

**Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie**

**der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. N. Roewer**

**Entwicklung und Einsatz eines Kreislaufmodells  
zum optischen Nachweis von Propofol in Blut**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

Judith Bosten

**aus Würzburg**

**Würzburg, November 2010**

**Referent** : Univ.-Prof. Dr. med. N. Roewer

**Koreferent:** Priv.-Doz. Dr. med. M. Gasser

**Dekan:** Prof. Dr. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 20.06.2011

**Die Promovendin ist Ärztin**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>4</b>
2.1	Das Kreislaufmodell . . . . .	4
2.2	Wärmeaustauscher und Thermostat . . . . .	6
2.3	Optische Messkonfiguration . . . . .	7
2.4	Verwendete Blutprodukte . . . . .	8
2.5	Klinisch relevante Propofol-Konzentrationen . . . . .	9
2.6	Theoretische Grundlagen der elektronischen Spektroskopie . . . . .	9
2.7	Messparameter bei Fluoreszenzexperimenten . . . . .	13
2.8	Durchführung und Versuchsprotokoll . . . . .	14
2.9	Optischer Nachweis von Ablagerungen . . . . .	16
2.10	Hämolyse-Messungen . . . . .	17
2.11	Statistik . . . . .	18
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>26</b>
3.1	<b>Statische Messungen in der Küvette</b>	<b>28</b>
3.1.1	Konzentrationsabhängige Messungen . . . . .	28
3.1.2	Temperatureinfluss auf das Fluoreszenzsignal . . . . .	30
3.1.3	Einfluss der UV-Bestrahlung . . . . .	31
3.2	<b>Untersuchungen an der Suspension aus Erythrozyten- konzentrat und Gefrorenem Frischplasma</b>	<b>34</b>
3.2.1	Signalkonstanz bei Zirkulation im Kreislaufsystem . . .	35
3.2.2	Signalzunahme bei Propofol-Zugabe . . . . .	37
3.2.3	Signal-Propofolkonzentrations-Korrelation . . . . .	40
3.2.4	Signalabfall . . . . .	41
3.2.5	Temperatureinfluss . . . . .	43
3.2.6	Differenzierung der Propofoleffekte auf das Spektrum	43
3.3	<b>Untersuchungen an Gefrorenem Frischplasma</b>	<b>47</b>
3.3.1	Das Plasmaspektrum . . . . .	48
3.3.2	Signalkonstanz bei Zirkulation im Kreislaufsystem . . .	48
3.3.3	Signalzunahme bei Propofol-Zugabe . . . . .	49
3.3.4	Signal-Propofolkonzentrations-Korrelation . . . . .	51
3.3.5	Signalabfall . . . . .	52

<b>3.4</b>	<b>Untersuchungen an Vollblut</b>	<b>53</b>
3.4.1	Blut-pH .....	54
3.4.2	Fehlende Signalkonstanz .....	55
3.4.3	Messung mit erhöhtem Fluss .....	58
<b>3.5</b>	<b>Ursachen des Signalabfalls</b>	<b>60</b>
3.5.1	Signalabfall im Medium Kochsalz .....	60
3.5.2	Nachweis der Ablagerung durch Raman-Spektroskopie .....	62
3.5.3	Nachweis der Ablagerung durch Fluoreszenz-Spektroskopie .....	64
3.5.4	Einfluss der UV-Bestrahlung .....	67
3.5.5	Hämolyse-Bestimmung .....	67
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>69</b>
4.1	Das Kreislaufmodell .....	69
4.2	Blutprodukte und ihre Eigenschaften .....	70
4.3	Signalkonstanz .....	72
4.4	Signal-Konzentrations-Korrelation .....	73
4.5	Vergleichbarkeit der einzelnen Kreislaufexperimente .....	74
4.6	Signalabfall .....	74
4.7	Ablagerungen von Propofol an der Schlauchinnenwand .....	77
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>82</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>84</b>

**Danksagung**

**Lebenslauf**



## 1 Einleitung

Die Narkosetiefe während der Anästhesie des Patienten wird indirekt mit Hilfe eines umfangreichen Monitorings kardiopulmonaler Parameter überwacht. Über Elektrokardiogramm, Blutdruckmessung, Pulsoxymetrie und Kapnometrie werden kardiovaskuläre und respiratorische Funktionen kontrolliert. Je nach Indikation kann dieses Basismonitoring um die Bestimmung von Körpertemperatur, Muskelrelaxation, kortikaler elektrischer Aktivität, Zentralvenösen Druck, Pulmonalkapillären Verschlussdruck, Blutgasen oder Säure-Basen-Haushalt ergänzt werden. All diese Hilfsgrößen erlauben dem Anästhesisten die Überprüfung der suffizienten Beatmung sowie des Effekts der eingesetzten Narkotika, Hypnotika und Sedativa an den Zielorganen. Ein Monitoring von Wirkspiegeln der verwendeten Pharmaka findet nicht statt.

Das Anästhetikum Propofol-Lipuro® wird heute regelmäßig für Narkoseeinleitung und Narkoseaufrechterhaltung bei Intravenöser Anästhesie sowie im Rahmen der Balancierten Anästhesie eingesetzt. Seine Vorteile sind ein besonders rascher Wirkungseintritt und eine schnelle Elimination, die eine gute Steuerung der Narkose erlauben. Ein Monitoring seiner Plasmakonzentration stellt bei bekannter Zielkonzentration eine sichere Beurteilung des Grades der Sedierung dar. Deshalb findet für Propofol die Target Controlled Infusion (TCI), eine mikroprozessorgesteuerte patientenadaptierte Substanzzufuhr über Spritzenpumpen, Verwendung. Mit Hilfe der bekannten pharmakodynamischen Eigenschaften von Propofol und pharmakokinetischen Modellen seiner Verteilung und Elimination wird die erzeugte Plasmakonzentration berechnet und die Zufuhr an die geplante Zielkonzentration angepasst. Ein direktes Monitoring des Plasmaspiegels gibt es nicht.

Die bisher angewandten Methoden zur Messung eines Propofol-Spiegels im Blut erfordern eine Aufbereitung der entnommenen Blutproben in mehreren Arbeitsschritten bevor die vorliegende Konzentration bestimmt werden kann. Das Propofolmolekül 2,6-Diisopropylphenol kann mit geeigneter Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden. Verantwortlich für die Fluoreszenzeigenschaften des Propofols ist der Phenolring des Moleküls. [8]

Die Fluoreszenzdetektion zur Bestimmung der Propofol-Plasmakonzentration wird in zahlreichen Studien angewandt. [3], [10] Dem Fluoreszenznachweis geht dabei immer die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) voraus. Aus den mit Lösungsmittel, z.B. Cyclohexan [13] oder Acetonitril [9], versetzten Vollblutproben wird mittels der HPLC Propofol extrahiert. Darauf folgt die Bestimmung der Propofolkonzentration anhand seiner Fluoreszenzeigenschaften. Diese zeitaufwendigen Methoden werden nur in Studien und nicht im klinischen Alltag eingesetzt.

Zur Anregung der Propofolmoleküle wird die Anregungswellenlänge von 276 nm [13] bzw. 274 nm [2] verwendet. Diese sehr energiereiche Strahlung gehört zum UV-C-Bereich des Lichtspektrums. Dieser Arbeit voraus gehende Messungen [2] zeigen eine hohe Korrelation des Fluoreszenzsignals von mit Propofol versetztem Plasma zur Höhe der vorhandenen Propofolkonzentrationen. Der Nachweis im optisch dichteren Medium Blut gelang bis dahin trotz spezieller Anordnung der Messküvette nicht. Da Blut selbst, in höherem Maße als Plasma, Fluoreszenzeigenschaften aufweist, mussten diese zuerst genauer bestimmt werden. Unter Anregung mit 274 nm zeigt seine Fluoreszenzintensität keine Signalkonstanz. Es kommt zur Signalabnahme durch photochemische Bleichung.

Ausgangspunkt für den Propofol-Nachweis im Medium Blut ist jedoch die Vorstellung, dass Veränderungen von Fluoreszenzintensitäten oberhalb eines konstanten Basisniveaus (dieses entspricht der Blutfluoreszenz) Rückschlüsse auf Zugaben bestimmter Konzentrationen von Propofol erlauben. Um Fluoreszenzschwankungen also zuverlässig auf Änderungen der Propofolkonzentration zurückzuführen, muss sicher gestellt sein, dass allein diese Einfluss auf das Signalniveau nehmen. Die Signalkonstanz des Messmediums ist daher die Voraussetzung für das Vorhaben des direkten Monitorings von Propofol.

Um einen Weg zum instantanen Nachweis des Propofolkonzentrations-Spiegels im Blut aufzuzeigen, wurde zu Beginn dieser Arbeit ein Kreislaufmodell entwickelt. Der kontinuierliche Fluss im Kreislauf soll sowohl einen höheren Umsatz in der Messküvette erzeugen als auch ein größeres Probenvolumen fassen. Ziel ist die

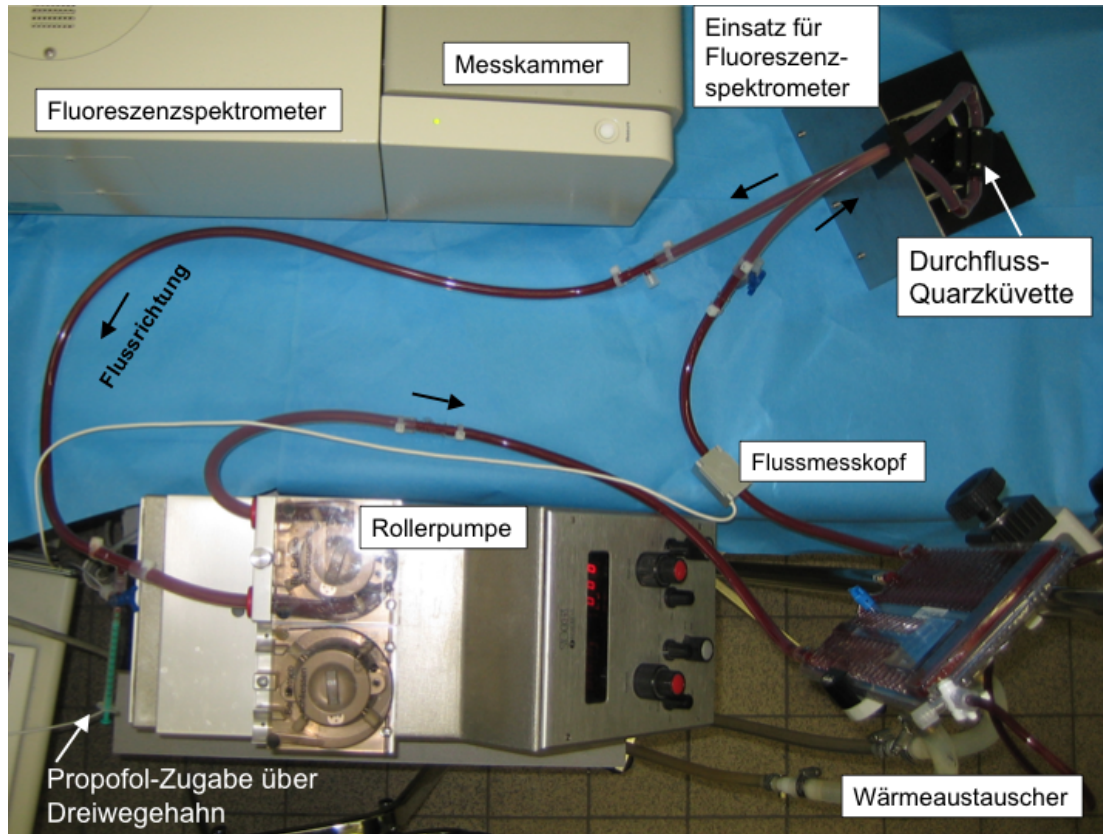
Reduktion der photochemisch induzierten Bleichung des Bluts durch die intensiv an der Messküvette einwirkende UV-C-Strahlung.

Ein weiterer Vorteil des Kreislaufmodells ist, dass der physiologische Blutfluss simuliert wird. Hierdurch soll eine Aussage darüber möglich werden, ob die Fluoreszenzmessung von Propofol auch in vivo als aussichtsreich zu beurteilen ist. Denkbar ist der Einsatz des Kreislaufmodells für weitere in-vitro-Untersuchungen von Pharmaka im fließenden Blut.

Das Kreislaufmodell wird in Kapitel 2 vorgestellt. Erläutert werden zudem die Durchführung und Analyse der Kreislaufexperimente sowie die theoretischen Grundlagen der eingesetzten elektronischen Spektroskopie. Die Darstellung der Ergebnisse in Kapitel 3 erfolgt gegliedert in die Untersuchungen an den eingesetzten Messmedien. Es enthält auch die der Entwicklung des Kreislaufsystems vorausgehenden Messungen.

Kapitel 3.5 zeigt mit der nachweisbaren Propofol-Adsorption im Kreislaufmodell die Grenzen seines Einsatzes auf.





**Abbildung 2-2: Das mit Blut gefüllte Kreislaufmodell**

Das Kreislaufsystem besteht aus einer Rollerpumpe (2), einem Wärmeaustauscher (3) und der Durchflussküvette (1). Verbunden werden diese einzelnen Elemente durch Polyvinylchlorid- (PVC) und Silikonschläuche (4 und 5) unterschiedlicher Länge (0,3-0,8 m). Die Schläuche haben einen Durchmesser von 0,6 cm. Der Wärmeaustauscher (Kapitel 2.2) und das speziell angefertigte Schlauchset (Spectral Set; HMT) werden für jeden Versuchsdurchlauf neu verwendet und anschließend verworfen.

Die Durchflussküvette (QS, 10,00 mm; Hellma) ist eine Spezialanfertigung aus Quarzglas mit Aufsatzstutzen für den Anschluss von Schläuchen auf beiden Seiten. Sie wird auf jeder Seite mit zwei 0,06 m langen Silikon-Schlauchstücken mit je einem gebogenen Glasrohr (6) verbunden. Silikon ist an den Stellen im Kreislauf eingesetzt, in denen höhere Flexibilität erforderlich ist. An das Glasrohr schließt sich auf jeder Seite ein jeweils 0,3 m langer Silikonschlauch an. Diese Schläuche treten aus dem lichtdichten Einsatz für das Fluoreszenzspektrometer hinaus. In Flussrichtung folgt nach dem Silikonteil ein 0,8 m langer PVC-Schlauch, an den ein 0,6 m langer Silikonschlauch anschließt. Dieser wird in die Rollerpumpe (Typ 10-20-00; Stöckert) eingesetzt. Es folgt ein 0,4 m langer PVC-Schlauch, der die Verbindung zum

Wärmeaustauscher darstellt. Das Blut verlässt den Wärmeaustauscher durch einen ebenfalls 0,4 m langen PVC-Schlauch, der wiederum am Silikonschlauchstück ansetzt, das in den Einsatz für das Fluoreszenzspektrometer hinein führt. Untereinander werden die Schläuche mit geraden Konnektoren verbunden. An die Konnektoren kann mit dem standardisierten Luer-Lock-System ein Dreiwegehahn angeschlossen werden.

Die Rollerpumpe erzeugt einen laminaren Fluss, dessen Geschwindigkeit über die einzustellende Drehzahl (rounds per minute, rpm) reguliert wird.

Abbildung 2-2 zeigt, dass der Wärmeaustauscher im Versuchsaufbau den höchsten Punkt bildet, sodass sich beim Befüllen oder Erwärmen entstehende Luftblasen in ihm ansammeln und entweichen können. Zur Entlüftung ist der Wärmeaustauscher mit einem Blutleerbeutel (7) verbunden, der bei Probenzugabe verhindert, dass sich der Druck im System erhöht.

Ein Flussmesskopf (MediStim) (8) kann am PVC-Schlauch, der sich in Flussrichtung an den Wärmeaustauscher anschließt, angebracht werden. Er dient der Kontrolle der Flussrate im Schlauchsystem, die über einen Monitor (9) kontrolliert wird.

### ***2.2 Wärmeaustauscher und Thermostat***

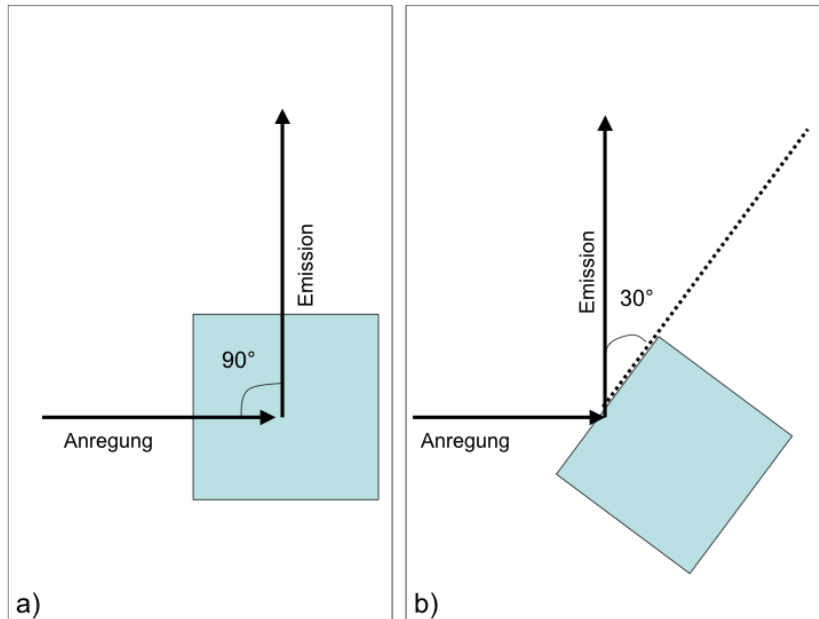
Die verlässliche Interpretation von Intensitätsveränderungen bei Fluoreszenzexperimenten erfordert eine genaue Temperaturregulation (Kapitel 3.1.2). Daher enthält das Kreislaufsystem einen Wärmeaustauscher. Für die durchgeführten Versuche wurde der Wärmeaustauscher „VISION Heat Exchanger“ (Eurosets) verwendet.

Der Wärmeaustauscher ist mit dem Thermostat (Crystat Haake F3; HAAKE CH) verbunden, das die Temperierflüssigkeit (Wasser) auf die Versuchs-Temperatur (36,7° C/ 22° C) erhitzt bzw. abkühlt.

Die Temperierflüssigkeit wird in einem geschlossenen System durch die Rückseite des Wärmeaustauschers gepumpt. Der Wärmeaustausch erfolgt durch ein Gegenstromprinzip von Temperierflüssigkeit und Blut entlang einer Austauschfläche

aus Edelstahl. Der Wärmeaustauscher enthält einen Zugang für eine Temperatursonde (Temp port). Dieser erlaubt es, die Temperatur des Bluts von außen zu messen.

### 2.3 Optische Messkonfiguration



**Abbildung 2-3: a) 90°-Anordnung der Kuvette des Herstellers, b) 30°-Anordnung der Kuvette zur Bestimmung von Fluoreszenz in Blut**

Erzeugung und Detektion des Fluoreszenzsignals finden im Fluoreszenzspektrometer statt (FP-6500; Jasco). Bei der vom Hersteller vorgesehenen Messanordnung bilden Anregungs- und Emissionsstrahlung einen Winkel von 90° (Abb. 2-3a). Die statischen Messungen in der abgeschlossenen Kuvette (Kapitel 3.1) werden in dieser Anordnung durchgeführt, bei der durch eine integrierte Temperiereinheit auch die Temperaturregulation möglich ist.

Das optisch sehr dichte Medium Blut erfordert eine besondere Messanordnung, da Anregungsstrahlung und emittiertes Licht sonst stark absorbiert werden. Die hohe Lichtabsorption im Blut ist verursacht durch den hohen Anteil korpuskulärer Bestandteile sowie insbesondere durch das Chromophor Hämoglobin in den Erythrozyten. Der für die Propofoldetektion im Blut angefertigte Einsatz für das Fluoreszenzspektrometer bildet einen Winkel von 30° zwischen Kuvettenhalter und Emissionsstrahlung (Abb. 2-3b). Dieser Winkel verhindert den unerwünschten Effekt

der Reabsorption der emittierten Strahlung, da die Messung lediglich an der Oberfläche der Probe erfolgt. Die emittierte Strahlung erreicht den Detektor, ohne die Küvette passieren zu müssen. [2]

Die Messung der Fluoreszenz darf nicht durch andere Lichtquellen gestört werden. Der angefertigte Einsatz lässt deshalb kein Licht von außen zum Detektor eindringen. Die an der Durchflussküvette angeschlossenen Schläuche verlassen die Messkammer (Abb. 2-1, (10)) durch zwei exakt angepasste Bohrlöcher, sodass der Einsatz trotz ihrem Durchtritt lichtdicht bleibt.

### ***2.4 Verwendete Blutprodukte***

Abgelaufene Erythrozytenkonzentrate, die nicht mehr für den klinischen Einsatz geeignet sind, werden mit humanem Plasma (Gefrorenenes Frischplasma, GFP) suspendiert. Es entsteht wieder ein physiologischer Hämatokrit-Wert. Mit dieser Suspension erhält man ein in seinen optischen Eigenschaften dem Vollblut sehr ähnliches Medium. Ein gleicher Anteil korpuskulärer Bestandteile ist enthalten. So kann deren Auswirkung auf das Propofol-Fluoreszenzsignal geprüft werden.

Die heute im klinischen Alltag verwendeten Konserven werden zur Antikoagulation mit Citrat versetzt. Die Citratwirkung erzeugt in der Blutkonserve einen sauren pH-Wert (Kapitel 3.4.1).

Um physiologische Bedingungen – auch im Hinblick auf eine mögliche Enzymkinetik - im Kreislaufmodell zu erhalten, wurde im nächsten Schritt eine Vollblutspende verwendet. Das Vollblut (200 ml Spende) wird am Morgen des Versuchstages abgenommen und mit 2500 Internationalen Einheiten (IE) Heparin antikoaguliert.

Heparin-Blut besitzt den Vorteil eines physiologischen pH-Wertes und eines normalen 2,3-Diphosphoglycerat-Spiegels. Nachteilig ist die schnell einsetzende Hämolyse, die zeitlich beschränkte Gerinnungshemmung des Heparins und die schnelle Bildung von Thrombozyten- und Leukozytenaggregation in der Blutkonserve. [12] Durch die schnelle Verarbeitung im Kreislaufmodell wird das Vollblut nach maximal 10 Stunden



verworfen, sodass die Haltbarkeitsgrenze der Heparinkonserven von 48 Stunden [12] deutlich unterschritten bleibt.

## ***2.5 Klinisch relevante Propofol-Konzentrationen***

Verwendet wird Propofol-Lipuro® 1% (10 mg/ml) aus 20 ml Ampullen (Braun).

Im Kreislaufmodell werden Fluoreszenzsignale von Propofol in klinisch relevanten Konzentrationsbereichen gemessen. Zur Narkoseeinleitung ist eine Propofolmenge von 1,0-2,5 mg/kg Körpergewicht (KG) erforderlich. [1] Einem Patienten von 70 kg KG werden zur Narkoseeinleitung 200 mg Propofol als Bolus injiziert. Das entspricht bei einem Blutvolumen von 5000 ml einer Anfangskonzentration von 40 µg/ml Blut. Die erwünschte Zielkonzentration zur Narkoseaufrechterhaltung bei der Target Controlled Infusion beträgt 3-5 µg/ml im Plasma. [1]

Die in das Kreislaufsystem zugegebenen Mengen bewegen sich innerhalb dieses während einer Narkose erzielten Konzentrationsbereichs. Die Zugaben erfolgen in drei Serien mit je 5 mg, 2,5 mg, 1 mg und 0,5 mg (Tab. 2-1, S. 17). Die dabei entstehende Verdünnung auf 140,2 ml Blut ergibt Konzentrationen von jeweils 35,7 µg/ml, 17,8 µg/ml, 7,1 µg/ml bzw. 3,6 µg/ml. Das jeweilige Mengenverhältnis von Blutvolumen zu zugegebenen Millilitern der Propofol-Emulsion beträgt 280 : 1, 560 : 1, 1400 : 1 bzw. 2800 : 1.

## ***2.6 Theoretische Grundlagen der elektronischen Spektroskopie***

Ein Atom oder Molekül kann Energie in Form von Photonen aufnehmen und diese Energie auch wieder abgeben. Die Aufnahme von Energie  $h\nu$  einer bestimmten Frequenz  $\nu$  heißt Absorption. Die Abgabe von Energie aus elektronisch angeregten Zuständen kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Einer davon ist die Abstrahlung der Energie über einen als Fluoreszenz bezeichneten Prozess.

Gewöhnlich befinden sich Atome bei Raumtemperatur im elektronischen Grundzustand. Zur vereinfachten Beschreibung des energetischen Zustandes eines Atoms wird nur die Elektronenkonfiguration der Elektronen der äußeren Orbitale (Valenzelektronen) betrachtet. Jedes Elektron besitzt einen Spin. Gepaarte Elektronen besitzen gegenläufige Spins und heben sich deshalb gegenseitig auf.

Liegen im Atom oder Molekül nur gepaarte Valenzelektronen vor, beträgt die Spinquantenzahl 0. Die Spinmultiplizität ist dann definitionsgemäß 1 (Singulettzustand). Dies trifft für alle organischen Moleküle, mit Ausnahme von Radikalen, zu.

Sichtbares ( $\lambda = 400-750$  nm) oder ultraviolettes Licht ( $\lambda = 10-400$  nm) kann die erforderliche Energie, die der Übergang in den elektronisch angeregten Molekülzustand bedarf, liefern. Dabei verändert sich die Molekülorbitalbesetzung, wenn Licht mit geeigneter Frequenz auf das jeweilige Molekül trifft. Gewöhnlich bleibt die Spinausrichtung der Elektronen gleich, d.h. die Multiplizität bleibt erhalten. [4] Im elektronisch angeregten Zustand verweilt das Molekül jedoch nur für kurze Zeit ( $10^{-8}$  s) [15], bevor es in den Grundzustand zurückkehrt.

Die verschiedenen möglichen elektronischen Übergänge bei Absorption und Emission besitzen jeweils bestimmte Wahrscheinlichkeiten. Welche Prozesse beim Elektronenübergang im einzelnen Fall stattfinden bestimmen quantenmechanische Gesetze, die das Franck-Codon-Prinzip beschreibt. [4]

Übergänge innerhalb des Singulettzustands sind im organischen Molekül am häufigsten, da gemäß dem Interkombinationsverbot eine Änderung der Multiplizität nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit vorkommt. Die Anregungsenergie hebt die Elektronen aus ihrem Singulett-Grundzustand  $S_0$  z.B. in den ersten elektronisch angeregten Singulettzustand  $S_1$ . [8] Auch energiereichere Singulettzustände ( $S_2, S_3, S_n$ ) können angeregt werden.

Photophysikalische und strahlungsfreie Prozesse führen zur Rückkehr in den Grundzustand. Eine schematische Zusammenfassung aller möglichen Prozesse stellt das Jablonski-Schema dar (Abb. 2-4).

Abbildung 2-4:

**Jablonski-Schema**

**S = Singulettzustand**

**T = Triplettzustand**

**A = Absorption**

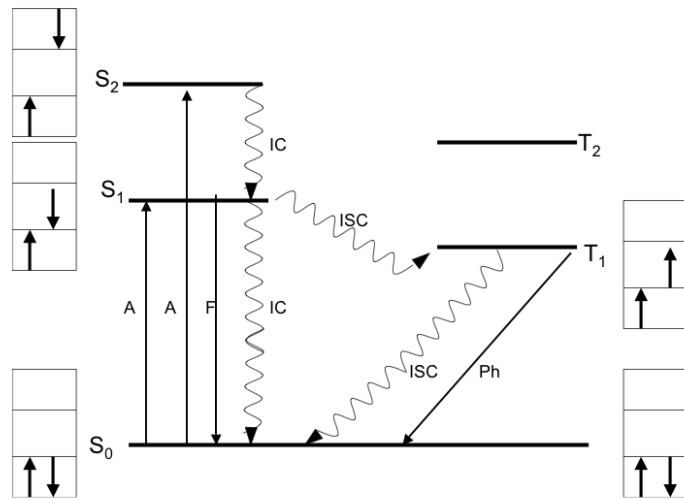
**F = Fluoreszenz**

**IC = Internal Conversion**

**ISC = Intersystem Crossing**

**Crossing**

**Ph = Phosphoreszenz**



Der elektronische Übergang aus S<sub>1</sub> zurück zu S<sub>0</sub> führt zur Fluoreszenz. Es handelt sich um den Übergang zwischen elektronischen Zuständen gleicher Spinnmultiplizität. [4]

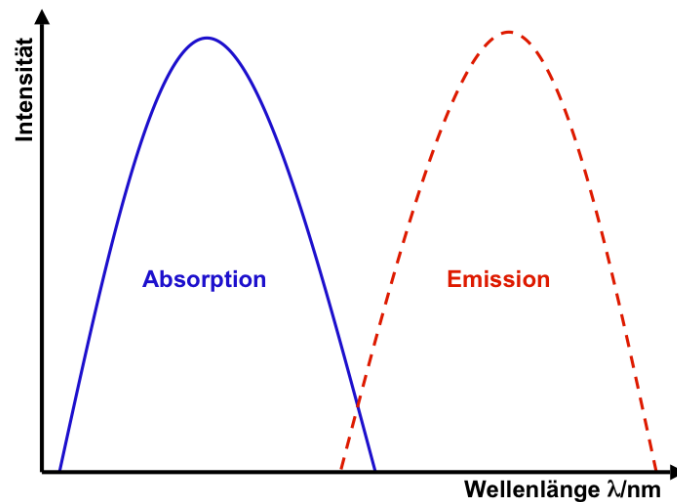
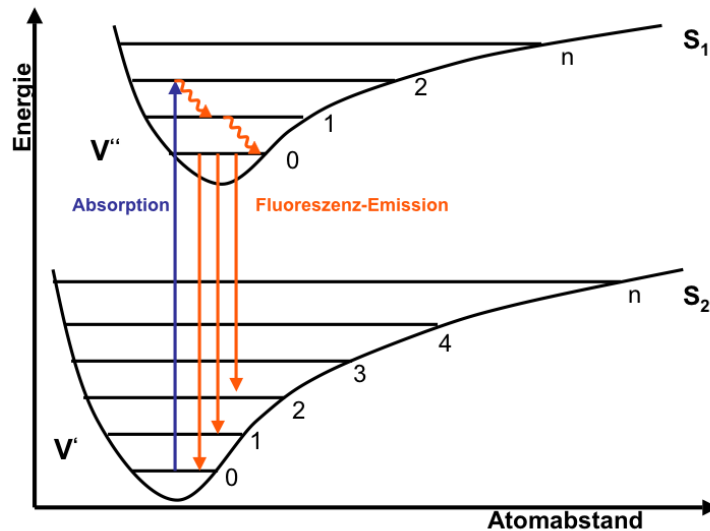


Abbildung 2-5: Absorptions- und Emissionsspektrum verhalten sich wie Bild und Spiegelbild. Die Emission ist in den längerwelligen Bereich verschoben.

