

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin IV

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

**Bestimmung der Laktatkonzentration in Plasma und
Vollblut:
Ein Methodenvergleich der enzymatischen und
ionenselektiven Messung mit der GC-MS Referenzmethode**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Julia Sabine Deutsch

aus

Stuttgart-Bad Cannstatt

2003

Dekan: Prof. Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Luft

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Unertl

Für meine Eltern

| | |
|--|--------------|
| Inhaltsverzeichnis | Seite |
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Laktat: Physiologie und klinische Relevanz | 1 |
| 1.1.1 Biochemie..... | 1 |
| 1.1.2 Produktion und Abbau | 3 |
| 1.1.3 Referenzbereiche | 3 |
| 1.1.4 Pathologische Laktatwerte und ihre Ätiologie | 4 |
| 1.1.5 Laktazidose und Anionenlücke | 6 |
| 1.1.6 Indikationen für die Laktatmessung | 7 |
| 1.2 Methoden zur Laktatbestimmung | 11 |
| 1.2.1 Photometrische Methode..... | 11 |
| 1.2.2 Elektrochemische Methode | 13 |
| 1.2.3 Gaschromatographie-Massenspektrometrie: GC/MS-Methode..... | 13 |
| 1.3 Die Untersuchungen dieser Arbeit | 14 |
| 2. MATERIAL UND METHODEN | 16 |
| 2.1 Versuchsdesign..... | 16 |
| 2.2 Untersuchungsgut | 16 |

| | | |
|------------|--|----|
| 2.3 | Analysegeräte | 17 |
| 2.3.1 | ABL 700 | 17 |
| 2.3.1.1 | Die Laktatelektrode | 18 |
| 2.3.1.2 | Reaktionsprinzip | 19 |
| 2.3.1.3 | Reagenzien | 20 |
| 2.3.1.4 | Versuchsablauf | 20 |
| 2.3.2 | Hitachi 917 | 21 |
| 2.3.2.1 | Reaktionsprinzip | 21 |
| 2.3.2.2 | Reagenzien | 21 |
| 2.3.2.3 | Versuchsablauf | 22 |
| 2.3.3 | Gaschromatograph mit massenspezifischem Detektor (GC/MS) | 22 |
| 2.3.3.1 | Reagenzien zur Probenaufbereitung für die GC/MS-Analyse | 23 |
| 2.3.3.2 | Geräte für die Probenaufbereitung und GC-Messung | 24 |
| 2.4 | GC/MS-Untersuchungen | 25 |
| 2.4.1 | Methodik | 25 |
| 2.4.2 | Aufarbeitung der Proben | 26 |
| 2.4.3 | GC/MS-Messung | 27 |
| 2.4.4 | Erstellung von Eichkurven | 28 |
| 2.4.5 | Quantifizierung von Laktat | 30 |
| 2.4.6 | Automatische Integration der Chromatogramme | 30 |
| 2.5 | Bestimmung der Unpräzision | 30 |
| 2.6 | Test auf Interferenzen durch Medikamente | 31 |
| 2.7 | Statistische Auswertung | 31 |

| | | |
|------------|--|----|
| 3. | ERGEBNISSE | 32 |
| 3.1 | Quantifizierung von Laktat mit der GC/MS-Referenzmethode | 32 |
| 3.1.1 | Massenspektren und Ionenchromatogramme..... | 32 |
| 3.1.2 | Eichkurven..... | 34 |
| 3.2 | Bestimmung der Unpräzision | 36 |
| 3.3 | Methodenvergleich | 38 |
| 3.3.1 | ABL 700: Methodenvergleich mit dem Hitachi 917 für Plasma | 39 |
| 3.3.2 | ABL 700: Methodenvergleich mit dem GC/MS für Plasma | 40 |
| 3.3.3 | Hitachi 917: Methodenvergleich mit dem GC/MS für Plasma..... | 41 |
| 3.3.4 | ABL 700: Methodenvergleich mit dem GC/MS für Vollblut..... | 42 |
| 3.4 | Test auf Interferenzen durch Medikamente | 43 |
| 4. | DISKUSSION | 44 |
| 4.1 | Quantifizierung von Laktat mit der GC/MS-Referenzmethode | 44 |
| 4.2 | Bestimmung der Unpräzision | 45 |
| 4.3 | Methodenvergleich | 46 |
| 4.4 | Test auf Interferenzen durch Medikamente | 48 |
| 4.5 | Eignung des ABL 700 im Point-of-Care-Testing | 49 |

| | | |
|-----------|-----------------------------------|----|
| 5. | ZUSAMMENFASSUNG | 51 |
| 6. | LITERATURVERZEICHNIS | 53 |
| 7. | DANKSAGUNG | 59 |
| 8. | LEBENS LAUF | 60 |

1. EINLEITUNG

1.1 Laktat: Physiologie und klinische Relevanz

1.1.1 Biochemie

Laktat ist das Anion der Milchsäure und entstammt dem Pyruvatstoffwechsel. Es kommt in zwei verschiedenen stöchiometrischen Konfigurationen, der D- und der L-Form vor. Der menschliche Körper bildet jedoch nur L-Laktat. Abbildung 1 zeigt die Strukturformel von L-Laktat:

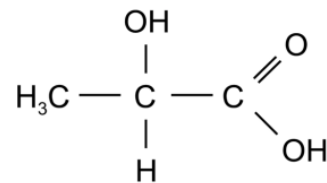


Abb. 1: Strukturformel L-Laktat

Die Laktatbildung ist eine Sackgasse des Stoffwechsels (1): Laktat entsteht bei Sauerstoffmangel aus der Vorstufe Pyruvat. Die Wiederverwertung von Laktat ist nur über die Oxidation zu Pyruvat möglich:

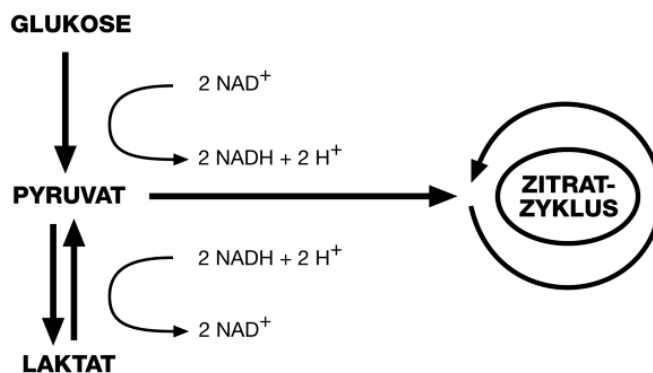


Abb. 2: Zusammenhang zwischen Glukose, Pyruvat und Laktat

Pyruvat, das Endprodukt der Glykolyse, fungiert innerhalb der Kohlenhydratverwertung als Schlüssel zum Zitratzyklus der Mitochondrien (siehe Abbildung 2). Um Kohlenhydrate in den Zitratzyklus einzuschleusen, muss Pyruvat durch den Multienzymkomplex Pyruvatdehydrogenase in die aktivierte Essigsäure (Acetyl-CoA) umgewandelt werden. Acetyl-CoA dient als Einstieg in den Zitratzyklus (44).

Im Zitratzyklus wird Acetyl-CoA zu CO_2 und H_2O oxidiert, wobei die reduzierten Coenzyme $\text{NADH} + \text{H}^+$ und FADH_2 für die dem Zitratzyklus angeschlossene Atmungskette bereitgestellt werden.

Die Energieausbeute aus Zitratzyklus und Atmungskette beträgt mit Hilfe von Sauerstoff insgesamt 38 Mol Adenosintriphosphat (ATP) pro eingesetztem Mol Glukose (aerobe Glykolyse). ATP dient als Energiequelle für sämtliche Zellfunktionen.

Bei Sauerstoffmangel können jedoch nur jeweils 2 Mol ATP pro Mol Glukose gebildet werden, wobei als Endprodukt Pyruvat entsteht (anaerobe Glykolyse) (2).

Der Hauptgrund für eine Akkumulation von Pyruvat ist ein durch Sauerstoffmangel verlangsamter Zitratzyklus (3): das anfallende Pyruvat kann nicht weiter oxidiert werden.

Pyruvat wird deshalb durch die Laktatdehydrogenase (LDH) mit $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu Laktat reduziert, welches aus der Zelle in die Blutbahn diffundiert: $\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Laktat} + \text{NAD}^+$, wobei das Gleichgewicht stark zugunsten des Laktats verschoben ist (1). Da bei dieser Reaktion NAD^+ entsteht, ergibt sich die Möglichkeit, die Glykolysekette auch bei Sauerstoffmangel ablaufen zu lassen. Das NAD^+ wird dabei für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Reaktion benötigt, ohne die der Zyklus stagnieren würde.

Eine erhöhte Laktatkonzentration im Blut ist folglich ein Zeichen dafür, dass Zellen mit Sauerstoff relativ unterversorgt sind (4).

1.1.2 Produktion und Abbau

Skelettmuskel, Haut, Darmmukosa, Blutzellen, Niere und Gehirn bilden zwischen 0,7 und 1,3 mmol Laktat pro Stunde und Kilogramm Körpergewicht. Der Abbau erfolgt in Leber, Niere und Herz, wobei die Leber 50-70% der gesamten Laktatelimination übernimmt. Es gibt folgende Möglichkeiten der Verwertung:

1. „Recycling“: Laktat gelangt über den Blutweg zur Leber. Dort wird es zu Pyruvat oxidiert, anschliessend zu Glukose resynthetisiert und wieder ans Blut abgegeben, womit es den Glukose-verbrauchenden Geweben erneut zur Verfügung steht (Cori-Zyklus).
2. Laktat wird zu Pyruvat oxidiert und im Zitratzyklus zu CO₂ und Wasser abgebaut (Endoxidation in den Mitochondrien) (44,45).

Während sportlicher Betätigung kann das von arbeitenden Muskeln produzierte Laktat auch von gleichzeitig ruhenden Muskeln abgebaut werden (2,3).

1.1.3 Referenzbereiche

Der Referenzbereich hängt ab vom Lebensalter, dem Tagesablauf, dem Geschlecht, dem körperlichen Aktivitätszustand, dem Entnahmeort (venös, kapillär, arteriell) und dem Bestimmungsmedium (Plasma, Serum, Vollblut) (5).

So enthält arterielles Blut auf dem Weg zu den Organen weniger Laktat und mehr Glukose, die zu den Zellen transportiert werden soll. Venöses Blut hingegen verlässt die Organe und bringt die dort entstandenen Stoffwechselprodukte mit: hier ist die Laktatkonzentration höher. Zwischen den Konzentrationen von arteriellem und venösem Blut liegt der Laktatwert von kapillärem Blut.

Da Plasma im Gegensatz zu Vollblut keine laktatbildenden Erythrocyten enthält, ist der Laktatwert in Plasma niedriger als in Vollblut (5).

Beim gesunden Erwachsenen liegt der physiologische Laktatwert unter Ruhebedingungen im arteriellen Blut unter 1,5 mmol/l; bei körperlicher Arbeit kann sich dieser deutlich erhöhen. So können bei Leistungssportlern kurzfristig extrem hohe Werte von bis zu 25 mmol/l auftreten (6), die jedoch bei normaler Kreislauf-, Leber- und Nierenfunktion innerhalb einer Stunde wieder abgebaut werden.

1.1.4 Pathologische Laktatwerte und ihre Ätiologie

Hyperlaktatämien sind die Folge eines Ungleichgewichtes zwischen der Laktatbildung auf zellulärer Ebene und dem vornehmlich in der Leber stattfindenden Metabolismus. Hierbei wird entweder zuviel Laktat produziert oder aber zu wenig abgebaut.

Als Hyperlaktatämie wird ein pathologischer Laktatanstieg bis 5 mmol/l ohne begleitende Azidose bezeichnet.

Laktatspiegel über 5 mmol/l mit metabolischer Azidose gelten als Laktazidose (2). Die Laktazidose ist eine Additionsazidose, bei der eine übermäßige Bildung von Laktat den arteriellen pH-Wert senkt (7).

Die Laktazidosen werden nach ihren Ursachen in Typ A und Typ B unterteilt:

Die Laktazidose Typ A ist durch eine Gewebehypoxie, das heisst ein Ungleichgewicht von Sauerstoffbedarf und Sauerstoffzufuhr im Gewebe verursacht. Alle Störungen der Sauerstoffaufnahme, des Transportes und der Sauerstoffabgabe im Gewebe können zu dieser Form der Laktazidose führen. Die wichtigsten Ursachen sind Lungen ventilationsstörungen, Herzinsuffizienz, Schockzustände (kardiogen, septisch, hypovolämisch), lokale Durchblutungsstörungen, Anämien und schweres Asthma.

Die Laktazidose Typ B hingegen entsteht bei unveränderter Sauerstoffversorgung des Gewebes als Folge von Stoffwechsellentgleisungen oder Erkrankungen. So begünstigt Diabetes mellitus die Laktazidose Typ B, weil die Einschleusung des Pyruvats in den Zitratzyklus gestört ist.

Auch generalisierte Krampfanfälle mit massiver Laktatbildung in der Muskulatur oder Tumore (Lymphome, Lungenkarzinome) mit eigener Laktatproduktion können eine Laktazidose Typ B fördern (7).

Als weitere Ursachen gelten Lebererkrankungen und Nebenwirkungen von Arzneimitteln und Toxinen.

In der Klinik ist Typ B der seltenere von beiden. Die grössere Bedeutung hat Typ A, die vermehrte Laktatproduktion aufgrund verstärkter anaerober Energiegewinnung bei Sauerstoffmangel (3,6).

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verschiedenen Ursachen der Laktazidose (8).

Tab. 1: Ursachen der Laktazidose

| Ursachen für die Laktazidose | |
|---|--|
| Typ A (Laktat-Anstieg) | Typ B (Laktat-Anstieg) |
| Klinischer Nachweis einer Gewebshypoxie | Fehlen der Gewebshypoxie |
| Schock (kardiogen, septisch, hypovolämisch) Regionale Hypoperfusion (Extremitäten, mesenterische Ischämie) Schwere Hypoxämie Asphyxie bei Neonaten Schwere Anämie CO ₂ -Vergiftung Schweres Asthma | Laktazidose / Primärerkrankung Diabetes mellitus Lebererkrankungen maligne Erkrankungen Sepsis Phäochromozytom Thiaminmangel Laktazidose / Arzneimittel / Toxine Biguanide, Ethanol, Methanol, Ethylen-glycol, Fruktose, Salizylate, Paracetamol, Terbutalin, Zyanid, Nitroprusside, Isoniazid |

1.1.5 Laktazidose und Anionenlücke

Durch die vermehrte Entstehung von Milchsäure in den Zellen wird Laktat und H^+ in den Extrazellulärraum abgegeben. Es kommt zu einem Verbrauch von Bicarbonat, einem pH-Abfall und einer Vergrößerung der Anionenlücke durch das Laktat (siehe Abbildung 3) (7).

