

Anwendungspotentiale für die LC-MS/MS in der Routinediagnostik

Die Massenspektrometrie (MS) wurde als Anwendung bereits 1899 von Joseph J. Thompson (Nobelpreis 1908) im Philosophical Magazine publiziert. Damals war an die Applikation dieser Methode in der klinischen Diagnostik noch nicht zu denken. Jahrzehntlang galt die um ihrer Empfindlichkeit wegen geschätzte Massenspektrometrie als ausschließliches Forschungswerkzeug, die Routinetauglichkeit war noch nicht gegeben. In den neunziger Jahren wurde die Methode weitgehend automatisiert und war nun geeignet für die Hochdurchsatz-Analytik. Die MS wurde für immer mehr Fragestellungen aus der klinischen Chemie genutzt, Vorreiter waren hier das Neonatalscreening und Anwendungen in der Forensik (Gerichtsmedizin).

Massenspektrometrie in der Diagnostik

Mittlerweile hat die MS ihre grundsätzliche Routinetauglichkeit bewiesen und bietet sich für ausgewählte Hochdurchsatz-Anwendungen der klinischen Diagnostik an, wo sich die Sensitivität, Spezifität und die Einfachheit der Methode umsetzen lassen. Nach den bereits etablierten Bereichen Neonatalscreening und Forensik erobert die MS nun die mit starkem Probendurchsatz gekennzeichneten Sorten der Arzneimittelspiegelbestimmung in Humanmatrizes. Die MS ersetzt damit vor allem die herkömmlichen Immunoassays, welche die Problematik der Kreuzreaktion einerseits und zeitverzögerter Herstellung von Antikörpern für neue Pharmaka andererseits nicht konsequent lösen konnten.

Anforderungen in der Routinediagnostik

Die Übertragung der MS in die Routinediagnostik ließ ein bisheriges Defizit offensichtlich werden: während für die übrigen, gängigen Methoden kommerzielle Probenvorbereitungswerkzeuge und Qualitätskontrollmaterial erhältlich sind, ist für die MS dergleichen nicht vorhanden. Dabei werden diese Hilfsmittel nicht nur Neueinsteigern entgegenkommen, sondern im Zuge der internationalen Standardisierung auch etablierte, professionelle MS-Labors signifikant unterstützen. Die Massenspektrometrie hat die Aura des komplizierten verloren und wird in immer mehr Labors als eine willkommene Alternative für Spezialanwendungen wahrgenommen.

Chromsystems-Produkte für LC-MS/MS

Die beschriebenen Stärken der LC-MS/MS kommen nur dann zur Geltung, wenn die Anwendung der Methode auf den betroffenen Parameter überhaupt möglich ist und wenn das Probenaufkommen den Investitionsaufwand rechtfertigt. Darum behält die klassische HPLC ihre Bedeutung für die Routinediagnostik. Während Chromsystems nun sein Aktivitätsfeld auf die LC-MS/MS erweitert, trifft dies nur für ausgesuchte Bestimmungen zu. Die neuen Reagenzienkits und das neue Qualitätskontrollmaterial wird sich in die Linie der bekannten Chromsystems-Qualität und Anwenderfreundlichkeit einreihen. Den Anfang macht eine Kooperation mit der Firma Waters, Milford, USA, für die Chromsystems einen Kit für die Analytik verschiedener Immunsuppressiva herstellt.

Chromsystems wird eigene Reagenzienkits und Qualitätskontrollmaterial für die LC-MS/MS-Analytik aller relevanten Parameter auf den Markt bringen.



Die Tandem-Massenspektrometrie ist ein außerordentlich wichtiges Werkzeug für die Neonataldiagnostik. Verschiedene angeborene, z.T. lebensbedrohliche Stoffwechselstörungen können mit dieser Methode innerhalb kürzester Zeit erkannt werden, so dass die Neugeborenen sofort die entsprechende notwendige Behandlung erhalten. Mit einer minimalen Menge an Vollblut, welches auf Filterpapier aufgefangen wird, können bislang ca. 40 verschiedene Krankheitsbilder von Neugeborenen mit der LC-MS/MS diagnostiziert werden.

Seite 2/3

Die Anwendung der Massenspektrometrie in der klinischen Analytik

Dr. Mike Morris, Waters

Seite 3

Neue Produktlinie: 6+1 Multilevel Kalibratorsets

Produktinformation

Seite 4

Untersuchung des oxidativen Status

Dipl.-Biol. Gabriel Erlenfeld, Chromsystems

Seite 5

β-Carotin – mehr als nur ein Antioxidans

Dr. Hans-Ulrich Koch, Institut für Laboratoriumsmedizin Berlin

Seite 6/7

Vitamin B1- und B2-Bestimmung in Bier

Dipl.-Ing. Martina Schütz, Dipl.-Ing. Ralf Mezger, Univ.-Prof. Dr.-Ing. Werner Back, TU München-Weihenstephan

Seite 7

Chromsystems Weiterentwicklungen: VMA, HVA, 5-HIAA im Urin

Homocystein im Plasma

Produktinformationen

Seite 8

Wir stellen vor...

Teil 2: Die Abteilung Auftragsbearbeitung

Chromsystems Messetermine

Impressum

Die Anwendung der Massenspektrometrie in der klinischen Analytik

Dr. Mike Morris, Business Manager Clinical Mass Spectrometry Group, Waters, UK

Technischer Hintergrund

In einem Massenspektrometer werden ionisierte Moleküle der zu analysierenden Substanz in einem Vakuum mittels elektrischer oder magnetischer Felder beeinflusst. Durch eine sorgfältige Steuerung der angelegten Felder können verschiedene Arten von Ionen entsprechend ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z -Wert) getrennt werden. Auf diese Weise lassen sich viele Eigenschaften der untersuchten Moleküle erforschen.

Ein Massenspektrometer besteht im Prinzip aus vier Komponenten:

- Probenezuführung: Einlass
- Ionisierung: Ionenquelle
- Trennung der Ionen nach m/z -Wert: Massenanalysator
- Ionennachweis: Detektor

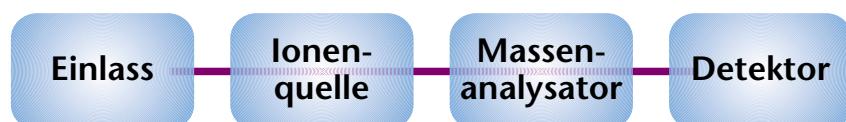


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Massenspektrometers.

Probenezuführung

Bei den in diesem Artikel betrachteten Proben handelt es sich hauptsächlich um Lösungen, und die Technik der Einführung des Analyten in das Massenspektrometer erfordert die Handhabung von Flüssigkeiten. Bei der einfachsten Versuchsanordnung wird eine Probe mittels Loop-Injektion in die mobile Phase eingebracht. Bei komplexeren Anordnungen ist eine HPLC-Säule dazwischengeschaltet. Das Ergebnis ist in beiden Fällen, dass die Probe von der mobilen Phase in die Ionenquelle des Massenspektrometers mitgenommen wird. Die Verwendung flüssiger Proben eröffnet die Möglichkeit, zusätzlichen Nutzen aus den Entwicklungen und der Durchsatzleistung der modernen HPLC-Technik zu ziehen.

