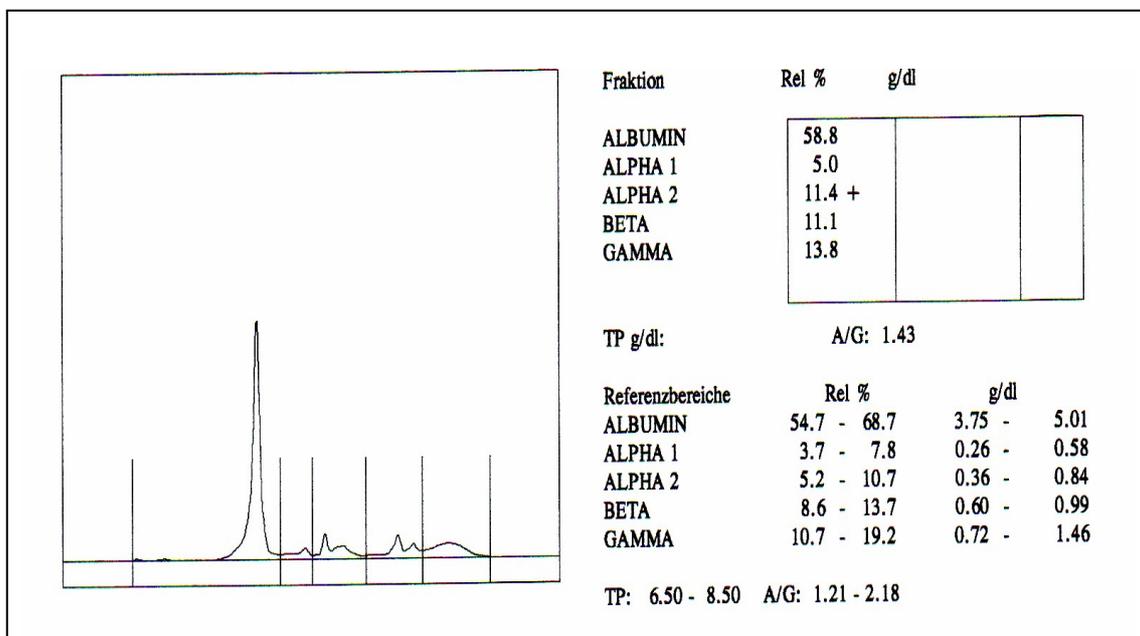


Abb. 4.1.2 Conray 60 mit Filter
Reststörung in α_2 -Fraktion: 11,4 %
3,6 % vom Normbereich entfernt

4.2. Omnipaque:

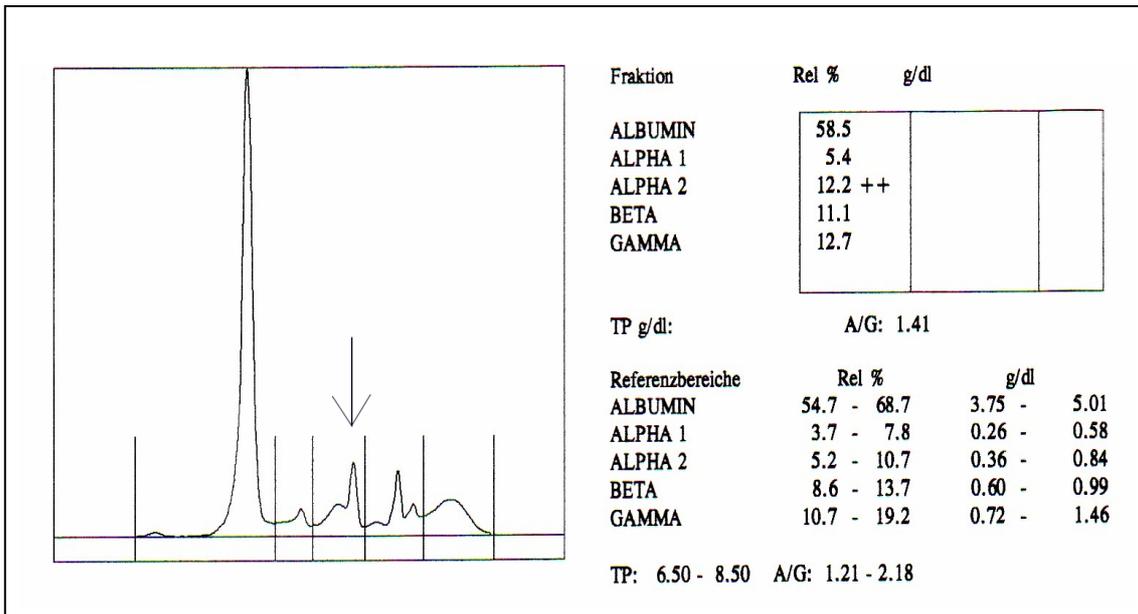


Abb. 4.2.1 Omnipaque 350 ohne Filter
1: 100 Verdünnung
Störung in α_2 -Fraktion

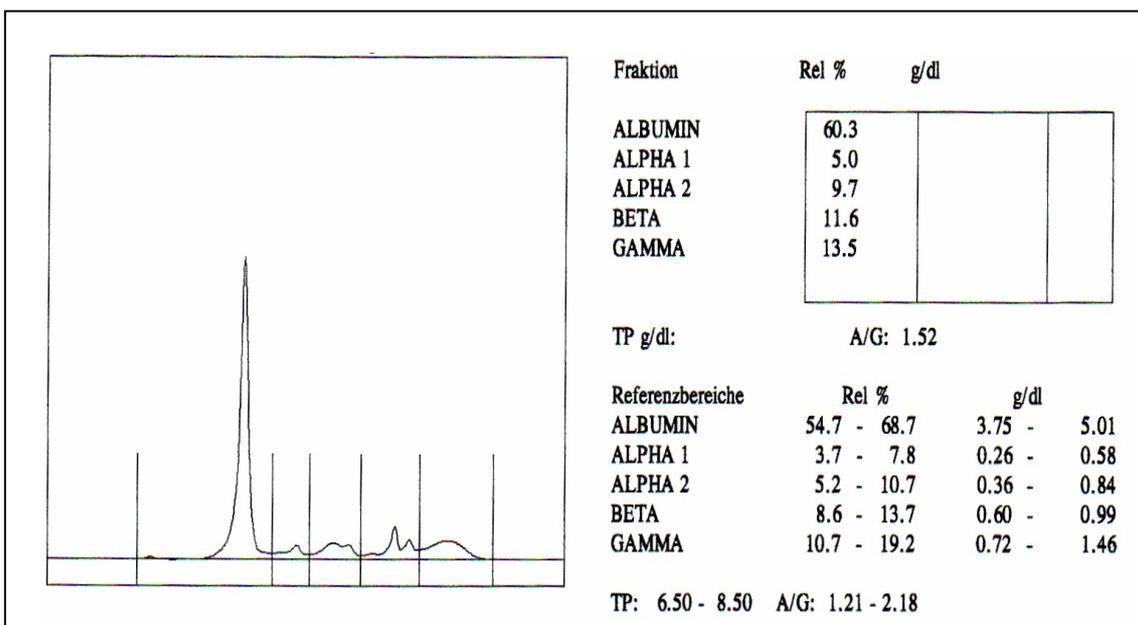


Abb. 4.2.2 Omnipaque 350 mit Filter
Reststörung in α_2 -Fraktion: 9,7 %
1,9 % vom Normbereich entfernt

4.3. Optiray:

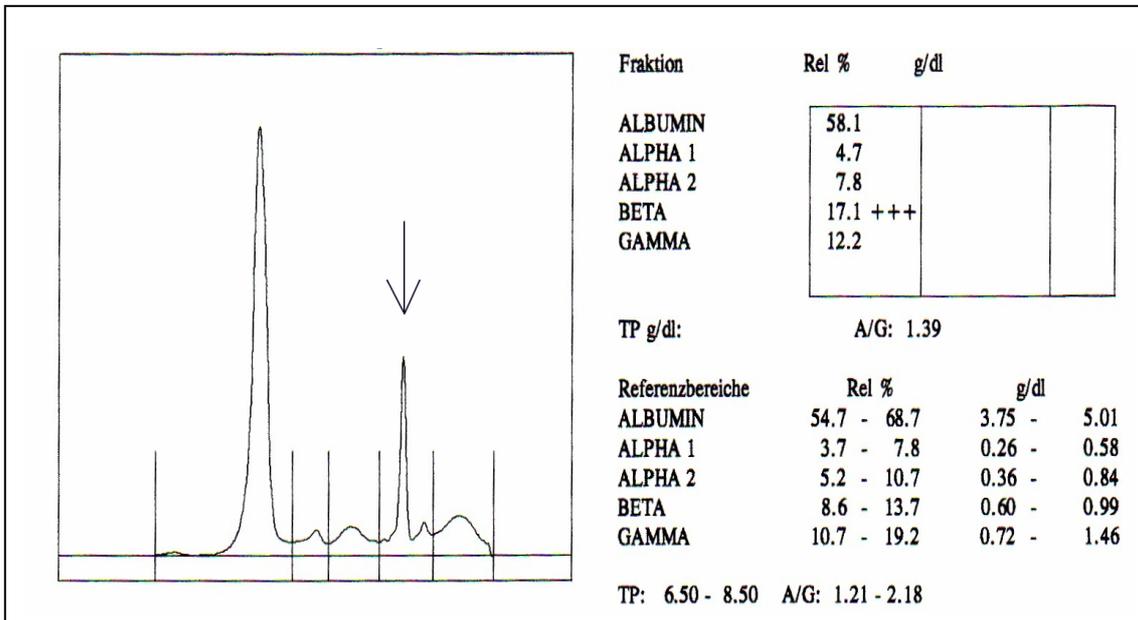


Abb. 4.3.1 Optiray 300 ohne Filter
1: 40 Verdünnung
Störung in β -Fraktion

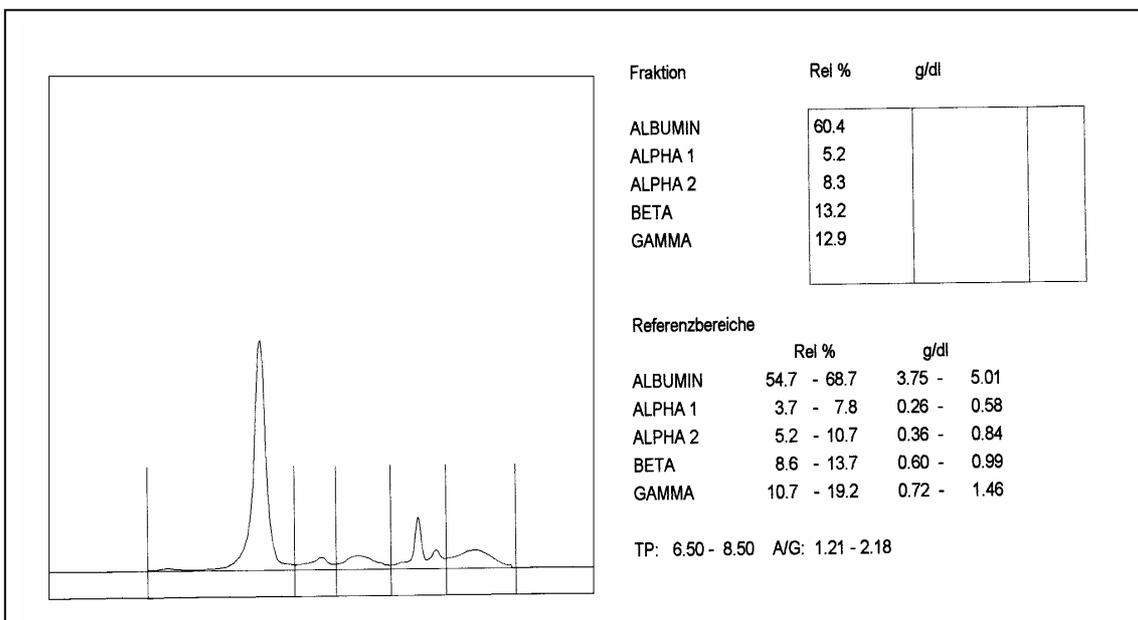


Abb. 4.3.2 Optiray mit Filter
Keine Reststörung

4.4. Ultravist:

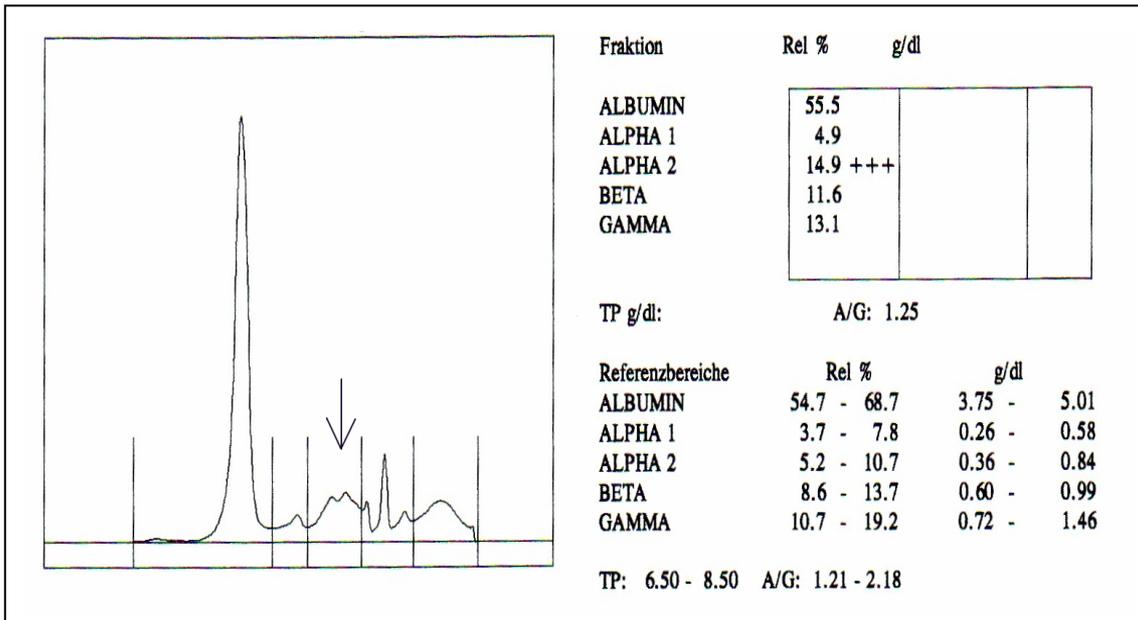


Abb. 4.4.1 Ultravist 300 ohne Filter
1: 50 Verdünnung
Störung in α_2 -Fraktion

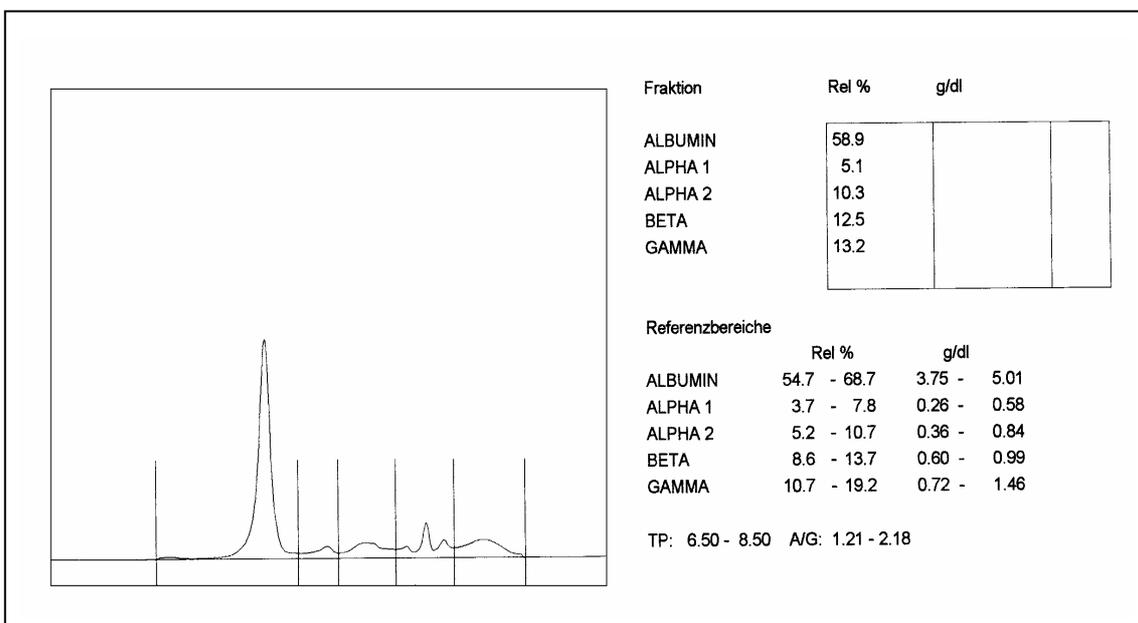


Abb. 4.4.2 Ultravist 300 mit Filter
Keine Restsstörung

4.5. Claforan:

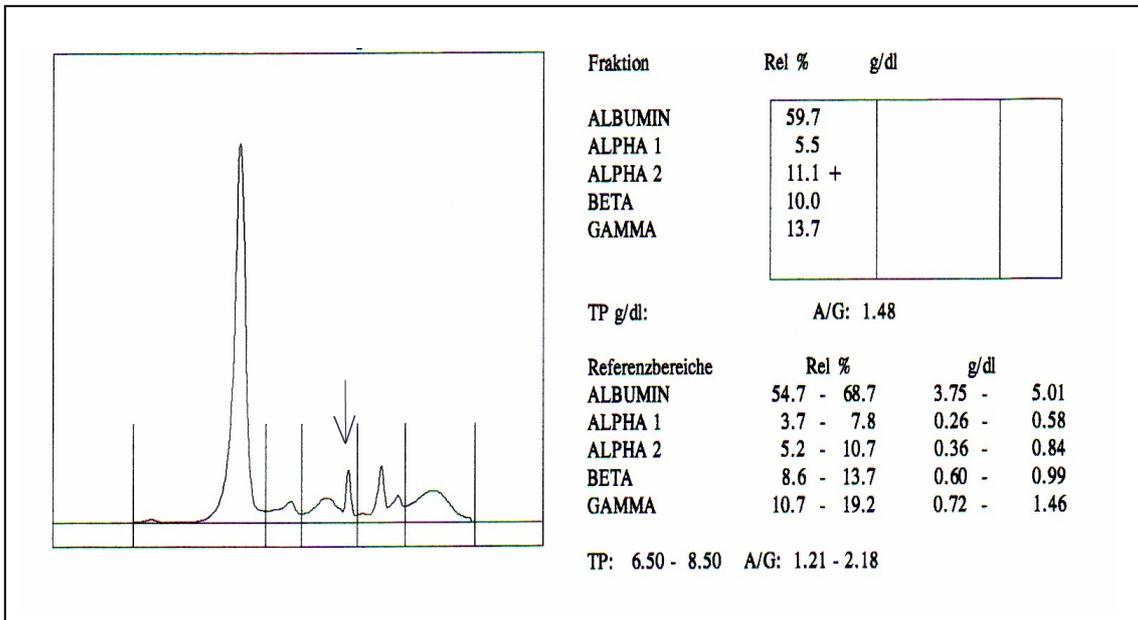


Abb. 4.5.1 Claforan 2,0g ohne Filter
1: 40 Verdünnung
Störung in α_2 -/ β -Fraktion

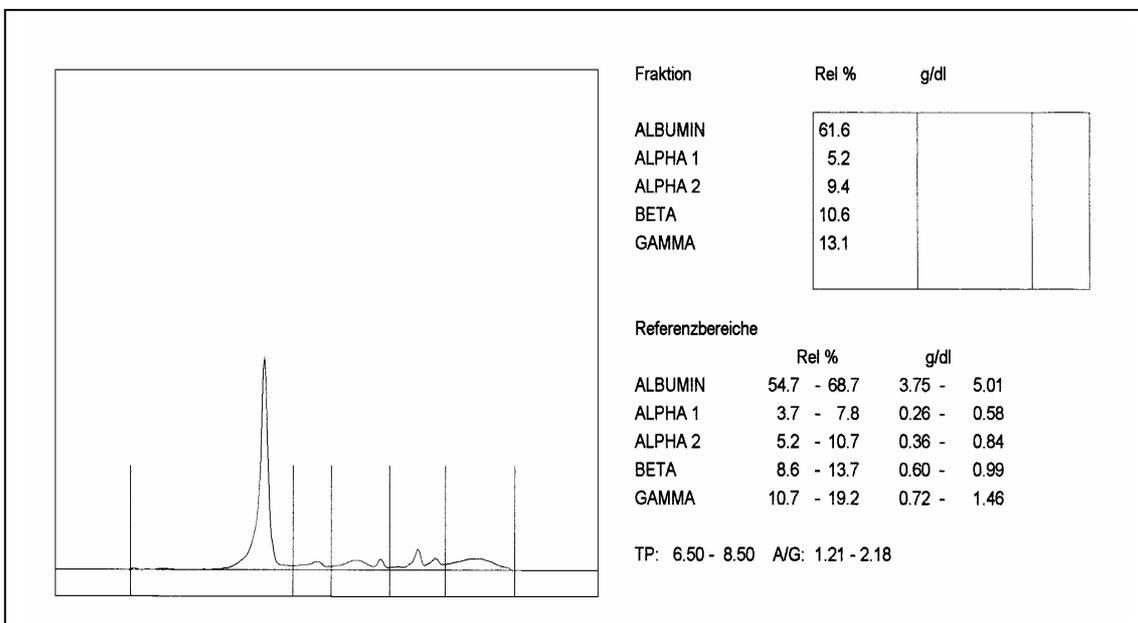


Abb. 4.5.2 Claforan 2,0g mit Filter
Keine Reststörung

4.6. Mefoxitin:

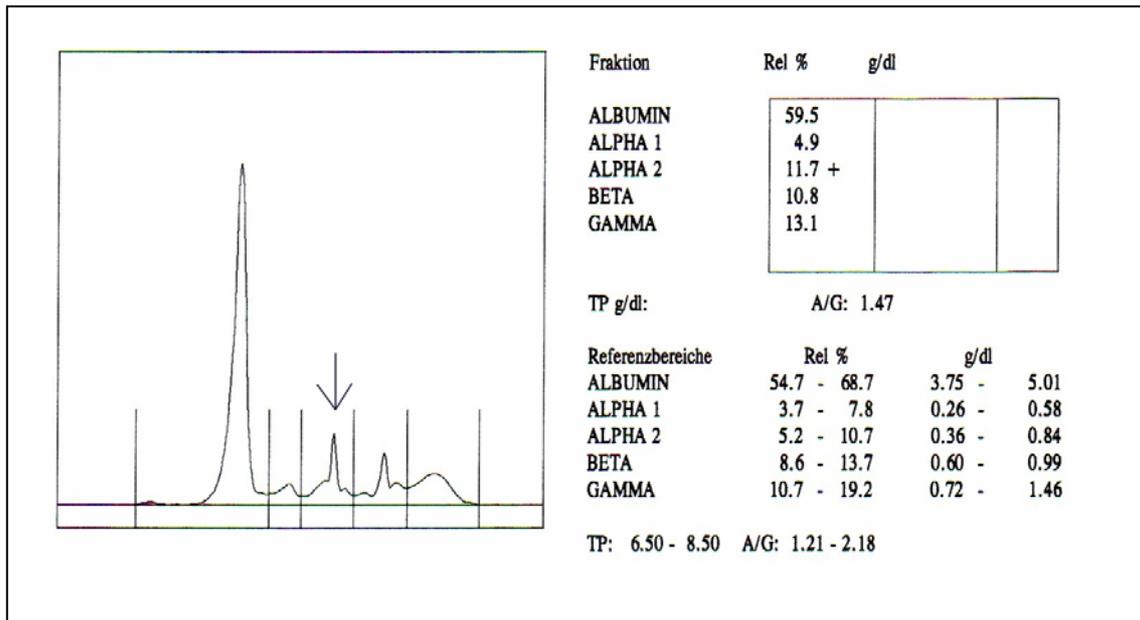


Abb. 4.6.1 Mefoxitin 1,0g ohne Filter
1:10 Verdünnung
Störung in α_2 -Fraktion

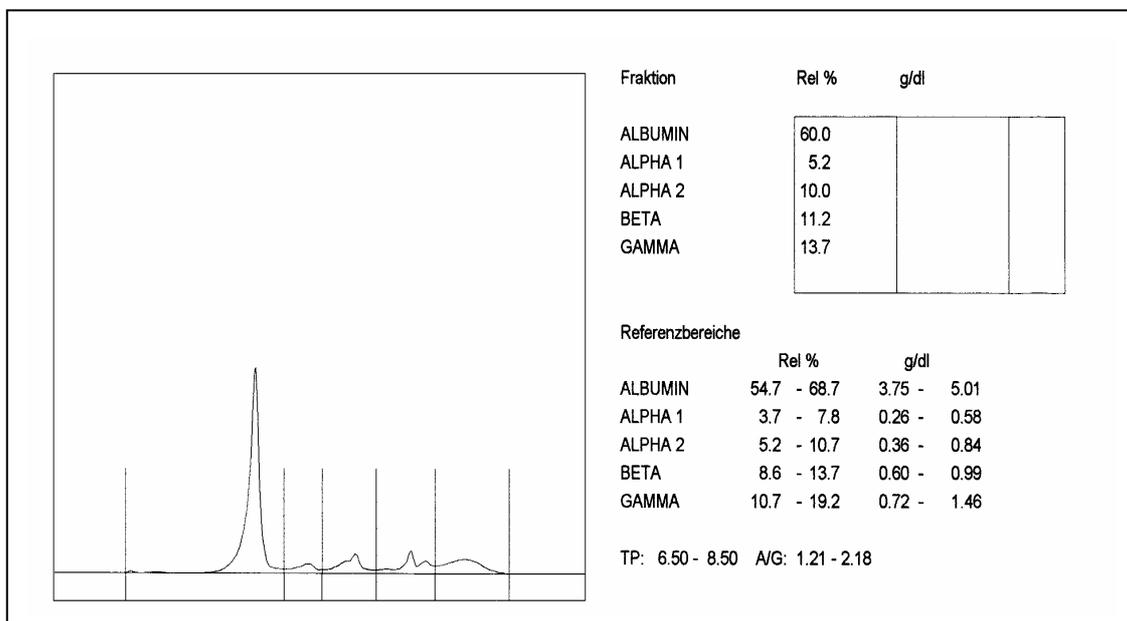


Abb. 4.6.2 Mefoxitin 1,0g mit Filter
Keine Reststörung

5. Ergebnisse der Messungen mit Albumin

Die Auswertung dieser Detektion ergab die gleichen Störungen wie bei den Serumproben. Die einzelnen Wirkstoffe verursachten auch in Verbindung mit dem Albumingemisch Interferenzen in ihren jeweilig entsprechenden Fraktionen.