Der Energiegehalt des abgestrahlten Photons ist energieärmer als der Energiegehalt des zuvor absorbierten Photons. Das Fluoreszenzspektrum ist im Vergleich zum Absorptionsspektrum daher in den längerwelligen Bereich verschoben (Abb. 2-5). Diese Rotverschiebung wird als bathochromer Effekt bezeichnet. Die Energiedifferenz ist durch strahlungslose Deaktivierungsprozesse im elektronisch angeregten Zustand

bedingt. Dabei relaxiert das Molekül innerhalb von  $S_1$  schnell in das unterste Schwingungsniveau  $v'' = 0$  (Abb. 2-6). Aufgrund seiner hohen Geschwindigkeit läuft dieser Prozess bevorzugt ab. Nach der Kasha-Regel [4] gibt das angeregte Molekül seine Energie von hier aus in Form von Fluoreszenz ab und erreicht wieder den elektronischen Grundzustand  $S_0$ .



**Abbildung 2-6: Schwingungsfinestruktur von elektronisch angeregtem Zustand und Grundzustand ( $S_0$ ,  $S_1$ ).**

Andere Prozesse in elektronisch angeregten Zuständen sind Innere Konversion (Internal Conversion, IC), Interkombination (Intersystem Crossing, ISC) und Phosphoreszenz (Abb. 2-4). Welcher der verschiedenen Deaktivierungsvorgänge für  $S_1$  vorrangig statt findet, hängt sowohl vom Molekül als auch von seiner Umgebung (Temperatur, Druck, Lösungsmittel) ab. [4]

Bei der Internal Conversion wird beim strahlungslosen Übergang von  $S_2$  zu  $S_1$  die Spinmultiplizität bei der Deaktivierung des Moleküls ebenfalls beibehalten. Die Internal Conversion kann auch von  $S_1$  in  $S_0$  erfolgen, ist aber in der Regel weniger wahrscheinlich als Fluoreszenz oder Intersystem Crossing

Beim Intersystem Crossing kommt es zur Spinumkehr. Die Spins zweier Elektronen sind dann parallel ausgerichtet. Die übrige Elektronenkonfiguration wird dabei beibehalten. Die Spinquantenzahl beträgt nun 1. Die Multiplizität ist definitionsgemäß 3 und beschreibt einen Triplettzustand ( $T_1$ ). Die Triplett-niveaus liegen energetisch tiefer

als die zugehörigen Singulettzustände. Die endgültige Rückkehr in den Singulettgrundzustand  $S_0$  erfolgt durch erneute Spinumkehr. Dies geschieht durch ein zweites Intersystem Crossing oder Phosphoreszenz. Phosphoreszenz bezeichnet die Lichtemission beim Übergang zwischen Elektronenzuständen unterschiedlicher Spinmultiplizität.

## ***2.7 Messparameter bei Fluoreszenzexperimenten***

Bedient wird das Fluoreszenzspektrometer mit der Software „Spectra Manager“ (Version 1.07.06; Jasco Cooperation).

Die Höhe des Hämatokrits und des pH-Werts variieren in den verschiedenen Blutkonserven. Daher müssen für jede Messung die optimalen Parameter neu eingestellt werden. Aus diesen Gründen ist ein direkter Vergleich absoluter Werte verschiedener Experimente nicht möglich. Die jeweiligen Parameter werden vor Messbeginn für das Messmedium Blut ermittelt. Die intrinsische Fluoreszenz (Autofluoreszenz) von Blut liefert das Ausgangssignal vor Propofol-Zugabe.

Auf einer Fluoreszenz-Intensitätsskala von bis zu 1000 Einheiten gilt es ein Blut-Basissignal zu finden, welches genug Spielraum zur Detektion für die Signalzunahme durch Propofol-Zugabe lässt. Für Messungen, bei denen vor allem das Fluoreszenzsignal um das Propofolmaximum bei 300 nm beobachtet wird, hat sich eine Basis-Signalintensität von 650-800 Intensitätseinheiten in diesem Wellenlängenbereich bewährt. Das Maximum des Gesamtspektrums kann dann nicht mehr ermittelt werden, wenn es oberhalb der detektierbaren Intensität liegt. Der absolute Signalanstieg im Fluoreszenz-Spektrum nach Propofol-Zugabe ist bei höherer Detektor-Sensitivität (Gain) größer.

Zur Betrachtung des vollständigen Spektrums mit seinem Maximum bei 330 nm muss eine geringere Sensitivität des Detektors gewählt werden.

Die Fluoreszenzintensität wird durch Variation der Spaltbreite der Lampe zur Anregung (Bandwidth Excitation) und der Spaltbreite des Detektors (Bandwidth Emission) eingestellt. Für die Messungen (Kapitel 3.2 und 3.4) wurden 10 nm (Bandwidth Excitation) bzw. 5 nm (Bandwidth Emission) gewählt.

Durch Veränderung der Sensitivität (Sensitivity) kann die erforderliche Signalverstärkung am Detektor eingestellt werden.

Einige Parameter waren bei allen Messungen identisch. Die Anregungswellenlänge (Excitation Wavelength) beträgt 274 nm (UV-C-Bereich). Hier zeigt Propofol sein maximales Fluoreszenzsignal. Die Aufnahmegeschwindigkeit (Scanning Speed) beträgt 500 nm/min und der Datenpunktabstand („Data Pitch“) beträgt 0,5 nm. Das Fluoreszenzspektrum wurde im Bereich von 285-420 nm aufgenommen (Funktion „Spectrum measurement“).

In Zeitverlaufsmessungen (Funktion „Time Course Measurement“) kann über einen beliebigen Zeitraum in gewählten Zeitabständen das Fluoreszenzsignal kontinuierlich bei einer bestimmten Wellenlänge aufgezeichnet werden. Da Propofol sein Fluoreszenzmaximum bei 300 nm besitzt, wurde für diese Wellenlänge die Konstanz des Blutsignals geprüft.

## ***2.8 Durchführung und Versuchsprotokoll***

Das Schlauchsystem wird zuerst mit isotonischer Kochsalzlösung (FreeFlex; Fresenius Kabi) befüllt. Nach Entfernung der Luftblasen, die über das Auslassventil des Wärmeaustauschers entweichen, wird das Schlauchsystem mit Blut bzw. Plasma befüllt. Dabei fließt die isotonische Kochsalzlösung in den Blutleerbeutel. Die dadurch erzeugte Senkung des Hämatokrits wird vergleichend mit einem Blutbild der Konserve und einer Blutgasanalyse einer Probe, die nach Versuche aus dem Schlauchsystem entnommen wird, dokumentiert.

Wenn das mit Blut gefüllte System luftblasenfrei ist, wird am Wärmeaustauscher die Verbindung zwischen Bluteinstrom-Seite und Blutausstrom-Seite („Priming Stop Cock“ (11) in Abb. 2-1) von der Horizontalen in die Vertikale gedreht. Dies gewährleistet, dass das Blut den vorgesehenen Weg entlang der Austauschfläche zur Temperaturregulation nimmt.

Zu Versuchbeginn wird die Rollerpumpe auf eine Drehzahl von 30-31 rpm eingestellt, die einen kontinuierlichen Blutfluss um 300 ml/min erzeugt. Das Thermostat erhitzt das Blut im Schlauch über den Wärmeaustauscher auf die gewünschte Temperatur (36,7° C). Die Messung startet, wenn das Thermostat die Solltemperatur erreicht hat.

Die Zugaben von Propofol-®Lipuro erfolgen mit Einwegspritzen ( $V = 1 \text{ ml}$ ) über einen Dreiwegehahn. Um Verdünnungseffekte auszuschließen wurden die unterschiedlichen Propofolmengen stets mit isotonischer Kochsalzlösung auf einen Milliliter aufgefüllt. So wird bei jeder Zugabe das gleiche Volumen mit variablen Konzentrationen verwendet. Der Dreiwegehahn zur Propofol-Zugabe ((12) in Abb. 2-1) befindet sich am Übergang des PVC- in den Silikon-Schlauch, der durch die Rollerpumpe führt. So fließt die zugegebene Probe zuerst durch den Wärmeaustauscher. Dadurch wird eine Änderung des Fluoreszenzsignals durch Temperaturschwankungen vermieden.

Unmittelbar vor der Zugabe der Propofolprobe wird die Rollerpumpe kurz gestoppt und direkt nach Zugabe wieder auf die Drehzahl 30-31 rpm eingestellt. Der Stopp vermeidet eine ungewollte Bildung von Luftblasen im Kreislaufsystem, die sonst bei Probenzugabe aufgrund der durch die Rollerpumpe erzeugten Druckverhältnisse schnell entstehen würden. Sobald der vorher erzielte Fluss wieder erreicht ist, wird das erste Spektrum nach Propofol-Zugabe gemessen.

**Tabelle 2-1: Messprotokoll für eine Versuchsserie der Experimente im Kreislauf**

Propofol-Zugabe in mg	Gesamtanzahl der gemessenen Spektren	Zeitabstände der Messungen
<b>5</b>	<b>26</b>	In den ersten 10 min alle 23 s (26 Spektren)
	<b>36</b>	In den weiteren 20 min alle 120 s (10 Spektren)
<b>2,5</b>	<b>62</b>	In den ersten 10 min alle 23 s (26 Spektren)
	<b>72</b>	In den weiteren 20 min alle 120 s (10 Spektren)
<b>1</b>	<b>98</b>	In den ersten 10 min alle 23 s (26 Spektren)
	<b>108</b>	In den weiteren 20 min alle 120 s (10 Spektren)
<b>0,5</b>	<b>134</b>	In den ersten 10 min alle 23 s (26 Spektren)
	<b>144</b>	In den weiteren 20 min alle 120 s (10 Spektren)

## ***2.9 Optischer Nachweis von Ablagerungen***

Zur Beurteilung einer möglichen Ad- oder Absorption des Propofols aus dem Blut durch die Silikon- und PVC-Schläuche werden sowohl die Raman- als auch die Fluoreszenz-Spektroskopie eingesetzt.

Die sehr spezifische Methode der Raman-Spektroskopie erlaubt die Identifizierung eines Moleküls anhand seiner charakteristischen Banden („Fingerprint-Bereich“). Es sind jedoch, verglichen mit der Fluoreszenzmessung, hohe Konzentrationen einer Substanz erforderlich, um aussagekräftige Spektren zu erhalten. [14]

Die sehr sensitive Fluoreszenzspektroskopie (Kapitel 2.6) dient dem Nachweis von geringen Mengen fluoreszierender Stoffe. Sie wird hier angewandt, um zu klären, ob Propofol sich auch in seiner klinischen Aufbereitung (Propofol-Lipuro® 1%) an Kunststoffmaterialien ablagern kann.

Für beide Methoden müssen zuvor Vergleichsspektren des jeweiligen Kunststoffes und des Propofols ermittelt werden. Für die Fluoreszenzmessungen gilt, dass Änderungen der Form dieser Spektren im Bereich des Propofolmaximums um 300 nm als Nachweis einer Propofol-Adsorption an die Oberfläche gewertet werden können.

Zur Raman-mikrospektroskopischen Charakterisierung werden die Schlauchproben (1cm x 0,2 cm) auf einem Objektträger positioniert. Mit dem Lichtmikroskop wird die Oberflächenstruktur der Schlauchinnenseite scharf eingestellt. Der Helium-Neon (HeNe)-Laser mit  $\lambda = 632,8$  nm trifft dadurch anschließend auf die zu untersuchende Ebene.

Für die Fluoreszenz-Spektroskopie werden die Schlauchproben (2,5 cm x 2,5 cm) aufgeschnitten und aufgebogen. Diese werden so in den 30°-Grad-Geräteinsatz eingespannt, dass die Innenfläche vom anregenden Lichtstrahl getroffen wird.

Vorbereitung der Schlauch-Proben: Die auf die entsprechende Größe zugeschnittenen Schlauchproben aus Silikon und PVC werden für mehrere Tage in Schnapdeckelgläser gelegt, die mit Propofol gefüllt sind. Verwendet wird Propofol in Reinform (2,6-



Diisopropylphenol  $\geq 97\%$ , Aldrich) sowie Propofol-®Lipuro (1%, 10 mg/ml) aus 20 ml-Ampullen (Braun).

Je eine Schlauchprobe wird danach mit Ethanol (Raman) bzw. Aceton (Fluoreszenz) gereinigt, um eine bloße Filmbildung des lipophilen Wirkstoffs auf der Oberfläche zu vermeiden. Entsprechend den hydrophilen Bedingungen des Kreislaufexperiments wird eine zusätzliche Schlauchprobe, die mit Propofol-®Lipuro Kontakt hatte, nur mit isotonischer Kochsalzlösung abgespült.

Im nächsten Schritt soll der Nachweis der Propofolablagerungen an Schlauchmaterial, das im Kreislaufexperiment eingesetzt wurde, erfolgen. Die Fluoreszenz-Messung an der inneren Schlauchoberfläche wird sofort nach Beendigung des Experiments (Kapitel 3.2) durchgeführt. Eine weitere Schlauchprobe des entleerten Kreislaufs wird vor der Bestimmung ihrer Fluoreszenz mit Wasser abgespült. Ein hier eventuell zurückbleibender Film auf der Oberfläche der Schlauchinnenseite nach dem Versuch ist jetzt von Interesse, weil er sich unter den gewählten Versuchsbedingungen gebildet hätte.

## **2.10 Hämolyse-Messungen**

Die UV-C-Bestrahlung und die mechanische Beanspruchung durch die Rollerpumpe wirken in der gewählten Versuchsanordnung 7 Stunden auf das Blut ein. Um die Hämolyserate zu beurteilen, wird sowohl vor als auch nach dem Experiment eine Blutprobe entnommen. Das freie Hämoglobin im Plasma wird mit Hilfe eines Photometers (HemoCue Plasma/Low Hb Analyzer, A Quest Diagnostic Company) bestimmt.

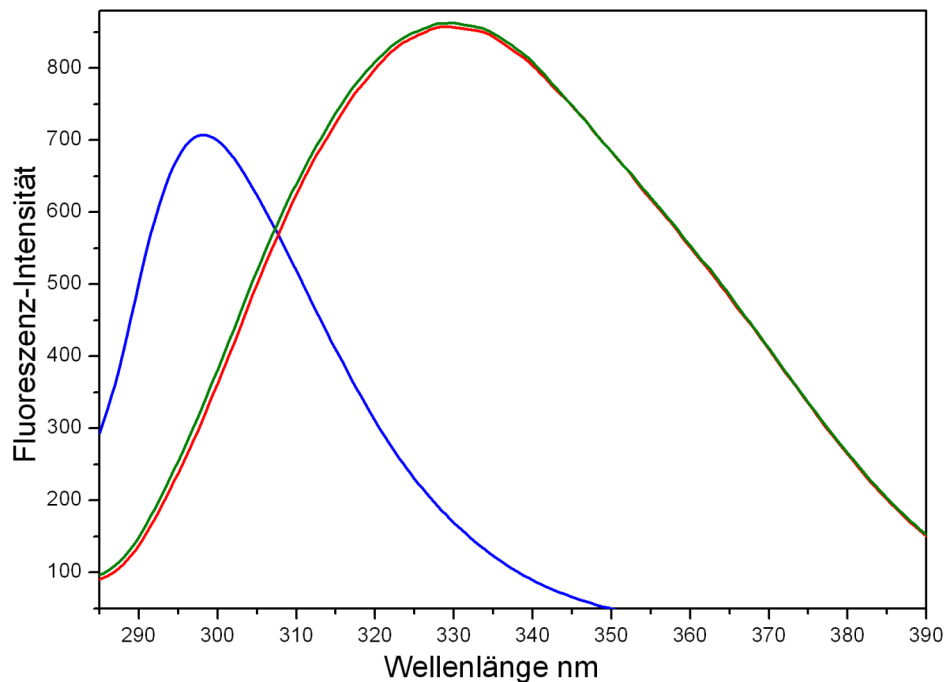
Zur Gewinnung von Plasma erfolgt eine Zentrifugation bei 5000 rpm über 5 Minuten der Blutproben (Zentrifuge: Universal 32R, Hettich). Das Plasma wird in spezielle Mikroküvetten des Herstellers für das Photometer gefüllt.

Vor jeder Messung erfolgt eine Eichung mit genormten hämolytischen Lösungen.

## 2.11 Statistik

Die zur Darstellung der Ergebnisse angewandten statistischen Methoden werden im Folgenden anhand für diese Arbeit repräsentativen Messergebnissen erläutert.

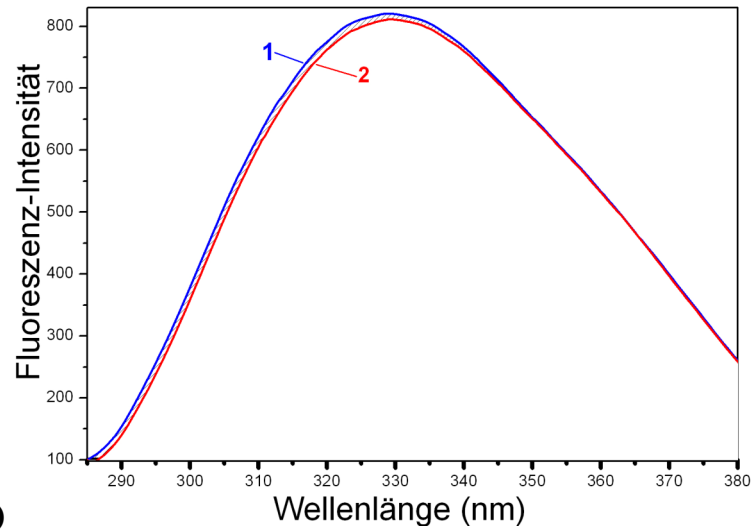
### Spektrenanalyse



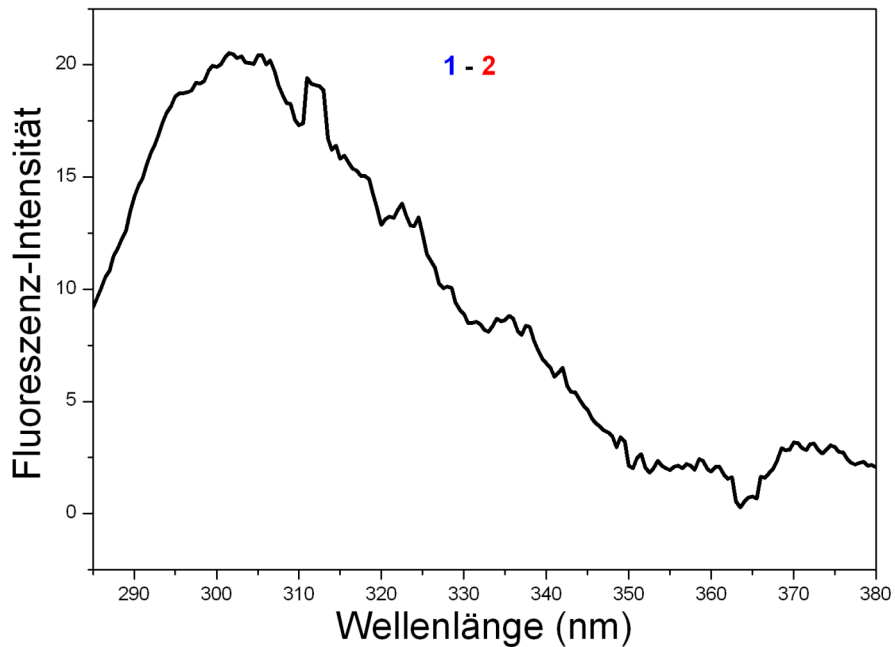
**Abbildung 2-7: Blau: Das reine Propofolspektrum einer statischen Fluoreszenz-Messung; Rot: Das reine Blutspektrum einer Messung im Kreislaufsystem; Grün: Das Spektrum von Blut, zu dem Propofol in klinischer Konzentration zugegeben wurde**

Eine zur Fluoreszenz angeregte Substanz liefert ein Signal in Form eines charakteristischen Spektrums über einen bestimmten Wellenlängenbereich. Daher ist zunächst die Betrachtung des gesamten Spektrums erforderlich. Am aussagekräftigsten sind die Werte des Propofol-Spektrums um sein Maximum von 300 nm. Blut besitzt sein Maximum bei 330 nm (Abb. 2-7).

Das aufgrund seiner korpuskulären Bestandteile sehr dichte Medium Blut liefert das dominierende Fluoreszenzsignal. Propofol-Zugaben bewirken im Blut-Spektrum eine erhöhte Intensität im Wellenlängenbereich 270 bis 330 nm (Abb. 2-7). Subtrahiert man davon das vor Propofol-Zugabe gemessene Blut-Spektrum, so erhält man die durch Propofol-Zugabe bedingten spektralen Unterschiede (Abb. 2-8).



a)

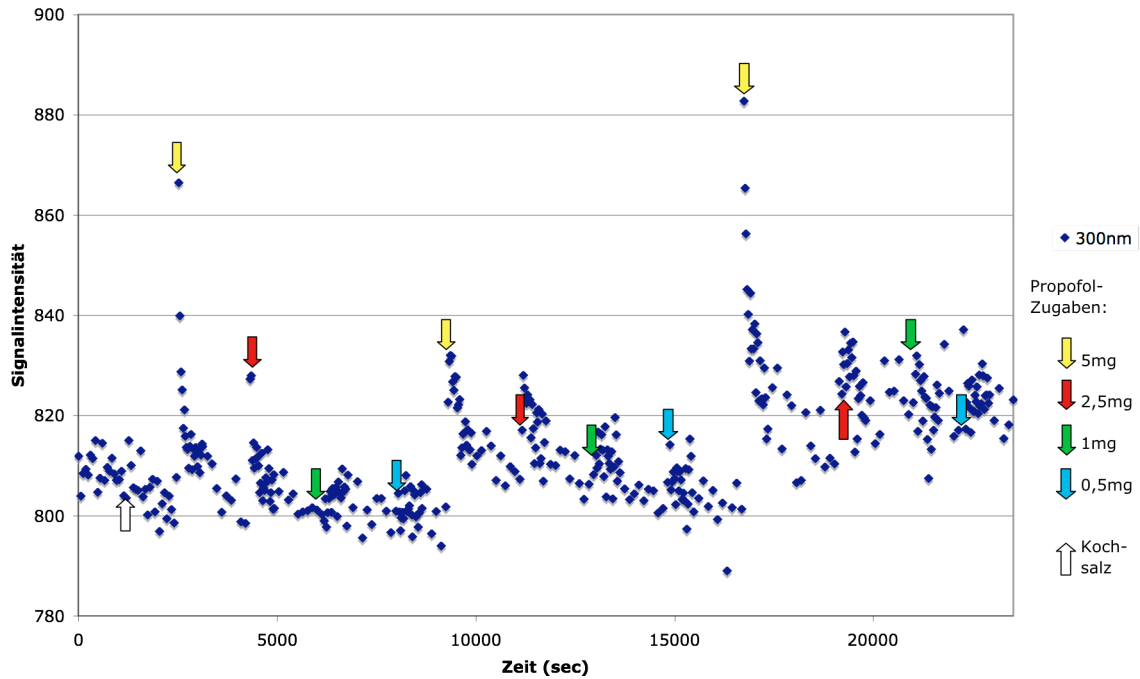


b)

**Abbildung 2-8:** a) Fluoreszenzspektren aufeinander folgender Messungen eines Experiments im Kreislaufsystem. Rot: Das reine Blutspektrum, Blau: Das Spektrum von Blut, nachdem Propofol in klinischer Konzentration zugegeben wurde.

b) Die Differenz des roten und blauen Spektrums ergibt wiederum ein Spektrum, das sein Maximum bei 300 nm aufweist. Dies ist charakteristisch für das Propofolspektrum. Diese Differenz entspricht der schraffiert Fläche zwischen den beiden Spektren in a).

Dies zeigt, dass der maximale Effekt von Propofol auf das Fluoreszenzsignal im Bereich von 300 nm zu erwarten ist. Daher wird in den folgenden Darstellungen des zeitlichen Verlaufs des Propofol-Signals die Auftragung der Fluoreszenzintensität bei 300 nm angewandt (Abb. 2-9).



**Abbildung 2-9: Beispiel für das typische Fluoreszenzverhalten bei 300 nm im zeitlichen Verlauf eines Experiments (Experiment E<sub>1</sub> aus Kapitel 3.2). Zum Zeitpunkt der Zugabe verschiedener Mengen Propofol (gekennzeichnet durch Pfeile) zeigt sich ein Signalanstieg.**

Propofol beeinflusst auch außerhalb seines Fluoreszenzmaximums von 300 nm das Fluoreszenzspektrum von Blut. Daher wird für ausgewählte Messreihen eine Darstellung angewandt, die den zeitlichen Fluoreszenz-Intensitätsverlauf für weitere Wellenlängen des Blut-Spektrums zeigt (Kapitel 3.2.6).

### Bestimmung des Propofol-Effekts

Zur Bestimmung des Propofol-Effekts (Intensitätsanstieg im Bereich 300 nm), der sich in der Differenz der Spektren vor und nach der Propofol-Zugabe äußert, eignen sich zwei Methoden: Die Differenz aus den Fluoreszenzintensitäten vor und nach Propofol-Zugabe bei 300 nm sowie die Fläche zwischen den durch Propofol-Zugabe verschobenen Kurven im Bereich 295-305 nm. Liegt das Signal bei 305 nm aufgrund der erhöhten Signalverstärkung des Detektors bereits außerhalb des Messbereichs (>999 Intensitätspunkte), so wird ein kürzerer Ausschnitt aus dem Spektrum zur Flächenberechnung gewählt (Kapitel 3.2.3).

Zur Berechnung des Signalanstiegs nach Propofol-Zugabe werden Mittelwerte verwendet. Der erste Wert nach Propofol-Zugabe wird stets ausgeschlossen. Der Mittelwert wird aus den drei folgenden Spektren berechnet. Die Differenzbildung erfolgt mit dem Mittelwert der letzten drei Spektren vor Propofol-Zugabe.

Bsp: [ (Spektren 38 + 39 + 40) : 3 ] – [ (Spektren 34 + 35 + 36) : 3 ] =  
Intensitätsdifferenz

34-36 = Spektren vor Propofol-Zugabe, 38-40 = Spektren nach Propofol-Zugabe

Dadurch werden Extremwerte, die durch noch unvollständige Verteilung von Propofol im Kreislaufsystem entstehen können, aus der Statistik ausgeschlossen.

Die Propofol-Effekte der vier zugegebenen Propofol-Konzentrationen 5 mg, 2,5 mg, 1 mg und 0,5 mg werden für alle drei Zugabe-Serien bestimmt. Aus den drei Intensitätszunahmen, jeweils einer Konzentration in den aufeinander folgenden Serien, erfolgt die Mittelwertbildung. Diese werden graphisch mit ihren Mittelwerten und Standardabweichungen gegen die Konzentration aufgetragen. Es wird eine lineare Regression durchgeführt (Kapitel 3.2.3).

Die verschiedenen Kreislaufexperimente wurden jeweils zwei Mal wiederholt, um ihre Reproduzierbarkeit belegen zu können.

### **Beschreibung des Signalabfalls**

Der Signalabfall nach Propofol-Zugabe wird mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung beschrieben. Verwendet werden die Werte bei 300 nm einer Spektrenmessung nach Propofol-Zugabe bis zum letzten Wert vor erneuter Propofol-Zugabe nach 30 Minuten (Kapitel 3.2.4).

Die allgemeine Formel lautet:  $y = Ae^{-x/t_1}$

Für die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  gilt:  $y = (1/2) A_0$                        $A_0 = \text{Ausgangskonzentration}$   
 $x = t_{1/2}$

Daraus ergibt sich:

$$\frac{1}{2} A_0 = A_0 e^{-(t_{1/2})/t_1} \quad \text{Logarithmus naturalis (ln)}$$
$$\ln \left(\frac{1}{2}\right) = - (t_{1/2})/t_1$$
$$t_1 \ln \left(\frac{1}{2}\right) = - t_{1/2} \quad \text{Es gilt: } \ln \left(\frac{1}{2}\right) = - \ln 2$$

Somit lautet die Formel für die Halbwertszeit:  $t_{1/2} = \ln(2) t_1$

Die ermittelten Halbwertszeiten werden vergleichend beurteilt.

Die Signalentwicklung des zeitlichen Gesamtverlaufs wird im Kapitel 3.2.4 durch eine lineare Geradenanpassung sowie die Differenz zwischen Ausgangs- und Endwert des Experiments bewertet.

Der Signalabfall bei den Messungen an Vollblut in Kapitel 3.4 wird ebenfalls mit Hilfe von Differenzen verglichen. Die Differenz wird aus dem letzten Messwert vor der zu beurteilenden Propofol-Zugabe und dem letzten Messwert vor der darauf folgenden Propofol-Zugabe gebildet. In Tab. 2-1 auf S. 17 ist dies z.B. die Differenz aus Spektrum 36 und Spektrum 72.

### **Bestimmung der Signifikanz der Signalanstiege nach Propofol-Zugabe**

Zur Bestimmung der Signifikanz der Signalanstiege nach Propofol-Zugabe in den Messreihen wurden folgende Schritte mit Origin Pro 8 und Microsoft Excel durchgeführt.

