

Entwicklung und Erprobung von HPLC-basierten Methoden für das
Therapeutische Drug-Monitoring von Betalaktam-Antibiotika,
Linezolid und Tigecyclin – Bestimmung von freien und totalen
Konzentrationen im Plasma von Intensivpatienten



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät Chemie und Pharmazie
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Alexander Ludwig Kratzer

aus Vilsbiburg

2015

Die Arbeit wurde angeleitet von: Herr Prof. Dr. Frieder Kees

Dissertation eingereicht am: 22.12.2015

Tag der mündlichen Prüfung: 17.03.2016

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. Sigurd Elz

1. Berichterstatter:

Herr Prof. Dr. Frieder Kees

2. Berichterstatter:

Herr Prof. Dr. Jörg Heilmann

3. Prüfer:

Herr Prof. Dr. Jens Schlossmann

Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
2	EINLEITUNG	9
2.1	ANTIBIOTIKATHERAPIE IN DER INTENSIVMEDIZIN	9
2.2	PHARMAKOKINETISCHE VERÄNDERUNGEN BEI SEPTISCHEN PATIENTEN	10
2.2.1	<i>Veränderung des Verteilungsvolumens</i>	10
2.2.2	<i>Veränderung der Clearance</i>	11
2.2.3	<i>Veränderung der Proteinbindung</i>	12
2.2.4	<i>Bedeutung für die Klinische Routine</i>	12
2.3	THERAPEUTISCHES DRUG-MONITORING VON ANTIINFEKTIVA BEI INTENSIVPATIENTEN	13
2.3.1	<i>Zielparameter für die Plasmakonzentrationsbestimmung</i>	14
2.3.2	<i>In der vorliegenden Arbeit untersuchte Antibiotika</i>	16
2.3.3	<i>Betalaktam-Antibiotika</i>	16
2.3.4	<i>Linezolid und Tigecyclin</i>	18
2.3.5	<i>Analytik</i>	18
2.3.6	<i>Bestimmung der freien Konzentration</i>	19
2.4	ZIELSETZUNG	22
3	MATERIALIEN UND METHODEN	23
3.1	LABORGERÄTE.....	23
3.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	24
3.3	SUBSTANZEN	25
3.4	REAGENZIEN UND CHEMIKALIEN	27
3.5	LÖSUNGEN UND VERDÜNNUNGEN	27
3.5.1	<i>Puffer</i>	27
3.5.2	<i>Lösungen zur Eiweißfällung</i>	28
3.5.3	<i>Sonstige Lösungen</i>	28
3.5.4	<i>Probenmatrix</i>	29
3.5.5	<i>Stammlösungen</i>	29
3.5.6	<i>Standards und Kontrollen</i>	30
3.5.7	<i>Referenzstandard</i>	31
3.6	CHROMATOGRAPHISCHES TRENNSYSTEM	31
3.7	METHODENVALIDIERUNG	33
3.7.1	<i>Nachweisgrenze on column (Limit of Detection, LOD)</i>	33
3.7.2	<i>Bestimmungsgrenze (Limit of Quantitation, LOQ)</i>	33
3.7.3	<i>Selektivität (Selectivity)</i>	34

3.7.4	<i>Linearität (Linearity)</i>	34
3.7.5	<i>Richtigkeit (Accuracy)</i>	35
3.7.6	<i>Präzision (Precision)</i>	35
3.7.7	<i>Wiederfindung (Recovery)</i>	36
3.7.8	<i>Stabilität (Stability)</i>	36
3.8	BESTIMMUNG DER TOTALEN KONZENTRATION	37
3.8.1	<i>Probenvorbereitung Betalaktame</i>	37
3.8.2	<i>Probenvorbereitung Linezolid</i>	37
3.8.3	<i>Probenvorbereitung Tigecyclin</i>	38
3.8.4	<i>Quantifizierung</i>	38
3.9	BESTIMMUNG DER FREIEN KONZENTRATION	39
3.9.1	<i>Wechselwirkungen mit der Ultrafiltrationseinheit</i>	39
3.9.2	<i>Probenvorbereitung</i>	40
3.9.3	<i>Quantifizierung</i>	40
3.9.4	<i>Proteinbestimmung</i>	41
3.10	UNTERSUCHUNGEN ZUR ABHÄNGIGKEIT DER PROTEINBINDUNG VON DEN EXPERIMENTELLEN BEDINGUNGEN	43
3.10.1	<i>Abhängigkeit der Proteinbindung von der Temperatur</i>	43
3.10.2	<i>Abhängigkeit der Proteinbindung vom pH-Wert</i>	44
3.10.3	<i>Abhängigkeit der Proteinbindung von der Zentrifugalkraft</i>	44
3.10.4	<i>Bindungsversuche zu Tigecyclin in Albuminlösung</i>	45
3.11	UNTERSUCHUNGEN AN PATIENTEN.....	45
3.11.1	<i>Entnahme, Handhabung und Lagerung der Blutproben</i>	46
3.11.2	<i>Medikation</i>	46
3.11.3	<i>Pharmakokinetische Berechnungen</i>	47
3.11.4	<i>Statistische Auswertung</i>	47
4	ERGEBNISSE	48
4.1	CHROMATOGRAPHISCHES TRENNSYSTEM	48
4.1.1	<i>Retentionsverhalten der Antibiotika</i>	48
4.1.2	<i>Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) und Bestimmungsgrenze (Limit of Quantitation, LOQ)</i>	50
4.2	BESTIMMUNG DER TOTALEN KONZENTRATIONEN VON ANTIBIOTIKA IN PLASMA ODER SERUM.....	52
4.2.1	<i>Methodenvalidierung</i>	52
4.3	BESTIMMUNG DER FREIEN KONZENTRATION	61
4.3.1	<i>Wechselwirkungen mit der Ultrafiltrationseinheit</i>	62
4.3.2	<i>Integrität der Ultrafiltrationsmembran</i>	65
4.4	STABILITÄT	65

4.5	ABHÄNGIGKEIT DER FREIEN KONZENTRATION VON DEN EXPERIMENTELLEN BEDINGUNGEN	69
4.5.1	<i>Betalaktam-Antibiotika</i>	69
4.5.2	<i>Linezolid</i>	72
4.5.3	<i>Tigecyclin</i>	73
4.6	BESTIMMUNG DER ANTIBIOTIKA IM PLASMA VON INTENSIVPATIENTEN.....	76
4.6.1	<i>Selektivität des chromatographischen Trennsystems</i>	76
4.6.2	<i>Konzentrationen der Antibiotika bei Intensivpatienten unter Routinetherapie</i>	78
5	DISKUSSION	84
5.1	CHROMATOGRAPHIE	84
5.1.1	<i>Trennsystem</i>	84
5.2	BESTIMMUNG DER TOTALEN KONZENTRATION	86
5.3	VALIDIERUNG	87
5.4	BESTIMMUNG DER FREIEN KONZENTRATION DURCH ULTRAFILTRATION	89
5.4.1	<i>Auswahl der Ultrafiltrationseinheit</i>	91
5.4.2	<i>Untersuchungen zu Wechselwirkungen der Antibiotika mit der Ultrafiltrationseinheit</i>	91
5.4.3	<i>Integrität der Ultrafiltrationsmembran</i>	94
5.5	ABHÄNGIGKEIT DER FREIEN KONZENTRATION VON DEN EXPERIMENTELLEN BEDINGUNGEN	95
5.5.1	<i>pH-Wert</i>	95
5.5.2	<i>Temperatur</i>	97
5.5.3	<i>Zentrifugalkraft</i>	97
5.5.4	<i>Puffersystem</i>	98
5.5.5	<i>Experimentelle Bedingungen für die Routinemethode zur Bestimmung der freien Konzentration</i>	100
5.6	BESTIMMUNG DER ANTIBIOTIKA IM PLASMA VON INTENSIVPATIENTEN.....	101
5.6.1	<i>Analytik</i>	102
5.6.2	<i>Klinische Ergebnisse</i>	103
6	ZUSAMMENFASSUNG	107
7	LITERATURVERZEICHNIS	109
8	ANHANG	122
8.1	PUBLIKATIONEN	122
8.2	POSTERBEITRÄGE.....	123
8.3	VORTRÄGE	124
8.4	DANKSAGUNG	125

1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Begriff
ABS	Antibiotic Stewardship
ARC	Augmented Renal Clearance
AU	Amicon ultra
AUC _{24h}	Fläche unter der 24 h Konzentrations-Zeit-Kurve
BSA	Bovines Serum-Albumin
CAZ	Ceftazidim
CF	Centrifree
CEZ	Cefazolin
Cl	Clearance
C _{max}	Spitzenkonzentration
C _{min}	Minimalkonzentration
CRO	Ceftriaxon
CV	Coefficient of variation (Variationskoeffizient)
CV _{inter}	Inter-Assay-Präzision
CV _{intra}	Intra-Assay-Präzision
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	European Medicines Agency
EoS	Tigecyclin-Eluent ohne SOS
ETP	Ertapenem
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	Food and Drug Administration
HSA	Humanes Serum-Albumin
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HWZ	Halbwertszeit
iS	Interner Standard
LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
LOQ	Limit of Quantitation (Bestimmungsgrenze)
LZD	Linezolid
MC	Microcon

MeCN	Acetonitril
MEM	Meropenem
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht in g/mol
MIN	Minocyclin
MHK	Minimale Hemm-Konzentration
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
n.d.	Not done (nicht durchgeführt)
NS	Nanosep omega
NSB	nicht-spezifische Bindung
NW	Nominalwert
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PC	Polycarbonat
PCA	Perchlorsäure
PES	Polyethersulfon
PIP	Piperacillin
PP	Polypropylen
PPB	Plasmaproteinbindung
QSIInf	Qualitätssicherung der Diagnostik und Therapie von akuten Infektionen in der Intensivmedizin
r	Korrelationskoeffizient
r ²	Bestimmtheitsmaß
RC	Regenerierte Cellulose
RCF	Relative Centrifugal Force (Zentrifugalbeschleunigung)
RP	Reversed Phase
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SOS	Sodium 1-octanesulfonate (Natrium-Octansulfonat)
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
StBd	Styrol-Butadien-Copolymer
T	Dosierungsintervall (Tau)
TCA	Trichloressigsäure

TDM	Therapeutisches Drug-Monitoring
TGC	Tigecyclin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TW	Tween
UV	Ultraviolett
VC	Vivacon
VS	Vivaspin

2 Einleitung

2.1 Antibiotikatherapie in der Intensivmedizin

Infektionen stellen auch in der modernen Intensivmedizin eine zentrale Herausforderung für den Kliniker dar. In einer großen internationalen Studie zu Prävalenz und Outcome von Infektionen an über 14000 erwachsenen Patienten auf Intensivstationen konnte gezeigt werden, dass ca. 50% der intensivmedizinisch behandelten Patienten an einer Infektion durch Bakterien oder Pilze erkrankt waren [1]. Der große Einfluss dieser Infektionen auf das Behandlungsergebnis der Patienten zeigte sich mit einer Erhöhung der Krankenhaussterblichkeit um 100% gegenüber dem Wert für die Patienten ohne nachgewiesene bakterielle oder mykotische Infektion [1]. Insbesondere Patienten, die im Zusammenhang mit ihrer Infektion ein septisches Krankheitsbild entwickeln sind von einer hohen Mortalität ihrer Erkrankung von bis zu 80% betroffen [2]. Eine multizentrische klinische Studie an 3147 erwachsenen Intensivpatienten zur Häufigkeit der Sepsis im Intensivbereich ergab, dass ca. 37% der untersuchten Intensivpatienten an einer Sepsis litten [3]. Neben einer evtl. möglichen chirurgischen Sanierung des Infektionsherds bildet die Verabreichung von Antibiotika die zentrale Säule der antiinfektiven Therapie. So ist es angesichts der Häufigkeit von bakteriellen und mykotischen Infektionen im Intensivbereich nicht verwunderlich, dass ca. 70% aller Intensivpatienten eine antibiotische Therapie erhalten [1]. Antibiotika stellen damit die in der Intensivmedizin am häufigsten eingesetzten Arzneistoffe dar [4].

In klinischen Studien wurde gezeigt, dass die frühzeitige, adäquate Antibiotikatherapie die Sterblichkeit von Intensivpatienten mit bakteriellen Infektionen und Mykosen reduziert [5,6]. So lag beispielsweise in einer Studie an 2000 intensivmedizinisch behandelten erwachsenen Patienten die Mortalität bei inadäquater Behandlung einer vorliegenden Infektion mit 52,1% ca. doppelt so hoch als bei Verabreichung einer adäquaten antiinfektiven Therapie, wo sich eine Mortalität von 23,5% ergab [5]. Eine hinreichend dosierte antibiotische Therapie kann zudem die Entwicklung resistenter Erreger unterdrücken [7]. Trotz dieses hohen Stellenwerts der antibiotischen Therapie im Intensivbereich, werden Antibiotika im Rahmen der Zulassungsstudien kaum an Intensivpatienten untersucht. Die in den Fachinformationen empfohlenen Dosierungen werden überwiegend an gesunden Probanden und "Normalpatienten" ermittelt. Allerdings werden bei Intensivpatienten, insbesondere bei Sepsis, mit Standarddosierungen nicht dieselben Wirkspiegel erreicht wie bei den ausgewählten Probanden, da sich die Pharmakokinetik eines Arzneistoffs durch das septische Krankheitsbild verändert [8]. So können Standarddosierungen bei Sepsispatienten zu Therapieversagen durch zu niedrige Spiegel oder zu toxischen Nebenwirkungen durch zu hohe Spiegel führen [9]. Strategien zur Optimierung und Individualisierung der Dosierung von Antibiotika finden daher im Intensivbereich vermehrt Beachtung [10].

2.2 Pharmakokinetische Veränderungen bei septischen Patienten

Die pharmakokinetischen Veränderungen beim Intensivpatienten sind bei Vorliegen des septischen Krankheitsbildes besonders ausgeprägt [11]. Die deutsche Sepsisgesellschaft definiert die Sepsis als eine komplexe, systemische, inflammatorische Wirtsreaktion auf eine Infektion [12]. Der Sepsis liegt eine generalisierte hyperinflammatorische Reaktion des Körpers auf eine mikrobielle Infektion zugrunde [12]. Die Vorstufe wird als SIRS (systemic inflammatory response syndrome) bezeichnet, wenn mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt sind:

- Körpertemperatur $\geq 38^{\circ}\text{C}$ oder $\leq 36^{\circ}\text{C}$
- Herzfrequenz ≥ 90 Schläge pro min
- Atemfrequenz ≥ 90 pro min
- Leukozytenwerte $\geq 12000/\text{mm}^3$ oder $\leq 4000/\text{mm}^3$ oder mehr als 10% unreife Formen

Von einer Sepsis spricht der Kliniker, wenn zusätzlich zum SIRS eine Infektion nachgewiesen wurde. Treten Organdysfunktionen bzw. Organversagen wie z.B. ein Nierenversagen auf, handelt es sich um eine schwere Sepsis. Kommt es zusätzlich auch noch zu einer ausgeprägten Hypotonie mit einem systolischen Blutdruck ≤ 90 mm Hg, die den Einsatz von Vasopressoren wie z.B. Noradrenalin erfordert, liegt ein septischer Schock vor. Dieser Zustand stellt die stärkste Ausprägung des septischen Krankheitsbildes dar [12].

Ursächlich für das Krankheitsgeschehen der Sepsis ist eine Aktivierung immunkompetenter Zellen, die die Freisetzung einer Vielzahl von Mediatoren bewirken. In der Folge kommt es zu einer Schädigung des Gefäßendothels, einer Kardiomyopathie sowie Störungen der Blutgerinnung und des endokrinen Systems. Ausgeprägte Zirkulationsstörungen führen zu einer Minderperfusion verschiedener Organe und begünstigen die Entstehung eines Multiorganversagens [13]. Die Sepsis stellt eine sehr komplexe Erkrankung dar, deren Schweregrad und Verlauf individuell stark variieren. Folglich zeigt auch die Pharmakokinetik von Arzneimitteln eine entsprechende Variabilität, wie die folgenden Ausführungen erläutern.

2.2.1 Veränderung des Verteilungsvolumens

Im Rahmen der Sepsis kommt es zu einer Freisetzung verschiedener Endotoxine aus dem Infektionserreger, die die Bildung endogener Mediatoren nach sich zieht wie z.B. Interleukine und Tumornekrosefaktor. Diese Signalmoleküle beeinflussen das Endothel der Blutgefäße, was zu Vasodilatation sowie einer erhöhten Permeabilität der Gefäße führt [14,15]. Dadurch kommt es zu einer starken Verlagerung von Flüssigkeit aus dem intravaskulären Raum ins Interstitium, ein Vorgang der im medizinischen Fachjargon als sogenanntes *capillary leak syndrome* bezeichnet wird [16,17].

Die ausgeprägte Ödembildung im Interstitium führt zu einer Erhöhung des Verteilungsvolumens insbesondere hydrophiler Antibiotika wie z.B. Aminoglycosiden und

Betalaktamen und damit zu erniedrigten Plasmaspiegeln nach der ersten Dosis [18,19]. Wegen der ausgeprägten Hypotension durch die sepsisbedingte Vasodilatation werden in der Regel große Mengen an Volumenersatz in Form von kristalloiden Infusionslösungen wie z.B. NaCl 0,9% verabreicht. Dadurch wird das Verteilungsvolumen von Arzneistoffen zusätzlich erhöht [20].

2.2.2 Veränderung der Clearance

In der Initialphase der Sepsis kommt es bei Patienten ohne Vorschädigung der Niere häufig zu einer verstärkten Durchblutung der Nieren in Folge einer Erhöhung des Herzzeitvolumens. Dieses Phänomen wird in der medizinischen Literatur als *augmented renal clearance* (ARC) bezeichnet [21]. Durch ARC kommt es zu einer vermehrten Ausscheidung renal eliminerter Arzneistoffe wie z.B. der Betalaktame und Aminoglycoside [22–24]. Die beschleunigte Ausscheidung kann bei diesen hydrophilen Antibiotika zu subtherapeutischen Plasmakonzentrationen führen [21].

Wie oben beschrieben kann es im Verlauf des septischen Krankheitsgeschehens auch zu einer Minderperfusion von Organen kommen. Sind die Nieren betroffen, kann dies zu Nierenfunktionsstörungen bis zum kompletten Nierenversagen führen. Das Vorliegen eines septischen Schocks ist ein Risikofaktor für die Entwicklung eines Nierenversagens [25]. Die Einschränkung der Nierenfunktion führt zur verlangsamten Ausscheidung renal eliminerter Antibiotika. In der Folge können daraus supratherapeutische Plasmakonzentrationen und evtl. toxische Nebenwirkungen resultieren [26]. So konnte eine Studie an 235 erwachsenen Intensivpatienten unter Therapie mit Vancomycin zeigen, dass die Plasmakonzentrationen des Vancomycin am Ende des Dosisintervalls bei Patienten mit Nierenfunktionsstörungen mit einem Wert von $20,2 \pm 7,1 \mu\text{g/ml}$ signifikant höher lagen als bei Patienten ohne Einschränkung der Nierenfunktion, wo sich ein Wert von $13,7 \pm 8,3 \mu\text{g/ml}$ ergab [27]. Plasmakonzentrationen von über $20 \mu\text{g/ml}$ am Ende des Dosisintervalls waren zudem mit einer Verschlechterung der Nierenfunktion verbunden, was als toxische Wirkung der hohen Vancomycinkonzentrationen gewertet wurde [27].

Zusätzlich verändern auch die in Folge eines Nierenversagens eingesetzten Nierenersatzfahren die Ausscheidung von Arzneistoffen, wobei das Ausmaß dieser extracorporalen Clearance von vielen Variablen (Verfahren, Substanz) abhängt und schwer vorhergesagt werden kann [28]. In einer Übersichtsarbeit zur Clearance von Meropenem, Piperacillin und Vancomycin in Abhängigkeit von den Dialysebedingungen konnte z.B. für Meropenem anhand von 15 eingeschlossenen klinischen Studien zur Pharmakokinetik unter Dialyse gezeigt werden, dass die resultierende Clearance des Dialyseverfahrens zwischen $17,3 \text{ ml/min}$ und $58,3 \text{ ml/min}$ betrug [29]. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Clearance des Meropenems und den Dialysebedingungen wie Blutfluss oder Dialysatfluss konnte nicht nachgewiesen werden [29].

2.2.3 Veränderung der Proteinbindung

Die Bindung von Arzneistoffen an Plasmaproteine stellt einen wichtigen pharmakokinetischen Aspekt dar, da nur der freie (= nicht gebundene) Anteil eines Arzneistoffs für die pharmakologische Wirkung verantwortlich ist. Nur der freie Anteil kann (1) ins Gewebe an den Rezeptor penetrieren und (2) durch glomeruläre Filtration eliminiert werden [30]. Albumin und Alpha1-saures-Glykoprotein (AAG) stellen dabei die wichtigsten arzneistoffbindenden Plasmaproteine dar, wobei Albumin vermehrt saure Pharmaka und AAG vor allem basische Pharmaka bindet [31]. Bei Intensivpatienten kommt es häufig zu deutlichen Verschiebungen in der Konzentration dieser beiden Plasmaproteine. So konnte in Studien gezeigt werden, dass ca. 40% aller kritisch kranken Patienten deutlich erniedrigte Albuminwerte aufweisen mit Konzentrationen ≤ 25 g/l, während der Normwert eines gesunden Erwachsenen bei ca. 35-55 g/l liegt [32]. Diese erniedrigte Albuminkonzentration führt zu einer Erhöhung der freien Fraktion eines an Albumin bindenden Arzneistoffs, was in Folge eine beschleunigte renale Ausscheidung bedingen kann. In einer klinischen Studie zur Pharmakokinetik von Ceftriaxon bei 12 erwachsenen Intensivpatienten mit schwerer Sepsis konnte gezeigt werden, dass bei Vorliegen einer Hypoalbuminämie Verteilungsvolumen und Clearance des Ceftriaxons erhöht waren [19]. Die Albuminwerte der eingeschlossenen Patienten lagen im Mittel bei $22,2 \pm 6,1$ g/l. Das Verteilungsvolumen betrug $0,32 \pm 0,05$ l/kg [19], während der Wert für gesunde Probanden mit $0,12 \pm 0,01$ l/kg angegeben wird [33]. Die Clearance war mit einem Wert von 37 ± 14 ml/min gegenüber gesunden Probanden erhöht [19], wo ein Wert von $13 \pm 2,6$ ml/min beschrieben wurde [33]. Die mittlere freie Fraktion lag mit einem Wert von 27% gegenüber gesunden Probanden ebenfalls höher [19], da hier die freie Fraktion lediglich mit ca. 5% angegeben wird [33].

2.2.4 Bedeutung für die Klinische Routine

Wie obige Ausführungen verdeutlichen, sind die zentralen pharmakokinetischen Parameter bei kritisch kranken Patienten großen Veränderungen unterworfen. In Studien konnte gezeigt werden, dass Clearance und Verteilungsvolumen eines Arzneistoffs zwischen vergleichbaren Studienpopulationen von Intensivpatienten um mehr als 200% schwanken können [34]. In einer großen Übersichtsarbeit zur Pharmakokinetik von Betalaktam-Antibiotika bei Intensivpatienten mit Infektion, in der 57 klinische Studien ausgewertet wurden, konnten z.B. für Piperacillin mittlere Verteilungsvolumina zwischen 11,7 und 40,7 l bezogen auf ein hypothetisches Körpergewicht von 70 kg gefunden werden [34]. So ist es nicht verwunderlich, dass bei Verabreichung von Arzneimitteln in Standarddosierungen an kritisch kranke Patienten in vielen Fällen nicht die gewünschten Wirkspiegel erreicht wurden [8,35–40]. In einer klinischen Studie an 10 erwachsenen Intensivpatienten mit bakterieller Infektion und einer Indikation für eine intravenöse Therapie mit Ceftazidim wurde das Erreichen des klinischen Zielparameters, einer Plasmakonzentration oberhalb der minimalen

Hemmkonzentration (MHK) für *Pseudomonas aeruginosa* als Leitkeim über das gesamte Dosisintervall, evaluiert [41]. Unter der empfohlenen Maximaldosierung von 3-mal täglich 2 g als Kurzinfusion über 30 min verfehlten an Tag 3 der Therapie 4 der 10 Patienten den Zielparameter [41]. Somit stellt die Frage nach der richtigen Dosierung von Antibiotika bei intensivmedizinisch behandelten Patienten eine zentrale Herausforderung für Ärzte und in der Klinik tätige Apotheker dar. Die Auswertung von Antibiotic-Stewardship-Programmen (ABS) zeigt, dass bis zu einem Drittel der an das ABS-Team herangetragenen Anfragen die Dosierung von Antiinfektiva betreffen [42]. Insbesondere der klinische Pharmazeut als Fachmann in Dosierungsfragen innerhalb des ABS-Teams wird hierbei adressiert. Die aktuelle S3-Leitlinie zu Strategien zur Sicherung rationaler Antibiotika-Anwendung im Krankenhaus empfiehlt daher die Etablierung eines Therapeutischen Drug-Monitorings (TDM) bei kritisch kranken Patienten [42].

2.3 Therapeutisches Drug-Monitoring von Antiinfektiva bei Intensivpatienten

Therapeutisches Drug-Monitoring (TDM) bezeichnet eine Dosierungsstrategie, bei der ausgehend von Konzentrationsbestimmungen des eingesetzten Arzneistoffs im Plasma bzw. Serum des Patienten individuelle Dosierungsempfehlungen erarbeitet werden, um optimale Wirkspiegel zu erhalten [43]. TDM ist zum einen empfehlenswert beim Einsatz von Arzneistoffen mit enger therapeutischer Breite, oder aber bei Patienten, die eine spezielle bzw. sehr variable Pharmakokinetik aufweisen, wie Intensivpatienten [44]. Für Antiinfektiva bietet sich ein TDM dabei besonders an, da die Dosis hier nicht in Abhängigkeit eines unmittelbar erkenn- und messbaren Effekts titriert werden kann. Während z.B. der Einsatz von Vasopressoren anhand des sich unmittelbar variierenden Blutdrucks angepasst wird, wird die Wirksamkeit eines Antiinfektivums nicht gleich bei Verabreichung ersichtlich. Vielmehr beträgt die Zeitspanne zwischen dem Start einer antibiotischen Therapie und dem Einsetzen eines klinisch erkennbaren Effekts ca. 48 h [45,46]. Bedenkt man hierbei, wie wichtig die zeitnahe Durchführung einer in Keimspektrum und Dosierung adäquaten antibiotischen Therapie gerade für septische Patienten ist, wird ersichtlich, dass ein TDM insbesondere für diese Patienten anzuraten ist, um ein Therapieversagen durch eine evtl. Unterdosierung zu vermeiden [34,47].

Bisher wird ein TDM für Antiinfektiva in der klinischen Routine vor allem für Substanzen mit enger therapeutischer Breite eingesetzt, um toxische Wirkungen durch zu hohe Plasmakonzentrationen zu minimieren. Daher werden in der überwiegenden Mehrzahl der klinisch chemischen Labore routinemäßig nur die Spiegel von Aminoglycosiden wie Gentamicin und Glykopeptiden wie Vancomycin bestimmt [48], da diese konzentrationsabhängig nephro- und ototoxisch wirken können. Für beide Substanzgruppen konnte nachgewiesen werden, dass ein TDM hier die Häufigkeit und Schwere toxischer Nebenwirkungen zuverlässig senken kann [49,50]. In einer Metaanalyse zu den Vorteilen

eines TDM für Vancomycin, in der 6 klinische Studien mit insgesamt 521 Patienten ausgewertet wurden, wurde die Häufigkeit des Auftretens einer Nephrotoxizität unter Vancomycin-Therapie bei Patienten mit und ohne Betreuung durch ein TDM verglichen [50]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das Auftreten einer Nephrotoxizität bei Patienten unter TDM signifikant verringert war gegenüber Patienten, die kein TDM für Vancomycin erhielten [50]. Während lediglich bei 6,5% der Patienten unter TDM eine Nephrotoxizität auftrat, lag die Häufigkeit für Patienten ohne TDM bei 19,9% [50].

Antibiotika mit geringem Potential für toxische Nebenwirkungen und somit größerer therapeutischer Breite wie die Betalaktam-Antibiotika standen bisher überwiegend nicht im Fokus von TDM-Programmen. Allerdings wird in aktuellen Leitlinien bei der Behandlung von kritisch kranken Patienten vermehrt auch für diese Substanzen die Durchführung von Plasmakonzentrationsbestimmung im Rahmen eines TDM empfohlen, um Unterdosierung zu vermeiden und die Effektivität der antibiotischen Therapie sicherzustellen [42,51].

2.3.1 Zielparameter für die Plasmakonzentrationsbestimmung

Eine wichtige Voraussetzung zur Durchführung eines TDM für einen Arzneistoff ist das Vorliegen einer möglichst klaren Konzentrations-Wirkungs-Beziehung, damit über die Plasmakonzentration als Surrogatparameter zuverlässig Rückschlüsse auf die pharmakologische Wirksamkeit gezogen werden können [48]. Dieser Zusammenhang zwischen der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik ist für Antibiotika gut untersucht und belegt [52–58]. So unterscheidet man im Hinblick auf das Wirkprofil der Antibiotika zwischen Substanzen mit einer zeitabhängigen und einer konzentrationsabhängigen Wirksamkeit [36]. Konkrete Zielparameter für die Dosierung entstehen, indem die minimale Hemmkonzentration des Erregers (MHK) mit der Plasmakonzentration zeit- oder konzentrationsabhängig ins Verhältnis gesetzt wird. Die folgende Abbildung 1 dient zur Illustration der verschiedenen Wirkprofile von Antibiotika

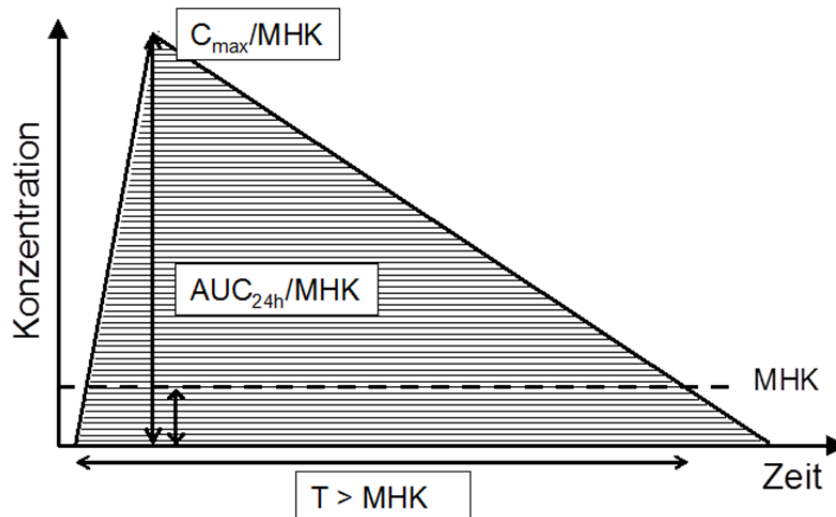


Abb. 1: Konzentrations-Zeit-Kurve mit Illustrierung der verschiedenen Zielgrößen für Pharmakokinetik und Pharmakodynamik (PK/PD): C_{max} : Spitzenkonzentration; AUC_{24h} : Fläche unter der 24 h Konzentrations-Zeit-Kurve; MHK: Minimale Hemmkonzentration des Erregers; T: Zeitspanne

Das Verhältnis aus Spitzenkonzentration zu MHK stellt den wirksamkeitsbestimmenden PK/PD-Parameter für konzentrationsabhängig wirkende Antibiotika wie z.B. die Aminoglycoside dar [59]. Für die zeitabhängig wirkenden Antibiotika wie die Betalaktame bestimmt die Zeitspanne, in der die Plasmakonzentration oberhalb der MHK liegt, über die Wirksamkeit der Therapie [59]. Daneben gibt es aber auch Substanzen, deren Wirksamkeit sowohl von der Zeit der Plasmakonzentration oberhalb der MHK des Erregers, als auch von der Spitzenkonzentration im Plasma abhängt. Als Zielparameter für dieses Wirkprofil, das z.B. Linezolid und die Tetracycline wie Tigecyclin aufweisen, hat sich das Verhältnis aus der Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve und der MHK bewährt [59].

Als konkreter Zielparameter für die Betalaktame wird für schwere Infektionen im Intensivbereich empfohlen, dass die Plasmakonzentration die MHK des Erregers für das komplette Dosisintervall überschreiten sollte [38]. Optimale Wirksamkeit wurde postuliert, wenn die Plasmakonzentration dabei die MHK des Erregers um den Faktor 4-5 übertrifft [60]. Eine weitere Erhöhung der Plasmakonzentration erzielt dabei keine zusätzlichen Effekte, aber erhöht das Risiko für die Toxizitätsreaktionen der Betalaktame wie z.B. neurologische Störungen bis hin zu Krampfereignissen [34]. Für Linezolid und Tigecyclin wird hingegen ein Verhältnis aus der Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve und der MHK des Erregers von 80-120 bzw. 17,9 als ideal für die klinische Wirksamkeit angesehen [61,62].

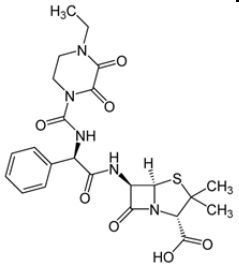
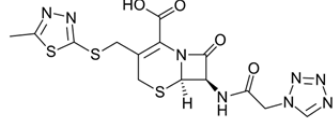
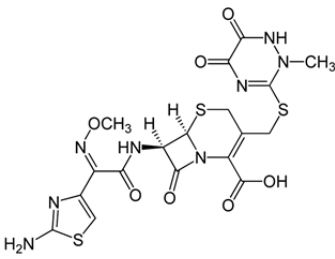
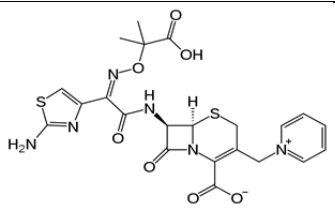
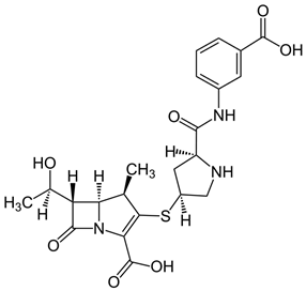
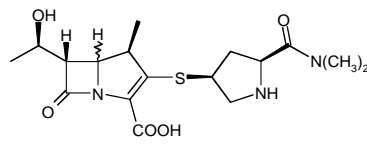
2.3.2 In der vorliegenden Arbeit untersuchte Antibiotika

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Schwerpunkt der Untersuchungen auf die Betalaktame gelegt, da am Universitätsklinikum Regensburg bisher keine Möglichkeit zur routinemäßigen Konzentrationsbestimmung dieser Antibiotika besteht. Eine Verbrauchsauswertung der Apotheke des Universitätsklinikums Regensburg zeigt, dass im Jahr 2014 allein für Piperacillin und Meropenem insgesamt ca. 31.000 Tagesdosen an die Stationen ausgeliefert wurden. Meropenem und Piperacillin bilden damit die am häufigsten eingesetzten Antibiotika. Linezolid und Tigecyclin stellen Reserveantibiotika dar, die bei speziellen Infektionen durch grampositive multiresistente Erreger wie methicillin-resistente *Staphylococcus-aureus*-Stämme oder vancomycinresistente *Enterokokken* zum Einsatz kommen [63,64]. Tigecyclin spielt daneben auch eine Rolle bei der Therapie von Infektionen durch multiresistente gramnegative Erreger, die Betalaktamasen mit einem erweiterten Spektrum bilden [64]. Auch für Linezolid und Tigecyclin besteht in der Routine keine Möglichkeit zur Konzentrationsbestimmung am Universitätsklinikum Regensburg.

2.3.3 Betalaktam-Antibiotika

Die Gruppe der Betalaktam-Antibiotika wird durch einen viergliedrigen Betalaktam-Ring in ihrer chemischen Struktur charakterisiert. Die 6-Aminopenicillansäure ist das Grundgerüst der Penicilline und wird als cyclisches Dipeptid aus den Aminosäuren Cystein und Valin gebildet [65]. Bei den Cephalosporinen bildet die 7-Aminocephalosporansäure die chemische Grundstruktur [65]. Die Carbapeneme ähneln in Ihrer Struktur stark den Penicillinen, allerdings ist im Bicyclus der Schwefel durch ein Kohlenstoffatom ersetzt [65]. Der Wirkmechanismus der Betalaktam-Antibiotika besteht in einer Hemmung der Synthese der bakteriellen Zellwand. Durch ihre strukturelle Ähnlichkeit mit dem D-Alanyl-D-Alanin-Rest binden Betalaktame unter Öffnung des Betalaktam-Ringes kovalent an das aktive Zentrum der Transpeptidase und blockieren das Enzym dadurch irreversibel. Die Betalaktam-Antibiotika werden daher auch als Suizid-Substrate bezeichnet [65]. Folgende Tabelle zeigt die untersuchten Betalaktam-Antibiotika mit Strukturformel und wichtigen pharmakokinetischen Kenngrößen.

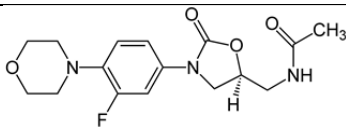
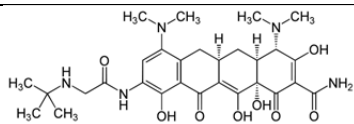
Tab. 1: Chemische Strukturen und pharmakokinetische Parameter der untersuchten Betalaktam-Antibiotika; HWZ: Halbwertszeit; PPB: Plasmaproteinbindung

Substanz	Chemische Struktur	Eliminationswege	HWZ	PPB
Piperacillin		5-10% in Form der Piperacillinsäure; 90-95% unverändert renal [66]	ca. 1 h	ca. 30%
Cefazolin		unverändert renal [67]	ca. 2 h	65-92%
Ceftriaxon		50-60% unverändert renal; 40-50% unverändert biliär [68]	ca. 6 h	ca. 95%
Ceftazidim		unverändert renal [69]	ca. 3 h	ca. 10%
Ertapenem		80% renal hälftig unverändert und hälftig als Metabolit mit Dehydropetidase-I-vermittelter Spaltung des Betalaktamrings; ca. 10% biliär [70]	ca. 4 h	ca. 95%
Meropenem		98% renal dabei ca. 70% unverändert und 30% als Metabolit mit Dehydropetidase-I-vermittelter Spaltung des Betalaktamrings; ca. 2% biliär [71]	ca. 1 h	ca. 2%

2.3.4 Linezolid und Tigecyclin

Linezolid stellt eine synthetische antibakterielle Substanz dar, die zu einer neuen Klasse von Antibiotika gehört, die in Folge ihrer chemischen Struktur als Oxazolidinone bezeichnet werden [65]. Die antibakterielle Wirkung beruht auf einer Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese. Linezolid bindet spezifisch an die 23S rRNA der 50S Untereinheit des bakteriellen Ribosoms und verhindert dadurch die Bildung eines funktionellen 70S-Initialkomplexes [72]. Dieser Prozess stellt einen wesentlichen Teil des Translationsprozesses dar. Tigecyclin, eine Verbindung, die das für die Tetracycline typische Grundgerüst aus 4 anellierten Sechsringen aufweist, entfaltet seine antibakterielle Aktivität ebenfalls über die Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese. Durch Bindung an die 30S Untereinheit des bakteriellen Ribosoms wird die Bindung von Aminoacyl-tRNA an die Akzeptorstelle verhindert und damit die Verlängerung der bakteriellen Peptidkette unterbunden [73]. Folgende Tabelle zeigt die chemischen Strukturen von Linezolid und Tigecyclin sowie wichtige pharmakokinetische Kenngrößen.

Tab. 2: Chemische Strukturen und Elimination von Linezolid und Tigecyclin; HWZ: Halbwertszeit; PPB: Plasmaproteinbindung

Substanz	Chemische Struktur	Eliminationwege	HWZ	PPB
Linezolid		Ca. 80% renal, dabei ca. 40% als Hydroxyethylglycin-Metabolit, 30% unverändert und 10% als Aminoethoxyessigsäure-Metabolit; ca. 12% biliär [63]	ca. 5-7 h	ca. 31%
Tigecyclin		Ca. 59% biliär, dabei ca. 55% unverändert und ca. 4% als Glucuronid ca. 32% renal, dabei ca. 28% unverändert und ca. 5% als Glucuronid [74]	ca. 42 h	73-79%

2.3.5 Analytik

Für die in der klinischen Routine bereits weit verbreitete Praxis der Konzentrationsbestimmung von Vancomycin und der Aminoglycoside existieren kommerziell erhältliche Assays, wie z.B. Immunoassays. Für das TDM von Betalaktamen sowie Linezolid und Tigecyclin sind bisher auf dem Markt keine anwendungsfertigen Assays verfügbar, sodass zur Konzentrationsbestimmung auf hausintern entwickelte analytische Verfahren zurückgegriffen werden muss [75]. Die HPLC stellt eine attraktive Methode zum TDM von Antiinfektiva dar, da sie kostengünstig, schnell und mit geringem personellen Aufwand durchgeführt werden kann [76]. Daneben ist die benötigte technische Ausrüstung zur

Durchführung von HPLC-Analysen in klinisch-chemischen Laboratorien und den meisten Krankenhausapotheken standardmäßig vorhanden.

In der Literatur sind bereits mehrfach analytische Methoden zur Quantifizierung von Betalaktam-Antibiotika sowie auch von Linezolid und Tigecyclin publiziert, wobei hier ausschließlich die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) als analytische Methode zum Einsatz kam [75,77–81]. Es wurden überwiegend Trennsäulen aus reversed phase Materialien (RP) und Fließmittelmischungen aus Acetonitril oder Methanol in wässriger Pufferlösung verwendet. Zur Detektion der untersuchten Substanzen kam in der Literatur die UV-Detektion, sowie zunehmend auch die massenspektrometrische Detektion zum Einsatz.

Durch die höhere Empfindlichkeit, Spezifität und Selektivität der massenspektrometrischen Detektion gegenüber der UV Detektion ist es möglich, eine größere Anzahl von verschiedenen Substanzen im gleichen analytischen Lauf zu untersuchen [82,83]. Allerdings sind massenspektrometrische Detektoren noch sehr kostenintensiv, sodass diese Technik nur in großen Laboratorien für die Routine zur Verfügung steht. Die Etablierung einer neuen Methode ist zudem deutlich zeitaufwendiger insbesondere im Bereich der Kalibrierungsverfahren und verwendeten Standardsubstanzen. Daneben stellt der Umgang mit der MS-Technik auch höhere Anforderungen an die technischen Kenntnisse des Anwenders [82,83].

2.3.6 Bestimmung der freien Konzentration

Während bisher zur Durchführung eines TDM überwiegend die totale Konzentration in einer Plasma- oder Serumprobe bestimmt wurde, wird mittlerweile vermehrt gefordert, direkt die freie, nicht an Plasmaproteine gebundene Konzentration zu bestimmen [47,84], da nur die freie Konzentration für die pharmakologische Wirkung eines Arzneistoffs verantwortlich ist [85].

In den bisher publizierten Assays zur Bestimmung der freien Konzentration von Betalaktam-Antibiotika kommt v.a. die Ultrafiltration als Methode zum Einsatz [86–89]. Das Prinzip der Ultrafiltration beruht auf einer Filtration durch eine semipermeable Membran. Moleküle oberhalb einer bestimmten Massengrenze können die Membran nicht mehr überwinden und werden im Überstand zurückgehalten. Die Molekülmasse von Plasmaproteinen liegt deutlich über dieser Grenze von typischerweise 10-30 kDa, sodass die Plasmaeiweiße und daran gebundene Antibiotika nicht filtrierte werden können [90].

Die in Plasma bzw. Serum vorhandene freie Fraktion der untersuchten niedermolekularen Antibiotika kann hingegen die Ultrafiltrationsmembran überwinden und findet sich so im Ultrafiltrat wieder (siehe Abb. 2). Durch Konzentrationsbestimmung im Ultrafiltrat kann die freie Konzentration ermittelt werden [90].

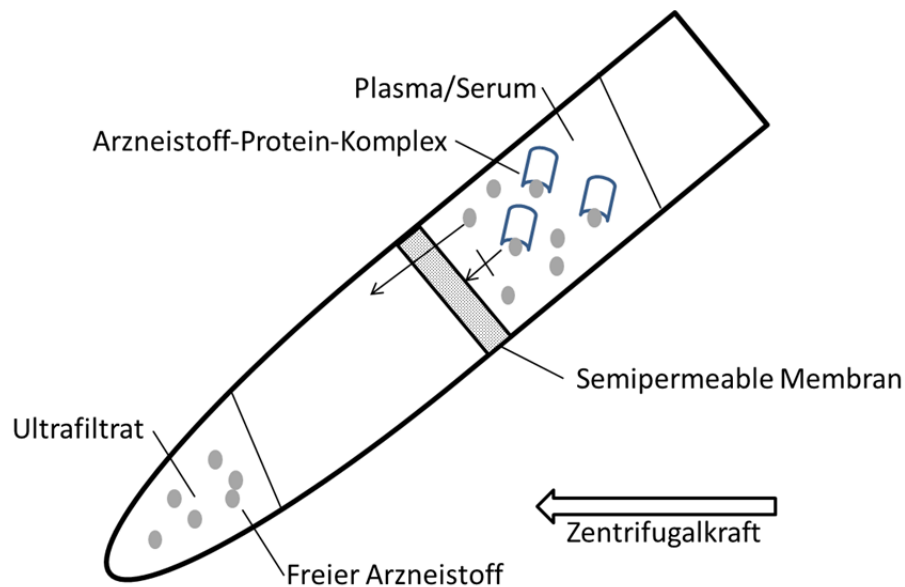


Abb. 2: Schematische Darstellung einer Ultrafiltrationseinheit nach [90]

Die Referenzmethode zur Bestimmung der freien Konzentration stellt die Gleichgewichtsdialyse dar, da diese Methode vielfach in Studien zur Untersuchung des Phänomens der Plasmaproteinbindung zum Einsatz gekommen ist und die Gleichgewichtseinstellung durch Diffusion ohne äußere Einflussnahme erfolgt [90,91]. Die kommerziell erhältlichen Dialysezellen bestehen aus zwei separaten Kammern, die durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt sind. In eine der beiden Zellen wird die zu untersuchende Serum- bzw. Plasmaprobe gefüllt. Die andere Zelle enthält den Dialysepuffer, der in der Regel auf einer Phosphatpufferlösung basiert. Durch Diffusion über die semipermeable Membran gelangt ungebundener Arzneistoff in die Pufferlösung bis ein Gleichgewichtszustand erreicht ist [90,91]. Plasmaproteine und der daran gebundene Arzneistoff können aufgrund der höheren Molekülmasse die Membran nicht überwinden und werden im Plasma bzw. Serum zurückgehalten. Nach Einstellung eines stabilen Gleichgewichts, ein Vorgang der je nach verwendeter Dialysezelle zwischen 4-24 h dauern kann, wird durch Konzentrationsbestimmung der zu untersuchenden Substanz im Dialysepuffer die freie Konzentration ermittelt (Abb. 3) [91].

