

Martin Busch

Etablierung und Evaluierung der
quantitativen Bestimmung von
Homocystein und den Metaboliten
Cystathionin, Methylmalonsäure und
2-Methylzitronensäure im Serum mittels
Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Doktorarbeit / Dissertation

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek:

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de/> abrufbar.

Dieses Werk sowie alle darin enthaltenen einzelnen Beiträge und Abbildungen sind urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsschutz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlanges. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen, Auswertungen durch Datenbanken und für die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronische Systeme. Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdrucks, der fotomechanischen Wiedergabe (einschließlich Mikrokopie) sowie der Auswertung durch Datenbanken oder ähnliche Einrichtungen, vorbehalten.

Copyright © 2000 Diplomica Verlag GmbH
ISBN: 9783832446055

Martin Busch

**Etablierung und Evaluierung der quantitativen
Bestimmung von Homocystein und den Metaboliten
Cystathionin, Methylmalonsäure und 2-Methylzitronen-
säure im Serum mittels Gaschromatographie-Massen-
spektrometrie**

Martin Busch

Etablierung und Evaluierung der quantitativen Bestimmung von Homocystein und den Metaboliten Cystathionin, Methylmalonsäure und 2-Methylzitronensäure im Serum mittels Gaschromatographie - Massenspektrometrie

Dissertation
an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Fachbereich Medizin
Dezember 2000 Abgabe



Diplomica GmbH _____
Hermannstal 119k _____
22119 Hamburg _____
Fon: 040 / 655 99 20 _____
Fax: 040 / 655 99 222 _____
agentur@diplom.de _____
www.diplom.de _____

ID 4605

Busch, Martin: Etablierung und Evaluierung der quantitativen Bestimmung von Homocystein und den Metaboliten Cystathionin, Methylmalonsäure und 2-Methylztronensäure im Serum mittels Gaschromatographie - Massenspektrometrie / Martin Busch - Hamburg: Diplomatica GmbH, 2001

Zugl.: Jena, Friedrich-Schiller-Universität, Dissertation, 2000

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funksendung, der Mikroverfilmung oder der Vervielfältigung auf anderen Wegen und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland in der jeweils geltenden Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtes.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Die Informationen in diesem Werk wurden mit Sorgfalt erarbeitet. Dennoch können Fehler nicht vollständig ausgeschlossen werden, und die Diplomarbeiten Agentur, die Autoren oder Übersetzer übernehmen keine juristische Verantwortung oder irgendeine Haftung für evtl. verbliebene fehlerhafte Angaben und deren Folgen.

Diplomatica GmbH
<http://www.diplom.de>, Hamburg 2001
Printed in Germany



Wissensquellen gewinnbringend nutzen

Qualität, Praxisrelevanz und Aktualität zeichnen unsere Studien aus. Wir bieten Ihnen im Auftrag unserer Autorinnen und Autoren Wirtschaftsstudien und wissenschaftliche Abschlussarbeiten – Dissertationen, Diplomarbeiten, Magisterarbeiten, Staatsexamensarbeiten und Studienarbeiten zum Kauf. Sie wurden an deutschen Universitäten, Fachhochschulen, Akademien oder vergleichbaren Institutionen der Europäischen Union geschrieben. Der Notendurchschnitt liegt bei 1,5.

Wettbewerbsvorteile verschaffen – Vergleichen Sie den Preis unserer Studien mit den Honoraren externer Berater. Um dieses Wissen selbst zusammenzutragen, müssten Sie viel Zeit und Geld aufbringen.

<http://www.diplom.de> bietet Ihnen unser vollständiges Lieferprogramm mit mehreren tausend Studien im Internet. Neben dem Online-Katalog und der Online-Suchmaschine für Ihre Recherche steht Ihnen auch eine Online-Bestellfunktion zur Verfügung. Inhaltliche Zusammenfassungen und Inhaltsverzeichnisse zu jeder Studie sind im Internet einsehbar.

Individueller Service – Gerne senden wir Ihnen auch unseren Papierkatalog zu. Bitte fordern Sie Ihr individuelles Exemplar bei uns an. Für Fragen, Anregungen und individuelle Anfragen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung. Wir freuen uns auf eine gute Zusammenarbeit.