Ionisierung

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, in der Gasphase Ionen zu erzeugen. Am besten geeignet für die Ionisierung der thermisch labilen Moleküle, die in biologischen Systemen typischerweise vorliegen, sind jedoch

die so genannten weichen Ionisierungstechniken (Fast Atom Bombardment etc., s. Literatur) und die Atmosphärendruck-Ionisierungstechniken (Elektrospray-Ionisation, chemische Ionisation bei Atmosphärendruck, Photoionisation bei Atmosphärendruck etc.). Bei diesen Techniken werden typischerweise in Lösung durch Hinzufügen oder Abspalten kleiner Ionen wie Protonen (H^+), Natriumionen (Na^+) und Ammoniumionen (NH_4^+) Molekülonen gebildet. Bei der Analyse einer Verbindung in Lösung wird man demnach Addukte dieser Ionenarten erwarten, abhängig von der genauen Zusammensetzung der mobilen Phase und den Bedingungen in der Ionenquelle (Temperatur, Gasströmungen etc.)

Massentrennung

Für die Trennung der geladenen Teilchen durch Manipulation in elek-

trischen und/oder magnetischen Feldern können unterschiedliche Massenanalysatoren verwendet werden. In diesem Artikel werden ausschließlich Quadrupol-Massenfilter betrachtet. In diesen Analysatoren werden an einer Reihe von Elektroden hochfrequente Gleich- und Wechselspannungen angelegt, um eine zuverlässige Flugbahn der Teilchen mit einem bestimmten Masse/Ladungs-Verhältnis zu ermöglichen. In dieser Hinsicht funktioniert der Quadrupol genau wie ein optisches Filter, das nur ein schmales Wellenband durchlässt.

Ionennachweis

Generell sind in der Massenspektrometrie (MS) verschiedene Ionennachweissysteme im Einsatz, die alle dazu dienen, die Ionen in ein messbares elektrisches Signal umzusetzen. Idealerweise ist das vom Detektor abgegebene Signal proportional zur Zahl der Ionen, die auf den Detektor treffen, so dass eine quantitative Messung erfolgt. In Quadrupol-Geräten werden typischerweise Elektronenvervielfacher und Photovervielfacher mit kon-

tinuierlicher Dynode als Detektoren verwendet.

Allgemeine Aspekte

Nach dem Transport der Ionen in einen Tandem-Massenanalysator ergeben sich mehrere interessante Optionen: Zunächst können die Bestandteile nach ihrem jeweiligen Masse/Ladungs-Verhältnis getrennt werden.

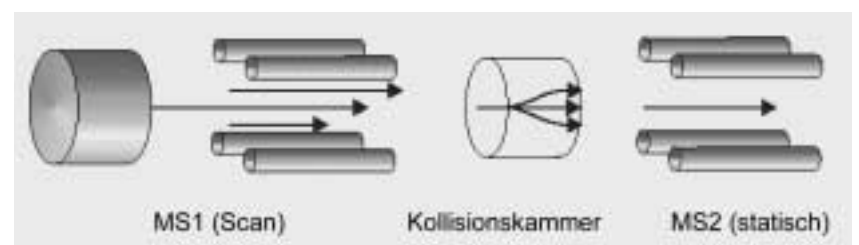


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Vorläufer-Ionen-Analyse, bei der der erste Massenanalysator (MS1) gescannt wird und der zweite Massenanalysator (MS2) so eingestellt wird, dass er nur ein spezifisches Fragment durchlässt (die Einstellung Scan bzw. statisch ist austauschbar).

Dies bedeutet, dass die Selektion nach Masse in den Prozess des Verbindungsnachweises integriert werden kann.

In einem Tandem-Quadrupol-Massenspektrometer sind zwei Massenanalysatoren in Reihe geschaltet. Diese sind durch einen Kollisionsbereich getrennt, in dem die vom ersten Analysator selektierten Ionen durch die Kollision mit neutralen Gasmolekülen unter höherem Druck fragmentiert werden können. Dieser Prozess führt zur Bildung strukturell relevanter, ionisierter oder neutraler Unterheiten des massenselektierten Moleküls. Er kann dazu dienen, die Molekülstruktur zu bestimmen oder die Spezifität der Analyse bestimmter Verbindungen um eine Dimension zu erweitern.

Einsatzbereiche

Die Massenspektrometrie wurde als Analyseverfahren der ersten Wahl in der Mineralölindustrie entwickelt. Im Bereich der Biowissenschaften wurde sie viele Jahre lang mit einer gewissen Skepsis betrachtet. Die Entwicklungen im Bereich der weichen Ionisierungstechniken im Laufe der letzten zehn Jahre haben eine Anwendung der Massenspektrometrie in der direkten Analyse biologischer Substanzen möglich gemacht. Darüber hinaus erleichtern Entwicklungen in der Elektronik- und Computertechnologie die Verwendung moderner Massenspektrometer heute erheblich und ermög-

lichen die Durchführung komplexer analytischer Versuche, ohne dass die Bediener jahrelang geschult werden müssen

Forschung

Die Massenspektrometrie wird häufig bei der Erforschung und Entwicklung neuer Arzneimittel genutzt, außerdem routinemäßig in toxikolo-

gischen Untersuchungen und klinischen Studien. Die Entwicklung der Massenspektrometrie (LC-MS und LC-MS/MS) zu einem hilfreichen Instrument im Bereich der klinischen Analyse in Hinblick auf den Nachweis und die Quantifizierung physiologischer Verbindungen - einschließlich angewandeter Wirkstoffe und deren Metaboliten - erscheint daher nur natürlich.

Diagnostik

In den letzten Jahren wurde die Massenspektrometrie bei einer wachsenden Anzahl von Fragestellungen mit klinischer Bedeutung angewendet. Der vielleicht wichtigste Durchbruch betraf die Anwendung der Massenspektrometrie beim (in der Massenspektrometrie so bezeichneten) High-Throughput-Screening auf endogene Metaboliten in getrockneten Blutproben. Es wurden Verfahren für die schnelle Bestimmung von Aminosäuren [1], Acylcarnitinen [2,3] und Gallensäuren [4] mit minimaler Probenvorbereitung entwickelt. Die gemeinsamen Merkmale der Molekülstruktur bei verwandten chemischen Stoffen führen zu einer voraussagbaren Aufspaltung im Massenspektrometer, die es ermöglicht, nach minimaler Probenaufarbeitung einzelne Molekülarten aus einer komplexen biologischen Matrix zu isolieren und sie zu bestimmen. Das Neugeborenen-Screening auf Phenylketonurie, die Ahornsirupurin-Krankheit und