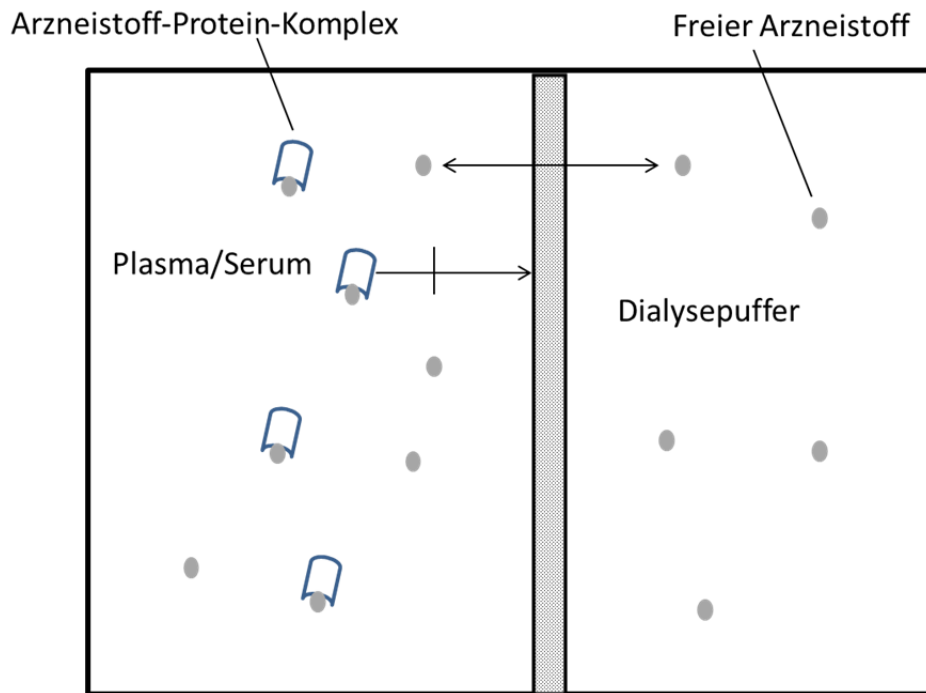


Abb. 3: Schematische Darstellung einer Dialysezelle zur Gleichgewichtsdialyse nach [90]

2.4 Zielsetzung

Ziele der vorliegenden Arbeit:

- Es sollen zuverlässige, methodisch einfache und schnelle HPLC-Methoden zur Bestimmung der untersuchten Betalaktam-Antibiotika Ceftazidim, Ceftriaxon, Ertapenem, Meropenem und Piperacillin sowie der Reserveantibiotika Linezolid und Tigecyclin in Plasma bzw. Serum entwickelt und validiert werden.
- Da bei Intensivpatienten die Proteinbindung von Arzneistoffen starken Schwankungen unterliegt, wird auch die Bestimmung der freien Konzentration mittels Ultrafiltration in die Methodenentwicklung integriert.
- Die entwickelten Methoden sollen eingesetzt werden, um bei Intensivpatienten die Plasmakonzentrationen der untersuchten Antibiotika zu bestimmen. Hierdurch soll die Eignung der Methoden für ein Routine-TDM überprüft werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Laborgeräte

Heraeus Multifuge 1L-R mit Windkesselrotor 75002005, Fa. Kendro Laboratory Products, 37520 Osterode, jetzt Thermo Electron LED GmbH, 63505 Langenselbold

pH-Meter pH 526 und pH 720, Fa. WTW, 82362 Weilheim

Magnetrührer Combimag RCT, Fa. IKA, 7813 Staufen i. Breisgau

Heizblock/Heatblock III, Fa. VWR, 64295 Darmstadt

Aluminiumkühlblock HxBxT 30x250x100 mm mit 4x10 Bohrungen von HxD 28x12 mm, Mechanische Werkstatt, Fakultät Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg

REAX 2000 Mixer (Vortex-Typ), Fa. Heidolph, 91126 Schwabach

REAX 2 Mischer (Überkopfschüttler), Fa. Heidolph, 91126 Schwabach

Finnpipette T41640 4500 (2-10 µl, 5-50 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl), Fa. Thermo Fisher Scientific, 38116 Braunschweig

Rainin Pipet-Lite XLS (20-200 µl, 100-1000 µl), Fa. Mettler-Toledo, 35396 Gießen

Eppendorf-Multipette, Fa. Eppendorf, 22339 Hamburg

Stepmate/PeqStepper (Mehrfachdispenser), Fa. VWR, 64295 Darmstadt

Brand-Dispensette (0,1-0,5 ml, 1-5 ml, 10-50 ml, 20-100 ml), Fa. Brand, 97877 Wertheim

Zentrifuge Eppendorf 5417 R, Festwinkelrotor F45-30-11, Fa. Eppendorf, 22339 Hamburg

Zentrifuge Hettich Mikro 22, Trommelrotor 1161, Fa. Hettich, 78532 Tuttlingen

Sunrise Absorbance Reader für Mikrotiterplatten, Fa. Tecan Austria, 5082 Grödig

Vakuum Pumpe ME 1C, Fa. Vacuubrand, 97877 Wertheim

Waage Sartorius BP 211D, 80/210g, d=0,01/0,1 mg, Fa. Sartorius AG, 37075 Göttingen

Waage Sartorius 1712, 30/160g, d=0,01/0,1 mg, Fa. Sartorius AG, 37075 Göttingen

Waage Sartorius Extended, 3200g, d=0,01g, Fa. Sartorius AG, 37075 Göttingen

Wasseraufbereitungsanlage Arium basic, Fa. Sartorius Stedim, 37075 Göttingen

Centrifuge & Vortex, Fa. neoLab Migge, 69123 Heidelberg

3.2 Verbrauchsmaterialien

Amicon ultra 10kDa: Regenerierte Cellulose, Fa. Millipore, 65824 Schwalbach/Ts

Centrifree YM-30K: Regenerierte Cellulose, Fa. Millipore, 65824 Schwalbach/Ts

Microcon-10kDa Centrifugal Filter Unit with Ultracel-10 membrane: Regenerierte Cellulose, Fa. Millipore, D-65824 Schwalbach/Ts

Nanosep Omega 10K/30K: modifiziertes Polyethersulfon auf Polyethylen, Fa. Pall, 63303 Dreieich

Vivacon 500 Hydrosart: Regenerierte Cellulose, Fa. Sartorius Stedim, 37075 Göttingen

Vivaspin 500 10K: Regenerierte Cellulose, Fa. Sartorius Stedim, 37075 Göttingen

Präzisions Dispenser tips (1,25 ml, 2,5 ml), Fa. Brand, 97877 Wertheim

Pipettenspitzen (10 (ohne Filter bis 20 µl geeignet), 200 µl, 1000 µl), Fa. Sarstedt, 51588 Nümbrecht

Reagiergefäße mit anhängendem Deckel (1,5 ml, 2,2 ml), Fa. Sarstedt, 51588 Nümbrecht

Röhre 4 ml, 75 x 12 mm, Rundboden, PP, Fa. Kabe Labortechnik GmbH, 51588 Nümbrecht

Röhre, 12 ml, 95 x 16 mm, Spitzboden, PP, Fa. Kabe Labortechnik GmbH, 51588 Nümbrecht

Schraubröhre, 15 ml, 120 x 17 mm, 50 ml, 114 x 28 mm, Fa. Sarstedt, 51588 Nümbrecht

Multipette ritips® 0,05 ml, Fa. Ritter GmbH, 86830 Schwabmünchen

Verschlussstopfen für Probenröhren 4 und 12 ml, Fa. Kabe Labortechnik GmbH, 51588 Nümbrecht

Blutgas-Monovette® 2 ml, Fa. Sarstedt, 51588 Nümbrecht

Mikro-Schraubröhren 2 ml mit Verschluss, PP, Fa. Sarstedt, 51588 Nümbrecht

HPLC-Zubehör

1,5 ml Short Thread Vial 32 x 11,6 mm (clear), wide opening, Fa. BGB, 79618 Rheinfelden

ND9 Short Thread Screw Caps (black) with Septa Silicone Rubber/PTFE, Fa. BGB, 79618 Rheinfelden

250 µl Conical Glass Insert (total volume 340 µl), 31 x 6mm, Fa. BGB, 79618 Rheinfelden

Membranfilter TE 36, PTFE 0,45 µm Ø 47 mm, Fa. Schleicher & Schüll (jetzt GE Healthcare/Whatman), 37586 Dassel

3.3 Substanzen

Tab. 3: Übersicht der eingesetzten Antibiotika

Substanz	Abk.	MG (g/mol)	Beschreibung
Cefazolin	CEZ	454,51	Cephazolin Fresenius 2 g, (Fresenius Kabi, 61346 Bad Homburg v.d.H.): Pulver zur Herstellung einer Injektions- oder Infusionslösung, 1 Durchstechflasche enthält 2,096 g Cephazolin-Natrium (entsprechend 2,0 g Cephazolin), Natriumgehalt: 48 mg (2,1 mmol), Sonstige Bestandteile: keine
Ceftazidim	CAZ	546,58	Ceftazidim Eberth 2 g, (Dr, Friedrich Eberth Arzneimittel GmbH, 92289 Ursensollen), Eine Durchstechflasche mit 2,606 g Pulver enthält 2,328 g Ceftazidim*5H ₂ O, entsprechend 2,0 g Ceftazidim (MG 546,58), Sonstige Bestandteile: Natriumcarbonat, (ChB 12003, verw. 09/2014), Ceftazidim*5H ₂ O,(GSK, 20097 Hamburg), 1,09 g Ceftazidim x 5 H ₂ O = 1,00 g freie Säure
Ceftriaxon	CRO	554,58	Ceftriaxon Kabi, 2 g, (Fresenius Kabi, 61346 Bad Homburg v.d.H.). Eine Durchstechflasche enthält Ceftriaxon-Natrium, entspr. 2 g Ceftriaxon, Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung, Sonstige Bestandteile: keine
Ertapenem	ETP	475,52	Ertapenem freie Säure, 1,00 mg = 1,00 mg, (MSD, 85540 Haar) Invanz 1 g (Infectopharm Arzneimittel GmbH, 64646 Heppenheim), Eine Durchstechflasche enthält 1,221 g Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung, entspr. 1,046 g Ertapenem-Natrium, entspr. 1,00 g Ertapenem freie Säure. Sonstige Bestandteile: Natriumhydrogencarbonat (E 500), Natriumhydroxid (E 524) zur pH-Einstellung auf 7,5. (ChB: 2053960, verw. 03/2014)
Meropenem	MEM	383,46	Meropenem Eberth 1 g, (Dr, Friedrich Eberth Arzneimittel GmbH, 92289 Ursensollen) Meropenem*3H ₂ O, Eine Durchstechflasche enthält 1348 mg Pulver, entspr. 1141 mg MEM-Trihydrat, entsprechend 1,0 g Meropenem, Sonstige Bestandteile: 208 mg Na ₂ CO ₃ , (ChB:2JB0402, verw. 09/2014), Meropenem-Trihydrat (AstraZeneca, 22880 Wedel) (MG 437,5); 114 mg MEM-Trihydrat = 100 mg Meropenem freie Säure
Minocyclin	MIN	457,48	Minocyclin-HCl (Fa, Lederle, 82515 Wolfpatshausen) (MG 493,96) Aktivität 85,4%, 11,8 mg Substanz entsprechen 10,0 mg Minocyclin (ChB: 102695, abgefüllt am 24Nov88)
Piperacillin	PIP	517,56	Piperacillin Fresenius 2 g (Fresenius Kabi, 61346 Bad Homburg v.d.H.) Eine Injektionsflasche Trockensubstanz enthält 2,085 Pip-Na, entsprechend 2,00 g Piperacillin, Sonstige Bestandteile: Keine (CHB: 18E0522; Verw.: 02/2014)

Tigecyclin	TGC	585,65	<p>Tygacil 50 mg (Pfizer, 10785 Berlin)</p> <p>Eine Ampulle enthält 50 mg Tigecyclin Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung,</p> <p>Sonstige Bestandteile: Lactose-Monohydrat, Salzsäure, Natriumhydroxid (zur pH-Einstellung) (CHB: G43508, verw. 03/2014),</p> <p>Tigecyclin Analysenstandard (Pfizer, 10785 Berlin) (CHB:PF-05208753)</p>
Linezolid	LZD	337,35	<p>Linezolid Analysenstandard (Pfizer, 10785 Berlin) (ChB: PF-00184033)</p>

3.4 Reagenzien und Chemikalien

Acetonitril LiChrosolv, Fa. Merck, 64293 Darmstadt

Methanol LiChrosolv, Fa. Merck, 64293 Darmstadt

Albumin from human serum, lyophilized powder, essentially fatty acid free, Fa. Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen

L(+)-Ascorbinsäure zur Analyse, Fa. Merck, 64293 Darmstadt

1-Octanesulfonic acid sodium salt, Fa. Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen

Titriplex III (Na_2 -EDTA) zur Analyse, Fa. Merck, 64293 Darmstadt

Natriumhydroxid Plätzchen, Fa. VWR, 64295 Darmstadt

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat zur Analyse, Fa. Merck, 64293 Darmstadt

Di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat zur Analyse, Fa. Merck, 64293 Darmstadt

Natriumchlorid zur Analyse, VWR, 64295 Darmstadt

Natronlauge 1 N zur Analyse, Fa. Merck, 64293 Darmstadt

Salzsäure 1 N zur Analyse, Fa. Merck, 64293 Darmstadt

Ortho-Phosphorsäure 85% zur Analyse, Fa. Merck, 64293 Darmstadt

Dichlormethan zur Analyse, Fa. Merck, 64295 Darmstadt

Wasser gereinigt über Wasseraufbereitungsanlage Arium, Fa. Sartorius Stedim, 37075 Göttingen

3.5 Lösungen und Verdünnungen

3.5.1 Puffer

3 M K_2HPO_4 pH 7,50:

6,85 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (MG 228,23) wurden in einem kalibrierten 15ml-Röhrchen in ca. 8 ml Wasser gelöst, mit o-Phosphorsäure 85% auf pH 7,50 titriert und mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt.

2 M K_2HPO_4 pH 7,32:

3 M K_2HPO_4 pH 7,50 wurde mit Wasser im Verhältnis 2:1 (v/v) verdünnt und mit konz. HCl auf einen pH von 7,32 titriert.

2 M HEPES pH 7,50:

11,91 g HEPES (MG 238,31) wurden in 25 ml Wasser gelöst und mit 10 M NaOH auf pH 7,50 titriert.

100 mM NaH_2PO_4 pH 7,40:

1380 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MG 137,99) wurden in 100 ml Wasser gelöst und mit 10 M NaOH auf pH 7,40 titriert.

100 mM HEPES pH 7,50:

596 mg HEPES (MG 238,31) wurden in 20 ml 0,3% NaCl gelöst, mit 10 M NaOH auf pH 7,50 titriert und mit 0,3% NaCl auf 25 ml ergänzt, Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH bzw, HCl nachkorrigiert.

70 mM NaH_2PO_4 pH 7,40:

966 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MG 137,99) wurden in 100 ml Wasser gelöst und mit 10 M NaOH auf pH 7,40 titriert.

50 mM NaH_2PO_4 pH 6,00:

690 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MG 137,99) wurden in 100 ml Wasser gelöst und mit 10 M NaOH auf pH 6,00 titriert.

25 mM NaH_2PO_4 :

345 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MG 137,99) wurden in 100 ml Wasser gelöst.

10 mM NaH_2PO_4 pH 6,00:

138 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MG 137,99) wurden in 100 ml Wasser gelöst und mit 10 M NaOH auf pH 6,00 titriert.

Albumin-Puffer-Lösung 4,2%:

168 mg Albumin from human serum, lyophilized powder, essentially fatty acid free in 40 ml 70-100 mM NaH_2PO_4 pH 7,40 bzw, 70-100 mM HEPES pH 7,50 lösen.

3.5.2 Lösungen zur Eiweißfällung

5% TCA/MeOH (3:1):

4,50 g Trichloressigsäure wurden in 90 ml Wasser gelöst und mit 30 ml Methanol gemischt.

7% PCA:

10,0 ml 70% Perchlorsäure wurden mit 90 ml Wasser verdünnt.

3.5.3 Sonstige Lösungen

0,1 M Na-EDTA:

931 mg $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MG 372,24) in 20 ml Wasser suspendieren, mit 10 M NaOH auf pH ca. 7 titrieren, mit 1 M NaOH auf pH 7,40 titrieren und auf 25 ml auffüllen, pH nachkorrigieren mit 1 M NaOH bzw, 1 M HCl.

0,1 M CaCl_2 :

368 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MG 147,02) in 25 ml Wasser lösen.

5% TW80:

0,5 g TWEEN 80 auf 10 g mit Wasser auffüllen.

0,9% NaCl/0,2% ASA:

0,9 g NaCl und 0,2 g L(+)-Ascorbinsäure in 100 ml Wasser lösen.

3.5.4 Probenmatrix

Die Matrix für die Bestimmung der Antibiotika war Humanserum oder Humanplasma von freiwilligen, gesunden Probanden oder von Patienten. Das Serum wurde mit Serum-Monovetten, das Plasma mit Heparin-Monovetten (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) gewonnen. Mehrheitlich wurde dabei Plasma verwendet.

3.5.5 Stammlösungen

Zur Herstellung der Stammlösungen wurde eine entsprechende Menge des jeweiligen Antibiotikums in einem Messkolben eingewogen und mit 10 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 6,00, (Betalaktam-Antibiotika), Wasser (Linezolid) bzw. 0,9% NaCl (Tigecyclin) bis zur Marke aufgefüllt. Aliquots von 300-600 µl wurden in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen, beschriftet mit Substanznamen, Konzentration und Abfülldatum, bei -70°C eingefroren. Reste einmal aufgetauter Aliquots wurden verworfen.

Tab. 4: Stammlösungen der Antibiotika

Antibiotikum	Einwaage	Messkolben	Konz. (mg/l)
Cefazolin (CEZ)	131,0 mg Cephazolin Fresenius, entspr, 125,0 mg CEZ	25 ml	CEZ 5000
Ceftazidim (CAZ)	65,2 mg Ceftazidim Eberth, entspr, 50,0 mg CAZ	10 ml	CAZ 5000
Ertapenem (ETP)	12,2 mg Invanz, entspr, 10,0 mg ETP	10 ml	ETP 5000
Ceftriaxon (CRO)	54,2 mg CRO-Na (Ceftriaxon Kabi) entspr, 50,0 mg CRO	10 ml	CRO 5000
Meropenem (MEM)	22,8 mg Meropenem x 3 H ₂ O oder 26,96 Meropenem Eberth, entspr, 20 mg MEM	10 ml	MEM 2000
Piperacillin (PIP)	130,3 mg Piperacillin Fresenius, entspr, 125 mg PIP	25 ml	PIP 5000
Linezolid (LZD)	25,0 mg LZD	25 ml	LZD 1000
Tigecyclin (TGC)	10,0 mg TGC	10 ml	TGC 1000
Tigecyclin (TGC)	19,7 mg TGC	1,97 ml ¹⁾	TGC 10000

1) TGC in 4 ml-PP-Röhrchen einwiegen und Lösemittel mit Finnpipette zupipettieren

3.5.6 Standards und Kontrollen

Standard- und Kontrollproben wurden in Leerplasma gesunder, freiwilliger Probanden hergestellt. Die Stammlösungen wurden mit Puffer oder Wasser vorverdünnt und dann 1:20 oder 1:50 mit Leerplasma gemischt. Die Präzision wurde bis zu einem Volumen von 10 µl Vorverdünnung nachgewiesen bei Verwendung von 2-20 µl Pipetten und 20 µl Spitzen.

Tab. 5: Übersicht der eingesetzten Standards und Kontrollen

Substanz	Standard (Kalibrator)	KA (hoch)	KB (niedrig)
Ertapenem, Piperacillin, Ceftriaxon, Ceftazidim, Cefazolin	50 mg/l	100 mg/l	10 mg/l
Meropenem	20 mg/l	50 mg/l	5 mg/l
Linezolid	5 mg/l	20 mg/l	2 mg/l
Tigecyclin	0,5 mg/l	1 mg/l	0,2 mg/l

Nachfolgende Tabelle zeigt beispielhaft die Herstellung der Standards und Kontrollen für Meropenem aus der Stammlösung.

Tab. 6: Beispiel eines Verdünnungsschemas für Meropenem

Konz. (mg/l):	2000	2000	2000
Volumen (µl):	100	200	50
Lösemittel (µl):	400	200	950
Res. Konz. (mg/l):	400	1000	100
1:20 mit Plasma:	20	50	5
Abk.:	Std	KA	KB

Für die Betalaktame und Linezolid wurden die Vorverdünnungen in 10 mM NaH₂PO₄, pH 6,00, hergestellt, für Tigecyclin in 0,9% NaCl/0,2% ASA.

Für Tigecyclin wurde eine Verdünnung von 1:50 gewählt. Für 10 Assays wurden Aliquots von 230 µl (Kontrollen) bzw. 350 µl (Standard) in Eppendorf-Tubes abgefüllt und bei -70°C gelagert.

3.5.7 Referenzstandard

Als Referenzstandards zur Berechnung der Wiederfindung wurden wässrige Lösungen der Substanzen mittlerer Konzentration verwendet.

Tab. 7: Übersicht der wässrigen Referenzstandards für die Routine

Substanz	Konz.	Lösemittel
Ertapenem, Piperacillin, Ceftriaxon, Ceftazidim, Cefazolin	25 mg/l	10 mM Phosphatpuffer pH 6,0
Meropenem	10 mg/l	10 mM Phosphatpuffer pH 6,0
Linezolid	5 mg/l	5% TCA/MeOH (3/1; v/v) oder 7% PCA, verdünnt mit dem gleichen Volumen Wasser
Tigecyclin	0,5 mg/l	0,9% NaCl/AsA oder Eluent ohne SOS

3.6 Chromatographisches Trennsystem

Das HPLC-System bestand aus den folgenden Komponenten der Firma Shimadzu, Duisburg, wenn nicht anders angegeben.

Tab. 8: Übersicht HPLC-Komponenten

Komponente	System A	System B
Degasser	Degasser DGU-20A3	DG-4000, Fa. Recipe Chemicals, München
Pumpe	Pumpe LC 20AT	Pumpe LC 20AT
Autosampler	Autosampler SIL-20AC HT	Autosampler SIL-20AC HT
Säulenofen	CTO-10AS VT	ERC 125, Fa. ERC, Riemerling
Detektor	SPD-20A	SPD-10AV
Steuergerät	CBM-20A	CBM-20A
Auswertesoftware	LC-Solution	LC-Solution

Die Trennung erfolgte standardmäßig für die Betalaktame und Linezolid an einer XBridge C18 BEH XP 2,5 μ , 50x3 mm Säule, versehen mit einem Column Protection System (Nucleoshell RP18 2,7 μ , Kartusche, i.D. 4x3 mm). Alternativ zur XBridge-Säule wurde auch eine Nucleoshell RP18 2,7 μ , 100x3 mm, verwendet, die eine etwas längere Retentionszeit, aber auch höhere Trennleistung zeigt. Zur Analyse von Tigecyclin wurde ebenfalls eine Nucleoshell RP18 2,7 μ , 100x3 mm verwendet. Alternativ kam zur Analyse von Tigecyclin auch eine Nucleodur HTec C 18, 125x4 mm Säule zum Einsatz, Die Säulentemperatur betrug

stets 40°C, der Fluss 0,4 ml/min bzw. 0,8 ml/min für die Säule Nucleodur HTec C18, 125x4 mm.

Die Trennung erfolgte für alle untersuchten Substanzen isokratisch. Die mobile Phase wurde hergestellt aus wässrigem Puffer und Acetonitril. Der Grundpuffer war 0,1 M H₃PO₄, pH 2,6-2,7. Die Herstellung der mobilen Phase ist nachfolgend am Beispiel Ceftriaxon beschrieben.

Zu 1000 ml Wasser wurden 6,80 ml 85% o-Phosphorsäure und 16 Plätzchen (ca. 3,2 g) Natriumhydroxid zugegeben. Der resultierende pH-Wert wurde mit 10 M NaOH auf pH 2,6 titriert. 1000 ml dieses Puffers wurden mit 120 ml Acetonitril gemischt und mit 10 M NaOH oder 85% o-Phosphorsäure auf 2,9 nachjustiert. Die fertige Mischung wurde im Vakuum (Vakuum-Filtrationsgerät 1000 ml, Fa. Waters, Eschborn) durch einen 0,45 µm Membranfilter (TE 36, PTFE 0,45 µm Ø 47 mm) filtriert. Der Membranfilter wurde vor der Filtration mit Methanol benetzt, weil sich das Wasser-Acetonitril-Gemisch sonst nur schwer filtrieren ließ.

Die verwendeten mobilen Phasen und die Detektionswellenlängen für die Routinemethoden sind in nachfolgender Tabelle zusammengestellt.

Tab. 9: Chromatographisches Standard-Trennsystem (Säule XBridge C18 BEH 2,5 µ, 50x3 mm bzw. Nucleoshell RP18 2,7 µ, 100x3 mm für TGC, Fluss stets 0,4 ml/min, Säulentemperatur 40°C) und Detektionswellenlängen (in Klammer die alternative Detektionswellenlänge). Trennung stets isokratisch.

Substanz	Mobile Phase	Lambda	RT (min)
CAZ	1000 ml 0,1 M mM H ₃ PO ₄ , pH = 3,0; 80 ml MeCN	260 nm	3,20
CEZ	800 ml 0,1 M H ₃ PO ₄ , pH = 2,7; 120 ml MeCN (s. ETP)	260 nm	2,75
CRO	1000 ml 0,1 M H ₃ PO ₄ , pH = 2,9; 120 ml MeCN	260 (300) nm	3,20
ETP	800 ml 0,1 M H ₃ PO ₄ , pH = 2,7; 120 ml MeCN (s. CEZ)	300 nm	2,43
ETP	500 ml 0,1 M NaH ₂ PO ₄ , pH = 6,0; 30 ml MeCN	300 nm	3,15
MEM	1000 ml 0,1 M H ₃ PO ₄ , pH = 2,9; 80 ml MeCN	300 nm	3,00
PIP	500 ml 0,05 M NaH ₂ PO ₄ , pH = 6,4; 125 ml MeCN oder 800 ml 0,1 M H ₃ PO ₄ , pH = 2,6; 260 ml MeCN	225 (245) nm	3,20 3,40
LZD	750 ml 0,1 M H ₃ PO ₄ , pH = 3,1; 250 ml MeCN	254 nm	2,50
TGC	800 ml 0,1 M H ₃ PO ₄ , pH = 3,1; 200 ml MeCN, 700 mg SOS	350 nm	4,10

3.7 Methodenvalidierung

Die Validierung der analytischen Methode erfolgte in Anlehnung an die Richtlinien der EMA und FDA [92,93].

3.7.1 Nachweisgrenze on column (Limit of Detection, LOD)

Die Stammlösungen der Substanzen wurden in absteigenden Konzentrationen in reinem Lösungsmittel, z.B. Wasser, Puffer oder mobiler Phase, verdünnt. Als Nachweisgrenze wurde die Menge an Substanz beschrieben, die unter den gewählten chromatographischen Bedingungen ein Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 erzeugte. Die Bestimmung erfolgte durch Ausmessen der Peakhöhe und der Höhe des Rauschens. Sie wurde als LOD "on column" definiert.

3.7.2 Bestimmungsgrenze (Limit of Quantitation, LOQ)

Nach den Empfehlungen der FDA soll das Detektorsignal der Bestimmungsgrenze mindestens um den Faktor 5 höher liegen als das Signal des Leerwertes. Die Präzision an der Bestimmungsgrenze sollte mindestens 20% und die Richtigkeit des gemessenen Wertes im Bereich 80-120% liegen [92]. Konservativ kann die Bestimmungsgrenze "on column" auch als die zweifache Nachweisgrenze LOD definiert werden, wie in der vorliegenden Arbeit praktiziert.

Während die so bestimmten Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen "on column" die Menge an injizierter Substanz angeben, wird die Bestimmungsgrenze einer Analysenmethode auch als niedrigste nachweisbare oder bestimmbare Konzentration einer Substanz definiert. In diese gehen andere Variablen ein, wie z.B. bei der HPLC das Injektionsvolumen oder auch evtl. Matrixkomponenten, die ab einem bestimmten Injektionsvolumen detektiert werden. Die Empfindlichkeit der HPLC-Methode kann dann nicht mehr durch Erhöhung des Injektionsvolumens verbessert werden.

Als Bestimmungsgrenze wird einerseits nach den Empfehlungen von FDA und EMA die niedrigste Konzentration der Kalibrierungsgeraden definiert [92,93]. Nach einem anderen Denkansatz wird der niedrigste Standard der Kalibrationsgerade im Verhältnis 1:2 weiterverdünnt und als Fünffachbestimmung analysiert. Als Bestimmungsgrenze wird dann diejenige Konzentration definiert, die noch mit hinreichender Präzision (CV 20%) und Richtigkeit (20%) bestimmt werden kann.

3.7.3 Selektivität (Selectivity)

Leerplasma bzw. Leerserum von 6 verschiedenen gesunden Freiwilligen wurde einzeln und in gepoolter Form analysiert.

Frei von Interferenzen wurde definiert als Abwesenheit von interferierenden Komponenten mit einer Signalstärke größer 20% des LOQ für den jeweiligen Analyten bzw. 5% für den internen Standard Minocyclin bei der Analyse von Tigecyclin.

3.7.4 Linearität (Linearity)

Die Kalibrierfunktion beschreibt den Zusammenhang zwischen der Konzentration eines Analyten und dem resultierenden Detektorsignal. Der für die Ermittlung der Kalibrationskurve gewählte Konzentrationsbereich sollte die in Patientenproben zu erwartenden Konzentrationen abdecken.

Zur Bestimmung der Linearität wurden in Poolplasma von gesunden Probanden mindestens 6 Kalibratoren geeigneter Konzentrationen vorbereitet.

Hierzu wurden aus den jeweiligen Stammlösungen Vorverdünnungen hergestellt, die im Verhältnis 1:20 für die Betalaktame und Linezolid, sowie 1:50 für Tigecyclin mit Poolplasma versetzt wurden.

Die nachfolgende Tabelle 10 zeigt zwei Schemata zur Herstellung der Verdünnungsreihen.

Tab. 10: Verdünnungsschemata zur Herstellung von Kalibratoren; PI=Plasma

Schema 1:

Konz. (mg/l):	5000	5000	5000	2000	1000	400	200
Volumen (µl):	200	100	40	50	50	50	50
Wasser (µl):	300	400	460	450	450	450	450
Res. Konz. (mg/l):	2000	1000	400	200	100	40	20
1:20 mit PI (mg/l):	100	50	20	10	5	2	1
Abk.:	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7

Schema 2:

Konz. (mg/l):	5000	5000	5000	5000	600	200	60	20
Volumen (µl):		100	60	20	100	100	100	100
Wasser (µl):		150	440	480	900	900	900	900
Res. Konz. (mg/l):		2000	600	200	60	20	6	2
1:20 mit PI (mg/l):	300 ¹⁾	100	30	10	3	1	0,3	0,1
Abk.:	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8

1) 30 µl Stammlösung 5000 mg/l + 470 µl Plasma (1:16,7)

Der Zusammenhang zwischen Detektorsignal und Konzentration des Analyten wurde mittels linearer Regression durch eine Geradengleichung $y = mx + b$ bzw. $y = mx$ beschrieben (Wichtungsfaktor $1/y^2$). Die Linearität der Gerade wurde mittels des Korrelationskoeffizienten r beurteilt. Nach den Vorgaben der FDA bzw. der EMA sollte die über die Geradengleichung berechnete Konzentration eines Kalibrators maximal 15% von der nominalen Konzentration abweichen. Für die Bestimmungsgrenze LOQ ist eine maximale Abweichung von 20% zulässig [92,93].

Zusätzlich wurde bei jedem Ansatz zur Bestimmung der Linearität auch eine Quantifizierung über die Methode der Einpunktkalibrierung validiert. Hierzu wurde jeweils das Detektorsignal eines Kalibrators mit mittlerer Konzentration als Einzelkalibrierungspunkt verwendet. Für Ertapenem wurden beispielsweise die Kalibratoren zu 50 mg/l, 20 mg/l, 10 mg/l und 5 mg/l als Einpunktkalibratoren untersucht. Die Konzentrationen der übrigen Kalibratoren wurden dann jeweils aus dem Verhältnis der Detektorsignale der Kalibratoren und dem des Einpunktkalibrators errechnet. Auch hier wurden analog der Quantifizierung mittels Kalibrationskurve dieselben Grenzen für Richtigkeit und Präzision festgelegt.

3.7.5 Richtigkeit (Accuracy)

Die Richtigkeit einer analytischen Methode beschreibt die Abweichung der über die Kalibrierfunktion bestimmten Werte von der nominalen Konzentration. Laut den Vorgaben von FDA und EMA sollten hierzu die Mittelwerte von mindestens fünf Bestimmungen bei mindestens drei verschiedenen Konzentrationen innerhalb des Kalibrationsbereichs mit der nominalen Konzentration der gewählten Qualitätskontrollen verglichen werden [92,93]. Die Bestimmung muss in Matrix erfolgen. Der Mittelwert (MW) der prozentualen Abweichung vom Nominalwert (NW) ist das Maß für die Richtigkeit. Sie wird auch als Bias bezeichnet und nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Bias [\%]} = \frac{MW - NW}{NW} \cdot 100\%; \text{ MW} = \text{Mittelwert der Bestimmungen}; \text{ NW} = \text{Nominalwert.}$$

Der Bias sollte maximal 15% betragen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Richtigkeit bei der Validierung für jede untersuchte Substanz im Rahmen von mindestens fünf Doppelbestimmungen der Kalibratoren für jede einzelne Standardkonzentration errechnet.

3.7.6 Präzision (Precision)

Die Präzision bezeichnet die Streuung der Konzentration von mehrfach analysierten Proben um den Mittelwert. Als Maß für die Präzision dient der Variationskoeffizient CV (Coefficient of Variation), der die relative Standardabweichung beschreibt. Man unterscheidet zwischen Intra-Assay-Präzision und Inter-Assay-Präzision. Die Intra-Assay-Präzision beschreibt die Streuung der Messwerte innerhalb eines analytischen Laufs. Die Inter-Assay-Präzision hingegen beschreibt die Streuung der Messwerte zwischen verschiedenen analytischen

Läufen. Intra-Assay-Präzision und Inter-Assay-Präzision wurden im Rahmen der mindestens fünffachen Doppelbestimmungen der Kalibratoren für jede untersuchte Substanz ermittelt. Der für jede Konzentration berechnete Variationskoeffizient soll hierbei einen Wert von 15% nicht überschreiten. Lediglich an der Bestimmungsgrenze wird ein Wert von 20% toleriert.

3.7.7 Wiederfindung (Recovery)

Als Wiederfindungsrate bezeichnet man das Verhältnis aus dem Detektorsignal einer aufgearbeiteten Probe gespikter Matrix zum Detektorsignal einer Probe identischer Konzentration in wässriger Lösung, die keinem Aufarbeitungsvorgang unterzogen wurde. Die Wiederfindung wurde im Rahmen der Methodvalidierung ermittelt. Bei mindestens 5 Doppelbestimmungen von Kalibratoren in Matrix zur Überprüfung der Linearität wurden stets auch Standards verschiedener Konzentration in wässriger Lösung mitgeführt. Durch Vergleich der Peakflächen der wässrigen Standards und der Kalibratoren in Matrix wurde die Wiederfindung für alle Kalibratoren in Matrix ermittelt.

3.7.8 Stabilität (Stability)

Während der Lagerung, Aufarbeitung und während der Messung kann sich die Arzneistoffkonzentration innerhalb einer Probe z.B. aufgrund von Instabilitäten ändern. Deshalb wurde die Stabilität der untersuchten Antibiotika in Plasma und Injektionslösung unter verschiedenen Bedingungen charakterisiert. Die Stabilität wurde in Plasma bzw. Serum bei Raum- und Kühlschranktemperatur über einen Zeitraum von 8 h überprüft. Hierzu wurden jeweils zwei verschiedene Konzentrationen des Analyten gewählt. Zusätzlich wurde auch die Stabilität in gepuffertem Plasma bzw. Serum bei 37°C über mindestens 1 h evaluiert, da die Bestimmung der freien Konzentration unter diesen Bedingungen erfolgt. Die Pufferung des Plasmas bzw. Serums erfolgte analog der Aufarbeitung der Proben für die Bestimmung der freien Konzentration mit 3 M K_2HPO_4 pH 7,50 bzw. auch mit TRIS-Puffer für pH-Werte > 8.

Während der verschiedenen Untersuchungszeiträume wurden in regelmäßigen Abständen Aliquote der Untersuchungslösung entnommen und analysiert. Typische Entnahmezeitpunkte waren nach 0; 1; 2; 4; 8 h für Kühlschrank- und Raumtemperatur. Bei 37°C erfolgte die Probennahme jeweils nach 0; 0,25; 0,5 und 1 h. Die gewonnenen Aliquote von 200 µl wurden jeweils mit 200 µl 50 mM Natriumphosphatpuffer abgepuffert (resultierender pH-Wert 6,7) und bis zur HPLC-Analytik bei -20°C zwischengelagert, wobei die Dauer der Lagerung lediglich bis zum Abschluss des Versuchs ca. 8 h betrug. Die Stabilität der Injektionslösung bei der Temperatur des Autosamplers von 6°C wurde durch wiederholte Messung (typischerweise am Folgetag) bereits analysierter Proben ermittelt. Als Stabilitätsgrenze wurde stets eine Konzentration von mindestens 90% gegenüber der Ausgangskonzentration zum Zeitpunkt 0 h definiert.

3.8 Bestimmung der totalen Konzentration

3.8.1 Probenvorbereitung Betalaktame

In einem 1,5 ml Cup wurden 200 µl 50 mM NaH₂PO₄, pH 6,0, vorgelegt. Anschließend wurden 200 µl Serum oder Plasma der zu untersuchenden Probe zugesetzt. Durch Vortexen für 1-2 Sekunden wurde die Mischung homogenisiert. Zur Ausfällung der Matrixeiproteine wurden 400 µl Acetonitril hinzugefügt. Anschließend wurde durch Vortexen für 1-2 Sekunden wieder homogenisiert. Die Proben wurden dann für 15 min im Kühlschrank bei ca. 8°C inkubiert, um eine vollständige Ausfällung der Matrixeiproteine sicherzustellen. Nach der Inkubationsphase wurden die Probencups nochmalig durch Vortexen für 1-2 Sekunden gemischt. Durch die anschließende Zentrifugation der Cups bei 10000 g über 2 min (Zentrifuge Hettich Mikro 220 R) wurden die ausgefällten Matrixproteine abgetrennt. Der Überstand wurde in 4,5 ml PP-Röhrchen mit 2 ml Dichlormethan dekantiert. Die Röhrchen wurden 10 min überkopf geschwenkt (REAX 2 Mischer), um das Acetonitril aus der wässrigen Phase in die Dichlormethanphase zu extrahieren. Zur vollständigen Phasentrennung wurden die Röhrchen nachfolgend für 20 min bei 4500 rpm (3850 g) zentrifugiert (Megafuge 1.0R). Aus dem wässrigen Überstand wurden 100 µl abpipettiert und in ein HPLC-Glasvial überführt.

Da die verfügbare Blutmenge von Intensivpatienten begrenzt ist, wurden auch Varianten mit weniger Plasma genutzt. Es wurden 50 µl Plasma mit 250 µl 25 mM NaH₂PO₄ oder 100 µl Plasma mit 200 µl 25 mM NaH₂PO₄ gepuffert und mit 500 µl Acetonitril enteipet. Die Extraktion des Acetonitrils erfolgte mit 1,3 ml Dichlormethan.

3.8.2 Probenvorbereitung Linezolid

100 µl Plasma wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Cup vorgelegt. Zur Ausfällung der Matrixproteine wurden 100 µl 5% TCA/MeOH (3:1) oder 100 µl 7% PCA zugesetzt. Durch Vortexen für 1-2 Sekunden wurde die Mischung homogenisiert. Die Proben wurden anschließend über 15 min im Kühlschrank bei ca. 6°C inkubiert, um eine vollständige Ausfällung der Proteine zu gewährleisten. Nach der Inkubation wurden die Proben nochmalig durch Vortexen für 1-2 Sekunden gemischt. Danach erfolgte zur Abtrennung der ausgefällten Matrixproteine eine Zentrifugation der Cups bei 10000 g über 2 min (Zentrifuge Hettich Mikro 22). Vom Überstand nach der Zentrifugation wurden 75 µl abgenommen und zur HPLC-Analytik in ein HPLC-Glasvial pipettiert.

3.8.3 Probenvorbereitung Tigecyclin

Eiweißfällung mit Acetonitril (analog Betalaktame):

In einem 1,5 ml Cup wurden 25 µl 1 M HCl vorgelegt. Anschließend wurden 350 µl Plasma zugesetzt. Durch Vortexen für 1-2 Sekunden wurde die Mischung homogenisiert. Zur Ausfällung der Matrixeigweiße wurden 600 µl Acetonitril hinzugefügt. Anschließend wurde durch Vortexen für 1-2 Sekunden wieder homogenisiert. Die Proben wurden danach für 15 min im Kühlschrank bei ca. 8°C inkubiert, um eine vollständige Ausfällung der Matrixeigweiße sicherzustellen. Nach der Inkubationsphase wurden die Probencups nochmalig durch Vortexen für 1-2 Sekunden gemischt. Durch die anschließende Zentrifugation der Cups bei 14000 g über 2 min (Zentrifuge Hettich Mikro 22) wurden die ausgefallten Matrixproteine abgetrennt. Der Überstand wurde in 4,5 ml PP-Röhrchen dekantiert, in denen 2 ml Dichlormethan vorgelegt waren. Die Röhrchen wurden 10 min überkopf geschwenkt (REAX 2 Mischer). Dabei wurde das Acetonitril aus der wässrigen Phase in die Dichlormethanphase extrahiert. Zur vollständigen Phasentrennung wurden die Röhrchen nachfolgend für 20 min bei 4500 rpm (3850 g) zentrifugiert (Megafuge 1.OR). Aus dem wässrigen Überstand wurden 100 µl abpipettiert und zur Durchführung der HPLC-Analytik in ein HPLC-Glasvial überführt.

Eiweißfällung mit TCA/MeOH (analog Linezolid):

Zu 100 µl Plasma in einem 1,5 ml Cup wurden zur Eiweißfällung 100 µl 5% TCA/MeOH (3:1) pipettiert. Durch Vortexen für 1-2 Sekunden wurde die Mischung homogenisiert. Die Proben wurden anschließend über 15 min im Kühlschrank bei ca. 6°C inkubiert, um eine vollständige Ausfällung der Plasma- bzw. Serumproteine zu gewährleisten. Nach der Inkubation wurden die Proben nochmalig durch Vortexen für 1-2 Sekunden gemischt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Cups bei 10000 g über 2 min (Zentrifuge Hettich Mikro 220 R) zur Abtrennung der ausgefallten Matrixproteine. Vom Überstand nach der Zentrifugation wurden 75 µl abgenommen und zur HPLC-Analytik in ein HPLC-Glasvial pipettiert.

3.8.4 Quantifizierung

Die Quantifizierung der totalen Konzentration erfolgte in der Routine über eine Einpunktkalibrierung. Hierzu wurden bei jedem analytischen Lauf pro 12-15 Proben drei Standards in Matrix mit mittlerer Konzentration des Analyten mitgeführt. Zusätzlich wurden jeweils zwei Kontrollen mit hoher bzw. niedriger Konzentration in Matrix mitgeführt, um im Sinne einer Inprozesskontrolle Präzision und Richtigkeit zu überprüfen. Daneben wurden jeweils mindestens zwei Referenzstandards mit mittlerer Konzentration des Analyten in wässriger Lösung analysiert. Diese Referenzstandards dienten zur Berechnung der Wiederfindung des Analyten aus den Kontrollen und Standards.

3.9 Bestimmung der freien Konzentration

Die freie Konzentration im Plasma wurde durch Ultrafiltration bestimmt. In der vorliegenden Arbeit kamen Ultrafiltrationseinheiten mit einer Ausschlussgrenze der Molekülmasse von 10 bzw. 30 kDa zum Einsatz.

3.9.1 Wechselwirkungen mit der Ultrafiltrationseinheit

Zur Untersuchung der unspezifischen Adsorption der untersuchten Betalaktame an die Ultrafiltrationseinheit, wurden Verdünnungsreihen der Antibiotika in einem Konzentrationsbereich von 100 – 1 mg/l in 100 mM NaH₂PO₄, pH 7,4, hergestellt und 10 min ultrafiltriert bei 1000 g. Im Ultrafiltrat wurde die Konzentration des Antibiotikums bestimmt. Durch den Vergleich der Konzentration im Ultrafiltrat mit der Ausgangskonzentration der Lösung vor Ultrafiltration wurde die Wiederfindung (Recovery) berechnet.

Für Linezolid in Kombination mit Nanosep Ultrafiltern wurden zusätzlich die Filtermembranen mit 50 µl einer wässrigen Lösung von 5% Tween 80 benetzt und die Filtrationseinheiten anschließend für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert (Zentrifuge Hettich Mikro 22). Das Tween 80 wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 10000 g mit 200 µl 100 mM NaH₂PO₄, pH 7,4, herausgewaschen und das Ultrafiltrat mit Zellstoff aus dem Auffanggefäß entfernt. Bei den Versuchen mit den Ultrafiltrationseinheiten Vivacon, Amicon Ultra, Centrifree und Microcon wurde keine Vorbehandlung der Filter mit Tween durchgeführt. Die in den Versuchslösungen eingesetzten Konzentrationen von Linezolid lagen im Bereich von 100 – 0,1 mg/l.