Ihr Team der Diplomarbeiten Agentur

Diplomica GmbH _____
Hermannstal 119k _____
22119 Hamburg _____

Fon: 040 / 655 99 20 _____
Fax: 040 / 655 99 222 _____

agentur@diplom.de _____
www.diplom.de _____

Inhaltsverzeichnis	Seite
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
<hr/>	
1.1 Homocystein	1
1.2 Homocystein-Stoffwechsel sowie Pathomechanismen der Hyperhomocysteinämie	4
1.3 Homocystein und Atherosklerose	9
1.3.1 Homocystein als Risikofaktor der Atherosklerose	9
1.3.2 Homocystein als pathogenetisches Agens der Atherosklerose	11
1.4 Homocysteinerhöhung und Vitaminstoffwechsel bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz	14
1.5 Einfluss einer Vitaminsubstitution auf die Homocystein-Konzentration	17
1.6 Homocysteinbestimmung bei anderen Erkrankungen	19
1.7 Bestimmungsmethoden	20
1.8 Referenzbereiche	22
2 Zielstellung	23
<hr/>	
3 Material und Methoden	24
<hr/>	
3.1 Material	24
3.1.1 Chemikalien und Lösungen	24
3.1.2 Geräte	25
3.2 Methoden	25
3.2.1 Probengewinnung	25
3.2.2 Probenvorbereitung	26
3.2.2.1 Probenvorbereitung zur Messung von Homocystein und Cystathionin	26
3.2.2.2 Probenvorbereitung zur Messung von Methylmalonsäure und 2-Methylzitronensäure	27
3.2.3 Messmethodik	27
3.2.3.1 Gaschromatographie-Massenspektrometrie	27
3.2.3.2 Konstante Isotopen-Verhältnisbestimmung (stable isotope dilution principle)	28
3.2.4 Messparameter	30
3.2.4.1 Messung von Homocystein und Cystathionin	30
3.2.4.2 Messung von Methylmalonsäure und 2-Methylzitronensäure	31

3.3	Entwicklung der Methodik	32
3.3.1	Ermittlung der Nachweisbarkeit und Retentionszeiten der zu messenden Substanzen	32
3.3.2	Korrektur der Konzentrationen der internen Standards	32
3.3.3	Wiederfindungsraten (recovery) der Reinsubstanzen	34
3.4	Evaluierung der Methodik	34
3.4.1	Präzision und Richtigkeit in Serumproben	34
3.4.1.1	Intra-Assay-Präzision	34
3.4.1.2	Inter-Assay-Präzision	35
3.4.1.3	Externe Evaluierung im Rahmen eines Ringversuches	35
3.5	Anwendung der Methodik	35
3.5.1	Bestimmung von Normalwerten an Gesunden	35
3.5.2	Bestimmung an Dialysepatienten	36
3.6	Statistische Verfahren	36
3.6.1	Präzision	37
3.6.2	Richtigkeit	37
3.6.3	Werte von Normalpersonen und Dialysepatienten	37
3.6.3.1	Referenzbereiche	37
3.6.3.2	Korrelationen	37
3.6.3.3	Geschlechtsunterschiede und Gruppenvergleich	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Retentionszeiten und Massenspektren	38
4.1.1	Homocystein	38
4.1.2	Cystathionin	40
4.1.3	Methylmalonsäure	42
4.1.4	2-Methylzitronensäure	44
4.2	Diastereomerverhältnis von 2-Methylzitronensäure-D ₃	47
4.3	Verunreinigungen von 2-Methylzitronensäure-D ₃	47
4.4	Korrekturfaktoren der Wiederfindungsraten der Reinsubstanzen	48
4.4.1	Homocystein	48
4.4.2	Cystathionin	48
4.4.3	Methylmalonsäure	49
4.4.4	2-Methylzitronensäure	49
4.5	Präzision und Richtigkeit in Serumproben	50
4.5.1	Intra-Assay-Präzision und Wiederfindung	50
4.5.1.1	Homocystein	50
4.5.1.2	Cystathionin	52
4.5.1.3	Methylmalonsäure	53
4.5.1.4	2-Methylzitronensäure	54
4.5.1.4.1	2-Methylzitronensäure _{gesamt}	54
4.5.1.4.2	2-Methylzitronensäure II	56
4.5.1.4.3	2-Methylzitronensäure I	56

4.5.2	Inter-Assay-Präzision	57
4.5.2.1	Homocystein	57
4.5.2.2	Cystathionin	57
4.5.2.3	Methylmalonsäure	57
4.5.2.4	2-Methylzitronensäure	58
4.5.3.	Externe Evaluierung der Bestimmung von Homocystein und Methylmalonsäure im Rahmen eines Ringversuches	58
4.5.3.1	Homocystein	58
4.5.3.2	Methylmalonsäure	59
4.6	Normalwerte	61
4.6.1	Referenzbereiche	61
4.6.2	Korrelationen	62
4.6.3	Geschlechtsunterschiede	63
4.7	Dialysepatienten	63
4.7.1	Werte	64
4.7.2	Korrelationen	65
4.7.3	Geschlechtsunterschiede	65
4.8	Gruppenvergleich	65
5	Diskussion	67
5.1	Messmethodik	68
5.1.1	Homocystein-Assay	68
5.1.2	Cystathionin-Assay	70
5.1.3	Methylmalonsäure-Assay	71
5.1.4	2-Methylzitronensäure-Assay	72
5.2	Normalwerte	74
5.3	Dialysepatienten	77
6	Zusammenfassung	84
7	Literaturverzeichnis	86
8	Danksagung	103
9	Selbstständigkeitserklärung	104