5.1. Elektropherogramm eines reinen Albumingemisches:

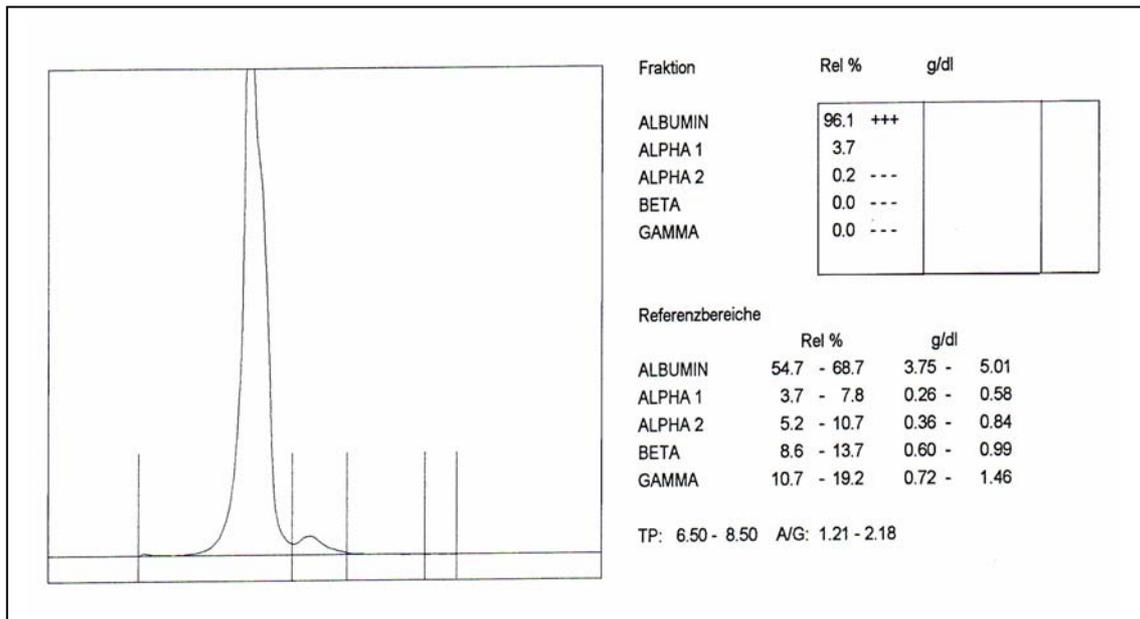


Abb. 5.1.1 Albumin rein ohne Störung

5.2. Elektropherogramme der Kontrastmittel mit Albuminzusatz:

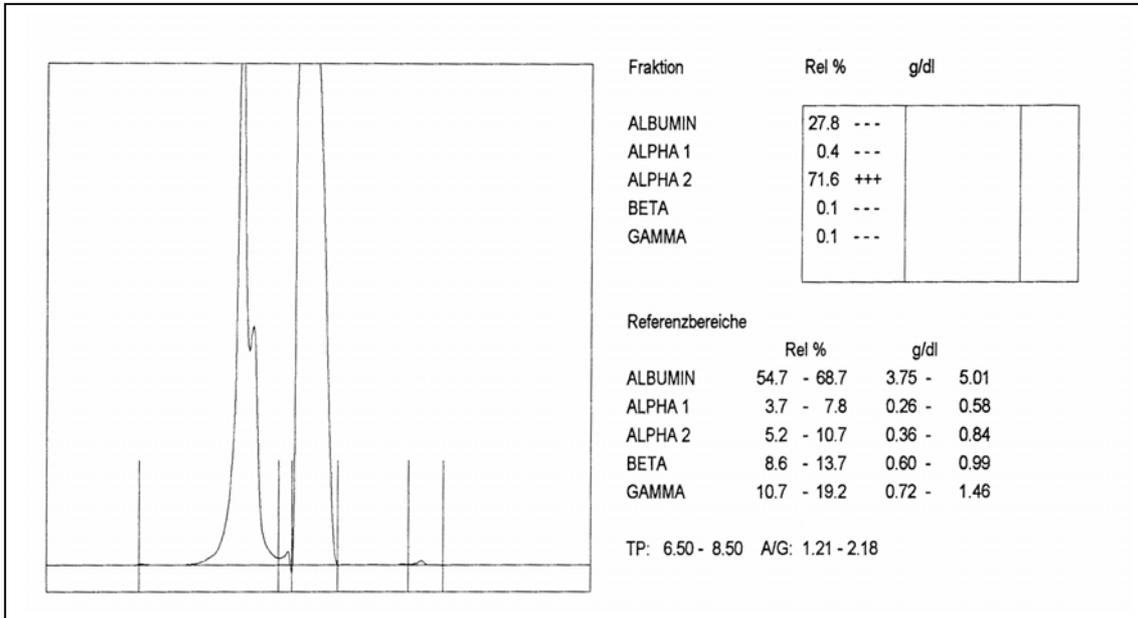


Abb. 5.2.1 Conray 60

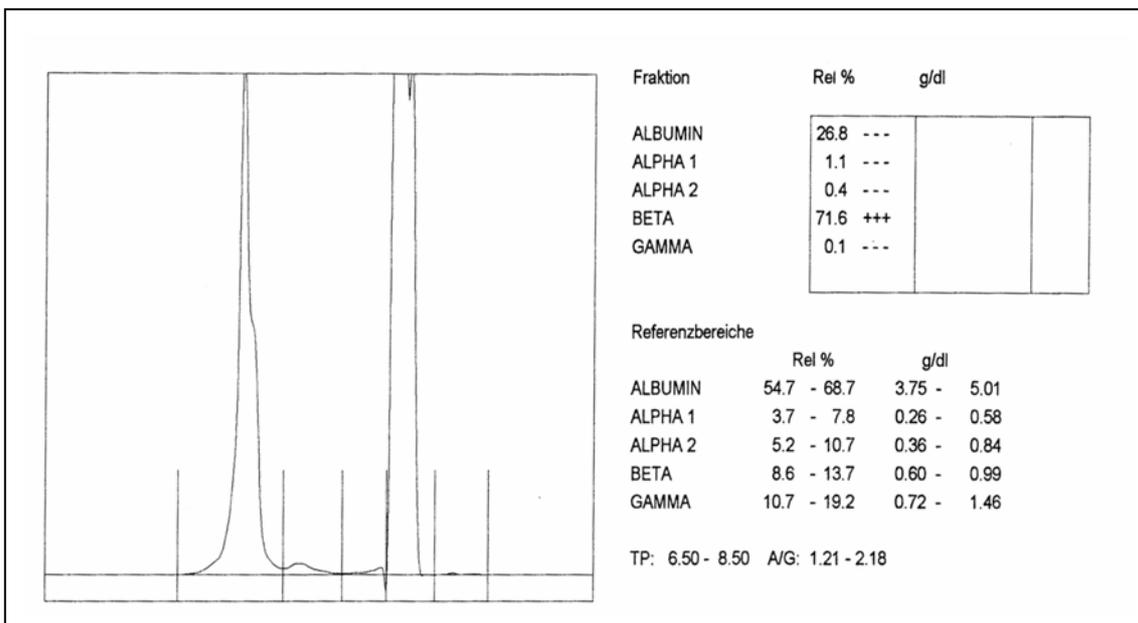


Abb. 5.2.2 Imeron 300

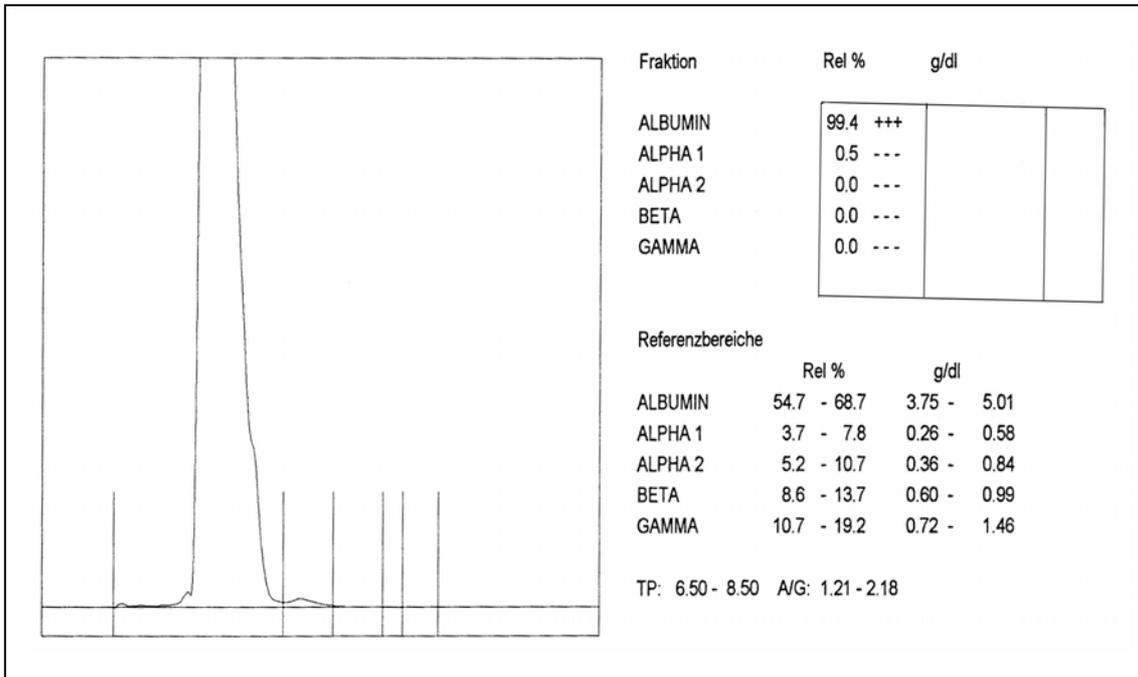


Abb. 5.2.3 Isovist 300

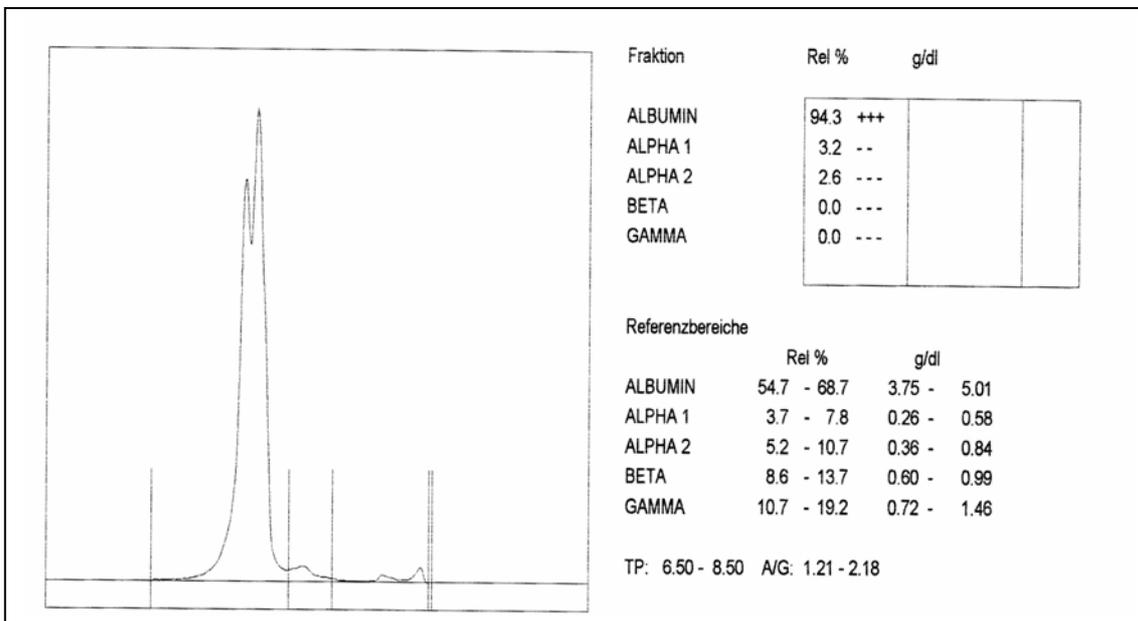


Abb. 5.2.4 Magnevist

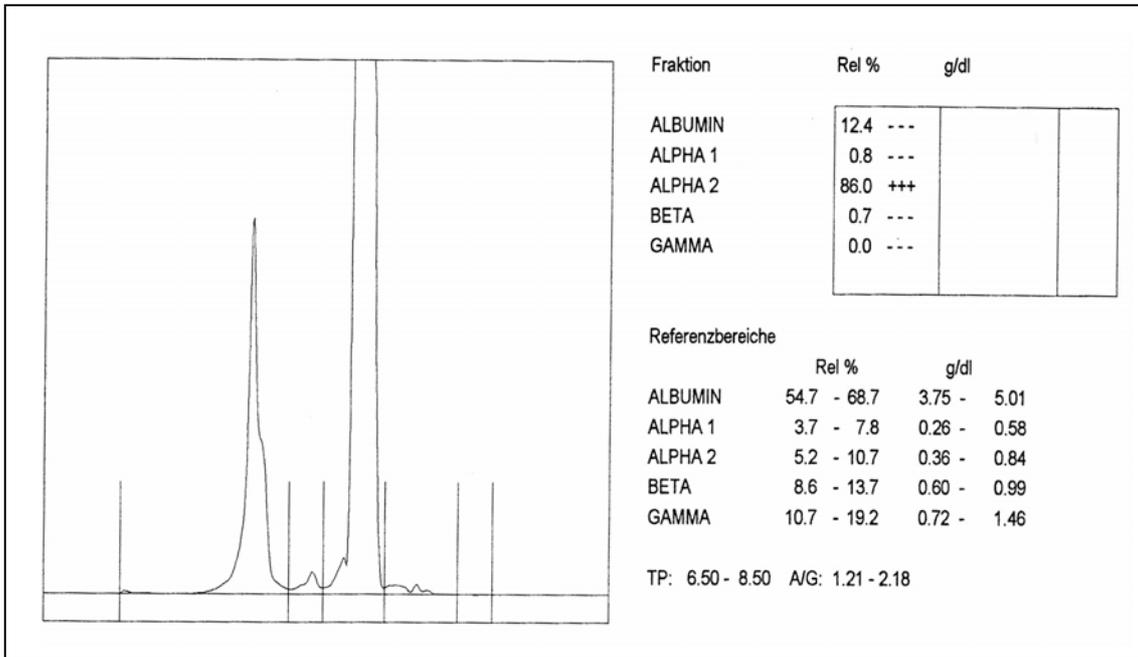


Abb. 5.2.5 Omnipaque 350

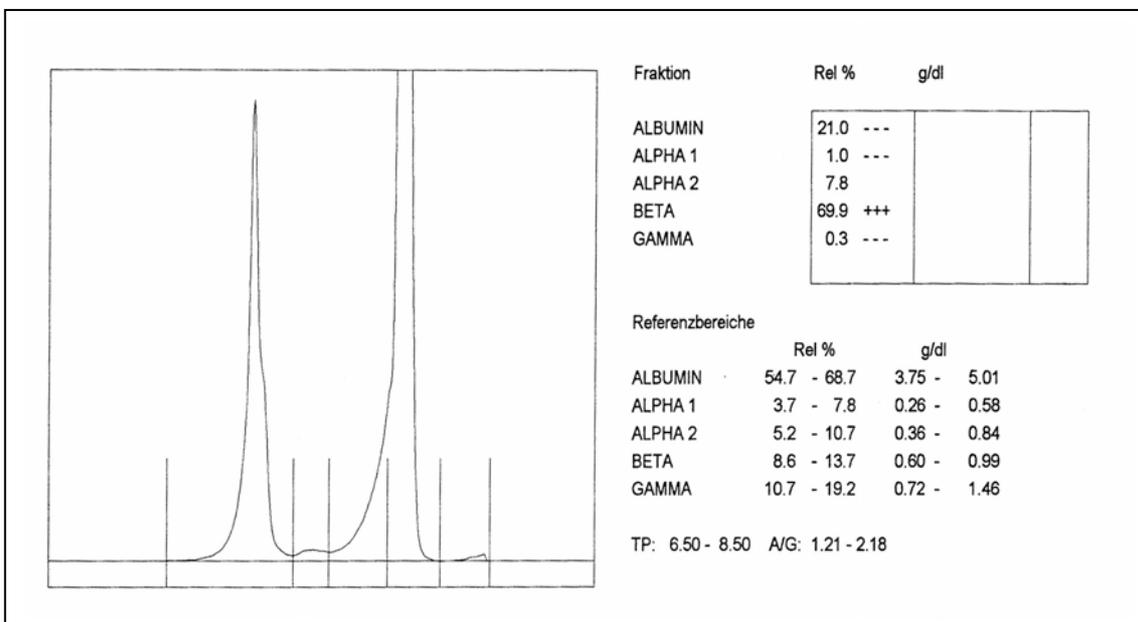


Abb. 5.2.6 Optiray 300

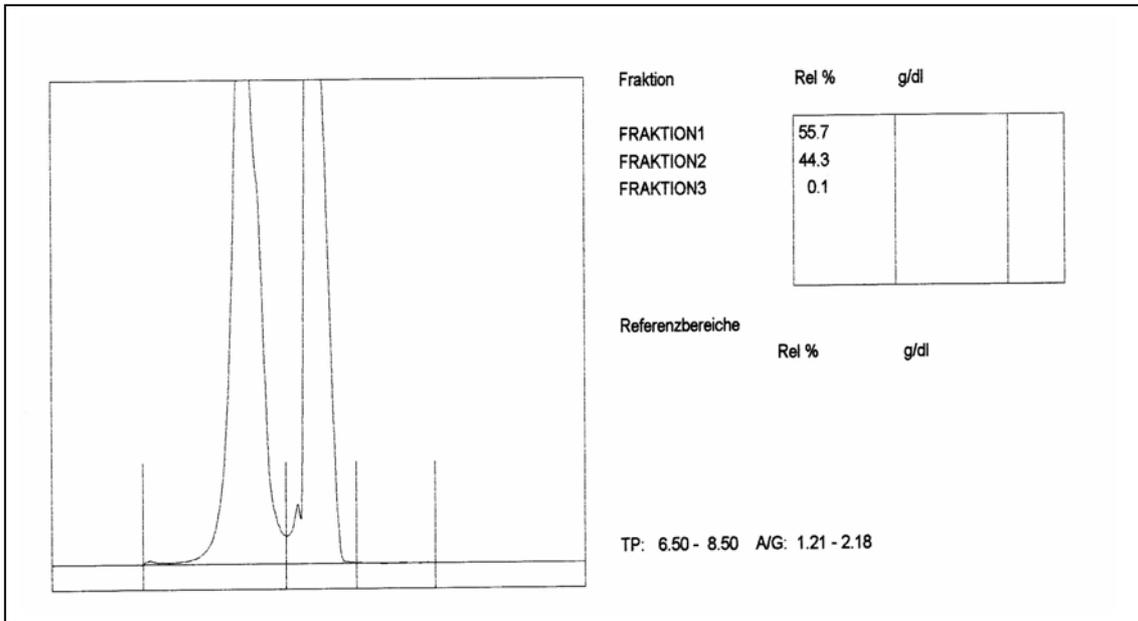


Abb. 5.2.7 Peritrast

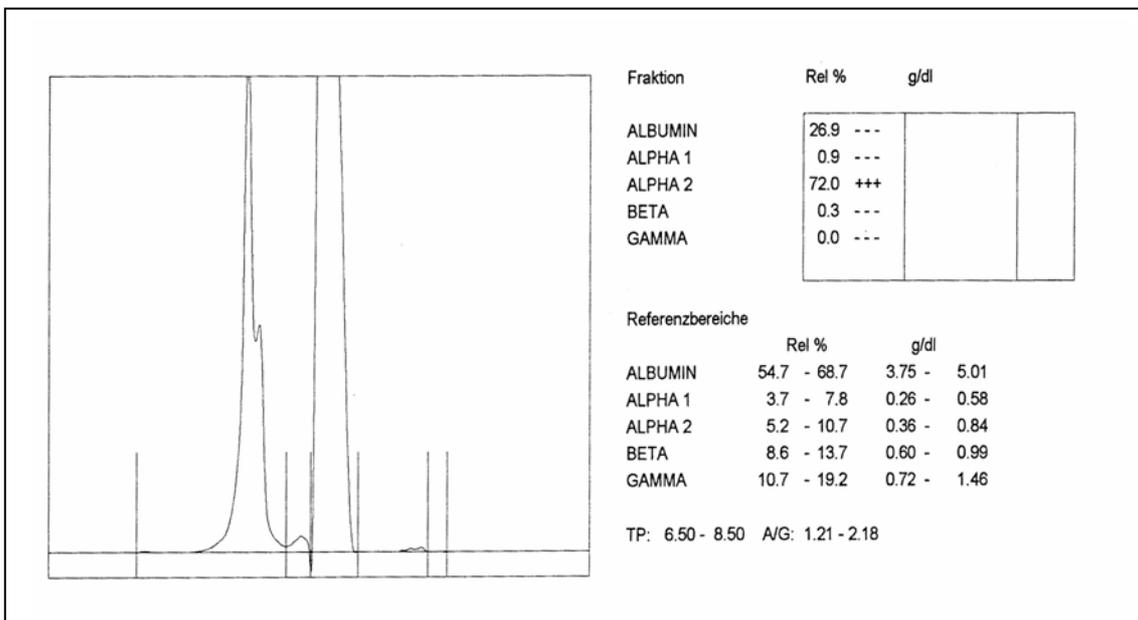


Abb. 5.2.8 Telebrix Gastro

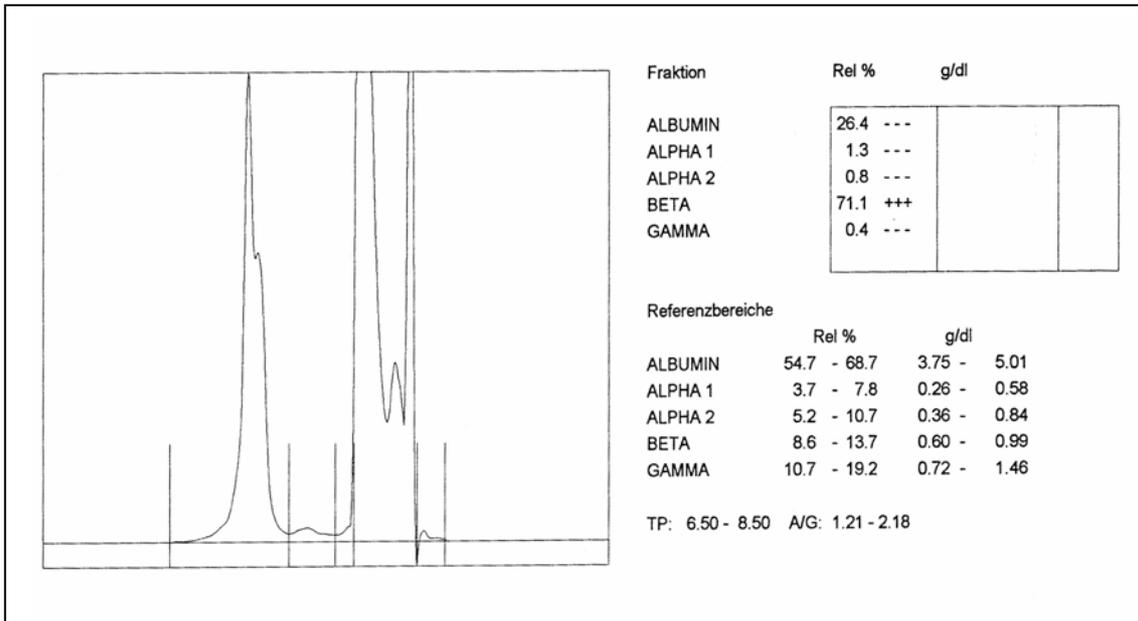


Abb. 5.2.9 Ultravist 300

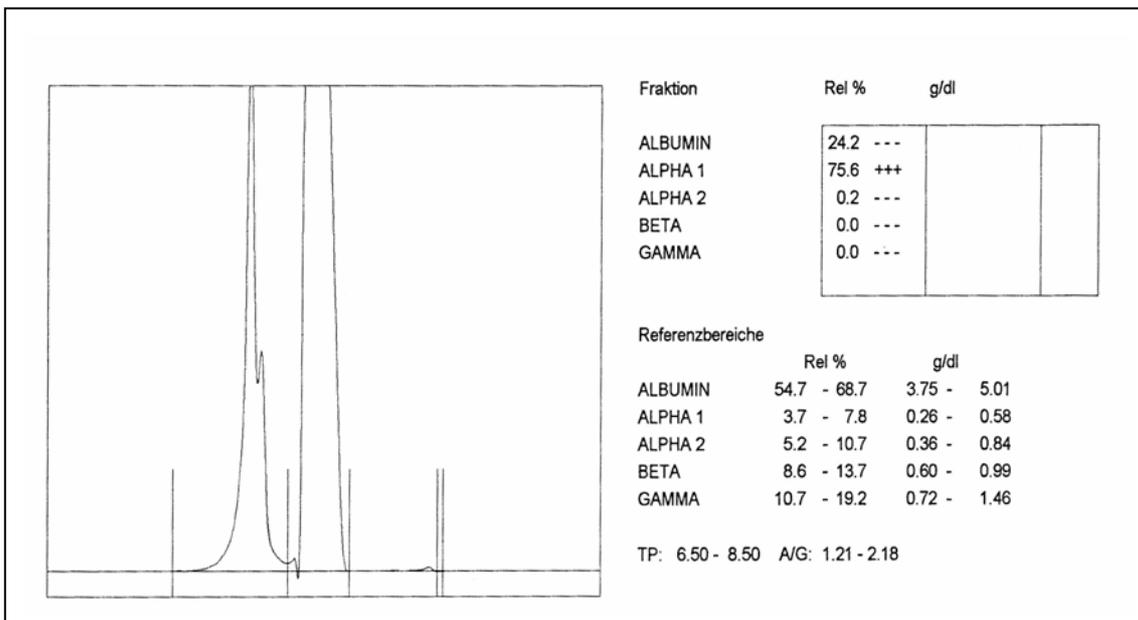


Abb. 5.2.10 Urografin 76 %

5.3. Elektropherogramme der Antibiotika mit Albuminzusatz

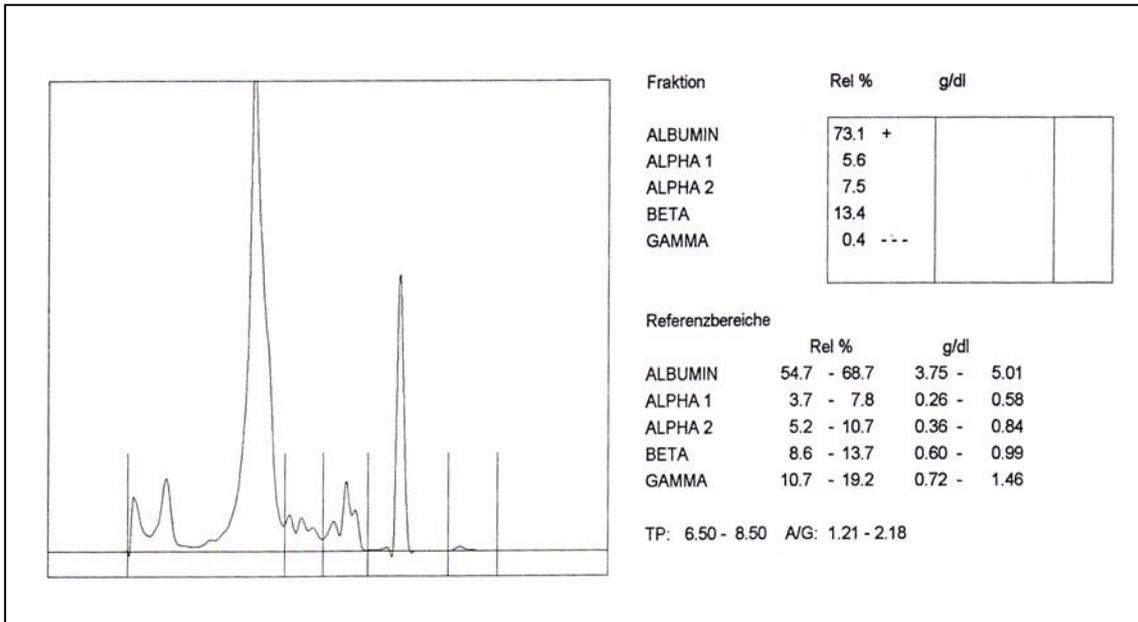


Abb. 5.3.1 Baypen 4g

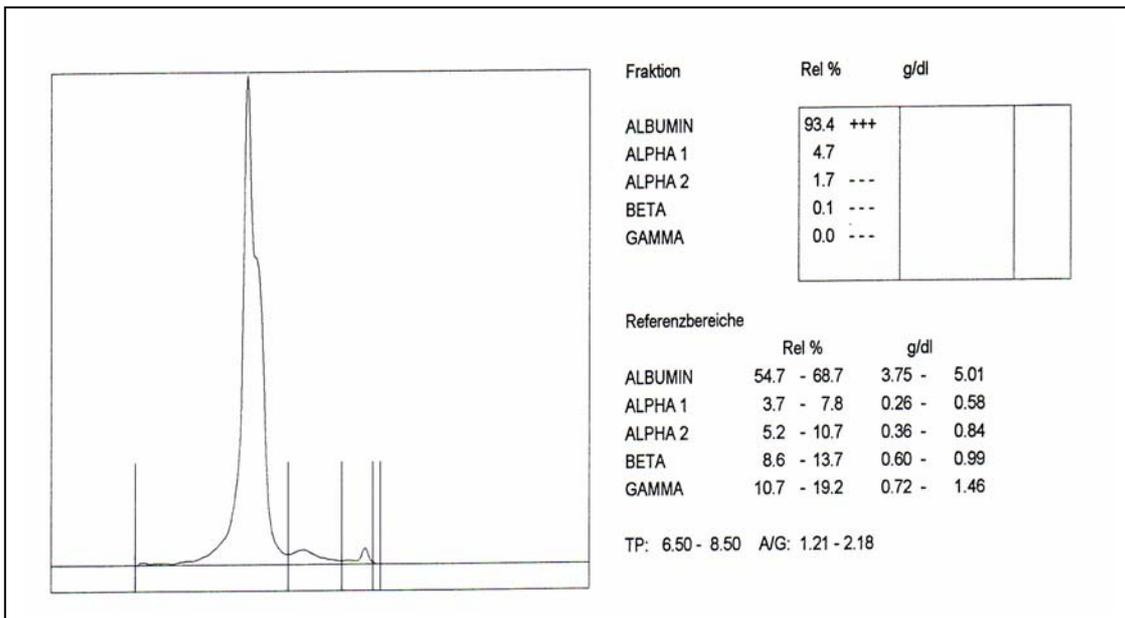


Abb. 5.3.2 Ciprobay 400

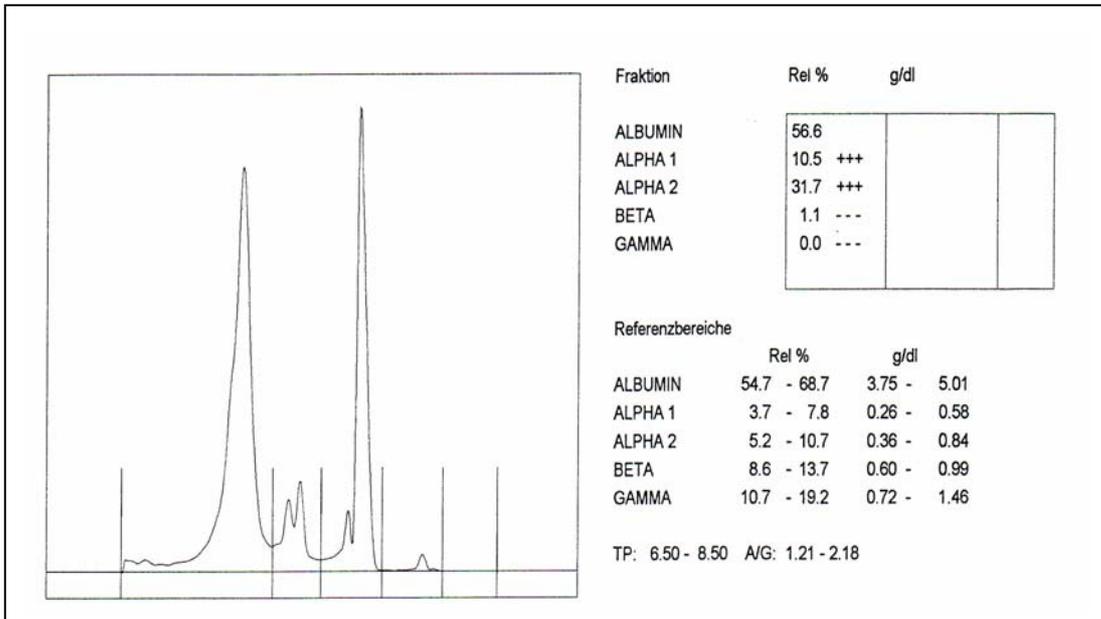


Abb. 5.3.3 Claforan 2,0g

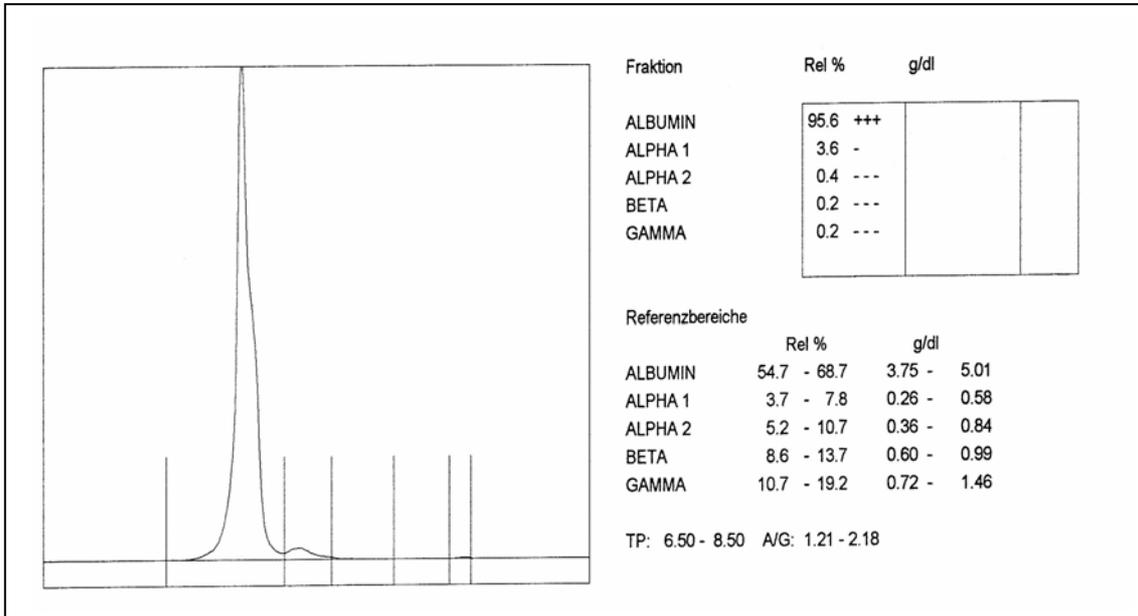


Abb. 5.3.4 Erythrocin i.v. 0,5g

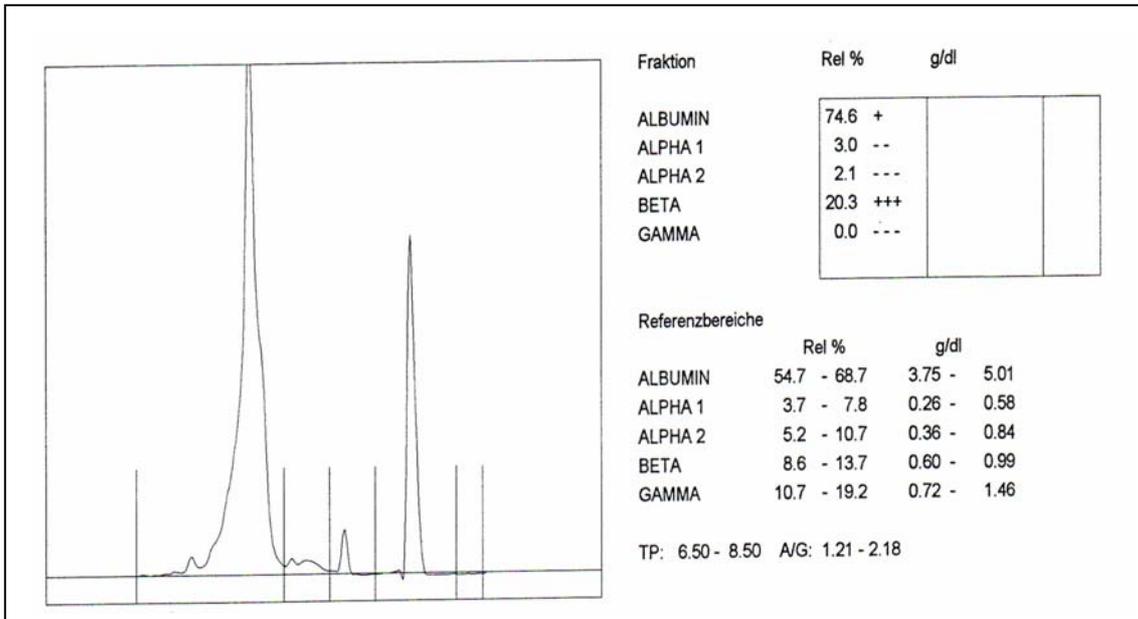


Abb. 5.3.5 Fortum 1,0g

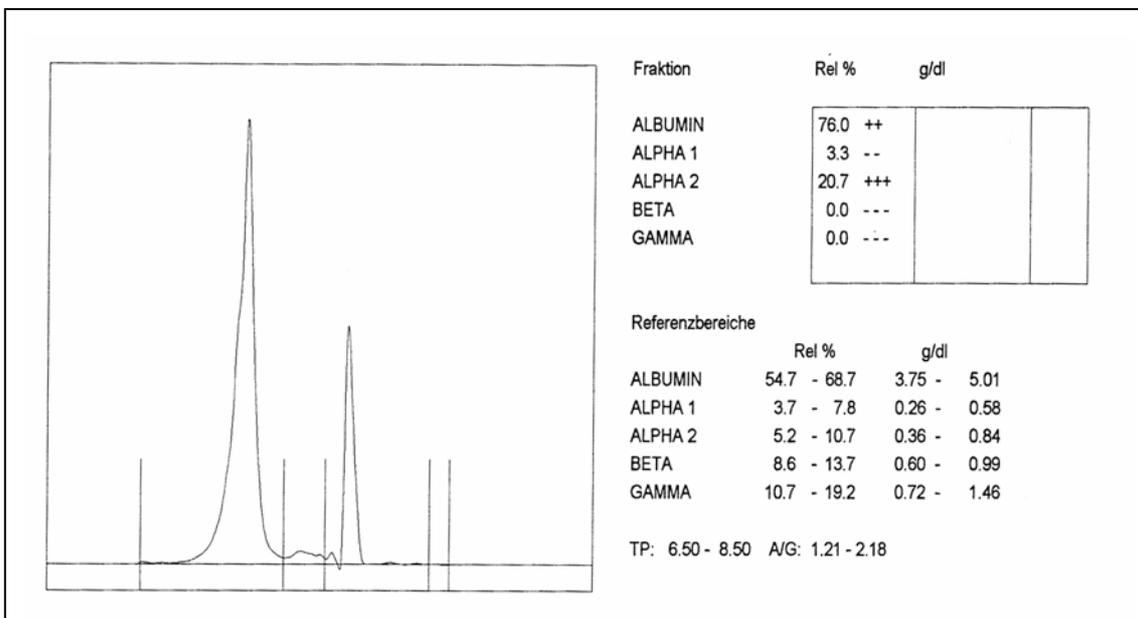


Abb. 5.3.6 Mefoxitin 1,0g

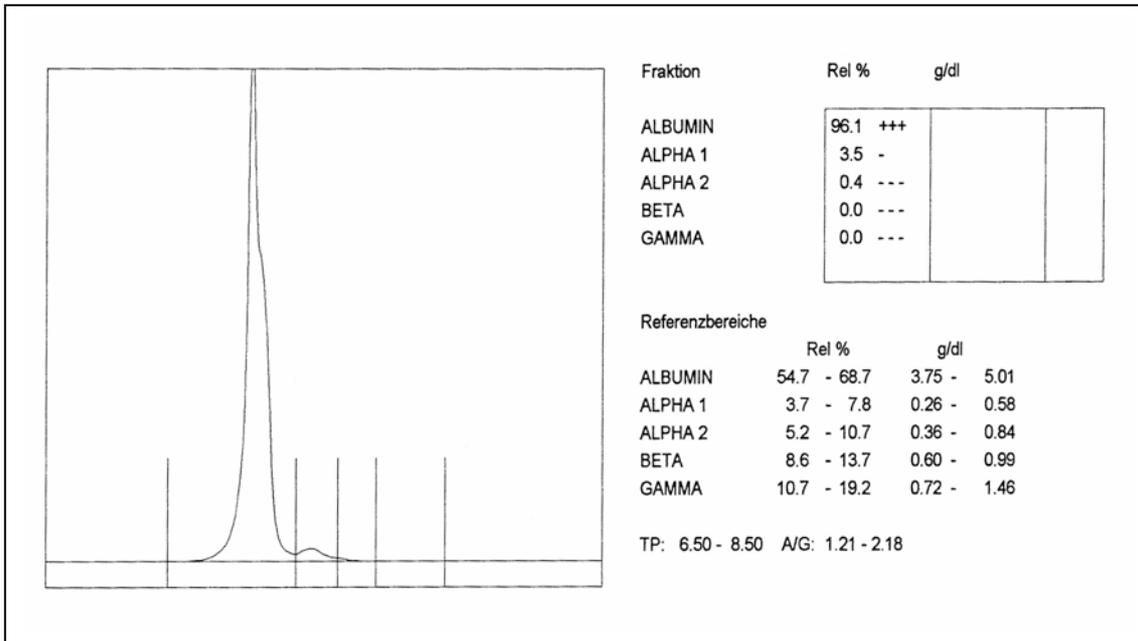


Abb. 5.3.7 Metronidazol Ratiopharm

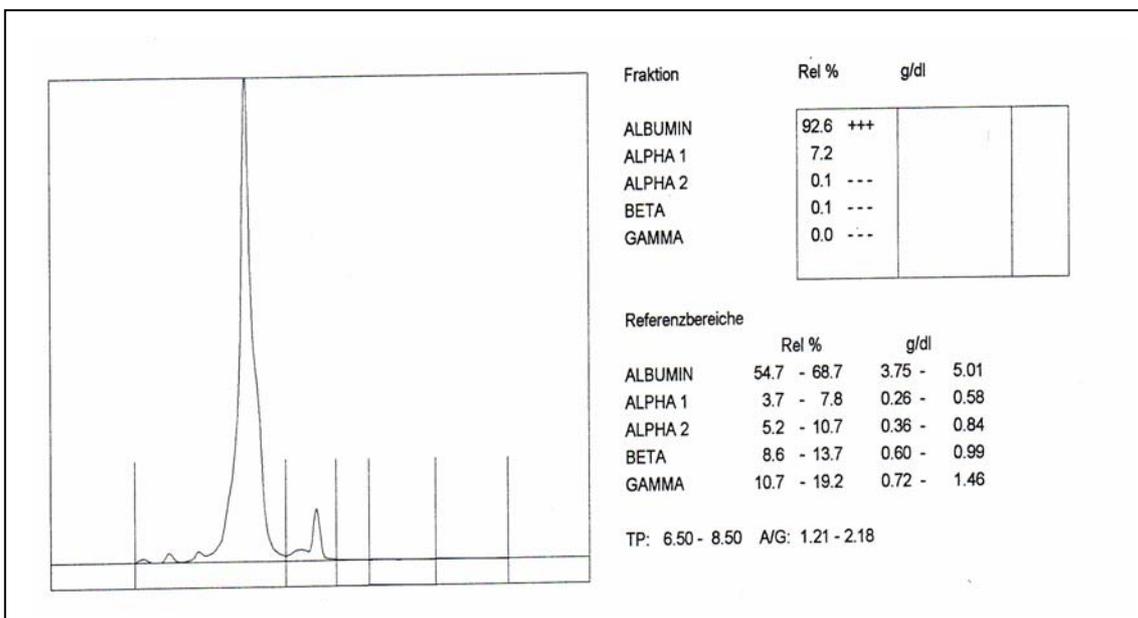


Abb. 5.3.8 Penicillin

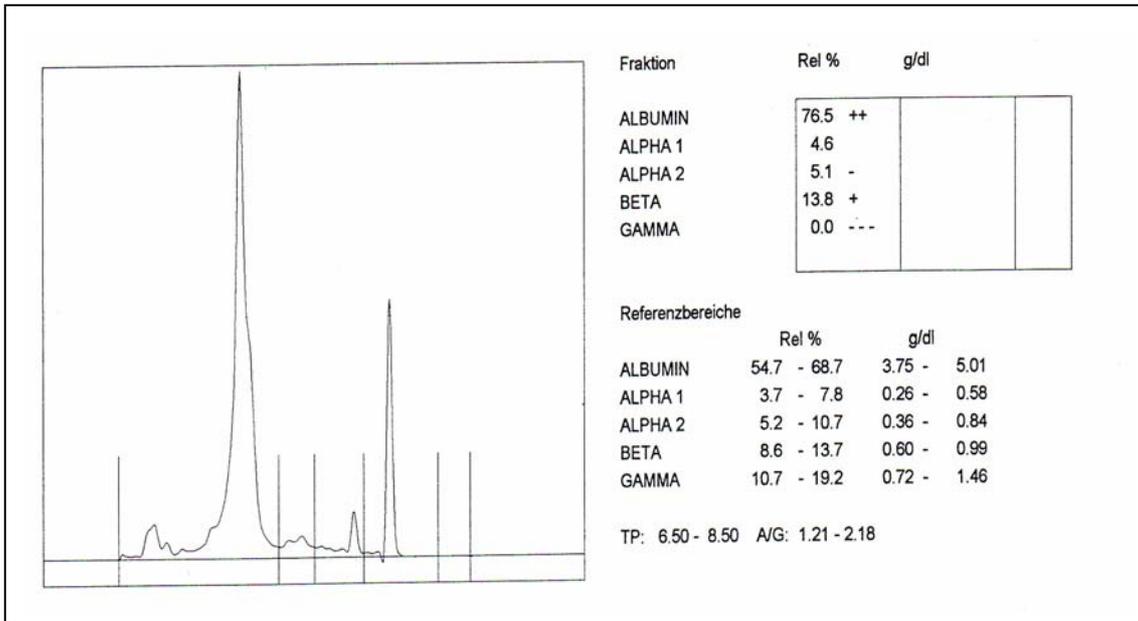


Abb. 5.3.9 Pipril 4g

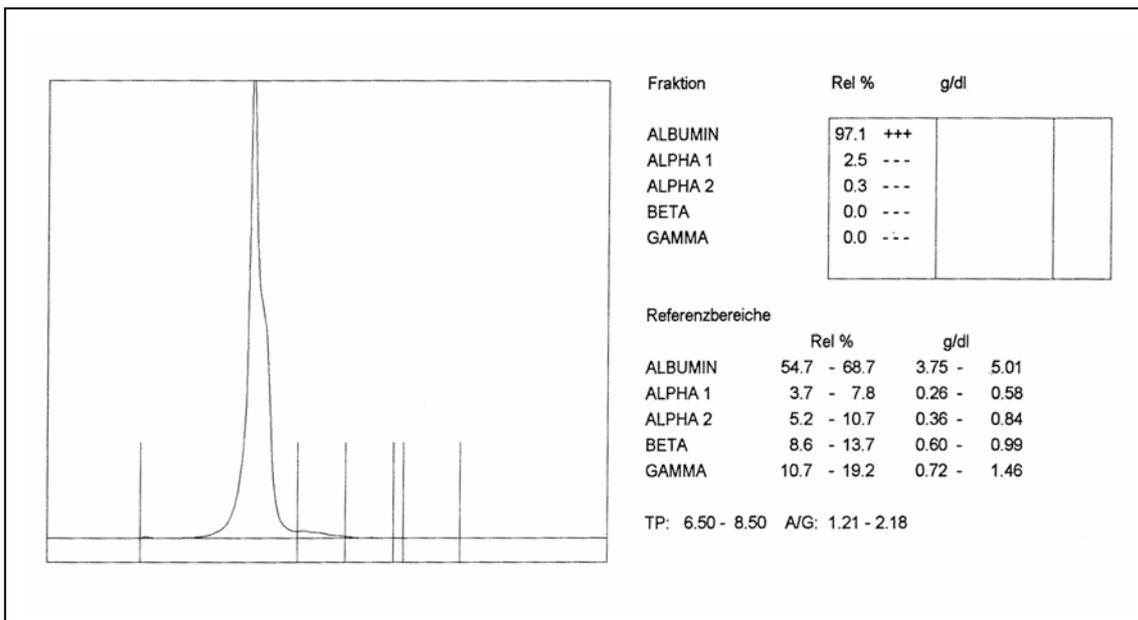


Abb. 5.3.10 Refobacin 80mg

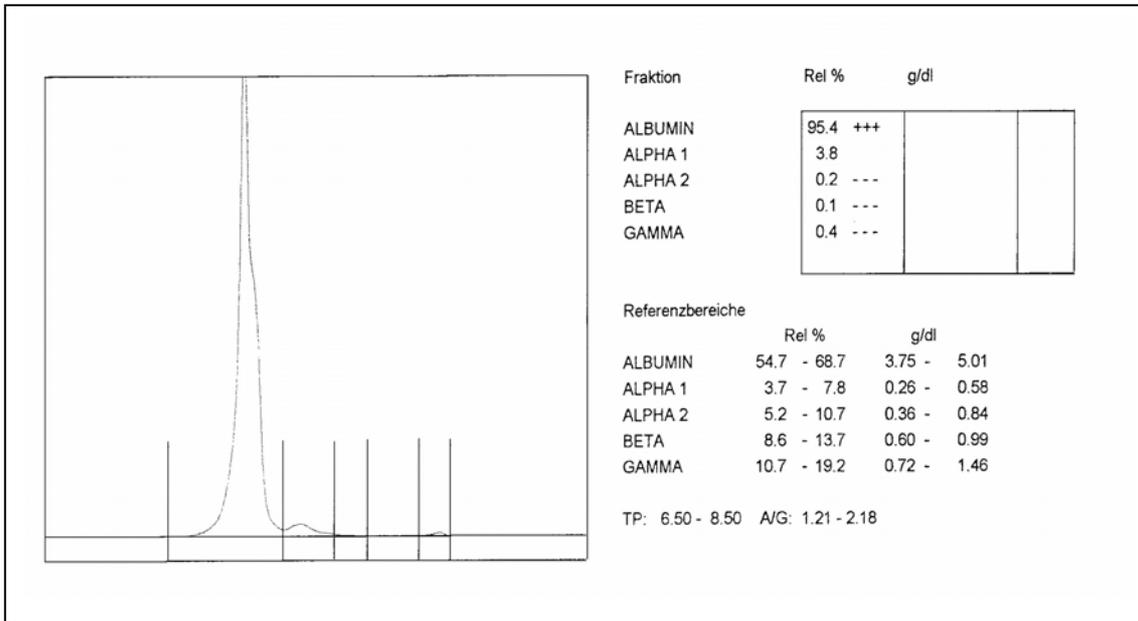


Abb. 5.3.11 RIFA Parenteral 600mg

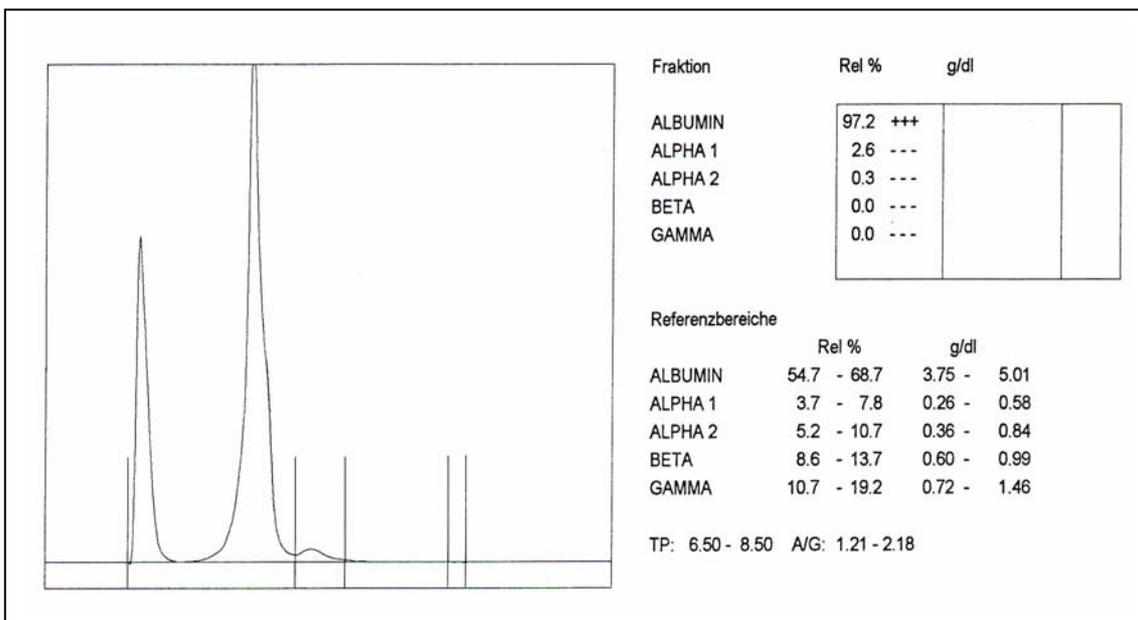


Abb. 5.3.12 Rocephin zur Infusion 2g

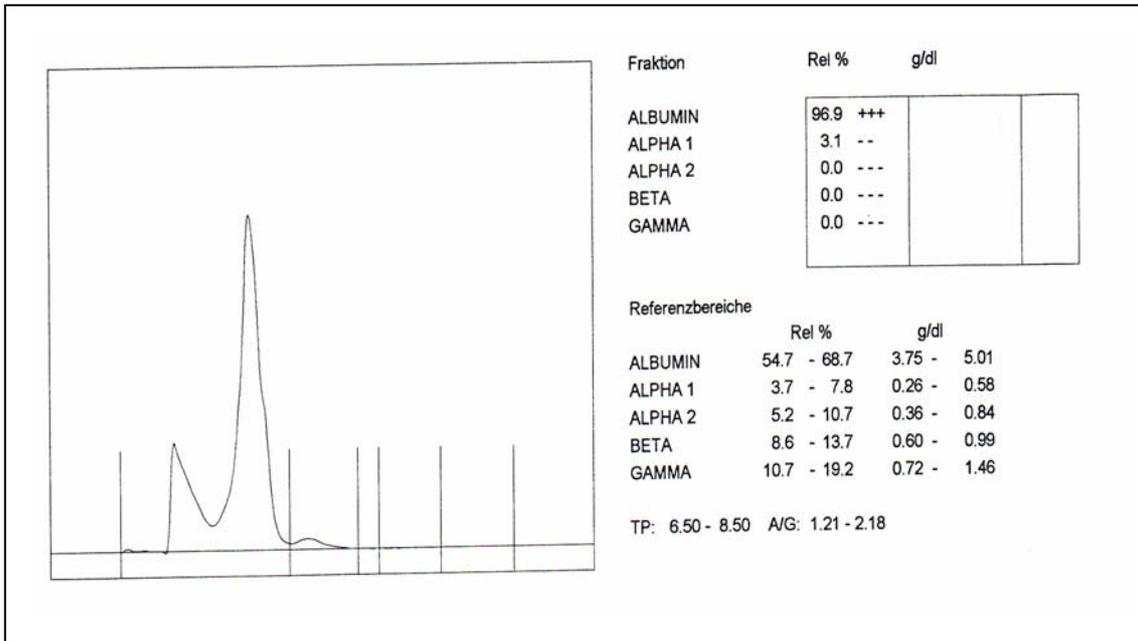


Abb. 5.3.13 Sobelin 300

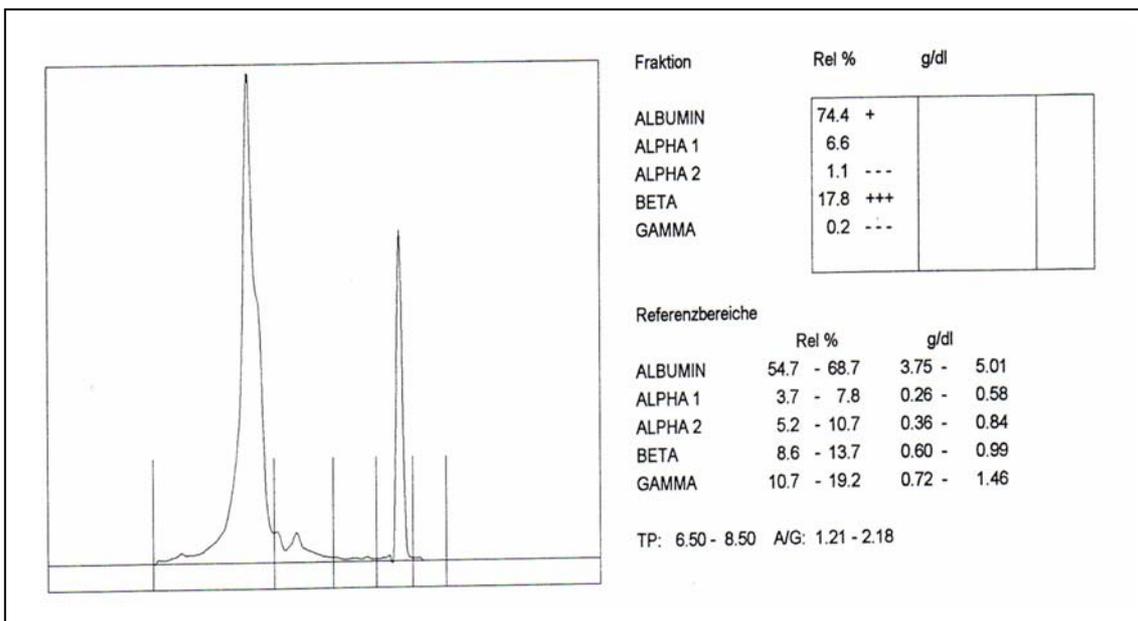


Abb. 5.3.14 Spizef 1,0g

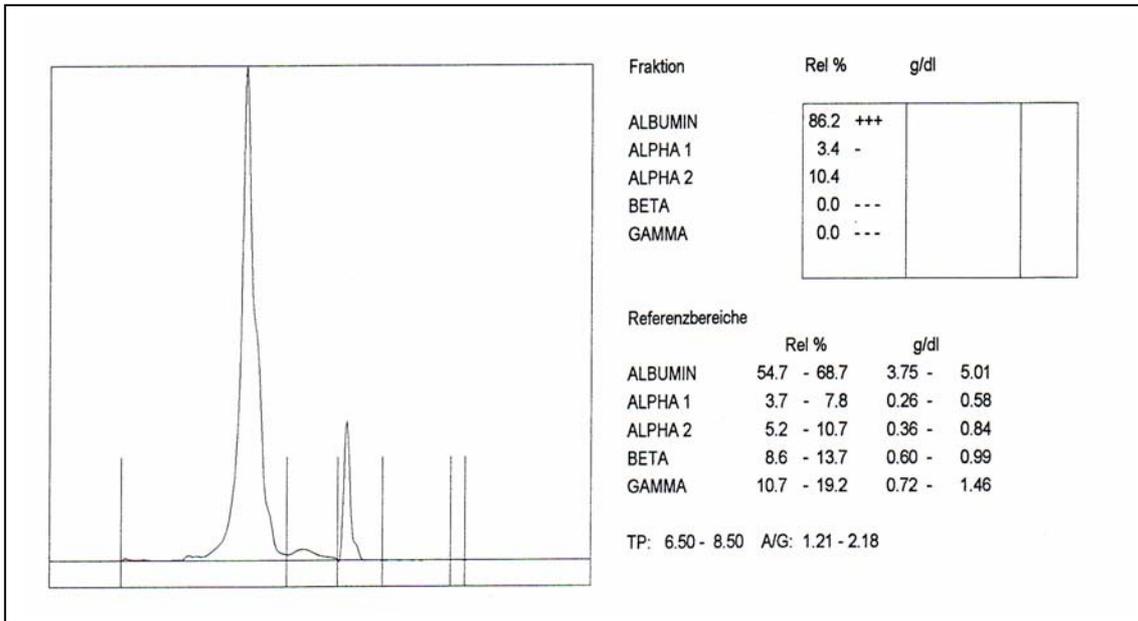


Abb. 5.3.15 Staphylex 1,0g

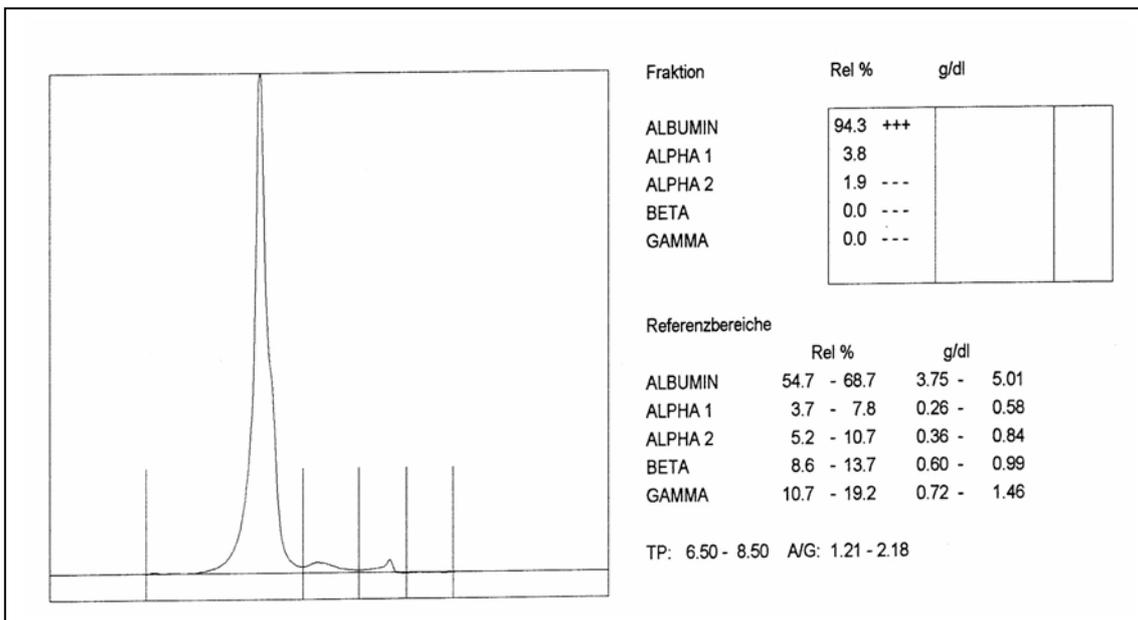


Abb. 5.3.16 Tarivid i.v. 200

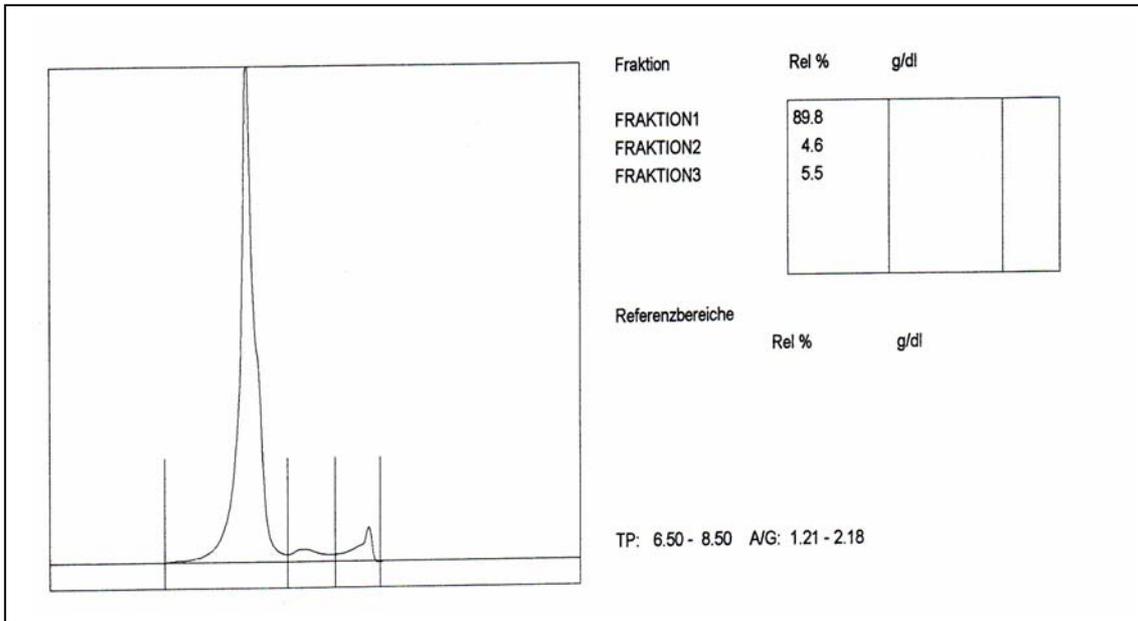


Abb. 5.3.17 Tavanic i.v. 500mg

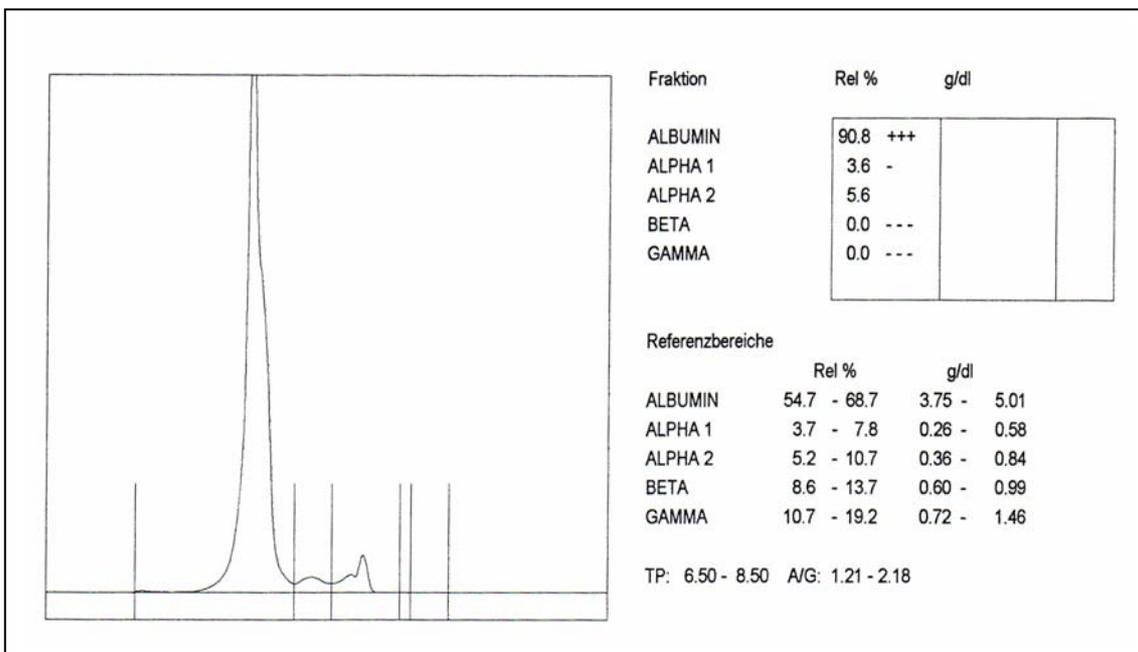


Abb. 5.3.18 Vancomycin CP Lilly 500

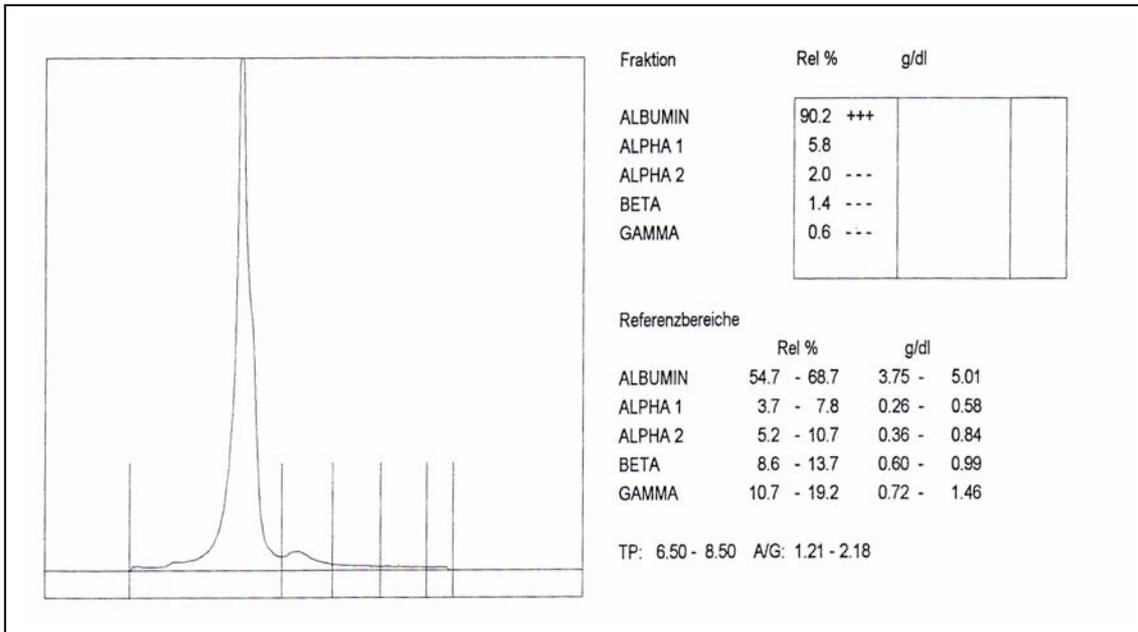


Abb. 5.3.19 Vibravenös SF

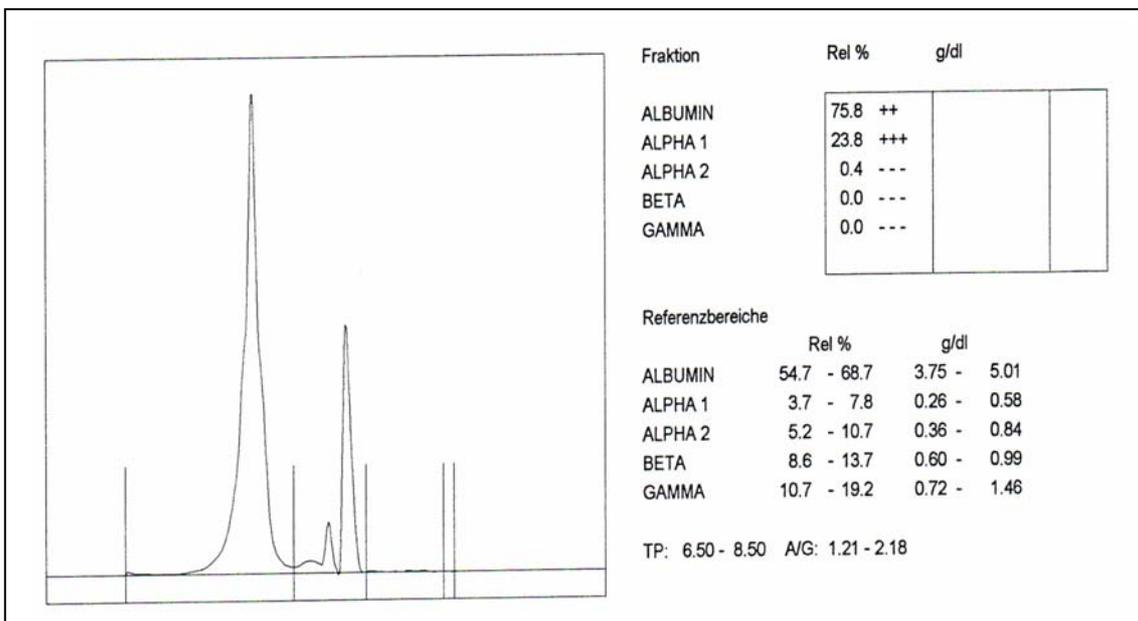


Abb. 5.3.20 Zinazef 1500mg

6. Serum-Proteinelektrophorese auf Celluloseacetatfolien mit Kontrastmittel und Antibiotika

Die Serum-Proteinelektrophorese auf Celluloseacetatfolien, der mit den Kontrastmitteln und Antibiotika versetzten Serumproben, ergab keine Störungen. In den Elektropherogrammen wurden keine zusätzlichen Peaks erkannt.

V. Diskussion

1. Grund der Untersuchung:

Bei Routineuntersuchungen von Patientenserum mit dem Analysegerät Paragon CZE™ 2000 entdeckte man Störungen während der Auswertung von Elektropherogrammen. Die jeweiligen Ergebnisse zeigten Veränderungen des Kurvenverlaufes durch das Auftreten von zusätzlichen Peaks. Diese veränderten Elektropherogramme mit den jeweiligen erhöhten Konzentrationsangaben in den einzelnen Proteinfractionen entsprachen z.B. Proteinkonzentrationsveränderungen im Sinne einer akuten Entzündung, eines nephrotischen Syndroms oder einer Leberzirrhose. Da die Patienten keinerlei klinische Symptome aufwiesen, die diesen pathologischen Befunden entsprachen, wurden daraufhin genauere Untersuchungen angeschlossen, die weitere Hinweise auf diese Erkrankungen liefern sollten. Über andere diagnostische Verfahren konnten die zuvor ermittelten Ergebnisse aber nicht bestätigt werden. Einige Tage später wurden zur Kontrolle erneut Serumproben derselben Patienten entnommen und noch einmal mit demselben Analysegerät unter gleichen Bedingungen untersucht. Die Ergebnisse dieser zweiten kapillarelektrophoretischen Untersuchungen entsprachen nicht mehr den anfänglich ermittelten.

Man fragte sich daraufhin, ob diese Artefakte durch Fremdstoffe im Serum ausgelöst wurden. Man vermutete, dass diese Stoffe, die anfänglich noch vorhanden waren, vom Körper nach einiger Zeit wieder aus dem Serum eliminiert wurden. Denn die Zweituntersuchungen, die nach einigen Tagen stattfanden, waren störungsfrei.

Da während der Detektion der Serumproteine diese Substanzen mitberücksichtigt wurden, nahm man außerdem an, dass die gesuchten Stoffe ebenfalls bei der Wellenlänge absorbierten, die während der Detektion benutzten Wellenlänge von 214nm entsprach (III.2.1.1). Zusätzlich mussten diese Fremdstoffe im gleichen Detektionszeitraum wie die Proteine am Kapillarfenster vorbeiziehen.

Da diese Veränderungen häufig nach der Durchführung einer Röntgenuntersuchung oder Computertomographie auftraten, die mit Hilfe von Röntgenkontrastmitteln stattfanden, vermutete man, dass die für diese Diagnostikverfahren notwendigen