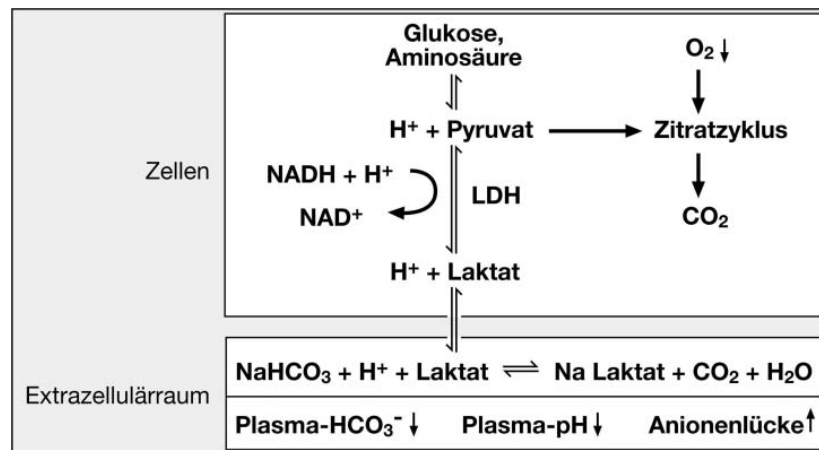


Abb. 3: Entstehung von Laktazidosen

Die Anionenlücke ist eine Berechnung der nichtgemessenen Anionen und kann als Indikator für organische Säuren, wie z.B. das Laktat, dienen. Sie wird durch Subtraktion der Summe der Anionen Chlorid und Bicarbonat von der Summe der Kationen Natrium und Kalium im Plasma errechnet. Dabei bleiben die quantitativ unbedeutenderen, bzw. nicht routinemässig bestimmten Kationen Calcium und Magnesium, sowie die Anionen Phosphat, Sulfat und die Proteine unberücksichtigt. Die Anionenlücke beträgt normalerweise 8 bis 16 mmol/l. Die negativen Veränderungen der Plasmaproteine, hauptsächlich des Albumins, haben den grössten Anteil an der Anionenlücke (47).

Die Differentialdiagnose zwischen den einzelnen Formen der metabolischen Azidose (Subtraktionsazidose, Retentionsazidose, Additionsazidose) kann über die Anionenlücke erfolgen (46).

Einer Subtraktionsazidose liegen vermehrte Bicarbonatverluste durch Diarrhöen, Erbrechen oder Galle-/ Pankreasfisteln zugrunde, die Anionenlücke bleibt jedoch unverändert. Die Retentionsazidose wird durch eine Einschränkung der Protonenausscheidung durch die Nieren verursacht (renal-tubuläre Azidose), auch hier ist die Anionenlücke unverändert.

Eine Additionsazidose hingegen kommt durch die Erhöhung organischer Säuren im Blut zustande. Zu den Additionsazidosen gehören einerseits die Ketoazidosen bei Diabetes mellitus oder Hunger und andererseits die Laktazidosen bei Hypoxie, Diabetes mellitus, Glykogenspeicherkrankheit Typ I oder Intoxikationen. In diesen Fällen kommt es zu einer Erweiterung der Anionenlücke (46,47).

1.1.6 Indikationen für die Laktatmessung

In allen nachfolgend genannten Fällen ergeben sich Gesamtdiagnose, therapeutische Planung und prognostische Aussagen nicht allein aus dem Laktatwert, sondern aus einer Kombination von Analysen: Säure-Basen-Haushalt, Blutgase, Sauerstoffpartialdruck, Hämoglobingehalt, Elektrolyte und Metabolite (Glukose, Laktat) ergeben gemeinsam ein Gesamtbild des Patienten.

In der Intensivmedizin:

Die Laktazidose wird häufig bei Intensivpatienten beobachtet. Hier korrelieren ständig erhöhte Laktatwerte, eine totale Sauerstoffschuld, mangelnde Durchblutung und die Schwere der klinischen Prognose miteinander (8).

Sowohl der Schweregrad wie auch die Fortdauer der Laktazidose gelten als Indikatoren einer schlechten Prognose: Patienten mit ständig erhöhten Laktatwerten haben eine höhere Letalitätsrate und ein grösseres Risiko für multiples Organversagen (1,3,8,9,17).

Darüber hinaus helfen serielle Laktatmessungen dem Arzt über die Notwendigkeit weiterer Tests und therapeutischer Interventionen zu entscheiden oder den Therapieerfolg im Sinne einer verbesserten Gewebepfusion zu bewerten (3,10). Sind die Werte anfänglich erhöht, wird eine erfolgreiche Therapie dazu führen, dass die Laktatwerte sinken. Unveränderte oder steigende Werte hingegen sind ein Anzeichen dafür, dass die Therapie ineffektiv ist.

Auch über mögliche postoperative Komplikationen (9,11,12,13,14) und den Zustand nach Reanimation gibt der Laktatparameter Aufschluss (3).

Primär fungiert der Laktatwert bei kritisch Kranken als ein prognostisch wichtiger Faktor und metabolischer Warnhinweis bei Schockzuständen. Der Schock ist ein Syndrom, bei dem ein Ungleichgewicht zwischen dem aktuellen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot im Gewebe herrscht.

Beim septischen Schock hat laut Bakker et al. die Laktatbestimmung sogar einen höheren prognostischen Wert als die sauerstoffbezogenen Parameter (15).

Peretz et al. bewiesen, dass bei Laktatwerten $>4,4$ mmol/l sich die Letalitätsrate von 18 % auf 73 % erhöhte (16).

Weitere Studien prognostizieren bei einer Laktatkonzentration von bis zu 4 mmol/l eine Überlebensrate von über 50%, während bei Werten >8 mmol/l die Sterblichkeit auf 90 % steigt (8,18,41,42).

In jedem Fall steigt die Letalität signifikant mit der Laktatkonzentration an (1).

Abbildung 4 zeigt den Zusammenhang zwischen Laktatkonzentration und Letalität (8,18,41,42).

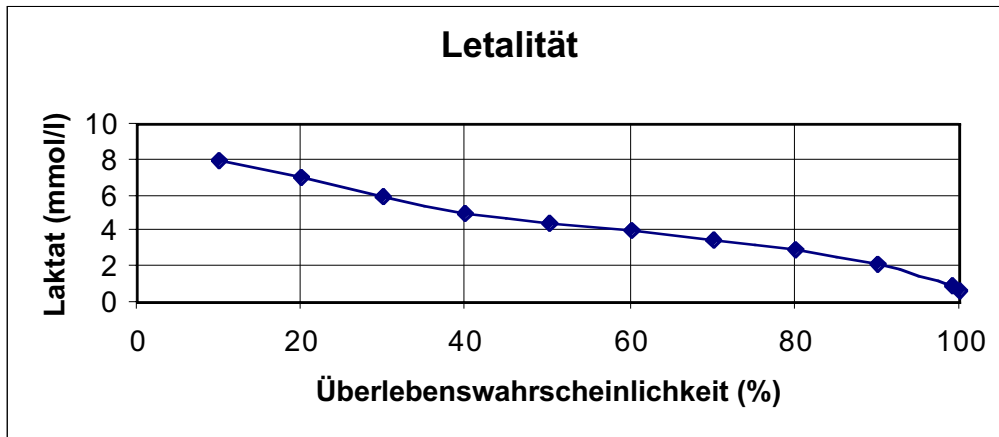


Abb. 4: Laktat als Indikator für die Letalität kritisch Kranker

In der Neonatologie:

Bei kranken Neugeborenen und speziell bei Frühgeborenen ist eine Unterversorgung mit Sauerstoff keine Seltenheit. Die Überwachung von Gewebepfusion und -ventilation ist hier wesentlich für die Früherkennung des Kreislaufversagens. Zwar geben in dieser Altersgruppe Veränderungen von Puls, Blutdruck, Hautdurchblutung und Urinausscheidung Aufschluss über eine Mangelversorgung des Gewebes, doch können Minderdurchblutung und Sauerstoffschuld bereits vorhanden sein, bevor klinisch offensichtliche kardiovaskuläre Reaktionen auftreten.

Wie auch beim erwachsenen Patienten geben nun serielle Laktatmessungen ein frühes Warnsignal und liefern wichtige Informationen über die Prognose des Neugeborenen (19,20,21).

Erhöhte Laktatwerte korrelieren auch bei Neugeborenen mit einer erhöhten Sterblichkeit. In einer Studie mit künstlich beatmeten Neugeborenen starben in der Probandengruppe mit Spitzenlaktatwerten $<2,5$ mmol/l 11 % der Kinder, während in der Gruppe mit Werten $>5,0$ mmol/l bereits 57 % nicht überlebten (19).

Auch im Bereich der pränatalen Diagnostik hilft der Laktatparameter, den Zustand des Feten zu überwachen (20).

Durch einen Rückschluss vom Laktatwert auf die Sauerstoffversorgung lässt sich eine Aussage über mögliche neurologische Schädigungen oder Behinderungen machen.

Die Laktatkonzentration und der pH-Wert dienen als Marker für die Vorhersage einer mittleren bis schweren ischämischen Enzephalopathie. Sowohl Sensitivität als auch Spezifität des Laktattests waren in einer Studie von Kruger et al. höher als die des pH-Tests (21).

Ausserdem hatte die Laktatmessung mit einem benötigten Volumen von nur 5 µl erhebliche Vorteile gegenüber der pH-Messung, für die 35 µl Blut entnommen werden mussten (21).

In der Sportmedizin:

Hier spielt Laktat bei der Einschätzung von Fitness und Belastbarkeit im Ausdauersport eine wichtige Rolle.

Sportmediziner bedienen sich der Laktatdiagnostik, um die Leistungsfähigkeit eines Athleten zu bewerten und individuelle Trainingspläne für den Einzelnen aufzustellen (22).

Die sogenannte anaerobe Schwelle ist definiert als diejenige Leistung, welche noch auf aerobem Niveau erreicht werden kann, bevor der immense Laktatanstieg im Blut beginnt.

Normalerweise liegt diese individuelle anaerobe Schwelle bei konditionstrainierten Athleten bei 2,5-3,5 mmol/l.

Ein guter Sportler zeichnet sich durch eine möglichst grosse Leistungsfähigkeit im aeroben Bereich aus. Je nach Sportart muss jedoch auch der anaerobe Bereich trainiert werden. So benötigt beispielsweise ein Rudersportler speziell beim Start, Zwischen- und Endspurt ein hohes Mass an Ausdauer, das heisst Leistungspotential bei Sauerstoffdefizit im anaeroben Bereich (6).

1.2 Methoden zur Laktatbestimmung

Seit Anfang des vergangenen Jahrhunderts wurden viele Methoden für die Messung der Laktatkonzentration im Blut entwickelt.

1886 war Gaglio der erste, der im Blut von Säugern Laktatmessungen durchführte (23). Dafür wurden damals mehrere Tage und bis zu 200 ml Blut benötigt. 1941 entwickelten Barker et al. eine kolorimetrische Methode, das Probenvolumen sank (24). Es folgte 1975 eine photometrische Methode, die jedoch unter einem instabilen Sensor litt (25).

Heute werden klinisch meist entweder optische (Photometrie) oder elektrochemische (Amperometrie) Methoden angewandt.

1.2.1 Photometrische Methode

Mit der Photometrie können Substanzen erfasst und gemessen werden, die aufgrund ihrer Konstitution Licht absorbieren.

Die photometrische Methode beruht auf zwei Schritten.

1. Das in der Blutprobe enthaltene Laktat wird mit Hilfe eines Enzyms umgesetzt.
2. Messung:
 - a) Das entstandene Produkt selbst absorbiert Licht und kann direkt photometrisch gemessen werden.
 - b) Das Produkt wird in einer Folgereaktion durch geeignete Reagentien zu einer gefärbten Verbindung (Indikator) umgewandelt, deren Lichtabsorption gemessen wird.
 - c) Bei der ersten Reaktion oder einer mit ihr gekoppelten Indikatorreaktion kommt es zur Umwandlung von NAD^+ (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid) in die reduzierte Form $\text{NADH} + \text{H}^+$. Im Gegensatz zu NAD besitzt NADH ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei 340 nm. Man misst die Absorption des NADH und errechnet daraus den Verbrauch von NAD (48).

In jedem Fall ist die Indikatorzunahme proportional zur anfangs eingesetzten Laktatmenge. Die Farbzunahme wird photometrisch gemessen und daraus anhand des Lambert-Beerschen Gesetzes die Laktatkonzentration errechnet (5).

Der erste Enzymtest, der zur Laktatbestimmung beschrieben wurde, basierte auf dem Transfer eines H^+ -Ions von Laktat auf Kaliumferricyanat (rotes Blutlaugensalz) durch die Laktatdehydrogenase (LDH). Das Verfahren war jedoch aufwendig und fand keine grosse Akzeptanz.

Die folgenden Methoden beruhten auf der UV-Messung der NADH-Bildung. 1974 beschrieben Gutmann und Wahlefeld eine Laktatbestimmung, bei der das durch die LDH-katalysierte Laktatoxidation gebildete NADH gemessen wird (26).

In der heutigen Laborroutine ist eine Enzymreaktion verbreitet, bei der Laktat zu Pyruvat umgesetzt wird. Das in dieser Reaktion gebildete Wasserstoffperoxid wird dann in einer zweiten Enzymreaktion zur Farbentwicklung eingesetzt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist der Laktatkonzentration proportional.

Methoden dieser Art benötigen rund 200 μ l Plasma und dauern ca. 30 Minuten (27).

Bei der patientennahen Laboruntersuchung direkt am Krankenbett (Point-of-Care-Testing), findet seit den 90er Jahren auch ein transportierbarer Laktatanalysator (Accusport, Roche Diagnostics, Mannheim) seinen Einsatz.

Es handelt sich hierbei um ein batteriebetriebenes Photometer, dem ein trockenchemischer Teststreifen mit einem Tropfen Blut (15-50 μ l) zugeführt wird. Eine Reaktionsschicht mit Laktatoxidase führt das Laktat über in Pyruvat und in einer weiteren Reaktion entsteht der Farbstoff Molybdänblau. Dieser wird bei einer Wellenlänge von 660 nm gemessen

und der Laktatmenge proportional gleichgesetzt. Das Ergebnis erscheint nach ca. 60 Sekunden (27,28).

1.2.2 Elektrochemische Methode

Diese Methode beruht auf einer ionenselektiven Elektrode mit einer integrierten Membran und einer substratspezifischen enzymatischen Komponente (5). Die Membran ist eine dünne blattähnliche Struktur, die die Probe von der inneren Elektrode trennt, zwischen verschiedenen Substanzen unterscheidet und nur die zu ermittelnde Substanz zur Elektrode diffundieren lässt. Gleichzeitig dient die Membran als Träger der für die Reaktion benötigten Enzymschicht.

Das Laktat aus der Blutprobe dringt durch eine äussere Membranschicht zu einer Enzymschicht vor, wo es mit der dort enthaltenen Laktatoxidase zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reagiert.

H_2O_2 gelangt durch eine innere Membranschicht, wird einer angelegten Spannung ausgesetzt und dabei oxidiert. Die Oxidation erzeugt einen Fluss von Elektronen und somit einen elektrischen Strom.

Die Grösse des Stroms wird amperometrisch gemessen und ist der eingesetzten Laktatmenge proportional (29,30,31).

Methoden dieser Art benötigen 35-195 μ l Vollblut oder Plasma und dauern ca. 60 Sekunden. Die Proben müssen nicht vorbereitet werden.

Damit bietet sich diese Methode für Notfallmedizin und Point-Of-Care-Testing an.