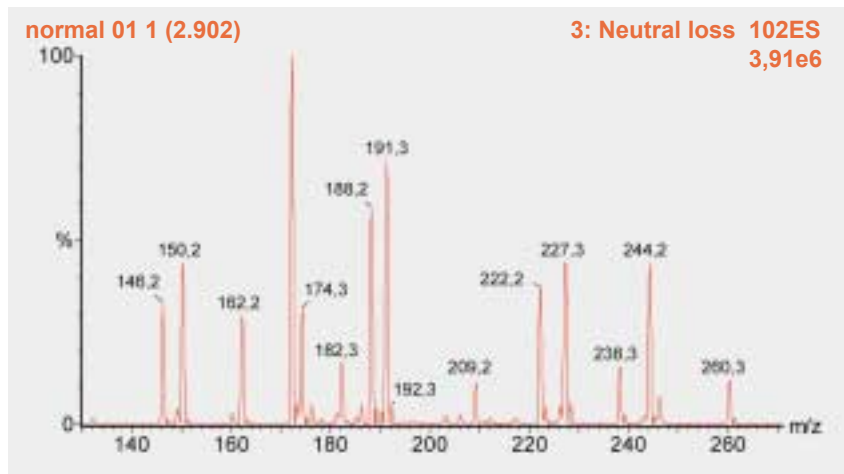


Abbildung 3: Profil der neutralen Aminosäuren eines gesunden Patienten.

MCAD, um nur einige zu nennen, wird jährlich weltweit bei einigen Millionen Säuglingen durchgeführt. Wahrscheinlich wird die Verbreitung dieses Verfahrens noch zunehmen.

TDM

Dasselbe Gerät, das für das High-Throughput-Screening auf spezifische Metabolite verwendet wird, bietet die Möglichkeit eines breiten Anwen-

dungsspektrums, wie z.B. die Messung der Immunsuppressiva Cyclosporin (Cyclosporin A) [5,6], Tacrolimus (FK506) [7] und Sirolimus (Rapamycin) [8]. Transplantierte Patienten erhalten diese Wirkstoffe nach der Transplantation lebenslanglich. Es existiert keine definierte therapeutische Konzentration für diese Wirkstoffe, jedoch werden individuelle Konzentrationsbereiche für die einzelnen Patienten

und Transplantattypen angegeben.

Vergleich

Die zwei kritischen Punkte bei transplantierten Patienten sind das Organversagen infolge einer chronischen Abstoßung und die Toxizität infolge der chronischen Immunsuppression. Aus diesen Gründen müssen die Wirkstoffspiegel genau überwacht werden.

Die derzeit hierfür üblichen Nachweisverfahren sind Immunoassays und HPLC. Die heutigen Immunoassays sind sehr teuer, und der Analysebereich deckt die von den neuen Therapieleitlinien geforderten Konzentrationsbereiche nicht ab. Daher ist eine Verdünnung der Probe erforderlich, was die Analysenzeit verlängert und die Genauigkeit des Ergebnisses beeinträchtigen kann. Die klassische HPLC-Analytik von Immunsuppressiva ist mühsam in der Durchführung und greift die HPLC-Säulen stark an. Dank der Verbesserungen durch die LC-MS/MS-Technologie können große Transplantationszentren alle drei

Wirkstoffe in großem Umfang wirtschaftlich analysieren. Hier wurden nur einige der Anwendungsmöglichkeiten der Massenspektrometrie in klinischen Labors angesprochen. Es ist klar, dass diese Verfahren im Laufe des 21. Jahrhunderts eine zunehmend wichtige Rolle bei klinischen Untersuchungen spielen werden.

Literatur:

1. D. H. Chace et al., Rapid Diagnosis of Phenylketonuria by Quantitative Analysis for Phenylalanine and Tyrosine in Neonatal Blood Spots by Tandem Mass Spectrometry, *Clin. Chem.*, 1993; 39: 66–71.
2. D. S. Millington et al., Diagnosis of Metabolic Disease in Biological Mass Spectrometry: Present and Future, T. Matsuo (Hrsg.), Wiley, 1994: 559–579.
3. M. S. Rashed et al., Diagnosis of Inborn Errors of Metabolism from Blood Spots by Acylcarnitines and Amino Acids Profiling using Automated Electrospray Tandem Mass Spectrometry, *Pediatr. Res.*, 1995; 38: 324–331.
4. I. Mushtaq et al., Screening of Newborn Infants for Cholestatic Hepatobiliary Disease with Tandem Mass Spectrometry, *Br. Med. J.*, 1999; 319: 471–477.
5. B. G. Keevil et al., Rapid Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry Method for Routine Analysis of Cyclosporin A Over an Extended Concentration Range, *Clin. Chem.*, 2002; 48: 69–76.
6. B. G. Keevil et al., Simultaneous and Rapid Analysis of Cyclosporin A and Creatinine in Finger Prick Blood Samples Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry and Its Application in C2 Monitoring, *Ther. Drug Mon.*, 2002; 24: 757–767.
7. B. G. Keevil et al., Evaluation of a rapid micro-scale assay for Tacrolimus by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Ann. Clin. Biochem.*, 2002; 39: 487–492.
8. P. E. Wallemacq et al., High-Throughput Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometric Analysis of Sirolimus in Whole Blood, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2003; 24.

NEUE PRODUKTLINIE: 6+1 Multilevel Kalibratorsets



Die neuen Chromsystems-Kalibratorsets enthalten sechs Konzentrationsstufen (Levels) des betreffenden Kalibrators und eine Leerwertkontrolle (Blank Kontrolle). Die neue Linie wird eröffnet mit dem 6+1 Multilevel Kalibratorset Immunsuppressiva.

Dieses Produkt richtet sich vor allem an die Nutzer der LC-MS/MS im klinischen Routinelabor, wo es eine einfache und verlässliche Sechs-Punkt-Kalibration ermöglicht. Weitere Kalibratorsets mit unterschiedlichen Analyten werden folgen.

Oxidativer Stress

Untersuchung des oxidativen Status

Dipl.-Biol. Gabriel Erlenfeld, Chromsystems

Molekularer Sauerstoff O₂ ist essentiell für die zelluläre Atmung. In den Mitochondrien wird er im Zuge der Energiegewinnung zu Wasser reduziert (6O₂ + 24H⁺ + 24e⁻ → 12H₂O). Dabei werden 3–10 % des Sauerstoffs nicht zu Wasser metabolisiert, sondern in reaktive Sauerstoffspezies umgewandelt (ROS = reactive oxygen species). Bei diesen Sauerstoffspezies (siehe Tabelle 1) handelt es sich oft um freie Radikale, um Moleküle mit ungepaarten Elektronen, welche deshalb sehr reaktiv bzw. instabil sind. Im Gegensatz zum Luftsauerstoff O₂, der im Organismus kontrolliert reduziert wird und einen festen Platz in der Redoxkette der Mitochondrien hat, sind ROS schwer kontrollierbare Reaktionspartner und können durch die Oxidation von ungesättigten Fettsäuren, Proteinen oder DNA im menschlichen Gewebe schwerwiegende zelluläre Schäden hervorrufen, welche zu signifikanten Missfunktionen von Organen und Organsystemen führen können.