Bei Tigecyclin wurde präliminar auch die Adsorption an Kunststoffoberflächen durch Verdünnungen von Tigecyclin zu 50; 5; 0,5 und 0,05 mg/l in verschiedenen Lösungsmitteln wie Wasser, Mischungen aus Wasser und Methanol, isotonische Kochsalzlösung, 0,1 M Salzsäure und TGC-Standardeluent mit und ohne SOS überprüft. Die Adsorption von Tigecyclin an der Ultrafiltrationsmembran der Nanosep Omega 10 kDa bzw. der Vivacon 30 k Ultrafiltrationseinheiten wurde untersucht, indem zuerst die Ausgangskonzentration im Filtereinsatz nach 10-minütiger Inkubation bestimmt wurde. Anschließend wurden durch Vergleich der Ausgangskonzentration im Filtereinsatz mit der Konzentration im Ultrafiltrat die Adsorptionsverluste an der Membran quantifiziert. Die Adsorptionsversuche wurden mit einer Verdünnung von Tigecyclin 1 mg/l in 100 mM NaH₂PO₄ pH 7,4 bzw. 100 mM HEPES pH 7,5 durchgeführt.

3.9.2 Probenvorbereitung

Die Aufarbeitung der Proben zur Bestimmung der freien Konzentration erfolgte für alle untersuchten Antibiotika weitgehend identisch. Zur Bestimmung der Betalaktam-Antibiotika und Tigecyclin in der Routine wurden Nanosep Omega 10k/30k Ultrafiltrationseinheiten verwendet. Zur Bestimmung der freien Konzentration von Linezolid kam in der Routine die Vivacon 30 k Filtereinheit zum Einsatz. In die Ultrafiltrationseinheiten wurden jeweils 10 µl Puffer (3 M M KH₂PO₄ pH 7,5 bzw. 2 M HEPES pH 7,5) vorgelegt. Anschließend wurden 300 µl Plasma bzw. Serum hinzugefügt. Durch Vortexen für 1-2 Sekunden wurde die Lösung homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 37° C inkubiert. Die Inkubation erfolgte in der Kühlzentrifuge Eppendorf 7417 R bei niedriger g-Zahl (100 g). Bei dieser niedrigen Zentrifugationskraft von 100 g erfolgte noch keine Ultrafiltration. Die Zentrifuge war vorher durch Leerbetrieb bei 1000 g über mindestens 45 min auf Solltemperatur erwärmt worden. Zur Durchführung der Ultrafiltration wurde die g-Zahl unter Beibehaltung einer Temperatur von 37° C für 20 min auf 1000 g erhöht. Hierbei entstand ein eiweißfreies Ultrafiltrat mit einem Volumen von ca. 60-90 µl, das quantitativ in HPLC-Vials überführt wurde.

Zur Untersuchung der freien Konzentration von Tigecyclin wurden dem Ultrafiltrat 50 µl interner Standard (Minocyclin 1 mg/l in 0,2 M HCl mit 0,2% Ascorbinsäure) zugesetzt. Aus der Verdünnung des internen Standards Minocyclin wurde das ursprüngliche Volumen des Ultrafiltrats (V_{UF}) berechnet.

$$V_{UF} = 50 \cdot (PF_{MIN,IS} / PF_{MIN,UF}) - 50 \text{ (}\mu\text{l)}$$

dabei sind:

- $PF_{MIN,IS}$: Peakfläche von Minocyclin in der iS-Lösung
- $PF_{MIN,UF}$: Peakfläche von Minocyclin in der Lösung von internem Standard plus Ultrafiltrat
- 50: das Volumen (µl) der iS-Lösung

3.9.3 Quantifizierung

Die Quantifizierung der freien Konzentration erfolgte analog der Bestimmung der totalen Konzentration in der Routine über eine Einpunktkalibrierung bei mittlerer Konzentration. Hierzu wurden mindestens zwei wässrige Referenzstandards mit einer bekannten mittleren Konzentration des Analyten mitgeführt. Zusätzlich wurde je eine Kontrolle mit hoher bzw. niedriger Konzentration in Matrix als Inprozesskontrollen mit aufgearbeitet und analysiert. Die Herstellung der Standards und Kontrollen wurde bereits dargelegt.

3.9.4 Proteinbestimmung

Um die Integrität der Membran der Ultrafiltrationseinheiten zu überprüfen, wurde stichprobenartig mehrmals der Proteingehalt im Ultrafiltrat bestimmt. Protein wurde nach der Methode von Bradford bestimmt mit Hilfe der Gebrauchsanleitung der Fa. Serva (Heidelberg).

Der Assay beruht auf der Verschiebung des Coomassie®-Absorptionsmaximums von 470 nm nach 595 nm durch Proteinbindung in saurem Medium. Die Farbreaktion ist abhängig vom Gehalt an aromatischen und basischen Aminosäuren. Somit ergeben sich unterschiedlich starke Absorptionen bei verschiedenen Proteinen. Für die Standardverdünnungsreihe wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet.

Nachfolgend Reagenzien und das Flussschema für die Durchführung:

Reagenzien:

Bradford-Reagenz 5-fach (Fa. Serva, Heidelberg) im Kühlschrank lagern und unverdünnt einsetzen. Vor Gebrauch mischen durch Invertieren der Flasche (nicht schütteln) und auf Raumtemperatur bringen.

Kalibrierungsreihe 2,5-50 mg/l (die Kurve flacht sich nach 30 mg/l ab).

BSA-Stammlösung 2 g/l: 100 mg BSA in 50 ml Wasser lösen und Aliquots von 50 µl bei -20°C lagern. Eppendorf-Cups mit "BSA 2 g/l" und "Datum" beschriften.

Gebrauchslösung BSA 50 mg/l: 25 µl BSA 2000 mg/l mit 975 µl Wasser verdünnen

Durchführung

1. Mikrotiterplatte mit flachem Boden bereit legen.
2. BSA 50 mg/l nach folgendem Schema in Reihe 1 und 2 (Doppelbestimmung) pipettieren.
3. 20 µl Probe in die restlichen Vertiefungen pipettieren und auf 200 µl mit Wasser auffüllen.
4. 50 µl Bradford-Reagenz unverdünnt zugeben (Multipette).
5. In das TECAN-Photometer setzen, mischen und messen bei 595 nm.

Je nach Proteingehalt müssen die Proben evtl. vorverdünnt werden, oder es muss mehr Probenvolumen eingesetzt werden. Die Belegung der Mikrotiterplatte findet sich in Tab. 11.

Tab. 11: Schema einer Mikrotiterplatte zur Durchführung der Proteinbestimmung nach Bradford.
 K: Kalibrierlösungen P: Probelösungen

BSA 50 (μ l)	H ₂ O (μ l)	Konz. (mg/l)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	200	0,0	A	K	K	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
10	190	2,5	B	K	K	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
20	180	5,0	C	K	K	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
40	160	10,0	D	K	K	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
80	120	20,0	E	K	K	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
120	80	30,0	F	K	K	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
160	40	40,0	G	K	K	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
200	0	50,0	H	K	K	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P

3.10 Untersuchungen zur Abhängigkeit der Proteinbindung von den experimentellen Bedingungen

Im Blut liegen physiologische Bedingungen (37°C und pH 7,4) vor, die bei der In-vitro-Bestimmung der Proteinbindung mittels Ultrafiltration nicht auf einfache Weise einzuhalten sind. In Vorversuchen wurde deshalb der Einfluss von Temperatur, pH-Wert und Zentrifugationskraft auf die Proteinbindung untersucht.

3.10.1 Abhängigkeit der Proteinbindung von der Temperatur

Serum oder Plasma wurde mit mindestens 2 verschiedenen Konzentrationen des zu untersuchenden Antibiotikums dotiert, wobei in Anlehnung an während einer Therapie zu erwartende Blutspiegel jeweils eine hohe und eine niedrige Konzentration gewählt wurden. So wurde zum Beispiel Ertapenem in Konzentrationen von 16 und 80 mg/l analysiert. Zur Dotierung wurden stets aus den jeweiligen Stammlösungen hergestellte wässrige Vorverdünnungen 1:20 mit Serum oder Plasma verdünnt. Die Pufferung der Probelösungen erfolgte analog der beschriebenen Routinemethode (Kapitel 3.9.2)

Die Temperatur während der Ultrafiltration wurde im Bereich von 4°C bis 37°C variiert. Typische Temperaturen waren hierbei 4, 15, 25 und 37°C. Um ein adäquates Ultrafiltrationsvolumen von ca. 70-80 µl zu erhalten, wurde die Zentrifugationsdauer bei Temperaturen unter 25°C entsprechend verlängert, sodass die Ultrafiltration bei 4°C schließlich über einen Zeitraum von 40 min durchgeführt wurde.

Damit die Solltemperatur während des Versuchs gewährleistet war, wurden Zentrifuge und Probe vor der Ultrafiltration entsprechend temperiert.

Die Zentrifuge wurde durch Leerbetrieb bei 1000 g über mindestens 45 min auf die jeweilige Solltemperatur gebracht. Zur Kontrolle der Solltemperatur wurden zwei 2,2 ml Cups mitgeführt, die mit jeweils ca. 1,5 ml Glycerol gefüllt waren. In diesen wurde vor Beginn der Zentrifugation der Proben die Solltemperatur der Zentrifuge mit einem Thermometer überprüft.

Die Proben wurden mindestens 10 min bei der entsprechenden Temperatur vorinkubiert, bei Temperaturen unter Raumtemperatur in einem gekühlten Wasserbad, bei Raumtemperatur und höher durch Zentrifugation bei 100 g über 10 min. Bei dieser niedrigen Zentrifugationskraft von 100 g erfolgte noch keine Filtration.

Die Messung der freien Konzentration im erhaltenen Ultrafiltrat erfolgte entsprechend der beschriebenen Routinemethoden.

3.10.2 Abhängigkeit der Proteinbindung vom pH-Wert

Die Versuche zur Abhängigkeit der Proteinbindung der untersuchten Antibiotika vom pH-Wert des Serums bzw. Plasmas wurden in Analogie zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit durchgeführt.

Der pH-Wert wurde in einem Bereich von pH 7,0 – pH 8,5 variiert. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit Hilfe verschiedener Pufferlösungen, wobei, analog der Standardmethode zur Bestimmung der freien Konzentration, einem Probenvolumen von 300 µl jeweils 10 µl Pufferlösung zugesetzt wurden. Zur pH-Einstellung wurde für den pH-Bereich 7-8 ein 3 M K_2HPO_4 Puffer eingesetzt, der mit o-Phosphorsäure 85% auf den benötigten pH-Wert eingestellt wurde. Der pH-Bereich 7,5-8,5 wurde mittels 3 M TRIS-Puffer bzw. 2 M HEPES-Puffer (HEPES auch zur Einstellung auf pH 7,5) abgebildet, der mit 10 M bzw. 1 M NaOH oder 37% HCl bzw. 1 M HCl auf den benötigten pH-Wert eingestellt wurde.

Die in der Probe resultierende Konzentration der Puffer lag somit jeweils bei 0,07 – 0,1 M. Typische pH-Messpunkte waren pH 7,0; pH 7,5; pH 8,0 und pH 8,5. Zusätzlich wurde auch ungepuffertes Plasma bzw. Serum mitgeführt, dessen pH nach dem Auftauen bei 7,9-8,0 lag. Die pH-Werte der gepufferten Serum- bzw. Plasmaproben wurden vor der Ultrafiltration überprüft und dokumentiert.

HEPES- und TRIS-Puffer zeigen eine Temperaturabhängigkeit bzgl. der resultierenden pH-Werte [94]. Mit steigender Temperatur sinken die pH-Werte um 0,140 bei HEPES bzw. 0,310 bei TRIS pro 10°C Anstieg. In den Serum- oder Plasmaproben war der Unterschied zwischen Raumtemperatur (22-23°C) und 37°C geringer, nämlich 0,1 bei HEPES und 0,2 bei TRIS. Dies wurde bei Pufferung der Proben mit diesen Puffersubstanzen entsprechend berücksichtigt, indem die pH-Werte der Puffer bei Raumtemperatur so moduliert wurden, dass während der Ultrafiltration bei 37°C der gewünschte pH-Wert erreicht wird. Nach der Ultrafiltration wurde im Überstand nochmalig der pH-Wert kontrolliert. Aufgrund der beschriebenen Temperaturabhängigkeit des pH-Werts bei Pufferung mit HEPES bzw. TRIS wurde die pH-Bestimmung im Heizblock bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt.

3.10.3 Abhängigkeit der Proteinbindung von der Zentrifugalkraft

Auch die Versuche zur Bestimmung der Abhängigkeit der Proteinbindung von der Zentrifugalkraft während der Ultrafiltration wurden analog den Versuchen zur Bestimmung der Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert durchgeführt. Die Probenaufarbeitung und Quantifizierung erfolgte entsprechend der beschriebenen Routinemethode zur Bestimmung der freien Konzentration. Die Zentrifugalkraft während der Ultrafiltration wurde in einem Bereich von 500 –10000 g variiert. Typische Messpunkte waren hierbei 500, 1000, 1500, 2000, 3000 und 10000 g. Die Dauer der Ultrafiltration wurde jeweils angepasst, um ein Filtratvolumen von ca. 70-80 µl zu erhalten. So betrug die Dauer der Ultrafiltration bei

10000 g ca. 7 min, während bei 1000 g ca. 20 min Ultrafiltration erforderlich waren, um das gewünschte Volumen an Ultrafiltrat zu erhalten.

3.10.4 Bindungsversuche zu Tigecyclin in Albuminlösung

Hierzu wurde eine Albuminlösung mit physiologischer Albuminkonzentration von 4,2% in 70 und 100 mM NaH₂PO₄ pH 7,40 bzw. 70 und 100 mM HEPES pH 7,50 hergestellt. Um den Effekt von Calcium auf das Ausmaß der Bindung von Tigecyclin an Albumin zu untersuchen, wurde den Albumin-Pufferlösungen bei 6 Ansätzen eine wässrige Calciumchloridlösung 0,1 M im Verhältnis 1:40 zu einer resultierenden Konzentration von 2,5 mM zugesetzt. Um den Effekt von polyvalenten Kationen komplett auszuschalten, erfolgte in 3 Versuchen auch ein Zusatz von EDTA-Na-Lösung 0,1 M pH 7,40 als Chelator im Verhältnis 1:20 zu einer Endkonzentration von 5,0 mM. Diese Albumin-Puffer-Lösungen wurden mit entsprechenden Tigecyclin-Vorverdünnungen zu Konzentrationen von 0,1; 0,3; 1; 3; 10 und 100 mg/l dotiert. Anschließend wurden die dotierten Lösungen für 10 min unter den oben beschriebenen experimentellen Bedingungen ultrafiltriert. Im Ultrafiltrat wurde analog der obigen Beschreibung die freie Konzentration quantifiziert.

3.11 Untersuchungen an Patienten

Die Methoden wurden angewandt zur Analyse von Plasmaproben aus einer prospektiven, multizentrischen Beobachtungsstudie am Universitätsklinikum Regensburg (Antragsnummer: 98/35) und der Charité Universitätsmedizin Berlin - Campus Benjamin Franklin (Antragsnummer: EA4/028/13). Die zuständigen Ethikkommissionen der Universität Regensburg und der Charité Universitätsmedizin Berlin – Campus Benjamin Franklin haben ihre Zustimmung zur weiteren Untersuchung von Blutproben erteilt, die im Zuge der Routinebehandlung anfielen.

Die Studie wurde im Zeitraum von Januar bis Juni 2014 mit Patienten der folgenden Intensivstationen durchgeführt:

- Station 92, Internistische Intensivstation der Medizinischen Klinik I, Universitätsklinikum Regensburg, Franz-Josef-Strauß-Allee 11, 93053 Regensburg
- Station 44i, Interdisziplinäre Intensivstation der Klinik für Anästhesie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin, Charité Universitätsmedizin Berlin - Campus Benjamin Franklin, Hindenburgdamm 30, 12203 Berlin.

Die Auswahl der Patienten erfolgte über regelmäßige Kontrolle der Belegungslisten und Patientenakten. Beide Intensivstationen sind als Maximalversorger einzustufen (tertiary care). Der fachliche Schwerpunkt der Intensivstationen lag auf gastroenterologischen, hepatologischen und Infektionskrankheiten (Regensburg), sowie auf der postoperativen Versorgung von großen allgemein- oder neurochirurgischen Eingriffen (Berlin). Ungeachtet

der speziellen Fachrichtung wurden jedoch auf beiden Stationen je nach Bedarf in der Belegung der Klinik auch Patienten anderer Fachdisziplinen intensivmedizinisch behandelt.

Einschlusskriterien

- Alter \geq 18 Jahre
- stationärer Aufenthalt auf Intensivstation
- schriftliche Einverständniserklärung oder Einwilligung mittels Behandlungsvertrag
- Behandlung mit einem oder mehreren der untersuchten Antibiotika
- brauchbarer intravenöser/ intraarterieller Zugang

Ausschlusskriterien

- fehlende Möglichkeit eine ausreichende Anzahl an Blutproben zu erhalten
(z.B. aufgrund bevorstehender Verlegung oder Tod des Patienten)

3.11.1 Entnahme, Handhabung und Lagerung der Blutproben

Bei der Blutprobennahme wurde eine „sparse-sampling“-Strategie angewendet. Das heißt, die Gewinnung der Blutproben erfolgte aus Restblut, das im Rahmen von Blutentnahmen zur Routinediagnostik anfiel. Hauptsächlich handelte es sich dabei um arterielles Blut von Blutgasbestimmungen. Soweit möglich, wurden ein oder zwei Dosierungsintervalle mit insgesamt drei bis vier Blutproben erfasst, die nach Möglichkeit über das Dosierungsintervall gleich verteilt sein sollten. Sofern möglich wurde eine Probe 0,5-1 h nach Infusionsende (Spitzenkonzentrationen), eine Probe in der Mitte des Dosierungsintervalls und eine Probe kurz vor der nächsten Gabe (Talspiegel) genommen. Bei allen Proben wurde die genaue Uhrzeit der Entnahme im CRF notiert.

Die Patientenproben wurden nach maximal vier Stunden Lagerung bei 4°C im Kühlschrank zehn Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Das dadurch von den korpuskulären Bestandteilen des Blutes abgetrennte Serum bzw. Plasma wurde anschließend bei -70 °C gelagert und zur weiteren Analyse auf Trockeneis zum Labor (Lehrstuhl für Pharmakologie der Universität Regensburg, Universitätsstraße 31, 93053 Regensburg) transportiert.

3.11.2 Medikation

Die Auswahl der antiinfektiven Therapie erfolgte durch den zuständigen Stationsarzt. Sofern von ärztlicher Seite nicht anders angeordnet, wurden die Antiinfektiva auf beiden Intensivstationen als Kurzinfusion über 30 Minuten verabreicht. Beginn, Dauer und Dosis der Infusion wurden dokumentiert. Die Auswahl der Dosierung erfolgte ebenfalls durch den zuständigen Stationsarzt. Die eingesetzten Dosierungen sind in nachfolgender Tabelle dargestellt.

Tab. 12: Eingesetzte Dosierungen der untersuchten Antibiotika

Antibiotikum	Dosierung
Ceftazidim (CAZ)	2-3 x 2 g pro Tag
Ertapenem (ETP)	1x 1 g pro Tag
Ceftriaxon (CRO)	1 x 2 g pro Tag
Meropenem (MEM)	2-3 x 0,5 – 1 g pro Tag
Piperacillin (PIP)	2-3 x 4 g/0,5 g pro Tag
Linezolid (LZD)	2 x 600 mg pro Tag
Tigecyclin (TGC)	2 x 50 mg pro Tag

3.11.3 Pharmakokinetische Berechnungen

Zur Berechnung der pharmakokinetischen Parameter wurde Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight/Certara, St Louis, MO, USA) verwendet. Für die Berechnungen wurde ein Ein-Kompartiment-Modell mit Invasionskinetik nullter Ordnung und einer Eliminationskinetik erster Ordnung (Wichtung $1/\gamma^2$) herangezogen, wobei mindestens drei Messwerte zur Verfügung stehen mussten.

3.11.4 Statistische Auswertung

Nicht-parametrische (Median, Abstand, Interquartilsabstand [IQR], Perzentilen) oder parametrische (Mittelwert, Konfidenzintervall), deskriptive, statistische Verfahren wurden, sofern angemessen, bei der Auswertung demographischer, klinischer oder PK/PD-bezogener Daten angewandt. Für die statistische Auswertung wurde Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) herangezogen.

4 Ergebnisse

4.1 Chromatographisches Trennsystem

Für die Bestimmung der Proben aller Matrices wurde die isokratische Trennung an reversed-phase Kieselgel mit Mischungen aus Acetonitril und Phosphatpuffer gewählt.

4.1.1 Retentionsverhalten der Antibiotika

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde im Vorfeld die Retention der Betalaktam-Antibiotika in wässriger Lösung (Konzentration jeweils 50 mg/L) an verschiedenen C18-Säulen leicht unterschiedlicher Selektivität im pH-Bereich von 2,5-7 überprüft. Beispielhaft sollen hier die Vorversuche zum Retentionsverhalten von Ceftazidim, Ceftriaxon, Ertapenem, Meropenem und Piperacillin dargestellt werden.

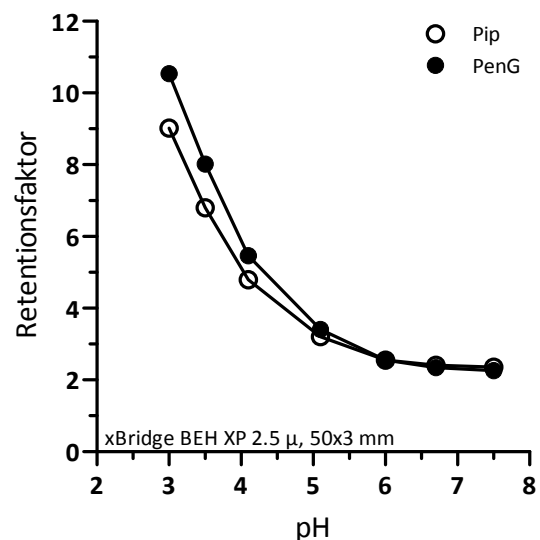
Ausgehend von 50 mM Ortho-Phosphorsäure, 50 mM Natriumdihydrogenphosphat und 10 M Natronlauge in der Mischung mit Acetonitril wurde der gewünschte pH-Wert des Eluenten eingestellt. In den Abb. 4 und 5 ist das Retentionsverhalten graphisch dargestellt. Für Piperacillin und Ertapenem erfolgte nur die Darstellung für den pH-Bereich 3 bzw. 4,5-7, da der Retentionsfaktor des Piperacillin bei $\text{pH} < 3$ und der Retentionsfaktor des Ertapenems bei $\text{pH} < 4$ einen extrem starken Anstieg zeigte.

Abb. 4 zeigt das typische Verhalten der Carbonsäuren Piperacillin und Penicillin G. Die Retention ist am geringsten bei pH-Werten über 6 und steigt dann steil an ab pH 5 und niedriger. Während Penicillin G bei pH-Werten ab 5 aufwärts mit Piperacillin koeluiert, ist es bei pH 3,5 und niedriger abgetrennt und eluiert später. Penicillin G könnte z.B. also nur bei sauren pH-Werten als interner Standard bei der Bestimmung von Piperacillin verwendet werden.

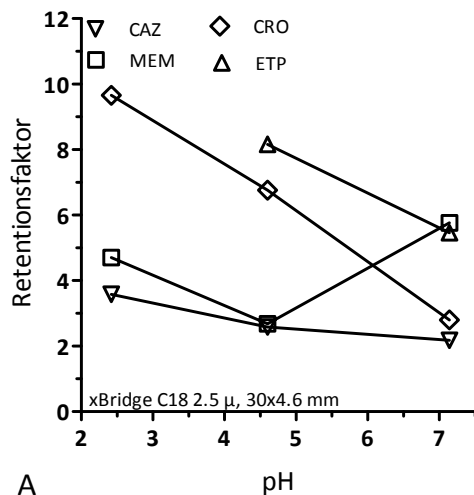
Abb. 4: Abhängigkeit des Retentionsfaktors von Piperacillin (PIP) und Penicillin G (PenG) vom pH-Wert der mobilen Phase an C18-Kieselgel ($n=1$).

Eluent: 50 mM H_3PO_4 /MeCN 1000:240, pH 3,00-7,00; Fluß 0,4 ml/min

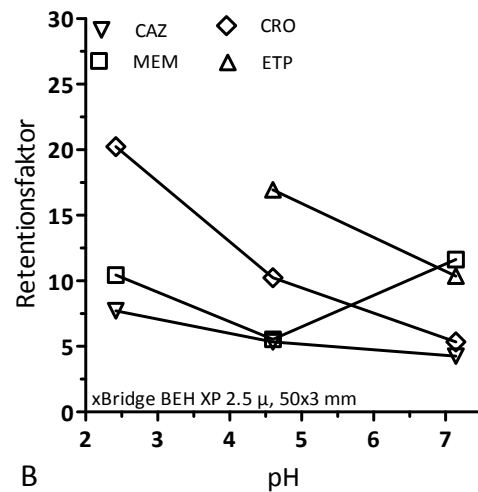
Säule: XBridge C18 BEH 2,5 μ , 50x3 mm
Säulentemperatur 40°C



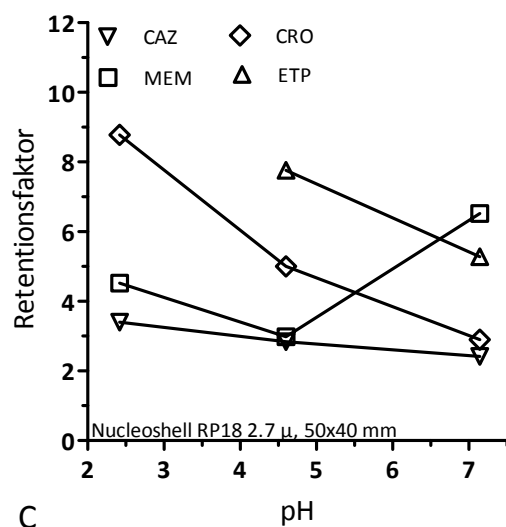
Deutlich erkennbar ist in Abb. 5 z.B. das starke Ansteigen der Retention von Ertapenem, das zwei Carboxylfunktionen enthält, mit fallendem pH-Wert und der U-förmige Kurvenverlauf von Meropenem, das auch basische Aminfunktionen enthält.



A



B



C

Abb. 5: Abhängigkeit des Retentionsfaktors von Meropenem (MEM), Cefprozidim (CAZ), Ceftriaxon (CRO) und Ertapenem (ETP) vom pH-Wert der mobilen Phase und der Säule ($n=1$).

Eluent: 50 mM H_3PO_4 /MeCN 1000:80, pH 2,45-7,00;

A: Säule XBridge C18 2,5 µ, 30x4,6 mm (Fluß 1,0 ml/min)

B: Säule XBridge C18 BEH 2,5 µ, 50x3 mm (Fluß 0,4 ml/min)

C: Säule Nucleoshell RP18, 2,7 µ, 50x4 mm (Fluß 0,8 ml/min)

Säulentemperatur jeweils 40°C

4.1.2 Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) und Bestimmungsgrenze (Limit of Quantitation, LOQ)

Die Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD) erfolgte durch Ausmessen der Peakhöhe und der Höhe des Rauschens im Chromatogramm. Als Nachweisgrenze wurde die Menge an Substanz beschrieben, die unter den gewählten chromatographischen Bedingungen ein Signal-Rausch-Verhältnis von mindestens 3:1 erzeugte.

Die graphische Ermittlung der Nachweisgrenze zeigt Abb. 6 beispielhaft für Piperacillin und Linezolid. Die Injektion von 1 μL einer Lösung von Linezolid 40 ng/ml (also 40 pg) erzeugte ein Signal mit dem Verhältnis von 4:1. Damit errechnet sich die Nachweisgrenze "on column" zu 30 pg.

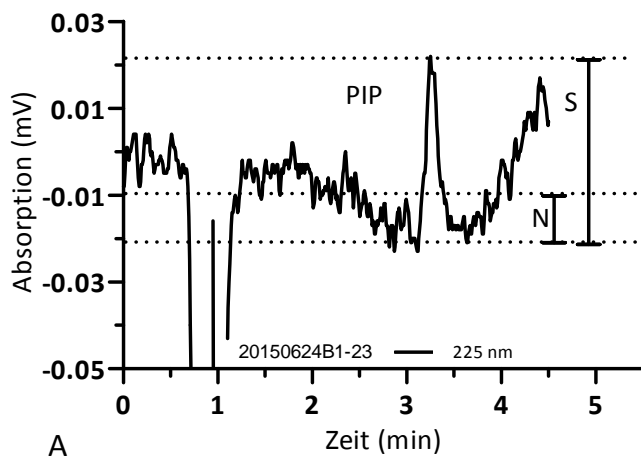
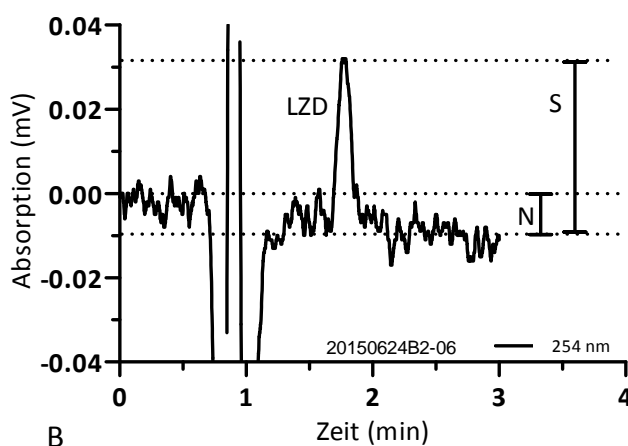


Abb. 6: Chromatogramme von Piperacillin 100 ng/ml (A) und Linezolid 40 ng/ml (B) in Wasser. Die Höhen von Signal (S) und Rauschen (N) wurden durch Ausmessen bestimmt. Ein Verhältnis von $S/N = 3/1$ bezeichnet die Nachweisgrenze (LOD)

Trennsystem:
Chromatographische Standardbedingungen (siehe 3.6); Injektionsvolumen 1 μL



Die ermittelten Nachweisgrenzen der untersuchten Antibiotika sind in Tab. 13 aufgeführt.

Tab. 13: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der untersuchten Antibiotika; Einsatz der chromatographischen Standardbedingungen (siehe 3.6)

Substanz	LOD (Wellenlänge, Säule)	LOQ in Wasser
Ertapenem	400/400 pg (300/260 nm, XBridge C18, 30x4.6 mm)	800/800 ng/ml
Ertapenem	200/200 pg (300/260 nm, XBridge BEH C18, 50x3 mm)	400/400 ng/ml
Meropenem	250/700 pg (300/260 nm, XBridge BEH C18, 50x3 mm)	500/1400 ng/ml
Piperacillin	100/150 pg (225/245 nm, XBridge BEH C18, 50x3 mm)	200/300 ng/ml
Ceftriaxon	30 pg (260 nm, XBridge BEH C18, 50x3 mm)	60 ng/ml
Ceftazidim	250/800 pg (260/300 nm, Nucleoshell RP18, 50x4 mm)	500/1600 ng/ml
Linezolid	30 pg (245 nm, XBridge BEH C18, 50x3 mm)	60 ng/ml
Tigecyclin	60-70 pg (350 nm, Nucleoshell RP18, 100x3 mm)	140 ng/ml

Als LOQ wurde jeweils der doppelte Wert der ermittelten Nachweisgrenze LOD definiert, da die Leitfäden der EMA und der FDA für den LOQ-Wert ein Signal-Rausch-Verhältnis von mindestens 5:1 empfehlen [92,93].

Die Bestimmungsgrenze wird in Konzentration = Menge/Volumen angegeben. Sie ist also abhängig vom Injektionsvolumen und kann mit diesem variieren. So entspricht z.B. einem LOD von 100 pg "on column" eine Bestimmungsgrenze in der reinen Lösung von 200 ng/ml bei einem Injektionsvolumen von 1 µl bzw. 40 ng/ml bei Injektion von 5 µl. Die Bestimmungsgrenze in der Matrix, z.B. Plasma, ist dann weiter abhängig von der Probenvorbereitung (Verdünnung/Aufkonzentrierung), der Recovery und einem eventuellen Blankwert. Der Berechnung der in Tab. 13 angegebenen LOQ-Werte in wässriger Lösung liegt ein Injektionsvolumen von 1 µl zu Grunde. Da es sich bei den LOQ-Werten lediglich um berechnete Größen handelt, wurden diese in der Routine nicht für die Quantifizierung herangezogen. Der niedrigste Punkt der Kalibrierung (siehe 4.2.1.2) stellte die untere Grenze zur Quantifizierung von Proben dar.

4.2 Bestimmung der totalen Konzentrationen von Antibiotika in Plasma oder Serum

4.2.1 Methodvalidierung

Zur Quantifizierung der Antibiotika wurden HPLC-Methoden mit UV-Detektion entwickelt. Die Validierung erfolgte unter Verwendung von Poolplasma gesunder Probanden in Anlehnung an die Empfehlungen der EMA und der FDA [92,93].

4.2.1.1 Selektivität

Die Chromatogramme (Abb. 7-14) von analytfreien Proben in Plasma und Serum zeigten keine Interferenz der Matrixbestandteile mit den untersuchten Antibiotika.

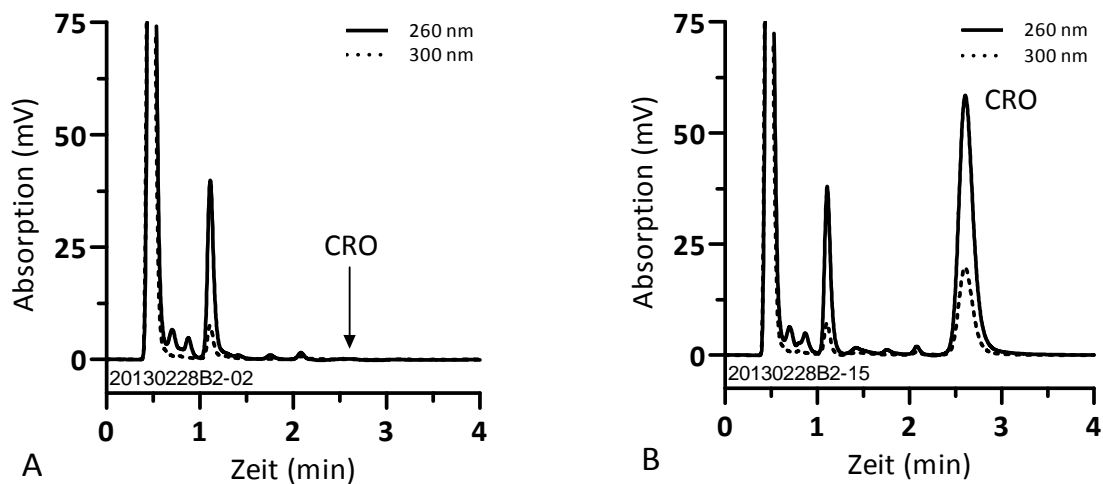


Abb. 7: Chromatogramme von Ceftriaxon in Serum; Bestimmung der totalen Konzentration

A: Leerwert Poolserum ohne Ceftriaxon

B: Poolserum versetzt mit Ceftriaxon (1:20) zu 20 mg/l

Eluent: 50 mM H_3PO_4 /MeCN 1000:80, pH 2,60.; Säule: XBridge C18 2,5 μ , 30x4,6 mm (1,0 ml/min); Säulentemperatur 40°C

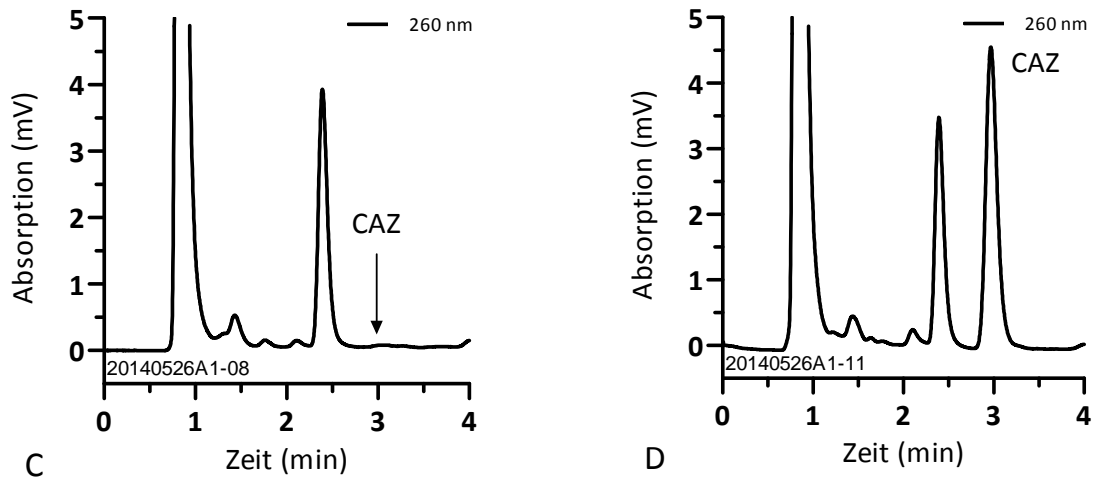


Abb. 8: Chromatogramme von Ceftazidim in Plasma; Bestimmung der totalen Konzentration.

C: Leerwert Poolplasma ohne Ceftazidim

D: Poolplasma versetzt mit Ceftazidim (1:20) zu 10 mg/l

Eluent: 100 mM H_3PO_4 /MeCN 1000:80, pH 2,84.; Säule: XBridge C18 BEH 2,5 μ , 50x3 mm (0,4ml/min); Säulentemperatur 40°C

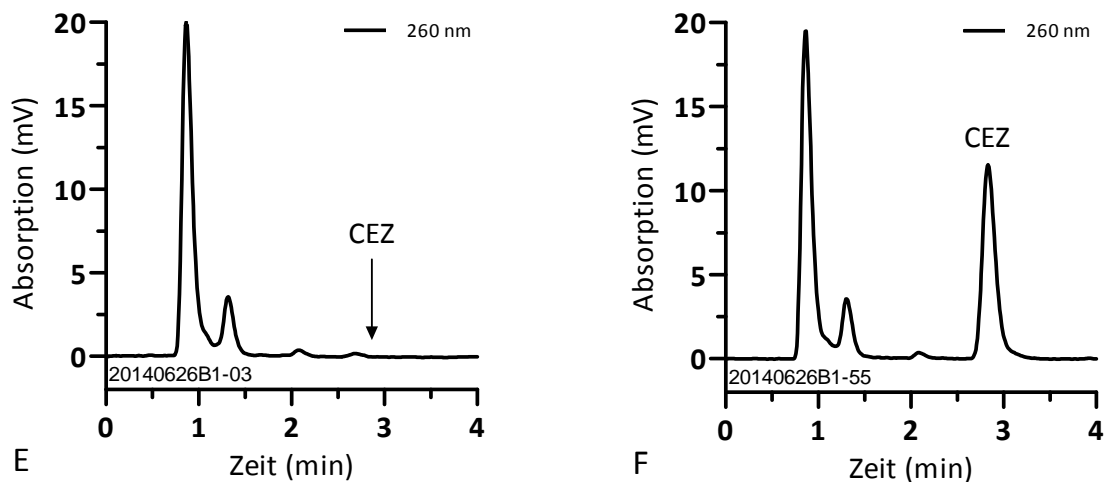


Abb. 9: Chromatogramme von Cefazolin in Plasma; Bestimmung der totalen Konzentration.

E: Leerwert Poolplasma ohne Cefazolin

F: Poolplasma versetzt mit Cefazolin (1:20) zu 50 mg/l

Eluent: 100 mM H_3PO_4 /MeCN 900:135, pH 2,70.; Säule: XBridge C18 BEH 2,5 μ , 50x3 mm (0,4 ml/min) Säulentemperatur 40°C

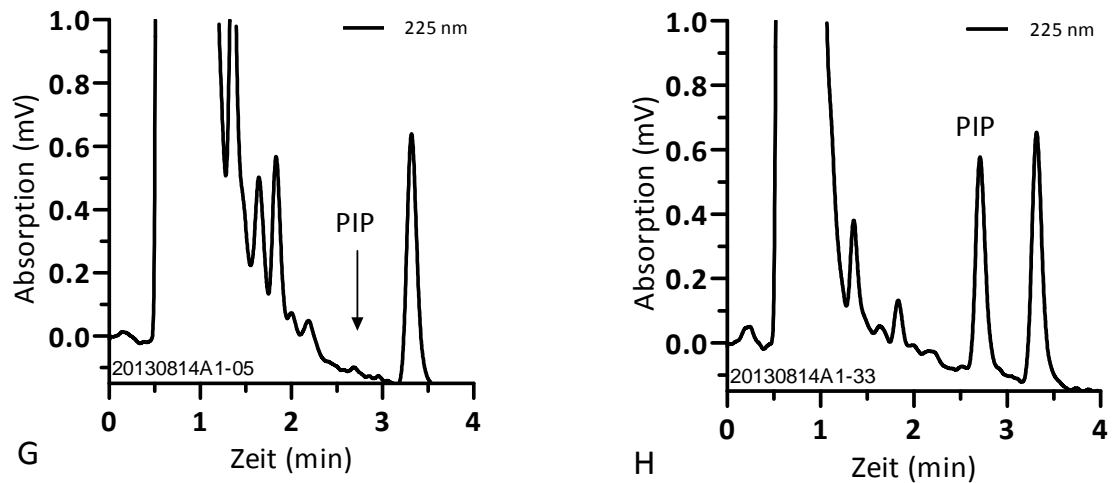


Abb. 10: Chromatogramme von Piperacillin in Plasma; Bestimmung der totalen Konzentration.
 G: Leerwert Poolplasma ohne Piperacillin
 H: Poolplasma versetzt mit Piperacillin (1:20) zu 10 mg/l
 Eluent: 50 mM NaH_2PO_4 /MeCN 500:125, pH 6,00; Säule: XBridge C18 BEH 2,5 μ , 50x3 mm
 (0,4 ml/min); Säulentemperatur 40°C

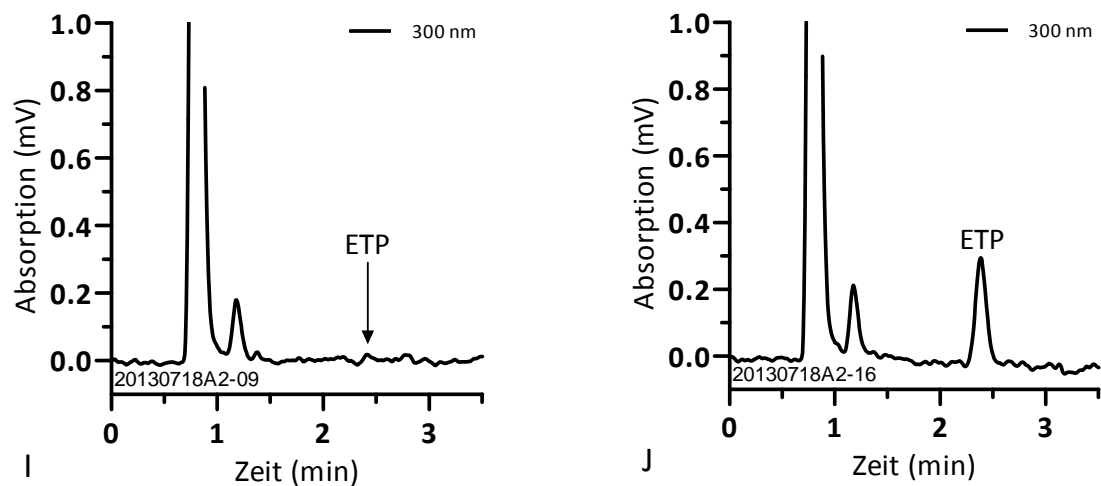


Abb. 11: Chromatogramme von Ertapenem in Plasma; Bestimmung der totalen Konzentration.
 I: Leerwert Poolplasma ohne Ertapenem
 J: Poolplasma versetzt mit Ertapenem (1:20) zu 5 mg/l
 Eluent: 100 mM H_3PO_4 /MeCN 400:60, pH 2,50; Säule: XBridge C18 BEH 2,5 μ , 50x3 mm (0,4 ml/min);
 Säulentemperatur 40°C

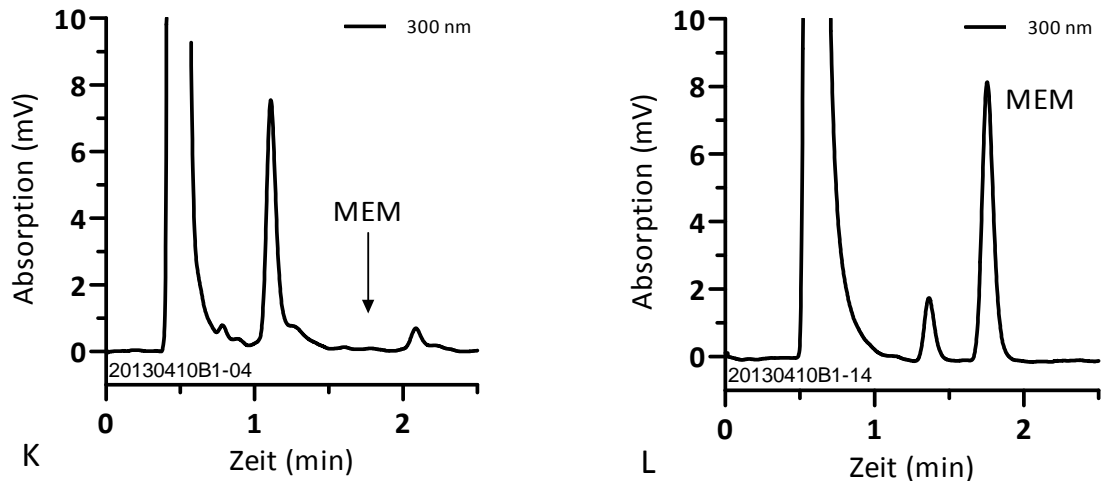


Abb. 12: Chromatogramme von Meropenem in Plasma; Bestimmung der totalen Konzentration.
 K: Leerwert Poolplasma ohne Meropenem
 L: Poolplasma versetzt mit Meropenem (1:20) zu 20 mg/l
 Eluent: 100 mM H_3PO_4 /MeCN 1000:80, pH 2,52; Säule: Nucleoshell RP18, 2,7 μ , 50x4 mm
 (0,8 ml/min); Säulentemperatur 40°C

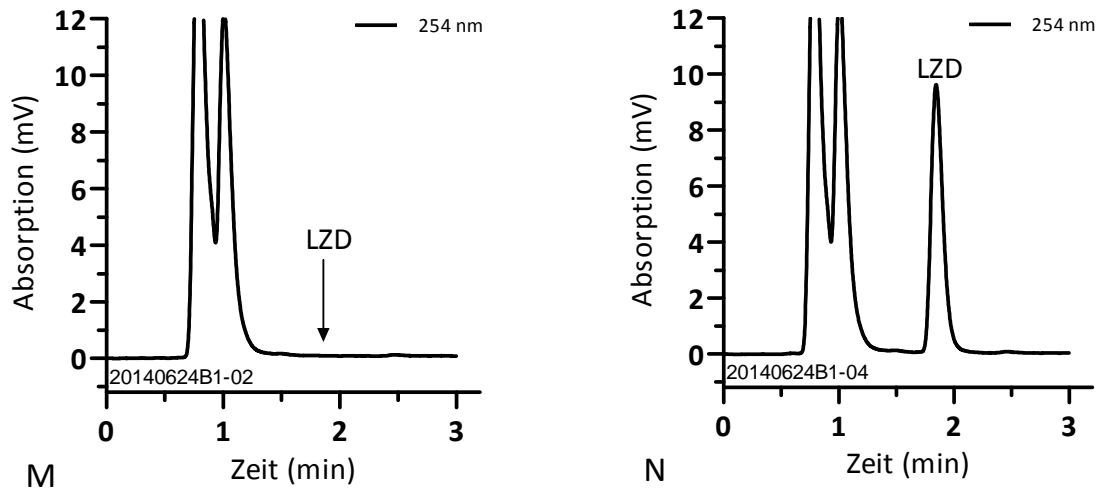


Abb. 13: Chromatogramme von Linezolid in Plasma; Bestimmung der totalen Konzentration.
 M: Leerwert Poolplasma ohne Linezolid
 N: Poolplasma versetzt mit Linezolid (1:20) zu 20 mg/l
 Eluent: 100 mM NaH_2PO_4 /MeCN 750:250, pH 3,06; Säule: XBridge C18 BEH 2,5 μ , 50x3 mm
 (0,4 ml/min); Säulentemperatur 40°C

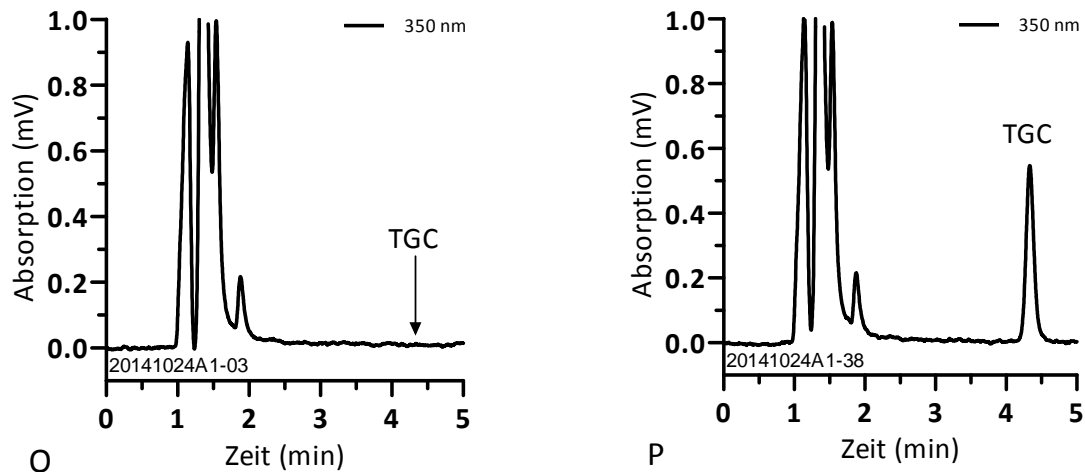


Abb. 14: Chromatogramme von Tigecyclin in Plasma; Bestimmung der totalen Konzentration.