1.2.3 Gaschromatographie-Massenspektrometrie: GC/MS-Methode

Die Probe wird bei dieser Methode im gasförmigen Zustand gemischt mit Helium als Trägergas über die Trennsäule des GC-Ofens geführt.

Nun zeigt der Massendetektor die verschiedenen in der Probe enthaltenen Ionen aufgrund ihrer unterschiedlichen Retention nacheinander an.

Jede Einzelkomponente ergibt im Registriergerät einen Kurvengipfel (Peak), dessen Lage die Qualität und dessen Höhe und Breite die Quantität des jeweiligen Stoffes anzeigen.

Zur Berechnung dient ein interner Standard aus $^{13}\text{C}_3$ -markiertem Laktat. Dieser wird während der Aufarbeitung in bekannter Konzentration zugegeben. Die Peakintegrationsflächen von unmarkiertem Laktat (m/z 327) und internem Standard (m/z 330) werden zueinander in Relation gesetzt und daraus die Laktatkonzentration der eingesetzten Probe ermittelt.

Eine Probenaufarbeitung für diese Methode dauert samt Auswertung ca. einen Tag. Das benötigte Plasmavolumen beträgt 10 bis 100 μl .

Die GC/MS-Methode zur Laktatbestimmung ist wegen des zeitlichen, manuellen und messtechnischen Aufwandes nicht für einen Einsatz direkt im Intensivbereich geeignet, dient jedoch in der vorliegenden Arbeit als Referenzmethode im Routinelabor.

1.3 Die Untersuchungen dieser Arbeit

Die meisten Blutgasanalytoren sind heute zusätzlich mit ionenselektiven Elektroden für die Messung von Elektrolyten und Metaboliten ausgestattet. So bietet auch das Tischgerät ABL 700 (Radiometer Kopenhagen) eine rasche Laktatanalyse neben den üblichen Parametern an, was vor allem in der Intensivmedizin von Interesse ist.

Ziel der Studie war es, die Qualität der Laktatbestimmung in Plasma und Vollblut mit dem Biosensor ABL 700 zu überprüfen.

Folgende Fragen sollten durch diese Studie beantwortet werden:

1. Unpräzision
2. GC/MS-Methode als Referenz
3. Evaluation des ABL 700 im Methodenvergleich mit einer enzymatischen Methode (Hitachi 917, Roche Diagnostics, Mannheim) und der GC/MS-Methode als Referenz
4. Kommt es durch Störgrößen wie Medikamente (Dopamin, Dobutamin, Arterenol) zu Interferenzen?
5. Eignet sich der ABL 700 für den Einsatz im Point-of-Care-Testing?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchsdesign

Das Tischgerät ABL 700 (Radiometer, Kopenhagen) zur Bestimmung der Laktatkonzentration in Plasma und Vollblut mittels einer ionenselektiven Elektrode wurde in dieser Studie im Vergleich zu einer enzymatischen Methode mit Laktatoxidase / Peroxidase (Hitachi 917, Roche Diagnostics, Mannheim) und der GC/MS-Analyse (Hewlett Packard, Avondale, USA) als Referenzmethode getestet.

Der Einsatz des Gerätes erfolgte im Zentrallabor der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen.

Im Methodenvergleich wurden unter kontrollierten Testbedingungen Proben von Intensivpatienten jeweils in Plasma und Vollblut gemessen.

Zur Bestimmung der Unpräzision wurden die Variationskoeffizienten in der Serie und von Tag zu Tag bei jeder der drei Methoden ermittelt.

Hinzu kam ein Test auf etwaige Interferenzen aufgrund verschiedener, in der Intensivmedizin häufig eingesetzter Medikamente. Hierfür wurden zusätzliche Proben mit steigenden Konzentrationen von Dopamin, Dobutamin und Arterenol angereichert und ebenfalls im Methodenvergleich gemessen.

2.2 Untersuchungsgut

Wir untersuchten insgesamt 100 Proben, die von Patienten der Intensivstationen der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen stammten.

Für die Studie wurden keine zusätzlichen Blutabnahmen vorgenommen, sondern Proben verwendet, die zur Laktatbestimmung vorgesehen waren.

Die Messungen dienten der Optimierung von Diagnostik und Therapie. Sie wurden anonymisiert durchgeführt und waren nicht rückführbar.

Das Vollblut lagerte in Monovetten der Firma Sarstedt. Als Antikoagulans diente EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), die Hemmung der Glykolyse erfolgte durch Natriumfluorid.

Die Messung der 100 Proben wurde am ABL 700 und am GC/MS jeweils in Vollblut und in Plasma durchgeführt, am Hitachi lediglich in Plasma.

Es wurden gezielt Proben mit verschiedenen Laktatkonzentrationen im Bereich von 0,5 bis 21,0 mmol/l ausgewählt, um die Präzision auf jedem Niveau ermitteln zu können.

Die Proben wurden wie folgt portioniert: 195µl Vollblut für den ABL 700, 100 µl Vollblut für die GC/MS-Analyse. Nach drei Minuten Zentrifugieren (3000 U/Min) wurden vom überstehenden Plasma weitere 35 µl für den ABL, 100 µl für die GC/MS-Analyse und 200µl für den Hitachi entnommen.

2.3 Analysegeräte

2.3.1 ABL 700, Radiometer, Kopenhagen

Das Gehäuse des Tischgerätes ABL 700 setzt sich aus Touchscreen, Drucker, Einlassklappen für die Proben, Fenster zur Beobachtung der Elektrodenmodule, Gas-, und Lösungsbehältern zusammen.

Das Kernstück des Tischgerätes ABL 700 sind seine Elektrodenmodule, die Messkammern für pH-, Blutgas-, Elektrolyt- und Metabolitelektroden.

In Abbildung 5 ist die Vorderansicht des ABL 700 mit seinen Hauptkomponenten dargestellt:

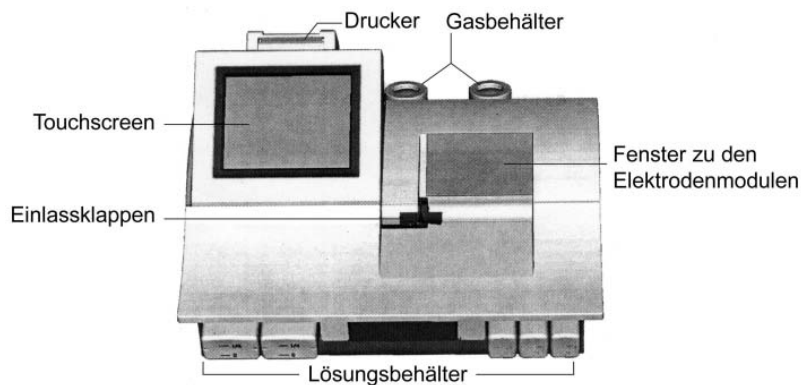


Abb. 5: Radiometer ABL 700

2.3.1.1 Die Laktatelektrode

Die Elektrodenkette, das heisst der elektrische Stromkreis zur Messung von Laktat ist im folgenden Diagramm illustriert:

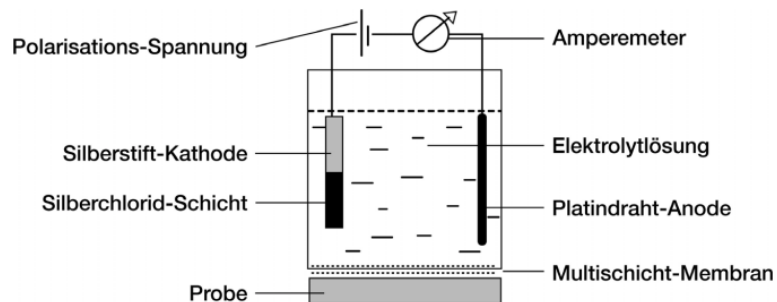


Abb. 6: Aufbau der Laktatelektrode

Amperemeter: Misst den durch die Schaltung fliessenden Strom.

Elektrolytlösung: Stellt den elektrischen Kontakt zwischen Anode und Kathode her.

Platindraht-Anode: Oxidiert H_2O_2

Multischichtmembran: Die äussere Membranschicht schleust Laktat ohne Blutkörperchen oder Störsubstanzen zur mittleren Schicht. Diese enthält das Enzym Laktatoxidase zur Umwandlung von Laktat in Pyruvat und H_2O_2 . Die innere und letzte Schicht transportiert das H_2O_2 zur Anode.

Probe: Ist in direktem Kontakt mit der Membran der Elektrode.

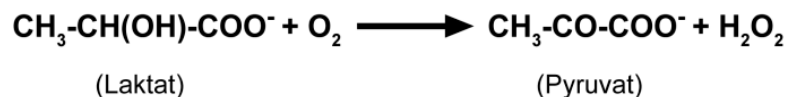
Silberchloridschicht: Liefert die Ag^+ -Ionen, die an der Kathode reduziert werden.

Silberstift-Kathode: Reduziert Ag^+ .

Polarisationsspannung: Liefert die für die Oxidation des H_2O_2 erforderliche Spannung.

2.3.1.2 Reaktionsprinzip

Das zwischen der inneren und äusseren Membran immobilisierte Enzym Laktatoxidase setzt Laktat um:



Der Sauerstoff für diese Reaktion wird von der äusseren Membranschicht sowie durch die H_2O_2 -Oxidation an der Platin-Anode geliefert.

Das gebildete H_2O_2 wird über die innere Membran zur Platin-Anode transportiert. An die Elektrodenkette ist eine Spannung angelegt, bei welcher H_2O_2 an der Platin-Anode oxidiert wird. Elektronen werden frei:



Der entstandene Elektronenfluss ist als elektrischer Strom am Ampere-meter messbar. Die Grösse dieses Stroms ist der ursprünglichen Laktatmenge proportional.

Zur Vervollständigung des elektrischen Stromkreises ist eine Reduktionsreaktion, bei der Elektronen verbraucht werden, notwendig. Diese Reaktion erfolgt an der Kathode, wo Ag^+ in Ag-Metall umgewandelt wird: $\text{Ag}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{Ag}$.

2.3.1.3 Reagenzien

Kalibrierlösung für die Laktatelektrode: 200 ml, enthält Laktat der Konzentration 4 mmol/l und einen Puffer zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes von 7,4.

Qualitätskontrolllösung: vier Kontrolllösungsampullen (je 0,7 ml) mit einem jeweils festgelegten Laktatlevel.

Level 1: 0,1 bis 0,5 mmol/l; Level 2: 0,7 bis 1,7 mmol/l; Level 3: 3,7 bis 4,9 mmol/l; Level 4: 8,7 bis 11,1 mmol/l.

Spüllösung: 600 ml, enthält Salze, einen Puffer, Konservierungsmittel und Tenside.

Reinigungslösung: enthält nicht-ionische Tenside.

Elektrolytlösung für die Laktatelektrode: 0,6 ml in Kunststoffkapseln zum Füllen des Elektrodenmantels, enthält einen Puffer, anorganische Salze und ein Dickmittel.

2.3.1.4 Versuchsablauf

Zu Beginn jeder Messperiode wurde eine Qualitätskontrolle durchgeführt. Ziel einer Qualitätskontrolle ist es, durch eine regelmässige Bewertung der Richtigkeit und Präzision die Leistung des Analysators zu validieren. Man misst dazu verschiedene Kontrolllösungen mit genau bekannten Parameterwerten und vergleicht dann die erhaltenen mit den bekannten Werten. Optimal ist eine regelmässige Messung aller Level des Qualitätskontroll-Systems.

Die Kalibrierung erfolgte anhand einer 1-Punkt-Kalibrierung mit einer bekannten Laktatkonzentration von 4 mmol/l. Die 1-Punkt-Kalibrierung wurde automatisch in einem Intervall von jeweils vier Stunden gestartet.

Das Vollblut entnimmt der ABL 700 über eine ausfahrbare Sonde direkt aus der Spritze. Im Spritzenmodus wird ein Volumen von 195 µl benötigt.

Bei der Plasmamessung wurde im Kapillarmodus gearbeitet. Das in eine 35 µl-Kapillare gefüllte Plasma wird über den Kapillareinlass des ABL 700 angesaugt.

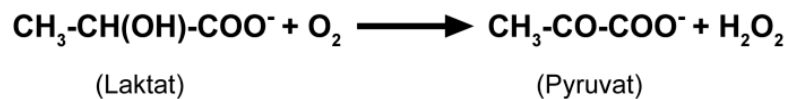
80 Sekunden nach dem Öffnen der Einlassklappe erscheint das Ergebnis der Laktatmessung auf dem Bildschirm. Insgesamt dauert ein Messzyklus samt Reinigung und Spülung 145 Sekunden.

2.3.2 Hitachi 917, Roche Diagnostics, Mannheim

2.3.2.1 Reaktionsprinzip

Der im Routinelabor eingesetzte Hitachi 917 arbeitet bei der Laktatmessung mit einem enzymatischen Farbttest.

L-Laktat wird durch das spezifische Enzym Laktatoxidase zu Pyruvat oxidiert:



Das gebildete Wasserstoffperoxid wird mit Peroxidase zu einem Farbstoff umgesetzt:



Die Intensität der gebildeten Farbe ist der Laktatkonzentration proportional (48).

2.3.2.2 Reagenzien

Die für die oben genannten Reaktionen benötigten Lösungen setzen sich wie folgt zusammen.

Lösung 1: Wasserstoffdonor; Ascorbatoxidase (Gurke) >30 U/ml; Puffer; Konservierungsmittel.

Lösung 2: 4-Aminoantipyrin 1 mg/ml; LOD (bakteriell) >15 U/ml; Peroxidase (Meerrettich) > 24 U/ml; Puffer; Konservierungsmittel.

Testserum zur Qualitätskontrolle: „Lyphocheck“ mit standardisierten Laktatkonzentrationen von 1,31 und 4,65 mmol/l.

2.3.2.3 Versuchsaufbau

Von jeder Probe wurden 200 µl Plasma am Hitachi 917 gemessen. Ergebnisse lagen nach ca. 30 Minuten vor.

2.3.3 Gaschromatograph mit massenspezifischem Detektor (GC/MS), Hewlett Packard, Avondale, USA

Das GC/MS-System besteht aus folgenden Einzelgeräten:

Gaschromatograph HP 5890 Series II

Automatischer Probengeber mit Steuereinheit HP 7673 A

Massenspezifischer Detektor HP 5971 A

Zentrale Steuereinheit „ChemStation“ HP 9000/300 mit Diskettenlaufwerk

„DiskStation“ HP 9153 C, Bildschirm und Drucker

Gerätetechnische Bedingungen waren, wenn nicht anders erwähnt:

Trärgas: Helium

Säule: Restek Rtx-200; 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm

Automatischer Probengeber: Einspritzvolumen 1 µl

Gaschromatograph:

| | |
|--------------------------|-------------------------------------|
| Säulenvordruck: | 8 psi |
| Septumspülung: | 2 mm/min |
| Injektorblocktemperatur: | 280° C |
| Temperaturprogramm: | |
| Ausgangstemperatur: | 100° C |
| Heizrate: | 4° C/min bis 122° C |
| Ausheizen: | 60° C/min bis 310° C für 10 Minuten |
| Gesamtdauer: | 18,63 min |

Massenspektrometer:

| | |
|-----------------------------|--------|
| Interface-Temperatur: | 300° C |
| Temperatur der Ionenquelle: | 170° C |
| Elektronenstossionisierung: | 70 eV |

2.3.3.1 Reagenzien/ Chemikalien zur Probenaufbereitung für die GC/MS-Analyse

Alle Reagenzien waren von p.a.-Qualität oder entsprachen dem Reinheitsgrad „reinst“.