Substanzen eine Rolle beim Auftreten der Störungen spielen könnten. Daraufhin wurden gezielt Patientenserien zur Analyse mit dem Paragon CZETM2000 ausgesucht, die kurz vorher eine intravenöse Applikation von drei Röntgenkontrastmitteln erhielten⁴⁶. Die drei Röntgenkontrastmittel waren Telebrix®, Omnipaque® und Urografin®. Die Elektropherogramme dieser Untersuchungsdurchläufe entsprachen den ursprünglich entdeckten Veränderungen und bestätigten somit die Vermutung, dass die zur Diagnostik eingesetzten Substanzen Interferenzen in der kapillarelektrophoretischen Analyse von Serumproteinen auslösten.

2. Auswahl des Untersuchungsgutes:

Sucht man nach Gemeinsamkeiten zwischen den einzelnen Substanzen, so erkennt man, dass alle Kontrastmittel intravenös appliziert wurden. Das bedeutet, dass sie kurz nach ihrer Verabreichung in hohen Konzentrationen im Serum vorkommen.

Da die Substanzen, die während den ersten Untersuchungen eine Störung provozierten, die Detektion manipulierten, wurde in ihrem chemischen Aufbau nach Verbindungen gesucht, die bei einer Wellenlänge von 214nm absorbierten (IV.Tab.1.1). Die Strukturformel der jeweiligen Kontrastmittel enthielt bei allen mindestens eine Peptidbindung (III.Abb.3.1.1 bis Abb.3.1.12). Diese chemische Bindung absorbiert ebenfalls bei der gesuchten Wellenlänge und wird während der Untersuchung mit dem Paragon CZETM2000 für die direkte Quantifizierung der Proteine benutzt. Die Auswahl weiterer Kontrastmittel bezog sich also zum einen auf ihre intravenöse Applikation und zum anderen auf das Vorhandensein einer Peptidbindung in der Strukturformel der Wirkstoffe.

Als weitere Substanzklasse wurden Antibiotika untersucht, deren Auswahl nach den gleichen Kriterien wie bei den Kontrastmitteln stattfand (III.Abb.3.2.1 bis Abb.3.2.20; IV.Tab.1.2).

3. Verdünnungsreihen

Zu Beginn der Versuchsdurchführung wurden die in Lösung gebrachten Medikamente auf ihre Fähigkeit untersucht, eine Störung in der Detektion mit dem Paragon CZE™ 2000 zu hervorzurufen. Die reinen Wirkstoffe wurden mit einem Serumpool vermischt und danach gemessen. Erkannte man nach der Probentrennung, dass ein Wirkstoff eine Störung verursachte, wurde eine Verdünnungsreihe mit der jeweiligen Substanz erstellt.

In den Detektionsergebnissen traten Veränderungen auf, die den anfänglich beschriebenen Effekten entsprachen (IV.Abb.2.4.1 bis Abb.2.5.20). Jedes Medikament erzeugte in seiner spezifischen Fraktion eine Konzentrationserhöhung gegenüber dem ursprünglichen Zustand (IV.Tab.2.1.1 und Tab.2.1.2). Der Verdünnungsgrad des Medikamentes bestimmte das Ausmaß dieser Veränderung. Die Elektropherogramme zeigten jeweils bei geringeren Medikamentenkonzentrationen auch geringere Veränderungen des Kurvenverlaufes, das bedeutet, dass mit steigendem Verdünnungsgrad auch die scheinbar erhöhten Konzentrationen der jeweiligen Plasmaproteinfraktionen abnahmen. Erreichte man aber eine für jedes Medikament individuelle Verdünnungsstufe, war keine Störung mehr zu erkennen. Das bedeutet, dass eine bestimmte minimale Grenzkonzentration erreicht werden muss, um eine Analysestörung zu erzeugen (IV.Tab.2.2.1 und Tab.2.2.2). Diese Ergebnisse konnten sowohl für die Kontrastmittel als auch für die untersuchten Antibiotika ermittelt werden.

Im Vergleich der Grenzkonzentrationen der beiden untersuchten Substanzklassen erkennt man, dass bei den Kontrastmitteln bei niedrigen Konzentrationen Interferenzen während der Detektion auftauchten. Da heißt, dass schon bei kleinsten Mengen ihrer Wirkstoffe Störeffekte hervorgerufen wurden. Insgesamt aber kam es bei dieser Substanzklasse im Vergleich der reinen Untersuchungsproben zu größeren Interferenzen, die jeweils einen höheren Ausschlag der Peaks provozierten.

Die verdünnten Substanzen wurden außerdem ohne Zusatz eines Serumpools bzw. von Proteinen gemessen. Damit erhoffte man sich einen direkten Nachweis der Störungen der Wirkstoffe und vor allem den Beweis, dass die Proteine ungebunden bei der Probentrennung mit den Proteinen mitlaufen. Dieser Versuch brachte jedoch keine

auswertbaren Ergebnisse, da ohne das Vorhandensein von Proteinen das Gerät softwarebedingt keine Analysen aufzeichnet und somit keine korrekte Untersuchung durchführen kann. Eine Änderung dieser Software war aber nicht möglich.

4. Patienten

Um die klinische Relevanz der Versuchsreihe in der Routinediagnostik zu verifizieren, wurden Probenmessungen von Patientenserum mit dem Paragon CZE™2000 durchgeführt. Die Patienten bekamen aus medizinischen Gründen diese Medikamente. Insgesamt entnahm man zwei Proben. Die erste Blutentnahme fand vor Verabreichung der Substanz und die zweite unmittelbar nach intravenöser Applikation des jeweiligen Stoffes statt. Die Ergebnisse, die nach dem Paragon CZE™2000 ermittelt wurden, entsprachen in den meisten Fällen den Ergebnissen aus den „in vitro“ Versuchen. Dabei fiel auf, dass insgesamt die Veränderungen bei Gabe von Kontrastmitteln wieder stärker waren als bei Verabreichung von Antibiotika. Der Grund hierfür liegt in der höheren Konzentration der Kontrastmittel (IV.Tab.2.2.2).