O: Leerwert Poolplasma ohne Tigecyclin

P: Poolplasma versetzt mit Tigecyclin (1:20) zu 0,5 mg/l

Eluent: 100 mM H_3PO_4 /MeCN 800:200, pH 3,04, 800 mg SOS; Säule: Nucleoshell RP18, 2,7 μ , 100x3 mm (0,4 ml/min); Säulentemperatur 40°C

4.2.1.2 Linearität

Zur Validierung der HPLC-Methoden wurden für jede untersuchte Substanz mindestens 5 unabhängige Verdünnungsreihen über den gesamten klinisch relevanten Konzentrationsbereich in Poolplasma von gesunden Probanden hergestellt, in Doppelbestimmung analysiert und daraus die Kenndaten zu Recovery, Linearität, Präzision und Richtigkeit abgeleitet. Für Meropenem und Linezolid soll im Folgenden das Vorgehen bei der Validierung detailliert dargestellt werden. Für die anderen Substanzen werden die Kenndaten später summarisch aufgeführt (Tab. 16).

Die Linearität der Bestimmung von Meropenem wurde für den Bereich von 1-100 mg/l geprüft. Dazu wurden sechs Standardreihen in Doppelbestimmung analysiert bei einer Detektionswellenlänge von 300 und 260 nm und über die Flächen- und Höhenmethode ausgewertet (Tab. 14).

Tab. 14: Linearität, Recovery, Präzision und Richtigkeit der Bestimmung von Meropenem in Serum ermittelt an Hand von 6 Verdünnungsreihen in Doppelbestimmung im Konzentrationsbereich von 1-100 mg/l. Die mit Bindestrich getrennten Werte zu Präzision und Richtigkeit beziehen sich auf die höchsten bis zweitniedrigsten Konzentrationen der Verdünnungsreihen; die durch Strichpunkt getrennten Werte beziehen sich auf die niedrigste Konzentration der Verdünnungsreihen. Die Angaben für den Korrelationskoeffizienten r geben jeweils den niedrigsten ermittelten Wert wieder. Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

Validierung Meropenem	300 nm Fläche	300 nm Höhe	260 nm Fläche	260 nm Höhe
r für $y = mx + b$:	0,9996	0,9997	0,9996	0,9997
r für $y = mx$:	0,9996	0,9997	0,9996	0,9997
Recovery (%):	99,7 ± 1,3	99,2 ± 2,6	99,5 ± 2,5	99,0 ± 2,1
CV_{intra} (%):	0,8-2,9; 3,2	1,1-2,5; 1,7	1,4-3,9; 9,6	1,5-4,1; 12,0
CV_{inter} (%); $y = m*x+b$:	0,6-1,7; 0,8	0,7-1,9; 0,4	1,3-3,2; 1,1	1,1-2,2; 1,1
CV_{inter} (%); $y = m*x$:	1,0-2,2; 1,5	0,73-2,1; 1,5	1,3-3,3; 1,8	0,8-2,6; 2,9
CV_{inter} (%); 50 mg/l:	1,3-2,6; 2,1	1,2-2,1; 2,3	1,3-3,9; 2,5	1,2-3,3; 2,7
CV_{inter} (%); 20 mg/l:	1,4-2,6; 2,5	0,8-2,6; 2,5	1,3-4,3; 2,7	1,3-3,0; 4,0
CV_{inter} (%); 10 mg/l:	1,4-3,1; 4,2	1,3-3,1; 4,3	1,7-2,6; 4,1	1,3-3,0; 5,1
Accuracy (%) $y = m*x+b$:	0,1-1,1; 0,5	0,2-1,8; 0,2	0,2-1,7; 0,5	0,2-2,0; 0,6
Accuracy (%) $y = m*x$:	0,1-1,7; 0,3	0,0-0,7; 1,0	0,1-1,1; 1,0	0,0-2,6; 3,0
Accuracy (%) 50 mg/l:	0,1-1,8; 0,3	0,0-2,1; 1,0	0,4-2,9; 0,1	0,3-2,7; 2,8
Accuracy (%) 20 mg/l:	1,4-2,6; 2,5	0,8-2,6; 2,5	1,3-4,3; 2,7	1,3-3,0; 4,0
Accuracy (%) 10 mg/l:	1,4-3,7; 4,1	1,3-3,0; 4,3	1,4-3,6; 3,8	1,4-3,6; 5,6

Die Präzision der Methode war sehr gut. Die Korrelationskoeffizienten für die **Linearität** waren gleich oder besser als 0,9996. Die **Intra-Assay-Präzision** wurde über die Abweichung der Doppelbestimmungen der Standardgeraden bestimmt. Die Auswertung bei 260 nm zeigte lediglich eine geringere Intra-Assay-Präzision bei der niedrigsten Konzentration von 1 mg/l, die aber mit 10-12% immer noch innerhalb der Grenze von 20% war. Die **Inter-Assay-Präzision** lag über den gesamten Konzentrationsbereich unter 6%; der Wert ist deshalb besser als die Intra-Assay-Präzision, weil in die Berechnung nicht die Einzelwerte, sondern die Mittelwerte der Doppelbestimmung eingingen. Die **Wiederfindung** war quantitativ, die Streuung betrug 2,6% oder weniger.

Die mittleren Abweichungen der gemessenen von den berechneten Werten (**Accuracy**) aus 6 Verdünnungsreihen betrug für alle Konzentrationen und Auswertemethoden weniger als 6% (Wichtungsfaktor $1/y^2$, Abb. 15). In der Routine kann deshalb die weniger aufwendige Einpunktkalibrierung bei mittlerer Konzentration verwendet werden.

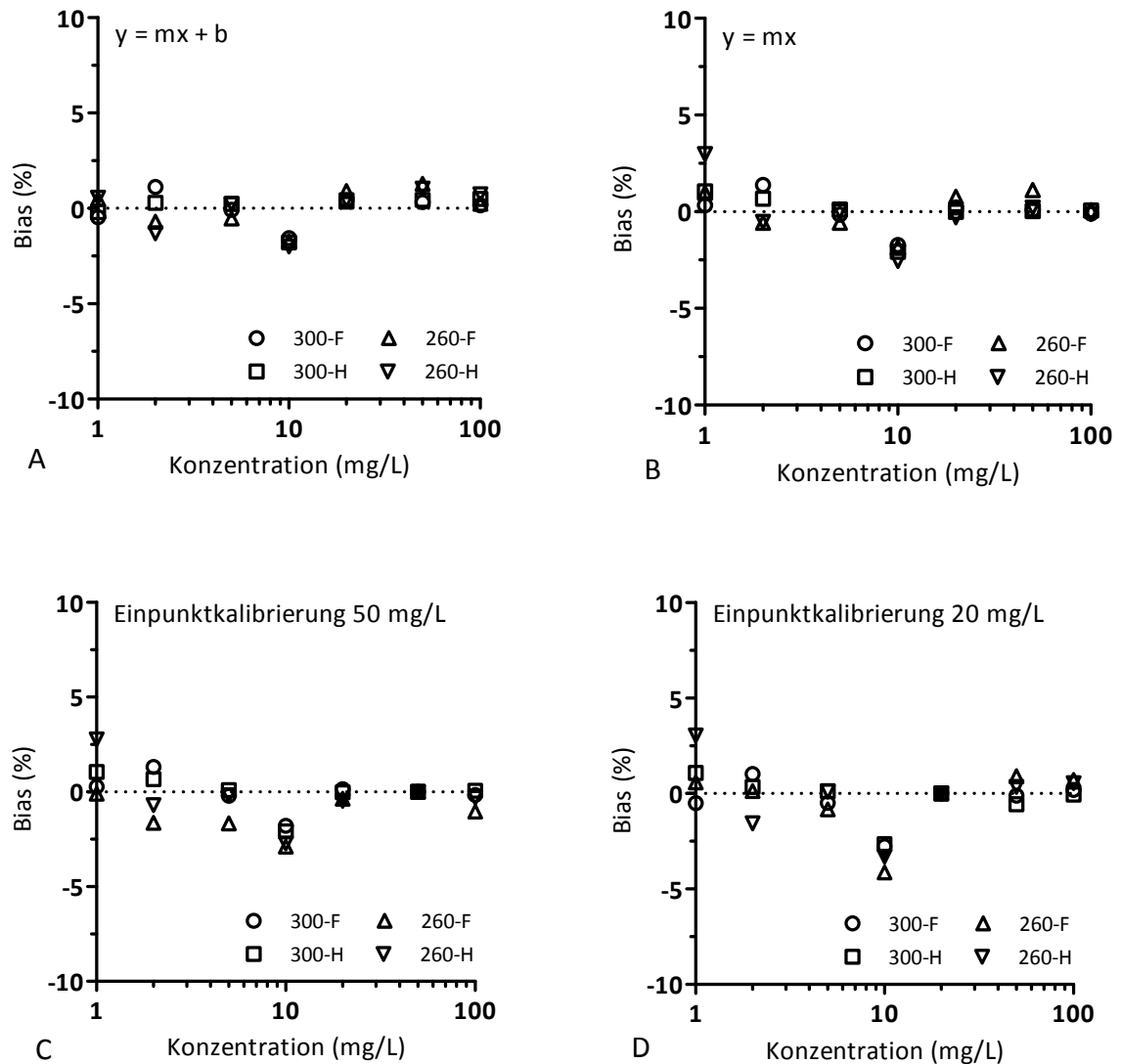


Abb. 15: Mittlere Abweichung der gemessenen von den berechneten Konzentrationen (Bias, %) von Meropenem ($n=6$) bei Auswertung über die Ausgleichsgeraden $y = mx + b$ (A), bzw. $y = mx$ (B) (Gerade durch den Ursprung gezwungen) oder die Einpunktkalibrierung bei mittlerer Konzentration (C: 50 mg/l; D 20 mg/l); Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

Die Linearität der Bestimmung von Linezolid wurde für den Bereich von 0,1-100 mg/l geprüft. Dazu wurden 5 Standardreihen in Doppelbestimmung analysiert bei einer Detektionswellenlänge von 254 nm und über die Flächen- und Höhenmethode ausgewertet (Tab. 15).

Tab. 15: Linearität, Recovery, Präzision und Richtigkeit der Bestimmung von Linezolid in Serum, ermittelt an Hand von 5 Verdünnungsreihen in Doppelbestimmung im Konzentrationsbereich von 0,1-100 mg/l. Die mit Bindestrich getrennten Werte zu Präzision und Richtigkeit beziehen sich auf die höchsten bis zweitniedrigsten Konzentrationen der Verdünnungsreihen; die durch Strichpunkt getrennten Werte beziehen sich auf die niedrigste Konzentration der Verdünnungsreihen. Die Angaben für den Korrelationskoeffizienten r geben jeweils den niedrigsten ermittelten Wert wieder. Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

Validierung Linezolid	254 nm Fläche	254 nm Höhe
r für $y = mx + b$:	0,9955	0,9954
r für $y = mx$:	0,9941	0,9953
Recovery (%):	93,3 ± 3,1	99,6 ± 2,9
CV_{intra} (%):	1,5-7,1; 7,8	1,1-5,8; 5,9
CV_{inter} (%); $y = m \cdot x + b$:	2,5-8,1; 2,0	2,6-9,8; 3,0
CV_{inter} (%); $y = m \cdot x$:	3,3-9,0; 7,4	3,3-10,4; 3,6
CV_{inter} (%); 10 mg/l:	1,5-11,9; 9,9	1,3-13,1; 4,9
CV_{inter} (%); 3 mg/l:	1,5-11,0; 9,4	2,0-12,4; 5,4
Accuracy (%) $y = m \cdot x + b$:	1,8-5,1; 0,3	0,4-3,7; 1,4
Accuracy (%) $y = m \cdot x$:	0,8-7,0; 4,5	3,7-0,3; 1,3
Accuracy (%) 10 mg/l:	1,5-7,0; 5,6	0,5-3,2; 0,1
Accuracy (%) 3 mg/l:	0,7-7,8; 3,5	0,5-5,7; 3,4

Die Präzision der Methode erwies sich ebenfalls als sehr gut. Die Korrelationskoeffizienten für die **Linearität** waren gleich oder besser als 0,9941. Die **Intra-Assay-Präzision** wurde wiederum über die Abweichung der Doppelbestimmungen der Standardgeraden bestimmt und lag auch bei der niedrigsten Konzentration der Kalibrierung von 0,1 mg/L noch unterhalb von 10%. Die **Inter-Assay-Präzision** lag über den gesamten Konzentrationsbereich mit einem Maximalwert von 13,1% unter 15%, was nach den Leitfäden der EMA und der FDA den zulässigen maximalen Grenzwert darstellt [92,93]. Die **Wiederfindung** war quantitativ, die Streuung betrug 3,1% oder weniger.

Die mittleren Abweichungen der gemessenen von den berechneten Werten (**Accuracy**) aus 5 Verdünnungsreihen betrug für alle Konzentrationen und Auswertemethoden weniger als 8% (Wichtungsfaktor $1/y^2$, Abb. 16). In der Routine kann deshalb auch für Linezolid die weniger aufwendige Einpunktkalibrierung bei mittlerer Konzentration verwendet werden.

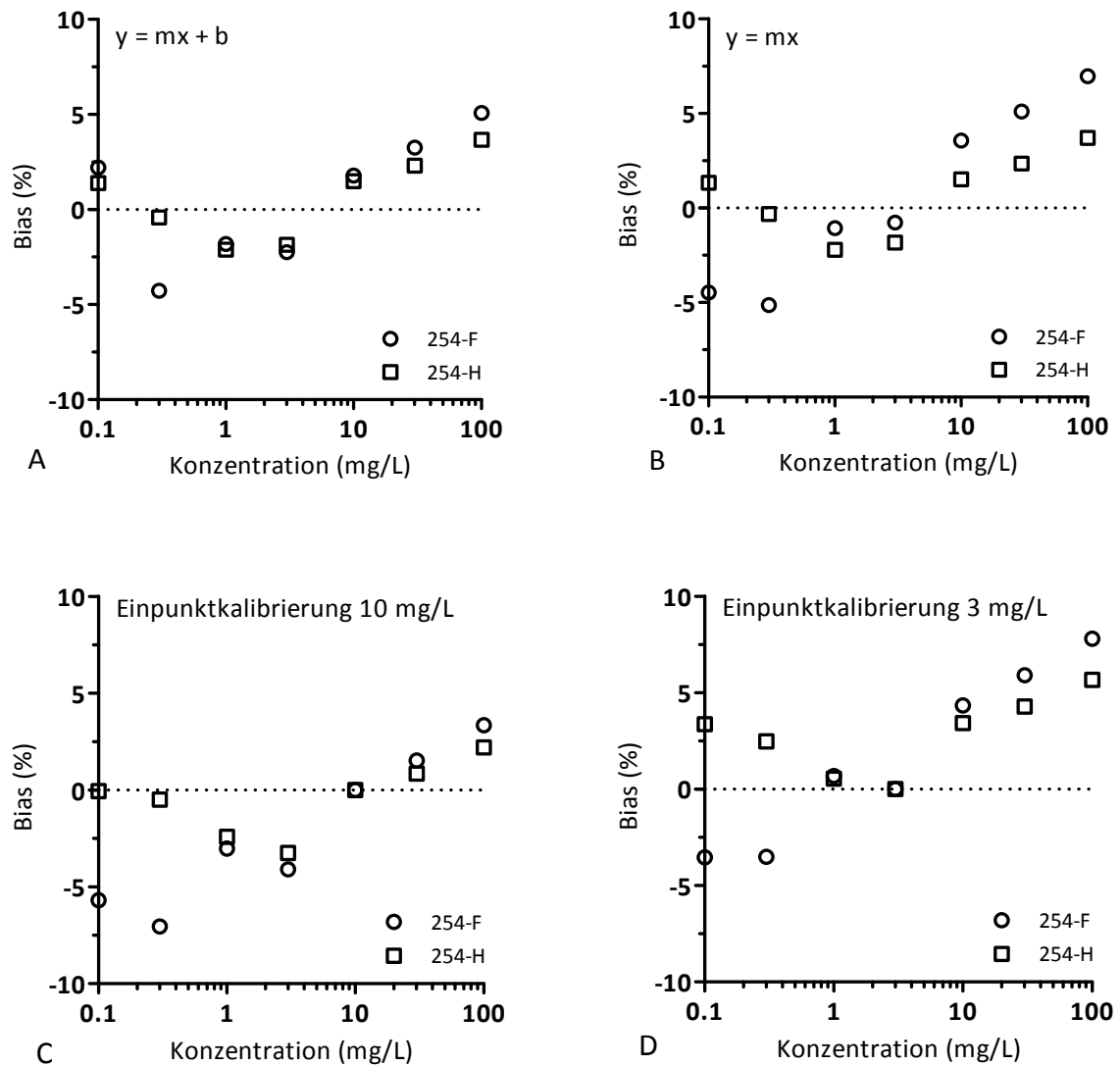


Abb. 16: Mittlere Abweichung der gemessenen von den berechneten Konzentrationen (Bias, %) von Linezolid ($n=5$) bei Auswertung über die Ausgleichsgeraden $y = mx + b$ (A), bzw. $y = mx$ (B) (Gerade durch den Ursprung gezwungen) oder die Einpunktkalibrierung bei mittlerer Konzentration (C: 10 mg/l; D 3 mg/l); Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

Auch für die weiteren untersuchten Antibiotika zeigten sich vergleichbar gute Werte (siehe Tab. 16). Der Korrelationskoeffizient r für die Linearität war - wie bei HPLC-Methoden mit UV-Detektion typisch - immer $> 0,995$. Die Recovery war quantitativ mit hoher Präzision. Wie Tab. 16 zeigt, waren die FDA/EMA-Kriterien für Richtigkeit und Präzision ($< 15\%$) auch bei Einpunktkalibrierung erfüllt [92,93].

Tab. 16: Übersicht der Validierungsparameter der untersuchten Antibiotika. Die mit Bindestrich getrennten Werte zu Präzision und Richtigkeit beziehen sich auf die höchsten bis zweitniedrigsten Konzentrationen der Verdünnungsreihen; die durch Strichpunkt getrennten Werte beziehen sich auf die niedrigste Konzentration der Verdünnungsreihen.

Subst.	Bereich mg/l	Linearität $r \geq$	Kalibrator mg/l	Präzision		Richtigkeit	Wiederfindung
				CV _{intra} (%)	CV _{inter} (%)	(%)	(%)
CAZ	100-1	0,9998	50	1,5-1,8; 3,0	1,5-2,9; 3,9	0,2-2,3; 2,8	101,0 ± 2,9
CRO	100-1	0,9997	50	0,7-4,5; 4,8	2,5-4,2; 2,3	0,1-2,3; 3,6	98,9 ± 1,9
ETP	80-0,8	0,9995	40	0,8-3,2; 4,1	0,0-1,5; 1,5	0,3-1,5; 1,5	94,4 ± 1,3
LZD	100-0,1	0,9954	10	1,1-5,8; 5,9	1,3-13,1; 4,9	0,5-3,2; 0,1	99,6 ± 2,9
MEM	100-1	0,9997	20	1,1-2,5; 1,7	0,8-2,6; 2,5	0,8-2,6; 2,5	99,2 ± 2,6
PIP	200-1	0,9992	50	2,2-3,5; 2,4	0,4-5,9; 0,3	1,6-4,3; 4,9	97,2 ± 5,8
TGC ¹⁾	5-0,05	0,9990	0,5	0,4-4,7; 4,9	6,9	≤5	91,5 ± 8,3

1) Daten aus der Bachelor Arbeit von Alexandra Murschhauser, Fakultät Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg, 2013

4.3 Bestimmung der freien Konzentration

Während die Kalibrierung zur Bestimmung der totalen Konzentration über dotierte Plasmaproben erfolgte, wurden bei der Bestimmung der freien Konzentrationen wässrige Lösungen der Antibiotika zur Kalibrierung verwendet, weil einige Substanzen eine nichtlineare, konzentrationsabhängige Proteinbindung zeigen, sodass keine lineare Kalibrierungsfunktion in Serum oder Plasma aufgestellt werden kann. Für die Kenndaten zu Präzision und Richtigkeit wurden die bei jedem Assay mitgeführten Kontrollproben in Plasma herangezogen. Die Kontrollproben wurden dabei in Einfachbestimmung analysiert, weil in Vorversuchen der Variationskoeffizient für die Intra-Assay-Präzision bei ca. 1% lag, und daher vergleichbar der Präzision der Pipetten oder des Injektors.

4.3.1 Wechselwirkungen mit der Ultrafiltrationseinheit

4.3.1.1 Betalaktame

Die untersuchten Betalaktame zeigten bei den angewandten experimentellen Bedingungen keine relevante Adsorption an das Filtermaterial bzw. das Behältnis der routinemäßig eingesetzten Nanosep Omega 10 k Ultrafiltrationseinheiten. Die Recovery im Ultrafiltrat betrug $99,4 \pm 1,2\%$ ($n=6$) der Konzentration in der Originallösung für Ertapenem, $100,8 \pm 0,8\%$ ($n = 6$) für Ceftriaxon und $94,8 \pm 0,9\%$ ($n=6$) für Piperacillin. Die Ultrafiltrationseinheit Nanosep Omega 10 k ist somit zur routinemäßigen Bestimmung der freien Konzentration der Betalaktam-Antibiotika Ceftriaxon, Ertapenem und Piperacillin geeignet, da keine relevante Bindung der Substanzen an Filtrationsmembran bzw. Gefäß erfolgt.

4.3.1.2 Linezolid

Linezolid konnte in Wasser oder 100 mM NaH_2PO_4 , pH 7,40, sowohl in Glas, als auch in PP-Röhrchen bis mindestens auf 0,1 mg/l ohne Verluste verdünnt werden. Bei der Ultrafiltration wurden bei Verwendung der Routine-Filtrationseinheit Nanosep Omega 10 k hingegen deutliche Verluste beobachtet. Daher wurden die Adsorptionsversuche mit den Ultrafiltrationseinheiten weiterer Hersteller wiederholt. Tabelle 17 zeigt die Ergebnisse der Adsorptionsversuche mit den Ultrafiltrationseinheiten verschiedener Hersteller.

Tab. 17: Recovery (%)($MW \pm SD$, wenn $n > 1$) von Linezolid (LZD) nach Ultrafiltration einer Lösung von 100-0,1 mg/l LZD in 0,1M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4 bei 37°C in einer Zentrifuge mit Festwinkelrotor. Abk.: NS = Nanosep Omega; VS = Vivaspin; AU = Amicon Ultra; CF = Centrifree; MC = Microcon; PP = Polypropylen; PC = Polycarbonat; StBd = Styrol-Butadien Copolymer; PES = Polyethersulfon; RC = regenerierte Cellulose; n.d. = not done; LOD = limit of detection.

		Recovery (%)						
	Filter	NS-10K	VC-10/30K	NS-10K_TW	VS-10K	AU-10K	CF-30K	MC-10K
Material	Oberteil	PP	PC	PP	PC	StBd	PC	PC
	Membrantyp	PES	RC	PES	PES	RC	RC	RC
	Unterteil	PP	PP	PP	PP	PP	PE	PP
	Totvolumen	5 µl	<5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	10 µl	10 µl
	Filterfläche	0,3 cm ²	0,32 cm ²	0,3 cm ²	0,5 cm ²	1,0 cm ²	0,92 cm ²	0,32 cm ²
	rcf	1000	1000	1000	1000	6000	1000	3000
	Zeit	5 min	20/10 min	5 min	5 min	5 min	3 min	5 min
	Vol. (µl)	130-190	80-90	80-90	240-250	130-160	100-120	70-80
C (mg/l)	n	1	4	6	1	1	1	1
100,00	Recovery (%)	90,3	100,5±0,4	89,9±2,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
30,00		78,8	96,4±1,0	n.d.	38,1	56,2	94,7	96,7
10,00		76,1	98,4±0,4	86,1±4,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3,00		63,8	97,7±0,6	n.d.	2,0	30,2	97,5	96,3
1,00		47,9	97,6±0,1	85,8±4,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0,30		42,0	97,5±1,5	n.d.	<LOD	27,2	n.d.	95,5
0,10		24,7	99,9±1,4	86,5±4,1	<LOD	n.d.	n.d.	n.d.

Verluste wurden beobachtet bei Nanosep, Vivaspin und Amicon Ultra, nicht aber bei Centrifree, Microcon und Vivacon. Die Recovery von LZD in Puffer war quantitativ bei Verwendung von Vivacon-Filtern und ca. 90% bei vorbehandelten Nanosep Omega Filtern, während sie in den nicht vorbehandelten Nanosep Filtern von 90% auf 25% bei 0,1 mg/l sank (Tab. 17). Bei den folgenden Untersuchungen mit Linezolid in Serum zeigte sich, dass es genügte, die Filtermembranen mit 5% TW80 zu behandeln, um Adsorptionsverluste bei den standardmäßig verwendeten Nanosep Omega 10 k zu verhindern. Als Referenzwert wurde die freie Fraktion mit Hilfe von Microcon bzw. Vivacon Ultrafiltrationseinheiten bestimmt, die sich in den Versuchen mit wässriger Lösung als inert für eine Bindung von Linezolid erwiesen. Zusätzlich wurde die freie Fraktion mit Nanosep Ultrafiltrationseinheiten bestimmt, die mit einer wässrigen Lösung von 5% TW80 vorbehandelt waren. Die freie Fraktion wurde hierbei konzentrationsunabhängig zu 80-85% bestimmt. In nicht vorbehandelten Nanosep Filtern hingegen ging die freie Fraktion von LZD scheinbar von 70% auf 40% zurück, wenn die Konzentrationen von 100 auf 0,1-0,3 mg/l sanken.

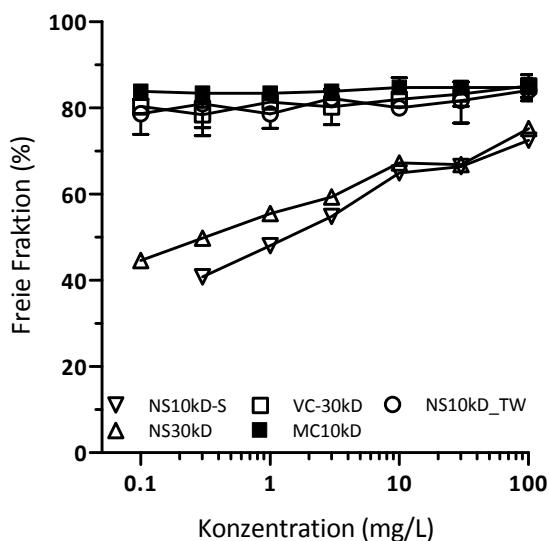


Abb. 17: Freie Fraktion (MW \pm SD, wenn $n > 1$) von Linezolid in Serum nach Ultrafiltration mit Nanosep Omega PES (NS10K/30K; $n=1$), Vivacon (VC30K; $n=2$) oder Microcon (MC10K; $n=2$) Ultrafiltrationseinheiten. Bei der Verwendung von Nanosep wurde auch eine Vorbehandlung mit 5% TW80 ($n=6$) durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte mit Hilfe einer Lösung von Linezolid in Phosphatpuffer, pH 7,4. Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

4.3.1.3 Tigecyclin

In Vorversuchen zeigte sich bei der Herstellung von Verdünnungsreihen in Wasser, dass Tigecyclin an die Kunststoff-Oberflächen der Eppendorf-Cups adsorbiert. Zur Untersuchung dieser Adsorption wurden in Eppendorf-Cups 1,5 ml, die ebenso wie die Auffanggefäße der Ultrafiltrationseinheiten aus PP bestehen, in verschiedenen wässrigen Lösungen Verdünnungsreihen hergestellt und analysiert (Abb. 18).

Abb. 18: Recovery (MW \pm SD, wenn $n > 1$) von TGC bei Verdünnung in verschiedenen Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelgemischen

Säule: NuDur HTec C18-3 μ , 125x4 mm

Eluent: 0,1M H₃PO₄/MeCN 750/250, 10mM SOS, pH = 3,31

Fluss: 0,8 ml/min; Temp.: 40°C

Abk.:

Saline = 0,9% NaCl (n=2)

SM5050 = Saline/MeOH 50:50 (v/v) (n=2)

Eluent = 0,1M H₃PO₄/MeCN 750/250, 10mM SOS, pH: 3,31 (n=1)

EoS = Eluent ohne SOS (n=2)

SOS = Sodium octane sulfonate

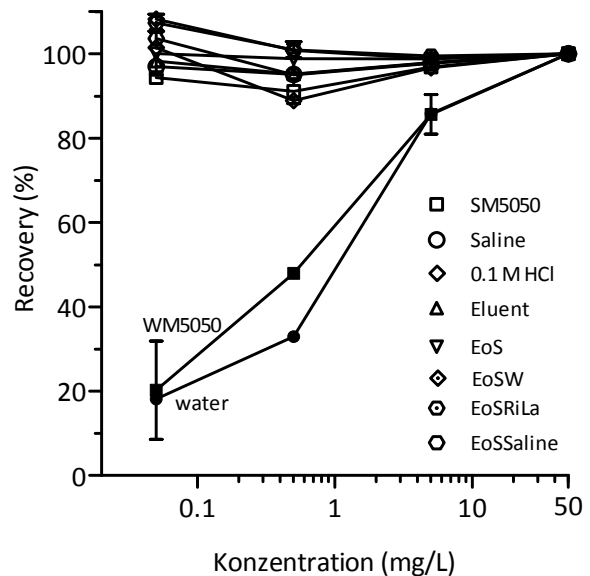
EoSW = EoS Wasser 1+2 (v/v) (n=1)

EoSRLa = EoS Ringer-Lactat 1+2 (v/v) (n=2)

EoSSaline = EoS Saline 1+2 (v/v) (n=1)

Water = Wasser (n=1)

WM = Wasser/MeOH 50:50 (v/v) (n=2)



Die Recovery fiel in Verdünnungen mit Wasser und Wasser-Methanol-Mischungen ab und betrug bei 5; 0,5 und 0,05 mg/l ca. 85, 30-45 und 20% der Ausgangskonzentration von 50 mg/l. In allen anderen Lösungsmitteln oder Lösungsmittelgemischen war die Recovery quantitativ (90-110%). Tigecyclin-Verdünnungen können somit in diesen Lösungsmitteln zuverlässig hergestellt werden.

Um die Adsorption von Tigecyclin an Kunststoffoberflächen weiter zu untersuchen, wurden auch TGC-Verdünnungsreihen zu 10, 1 und 0,1 mg/l in Plasma-Ultrafiltrat von gesunden Freiwilligen hergestellt und vor bzw. nach Zusatz von EoS untersucht. Hier zeigte sich, dass nach Zusatz von EoS eine quantitative Wiederfindung (90-110%) erzielt werden konnte, während sich vorher deutliche Adsorptionsverluste zeigten. Neben der Adsorption an Kunststoffoberflächen wurde auch die Adsorption des Tigecyclin in wässrigen Pufferlösungen an das Filtermaterial der Nanosep Omega 10 k und der Vivacon 30 k Ultrafiltrationseinheiten überprüft (Durchführung siehe Kapitel 3.9.1). Der mittlere Adsorptionsverlust betrug für die Filtermembran der Nanosep Filter 15,2 \pm 5,1% bei Pufferung mit 100 mM NaH₂PO₄, pH 7,4, bzw. 13,6 \pm 0,4% bei Pufferung mit 100 mM HEPES, pH 7,5. Für die Vivacon 30 k Filter betragen die mittleren Adsorptionsverluste 9,4 \pm 2,1% bzw. 11,3 \pm 0,6%.

4.3.2 Integrität der Ultrafiltrationsmembran

Bei 18 zufällig ausgewählten analytischen Läufen zur Bestimmung der freien Konzentration wurde bei insgesamt 305 Proben der Proteingehalt im Ultrafiltrat bestimmt. Bei 286 Proben lag die Konzentration an Proteinen im erhaltenen Ultrafiltrat unter der Nachweisgrenze der Methode von 25 mg/l. In 19 Fällen konnten Proteine im Ultrafiltrat nachgewiesen und quantifiziert werden. Es wurden Konzentrationen zwischen 27 und 488 mg/l gemessen, wobei der Median bei einer Konzentration von 89 mg/l lag.

4.4 Stabilität

Die Daten zur Stabilität der untersuchten Antibiotika bei den Lagerbedingungen der Patientenproben, Standards und Kontrollen (Gefrierschrank -70°C) wurden der Literatur entnommen [95–97]. Die Stabilität unter den Bedingungen der Probenverarbeitung für die Bestimmung der totalen Konzentration (Kühlschranktemperatur, Raumtemperatur, Temperatur des Autosamplers für die Injektionslösung) konnten ebenfalls der gleichen Literatur entnommen werden. Zusätzlich wurde aber für die in der klinischen Praxis am häufigsten eingesetzten Antiinfektiva Meropenem, Piperacillin und Ceftazidim in Serum die Stabilität bei Raum- bzw. Kühlschranktemperatur nochmalig über einen Zeitraum von 8 h Stunden überprüft. Die Stabilitätsprüfung bei 37°C erfolgte nur bei den stärker eiweißgebundenen Substanzen Ceftriaxon, Ertapenem, Piperacillin, Linezolid und Tigecyclin, bei denen in der Routine auch die Bestimmung der freien Konzentration vorgesehen war (Abb. 20, 22, 24, 25 u. 26).

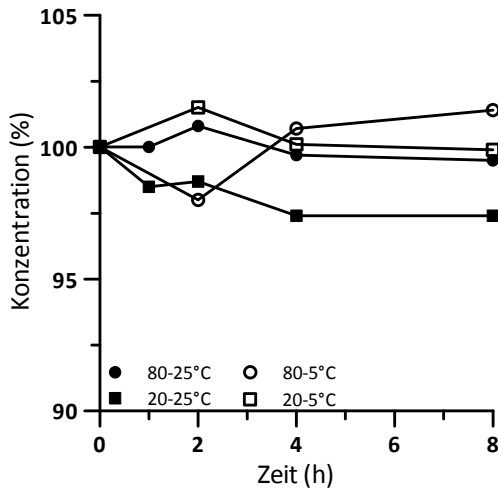


Abb. 19: Stabilität von ETP (n=1) (80 u. 20 mg/l) in Serum bei Raum- (25°C) und Kühlschrantemperatur (5-6°C); Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

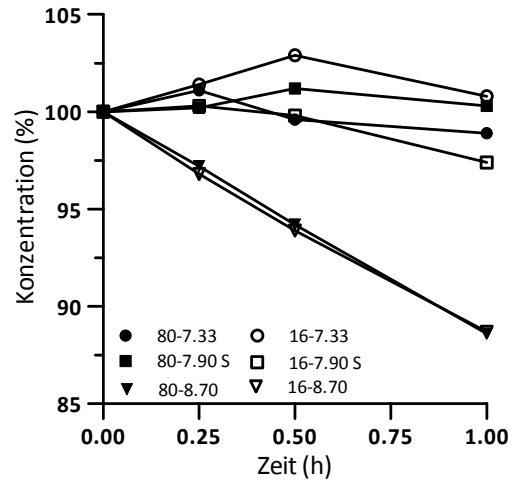


Abb. 20: Stabilität von ETP (n=1) (80 u. 16 mg/l) bei 37°C in Serum (pH 7,90) und in Serum, gepuffert auf pH 7,33 bzw. 8,70 mit Phosphat- bzw. TRIS-Puffer; Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

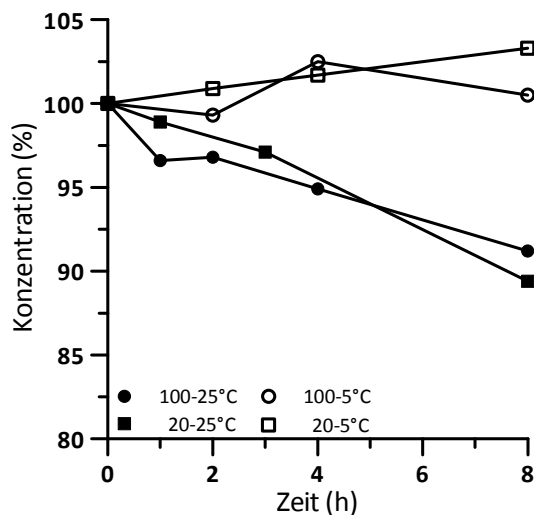


Abb. 21: Stabilität von CAZ (n=1) (100 u. 20 mg/l) in Serum bei Raum- (25°C) und Kühlschrantemperatur (5-6°C) Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

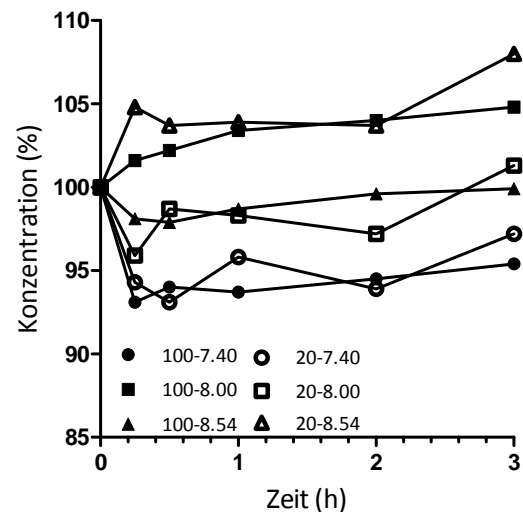


Abb. 22: Stabilität von CRO (n=1) (100 u. 20 mg/l) bei 37°C in Serum (pH 8,00) und in Serum, gepuffert auf pH 7,40 bzw. 8,54 mit Phosphat- bzw. TRIS-Puffer; Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

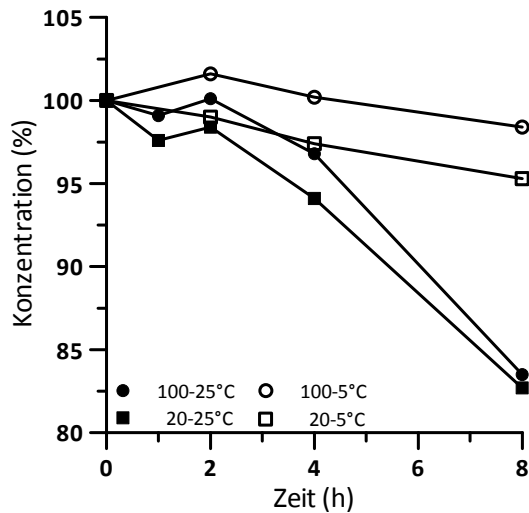


Abb. 23: Stabilität von PIP (n=1) (100 u. 20 mg/l) in Serum bei Raum- (25°C) und Kühlschranktemperatur (5-6°C); Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

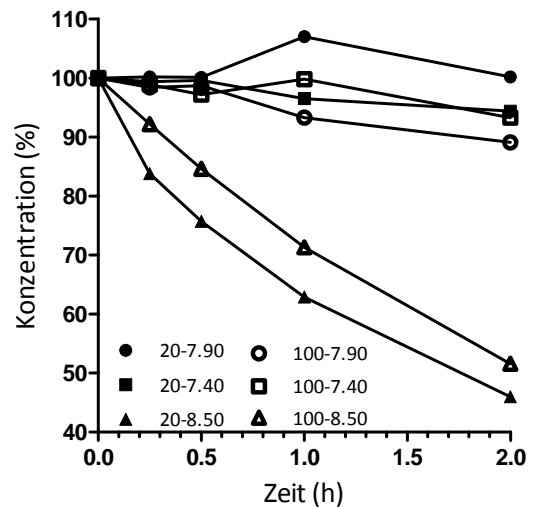


Abb. 24: Stabilität von PIP (n=1) (100 u. 20 mg/l) bei 37°C in Serum (pH 7,90) und in Serum, gepuffert auf pH 7,40 bzw. 8,50 mit Phosphat-Puffer. Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

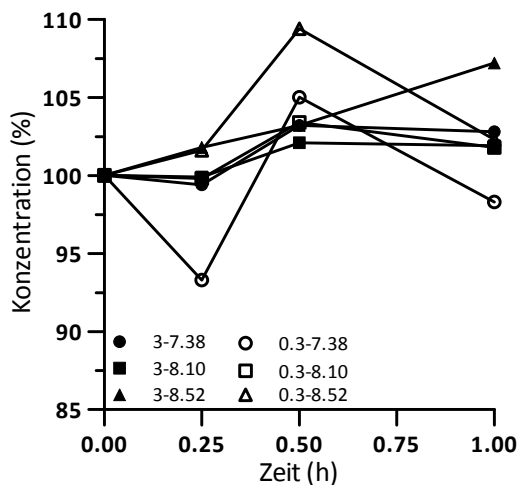


Abb. 25: Stabilität von TGC (n=1) (3 u. 0,3 mg/l) bei 37°C in Serum (pH 8,10) und in Serum, gepuffert auf pH 7,38 bzw. 8,52 mit Phosphat-Puffer. Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

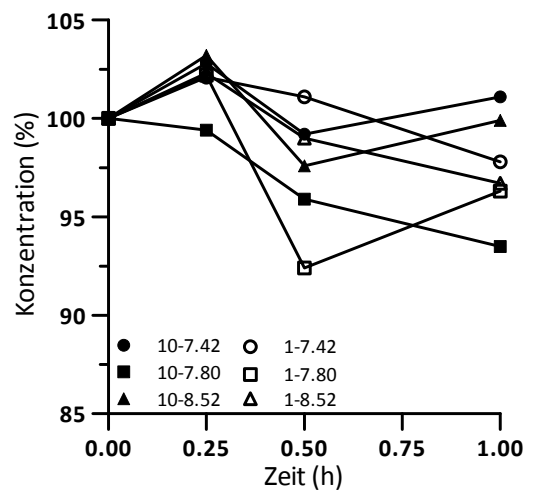


Abb. 26: Stabilität von LZD (n=1) (10 u. 1 mg/l) bei 37°C in Serum (pH 7,80) und in Serum, gepuffert auf pH 7,42 bzw. 8,52 mit Phosphat-Puffer. Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

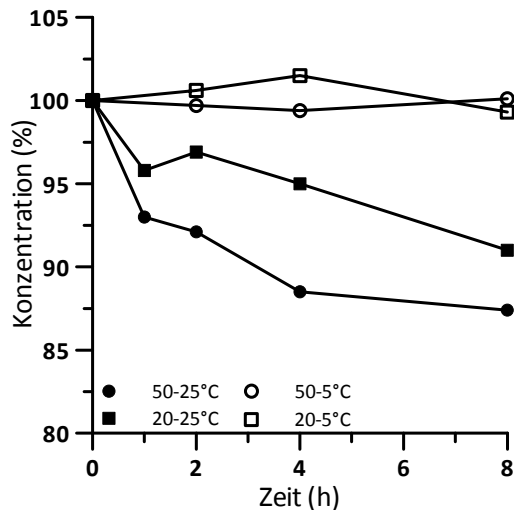


Abb. 27: Stabilität von MEM ($n=1$) (50 u. 20 mg/l) in Serum bei Raum- (25°C) und Kühlschrankschranktemperatur (5-6°C) Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

Ertapenem zeigte sich bei Kühlschrankschrank- bzw. Raumtemperatur als stabil über den gesamten Untersuchungszeitraum, da die gemessene Konzentration zu allen Untersuchungszeitpunkten 90% der Ausgangskonzentration zum Zeitpunkt 0 h überschritt (Abb. 19). Bei 37°C hingegen unterschritten nach 1 h die Werte bei Pufferung auf pH 8,7 die Stabilitätsgrenze von 90% knapp (Abb. 20). Bei Pufferung auf pH 7,33 bzw. in ungepuffertem Serum zeigte sich Ertapenem bei 37°C stabil über den gesamten Untersuchungszeitraum (Abb. 20). Für Ceftriaxon lagen in der Stabilitätsprüfung bei 37°C alle Konzentrationswerte oberhalb von 90% der Ausgangskonzentration, sodass hier eine hinreichende Stabilität zur Bestimmung der freien Konzentration vorausgesetzt werden kann (Abb. 22). Meropenem (Abb. 27), Piperacillin (Abb. 23) und Ceftazidim (Abb. 21) zeigten sich bei Kühlschrankschranktemperatur ebenfalls stabil über den gesamten Untersuchungszeitraum. Bei Raumtemperatur allerdings wurde bei Meropenem (Abb. 27) und Piperacillin (Abb. 23) nach ca. 5-6 h die Stabilitätsgrenze von 90% gegenüber der Ausgangskonzentration unterschritten. Bei Ceftazidim (Abb. 21) ist dies erst nach 7-8 h bei Raumtemperatur der Fall. Piperacillin (Abb. 24) ist bei 37°C nur in physiologisch gepuffertem und ungepuffertem Serum stabil, während bei Pufferung des Serums auf pH 8,5 nach 1 h nur noch ca. 60-70% der Ausgangskonzentration vorlagen. Linezolid (Abb. 26) und Tigecyclin (Abb. 25) erwiesen sich bei 37°C bei allen eingesetzten pH-Werten über den Untersuchungszeitraum von 1 h als stabil. Da für alle Substanzen jeweils 2 verschiedene Konzentrationen zur Versuchsdurchführung eingesetzt wurden, wurde auf eine Mehrfachbestimmung verzichtet.