AGA Gas GmbH & Co KG, Hamburg:

Verdichteter Stickstoff

Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA:

Interner Standard: Sodium L-Lactate ¹³C₃;

0,5 g of compound; 20% w/w in 50 ml aqua dest.

Curasan, Kleinostheim: Albumin 20%

Fluka, Neu-Ulm:

2,2-Dimethoxypropan (DMP)

Propylamin

Heptafluorobutyricanhydrid (HFBA)

Merck, Darmstadt:

Ethylacetat

pH-Indikatorpapier mit Farbskala

Perchlorsäure 10%

K₂CO₃, HCl/ MeOHSigma Diagnostics, St.Louis, USA:

Laktat-Eichstandard 120 mg/dl

2.3.3.2 Geräte für die Probenaufbereitung und GC-MessungEppendorf, Hamburg: Reaktionsgefäße 1,5 mlHettich, Tuttlingen:Zentrifuge „Rotanta“; Zentrifuge „Mikroliter“Heidolph, Kehlheim: Vortexer „Reax 2000“Pierce, Rockford, USA: Heizblock “Reakti-Therm Module”Vetter, Ammerbuch: Reaktivials; Pyrex-KulturröhrchenZiemer, Mannheim: GC-Injektionsflaschen 1,0 ml; Bördelkappen;
Glasmikroeinsätze konisch 0,1 ml

2.4 Gaschromatographisch-Massenspektrometrische Untersuchungen

2.4.1 Methodik

Die Durchführung der GC/MS-Analysen erfolgte in Anlehnung an bereits publizierte Methoden (32,37), die ursprünglich für die Untersuchung des Laktatstoffwechsels bei Neugeborenen und Schwangeren entwickelt wurden. Es gab vormals bereits diverse Studien mit ^{14}C -markiertem Laktat, einem radioaktiven Tracer, der jedoch bei Schwangeren und Kindern wegen der Strahlengefahr nicht anwendbar war.

Tserng et al. beschrieben daraufhin das Laktatderivat n-Propylamid-heptafluorobutyrat in Kombination mit $^{13}\text{C}_3$ -markiertem Laktat (interner Standard) und der Gaschromatographie/Massenspektrometrie als eine „ideale Methode zur Untersuchung des Laktatstoffwechsels“ und konnten damit einen durchschnittlichen Variationskoeffizienten von 4,8 % erreichen (32).

^{13}C ist im Gegensatz zu ^{14}C ein stabiles, also nicht radioaktives Isotop. $^{13}\text{C}_3$ bedeutet, dass alle drei C-Atome des Laktatmoleküls Kohlenstoffisotope mit der relativen Atommasse 13 sind.

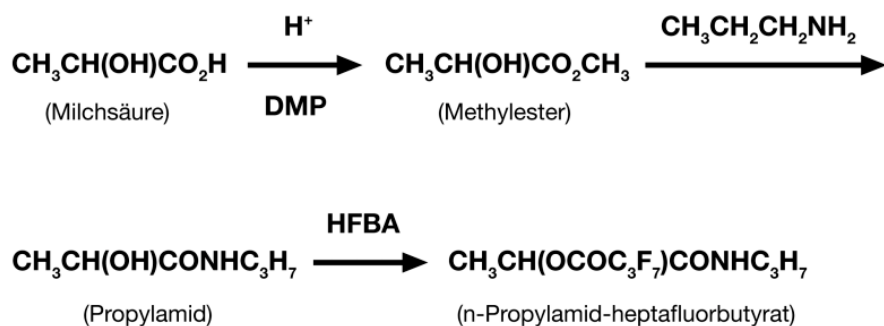
Die von uns verwendete Methode benutzt nun in Anlehnung an Tserng et al. das oben genannte HFBA-Derivat und $^{13}\text{C}_3$ -markiertes Laktat als internen Standard zur Quantifizierung im GC/MS.

^{13}C -markiertes Laktat erfüllt die Anforderungen, die an einen internen Standard gestellt werden. Der interne Standard sollte dem Analyten hinsichtlich der chromatographischen und chemischen Eigenschaften möglichst ähnlich sein. Er darf auf natürliche Weise im Blut nicht vorhanden sein und sollte chromatographisch von anderen Komponenten der Probe getrennt werden können. Ausserdem sollte er auch in geringer Anreicherung noch bestimmbar sein.

Die Hauptschritte der Probenaufarbeitung zur Derivatisierung lauten wie folgt:

1. Bildung von Methylester
2. Bildung von Propylamid
3. Bildung von n-Propylamid-heptafluorobutyrat (Heptafluorobuttersäureester) mittels Heptafluorobutyricanhydrid (HFBA).

Die folgende Reaktionsgleichung beschreibt die Umwandlung von Laktat zum HFBA-Derivat:



2.4.2 Aufarbeitung der Proben

1) Enteiweissung

100 µl Perchlorsäure (10%), eiskalt

+ 100 µl Probe

+ 10 µl interner Standard (IST): 0,5 g Laktat-¹³C₃ 20% w/w in 50 ml a. d. in Eppendorfcups pipettieren, mischen, bei 3000 U/min fünf Minuten zentrifugieren

2) Neutralisierung

Proben mit ca. 100µl K₂CO₃ (14%) auf einen pH 7 einstellen, mischen, bei 3000 U/min fünf Minuten zentrifugieren

3) Einengung

Überstand der zentrifugierten Proben in Pyrexgläser pipettieren, unter Stickstoff vollständig einengen

4) Bildung von Methylester

200 µl 2,2-Dimethoxypropan (DMP)

+ 20 µl HCl/MeOH zum Überstand pipettieren, mischen, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren lassen

5) mischen, zentrifugieren, in Reaktivials umpipettieren

6) Bildung von Propylamid

50 µl Propylamin hinzupipettieren, mischen, mit Deckel verschliessen, im Heizblock 30 Minuten bei 100° C inkubieren lassen, abkühlen, einengen unter Stickstoff

7) 200 µl Ethylacetat hinzupipettieren, mischen, in saubere Reaktivials umpipettieren, einengen unter Stickstoff

8) Bildung von n-Propylamid-heptafluorobutyrat (Heptafluorobuttersäureester)

10 µl Heptafluorobutyricanhydrid (HFBA) hinzupipettieren, fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen, einengen unter Stickstoff

9) Aufnahme in Lösungsmittel

in 60 µl Ethylacetat aufnehmen, mischen, in GC-Vials abfüllen.

2.4.3 GC/MS-Messung

Massenspektren geben Auskunft über die Molekülmasse und die Summenformel der untersuchten Verbindung. Im Massenspektrometer entstehen

durch Spaltreaktionen der Moleküle (Fragmentierung) auch Teilstücke, die sich nachweisen lassen.

Innerhalb des Massenspektrometers befindet sich eine Vakuum-Kammer, in die eine kleine Menge des Analyten in Dampfform eingeleitet wird. Hier werden die Moleküle mit energiereichen Elektronen (70 eV) beschossen, die die Abgabe eines Elektrons aus dem ungeladenen Molekül bewirken (Elektronenstoß-Ionisierung). So entsteht ein positiv geladenes Ion, das Molekül-Ion, das durch elektrische Felder beschleunigt und in einem variablen Magnetfeld abgelenkt wird. Gleiches geschieht mit den Fragmentionen.

Da die Ablenkung eines Ions bei gegebenem Magnetfeld von seiner Masse und Ladung abhängt, kann man durch Variieren des Magnetfeldes Ionen verschiedener Masse in einem Kollektor nacheinander einfangen und registrieren. Die Molekül- und Fragmentionen werden mit m/z angegeben, wobei „m“ die Masse und „z“ die Ladung ist. Die Häufigkeit, mit der ein Ion mit bestimmter Massenzahl auftritt, drückt sich in der Intensität des Detektionssignals aus. Man setzt das stärkste Signal (Peak) gleich 100 und bezieht alle anderen Peaks darauf. Dies führt zur relativen Häufigkeit der Peaks (38).

Zur Erhöhung der Sensitivität und Spezifität der Methode erfolgte die GC/MS-Messung im „Single-Ion-Monitoring“ Modus (sim). Bei dieser Betriebsart werden statt des gesamten Massenbereiches (scan) nur einzelne selektive Ionen erfasst. Durch die längere Messzeit für jedes einzelne Ion wird dessen Nachweisempfindlichkeit um ein Vielfaches gesteigert (33).

2.4.4 Erstellung von Eichkurven

Für die Plasma-Eichkurve wurden zu jeweils 25 µl Albumin (20%) genau festgelegte, steigende Mengen des wässrigen Laktat-Eichstandards

(120 mg/dl) gegeben (Tabelle 2) und nach Zugabe des internen Standards $^{13}\text{C}_3$ -Laktat (IST) wie oben beschrieben aufgearbeitet. Für die Vollblut-Eichkurve wurden anstelle des Albumins 50 μl Vollblut mit einer geringen Laktatkonzentration von 0,8 mmol/l verwendet (Tabelle 3). Die aus den integrierten Peakflächen der Einzelionenmessung von Laktat (A_L) und internem Standard (A_{IST}) gebildeten Verhältnisse (A_L/A_{IST}) können nach Subtraktion des Leerwertes (eine Probe mit internem Standard, aber ohne Zusatz von Analyten) gegen die Laktatkonzentration aufgetragen werden (siehe Abbildungen 10 und 11 der Eichkurven in Kapitel 3).

Tab. 2: Pipettierschema zur Eichkurve für Plasma

| Eichkurve für Plasma: Pipettierschema in μl | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|------|-----|------|------|------|-------|-------|
| Probe | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| Albumin 20% | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| aqua dest. | 75 | 65 | 45 | 65 | 50 | 50 | 25 | 0 | 0 |
| Lsg. A | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 25 | 50 | 100 | 150 |
| Lsg. B | 0 | 0 | 0 | 10 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lsg. C | 0 | 10 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ges. Volumen | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 125 | 175 |
| Konz. mg/dl | 0 | 4,5 | 13,5 | 9 | 22,5 | 30 | 60 | 119,9 | 179,8 |
| Konz. mmol/l | 0 | 0,5 | 1,5 | 1 | 2,5 | 3,33 | 6,66 | 13,32 | 19,98 |
| Lsg. A: Laktat 120 mg/dl (Eichstandard unverdünnt) | | | | | | | | | |
| Lsg. B: Laktat 90 mg/dl (3 ml Lsg.A + 1 ml a.d.) | | | | | | | | | |
| Lsg. C: Laktat 45 mg/dl (1 ml Lsg.B + 1 ml a.d.) | | | | | | | | | |

Tab. 3: Pipettierschema zur Eichkurve für Vollblut

| Eichkurve für Vollblut: Pipettierschema in μl | | | | | |
|--|-----|-----|------|------|------|
| Probe | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Vollblut | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| aqua dest. | 50 | 40 | 25 | 25 | 0 |
| Lsg. A | 0 | 0 | 0 | 25 | 50 |
| Lsg. B | 0 | 10 | 25 | 0 | 0 |
| ges. Volumen | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Konz. mg/dl | 0 | 9 | 22,5 | 30 | 60 |
| Konz. mmol/l | 0 | 1 | 2,5 | 3,33 | 6,66 |
| Lsg. A: Laktat 120 mg/dl (Eichstandard unverdünnt) | | | | | |
| Lsg. B: Laktat 90 mg/dl (3 ml Lsg. A + 1 ml a. d.) | | | | | |

2.4.5 Quantifizierung von Laktat

Man erhält schliesslich die in den Patientenproben der Studie enthaltenen Laktatkonzentrationen, indem man das jeweilige Peakflächenverhältnis $A_L/A_{IST} = A_{327}/A_{330}$ durch die Steigung der Eichkurve dividiert.

2.4.6 Automatische Integration der Chromatogramme

Die Vielzahl der Analysen setzt eine automatisierte Auswertung der Chromatogramme voraus. Hierfür wurde das geräteeigene Softwareprogramm zur Erstellung von kleinen Macros benützt. Folgende Aufgaben wurden von den programmierten Macros erfüllt:

1. Korrekte Integration der Peakflächen (Abtrennung, Basislinienfindung)
2. Eindeutige Identifizierung der Substanzen
3. Zusammenstellung aller gefundenen Peaks und der Peakflächen
4. Erstellung eines Reports mit allen Ergebnissen

2.5 Bestimmung der Unpräzision

Zur Bestimmung der Unpräzision in der Serie wurden mehrere Patientenproben (n) mit unterschiedlich hohen Laktatkonzentrationen (Level 1 mit einer Laktatkonzentration von 1-2 mmol/l, Level 2 mit 3-5 mmol/l und Level 3 mit 8-9 mmol/l) gemessen. Daraus wurde die Unpräzision in der Serie (n = 10) für jede der drei Methoden bestimmt.

Zur Bestimmung der Unpräzision von Tag zu Tag wurde ein Poolserum aus 20 Patientenproben erstellt. Das Poolserum wurde in Proben zu je 1,5 ml abgefüllt, bei -20°C eingefroren und an zehn aufeinander folgenden Tagen aufgearbeitet und gemessen.

2.6 Test auf Interferenzen durch Medikamente

Durch Zugabe der drei Medikamente Dopamin Fresenius (40 mg/ml), Dobutamin Solvay (Dobutaminhydrochlorid, 10 mg/ml) und Arterenol Hoechst (Norepinephrinhydrochlorid, 40 µg/ml) sowohl in therapeutischen als auch in stark überdosierten Konzentrationen wurde der ABL 700 auf etwaige Interferenzen im Vergleich zum Hitachi 917 getestet.

Die Substanzen wurden in Konzentrationen zwischen 0,5 und 100 µg/ml hinzugegeben. Die Verdünnungsreihe gestaltete sich wie folgt:

Tab. 4: Verdünnungsreihe der Medikamente

| Verdünnungsreihe | | | | | | | |
|------------------|-------------|---------|-----------------|--------|-----------------|-------------------|-------------------|
| Nr. | Plasma (µl) | Na (µl) | Medikament (µl) | Faktor | Dopamin (µg/ml) | Dobutamin (µg/ml) | Arterenol (µg/ml) |
| 1 | 200 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 400 | 390 | 10 | 0,0125 | 2 | 2,5 | 0,5 |
| 3 | 200 | 190 | 10 | 0,025 | 4 | 5 | 1 |
| 4 | 200 | 175 | 25 | 0,0625 | 10 | 12,5 | 2,5 |
| 5 | 200 | 150 | 50 | 0,125 | 20 | 25 | 5 |
| 6 | 200 | 100 | 100 | 0,25 | 40 | 50 | 10 |
| 7 | 200 | 0 | 200 | 0,5 | 80 | 100 | 20 |

2.7 Statistische Auswertung

Alle Daten zur Auswertung des Methodenvergleiches wurden mit dem Datenprogramm EVAPAK (EP) von Boehringer Mannheim erfasst.

Die biometrische Auswertung basiert auf dem Regressionsverfahren nach Passing/ Bablok, das Fehlerkomponenten sowohl für die X- als auch für die Y-Variable berücksichtigt (30,31).