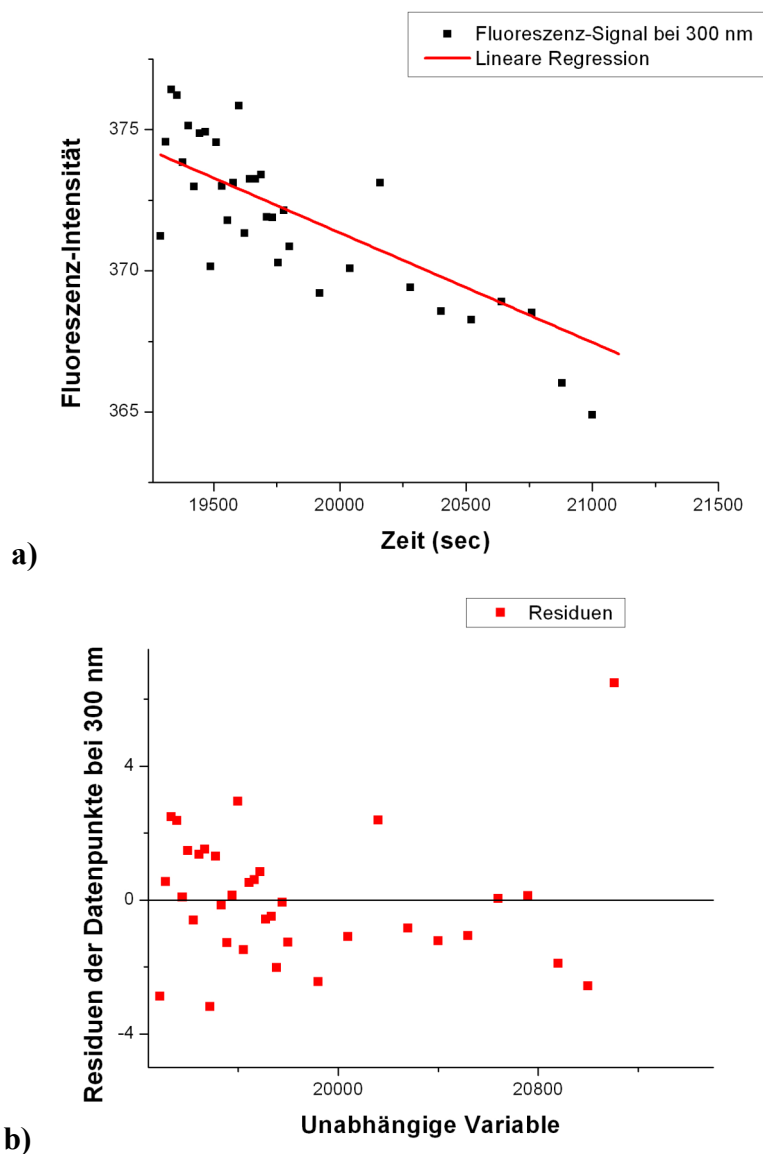
Das Vorgehen beruht auf der Betrachtung von Residuen der linearen Regression, für deren Durchführung die Messdaten vor der jeweiligen Propofol-Zugabe verwendet werden. Ein Residuum ist die Abweichung der Datenpunkte von der linearen Regression. Diese Residuen liegen im idealen Fall normalverteilt vor. Durch Studentisierung der Residuen erhalten diese identische Varianzen. Somit liefert die Studentisierung eine Normalverteilung [7].

Der durch Propofol-Zugabe erzeugte Signalanstieg (Mittelwert des 2.–4. Werts nach Propofol-Zugabe; siehe oben) stellt das zu prüfende Residuum dar. Die Nullhypothese,

dass das studentisierte Residuum nach Propofol-Zugabe die Realisation einer standardnormalverteilten Zufallsvariablen ist, wird abgelehnt, falls der p-Wert kleiner gleich 0,05 ist. In diesem Fall ist auf einem Signifikanzniveau von 5 % gezeigt, dass der Anstieg nach der Zugabe nicht auf Zufall bzw. dem Messfehler der Apparatur beruht.

**Bestimmung des Korrekturfaktors zur Studentisierung des Residuums nach Propofol-Zugabe:**

Erstellung einer linearen Regression<sup>a</sup> ( $y = ax + b$ ) der Messdaten vor Propofol-Zugabe und dem folgenden Signalanstieg. Anhand dieser wird eine Residuenanalyse vorgenommen (Abb. 2-10).



**Abbildung 2-10: a) Lineare Regression der Messdaten vor Propofol-Zugabe mit dem Wert nach Propofol-Zugabe, b) Residuen der Messdaten zur linearen Regression**

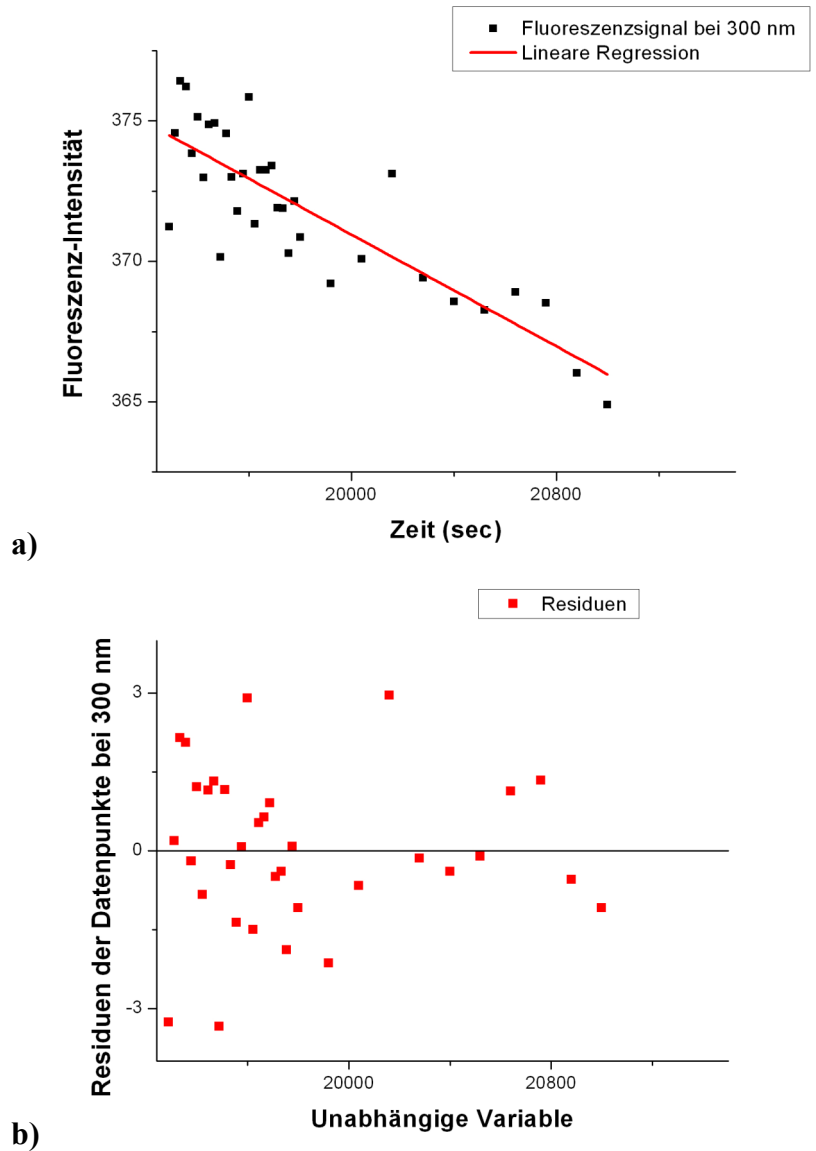
Die Residuen werden studentisiert. Der Korrekturfaktor  $(1-p_{\text{neu}})^{0,5}$  zur Studentisierung des Residuums nach Propofol-Zugabe wird aus folgender Formel bestimmt:

$$\text{Studentisiertes Residuum} = \text{Residuum} / ((1-p_{\text{neu}})^{0,5} * S)$$

S = geschätzte Standardabweichung der linearen Regression<sup>a</sup> mit Signalanstieg

**Studentisierung des Residuums nach Propofol-Zugabe:**

Erstellung einer linearen Regression<sup>b</sup> ( $y = ax + b$ ) allein aus den Messdaten vor Propofol-Zugabe und Studentisierung der Residuen (Abb. 2-11).



**Abbildung 2-11: a) Lineare Regression allein aus den Messdaten vor Propofol-Zugabe, b) Residuen der Messdaten zur linearen Regression**



Die studentisierten Residuen haben definitionsgemäß den Mittelwert 0 und die Standardabweichung 1. Die studentisierten Residuen werden auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test geprüft. Normalverteilung liegt bei einem Wert von  $Prob < W$  über 0,1 vor.

Anhand von der Steigung  $a$  und dem Achsenabschnitt  $b$  kann das der Normalverteilung zugehörige Residuum  $y$  zum Zeitpunkt  $x$  geschätzt werden. Das zu beurteilende Residuum  $R$  ergibt sich aus der Differenz des tatsächlichen und geschätzten Residuums. Dieses wird nun ebenfalls studentisiert, indem es durch die geschätzte Standardabweichung der Regression<sup>b</sup> und oben geschätzten Faktor  $(1-p_{neu})^{0,5}$  dividiert wird. Dadurch ist ein Vergleich mit den ebenfalls studentisierten übrigen Residuen möglich.

### **Hypothesentest:**

Hypothese: Das studentisierte Residuum zum gewählten Zeitpunkt  $t = x$  stammt von einer standardnormalverteilten Zufallsvariablen  $X$ .

Testgröße (Studentisiertes Residuum nach Zugabe) =  $R / ((1-p_{neu})^{0,5} * S)$

$S$  = geschätzte Standardabweichung der linearen Regression<sup>b</sup> ohne Signalanstieg

$p$ -Wert =  $1 - \text{Standardnormalverteilt}(\text{Testgröße})$

### 3 Ergebnisse

In den Kapiteln 3.1.1 und 3.1.2 werden die Untersuchungen, die der Entwicklung des Kreislaufmodells voraus gingen, dargestellt. Die Kapitel 3.2 bis 3.4 behandeln die Ergebnisse, die im Kreislaufsystem mit verschiedenen Blutprodukten als Messmedien entstanden sind. Von den unterschiedlichen Einflüssen auf das Fluoreszenzsignal des Propofols handelt Kapitel 3.1.3 sowie Kapitel 3.5.

Abbildung 3-1 gibt einen Überblick über die mit dem Kreislaufsystem durchgeführten Experimente und den sich daraus entwickelnden Fragestellungen, denen in dieser Arbeit nachgegangen wurde.

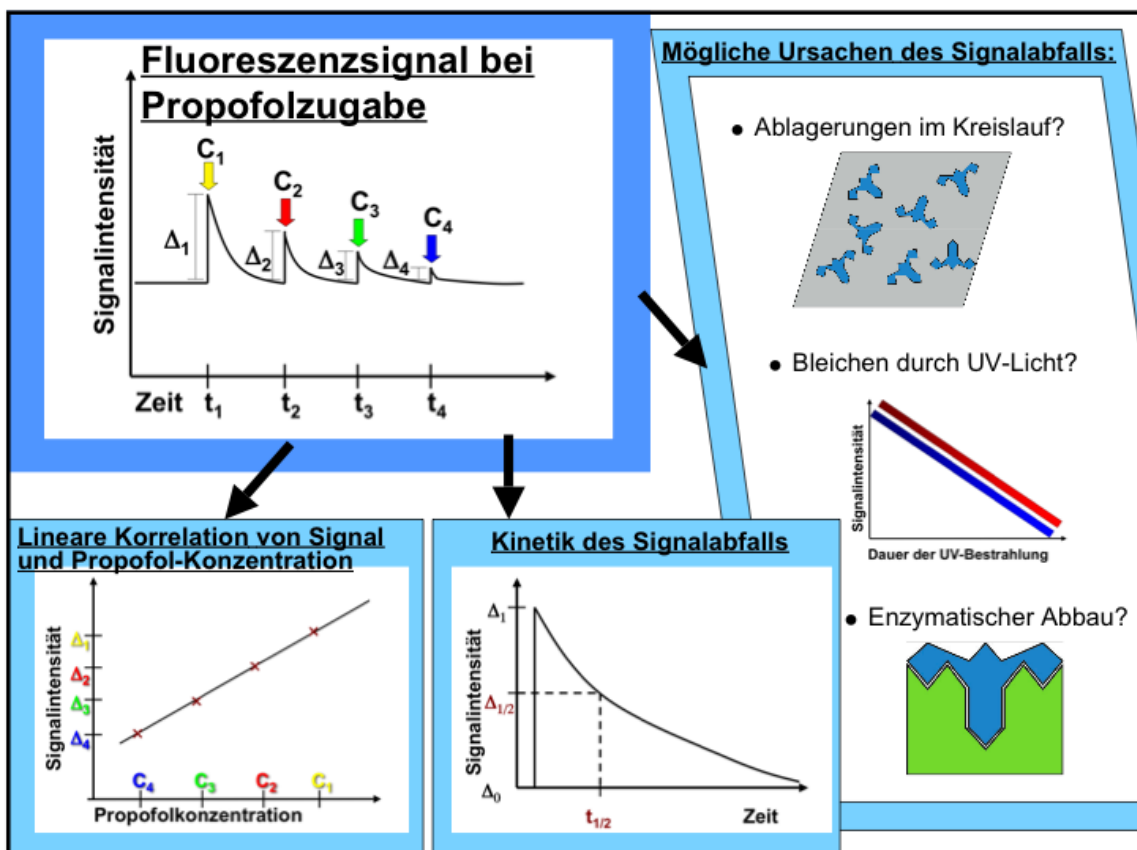


Abbildung 3-1: Inhalte der Experimente: Das typische Fluoreszenzverhalten von Propofol im mit Blut gefüllten Kreislaufsystem wird auf seine lineare Korrelation von Signal und Propofol-Konzentration, die Kinetik des Signalabfalls sowie auf unterschiedliche für den Signalabfall verantwortliche Faktoren untersucht.

Abbildung 3-2 zeigt in einer Übersicht die verschiedenen Blutprodukte, die als Messmedien in den Fluoreszenzexperimenten mit Propofol eingesetzt wurden.



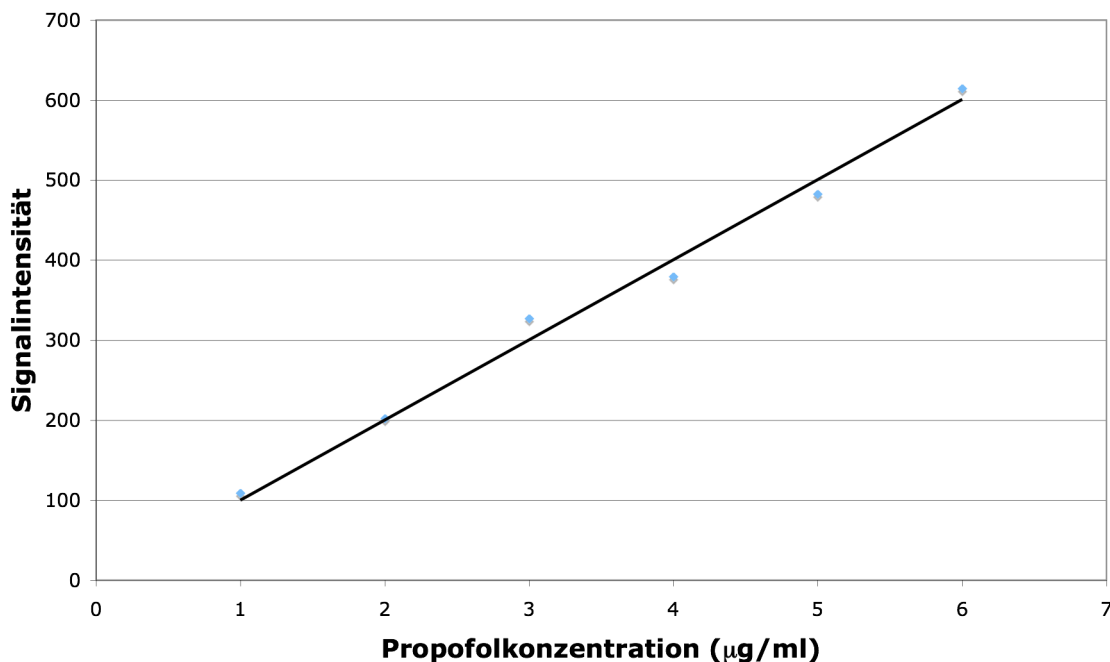
Abbildung 3-2: Die Darstellung der Ergebnisse ist nach den als Messmedien eingesetzten Blutprodukten, in denen der Propofol-Nachweis durch Fluoreszenz erfolgt, gegliedert. Zu erkennen ist die schrittweise Entwicklung der Experimente zum physiologischen Medium Vollblut.

### 3.1 Statische Messungen in der Küvette

#### 3.1.1 Konzentrationsabhängige Messungen

Das Fluoreszenzsignal bei Anregung mit 274 nm und die Propofol-Konzentration verschiedener Proben korrelieren linear miteinander. Gemessen werden Verdünnungsreihen in isotonischer Kochsalzlösung mit Konzentrationen von 1-6  $\mu\text{g/ml}$  und 10-50  $\mu\text{g/ml}$  Propofol-Lipuro®. Aufgetragen wird jeweils die Signalintensität des Maximalwerts des erzeugten Fluoreszenzspektrums. Dieser liegt in etwa bei einer Wellenlänge von 300 nm.

Diese Messungen in abgeschlossenen Küvetten ergeben sehr gute Übereinstimmung mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,99 bzw. 0,98 in Abhängigkeit von der Propofolkonzentration sowohl im Bereich 1-6  $\mu\text{g/ml}$  (Abb. 3-3) als auch 10-50  $\mu\text{g/ml}$  (Abb. 3-4).



**Abbildung 3-3: Signal-Konzentrations-Korrelation für die Verdünnungsreihe 1-6  $\mu\text{g/ml}$  Propofol in isotonischer Kochsalzlösung (Anregungswellenlänge: 274 nm, Sensitivität: 540 V). Die lineare Regression mit  $y = 100,15x$  weist ein  $R^2$  von 0,9895 auf und führt durch den Koordinatenursprung.**

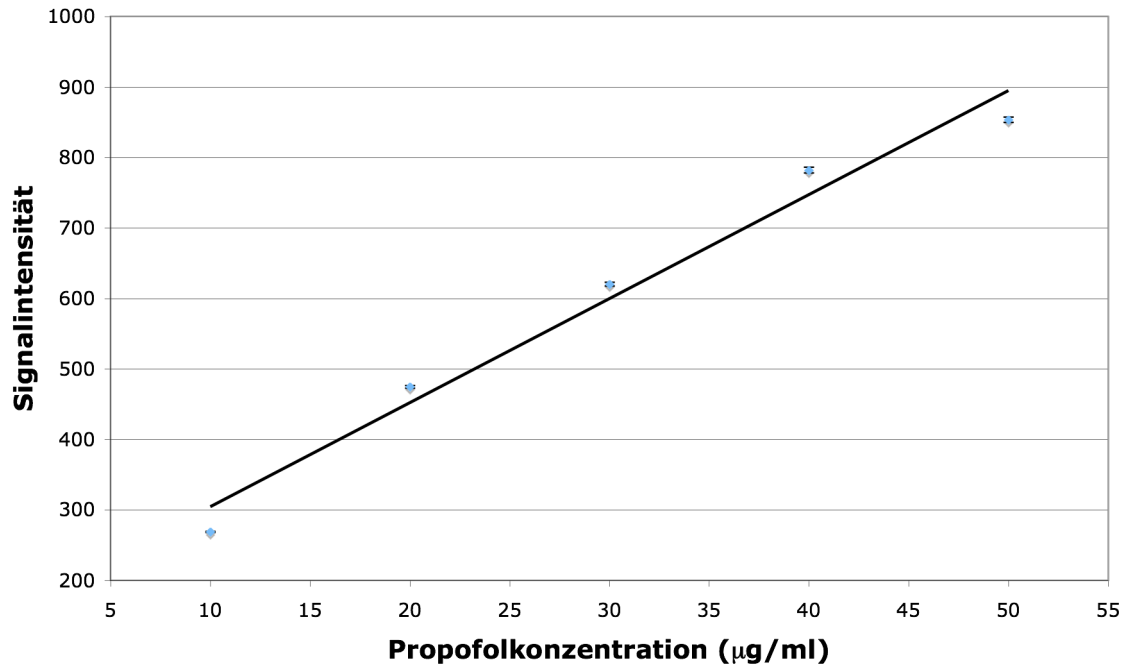


Abbildung 3-4: Signal-Konzentrations-Korrelation für die Verdünnungsreihe 10-50 µg/ml Propofol in isotonischer Kochsalzlösung (Anregungswellenlänge 274 nm, Sensitivität: 390 V). Die lineare Regression mit  $y = 14,764x + 156,88$  weist ein  $R^2$  von 0,9771 auf.

Tabelle 3-1: Propofolkonzentration und zugehörige Signalintensitäten

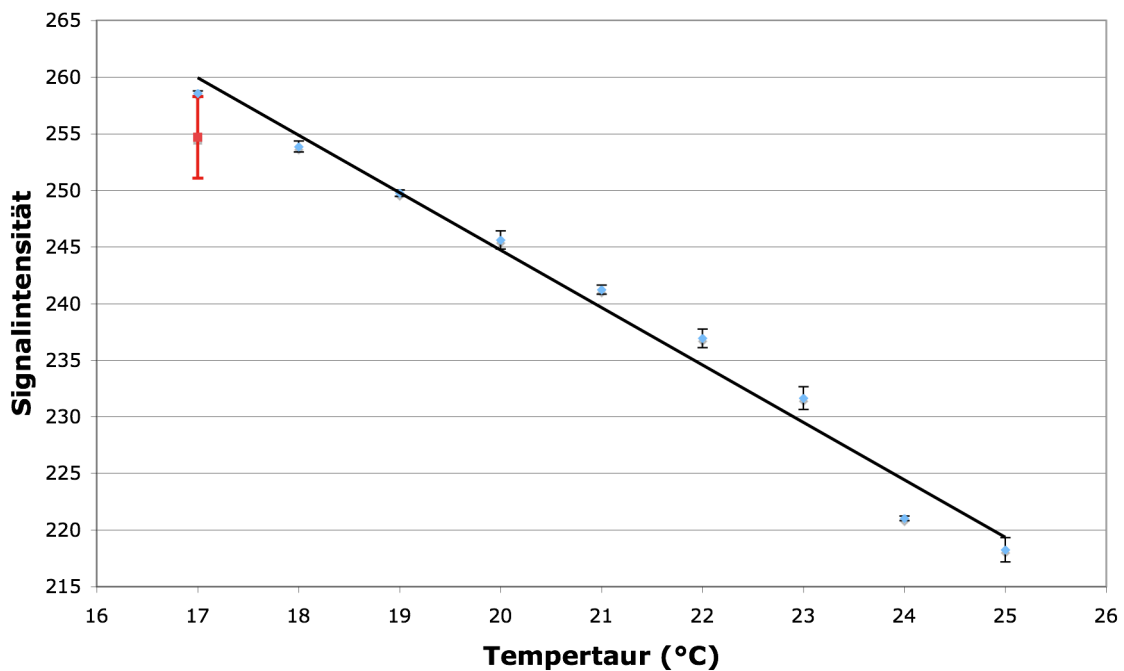
Propofol-konzentration (µg/ml)	Signalintensität bei 300 nm	Propofol-konzentration (µg/ml)	Signalintensität bei 300 nm
1	109	10	269
2	202	20	475
3	327	30	620
4	379	40	782
5	483	50	853
6	615		

### 3.1.2 Temperatureinfluss auf das Fluoreszenzsignal

In diesem Kapitel wird der Temperatureinfluss auf das Fluoreszenzsignal untersucht. Mit steigender Temperatur sinkt die Signalintensität des Fluoreszenzsignals. Die Propofol-Konzentration der Probe in isotonischer Kochsalzlösung beträgt 3 µg/ml. Bereits die Temperaturerhöhung um 1° C erzeugt einen durchschnittliche Signalabfall von 1,95 % (Tab. 3-2).

Bei der gewählten Temperaturdifferenz von 8° C erhält man einen Intensitätsunterschied der Fluoreszenz von 40,3 Intensitätspunkten bei mittlerer Sensitivität des Detektors. Dies entspricht einem Signalabfall von 15,6 % (Abb. 3-5). Es besteht ein sehr guter linearer Zusammenhang mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,98.

Neben dem Temperatureinfluss auf das Fluoreszenz-Signal bewirkt das zur Anregung verwendete UV-Licht eine Abnahme des Fluoreszenzsignals der Propofol-Probe (Kapitel 3.1.3). Aus diesem Grund erfolgt eine Referenzmessung der Probe bei 17° C nach jeder Temperaturerhöhung. Sie zeigt eine im zeitlichen Verlauf abnehmende Signalintensität. In Abbildung 3-5 sind Mittelwert und Schwankungen der Fluoreszenz-Intensität bei 17° C über den Gesamtverlauf der Messung rot dargestellt.



**Abbildung 3-5:** Das Fluoreszenzsignal ist abhängig von der Temperatur der Probe (3 µg/ml Propofol in isotonischer Kochsalzlösung). Die lineare Regression,  $y = -5,0766x + 346,26$ , besitzt ein  $R^2$  von 0,9815. Rot eingetragen ist der Mittelwert der Referenzmessungen bei 17° C mit seiner Standardabweichung.

**Tabelle 3-2: Fluoreszenzsignal von Propofol (3 µg/ml Propofol) bei Temperaturerhöhung um jeweils 1° C.**

Temperatur (° C)	Fluoreszenzintensität*	Abnahme in Prozent (%) bei Temperaturerhöhung um 1° C
17	259	-
18	254	1,8
19	250	1,6
20	246	1,6
21	241	1,7
22	237	1,7
23	232	2
24	221	4,1
25	218	1

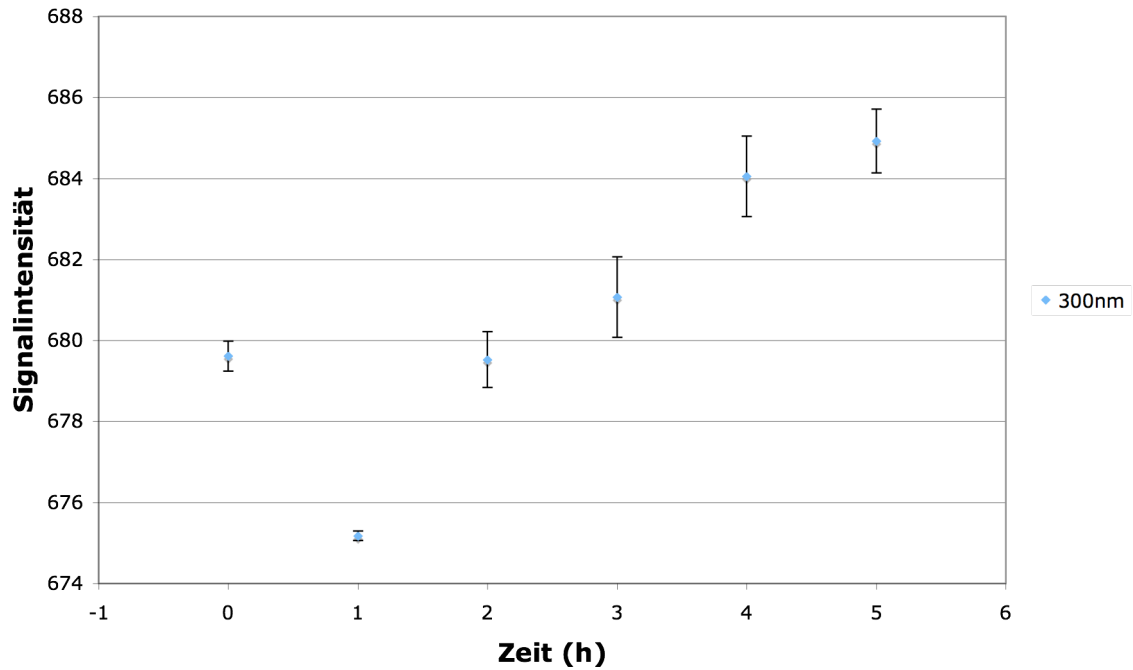
\*Mittelwert aus 5 Spektren

Neben der Energieabgabe in Form von Emission erreichen die mit 274 nm angeregten Moleküle ihren Grundzustand auch durch Prozesse, die zur Erwärmung der Probe führen (Kapitel 2.6). Über einen Messzeitraum von einer Stunde und 40 Minuten kann unter sonst identischen Messbedingungen ein Signalabfall von 4,15 %, ohne Erhaltung einer konstanten Temperatur, gegenüber einem Signalabfall von 1,94 %, mit Temperaturregulation, beobachtet werden.

### **3.1.3 Einfluss der UV-Bestrahlung**

Nach mehrstündiger Anregung mit UV-Licht von 274 nm sinkt das Fluoreszenzsignal von Propofol.

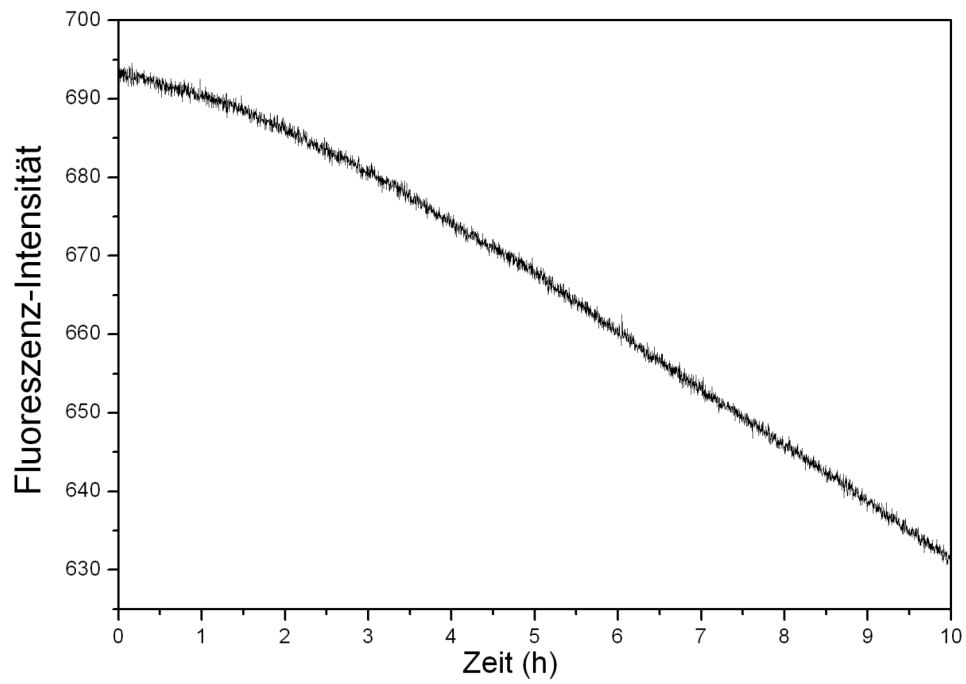
Die Fluoreszenz einer temperaturregulierten Probe von 40 µg/ml Propofol-Lipuro® in isotonomischer Kochsalzlösung wird unter sterilen Bedingungen zuerst stündlich bestimmt (Abb. 3-6) und somit auch nur stündlich dem UV-Licht ausgesetzt. Die Fluoreszenzschwankungen zwischen Maximal- und Minimalwert (684,92 und 675,17) unter kurzfristiger stündlicher UV-Bestrahlung bei 274 nm betragen 9,75 Intensitätspunkte. Dies entspricht 1,43 % des Mittelwertes der gemessenen Intensitäten.