4.5 Abhängigkeit der freien Konzentration von den experimentellen Bedingungen

4.5.1 Betalaktam-Antibiotika

4.5.1.1 Temperatur

Die untersuchten Antibiotika zeigten eine deutliche Abhängigkeit der freien Konzentration von der gewählten Temperatur während der Ultrafiltration. Abb. 28 zeigt die Ergebnisse, sowie den Vergleich mit Vancomycin. Die freie Fraktion von Ertapenem und Cefazolin erhöhte sich mit ansteigender Temperatur. Ceftriaxon hingegen zeigte einen U-förmigen Kurvenverlauf, sodass bei 4°C und 37°C vergleichbare Werte für die freie Konzentration gemessen wurden. Bei Raumtemperatur lagen die Messwerte für die freie Konzentration niedriger. Piperacillin hingegen zeigte keine Abhängigkeit der freien Fraktion von der Temperatur. So wies jede Substanz ein spezifisches Verhalten in der Temperaturabhängigkeit der freien Konzentration auf.

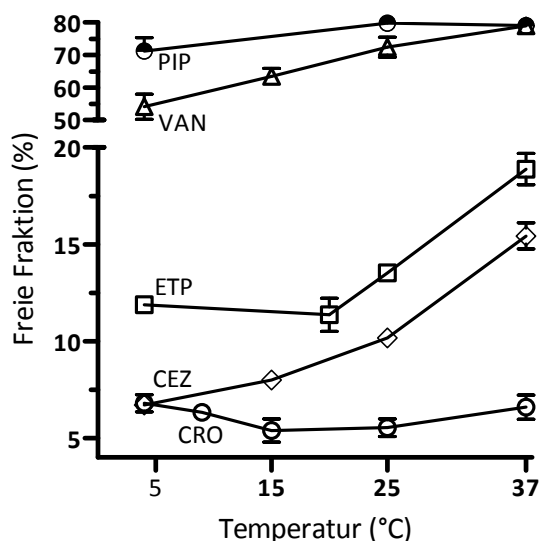


Abb. 28: Einfluss der Temperatur auf die freie Fraktion von Piperacillin (20 mg/l), Vancomycin (VAN; 25 mg/l), Ertapenem (ETP; 16 mg/l); Ceftriaxon (CRO; 20 mg/l) und Cefazolin (CEZ; 20 mg/l). Abgebildet sind die Mittelwerte (\pm SD) von jeweils 2-5 unabhängigen Versuchsreihen. Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

4.5.1.2 pH-Wert

Die freie Konzentration zeigte für alle untersuchten Substanzen eine Abhängigkeit vom pH-Wert (Abb. 29). Bei Ceftriaxon und Cefazolin nahm die Plasmaproteinbindung bei höheren pH-Werten ab. Bei Ertapenem hingegen liegt die freie Fraktion bei ungepuffertem Plasma/Serum bzw. bei Pufferung auf einen pH-Wert von 8,5 niedriger als bei Pufferung auf einen physiologischen pH-Wert von 7,4. So zeigt analog der Temperaturabhängigkeit wiederum jede Substanz ein spezifisches Verhalten in der Abhängigkeit der freien Konzentration vom pH-Wert.

Zusätzlich wurde im Rahmen der Versuche zur Bestimmung der Abhängigkeit der freien Fraktion vom pH-Wert auch noch untersucht, ob die Verwendung von Plasma oder Serum zu abweichenden Ergebnissen bei den gemessenen freien Konzentrationen führt. Hierbei zeigten sich allerdings keinerlei Unterschiede zwischen dem Einsatz von Plasma oder Serum, sodass beide Matrices als gleichermaßen geeignet für die Analytik betrachtet werden können.

Die pH-Abhängigkeit der freien Fraktion wurde für Piperacillin nicht untersucht, da sich die Substanz bei pH-Werten im Bereich von 8 schon nicht mehr ausreichend stabil für die Durchführung des Versuches zeigte.

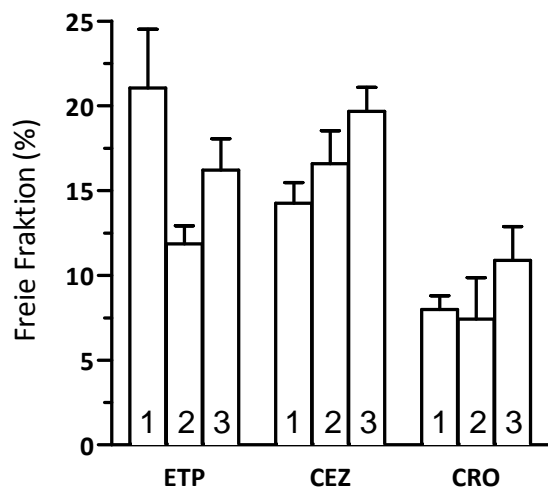


Abb. 29: Mittlere (+ SD) freie Fraktion ($n = 6$) für Ertapenem 25 mg/l (ETP), Cefazolin 25 mg/l (CEZ) und Ceftriaxon 25 mg/l (CRO) in (1) Serum/Plasma gepuffert auf pH 7,4, (2) ungepuffertes Serum/Plasma, und (3) Serum/Plasma gepuffert auf pH 8,5. Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

4.5.1.3 Zentrifugalkraft

Mit steigender Zentrifugalkraft nimmt die freie Fraktion der untersuchten Antibiotika deutlich ab. Folgende Abbildung zeigt beispielhaft die Abhängigkeit der freien Fraktion von Ceftriaxon und Ertapenem von der Zentrifugalkraft.

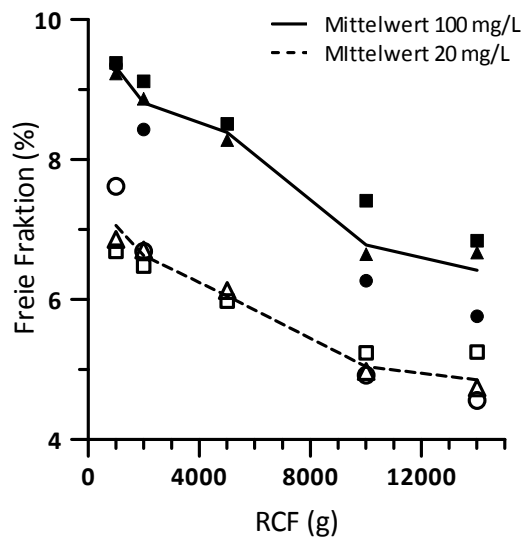


Abb. 30: Mittlere freie Fraktion ($n=2$) und Einzelwerte von Ceftriaxon in Serum gepuffert auf pH 7,4 (20 bzw. 100 mg/l) nach Ultrafiltration bei unterschiedlicher Zentrifugalbeschleunigung (g).

Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

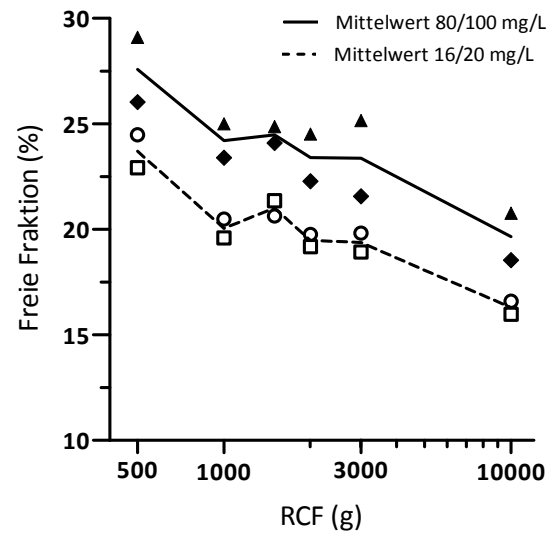


Abb. 31: Mittlere freie Fraktion ($n=2$) und Einzelwerte von Ertapenem in Serum gepuffert auf pH 7,4 (16/20 bzw. 80/100 mg/l) nach Ultrafiltration bei unterschiedlicher Zentrifugalbeschleunigung (g).

Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

4.5.2 Linezolid

Die Abhängigkeit der freien Fraktion von Linezolid von der Temperatur bzw. vom pH-Wert bei der Ultrafiltration wurde analog den Betalaktamen untersucht. Lösungen von Linezolid 30 und 1 mg/l in gepuffertem und ungepuffertem Serum wurden nach der Standardmethode (siehe Kapitel 3.10.1 und 3.10.2) in Vivacon 500 Filtern ultrafiltriert. Es wurden jeweils zwei Assays in Doppelbestimmung durchgeführt. Da zwischen den Konzentrationen kein Unterschied festgestellt werden konnte, wurden die Ergebnisse gepoolt. Die Proteinbindung von Linezolid zeigte sich im Vergleich zu den Betalaktamen indifferent, sowohl gegenüber Änderungen der Temperatur (Abb. 32), als auch des pH-Werts (Abb. 33). Die ungebundene Fraktion lag bei 77-80% (5-37°C) und 79-85% (pH 7,0-8,6).

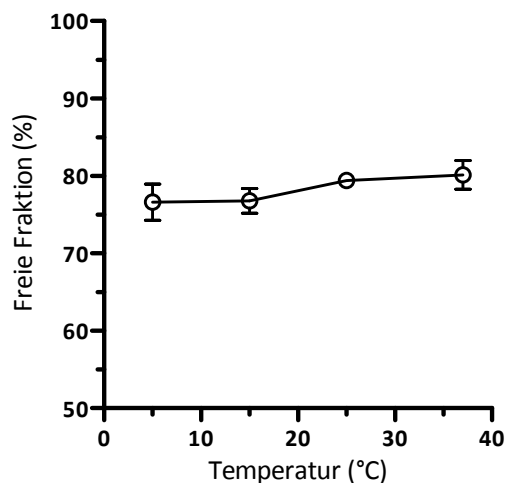


Abb. 32: Mittlere (\pm SD) freie Fraktion ($n=4$) von Linezolid in Serum gepuffert auf pH 7,4 (totale Konzentration 1 bzw. 30 mg/l) nach Ultrafiltration bei verschiedenen Temperaturen (5-15-25-37°C).

Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

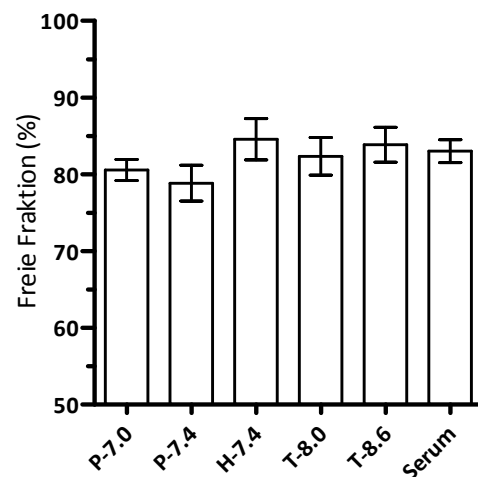


Abb. 33: Mittlere (\pm SD) freie Fraktion ($n=4$) von Linezolid in Serum (totale Konzentration 1 bzw. 30 mg/l) gepuffert auf pH 7,0 (Phosphatpuffer); 7,4 (Phosphat-/HEPES-Puffer); 8,0 (TRIS-Puffer); 8,6 (TRIS-Puffer) und ungepuffert.

Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

4.5.3 Tigecyclin

Die Temperaturabhängigkeit der freien Konzentration von Tigecyclin wurde bei vier verschiedenen Konzentrationen untersucht, da für Tigecyclin ein sogenanntes atypisches Bindungsverhalten in der Literatur beschrieben wurde. So konnte gezeigt werden, dass bei sehr niedrigen Konzentrationen die freie Fraktion von Tigecyclin ansteigt. Dies deutet sich auch in den Ergebnissen des Versuchs zur Temperaturabhängigkeit - insbesondere bei 37°C - an, der bei Konzentrationen von 0,1; 1; 10 und 100 mg/l TGC in Serum durchgeführt wurde. Die Temperaturabhängigkeit der freien Konzentration von Tigecyclin zeigte sich wie bei Linezolid weitgehend indifferent.

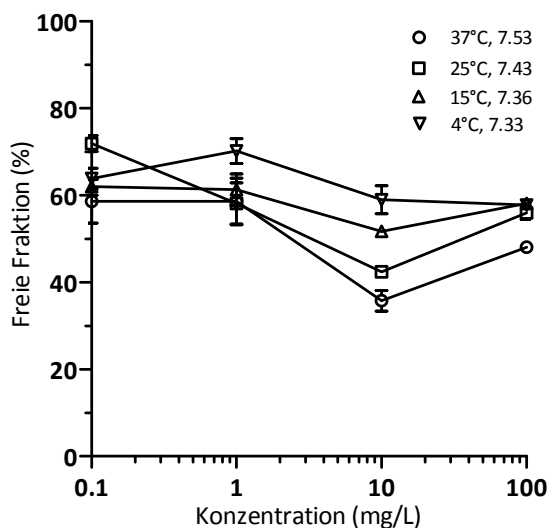


Abb. 34: Einfluss der Temperatur auf die mittlere (\pm SD) freie Fraktion ($n=2$) von Tigecyclin (TGC; 0,1-1-10-100 mg/l), in gepuffertem Serum (pH 7,4; Pufferung mit 3 M K_2HPO_4 , pH 7,50).

Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

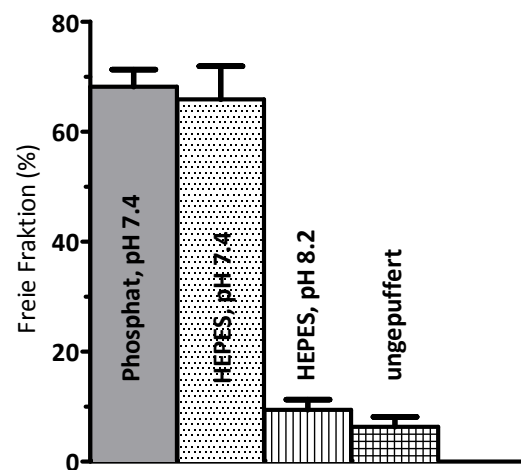


Abb. 35: Mittlere (\pm SD) freie Fraktion ($n=8$) von Tigecyclin (TGC; 0,3 mg/l) in Plasma gepuffert mit 3 M K_2HPO_4 auf pH 7,4 bzw. 2 M HEPES auf pH 7,4/8,2 bzw. ungepuffert.

Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

Die Abhängigkeit der freien Fraktion von Tigecyclin vom pH-Wert war hingegen sehr stark ausgeprägt. So lag die freie Fraktion bei gepuffertem Serum mit einem pH-Wert von ca. 7,4 deutlich höher als bei ungepuffertem Serum bzw. bei Pufferung auf einen hohen pH-Wert von ca. 8,2.

Das atypische Bindungsverhalten von Tigecyclin wurde eingehender untersucht, indem die freie Fraktion in Plasma in Abhängigkeit von der Konzentration bei Pufferung mit verschiedenen Puffersystemen (Phosphat und HEPES) ermittelt wurde. Hier zeigte sich, dass das atypische Bindungsverhalten von Tigecyclin bei Pufferung mit HEPES deutlicher auftrat als bei Pufferung mit Phosphat-Puffer. Der identische Versuch wurde auch mit Minocyclin durchgeführt, das als strukturverwandtes Tetracyclin ein vergleichbares Bindungsverhalten aufwies.

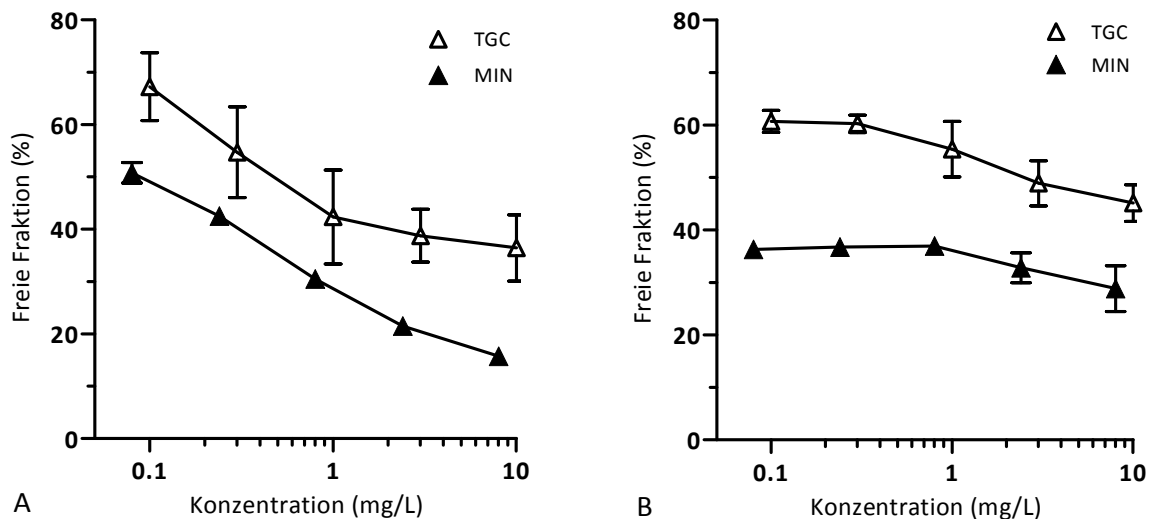


Abb. 36: Mittlere (\pm SD) freie Fraktion von Tigecyclin (TGC) und Minocyclin (MNC) in Plasma gepuffert mit (A) 2 M HEPES ($n = 3$) oder (B) 3 M K₂HPO₄ ($n = 4$) auf pH 7,4.

(1 μ M = Tigecyclin 0,6 mg/l bzw. Minocyclin 0,5 mg/l).

Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

Da Tigecyclin als Tetracyclin mit polyvalenten Kationen wie Calcium-Ionen Komplexe bilden kann, wurde auch das Bindungsverhalten in Abhängigkeit der Anwesenheit von Calcium untersucht. Hierzu wurden Versuche in Albuminlösung an Stelle von Plasma durchgeführt, um somit Proteinbindung in calciumfreiem Umfeld untersuchen zu können (Abb. 37). Die Ergebnisse der Bindungsversuche zeigen, dass die freie Fraktion von Tigecyclin in Abhängigkeit der Konzentration bei Pufferung mit HEPES einen U-förmigen Kurvenverlauf liefert. Bei niedrigen Konzentrationen steigt die freie Fraktion im Sinne des atypischen Bindungsverhaltens von Tigecyclin an. Dieses atypische Bindungsverhalten wurde durch den Zusatz von Calcium-Ionen deutlich verstärkt. Durch Zusatz von EDTA zu den HEPES gepufferten Lösungen stieg die freie Fraktion deutlich an und das atypische Bindungsverhalten wurde unterdrückt. Bei Pufferung mit Phosphat trat das atypische Bindungsverhalten nicht auf. Die freie Fraktion lag allerdings etwas höher als bei Pufferung mit HEPES. Der Zusatz von Calciumionen führte bei den Phosphat-gepufferten Lösungen zu keiner Veränderung der freien Fraktion. Durch den Zusatz von EDTA zeigte sich bei den mit

Phosphat gepufferten Lösungen ebenfalls ein leichter Anstieg der freien Fraktion um ca. 10%, sodass sich bei Anwesenheit von EDTA die Ergebnisse für die Pufferung mit HEPES und Phosphat annäherten.

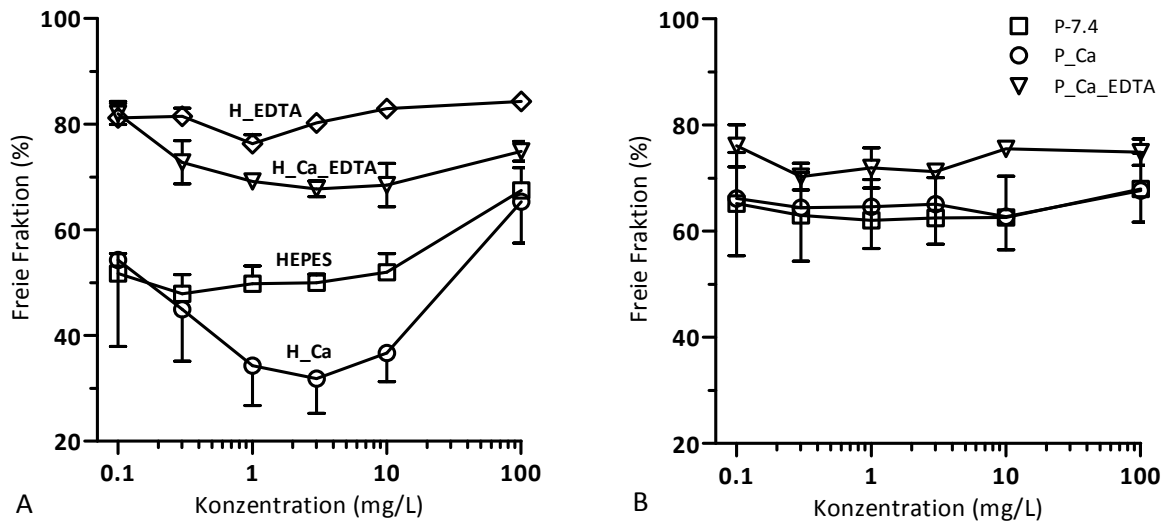


Abb. 37: Mittlere (\pm SD) freie Fraktion von Tigecyclin ($n = 3-6$) in HSA 4,2% gepuffert auf pH 7,4 mit 70 mM HEPES (A) oder 70 mM Natriumphosphatpuffer (B) mit/ohne 2,5 mM Calciumchlorid und/oder EDTA-Na 5,0 mM.

Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

4.6 Bestimmung der Antibiotika im Plasma von Intensivpatienten

4.6.1 Selektivität des chromatographischen Trennsystems

Bei der Messung von Patientenproben traten bei Ceftazidim keine Interferenzen auf. Zu den Retentionszeiten anderer Antibiotika wie z.B. Meropenem, Piperacillin, Linezolid und Tigecyclin zeigten sich im Plasma bzw. Serum von Patienten in Einzelfällen interferierende Peaks.

Die folgenden Abbildungen zeigen am Beispiel von Piperacillin, wie durch Veränderung der Fließmittelzusammensetzung und des pH-Werts eine hinreichende Trennung erzielt werden konnte. Während in Chromatogramm (A) der Piperacillin-Peak nicht von einem interferierenden Peak abgetrennt ist, konnte in Chromatogramm B durch Erniedrigung des pH-Werts eine vollständige Trennung erzielt werden. Der interferierende Peak X eluierte nun später als Piperacillin.

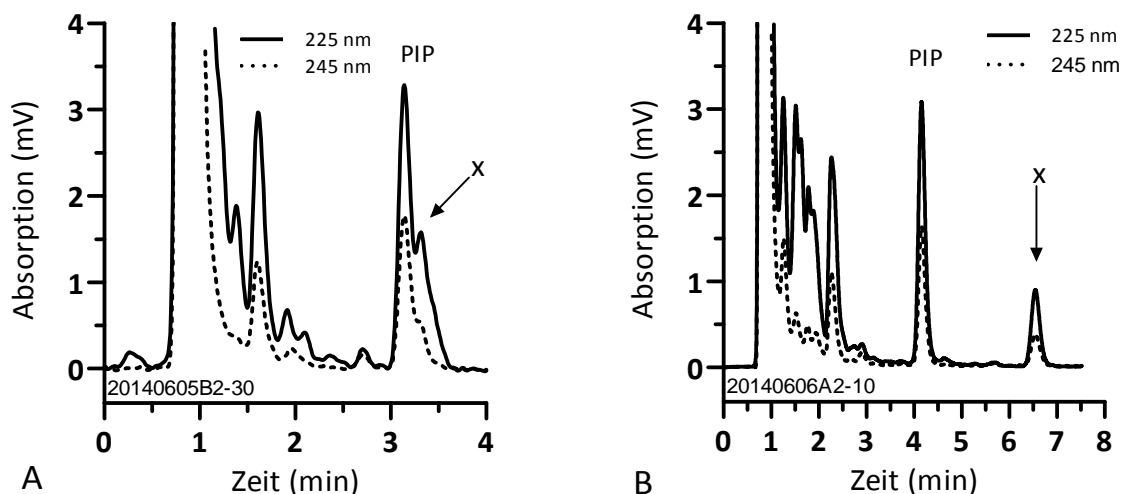


Abb. 38: Chromatogramme von Piperacillin in Plasma eines Patienten, das eine Interferenz zeigt (A), die durch Änderung der mobilen Phase umgangen werden kann (B). Die interferierende Substanz, die bei (A) als Schulter erscheint, eluiert bei (B) später und gut abgetrennt von Piperacillin.

Die Konzentration von Piperacillin wurde bei Auswertung über die Fläche/Höhe zu (A) 33,5/27,0 mg/l bzw. zu (B) 28,2/28,3 mg/l berechnet.

Trennsystem: Säule XBridge C18 BEH 2,5 μ , 50x3 mm; Fluss 0,4 ml/min, Temp. 40°C; Eluent: (A) 0,05 M H_3PO_4 /MeCN 770:180, pH 6,45; (B) 0,1M H_3PO_4 /MeCN 800:250, pH 3,01.

Am Beispiel von Linezolid konnte gezeigt werden, dass auch durch Ausweichen auf ein für eine andere Substanz etabliertes Trennsystem Interferenzen in Patientenproben überwunden werden können. So zeigt das folgende Beispiel, dass in Chromatogramm A bei Verwendung des Standard-Trennsystems Linezolid zeitgleich mit Matrixbestandteilen der Patientenprobe eluierte. Durch Ausweichen auf das Trennsystem für Tigecyclin konnte hingegen eine befriedigende Trennung gewährleistet werden, wie aus Chromatogramm B ersichtlich wird.

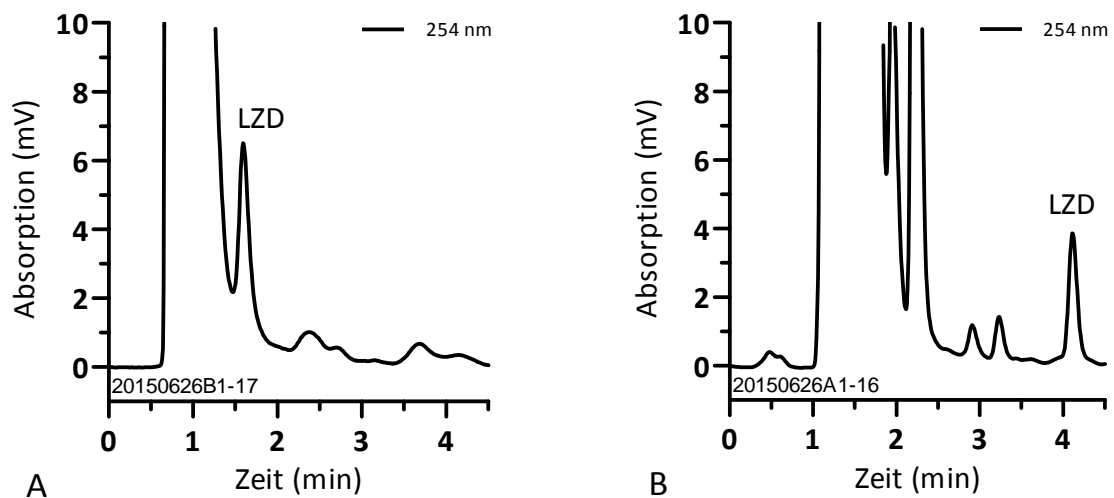


Abb. 39: Chromatogramme von Linezolid in Plasma eines Patienten, das in Chromatogramm (A) Interferenzen zeigt; Ausschaltung der Interferenzen durch Nutzung des Tigecyclin-Trennsystems (B). Die Konzentration von Linezolid wurde bei Auswertung über die Fläche/Höhe zu (A) 5,28/5,12 mg/l bzw. zu (B) 4,03/4,12 mg/l berechnet.

Trennsystem: (A) Säule XBridge C18 BEH 2,5 μ , 50x3 mm; Eluent 0,1M H_3PO_4 /MeCN 750:250, pH 3,06; (B) Säule Nucleoshell RP18 2,7 μ , 100x3 mm; Eluent 0,1M H_3PO_4 /MeCN 800:200, pH 3,16, 700 mg SOS;

Fluss 0,4 ml/min; Temp. 40°C;

4.6.2 Konzentrationen der Antibiotika bei Intensivpatienten unter Routinetherapie

Einen Überblick über die Patienten- und Probenzahl für die Substanzen Meropenem und Piperacillin gibt Tab. 18.

Tab. 18: Patientenproben Meropenem und Piperacillin

Substanz	Probenzahl	Patientenzahl	Median (mg/l)	C _{min} /max (mg/l)	Interquartilabstand (mg/l)
MEM	230	48	14,64	0,27/88,80	7,92-24,47
PIP	159	25	68,20	0,95/286,00	36,41-118,40

Alle gemessenen Konzentrationen lagen oberhalb der berechneten Bestimmungsgrenze ($S/N \geq 6:1$). Allerdings waren für Meropenem die Konzentrationen von 7 Patientenproben niedriger als die untere Grenze des Validierungsbereichs von 1 mg/l. Für Piperacillin lag eine Patientenprobe mit einer Konzentration von 0,95 mg/l minimal unterhalb der unteren Validierungsgrenze von 1 mg/l. Die Konzentrationen von 13 Patientenproben mit Piperacillin lagen oberhalb der oberen Grenze des Validierungsbereichs von 200 mg/l, wobei eine Probe mit einer Konzentration von 285,50 mg/l den Maximalwert darstellte. Die in den mitgeführten Kontrollen bestimmte Konzentration, wich in keinem Fall mehr als 15% vom Nominalwert ab. Die Streuung der gemessenen Spiegel zeigte sich sehr breit. Abbildung 40 dient zur graphischen Illustration der gemessenen Konzentrationen.

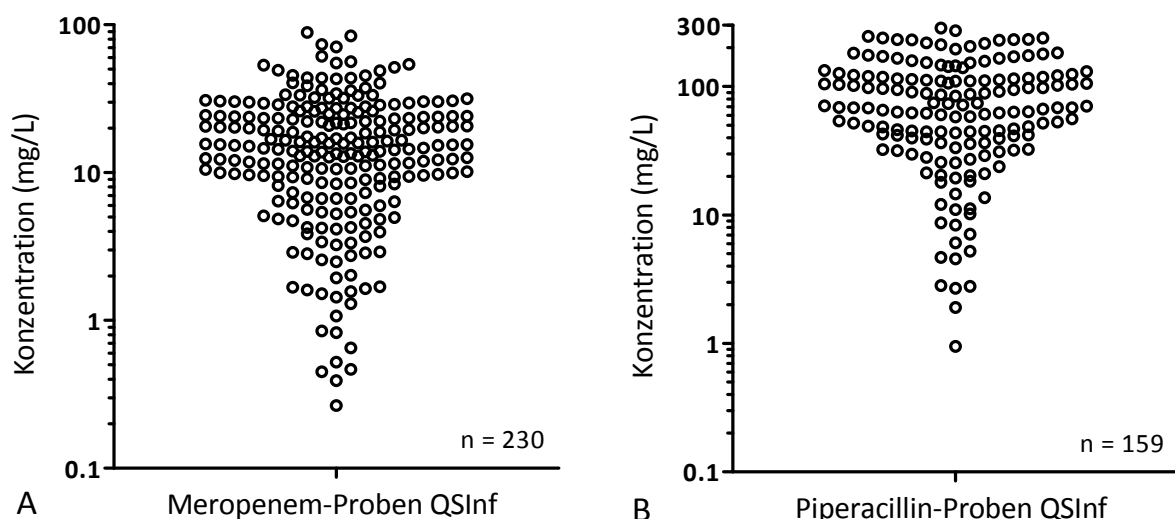


Abb. 40: Verteilung der gemessenen Konzentrationen von Meropenem (A) und Piperacillin (B). Ein Datenpunkt entspricht jeweils der Konzentration in einer Patientenprobe. Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

Mit Hilfe des EDV-Programms Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight/Certara, St Louis, MO, USA) wurden aus den gemessenen Spiegeln und den Angaben zu den Dosierungszeitpunkten für jeden Patienten die Konzentrationen zur Hälfte (Tau/2) und zum Ende des Dosisintervalls (Tau) berechnet. Zur Beurteilung der Spiegel wurde bei den gegen *Pseudomonas aeruginosa* wirksamen Antibiotika Meropenem und Piperacillin die minimale Hemmkonzentration (MHK) dieses Keims aus den Empfehlungen der EUCAST herangezogen [117].

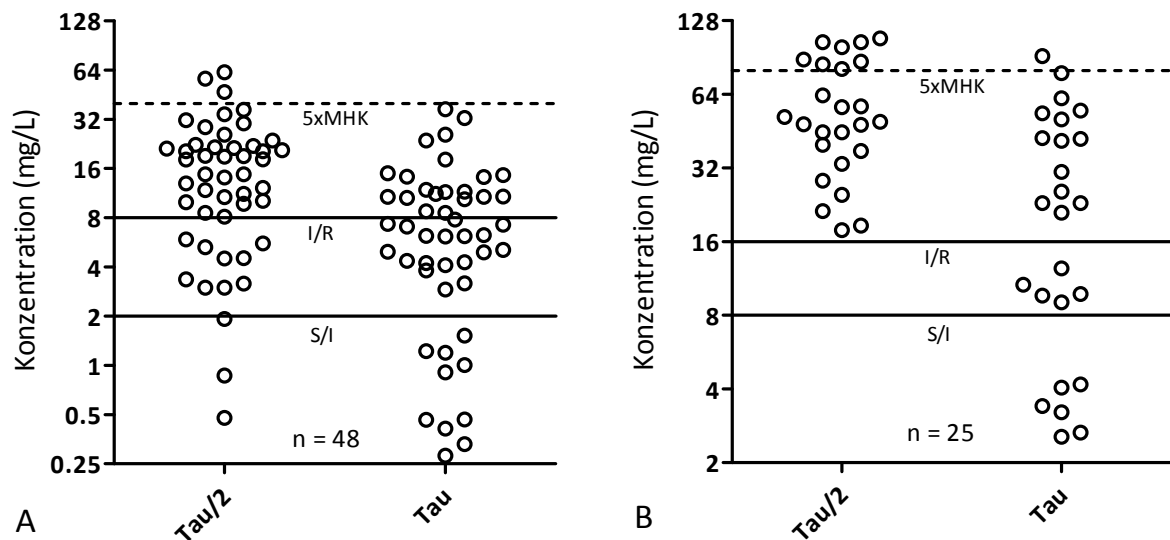


Abb. 41: Berechnete Konzentrationen zur Hälfte (Tau/2) bzw. zum Ende des jeweiligen Dosisintervalls (Tau). Ein Datenpunkt entspricht jeweils einem Patienten. Die Linie S/I bezeichnet den Grenzwert zwischen sensibel und intermediär. Die Linie I/R den Grenzwert zwischen intermediär und resistent. Die Linie 5xMHK entspricht dem Fünffachen des jeweiligen I/R-Werts:

A) Berechnete Werte für MEM

B) Berechnete Werte für PIP

Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

Bei MEM lagen zur Hälfte des Dosisintervalls 25,0% der Patienten mit ihren Spiegeln unterhalb des I/R Grenzwerts für *Pseudomonas aeruginosa*. Zum Ende des Dosisintervalls erreichten die berechneten Spiegel der Patienten bereits in 58,3% der Fälle diesen Grenzwert nicht. Bei Piperacillin hingegen lagen zur Hälfte des Dosisintervalls alle berechneten Spiegel oberhalb des I/R Grenzwertes für *Pseudomonas aeruginosa*. Zum Ende des Dosisintervalls erreichten aber auch hier 44,0% der Patienten diesen Grenzwert nicht.

Zusätzlich wurde für Meropenem als Antibiotikum mit den meisten Patientenproben auch betrachtet, inwieweit das gewählte Dosisregime Einfluss auf das Erreichen der Zielspiegel hat. Hierzu wurden die berechneten Spiegel zum Ende des Dosierungsintervalls betrachtet. Auffällig ist, dass die Verabreichung des Meropenems als verlängerte Infusion in allen Fällen zu Spiegeln im gewünschten Konzentrationsbereich bei gleichzeitig geringer Streuung führte.

Die Schwankungsbreite der errechneten Konzentrationen stellte sich bei Gabe als Kurzinfusion hingegen stets groß dar und der gewünschte Konzentrationsbereich wurde häufig nicht erreicht. Zwischen den Dosierungsregimen mit zwei- (Tau = 12 h) bzw. dreimal täglicher (Tau = 8 h) Verabreichung als Kurzinfusion zeigten sich keine bemerkenswerten Unterschiede in den erreichten Konzentrationen.

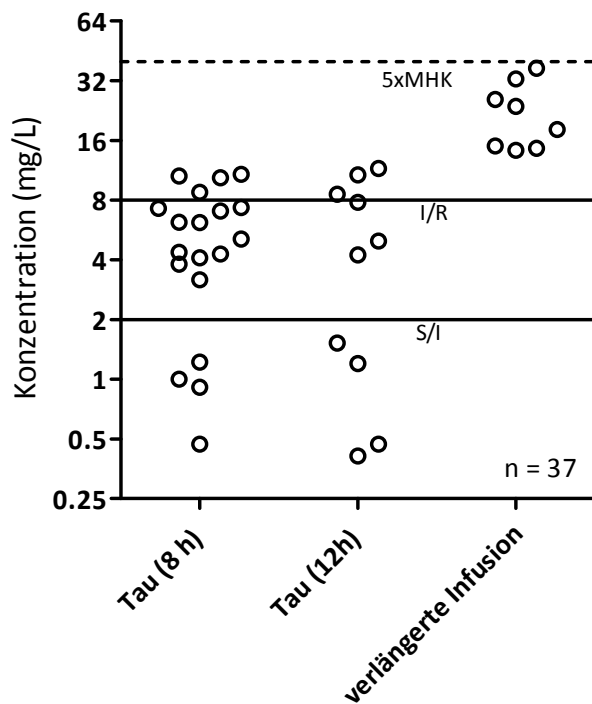


Abb. 42: Graphische Darstellung der berechneten Meropenem -Konzentrationen zum Ende des jeweiligen Dosisintervalls. Ein Datenpunkt entspricht jeweils einem Patienten. Die Linie S/I bezeichnet den Grenzwert zwischen sensibel und intermediär. Die Linie I/R den Grenzwert zwischen intermediär und resistent. Die Linie 5xMHK entspricht dem Fünffachen des jeweiligen I/R-Wertes; Die Einzeldosis betrug stets 1000 mg; Patienten mit abweichender Dosierung wurden wegen der geringen Anzahl hier nicht ausgewertet. Bei den Patienten mit verlängerter Infusion erfolgte die Verabreichung einer Einzeldosis über 2-4 h bei einem Dosisintervall von 8 h. Bei den übrigen dargestellten Patienten erfolgte die Verabreichung der Einzeldosis als Kurzinfusion über 0,25 – 1h. Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

Schließlich wurde für Piperacillin und Meropenem auch überprüft, ob die aus den gemessenen Konzentrationen berechnete Clearance der beiden Antiinfektiva mit der Nierenfunktion der Patienten korrelierte. Dies war für beide Substanzen der Fall, allerdings war für Piperacillin die Korrelation deutlich schwächer ausgeprägt.

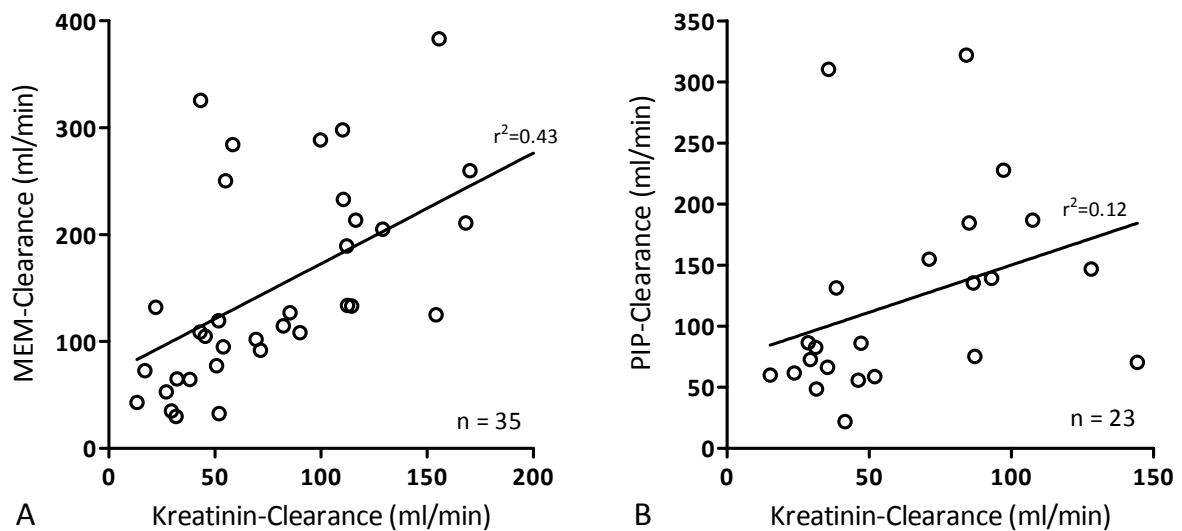


Abb. 43: Berechnete MEM- bzw. PIP-Clearance der Patienten aufgetragen gegen die berechnete Kreatinin-Clearance (Cockcroft-Gault) der Patienten. Ein Datenpunkt entspricht jeweils einem Patienten.

A) Berechnete Werte für die MEM-Clearance aufgetragen gegen die Kreatinin-Clearance der Patienten

B) Berechnete Werte für die PIP-Clearance aufgetragen gegen die Kreatinin-Clearance der Patienten
Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

Für Piperacillin, Meropenem [98] und Linezolid [98] wurde bei zufällig ausgewählten Proben auch die freie Konzentration bestimmt. Für Linezolid erfolgte die Konzentrationsbestimmung neben der Nanosep Omega 10 k Ultrafiltrationseinheit auch mit den Vivacon 500 30 k Filtern. Folgende Abbildungen 44 und 45 zeigen die gemessenen freien Fraktionen.

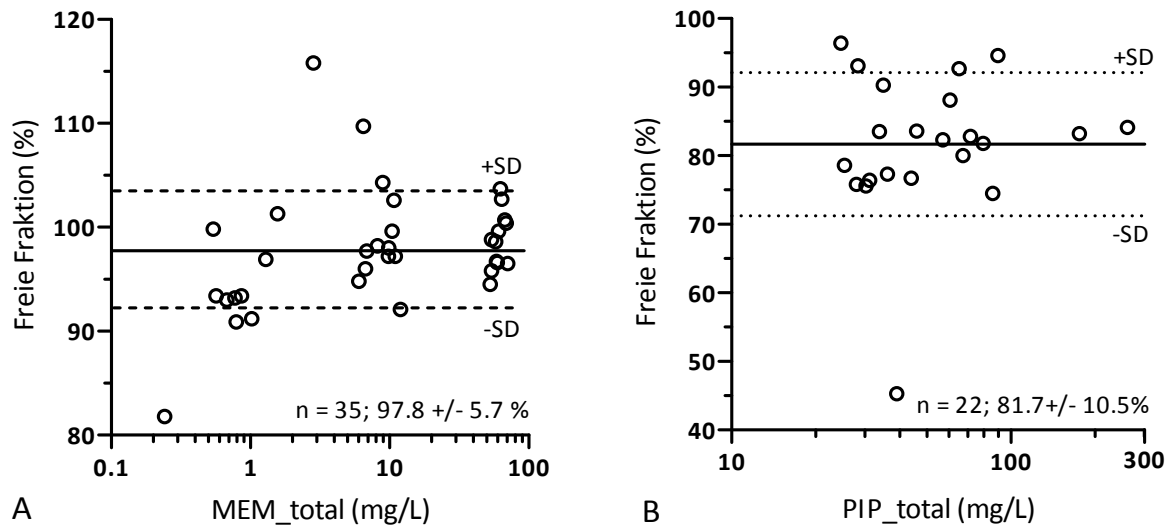


Abb. 44: Ermittelte freie Fraktion für Meropenem [98] (A) und Piperacillin (B). Ein Datenpunkt entspricht jeweils einer Patientenprobe

Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

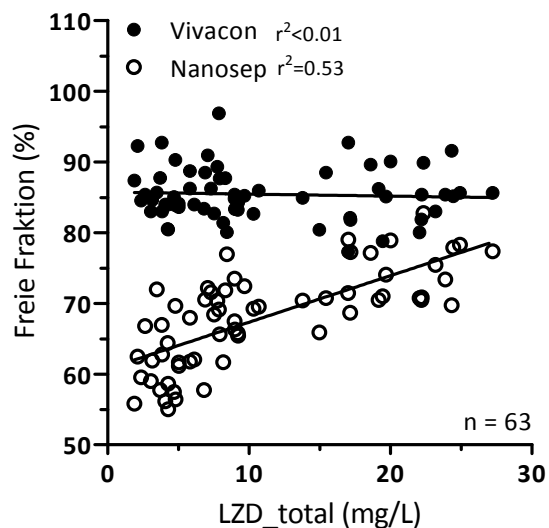


Abb. 45: Ermittelte freie Fraktion für Linezolid mit den Ultrafiltrationseinheiten

Nanosep 10 k und Vivacon 30 k in Plasma von Patienten, die im Rahmen der perioperativen Prophylaxe einmalig LZD 600 mg i.v. erhalten hatten [98]. Ein Datenpunkt entspricht jeweils einer Patientenprobe.