Die Ermittlung der Unpräzision erfolgte über das Kalkulationsprogramm Excel von Microsoft.

3. ERGEBNISSE

3.1 Quantifizierung von Laktat mit der GC/MS-Referenzmethode

3.1.1 Massenspektren und Ionenchromatogramme

Die gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung von Laktat in den Blutproben erfolgte nach der in 2.4 bereits beschriebenen Methode.

Abbildung 7 zeigt das Massenspektrum von unmarkiertem Laktat, Abbildung 8 das Massenspektrum des internen Standards $^{13}\text{C}_3$ -Laktat (IST). Zur Identifizierung wurden die Ionen m/z 86, m/z 327 und m/z 241 für Laktat und die Ionen m/z 87, m/z 243 und m/z 330 für den internen Standard verwendet. Zur Quantifizierung diente das Ion m/z 327 für Laktat und das Ion m/z 330 für den internen Standard $^{13}\text{C}_3$ -Laktat.

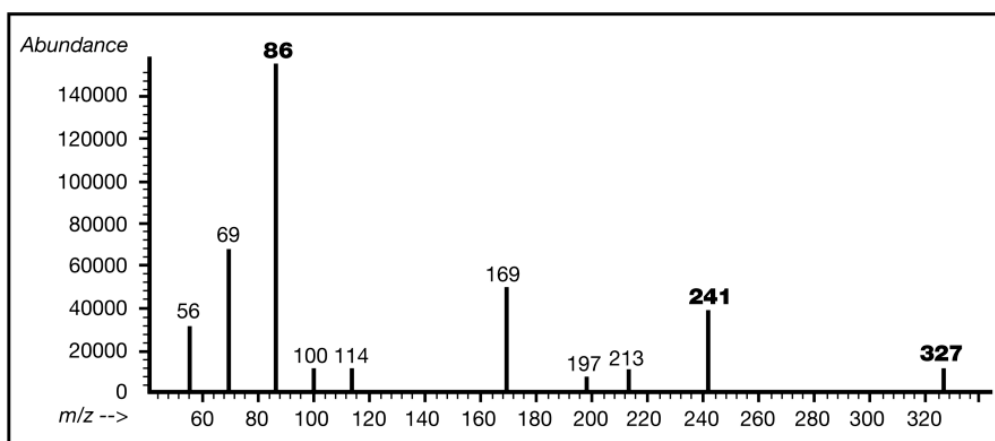


Abb. 7: Massenspektrum ^{12}C -Laktat

In Abbildung 7 erkennt man das Molekülion m/z 327, das alle drei C-Atome enthält und somit der gesamten Summenformel des Laktatderivates entspricht. Daneben sieht man auffällige Fragmente bei den Massenzahlen m/z 241, m/z 169 und m/z 86, die durch die Spaltung zwischen den einzelnen C-Atomen entstehen. Das Ion m/z 241 enthält die C-Atome C2 und C3 des Laktats, während das Ion m/z 86 nur noch das C1-Atom enthält (28).

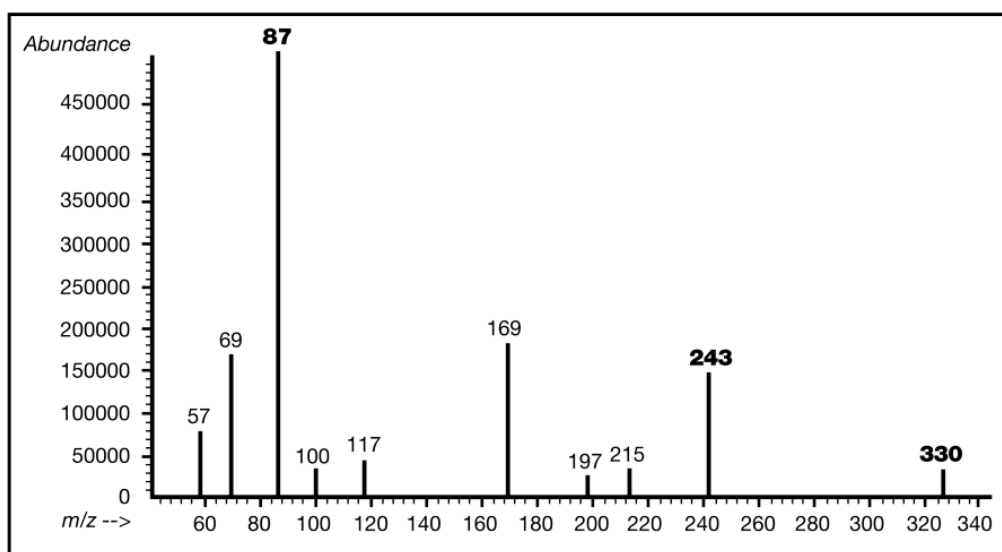


Abb. 8: Massenspektrum interner Standard $^{13}\text{C}_3$ -Laktat

Die folgende Abbildung 9 zeigt den typischen Verlauf eines Ionenchromatogrammes mit den Ionen m/z 327 für Laktat (oben) und m/z 330 (unten) für den internen Standard. Die Retentionszeit für Laktat und internen Standard liegt bei 6,7 Minuten.

Wie das Ionenchromatogramm zeigt, konnte durch die geeignete Wahl der GC-Säule eine sehr gute Trennung und Peakform erzielt werden, die zur Qualität der Methode mit beigetragen hat.

Die Nachweisgrenze für Laktat in Plasma lag bei 0,001 mmol/l. Dies entspricht 0,009 mg/dl).

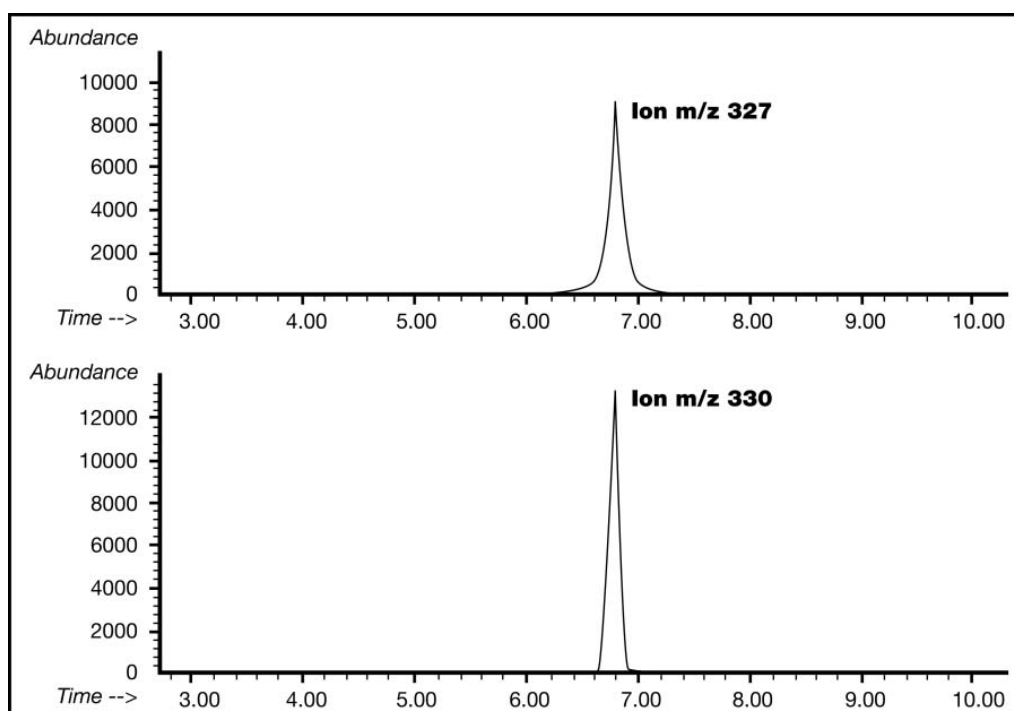


Abb. 9: Ionenchromatogramm von Laktat (oben) und internem Standard (unten)

3.1.2 Eichkurven

Die aus den integrierten Peakflächen der Einzelionenmessung von Laktat (A_L) und internem Standard (A_{IST}) gebildeten Verhältnisse (A_L/A_{IST}) wurden nach Subtraktion des Leerwertes gegen die Konzentration des Laktats aufgetragen. A_L entspricht der Peakfläche des Ions m/z 327 und A_{IST} der Peakfläche des Ions m/z 330.

Die Erstellung der Eichkurve erfolgte durch lineare Regression mit dem Korrelationskoeffizienten r als Maß für die lineare Abhängigkeit und die Qualität der Eichkurve.

Die Berechnung der linearen Regression für $A_L/A_{IST} = f(C_L)$ ergab für Plasma eine Eichgerade mit dem Achsenabschnitt $y = 0$ und der Steigung $m = 0,3065$ (Abbildung 10). Wegen $y = m \cdot x$ lautet die Geradengleichung somit $A_L/A_{IST} = 0,3065 \cdot C_L$.

Der Korrelationskoeffizient ist $r = 0,9990$.

Zur rechnerischen Ermittlung einer unbekanntem Laktatkonzentration wurde die Gleichung nach C_L aufgelöst:

$$C_{L\text{Plasma}} = [(A_L/A_{\text{IST}}) / 0,3065] \text{ mmol/l.}$$

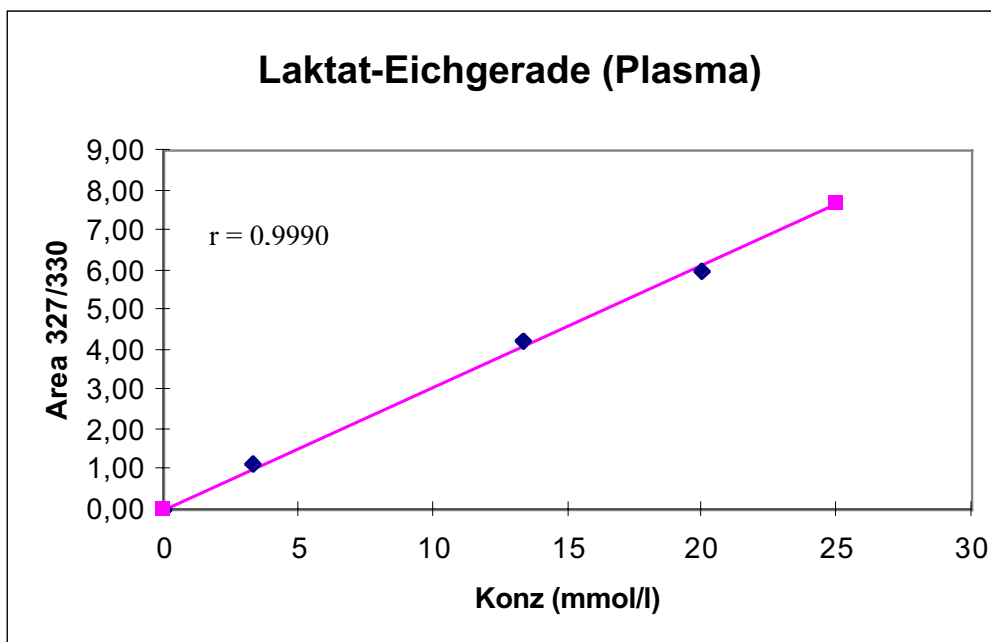


Abb. 10: Eichkurve GC/MS-Analyse von Laktat in Plasma

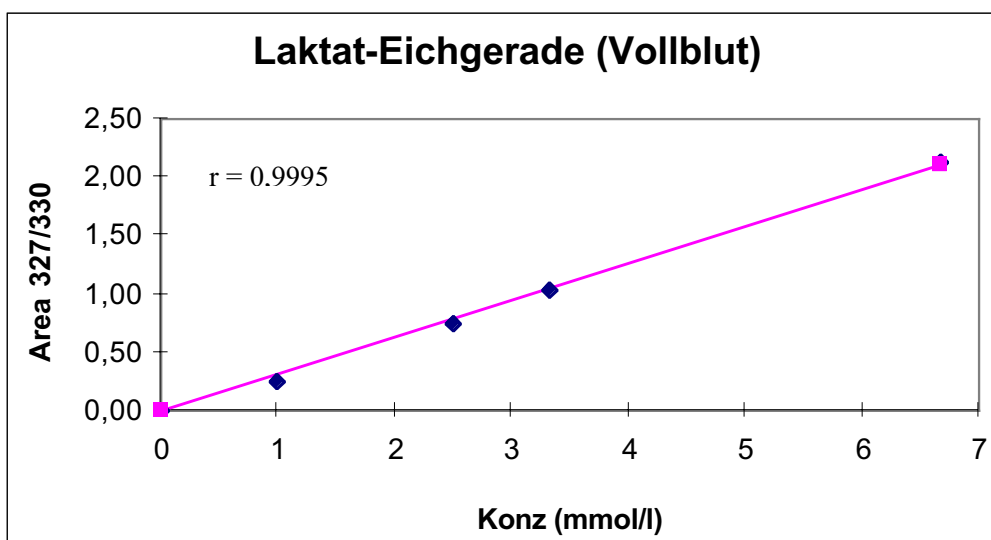


Abb. 11: Eichkurve GC/MS-Analyse von Laktat in Vollblut

Für Vollblut wurde analog eine Eichkurve erstellt mit dem Achsenabschnitt $y = 0$, der Steigung $m = 0,3157$ und dem Korrelationskoeffizienten $r = 0,9995$ (Abbildung 11). So ergab sich für die Laktatkonzentration in Vollblut die Gleichung $C_{LVollblut} = [(A_L/A_{IST})/0,3157]$ mmol/l.

Basierend auf diesen Eichkurven wurden alle Werte der Studie ermittelt.

Die einzelnen Eichkurven für Plasma verliefen linear für Laktatkonzentrationen zwischen 0,4 und 19,98 mmol/l mit Korrelationskoeffizienten r zwischen 0,9904 und 0,9990.

Die einzelnen Eichkurven für Vollblut verliefen linear für Laktatkonzentrationen zwischen 0,5 und 6,66 mmol/l mit Korrelationskoeffizienten r zwischen 0,9923 und 0,9995.

3.2 Bestimmung der Unpräzision

Zur Bestimmung der Unpräzision in der Serie wurden mehrere Patientenproben (n) mit unterschiedlich hohen Laktatkonzentrationen (Level 1 mit einer Laktatkonzentration von 1-2 mmol/l, Level 2 mit 3-5 mmol/l und Level 3 mit 8-9 mmol/l) gemessen.