**Abbildung 3-6: Stündliche Fluoreszenzbestimmung einer sterilen Probe von 40 µg/ml Propofol in isotonischer Kochsalzlösung.**

Die permanente UV-Bestrahlung im 10-Sekunden-Takt während der Zeitverlaufsmessung über einen Zeitraum von 10 Stunden (Abb. 3-7) führt zu einer kontinuierlichen Intensitätsabnahme des Fluoreszenzsignals. Diese tritt trotz einer verlässlichen Temperaturregulation während der Messung mit einer Temperiereinheit auf. Im Zeitraum der ersten 5 Stunden erfolgt ein Intensitätsabfall von 25 Punkten oder 3,6 %. Nach 10 Stunden liegt ein um 8,8 % oder 61 Punkte schwächeres Signal als zu Beginn vor.





**Abbildung 3-7: Das Fluoreszenzsignal einer sterilen Propofol-Probe von 40  $\mu\text{g/ml}$  in isotonischer Kochsalzlösung bei 300 nm über 10 h.**

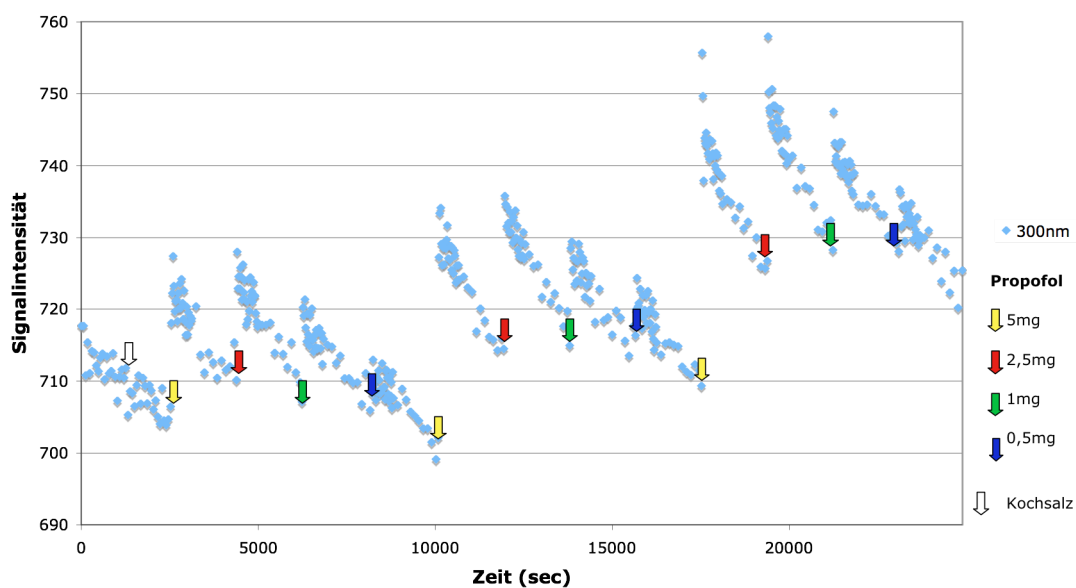
### 3.2 Untersuchungen an der Suspension aus Erythrozytenkonzentrat und Gefrorenem Frischplasma

Im diesem Kapitel werden 6 Fluoreszenzmessungen im Kreislaufsystem dargestellt (Tab. 3-3). Das Medium zum Propofol-Nachweis ist mit Gefrorenem Frischplasma (GFP) suspendiertes Erythrozytenkonzentrat. Abbildung 3-8 zeigt beispielhaft, wie sich die Fluoreszenzintensität über die Dauer des experimentellen Verlaufs im Kreislaufmodell verändert.

**Tabelle 3-3: Versuchsbedingungen der Experimente E<sub>1</sub>-E<sub>6</sub>.**

Die gelb und blau hinterlegten Experimente wurden bei höherer Detektorspannung (Sensitivität) aufgezeichnet. Grün hinterlegt sind die Experimente deren vollständiges Spektrum bei geringerer Sensitivität gemessen wurde.

Experiment	Temperatur (°C)	Detektorspannung (V)	Hämatokrit (%) der Probe aus dem Kreislauf	pH-Wert
E <sub>1</sub>	36,7	435	30,4	7,01
E <sub>2</sub>	36,7	435	34,7	6,62
E <sub>3</sub>	36,7	380	43,7	6,43
E <sub>4</sub>	36,7	380	47,5	6,69
E <sub>5</sub>	22	410	42,9	6,75
E <sub>6</sub>	22	410	34,7	6,52

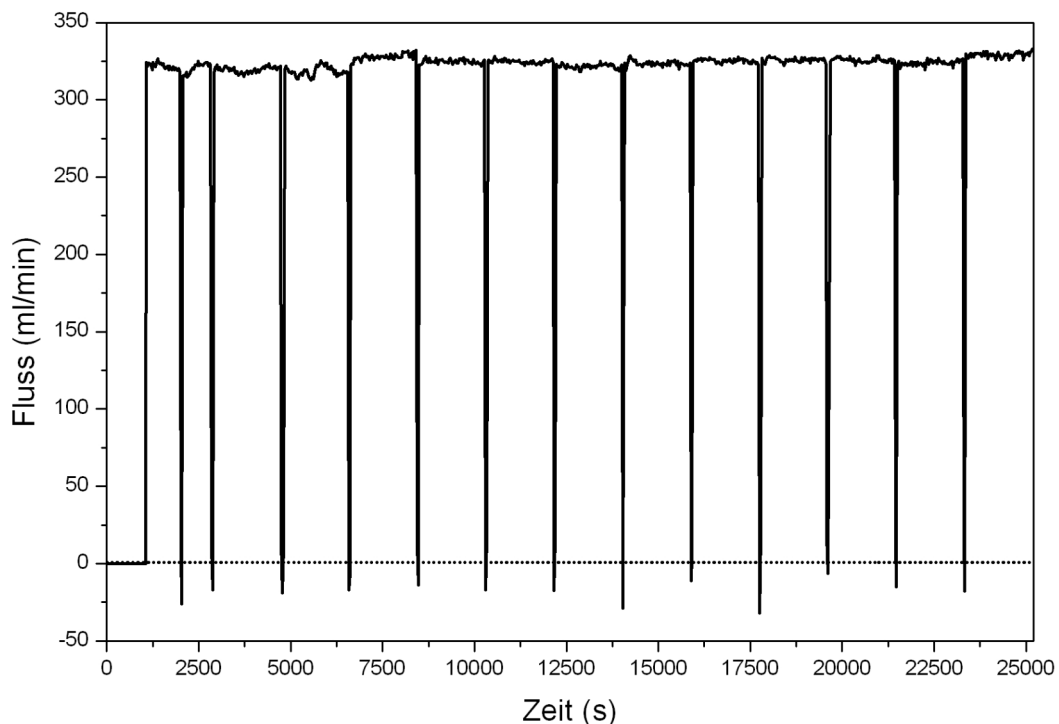


**Abbildung 3-8: Typischer Zeitverlauf der Fluoreszenzintensität während 3 Propofol-Zugabeserien im Medium „Suspension aus Erythrozytenkonzentrat und**

GFP“ (Experiment E<sub>5</sub>). Die Pfeile kennzeichnen den Zeitpunkt der Propofol-Zugaben.

### 3.2.1 Signalkonstanz bei Zirkulation im Kreislaufsystem

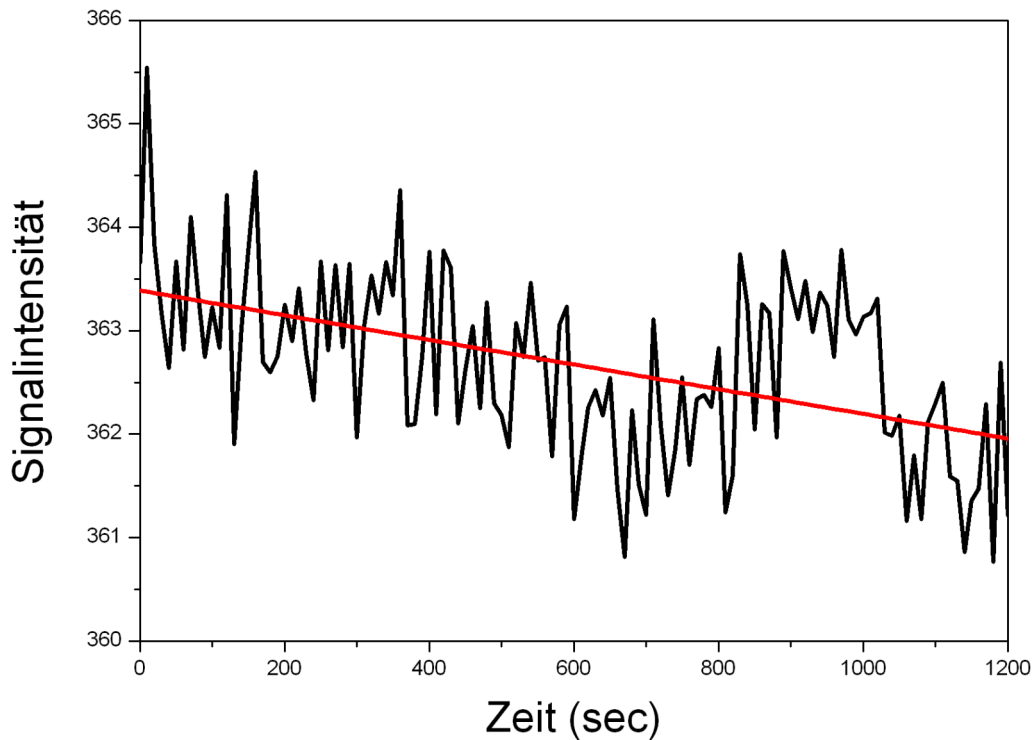
Durch die Rollerpumpe entsteht einen kontinuierlicher Blutfluss im Kreislaufmodell. Dies dokumentiert die Flussmessung (Abb. 3-9). Zu erkennen ist, dass der Blutfluss alle 30 Minuten (=1800 s) zur Propofol-Zugabe gestoppt wird. Anschließend wird die Flussrate sofort wieder erreicht.



**Abbildung 3-9: Flussrate eines experimentellen Durchlaufs. Der Fluss von 320 – 330 ml/ min im Kreislaufsystem wird alle 1800 s zur Propofol-Zugabe gestoppt. Die gepunktete Linie stellt die Nulllinie dar.**

Der Blutfluss durch die Messkammer kann den Bleichungseffekt der UV-Strahlung bei 274 nm auf das Blut minimieren. Vor jedem Versuch wurde in einer Zeitverlaufsmessung für 20 Minuten in Abständen von 10 Sekunden die Signalintensität der Fluoreszenz der Suspension aus Erythrozytenkonzentrat und GFP bestimmt (Abb. 3-10). Das Fluoreszenzsignal unterliegt dabei Schwankungen, die als Standardabweichung vom Mittelwert in Tabelle 3-4 aufgetragen sind. Die Standardabweichungen des Fluoreszenzsignals liegen zwischen 0,2 % und 0,3 % vom Mittelwert. Die geringen

Steigungen der linearen Regression im Bereich von +0,08 % bis -0,27 % über 5 Minuten belegen, dass der Bleichungseffekt des Bluts im Durchfluss deutlich reduziert ist.



**Abbildung 3-10: E<sub>3</sub>: Fluoreszenzsignal der Suspension aus Erythrozytenkonzentrat mit GFP bei 300 nm über 20 Minuten (1200 s).**

**Tabelle 3-4: Das Fluoreszenzverhalten der Suspension aus Erythrozytenkonzentrat mit GFP bei 300 nm über 20 Minuten.**

Versuch	Steigung*: Signalabfall über 5 min in Prozent (%)	Abfall* nach 20 min in Prozent (%)	Mittelwert (absolut)	Standard- abweichung
E <sub>1</sub>	-0,03	-0,14	816,17	2,52 (0,3 %)
E <sub>2</sub>	-0,04	-0,18	775,45	1,45 (0,2 %)
E <sub>3</sub>	+0,08	+0,32	362,67	0,87 (0,2 %)
E <sub>4</sub>	-0,15	-0,59	692,01	1,73 (0,3 %)
E <sub>5</sub>	-0,27	-1,09	718,27	2,42 (0,3 %)
E <sub>6</sub>	-0,21	-0,83	739,01	2,06 (0,3 %)

\* der linearen Regression

### 3.2.2 Signalzunahme bei Propofol-Zugabe

Nach der Propofol-Zugabe erfolgt ein Anstieg der Fluoreszenzintensität. Zum besseren Vergleich der Experimente untereinander stellt die Tabelle 3-5 die Signalzunahme bei 300 nm nach Propofol-Zugabe in Prozent dar. Die Signalzunahme ist bei Messungen mit hoher Spannung des Detektors ( $E_1$  und  $E_2$ ) größer als bei Messungen mit geringerer Sensitivität ( $E_3$  und  $E_4$ ). Der Effekt der Propofol-Zugabe von 5 mg liegt bei  $E_1$  bis  $E_6$  zwischen 4,92 % in  $E_1$  und 0,88 % in  $E_4$ .

Jedoch auch die Experimente mit gleichen Parametereinstellungen des Fluoreszenzspektrometers und gleicher Temperatur variieren untereinander in der Größe ihrer Signalzunahmen. So unterscheidet sich der Signalanstieg nach Zugabe von 5 mg Propofol bei  $E_1$  und  $E_2$  um 1,15 Prozentpunkte, bei  $E_3$  und  $E_4$  um 2,11 Prozentpunkte sowie bei  $E_5$  und  $E_6$  um 1,25 Prozentpunkte.

**Tabelle 3-5: Signalanstieg bei 300 nm nach Propofol-Zugabe in Prozent (Mittelwert aus je drei Zugabe-Serien eines Experiments).**

Propofol-Zugabe (mg)	Signalanstieg in Prozent (%) und normierter Wert* bei Experiment					
	$E_1$	$E_2$	$E_3$	$E_4$	$E_5$	$E_6$
5	4,92 (5*)	3,77 (5*)	2,99 (5*)	0,88 (5*)	4 (5*)	2,75 (5*)
2,5	2,07 (2,1*)	1,8 (2,3*)	2,67 (4,5*)	0,37 (2,1*)	2 (2,5*)	2,19 (4*)
1	0,39 (0,4*)	1,08 (1,4*)	1,43 (2,4*)	0,2 (1,1*)	1,2 (1,5*)	1,52 (2,8*)
0,5	0,38 (0,4*)	0,94 (1,2*)	0,68 (1,1*)	0,22 (1,3*)	0,51 (0,6*)	0,44 (0,8*)

Jeder Anstieg des Fluoreszenzsignals nach Propofol-Zugabe in den Mengen von 5 mg und 2,5 mg Propofol (Verdünnung im Kreislaufsystem auf 35,7  $\mu\text{g/ml}$  und 17,8  $\mu\text{g/ml}$ ) ist allen sechs Experimenten hochsignifikant. Auch die Injektion von 1 mg bzw. 0,5 mg (Verdünnung im Kreislaufsystem auf 7,1  $\mu\text{g/ml}$  und 3,6  $\mu\text{g/ml}$ ) bewirkt in den Experimenten  $E_3$  bis  $E_6$  hochsignifikante Fluoreszenzveränderungen (Tabelle 3-6).

Allein im Experiment  $E_1$  zeigt das Fluoreszenzsignal keine Signifikanz für die Propofol-Mengen 1 mg und 0,5 mg. Nur die 1 mg Propofol-Injektion der zweiten Zugabe-Serie ist hier signifikant.

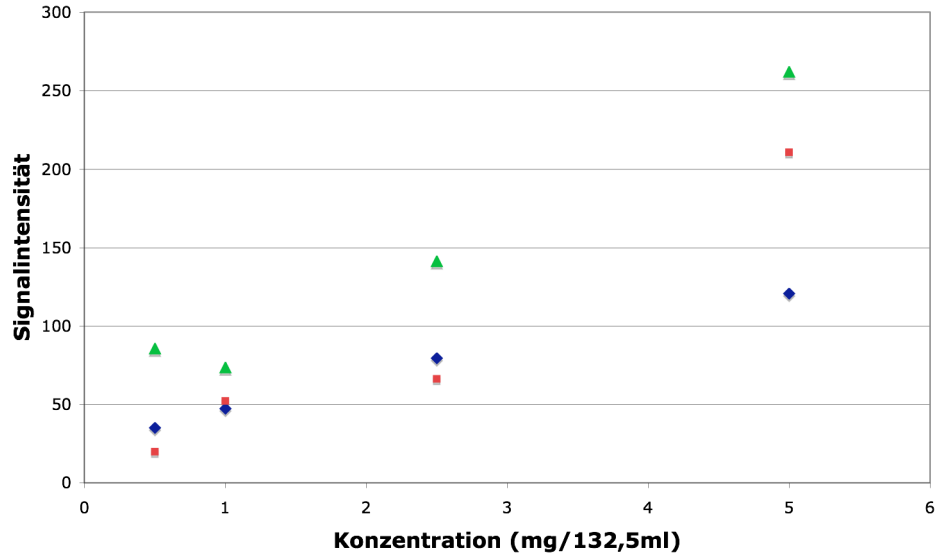
Experiment  $E_2$  weist bei der Propofolgabe von 0,5 mg der zweiten Serie keine Signifikanz auf.

Tabelle 3-6: Signifikanz des Signalanstiegs nach Zugabe von Propofol

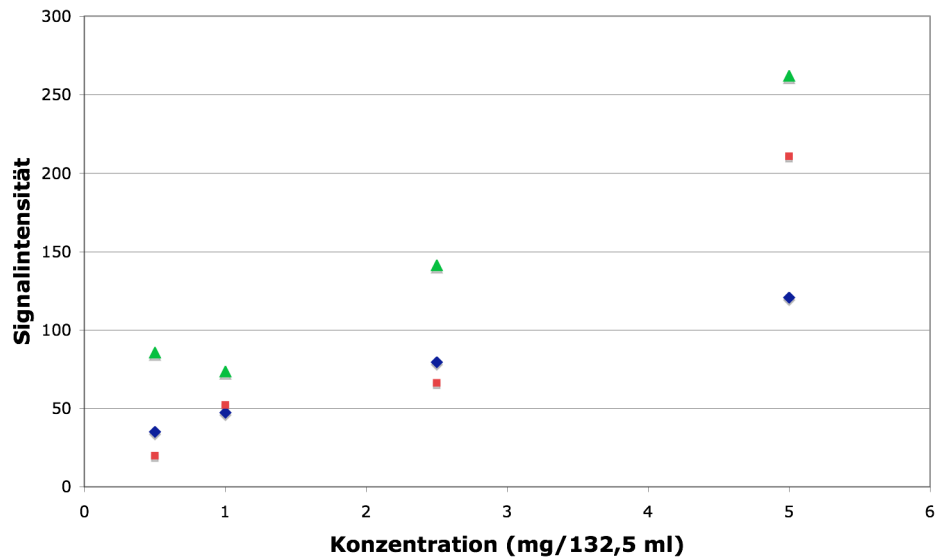
<b>E1</b>	<b>Zugegebene Menge Propofol (mg):</b>			
<b>Zugabe-Serie:</b>	<b>5</b>	<b>2,5</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>
1.	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 6,9 E-14	nicht signifikant, p = 0,2	nicht signifikant, p = 1,8 E-3
2.	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 3,0 E-8	signifikant, p = 1,3 E-2	nicht signifikant, p = 5,5 E-2
3.	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 2,8 E-4	nicht signifikant, p = 0,2	nicht signifikant, p = 0,6
<b>E2</b>				
<b>Zugegebene Menge Propofol (mg):</b>				
<b>Zugabe-Serie:</b>	<b>5</b>	<b>2,5</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>
1.	hochsignifikant, p = 4,1 E-13	hochsignifikant, p = 9,3 E-8	hochsignifikant, p = 1,6 E-5	hochsignifikant, p = 1,8 E-3
2.	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 3,7 E-5	hochsignifikant, p = 9,2 E-4	nicht signifikant, p = 0,11
3.	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 6,9 E-7	hochsignifikant, p = 4,5 E-3	hochsignifikant, p = 4,7 E-4
<b>E3</b>				
<b>Zugegebene Menge Propofol (mg):</b>				
<b>Zugabe-Serie:</b>	<b>5</b>	<b>2,5</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>
1.	hochsignifikant, p = 2,5 E-5	hochsignifikant, p = 1,3 E-13	hochsignifikant, p = 5,2 E-5	hochsignifikant, p = 2,5 E-4
2.	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 1,5 E-7	hochsignifikant, p = 5,0 E-7	hochsignifikant, p = 5,3 E-6
3.	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 7,5 E-8	hochsignifikant, p = 1,6 E-3
<b>E4</b>				
<b>Zugegebene Menge Propofol (mg):</b>				
<b>Zugabe-Serie:</b>	<b>5</b>	<b>2,5</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>
1.	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 2,9 E-8	hochsignifikant, p = 1,6 E-5	hochsignifikant, p = 9,8 E-3
2.	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 5,2 E-7	hochsignifikant, p = 8,9 E-5
3.	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 5,1 E-14	hochsignifikant, p = 2,5 E-7

<b>E5</b>	<b>Zugegebene Menge Propofol (mg):</b>			
<b>Zugabe-Serie:</b>	<b>5</b>	<b>2,5</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>
1.	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 1,8 E-12	hochsignifikant, p = 3,1 E-8	hochsignifikant, p = 8,5 E-3
2.	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 4,0 E-13	hochsignifikant, p = 9,0 E-5
3.	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 3,9 E-6
<b>E6</b>	<b>Zugegebene Menge Propofol (mg):</b>			
<b>Zugabe-Serie:</b>	<b>5</b>	<b>2,5</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>
1.	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 1,2 E-15	hochsignifikant, p = 2,9 E-6	hochsignifikant, p = 1,7 E-3
2.	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 4,4 E-4	hochsignifikant, p = 1,6 E-3
3.	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 1,4 E-10	hochsignifikant, p = 9,5 E-3

Die drei Propofol-Zugabe-Serien im Experiment unterscheiden sich in ihren Signalanstiegen. Je mehr Propofol bereits im Kreislaufsystem ist, desto höher steigt das Fluoreszenzsignal bei erneuter Injektion. So werden in der dritten Zugabe-Serie mit den vier verschiedenen Propofolkonzentrationen die höchsten Fluoreszenz-Steigerungen erreicht. Besonders regelhaft tritt dieser Effekt bei Zugabe von 5 mg ein. Die folgende Darstellung der Experimente E<sub>2</sub> und E<sub>5</sub> (Abb. 3-11) zeigt eine Auftragung der Fläche zwischen den durch Propofol-Zugabe verschobenen Kurven im Bereich 295 bis 302 bzw. 303 nm (Kapitel 2.11). Die Experimente E<sub>2</sub> und E<sub>5</sub> weisen hohe Signal-Konzentrations-Korrelationen auf (Kapitel 3.2.3).



a) E<sub>2</sub>



b) E<sub>5</sub>

**Abbildung 3-11: Signalanstieg nach Propofol-Zugabe der verschiedenen Zugabe-Serien der Experimente E<sub>2</sub> (a) und E<sub>5</sub> (b). 1. Serie = Blaue Raute, 2. Serie = Rotes Quadrat, 3. Serie = Grünes Dreieck.**

### 3.2.3 Signal-Propofolkonzentrations-Korrelation

Nach jeder Propofol-Zugabe (Kapitel 2.8) kann ein Anstieg der Fluoreszenzintensität im Bereich von 300 nm im Spektrum beobachtet werden.

Die lineare Korrelation des Fluoreszenzanstiegs zur zugegebenen Propofolmenge ist in Tabelle 3-7 aufgetragen. Die bessere Propofol-Signal-Korrelation ergibt sich aus den Messungen mit erhöhter Sensitivität für Veränderungen im Bereich 300 bzw. 295-305 nm (E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>). Hier werden höhere absolute Werte nach Propofol-Zugabe erzielt.



**Tabelle 3-7: Die lineare Regression von Propofol-Konzentration zu Fluoreszenzsignal und seine Korrelationskoeffizienten für die Experimente E<sub>1</sub> bis E<sub>6</sub>.**

Versuch	Differenz bei 300 nm aus den Signalen nach und vor Propofol-Zugabe	Integral 295-305 nm	Fläche 295-302 nm * *Signal > 999 vor 305 nm	Fläche 295-303 nm * *Signal > 999 vor 305 nm
E <sub>1</sub>	$y = 8,41x - 3,35$ $R^2 = 0,989$	$y = 62,53x - 26,43$ $R^2 = 0,988$	$y = 51,75x - 18,07$ $R^2 = 0,991$	
E <sub>2</sub>	$y = 4,93x + 3,71$ $R^2 = 0,980$	$y = 40,64x + 28,04$ $R^2 = 0,985$	$y = 33,80x + 23,58$ $R^2 = 0,984$	
E <sub>3</sub>	$y = 1,77x + 3,35$ $R^2 = 0,733$	$y = 17,61x + 28,96$ $R^2 = 0,715$		
E <sub>4</sub>	$y = 2,04x + 1,21$ $R^2 = 0,927$	$y = 26,45x + 10,80$ $R^2 = 0,996$		
E <sub>5</sub>	$y = 5,26x + 1,78$ $R^2 = 0,993$			$y = 38,95x + 30,45$ $R^2 = 0,962$
E <sub>6</sub>	$y = 3,84x + 2,73$ $R^2 = 0,888$			$y = 30,36x + 22,58$ $R^2 = 0,887$

### 3.2.4 Signalabfall

Jedem Signalanstieg nach Propofol-Zugabe folgt ein Signalabfall. Das Ausgangsfluoreszenzniveau bei 300 nm bleibt bei der Suspension aus Erythrozytenkonzentrat und GFP erhalten (Kapitel 3.2.7).

Der Signalabfall wird mit Hilfe einer Kurvenanpassung einer Exponentialfunktion erster Ordnung beschrieben. Der beste Korrelationskoeffizient der Messungen E<sub>1</sub> bis E<sub>6</sub> erreicht einen Wert von 0,93 (Abb. 3-12). Die höchsten Korrelationen ergeben sich für

den Signalabfall nach Zugabe von 5 mg Propofol (Konzentration im Kreislaufsystem: 35,7 µg/ ml). Daher werden im Folgenden die zwei Experimente mit den höchsten Korrelationskoeffizienten (E<sub>1</sub> und E<sub>4</sub>) bei 5 mg-Zugaben dargestellt.

Die hier erzielten Korrelationskoeffizienten liegen für E<sub>1</sub> zwischen 0,75 und 0,86 sowie für E<sub>4</sub> zwischen 0,87 und 0,93. Zu erkennen ist, dass die Halbwertszeiten der ersten beiden aufeinander folgenden Zugabe-Serien größer werden (Tabelle 3-8). Die Zeiten weichen im Vergleich der beiden Experimente stark voneinander ab. Im Experiment E<sub>1</sub> liegen sie im Bereich von 2,8 bis 3,7 Minuten (169 s bis 224 s), während sie im Experiment E<sub>4</sub> zwischen 10,8 bis 24,6 Minuten (650 s bis 1477 s) liegen.

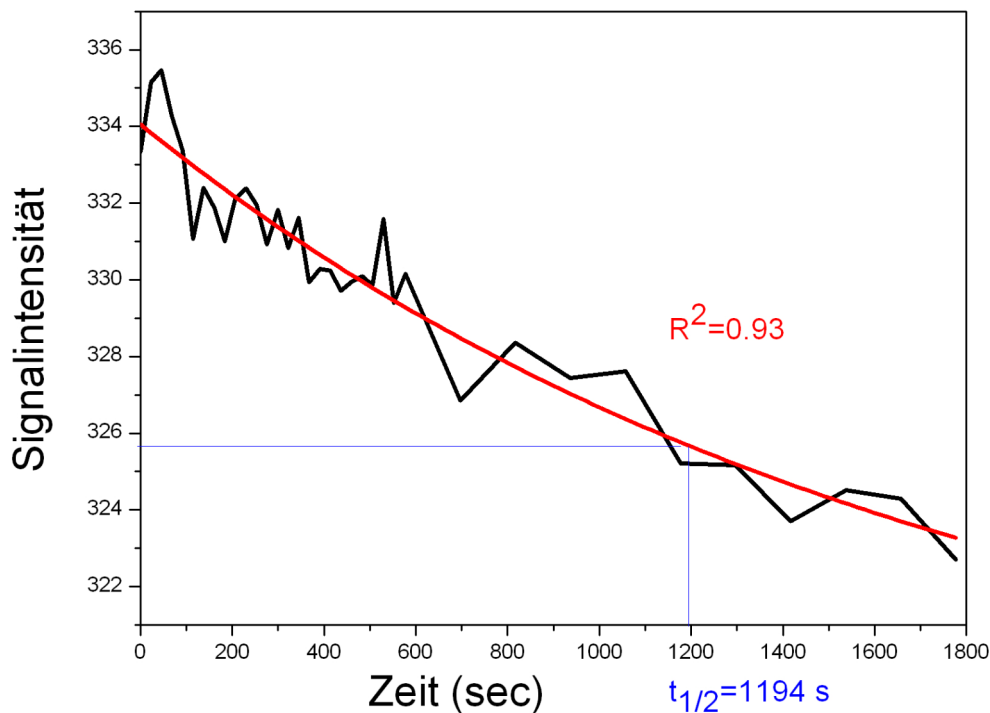


Abbildung 3-12: Schwarz: Fluoreszenzsignal bei 300 nm nach 5 mg-Zugabe der dritten Zugabe-Serie von Propofol (E<sub>4</sub>). Rot: Die Kurvenanpassung nach einer Exponentialfunktion erster Ordnung besitzt ein R<sup>2</sup> von 0,93.

Tabelle 3-8: Halbwertszeiten des Signalabfalls nach Propofol-Zugabe von 5 mg.