Anhang 1 a und 1 b

Anhang 2 a und 2 b

Anhang 3 a und 3 b

Abbildungsverzeichnis	Seite
Abb.1 Formen von Homocystein im Plasma	2
Abb.2 Übersicht über die Stoffwechselwege von Homocystein und Metaboliten	9
Abb.3 Chromatogramm von Homocystein (Scan)	38
Abb.4 Spektrum von Homocystein (Scan)	39
Abb.5 Formel und Fragmente des Derivatisierungsproduktes von Homocystein (modif. nach [144])	39
Abb.6 Spektrum (Scan) und Formel des Derivatisierungsproduktes von Homocystein-D ₄	40
Abb.7 Chromatogramm von Cystathionin (Scan)	40
Abb.8 Spektrum von Cystathionin (Scan)	41
Abb.9 Formel und Fragmente des Derivatisierungsproduktes von Cystathionin (modif. nach [143])	41
Abb.10 Spektrum (Scan) und Formel des Derivatisierungsproduktes von Cystathionin-D ₄	42
Abb.11 Chromatogramm von Methylmalonsäure (Scan)	43
Abb.12 Spektren von Methylmalonsäure und Methylmalonsäure-D ₃ (Scan, verschiedene Scan-Bereiche)	43
Abb.13 Fragmente des Derivatisierungsproduktes von Methylmalonsäure (modif. nach [100]) und Formel von TBDMS-Methylmalonsäure-D ₃	44
Abb.14 Strukturformel von 2-Methylzitronensäure	45
Abb.15 Chromatogramm von 2-Methylzitronensäure II und I mit darunter ermitteltem Spektrum (Scan)	45
Abb.16 Formel und Fragmente des Derivatisierungsproduktes von 2-Methylzitronensäure (modif. nach [2])	46
Abb.17 Spektrum von 2-Methylzitronensäure-D ₃ (Scan)	46
Abb.18 Spektren bei 15,10 und 15,92 Minuten	47
Abb.19 Strukturformeln der festgestellten Verunreinigungen des internen Standards	48
Abb.20 Ergebnisse des Ringversuches 1999 für Homocystein	59
Abb.21 Ergebnisse des Ringversuches 1999 für Methylmalonsäure	60
Abb.22 Altersverteilung der Normalpopulation	61
Abb.23 Altersverteilung der Dialysepatienten	64
Abb.24 Vergleich der Homocystein-Werte zwischen den Gruppen (Median mit 95%-Konfidenzintervall)	66
Abb.25 Vergleich der Cystathionin-, Methylmalonsäure- und Methylcitrat _{gesamt} -Konzentrationen zwischen den Gruppen (Median mit 95%-Konfidenzintervall)	66

Abbildungen - Anhang

Abb.A1	Inter-Assay-Präzision Homocystein	Anhang 1a
Abb.A2	Inter-Assay-Präzision Cystathionin	Anhang 1a
Abb.A3	Inter-Assay-Präzision Methylmalonsäure	Anhang 1b
Abb.A4	Inter-Assay-Präzision 2-Methylzitronensäure	Anhang 1b

Tabellenverzeichnis		Seite
Tab.1	Intra-Assay-Präzision und Recovery verschiedener HC-Konzentrationen	51
Tab.2	Intra-Assay-Präzision und Recovery verschiedener Cys-Konzentrationen	52
Tab.3	Intra-Assay-Präzision und Recovery verschiedener MMA-Konzentrationen	53
Tab.4	Intra-Assay-Präzision und Recovery verschiedener MC _{gesamt} -Konzentrationen	55
Tab.5	Ringversuch Homocystein 1999	59
Tab.6	Ringversuch Methylmalonsäure 1999	60
Tab.7	Ermittelte Referenzintervalle von Homocystein und Metaboliten (n=52)	62
Tab.8	Geschlechtsunterschiede innerhalb der Normalpopulation	63
Tab.9	Ermittelte Wertebereiche von Homocystein und Metaboliten bei dialysierten Patienten (n=52)	64

Tabellen - Anhang

Korrelationen – Normalwerte	Anhang 2a
Korrelationen – Dialysepatienten	Anhang 2b
Messergebnisse – Normalpersonen	Anhang 3a
Messergebnisse – Dialysepatienten	Anhang 3b