Radikalkettenreaktion, endogene und exogene Faktoren

Bei der Reaktion von freien Radikalen mit anderen Substanzen können als Reaktionsprodukte wiederum freie Radikale entstehen, die ebenfalls extrem reaktionsfähig sind und andere Moleküle angreifen. Es entsteht die „Radikalkettenreaktion“. Die Entstehung freier Radikale findet nicht nur im Mitochondrium statt, es gibt darüber hinaus endogene Faktoren, die dazu beitragen. Im Zuge der Immunreaktion durch Granulozyten und Makrophagen produzieren diese gezielt ROS (ROS = reactive oxygen species), welche durch Lyse der Zellen frei werden und Infektionen durch Bakterien, Protozoen, Parasiten etc. bekämpfen. Auch natürliche enzymatische Reaktionen von Oxidasen, Peroxidasen und Oxidoreduktasen erzeugen ROS als „Nebenprodukte“. Neben den endogenen Faktoren sind einige exogene Induktoren bekannt: UV- und Röntgenstrahlung wie auch die Belastung durch Ozon, toxische Chemikalien (Umweltgifte), Nikotin und Alkohol kann die Bildung von ROS fördern.

Physiologische antioxidative Ressourcen

Die endogen bewirkte Entstehung von freien Radikalen ist ein normaler physiologischer Prozess. Dementsprechend verfügt der Körper über ein Repertoire antioxidativer Ressourcen. Diese können in zwei Gruppen untergliedert werden (Tabelle 2): zum einen die Antioxidantien, welche durch die Fähigkeit, selbst leicht oxidiert zu werden, den oxidativen Druck von ROS auf andere Moleküle „abpuffern“ und zum anderen Enzyme, welche die Umwandlung von Oxidantien katalysieren und das Vorhandensein dieser freien Radikale reduzieren. Mit diesen Mitteln ist ein gesunder Organismus in der Lage, sich vor freien Radikalen zu schützen und den Zustand eines gesunden Metabolismus zu wahren.

Oxidativer Stress

Freie Radikale werden erst dann zur Gefahr, wenn das Gleichgewicht zwischen antioxidativen und oxidativen Prozessen sich zuungunsten der ersteren verschiebt. Die antioxidativen Maßnahmen können den oxidativen Druck dann nicht mehr genügend abfangen, so dass Fettsäuren, Proteine und DNA in zunehmendem Grade geschädigt werden. Dieser Zustand wird als oxidativer Stress bezeichnet. Im Laufe der Zeit können sich im ungünstigen Zusammenwirken von oxidativem Stress und weiteren Faktoren diese Schäden dann manifestieren als Gewebeerkrankung und degenerative Erkrankungen wie Herz- und Kreislauferkrankungen, Katarakt, Alzheimer-Demenz, Arteriosklerose, Arthritis, Rheuma/Allergien etc.

Messung des oxidativen Status

Um den Auswirkungen von oxidativem Stress schon prophylaktisch zu begegnen ist es notwendig, den oxidativen Status eines Organismus bzw. seiner Gewebe festzustellen. Dies trägt nicht nur bei Sportlern Bedeutung, welche durch einen z.T. stark erhöhten Metabolismus mehr Sauerstoff umsetzen und entsprechend mehr ROS produzieren, sondern grundsätzlich bei allen Menschen, deren Ernährung im besonderen und Lebensführung im allgemeinen die antioxidativen Ressourcen besonders belastet und deren Gewebe oxidativem Stress ausgesetzt ist.

Chromsystems-Produkte

Chromsystems bietet eine Palette von HPLC-Reagenzienkits zur Analytik unterschiedlicher Parameter für den oxidativen Stress an. Mit jeweils dafür entwickelten, spezifischen Testbesteckungen können Malondialdehyd oder

Vitamin E, Vitamin C oder β-Carotin, Coenzym Q₁₀ oder Glutathion bestimmt werden. Zu jedem Produkt ist eine passende HPLC-Säule erhältlich. Eine Auswahl an Kontrollen für die Qualitätssicherung komplettiert die Auswahl.

OXIDANTZEN		WIRKUNGEN
¹ O ₂	Singulett-sauerstoff	Hochreaktive Sauerstoffmoleküle (Reactive Oxygen Species, Abk. ROS), die freie Radikale bilden können.
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	
O ₂ ^{-•}	Superoxidanion	Freie Radikale, besitzen ein oder mehrere ungepaarte Elektronen, sehr reaktiv; können bei der Reaktion mit anderen Molekülen wiederum freie Radikale erzeugen (Radikalkettenreaktion).
HO•	Hydroxylradikal	
ROO•	Peroxyradikal	
RO•	Alkoxyradikal	
NO•	Stickstoffoxid	

Tabelle 1: Beispiele für Oxidantien.

ENDOGENES ANTIOXIDATIVES REPERTOIRE	WIRKUNGEN
ENZYMATISCH	
Se-Glutathion-Peroxidase (GSH-Px), selenhaltiges Enzym, katalysiert die Oxidation von reduziertem Glutathion (GSH) zu oxidiertem Glutathion (GSSG). Dabei werden H ₂ O ₂ oder organische Peroxide verbraucht.	ROOH + 2GSH → GSSG + ROH + H ₂ O
Katalase	2H ₂ O ₂ → 2H ₂ O + O ₂
Superoxiddismutase (SOD)	2O ₂ ^{-•} → H ₂ O ₂ + O ₂
NICHT-ENZYMATISCH	
Glutathion	Glutathionperoxidase, Antioxidans
Coenzym Q ₁₀	Radikalfänger lipophil
Liponsäure	Radikalfänger
Harnsäure	Harnsäure → Allantoin + CO ₂ (unter Beteiligung von Singulett-Sauerstoff oder Superoxid)
EXOGENES ANTIOXIDATIVES REPERTOIRE	
Vitamin C	Radikalfänger hydrophil, regeneriert Vit. E
Vitamin E	Radikalfänger lipophil
Sekundäre Pflanzenstoffe (Carotinoide, Flavonoide, Sulfide, Phenolsäuren, Phytoöstrogene)	divers
Verschiedene Lebensmittelzusätze	divers
β-Carotin	¹ O ₂ -Fänger

Tabelle 2: Beispiele für das endogene und exogene (von außen erworbene) antioxidative Repertoire.