Daraus wurde die Unpräzision in der Serie ($n = 10$) für jede der drei Methoden bestimmt. Es ergaben sich folgende Werte für die Variationskoeffizienten (VK) von ABL 700, Hitachi 917 und GC/MS:

Tab. 5: Unpräzision in der Serie

| Analysegerät | Anzahl der Messungen/Probe | Laktat-konzentration (mmol/l) | VK (%) | Medium |
|--------------|----------------------------|-------------------------------|--------|----------|
| ABL 700 | 10 | 1,2 | 0,1 | Plasma |
| | | 3,2 | 2,1 | |
| | | 8,7 | 0,8 | |
| Hitachi 917 | 10 | 1,2 | 1,3 | Plasma |
| | | 4,6 | 1,4 | |
| | | 9,9 | 0,9 | |
| GC/MS | 10 | 1,3 | 2,1 | Plasma |
| | | 4,3 | 0,7 | |
| | | 9,9 | 2,6 | |
| ABL 700 | 10 | 1,4 | 2,7 | Vollblut |
| | | 4,0 | 2,9 | |
| | | 9,5 | 0,9 | |
| GC/MS | 10 | 1,3 | 3,5 | Vollblut |
| | | 3,0 | 1,4 | |
| | | 9,0 | 3,1 | |

Zur Bestimmung der Unpräzision von Tag zu Tag wurde eine Kontrolllösung (Poolserum) bei den einzelnen Methoden mitgeführt und an zehn aufeinander folgenden Tagen gemessen. Es ergaben sich folgende Werte für die Variationskoeffizienten:

Tab. 6: Unpräzision von Tag zu Tag

| Analysegerät | Anzahl der Tage | VK (%) der Kontrolle |
|--------------|-----------------|----------------------|
| ABL 700 | 10 | 1,3-1,6 |
| Hitachi 917 | 10 | 2,6-3,7 |
| GC/MS | 10 | 1,3-3,6 |

3.3 Methodenvergleich

Der Methodenvergleich richtete sich nach W. Bablock/ H. Passing. Die Prüfung der relativen Richtigkeit („Vergleichbarkeit“) der ABL-700-Methode zur Laktatbestimmung erfolgte durch Vergleich mit der Hitachi-917-Methode und der GC/MS-Methode.

Als Mass für die Linearität der Messung wurde das Regressionsverfahren nach Bablock/ Passing zur Berechnung der Strukturgeraden angewendet, der Korrelationskoeffizient r ermittelt und das Ergebnis anhand einer Grafik dargestellt. Der Cusumtest mit der Frage auf Abweichung von der Linearität wurde durchgeführt.

Abbildung 12 zeigt den Methodenvergleich zwischen ABL 700 und Hitachi 917 für Plasma.

Abbildung 13 zeigt den Methodenvergleich zwischen ABL 700 und GC/MS für Plasma.

Abbildung 14 zeigt den Methodenvergleich zwischen Hitachi 917 und GC/MS für Plasma.

Abbildung 15 zeigt den Methodenvergleich zwischen ABL 700 und GC/MS für Vollblut.

3.3.1 ABL 700: Methodenvergleich mit dem Hitachi 917 für Plasma

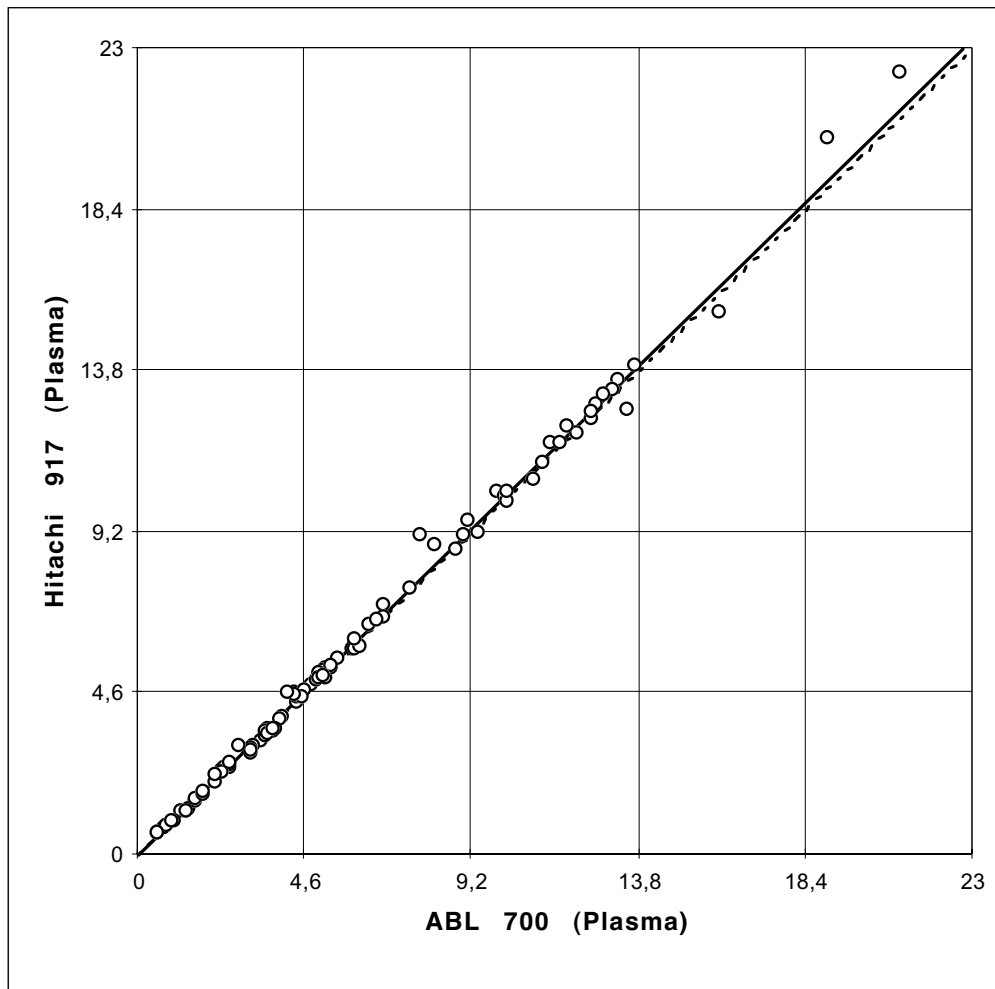


Abb. 12: Methodenvergleich ABL versus Hitachi für Plasma

Regression:

$$y = 1,013 \cdot x - 0,016$$

$$n = 99$$

$$r = 0,998$$

Der Cusumtest auf Abweichung von der Linearität war nicht signifikant.

3.3.2 ABL 700: Methodenvergleich mit dem GC/MS für Plasma

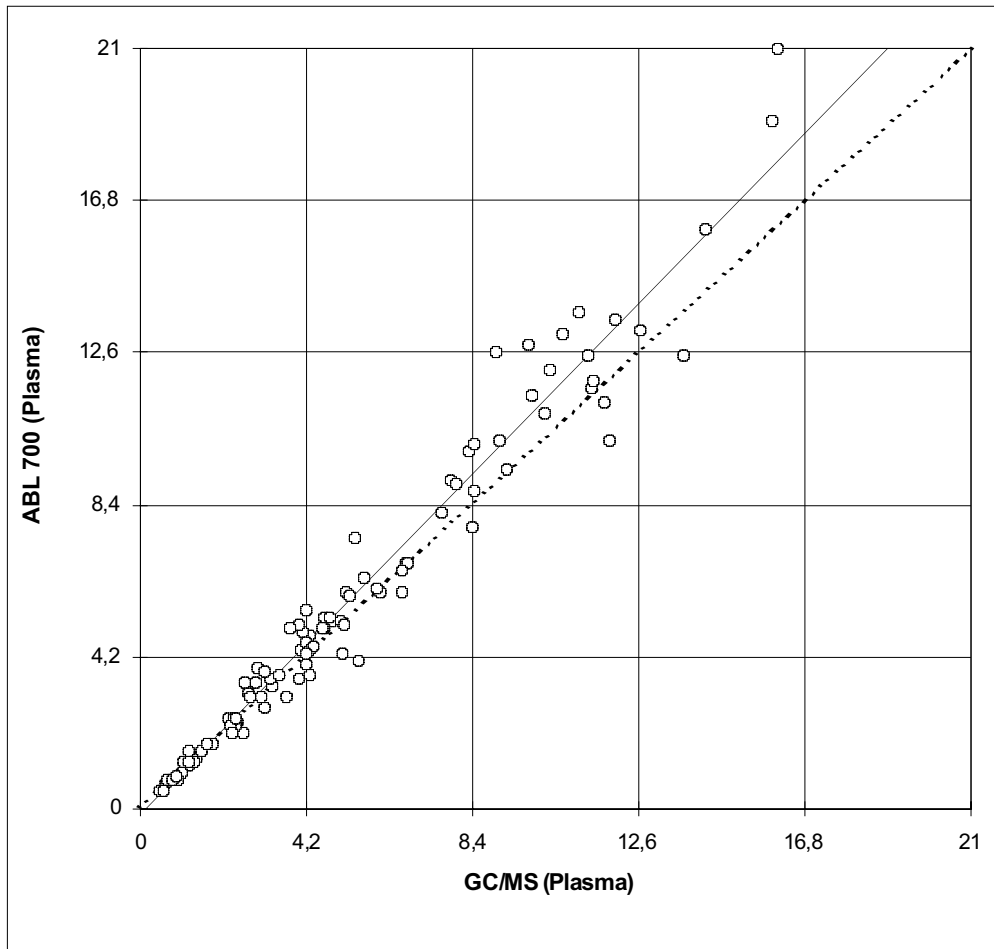


Abb. 13: Methodenvergleich ABL versus GC/MS für Plasma

Regression:

$$y = 1,118 \cdot x - 0,152$$

$$n = 99$$

$$r = 0,980$$

Der Cusumtest auf Abweichung von der Linearität war nicht signifikant.

3.3.3 Hitachi 917: Methodenvergleich mit dem GC/MS für Plasma

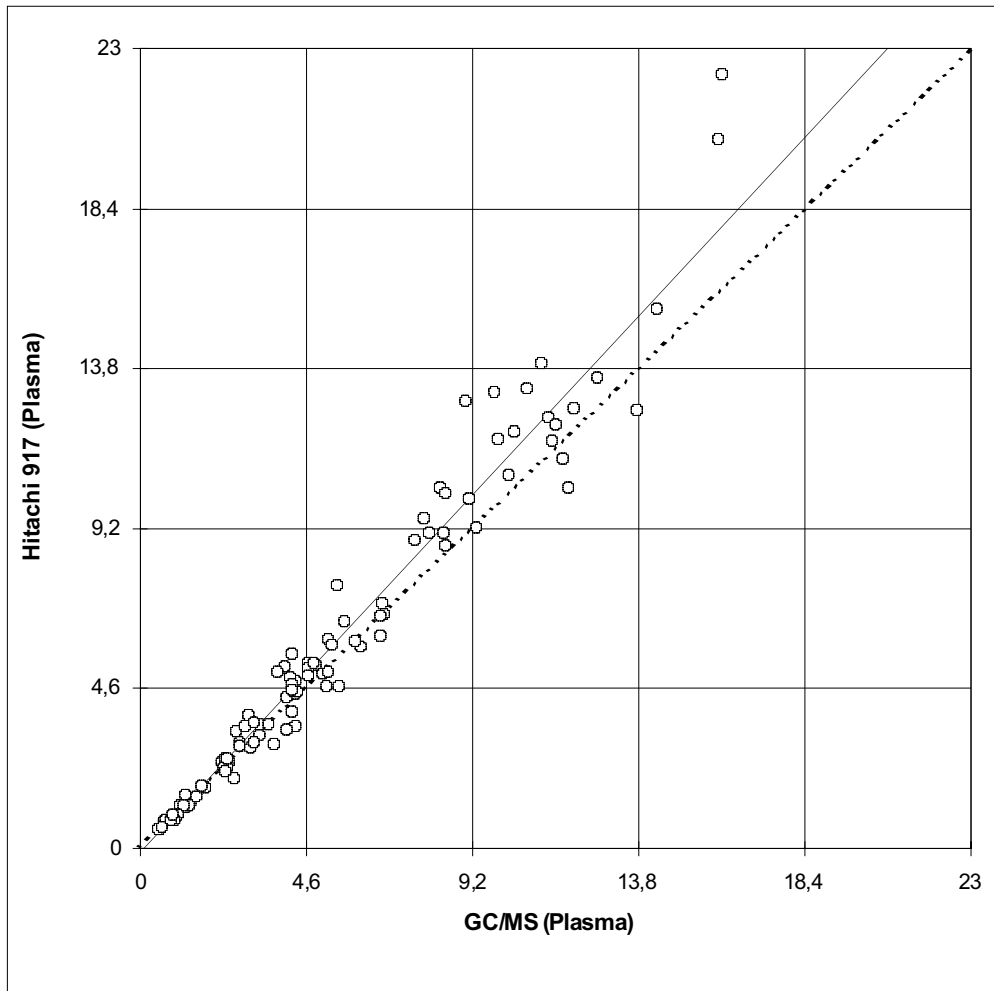


Abb. 14: Methodenvergleich Hitachi 917 versus GC/MS für Plasma

Regression:

$$y = 1,116 \cdot x - 0,132$$

$$n = 99$$

$$r = 0,978$$

Der Cusumtest auf Abweichung von der Linearität war nicht signifikant.

3.3.4 ABL 700: Methodenvergleich mit dem GC/MS für Vollblut

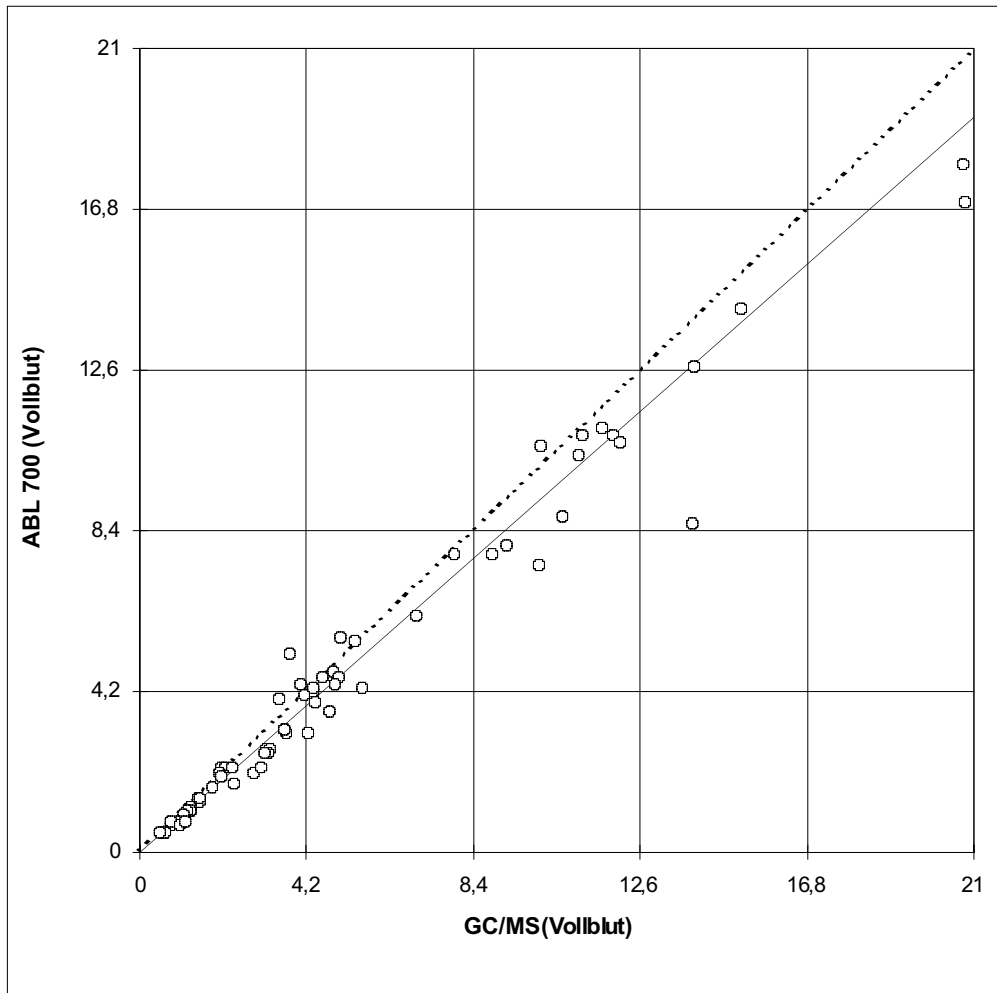


Abb. 15: Methodenvergleich ABL 700 versus GC/MS für Vollblut

Regression:

$$y = 0,914 \cdot x + 0,0$$

$$n = 66$$

$$r = 0,985$$

Der Cusumtest auf Abweichung von der Linearität war nicht signifikant.