Bei den Antibiotika konnte man allerdings nicht in jedem Fall die erwarteten Störungen finden, da diese Substanzen nicht in genügend hohen Dosen verabreicht wurden, um eine Detektionsstörung auslösen zu können. Die Konzentration der eingesetzten Antibiotika lag zum Teil unterhalb der Konzentrationen, die zu Interferenzen führen (IV.Tab.2.2.2). Das bedeutet, dass diese Medikamente keine Hindernisse in der klinischen Diagnostik mit sich bringen dürften, solange jede Verunreinigung (Blutentnahme während der Infusion oder aus entsprechenden Infusionssystemen) durch die Infusion selbst vermieden wird.

Zu diesen Antibiotika zählen:

Ciprobay 400	RIFA Parenteral 600mg	Tarivid i.v. 200
Fortum 1,0g	Sobelin 300	Tavanic i.v. 500
Mefoxitin 1,0g	Spizef 1,0g	Vancomycin 500
Penicillin	Staphylex 1,0g	Zinazef 1500

5. CZE-spezifische Interferenzen

Um zu überprüfen, ob diese Interferenzen spezifisch für die Untersuchung mit der Methode der Kapillarelektrophorese waren, wurde zeitgleich eine Serum-Proteinelektrophorese auf Celluloseacetatfolien durchgeführt. Die Auswertung der Probentrennung zeigte normale Prozentangaben der einzelnen aufgetrennten Proteinfractionen und wies demzufolge nicht die entsprechenden Störungen wie zuvor bei dem Analysegerät Paragon CZETM2000 auf. Das bedeutet, dass bei dieser Methode die ermittelten Ergebnisse nicht von den anwesenden Substanzen beeinflusst bzw. Fremdstoffe nicht während der Probenanalyse mitberücksichtigt wurden. Grund hierfür ist das Prinzip der Detektion. Sie erfolgt nicht wie bei der kapillarelektrophoretischen Trennung des Paragon CZETM2000 über die Absorption eines Lichtstrahls mit definierter Wellenlänge, sondern läuft über das Sichtbarmachen von Proteinen über Farbstoffe.

Wenn also ein begründeter Verdacht auf Interferenzen einer dieser Substanzen mit der Analysemethode der Kapillarelektrophorese besteht, können jeweils die Serumproben zusätzlich mit einer der herkömmlichen Verfahren auf Trägermaterialien untersucht werden. Auf diesem Weg erhält man zwei von einander unabhängige Ergebnisse von derselben Serumprobe. Weisen die Resultate der herkömmlichen Messmethode keine pathologischen Befunde auf, kann man auf diesem Weg ein aussagekräftiges Vergleichsergebnis erhalten. Diese Zweituntersuchung kann somit die falsche Diagnosestellung abwenden.

6. Proteinbindung

Die nächste Frage ist, ob die Wirkstoffe der Medikamente ungebunden vorliegen bzw. frei neben den aufgetrennten Proteinfractionen mitlaufen oder ob sie sich eventuell an bestimmte Serumproteine anlagern. Die zugeführten Medikamente werden dann als Teil der Proteine zu den aufgetrennten Proteinfractionen mitgezählt.

Um herauszufinden, ob die Substanzen z.B. an Albumin gebunden vorkommen, wurden die unverdünnten Medikamentlösungen zunächst mit einem Albumingemisch versetzt.

Die Messungen mit dem Paragon CZETM2000 ließen zwei Peaks erkennen (IV.Abb.5.1.1 bis Abb.5.3.20). Der eine Peak entsprach dem Albumin, der andere Peak konnte der Fraktion, in der das jeweilige Medikament eine Störung verursacht, zugeordnet werden. Da die störenden Peaks bei Anwesenheit eines reinen Albumingemisches den am Anfang determinierten Fraktionen der jeweiligen Wirkstoffe entsprachen, kann man weiterhin sagen, dass sich diese Fremdstoffe zumindest nicht an andere Proteine im Serum anlagern.

Durch den Filtrationsversuch kann man einen weiteren Hinweis auf das ungebundene Vorliegen der Störelemente erhalten (IV.Abb.4.1.1 bis Abb.4.6.2). Die Protein-Medikament-Proben wurden durch einen Filter mit geeigneter Membran filtriert. Die anschließende Messung sollte zu erkennen geben, ob die Substanzen sich von der Serum-Proteinlösung trennen lassen oder ob das Filtrat abermals entsprechende Störungseffekte provoziert. Aus der Auswertung der Elektropherogramme kann geschlossen werden, dass die Substanzen eher frei im Serum vorliegen, da die Ergebnisse deutliche Verringerungen der Peakverläufe und zum Teil vollständig aus dem Serum eliminierte Fremdstoffe aufwiesen.

7. Problematik

Die Interferenzen bestimmter Substanzen wurden schon in der Vergangenheit erkannt^{46,47}. Vor kurzem wurde das Antibiotikum Tazocin® als weiteres Medikament, das zu einem zusätzlichen Peak im Bereich der β -Globulin-Fraktion führt, identifiziert⁸¹. Zu beachten ist, dass die Störungen der untersuchten Antibiotika und Kontrastmittel nur durch überschreiten einer bestimmten minimalen Konzentration verursacht werden. In Situationen, bei denen Serumproben während oder unmittelbar nach intravenöser Applikation der Substanzen entnommen wurden, sollten keine kapillarelektrophoretischen Untersuchungen am Analysegerät Paragon CZETM2000 stattfinden. Durch die hohen Konzentrationen, die vor allem direkt nach dem Durchlauf der Infusion herrschen, werden die ermittelten Grenzwerte in vielen Fällen überschritten. Bei Nichtbeachten dieser Problematik in der Routinediagnostik, können

falsche diagnostische Auswertungen der Elektropherogramme erfolgen und somit über falsche Befunde zu falsch eingeleiteten Therapien führen.