β -Carotin – mehr als nur ein Antioxidans

Dr. Hans-Ulrich Koch, Institut für Laboratoriumsmedizin Berlin

β -Carotin ist eins von über 500 in der Natur vorkommenden Carotinoiden. Es ist ein Pflanzenfarbstoff, der eine Sonderstellung einnimmt, da er eine Vorstufe des Retinols, dem eigentlichen Vitamin A, ist. Als fettlösliche Substanz wird β -Carotin je nach Fettanteil im Dünndarm bis zu ca. 50 % resorbiert und innerhalb der Mucosa mit Hilfe der β -Carotin-15,15'-dioxygenase unter Mitwirkung von molekularem Sauerstoff in Retinol gespalten, der andere Teil gelangt in die Leber und in das Fettgewebe und wird dort gespeichert. Je nach Bedarf wird β -Carotin in den Depots aktiviert und steuert somit einer übermäßigen Vitamin A-Zufuhr gegen.

Neben der Provitamin A-Funktion zeigt β -Carotin weitere protektive Eigenschaften: Es steigert die Aktivität der B- und T-Lymphozyten, die für die zelluläre Immunantwort verantwortlich sind. Es ist ein potentieller Radikalfänger mit Wirkort in der lipidhaltigen Zellmembran (zusammen mit Coenzym Q₁₀ und Vitamin E), in der es hauptsächlich den für die Zelle äußerst schädlichen Singulett-Sauerstoff inaktiviert und nicht zuletzt bietet es einen Schutz vor Schäden durch UV-Licht. Der neue Richtwert für die tägliche Versorgung mit β -Carotin wird mit 2 bis 4 mg angegeben. Allerdings zeigten bereits frühere Studien, dass es bei extremer zusätzlicher Einnahme von β -Carotin bei Rauchern zu einem erhöhten Krebsrisiko kommt.

Auch soll hier das Wachstum von Darmpolypen stimuliert werden. Aus diesem Grund hat das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) vorgesehen, die Fach- u. Gebrauchsinformationen für Arzneimittel entsprechend zu ergänzen und auf das erhöhte Krebsrisiko bei Rauchern hinzuweisen. Eine abschließende Ein-

schätzung dieser Risiken steht allerdings noch aus.

Auf Grund des großen Wirkungsspektrums ist es daher empfehlenswert, die Konzentration von β -Carotin zu kontrollieren. In den letzten Jahren wurde hauptsächlich die Bestimmung von β -Carotin im Rahmen eines „antioxidativen Status“ empfohlen. Doch existieren seit langem Vorschläge, diesen Parameter für die Erfassung von intestinalen Störungen, insbesondere

Steatorrhoen, einzusetzen. Hier wird die Eigenschaft der Fettlöslichkeit des β -Carotins ausgenutzt.

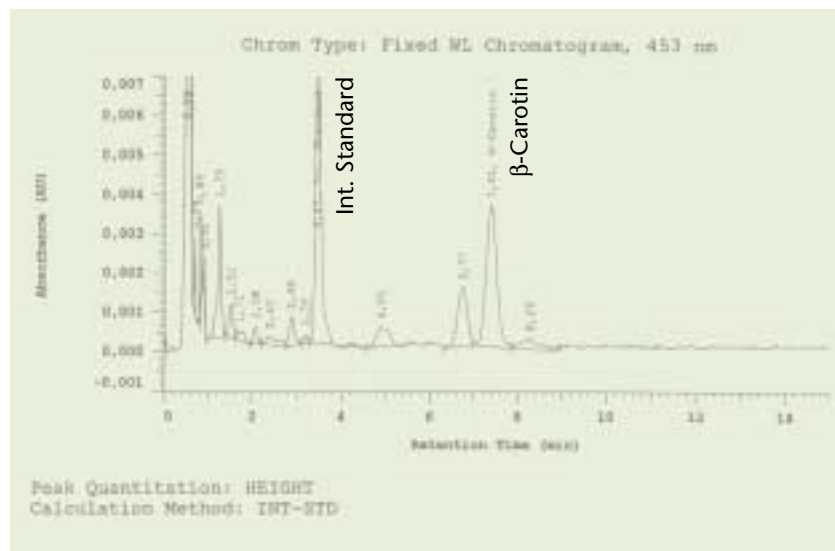
Störungen der Fettresorption (einheimische Sprue, Morbus Whipple, Kurzdarm-Syndrom, Laktoseintoleranz u.a.) führen zu einer Anreicherung von Lipiden im Darm und damit

zur β -Carotin-Konzentration. Daher kann in vielen Fällen die unangenehme und methodisch aufwendige Stuhlfett-Bestimmung nach van de Kamer im dreimal 24-Std.-Sammelstuhl durch die β -Carotin-Bestimmung mittels der schnelleren und zuverlässigeren HPLC-Methode ersetzt werden.

Nicht unproblematisch ist hingegen die Festlegung des Referenzbereiches. Während photometrische Assays nicht nur das alleinige β -Carotin, sondern in unterschiedlichem Maße auch andere Carotinoide erfassen, zeigt sich, dass mittels HPLC exakt das β -Carotin nachgewiesen wird. Eingesetzt werden können Serum oder Plasma. Als Referenzbereich für diese Methode gelten momentan 150–1250 ng/ml. Hier sollten aber weitere Messwerterhebungen erfolgen, um den Referenzbereich zu verifizieren.

Die Abbildung zeigt das Chromatogramm von einer Patientenprobe mit normwertiger β -Carotin-Konzentration. Eingesetzt wurde das Reagenzienkit der Fa. Chromsystems, München. Die Probenvorbereitung besteht aus einer schnellen kombinierten Fällung und Extraktion. Die anschließende chromatografische Bestimmung erfolgt auf einem isokratischen HPLC-System mit UV/VIS-Detektion.

Literaturhinweise werden auf Wunsch genannt.



verbunden zu einer erhöhten Löslichkeit von β -Carotin und anderen fettlöslichen Vitaminen. Bei einer Malabsorption von Fetten, aber auch bei Maldigestion (verminderte Sekretion von Verdauungsenzymen, z. B. bei der exokrinen Pankreasinsuffizienz) kommt es bereits nach 1 Woche zu einer beginnenden Erniedrigung der β -Carotin-Konzentration, die sich im Serum sehr gut nachweisen läßt. Der Grad der Fett-Malabsorption oder -Maldigestion verhält sich reziprok

Chromsystems-Analytik für Parameter des oxidativen Stress



Vitamine A und E, Best.-Nr. 34000

β -Carotin, Best.-Nr. 32000

Coenzym Q₁₀, Best.-Nr. 68000

Glutathion, Best.-Nr. 66000

Vitamin C, Best.-Nr. 65000

Malondialdehyd,
Best.-Nr. 67000

Anwendungsmöglichkeiten der HPLC-Analytik

Vitamin B₁- und B₂-Bestimmung in Bier

Dipl.-Ing. Martina Schütz, Dipl.-Ing. Ralf Mezger, Univ.-Prof. Dr.-Ing. Werner Back,
Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I, Wissenschaftszentrum für Ernährung, Landnutzung und Umwelt,
Technische Universität München-Weihenstephan

Vitamine im Brauprozess

Gerste und Malz sind reich an Vitaminen, die in den lebenden Geweben des Keimlings und der Aleuronschicht lokalisiert sind und als prosthetische Gruppe am Aufbau von Enzymen beteiligt sind. Von den Vitaminen des B-Komplexes ist Vitamin B₁ in der Gerste in einer Menge von 1,2–7,4 mg/kg Trs. vorhanden. Während der Keimung wird die Konzentration von Vitamin B₂ auf den 1,5fachen Gehalt der Gerste gesteigert. Dies entspricht einer Konzentration von 1–3,7 mg/kg Malz-Trs.