Experiment	Halbwertszeiten (s) bei 5 mg-Injektion der Zugabe-Serien		
	1	2	3
E <sub>1</sub>	169	224	191
E <sub>4</sub>	650	1477	1194

### 3.2.5 Temperatureinfluss

Zur Beurteilung des Signalabfalls werden im Hinblick auf eine mögliche Enzymkinetik Messungen bei 22° C, außerhalb des Temperaturoptimums physiologischer Enzyme, durchgeführt. Die beste Kurvenanpassung nach einer Exponentialfunktion erster Ordnung kann für den Signalverlauf nach Propofol-Zugaben von 5 mg im Experiment E<sub>6</sub> erreicht werden. Die Korrelationen liegen zwischen 0,72 und 0,87. Jedoch weichen die Halbwertszeiten um das Doppelte voneinander ab (Tabelle 3-9). Sie liegen zwischen 10,5 und 19,5 Minuten (630 und 1174 s).

**Tabelle 3-9: Halbwertszeit des Signalabfalls nach Propofol-Zugabe von 5 mg.**

Experiment	Halbwertszeit (s) bei 5 mg-Injektion der Zugabe-Serien		
	1	2	3
E <sub>6</sub>	1174	630	652

### 3.2.6 Differenzierung der Propofoleffekte auf das Spektrum

Propofol verändert auch außerhalb seines Maximums das Fluoreszenzspektrum von Blut (Kapitel 2.11). Die bisher gezeigten Auftragungen berücksichtigen nur den Propofoleffekt bei 300 nm. Daher wurde für die Messreihen mit den vollständig aufgezeichneten Spektren (E<sub>3</sub> und E<sub>4</sub>) eine Auftragung gewählt, die den Signalverlauf der Fluoreszenz in verschiedenen Wellenlängenbereichen des Blut-Spektrums zeigt (Abb. 3-13, 3-14). Zu erkennen ist, dass sich ein Signalanstieg bei Propofol-Zugabe nicht nur im Bereich des Propofolmaximums von 300 nm, sondern auch bei Wellenlängen der maximalen Blutfluoreszenz um 330 nm zeigt. Nur im Bereich geringer Signalintensität des Spektrums (290 nm, 390-420 nm) fehlen deutliche Änderungen der Fluoreszenz nach Propofol-Zugabe.

Die Auftragung des zeitlichen Verlaufs verschiedener Wellenlängen des Spektrums zeigt, dass die Fluoreszenz-Intensität im Bereich 300 nm nicht unter ihr Ausgangsniveau absinkt. Dagegen liegt eine Signalabnahme bei den weniger von Propofol beeinflussten Wellenlängenbereichen des Blutspektrums vor (z.B. 320 – 350 nm).

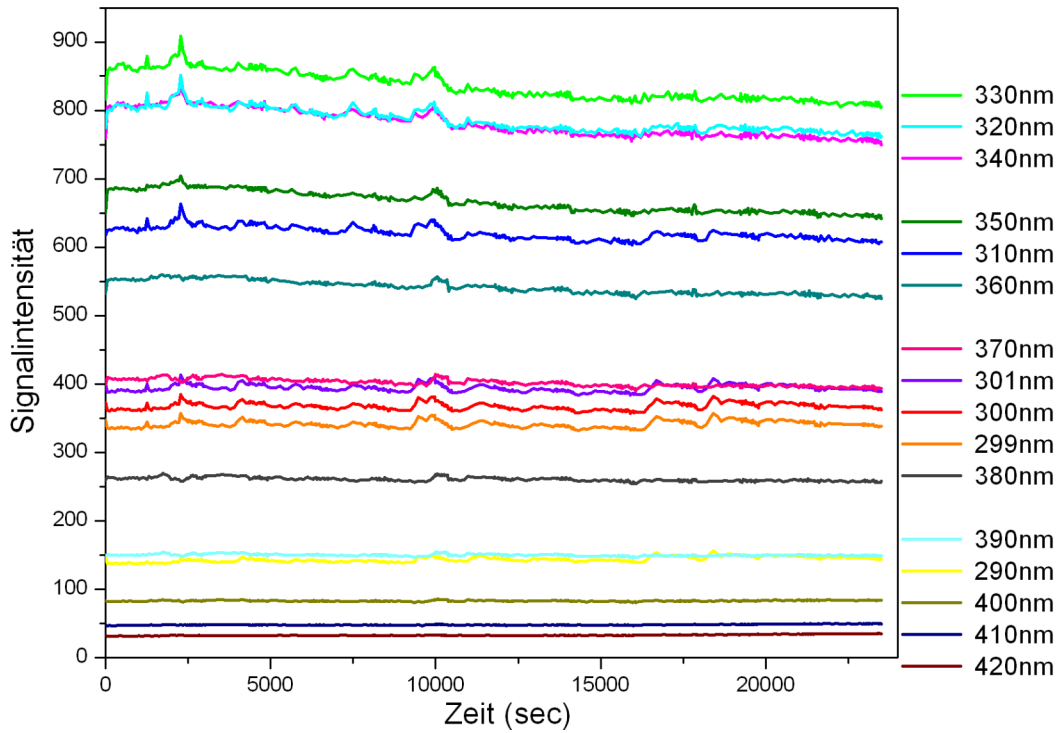


Abbildung 3-13: Das Fluoreszenzsignal verschiedener Wellenlängen des Spektrums im zeitlichen Gesamtverlauf des Experiments E<sub>3</sub>.

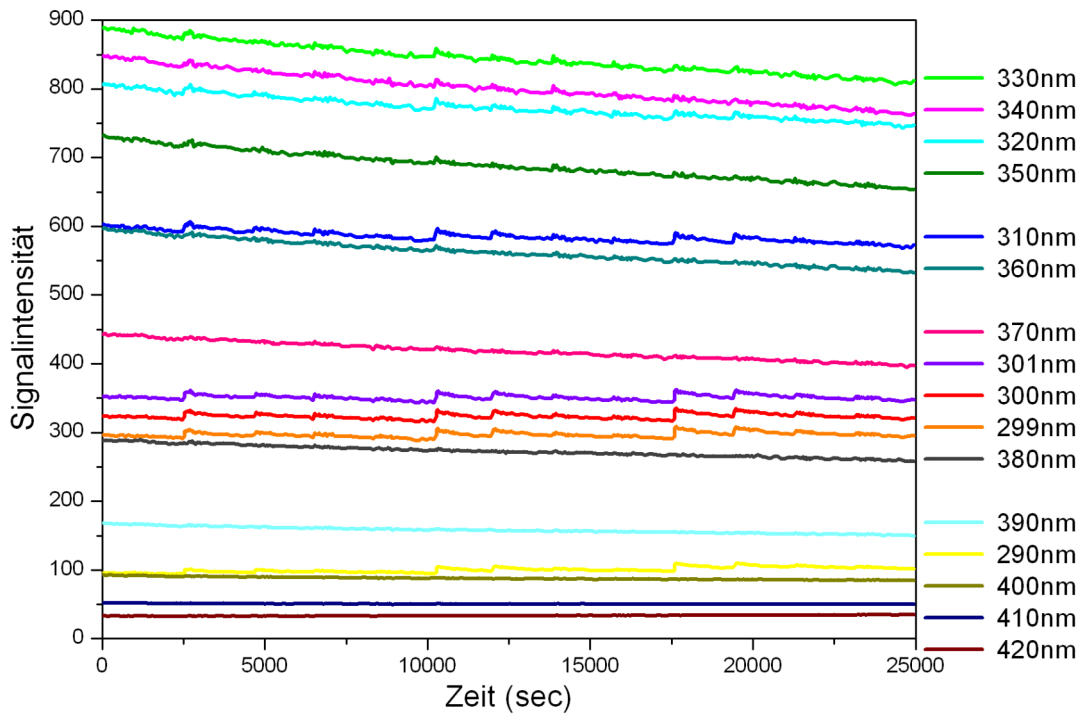
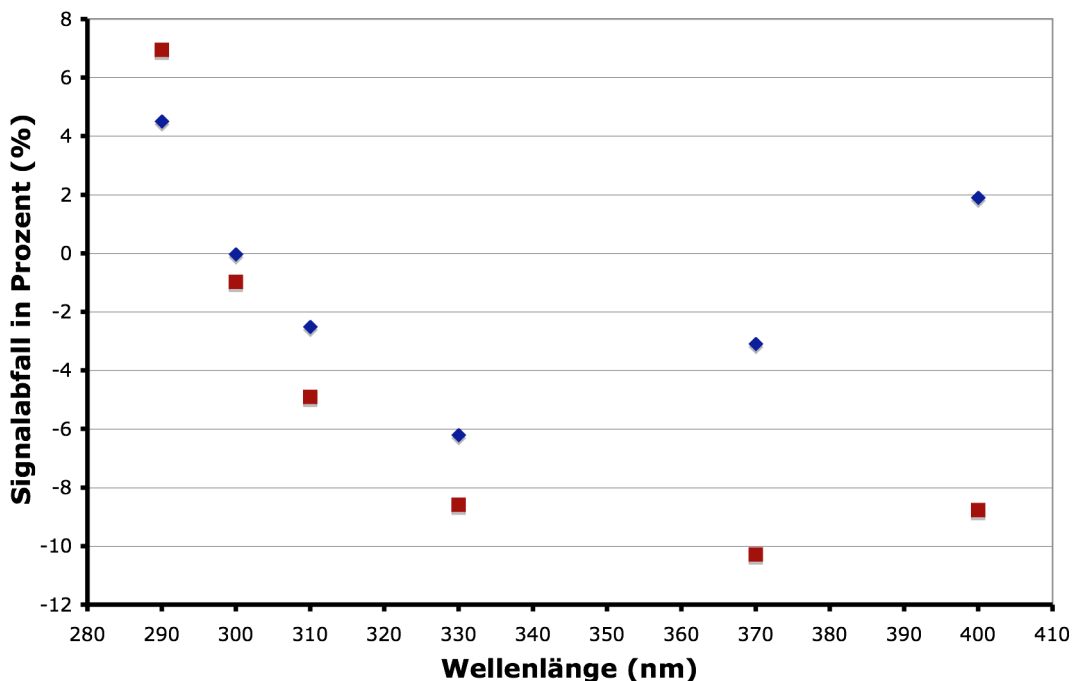


Abbildung 3-14: Das Fluoreszenzsignal verschiedener Wellenlängen des Spektrums im zeitlichen Gesamtverlauf des Experiments E<sub>4</sub>.

Die Signalintensität der unterschiedlichen Wellenlängenbereiche des Spektrums zeigt in der linearen Regression ein zueinander gegenläufiges Verhalten (Tab. 3-10). Bei 290 nm handelt es sich um eine geringe positive Steigung. In den verschiedenen experimentellen Durchläufen zeigt sich im Bereich des Propofolmaximums bei 300 nm die kleinste Steigung und daher größte Konstanz des Fluoreszenzniveaus im Gesamtverlauf. Im Bereich des Spektrums, in dem Blut maximal fluoresziert (310 nm, 330 nm) ist dagegen ein Signalabfall von 0,1 % bis 0,2 % festzustellen. Der zeitliche Verlauf von 370 nm und 400 nm zeigt keine Signalzunahmen durch einzelne Propofol-Zugaben und besitzt absteigende Tendenz (370 nm) oder keinen gemeinsamen Trend (400 nm).

**Tabelle 3-10: Steigung der linearen Regression der Experimente E<sub>3</sub> und E<sub>4</sub>.**

Versuch	Steigung: Signalveränderung der linearen Regression in % (über 8 min) bei					
	290 nm	300 nm	310 nm	330 nm	370 nm	400 nm
E <sub>3</sub>	+0,11	-0,003	-0,08	-0,14	-0,08	+0,01
E <sub>4</sub>	+0,22	+0,01	-0,08	-0,17	-0,2	-0,15



**Abbildung 3-15: Prozentuale Signalveränderungen in verschiedenen Wellenlängen-bereichen des Spektrums im zeitlichen Gesamtverlauf der Experimente E<sub>3</sub> (blaue Raute) und E<sub>4</sub> (rotes Quadrat). Oberhalb der Nulllinie handelt es sich um einen Signalanstieg, unterhalb um einen Signalabfall.**

Die absoluten Signalveränderungen zeigen, dass die Differenz aus Ausgangs- und Endwert bei 300 nm im zeitlichen Gesamtverlauf der Messung gleich 0 ist ( $E_3 = -0,1$ ,  $E_4 = -3,2$ ). Der Signalabfall liegt jeweils unter 1 % vom Ausgangssignal. Dagegen ist bei 330 nm mit -6,2 % der größte Signalabfall im Experiment  $E_3$  festzustellen. Experiment  $E_4$  weist bei 370 nm (-10,3 %) und 400 nm (-8,8 %) einen etwas stärkeren Signalabfall als bei 330 nm (-8,6 %) auf (Abb. 3-15, Tab. 3-11).

**Tabelle 3-11: Differenzen der Fluoreszenzsignale (Beginn – Ende) der Experimente  $E_3$  und  $E_4$  in den verschiedenen Wellenlängenbereichen des Spektrums. Das negative Vorzeichen kennzeichnet den Signalabfall.**

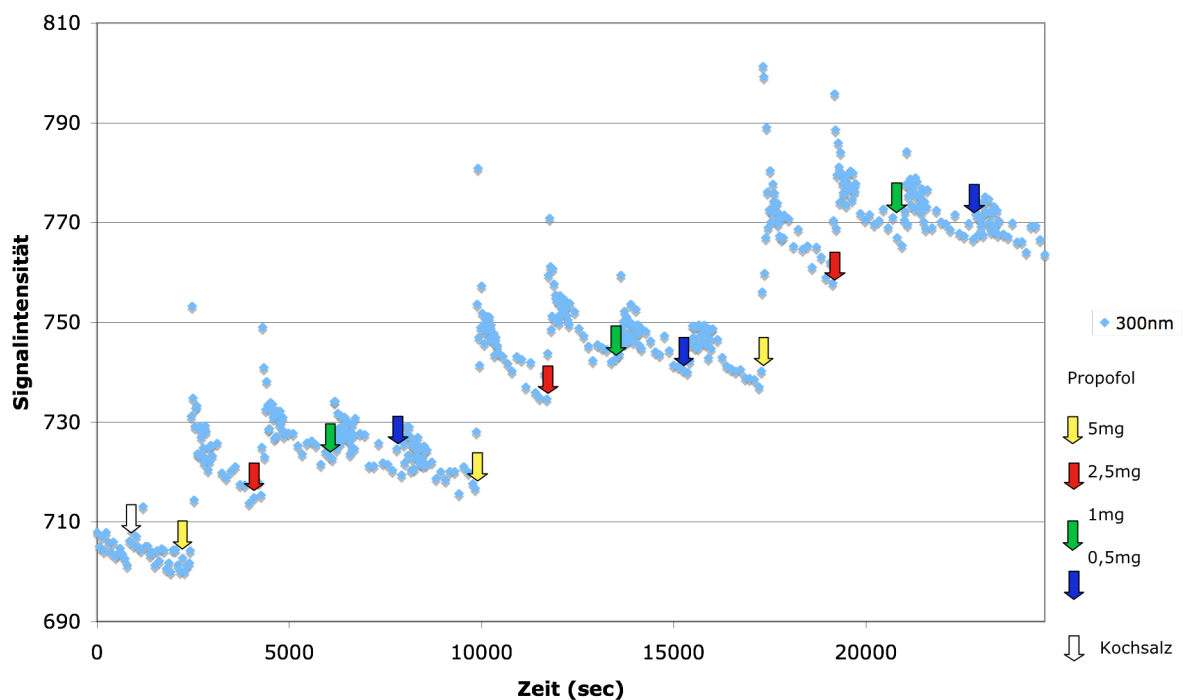
Versuch	Signalabfall in Prozent (%) bei					
	290 nm	300 nm	310 nm	330 nm	370 nm	400 nm
$E_3$	+4,5	-0,03	-2,5	-6,2	-3,2	+1,9
$E_4$	+6,9	-0,9	-4,9	-8,6	-10,3	-8,8

### 3.3 Untersuchungen an Gefrorenem Frischplasma

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Experimente P<sub>1</sub> und P<sub>2</sub> (Tab. 3-12) dargestellt. Das mit Gefrorenem Frischplasma (GFP) gefüllte Kreislaufsystem zeigt das Fluoreszenzverhalten von Propofol in einem Medium ohne die zellulären Bestandteile des Bluts (Abb. 3-16). Untersucht werden auch hier die Signalkonstanz des Mediums Plasma, die Propofol-Signal-Korrelation, die Signifikanz der Signalanstiege und der Signalabfall.

**Tabelle 3-12: Die Experimente mit Plasma erfolgten bei hoher Sensitivität zur Detektion größerer Propofol-Effekte.**

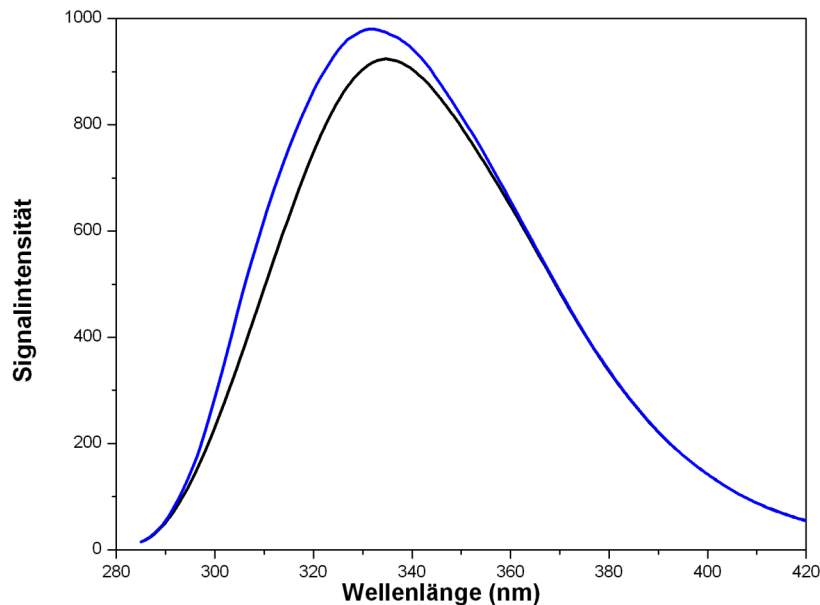
Experiment	Temperatur (° C)	Sensitivität des Detektors (V)	pH-Wert
P <sub>1</sub>	36,7	460	7,74
P <sub>2</sub>	36,7	460	7,76



**Abbildung 3-16: Das Beispiel des Experiments P<sub>2</sub> zeigt das Fluoreszenzverhalten bei 300 nm im Medium Gefrorenes Frischplasma im zeitlichen Gesamtverlauf. Die Pfeile kennzeichnen die Propofol-Zugaben verschiedener Konzentrationen, die einen Signalanstieg erzeugen.**

### 3.3.1 Das Plasmaspektrum

Das Spektrum von Plasma hat bei Anregung mit 274 nm sein Maximum bei 335 nm (Abb. 3-17). Unter Zugabe von Propofol verändert sich das Plasma-Spektrum im Wellenlängenbereich des Fluoreszenzspektrums des Propofols (Kapitel 2.11).



**Abbildung 3-17: Schwarz: Fluoreszenzspektrum von Gefrorenem Frischplasma im Kreislaufexperiment. Blau: Fluoreszenzspektrum von Plasma nach Propofol-Zugabe im Kreislaufexperiment.**

### 3.3.2 Signalkonstanz bei Zirkulation im Kreislaufsystem

Das Fluoreszenzsignal des Plasmas wird vor der Messung für 16,6 Minuten mit der Einstellung „Time Course Measurement“ alle 10 Sekunden bestimmt (Abb. 3-18). Zur Beurteilung der Signalkonstanz werden Mittelwert, Standardabweichung und die Steigung der linearen Regression ermittelt. Die geringe negative Steigung liegt bei 0,1 % über 5 Minuten (Tab. 3-13).



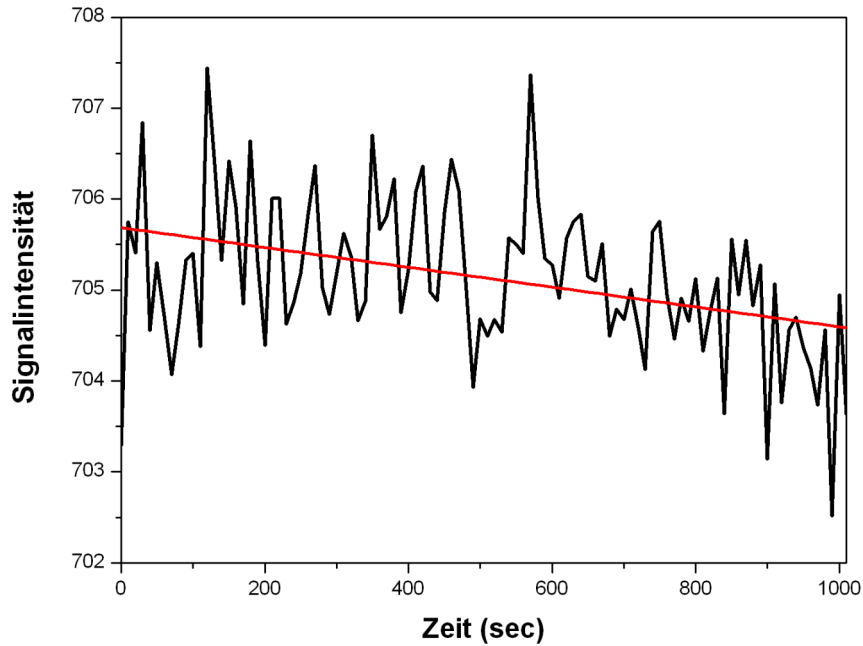


Abbildung 3-18: Fluoreszenzsignal bei 300 nm über 1000 s von Plasma im Kreislaufexperiment P<sub>1</sub>.

Tabelle 3-13: Das Fluoreszenzverhalten von Gefrorenem Frischplasma bei 300 nm über 20 Minuten.

Versuch	Steigung*: Signalabfall über 5 min in Prozent (%)	Abfall* nach 16,6 min in Prozent (%)	Mittelwert (absolut)	Standard- abweichung
P <sub>1</sub>	-0,09	0,27	340,5	0,42 (0,12 %)
P <sub>2</sub>	-0,05	0,16	705,14	0,85 (0,12 %)

\* der linearen Regression

### 3.3.3 Signalzunahme bei Propofol-Zugabe

Die Veränderung der Fluoreszenz nach Propofol-Zugabe in drei Serien zeigt eine deutliche Signalzunahme um 300 nm (Abb. 3-16).

Die Fluoreszenzzunahme der höchsten Propofol-Zugaben von 5 mg liegt bei durchschnittlich 7 % (P<sub>1</sub>) und 5,1 % (P<sub>2</sub>) vom Ausgangssignal (Tab. 3-14).

**Tabelle 3-14: Signalanstieg bei 300 nm nach Propofol-Zugabe in Prozent (Mittelwert aus je drei Zugabe-Serien eines Experiments).**

Propofol-Zugabe (mg)	Signalanstieg in Prozent (%) und normierter Wert* bei Experiment			
	P <sub>1</sub>		P <sub>2</sub>	
5	7	(5*)	5,1	(5*)
2,5	2,14	(1,5*)	3,1	(3*)
1	0,56	(0,4*)	1,21	(1,2*)
0,5	0,57	(0,4*)	0,64	(0,6*)

Die Propofolinjektionen aller verwendeten Konzentrationen liefern in beiden Experimenten einen signifikanten Signalanstieg. Mit Ausnahme von geringeren Propofol-Mengen (1 mg und 0,5 mg der 2. Zugabe-Serie) in Experiment P1 liegen sogar ausschließlich hochsignifikante Messergebnisse vor (Tab. 3-15).

**Tabelle 3-15: Signifikanz des Signalanstiegs nach Zugabe von Propofol**

P1	Zugegebene Menge Propofol (mg):			
	5	2,5	1	0,5
Zugabe-Serie:				
1.	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 6,0 E-3	hochsignifikant, p = 1,3 E-3	hochsignifikant, p = 3,6 E-4
2.	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 2,5 E-5	signifikant, p = 0 1,5 E-2	signifikant, p = 1,1 E-2
3.	hochsignifikant, p = 0	X	hochsignifikant, p = 7,1 E-3	hochsignifikant, p = 1,9E-3
P2	Zugegebene Menge Propofol (mg):			
	5	2,5	1	0,5
Zugabe-Serie:				
1.	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 8,0 E-11	hochsignifikant, p = 1,1 E-4	hochsignifikant, p = 6,9 E-3
2.	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 1,8 E-15	hochsignifikant, p = 1,2 E-4	hochsignifikant, p = 3,5 E-4
3.	hochsignifikant, p = 0	hochsignifikant, p = 4,3 E-8	hochsignifikant, p = 1,0 E-4	hochsignifikant, p = 2,8 E-2

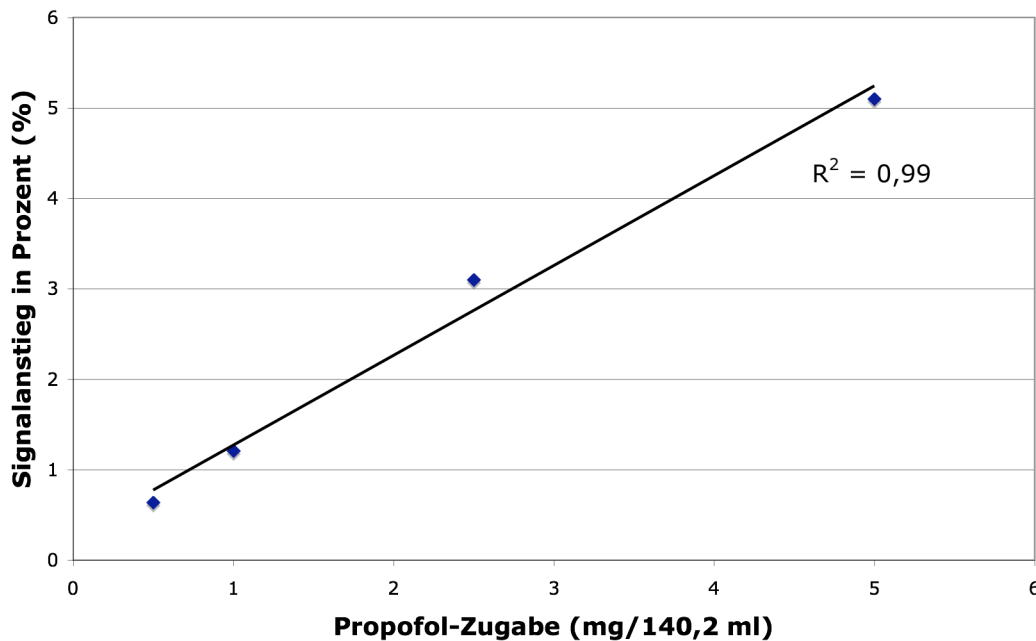
X = Es liegt keine Normalverteilung der Residuen vor (Prob<W < 0,1 im Shapiro-Wilk-Test)

### 3.3.4 Signal-Propofolkonzentrations-Korrelation

Die erzeugte Propofol-Konzentration und die Signalzunahme bei 300 nm korrelieren in der linearen Regression um 0,96 und 0,99 (Abb. 3-19). Für die Fläche zwischen 295 und 305 nm liegt die lineare Korrelation bei 0,88 und 0,99 (Tab. 3-16).

**Tabelle 3-16: Die lineare Regression von Propofol-Konzentration zu Fluoreszenzsignal und seine Korrelationskoeffizienten für die Experimente P<sub>1</sub> bis P<sub>2</sub>.**

Experiment	Mittelwert bei 300 nm	Fläche 295-305 nm
P <sub>1</sub>	$y = 7,51x - 3,64$ $R^2 = 0,956$	$y = 76,99x - 55,48$ $R^2 = 0,883$
P <sub>2</sub>	$y = 7,12x + 2,25$ $R^2 = 0,986$	$y = 54,96x + 11,49$ $R^2 = 0,989$



**Abbildung 3-19: Signal-Konzentrations-Korrelation bei Propofol-Zugabe in GFP im Kreislauf.**

### **3.3.5 Signalabfall**

Die Kurvenanpassung nach einer Exponentialfunktion erster Ordnung ergibt für  $P_1$  Korrelationen zwischen 0,67 und 0,14 sowie für  $P_2$  zwischen 0,19 und 0. Daher erfolgt keine weitere Beschreibung der Halbwertszeiten.

### 3.4 Untersuchungen an Vollblut

In diesem Kapitel werden die Messungen der drei Vollblutexperimente ( $V_1 - V_3$ ) beschrieben (Tab. 3-17). Die Experimente mit dem Messmedium Vollblut, antikoaguliert mit Heparin, kommen den physiologischen Verhältnissen am nächsten. Das Fluoreszenzverhalten des Vollbluts zeigt jedoch im Vergleich mit den vorherigen Kapiteln keine Fluoreszenzstabilität (Abb. 3-20). Im zeitlichen Gesamtverlauf der Messungen sinkt das Fluoreszenzsignal.

Tabelle 3-17: Parameter der Vollblut-Experimente  $V_1$  bis  $V_3$ .

Gelb hinterlegt sind die Experimente, die bei erhöhter Sensitivität für das Fluoreszenzmaximum von Propofol bei 300 nm gemessen wurden. Grün hinterlegt ist  $V_3$ , da hier durch geringere Signalverstärkung das vollständige Spektrum erfasst wurde.