Trennsystem: Chromatographische Standardbedingungen (siehe Kapitel 3.6)

Die mittlere freie Fraktion für Meropenem (Abb. 44) lag bei $97,8 \pm 5,7\%$ und für Piperacillin (Abb. 44) bei $81,7 \pm 10,5\%$. Für beide Substanzen zeigte sich keine Abhängigkeit der freien Konzentration von der totalen Konzentration, was sich aus dem Bestimmtheitsmaß r^2 für Meropenem von 0,03 und für Piperacillin von 0,01 ableiten ließ. Für Linezolid (Abb. 45) hingegen korreliert bei Verwendung der Nanosep omega 10 k Filter die freie Konzentration mit der totalen Konzentration ($r^2=0,53$). Bei Verwendung der Vivacon 500 30 k Filter hingegen zeigte sich die freie Konzentration von Linezolid unabhängig von der totalen Konzentration ($r^2<0,01$). Der Mittelwert für die freie Fraktion lag bei Verwendung der Nanosep Omega 10 k Filter mit $68,0 \pm 6,7\%$ niedriger als bei Verwendung der Vivacon 500 30 k Einheiten, wo sich eine mittlere freie Fraktion von $85,4 \pm 3,7\%$ ergab.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, HPLC-Methoden mit photometrischer Detektion für die Konzentrationsbestimmung von Betalaktam-Antibiotika sowie Linezolid und Tigecyclin in Plasma zu entwickeln und zu validieren. Neben den totalen Konzentrationen sollten auch die freien Konzentrationen bestimmt werden, da für die Wirksamkeit eines Pharmakons nur der freie, nicht an Plasmaproteine gebundene Anteil zur Verfügung steht [65]. Schließlich wurden die Methoden im Rahmen einer Studie an Intensivpatienten des Universitätsklinikums Regensburg sowie der Charité Universitätsmedizin Berlin - Campus Benjamin Franklin eingesetzt und auf ihre Brauchbarkeit überprüft. Ergebnisse dieser Studie dienten zur Evaluation, inwieweit in der klinischen Routine definierte Zielspiegel erreicht wurden.

5.1 Chromatographie

Anders als bei den Aminoglycosiden und Vancomycin stehen zur Analytik der Betalaktam-Antibiotika sowie für Linezolid und Tigecyclin im Rahmen eines TDM-Programms keine kommerziellen Assays wie z.B. Immunoassays zur Verfügung [75]. In solchen Fällen gilt bisher die HPLC als analytische Standardmethode, da sie zur Auftrennung komplexer Substanzmischungen aus verschiedenen biologischen Matrices, sowie zur Quantifizierung der Bestandteile gut geeignet ist [99]. Zum Aufbau des chromatographischen Trennsystems sind insbesondere eine geeignete Säule und ein geeignetes Fließmittel zu bestimmen, wozu präliminare Experimente durchgeführt wurden. In Anlehnung an publizierte Methoden wurden Säulen mit reversed-phase Materialien verwendet sowie Eluenten auf Basis von Phosphatpuffer und Acetonitril [86,100,101].

5.1.1 Trennsystem

Den Schwerpunkt der Untersuchungen bildete die Etablierung des Trennsystems für die Gruppe der untersuchten Betalaktam-Antibiotika. Alle Betalaktame sind Carbonsäuren, die zum Teil auch Aminfunktionen enthalten. Mit stärker sauren pH-Werten liegen die Betalaktame daher zunehmend in nicht dissoziierter Form vor und erhalten dadurch einen lipophilen Charakter [102]. Somit eluieren sie an reversed-phase Materialien später. Weist das Molekül zusätzlich Aminfunktionen auf, können diese im sauren pH-Bereich protoniert werden, was dem Molekül wieder einen hydrophileren Charakter verleiht und zur Verkürzung der Retentionszeit führt. So ergibt sich ein pH-abhängiges Retentionsverhalten an reversed-phase Materialien, das durch den Retentionsfaktor beschrieben wird. So kamen in publizierten Methoden zur HPLC-Analytik von Betalaktam-Antibiotika überwiegend C18-Säulen zum Einsatz [77,103,104]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit das Retentionsverhalten an verschiedenen C18-Trennsäulen mit moderat unterschiedlicher Selektivität überprüft (Kapitel 4.1.1). Bei Kenntnis des Retentionsverhaltens des Analyten an

verschiedenen Säulen kann im Fall von Interferenzen in Patientenproben durch die Verwendung einer alternativen Trennsäule leicht versucht werden, eine hinreichende Trennung herbeizuführen. Zur routinemäßigen Bestimmung der Betalaktame wurde die Säule xBridge BEH XP 2,5 μ , 50x3 mm, gewählt. Eine Säule mit identischem Material und ähnlicher Dimension wurde auch in einer publizierten Methode bereits erfolgreich zur Analytik der untersuchten Betalaktam-Antibiotika eingesetzt [100]. Als Alternative diente die Säule Nucleoshell RP 18 2,7 μ , 100x3 mm, die eine etwas abweichende Selektivität zeigte. Durch den geringen Innendurchmesser der Säulen von jeweils nur 3 mm konnte im Vergleich zur Literatur [100] mit einer niedrigen Flussrate von nur 0,4 ml/min gearbeitet werden bei vergleichbaren Analysenzeiten, sodass sich der Verbrauch an Fließmittel moderat gestaltete.

Bei der Validierung entwickelt man ein Trennsystem mit Plasma gesunder Probanden, bei dem typischerweise keine anderen Substanzen mit den Analyten koeluiieren. Der chromatographische Hintergrund in Plasma von Intensivpatienten ist aber stärker und variabler, sodass Interferenzen auftreten können. In solchen Fällen ist es hilfreich, das Retentionsverhalten des Analyten im Hinblick auf die pH-Abhängigkeit gut einschätzen zu können, da es durch Veränderung des pH-Werts der mobilen Phase gelingen kann, interferierende Peaks hinreichend zu trennen. Aus diesem Grund wurde bereits vor dem Beginn der Analysen von Serum der Einfluss des pH-Werts der mobilen Phase auf die Retention der Substanzen in wässriger Lösung untersucht (Kapitel 4.1.1).

Als mobile Phase dienten stets Mischungen von 0,1 M Phosphatpuffer mit wechselnden Anteilen an Acetonitril. Der pH-Wert der Eluenten lag dabei stets im sauren Bereich, da die Betalaktam-Antibiotika hier bei den eingesetzten analytischen Säulen eine zufriedenstellende Retention zeigten. Auch in der Literatur wurden Mischungen aus diesen Komponenten zur Analytik der Betalaktame eingesetzt [86,100,101,105,106]. Das Arbeiten mit einer einheitlichen Konzentration des Phosphatpuffers und pH-Werten auf ähnlichem Niveau machte es möglich, den Phosphatpuffer in größerer Menge vorzubereiten, sodass zur Herstellung des benötigten Eluenten lediglich noch Acetonitril in der gewünschten Menge zugesetzt und der pH-Wert auf den gewünschten Wert justiert werden musste. Für die Routine wurde eine isokratische Elution gewählt. So konnten durch substanzspezifisch optimierte Fließmittelmischungen kurze Analysenzeiten bei gleichzeitig hoher Auflösung realisiert werden. Die Retentionszeiten der untersuchten Antibiotika lagen im Bereich zwischen 2,4 und 4,1 min (Kapitel 3.6). Der Einsatz eines Fließmittelgradienten würde es zwar ermöglichen, mehrere Antibiotika in der gleichen Methode und somit im gleichen analytischen Lauf zu quantifizieren, allerdings führt dies zu einer deutlichen Verlängerung der Analysenzeiten, wie Beispiele aus der Literatur zeigen [100,101,107]. Auch werden im Rahmen des TDM nicht alle Antiinfektiva in gleicher Häufigkeit zur Analyse angefordert, sodass eine Integration aller untersuchten Substanzen in eine Methode in diesen Fällen unnötig zu einer Routinemethode mit langer Laufzeit führen kann. Ferner war es ein

besonderer Anspruch dieser Arbeit, eine technisch einfach umsetzbare Lösung zur Quantifizierung der untersuchten Antibiotika zu entwickeln. Die erforderliche Technik zur Durchführung von Fließmittelgradienten steht nicht in jeder Krankenhausapotheke zur Verfügung.

Die Detektion erfolgte UV-photometrisch bei definierten Wellenlängen, da alle untersuchten Antibiotika im UV-Bereich eine hinreichende Absorption zeigen. Für Carbapeneme war eine Detektionswellenlänge von 300 nm gut geeignet, während die Cephalosporine bei 260 nm detektiert wurden. Piperacillin als Penicillin hingegen absorbiert bei einer Wellenlänge von 225 nm und kann dort ideal detektiert werden. Diese Wellenlängen wurden in der Literatur typischerweise zur Detektion der untersuchten Betalaktam-Antibiotika gewählt, da hier jeweils Absorptionsmaxima der Substanzen vorliegen. [89,102,107]. Häufig wurde zusätzlich simultan die Absorption bei einer zweiten Wellenlänge gemessen, um Interferenzen aufzuspüren, die bei der zur Auswertung genutzten Wellenlänge evtl. nicht zu erkennen sind. Hier kann auch der Einsatz eines Photodiodenarraydetektors hilfreich sein, der es ermöglicht das komplette UV-Spektrum eines Peaks aufzunehmen [108]. Mögliche Interferenzen könnten so noch besser erkannt werden [108]. Allerdings ist diese spezielle Form des UV-Detektors in der Anschaffung deutlich teurer. Durch den Einsatz eines massenspektrometrischen Detektors kann die Selektivität und Spezifität einer HPLC-Methode nochmals erhöht werden [82]. Allerdings kommt diese kostenintensive Detektionsmethode bisher nur in großen klinisch-chemischen Laboratorien zum Einsatz. In Krankenhausapotheken, die mit der entwickelten Methode zum TDM vorrangig adressiert werden sollten, steht die massenspektrometrische Detektion in der Regel nicht zur Verfügung.

5.2 Bestimmung der totalen Konzentration

Die totale Konzentration wurde für alle untersuchten Antiinfektiva bestimmt. Um den zu untersuchenden Arzneistoff aus seiner Bindung an Plasmaproteine freizusetzen und die analytische Säule vor Beeinträchtigung durch Eiweißbestandteile zu schützen, müssen hierzu die in der Plasma- bzw. Serumprobe enthaltenen Proteine durch eine geeignete Probenvorbereitung entfernt werden [109].

Hierzu diente überwiegend die Proteinfällung mittels Acetonitril mit nachfolgender Extraktion des überschüssigen Acetonitrils durch Dichlormethan (Kapitel 3.8). Dieses einfache Verfahren der Proteinfällung wurde vor vielen Jahren eingeführt [110] und kam auch bereits in anderen publizierten Methoden für das Routine-TDM von Antiinfektiva zum Einsatz [100,111,112].

Als alternative Probenvorbereitung zur Bestimmung der totalen Konzentration ist auch die Festphasenextraktion publiziert [105,113,114]. Hierbei wird der Analyt unter Verwendung einer Festphasenkartusche mit festem Adsorbentmaterial aus der Matrix extrahiert. Diese

Methode bietet gegenüber der Proteinfällung auch die Möglichkeit der Wirkstoffanreicherung, ist allerdings apparativ aufwendiger und kostenintensiver, da hierfür die Festphasenkartuschen als Einwegmaterial beschafft werden müssen [115].

In der vorliegenden Arbeit konnten mit der Proteinfällungsmethode sehr hohe und reproduzierbare Wiederfindungsraten von deutlich über 90% realisiert werden, sodass diese Methode wegen ihres geringen technischen Aufwands und der geringeren Kosten als ideal für ein Routine-TDM erachtet wurde (Kapitel 4.2.1.2).

Das standardmäßig verwendete Probenvolumen betrug 200 µl. Um in der Routine die Belastung der Patienten möglichst gering zu halten, ist auch die Verwendung einer geringeren Plasmamenge möglich, da die entwickelte Methode auch mit einem Volumen von 50 µl Plasma durchgeführt werden kann (Kapitel 3.8.). Die Reduktion der Probenmenge ist insbesondere dann relevant, wenn die Methode auch zum Routine-TDM bei Kindern und Neugeborenen eingesetzt werden soll, denn hier ist die Möglichkeit zur Entnahme größerer Blutmengen im Vergleich zu Erwachsenen deutlich eingeschränkt [116].

5.3 Validierung

Wie in beiden Leitfäden der EMA und der FDA zur Validierung bioanalytischer Methoden gefordert, zeigten alle untersuchten Antibiotika keine Interferenzen mit Matrixbestandteilen [92,92] (Kapitel 4.2.1.1). Die unteren Grenzen der Kalibrierungsbereiche der untersuchten Antibiotika liegen durchwegs unterhalb der Grenzwerte sensibel/intermediär (Clinical Breakpoints) nach EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) für die zur Bewertung herangezogenen Leitkeime [117]. Da die Wirksamkeit der untersuchten Substanzen mit dem Überschreiten dieses definierten Grenzwerts korreliert, ist es essentiell, dass Konzentrationen in dieser Größenordnung noch zuverlässig detektiert werden können [75]. So liegen beispielsweise nach EUCAST die Clinical Breakpoints für *Pseudomonas* bei 2 mg/l für Meropenem und 8 mg/l für Piperacillin. Für beide Methoden allerdings stellt bereits eine Konzentration von 1 mg/l den niedrigsten Punkt der Kalibrierung dar (Kapitel 4.2.1.2). So ist sichergestellt, dass Konzentrationen im Bereich der MHK mit hoher Präzision bestimmt werden können. Die obere Grenze des Validierungsbereichs wurde an die nach Kurzinfusion einer Standarddosis erhaltenen Spitzenspiegel angelehnt. So weisen die Fachinformationen von Meropenem Eberth 1 g und Piperacillin Fresenius 4 g nach Kurzinfusion der jeweiligen Dosierung Spitzenspiegel von 49 mg/l bzw. 200 mg/l aus [66,71]. Die oberen Grenzen der Validierungsbereiche wurden entsprechend zu 100 bzw. 200 mg/l gewählt (Kapitel 4.2.1.2). Als wichtiger oberer Grenzwert zur Bewertung von Betalaktam-Spiegeln wird häufig das Fünffache des MHK-Werts intermediär/resistent herangezogen. Oberhalb dieses Wertes führt eine Erhöhung der Spiegel zu keinem verbesserten Ansprechen der Therapie [54]. Diese Werte liegen für alle untersuchten Betalaktame jeweils deutlich unter der oberen Grenze des Validierungsbereichs. Für

Meropenem und Piperacillin als die Substanzen mit der größten Probenzahl liegen diese Werte mit *Pseudomonas aeruginosa* als Leitkeim beispielsweise bei 40 bzw. 80 mg/l [117]. Beide Werte liegen deutlich unter den oberen Werten der Kalibrierung von 100 bzw. 200 mg/l (Kapitel 4.2.1.2).

Alle entwickelten Methoden zeigten bei der Validierung eine sehr hohe Linearität mit Korrelationskoeffizienten $\geq 0,99$ für die Auswertung nach der Geradengleichung $y = m \cdot x + b$, als auch bei Führung der Gerade durch den Nullpunkt nach $y = m \cdot x$ (Kapitel 4.2.1.2). Da somit Linearität und ein Detektorsignal von Null bei einer Konzentration von Null des Analyten nachgewiesen werden konnte ($y = m \cdot x$), kommt zur Auswertung der Proben in der Routine auch eine Einpunktkalibrierung in Frage, die das Vorgehen bei der Probenvorbereitung und Auswertung deutlich vereinfachen kann, was bei einer Methode für die klinische Routine von hoher Relevanz ist [118,119]. Um allerdings die Qualität der Einpunktkalibrierung sicherzustellen, wurde auch dieses Verfahren validiert, indem aus einem Kalibrator mittlerer Konzentration als Standard die Konzentrationen der übrigen Kalibratoren errechnet wurden (Kapitel 4.2.1.2). Die Abweichungswerte für die Intra- bzw. Inter-Assay-Präzision lagen für die Einpunktkalibrierung bei jeweils $\leq 13,1\%$, was unter den in den Empfehlungen der EMA und der FDA geforderten Werten von 15% bzw. 20% für den niedrigsten Wert der Kalibration liegt (Kapitel 4.2.1.2). Die Werte für die Richtigkeit bei wiederholter Messung von Standardreihen lagen stets unter 5% (Kapitel 4.2.1.2). Auch hier fordern EMA und FDA Werte ≤ 15 bzw. 20% für den niedrigsten Wert der Kalibrierung, was mit den entwickelten Methoden deutlich unterschritten werden konnte. Die Wiederfindung war mit Werten $\geq 94,4\%$ quantitativ, sodass für die Routine auf einen internen Standard verzichtet werden konnte [115] (Kapitel 4.2.1.2).

Zur Bestimmung der freien Konzentration aus Ultrafiltrat wurden keine separaten Validierungsexperimente durchgeführt, da durch die Methodvalidierung für die Konzentrationsbestimmung der totalen Konzentration die Validierungsparameter wie Linearität, Präzision und Richtigkeit bereits erhoben wurden. Ferner handelt es sich auch beim Ultrafiltrat um eine wässrige Lösung mit Plasmaelektrolyten analog der Injektionslösung zur Bestimmung der totalen Konzentration. Die Richtigkeit kann separat für die Bestimmung der freien Konzentration auch nicht validiert werden, da das Ausmaß der Plasmaproteinbindung nicht genau vorhergesagt werden kann [120].

Die Stabilität in Plasma und Injektionslösung zeigte sich für alle untersuchten Substanzen als hinreichend zur Durchführung der totalen und freien Konzentrationsbestimmung, sowie zur Lagerung der Proben und Standards bei -70 °C [95–97]. Im Falle einer Routine-Anwendung der entwickelten Methoden für ein TDM, sollte die Stabilität der Proben im Rahmen der Präanalytik nochmalig anhand der konkreten Transport- und Analysenzeiten überprüft werden, sofern diese von den in der Untersuchung evaluierten Zeiträumen abweichen. Auch im Falle einer geplanten kontinuierlichen Verabreichung der untersuchten Betalaktame sind

vorausgehende Stabilitätsprüfungen der vorbereiteten Infusionslösungen zu fordern. Bisherig ist nur Ceftazidim für eine kontinuierliche Infusion explizit zugelassen. Bei den übrigen untersuchten Betalaktam-Antibiotika wird in der Fachinformation die Applikation als Kurzinfusion empfohlen, sodass die Stabilität bei längerer Applikationsdauer im Rahmen der Zulassung nicht gesondert untersucht wurde [66–68,70,71].

5.4 Bestimmung der freien Konzentration durch Ultrafiltration

Zur Bestimmung der freien Konzentration wurde die Methode der Ultrafiltration gewählt (Kapitel 3.9). Die Gleichgewichtsdialyse als früher häufig eingesetzte Alternativmethode gilt zwar in der publizierten Literatur, insbesondere als Mikrodialyse ausgeführt, noch als Referenzmethode zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung von Arzneistoffen, zeigt sich aber als Methode für ein Routine-TDM wenig geeignet [91,121,122]. Besonders die Mikrodialyse kommt natürlich als invasives Verfahren für ein Routine-TDM nicht in Frage. Die Ultrafiltration kann zum Einsatz kommen, wenn für die verwendete Ultrafiltrationseinheit sichergestellt ist, dass der Arzneistoff nicht daran adsorbiert, die Filtrationsmembran zuverlässig Proteine zurückhält und das Gleichgewicht zwischen freier und gebundener Substanz durch den Ultrafiltrationsvorgang nicht gestört wird [123,124]. Diese Parameter wurden für die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Ultrafiltrationseinheiten überprüft.

Ein zentraler Aspekt, der für die Anwendung der Ultrafiltration zum TDM von freien Konzentrationen spricht, ist der gegenüber der Gleichgewichtsdialyse geringere zeitliche Aufwand zur Anwendung der Methode. Während bei der entwickelten Methode die Durchführung der Ultrafiltration einer Probe für die Analytik der freien Konzentration lediglich 20 min dauert, liegt der Zeitaufwand bis zum Erreichen eines stabilen Gleichgewichts bei der Gleichgewichtsdialyse deutlich höher. So liegen die Angaben zu den für die Gleichgewichtseinstellung in der Dialysezelle erforderlichen Zeitspannen je nach Hersteller zwischen 4 und 24 h [125]. Einige Antibiotika insbesondere aus der Gruppe der Betalaktame sind über diese lange Zeitspanne in Plasma nicht hinreichend stabil, wie Ergebnisse der Stabilitätsprüfung in dieser Arbeit zeigten (Kapitel 4.4). Durch die längere Dauer der Gleichgewichtsdialyse vergrößert sich folglich aber auch die Zeitspanne, bis dem behandelnden Arzt im Rahmen eines TDM-Programms die Plasmakonzentration des Patienten kommuniziert werden kann. Insbesondere bei septischen Patienten ist es essentiell für den Behandlungserfolg, dass möglichst frühzeitig eine adäquat dosierte zielgerichtete Therapie durchgeführt wird [6]. Gerade in der Therapie dieser schwerstkranken Patienten sollen TDM-Programme für Antiinfektiva zum Einsatz kommen [42], sodass eine möglichst kurze Zeitdauer für die genutzte analytische Methode zu fordern ist. Auch der Aufwand zur Etablierung der Methode stellt sich für die Gleichgewichtsdialyse umfangreicher dar, da neben der auch bei der Ultrafiltration zu prüfenden

Adsorptionsphänomene an Kunststoffoberflächen und Membran zusätzlich auch die Zeitdauer bis zum Erreichen des Gleichgewichts evaluiert werden muss [126].

Eine weitere Einschränkung bei der Gleichgewichtsdialyse betrifft den durch osmotische Effekte auftretenden Volumenfehler. Da bei der Gleichgewichtsdialyse mit einem unphysiologischen Dialysepuffer gearbeitet werden muss, der im Vergleich zu Plasma keine makromolekularen Bestandteile enthält, kommt es während des Dialysevorgangs zu einem Flüssigkeitsshift vom Dialysepuffer in das Plasma, was auch die Konzentration des Arzneistoffs im Plasmakompartiment der Dialysezelle verändert [127]. Diese Volumenänderungen können gegenüber dem Ausgangsvolumen im Plasmakompartiment eine Größenordnung von 10-30% erreichen [128]. Dieser Effekt wird umso relevanter bei Substanzen, deren Plasmaproteinbindung auch von der Gesamtkonzentration abhängt, da in diesem Fall die freie Konzentration zusätzlich zum Verdünnungseffekt nochmalig verfälscht wird [129].

Bei der Ultrafiltration hingegen wurde häufig kritisch angeführt, dass die während des Ultrafiltrationsvorgangs stattfindende Aufkonzentrierung des Proteinanteils im Überstand zu einer Veränderung des Gleichgewichts führen könnte [130]. Diese Vermutung konnte allerdings schon mehrfach in Experimenten widerlegt werden [120,131,132]. Da während des Ultrafiltrationsvorgangs ein äquilibrierter Teil der Probe entfernt wird, wird im Überstand das Gleichgewicht nicht beeinflusst. So konnte Nilsson nachweisen, dass Ultrafiltrationsvolumina zwischen 16 u. 47% des ursprünglichen Plasmavolumens identische Ergebnisse in der freien Konzentration lieferten [120]. Lediglich extreme Filtratvolumina von 80% des ursprünglichen Plasmavolumens scheinen das Gleichgewicht zu beeinflussen [133]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein Filtratvolumen von ca. 70 µl angestrebt, was bei einem Ausgangsvolumen von 300 µl Plasma bzw. Serum ca. 23-24% entspricht. Dies steht auch in Einklang mit der Arbeit von Beer et al., 2009, die empfehlen, ein Filtratvolumen von 40% des Ausgangsvolumens an Plasma nicht zu überschreiten, um evtl. Verfälschungen der freien Konzentration durch Aufkonzentrierung des Proteins im Überstand auszuschließen [90].

Bei der Ultrafiltration ist es zudem einfach möglich, während der Versuchsdurchführung die experimentellen Bedingungen wie Temperatur und pH-Wert zu adjustieren und auf konstantem Niveau zu halten, worauf bei dieser Arbeit wie oben erwähnt besonderer Wert gelegt wurde. Denn gerade die Einflüsse dieser Größen auf die freie Konzentration hocheiweißgebundener Arzneistoffe sollten evaluiert werden. Auch die Tatsache, dass in der publizierten Literatur zum TDM von freien Konzentrationen bei Betalaktam-Antibiotika vielfach die Ultrafiltration als Methode zur Probenaufbereitung genutzt wurde, belegt die gute Eignung für die klinische Routine [86–89].

5.4.1 Auswahl der Ultrafiltrationseinheit

Vancomycin diene als Testsubstanz zur Auswahl einer geeigneten Ultrafiltrationseinheit für die Routinemethode zur Bestimmung der freien Konzentration, da zur Ultrafiltration für dieses Antibiotikum bereits mehrere Publikation vorliegen, in denen verschiedene Ultrafiltrationseinheiten zum Einsatz kamen [134–136].

Die untersuchten Ultrafiltrationseinheiten wurden mit der überwiegend in der Literatur verwendeten Centrifree (Merck Millipore) Ultrafiltrationseinheit verglichen, die vom Hersteller auch zur Bestimmung der freien Konzentration mittels Ultrafiltration zugelassen ist [137]. Die Ergebnisse für die freie Konzentration, die mit der Centrifree Ultrafiltrationseinheit ermittelt wurden, wurden mit den Ergebnissen der Nanosep Omega Einheit (Pall), der Vivaspin Einheit (Sartorius), der Vivacon Einheit (Sartorius) und der Amicon ultra Einheit (Merck Millipore) verglichen [137].

Da die Ergebnisse bei Einsatz der Nanosep Omega Ultrafiltrationseinheit mit den Ergebnissen der Centrifree Einheit identisch waren, wurde diese Ultrafiltrationseinheit für die Routinemethode ausgewählt, denn der Einsatz dieser Einheit bietet Vorteile [137]. So handelt es sich hier zum einen um das preisgünstigste Produkt aus der Vergleichsgruppe, was für den Einsatz in der klinischen Routine mit hohem Probenaufkommen von großer Relevanz ist. Ferner kann die Nanosep Omega Einheit wegen der geringeren Ausmaße im Vergleich zur Centrifree Einheit auch in Mikrozentrifugen mit Festwinkelroter und hoher Probenkapazität eingesetzt werden, was diese Einheit wiederum für den Einsatz in einem Routine-TDM attraktiv macht.

Im Rahmen der Untersuchungen zur Plasmaproteinbindung von Ertapenem wurden nochmalig Vergleichsexperimente zwischen der Routineeinheit Nanosep Omega und der Centrifree Einheit durchgeführt, um auch für ein Betalaktam-Antibiotikum die Eignung der Nanosp Omega Einheiten zu belegen. Auch hier zeigten sich identische Ergebnisse, was die gute Eignung der Nanosep Omega Einheit für die Routine untermauert [138].

5.4.2 Untersuchungen zu Wechselwirkungen der Antibiotika mit der Ultrafiltrationseinheit

Wie oben beschrieben, wird bei der Ultrafiltration das Vorkommen einer Adsorption der untersuchten Substanz an Oberflächen und Membran der Ultrafiltrationseinheit als Einschränkung der Methode betrachtet, da im Falle einer ausgeprägten Adsorption an die Ultrafiltrationseinheit die Konzentration im Ultrafiltrat falsch niedrig und die Plasmaproteinbindung somit falsch hoch eingeschätzt wird. Die Adsorption kann an die Gefäßwand, an die Filtrationsmembran, oder auch an beide Strukturen erfolgen. Es wird empfohlen, das Ausmaß dieser unspezifischen Bindung im Vorfeld durch geeignete Experimente abzuklären. In der Literatur wurde hierfür die Ultrafiltration von dotierten

Pufferlösungen wie PBS herangezogen [139–143]. Durch Vergleich der Ausgangskonzentration mit der Konzentration im erhaltenen Ultrafiltrat wurde das Ausmaß der unspezifischen Bindung an die Ultrafiltrationseinheit quantifiziert.

1) Für die Betalaktam-Antibiotika konnte in der vorliegenden Arbeit durch Ultrafiltration von dotierten wässrigen Phosphatpufferlösungen das Auftreten von Adsorptionsphänomenen an Oberflächen und Filtrationsmembran der routinemäßig eingesetzten Filter Nanosep Omega 10 k ausgeschlossen werden. Die Wiederfindung im Ultrafiltrat zeigte sich quantitativ (Kapitel 4.3.1.1).

2) Bei Linezolid hingegen zeigten sich bei der Ultrafiltration von dotierten Phosphatpufferlösungen deutliche Verluste (Kapitel 4.3.1.2). So lag die Wiederfindung bei einer Ausgangskonzentration von 0,3 mg/l Linezolid im Ultrafiltrat lediglich bei ca. 40%. In Vorversuchen bei der Herstellung von Verdünnungsreihen konnte schon gezeigt werden, dass Linezolid in Glasgefäßen und auch in Kunststoffgefäßen aus Polypropylen ohne Verluste verdünnt werden kann. Somit wurde vermutet, dass die Verluste bei der Ultrafiltration auf Adsorption an die Filtrationsmembran zurückzuführen sind, da sowohl das Gehäuse als auch das Auffanggefäß der Nanosep Omega 10 k Filter aus dem als inert befundenen Polypropylen bestehen [144]. Die Filtrationsmembran der Nanosep Omega 10 k Filter besteht aus Polyethersulfon. Daher wurden die Versuche zur Adsorption des Linezolid mit den Ultrafiltrationseinheiten anderer Hersteller wiederholt, deren Filtrationsmembranen aus regenerierter Cellulose als alternativem Filtermaterial bestehen. Dieses Material wird in der Literatur bei Auftreten von Adsorptionsphänomenen in der Ultrafiltration als vorteilhaft bewertet [120]. Durch Anwendung von einigen Ultrafiltrationseinheiten mit Filtern aus regenerierter Cellulose (Centrifree, Microcon, Vivacon, Amicon) gelang es, eine quantitative Wiederfindung im Ultrafiltrat zu erzielen und somit die Adsorptionsproblematik zu umgehen. Beim Filter Amicon Ultra zeigten sich aber ebenfalls Adsorptionsverluste trotz der Membran aus regenerierter Cellulose. Dies verdeutlicht, dass die Adsorption für jeden Filtertyp konkret zu prüfen ist. Neben der Evaluation alternativer Filtermaterialien wurde aber auch analog dem Ansatz von Lee et al., 2003, versucht, die Adsorption des Linezolid an die Filtermembran der Nanosep Omega 10 k Ultrafiltrationseinheit durch Vorbehandlung der Membran zu umgehen [141]. Die Adsorption verschiedener Pharmaka an Ultrafiltrationsmembranen aus regenerierter Cellulose haben Lee et al., 2003, in Serum und PBS untersucht [141]. Etoposid, Hydrocortisone, Propranolol oder Vinblastin zeigten eine hohe nicht-spezifische Bindung (NSB) an die Membran. Die Vorbehandlung der Membran mit 5% TW80 bzw. 5% Benzalkoniumchlorid senkte die NSB von 87–95% auf 13–64%. Sofern die NSB auf unter 50% reduziert werden konnte, ergaben sich vergleichbare Ergebnisse für das Ausmaß der Proteinbindung wie bei Gleichgewichtsdialyse [141]. Die Vorbehandlung der Nanosep Filter mit TW80 für die Untersuchungen mit Linezolid ergab nun vergleichbare Ergebnisse wie mit Microcon oder Vivacon Ultrafiltrationseinheiten. Die Vorbehandlung der Filter mit

5% TW80 konnte durch Zugabe von 1% TW80 zum Serum ersetzt werden. Jedoch ergeben sich Vorbehalte gegen diese Maßnahme, da TW80 selbst an Albumin binden und die Eiweißbindung von Substanzen beeinflussen kann [145,146]. Die Vorbehandlung der Ultrafiltrationseinheiten mit TW80 erhöht zudem den Zeitaufwand erheblich, was gegen die Praktikabilität dieser Methode im Rahmen eines routinemäßigen TDM spricht. Daher wurden für die Routineapplikation zur Bestimmung der freien Konzentration von Linezolid Vivacon-Ultrafiltrationseinheiten verwendet

3) Bei Tigecyclin zeigte sich bereits in Vorversuchen zur Validierung bei der Herstellung von Verdünnungsreihen, dass in Kunststoffgefäßen nennenswerte Adsorptionsverluste auftreten. Auch in der Literatur ist die Adsorption von Tigecyclin an verschiedene Polymeroberflächen bereits beschrieben [147]. Durch die Herstellung von Verdünnungsreihen in verschiedenen Lösungsmitteln konnte gezeigt werden, dass die Adsorptionsproblematik durch die Wahl des Lösungsmittels wirksam umgangen werden kann. Durch Verdünnung in sauren Lösungen wie 0,1 M Salzsäure oder TGC-Eluent ohne SOS wurde die Adsorption komplett unterdrückt. Für die Routine wurde daher zur Vermeidung von Adsorption des Tigecyclin im Auffanggefäß der Ultrafiltrationseinheit der Zusatz eines sauren internen Standards in 0,2 M HCl gewählt. Der interne Standard ist hier erforderlich, da das genaue Volumen des Ultrafiltrats ja nicht bekannt ist. Über die Konzentration des internen Standards im Ultrafiltrat konnte das Filtratvolumen und somit die Ausgangskonzentration des Tigecyclin im Ultrafiltrat berechnet werden (Kapitel 3.9.2).

Adsorptionsphänomene im Filtereinsatz der Ultrafiltrationseinheit können in der Routine ausgeschlossen werden, da in Gegenwart von Plasmaproteinen die Adsorption von Arzneistoffen an Kunststoffoberflächen von Gefäßen unterbunden wird. Diese Tatsache ist in der Literatur bereits vielfach beschrieben [148–150]. Bista et al., 2014, konnten diese Beobachtung für das lipophile Opioid-Analgetikum Fentanyl als Modellsubstanz beschreiben. Während die Adsorptionsverluste des Fentanyl an die Oberfläche von Kunststoffgefäßen in PBS bei ca. 10-15% lagen, konnte durch Wiederholung der Adsorptionsversuche in Plasma bzw. Albumin-Lösung eine quantitative Wiederfindung erzielt werden [151].

Da allerdings durch die Ultrafiltration Plasmaproteine zurückgehalten werden, liegen im Inneren der Membran keine vor Adsorption schützenden Proteine mehr vor. Daher wurden für Tigecyclin noch gesonderte Versuche in Phosphatpuffer zum Ausschluss von Adsorption an die Membran durchgeführt (Kapitel 4.3.1.3). Durch Abgleich der Konzentration im Filtereinsatz mit der Konzentration im Ultrafiltrat wurde das Ausmaß der Bindung an die Filtrationsmembran evaluiert. Durch Bestimmung der Ausgangskonzentration im Filtereinsatz wurde auch eine evtl. Adsorption des Tigecyclin an diesen berücksichtigt, die sich auch tatsächlich mit einem Verlust von ca. 10% gegenüber der nominalen Ausgangskonzentration bemerkbar machte. Die Adsorptionsverluste in der Filtrationsmembran betragen für Vivacon- und Nanosep-Filter gleichermaßen ca. 10-15%. Da aber in Gegenwart

von Plasma durch Passivierung der Membrankontaktfläche im Filtereinsatz die Adsorptionsverluste noch geringer ausfallen werden, kann in der Routine auf einen Korrekturfaktor verzichtet werden.

Das geringere Ausmaß von Adsorption bei der Ultrafiltration in Gegenwart von Plasma konnten Wang et al., 2013, für 27 verschiedene Arzneistoffe als Testsubstanzen demonstrieren [150]. Während das Ausmaß der NSB für die meisten Testsubstanzen in PBS oberhalb von 25% lag, betrugen die Adsorptionsverluste bei der Ultrafiltration in Plasma in 24 Fällen weniger als 10%. Lediglich bei drei der untersuchten Pharmaka zeigten sich Verluste zwischen 10 und 20% [150].

5.4.3 Integrität der Ultrafiltrationsmembran

Um durch die Ultrafiltration korrekte Ergebnisse der freien Konzentration von Arzneistoffen zu generieren, ist es wichtig, dass die Filtrationsmembran zuverlässig Proteine zurückhält. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit stichprobenartig bei 305 Ultrafiltraten von 18 zufällig ausgewählten analytischen Läufen mit der Proteinbestimmung nach Bradford untersucht (Kapitel 4.3.2). Insbesondere bei extrem hoch eiweißgebundenen Pharmaka führen Proteine im Ultrafiltrat zu deutlich verfälschten Ergebnissen in der freien Konzentration. So kann ein Restgehalt an Protein im Ultrafiltrat von 1% zu einer Überschätzung der freien Konzentration um den Faktor 2 führen, wenn eine Substanz mit einer Plasmaproteinbindung von 99% untersucht wird. Von den untersuchten Substanzen zeigt Ceftriaxon die stärkste Proteinbindung in einer Größenordnung von ca. 95% [152]. Auch in diesem Fall kann eine Proteinrestmenge von 1% noch zu einer Überschätzung der freien Konzentration um ca. 20% führen. Wird ein physiologischer Proteingehalt im Plasma von ca. 70 g/l angenommen [153], so zeigen die Ergebnisse der Proteinbestimmung in der vorliegenden Arbeit, dass in über 90% der Fälle die Proteinkonzentration im Ultrafiltrat unter 0,1% der Ausgangskonzentration lag. Bei den wenigen Proben mit detektierbarem Proteingehalt im Ultrafiltrat lag der Median des Restgehalts bei ca. 0,13% mit einem Maximalwert von 0,70%, was bei Ceftriaxon zu einer maximalen Überschätzung der freien Konzentration um ca. 14% führen würde. Durch Verfärbung des Ultrafiltrats makroskopisch erkennbare Undichtigkeiten der Membran zeigten sich während der gesamten Versuche für die vorliegende Arbeit lediglich in 2 Fällen. Dennoch ist es empfehlenswert in der Routine regelmäßig den Proteingehalt im Ultrafiltrat zu bestimmen, um hier Fehler bei den ermittelten freien Konzentrationen auszuschließen. Insbesondere bei Verwendung eines neuen Filtertyps ist dies sinnvoll, da sich die vorliegenden Ergebnisse auf die Standardfilter Nanosep Omega 10 k beziehen. Nilsson, 2013, konnte zeigen, dass der Proteinrestgehalt bei Verwendung verschiedener Ultrafiltrationseinheiten variieren kann, wobei auch hier die gemessenen Restgehalte mit einem Maximalwert von 0,23% sehr niedrig waren [120]. Die vorliegende Bradford-Methode zeigte sich mit einer Bestimmungsgrenze von 25 mg/l, was ca. 0,04% der

Ausgangskonzentration an Protein in Plasma entspricht, als geeignet zur Quantifizierung des Proteingehalts im Ultrafiltrat.

5.5 Abhängigkeit der freien Konzentration von den experimentellen Bedingungen

In der publizierten Literatur konnte bereits vielfach gezeigt werden, dass bei der Bestimmung der freien Konzentration durch Gleichgewichtsdialyse oder auch Ultrafiltration die gewählten experimentellen Bedingungen das Ergebnis in erheblichem Ausmaß beeinflussen können. Insbesondere Veränderungen bei Temperatur und pH-Wert des untersuchten Serums bzw. Plasmas haben einen Einfluss auf die gemessene freie Konzentration [90,137,154–156]. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Bedeutung dieser experimentellen Bedingungen evaluiert, wobei die Aufrechterhaltung physiologischer Bedingungen in Temperatur und pH-Wert besondere Berücksichtigung fand.

5.5.1 pH-Wert

Der pH-Wert in menschlichem Blut wird durch das physiologische Blutpuffersystem konstant in einem pH-Bereich von 7,35 bis 7,45 gehalten. Hierfür wesentlich verantwortlich ist im Blut gelöstes CO₂, das dort das Puffersystem H⁺/HCO₃⁻ bildet [157]. Außerhalb des Körpers steigt der pH-Wert in Plasma bzw. Serum an, da durch Lagerung und Probenverarbeitung Kohlendioxid entweicht [158]. So konnten im Rahmen dieser Arbeit nach der Zentrifugation von Blut (10 min bei 3000 g; Megafuge 1.0 R) pH-Werte von 7,7 – 7,8 gemessen werden. Der pH-Wert lag nach dem Auftauen von tiefgefrorenem Plasma bzw. Serum bei 7,9 – 8,0. Diese Beobachtungen bzgl. des pH-Anstiegs im Plasma außerhalb des Körpers sind auch in der Literatur bereits umfassend beschrieben [155,159]. So konnten Fura et al., 2003, nach Langzeitlagerung von Plasmaproben im tiefgefrorenen Zustand pH-Werte bis 9 messen [159].

Das Ausmaß der Plasmaproteinbindung vieler Arzneistoffe wird durch den pH-Wert im Plasma beeinflusst [154,160,161]. Kochansky et al., 2008, untersuchten die Plasmaproteinbindung von 55 verschiedenen Arzneistoffen aus unterschiedlichen Indikationsgebieten bei pH 7,4 bzw. pH 8,7. In 67% der Fälle führte der pH-Anstieg zu einer Verringerung der freien Fraktion um mehr als 30% [154]. In den übrigen Fällen zeigte sich überwiegend keine Beeinflussung der freien Fraktion durch eine Veränderung des pH-Werts im Plasma [154]. Nur in einem Fall kam es durch die Erhöhung des pH-Werts zu einem Anstieg der freien Konzentration um mehr als 10%. Vergleichbare Ergebnisse konnten für die hocheiweißgebundenen Barbiturate Thiopental und Methohexital gefunden werden. Auch hier führte eine pH-Wert-Erhöhung zu einem deutlichen Anstieg der Plasmaproteinbindung [162,163]. Auch Abdel-Rehim et al., 2000, konnten dieses Phänomen für eine Reihe von 5 verschiedenen Lokalanästhetika demonstrieren [164]. Diese in der Literatur beschriebenen Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit (Kapitel 4.5). Während bei

Ertapenem und Tigecyclin die Plasmaproteinbindung durch eine Erhöhung des pH-Werts deutlich verstärkt wird, zeigte sich bei Cefazolin und Ceftriaxon ein mäßiger gegenteiliger Effekt. Für Linezolid hingegen war in den durchgeführten Versuchen keine Abhängigkeit der freien Fraktion vom im Plasma vorliegenden pH-Wert erkennbar. Dies belegt deutlich, dass sich, wie von Kochansky et al., 2008, postuliert, die pH-Abhängigkeit der Proteinbindung substanzspezifisch darstellt [154].

Als Ursache werden in der Literatur pH-abhängige Konformationsänderungen von Bindungsstellen bei den wichtigsten arzneistoffbindenden Proteinen wie Albumin und Alpha-1-Saures Glycoprotein genannt [120]. Insbesondere für Albumin sind Veränderungen der Konformation im pH-Bereich von 6-9 gut beschrieben [165–169]. So wurde z.B. postuliert, dass pH-abhängige Konformationsänderungen des Albumin die freie Fraktion von Warfarin und Diazepam beeinflussen [170,171]. Daneben kann sich aber auch eine Protonierung bzw. Deprotonierung der untersuchten Substanz auswirken, was insbesondere dann in Plasma auftreten kann, wenn deren pK_s -Wert im physiologischen pH-Bereich liegt [120,154,160,172]. Dies könnte zum Teil das pH-abhängige Bindungsverhalten von Tigecyclin erklären, dessen Phenoldiketon-Gruppe einen pK_s -Wert von ca. 7,7 aufweist [173].

So ist generell zu fordern, bei Untersuchungen zur Bestimmung der freien Konzentration eines Arzneistoffs eine physiologische pH-Einstellung sicherzustellen [90,120]. Nur so können im Rahmen eines TDM zuverlässige Werte zur Dosisanpassung bei Patienten generiert werden. Zur pH-Einstellung während der Bestimmung der freien Konzentration bieten sich zwei verschiedene Herangehensweisen an. So kann die Ultrafiltration oder die Gleichgewichtsdialyse unter definierter CO_2 Atmosphäre durchgeführt werden [154,156,161]. Diese Technik steht allerdings nicht in jedem Labor zur Verfügung. Um den technischen Aufwand für eine routinefähige Methode möglichst gering zu halten, wurde in der vorliegenden Arbeit ein alternativer Ansatz durch Pufferung des Plasmas mit 3 M K_2HPO_4 , pH 7,50, zur Aufrechterhaltung physiologischer pH-Werte gewählt. Die resultierende Endkonzentration des Puffers in der Probe war 100 mM. Pufferung zur Einstellung eines physiologischen pH wird aus denselben praktischen Erwägungen in einer Arbeit von Fura et al., 2003, vorgeschlagen [159]. Auch im Rahmen der Gleichgewichtsdialyse als Referenzmethode kamen bereits Phosphatpufferlösungen vergleichbarer Molarität als Dialysepuffer zum Einsatz und waren hier gut geeignet den pH-Wert stabil im physiologischen Bereich zu halten [160,174]. Durch Abgleich der unter Pufferung generierten Werte mit Literaturwerten z.B. aus der Gleichgewichtsdialyse kann sichergestellt werden, dass die Puffersubstanz die Proteinbindung nicht beeinflusst und somit die gemessenen freien Konzentrationen nicht verfälscht.

5.5.2 Temperatur

Die normale Körpertemperatur des Menschen beträgt ca. 37°C. Da auch die Temperatur während der Bestimmung der freien Konzentration durch Ultrafiltration oder Gleichgewichtsdialyse die erhaltene freie Fraktion beeinflusst, sollte auch dieser Parameter während der Ultrafiltration auf den physiologischen Wert justiert werden [90,120,175]. In der vorliegenden Arbeit konnte für die untersuchten Antibiotika eine substanzspezifische Temperaturabhängigkeit der freien Fraktion gezeigt werden (Kapitel 4.5). Während Tigecyclin, Linezolid und Ceftriaxon nur eine schwache Temperaturabhängigkeit aufwiesen, kam es bei Ertapenem und Cefazolin zu einem deutlichen Anstieg der freien Konzentration mit steigender Temperatur. Auch in der Literatur ist die Temperaturabhängigkeit der Plasmaproteinbindung gut beschrieben. So wurde beispielsweise die freie Konzentration von verschiedenen Lokalanästhetika bei Temperaturen im Bereich von 32-40°C untersucht [164]. Während es in 3 Fällen zu einem deutlichen Anstieg der freien Fraktion mit zunehmender Temperatur kam, zeigte sich in 2 Fällen nur eine minimale Veränderung in Abhängigkeit von der Temperatur. Auch für das Barbiturat Metohexital, das Antiepileptikum Phenytoin sowie das Antibiotikum Vancomycin konnte bereits ein Anstieg der freien Fraktion bei steigender Temperatur gezeigt werden [163,176,177]. Eine Abnahme der Bindungskräfte mit steigender Temperatur wurde als mögliche Ursache genannt [163,176]. Ebenso wie die pH-Abhängigkeit, stellt sich auch die Temperaturabhängigkeit der Proteinbindung substanzspezifisch dar.