3.4 Test auf Interferenzen durch Medikamente

In Anlehnung an die in 2.6 erstellte Verdünnungsreihe wurden die Medikamente Dopamin Fresenius (40 mg/ml), Dobutamin Solvay (Dobutaminhydrochlorid, 10 mg/ml) und Arterenol Hoechst (Norepinephrinhydrochlorid, 10µg/ml) in verschiedenen Konzentrationen zwischen 0,5 und 100 µg/ml dem Plasma hinzugegeben. So sollten ABL 700 und Hitachi 917 vergleichend auf etwaige Interferenzen durch Störgrößen getestet werden.

Die Prozentzahlen in Tabelle 7 geben die Abnahme der Laktatkonzentration nach Zugabe der Medikamente gegenüber dem ursprünglichen Messwert der jeweiligen Proben an.

Tab. 7: Einfluss von Medikamenten auf die Laktatanalyse. Die Prozentzahlen geben die Abnahme gegenüber dem ursprünglichen Messwert an.

| Probe | ursprünglicher Messwert (mmol/l) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------------------|----------------------------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| Dopamin (µg/ ml) | | 2,0 | 4,0 | 10,0 | 20,0 | 40,0 | 80,0 |
| ABL 700 | 1,8 | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 6% |
| Hitachi 917 | 1,8 | 0% | 1% | 3% | 10% | 26% | 44% |
| Dobutamin (µg/ ml) | | 2,5 | 5,0 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 100,0 |
| ABL 700 | 1,9 | 5% | 8% | 8% | 8% | 10% | 14% |
| Hitachi 917 | 1,9 | 1% | 1% | 3% | 9% | 19% | 39% |
| Arterenol (µg/ ml) | | 0,5 | 1,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 20,0 |
| ABL 700 | 1,8 | 0% | 0% | 0% | 0% | 3% | 3% |
| Hitachi 917 | 1,9 | 11% | 16% | 34% | 53% | 78% | 91% |

4. Diskussion

4.1 Quantifizierung von Laktat mit der GC/MS-Referenzmethode

Die hier benutzte GC/MS-Methode zur Bestimmung von Laktat in Plasma und Vollblut (32) hat sich als zuverlässige, routinetaugliche und im vorliegenden Fall vor allem als geeignete Referenzmethode für den Methodenvergleich erwiesen. Bei einer Gesamtzahl von 100 Proben mit über 200 Einzelbestimmungen lagen die durchgeführten Kontrollen immer im vorgegebenen Bereich.

Verglichen mit der Studie von Tserng et al. (32), die einen Variationskoeffizienten von 4,8 % erreichte, konnte die Präzision in der vorliegenden Studie noch leicht gesteigert werden. Dies ist durch Variationskoeffizienten < 3 % in Plasma belegt.

Die nach mehreren Versuchen festgelegten gaschromatographischen Bedingungen erlaubten bei ausreichender Sensitivität der Messung und Trennung der Komponenten dennoch eine kurze Analysendauer von 7 Minuten.

Die sehr gute Qualität dieser Methode ist durch folgende Ergebnisse belegt:

1. Die Variationskoeffizienten lagen für Plasma zwischen 0,7 und 2,6 % und für Vollblut zwischen 1,4 und 3,5 %.
2. Die Nachweisgrenze für Laktat in Plasma lag bei 0,001 mmol/l. Dies entspricht 0,009 mg/dl.
3. Alle Eichkurven wiesen sowohl für die Plasma-, als auch für die Vollblutaufarbeitung Korrelationskoeffizienten von $r > 0,99$ (vgl. 3.1.2), d. h. eine sehr gute Linearität im gesamten Messbereich auf.
4. Eine deutliche Abtrennung, klare Basislinienfindung und somit eine korrekte Integration der Peakflächen waren möglich.

4.2 Bestimmung der Unpräzision

Um die Präzision aller drei Geräte zu bestimmen, wurden Zehnfach-Bestimmungen in der Serie durchgeführt (vgl. 3.2, Tabelle 5).

Für Plasma ergaben sich am ABL 700 Variationskoeffizienten in der Serie von 0,1 bis 2,1 % im Laktatbereich von 1,2 bis 8,7 mmol/l.

Am Hitachi 917 ergaben sich Variationskoeffizienten von 0,9 bis 1,4 % im Laktatbereich von 1,2 bis 9,9 mmol/l und die GC/MS-Methode wies Variationskoeffizienten von 0,7 bis 2,6 % im Laktatbereich von 1,3 bis 9,9 mmol/l auf. Diese Ergebnisse können durchweg als gut bewertet werden. Die Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen fordert für die Laktatmessung in Plasma Variationskoeffizienten <6 % (43).

Für Vollblut lagen die Werte insgesamt etwas höher: Am ABL 700 ergaben sich Variationskoeffizienten in der Serie von 0,9 bis 2,9 % im Laktatbereich von 1,4 bis 9,5 mmol/l. Am GC/MS wurden Variationskoeffizienten von 1,4 bis 3,5 % im Laktatbereich von 1,3 bis 9,0 mmol/l erreicht.

Bei der Präzision von Tag zu Tag (n = 10 Tage) wurde ein vorportioniertes Poolserum verwendet (vgl. 3.2, Tabelle 6). Hier ergaben sich für die Variationskoeffizienten von Tag zu Tag Werte von 1,3 % (im Laktatbereich von 4 mmol/l) bis 1,6 % (im Laktatbereich von 9 mmol/l) am ABL 700, am Hitachi 917 waren es 2,6 bis 3,7 % und am GC/MS 1,3 bis 3,6 %.

Das in der vorliegenden Studie zu testende Radiometer ABL 700 erbrachte mit Variationskoeffizienten zwischen 0,1 und 2,9 % gute bis sehr gute Präzisionswerte.

4.3 Methodenvergleich

Für Plasma ergab der Vergleich zwischen ABL 700 und Hitachi 917 eine deutliche Übereinstimmung (vgl. 3.3.1, Abbildung 12). Die Regressionsgerade über dem möglichen Messbereich von 0,5 bis 22 mmol/l Laktat wurde ermittelt. Dabei lag der Korrelationskoeffizient r bei 0,998. Die Geradensteigung betrug 1,013. Der Cusumtest auf Abweichung von der Linearität war nicht signifikant. Insgesamt stimmen die Geräte ABL 700 und Hitachi 917 also sehr gut überein.

In einer Studie von Wahl et al. (10) wurde noch eine geringere Übereinstimmung zwischen dem Vorgängermodell ABL 625 und dem Hitachi 747 bei der Laktatbestimmung in höheren Laktatbereichen beschrieben. Grund hierfür war der Hitachi 747, welcher noch mit der älteren LDH/ GPT-Methode (Laktatdehydrogenase/ Glutamat-Pyruvat-Transaminase) arbeitete. Die neue Methode des Hitachi 917 mit Laktatoxidase und Peroxidase ist dieser nun deutlich überlegen. An der Methode des ABL 700 wurden gegenüber dem ABL 625 keine Änderungen vorgenommen.

Im Methodenvergleich mit der GC/MS-Referenz wies der ABL 700 für Plasma ebenfalls eine gute Übereinstimmung auf (vgl. 3.3.2, Abbildung 13). Im oberen Laktatbereich (>10 mmol/l) lagen die Ergebnisse des ABL 700 etwas höher als die der GC/MS-Analyse. Die Regressionsgerade über dem möglichen Messbereich von 0,5 bis 16 mmol/l ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,980$. Die Steigung betrug 1,118. Der Cusumtest auf Abweichung von der Linearität fiel nicht signifikant aus.

Der Vergleich von Hitachi 917 und GC/MS ergab für Plasma schliesslich ebenfalls eine gute Korrelation (vgl. 3.3.3, Abbildung 14). Im oberen Laktatbereich mit Konzentrationen über 10 mmol/l lieferte der Hitachi 917 etwas höhere Ergebnisse als die GC/MS-Analyse. Die Regressionsgerade über dem möglichen Messbereich von 0,5 bis 16 mmol/l ergab einen

Korrelationskoeffizienten von $r = 0,978$ und eine Steigung von 1,116. Der Cusumtest auf Abweichung von der Linearität war nicht signifikant.

Hier fällt eine Gemeinsamkeit von ABL 700 und Hitachi 917 auf, deren beider Werte leicht über denen des GC/MS lagen. Gründe dafür liegen in der unterschiedlichen Kalibrierung der Geräte. Bei ABL 700 und Hitachi 917 erfolgte lediglich eine 1-Punkt-Kalibrierung, während am GC/MS eine 5-Punkt-Kalibrierung über den gesamten Messbereich durchgeführt wurde.

Für Vollblut wurden lediglich die Geräte ABL 700 und GC/MS miteinander verglichen.

Der Vergleich von ABL 700 und GC/MS für Vollblut ergab eine akzeptable Übereinstimmung (vgl. 3.3.4, Abbildung 15). Hier lagen die Ergebnisse des ABL 700 ab einer Laktatkonzentration von 5 mmol/l unter denen des GC/MS. Die Regressionsgerade über dem möglichen Messbereich von 0,5 bis 14 mmol/l wies einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,985$ und eine Steigung von 0,914 auf. Der Cusumtest auf Abweichung von der Linearität fiel auch für Vollblut nicht signifikant aus (34,35,36).

Zwischen den getesteten Messmethoden konnten im Hinblick auf die verschiedenen Medien Plasma und Vollblut keine signifikanten Unterschiede erfasst werden.

Insgesamt wurde häufig beobachtet, dass das Messergebnis einer Probe sowohl am ABL 700 als auch am GC/MS in Plasma höher lag als das Messergebnis derselben Probe in Vollblut. Ein Grund hierfür könnte das Zentrifugieren der Proben sein.

Nach der Entnahme der benötigten Vollblutmenge aus der Monovette musste das Blut für drei Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert werden, um Plasma als Überstand zu erhalten. Beim Zentrifugieren kann es zum Platzen von Zellen kommen, wodurch zusätzliches Laktat aus den Erythrocyten freigesetzt wird.

Auf diese Weise lässt sich in ein und derselben Probe eine höhere Laktatkonzentration in Plasma als in Vollblut erklären.

4.4 Test auf Interferenzen durch Medikamente

Durch Zugabe der drei im Intensivbereich gängigen Substanzen Dopamin, Dobutamin und Norepinephrinhydrochlorid sowohl in therapeutischen als auch in stark überdosierten Konzentrationen wurde der ABL 700 im Vergleich mit dem Hitachi 917 auf etwaige Interferenzen geprüft (vgl. 3.4, Tabelle 7).

Auf Dopamin reagierte der ABL 700 bis zu einer Konzentration von 40 µg/ml unempfindlich, erst bei einer weiteren Verdopplung auf 80 µg/ml ergab sich eine Abnahme des gemessenen Laktatwertes um 6 % des Originalwertes. Der Hitachi 917 hingegen wies bereits ab einer Konzentration von 10 µg/ml Interferenzen auf. Bei einer Dopaminkonzentration von 40 µg/ml fiel der gemessene Laktatwert bereits um 26 %, bei einer Dopamingabe von 80 µg/ml sogar um 44 % des Originalwertes.

Ebenfalls unempfindlich zeigte sich der ABL 700 auf die Substanz Norepinephrinhydrochlorid (Arterenol) bis zu einer Konzentration von 10 µg/ml. Selbst bei einer Konzentration von 20 µg/ml verringerte sich der Messwert nur um 3 % des Ausgangswertes. Am Hitachi 917 hatte Arterenol schon ab 0,5 µg/ml deutliche störende Auswirkungen: der Messwert sank um 11 % des Originallaktatwertes. Bei der Maximalgabe von 20 µg/ml ergab sich ein Messwert, der bereits um 91 % des ursprünglichen Laktatwertes verringert war.

Im Test mit Dobutamin sank der Laktatmesswert des ABL 700 bei Konzentrationen von 5 bis 25 µg/ml um 8 % und bei 50 µg/ml um 10 % des Originalwertes. Der Hitachi 917 zeigte sich bis zu einer Dosis von 5 µg/ml relativ unempfindlich. Bei der Maximaldosis von 100 µg/ml verringerte sich der Messwert am Hitachi 917 jedoch um 39 % des Ausgangswertes, während sich am ABL 700 eine Abnahme um 14 % ergab.

Der ABL 700 wies demnach keine signifikanten Abweichungen durch gängige Medikamente auf. Dieses geringe Mass an Interferenzen wird durch die Multischichtmembran des Radiometers gewährleistet. Die innere

Membran ist eine Interferenz-limitierende, aber für H_2O_2 durchlässige Membran. Interferenzen können nur Substanzen verursachen, die auch an der Elektrode oxidiert werden. Die innere Membran jedoch begrenzt die Anzahl derer Substanzen, die zur Elektrode transportiert und dort oxidiert werden können.

Das Prinzip der Membran konnte durch die vorliegende Studie bestätigt werden.

4.5 Eignung des ABL 700 im Point-of-Care Testing

Unter Point-of-Care-Testing (POCT) versteht man heute die patientennahe, meist am Krankenbett vorgenommene Durchführung von Laboruntersuchungen, die unmittelbar zu therapeutischen Konsequenzen führen (39,40).

Ein wesentlicher Vorteil des POCT ist der Zeitgewinn bei Analyten (u.a. Laktat), die Aussagen über Vitalfunktionen des Patienten erlauben. In Notfallsituationen stellt eine zu lange Antwortzeit („Turn-Around-Time“) der Laboranalysen ein grosses Problem dar, da bis zum Eintreffen der Laborresultate oft keine weiterreichenden Entscheidungen für das Patientenmanagement getroffen werden können oder dürfen (39).

Das Radiometer ABL 700 erfüllt alle folgenden POCT-Kriterien:

1. Eine patientennahe Durchführung von Laboranalysen ist im Rahmen der unmittelbaren Patientenversorgung möglich.
2. Ein Einsatz in klinisch sensiblen Bereichen, wie Notaufnahme, Intensivstation, OP, Aufwachraum, KreiBsaal etc. ist möglich.
3. Ein eingeschränktes, dem Patientengut entsprechendes Analysenspektrum fördert den schnellen Überblick: der ABL 700 ermittelt Blutgase, Elektrolyte und Metabolite.
4. Die Durchführung der Tests muss durch Personal möglich sein, das in der Regel keine eingehende medizinisch-technische Ausbildung und Erfahrung auf dem Gebiet der Laboratoriumsdiagnostik

aufweist. So muss zum Beispiel bei der Laktatanalyse am ABL 700 das Blut nicht aufbereitet, sondern lediglich über den Spritzenmodus eingegeben werden.