Neben einer Vielzahl von anderen organischen Wirkstoffen sind auch Vitamine für die Hefe während der Vermehrung und Gärung erforderlich. Dazu gehören vorrangig Thiamin (Vitamin B₁), Riboflavin (Vitamin B₂), Niacin (Vitamin B₃), Panthotensäure (Vitamin B₅), Pyridoxin (Vitamin B₆), Biotin (Vitamin H) und Inosit. Die Funktion der organischen Wachstoffsstoffe ist es, als stoffwechselfunktionelle Bauglieder wichtiger Zellfermente zu wirken. Niacin ist ein Bestandteil des Coenzym I, welches im Zellstoffwechsel der Hefe als Wasserstoffüberträger im Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase-System fungiert. Niacin kommt dort in Form des Nikotinsäureamid vor. Panthotensäure ist ein Bestandteil des Coenzym A, welches eine Schlüsselposition im Kohlenhydratstoffwechsel einnimmt.

Pyridoxal-5'-phosphat ist die aktive Coenzymform des Pyridoxin und für den Aminosäurestoffwechsel von großer Bedeutung. Neben dem für das Hefewachstum wichtigen Biotin, das als Coenzym bei allen ATP-abhängigen Carboxylierungen dient, unterstützen auch Thiamin und Riboflavin als Wachstoffsstoffe den Hefestoffwechsel. Thiamin hat als Co-Ferment der Carboxylase große Bedeutung für den Kohlenstoffwechsel, Riboflavin ist als Flavinmononucleotid in den prosthetischen Gruppen von Dehydrogenasen an Oxydoreaktionsprozessen beteiligt. Bier enthält nur geringe Mengen an Thiamin. Die Brauereihefe ist jedoch reich an Thiamin, da sie dieses Vitamin sehr schnell aus der Würze aufnimmt. Hingegen befinden

sich in Bier größere Mengen an Riboflavin, da dieses Enzym, wie bereits beschrieben, durch den Mälzungsprozess beeinflusst wird und vor allem aus dem Malz kommt. Die Hefe nimmt während der Gärung nur wenig Riboflavin aus der Würze auf.

Riboflavin unterstützt eine Reihe von Prozessen, welche die Bialterung beschleunigen, da die Photooxidation von Riboflavin den Streckerabbau fördert. So tritt eine Vermehrung von flüchtigen Substanzen, unter ihnen eine größere Anzahl von längerkettigen, z. T. ungesättigten Carbonylen ein, die als Hauptursache für den Alterungsgeschmack des Bieres gelten. Analog zum Streckerabbau verläuft die Oxidation höherer Alkohole durch Lichteinfluss in Gegenwart von Riboflavin schneller. Die Oxidation der Seitenketten von Isohumulonen wird ebenfalls durch Licht und Anwesenheit von Riboflavin verstärkt. Die Photoaktivierung des Riboflavins führt so zur Bildung von Carbonylverbindungen und Mercaptanen. Bei der Bildung zahlreicher Mercaptane entsteht auch das 3-Methyl-2-Buten-1-Thiol (Lichtgeschmack). Jedoch bewirkt Riboflavin eine Verlangsamung der Autoxidation von längerkettigen Fettsäuren zu kürzerkettigen Aldehyden.

	Empfohlener Tagesbedarf RDA (recommended daily allowance)	Vorkommen in Pilsner Lagerbier	Bedarfsdeckung durch 1 Liter Pilsner Lagerbier in %
B ₁ Thiamin	1,0–1,3 mg	0,029 mg/l	2,3
B ₂ Riboflavin	1,2–1,5 mg	0,335 mg/l	20,9
B ₃ Niacin	13–17 mg	7,733 mg/l	46,9
B ₅ Panthotensäure	6 mg	1,490 mg/l	24,8
B ₆ Pyridoxin	1,2–1,6 mg	0,619 mg/l	36,4
B ₉ Folsäure	400 µg	86 µg/l	38,2
B ₁₂ Cobalamin	3–4 µg	0,82 µg/l	27,3

Abbildung 1: Täglich empfohlener Tagesbedarf eines durchschnittlichen Erwachsenen an B-Vitaminen und das Vorkommen in Pilsner Bier.

Mögliche Zusammenhänge zwischen den Vitamin B₁- und B₂-Gehalten in Würze und Bier und den biochemischen Prozessen der Bierbereitung

Zur Analyse von Vitamin B₁ und B₂ wurde ein Reagenzienkit zur Bestimmung der Vitamine B₁ und B₂ in Vollblut der Firma Chromsystems GmbH/München verwendet. Diese Firma ist darauf spezialisiert, Reagenzienkits für klinische Anwendungen herzustellen. Die Applikationen zeichnen sich durch eine einfache Durch-

föhrbarkeit sowie einen geringen apparativen Aufwand aus, da ein einfaches isokratisches HPLC-System genügt. Die Anwendung der Applikation wurde in Zusammenarbeit mit dieser Firma in Hinsicht auf die veränderte Probenmatrix (Maische, Würze und Bier) modifiziert.

Applikationen zur Übertragung weiterer verfügbarer Produkte, z. B. die Anpassung der HPLC-Analyse zur Bestimmung von Vitamin B₆, werden derzeit noch entwickelt.

Die Vitamin-Bestimmung ermöglicht die Konzentration an Vitamin B₁ und B₂ schnell und einfach zu erfassen und könnte dazu dienen, Vitamine als analytische Indikatoren im Bierbereitungsprozess zu nutzen.

Vitamin B₁

Thiamin ist ein farbloses, bitter schmeckendes, wasserlösliches und hitzeempfindliches Vitamin. Es besteht aus einem Pyrimidin-Ring, der über eine Methylengruppe mit einem Thiazol-Ring verbunden ist. Thiamin ist in Form des Thiaminpyrophosphats Coenzym des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes, der Transketolase, Phosphoketolase und 2-Oxoglutaratdehydrogenase und überträgt aktive Aldehydgruppen. Als Folge eines Thia-

minmangels sind die entsprechenden Enzymaktivitäten herabgesetzt. Thiamin wäre auf Grund seiner hitzelablen Eigenschaft auch als analytischer Indikator für thermische Einflüsse während des Bierbereitungsprozesses denkbar.

Zur Erfassung der thermischen Belastung könnte der Gehalt an Thiamin in den Prozessschritten Maischen und Würzekochen bzw. im Abfüllbereich zur Beurteilung der Hitzebelastung bei der Kurzzeiterhitzung bzw. Pasteurisation herangezogen werden.