Experiment	Temperatur (°C)	Detektorspannung (V)	Hämatokrit (%) der Probe aus dem Kreislauf	pH-Wert
$V_1$	36,7	360	37,3	7,33
$V_2$	36,7	360	42,2	7,32
$V_3$	36,7	300	43,7	7,31

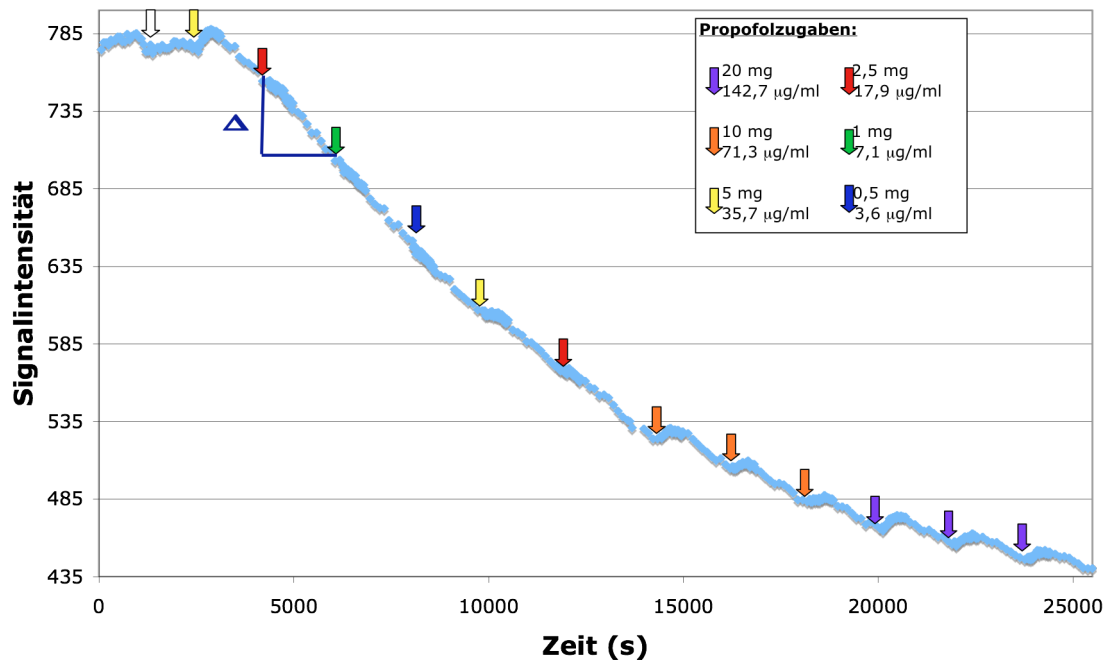


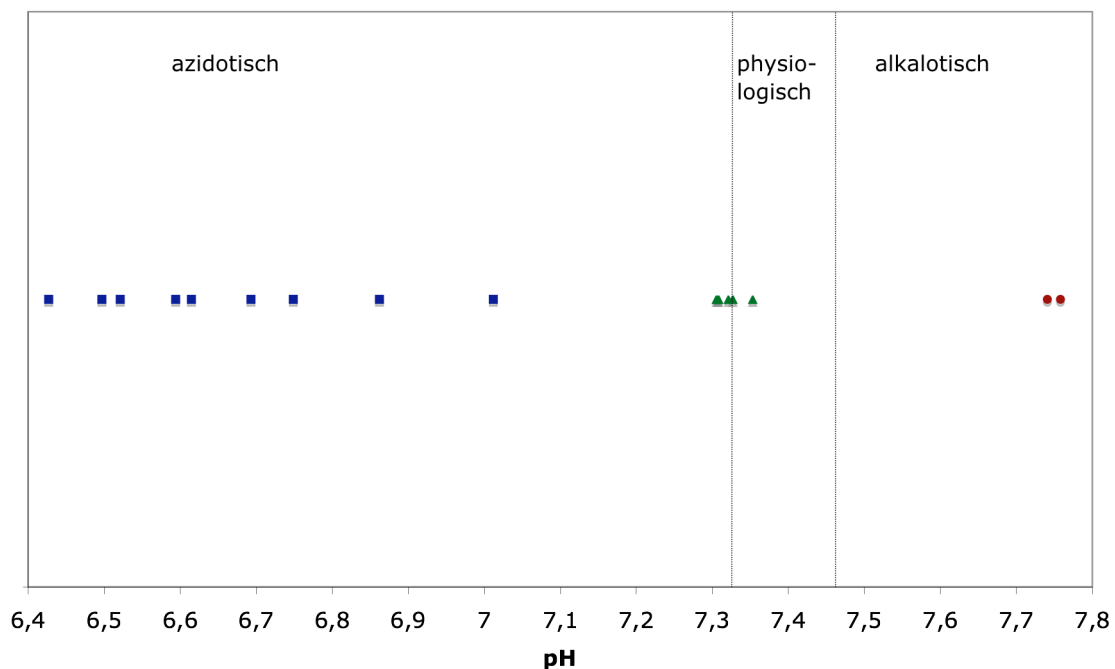
Abbildung 3-20: Fluoreszenz bei 300 nm im zeitlichen Gesamtverlauf des Experiments  $V_1$ . Die Pfeile kennzeichnen die Propofol-Zugaben verschiedener Konzentrationen, die kaum einen Signalanstieg auslösen. Dunkelblau eingetragen ist Intensitätsdifferenz ( $\Delta$ ) des Signalabfalls zwischen zwei Propofol-Zugaben.

### 3.4.1 Blut-pH

Heparin als Antikoagulant für die Vollblutspende bewahrt den physiologischen Blut-pH zur Messung im Kreislaufsystem (grüne Dreiecke in Abb. 3-21). Die im Anschluss an die Experimente durchgeführte Blutgasanalyse ergibt pH-Werte zwischen 7,31 und 7,35.

Der Blut-pH der Suspension aus Erythrozytenkonzentrat und GFP unterscheidet sich deutlich von physiologischen Werten (blaue Quadrate in Abb. 3-21). Die pH-Werte der bestimmten Konserven liegen zwischen 6,43 und 7,01. Sie sind also saurer als der physiologisch eng regulierte Blut-pH, der in den nur wenige Stunden alten Vollblutspenden erhalten bleibt.

Das Messmedium GFP ist dagegen mit pH 7,74 bis 7,76 alkalischer (rote Kreise in Abb. 3-21)

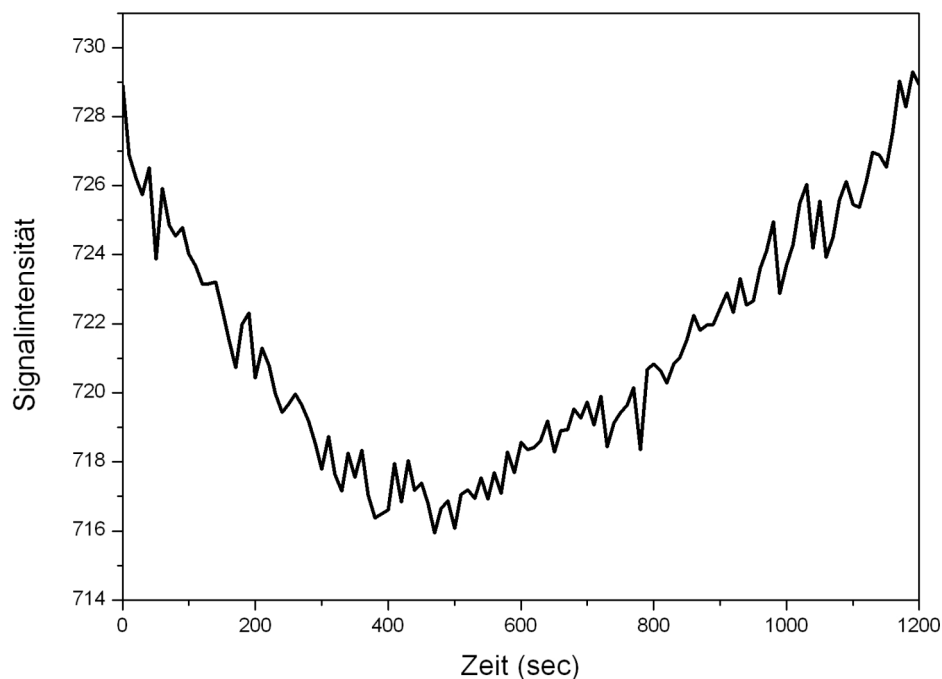


**Abbildung 3-21: Die durch Blutgasanalyse bestimmten pH-Werte der durchgeführten Experimente im Kreislaufsystem.**

**Die Suspension aus Erythrozytenkonzentrat und GFP (blaue Quadrate) liegt im azidotischen, GFP (rote Kreise) im alkalotischen und Vollblut (grüne Dreiecke) im physiologischen pH-Bereich.**

### 3.4.2 Fehlende Signalkonstanz

Das Fluoreszenzsignal von Vollblut im Kreislaufsystem erreicht, im Gegensatz zur Fluoreszenz älterer Erythrozytenkonzentrate (Kapitel 3.2.1), bei Anregung mit 274 nm keine Signalkonstanz. Die Bestimmung der Signalintensität des Fluoreszenzsignals in der Zeitverlaufsmessung ergibt große Schwankungen innerhalb der ersten 20 Minuten (Abb. 3-22). Im zeitlichen Gesamtverlauf des Experiments (Abb. 3-20) tritt ein Bleichungseffekt auf, also eine deutliche Abnahme des Ausgangssignals.



**Abbildung 3-22: Fluoreszenzsignal bei 300 nm über 1200 s von Vollblut im Kreislaufexperiment V<sub>2</sub>.**

In allen drei Vollblutexperimenten fehlt eine regelhaft signifikante Signalveränderung im Sinne einer Fluoreszenzunahme (Tab. 3-18 und 3-20).

Tabelle 3-18: Signifikanz des Signalanstiegs nach Zugabe von Propofol

<b>V1</b>	<b>Zugabe-Serie:</b>			
<b>Zugegebene Menge (mg):</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>weitere</b>
<b>5</b>	nicht signifikant p = 0,9	nicht signifikant p = 0,1		
<b>2,5</b>	nicht signifikant p = 0,7	nicht signifikant p = 0,6		
<b>1</b>	nicht signifikant p = 0,8			
<b>0,5</b>	nicht signifikant p = 0,95			
<b>V1</b>	<b>Zugabe-Serie:</b>			
<b>Zugegebene Menge (mg):</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>weitere</b>
<b>10</b>		hochsignifikant p = 6,0 E-3	nicht signifikant P = 6,8 E-2	nicht signifikant P = 0,4
<b>20</b>		nicht signifikant P = 0,6	nicht signifikant P = 0,8	nicht signifikant P = 0,7
<b>V2</b>	<b>Zugabe-Serie:</b>			
<b>Zugegebene Menge (mg):</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>weitere</b>
<b>5</b>	nicht signifikant p = 0,3	nicht signifikant P = 0,1	hochsignifikant P = 0	
<b>2,5</b>	nicht signifikant p = 0,5			
<b>1</b>	nicht signifikant p = 6,4 E-2			
<b>0,5</b>	nicht signifikant p = 9,3 E-2			
<b>10</b>		nicht signifikant p = 0,3	nicht signifikant p = 0,2	nicht signifikant P = 0,7
<b>20</b>		nicht signifikant P = 0,5	nicht signifikant p = 0,9	nicht signifikant P = 0,5

Die Propofol-Zugaben in den gewählten klinischen Konzentrationen bewirken nur geringfügige Signalzunahmen im Bereich von 300 nm. Sie reduzieren dagegen deutlich die Geschwindigkeit des Signalabfalls. Die Signalabnahme verläuft nach der Zugabe höherer Propofolkonzentrationen flacher. Die absoluten Werte ergeben, dass die Signaldifferenz  $\Delta$  zwischen zwei Propofol-Zugaben für die größten injizierten

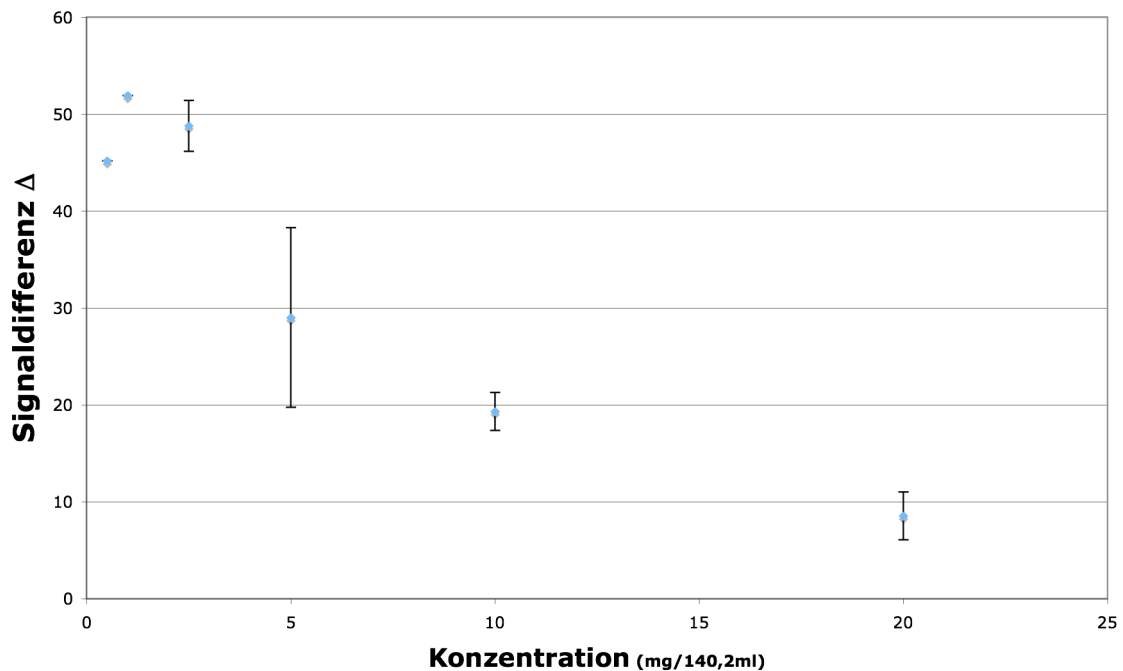


Propofolmengen am niedrigsten ausfällt (Tab. 3-19). Die graphische Auftragung verdeutlicht, dass dies vor allem für die größeren Zugaben im Bereich von 5-20 mg Propofol gilt (Abb. 3-23). Dies entspricht im Kreislaufsystem Konzentrationen zwischen 35,7 – 142,7 µg/ml.

**Tabelle 3-19: Intensitätsdifferenz ( $\Delta$ ) des Signalabfalls zwischen zwei Propofol-Zugaben.**

Propofol-Zugaben		0,5 mg	1 mg	2,5 mg	5 mg	10 mg	20 mg
V <sub>1</sub>	$\Delta$ Signalintensität*	45,2	51,9	50,7	22,5	19,1	10
				46,9	35,6	21,4	10
						17,5	5,7
	Mittelwert			48,8	29,0	19,3	8,5
Propofol-Zugaben		0,5 mg	1 mg	2,5 mg	5 mg	10 mg	20 mg
V <sub>2</sub>	$\Delta$ Signalintensität*	38,1	42,6	47,2	27,8	19,5	8,1
					31,9	18,0	7,7
					25,2	17,0	5,6
	Mittelwert				28,3	18,2	7,1

\* Differenz zwischen dem letzten Wert vor der zu beurteilenden Propofol-Zugabe und dem 30-Minuten-Wert.



**Abbildung 3-23: Absolute Signaldifferenz  $\Delta$  (aus dem letzten Wert vor Propofol-Zugabe und letztem Wert vor darauf folgender Zugabe) der verschiedenen Konzentrationen im Experiment V<sub>1</sub>.**

### 3.4.3 Messung mit erhöhtem Fluss

Der Ansatz, die Effekte des einstrahlenden UV-Lichts auf das Blut mit Hilfe des Kreislaufsystems zu vermindern, wird mit der Erhöhung der Drehzahl von 30 rpm auf 50 rpm (Fluss: ca. 370 ml/min) fortgeführt. Trotz des schnelleren Umsatzes in der Messküvette, fällt das Fluoreszenzsignal wie schon bei V<sub>1</sub> und V<sub>2</sub> ab (Tab. 3-20).

**Tabelle 3-20: Signaldifferenz zwischen zwei Propofol-Zugaben.**

Propofol-Zugaben		5 mg	10 mg	20 mg
V <sub>3</sub>	Δ Signalintensität*	9,7	8,3	1,9
		11,5	7,8	0,8
		11,1	6,7	1,1
	Mittelwert	10,8	7,6	1,3

Selbst größere Propofolmengen, die im System wesentlich höhere Konzentrationen erzeugen, als der klinisch relevante Konzentrationsbereich, zeigen keinen regelhaft signifikanten Signalanstieg (Tab.3-20).

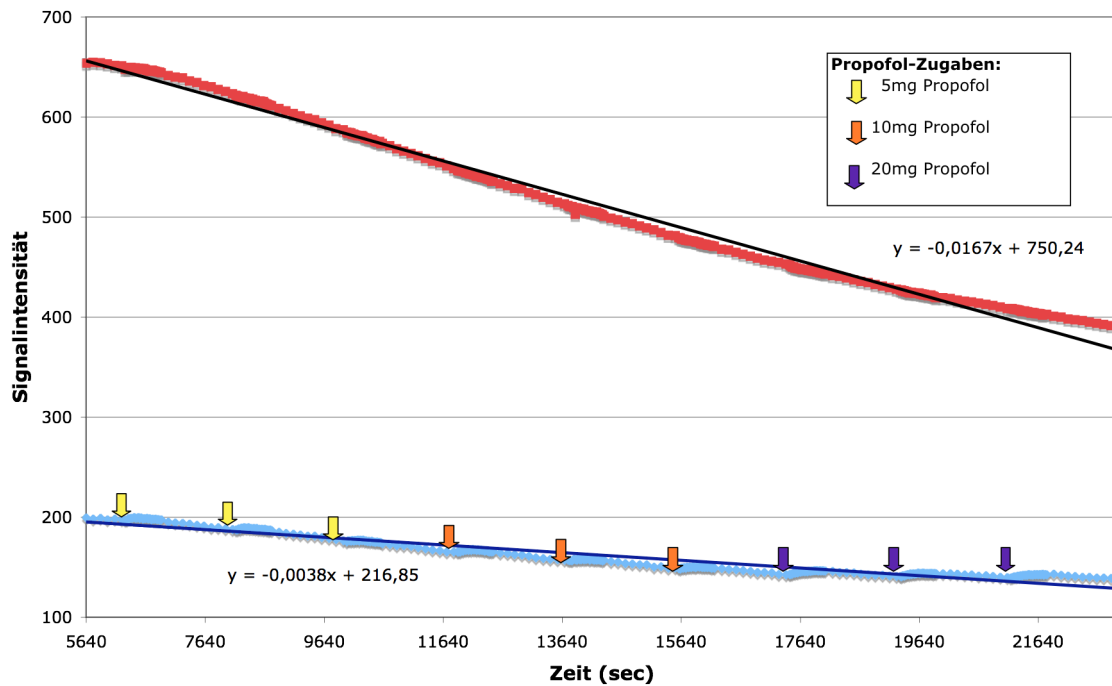
**Tabelle 3-21: Signifikanz des Signalanstiegs nach Zugabe von Propofol**

V <sub>3</sub> Zugegebene Menge Propofol (mg):	Zugabe-Serie:		
	1	2	3
5	X	nicht signifikant, p = 8,2 E-2	nicht signifikant P = 0,3
10	hochsignifikant P= 7,6 E-4	hochsignifikant p = 2,2 E-4	signifikant p = 3,1 E-2
20	hochsignifikant p = 4,9 E-9	nicht signifikant P = 6,4 E-2	nicht signifikant P = 0,2

X = Es liegt keine Normalverteilung der Residuen vor (Prob<W < 0,1 im Shapiro-Wilk-Test)

Die Messung findet bei niedrigerer Detektorspannung (geringerer Sensitivität) statt. Dies ermöglicht die Aufnahme des gesamten Spektrums im Bereich von 285–420 nm mit seinem Maximum bei 330 nm. Deutlich ist der Unterschied des Signalabfalls im zeitlichen Gesamtverlauf des Experiments (Abb. 3-24). Dieser beträgt 60,68

Intensitätspunkte bzw. 30,4 % für 300 nm sowie 263,94 Intensitätspunkte bzw. 40,4 % für 330 nm. Der Abfall des Signals bei 330 nm im Spektrum, wo Propofol selbst nur noch geringe Fluoreszenz aufweist, ist um 10 Prozentpunkte höher als im Fluoreszenzmaximum des Propofols bei 300 nm.



**Abbildung 3-24: Fluoreszenzsignal bei 300 nm (blaue Rauten) und 330 nm (rote Quadrate) im zeitlichen Gesamtverlauf des Experiments V<sub>3</sub> mit linearer Regression.**

### 3.5 Ursachen des Signalabfalls

#### 3.5.1 Signalabfall im Medium Kochsalz

Der Einsatz gleicher Konzentrationen von Propofol wie in den Kapiteln 3.2 bis 3.4 weist bei Zugabe in das mit isotonischer Kochsalzlösung gefüllte Kreislaufsystem eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität auf. Im Gegensatz zu den zahlreichen fluoreszierenden Bestandteilen im Blut, ist Propofol hier die einzige fluoreszierende Substanz im System.

Ein Signalabfall nach Propofol-Zugabe ist auch in isotonischer Kochsalzlösung im Kreislaufsystem festzustellen (Abb. 3-25). Nach Zugabe von 5 mg Propofol steigt das Signal um 782 Intensitätspunkte von 217 auf 999. Die Fluoreszenzintensität liegt für 144 s (2,4 min) oberhalb des mit den gewählten Einstellungen detektierbaren Bereichs (Maximum: 999 Intensitätspunkte). 30 Minuten später ist das Fluoreszenzsignal bei 300 nm um 86,7 %, von 999 auf 321 Intensitätspunkte, abgesunken.

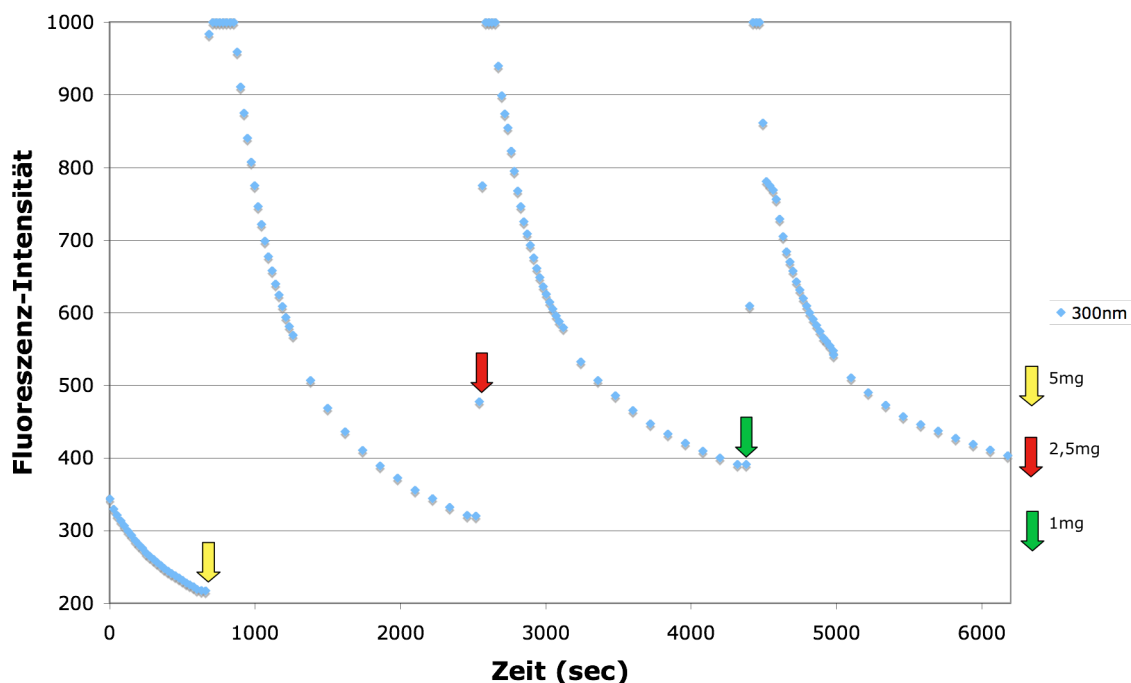
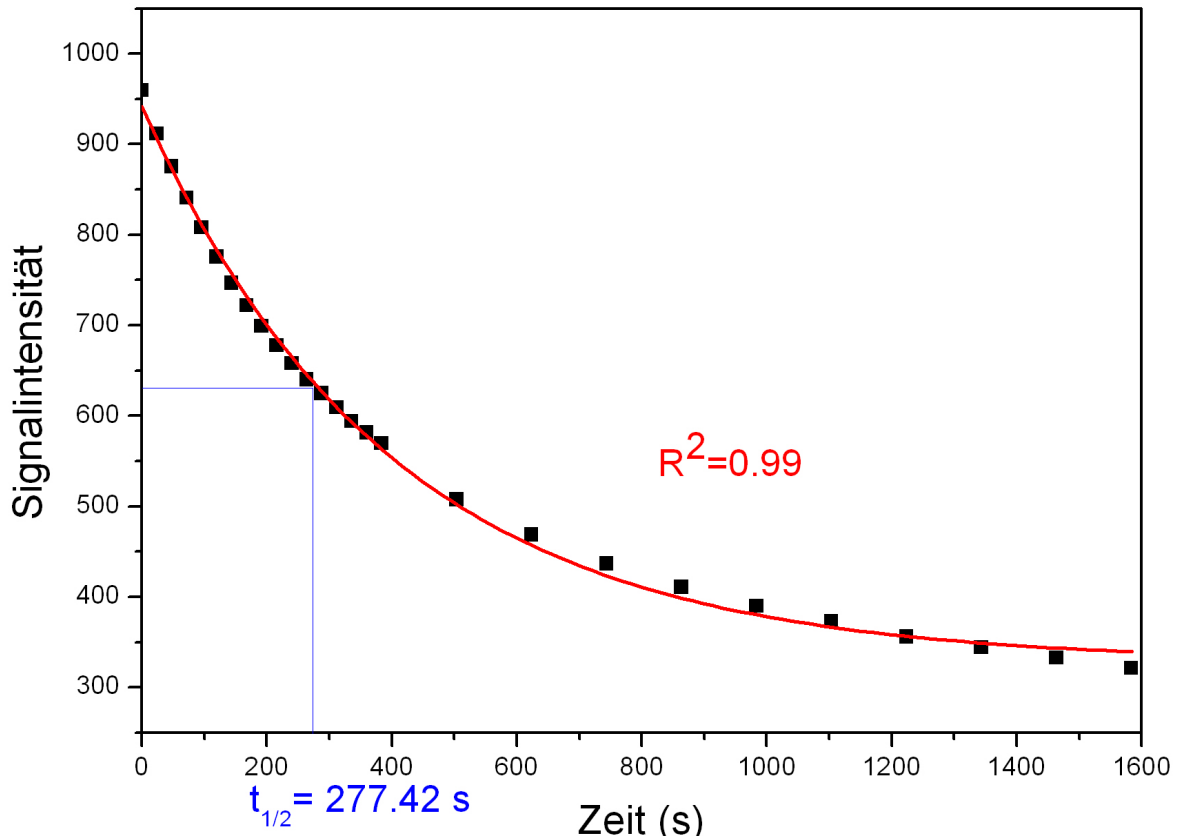


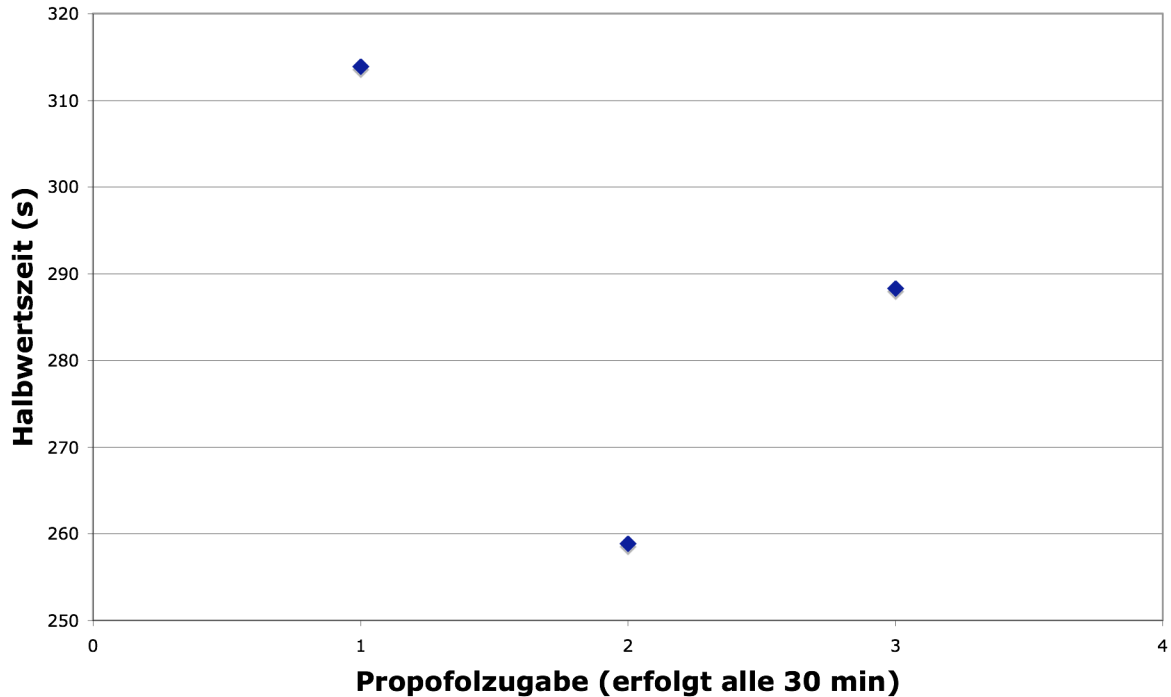
Abbildung 3-25 : Propofol-Zugaben in isotonische Kochsalzlösung im Kreislaufsystem. Die Pfeile kennzeichnen die Propofol-Zugaben verschiedener Konzentrationen, die einen Signalanstieg auslösen. Der Signalanstieg liegt anfangs für kurze Zeit (bis zu 144 s) oberhalb des detektierbaren Bereichs.

Die Abnahme der Fluoreszenz folgt einer Exponentialfunktion erster Ordnung. Der Signalabfall im durchgeführten Experiment mit sechs aufeinander folgenden Propofol-Zugaben in zwei Serien mit je 5 mg, 2,5 mg und 1 mg ergibt einen Korrelationskoeffizienten von 0,99 der Kurvenanpassung (Abb. 3-26).