Für den Klinikalltag ist ebenfalls zu beachten, dass bei zwölf von den zwanzig untersuchten Antibiotika keine Störung der Elektropherogramme zu erwarten ist. Vergleicht man die maximal mögliche Konzentration, die die Medikamente im therapeutischen Einsatzbereich erreichen können, so liegt sie unter der minimalen Konzentration, die erforderlich ist, um eine Interferenz zu bewirken. Die Konzentration dieser Medikamente bleibt aus zwei Gründen im Plasma gering. Zum einen werden in der Therapie dieser Antibiotika keine zu hohen Dosen benötigt, um in therapeutische Bereiche zu gelangen. Zum anderen besitzen diese Substanzen kurze Eliminations-Halbwertszeiten, so dass sie kurze Zeit nach ihrer Applikation aus dem Plasma eliminiert werden.

Im Gegensatz dazu erreichen die Kontrastmittel nach intravenöser Applikation insgesamt viel höhere Serumkonzentrationen als die Antibiotika. Das bedeutet, dass nach deren Gabe die Störungen in den Ergebnissen extremer ausfallen. Da ihre vollständige Elimination aus dem Serum insgesamt länger dauert, bleiben diese Störungen längere Zeit bestehen. Aus diesem Grund sollte man bei der Anwendung dieser Substanzklasse eine gewisse Zeitspanne nach der Applikation abwarten, bevor eine Blutentnahme zur Messung der Serumproteinkonzentrationen stattfindet.

Mit der Filtration der Serumproben wurde getestet, ob sich die störenden Substanzen aus dem Serum eliminieren lassen. Da das Filtrat danach nahezu vollständig fremdstofffrei ist, können bei anschließenden kapillarelektrophoretischen Untersuchungen mit geringerer Wahrscheinlichkeit störende Peaks auftreten. So könnte man bei Routineuntersuchungen von Serumproben, die Interferenzen bei der Elektrophorese aufweisen, zunächst eine Filtration der jeweiligen Serumprobe anschließen. Wenn sich die Ergebnisse nach dieser Filtration unterscheiden, kann in den meisten Fällen davon ausgegangen werden, dass es sich um eine durch das Medikament verursachte Störung gehandelt hat.

VI. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das automatische Kapillarelektrophoresesystem Paragon CZETM2000 (Beckman) auf Interferenzen getestet, die durch Kontrastmittel und Antibiotika bei der Analyse von Serumproteinen auftraten.

Die CZE, als neue Generation der Kapillarelektrophoresen, stellt eine schnelle und effektive Trennmethode von Serumproteinen dar. Dieses System bietet sich als eine gute Alternative zur herkömmlichen Serumelektrophorese auf Celluloseacetatfolien an. Die Vorteile liegen in der verbesserten Präzision der Proteintrennung und in kürzeren Analysezeiten.

In die Untersuchung wurden Medikamente eingebunden, die intravenös appliziert werden, und nach Applikation in hoher Konzentration im Blutserum auftreten. Außerdem müssen die Wirkstoffe in ihrem chemischen Aufbau Peptidbindungen enthalten, die eine Detektionsstörung verursachen können. Die Quantifizierung der aufgetrennten Proteinfractionen erfolgt bei diesem Analysegerät durch UV-Detektion mit einer Wellenlänge von 214nm, das von den Peptidbindungen in den Proteinen absorbiert wird. Wenn die Wirkstoffe den gleichen chemischen Aufbau wie die zu analysierenden Proteine aufweisen, werden diese in die Detektion integriert. Um eine geeignete Auswahl der Substanzen zu treffen, wurden zunächst UV-Spektren verschiedener Medikamente ermittelt und nur diejenigen evaluiert, die ebenfalls bei dieser Wellenlänge absorbieren.

Danach wurden aus den ausgesuchten Substanzklassen Verdünnungsreihen erstellt. Die verdünnten Proben wurden mit einem pathologisch unauffälligen Serumpool vermischt und anschließend mit dem Paragon CZETM2000 gemessen. Aus den Ergebnissen dieser Versuchsreihe erkannte man die minimalen Grenzkonzentrationen, ab welcher die Interferenzen auftraten. Zusätzlich konnten die Fraktionen erkannt werden, in denen die jeweiligen Proben eine Störung provozierten, indem sie im Kurvenverlauf der Elektropherogramme zusätzliche Peaks hervorriefen.

Im Vergleich der beiden untersuchten Substanzklassen stellte man fest, dass die Kontrastmittel schon bei geringeren Konzentrationen eine Störung initiierten als die untersuchten Antibiotika und dass sie in ihren diagnostisch eingesetzten Dosen hohe Peaks hervorbrachten. Von wichtiger Bedeutung ist, dass bei einigen Antibiotika die minimalen Grenzkonzentrationen nicht immer die therapeutisch genutzten Konzentrationen überschreiten, um relevante Störungen hervorbringen zu können. Um diese Resultate zu verifizieren, wurden zusätzlich Patientenserum untersucht. Die Probenentnahme geschah einmal vor und einmal nach intravenöser Applikation einer der in dieser Arbeit untersuchten Substanzen. Die Elektropherogramme zeigten entsprechende Resultate wie in den „in vitro“ durchgeführten Versuchen.

Die Frage, ob die Substanzen an Proteinen bzw. an Albumin gebunden vorkommen, kann verneint werden. Die Auswertungen der Untersuchungsdurchläufe von Substanz-Albumin-Gemischen zeigten, dass die Fremdstoffe separat vom Albumin erfasst wurden und dass sie sonst auch an keine anderen Proteine gebunden vorliegen.