5. Eine raschest mögliche Verfügbarkeit von Ergebnissen zur zeitnahen Therapiekontrolle muss gewährleistet sein: das Ergebnis einer Laktatanalyse am ABL 700 liegt nach 80 Sekunden vor.

Der ABL 700 eignet sich somit gut für den Einsatz im Point-of-Care-Testing.

5. Zusammenfassung

In der Überwachung kritisch kranker Patienten kann der Blutlaktatwert eine Schlüsselrolle spielen. Heute sind die meisten Blutgasanalytoren deshalb zusätzlich mit ionenselektiven Elektroden für die Messung von Elektrolyten und Metaboliten wie Glukose und Laktat ausgestattet.

In der vorliegenden Studie wurde das Radiometer ABL 700, das mit solch einer ionenselektiven Elektrode arbeitet, am Beispiel der Laktatbestimmung in Plasma und Vollblut evaluiert.

Das mobile Tischgerät ABL 700 ist einfach in der Handhabung, da die Blutprobe vor der Messung nicht aufbereitet werden muss, sondern direkt aus der Spritze über eine Einlassklappe zugeführt wird. Auch die Bedienung des Gerätes mittels Touchscreen ist aufgrund der übersichtlichen Menüführung unkompliziert. Innerhalb einer Messzeit von 80 Sekunden wird die Laktatkonzentration der Probe bestimmt.

Die ABL 700-Methode beruht auf einer ionenselektiven Elektrode mit Laktatoxidase als Enzym. Der Methodenvergleich erfolgte mit der Laktatoxidase/ Peroxidase-Methode des Hitachi 917 und der GC/MS-Analyse als Referenzmethode. Die GC/MS-Analyse basiert auf dem Derivat n-Propylamid-heptafluorobutyrat und $^{13}\text{C}_3$ -markiertem Laktat als internem Standard.

Das Radiometer ABL 700 ist hinsichtlich der Präzision und Reproduzierbarkeit mit dem Hitachi 917 und der GC/MS-Methode durchaus vergleichbar. Es wurden Variationskoeffizienten $< 3\%$ für Bestimmungen sowohl in der Serie als auch von Tag zu Tag gemessen. Damit übertrifft der ABL 700 beide Vergleichsmethoden in seiner Präzision.

Im Methodenvergleich zeigte sich für die Laktatmessung in Plasma eine deutliche Übereinstimmung des ABL 700 mit dem Hitachi 917, wobei beide Geräte auch gut mit der GC/MS-Referenzmethode korrelierten. Sowohl ABL 700 als auch Hitachi 917 lieferten im oberen Laktatbereich etwas höhere Werte als die GC/MS-Analyse. Im Vergleich mit der Referenz bestand jedoch keine signifikante Abweichung von der Linearität. In Vollblut korrelierte der ABL 700 ebenfalls akzeptabel mit dem GC/MS. Hier lagen die Messwerte des ABL 700 bereits im mittleren Laktatbereich unter denen des GC/MS, jedoch ohne eine signifikante Abweichung von der Linearität.

Im Test auf Interferenzen durch gängige Intensiv-Medikamente zeigte sich der ABL 700 bis in hohe Konzentrationsbereiche unempfindlich. Medikationen in Dosen bis zu 40 µg/ml (Dopamin, Dobutamin) und 10 µg/ml (Arterenol) hatten keinerlei Auswirkungen auf die Laktatmessung des ABL 700, während sich die Messwerte am Hitachi 917 um 44 % (Dopamin), 39 % (Dobutamin) und 91 % (Arterenol) des Ausgangswertes verringerten.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie, dass der ABL 700 eine Methode von guter Präzision und Reproduzierbarkeit ist und nur geringe Interferenzen durch gängige Medikamente aufweist.

Am ABL 700 kann schnell und zuverlässig Laktat gemessen werden, wodurch sich diese Methode gerade für einen Einsatz im Point-of-Care-Testing eignet.

6. Literaturverzeichnis

1. Luft, D. (1981)
Klinische Bedeutung der Hyperlaktatämie
Thieme Verlag Stuttgart
2. Knichwitz, G. (1996)
Die Bedeutung von Laktat in der Intensivmedizin
Radiometer- Info zur Zeit, 7, 1-3
3. Vincent, J.-L. (1995)
Lactate levels in critically ill patients
Acta Anaesthesiol Scand, 39, Supplementum 107, 261- 266
4. Kruse, J.A., Haupt, M.T., Puri, V.K., Carlson, R.W.(1990)
Lactate levels are predictors of the relationship between oxygen
delivery and consumption
Chest, 98, 959-962
5. Biedler, A., Risch, A., Mertzluft, F. (1998)
Bestimmung der Laktatkonzentration in Blut und Plasma mit
Biosensoren – Ein Methodenvergleich
Anaesthesist, 47, 968-974
6. Rodziewicz, M., Jung, K. (1996)
Is lactate diagnostics really that simple?
Blood Gas News, 5, 6-9
7. Meyfeldt, B. K. (1997)
Die Blutgasfibel
Radiometer Verlags-GmbH, 1. Auflage, Willich
8. Mizock, B. (1987)
Controversies in lactic acidosis: Implications in critically ill patients
JAMA, 258, 497-501
9. Bonde, J. (1997)
Value of blood lactate measurements for assessing acutely ill patients
AS 126, 3, 1-2

10. Wahl, H.G. (1998)
Auswertung des neuen Radiometer ABL System 625 für die Analyse von Elektrolyten und Metaboliten in Vollblut
26. Nordischer Kongress für Klinische Chemie, Turku, Finnland
11. Hatherill, M., Sajjanhar, T., Tibby, S.M., Champion, M.P., Anderson, D., Marsh, M.J., Murdoch, I.A. (1997)
Serum lactate as a predictor of mortality after paediatric cardiac surgery
Arch Dis Child, 77, 235-238
12. Siegel, L.B., Dalton, H.J., Hertzog, J.H., Hopkins, R.A., Hannan, R.L., Hauser, G.J. (1996)
Initial postoperative serum lactate levels predict survival in children after open heart surgery
Intensive Care Med, 22, 1418-1423
13. Marnitz, U., Dauberschmidt, R., Mrochen, H. (1994)
The value of blood lactate determination in the post-operative phase
Anaesthesiol Reanim, 19, 103-109
14. Abramson, D., Scalea, T.M., Hitchcock, R. (1993)
Lactate clearance and survival following injury
J Trauma, 35, 584-589
15. Bakker, J., Coffernils, M., Leon, M. (1991)
Blood lactate levels are superior to oxygen derived variables in predicting outcome in human septic shock
Chest, 99, 956-962
16. Peretz, D.I., Scott, H.M., Duff, J. (1984)
The relative prognostic value of lactate and hemodynamic measurement in early shock
Anesthesia, 39, 750-755
17. Manikis, P., Jankowski, S., Zhang, H. (1995)
Serial blood lactate levels are correlated to organ failure and mortality following trauma
Am J Emerg Med, 13, 619-622

18. Aduen, J., Bernstein, W.K., Khastgir, T. (1994)
The use and clinical importance of a substrate-specific electrode for rapid determination of blood lactate concentrations
JAMA, 272, 1678-1685
19. Deshpande, S.A., Platt, M.P. (1997)
Association between blood lactate and acid-base status and mortality in ventilated babies
Arch Dis Child, 76, F15-F20
20. Pennell, C.E., Tracy, M.B. (1999)
A new method for rapid measurement of lactate in fetal and neonatal blood
Aust N Z J Obstet Gynaecol, 39, 227-233
21. Kruger, K., Hallberg, B., Blennow, M., Kublickas, M. (1999)
Predictive value of fetal scalp blood lactate concentration and pH as markers of neurologic disability
Am J Obstet Gynecol, 181, 1072-1078
22. Kamber, M. (1992)
Laktatmessungen in der Sportmedizin: Messmethodenvergleich
Schweiz Z Sportmed, 40, 77-86
23. Gaglio, G. (1886)
Die Milchsäure des Blutes und ihre Ursprungsstätten
Arch Anat Physiol Abt., 10, 400-414
24. Barker, S.B., Summerson, W.H. (1941)
The colorimetric determination of lactic acid in biological material
J Biol Chem, 138, 535-545
25. Racine, P., Klenk, H.O., Kochsiek, K. (1975)
Rapid lactate determination with an electrochemical enzymatic sensor: clinical usability and comparative measurements
Z Klin Chem Klin Biochem, 13, 533-539
26. Gutmann, I., Wahlefeld, A.W. (1974)
L-Lactat: Bestimmung mit Lactat-Dehydrogenase und NAD^+ , 1510-1514
in: Bergemeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie GmbH, 3.Auflage, Weinheim/Bergstrasse

27. Brinkert, W., Rommes, J.H., Bakker, J. (1999)
Lactate measurements in critically ill patients with a hand-held analyser
Intensive Care Med, 25, 966-969
28. Yam, J., Chua, S., Razvi, K., Arulkumaran, S. (1998)
Evaluation of a new portable system for cord lactate determination
Gynecol Obstet Invest, 45, 29-31
29. Pyne, D., Boston, T., Martin, D.T., Logan, A. (2000)
Evaluation of the Pro blood Lactate Analyser
Eur J Appl Physiol, 82, 112-116
30. Detry, B., Nullens, W., Cao, M.L., Frans, A., Robert, A. (1998)
Assessment of the lactate biosensor methodology
Eur Respir J, 11, 183-187
31. Burnett, R.W., Covington, A.K., Fogh-Anderson, N., Külpmann, W.R., Lewenstam, A., Maas, A.H.J., Müller-Plathe, O., Vankessel, A.L., Zijlstra, W.G. (1997)
Use of ion-selective electrodes for blood-electrolyte analysis
JIFCC, 9, 16-21
32. Tserng, X., Gilfillan, C.A., Kalhan, S.C. (1984)
Determination of carbon-13 labeled lactate in blood gas by gaschromatography/ mass spectrometry
Anal Chem, 56, 517-523
33. Wahl, H.G. (1998)
Gaschromatographisch-Massenspektrometrische Untersuchungen in: Das renale Ausscheidungsverhalten von Furansäuren
Med. Dissertation, Universität Tübingen
34. Bablok, W., Passing, H. (1983)
A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods
J Clin Chem Biochem, 21, 709-720
35. Bablok, W., Passing, H. (1984)
Comparison of several regression procedures for method comparison studies and determination of sample sizes
J Clin Chem Biochem, 22, 431-445

36. Sachs, L. (1982)
Statistische Methoden
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
37. Neese, R.A., Gertz, E.W., Wisneski, J.A., Gruenke, L.D., Cymerman
Craig, J. (1983)
A stable isotope technique for investigating lactate metabolism
in humans
Biomed Mass Spectrom, 8, 458-462
38. Zeeck, A. (1992)
Spektroskopie organischer Verbindungen, 313-321
in: Zeeck, A., Eick, S., Krone, B.: Chemie für Mediziner
Urban und Schwarzenberg, 2. Auflage, München, Wien, Baltimore
39. Müller, M.M., Hackl, W., Griesmacher, A. (1999)
Point-of-Care-Testing, das Intensivlaboratorium
Anaesthesist, 48, 3-8
40. Mizock, B.A. (1998)
Lactate and point-of-care-testing
Crit Care Med, 26, 1474-1476
41. Gady, L.D., Weil, M.H., Afifi, A.A. (1973)
Quantitation of severity of critical illness with special reference to
blood lactate
Crit Care Med, 1, 75-80
42. Weil, M.H., Afifi, A.A. (1970)
Experimental and clinical studies on lactate and pyruvate as indica-
tors of the severity of acute circulatory failure (shock)
Circ, 41, 989-1001
43. Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitati-
ver laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen – Beschluss des
Vorstandes der Bundesärztekammer vom 24. August 2001
Deutsches Ärzteblatt, 42, 2747-2759
44. Löffler, G. (1999)
Basiswissen Biochemie
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

45. Kreutzig, T. (1997)
Biochemie
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
46. Petrides, P.E. (1997)
Säure-Basen-Haushalt, 932-947
in: Löffler, G., Petrides, P.E.: Biochemie und Pathobiochemie
Springer Verlag, 6.Auflage, Berlin, Heidelberg, New York
47. Levinsky, N.G. (1995)
Azidose und Alkalose, 305-315
in: Schmailzl, K.J.G.: Harrison's Innere Medizin I
Blackwell Wissenschafts-Verlag, 13.Auflage, Berlin, Wien
48. Rick, W. (1977)
Klinische Chemie und Mikroskopie
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

7. Danksagung

Folgenden Personen möchte ich meinen Dank aussprechen:

- Herrn Professor Dr. med. Dieter Luft für die Überlassung des Themas.
- Herrn Dr. Dr. Hans Günther Wahl für die eingehende Betreuung bei den Versuchen und in allen Lebenslagen, die hilfreichen Diskussionen und die Unterstützung bei der Auswertung der Studie.
- Claudia Peterfi, sowie Roman Werner, Josef Wöll und allen Mitarbeitern des Zentral- und Stoffwechsellabors für ihre Hilfe und Geduld bei den Laborarbeiten.
- Jessica Widmaier für die zuverlässige Hotline in Sachen Datenverarbeitung und Grafikgestaltung.
- Marc Tippelt für allen Beistand.
- Meinen Eltern für ihr Verständnis und all ihre Unterstützung.

8. Lebenslauf

Julia Sabine Deutsch

- Eltern:** Dr. Klaus Deutsch und Christa Deutsch-Kaupp
- Geburtsdatum:** 03. 12. 1977
- Geburtsort:** Stuttgart Bad-Cannstatt
- Schulbildung:** 1984-1988 Grundschule
1988-1997 Goethe-Gymnasium Ludwigsburg
1997 Abitur
- Studium:** 1997-2003: Studium der Zahnmedizin an der Universität
Tübingen
Januar 1998: Aufnahme in die Studienstiftung des
Deutschen Volkes
September 1998: Naturwissenschaftliche Vorprüfung
September 2000: Zahnärztliche Vorprüfung
November 2000: Postervorstellung beim Kongreß
für Laboratoriumsmedizin in Düsseldorf und Abstract-
Veröffentlichung im Journal of Laboratory Medicine
(10/2000)
13.Juni 2003: Zahnärztliche Prüfung
- Musik:** „Jugend musiziert“:
1993: Gitarre solo, 1. Preis Landesebene
1995: Gesang solo, 1. Preis Regionalebene
Gitarre Duo, 2. Preis Bundesebene
1997: Gesang solo: 1. Preis Regionalebene
Gitarre solo: 1. Preis, Bundessieg
1999: Gesang solo: 3. Preis Landesebene

- Kurse:**
- 1996: Deutsche Schülerakademie Bildung und Begabung e.V.: „Literaturverfilmungen“ in Salem
 - 1997: Deutscher Kammermusikkurs für Preisträger des Bundeswettbewerbes Jugend musiziert in Heide
 - 1999: „Kreatives Schreiben“ bei Prof. G. Ueding (Rhetorik, Universität Tübingen)
 - 2000: Meisterkurs „Gitarre und Kammermusik“ in Istrien
 - 2001: Italienischkurs der Studienstiftung des Deutschen Volkes in Rom
- sonstiges:**
- Freie Mitarbeit und diverse Praktika bei der „Ludwigsburger Kreiszeitung“, Stadtreaktion