**Abbildung 3-26: Der Signalabfall nach Propofol-Zugabe von 5 mg in das mit isotonischer Kochsalzlösung gefüllte Kreislaufsystem folgt einer Exponentialfunktion erster Ordnung mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,99.**

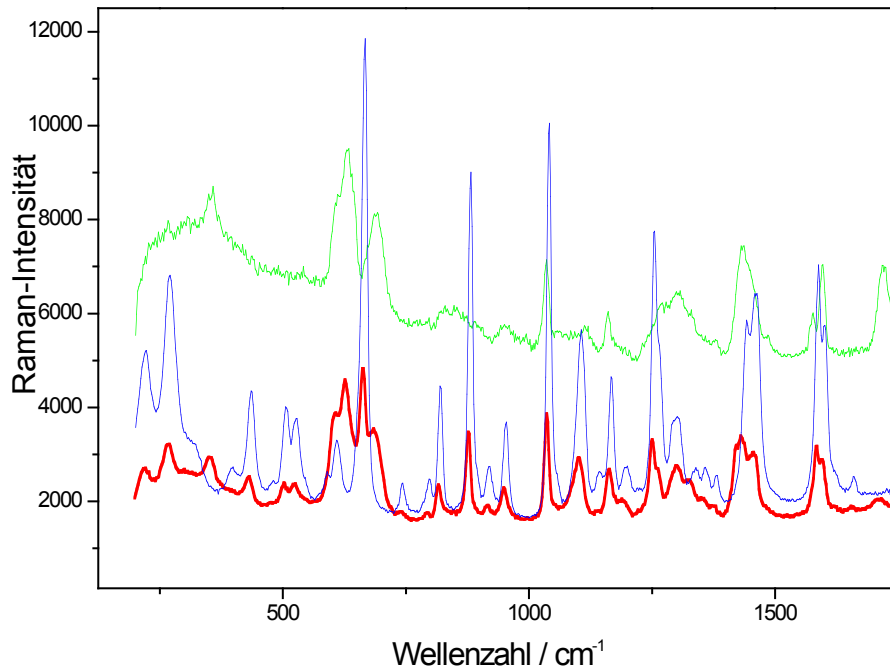
Die Beurteilung der Halbwertszeiten ist aufgrund der fehlenden Werte des großen Signalanstiegs über den Messbereich des Detektors von 1000 Intensitätspunkten schwierig. Die erste Zugabe-Serie zeigt in der Kurvenanpassung nach 120 Sekunden Signalabfall nach Propofol-Injektion Halbwertszeiten zwischen 4,3 und 5,2 Minuten (Abb. 3-27)



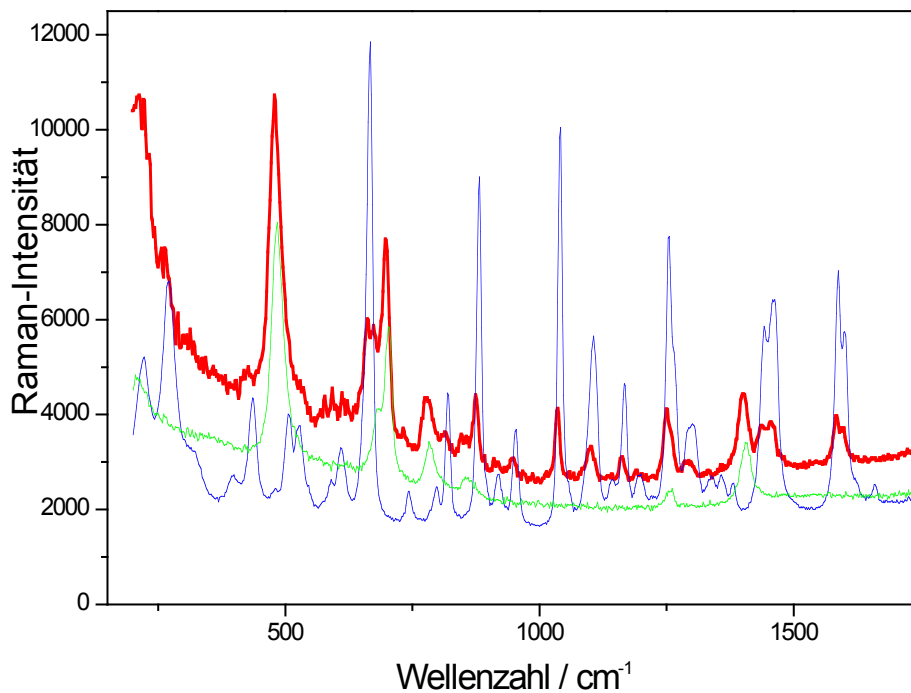
**Abbildung 3-27: Halbwertszeiten der drei Propofol-Zugaben in Kochsalz im Kreislaufsystem ermittelt durch Kurvenanpassung einer Exponentialfunktion erster Ordnung.**

### 3.5.2 Nachweis der Ablagerung durch Raman-Spektroskopie

An der Oberfläche der Schlauchproben, die in Propofol in Reinform, 2,6-Diisopropylphenol (> 97 %), für 69 Stunden eingelegt worden sind, lassen sich mit Raman-Spektroskopie spezifische Propofolbanden nachweisen. Der Nachweis gelingt, obwohl die Schlauchproben nach 69 Stunden Propofolkontakt mit Ethanol gereinigt wurden. Dies schließt eine bloße Filmbildung des lipophilen Wirkstoffs auf der Oberfläche aus. Die Banden der präparierten Schlauchproben (siehe rot gezeichnetes Spektrum in den Abb. 3-28 und 3-29) weisen sowohl die charakteristischen Banden ihres Kunststoffes, als auch des 2,6-Diisopropylphenols auf (Abb. 3-28 und 3-29). Eine Adsorption des Propofol an die Kunststoffe PVC und Silikon findet statt.



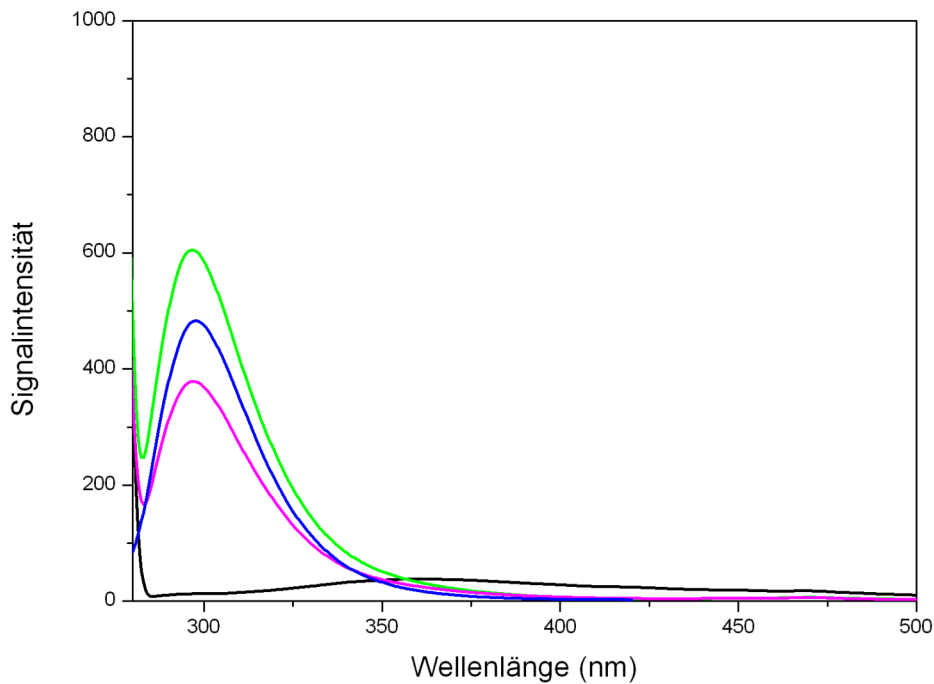
**Abbildung 3-28:** Das Raman-Spektrum des PVC-Schlauchs (rot), der nach 69 Stunden 2,6-Diisopropylphenol-Kontakt mit Ethanol gespült wurde, belegt die Propofol-Adsorption. Das Spektrum stimmt sowohl mit den Maxima des 2,6-Diisopropylphenols (blau) und des PVC (grün) überein.



**Abbildung 3-29:** Das Raman-Spektrum des Silikon-Schlauchs (rot), der nach 69 Stunden 2,6-Diisopropylphenol-Kontakt mit Ethanol gespült wurde, belegt die Propofol-Adsorption. Das Spektrum stimmt sowohl mit den Maxima des 2,6-Diisopropylphenols (blau) und des Silikons (grün) überein.

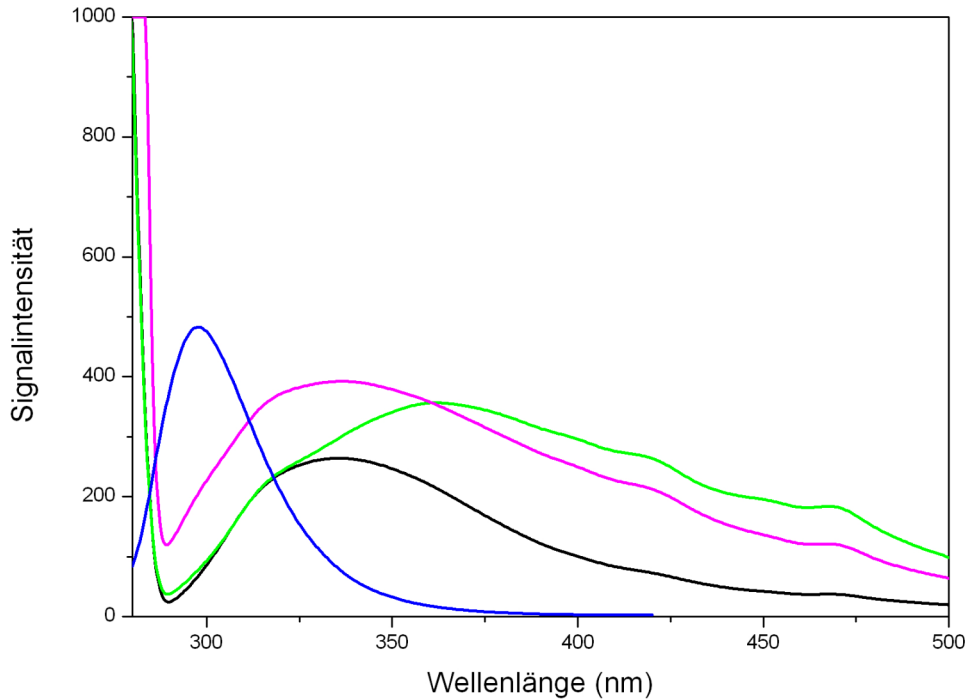
### 3.5.3 Nachweis der Ablagerung durch Fluoreszenz-Spektroskopie

Die Fluoreszenzmessung der Schlauchproben, die in der einprozentigen Propofol-Emulsion für zwölf Tage eingelegt wurden, zeigt ein deutlich verändertes Spektrum des Kunststoffes Silikon bei 300 nm (Abb. 3-30). Dies gilt nicht für den Kunststoff PVC (Abb. 3-31).



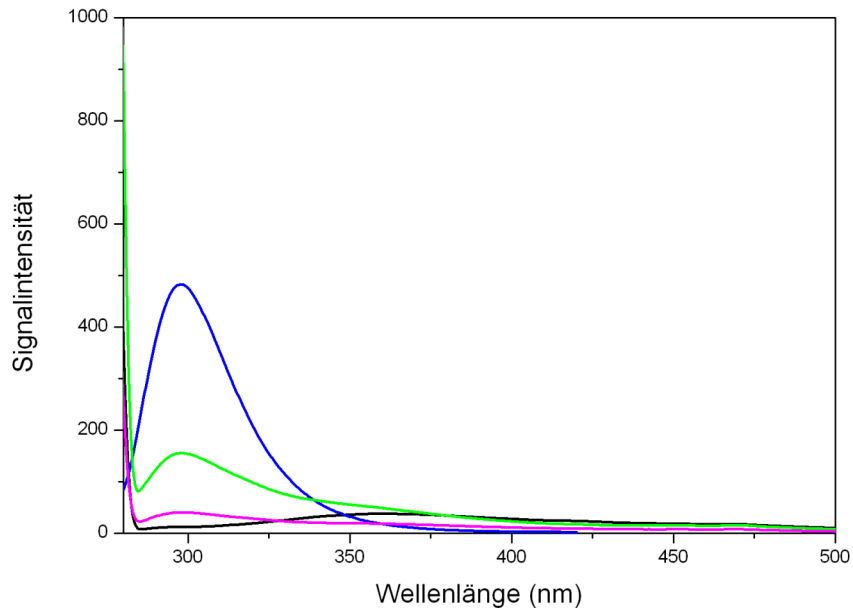
**Abbildung 3-30: Adsorption von Propofol aus einer einprozentigen Emulsion an Silikon. Gezeigt sind die Fluoreszenzspektren von Silikon (schwarz), Propofol (blau), dem nach zwölf tägigem Propofolkontakt mit isotonischer Kochsalzlösung gespülten Silikonschlauch (grün) und dem nach zwölf tägigem Propofolkontakt mit Aceton gespülten Silikonschlauch (lila). Letztere beiden zeigen das für Propofol charakteristische Maximum um 300 nm.**



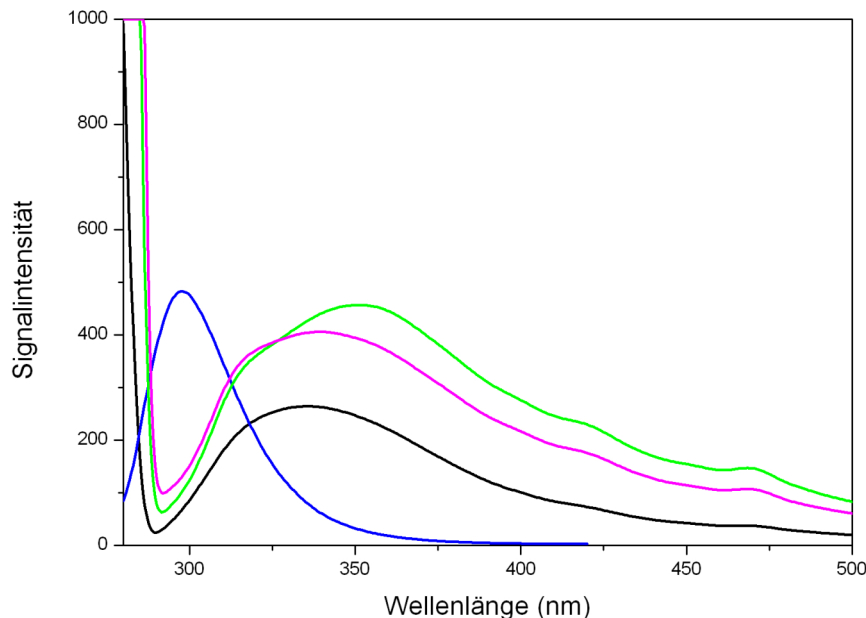


**Abbildung 3-31: Adsorption von Propofol aus einer einprozentigen Emulsion an PVC. Gezeigt sind die Fluoreszenzspektren von PVC (schwarz), Propofol (blau), dem nach zwölfjährigem Propofolkontakt mit isotonischer Kochsalzlösung gespülten PVC-Schlauch (grün) und dem nach zwölfjährigem Propofolkontakt mit Aceton gespülten PVC-Schlauch (lila). Letztere beiden weisen keine Verschiebung ihres Maximums zu 300 nm auf, die einen Propofol-Nachweis belegen würden.**

Der Fluoreszenz-Nachweis von Propofol auf der Innenfläche des verwendeten Schlauchmaterials nach Beendigung des Kreislaufexperiments gelingt ebenfalls für den Kunststoff Silikon (Abb. 3-32), aber nicht für PVC (Abb. 3-33). Es können Veränderung des Spektrums bei 300 nm für Silikon gezeigt werden. Diese sind mit kleinerem Maximum bei 300 nm auch noch vorhanden, wenn der im Kreislaufexperiment eingesetzte Silikonschlauch mit isotonischer Kochsalzlösung abgspült wurde.



**Abbildung 3-32: Adsorption von Propofol unter Versuchsbedingungen an Silikon.** Zu sehen sind die Fluoreszenzspektren von Silikon (schwarz), Propofol (blau), einer direkt im Anschluss an das Experiment gemessenen Schlauchprobe (grün) sowie einer weiteren nach Ende des Experiments mit Wasser gespülten Schlauchprobe des Kreislaufsystems (lila). Beide Schlauchproben weisen ein Maximum bei 300 nm auf. Dies belegt die Propofol-Adsorption an Silikon.



**Abbildung 3-33: Adsorption von Propofol unter Versuchsbedingungen an PVC.** Zu sehen sind die Fluoreszenzspektren von PVC (schwarz), Propofol (blau), einer direkt im Anschluss an das Experiment gemessenen Schlauchprobe (grün) sowie einer weiteren nach Ende des Experiments mit Wasser gespülten Schlauchprobe des Kreislaufsystems (lila). Keine der Schlauchproben weist ein Maximum bei 300 nm auf. Eine Propofol-Adsorption an PVC kann nicht nachgewiesen werden.

### 3.5.4 Einfluss der UV-Bestrahlung

Auch die Bestrahlung mit UV-Licht (274 nm) zur Erzeugung eines Fluoreszenzsignals von Propofol hat Einfluss auf dessen Intensität. Die Intensität nimmt ab. UV-Licht löst Effekte aus, die zur Abnahme der Fluoreszenzintensität des Propofols führen (Kapitel 3.1.3).

### 3.5.5 Hämolyse-Bestimmung

Über die Versuchsdauer von 7 Stunden wird aus den Erythrozyten während der Zirkulation im Kreislaufsystem Hämoglobin freigesetzt. Bestimmt wird das freie Hämoglobin von einer Blutprobe aus der verwendeten Konserve sowie einer Blutprobe, die aus dem Kreislaufsystem nach dem experimentellen Durchlauf entnommen wurde (Tab. 3-22).

**Tabelle 3-22: Freies Hämoglobin im Plasma vor und nach dem Experiment im Kreislaufsystem.**

Experiment	Freies Hämoglobin im Plasma aus Proben	
	der Konserve (g/dl)	des Kreislaufsystem (g/dl)
E <sub>4</sub>	0,04	0,91
E <sub>5</sub>	0,04	0,72
E <sub>6</sub>	0,44	1,00
EE*	0,52	1,13
V <sub>3</sub>	0,03	1,85 (erhöhte rpm)
VV <sub>1</sub> *	0,01	0,57
VV <sub>2</sub> *	0,08	0,87
VV <sub>3</sub> *	0,02	0,76

\* Experimente, die in dieser Arbeit nicht beschrieben werden (gleicher experimenteller Aufbau, EE = Suspension von Erythrozytenkonzentrat und GFP, VV = Vollblut)

Eine Erhöhung der Hämolyse kann nach Erhöhung der Drehzahl von 30/31 rpm auf 50 rpm festgestellt werden.

In den für den klinischen Gebrauch nicht mehr zugelassenen Konserven (E<sub>4</sub> – E<sub>6</sub>, EE), ist bereits vor der Durchführung des Experiments vermehrt freies Hämoglobin im Plasma nachweisbar.

## 4 Diskussion

### 4.1 Das Kreislaufmodell

**Blutzirkulation.** Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität von Blut über einen längeren Zeitraum ist eine konstante Blutzirkulation erforderlich. Das Absinken zellulärer Bestandteile verändert die optische Dichte der Probe und erzeugt eine Änderung der Signalintensität der Fluoreszenz. Das entwickelte Kreislaufsystem verhindert diesen Effekt.

Die Zirkulation eines Volumens von 140 ml führt zu einem hohen Umsatz in der Messküvette, sodass die punktuelle Einstrahlung auf den immer gleichen kleinen Teil der Probe verhindert wird. Tatsächlich konnte der zuvor beobachtete Bleichungseffekt [2] durch den neuen experimentellen Aufbau deutlich reduziert werden (Kapitel 4.3).

**Temperaturregulation.** Die Integration eines Wärmeaustauschers zur Temperaturregulation ist entscheidend für das Ziel der Signalkonstanz im Kreislaufsystem. Bereits geringe Temperaturschwankungen nehmen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität (Kapitel 3.1.2). Um Schwankungen der Signalintensität auf Veränderungen der Propofol-Konzentration im Kreislaufsystem zurückzuführen, muss die Temperaturkonstanz gewährleistet sein. Da die durch UV-Licht zugeführte Energie unter anderem auch in Form von Wärme abgestrahlt wird, die Rollerpumpe Reibung erzeugt und die Mess-Monitore zusätzliche Wärme produzieren, ist eine über den experimentellen Verlauf konstante Temperatur ohne Temperaturregulation nicht möglich. Die Experimente sind durch Einsatz des Wärmeaustauschers stets reproduzierbar und nicht von der Raumtemperatur abhängig.

**Flussrate.** Die Flussrate im Kreislaufsystem wird über einen an das Schlauchsystem angebrachten Flussmesskopf überwacht. Die Flussmessung trägt damit ebenfalls entscheidend dazu bei, reproduzierbare Versuchsbedingungen zu schaffen.

## 4.2 Blutprodukte und ihre Eigenschaften

Die verschiedenen Messmedien wurden für unterschiedliche Fragestellungen eingesetzt. Tabelle 4-1 gibt einen Überblick über die eingesetzten Blutprodukte und deren Eigenschaften, die zur Weiterentwicklung des Kreislaufexperiments führten.

**Tabelle 4-1: Blutprodukte und ihre Eigenschaften**

Messmedium/ Blutprodukt	Eigenschaften und Probleme	Weiterentwicklung
1) GFP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Optische Eigenschaften entsprechen nicht denen des Vollbluts</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verwendung von für den klinischen Gebrauch nicht mehr zugelassenen Erythrozytenkonzentraten in einer Suspension mit GFP</li> </ul>
2) Suspension aus Erythrozytenkonzentrat und GFP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antikoagulation der Konserven mit Citrat führt zu saurem pH-Wert</li> <li>• kein physiologisches Medium</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verwendung von pH-neutralem Heparin als Antikoagulanz für Vollblutspenden</li> </ul>
3) Vollblutspende	<ul style="list-style-type: none"> <li>• kein konstantes Signalniveau bei Anregung mit 274 nm</li> </ul>	
4) isotonische Kochsalzlösung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Signalabfall der Propofolfluoreszenz</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Untersuchungen der Propofol-Adsorption an Schlauchmaterialien</li> </ul>

**Gefrorenes Frischplasma.** Die Experimente mit Gefrorenem Frischplasma (GFP) knüpfen an den erfolgreichen konzentrationsabhängigen Propofolnachweis im Plasma im kleinen Durchfluss an. [2] Dieser Nachweis in Form einer Fluoreszenzzunahme bei 300 nm gelingt auch im mit GFP gefüllten Kreislaufsystem mit hochsignifikanten Messergebnissen. Wie erwartet ist der prozentuale Anstieg des Propofolsignals im Plasma ohne korpuskuläre Elemente höher als im Blut (Kapitel 3.2.2 und 3.3.3). Jedoch ist seine Höhe nicht mit dem Signalanstieg durch Zugabe gleicher Mengen Propofol in isotonischer Kochsalzlösung vergleichbar (Kapitel 3.5.1). Isotonische Kochsalzlösung

enthält keine fluoreszierenden Bestandteile, während Plasma selbst Fluoreszenzeigenschaften aufweist.

GFP ist ein Medium, das prinzipiell Plasma-Enzyme enthält. Jedoch muss deren Aktivität nach den durchlaufenen Produktionsprozessen kritisch hinterfragt werden. Die Blutgasanalyse ergibt, dass der pH-Wert nicht im physiologischen Bereich liegt, sondern alkalischer ist (Abb. 21, Kapitel 3.4.1). Außerhalb ihres pH-Optimums können physiologische Enzyme keine maximale Enzymaktivität entwickeln.

**Suspension aus Erythrozytenkonzentrat und GFP.** Die Suspension aus Erythrozytenkonzentrat und GFP besitzt die optischen Eigenschaften von Blut, mit einem ähnlichen Anteil korpuskulärer Bestandteile und Hämoglobin. Dies bestätigen die zugehörigen Bestimmungen des Hämatokrits.

Durch die spezielle Anordnung der Küvette in der Messkammer (Kapitel 2.3) ist der Propofolnachweis in diesem Medium möglich. Blut besitzt ein eigenes Fluoreszenzspektrum mit einem Maximum um 330 nm. Trotz Mengenverhältnissen von 1 : 280 bei Zugabe von 5 mg Propofol, kann je nach Experiment durch hohe Signalverstärkung ein Anstieg von 2,8 % bis zu 4,9 % bei 300 nm detektiert werden (Kapitel 3.2.2). Der größte erzielte Fluoreszenzanstieg im Kreislaufexperiment für eine Zugabe von 0,5 mg Propofol, d.h. bei einem Mengenverhältnis von 2800 : 1, beträgt 0,9 %. Der Propofolnachweis im Bereich klinischer Konzentrationen gelingt in Form eines regelhaften Anstiegs nach Propofol-Zugabe.

Abgesehen von Ausreißern in den Experimenten E1 und E2, liefert die Fluoreszenzmessung von Propofol in diesem Medium hochsignifikante Ergebnisse. Die gewählte Anregungswellenlänge und Messkonfiguration erweisen sich hier als geeignet für das Vorhaben eines direkten konzentrationsabhängigen Propofol-Online-Nachweises.

Es gelten die gleichen Annahmen für Enzymaktivität wie für das Medium GFP (siehe oben).

**Vollblut.** Mit der frischen Vollblutspende erfolgt der Propofol-Nachweis schließlich im physiologischen Medium. Die Antikoagulation mit Heparin ist entscheidend zur Bewahrung eines physiologischen Blut-pHs (Kapitel 1.4).

Ein Signalanstieg durch Propofol-Zugabe kann bei Anregung mit 274 nm in Vollblut schwer differenziert werden. Es gibt keine signifikante Fluoreszenzsteigerung nach

Injektion des Anästhetikums in das Kreislaufsystem. Grund ist die fehlende Signalkonstanz der Blutfluoreszenz unter UV-Bestrahlung (Kapitel 3.4.2).

### ***4.3 Signalkonstanz***

**Signalkonstanz der Blutfluoreszenz.** Die gewünschte Signalkonstanz der Blutfluoreszenz unter Anregung mit 274 nm kann mit dem Kreislaufmodell für die Medien GFP und die Suspension aus Erythrozytenkonzentrat und GFP bedingt erreicht werden.

Vor Beginn der Propofol-Zugabe-Serien wurde die Signalkonstanz des Messmediums bei Zirkulation im Kreislaufmodell für 20 Minuten in der Zeitverlaufsmessung bei 300 nm bestimmt (Kapitel 3.2.1 und Kapitel 3.3.2). Die Fluoreszenz der Suspension aus Erythrozytenkonzentrat und GFP zeigt in der linearen Regression bei 300 nm nur noch sehr geringe Steigungen in der Größenordnung von +0,08 % bis -0,27 % über 5 Minuten. Für GFP beträgt die Steigung -0,05 % und -0,09 % über 5 Minuten.

Die Betrachtung aller Wellenlängenbereiche des Spektrums im zeitlichen Gesamtverlauf des Experiments belegt, dass die nur wenig von Propofol beeinflussten Wellenlängen, die die maximale Blut-Fluoreszenz repräsentieren, an Fluoreszenzintensität verlieren (Kapitel 3.2.6). Das Blutsignal bleicht also trotz des ständigen Umsatzes in der Messküvette.

**Signalkonstanz bei 300 nm.** Das Signal erreicht im Bereich des Propofol-Maximums um 300 nm konstante Fluoreszenz. Doch muss bedacht werden, dass es sich immer um ein Summationsspektrum der Fluoreszenzintensitäten von Propofol und Blut handelt. In den Wellenlängenbereichen, in denen Propofol fluoresziert, addieren sich beide Signale. Das heißt, dass die ansteigenden Propofol-Mengen im Kreislaufsystem trotz abnehmender Blut-Fluoreszenz den Intensitätsverlust durch Bleichungseffekt bei 300 nm mit ihrem Signal aufheben.

**Signalkonstanz im Vollblut.** Für Vollblut wird, im Gegensatz zur Suspension aus Erythrozytenkonzentrat und GFP, bereits vor Beginn der Propofol-Zugabe-Serien keine Signalkonstanz im Durchfluss erreicht (Kapitel 3.4.2). Dies lässt darauf schließen, dass



die UV-Bestrahlung mit 274 nm und die mechanische Beanspruchung durch die Rollerpumpe auf Blutkomponenten Einfluss nehmen, die nach Verarbeitung und längerer Lagerung bereits nicht mehr dem physiologischen Ausgangszustand der Blutspende entsprechen. Einen Hinweis darauf liefert die Bestimmung des freien Hämoglobins im Plasma, das bei den verwendeten (für den klinischen Gebrauch nicht mehr zugelassenen) Erythrozytenkonzentraten deutlich höher lag (Kapitel 3.5.5).

Auch eine Erhöhung des Umsatzes in der Küvette durch Erhöhung des Flusses vermag den bei Vollblut stärker auftretenden Bleichungseffekt unter UV-Bestrahlung nicht zu verhindern. Die erhöhte Drehzahl der Rollerpumpe erzeugt eine dreifach höhere Hämolyse durch die verstärkte mechanische Beanspruchung (Kapitel 3.5.5).

#### ***4.4 Signal-Konzentrations-Korrelation***

**Korrelationskoeffizienten der linearen Regression.** Die gute Korrelation bei linearer Auftragung zwischen Propofol-Konzentration und Fluoreszenzsignal in Verdünnungsreihen mit isotonischer Kochsalzlösung (Kapitel 3.1.1), kann auch im fließenden Blut erzielt werden (Kapitel 3.2.3). In der Suspension aus Erythrozytenkonzentrat und GFP wird in der linearen Regression ein Korrelationskoeffizient von bis zu 0,99 ( $E_1$ ) erreicht. Der konzentrationsabhängige Nachweis von Propofol im Kreislauf ist in diesem Medium möglich.

**Korrelation bei 300 nm sowie 295-300 nm.** Der Propofoleinfluss auf die Fluoreszenzintensität des Spektrums kann durch zwei gleichwertige Methoden dargestellt werden: Die Beurteilung des Signalanstiegs im Spektrum bei genau 300 nm sowie des Signalanstieges als Fläche im Bereich 295-305 nm (Kapitel 2.11). Beide Methoden zeigen ähnlich gute Signal-Konzentrations-Korrelationen (Kapitel 3.2.3 und Kapitel 3.3.4).

**Veränderung des Signalanstiegs innerhalb der Zugabe-Serien.** Der Signalanstieg verändert sich innerhalb der drei Zugabe-Serien. Die Fluoreszenz-Zunahme steigt mit der Menge des im System enthaltenen Propofols (Kapitel 3.2.2). Aufgrund der nachweisbaren Propofol-Adsorption während des experimentellen Verlaufs (Kapitel 3.5.2, 3.5.3), ist die letzte Zugabe-Serie für die tatsächlich erzeugten

Propofolkonzentrationen am repräsentativsten. Wenn eine Sättigung bzw. ein Gleichgewichtszustand für die Propofol-Ablagerung an Kunststoff eintritt, dann ist dies gegen Ende des Experiments am wahrscheinlichsten.