Da nur unmittelbar nach intravenöser Gabe dieser Substanzen im Serum Höchstkonzentrationen erreicht werden, sollte in der Routinediagnostik besondere Aufmerksamkeit herrschen. Es sollte beachtet werden, dass keine Serumproben mit dem Paragon CZETM2000 untersucht werden, wenn diese in dem Zeitraum während oder kurz nach intravenöser Applikation der Medikamente entnommen wurden.

Durch eine vorangehende Filtration, kann man allerdings versuchen die Serumproben von den applizierten Substanzen zu befreien und so die Störungen deutlich zu minimieren bzw. vollständig zu eliminieren. Auf diese Weise können mögliche Interferenzen, verursacht durch Kontrastmittel und Antibiotika, bei der Analyse mit dem Paragon CZETM2000 verhindert werden.

VII. Literaturverzeichnis

- 1 Wagner, H., Kuhn, R., Hoffstetter S. (1989)
Theorie der elektrophoretischen Wanderung, 1-19
in: Wagner H., Blasius E.: Praxis der elektrophoretischen Trennmethode
1. Aufl., Springer Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo
- 2 Hallman L. (1980)
Quantitative und spezielle Untersuchungsverfahren, 599-695
in: Hallman L.: Klinische Chemie und Mikroskopie
11. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- 3 Vámos L., (1972)
Theoretische Grundlagen der Papierelektrophorese, 19-39
in: Vámos L.: Elektrophorese auf Papier und anderen Trägern
1. Aufl., Akademie-Verlag, Berlin, Budapest
- 4 Kleinert T. (1990)
Die Elektrophorese, eine Methode der modernen Proteinanalytik, 11-30
in: Kleinert T.: Elektrophoretische Methoden in der Proteinanalytik
1. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- 5 Ewerbeck H., (1957)
Zur Physiologie des Eiweißes, 39-57
in: Antweiler H.J.: Die Quantitative Elektrophorese in der Medizin
2. Aufl., Springer Berlin, Göttingen, Heidelberg
- 6 Gressner A.M., Thomas L. (1994)
Proteinstoffwechsel, 194-246
in: Greiling H., Gressner A.M.: Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie
3. Aufl., Schattauer Stuttgart, New York
- 7 Thomas L. (1992)
Serumeiweiß-Elektrophorese, 758-770
in: Thomas L.: Labor und Diagnose
4. Aufl., Die Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg
- 8 Cooper M.D., Lawton A.R. III. (1995)
Primäre Immundefekte, 1824-1832
in: Isselbacher K.J., Braunwald E., Wilson J.D., Martin J.B., Fauci A.S., Kasper D.L.:
Harrisons Innere Medizin 2
*13. Aufl., Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin, Wien, Oxford, Edinburgh, Boston, London,
Melbourne, Paris, Yokohama*
- 9 Berger I. (1980)
Spezielle elektrophoretische Trennmethode, 22-90
in: Ohlenschläger G., Berger I., Depner W.: Synopsis der Elektrophoresetechniken
1. Aufl., G-I-T Verlag Ernst Giebeler Darmstadt
- 10 Maier K.- H., Voggel K. (1962)
Ein neues Trägermaterial für die elektrophoretische Auftrennung
Z. anal. Chem. 186, 257-264
- 11 Chin H.P. (1970)
Cellulose acetate electrophoresis, 1-54
1. Aufl., Ann Arbor-Humphrey science publ. Inc., London

- 12 Kohn J. (1964)
Zur Technik der Celluloseacetat-Elektrophorese, 233-248
Ärztl. Lab. 10
- 13 Kohn J. (1971)
Zur Technik der Cellulose Acetat Elektrophorese, 1221
GIT 15
- 14 Westermeier R. (1990)
Elektrophorese, 5-33
in: Westermeier R.: Elektrophorese-Praktikum
1. Aufl., VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge
- 15 Miller J.N., Newton A.H., Burns D.T. (1971)
Cellulose acetate electrophoresis: The use of discontinuous buffer systems for protein separations, 427-433
Clin. Chim. Acta 31
- 16 Thomas L. (1981)
Grundlagen und Technik der Eiweiß-Elektrophorese auf Celluloseacetatfolie, 1-64
in: Thomas L.: Eiweiß-Elektrophorese
1. Aufl., Urban & Schwarzenberg München, Wien, Baltimore
- 17 Busse V. (1968)
Papierchromatographische Untersuchungen von zur Anfärbung von Elektropherogrammen benutzten Farbstoffen I. Mitteilung zur Methodik der Serumelektrophorese, 273-277
Z- klin-Chem-klin-Biochem. 6
- 18 Scheiffarth F., Berg G., Götz H. (1962)
Papierlektrophorese in Klinik und Praxis
1. Aufl., Urban & Schwarzenberg München, Berlin
- 19 Schmidtmann W., Kaempffer R., Reschke L. (1969)
Celluloseacetatfolien-Elektrophorese bei Auswertung mit einem elektronischen Scanner, 165-174
Ärztl. Lab. 15
- 20 Büchner M. (1958)
Moderne chemische Methoden in der Klinik: unter Berücksichtigung physikalisch- chemischer Analysenverfahren, 141
1. Aufl., VEB-Verlag Georg Thieme Leipzig
- 21 Engelhardt H., Beck W., Schmitt T. (1994)
Grundlagen der Kapillarelektrophorese, 3-6
in: Engelhardt H., Beck W., Schmitt T.: Kapillarelektrophorese
1. Aufl., Verlag Vieweg
- 22 Böcker J. (1997)
Kapillarelektrophorese, 357-400
in: Böcker J.: Chromatographie
1. Aufl., Vogel Buchverlag Würzburg
- 23 Prausnitz P.H., Reitsötter J. (1931)
Elektrosmose, 61-112
in: Liesegang R.ED.: Elektrophorese, Elektrosmose, Elektrodialyse
1. Aufl., Verlag von Theodor Steinkopff Dresden, Leipzig

- 24 Huang X., Luckey J.A., Gordon M.J., Zare R.N. (1989)
Quantitative Analysis of Low Molecular Weight Carboxylic Acids by Capillary Zone Electrophoresis/
Conductivity Detection
Anal. Chem. 61/7, 766-770
- 25 Wehr T., Rodriguez- Diaz R. Zhu M. (1999)
Capillary Zone Elektrophoresis, 51-129
in: Wehr T., Rodríguez- Díaz R. Zhu M.: Capillary Electrophoresis of Proteins
Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hong Kong
- 26 Baker D.R. (1995)
Development of Capillary electrophoresis, 1-7
in: Baker D.R.: Capillary electrophoresis
1. Aufl., John Wiley & Sons, Inc. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore
- 27 Weinberger R. (2000)
Capillary Zone Electrophoresis: Basic Concepts, 25-71
in: Weinberger R.: Practical Capillary Electrophoresis
2. Aufl., Academic Press San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo
- 28 Kim J.W., Park J.H., Park J.W., Doh H.J., Heo G.S., Lee K.-J. (1993)
Quantitative Analysis of Serum Proteins Separated by Capillary Elektrophoresis
Clin. Chem. 39/4, 689-692
- 29 Landers J.P. (1995)
Clinical capillary electrophoresis
Clin. Chem. 41/4, 495-509
- 30 Gordon M.J., Huang X., Pentoney S.L. JR., Zare R.N. (1988)
Capillary Electrophoresis
Science 242, 224-228
- 31 Smith A. J (1997)
Analytical and Micropreparative Capillary Electrophoresis of Peptides, 91-99
in: Smith B.J.: Protein Sequencing Protocols
1. Aufl., Humana Press Totowa, New Jersey
- 32 Cunat- Walter M.- A. (1995)
Anwendung der Kapillarelektrophorese in der biochemischen Analytik
Diagnostik Digest, Beckman, 20-22
- 33 Perrett D. (1999)
Capillary electrophoresis in clinical chemistry
Ann Clin. Biochem. 36, 133-150
- 34 Engelhardt H., Beck W., Schmitt T. (1994)
Kapillarzonenelektrophorese von Proteinen, 98-117
in: Engelhardt H., Beck W., Schmitt T.: Kapillarelektrophorese
1. Aufl., Verlag Vieweg
- 35 Ewing A.G., Wallingford R.A., Olefirowicz T.M. (1989)
Capillary Electrophoresis
Analytical Chemistry, 61/4, 292A-303A
- 36 Bossuyt X., Schiettekatte G., Bogaerts A., Blanckaert N. (1998)
Serum protein electrophoresis by CZE 2000 clinical capillary electrophoresis system
Clin.Chem. 44/4, 749-759

- 37 Demel U., Tilz G.P., Artner- Dworzak E., Fuchs D. (1997)
A new micromethod in medicine: capillary electrophoresis
Wien Med Wochenschr. 147/14, 336-338
- 38 Chen F.T. A., Liu C.M., Hsieh Y.Z., Sternberg J.C. (1991)
Capillary Electrophoresis- a New Clinical Tool
Clin. Chem. 37/1, 14-19
- 39 Habermann J. (1997)
Der Einsatz der Kapillarelektrophorese in Krankenhauslaboratorien
Diagnostik Digest, Beckman, 3-6
- 40 Guzman N.A., Hernandez L., Hoebel B.G. (1989)
Capillary Electrophoresis: A New Era in Microseparations
BioPharm, 22-36
- 41 Bienvenue J., Graziani M.S., Arpin F., Bernon H., Blessum C., Marchetti C., Righetti G., Somenzini M., Verga G., Aguzzi F. (1998)
Multicenter evaluation of the Paragon CZE™ 2000 capillary zone electrophoresis system for serum protein electrophoresis and monoclonal component typing
Clin.Chem. 44/3, 599-605
- 42 Bossuyt X., Bogaerts A., Schiettekatte G., Blanckaert N. (1998)
Serum protein electrophoresis and immunofixation by a semiautomated electrophoresis system
Clin.Chem. 44/5, 944-949
- 43 Bossuyt X., Marien G. (2001)
False-Negative Results in Detection of Monoclonal Proteins by Capillary Zone Electrophoresis: A Prospective Study
Clin.Chem. 47/8, 1477-1479
- 44 Claeys R., Groven C., Gorus F.K. (2001)
Capillary Zone Electrophoresis of Proteins in Body Fluids: Comparison of Capillary and Agarose Gel Electrophoresis
Clin.Chem. 47/5, 967-970
- 45 Blessum C.R., Khatter N., Alter S.C. (1999)
Technique to Remove Interference Caused by Radio- Opaque Agents in Clinical Capillary Zone Electrophoresis
Clin.Chem. 45/8, 1313
- 46 Bossuyt X., Mewis A., Blanckaert N. (1999)
Interference of Radio-opaque Agents in Clinical Capillary Zone Electrophoresis
Clin.Chem. 45/1, 129-131
- 47 Arranz- Peña M.L., González- Sagrado M., Olmos- Linares A.M., Fernández- García N., Martín- Gil F.J. (2000)
Interference of Iodinated Contrast Media in Serum Capillary Zone Electrophoresis
Clin.Chem. 46/5, 736-737
- 48 Fachinformation (2001)
Mallinckrodt Medical GmbH
Conray 30, 60

- 49 Fachinformation (1996)
Byk Gulden
Imeron
6965- 0942-- Imeron
- 50 Fachinformation (1998)
Schering Deutschland GmbH
Isovist
2409- r830-- Isovist
- 51 Fachinformation (1998)
Schering Deutschland GmbH
Magnevist
2374- r769-- Magnevist
- 52 Fachinformation (1999)
Byk Gulden
Multihance
362- R691-- Multihance
- 53 Fachinformation (1998)
Schering Deutschland GmbH
Omnipaque
2739- r819-- Omnipaque
- 54 Fachinformation (2001)
Tyco Healthcare Deutschland GmbH
Optiray 160/ 240/ 300/ 320/ 350
- 55 Fachinformation (1999)
Dr. Franz Köhler GmbH
Peritrast- 300/ 60%
- 56 Fachinformation (1997)
Byk Gulden
Solutrast
1919- 0665-- Solutrast
- 57 Fachinformation (2000)
Guerbet
Telebrix Gastro
2040- R983-- Telebrix Gastro
- 58 Fachinformation (1998)
Schering Deutschland GmbH
Ultravist
2744- r819 (9712)-- Ultravist
- 59 Fachinformation (1997)
Schering Deutschland GmbH
Urografin
5506- q727 (9804)-- Urografin
- 60 Fachinformation (1996)
Bayer Vital GmbH
Baypen
0222- p638-- Baypen

- 61 Fachinformation (1996)
Bayer Vital GmbH
Ciprobay
0394- 0979-- Ciprobay
- 62 Fachinformation (1998)
Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH
Claforan
0403- q932-- Claforan
- 63 Fachinformation (1996)
Heumann Pharma GmbH
Erythromycin Heumann
0542- p685-- Erythromycin Heumann
- 64 Fachinformation (1998)
Glaxo Wellcome GmbH
Fortum
0877- q749-- Fortum
- 65 Fachinformation (1994)
MSD Sharp & Dohme GmbH
Mefoxitin
1313- r740-- Mefoxitin
- 66 Fachinformation (1999)
Ratiopharm GmbH
Metronidazol- Ratiopharm
6574- r797-- Metronidazol- Ratiopharm
- 67 Forth W., Henschler D., Rummel W., Starke K. (1996)
Antibiotika und Chemotherapeutika, 677-787
in: Forth W., Henschler D., Rummel W., Starke K.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und
Toxikologie
7. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford
- 68 Fachinformation (1999)
Grünenthal GmbH
Penicillin „Grünenthal“
1639- r864-- Penicillin Grünenthal
- 69 Fachinformation (1995)
Lederle Arzneimittel GmbH
Pipril
3036- p869-- Pipril
- 70 Fachinformation (1999)
Merck KGaA
Refobacin 120 mg/ 80mg/ 40mg/ 10mg
1782- r796-- Refobacin 120/ 80/ 40/ 10
- 71 Fachinformation (1994)
Grünenthal GmbH
RIFA
1822- m960-- RIFA

- 72 Fachinformation (1999)
Hoffmann- La- Roche AG
Rocephin
1834- r768-- Rocephin
- 73 Fachinformation (1996)
Pharmacia & Upjohn GmbH
Sobelin 75/ 150/ 300
2595- p632-- Sobelin 75/ 150/ 300
- 74 Fachinformation (1996)
Takeda Pharma GmbH
Spizef
1947- 0916-- Spizef
- 75 Fachinformation (1999)
SmithKline Beechcham GmbH
Staphylex
1956- r907-- Staphylex
- 76 Fachinformation (1998)
Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH
Tarivid i.v. 100/ 200/ 400
5537- q960-- Tarivid i.v. 100/ 200/ 400
- 77 Fachinformation (1998)
Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH
Tavanic i.v. 500mg
2261- Q740-- Tavanic i.v.
- 78 Fachinformation (1998)
Lilly Deutschland GmbH
Vancomycin CP Lilly
2226- q907-- Vancomycin CP Lilly
- 79 Fachinformation (1999)
Pfizer GmbH
Vibravenös SF
9V8- 1026VV- AP- 0- F
- 80 Fachinformation (1998)
Glaxo Wellcome GmbH
Zinazef
2326- r655-- Zinazef
- 81 Bossuyt X, Peetermans W.E. (2002)
Effect of Piperacillin- Tazobactam on Clinical Capillary Zone Electrophoresis of Serum Proteins
Clin.Chem. 48/1, 204-205

VIII. Anhang

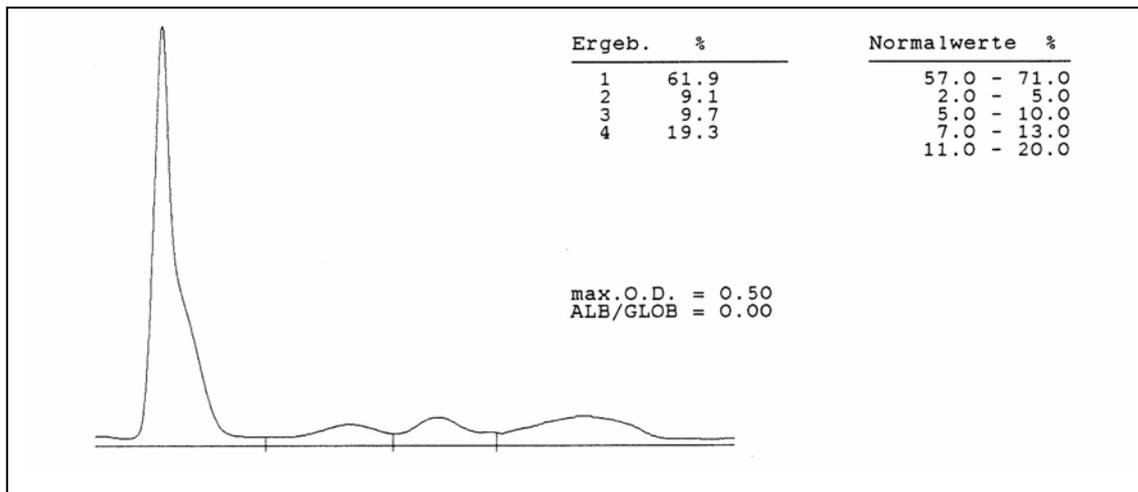
1. Untersuchung auf Celluloseacetatfolien1.1. Kontrastmittel

Abb. 1.1.1 Conray 60

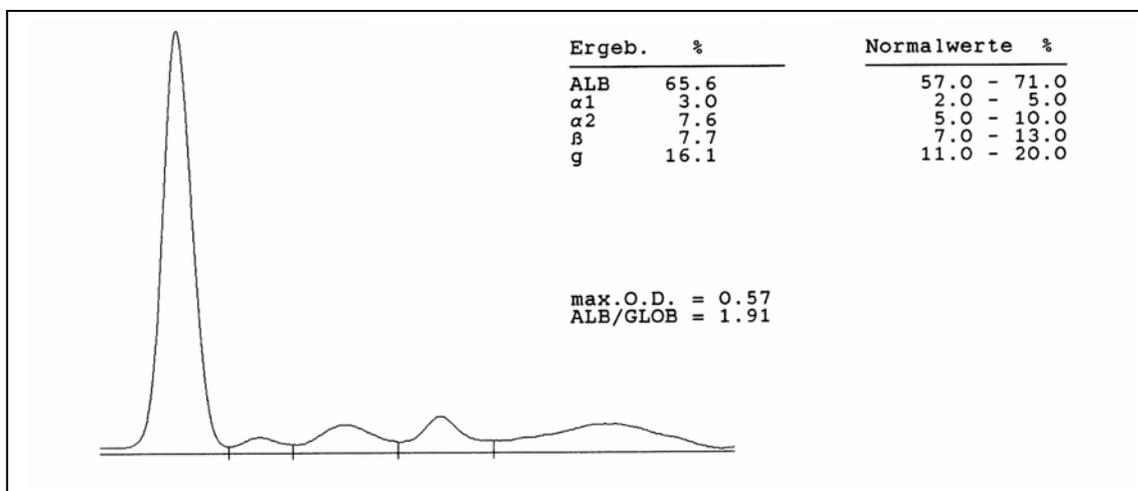


Abb. 1.1.2 Imeron 300

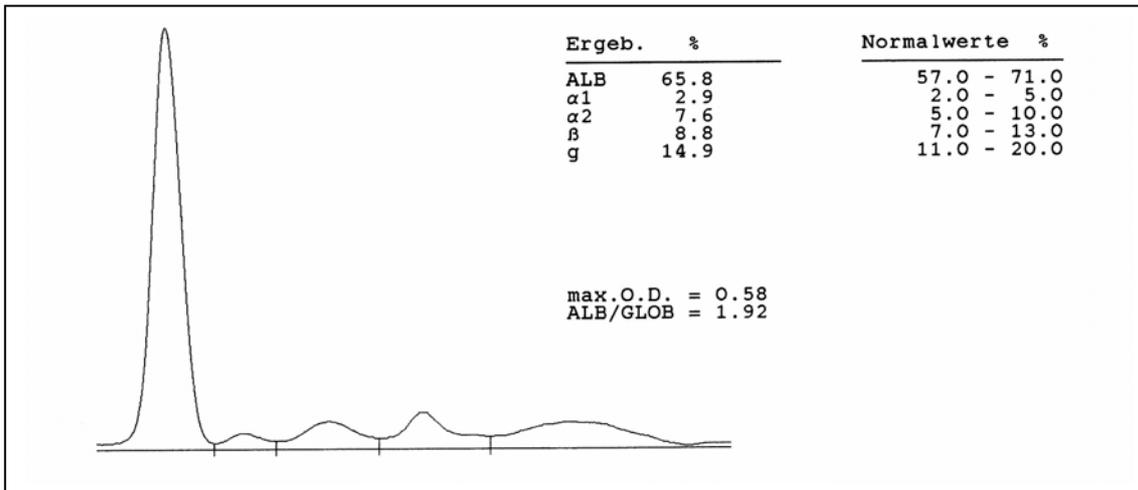


Abb. 1.1.3 Isovist 300

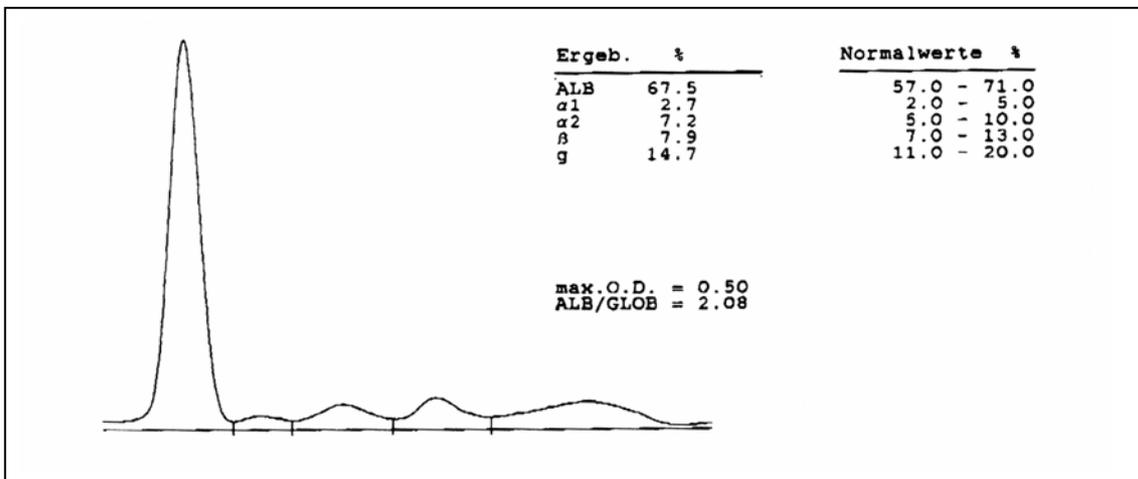


Abb. 1.1.4 Magnevist

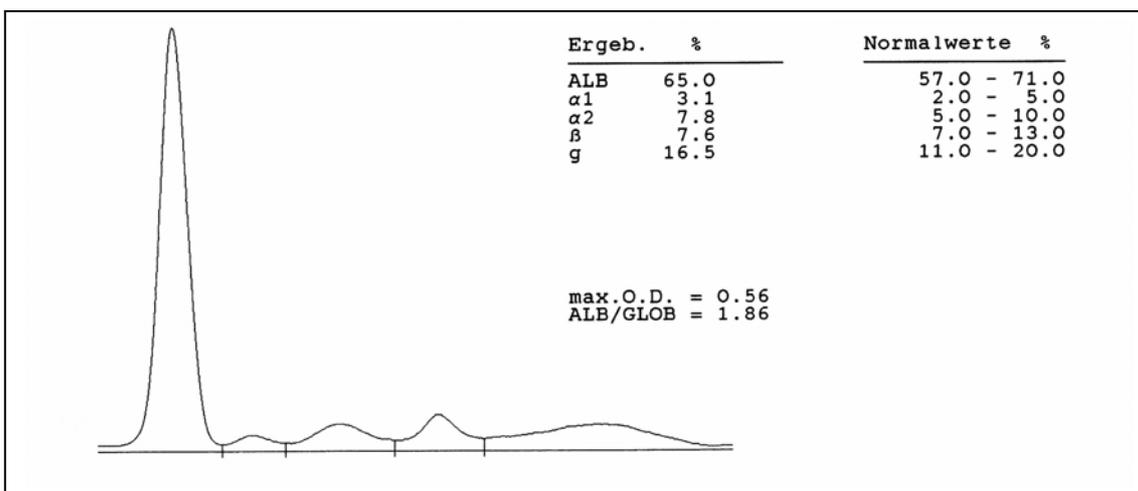


Abb. 1.1.5 Omnipaque 350

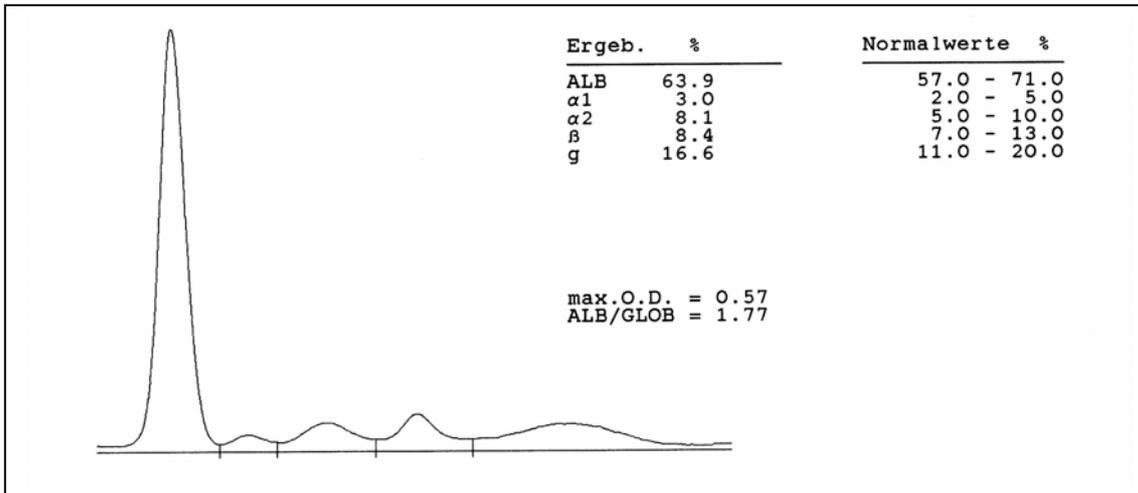


Abb. 1.1.6 Optiray 300

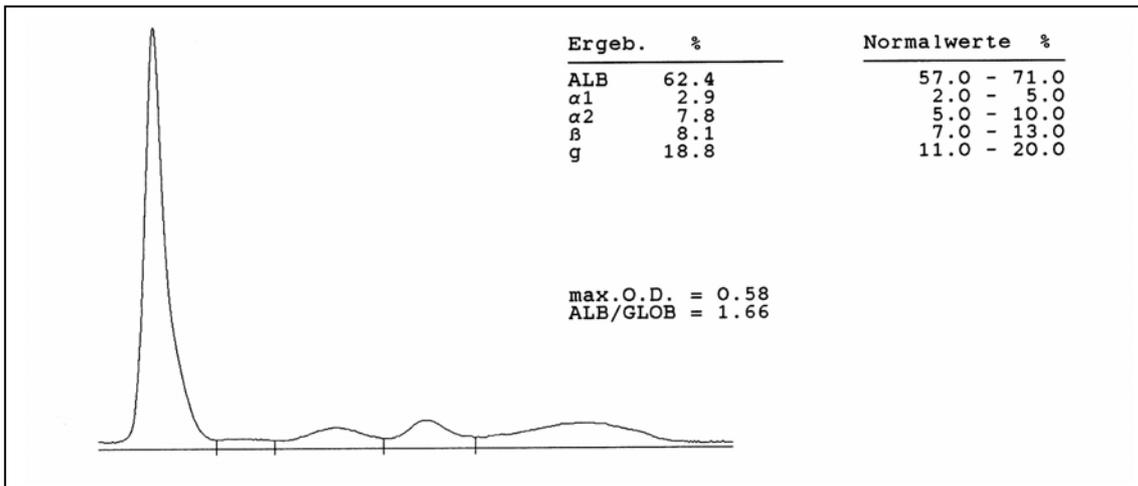


Abb. 1.1.7 Peritrast

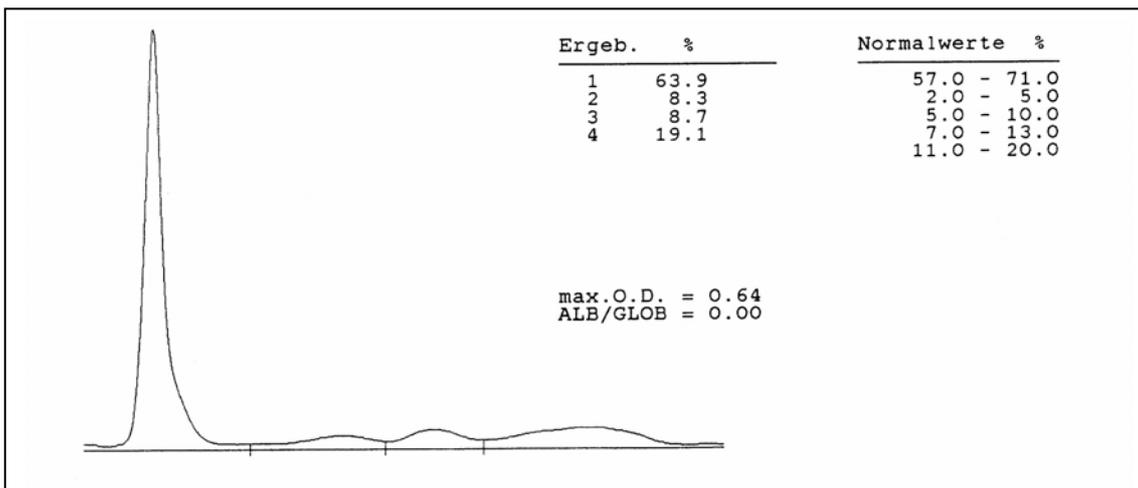


Abb. 1.1.8 Telebrix Gastro

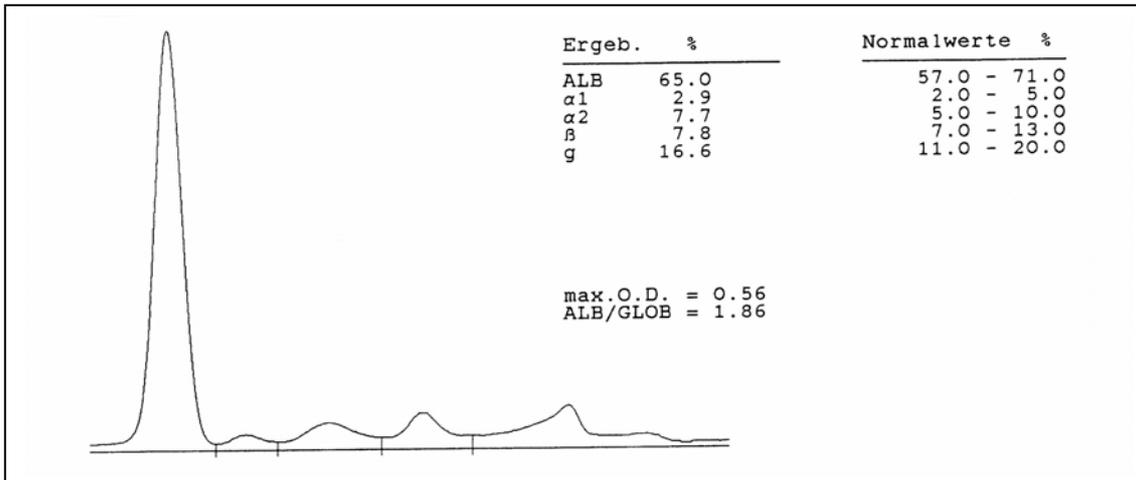


Abb. 1.1.9 Ultravist 300

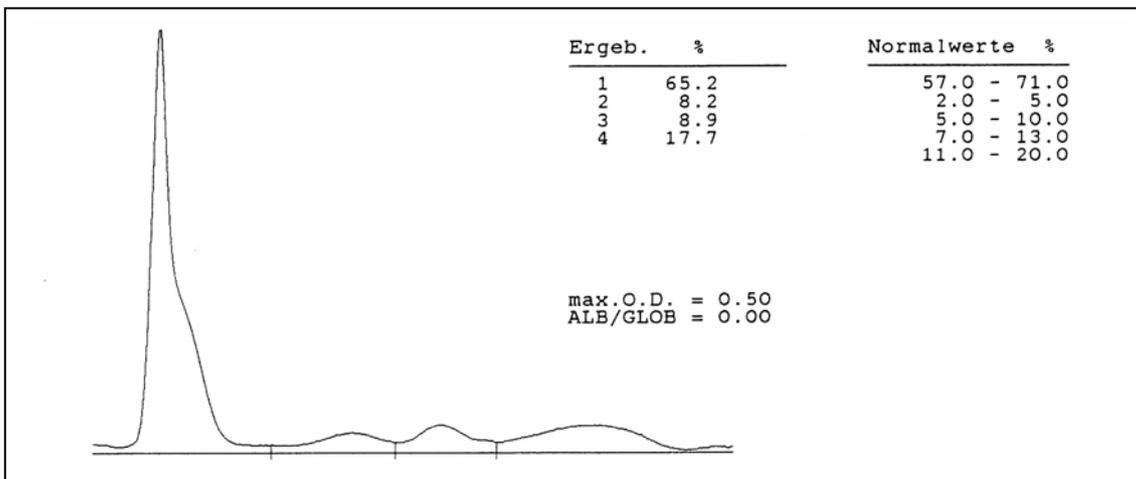


Abb. 1.1.10 Urografin 76%

1.2. Antibiotika

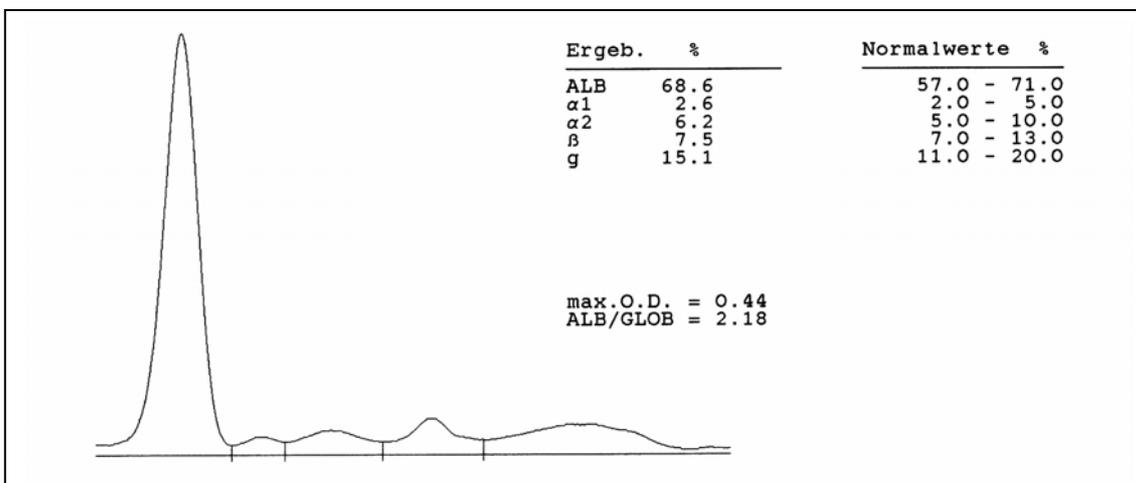


Abb. 1.2.1 Baypen 4g

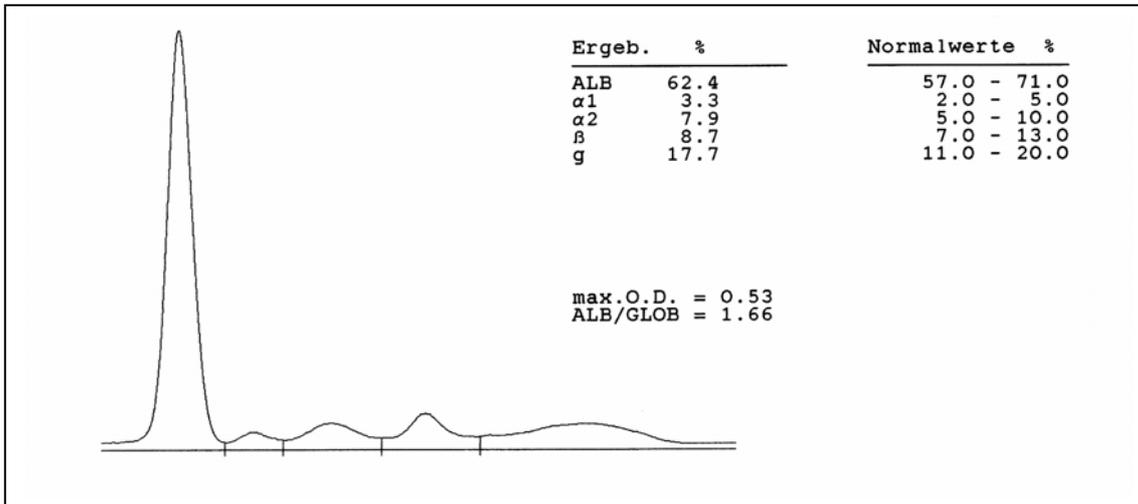


Abb. 1.2.2 Ciprobay 400

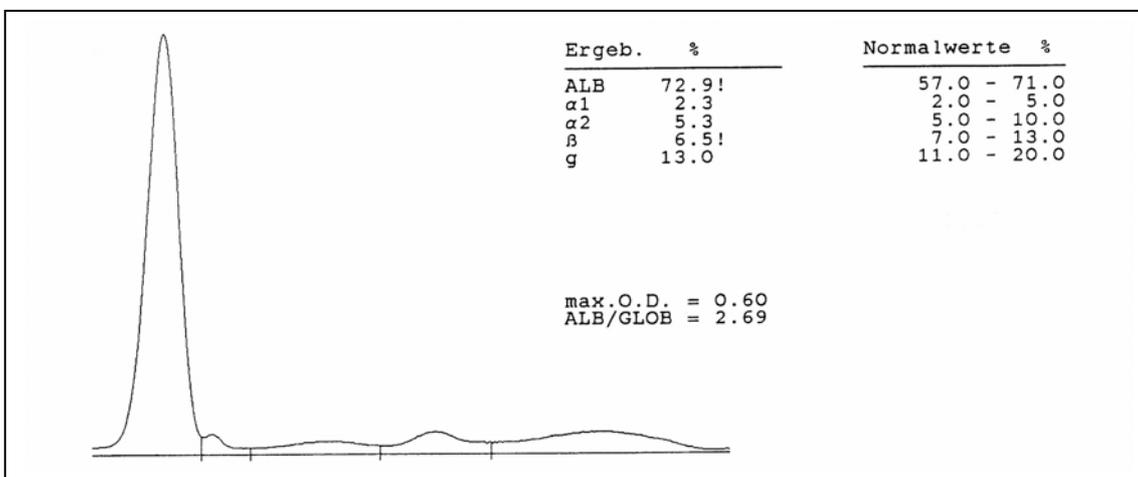


Abb. 1.2.3 Claforan 2,0g

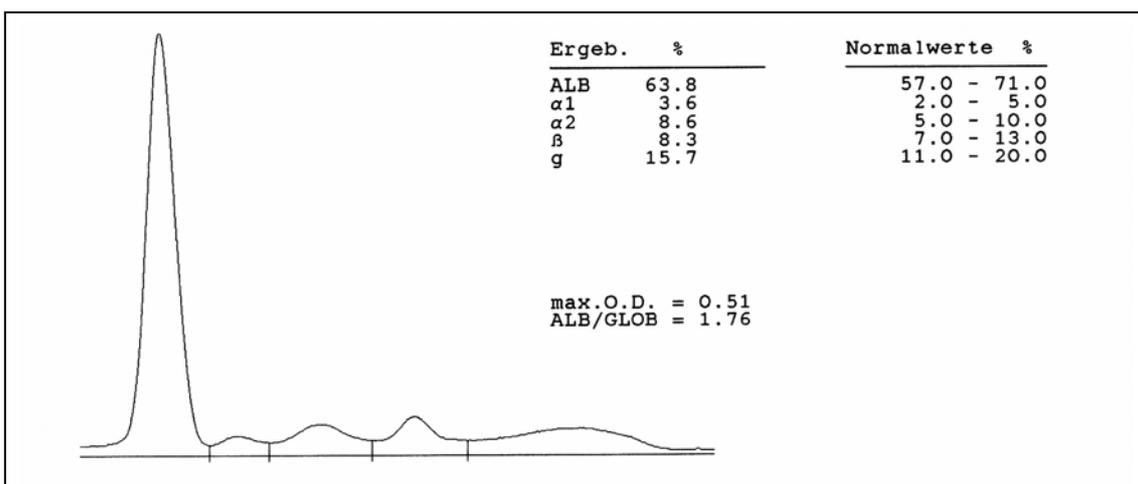


Abb. 1.2.4 Erythrocin i.v. 0,5g

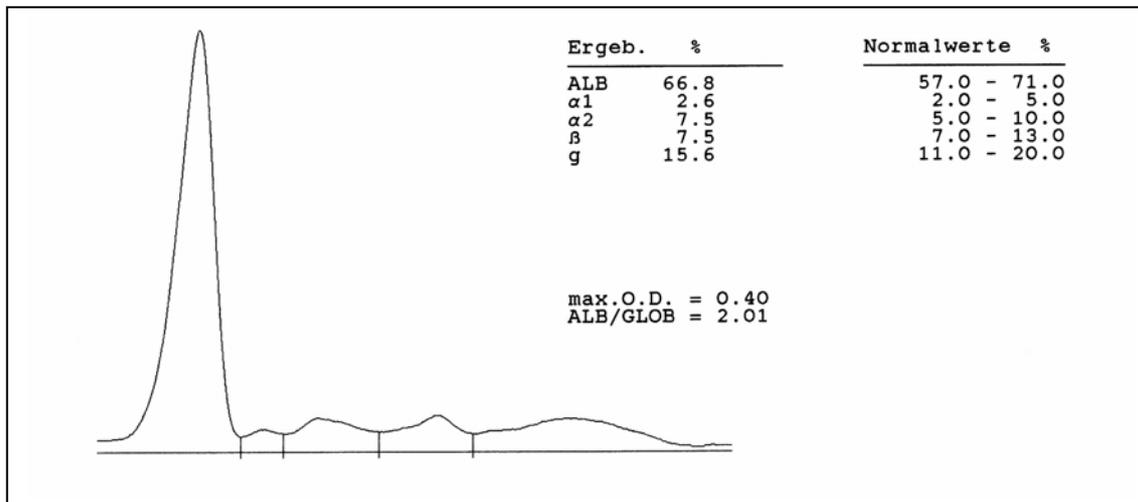


Abb. 1.2.5 Fortum 1,0g

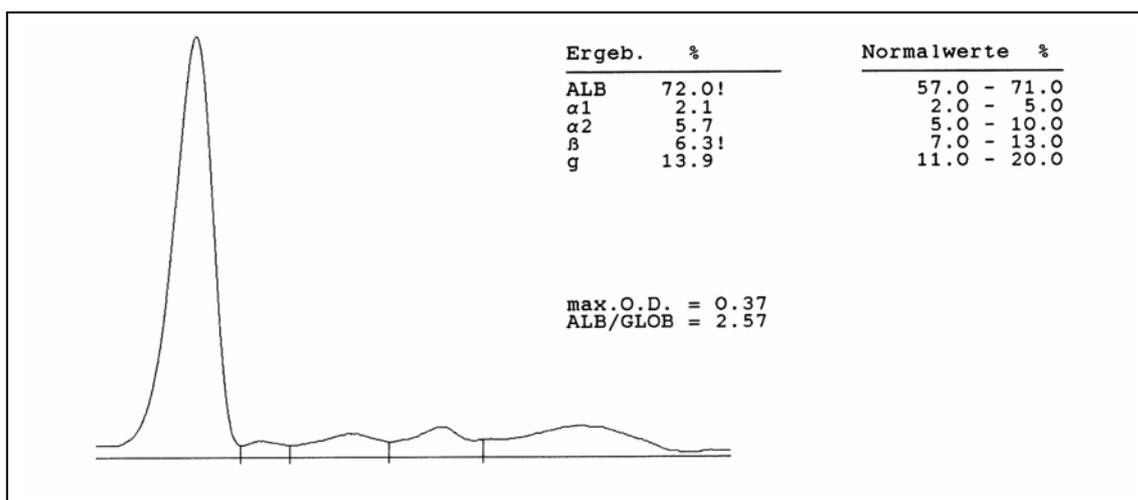


Abb. 1.2.6 Mefoxitin 1,0g

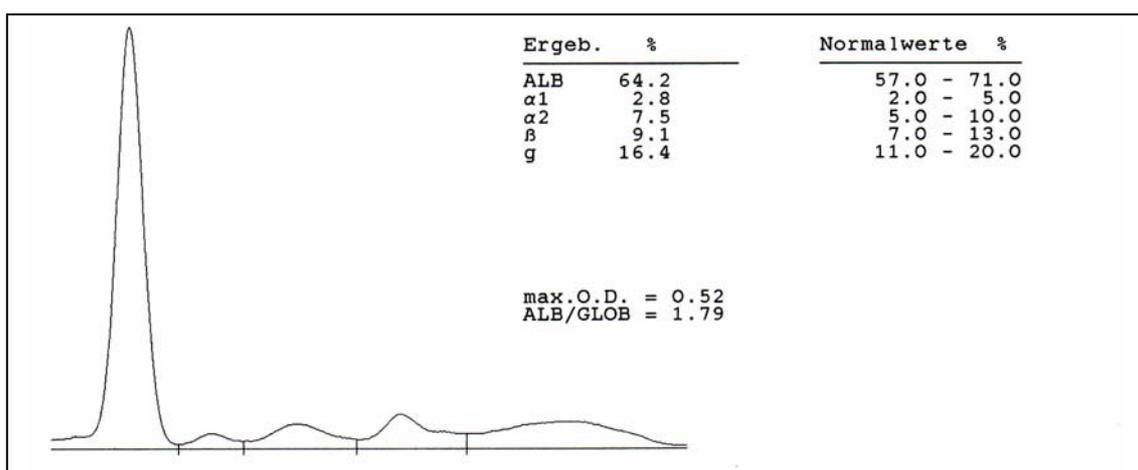


Abb. 1.2.7 Metronidazol Ratiopharm

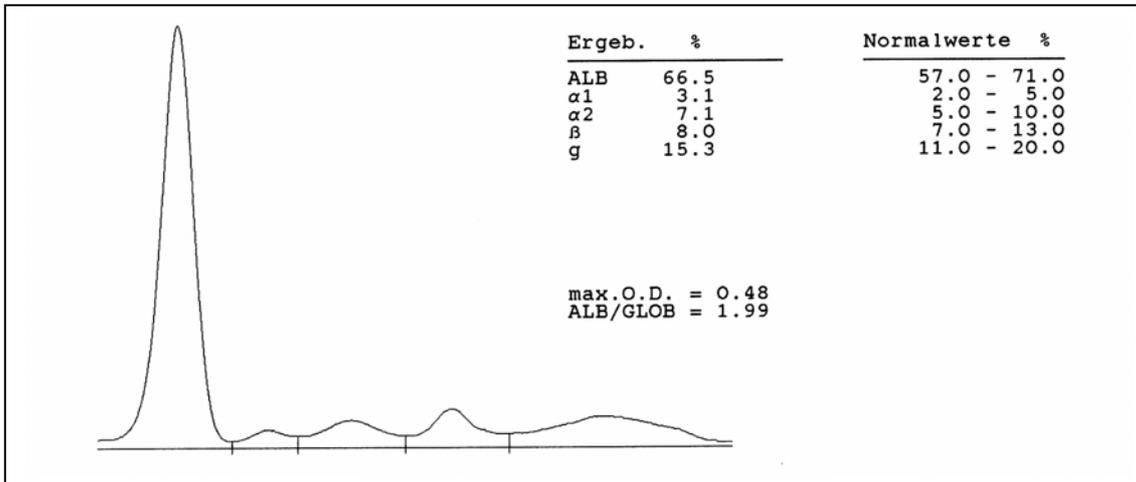


Abb. 1.2.8 Penicillin

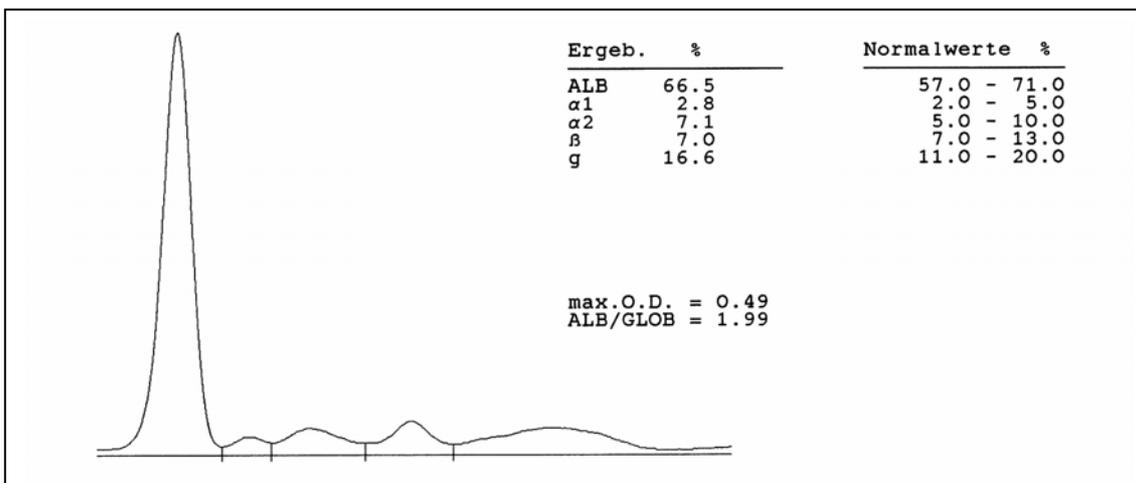


Abb. 1.2.9 Pipril 4g

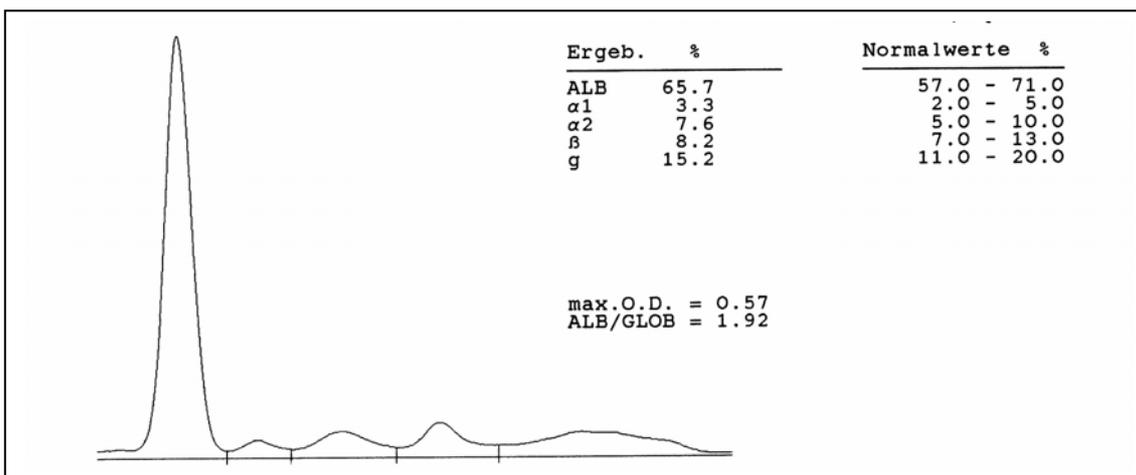


Abb. 1.2.10 Refobacin 80mg

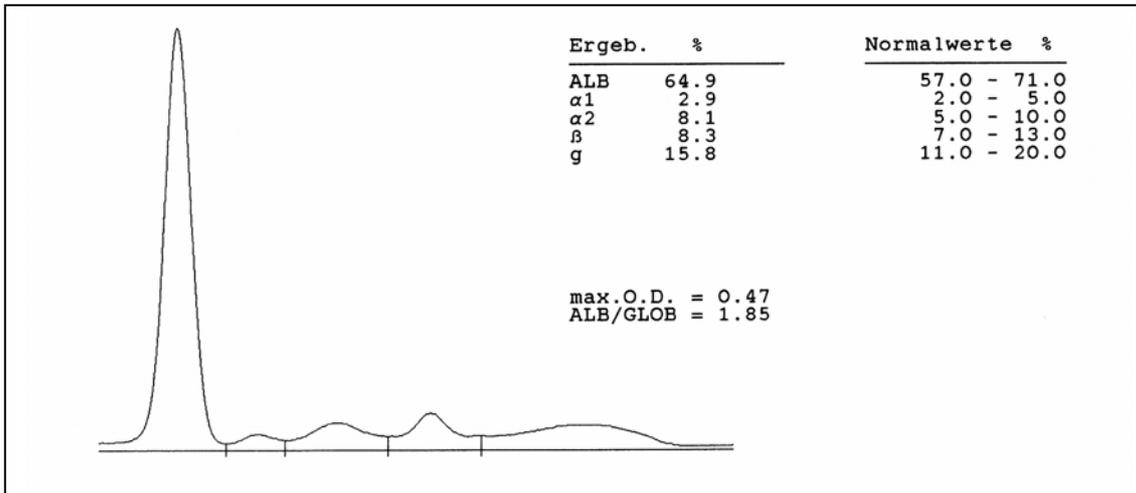


Abb. 1.2.11 RIFA Parenteral 600mg

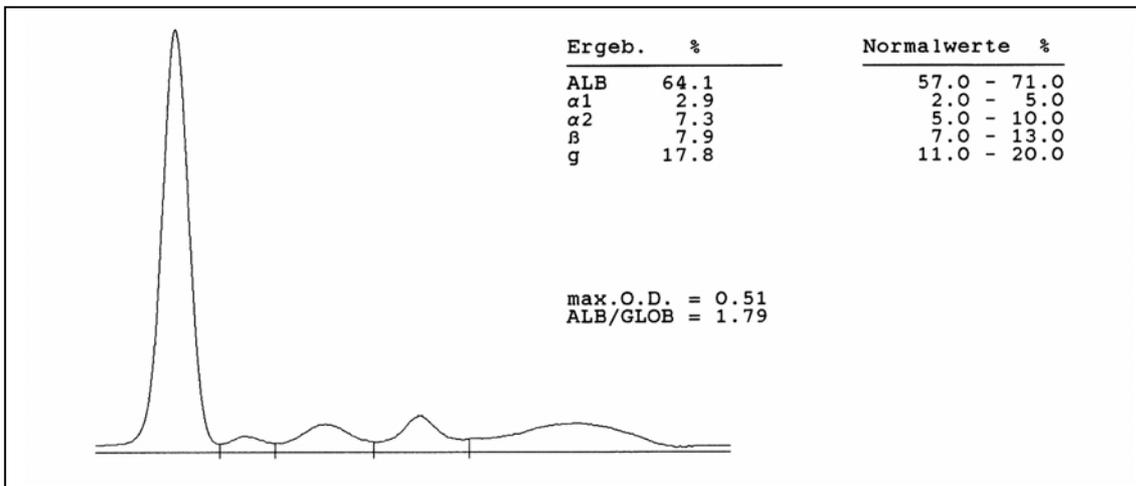


Abb. 1.2.12 Rocephin zur Infusion 2g

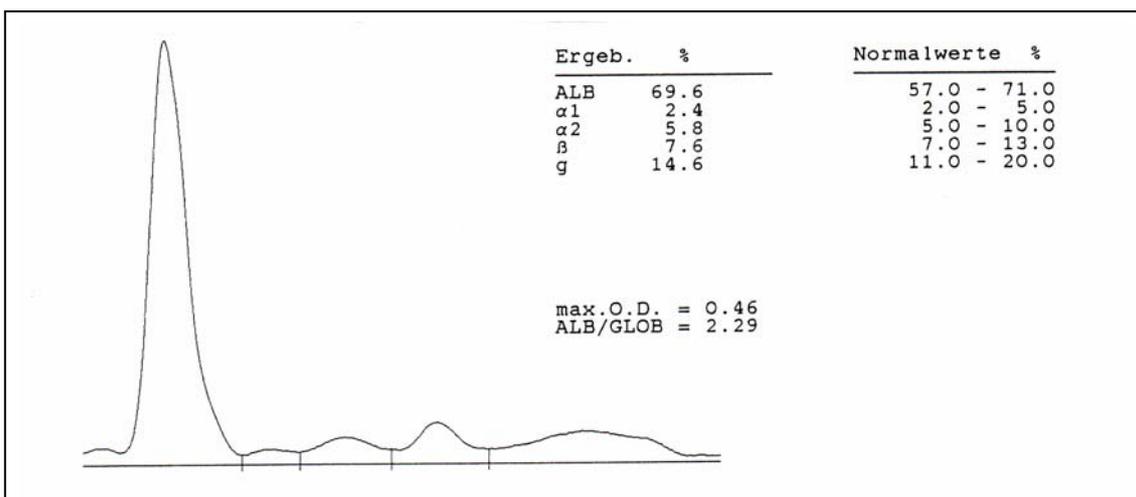


Abb. 1.2.13 Sobelin 300

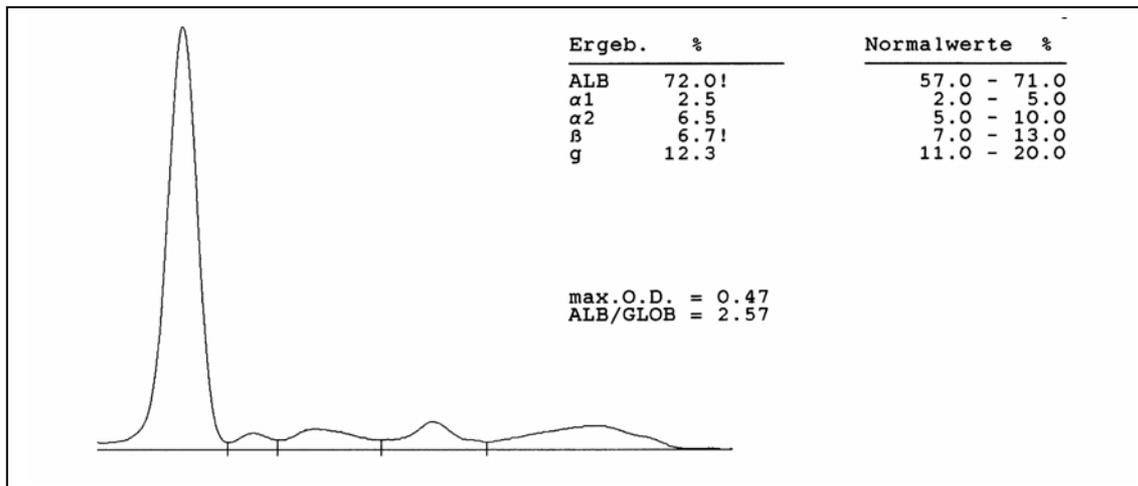


Abb. 1.2.14 Spizef 1,0g

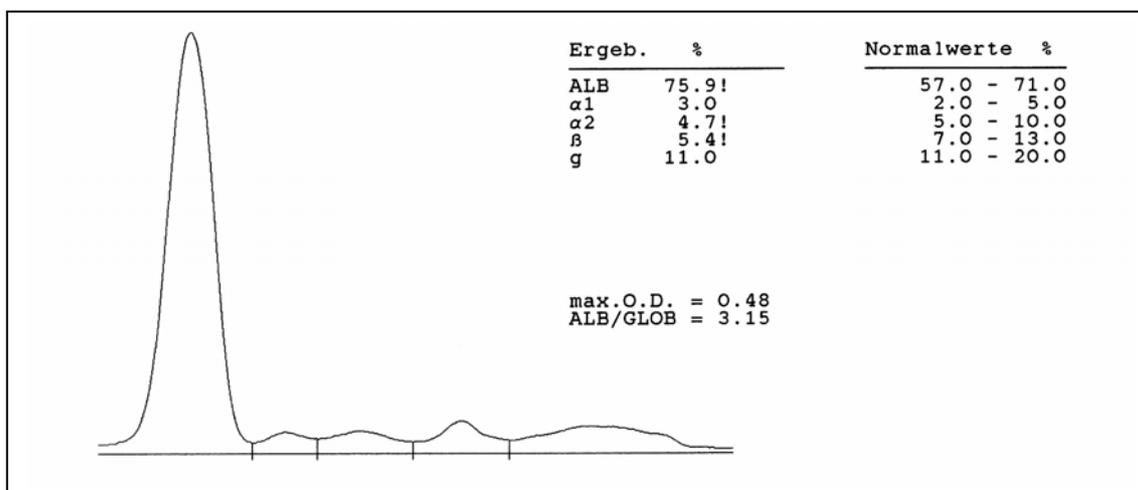