Durch die kurze Dauer der Ultrafiltration von nur 20 min ist auch die Gefahr der Verfälschung der Ergebnisse durch Verdunstung minimiert, während dieser Aspekt bei der Gleichgewichtsdialyse in Folge der langen Dauer von bis zu 24 h bei einer Temperatur von 37°C durchaus zu berücksichtigen ist. Daher wird empfohlen, bei der Gleichgewichtsdialyse zur Vermeidung eines Volumenfehlers durch Verdunstung die Luftfeuchtigkeit zu modulieren, was im Vergleich zur Ultrafiltration den technischen Aufwand erhöht [120].

5.5.3 Zentrifugalkraft

Eine Abnahme der freien Fraktion mit steigender Zentrifugalkraft ist in der Literatur schon lange bekannt. So wurde bereits 1973 über einen sogenannten „pressure-effect“ bei der Ultrafiltration berichtet [178]. Dieses Phänomen bezeichnet die Tatsache, dass bei ansteigenden Zentrifugalkräften und steigendem Molekulargewicht die Ultrafiltrationsmembran nicht mehr in gleichem Ausmaß für Wasser und Arzneistoff durchlässig ist [178]. So konnte in einer Arbeit von Kees et al., 2013, gezeigt werden, dass die freie Fraktion von Vancomycin in Plasma durch Erhöhung der Zentrifugalkraft bei Ultrafiltration von 1000 g auf 10000 g von 72% auf 45% abfällt, was einem Rückgang der freien Konzentration um ca. 38% entspricht [177]. Der Effekt war in der vorliegenden Arbeit für Ertapenem und Ceftriaxon mit einem Abfall um ca. 30% von 1000 g gegenüber 10000 g weniger stark ausgeprägt. Dies

resultiert aus dem geringeren Molkulargewicht der beiden Cephalosporine von 476-555 Da gegenüber dem Vancomycin mit einem Molekulargewicht von 1450 Da.

Da der pressure-effect, wie beschrieben, vom Molekulargewicht des untersuchten Arzneistoffs abhängt, kann keine generelle Obergrenze für die Zentrifugalkraft genannt werden, um dieses Phänomen möglichst gering zu halten. Da allerdings in der Gebrauchsinformation für Centrifree Ultrafiltrationseinheiten empfohlen wird, eine Zentrifugalkraft von 2000 g nicht zu überschreiten, um den pressure-effect auszuschalten [179], kann dieser Wert als Anhaltspunkt für eine Obergrenze dienen. Denn die Centrifree Ultrafiltrationseinheit ist vom Hersteller zur Bestimmung der Proteinbindung von Arzneistoffen explizit zugelassen [179]. Da mit der Nanosep Omega 10 k Ultrafiltrationseinheit auch schon bei 1000 g innerhalb von 20 min eine suffiziente Menge an Ultrafiltrat gewonnen werden konnte, wurde dieser niedrige Wert der Zentrifugalkraft für die Routinemethode etabliert, um den pressure-Effect auszuschließen.

5.5.4 Puffersystem

Zur Aufrechterhaltung eines physiologischen pH-Werts im Rahmen der Ultrafiltration wurde in der Routine Phosphatpuffer verwendet, da auch bei der Gleichgewichtsdialyse als Referenzmethode Phosphatpufferlösungen die Basis der Dialyseflüssigkeit darstellen [90,91,154,160]. Bei der Bestimmung der freien Konzentration von Tigecyclin wurde zu experimentellen Zwecken allerdings von diesem Standard abgewichen und es wurde auch eine alternative Pufferung mit HEPES-Puffer untersucht (Kapitel 4.5.3). Tigecyclin zeigte im Rahmen der durchgeführten Experimente zur freien Konzentration ein sogenanntes atypisches Bindungsverhalten. Das heißt, die freie Fraktion des Tigecyclin steigt bei niedrigen Konzentrationen an, während man hier wegen des im Überschuss vorliegenden Proteins im Plasma das Gegenteil vermuten würde. Dieses atypische Bindungsverhalten wurde in der Literatur mehrfach beschrieben [180,181]. Um methodisch bedingte Verfälschungen bei der Bestimmung der freien Konzentration auszuschließen, führten Mukker et al., 2014, die Bestimmung der freien Konzentration neben der Ultrafiltration auch mit einer in-vitro-Mikrodialysetechnik als Referenz durch [180]. Mit beiden Methoden konnte das atypische Bindungsverhalten gleichermaßen dargestellt werden.

Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, ob ein Austausch des Puffersystems evtl. Einfluss auf das Bindungsverhalten nehmen kann. So zeigte sich auch bei der Verwendung von HEPES zur Pufferung der Plasmaproben ein Anstieg der freien Fraktion bei niedrigeren Konzentrationen, allerdings war dieses atypische Verhalten bei der Verwendung von HEPES-Puffer gegenüber Phosphatpuffer noch verstärkt. Eine Wiederholung der Versuche mit Minocyclin statt Tigecyclin lieferte ebenfalls ein vergleichbares Verhalten bei etwas niedrigerer freier Fraktion, sodass es sich beim

atypischen Bindungsverhalten offensichtlich um einen Klasseneffekt der Tetracycline handelt (Kapitel 4.5.3).

Es ist bereits seit langem bekannt, dass Tetracycline wie Tigecyclin in biologischen Flüssigkeiten wie Plasma mit mehrwertigen Kationen stabile Komplexe bilden können [182,183]. Ferner wurde auch bereits beschrieben, dass die Anwesenheit polyvalenter Kationen die Bindung von Tetracyclinen an Makromoleküle wie Proteine beeinflusst [184,185]. Daher ist die Annahme naheliegend, dass das atypische Bindungsverhalten auf Wechselwirkungen des Tigecyclins mit im Plasma vorkommenden polyvalenten Kationen wie Calcium beruhen könnte. Um die Effekte durch Calcium auf die Proteinbindung auszuschließen, wurden auch Bindungsexperimente in wässriger Albuminlösung durchgeführt (Kapitel 4.5.3), wobei die Albuminkonzentration mit 4% physiologisch gewählt wurde [153]. Zur Pufferung dienten wiederum HEPES- bzw. Phosphatpuffer, die der Albuminlösung in einer Konzentration von 70 bzw. 100 mM zugesetzt wurden, da dies der Endkonzentration an Puffer bei der Routinemethode zur Bestimmung der freien Konzentration entspricht. Hier zeigte sich deutlich, dass in Abwesenheit von Calcium das atypische Bindungsverhalten aufgehoben wird. Allerdings lag die freie Fraktion bei HEPES gegenüber Phosphat tendenziell etwas niedriger. Unter Zusatz von Calcium in physiologischer Konzentration von 2,5 mM zeigte sich bei der HEPES-gepufferten Albuminlösung das atypische Bindungsverhalten wieder deutlich, während dies bei Pufferung mit Phosphat keinen Effekt hatte [153].

Um den Einfluss mehrwertiger Kationen auf das Bindungsverhalten des Tigecyclin noch genauer zu untersuchen, wurde zusätzlich EDTA in einer Konzentration von 5,0 mM zum Calcium beigefügt (Kapitel 4.5.3). Denn es konnte bereits gezeigt werden, dass EDTA als Komplexbildner für mehrwertige Kationen wie Calcium die freie Konzentration von Tigecyclin erhöhen kann [186]. Auch hier wurde die Vermutung aufgestellt, dass Wechselwirkungen zwischen Tigecyclin und mehrwertigen Kationen im Plasma wie Calcium die Proteinbindung beeinflussen [186]. Durch den EDTA-Zusatz wurde schließlich das atypische Bindungsverhalten komplett aufgehoben und auch die Unterschiede in der freien Fraktion zwischen HEPES-Pufferung und Phosphatpufferung wurden nivelliert. So kann angenommen werden, dass die im Plasma vorhandenen mehrwertigen Kationen wie Calcium für das atypische Bindungsverhalten des Tigecyclin bei niedrigen Konzentrationen verantwortlich sind. Auch für verschiedene Gyrasehemmer konnte eine Abnahme der Bindungsaffinität gegenüber Proteinen in Gegenwart polyvalenter Kationen wie Zink- und Magnesiumionen bereits beschrieben werden [187].

Phosphationen scheinen diesen Effekt abzuschwächen. Die niedrigere freie Fraktion in der HEPES-gepufferten Albuminlösung gegenüber der Phosphat-gepufferten Albuminlösung könnte demnach aus geringen Mengen polyvalenter Kationen resultieren, die sich wohl auch

im kommerziell angebotenen HSA finden. In zukünftigen Experimenten könnte dieser Sachverhalt noch genauer untersucht werden.

Da sich in Plasma beim Einsatz der Routinemethode allerdings bei den zu erwartenden Konzentrationen des Tigecyclins keine relevanten Unterschiede zwischen Phosphatpuffer und HEPES im Ergebnis der freien Konzentration zeigten, kann auch hier die Routinemethode zum Einsatz kommen. Dies ist vorteilhaft, da bei Pufferung mit HEPES der bestehende Temperaturgradient des pH-Werts berücksichtigt werden muss [188]. Allerdings sollte bei der Übertragung der Methodik auf weitere Substanzen mit potentiell komplexierenden Eigenschaften gegenüber polyvalenten Kationen dieser Sachverhalt Berücksichtigung finden. So kann empfohlen werden, in diesem Fall initial die Eignung des Phosphat-Puffersystems durch Abgleich mit den Ergebnissen bei HEPES-Pufferung zu überprüfen.

5.5.5 Experimentelle Bedingungen für die Routinemethode zur Bestimmung der freien Konzentration

In Folge der obig beschriebenen starken Abhängigkeit der freien Konzentration von den experimentellen Bedingungen, wurde für die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Routinemethode zur Bestimmung der freien Konzentration mittels Ultrafiltration die Aufrechterhaltung eines physiologischen Temperatur- und pH-Werts etabliert. Dies steht im Einklang mit Empfehlungen aus der Literatur [90,120]. Trotzdem wurde in bisher publizierten Untersuchungen zur Bestimmung der freien Konzentration von Betalaktam-Antibiotika die Sicherstellung physiologischer Bedingungen bei der Ultrafiltration nicht konsequent beachtet. Vermutlich um die Versuchsdurchführung zu beschleunigen und Instabilitäten der untersuchten Substanzen zu umgehen, wurden niedrige Temperaturen und hohe Zentrifugalbeschleunigungen gewählt und die pH-Werte des Plasmas bei der Ultrafiltration wurden nicht beachtet [88,89,189]. Die Verwendbarkeit der mit den zitierten Assays ermittelten freien Konzentrationen ist daher kritisch zu betrachten.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Temperatur durch den Einsatz einer temperierbaren Zentrifuge (Eppendorf 5417 R) während der Ultrafiltration konstant bei 37°C gehalten werden. Zur Überprüfung der angezeigten Temperatur im Rotor der Zentrifuge wurden glycerolgefüllte Eppendorf Cups während der Ultrafiltration mitgeführt, deren Temperatur sowohl vor Beginn als auch nach Abschluss der Ultrafiltration überprüft wurde. Die bestimmte Temperatur wich dabei maximal 1°C vom nominellen Wert ab, der auf dem Display der Zentrifuge angezeigt wurde [137].

Zur Aufrechterhaltung eines physiologischen pH-Werts während der Ultrafiltration wurden die Plasma- bzw. Serumproben von 300 µl jeweils mit 10 µl 3 M K_2HPO_4 , pH 7,50 versetzt. Die pH-Werte wurden im Rahmen der Experimente zur freien Konzentration vor bzw. nach Ultrafiltration geprüft. Die beschriebene Pufferung führte zu einem resultierenden pH-Wert

von ca. 7,30-7,35, der im Zuge der Ultrafiltration leicht anstieg, sodass im Überstand der Ultrafiltration ein pH-Wert von ca. 7,45-7,55 nachgewiesen werden konnte [137]. In einer Arbeit zur Bestimmung freier Konzentrationen durch Gleichgewichtsdialyse wurde ein pH von $7,40 \pm 0,10$ im Plasma am Ende der Versuchsdurchführung als ideal erachtet [158]. Um den oben beschriebenen Einfluss der Zentrifugalkraft auf die freie Konzentration durch den sogenannten pressure effect zu eliminieren, wurde die Ultrafiltration bei einer niedrigen Zentrifugalkraft von 1000 g durchgeführt.

So gelang es bei der entwickelten Methode durch niedrigen apparativen Aufwand, die Zeitspanne für die Probenvorbereitung zur Bestimmung der freien Konzentration auf ca. 30 min zu beschränken. Der Vergleich der mit der entwickelten Methode bestimmten freien Konzentration mit Literaturwerten insbesondere aus der Gleichgewichtsdialyse belegt die Eignung der Methode für die Routinebestimmung von freien Konzentrationen. So kam die entwickelte Methode unter anderem bereits zur Bestimmung der freien Fraktion von Ertapenem bei Intensivpatienten zum Einsatz. Hier zeigte sich bei den untersuchten Patienten im Median eine freie Fraktion von 37,8% (30,9% - 53,6%). [190]. Dieses Resultat deckt sich mit den Ergebnissen aus Studien, in denen die freie Fraktion mittels Gleichgewichtsdialyse bzw. Microdialyse bestimmt wurde [191,192]. Auch für die Analyse der freien Konzentrationen von Vancomycin bei Intensivpatienten kam eine vergleichbare Ultrafiltrationsmethode mit Pufferung der Proben mittels Phosphatpuffer bereits zum Einsatz [177]. Hier ergab sich eine mittlere freie Fraktion von $67,2 \pm 7,5\%$. Stove et al., 2015, bestimmten die freie Fraktion von Vancomycin bei Intensivpatienten mittels Gleichgewichtsdialyse und Ultrafiltration. Bei Einhaltung physiologischer Bedingungen wurde mit der Ultrafiltration eine mittlere freie Fraktion von $75,2 \pm 6,6\%$ ermittelt. Für die Gleichgewichtsdialyse lag bei Analyse der gleichen Proben der Wert für die freie Fraktion bei $72,5 \pm 5,7\%$ [156]. So zeigt die Arbeit von Stove et al., 2015, dass sich bei Einhaltung physiologischer Bedingungen die durch Ultrafiltration ermittelten Ergebnisse nicht von den durch Gleichgewichtsdialyse ermittelten Ergebnissen unterscheiden [156]. Die Tatsache, dass die freie Fraktion des Vancomycin bei Stove et al., 2015, in der gleichen Größenordnung lag wie bei Kees et al., 2013, belegt ferner die Eignung der entwickelten Methode für die Routinebestimmung der freien Konzentration [156,177].

Die Anwendung der entwickelten Ultrafiltrationsmethode, sowie der Gleichgewichtsdialyse auf dieselben Proben zum Vergleich der Ergebnisse, könnte in zukünftigen Versuchen die Eignung der entwickelten Methode weiter bestätigen.

5.6 Bestimmung der Antibiotika im Plasma von Intensivpatienten

Durch die Anwendung der entwickelten Methoden zur Bestimmung verschiedener Betalaktam-Antibiotika im Plasma bzw. Serum von Intensivpatienten, sollte die Eignung im Hinblick auf Zuverlässigkeit und Selektivität für den Einsatz im Rahmen eines TDM-

Programms in der klinischen Routine überprüft werden. Dabei wurde ein besonderer Schwerpunkt auf die Substanzen Piperacillin und Meropenem gelegt, da diese die am Universitätsklinikum Regensburg am häufigsten im Intensivbereich eingesetzten Betalaktam-Antibiotika darstellen. Die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmungen dienten der Evaluation, inwieweit mit den routinemäßig praktizierten Dosierungsstrategien die gewünschten Wirkspiegel erzielt wurden.

5.6.1 Analytik

Die validierten Methoden erwiesen sich als gut geeignet zur Bestimmung der untersuchten Antibiotika im Plasma von Patienten. Durch die mitgeführten Kontrollproben bekannter Konzentration in Matrix konnte die Zuverlässigkeit der Methoden in jedem Lauf überwacht werden. In Übereinstimmung mit den Empfehlungen der EMA und der FDA wurde ein analytischer Lauf nur dann zur Quantifizierung der totalen Konzentration herangezogen, wenn die in den Kontrollen gemessene Konzentration nicht mehr als 15% vom Nominalwert abwich [92,93]. Dies wurde in allen durchgeführten analytischen Läufen erreicht, was die Zuverlässigkeit der Methode veranschaulicht. Bei der Bestimmung der freien Konzentration wurden ebenfalls Kontrollproben in Matrix mitgeführt, allerdings konnte hier natürlich die Richtigkeit über den Abgleich der gemessenen mit der nominalen Konzentration nicht überprüft werden, da das konkrete Ausmaß der Proteinbindung nicht im Detail vorhergesagt werden kann. Den Empfehlungen von Nilsson folgend wurde die in den Kontrollen ermittelte freie Fraktion mit den Werten aus Vorversuchen abgeglichen, um die Zuverlässigkeit des analytischen Laufs zu bewerten. Bei Abweichungen, die 20% der üblichen freien Fraktion in Poolserum oder Poolplasma übersteigen, sollte der analytische Verlauf nicht gewertet werden [120]. Diese Anforderung konnte für alle analytischen Läufe zur Bestimmung der freien Konzentration erfüllt werden, sodass kein Lauf von der Auswertung ausgeschlossen werden musste (Kapitel 4.6.2).

Durch Veränderungen in der Zusammensetzung des Plasmas der Patienten, z.B. auf Grund von Leber- oder Niereninsuffizienz und/oder durch die Begleitmedikation, die sich bei den Intensivpatienten häufig sehr umfangreich darstellt, zeigten sich in den Patientenproben vereinzelt Interferenzen zu den Retentionszeiten der untersuchten Antibiotika. Hierauf wurde das chromatographische System durch moderate Anpassung des Fließmittels bzw. Nutzung einer alternativen Säule adaptiert, um eine befriedigende Trennung zu ermöglichen. Es gelang so, in allen Fällen die auftretenden Interferenzen zu umgehen. Hier zeigte sich die Wichtigkeit der Vorversuche zum Retentionsverhalten der untersuchten Antibiotika an verschiedenen analytischen Säulen, deren Ergebnisse oben beschrieben wurden. Durch die hier ermittelten Vorkenntnisse gelang es schnell, das System entsprechend den Erfordernissen anzupassen. Um Interferenzen sicher erkennen zu können, wurden meist 2 verschiedene Wellenlängen zur Auswertung der Chromatogramme

herangezogen und auch jeweils über die Fläche und über die Höhe ausgewertet. Kam es hier zu auffälligen Abweichungen, wurden die Chromatogramme auf evtl. vorkommende Interferenzen gesichtet. Dieses Vorgehen empfiehlt sich auch für die klinische Routine im Rahmen eines TDM, um sicherzustellen, dass dem behandelnden Arzt zuverlässige Werte kommuniziert werden.

5.6.2 Klinische Ergebnisse

Als Anwendungsbeispiel für die entwickelten analytischen Methoden wurden die totalen Konzentrationen, sowie teilweise auch die freien Konzentrationen der Antibiotika im Plasma von Intensivpatienten bestimmt. In der Literatur konnte bereits vielfach gezeigt werden, dass sich unter Anwendung der Standarddosierungen der Betalaktam-Antibiotika bei kritisch kranken Patienten inadäquate Plasmakonzentrationen ergeben können [193–195]. So erreichen viele Patienten den entsprechenden PK/PD Zielparameter nicht, der für die untersuchten Betalaktame bei schweren Infektionen vorsieht, dass die Konzentration des Antibiotikums über das volle Dosisintervall oberhalb der MHK des Erregers liegen sollte [36,196].

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessenen Konzentrationen für Meropenem und Piperacillin bei Intensivpatienten ergaben, dass für Meropenem 58,3% der Patienten und für Piperacillin 44,0% der Patienten den PK/PD Zielparameter einer Plasmakonzentration oberhalb der MHK von *Pseudomonas aeruginosa* zum Ende des Dosisintervalls nicht erreichten (Kapitel 4.6.2). Die routinemäßig eingesetzten Dosierungen entsprachen hierbei den Empfehlungen der jeweiligen Fachinformation. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit publizierten klinischen Untersuchungen zur Dosierung von Betalaktam-Antibiotika bei Intensivpatienten. Roberts et al., 2010, konnten in einer klinischen Studie zur Dosisoptimierung von Betalaktam-Antibiotika an insgesamt 236 erwachsenen Patienten einer Intensivstation zeigen, dass für Piperacillin-Tazobactam unter Standarddosierung die Plasmakonzentrationen von 49% der 116 Patienten unter Therapie mit Piperacillin-Tazobactam am Ende des Dosisintervalls unterhalb des PK/PD-Ziels lagen, sodass eine Dosiserhöhung vorgenommen werden musste [197]. In 28% der Fälle erfolgte aber auch eine Dosisreduktion, da die gemessene Konzentration zum Ende des Dosisintervalls oberhalb des 10-fachen Wertes der MHK des Erregers lag, was als Obergrenze im Rahmen dieser Studie definiert wurde. Die Werte für Meropenem zeigten sich in dieser Studie in einer vergleichbaren Größenordnung [197]. Sime et al, 2012, führten eine vergleichbare Untersuchung zur Therapie mit Piperacillin/Tazobactam bei onkologischen Patienten mit febriler Neutropenie durch. Auch hier zeigte sich, dass mit einer Standarddosierung von Piperacillin/Tazobactam 4g/0,5g 3-4-mal täglich nur 22% der untersuchten 32 Patienten am Ende des Dosisintervalls Plasmakonzentrationen oberhalb der MHK für *Pseudomonas aeruginosa* aufwiesen [198]. Dies verdeutlicht, wie in der Literatur vielfach gefordert, dass insbesondere für

schwerkranke Patienten ein TDM-Programm zur Optimierung der Dosierung auch für Betalaktam-Antibiotika hilfreich ist [34,57,199]. Daher wird in der aktuellen S3 Leitlinie zu Strategien zur Sicherung rationaler Antibiotika-Anwendung im Krankenhaus bei schwerkranken Patienten ein TDM auch für Betalaktam-Antibiotika gefordert [42]. Auch die beobachtete schwache Korrelation der Nierenfunktion mit der Clearance der überwiegend renal eliminierten Antibiotika Meropenem und Piperacillin verdeutlicht die Relevanz einer Dosisindividualisierung bei diesem Patientenkollektiv. Ein interessantes Teilergebnis der Spiegelmessung für Meropenem stellt die Tatsache dar, dass die Patienten, die Meropenem in Form einer verlängerten Infusion der Einzeldosis über 2-4 h erhalten hatten, das PK/PD-Ziel zum Ende des Dosisintervalls vollständig erreichten (Kapitel 4.6.2). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen aus klinischen Studien zur verlängerten bzw. kontinuierlichen Applikation von Betalaktam-Antibiotika, in denen gezeigt werden konnte, dass durch eine derartige Anpassung des Dosierungsregimes das Erreichen des PK/PD-Zielparameters für Betalaktame verbessert werden kann [200,201]. Einschränkend ist in der vorliegenden Arbeit allerdings die geringe Anzahl von nur 8 Patienten zu erwähnen, denen Meropenem als verlängerte Infusion verabreicht wurde.

Für Piperacillin wurden auch freie Konzentrationen im Plasma von Intensivpatienten bestimmt. Die freie Fraktion von $82 \pm 10\%$ lag deutlich oberhalb der bei gesunden Probanden gemessenen Werte. So beträgt die freie Fraktion von Piperacillin bei gesunden Probanden nur ca. 70% [202,203]. Für das stark eiweißgebundene Ceftriaxon ist eine Erhöhung der freien Fraktion bei Intensivpatienten ebenfalls mehrfach beschrieben. Während bei gesunden Probanden nur ca. 6% als freie Fraktion im Plasma vorliegen, konnten bei Intensivpatienten deutlich erhöhte mittlere freie Fraktionen von 13-33% nachgewiesen werden [203–205]. Im Rahmen einer klinischen Studie an Dialysepatienten zeigten sich sogar noch weit höhere freie Fraktionen von ca. $60 \pm 15\%$, Werte welche die große Variabilität im Ausmaß der Plasmaproteinbindung von schwerkranken Patienten illustrieren [206]. Als Ursache wird in der Literatur zum einen die bei Intensivpatienten häufig vorkommende Hypoalbuminämie genannt [207]. Daneben können auch endogene Stoffe, die im Rahmen der jeweiligen Grunderkrankung des Intensivpatienten vermehrt gebildet werden, Einfluss auf die Plasmaproteinbindung nehmen, indem diese gebundene Arzneistoffe aus der Proteinbindung verdrängen [208]. So kann das z.B. bei Lebererkrankungen vermehrt zirkulierende Bilirubin die Proteinbindung von Arzneistoffen herabsetzen [208]. Vergleichbares ist auch für Harnstoff beschrieben, der sich im Rahmen einer Nierenfunktionsstörung, die bei vielen Intensivpatienten vorliegt [209], anreichern kann [208].

Eine deutliche Erhöhung der freien Fraktion bei Intensivpatienten ist auch schon mehrfach in der Literatur für Arzneistoffe anderer Indikationsgruppen beschrieben worden. Zamacona et al., 1997, konnten dieses Phänomen für das Anästhetikum Propofol nachweisen und Saari

et al., 2014, beschreiben die gleiche Beobachtung für das Opioid-Analgetikum Sufentanil [210,211]. Auch die in der vorliegenden Arbeit beobachtete starke Streuung der freien Fraktion bei Intensivpatienten ist bereits in der Literatur bekannt [203]. Wolf et al., 2006, leiten daraus für das Antiepileptikum Phenytoin ab, dass aus der Bestimmung der totalen Konzentration freie Konzentrationen nicht zuverlässig berechnet werden können [212]. Daher wird für diesen hocheiweißgebundenen Arzneistoff mit einer freien Fraktion von ca. 9% gefordert, bei Intensivpatienten zum TDM die freie Konzentration direkt zu bestimmen [212]. Dies deckt sich auch mit der Empfehlung von Wong et al., 2013, die vorschlagen, für hocheiweißgebundene Antibiotika wie Ceftriaxon zur Dosisoptimierung die freie Konzentration analytisch zu bestimmen, anstatt sie aus der totalen Konzentration mittels Literaturwerten für die Proteinbindung abzuleiten [203]. Lodise et al., 2007, gingen zur Berechnung freier Konzentrationen von Ceftriaxon bei kritisch kranken Patienten von einer freien Fraktion von nur 10% aus [213]. Die Anwendung dieses Modells auf die Ergebnisse der Arbeit von Schleibinger et al., 2015, hätte zu einer Unterschätzung der freien Konzentration um den Faktor 3 geführt, da hier eine freie Fraktion von ca. 33% ermittelt werden konnte [204].

Für schwach proteingebundene Antibiotika hingegen wie z.B. Meropenem scheint eine Bestimmung der freien Konzentration im Rahmen eines TDM nicht erforderlich. In der vorliegenden Arbeit konnte bei adipösen chirurgischen Patienten eine mittlere freie Fraktion für Meropenem von $97,8 \pm 5,7\%$ ermittelt werden, was annähernd dem Wert von gesunden Probanden entspricht, der in der Literatur mit ca. 98% angegeben wird [214]. In der Literatur wurde zwar bei kritisch kranken Patienten von einer Reduktion der freien Fraktion auf ca. 90% berichtet, doch auch diese Veränderung stellt im Hinblick auf die verfügbare freie Konzentration lediglich eine Veränderung um ca. 8% dar, ein Wert der im Rahmen eines TDM Programms nur geringe Relevanz haben sollte [203]. Auch Wong et al., 2013, kommen anhand der Ergebnisse ihrer Untersuchung zur Proteinbindung von verschiedenen Antibiotika zu diesem Schluss [203]. Eine Erniedrigung der freien Fraktion bei Intensivpatienten ist zudem angesichts oben beschriebener Ergebnisse kritisch zu hinterfragen, da üblicherweise eine Erhöhung der freien Fraktion beobachtet werden konnte. Der für Meropenem beobachtete Rückgang könnte Folge der Messmethodik sein, bei der die Aufrechterhaltung physiologischer Bedingungen bei der Ultrafiltration keine Berücksichtigung fand. So wurde die Ultrafiltration bei Raumtemperatur durchgeführt und es erfolgte keine Aufrechterhaltung physiologischer pH-Bedingungen. Die Zentrifugalkraft wurde mit 16200 g sehr hoch gewählt [203].

Die Ergebnisse der Bestimmung der freien Konzentration von Linezolid im Plasma von adipösen chirurgischen Patienten verdeutlichen die Relevanz der Adsorptionsproblematik bei Einsatz der Ultrafiltration zur Bestimmung der freien Konzentration. Während bei Verwendung der als inert befundenen Vivacon Ultrafiltrationseinheit eine einheitliche freie

Fraktion von $85,4 \pm 3,7\%$ ermittelt wurde, lag bei Verwendung der Nanosep Ultrafiltrationseinheiten durch die oben dargestellte Adsorption an die Membran die freie Fraktion lediglich bei ca. $68,0 \pm 6,7\%$ und zeigte einen Abfall bei niedrigen Konzentrationen, der eine Konzentrationsabhängigkeit der freien Fraktion vortäuschte. Die mit den Vivacon Ultrafiltrationseinheiten ermittelten Ergebnisse stimmen mit Literaturwerten überein, die mit Hilfe der Mikrodialyse bei septischen Patienten ermittelt wurden, wo sich ebenfalls eine freie Fraktion von ca. 85% zeigte [215]. Auch für die Verwendung von Nanosep Ultrafiltrationseinheiten zur Bestimmung der freien Konzentration bei kritisch kranken Patienten konnte in der Literatur ein Beispiel gefunden werden. Auch hier zeigte sich gegenüber den in dieser Arbeit mit Vivacon Filtern ermittelten Ergebnissen eine etwas erniedrigte freie Fraktion für Linezolid von im Mittel 77% [216]. Diese etwas niedrigere freie Fraktion könnte als Folge der bei Nanosep Ultrafiltern beobachteten Adsorption an die Membran gewertet werden. Die Einhaltung von physiologischen Bedingungen in Temperatur und pH bei der Ultrafiltration wurde zwar in dieser Arbeit ebenfalls nicht beachtet, aber für Linezolid ist dies nur von untergeordneter Bedeutung, da keine relevante Abhängigkeit der freien Konzentration von diesen Parametern vorliegt.

Für ein TDM von Linezolid in der klinischen Routine wird die Bestimmung von freien Konzentrationen als Grundlage für die Dosisanpassung empfohlen [217]. Dies erscheint sinnvoll, da die in den Patientenproben gemessene freie Fraktion im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht war. Während bei den schwer kranken Patienten hier eine freie Fraktion von ca. 85% ermittelt werden konnte, liegen die Literaturwerte für gesunde Probanden nur bei ca. 70% [218,219].

6 Zusammenfassung

Die Betalaktam-Antibiotika stellen die in der klinischen Routine am Universitätsklinikum Regensburg am häufigsten eingesetzten Antibiotika dar. Linezolid und Tigecyclin sind wichtige Reserveantibiotika zur Behandlung von Infektionen durch multiresistente grampositive Erreger. Tigecyclin kommt zusätzlich auch zur Therapie von Infektionen durch multiresistente gramnegative Keime zum Einsatz, die Betalaktamasen mit erweitertem Spektrum bilden. Trotz der großen Relevanz dieser Antibiotika für die klinische Praxis ist es bisher am Universitätsklinikum Regensburg nicht möglich, in der klinischen Routine die Plasmakonzentrationen dieser Substanzen im Rahmen eines TDM zu bestimmen. Da die Standarddosierungen der Fachinformationen aus pharmakokinetischen Studien an gesunden Probanden abgeleitet wurden, ist zu hinterfragen, ob mit diesen Dosierungen bei Intensivpatienten optimale Wirkspiegel erreicht werden. Kritisch kranke Patienten weisen eine stark veränderte und hoch variable Pharmakokinetik auf, was auf den pathophysiologischen Veränderungen im Rahmen ihrer schweren Erkrankung beruht. Eine optimal dosierte Antibiotikatherapie ist für Intensivpatienten mit schweren Infektionen von hoher Relevanz, da in klinischen Studien ein Überlebensvorteil bei adäquater Antibiose gezeigt werden konnte. Das Risiko der Resistenzbildung kann durch suffiziente Plasmakonzentrationen der eingesetzten Antibiotika gesenkt werden. Daher wird in Leitlinien insbesondere bei kritisch kranken Patienten vermehrt die Durchführung eines TDM für Antibiotika gefordert.

1) Hierzu wurden HPLC-Methoden mit UV-photometrischer Detektion zur Bestimmung der Betalaktam-Antibiotika Ceftazidim, Ceftriaxon, Ertapenem, Meropenem und Piperacillin, sowie der Reserveantibiotika Linezolid und Tigecyclin entwickelt und voll oder teilweise validiert. Die zentralen Validierungsparameter Präzision, Richtigkeit und Selektivität erfüllten die Anforderungen der EMA bzw. der FDA für die Validierung bioanalytischer Methoden. Um routinefähige Methoden mit möglichst kurzen Laufzeiten zu erhalten, wurde eine isokratische Elution gewählt. Zur Bestimmung der totalen Konzentration erfolgte die Probenvorbereitung durch Proteinfällung. Da für die pharmakologische Wirkung eines Arzneistoffs aber nur die freie, nicht an Plasmaproteine gebundene Fraktion zu Verfügung steht, wurde die Messung freier Konzentrationen in der Methodenentwicklung schwerpunktmäßig berücksichtigt. Dies ist für Intensivpatienten von besonderer Bedeutung, da bei diesem Patientenkollektiv auch die Proteinbindung starke Veränderungen aufweist. Zur Bestimmung der freien Konzentration kam die Ultrafiltration zum Einsatz.

2) Die Ultrafiltration gilt als zuverlässige Methode zur Bestimmung der freien Konzentration, sofern Adsorptionsphänomene der untersuchten Substanz an die Ultrafiltrationseinheit ausgeschlossen sind. Dies wurde für alle untersuchten Antibiotika geprüft. Da bekannt ist, dass das Ausmaß der Proteinbindung von den experimentellen Bedingungen wie

Temperatur, pH-Wert und Zentrifugalkraft beeinflusst werden kann, wurde die Bedeutung dieser Parameter für die gemessene freie Konzentration der untersuchten Substanzen evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass die freie Konzentration substanzspezifisch stark von den experimentellen Bedingungen abhängt. Daher wurde für die Routinemethode zur Bestimmung der freien Konzentration die Aufrechterhaltung physiologischer Bedingungen etabliert. Durch Pufferung der Proben und den Einsatz einer temperierbaren Zentrifuge konnte der hierfür erforderliche Aufwand an Arbeitszeit und Technik gering gehalten werden. Durch Vergleich der ermittelten Ergebnisse mit Literaturdaten aus Gleichgewichts- bzw. Mikrodialyse wurde die Zuverlässigkeit der Methode unter Beweis gestellt. Ergebnisse der jüngeren Literatur, bei der die Einhaltung physiologischer Bedingungen während der Ultrafiltration nicht berücksichtigt wurde, konnten korrigiert werden.

3) Die entwickelten Methoden erwiesen sich als gut geeignet zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen der untersuchten Substanzen bei Intensivpatienten. Die Ergebnisse der klinischen Untersuchung für Meropenem und Piperacillin konnten zeigen, dass bei ca. 50% der Patienten der PK/PD-Zielparameter einer Plasmakonzentration oberhalb der MHK des Leitkeims *Pseudomonas aeruginosa* über das gesamte Dosisintervall nicht erreicht wurde. Die gemessenen Spiegel zeigten eine breite Streuung. Beide Faktoren sprechen für die Anwendung modifizierter Dosierungsstrategien, sowie eines TDM zur Optimierung der antibiotischen Dosierung der Betalaktam-Antibiotika. Durch die Messung freier Konzentrationen von Meropenem, Piperacillin und Linezolid im Plasma von schwer kranken Patienten konnte gezeigt werden, dass die freie Konzentration nur bei schwach eiweißgebundenen Substanzen aus der totalen Konzentration abgeleitet werden kann. Bei hocheiweißgebundenen Antibiotika sollte im Rahmen eines TDM für schwerkranke Patienten die freie Konzentration analytisch bestimmt werden.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Vincent J-L, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA J Am Med Assoc* 2009;302:2323–9. doi:10.1001/jama.2009.1754.
- [2] Marshall JC. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 2001;29:S99–106.
- [3] Vincent J-L, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study*: *Crit Care Med* 2006;34:344–53. doi:10.1097/01.CCM.0000194725.48928.3A.
- [4] Moerer O, Schmid A, Hofmann M, Herklotz A, Reinhart K, Werdan K, et al. Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use. *Intensive Care Med* 2002;28:1440–6. doi:10.1007/s00134-002-1429-9.
- [5] Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest* 1999;115:462–74.
- [6] Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock*. *Crit Care Med* 2006;34:1589–96. doi:10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9.
- [7] Roberts JA, Kruger P, Paterson DL, Lipman J. Antibiotic resistance--what's dosing got to do with it? *Crit Care Med* 2008;36:2433–40. doi:10.1097/CCM.0b013e318180fe62.
- [8] Lipman J, Udy AA, Roberts JA. Do we understand the impact of altered physiology, consequent interventions and resultant clinical scenarios in the intensive care unit? The antibiotic story. *Anaesth Intensive Care* 2011;39:999–1000.
- [9] Roberts JA, De Waele JJ, Dimopoulos G, Koulenti D, Martin C, Montravers P, et al. DALI: Defining Antibiotic Levels in Intensive care unit patients: a multi-centre point of prevalence study to determine whether contemporary antibiotic dosing for critically ill patients is therapeutic. *BMC Infect Dis* 2012;12:152. doi:10.1186/1471-2334-12-152.
- [10] Scaglione F, Paraboni L. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of antibacterials in the Intensive Care Unit: setting appropriate dosing regimens. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32:294–301.e7. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.03.015.
- [11] Varghese JM, Roberts JA, Lipman J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in critically ill patients. *Curr Opin Anaesthesiol* 2010;23:472–8. doi:10.1097/ACO.0b013e328339ef0a.
- [12] Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone H-G, Bardutzky J, Dempfle C-E, Forst H, et al. Prevention, diagnosis, therapy and follow-up care of sepsis: 1st revision of S-2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG)) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)). *Ger Med Sci GMS E-J* 2010;8:Doc14. doi:10.3205/000103.
- [13] Renz-Polster H. *Basislehrbuch Innere Medizin*. 5. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2013.
- [14] van der Poll T. Immunotherapy of sepsis. *Lancet Infect Dis* 2001;1:165–74. doi:10.1016/S1473-3099(01)00093-7.
- [15] Roberts JA, Lipman J. Pharmacokinetic issues for antibiotics in the critically ill patient. *Crit Care Med* 2009;37:840–51; quiz 859. doi:10.1097/CCM.0b013e3181961bff.
- [16] Gosling P, Sanghera K, Dickson G. Generalized vascular permeability and pulmonary function in patients following serious trauma. *J Trauma* 1994;36:477–81.
- [17] Nuytinck HS, Offermans XW, Kubat K, Goris RA. Whole-body inflammation in trauma patients: An autopsy study. *Arch Surg* 1988;123:1519–24. doi:10.1001/archsurg.1988.01400360089016.

- [18] Buijk SE, Mouton JW, Gyssens IC, Verbrugh HA, Bruining HA. Experience with a once-daily dosing program of aminoglycosides in critically ill patients. *Intensive Care Med* 2002;28:936–42. doi:10.1007/s00134-002-1313-7.
- [19] Joynt GM, Lipman J, Gomersall CD, Young RJ, Wong EL, Gin T. The pharmacokinetics of once-daily dosing of ceftriaxone in critically ill patients. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:421–9.
- [20] Blot SI, Pea F, Lipman J. The effect of pathophysiology on pharmacokinetics in the critically ill patient — Concepts appraised by the example of antimicrobial agents. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;77:3–11. doi:10.1016/j.addr.2014.07.006.
- [21] Udy AA, Putt MT, Boots RJ, Lipman J. ARC--augmented renal clearance. *Curr Pharm Biotechnol* 2011;12:2020–9.
- [22] Conil J-M, Georges B, Mimoz O, Dieye E, Ruiz S, Cougot P, et al. Influence of renal function on trough serum concentrations of piperacillin in intensive care unit patients. *Intensive Care Med* 2006;32:2063–6. doi:10.1007/s00134-006-0421-1.
- [23] Conil JM, Georges B, Fourcade O, Seguin T, Houin G, Saivin S. Intermittent administration of ceftazidime to burns patients: influence of glomerular filtration. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2007;45:133–42.
- [24] Conil JM, Georges B, Breden A, Segonds C, Lavit M, Seguin T, et al. Increased amikacin dosage requirements in burn patients receiving a once-daily regimen. *Int J Antimicrob Agents* 2006;28:226–30. doi:10.1016/j.ijantimicag.2006.04.015.
- [25] Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury. *The Lancet* 2012;380:756–66. doi:10.1016/S0140-6736(11)61454-2.
- [26] Ulldemolins M, Roberts JA, Lipman J, Rello J. Antibiotic dosing in multiple organ dysfunction syndrome. *Chest* 2011;139:1210–20. doi:10.1378/chest.10-2371.
- [27] Fujii S, Takahashi S, Makino S, Kunimoto Y, Nakata H, Noda N, et al. Impact of Vancomycin or Linezolid Therapy on Development of Renal Dysfunction and Thrombocytopenia in Japanese Patients. *Chemotherapy* 2013;59:319–24. doi:10.1159/000356756.
- [28] Pea F, Viale P, Pavan F, Furlanut M. Pharmacokinetic considerations for antimicrobial therapy in patients receiving renal replacement therapy. *Clin Pharmacokinet* 2007;46:997–1038.
- [29] Jamal J-A, Udy AA, Lipman J, Roberts JA. The impact of variation in renal replacement therapy settings on piperacillin, meropenem, and vancomycin drug clearance in the critically ill: an analysis of published literature and dosing regimens*. *Crit Care Med* 2014;42:1640–50. doi:10.1097/CCM.0000000000000317.
- [30] Roberts DJ, Hall RI. Drug absorption, distribution, metabolism and excretion considerations in critically ill adults. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2013;9:1067–84. doi:10.1517/17425255.2013.799137.
- [31] Gonzalez D, Conrado DJ, Theuretzbacher U, Derendorf H. The effect of critical illness on drug distribution. *Curr Pharm Biotechnol* 2011;12:2030–6.
- [32] SAFE Study Investigators, Finfer S, Bellomo R, McEvoy S, Lo SK, Myburgh J, et al. Effect of baseline serum albumin concentration on outcome of resuscitation with albumin or saline in patients in intensive care units: analysis of data from the saline versus albumin fluid evaluation (SAFE) study. *BMJ* 2006;333:1044. doi:10.1136/bmj.38985.398704.7C.
- [33] Ulldemolins M, Roberts JA, Rello J, Paterson DL, Lipman J. The effects of hypoalbuminaemia on optimizing antibacterial dosing in critically ill patients. *Clin Pharmacokinet* 2011;50:99–110. doi:10.2165/11539220-000000000-00000.
- [34] Gonçalves-Pereira J, Póvoa P. Antibiotics in critically ill patients: a systematic review of the pharmacokinetics of β -lactams. *Crit Care Lond Engl* 2011;15:R206. doi:10.1186/cc10441.
- [35] Pea F, Viale P, Furlanut M. Antimicrobial therapy in critically ill patients: a review of pathophysiological conditions responsible for altered disposition and pharmacokinetic variability. *Clin Pharmacokinet* 2005;44:1009–34.
- [36] Roberts JA, Lipman J. Antibacterial dosing in intensive care: pharmacokinetics, degree of disease and pharmacodynamics of sepsis. *Clin Pharmacokinet* 2006;45:755–73.

- [37] Ariano RE, Nyhlén A, Donnelly JP, Sitar DS, Harding GKM, Zelenitsky SA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of meropenem in febrile neutropenic patients with bacteremia. *Ann Pharmacother* 2005;39:32–8. doi:10.1345/aph.1E271.
- [38] McKinnon PS, Paladino JA, Schentag JJ. Evaluation of area under the inhibitory curve (AUC) and time above the minimum inhibitory concentration (T>MIC) as predictors of outcome for cefepime and ceftazidime in serious bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31:345–51. doi:10.1016/j.ijantimicag.2007.12.009.
- [39] Li C, Du X, Kuti JL, Nicolau DP. Clinical Pharmacodynamics of Meropenem in Patients with Lower Respiratory Tract Infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1725–30. doi:10.1128/AAC.00294-06.
- [40] Sinnollareddy M, Peake SL, Roberts MS, Playford EG, Lipman J, Roberts JA. Pharmacokinetic evaluation of fluconazole in critically ill patients. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011;7:1431–40. doi:10.1517/17425255.2011.615309.
- [41] Young RJ, Lipman J, Gin T, Gomersall CD, Joynt GM, Oh TE. Intermittent bolus dosing of ceftazidime in critically ill patients. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:269–73.
- [42] S3-Leitlinie Strategien zur Sicherung rationaler Antibiotika-Anwendung im Krankenhaus n.d. <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/092-001.html> (Zugriff am 09.10. 2015).
- [43] Kang J-S, Lee M-H. Overview of Therapeutic Drug Monitoring. *Korean J Intern Med* 2009;24:1–10. doi:10.3904/kjim.2009.24.1.1.
- [44] Roberts JA, Norris R, Paterson DL, Martin JH. Therapeutic drug monitoring of antimicrobials. *Br J Clin Pharmacol* 2012;73:27–36. doi:10.1111/j.1365-2125.2011.04080.x.
- [45] Póvoa P. Serum markers in community-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21:157–62. doi:10.1097/QCO.0b013e3282f47c32.
- [46] Frank U. *Antibiotika am Krankenbett*. 16., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl. Berlin ; Heidelberg: Springer; 2013.
- [47] Wong G, Sime FB, Lipman J, Roberts JA. How do we use therapeutic drug monitoring to improve outcomes from severe infections in critically ill patients? *BMC Infect Dis* 2014;14:288. doi:10.1186/1471-2334-14-288.
- [48] Nosseir N, Michels G, Pfister R, Adam R, Wiesen M, Müller C. Therapeutisches Drug Monitoring (TDM) von Antiinfektiva in der Intensivmedizin. *DMW - Dtsch Med Wochenschr* 2014;139:1889–94. doi:10.1055/s-0034-1387215.
- [49] Destache CJ. Aminoglycoside-Induced Nephrotoxicity—A Focus on Monitoring A review of Literature. *J Pharm Pract* 2014;27:562–6. doi:10.1177/0897190014546102.
- [50] Ye Z-K, Tang H-L, Zhai S-D. Benefits of Therapeutic Drug Monitoring of Vancomycin: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2013;8:e77169. doi:10.1371/journal.pone.0077169.
- [51] Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock, 2012. *Intensive Care Med* 2013;39:165–228. doi:10.1007/s00134-012-2769-8.
- [52] Drusano GL. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobials. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2007;45 Suppl 1:S89–95. doi:10.1086/518137.
- [53] Drusano GL. Antimicrobial pharmacodynamics: critical interactions of “bug and drug.” *Nat Rev Microbiol* 2004;2:289–300. doi:10.1038/nrmicro862.
- [54] Ambrose PG, Bhavnani SM, Rubino CM, Louie A, Gumbo T, Forrest A, et al. Pharmacokinetics-Pharmacodynamics of Antimicrobial Therapy: It’s Not Just for Mice Anymore. *Clin Infect Dis* 2007;44:79–86. doi:10.1086/510079.
- [55] Mouton JW, Dudley MN, Cars O, Derendorf H, Drusano GL. Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs. *Int J Antimicrob Agents* 2002;19:355–8.
- [56] Derendorf H, Meibohm B. Modeling of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationships: concepts and perspectives. *Pharm Res* 1999;16:176–85.
- [57] Roberts JA. Using PK/PD to Optimize Antibiotic Dosing for Critically Ill Patients. *Curr Pharm Biotechnol* 2011;12:2070–9. doi:10.2174/138920111798808329.