Vitamin B₂

Riboflavin ist eine gelb fluoreszierende, in Wasser wenig lösliche, bitter schmeckende, photosensitive, aber hitzestabile Substanz. Wie alle B-Vitamine enthält es ein heterocyclisches Ringsystem, das Isoalloxazin-System. Riboflavin liegt in Lebensmitteln jedoch nur selten in freier Form, sondern meist als Flavinmononucleotid (Riboflavin-5-Phosphat/FMN) oder Flavinadenindinucleotid (FAD), d. h. als Flavoprotein an Proteine gebunden, vor. FMN und FAD sind auch die Derivate, die als Coenzyme von Oxidasen und Dehydrogenasen im Organismus wirken. Riboflavin könnte wegen seiner photosensitiven Eigenschaften als Indikator für Lichtbelastung eingesetzt werden. Da ein hoher Riboflavingehalt die Geschmacksstabilität des Bieres negativ beeinflusst, könnte Riboflavin ebenfalls als Indikator zur Kontrolle der Lagerbedingungen sowie zur Überprüfung des Einflusses der Gebindeart (z. B. Flaschenfarbe, Kunststoffart) herangezogen werden.

Übertragung klinischer Applikationen zur Bestimmung von B-Vitaminen in Würze und Bier

Um eine analytische Methode sinnvoll in den Produktionsprozess einsetzen zu können, muss diese jedoch gewisse Anforderungen erfüllen: Sie sollte schnell, einfach und reproduzierbar sein sowie eine hohe Analysengenauigkeit aufweisen. Die verlässliche Analytik von Vitaminen stellt eine große Herausforderung dar. Neben den modernen chromatographischen Methoden kommen auch heute noch die klassischen mikrobiologischen Wachstumstests zur Anwendung. Nur wenige Labore sind in der Lage eine akkreditierte Vitaminanalytik durchzuführen. Eine besondere Schwierigkeit stellt dabei die Vitaminanalytik mittels HPLC in Würze und Bier dar, da hier nur sehr geringe Konzentrationen vorliegen.

Zur Analyse von vitaminhaltigen alkoholfreien Getränken werden HPLC-Methoden erfolgreich eingesetzt. Diese lassen sich jedoch meist nicht auf die in Würze- und Biermatrix vorliegenden Konzentrationen übertragen. Anwendungen für sehr

geringe Konzentrationsbereiche sind vor allem im klinischen Bereich zu finden, da hier schnelle und exakte Analysen notwendig sind.

Zur Kalibrierung der Vitamine wurde eine 5-Punkt-Kalibrierung in einer Pilsner Würze (12 GG-%) bzw. Bier durchgeführt. Die Thiamin- bzw. Riboflavin-Reinsubstanzen wurden von der Firma Sigma-Aldrich/Deutschland bezogen. Der Variationskoeffizient der Analysen beträgt 3,1 % bei Vitamin B₁ und 1,8 % bei Vitamin B₂ (n=7).

Beispiel zur Anwendung der Vitamin-Analytik im Sudhausbereich

Nach Narziß stellt Thiamin, zusammen mit Niacin, das wichtigste Vitamin für den Gärprozess dar. Im Bereich der Kochung wurden bereits erste Untersuchungen zur Änderung der Vitamin B₁- und B₂-Konzentration während des Kochprozesses durchgeführt, um den thermischen Einfluss beim Kochprozess auf den Vitamin B₁- und B₂-Gehalt zu beschreiben. Es konnte bestätigt werden, dass die Vitamin B₁-Konzentration in Abhängigkeit der thermischen Belastung, in diesem Fall durch unterschiedliche Kochzeiten bei 100 °C, abnimmt. Inwieweit sich die Verfolgung der Vitamin B₁-Konzentration im Verlauf der Kochung zur Beurtei-

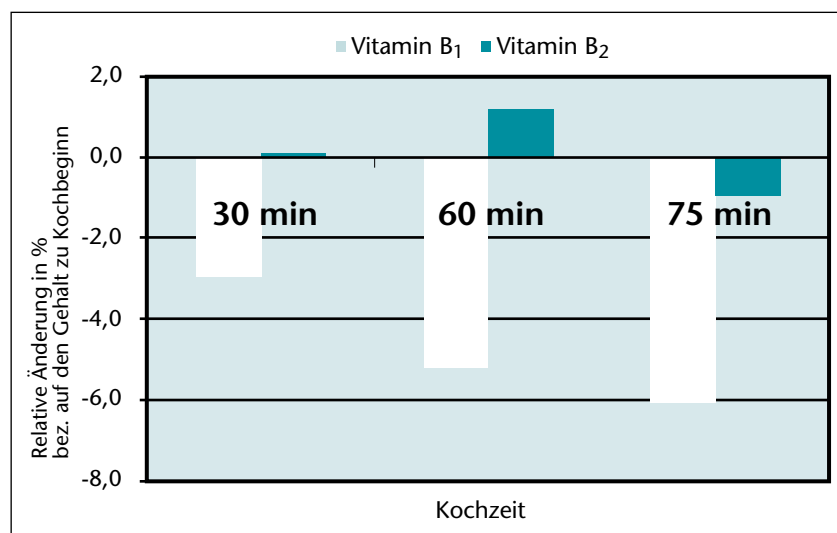


Abbildung 2: Änderung des Gehaltes an Vitamin B₁ und B₂ während des Kochprozesses durch den thermischen Einfluss.

lung der thermischen Belastung eignet, muss in weiteren Versuchen geklärt werden. Hingegen zeigt die Konzentration an Riboflavin, welches als relativ hitzestabiles Vitamin zu bezeichnen ist, im Rahmen der Analysengenauigkeit keine Veränderung während des Kochprozesses. Abbildung 2 zeigt die relative Änderung des Vitamin B₁- und B₂-Gehaltes während des Kochprozesses.

Zusammenfassung

In Zusammenarbeit mit der Firma Chromsystems GmbH ist es gelungen,

medizinische Applikationen zur Bestimmung von Vitamin B₁ und B₂ in Vollblut auf die Matrices Maische, Würze und Bier zu übertragen.

Die Anwendbarkeit dieser einfach durchführbaren und genauen Analytik ermöglicht, trotz der teilweise sehr geringen Konzentrationen, eine unkomplizierte HPLC-Analytik zur Bestimmung von Vitaminen im Brauprozess. Die B-Vitamine in der Würze sind einerseits als Hefewuchsstoffe von großer Bedeutung, andererseits können Vitamine, wie z. B. das Riboflavin, auch Einfluss auf die Ge-

schmackstabilität des Bieres nehmen. Weiter könnten Vitamine auf Grund ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften auch als analytische Indikatoren, z. B. zur Beurteilung der thermischen Belastung, im Bierbereitungsprozess eingesetzt werden. Dies ermöglicht zahlreiche interessante Anwendungsgebiete der Vitamin-Analytik im Brauprozess.