Abb. 1.2.15 Staphylex 1,0g

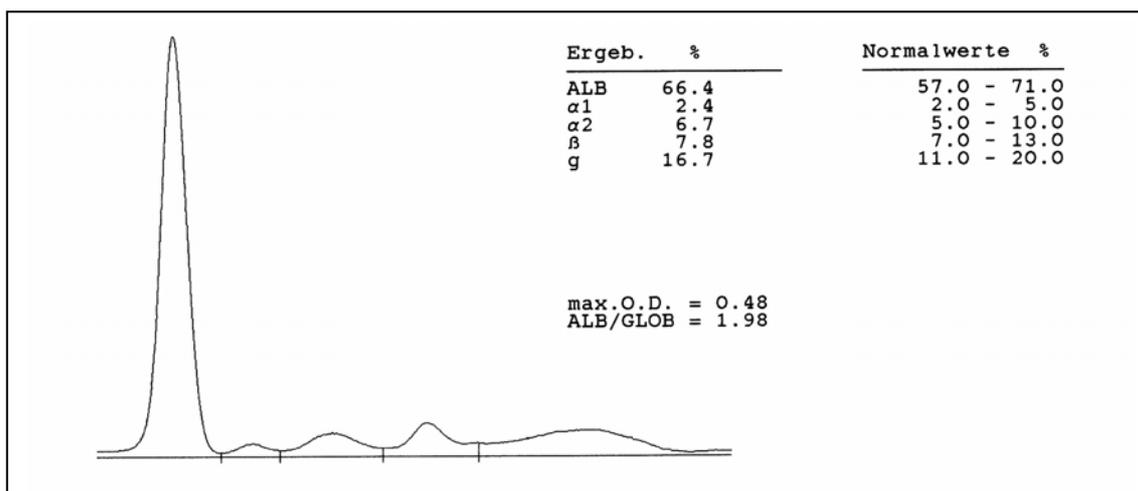


Abb. 1.2.16 Tarivid i.v.200

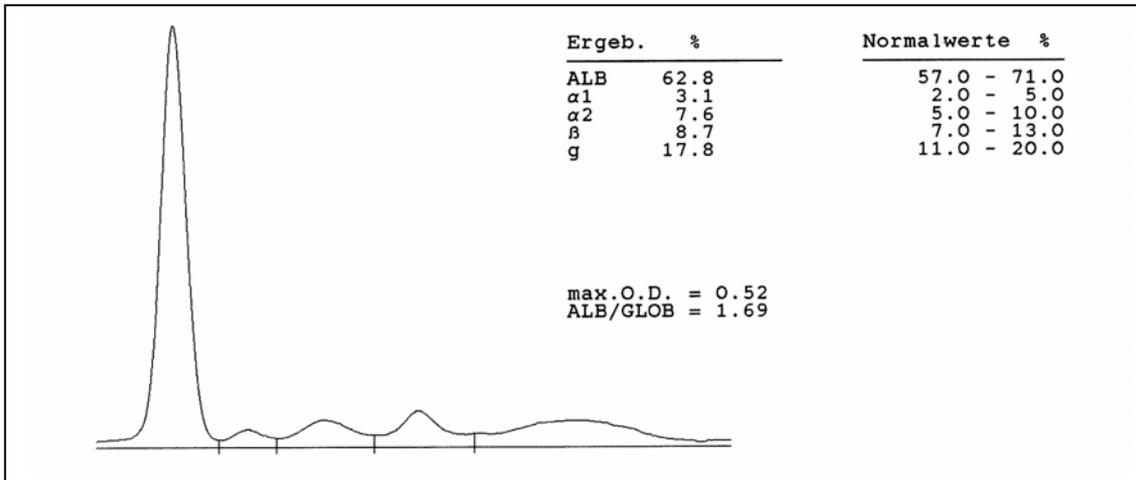


Abb. 1.2.17 Tavanic i.v. 500mg

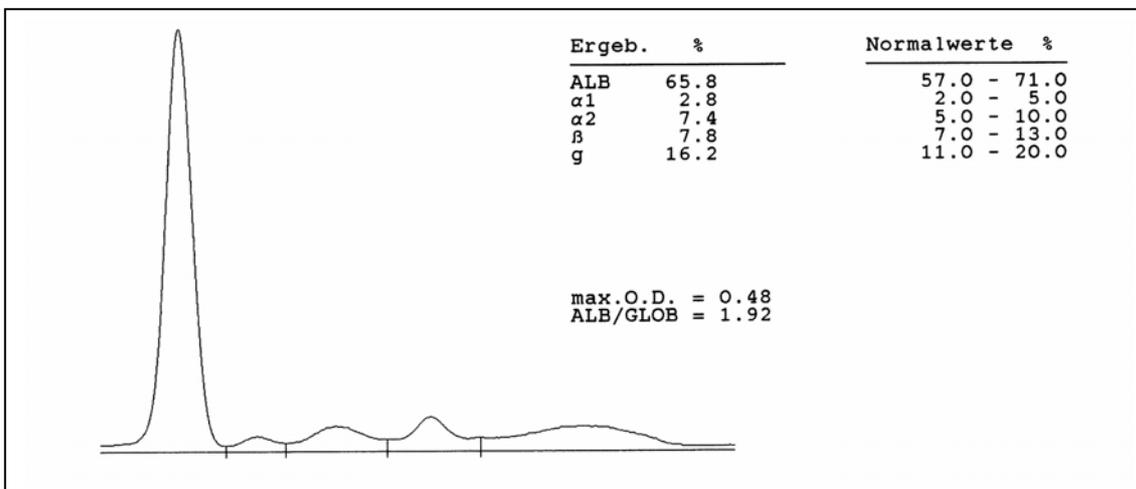


Abb. 1.2.18 Vancomycin CP Lilly 500

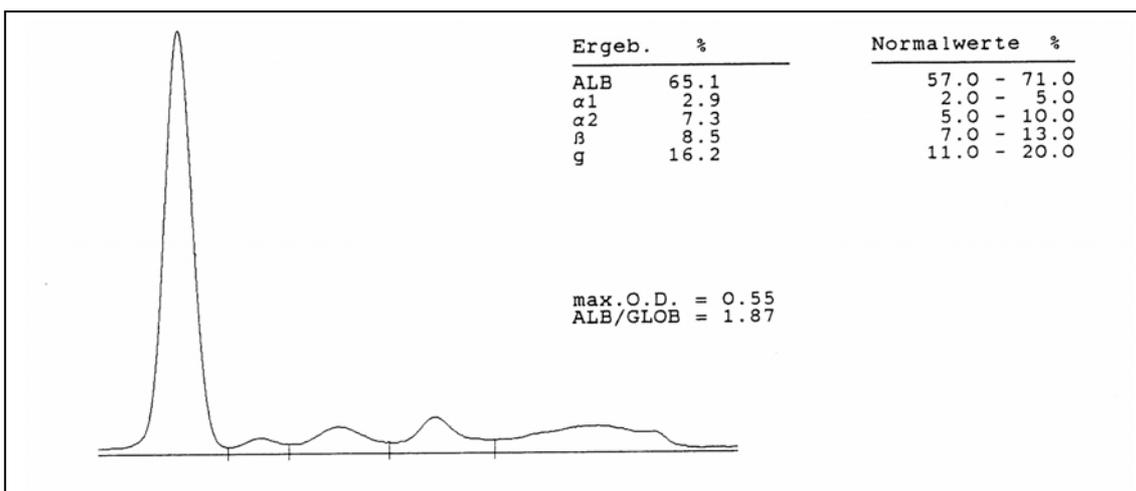


Abb. 1.2.19 Vibravenös SF

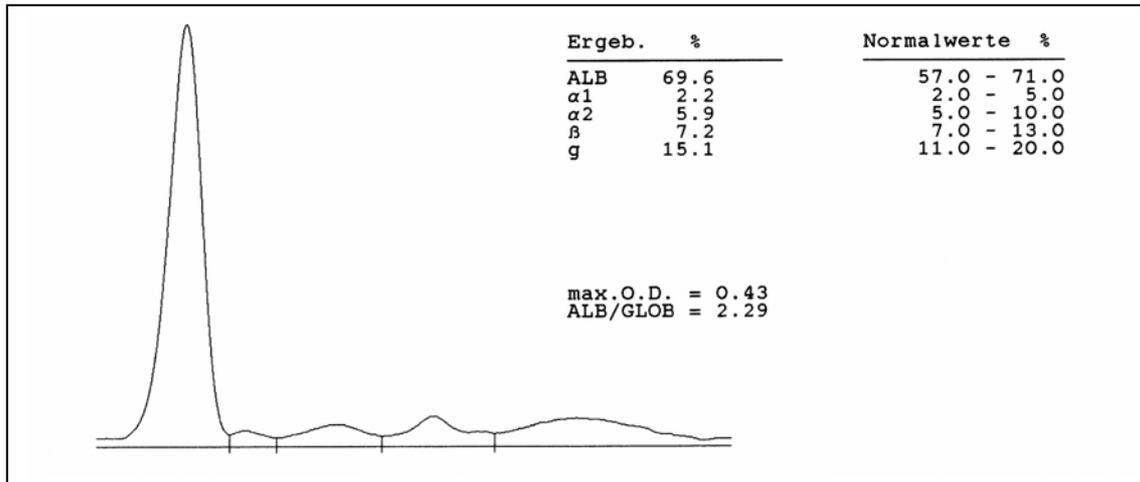


Abb. 1.2.20 Zinazef 1500mg

IX. Danksagung

Folgenden Personen möchte ich meinen Dank aussprechen:

- Herrn Professor Dr. med. Dieter Luft möchte ich für die Überlassung des Themas danken.
- Bei Herrn Oberarzt Dr. med. Dr. rer. nat. Hans-Günther Wahl möchte ich mich für die Betreuung der Versuche, die aufmunternden Gespräche und die Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit bedanken.
- Ebenso besten Dank an alle Mitarbeiter des Zentral- und Stoffwechsellabors für die Hilfe und Unterstützung bei den Messungen.
- Aufrichtiger Dank gilt weiterhin Herrn Roman Werner für seine erfrischenden Worte und vor allem seinen Einsatz für einen reibungslosen Ablauf der Versuchsdurchführung.
- Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl. Ing. Josef Wöll für seine fachkundigen Ratschläge und Anregungen, die interessanten und witzigen Gespräche und vor allem seine herzliche Art.
- Meinen Freunden Roxana Schwab, Manfred Krucker sowie Sonja Neef, insbesondere meinem lieben Freund Thomas Leipnitz, möchte ich für die Unterstützung, aufmunternden Worte und guten Ratschläge danken.

Meinen Eltern und vor allem meiner Schwester möchte ich ganz herzlich für ihre unendliche Geduld, Verständnis und Unterstützung während meines gesamten Zahnmedizinstudiums danken.