- [58] Roberts JA, Taccone FS, Lipman J. Understanding PK/PD. *Intensive Care Med* 2015;1–4. doi:10.1007/s00134-015-4032-6.
- [59] Nicolau DP. Optimizing outcomes with antimicrobial therapy through pharmacodynamic profiling. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother* 2003;9:292–6. doi:10.1007/s10156-003-0279-x.
- [60] Tam VH, McKinnon PS, Akins RL, Rybak MJ, Drusano GL. Pharmacodynamics of cefepime in patients with Gram-negative infections. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:425–8. doi:10.1093/jac/dkf130.
- [61] Dong H, Wang X, Dong Y, Lei J 'e, Li H, You H, et al. Clinical pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of linezolid in severely ill intensive care unit patients. *Int J Antimicrob Agents* 2011;38:296–300. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.05.007.
- [62] Meagher AK, Passarell JA, Cirincione BB, Wart SAV, Liolos K, Babinchak T, et al. Exposure-Response Analyses of Tigecycline Efficacy in Patients with Complicated Skin and Skin-Structure Infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1939–45. doi:10.1128/AAC.01084-06.
- [63] Fa. Pfizer - Fachinfo Zyvoxid® Infusionslösung (Stand September 2014). <https://www.pfizer.de/medikamente-produkte/rezeptpflichtige-medikamente/pfizer-produkte/detailansicht/zyvoxidR-infusionsloesung.htm> (Zugriff am 09.10.2015).
- [64] Fa. Pfizer - Fachinfo Tygacil® (Stand Juni 2015). <https://www.pfizer.de/medikamente-produkte/rezeptpflichtige-medikamente/pfizer-produkte/detailansicht/tygacilR.htm> (Zugriff am 09.10.2015).
- [65] Mutschler E. *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Pharmakologie, Klinische Pharmakologie, Toxikologie*. 10th ed. Stuttgart: Wiss. Verlagsgesellschaft; 2013.
- [66] Fa. Fresenius Kabi - Fachinfo Piperacillin Fresenius (Stand Februar 2014). https://www.fresenius-kabi.de/piperacillin_fresenius.htm (Zugriff am 09.10.2015).
- [67] Fa. Fresenius Kabi Deutschland - Fachinfo Cephazolin Fresenius 2g (Stand April 2015). http://www.fresenius-kabi.de/cephazolin_fresenius.htm (Zugriff am 03.11.2015).
- [68] Fa. Fresenius Kabi 1g - Fachinfo Ceftriaxon Kabi (Stand Januar 2014). http://www.fresenius-kabi.de/ceftriaxon_kabi.htm (Zugriff am 03.11.2015).
- [69] Fa. Eberth Arzneimittel GmbH - Fachinfo Ceftazidim Eberth 2g (Stand August 2014). http://www.eberth-arzneimittel.de/index.php?id=ceftazidim_eberth (Zugriff am 09.10.2015).
- [70] Fa. InfectoPharm - Fachinfo Invanz 1g (Stand Oktober 2014). <http://www.infectopharm.com/praeparate/paerparate/fachkreise/invanz?hilite=invanz> (Zugriff am 03.11.2015).
- [71] Fa. Eberth Arzneimittel GmbH - Fachinfo Meropenem Eberth 1g (Stand Mai 2012). http://www.eberth-arzneimittel.de/index.php?id=meropenem_eberth (Zugriff am 09.10.2015).
- [72] Swaney SM, Aoki H, Ganoza MC, Shinabarger DL. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:3251–5.
- [73] Doan T-L, Fung HB, Mehta D, Riska PF. Tigecycline: A glycylyccline antimicrobial agent. *Clin Ther* 2006;28:1079–106. doi:10.1016/j.clinthera.2006.08.011.
- [74] Meagher AK, Ambrose PG, Grasela TH, Ellis-Grosse EJ. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile for tigecycline-a new glycylyccline antimicrobial agent. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;52:165–71. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2005.05.006.
- [75] Carlier M, Stove V, Wallis SC, De Waele JJ, Verstraete AG, Lipman J, et al. Assays for therapeutic drug monitoring of β -lactam antibiotics: A structured review. *Int J Antimicrob Agents* n.d. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.06.016.
- [76] Hill RE. Methods of therapeutic drug analysis. *Clin Biochem* 1986;19:113–21. doi:10.1016/S0009-9120(86)80057-1.
- [77] El-Shaboury SR, Saleh GA, Mohamed FA, Rageh AH. Analysis of cephalosporin antibiotics. *J Pharm Biomed Anal* 2007;45:1–19. doi:10.1016/j.jpba.2007.06.002.
- [78] Zorpas KM, Valsami GN, Vryonis EV, Skoutelis AT, Archontaki HA. Robust and sensitive high-performance liquid chromatographic-UV detection technique for the determination of tigecycline in rabbit plasma. *J AOAC Int* 2011;94:847–56.

- [79] Zander J, Maier B, Zoller M, Teupser D, Vogeser M. Quantification of linezolid in serum by LC-MS/MS using semi-automated sample preparation and isotope dilution internal standardization. *Clin Chem Lab Med CCLM FESCC* 2014;52:381–9. doi:10.1515/cclm-2013-0594.
- [80] Cattaneo D, Baldelli SC, Conti FB, Cozzi VB, Clementi E. Determination of Linezolid in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography With Ultraviolet Detection. [Miscellaneous Article]. *Ther Drug Monit* August 2010 2010;32:520–4. doi:10.1097/FTD.0b013e3181d5e4ee.
- [81] Xie J, Wang T, Wang X, Cheng X, Dong H, Wang Y, et al. Quantitative analysis and pharmacokinetics study of tigecycline in human serum using a validated sensitive liquid chromatography with tandem mass spectrometry method. *J Sep Sci* 2014;37:1396–403. doi:10.1002/jssc.201400152.
- [82] Leung KS-Y, Fong BM-W. LC-MS/MS in the routine clinical laboratory: has its time come? *Anal Bioanal Chem* 2014;406:2289–301. doi:10.1007/s00216-013-7542-5.
- [83] Seger C. Usage and limitations of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in clinical routine laboratories. *Wien Med Wochenschr* 2012;162:499–504. doi:10.1007/s10354-012-0147-3.
- [84] Mouton JW, Dudley MN, Cars O, Derendorf H, Drusano GL. Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:601–7. doi:10.1093/jac/dki079.
- [85] Hardman JG eds et al. Goodman and Gilman's The pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill; 2010.
- [86] Wolff F, Deprez G, Seyler L, Taccone F, Hites M, Gulbis B, et al. Rapid quantification of six β -lactams to optimize dosage regimens in severely septic patients. *Talanta* 2013;103:153–60. doi:10.1016/j.talanta.2012.10.024.
- [87] Kurihara Y, Kizu J, Hori S. Simple and rapid determination of serum carbapenem concentrations by high-performance liquid chromatography. *J Infect Chemother* 2008;14:30–4. doi:10.1007/s10156-007-0576-x.
- [88] Briscoe SE, McWhinney BC, Lipman J, Roberts JA, Ungerer JPJ. A method for determining the free (unbound) concentration of ten beta-lactam antibiotics in human plasma using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2012. doi:10.1016/j.jchromb.2012.09.016.
- [89] Dailly E, Bouquié R, Deslandes G, Jolliet P, Le Floch R. A liquid chromatography assay for a quantification of doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem concentrations in human plasma: Application to a clinical pharmacokinetic study. *J Chromatogr B* 2011;879:1137–42. doi:10.1016/j.jchromb.2011.03.038.
- [90] Beer J, Wagner CC, Zeitlinger M. Protein binding of antimicrobials: methods for quantification and for investigation of its impact on bacterial killing. *AAPS J* 2009;11:1–12. doi:10.1208/s12248-008-9072-1.
- [91] Vuignier K, Schappler J, Veuthey J-L, Carrupt P-A, Martel S. Drug–protein binding: a critical review of analytical tools. *Anal Bioanal Chem* 2010;398:53–66. doi:10.1007/s00216-010-3737-1.
- [92] FDA Guidance for industry. Bioanalytical method validation (Stand September 2013). <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm064964.htm> (Zugriff am 04.11.2015).
- [93] EMA Guidance for industry. Bioanalytical method validation (Stand Februar 2012). http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/includes/document/document_detail.jsp?webContentId=WC500109686&mid=WC0b01ac058009a3dc (Zugriff am 09.10.2015).
- [94] Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RM. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry (Mosc)* 1966;5:467–77.
- [95] D'Avolio A, Peila EP, Simiele M, Pensi D, Baietto L, Cusato J, et al. Ultra Performance Liquid Chromatography PDA Method for Determination of Tigecycline in Human Plasma.

- [Miscellaneous Article]. *Ther Drug Monit* Dec 2013 2013;35:853–8. doi:10.1097/FTD.0b013e31829403b1.
- [96] Cios A, Kuś K, Szymura-Oleksiak J. Determination of linezolid in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet and diode array detection. *Acta Pol Pharm* 2013;70:631–41.
- [97] Sime FB, Roberts MS, Roberts JA, Robertson TA. Simultaneous determination of seven β -lactam antibiotics in human plasma for therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B* 2014;960:134–44. doi:10.1016/j.jchromb.2014.04.029.
- [98] Prof. Dr. Hermann Wrigge, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Leipzig,, Liebigstr. 20; 04103 Leipzig. Prospektive, offene, monozentrische Studie zur Untersuchung von perioperativen Gewebkonzentrationen an Antibiotika und peripheren Analgetika mittels Mikrodialysetechnik bei adipösen und nicht adipösen Patienten. EudraCT-Nr.: 2012-004383-22).
- [99] Nováková L, Vlčková H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Anal Chim Acta* 2009;656:8–35. doi:10.1016/j.aca.2009.10.004.
- [100] McWhinney BC, Wallis SC, Hillister T, Roberts JA, Lipman J, Ungerer JPJ. Analysis of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010;878:2039–43. doi:10.1016/j.jchromb.2010.05.027.
- [101] Verdier M-C, Tribut O, Tattevin P, Le Tulzo Y, Michelet C, Bentué-Ferrer D. Simultaneous determination of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection: application to therapeutic drug monitoring. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4873–9. doi:10.1128/AAC.00533-11.
- [102] Hou JP, Poole JW. β -lactam antibiotics: Their physicochemical properties and biological activities in relation to structure. *J Pharm Sci* 1971;60:503–32. doi:10.1002/jps.2600600402.
- [103] Samanidou VF, Evaggelopoulos EN, Papadoyannis IN. Chromatographic analysis of penicillins in pharmaceutical formulations and biological fluids. *J Sep Sci* 2006;29:1879–908. doi:10.1002/jssc.200600137.
- [104] Joshi S. HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. *J Pharm Biomed Anal* 2002;28:795–809. doi:10.1016/S0731-7085(01)00706-3.
- [105] Rosseel MT, Peleman R, Van Hoorebeke H, Pauwels RA. Measurement of cefuroxime in human bronchoalveolar lavage fluid by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction. *J Chromatogr B Biomed Sci App* 1997;689:438–41.
- [106] Guitton J, Laffont A, Bruzeau J, Rochet-Mingret L, Bonnefoy M, Bureau J. Determination of ceftazidime in plasma using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. Application for individualizing dosage regimens in elderly patients. *J Chromatogr B Biomed Sci App* 1998;719:151–7.
- [107] Denooz R, Charlier C. Simultaneous determination of five beta-lactam antibiotics (cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem and piperacillin) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008;864:161–7. doi:10.1016/j.jchromb.2008.01.037.
- [108] Pragst F, Herzler M, Erxleben B-T. Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). *Clin Chem Lab Med CCLM FESCC* 2004;42:1325–40. doi:10.1515/CCLM.2004.251.
- [109] Metz P, Kohlhepp SJ, Gilbert DN. Study of different off-line sample processing procedures and the measurement of antibiotic and antiviral levels in human serum by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 2002;773:159–66. doi:10.1016/S1570-0232(02)00140-X.
- [110] Kees F. Preparation for HPLC of Samples in Biological Matrices, and Problems of Degradation. *High Perform. Liq. Chromatogr. Med. Microbiol.*, Stuttgart, New York: F. Fischer Verlag; 1986, p. 7–19.
- [111] Carlier M, Stove V, Roberts JA, Van de Velde E, De Waele JJ, Verstraete AG. Quantification of seven β -lactam antibiotics and two β -lactamase inhibitors in human plasma using a validated

- UPLC-MS/MS method. *Int J Antimicrob Agents* 2012;40:416–22. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.06.022.
- [112] Pickering M, Brown S. Quantification and validation of HPLC-UV and LC-MS assays for therapeutic drug monitoring of ertapenem in human plasma. *Biomed Chromatogr* 2012;n/a – n/a. doi:10.1002/bmc.2829.
- [113] Ohmori T, Suzuki A, Niwa T, Ushikoshi H, Shirai K, Yoshida S, et al. Simultaneous determination of eight β -lactam antibiotics in human serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2011;879:1038–42. doi:10.1016/j.jchromb.2011.03.001.
- [114] Qureshi T, Memon N, Memon SQ, Abro K, Shah SW. LC/UV determination of cefradine, cefuroxime, and cefotaxime in dairy milk, human serum and wastewater samples. *SpringerPlus* 2013;2:575. doi:10.1186/2193-1801-2-575.
- [115] Meyer VR. *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. 10., vollst. überarb. und erw. Aufl. Weinheim: WILEY-VCH Verl.; 2009.
- [116] Millership JS. Microassay of drugs and modern measurement techniques. *Pediatr Anesth* 2011;21:197–205. doi:10.1111/j.1460-9592.2011.03535.x.
- [117] EUCAST: Clinical breakpoints (Version 5.0; Stand 01.01.2015). http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (Zugriff am 09.10.2015).
- [118] Kromidas S. *Validierung in der Analytik*. 2., überarb. Aufl. Weinheim [u.a.]: Wiley-VCH; 2011.
- [119] Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, McDowall RD. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J Pharm Biomed Anal* 1998;17:193–218. doi:10.1016/S0731-7085(97)00198-2.
- [120] Nilsson LB. The bioanalytical challenge of determining unbound concentration and protein binding for drugs. *Bioanalysis* 2013;5:3033–50. doi:10.4155/bio.13.274.
- [121] Oravcová J, Böhs B, Lindner W. Drug-protein binding sites. *New trends in analytical and experimental methodology. J Chromatogr B Biomed Appl* 1996;677:1–28.
- [122] Barré J, Chamouard JM, Houin G, Tillement JP. Equilibrium dialysis, ultrafiltration, and ultracentrifugation compared for determining the plasma-protein-binding characteristics of valproic acid. *Clin Chem* 1985;31:60–4.
- [123] Howard ML, Hill JJ, Galluppi GR, McLean MA. Plasma protein binding in drug discovery and development. *Comb Chem High Throughput Screen* 2010;13:170–87.
- [124] Zhang F, Xue J, Shao J, Jia L. Compilation of 222 drugs' plasma protein binding data and guidance for study designs. *Drug Discov Today* 2012;17:475–85. doi:10.1016/j.drudis.2011.12.018.
- [125] Waters NJ, Jones R, Williams G, Sohal B. Validation of a rapid equilibrium dialysis approach for the measurement of plasma protein binding. *J Pharm Sci* 2008;97:4586–95. doi:10.1002/jps.21317.
- [126] Wright JD, Boudinot FD, Ujhelyi MR. Measurement and analysis of unbound drug concentrations. *Clin Pharmacokinet* 1996;30:445–62.
- [127] Huang JD. Errors in estimating the unbound fraction of drugs due to the volume shift in equilibrium dialysis. *J Pharm Sci* 1983;72:1368–9.
- [128] Lockwood GF, Wagner JG. Plasma volume changes as a result of equilibrium dialysis. *J Pharm Pharmacol* 1983;35:387–8.
- [129] Sebillé B. Methods of drug protein binding determinations. *Fundam Clin Pharmacol* 1990;4 Suppl 2:151s – 161s.
- [130] Bohnert T, Gan L-S. Plasma protein binding: From discovery to development. *J Pharm Sci* 2013;102:2953–94. doi:10.1002/jps.23614.
- [131] Sophianopoulos JA, Durham SJ, Sophianopoulos AJ, Ragsdale HL, Cropper WP Jr. Ultrafiltration is theoretically equivalent to equilibrium dialysis but much simpler to carry out. *Arch Biochem Biophys* 1978;187:132–7.
- [132] McMillin GA, Juenke J, Dasgupta A. Effect of ultrafiltrate volume on determination of free phenytoin concentration. *Ther Drug Monit* 2005;27:630–3.
- [133] Dong W-C, Jiang Y, Zhang Z-Q, Jiang X-H, Sun Y-G. Effect of volume ratio of ultrafiltrate to sample solution on the analysis of free drug and measurement of free carbamazepine in

- clinical drug monitoring. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci* 2012. doi:10.1016/j.ejps.2012.11.006.
- [134] Berthoin K, Ampe E, Tulkens PM, Carryn S. Correlation between free and total vancomycin serum concentrations in patients treated for Gram-positive infections. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:555–60. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.08.005.
- [135] Butterfield JM, Patel N, Pai MP, Rosano TG, Drusano GL, Lodise TP. Refining vancomycin protein binding estimates: identification of clinical factors that influence protein binding. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4277–82. doi:10.1128/AAC.01674-10.
- [136] Crandon JL, Macvane SH, Nicolau DP. Clinical Laboratory-Based Assay Methodologies May Underestimate and Increase Variability of Vancomycin Protein Binding in Hospitalized Patients. *Pharmacotherapy* 2013. doi:10.1002/phar.1323.
- [137] Kratzer A, Liebchen U, Schleibinger M, Kees MG, Kees F. Determination of free vancomycin, ceftriaxone, cefazolin and ertapenem in plasma by ultrafiltration: Impact of experimental conditions. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2014;961:97–102. doi:10.1016/j.jchromb.2014.05.021.
- [138] Liebchen U, Kratzer A, Wicha S, Kees F, Kees M. Protein binding of ertapenem in plasma from healthy volunteers and from ICU patients. ESCMID: Online Lecture Library (Poster 1741 ECCMID 2014 Barcelona). https://www.escmid.org/escmid_library/online_lecture_library/?search=1¤t_page=1&search_term=Liebchen&entrytype%5B%5D=17&entrytitle%5B%5D=8768 (Zugriff am 04.11.2015).
- [139] Tasker RA, Nakatsu K. Factors affecting ultrafiltration-assessed values for drug binding. *Clin Chem* 1982;28:1244–6.
- [140] Zhirkov YuA, Piotrovskii VK. On the usefulness of ultrafiltration in drug-protein binding studies. *J Pharm Pharmacol* 1984;36:844–5.
- [141] Lee K-J, Mower R, Hollenbeck T, Castelo J, Johnson N, Gordon P, et al. Modulation of Nonspecific Binding in Ultrafiltration Protein Binding Studies. *Pharm Res* 2003;20:1015–21. doi:10.1023/A:1024406221962.
- [142] Ballard P, Rowland M. Correction for Nonspecific Binding to Various Components of Ultrafiltration Apparatus and Impact on Estimating In Vivo Rat Clearance for a Congeneric Series of 5-Ethyl, 5-n-Alkyl Barbituric Acids. *Drug Metab Dispos* 2011;39:2165–8. doi:10.1124/dmd.111.040683.
- [143] Taylor S, Harker A. Modification of the ultrafiltration technique to overcome solubility and non-specific binding challenges associated with the measurement of plasma protein binding of corticosteroids. *J Pharm Biomed Anal* 2006;41:299–303. doi:10.1016/j.jpba.2005.10.031.
- [144] Fa. Pall - Online Produktinformation - Nanosep® Centrifugal Devices. <http://www.pall.com/main/laboratory/literature-library-details.page?id=40883> (Zugriff am 09.11.2015).
- [145] Kim TK, Yoo HH, Kim EJ, Sa JH, Lee B-Y, Park JH. Comparative protein binding of taxotere and SID530, a new docetaxel formulation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin, in human plasma in vitro. *Pharm* 2012;67:789–91.
- [146] Delgado-Magnero KH, Valiente PA, Ruiz-Peña M, Pérez-Gramatges A, Pons T. Unraveling the binding mechanism of polyoxyethylene sorbitan esters with bovine serum albumin: a novel theoretical model based on molecular dynamic simulations. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014;116:720–6. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.11.018.
- [147] Honore PM, Jacobs R, Waele ED, Gorp VV, Spapen HD. The blind spot in high-dose tigecycline pharmacokinetics in critically ill patients: membrane adsorption during continuous extracorporeal treatment. *Crit Care* 2015;19:24. doi:10.1186/s13054-015-0744-9.
- [148] Brash JL, Lyman DJ. Adsorption of plasma proteins in solution to uncharged, hydrophobic polymer surfaces. *J Biomed Mater Res* 1969;3:175–89. doi:10.1002/jbm.820030114.
- [149] Guha Thakurta S, Subramanian A. Evaluation of in situ albumin binding surfaces: a study of protein adsorption and platelet adhesion. *J Mater Sci Mater Med* 2011;22:137–49. doi:10.1007/s10856-010-4169-3.

- [150] Wang C, Williams NS. A mass balance approach for calculation of recovery and binding enables the use of ultrafiltration as a rapid method for measurement of plasma protein binding for even highly lipophilic compounds. *J Pharm Biomed Anal* 2013;75:112–7. doi:10.1016/j.jpba.2012.11.018.
- [151] Bista SR, Haywood A, Hardy J, Lobb M, Tapuni A, Norris R. Protein binding of fentanyl and its metabolite nor-fentanyl in human plasma, albumin and α -1 acid glycoprotein. *Xenobiotica* 2014:1–6. doi:10.3109/00498254.2014.971093.
- [152] Brogden RN, Ward A. Ceftriaxone. A reappraisal of its antibacterial activity and pharmacokinetic properties, and an update on its therapeutic use with particular reference to once-daily administration. *Drugs* 1988;35:604–45.
- [153] Hahn J-M. *Checkliste Innere Medizin*. 7., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2013.
- [154] Kochansky CJ, McMasters DR, Lu P, Koeplinger KA, Kerr HH, Shou M, et al. Impact of pH on Plasma Protein Binding in Equilibrium Dialysis. *Mol Pharm* 2008;5:438–48. doi:10.1021/mp800004s.
- [155] Nilsson L, Schmidt S. Simultaneous determination of total and free drug plasma concentrations combined with batch-wise pH-adjustment for the free concentration determinations. *J Pharm Biomed Anal* 2001;24:921–7. doi:10.1016/S0731-7085(00)00560-4.
- [156] Stove V, Coene L, Carlier M, De Waele JJ, Fiers T, Verstraete AG. Measuring Unbound Versus Total Vancomycin Concentrations in Serum and Plasma: Methodological Issues and Relevance. *Ther Drug Monit* 2015;37:180–7. doi:10.1097/FTD.0000000000000122.
- [157] Shaw JC. Nonmetabolizable base balance: effect of diet composition on plasma pH. *J Nutr* 1989;119:1789–98.
- [158] Curran RE, Claxton CRJ, Hutchison L, Harradine PJ, Martin IJ, Littlewood P. Control and Measurement of Plasma pH in Equilibrium Dialysis: Influence on Drug Plasma Protein Binding. *Drug Metab Dispos* 2011;39:551–7. doi:10.1124/dmd.110.036988.
- [159] Fura A, Harper TW, Zhang H, Fung L, Shyu WC. Shift in pH of biological fluids during storage and processing: effect on bioanalysis. *J Pharm Biomed Anal* 2003;32:513–22. doi:10.1016/S0731-7085(03)00159-6.
- [160] Hinderling PH, Hartmann D. The pH dependency of the binding of drugs to plasma proteins in man. *Ther Drug Monit* 2005;27:71–85.
- [161] Musteata FM, Pawliszyn J, Qian MG, Wu J-T, Miwa GT. Determination of drug plasma protein binding by solid phase microextraction. *J Pharm Sci* 2006;95:1712–22. doi:10.1002/jps.20558.
- [162] Christensen JH, Andreasen F, Jensen EB. The binding of thiopental to human serum albumin at variable pH and temperature. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1983;52:364–70.
- [163] Girard I, Ferry S. Protein binding of methohexital. Study of parameters and modulating factors using the equilibrium dialysis technique. *J Pharm Biomed Anal* 1996;14:583–91. doi:10.1016/0731-7085(95)01636-8.
- [164] Abdel-Rehim M, Carlsson G, Bielenstein M, Arvidsson T, Blomberg LG. Evaluation of solid-phase microextraction for the study of protein binding in human plasma samples. *J Chromatogr Sci* 2000;38:458–64.
- [165] Wilting J, Weideman MM, Roomer AC, Perrin JH. Conformational changes in human serum albumin around the neutral pH from circular dichroic measurements. *Biochim Biophys Acta* 1979;579:469–73.
- [166] Wanwimolruk S, Birkett DJ. The effects of N-B transition of human serum albumin on the specific drug-binding sites. *Biochim Biophys Acta* 1982;709:247–55.
- [167] Yamasaki K, Maruyama T, Yoshimoto K, Tsutsumi Y, Narazaki R, Fukuhara A, et al. Interactive binding to the two principal ligand binding sites of human serum albumin: effect of the neutral-to-base transition. *Biochim Biophys Acta BBA - Protein Struct Mol Enzymol* 1999;1432:313–23. doi:10.1016/S0167-4838(99)00098-9.
- [168] Otagiri M, Yamamichi R, Maruyama T, Imai T, Suenaga A, Imamura Y, et al. Drug binding to alpha 1-acid glycoprotein studied by circular dichroism. *Pharm Res* 1989;6:156–9.
- [169] Yamasaki K, Chuang VTG, Maruyama T, Otagiri M. Albumin–drug interaction and its clinical implication. *Serum Albumin* 2013;1830:5435–43. doi:10.1016/j.bbagen.2013.05.005.

- [170] van der Giesen WF, Wilting J. Consequences of the N-B transition of albumin for the binding of warfarin in human serum. *Biochem Pharmacol* 1983;32:281–5.
- [171] Wilting J, Hart BJ, De Gier JJ. The role of albumin conformation in the binding of diazepam to human serum albumin. *Biochim Biophys Acta* 1980;626:291–8.
- [172] Ermondi G, Lorenti M, Caron G. Contribution of Ionization and Lipophilicity to Drug Binding to Albumin: A Preliminary Step toward Biodistribution Prediction. *J Med Chem* 2004;47:3949–61. doi:10.1021/jm040760a.
- [173] Pinsuwan S, Alvarez-Núñez FA, Esmail Tabibi S, Yalkowsky SH. Spectrophotometric determination of acidity constants of 4-dedimethylamino sancycline (Col-3), a new antitumor drug. *J Pharm Sci* 1999;88:535–7. doi:10.1021/js980398l.
- [174] Wan H, Rehgren M. High-throughput screening of protein binding by equilibrium dialysis combined with liquid chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2006;1102:125–34. doi:10.1016/j.chroma.2005.10.030.
- [175] Paxton JW, Calder RL. Propranolol binding in serum: comparison of methods and investigation of effects of drug concentration, pH, and temperature. *J Pharmacol Methods* 1983;10:1–11.
- [176] Kodama H, Kodama Y, Itokazu N, Shinozawa S, Kanemaru R, Sugimoto T. Effect of temperature on serum protein binding characteristics of phenytoin in monotherapy paediatric patients with epilepsy. *J Clin Pharm Ther* 2001;26:175–9. doi:10.1046/j.1365-2710.2001.00340.x.
- [177] Kees MG, Wicha SG, Seefeld A, Kees F, Kloft C. Unbound fraction of vancomycin in intensive care unit patients. *J Clin Pharmacol* 2013. doi:10.1002/jcph.175.
- [178] Spector R, Vernick R, Lorenzo AV. Effects of pressure on the plasma binding of digoxin and ouabain in an ultrafiltration apparatus. *Biochem Pharmacol* 1973;22:2486–7.
- [179] Fa. Merckmillipore - Online Produktinformation - Centrifree® Ultrafiltration Device. http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Centrifree-Ultrafiltration-Device,MM_NF-C933?bd=1 (Zugriff am 09.10.2015).
- [180] Mukker JK, Singh RP, Derendorf H. Determination of Atypical Nonlinear Plasma–Protein-Binding Behavior of Tigecycline Using an In Vitro Microdialysis Technique. *J Pharm Sci* 2014;103:1013–9. doi:10.1002/jps.23872.
- [181] Muralidharan G, Micalizzi M, Speth J, Raible D, Troy S. Pharmacokinetics of tigecycline after single and multiple doses in healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:220–9. doi:10.1128/AAC.49.1.220-229.2005.
- [182] Brion M, Berthon G, Fourtillan J-B. Metal ion-Tetracyclines interactions in biological fluids. Potentiometric study of calcium complexes with tetracycline, oxytetracycline, doxycycline and minocycline and simulation of their distributions under physiological conditions. *Inorganica Chim Acta* 1981;55:47–56. doi:10.1016/S0020-1693(00)90781-3.
- [183] Berthon G, Brion M, Lambs L. Metal ion-tetracycline interactions in biological fluids. 2. Potentiometric study of magnesium complexes with tetracycline, oxytetracycline, doxycycline, and minocycline, and discussion of their possible influence on the bioavailability of these antibiotics in blood plasma. *J Inorg Biochem* 1983;19:1–18.
- [184] Kohn KW. Mediation of Divalent Metal Ions in the Binding of Tetracycline to Macromolecules. *Nature* 1961;191:1156–8. doi:10.1038/1911156a0.
- [185] Popov PG, Vaptzarova KI, Kossekova GP, Nikolov TK. Fluorometric study of tetracycline-bovine serum albumin interaction: The tetracyclines—A new class of fluorescent probes. *Biochem Pharmacol* 1972;21:2363–72. doi:10.1016/0006-2952(72)90388-7.
- [186] Chen Q, Tung EC, Ciccotto SL, Strauss JR, Ortiga R, Ramsay KA, et al. Effect of the anticoagulant ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) on the estimation of pharmacokinetic parameters: A case study with tigecycline and ciprofloxacin. *Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst* 2008;38:76–86. doi:10.1080/00498250701678955.
- [187] Seedher N, Agarwal P. Effect of metal ions on some pharmacologically relevant interactions involving fluoroquinolone antibiotics. *Drug Metabol Drug Interact* 2010;25:17–24. doi:10.1515/DMDI.2010.003.

- [188] Roy RN, Roy LN, Ashkenazi S, Wollen JT, Dunseth CD, Fuge MS, et al. Buffer Standards for pH Measurement of N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'-2-ethanesulfonic Acid (HEPES) for $I = 0.16 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ from 5 to 55°C. *J Solut Chem* 2009;38:449–58. doi:10.1007/s10953-009-9378-3.
- [189] Musson DG, Birk KL, Kitchen CJ, Zhang J, Hsieh JYK, Fang W, et al. Assay methodology for the quantitation of unbound ertapenem, a new carbapenem antibiotic, in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;783:1–9.
- [190] Liebchen U, Kratzer A, Wicha SG, Kees F, Kloft C, Kees MG. Unbound fraction of ertapenem in intensive care unit patients. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:3108–11. doi:10.1093/jac/dku226.
- [191] Eyler RF, Vilay AM, Nader AM, Heung M, Pleva M, Sowinski KM, et al. Pharmacokinetics of ertapenem in critically ill patients receiving continuous venovenous hemodialysis or hemodiafiltration. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:1320–6. doi:10.1128/AAC.02090-12.
- [192] Schmidt S, Röck K, Sahre M, Burkhardt O, Brunner M, Lobmeyer MT, et al. Effect of protein binding on the pharmacological activity of highly bound antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:3994–4000. doi:10.1128/AAC.00427-08.
- [193] Sinnollareddy MG, Roberts MS, Lipman J, Roberts JA. β -Lactam pharmacokinetics and pharmacodynamics in critically ill patients and strategies for dose optimization: A structured review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012;39:489–96. doi:10.1111/j.1440-1681.2012.05715.x.
- [194] Udy AA, Varghese JM, Altukroni M, Briscoe S, McWhinney BC, Ungerer JP, et al. Subtherapeutic Initial β -Lactam Concentrations in Select Critically Ill Patients: Creatinine Clearance and β -Lactams Association Between Augmented Renal Clearance and Low Trough Drug Concentrations. *CHEST J* 2012;142:30–9. doi:10.1378/chest.11-1671.
- [195] Taccone FS, Laterre P-F, Dugernier T, Spapen H, Delattre I, Witebolle X, et al. Insufficient beta-lactam concentrations in the early phase of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Lond Engl* 2010;14:R126. doi:10.1186/cc9091.
- [196] Turnidge JD. The Pharmacodynamics of β -Lactams. *Clin Infect Dis* 1998;27:10–22. doi:10.1086/514622.
- [197] Roberts JA, Ulldemolins M, Roberts MS, McWhinney B, Ungerer J, Paterson DL, et al. Therapeutic drug monitoring of beta-lactams in critically ill patients: proof of concept. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36:332–9. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.06.008.
- [198] Sime FB, Roberts MS, Tiong IS, Gardner JH, Lehman S, Peake SL, et al. Can therapeutic drug monitoring optimize exposure to piperacillin in febrile neutropenic patients with haematological malignancies? A randomized controlled trial. *J Antimicrob Chemother* 2015:dkv123. doi:10.1093/jac/dkv123.
- [199] Sime FB, Roberts MS, Peake SL, Lipman J, Roberts JA. Does Beta-lactam Pharmacokinetic Variability in Critically Ill Patients Justify Therapeutic Drug Monitoring? A Systematic Review. *Ann Intensive Care* 2012;2:35. doi:10.1186/2110-5820-2-35.
- [200] Dulhunty JM, Roberts JA, Davis JS, Webb SAR, Bellomo R, Gomersall C, et al. Continuous infusion of beta-lactam antibiotics in severe sepsis: a multicenter double-blind, randomized controlled trial. *Clin Infect Dis* 2012. doi:10.1093/cid/cis856.
- [201] Rafati MR, Rouini MR, Mojtahedzadeh M, Najafi A, Tavakoli H, Gholami K, et al. Clinical efficacy of continuous infusion of piperacillin compared with intermittent dosing in septic critically ill patients. *Int J Antimicrob Agents* 2006;28:122–7. doi:10.1016/j.ijantimicag.2006.02.020.
- [202] Kratochwil NA, Huber W, Müller F, Kansy M, Gerber PR. Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach. *Biochem Pharmacol* 2002;64:1355–74.
- [203] Wong G, Briscoe S, Adnan S, McWhinney B, Ungerer J, Lipman J, et al. Protein Binding of Beta-Lactam Antibiotics in Critically Ill Patients: Can we successfully predict unbound concentrations? *Antimicrob Agents Chemother* 2013:AAC.00951–13. doi:10.1128/AAC.00951-13.

- [204] Schleibinger M, Steinbach CL, Töpper C, Kratzer A, Liebchen U, Kees F, et al. Protein binding characteristics and pharmacokinetics of ceftriaxone in ICU patients. *Br J Clin Pharmacol* 2015. doi:10.1111/bcp.12636.
- [205] Heinemeyer G, Link J, Weber W, Meschede V, Roots I. Clearance of ceftriaxone in critical care patients with acute renal failure. *Intensive Care Med* 1990;16:448–53.
- [206] Matzke GR, Frye RF, Joy MS, Palevsky PM. Determinants of ceftriaxone clearance by continuous venovenous hemofiltration and hemodialysis. *Pharmacotherapy* 2000;20:635–43.
- [207] Roberts JA, Pea F, Lipman J. The Clinical Relevance of Plasma Protein Binding Changes. *Clin Pharmacokinet* 2012;52:1–8. doi:10.1007/s40262-012-0018-5.
- [208] Tillement JP, Lhoste F, Giudicelli JF. Diseases and drug protein binding. *Clin Pharmacokinet* 1978;3:144–54.
- [209] Hotchkiss JR, Palevsky PM. Care of the critically ill patient with advanced chronic kidney disease or end-stage renal disease. *Curr Opin Crit Care* 2012;18:599–606. doi:10.1097/MCC.0b013e32835a1c59.
- [210] Zamacona MK, Suárez E, Aguilera L, Rodríguez-Sasiáin JM, Aguirre C, Calvo R. Serum protein binding of propofol in critically ill patients. *Acta Anaesthesiol Scand* 1997;41:1267–72. doi:10.1111/j.1399-6576.1997.tb04643.x.
- [211] Saari TI, Fechner J, Ihmsen H, Schüttler J, Jeleazcov C. Analysis of total and unbound hydromorphone in human plasma by ultrafiltration and LC–MS/MS: Application to clinical trial in patients undergoing open heart surgery. *J Pharm Biomed Anal* 2012;71:63–70. doi:10.1016/j.jpba.2012.07.025.
- [212] Wolf GK, McClain CD, Zurakowski D, Dodson B, McManus ML. Total phenytoin concentrations do not accurately predict free phenytoin concentrations in critically ill children*: *Pediatr Crit Care Med* 2006;7:434–9. doi:10.1097/01.PCC.0000235252.43921.DE.
- [213] Lodise Jr. TP, Nau R, Kinzig M, Jones RN, Drusano GL, Sörgel F. Comparison of the probability of target attainment between ceftriaxone and cefepime in the cerebrospinal fluid and serum against *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;58:445–52. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2007.03.015.
- [214] Craig WA. The pharmacology of meropenem, a new carbapenem antibiotic. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 1997;24 Suppl 2:S266–75.
- [215] Thallinger C, Buerger C, Plock N, Kljucar S, Wuenscher S, Sauermann R, et al. Effect of severity of sepsis on tissue concentrations of linezolid. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:173–6. doi:10.1093/jac/dkm431.
- [216] Yagi T, Naito T, Doi M, Nagura O, Yamada T, Maekawa M, et al. Plasma exposure of free linezolid and its ratio to minimum inhibitory concentration varies in critically ill patients. *Int J Antimicrob Agents* 2013;42:329–34. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.06.015.
- [217] Richards GA, Brink AJ. Therapeutic drug monitoring: linezolid too? *Crit Care* 2014;18. doi:10.1186/s13054-014-0525-x.
- [218] Dryden MS. Linezolid pharmacokinetics and pharmacodynamics in clinical treatment. *J Antimicrob Chemother* 2011;66 Suppl 4:iv7–15. doi:10.1093/jac/dkr072.
- [219] Diekema DJ, Jones RN. Oxazolidinone antibiotics. *The Lancet* 2001;358:1975–82. doi:10.1016/S0140-6736(01)06964-1.
- [220] Posterausstellung beim ADKA-Kongress in Hamburg : Abstracts der Poster und Kurzvorträge beim 39. Wissenschaftlichen Kongress der ADKA vom 15. bis 18. Mai 2014. *Krankenhauspharmazie* 2014;5:175–209.
- [221] Kratzer A, Murschauser A, Schleibinger M, Liebchen U, Kees M, Rothe U, et al. In vitro investigations on the atypical protein binding behaviour of tigecycline using ultrafiltration. ESCMID: Online Lecture Library (Poster 1137 ECCMID Copenhagen). https://www.escmid.org/escmid_library/online_lecture_library/?search=1¤t_page=1&search_term=Kratzer&entrytype%5B%5D=17 (Zugriff am 06.11.2015).
- [222] Schleibinger S, Kees M, Kratzer A, Liebchen U, Kees F, Häberle H. Multiple-dose pharmacokinetics of tigecycline during continuous renal replacement therapy. ESCMID: Online Lecture Library (Poster 1136 ECCMID 2015 Copenhagen).

https://www.escmid.org/escmid_library/online_lecture_library/?search=1¤t_page=1&search_term=Kratzer&entrytype%5B%5D=17 (Zugriff am 06.11.2015).

[223] Kurzvorträge der 4. LAUD-Forschungstagung. Krankenhauspharmazie 2015;5:252–62.

8 Anhang

8.1 Publikationen

Ergebnisse dieser Arbeit fanden Eingang in folgende Publikationen:

- **Kratzer A**, Liebchen U, Schleibinger M, Kees MG, Kees F. Determination of free vancomycin, ceftriaxone, cefazolin and ertapenem in plasma by ultrafiltration: Impact of experimental conditions. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2014;961:97–102.
- Liebchen U, **Kratzer A**, Wicha SG, Kees F, Kloft C, Kees MG. Unbound fraction of ertapenem in intensive care unit patients. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:3108–11.
- Schleibinger M, Steinbach CL, Töpper C, **Kratzer A**, Liebchen U, Kees F, Salzberger B, Kees MG. Protein binding characteristics and pharmacokinetics of ceftriaxone in ICU patients. *Br J Clin Pharmacol* 2015;80:525-33.

8.2 Posterbeiträge

- **Kratzer AL**, Rothe U, Lang S, Salzberger B, Liebchen U, Kees F, Kees MG. Qualitätssicherung der Antibiotikatherapie im Intensivbereich durch Spiegelbestimmung von Betalaktam-Antibiotika. 15.05.2014-18.05.2014. Posterbeitrag 73. ADKA-Kongress 2014 (Hamburg) [220]
- Liebchen U, **Kratzer A**, Wicha S, Kees F, Kees M. Protein binding of ertapenem in plasma from healthy volunteers and from ICU patients. 10.05.2014-13.05.2014. Posterbeitrag 1741. ECCMID 2014 (Barcelona) [138]
- **Alexander Kratzer**, Christoph Töpfer, Catherine Steinbach, Michael Schleibinger, Uwe Liebchen, Ulrich Rothe, Frieder Kees, Bernd Salzberger, Martin Kees. Totale und freie Plasmakonzentrationen von Linezolid bei Intensivpatienten unter Routinebedingungen. 30.03.2015-31.03.2015. Posterbeitrag. P-E-G Bad-Honnef-Symposium 2015 (Königswinter)
- **Kratzer A**, Murschauser A, Schleibinger M, Liebchen U, Kees M, Rothe U, Kees F. In vitro investigations on the atypical protein binding behaviour of tigecycline using ultrafiltration. 25.04.2015-28.04.2015. Posterbeitrag 1137. ECCMID 2015 (Kopenhagen) [221]
- Schleibinger S, Kees M, **Kratzer A**, Liebchen U, Kees F, Häberle H. Multiple-dose pharmacokinetics of tigecycline during continuous renal replacement therapy. 25.04.2015-28.04.2015. Posterbeitrag 1136. ECCMID 2015 (Kopenhagen) [222]

8.3 Vorträge

- **Kratzer Alexander.** Qualitätssicherung der Antibiotikadosierung im Intensivbereich durch Spiegelbestimmung von Betalaktam-Antibiotika. LAUD-Doktorandentagung 2014 (Mainz) [223]

8.4 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2013 bis Dezember 2015 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Frieder Kees. Ihm gilt mein aufrichtiger Dank für die Überlassung des interessanten Themas und die intensive Betreuung der Arbeit. Ich danke ihm für sein Engagement, für seine wissenschaftlichen Anregungen, die fördernde Kritik und auch für die harmonische Zusammenarbeit. Ich hoffe auf eine weitere Kooperation und Kontaktpflege.

Herrn Prof. Dr. Jörg Heilmann danke ich herzlich für die hilfreichen Diskussionen während der wissenschaftlichen Arbeiten und bei der Anfertigung der Dissertation sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Dr. Martin Kees und Herrn Prof. Dr. Bernd Salzberger möchte ich mich für die Überlassung von klinischen Proben, die wissenschaftliche Zusammenarbeit sowie die Diskussions- und Hilfsbereitschaft in verschiedenen Phasen meiner Promotion bedanken.

Für seine Bereitschaft, mir neben meiner beruflichen Tätigkeit die Durchführung dieses Promotionsprojektes zu ermöglichen und dieses zu fördern, gilt Herrn Rothe mein aufrichtiger Dank.

Ich danke auch meinen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises für die konstruktive Zusammenarbeit in freundschaftlicher Atmosphäre. Mein besonderer Dank gilt hier Uwe Liebchen, Michael Schleibinger, Julia Thoma, Franziska Limmer und Stefanie Wolferstetter.

Für ihre tatkräftige Unterstützung in allen Fragen des Laboralltags danke ich den technischen Assistentinnen Astrid Seefeld und Gertraud Willberg herzlich.

Bei Herrn Prof. Dr. Jens Schlossman möchte ich mich für die freundliche Aufnahme an seinem Lehrstuhl sowie die Überlassung von Büro- und Laborraum bedanken. Herr Prof. Schlossmann hat sich dankenswerter Weise auch dazu bereit erklärt, als Mitglied des Prüfungsausschusses zu fungieren.

Herrn Prof. Dr. Sigurd Elz möchte ich für seine Bereitschaft danken, den Vorsitz des Prüfungsausschusses zu übernehmen.

Herrn Dr. Sebastian Wicha (Lehrstuhl für Klinische Pharmazie; Freie Universität Berlin) danke ich für die Durchführung pharmakokinetischer Berechnungen.

Nicht zuletzt danke ich herzlichst meiner Familie, allen voran meiner Frau, für die Unterstützung und Geduld während der Entstehung dieser Arbeit.