Wir danken der Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, München, für die Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Ausblick

Im Rahmen eines anlaufenden Forschungsprojektes am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei I sollen weitergehende Untersuchungen im Bereich der Vitamin-Analytik erfolgen. Ziel ist es, weitere Erkenntnisse über den Verlauf der Vitamine im Brauprozess zu erhalten. Dabei sollen technologische Einflussmöglichkeiten herausgearbeitet und Anreicherungstechnologien konform dem bayrischen Reinheitsgebot entwickelt werden.

Dieser Artikel ist gekürzt. Der Originalartikel wurde in der Zeitschrift „Der Weihenstephaner“, Ausgabe 1/2005, veröffentlicht. Literaturhinweise werden auf Wunsch genannt.

Chromsystems Weiterentwicklungen:

VMA, HVA, 5-HIAA im Urin (Best.-Nr. 1000/B)

Neue Mobile Phase Best.-Nr. 1011

Ersetzt bisherige Mobile Phase Best.-Nr. 1001

- > **Verbesserte Trennung von VMA und Internem Standard, Mobile Phase ist wie gewohnt rezirkulierbar**
- > **Minimale Deaktivierung der ECD-Arbeits Elektrode**
- > **Kürzere Laufzeiten des Chromatogramms**

Das Probenvorbereitungsschema bleibt unverändert, die bisherige HPLC-Trennsäule bleibt bestehen.

Homocystein im Plasma (Best.-Nr. 45000)

Neuer Interner Standard Best.-Nr 45099

Ersetzt früheren Int. Standard Best.-Nr. 45005

- > **Optimale Reproduzierbarkeit**
- > **Reduzierte Interferenzen bei Proben von Dialysepatienten**
- > **Lange Säulenstandzeiten**

Es ist zwingend notwendig, den neuen Internen Standard Best.-Nr. 45099 nur mit der Mobil Phase Best.-Nr. 39001 zu benutzen.

Die bisherige Mobile Phase Best.-Nr. 45001 wird durch Best.-Nr. 39001 ersetzt. Die bisherige HPLC-Trennsäule bleibt bestehen.

Einblicke Chromsystems

Teil 2: Die Abteilung Auftragsbearbeitung



Liebe Leserinnen und Leser, mit unserer neuen Artikelreihe „Einblicke Chromsystems“ wollen wir Ihnen Chromsystems und auch einiges von den Vorgängen in unserer Firma näher bringen. In jeder Ausgabe des DIALOG wird eine unserer Abteilungen näher betrachtet werden, von der Auftragsbearbeitung, Versand/Lager, der Forschung und Entwicklung, über die Produktion und das Qualitätsmanagement bis zu Vertrieb und Marketing. Kurzum, wir laden Sie ein zu einem Rundgang durch unsere Firma.

Willkommen bei Chromsystems.

Die Abteilung Auftragsbearbeitung

Die Abteilung Customer Services ist jene Zentrale, die Aufträge, welche uns auf diversen Wegen erreichen, entgegennimmt, elektronisch erfasst und für die weitere Abwicklung des Auftrages verantwortlich zeichnet. Neben einer Vielzahl unterschiedlicher Ausführbestimmungen müssen die Sachbearbeiter die Produkte auch in ihren Details kennen; vorschriftsgemäß absolvierten sie daher Schu-

lungen zur Abfertigung von Lieferungen mit Gefahrgutanteil. Obwohl es sich bei letzteren meistens um verschwindend geringe Mengen handelt, muss zu deren korrekter Deklaration dennoch eine beachtliche Anzahl von Formularen fachmännisch ausgefüllt werden. Schließlich übernimmt das Customer Services Team auch die Rolle der Telefonzentrale. Jeden Tag erhalten viele Anrufer Antworten auf ihre Fragen: technische Belange, Lieferzeiten, etc.

Margit Paschiller leitet die Auftragsbearbeitung seit Mitte 2003. Sie ist eine erfahrene Industriekaufrau, die ihre vielfältigen Erfahrungen vor allem im Abwickeln von Exportaufträgen gesammelt hat. Eine der täglichen Herausforderungen sieht Frau Paschiller darin, den Überblick über die sehr diversen Sonderwünsche zu bewahren, welche Chromsystems seinen Kunden einräumt. Anders als es in dieser Sparte üblich ist, ermöglicht es Chromsystems, maßgeschneiderte Sonderkonfigurationen und Sondermengen routinemäßig zu bestellen. In Anbetracht der regen Nutzung dieser Möglichkeit in dutzenden verschiedenen Ländern, kommt jeder Mitarbeiterin eine große

Verantwortung zu. Vor allem in den Exportabläufen ist ein enger Kontakt zu den Kolleginnen und Kollegen vom Vertrieb wichtig, da oft Einzelheiten bestellungsspezifisch vereinbart werden. Eine ähnlich anspruchsvolle Stellung nehmen die Gefahrgutdeklarationen ein. Trotz einheitlicher Bestimmungen werden die Anforderungen von unterschiedlichen Transportunternehmen verschieden ausgelegt. Es kommt zuweilen darauf an, wo ein Aufkleber platziert ist, ob ein Paket zugestellt wird oder nicht, das ist kein trivialer Aspekt.

Als Schnittstelle zwischen der Firma und den Speditionen ist die Auftragsbearbeitung dafür verantwortlich, Pünktlichkeit und Lieferqualität zu gewährleisten. Nach der erfolgten Produktkonfektionierung im Lager stellt die Auftragsbearbeitung die Lieferpapiere und die Rechnung aus. In der Regel ist der Ablauf mit der Abholung der Lieferung beendet.

Wenn Sie das nächste Mal bei der Chromsystems-Durchwahl - 0 anrufen, wissen Sie jetzt, wer dahinter steckt.

Termine

2005 ist Chromsystems noch auf folgenden nationalen und internationalen Messen vertreten:

- > 26.–29. Juni
HOMOCYSTEINE 2005, Mailand, Italien
- > 26.–28. Juli
AACC Clinical Lab Expo, Orlando, USA
- > 1.–3. September
ADMA-Konferenz, Mersin, TR
- > 6.–8. September
HOSPIMEDICA, Bangkok, THA
- > 14.–16. September
Sportmedizin-Kongress, Hamburg
- > 4.–7. Oktober
AACB Konferenz, Sydney, AUS
- > 6.–8. Oktober
DGKL, Jena
- > 11.–14. Oktober
MedLab 2005, Rom, Italien
- > 16.–19. November
Medica, Messe Düsseldorf
- > 24.–25. November
Journé Internationales de Toxicologie Hospitalière, Liège, Belgien

Impressum

Herausgeber:
Chromsystems
Instruments & Chemicals GmbH
Heimburgstrasse 3
81243 München

Telefon: +49 (0) 89 189 30 200
Telefax: +49 (0) 89 189 30 299
eMail: mailbox@chromsystems.de

Redaktion:
Gabriel Erlenfeld

Gestaltung:
lengnick-design

Druck:
OrtmannTeam, München

Ausgabe Juni 2005