#### ***4.5 Vergleichbarkeit der einzelnen Kreislaufexperimente***

Der Vergleich der absoluten Signalzunahmen nach Propofolinjektion der drei Zugabeserien innerhalb eines experimentellen Durchlaufs ist möglich. Jedoch nicht zwischen verschiedenen Experimenten, die mit unterschiedlichen Konserven bzw. Vollblutspenden durchgeführt werden mussten (Kapitel 3.2.2 und 3.3.3).

Unterschiedliche Blutkonserven besitzen nie identische Eigenschaften. Einer der bestimmten Parameter, der Hämatokrit, zeigt, dass die Konserven bereits in ihrer optischen Dichte voneinander abweichen. Weitere Eigenschaften einer Konserve, wie ihre Zusammensetzung aus den einzelnen Blutkomponenten sowie ihr Alter sind nicht in gleicher Weise reproduzierbar. Daher liefert jede Blutprobe auch Fluoreszenzsignale in individueller Stärke. Die Signalintensität ist in den verschiedenen Experimenten nie identisch.

#### ***4.6 Signalabfall***

Als Ursache für den Signalabfall der Propofol-Fluoreszenz nach Zugabe kommen mehrere Faktoren in Frage. Nachweisbar verantwortlich ist eine Ablagerung von Propofol-Molekülen am Kunststoff der Schlauchinnenseite (Kapitel 4.7). Zudem nimmt UV-Licht Einfluss auf die Fluoreszenz des Propofols. Über die Bestimmung einer möglichen Abbaukinetik soll die Frage einer möglichen Enzymaktivität im Plasma geklärt werden.

**Photochemische Spaltung des Propofols.** Die Fluoreszenzstabilität des Propofols wurde unter UV-Bestrahlung geprüft (Kapitel 3.1.3). Die gleiche temperaturregulierte Probe wurde zuerst nur stündlich bestimmt. Die Abweichungen der Fluoreszenz lagen im Bereich von 1,43 %. Nachdem die Probe für zehn Stunden dem zur Anregung

verwendeten UV-Licht ausgesetzt war, ergab sich ein Signalabfall von 8,8 % vom Ausgangssignal. Energie von 274 nm nimmt also dauerhaft Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften von Propofol. Das Experiment wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um eine bakterielle Kontamination der Probe auszuschließen. Daher kommt für den Signalabfall des Propofols in diesem Aufbau nur ein Bleichungseffekt durch UV-Strahlung in Betracht.

Mit Hilfe von Katalysatoren wurde die photochemische Spaltung von Phenolringen durch UV-Bestrahlung unter kontrollierten Bedingungen in verschiedenen Arbeiten [5], [6] nachgewiesen. Durch Verwendung der Katalysatoren Zirkonphosphat bzw. Titanphosphat, versetzt mit Titandioxid, werden unter UV-Bestrahlung Abbauraten für Phenole in wässriger Lösung von 70 % bis zu 80 % beobachtet. Sonnenlicht bewirkt bei sonst identischen Bedingungen einen noch größeren Abbau von 92 % bis 96 %. [5] Mit dem Katalysator Wasserstoffperoxid ist ein Umsatz der Phenole von über 90 %, je nach Ausgangskonzentration von Substrat und Katalysator, möglich. [6] Daher ist eine UV-induzierte Spaltung des Propofols, wenn auch in geringerem Umfang, in isotonischer Kochsalzlösung denkbar. Im Kreislaufexperiment bietet Blut prinzipiell eine Vielzahl an möglichen Katalysatoren. Blut als Trägermedium für Atemgase, Nährstoffe, Ionen und Hormone enthält korpuskuläre Elemente, Puffersysteme, Transportproteine, Komponenten des humoralen und zellulären Abwehrsystems sowie Gerinnungsfaktoren.

**Enzymkinetik.** Zur Beantwortung der Fragestellung nach einer Enzymkinetik sind die durchgeführten Experimente im Kreislauf nicht geeignet. Maximale Enzymaktivität bedarf eines bestimmten Temperatur- und pH-Optimums. Das pH-Optimum wird ausschließlich in den Vollblut-Experimenten (Kapitel 3.4.1) durch Antikoagulation mit Heparin erreicht. Nur hier handelt es sich um eine frische Vollblutspende in der tatsächlich von physiologischer Enzymaktivität auszugehen ist. Ein Signalabfall des Propofols im Vollblut unter Anregung mit 274 nm ist aufgrund des fehlenden Signalanstiegs nach Propofol-Zugabe nicht zu differenzieren. Daher kann hier auch keine Abbaukinetik einer Exponentialfunktion erster Ordnung gefunden werden.

Die ermittelten Halbwertszeiten besitzen aufgrund der schlechten Korrelationen zur Exponentialfunktion erster Ordnung in allen Kreislaufexperimenten bloß geringe

Aussagekraft. Zudem variieren die Halbwertszeiten zwischen den einzelnen 36,7° C-Messungen bereits um 10 Prozentpunkte.

Der Ansatz, die Abbaukinetik im Medium Suspension aus Erythrozytenkonzentrat und GFP außerhalb des Temperaturoptimums physiologischer Enzyme mit der Kinetik bei Körpertemperatur zu vergleichen, scheitert. Ein Signalabfall mit längerer Halbwertszeit gemäß einer Exponentialfunktion erster Ordnung bei 22° C wurde erwartet. Die Vergleichbarkeit ist durch die niedrigen Korrelationskoeffizienten einer Exponentialfunktion erster Ordnung (unter 0,85) nicht gegeben.

Die Vorstellung von einer in den Kreislaufexperimenten nachzuweisenden Enzymkinetik muss aus einem weiteren Grund kritisch betrachtet werden: Ursache für die fluoreszierenden Eigenschaften des Propofols ist der Phenolring des Moleküls 2,6-Diisopropylphenol. [8] Abnehmende Fluoreszenz unter Enzymabbau setzt die Spaltung dieser Struktur voraus. Bekannte Prozesse der metabolischen Inaktivierung des Propofols sind Hydroxylierung und Konjugation mit Glucuron-/ Schwefelsäure in der Leber. [1] Sollten ähnliche metabolische Inaktivierungswege bereits im Plasma stattfinden, würden die Metabolite des Propofols ihre Fluoreszenzeigenschaften beibehalten. Ein über die Fluoreszenzeigenschaften des Propofols geführter Nachweis seines Enzymabbaus ist daher ungeeignet.

Die „Abbaukinetik“ als Exponentialfunktion erster Ordnung kann in isotonischer Kochsalzlösung mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,99 beobachtet werden (Kapitel 3.5.1). Dies spricht für die Ablagerungsprozesse am Schlauchsystem und Verteilungsvorgänge nach Propofolinjektion im Kreislaufsystem, die die Kinetik des Signalabfalls dominieren.

**Propofolfluoreszenz bei 300 nm in Vollblut.** Die angestrebte Signalkonstanz konnte im Vollblut unter Anregung mit 274 nm nicht erreicht werden. Jedoch stehen die Geschwindigkeit der Abnahme der Fluoreszenzintensität und die zugegebenen Propofolmengen in Zusammenhang. Dies ist wieder auf die Summation der Signale zweier fluoreszierender Substanzen zurückzuführen. Während weniger von Propofol beeinflusste Wellenlängenbereiche des Spektrums eine um 10 Prozentpunkte stärkere Signalabnahme aufweisen, addiert sich die Propofol-Fluoreszenz mit der abnehmenden Blut-Fluoreszenz bei 300 nm (Kapitel 3.4.3). Daher muss der Ansatz, ein konstantes

Fluoreszenzniveau des Blutes erreichen zu wollen, nicht notwendig weiter verfolgt werden. Verschiedene Propofolmengen verlangsamen den eintretenden Signalabfall des Vollbluts um 300 nm. Dieser verläuft flacher und bietet die Möglichkeit des Rückschlusses von seiner veränderten Steigung auf bestimmte Konzentrationen von Propofol.

#### ***4.7 Ablagerungen von Propofol an der Schlauchinnenwand***

**Raman-Mikrospektroskopie.** Der spezifische Propofol-Nachweis durch Raman-Mikrospektroskopie zeigt, dass die Kunststoffe des Schlauchmaterials Silikon und PVC potentiell Propofol-Moleküle adsorbieren (Kapitel 3.5.2). Verwendet wurde Propofol in Reinform (2,6-Diisopropylphenol > 96 %). Dies entspricht weder bezüglich der Konzentration, der Kontaktzeit (96 Stunden) noch der Aufbereitung des lipophilen Propofols den Bedingungen des Kreislaufexperiments. Die Raman-Mikrospektroskopie beweist dennoch, dass eine Affinität zwischen 2,6-Diisopropylphenol und den Kunststoffen besteht.

**Fluoreszenzspektroskopie.** Der Adsorptions-Nachweis geringer konzentrierten Propofols in Form einer Emulsion (Propofol-Lipuro®, 1%), wie sie im Experiment und klinischen Alltag verwendet wird, gelingt nur für Silikon durch Einsatz der Fluoreszenzspektroskopie (Kapitel 3.5.3). Beide Materialien des Kreislaufsystems hatten für zwölf Tage Kontakt mit der einprozentigen Propofol-Emulsion. Propofol ist an der Silikon-Oberfläche sogar dann noch nachzuweisen, wenn diese mit dem Lösungsmittel Aceton, gereinigt wurde. Eine Adsorption hat stattgefunden. Es handelt sich nicht um eine bloße lipophile Filmbildung des Propofols auf dem Kunststoff.

Im letzten Schritt wird der Propofol-Nachweis auf der Kunststoff-Oberfläche nach einem experimentellen Durchlauf erbracht. Hier zeigt sich, dass am Silikon weiterhin Propofol-Moleküle nachweisbar sind. Dies gilt für Kunststoffproben aus dem geleerten System und weitere Proben des gleichen Systems, die zusätzlich mit Wasser abgespült wurden (Kapitel 2.9). Da im Kreislaufexperiment ausschließlich hydrophile Bedingungen vorliegen, wurde zur Spülung kein lipophiles Lösungsmittel verwendet. Unter den Versuchsbedingungen adsorbieren Propofolmoleküle aus der Emulsion nachweislich an die Silikon-Oberfläche.

Für PVC gelingt der Nachweis im Bereich klinisch relevanter Konzentrationen nicht. Entweder liegt die Menge der adsorbierten Moleküle unter der Nachweisgrenze der Fluoreszenzmethode oder es findet keine Adsorption an die PVC-Oberfläche statt.

Bei der Beurteilung der Fluoreszenz-Spektren sollte die Form des Spektrums, aber nicht die Signalintensität bewertet werden. Veränderungen im Bereich 300 nm nach Propofol-Kontakt erbringen den Nachweis, dass Propofol vorhanden ist. Jedoch ist bei diesem experimentellen Aufbau, die Fluoreszenzintensität nicht auf zugehörige Konzentrationen genormt. Der Wechsel der Schlauchproben, die in den angefertigten Einsatz eingespannt werden, kann Intensitätsschwankungen der sensiblen Fluoreszenzmessung hervorrufen. Eine verlässliche Aussage über die Quantität ist nur möglich, wenn die Proben im Fluoreszenzeinsatz nicht in ihrer Position verändert werden und weitere Parameter wie Temperatur absolut konstant bleiben. Daher kann im gewählten Versuchsaufbau nicht zuverlässig auf die Menge der Ablagerungen des Propofols geschlossen werden.

**Adsorption von Arzneimitteln an Kunststoffmaterialien.** Die Untersuchung der Adsorption von Arzneimitteln an medizinisch eingesetzten Kunststoffen von Unger [16] bestätigt die erhobenen Ergebnisse am Beispiel eines dynamischen Zellkulturmodells. Die Bestimmung der Adsorptionskinetik erfolgte über die Substratkonzentration der zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Proben aus dem dynamischen System. Je nach Eigenschaften der eingesetzten Substrate wurde ihre Konzentration durch Fluoreszenzpolarisations-Immunoassay bzw. der HPLC mit UV-Detektor gemessen. Die Studie zeigt am Beispiel von Lidocain, dass PVC und Silikon lipophile Substanzen adsorbieren. Die höchste Kapazität aller untersuchten Kunststoffmaterialien weist Silikon auf.

Dynamische Systeme, die zuvor mit Serum (fetal calf serum) inkubiert wurden, adsorbieren mehr Lidocain. Die Autoren führen dies auf die hohe Plasmaproteinbindung des Lidocains zurück. Propofol besitzt eine höhere Plasmaproteinbindung (80%). [1]

Angewandt auf die durchgeführten Kreislaufexperimente ist die Adsorption von Propofol an die Schlauchoberfläche der am besten untersuchte Faktor, der Einfluss auf den Signalabfall der Fluoreszenzintensität nimmt. Allein deshalb gestaltet sich die Differenzierung weiterer Einflüsse auf das Fluoreszenzsignal von Propofol schwierig.

Für das Kreislaufsystem müssten zuvor eine Adsorptionskinetik oder eine Konzentration zur Sättigung der Adsorptionskapazität ermittelt werden. Erst dann können verlässliche Aussagen über weitere Prozesse, die Einfluss auf die Fluoreszenz von Propofol nehmen, getroffen werden.

**Bedeutung für das Kreislaufexperiment.** Das Fluoreszenzverhalten des Propofols in isotonischer Kochsalzlösung (Kapitel 3.5.1) kann nicht direkt auf das Adsorptionsverhalten des Propofols im mit Blut gefüllten Kreislaufmodell übertragen werden. Laut Angaben des Herstellers des Schlauchmaterials kommt es nach Kontakt mit Blut bzw. Plasma zu einer Biofilmbildung auf den Kunststoffmaterialien. Diese beeinflusst die Adsorptionskapazität der Kunststoffoberfläche. An die Oberfläche angelagerte Plasmaproteine können für eine Substanz mit hoher Plasmaproteinbindung wie Propofol weitaus höhere Adsorptionsraten bedeuten. Daher muss bei der Bestimmung einer Adsorptionskinetik oder einer Konzentration zur Sättigung der Adsorptionskapazität neben den verwendeten Kunststoffen auch das jeweilige Mess-Medium berücksichtigt werden.

Um weiter mit dem Kreislaufmodell zu arbeiten, sollten nur noch Kunststoffmaterialien verwendet werden, die sicher keine oder nur minimale Adsorption von lipophilen Propofol-Molekülen aufweisen. Die Silikon-Elemente sollten keine weitere Verwendung finden. Nur so kann das „In-Vivo-Verhalten“ von Propofol im Blut möglichst unverfälscht im Kreislaufmodell wieder gegeben werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Entwicklung eines Kreislaufmodells mit integrierten Elementen zur Temperaturregulation und Kontrolle der Flussrate schafft reproduzierbare Versuchsbedingungen zum direkten optischen Propofolnachweis im zirkulierenden Blut. Der Nachweis erfolgt anhand des charakteristischen Fluoreszenzspektrums des Propofolmoleküls (2,6-Diisopropylphenol) mit einem Maximum um 300 nm. Das Kreislaufmodell aus PVC- und Silikonschläuchen enthält eine Durchflussquarzküvette, die in die Messkammer des Fluoreszenzspektrometers eingesetzt wird. Entscheidend ist die Erzeugung des erhöhten Umsatzes eines großen Blutvolumens in der Messküvette. Ziel der Entwicklung ist die Signalkonstanz des Messmediums Blut durch die Reduktion photochemischer Bleichungseffekte, die unter Anregung mit Licht der Wellenlänge 274 nm (UV-C) auftreten. So werden Rückschlüsse von Signalveränderungen der Blutfluoreszenz nach Propofol-Zugabe auf die im Kreislauf enthaltenen Propofolkonzentrationen möglich.

Als Messmedien zum Propofolnachweis eingesetzt werden Gefrorenes Frischplasma (GFP), eine Suspension aus Erythrozytenkonzentrat und GFP sowie frische Vollblutspenden. Nur das mit Heparin versetzte Vollblut weist tatsächlich physiologische Bluteigenschaften auf.

Die Signalanstiege nach Propofolinjektion in das mit GFP oder der Suspension gefüllte Kreislaufsystem sind hochsignifikant für die erzeugten Konzentrationen von 35,7 µg/ml bis 3,6 µg/ml. Hier zeigt sich auch eine sehr gute lineare Korrelation von bis zu 0,99 zwischen Fluoreszenzsignal und den klinisch relevanten Propofolkonzentrationen. Für diese Messmedien wurde durch den Einsatz des Kreislaufmodells ein ausreichend stabiles Fluoreszenzsignal zum Propofolnachweis erreicht. Vollblut unterliegt weiterhin der photochemischen Bleichung und liefert keine konstante Autofluoreszenz.

Jedem Anstieg der Fluoreszenzintensität durch Propofol-Zugabe folgt ein Abfall des Signals. Durch Raman-Mikrospektroskopie und Fluoreszenzspektroskopie wurden Schlauchproben auf eine Adsorption der Propofolmoleküle an der Innenwand untersucht. Unter den Versuchsbedingungen des Kreislaufexperiments ist die Adsorption von Propofol an Silikon nachweisbar. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Propofol unter permanenter Bestrahlung mit 274 nm an Fluoreszenzintensität



verliert. Somit können die Propofoladsorption an der Schlauchinnenfläche und die Bleichung des Propofols durch Anregungsstrahlung als Ursachen für den Signalabfall benannt werden.

**Schlussfolgerung:** Der hochsignifikante konzentrationsabhängige Nachweis für klinisch relevante Propofolmengen in Form einer Zunahme des Fluoreszenzsignals bei 300 nm gelingt in der Suspension aus Erythrozytenkonzentrat und GFP im Kreislaufsystem. Der anschließend zu beobachtende Signalabfall beschreibt nicht die pharmakokinetischen Eigenschaften des Propofols, da die Adsorption von Propofol an die Silikonschläuche sowie eintretende photochemische Bleichungseffekte der Aussagekraft des in-vitro-Modells Grenzen setzen.

## Literaturverzeichnis

- [1] Aktories, K.: *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 9.Auflage, Elsevier, 2004
- [2] Bejan, I.: *Nachweis des Anästhetikums Diprivan ® in Blut und Blutplasma mittels optischer Spektroskopie*, Institut für P/A/O Chemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Diplomarbeit 2006
- [3] Chen YZ, Zhu SM, He HL, Xu JH, Huang SO, Chen OL: Do lungs contribute to propofol elimination in patients during orthotopic liver transplantation without veno-venous bypass?, *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2006 Nov; 5 (4): 511-4
- [4] Colditz, R., *Praktikums-Skript für physikalische Chemie*, Institut für Physikalische Chemie, Universität Würzburg (2008)
- [5] Das DP, Parida K, De BR: Photo-oxidation of phenol over titania pillared zirconium phosphate and titanium phosphate, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 240 (2005) 1-6
- [6] De AK, Bhattacharjee S, Dutta BK: Kinetics of Phenol Photooxidation by Hydrogen Peroxide and Ultraviolet Radiation, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 1997, 36 (9), 3607–3612
- [7] Falk, M., Becker, R., Marohn, F.: *Angewandte Statistik mit SAS*, 1. Auflage, Springer, 1995
- [8] Hesse, M. Meier, H., Zeeh, B.: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 7. Auflage, Thieme, 2005
- [9] Knibbe CAJ, Koster VS, Deneer VHM, Stuurman RM, Kuks PFM, Lange R: Determination of propofol in low-volume samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Chromatography B*, 1998 Mar 20; 706 (2): 305-10
- [10] Luo W, Li YH, Yang JJ, Tian J, Xu JG: Cerebrospinal fluid an plasma propofol concentration during total intravenous anaesthesia of patients undergoing elective intracranial tumor removal, *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, 2005 Sep; 6 (9): 865-8
- [11] Meschede, D.: *Gerthsen Physik*, 23. Auflage, Springer, 2006
- [12] Mueller-Eckhardt, C.: *Transfusionsmedizin: Grundlagen - Therapie - Methodik*, Springer, 1988
- [13] Plummer GF: Improved method for the determination of propofol in blood by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection; *Journal of Chromatography*, 1987 Oct 9;421 (1): 171-6

- [14] Schnepel, Frank-M., Physikalische Methoden in der Chemie: Raman-Spektroskopie, *Chemie in unserer Zeit*/ 14. Jahrgang 1980/ Nr.5
- [15] Tipler, A.: *Physik für Wissenschaftler und Ingenieure*, 2. Auflage, Spektrum akademischer Verlag, 2006
- [16] Unger JK, Kuehlein G, Schroers A, Gerlach JC, Rossaint R: Adsorption of xenobiotics to plastic tubing incorporated into dynamic in vitro systems used in pharmacological research—limits and progress, *Biomaterials*, 2001 Jul; 22 (14): 2031-7

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 2-1 Kreislaufmodell: Schema-Zeichnung, Symbole für Wärmeaustauscher (3), Blutleerbeutel (7) und gerade Konnektoren nach CODEC HMT Medizintechnik GMBH
- Abb. 2-2 Übersichtsfoto: Kreislaufsystem
- Abb. 2-3 Küvettenanordnung, übernommen aus [2]
- Abb. 2-4 Jablonski-Schema nach [8]
- Abb. 2-5 Absorptions- und Emissionsspektrum (Stokes-Shift)
- Abb. 2-6 Schwingungsniveaus der Elektronen nach [8]
- Abb. 2-7 Spektren von Propofol, Blut und Blut mit Propofol in der Übersicht
- Abb. 2-8 Definition des Differenzspektrums der Spektren Blut mit Propofol und Blut
- Abb. 2-9 Beispielgraph für die Signalauftragung bei 300 nm
- Abb. 2-10 a) Lineare Regression der Messdaten vor Propofol-Zugabe mit dem Wert nach Propofol-Zugabe,  
b) Residuen der Messdaten zur Linearen Regression
- Abb. 2-11 a) Lineare Regression allein aus den Messdaten vor Propofol-Zugabe,  
b) Residuen der Messdaten zur Linearen Regression
- Abb. 3-1 Inhalte der Experimente
- Abb. 3-2 Verwendete Messmedien; Fotos „Gefrorenes Frischplasma“, „Erythrozytenkonzentrat + Gefrorenes Frischplasma“ und Vollblutspende von:  
<http://www.transfusionsmedizin.uni-wuerzburg.de/deutsch/einrichtungen/kliniken/InstitutfrKlinischeTransfusionsmedizinundHmotherapie/Studenten/Hauptvorlesung/HerstellungIndikationEKs/content.html>
- Abb. 3-3 Konzentration-Signal-Korrelation für die Verdünnungsreihe 1-6 µg/ml
- Abb. 3-4 Konzentration-Signal-Korrelation für die Verdünnungsreihe 10-50 µg/ml
- Abb. 3-5 Das Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von der Temperatur

- Abb. 3-6 Stündliche Fluoreszenzbestimmung einer sterilen Propofol-Probe von 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Abb. 3-7 Das Fluoreszenzsignal von Propofol bei 300 nm über 10 Stunden
- Abb. 3-8 Experiment E<sub>5</sub>
- Abb. 3-9 Flussrate eines experimentellen Durchlaufs
- Abb. 3-10 Fluoreszenzsignal der Suspension aus Erythrozytenkonzentrat mit Gefrorenem Frischplasma bei 300 nm über 20 Minuten
- Abb. 3-11 Signalanstieg nach Propofol-Zugabe der verschiedenen Zugabe-Serien
- Abb. 3-12 Signalabfall nach Zugabe von 5 mg Propofol
- Abb. 3-13 Das Fluoreszenzsignal verschiedener Wellenlängen des Spektrums im zeitlichen Gesamtverlauf des Experiments E<sub>3</sub>
- Abb. 3-14 Das Fluoreszenzsignal verschiedener Wellenlängen des Spektrums im zeitlichen Gesamtverlauf des Experiments E<sub>4</sub>
- Abb. 3-15 Prozentualer Signalabfall verschiedener Wellenlängen des Spektrums im zeitlichen Gesamtverlauf des Experiments E<sub>4</sub>
- Abb. 3-16 Experiment P<sub>2</sub>
- Abb. 3-17 Das Plasma-Spektrum, Spektrum von Plasma und Propofol
- Abb. 3-18 Fluoreszenzsignal bei 300 nm über 1000 s von Plasma im Durchfluss im Experiment P<sub>1</sub>
- Abb. 3-19 Signal-Konzentrations-Korrelation bei Propofol-Zugabe in GFP
- Abb. 3-20 Experiment V<sub>1</sub>
- Abb. 3-21 pH-Werte der Experimente
- Abb. 3-22 Fluoreszenzsignal bei 300 nm über 1200 s von Vollblut im Durchfluss im Experiment V<sub>2</sub>
- Abb. 3-23 Signaldifferenz nach den Propofol-Zugaben verschiedener Konzentrationen im Experiment V<sub>1</sub>
- Abb. 3-24 Fluoreszenzsignal bei 300 nm und 330 nm im zeitlichen Gesamtverlauf des Experiments V<sub>3</sub>
- Abb. 3-25 Propofol-Zugaben zu isotonischer Kochsalzlösung im Kreislaufsystem
- Abb. 3-26 Signalabfall nach Propofolzugabe in isotonischer Kochsalzlösung

Abb. 3-27 Halbwertszeiten, ermittelt durch Kurvenanpassung einer Exponentialfunktion erster Ordnung

Abb. 3-28 Raman-Spektrum des PVC-Schlauchs

Abb. 3-29 Raman-Spektrum des Silikon-Schlauchs

Abb. 3-30 Adsorption von Propofol an Silikon (Fluoreszenz-Nachweis)

Abb. 3-31 Adsorption von Propofol an PVC (Fluoreszenz-Nachweis)

Abb. 3-32 Adsorption von Propofol an Silikon (Fluoreszenz-Nachweis unter Versuchsbedingungen)

Abb. 3-33 Adsorption von Propofol an PVC (Fluoreszenz-Nachweis unter Versuchsbedingungen)

## **Danksagung**

Bei der Entstehung dieser Arbeit hatte ich das große Glück, viel Unterstützung zu erfahren. Dies halte ich nicht für selbstverständlich und möchte mich deshalb bei denjenigen herzlich bedanken, die mich in dieser Zeit begleitet haben:

Herrn Univ.-Prof. Dr. Norbert Roewer für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Jens Broscheit für das Überlassen des spannenden Promotionsthemas, die engagierte Betreuung mit stetiger Bereitschaft zur Diskussion und Beantwortung großer und kleiner Fragen sowie der Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Sebastian Schlücker für meine Aufnahme in seinen Arbeitskreis am Institut für Physikalische Chemie der Universität Würzburg, die direkte unkomplizierte Betreuung vor Ort und für die schnelle kritische Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Volker Fischer für die Ermöglichung der Entwicklung des Kreislaufsystems dank seiner speziellen Fachkenntnisse und entscheidenden Hilfestellungen bei vielen praktischen Fragen.

Allen Mitgliedern und Mitarbeitern des Arbeitskreises Priv.-Doz. Dr. Schlücker von 2007 – 2008, die mich offen aufgenommen haben und von deren Erfahrungsschatz im wissenschaftlich, experimentellen Arbeiten ich sehr profitieren durfte. Insbesondere bedanken möchte ich mich bei Magdalena Gellner, Carina Jehn, Stephan Niebling und Max Schütz.

Den Mitarbeitern der Elektronik-Werkstatt und Feinmechanik des Instituts für Physikalische Chemie der Universität Würzburg für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Carsten Schmuck für die Erlaubnis zur Nutzung des Fluoreszenzspektrometers und zur Durchführung der Experimente im Labor seines Arbeitskreises.

Dr. Volker Bickert, Dr. Jürgen Dudaczek, Michael Merschky, Ute Michel, Dr. Christian Urban und Dr. Peter Wich aus dem Arbeitskreis Prof. Dr. Schmuck des Instituts für Organische Chemie der Universität Würzburg für zahlreiche Tipps.

Herrn Dr. Andreas Opitz für wertvolle Anregungen und sehr freundliche Kooperation in diesem Projekt sowie dem Labor der Transfusionsmedizin im Zentrum Operativer Medizin.

Dr. Volker Bickert, Mirjam Kirschnick, Stephan Sönnekes und Philipp Werle für die unkomplizierte Unterstützung mit ihren Blutspenden.

Den Teilnehmern am Seminar „Biostatistik, Epidemiologie und klinische Studien“ im SS 09, insbesondere Sabine Karl, für die produktive Diskussion und Hilfestellung zur Beantwortung meiner statistischen Fragestellung.

Meinen Eltern, die mich bei all meinen Entscheidungen auf meinem Weg unterstützen.





# Lebenslauf von Judith Bosten

Geburtstag: 20.03.1985  
Geburtsort: Frankfurt a.M.  
Konfession: römisch katholisch  
Familienstand: ledig

Vater: Dipl. Päd. Johannes Bosten, lic. theol.  
Mutter: Hiltrud Gabriele Bosten, geb. Strupp

## SCHULBESUCH

1991 – 1995 Freiherr-vom-Stein-Schule, Grundschule, Rodgau  
1995 – 2001 Heinrich-Böll-Schule, integrierte Gesamtschule, Rodgau  
2001 – 2004 Claus-von-Stauffenberg-Schule, Gymnasiale Oberstufe, Rodgau  
**Abitur**

## STUDIUM

Oktober 2004 Beginn des Medizinstudiums, an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg

August 2006 **Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung**

### **Famulaturen:**

01.03. – 31.03.2007 *Anästhesiologie*, Ketteler Krankenhaus Offenbach  
04.09. – 04.10.2007 *Herz-Thorax-Chirurgie*, Universitätsklinikum Würzburg  
11.08. – 25.08.2008 *Dermatologische Praxis*, Dr. med. Thomas Zimmermann, Heusenstamm  
01.09. – 30.09.2008 *Neurologie*, Juliusspital, Würzburg  
01.03. – 15.03.2009 *Anästhesiologie*, Universitätsklinikum Würzburg

### **Praktisches Jahr:**

17.08. – 06.12.2009 *Wahlfach Anästhesiologie* in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Würzburg  
07.12.09 – 28.03.10 *Chirurgie* in den Abteilungen Visceral-, Gefäß- und Unfallchirurgie des Lehrkrankenhauses Klinikum Coburg  
29.03. – 18.07. 2010 *Innere Medizin* in den Abteilungen Hämato-Onkologie und Kardiologie in den Medizinischen Kliniken I und II des Universitätsklinikums Würzburg

12.11.2010 **Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung**