

Entwicklung einer universellen Ultrafiltrationsmethode für die
Bestimmung der freien Fraktionen von Antibiotika mittels
HPLC-UV und ein Beitrag zur Ionenpaarchromatographie



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN
(DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT CHEMIE UND PHARMAZIE

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Constantin Lier

aus Nürnberg

im Jahr 2025

Promotionsgesuch eingereicht am: 24.09.2025

Die Arbeit wurde angeleitet von: Herr PD Dr. rer. nat. habil. med. Christoph Dorn

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Herr Prof. Dr. rer. nat. Achim Göpferich

1. Erstgutachter: Herr PD Dr. rer. nat. Christoph Dorn

2. Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Steffen Pockes

3. Prüfer: Herr Prof. Dr. rer. nat. Jens Schloßmann

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Freie Konzentrationen von Antibiotika in Serum	1
1.1.1	Plasmaproteinbindung von Arzneistoffen	1
1.1.2	Methoden zur Bestimmung der Proteinbindung	2
1.1.3	Veränderung der Pharmakokinetik von Antibiotika bei kritisch Kranken	4
1.1.4	Individualisierte Dosierung	5
1.1.5	Untersuchte Substanzen	8
1.2	Neue Kombination: Zavicefta® – Ceftazidim und Avibactam.....	10
1.3	Zielsetzung.....	11
2	Materialien und Methoden	12
2.1	Geräte.....	12
2.1.1	Allgemeine Laborausstattung	12
2.1.2	Chromatographisches Trennsystem	13
2.2	Verbrauchsmaterialien.....	15
2.3	Arzneistoffe und Chemikalien	16
2.3.1	Arzneistoffe	16
2.3.2	Chemikalien.....	19
2.4	Lösungen und Reagenzien.....	20
2.4.1	Puffer und Lösungen	20
2.4.2	Stammlösungen der Arzneistoffe	20
2.4.3	Standards, Kontrollen und Arbeitslösungen	21
2.4.4	Matrix.....	22
2.5	Probenvorbereitung des Serums	23
2.5.1	Bestimmung der freien Konzentration und Berechnung der freien Fraktion...23	
2.5.2	Adaption der Methode zur Bewertung der Einflussparameter	24
2.6	Charakterisierung der Ultrafiltrationsmethode	25
2.6.1	Probenstabilität	25
2.6.2	Eignung der Ultrafilter	25
2.7	Ceftazidim/Avibactam – Methode.....	28
2.7.1	Probenvorbereitung zur Bestimmung der totalen Konzentrationen von Ceftazidim und Avibactam	28
2.7.2	Serumstandards und Qualitätskontrollproben	28
2.7.3	Validierung	30
2.8	Software – Chromatographische und statistische Auswertung	31

3	Ergebnisse.....	32
3.1	Einfluss der experimentellen Bedingungen der Ultrafiltration auf die freie Fraktion von Antibiotika	32
3.1.1	HPLC-Trennsystem.....	32
3.1.2	Probenstabilität	42
3.1.3	Unspezifische Bindung an der Ultrafiltrationseinheit	43
3.1.4	Integrität der Ultrafiltermembran	44
3.1.5	Bestimmung der freien Konzentrationen der Substanzen und anschließende Berechnung der freien Fraktion	45
3.1.6	Abhängigkeit der freien Fraktion von der Temperatur	47
3.1.7	Abhängigkeit der freien Fraktion von der Zentrifugalkraft.....	50
3.1.8	Abhängigkeit der freien Fraktion vom Puffer	53
3.1.9	Einfluss der Auswahl des Puffers.....	58
3.2	Isokratische HPLC-Methode zur simultanen Bestimmung von Ceftazidim und Avibactam	63
3.2.1	Chromatographie und Methodenetablierung	63
3.2.2	Methodenvalidierung	67
3.2.3	Stabilität von Ceftazidim und Avibactam.....	69
3.2.4	Analyse von Ceftazidim und Avibactam in Patientenplasma.....	71
4	Diskussion.....	73
4.1	Chromatographische Trennung	73
4.1.1	HPLC-Trennsystem.....	73
4.1.2	Probenstabilität	77
4.1.3	Applikation der Ceftazidim-Avibactam-Methode	78
4.2	Bestimmung der freien Fraktionen von Antibiotika mittels Ultrafiltration	80
4.2.1	Unspezifische Bindung und Membranintegrität	80
4.2.2	Abhängigkeit der freien Fraktion von der Temperatur	82
4.2.3	Abhängigkeit der freien Fraktion von der Zentrifugalkraft.....	84
4.2.4	Abhängigkeit der freien Fraktion vom Puffer	85
5	Limitationen	91
6	Zusammenfassung	93
7	Literaturverzeichnis	94
8	Anhang.....	105
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	105
8.2	Publikationen im Rahmen der Dissertation	107
8.3	Danksagung	108
8.4	Eidesstattliche Erklärung	109

Abkürzungsverzeichnis

$\times g$	x-fache der Erdbeschleunigung
AAG	Alpha-1-saures Glykoprotein
al.	andere
AS-Stabilität	Autosampler-Stabilität
AUC	Fläche unter der Konzentrationszeitkurve (engl.: <i>area under the curve</i>)
BEH	<i>Bridged Ethyl Hybrid</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca^{2+}	Calcium-Ion
C_{frei}	freie Konzentration
Ch.-B.	Chargenbezeichnung
C_{TBA}	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat-Konzentration
C_{total}	totale Konzentration
CV	Variationskoeffizient
CV_{inter}	Variationskoeffizient der Inter-Assay-Präzision
CV_{intra}	Variationskoeffizient der Intra-Assay-Präzision
DAD	<i>Diode Array Detector</i>
Det.	Detektionswellenlänge
Diff.	Differenz
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E_m	<i>Emission Wavelength</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
entspr.	entsprechend
ED	Equilibriumdialyse
Ex	<i>Excitation Wavelength</i>
f_{AUC}	Fläche unter der Konzentrationszeitkurve bezogen auf die freie Konzentration
f_b	gebundene Fraktion
f_{Cmax}	freie Spitzenspiegelkonzentration
FI	Fachinformation

$f_T/\%T$	Zeitspanne, in der die freie Konzentration die MHK überschreitet
f_u	freie Fraktion
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSA	Humanes Serumalbumin
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
IFCC	<i>International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine</i>
Inc.	<i>Incorporated</i>
k	Retentionsfaktor ($t_R - t_0$)/ t_0
Konz.	Konzentration
KPP	Kaliumphosphatpuffer
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography-Tandem Mass Sepctrometry</i>
LEP	<i>Late Eluting Peaks</i>
LLOD	Nachweisgrenze (engl.: <i>Lower Limit of Detection</i>)
LLOQ	Bestimmungsgrenze (engl.: <i>Lower Limit of Quantitation</i>)
LLOQ _{10σ}	<i>Lower Limit of Quantitation</i> berechnet mit der 10-Sigma-Methode
M	Molare Masse
MHK	minimale Hemmkonzentration
MW	arithmetischer Mittelwert
MWCO	Molekulargewichtsausschlussgrenze (engl.: <i>Molecular Weight Cut-Off</i>)
n	Anzahl
N/A	nicht verfügbar (engl.: <i>not available</i>)
NA	nicht anwendbar (engl.: <i>not applicable</i>)
Na	Natrium
0,9 % NaCl-Lsg.	0,9 %ige Kochsalzlösung
NaPP	Natriumphosphatpuffer
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
ND	nicht durchgeführt
NSB	unspezifische Bindung (engl.: <i>non-sepcific binding</i>)

PK/PD	Pharmakokinetischer/Pharmakodynamischer Zusammenhang
PPB	Plasmaproteinbindung
Proteinkonz.	Proteinkonzentration
PVB	Probenvorbereitung
QK(s)	Qualitätskontrollprobe(n)
res.	resultierende
RET	Retentat
RIL	Ringerlösung
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>Rounds per Minute</i>)
RT	Retentionszeit (engl.: <i>Retention time</i>)
S	Steigung der Kalibriergeraden
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis
SD	Standardabweichung
Stammlsg.	Stammlösung
STD	Kalibrierungsstandard
Subst.	Substanz
TBA	Tetrabutylammonium
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring
UF	Ultrafiltrat
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
VV_A	Vorverdünnung A
VV_B	Vorverdünnung B
WHO	<i>World Health Organization</i>
λ	Wellenlänge
ρ	Dichte

1 Einleitung

1.1 Freie Konzentrationen von Antibiotika in Serum

1.1.1 Plasmaproteinbindung von Arzneistoffen

Viele Arzneistoffe liegen im Blut nicht ausschließlich in freier Form vor, sondern sind teilweise an Plasmaproteine gebunden. Bei der Plasmaproteinbindung handelt es sich um einen reversiblen Prozess, bei dem proteingebundener und freier Arzneistoff im Gleichgewicht stehen. Da nur der freie Anteil pharmakologisch wirksam ist, kommt der Kenntnis über das Ausmaß der Plasmaproteinbindung entscheidende Bedeutung zu (Kunin et al. 1973; Merrikin, Briant und Rolinson 1983); zum einen für die klinische Praxis und zum anderen auch für die frühe Phase der Entwicklung neuer Substanzen, da Bioverfügbarkeit, Distribution und Clearance maßgeblich durch die Proteinbindung beeinflusst sein können (Bteich 2019). Zur Bestimmung der Proteinbindung wird die freie Fraktion (der ungebundene Anteil, f_u) ermittelt, also das Verhältnis der Konzentration des freien Arzneistoffs (c_{frei}) zur Gesamtkonzentration (c_{total}).

In Serum binden Arzneistoffe vorwiegend an Albumin und Alpha-1-saures Glykoprotein (AAG). Albumin ist mengenmäßig das häufigste Plasmaprotein und ist für die Regulation des kolloidosmotischen Druckes sowie für Bindung und Transport körpereigener Substanzen wie z.B. Hormone, Bilirubin und Gallen-, Fett- und Aminosäuren sowie körperfremder Substanzen wie z.B. Arzneistoffe oder Toxine verantwortlich. Humanes Serumalbumin (HSA) ist aus einer Polypeptidkette mit 585 Aminosäuren aufgebaut, nicht glykosyliert und hat ein Molekulargewicht von etwa 66,5 kDa. Als Sekundärstruktur besitzt es drei alpha-helikale Domänen (I-III), die jeweils in Subdomänen (A und B) unterteilt sind. Mitverantwortlich für die Tertiärstruktur des Proteins sind die 35 Cysteinreste, die bis auf Cystein34 an der Bildung von Disulfidbrücken beteiligt sind. HSA bindet vorwiegend saure und neutrale Substanzen (Yamasaki et al. 2013). Die Bindung erfolgt meist an ein oder zwei spezifischen Bindungsstellen des Proteins, die erstmals von Sudlow et al. (1975) beschrieben wurden und deren exakte Lokalisation heute durch röntgenkristallographische Methoden bekannt ist. Differenziert wird zwischen der Sudlow-I-Bindestelle und der Sudlow-II-Bindestelle, die in Domäne II und III lokalisiert sind (Yamasaki et al. 2013). Bekannt ist zudem, dass Metallionen wie z.B. Calcium-Ionen an Serumproteine, vorwiegend Albumin, binden (Payne et al. 1973).

AAG macht im Vergleich zu Albumin nur einen geringen Anteil (ca. 3 %) des Gesamtplasmaproteins aus, nimmt aber eine Bedeutung bei der Bindung von Steroiden, Katecholaminen sowie basischen Arzneistoffen ein. Die physiologischen Konzentrationen bei gesunden Erwachsenen liegen zwischen 0,06-0,12 g/dL und können bei verschiedenen Krankheitszuständen stark variieren, da es sich um ein Akute-Phase-Protein handelt. Das Molekulargewicht von AAG liegt zwischen 38,8 und 48 kDa (Kaliszan, Nasal und Turowski 1995; Israili und Dayton 2001; Bteich 2019).

1.1.2 Methoden zur Bestimmung der Proteinbindung

Als „Goldstandard-Methode“ für die Bestimmung der freien Fraktion im Rahmen von Plasmaproteinbindungsstudien und bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe hat sich die Equilibriumdialyse etabliert (Zhang et al. 2012; Buscher et al. 2014). Bei dieser Methode kommen Dialysezellen zum Einsatz, die durch eine semipermeable Membran in zwei Kompartimente unterteilt sind. Ein Kompartiment enthält einen Puffer, üblicherweise Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4, das andere die zu analysierende Plasma- oder Serumprobe. Freier Arzneistoff kann die Membran passieren und diffundiert in das Pufferkompartiment, bis sich ein Gleichgewicht zwischen Puffer- und Probenkompartiment eingestellt hat (Abbildung 1) (Zhang et al. 2012).

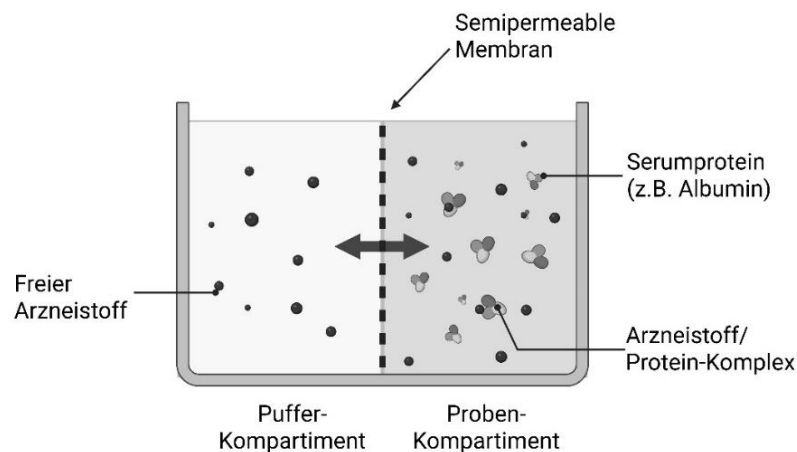


Abbildung 1: Prinzip der Equilibriumdialyse

Durch Bestimmung der Konzentrationen im Puffer- und Probenkompartiment kann die freie Fraktion ermittelt werden (Musteata 2017). Um die freie Arzneistoffkonzentration zu bestimmen, ist zusätzlich eine Messung der Gesamtkonzentration außerhalb der Dialysezelle

vonnöten, die mit der ermittelten freien Fraktion multipliziert wird. Dies ist erforderlich, da bei der Equilibriumdialyse eine Umverteilung der freien Arzneistoffmoleküle stattfindet und somit im Gleichgewicht eine geringere totale Konzentration auf der Plasmaseite gemessen wird. Eine weitere Einschränkung für den Einsatz der Equilibriumdialyse in der klinischen Praxis ist, dass für die Gleichgewichtseinstellung ein erheblicher Zeitaufwand erforderlich ist. Zudem können durch osmotische Effekte Flüssigkeitsverschiebungen eintreten, die zu einer Verdünnung der ursprünglichen Probe führen. Diese Verdünnungen müssen berücksichtigt werden und erschweren insbesondere bei Substanzen, die ein konzentrationsabhängiges Plasmaproteinbindungsverhalten zeigen, die korrekte Bestimmung der freien Fraktion (Wright, Boudinot und Ujhelyi 1996; Beer, Wagner und Zeitlinger 2009). Auch wenn die Equilibriumdialyse häufig als Referenzverfahren für die Bestimmung der Plasmaproteinbindung angeführt wird, ist die Methode für die Bestimmung der freien Konzentrationen in der klinischen Routine nicht zweckmäßig.

Das Verfahren der Wahl für den klinischen Routinebetrieb ist die Ultrafiltration. Bei der Ultrafiltration handelt es sich um ein Membranfiltrationsverfahren. Eine Ultrafiltrationseinheit besteht aus einem Probenreservoir und einem Auffanggefäß, die durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt sind (Abbildung 2).

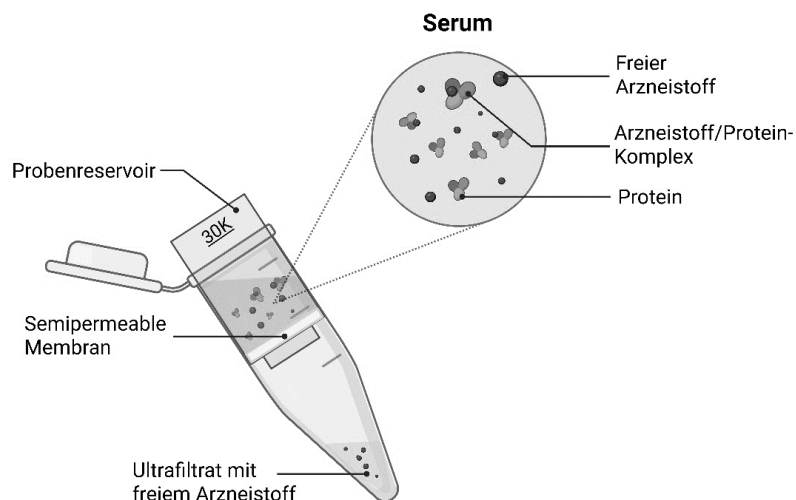


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Ultrafiltrationseinheit

Das Serum wird in das Probenreservoir gegeben. Durch anschließende Zentrifugation wird mithilfe einer Größenausschlussmembran proteinfreies Ultrafiltrat gewonnen. Die freie Konzentration wird im Ultrafiltrat bestimmt.

Durch diese Membran können nur kleinere Moleküle – vorgegeben durch die Größe der Poren – passieren. Moleküle, die den *Molecular Weight Cut-Off* (MWCO, beispielsweise 30 kDa) der Membran überschreiten, verbleiben im Probenreservoir. So kann eine Separation zwischen hochmolekularen Plasmaproteinen, Plasmaprotein/Arzneistoff-Komplexen und niedermolekularen Verbindungen, wie Plasmawasser und freiem Arzneistoff erzielt werden (Wright, Boudinot und Ujhelyi 1996; Beer, Wagner und Zeitlinger 2009). Im Gegensatz zur Equilibriumdialyse können hier die freien Konzentrationen direkt und in kurzer Zeit gemessen werden. Jedoch existiert für die Bestimmung der freien Konzentrationen mittels Ultrafiltration bis dato noch kein Standardprotokoll.

1.1.3 Veränderung der Pharmakokinetik von Antibiotika bei kritisch Kranken

Die antiinfektive Therapie hat in der intensivmedizinischen Versorgung einen hohen Stellenwert. Laut *World Health Organization* (WHO) ist die Behandlung der Sepsis und deren schwerster Verlaufsform – des septischen Schocks – eine der größten Herausforderungen und damit ein „Schlüsselproblem für die globale Gesundheit“ (WHO 2017). Bei einer Sepsis schädigt der Wirt seine eigenen Organe und Gewebe in Folge einer überschießenden Reaktion des Immunsystems auf eine Infektion. Der septische Schock ist eine spezielle Form der Sepsis, bei der tiefgreifende Kreislauf-, Zell- und Stoffwechselanomalien auftreten, die mit einer erhöhten Sterblichkeit verbunden sind (Singer et al. 2016). Schätzungsweise wurden 48,9 Millionen Fälle einer Sepsis und elf Millionen Sepsis bedingte Todesfälle 2017 erfasst (Rudd et al. 2020). Nach internationalen Leitlinien verbessert eine frühzeitige Diagnosestellung und adäquate Behandlung in den ersten Stunden das Therapieergebnis (Evans et al. 2021). Dabei ist für die bakterielle Sepsis das Wechselspiel zwischen Erreger, Antibiotikum und Wirt zu berücksichtigen. Um dem gerecht zu werden, muss primär das richtige Antibiotikum, unter Berücksichtigung der lokalen Resistenzlage, ausgewählt werden (Plata-Menchaca et al. 2022). Weiterhin ist zu beachten, dass die Pharmakokinetik („Was macht der Organismus mit dem Arzneistoff?“) von Antibiotika durch eine Sepsis erheblich beeinflusst sein kann.

Viele Substanzen sind von den pathophysiologischen Veränderungen, die bei einer Sepsis auftreten, beeinflusst (Blot, Pea und Lipman 2014). Beispielsweise kann ein vergrößertes Verteilungsvolumen in Folge einer Vasodilatation und dem sogenannten *capillary leak syndrome*, welches durch eine erhöhte Permeabilität von Gefäßen gekennzeichnet ist,

auftreten (Hosein, Udy und Lipman 2011). Sowohl die Vasodilatation als auch der Verlust an intravaskulärem Volumen haben zur Folge, dass häufig eine intravenöse Volumensubstitution erfolgen muss, aus der für hydrophile Substanzen ein vergrößertes Verteilungsvolumen resultiert. Neben dem Verteilungsvolumen ist auch die renale Clearance beeinflusst. Möglich ist dabei sowohl eine gesteigerte renale Clearance, die eine verstärkte Exkretion bedingt als auch eine Abnahme der glomerulären Filtrationsrate in Folge einer Niereninsuffizienz. Eine weitere Erschwernis für die Vorhersage von Plasmaspiegeln kommt hinzu, wenn Patienten der extrakorporalen Membranoxygenierung oder Nierenersatzverfahren unterliegen (Hoff et al. 2020). Ferner können Dysfunktionen der Leber zu einem veränderten Metabolismus und damit u.a. zu einer Akkumulation von Antibiotika führen (Blot, Pea und Lipman 2014). Lebererkrankungen können zudem zu einer verminderten Albuminsynthese und damit durch eine Hypoalbuminämie zu einer Änderung des proteingebundenen Anteils führen (Levitt und Levitt 2016).

Alle diese Veränderungen, die Einfluss auf die Pharmakokinetik nehmen, sind nicht nur auf septische Patienten beschränkt, sondern können im Allgemeinen bei kritisch kranken Patienten auftreten. Infolgedessen inadäquat ausgewählte Dosierungen manifestieren sich in Unter- oder Überdosierungen der Antibiotika und damit in einem ausbleibenden Therapieerfolg oder in einer Intoxikation.

1.1.4 Individualisierte Dosierung

Besonders kritisch kranke Patienten profitieren von einer individuell abgestimmten Dosierung. So konnten Sanz-Codina et al. (2023) in einer Metaanalyse aufzeigen, dass durch eine individualisierte Antibiotikatherapie das Erreichen von Therapiezielen verbessert und ein Therapieversagen sowie Nephrotoxizität signifikant reduziert wurden. Zusätzlich zeigte sich eine verringerte Mortalität sowie ein verbesserter klinischer und mikrobiologischer Therapieerfolg. Im Idealfall sollte demnach ein personalisierter Ansatz verfolgt werden, bei dem durch Bestimmung der Substanzen in Plasma oder Serum Empfehlungen für die Dosierung erfolgen. Dieses Konzept wird als Therapeutisches Drug Monitoring (TDM) bezeichnet. Während in der Vergangenheit das primäre Ziel eines Therapeutischen Drug Monitorings die Vermeidung toxischer Effekte war, beispielsweise durch Aminoglykoside oder

Vancomycin verursachte Nephrotoxizität, rückt heute zusätzlich der klinische Therapieerfolg in den Fokus (Fratoni, Nicolau und Kuti 2021).

Um Beziehungen zwischen der Dosis, der Konzentration und der Effektivität eines Antibiotikums herzustellen, werden Antibiotika in der Regel anhand von pharmakokinetischen/pharmakodynamischen-Indizes (PK/PD-Zielparameter) evaluiert. Diese PK/PD-Zielparameter basieren alle auf dem Vergleich der Plasmakonzentrationen mit der minimalen Hemmkonzentration (MHK). Unterschieden wird zwischen konzentrationsabhängig wirkenden Substanzen (z.B. Aminoglykoside und Fluorchinolone), Substanzen die zeitabhängig wirken (z.B. Betalactame) und Antibiotika, deren Wirksamkeit mithilfe der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (*area under the curve*, AUC) charakterisiert wird (z.B. Vancomycin) (Abbildung 3) (Nielsen, Cars und Friberg 2011).

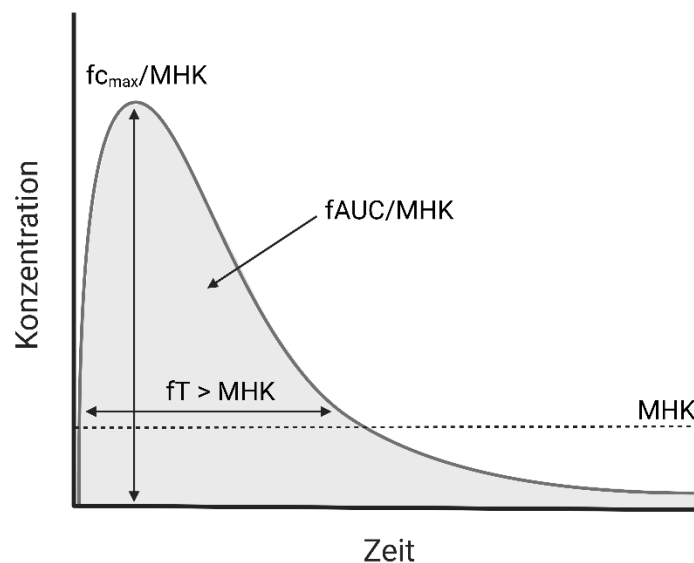


Abbildung 3: PK/PD-Zielparameter

fc_{max}: freie Spitzenspiegelkonzentration, *fAUC*: Fläche unter der Konzentrationszeitkurve bezogen auf die freie Konzentration (*area under the curve*), *fT*: Zeitspanne, in der die freie Konzentration die MHK überschreitet, MHK: Minimale Hemmkonzentration

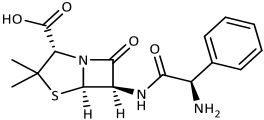
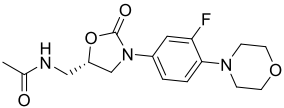
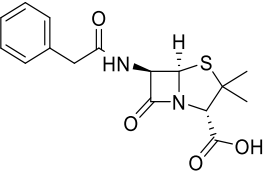
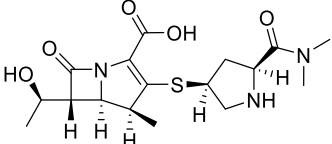
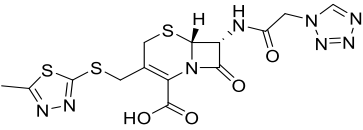
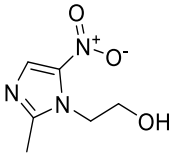
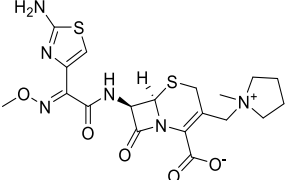
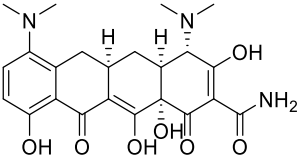
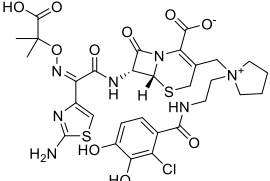
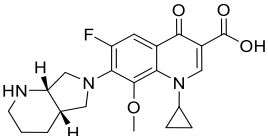
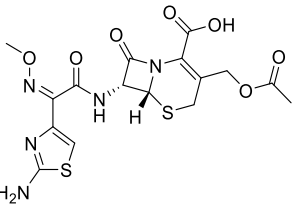
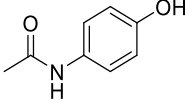
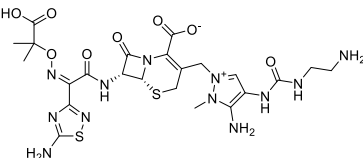
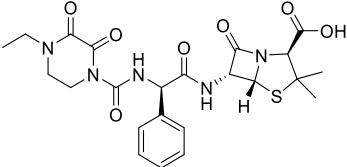
Der pharmakodynamische Parameter, die MHK, wird *in vitro* in eiweißfreiem Medium, meist Müller-Hinton-Agar, bestimmt (Åhman, Matuschek und Kahlmeter 2022). Ein möglicher Schwachpunkt dieses Ansatzes liegt in der Tatsache, dass *in vivo* die Arzneistoffe an Proteine gebunden sind, aber nur der freie, nicht proteingebundene Arzneistoff antimikrobiell aktiv ist.

Dementsprechend besteht ein enger Zusammenhang zwischen der freien Konzentration des Arzneistoffes und der pharmakologischen Aktivität von Antibiotika (Kunin et al. 1973). Demnach sollten alle PK/PD-Indizes als Funktion der freien Konzentration ausgedrückt werden (Craig 2003; Mouton et al. 2005; EMA 2016). Eine Möglichkeit zur Bestimmung der freien Konzentrationen besteht darin, die totalen Konzentrationen zu bestimmen und mit dem Grad der Proteinbindung zu multiplizieren, welcher der Fachinformation entnommen werden kann. Die Vorhersagekraft solcher Proteinbindungsdaten ist für kritisch Kranke nur bedingt geeignet und birgt die Gefahr falscher Schlussfolgerungen (Wong et al. 2013; Schleibinger et al. 2015; Wallenburg et al. 2022). Daher sollte auch die Proteinbindung idealerweise auf individueller Basis bestimmt werden.

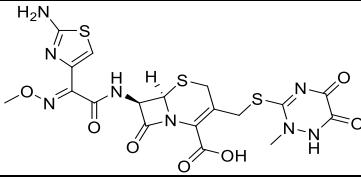
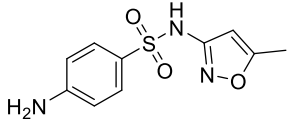
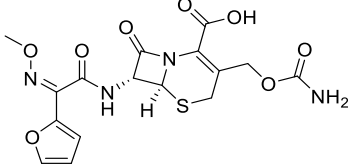
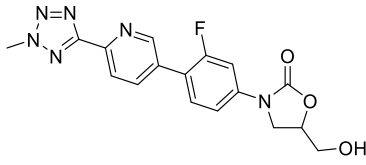
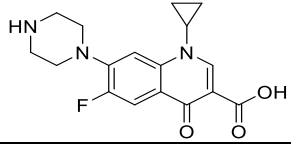
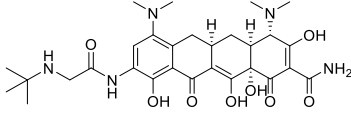
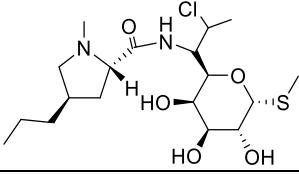
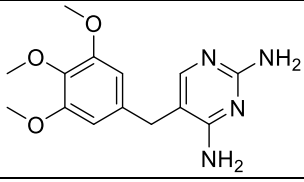
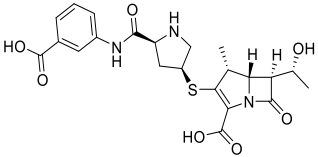
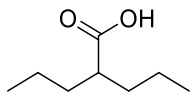
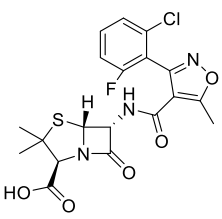
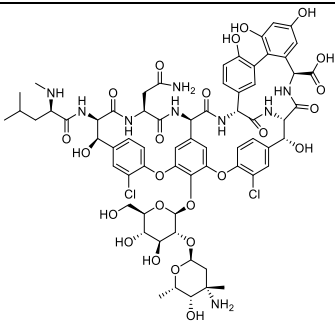
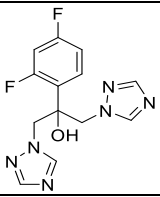
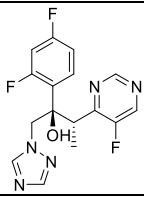
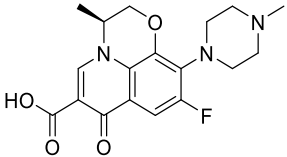
1.1.5 Untersuchte Substanzen

In Tabelle 1 sind alle analysierten Substanzen, die zugehörigen PK/PD-Zielparameter und deren chemische Strukturen aufgelistet. Es wurden 28 Antiinfektiva, vorwiegend Antibiotika sowie Valproinsäure und Paracetamol vermessen.

Tabelle 1: Untersuchte Substanzen, deren chemische Struktur, Plasmaproteinbindung (PPB) [%] und pharmakokinetisch/pharmakodynamische (PK/PD) Zielparameter. %T: Zeitdauer, c_{max} : Maximalkonzentration in Serum, AUC: Fläche unter der Konzentrationskurve, MHK: Minimale Hemmkonzentration

Substanz PPB [%]* PK/PD-Ziel*	Struktur	Substanz PPB [%]* PK/PD-Ziel*	Struktur
Ampicillin 17-20 % %T > MHK		Linezolid ca. 31 % %T > MHK	
Benzylpenicillin 45-65 % %T > MHK		Meropenem 2 % %T > MHK	
Cefazolin 85-90 % %T > MHK		Metronidazol < 20 % c_{max} /MHK	
Cefepim 16 % %T > MHK		Minocyclin 70-75 % AUC/MHK	
Cefiderocol 40-60 % %T > MHK		Moxifloxacin 40-42 % AUC _{24h} /MHK	
Cefotaxim 25-40 % %T > MHK		Paracetamol gering N/A	
Ceftolozan 16-21 % %T > MHK		Piperacillin 16-21 % %T > MHK	

Einleitung

<p>Ceftriaxon 85-95 % %T > MHK</p>		<p>Sulfamethoxazol ca. 65 % %T > MHK</p>	
<p>Cefuroxim 33-50 % %T > MHK</p>		<p>Tedizolid 70-90 % AUC/MHK</p>	
<p>Ciprofloxacin 20-30 % C_{max}/MHK</p>		<p>Tigecyclin 71-89 % AUC/MHK</p>	
<p>Clindamycin 40-94 % %T > MHK</p>		<p>Trimethoprim 40 % %T > MHK</p>	
<p>Ertapenem 92-95 % %T > MHK</p>		<p>Valproinsäure 90-95 % N/A</p>	
<p>Flucloxacillin 95 % %T > MHK</p>		<p>Vancomycin 30-55 % AUC/MHK</p>	
<p>Fluconazol 11-12 % AUC/MHK</p>		<p>Voriconazol ca. 58 % N/A</p>	
<p>Levofloxacin 30-40 % C_{max}/MHK AUC/MHK</p>			

*PPB und PK/PD-Ziele aus der jeweils aktuellen Fassung der Fachinformation (<https://www.fachinfo.de>)

1.2 Neue Kombination: Zavicefta® – Ceftazidim und Avibactam

Der zweite Teil dieser Arbeit widmet sich der HPLC-Analytik von Ceftazidim und Avibactam. Ceftazidim ist ein semisynthetisches Cephalosporin der dritten Generation, das in den 1980er Jahren mit einem breiten Wirkungsspektrum gegen grampositive und gramnegative Erreger, einschließlich *Pseudomonas aeruginosa*, in die klinische Praxis eingeführt wurde. Die Wirksamkeit von Cephalosporinen der dritten Generation wird jedoch zunehmend durch die wachsende Vielfalt an Beta-Laktamasen in gramnegativen Bakterien beeinträchtigt. Avibactam ist ein potenter sowie reversibler Inhibitor vieler Beta-Laktamasen und schützt deren Substrat Ceftazidim vor der Hydrolyse durch gramnegative Erreger (Grayson et al. 2017). Die Fixkombination von Ceftazidim und Avibactam (Zavicefta®) wurde 2016 in Europa zugelassen und ist zur Behandlung komplizierter intraabdomineller Infektionen, komplizierter Harnwegsinfektionen, nosokomialer Pneumonien und bei Infektionen mit aeroben gramnegativen Keimen indiziert (Sy et al. 2019). Abbildung 4 zeigt die Strukturen von Ceftazidim und Avibactam.

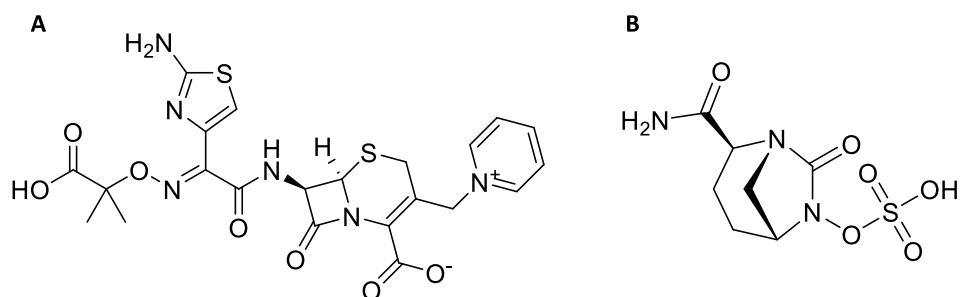


Abbildung 4: Strukturen von Ceftazidim und Avibactam

Strukturen von **A** Ceftazidim (pK_s (2-Carboxygruppe) = 1,9; pK_s (Aminothiazol) = 4,1; pK_s (2-Hydroxy-2-methylpropionsäure) = 2,7) und **B** Avibactam (pK_s = - 2).

1.3 Zielsetzung

I. Einfluss der experimentellen Bedingungen der Ultrafiltration auf die freien Konzentrationen von Antibiotika

Ziel dieser Arbeit war es, basierend auf früheren Untersuchungen mit einzelnen Antibiotika, eine universelle und routinefähige Ultrafiltrationsmethode für die Bestimmung der freien Konzentration von Antibiotika in Serum zu entwickeln. Dafür wurde untersucht, welchen Einfluss die experimentellen Bedingungen der Ultrafiltration auf das Ergebnis der freien Konzentration haben.

Die Trennung sollte mithilfe isokratischer HPLC-UV-Methoden erfolgen, die eine simultane Bestimmung mehrerer Substanzen erlauben.

II. Entwicklung und Validierung einer isokratischen HPLC-Methode zur simultanen Bestimmung von Ceftazidim und Avibactam in Serum oder Ultrafiltrat

2 Materialien und Methoden

2.1 Geräte

2.1.1 Allgemeine Laborausstattung

Tabelle 2: Geräteliste

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Flaschenaufsatz-Dispenser	Brand-Dispensette (0,1-0,5 mL, 1-5 mL, 10-50 mL)	Brand, 97877 Wertheim
Heizblock	Labnet ACCUBLOCK D1200	Labnet International, Inc., 08837 Edison, USA
Magnetrührer	Heidolph MR 3000	Heidolph, 91126 Schwabach
Mikrotiterplatten	Tecan Sunrise Remote	Tecan Austria, 5082 Grödig
Photometer		
pH-Meter	pH 526 pH 7110 pH 720	Wissenschaftliche Technische Werkstätten, 82362 Weilheim
Pipetten	Eppendorf-Multipette plus	Eppendorf, 22339 Hamburg
	Finnpipette T41640 4500 (2-10 µL, 5-50 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL)	Thermo Fisher Scientific, 38116 Braunschweig
	Finnpipette F1 Einkanalpipettierer mit variablem Volumen (2-20 µL, 5-50 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)	Thermo Fisher Scientific, 38116 Braunschweig
	Finnpipette T98243 4500 (1-5 mL)	Thermo Fisher Scientific, 38116 Braunschweig
	peqSTEPPER mech. Hand dispenser	Peqlab Biotechnologie GmbH, 91052 Erlangen
Schüttler	Heidolph REAX 1 R (Vortex-Typ)	Heidolph, 91126 Schwabach
	Heidolph REAX 2 Mischer (Überkopfschüttler)	Heidolph, 91126 Schwabach
	Heidolph Titramax 101 (Mikrotiterschüttler)	Heidolph, 91126 Schwabach
	IKA Vortex Genius 3	IKA-Werke GmbH & CO. KG, 79219 Staufen
Ultraschallbad	BRANSONIC M5800-E	Branson Ultrasonics, 06810 Danbury, USA
Waagen	Sartorius BP 211D, 80/210 g, d = 0,01/0,1 mg	Sartorius AG, 37075 Göttingen
	Sartorius 1712, 30/160 g, d = 0,01/0,1 mg	Sartorius AG, 37075 Göttingen

	Sartorius Extended, 3200 g, d=0,01 g	Sartorius AG, 37075 Göttingen
Wasseraufbereitungsanlage	Arium basic	Sartorius Stedim, 37075 Göttingen
Zentrifugen	Centrifuge & Vortex, CM- 70M	neoLab Migge Laborbedarf- Vertrieb GmbH, 69123 Heidelberg
	Eppendorf 5417 R, Festwinkelrotor F45-30-11	Eppendorf, 22339 Hamburg
	Heraeus Multifuge 1L-R mit Windkesselrotor 75002005	Kendro Laboratory Products, 37520 Osterode
	Hettich Mikro 220, Trommelrotor 1161	Hettich, 78532 Tuttlingen

2.1.2 Chromatographisches Trennsystem

Die Trennung der Substanzen erfolgte an *reversed phase* Kieselgel mit Phosphatpuffer/Acetonitril-Mischungen als mobiler Phase. Die Flussrate betrug 0,4 mL/min bei Säulen mit einem Innendurchmesser von 3 mm und 0,8 mL/min bei einer Säule mit 4 mm Innendurchmesser.

2.1.2.1 Aufbau der HPLC-Apparatur

Die Bestimmung der Substanzen erfolgte an zwei modular aufgebauten Shimadzu HPLC-Anlagen der LC-20 Serie (Tabelle 3).

Tabelle 3: Module der HPLC-Anlagen

Modul	System A	System B
Entgaser	DGU-20A ₃	DGU-20A ₃
Hochdruckpumpe	LC-20AD _{XR}	2 × LC20AT
Injektionssystem	Autosampler: SIL-20AC _{HAT} (6 °C)	Autosampler: SIL-20AC _{HAT} (6 °C)
Säulenofen	CTO-20AC (40 °C)	CTO-10AS _{VP} (40 °C)
Detektor	Photodioden-Array-Detektor: SPD-M30A	Photodioden-Array-Detektor: SPD-M30A
	Fluoreszenzdetektor: RF-20A	
Steuergerät	CBM-20A	CBM-20A

2.1.2.2 HPLC-Säulen

Die verwendeten HPLC-Säulen sind in Tabelle 4 aufgeführt. Vorrangig wurde die Cortecs T3 verwendet. Zum Schutz der analytischen Säulen vor Kontaminationen wurde eine Vorsäule vorgeschaltet: Nucleoshell RP18 2,7 μ 4 \times 3 mm (Vorsäulenhalter *Column protection system*, Macherey-Nagel, Düren).

Tabelle 4: HPLC-Säulen

Säulenbezeichnung	Dimensionen	Partikelgröße/ Porengröße	Hersteller
Cortecs T3	100 \times 3 mm	2,7 μ m/120 Å	Waters, Eschborn
NUCLEODUR C18 HTec	125 \times 4 mm	3 μ m/110 Å	Macherey-Nagel, Düren
NUCLEOSHELL RP 18	100 \times 3 mm	2,7 μ m/90 Å	Macherey-Nagel, Düren
XBridge BEH C18	100 \times 3 mm	2,5 μ m/130 Å	Waters, Eschborn

2.1.2.3 Mobile Phase

Als mobile Phase wurde 0,1 M oder 20 mM Natriumphosphatpuffer in Mischung mit Acetonitril mit pH-Werten von 2,5 bis 7,0 verwendet. Der Anteil an Acetonitril wurde mit Hilfe des Gradientenmischers aus (A) Natriumphosphatpuffer/Acetonitril 97:3 (v/v) und (B) Natriumphosphatpuffer/Acetonitril 60:40 (v/v) eingestellt.

Die Puffer mit dem beabsichtigten pH-Wert wurden, gegebenenfalls nach Verdünnung, aus den folgenden Einzellösungen gemischt:

(1) 0,1 M H₃PO₄: 6,8 mL H₃PO₄, (\geq 85 %, *M* 98,00 g/mol, ρ = 1,69 g/mL) in 1 L Wasser lösen.

(2) 0,1 M NaH₂PO₄: 13,8 g NaH₂PO₄ \times H₂O (*M* 137,99 g/mol) in 1 L Wasser lösen.

(3) 0,1 M Na₂HPO₄: 35,8 g Na₂HPO₄ \times 12 H₂O (*M* 358,14 g/mol) in 1 L Wasser lösen.

Anschließend wurde Acetonitril hinzugefügt und der endgültige pH-Wert mit 10 M NaOH oder 37 %iger Salzsäure eingestellt, da der gemessene pH-Wert in der Puffer-Acetonitril-Mischung vom pH-Wert in rein wässriger Puffer-Lösung abwich.

Für einige Substanzen wurde die Abhängigkeit des Retentionsfaktors vom pH-Wert genauer analysiert. Für diese Untersuchung wurde der pH-Wert aus einem sauren Eluenten (A) und einem Eluenten mit basischem pH-Wert (B) gemischt. Dabei wurde der Anteil von B in Stufen erhöht und die jeweilige Probe wiederholt injiziert, bis zwei aufeinander folgende

Chromatogramme identische Retentionszeiten aufwiesen. Durch dieses Vorgehen konnte sichergestellt werden, dass sich ein stabiles und reproduzierbares System eingestellt hat.

Die Retentionszeiten, pH-Werte des Eluenten und der Anteil an Acetonitril, der sich aus der Mischung von Eluent A und B ergab, sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Verbrauchsmaterial

Artikel	Hersteller
1,5 mL Short Thread Vial 32 × 11,6 mm (clear), wide opening	BGB Analytik Vertrieb GmbH, 79618 Rheinfelden
250 µL Conical Glass Insert (total volume 340 µL), 31 × 6 mm	BGB Analytik Vertrieb GmbH, 79618 Rheinfelden
Centrifree YM-30K Ultrafiltrationseinheit	Millipore, 65824 Schwalbach/Ts
Combitips plus (verschiedene Größen)	Eppendorf AG, 22331 Hamburg
Mikrotiterplatte 96 Well	Sarstedt, 51588 Nümbrecht
ND9 Short Thread Screw Caps (transparent, green, yellow, red, black, blue) with Septa Natural Rubber/TEF	BGB Analytik Vertrieb GmbH, 79618 Rheinfelden
Pipettenspitzen (10 µL, 200 µL, 1000 µL)	Sarstedt, 51588 Nümbrecht
Präzisions Dispenser (1,25 mL, 2,5 mL)	Brand, 97877 Wertheim
Reagiergefäße mit anhängendem Deckel (1,5 mL, 2,2 mL)	Sarstedt, 51588 Nümbrecht
Röhre 4 mL, 75 × 12 mm, Rundboden und zugehörige Stopfen (Polypropylen Röhrchen)	Kabe Labortechnik GmbH, 51588 Nümbrecht
Röhre 12 mL, 95 × 16 mm, Spitzboden und zugehörige Stopfen	Kabe Labortechnik GmbH, 51588 Nümbrecht
Safety-Multifly 21 G 200 mm lang	Sarstedt, 51588 Nümbrecht
Schraubröhre, 15 mL, 120 × 17 mm, 50 mL, 114 × 28 mm	Sarstedt, 51588 Nümbrecht
S-Monovette 7,5 Z	Sarstedt, 51588 Nümbrecht
Vivafree 500, 30,000 MWCO Hydrosart Ultrafilter	Vivaproducts Inc., 01460 Littleton MA, USA

2.3 Arzneistoffe und Chemikalien

2.3.1 Arzneistoffe

Tabelle 6: Liste der untersuchten Substanzen

Substanz (M [g/mol])	Abk.	Art und Herkunft
Ampicillin (M 349,41)	AMP	Ampicillin/Sulbactam Astro 3 g (Astro-Pharma GmbH, 1200 Wien, AUT), eine Durchstechflasche mit enthält 2,132 g Ampicillin-Natrium (entspr. 2 g Ampicillin) und 1,099 g Sulbactam-Natrium (entspr. 1 g Sulbactam) (Natriumgehalt pro Flasche: 10 mmol, entspr. 230 mg) Pulver zur Herstellung einer Injektions- oder Infusionslösung
Avibactam (M 265,24)	AVI	Avibactam-Natrium (TargetMol, 36 Washington Street, Wellesley Hills, 02481 MA, USA)
Benzylpenicillin (M 334,39)	PEN	Penicillin G-Natrium Sandoz 10 Mega IE (Hexal AG, 83607 Holzkirchen), eine Durchstechflasche enthält 10.000.000 IE (entspr. ca. 6 g) Benzylpenicillin als Natrium-Salz (entspr. 16,84 mmol oder 386 mg Natrium) als Pulver zur Herstellung einer Injektions-/Infusionslösung
Cefazolin (M 454,51)	CFZ	Cefazolin Hikma 2 g (Hikma Pharma GmbH, 82152 Martinsried), enthält 2,096 g Cefazolin (entspr. 2 g Cefazolin) Pulver zur Herstellung einer Injektions- oder Infusionslösung
Cefepim (M 480,56)	FEP	Cefepim Rotexmedica 2 g Pulver zur Herstellung einer Injektions- bzw. Infusionslösung (Panmedica, 92100 Boulogne-Billancourt, FRA), eine Durchstechflasche enthält 2,0 g Cefepim als Cefepimdihydrochlorid-Monohydrat, sonstige Bestandteile: Arginin
Cefiderocol (M 752,21)	CFC	Fetroja 1 g (Shionogi Europe B.V., 1017 CA Amsterdam, NLD), eine Durchstechflasche enthält Cefiderocolhemisulfat (entspr. 1 g Cefiderocol) und 7,64 mmol Natrium (etwa 176 mg) als Pulver für ein Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung
Cefotaxim (M 455,47)	CTX	Cefotaxim-Natriumsalz (Hoechst AG, 65926 Frankfurt am Main), Analysenstandard
Ceftazidim (M 546,58)	CAZ	Ceftazidim Eberth 2 g (Dr. Friedrich Eberth Arzneimittel GmbH, 92289 Ursensollen), eine Durchstechflasche mit 2,606 g Pulver enthält 2,328 g Ceftazidim \times 5 H ₂ O, (entspr. 2,0 g Ceftazidim), sonstige Bestandteile: Natriumcarbonat
Ceftolozan (M 666,69)	CLZ	Zerbaxa 1 g/0,5 g (MSD Sharp and Dohme, 85530 Haar), eine Durchstechflasche enthält Ceftolozansulfat (entspr. 1 g Ceftolozan) und Tazobactam-Natrium (entspr. 0,5 g Tazobactam), sonstige Bestandteile: Natriumchlorid, Arginin und Citronensäure

Ceftriaxon (M 554,58)	CRO	Ceftriaxon Kabi 2 g (Fresenius Kabi, 61346 Bad Homburg), eine Durchstechflasche enthält Ceftriaxon-Natrium (entspr. 2 g Ceftriaxon), Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung, keine sonstigen Bestandteile
Cefuroxim (M 424,39)	CXM	Cefuroxim Hikma 1,5 g (Hikma Pharma GmbH, 82152 Martinsried), eine Durchstechflasche enthält 1,578 g Cefuroxim-Natrium (entspr. 1,5 g Cefuroxim), keine sonstigen Bestandteile
Ciprofloxacin (M 331,34)	CIP	Ciprofloxacin Hikma 2 mg/mL (Hikma Pharma GmbH, 82152 Martinsried), 1 mL Infusionslösung enthält: Ciprofloxacinlactat (entspr. 2 mg Ciprofloxacin), jeder Beutel enthält 400 mg Ciprofloxacin, sonstige Bestandteile: Milchsäure, Natriumchlorid, Salzsäure und Wasser für Injektionszwecke
Clindamycin (M 424,98)	CLI	Clindamycin-HCl (Fagron, 22885 Barsbüttel), Reinheit 96,8 %
Ertapenem (M 475,52)	ETP	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. 1,0 g Ertapenem freie Säure), sonstige Bestandteile: Natriumhydrogencarbonat, Natriumhydroxid zur pH-Einstellung auf 7,5
Flucloxacillin (M 453,87)	FXN	Staphylex Injektion 1 g Trockensubstanz (Actavis Deutschland GmbH & Co. KG, 81829 München), eine Injektionsflasche enthält 1,088 g Flucloxacillin-Natrium \times 1 H ₂ O (entspr. 1 g Flucloxacillin), keine sonstigen Bestandteile
Fluconazol (M 306,27)	FLC	Fluconazol B. Braun 2 mg/mL (B. Braun Melsungen AG, 34209 Melsungen), 1 mL enthält 2 mg Fluconazol, keine sonstigen Bestandteile
Levofloxacin (M 361,37)	LVX	Levofloxacin Kabi 5 mg/mL (Fresenius Kabi, 61352 Bad Homburg), 1 mL Infusionslösung enthält 5 mg Levofloxacin (als Levofloxacin-Hemihydrat)
Linezolid (M 337,35)	LZD	Zyvoxid 2 mg/mL-Infusionslösung (Pfizer, 10785 Berlin), 1 mL Infusionslösung enthält 2 mg Linezolid, sonstige Bestandteile: Glucosemonohydrat, Natriumcitratdihydrat, wasserfreie Zitronensäure, Salzsäure, Natriumhydroxid, Wasser für Injektionszwecke
Meropenem (M 383,46)	MEM	Meropenem Eberth 1 g Meropenem \times 3 H ₂ O (Dr. Friedrich Eberth Arzneimittel GmbH, 92289 Ursensollen), eine Durchstechflasche enthält 1,348 g Pulver (entspr. 1,141 mg MEM-Trihydrat, entspr. 1,0 g Meropenem), sonstige Bestandteile: 208 mg Na ₂ CO ₃
Metronidazol (M 171,15)	MTZ	Metronidazol Kabi 0,5 %-Infusionslösung (Fresenius Kabi, 61352 Bad Homburg), 1 mL Infusionslösung enthält 5 mg Metronidazol, sonstige Bestandteile: Citronensäure-Monohydrat, Natriummonohydrogenphosphat-Dodecahydrat, Natriumchlorid, Wasser für Injektionszwecke

Materialien und Methoden

Minocyclin (M 457,48)	MIN	Minocyclin-HCl (Fa. Lederle, 82515 Wolfratshausen), Aktivität 85,4 %, 11,8 mg Substanz entspr. 10,0 mg Minocyclin
Moxifloxacin (M 401,34)	MXF	Moxifloxacin Kabi 400 mg Infusionslösung (Fresenius Kabi, 61352 Bad Homburg), jeder mL enthält 1,6 mg Moxifloxacin als Moxifloxacinhydrochlorid, sonstige Bestandteile: Natriumsulfat und Wasser für Injektionszwecke
Paracetamol (M 151,16)	PCM	Paracetamol Kabi 10 mg/mL Infusionslösung (Fresenius Kabi, 61352 Bad Homburg), 1 mL enthält 10 mg Paracetamol, sonstige Bestandteile: Cystein, Mannitol, Wasser für Injektionszwecke
Piperacillin (M 517,56)	PIP	Piperacillin/Tazobactam 2 g (Fresenius Kabi, 61346 Bad Homburg), eine Injektionsflasche Trockensubstanz enthält 2,085 g Piperacillin-Natrium (entspr. 2,00 g Piperacillin), keine sonstigen Bestandteile
Sulfamethoxazol (M 253,28)	SMX	Cotrim-ratiopharm Ampullen SF 480 mg/5 mL (Ratiopharm GmbH, 89079 Ulm), Cotrimoxazol (entspr. 400 mg Sulfamethoxazol und 80 mg Trimethoprim)
Tedizolid (M 370,34)	TZD	Tedizolid (Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, 85386 Eching), Reinheit 97 %, Analysenstandard
Tigecyclin (M 585,65)	TGC	Tygacil 50 mg (Pfizer, 10785 Berlin), eine Ampulle enthält 50 mg Tigecyclin Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung, sonstige Bestandteile: Lactose-Monohydrat, Salzsäure, Natriumhydroxid (zur pH-Einstellung)
Trimethoprim (M 290,32)	TMP	Cotrim-ratiopharm Ampullen SF 480 mg/5 mL (Ratiopharm GmbH, 89079 Ulm), Cotrimoxazol entspr. 400 mg Sulfamethoxazol und 80 mg Trimethoprim
Valproinsäure (M 144,21)	VPA	Orfiril 100 mg/mL Injektionslösung (Desitin Arzneimittel GmbH, 22335 Hamburg), 1 mL Injektionslösung enthält 100 mg Natriumvalproat (entspr. 86,76 mg Valproinsäure)
Vancomycin (M 1449,25)	VAN	Vancomycin-HCl CP (Hikma Pharma GmbH, 82152 Martinsried)
Voriconazol (M 349,32)	VRC	Voriconazol freie Base (Pfizer, 07977 Peapack, NJ USA), Analysenstandard

2.3.2 Chemikalien

Tabelle 7: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Herkunft
Acetonitril LiChrosolv	Merck, 64293 Darmstadt
Albumin, Bovine Fraction V Powder, Fatty acid free; low endotoxin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89552 Steinheim
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories, Life Science Group, 94547 Hercules, CA USA
Dichlormethan zur Analyse	Fisher Scientific GmbH, 58239 Schwerte
Dimethylsulfoxid	Merck, 64293 Darmstadt
Di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat zur Analyse	Merck, 64293 Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat zur Analyse	Merck, 64293 Darmstadt
HEPES $\geq 99,5$ % (titration)	Roth Carl GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
L(+)-Ascorbinsäure zur Analyse	Merck, 64293 Darmstadt
Methanol LiChrosolv	Merck, 64293 Darmstadt
Natriumchlorid $\geq 99,5$ % zur Analyse (NaCl)	Roth Carl GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat zur Analyse	Merck, 64293 Darmstadt
Natriumhydroxid zur Analyse in Plätzchen	Roth Carl GmbH & Co. KG, 76185 Karlsruhe
Natronlauge 1 N zur Analyse	Merck, 64293 Darmstadt
Ortho-Phosphorsäure 85 % zur Analyse	Merck, 64293 Darmstadt
Salzsäure 37 % (HCl)	Fisher Scientific GmbH, 58239 Schwerte
Tetra-n-butylammoniumhydrogensulfat zur Synthese	Merck, 64293 Darmstadt
Titriplex III (Na ₂ -EDTA) zur Analyse	Merck, 64293 Darmstadt

2.4 Lösungen und Reagenzien

2.4.1 Puffer und Lösungen

3 M Kaliumphosphatpuffer: 6,85 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ (M 228,23 g/mol) ad 9 mL mit Wasser (15 mL skaliertes Röhrchen) auffüllen, lösen, mit HCl_{konz} auf pH 7,4 titrieren und mit Wasser auf 10 mL auffüllen.

2 M HEPES: 4,77 g HEPES (M 238,31 g/mol) in ca. 8 mL Wasser lösen, mit 10 M NaOH auf pH 7,5 titrieren und mit Wasser auf 10 mL auffüllen.

50 mM NaH_2PO_4 , pH 6,0: 1,38 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ in 100 mL Wasser lösen, mit 10 M NaOH auf pH 6,0 titrieren.

10 mM NaH_2PO_4 , pH 6,0: 50 mM NaH_2PO_4 , pH 6,0, 1:5 mit Wasser verdünnen.

Bovines Serumalbumin (BSA) 2 g/L: 0,2 g BSA mit Wasser auf 100 mL auffüllen und lösen.

2.4.2 Stammlösungen der Arzneistoffe

Die Stammlösungen wurden durch jeweilige Einwaage der Analysesubstanzen in einen Messkolben und anschließendem Lösen in einem geeigneten Lösungsmittel hergestellt. Alle verwendeten Lösungsmittel, Einwaagen und Konzentrationen der Stammlösungen sind in Tabelle 8 aufgeführt. Für die Substanzen Fluconazol, Linezolid, Metronidazol, Paracetamol, Sulfamethoxazol/Trimethoprim und Valproinsäure wurden die bereits als Lösung vorliegenden Handelspräparate direkt als Stammlösung verwendet.

Tabelle 8: Stammlösungen

Substanz	Einwaage [mg]	Lösungsmittel	Konz. [mg/L]
Ampicillin/ Sulbactam	201,9	10 mM Na-Phosphatpuffer pH 6 ad 25 mL	5000/ 2500
Avibactam	50,0	10 mM Na-Phosphatpuffer pH 6 ad 25 mL	2000
Benzylpenicillin	133,5	10 mM Na-Phosphatpuffer pH 6 ad 25 mL	5000
Cefazolin	250,0	H_2O ad 50 mL	5000
Cefepim	233,4	H_2O ad 25 mL	5000
Cefiderocol	359,3	H_2O ad 25 mL	5000
Cefotaxim	131,0	10 mM Na-Phosphatpuffer pH 6 ad 25 mL	5000
Ceftazidim	162,9	10 mM Na-Phosphatpuffer pH 6 ad 25 mL	5000
Ceftolozan	140,2	10 mM Na-Phosphatpuffer pH 6 ad 10 mL	5000
Ceftriaxon	271,0	10 mM Na-Phosphatpuffer pH 6 ad 50 mL	5000
Cefuroxim	250,0	H_2O ad 50 mL	5000

Ciprofloxacin	118,5	0,01 N HCl ad 50 mL	2000
Clindamycin	560,9	H ₂ O ad 100 mL	2000
Ertapenem	26,2	10 mM Na-Phosphatpuffer pH 6 ad 5 mL	5000
Flucloxacillin	108,8	H ₂ O ad 20 mL	5000
Fluconazol	-	lag bereits gelöst vor	2000
Levofloxacin	102,5	0,01 N HCl ad 50 mL	2000
Linezolid	-	lag bereits gelöst vor	2000
Meropenem	53,9	10 mM Na-Phosphatpuffer pH 6 ad 20 mL	2000
Metronidazol	-	lag bereits gelöst vor	5000
Minocycline	11,7	0,9 % NaCl/0,1 % Ascorbinsäure ad 10 mL	1000
Paracetamol	-	lag bereits gelöst vor	10000
Piperacillin/ Tazobactam	147,3	10 mM Na-Phosphatpuffer pH 6 ad 25 mL	5000/ 625
Sulfamethoxazol/ Trimethoprim	-	lag bereits gelöst vor	80000/ 16000
Tedizolid	8,74	DMSO ad 4,3 mL	2000
Tigecyclin	29,1	0,9 % NaCl/0,1 % Ascorbinsäure ad 10 mL	1000
Valproinsäure	-	lag bereits gelöst vor	100000
Vancomycin	102,5	H ₂ O ad 50 mL	2000
Voriconazol	20,0	DMSO ad 10 mL	2000

2.4.3 Standards, Kontrollen und Arbeitslösungen

Für jeden Assay wurden die Stammlösungen der Substanzen mit 0,9 % NaCl-Lsg. verdünnt, um zwei Vorverdünnungen (VV_A und VV_B) zu erhalten. VV_B wurde dabei aus VV_A hergestellt: 200 µL VV_A + 800 µL 0,9 % NaCl-Lsg.. Sofern zwei oder drei Substanzen gleichzeitig analysiert wurden, wurde die erste Vorverdünnung entsprechend angepasst, also z.B. 30 µL Ciprofloxacin (CIP) 2000 mg/L + 30 µL Levofloxacin 2000 mg/L (LVX) + 30 µL Moxifloxacin (MXF) 2000 mg/L + 910 µL 0,9 % NaCl-Lsg. ergibt je 60 mg/L CIP/LVX/MXF. Bei Valproinsäure wurde VV_B direkt aus der Stammlösung hergestellt. Aus den Vorverdünnungen wurden die Standards (1:20 Verdünnung mit 0,9 % NaCl-Lsg.) und die Arbeitslösungen (1:20 Verdünnung mit Serum) hergestellt. Die Auswahl der beiden finalen Konzentrationen (hoch und niedrig) erfolgte in Orientierung an die zu erwartenden Plasmakonzentrationen des jeweiligen Arzneistoffes. Die Herstellung der Vorverdünnungen aus den jeweiligen Stammlösungen und die finalen Konzentrationen können Tabelle 9 entnommen werden.

Tabelle 9: Verdünnungsschemata für Standards und Arbeitslösungen

Substanz	Konz. Stammlsg. [mg/L]	Vol. Stammlsg. [µL]	Vol. 0,9 % NaCl [µL]	Res. Konz. VV_A [mg/L]	Res. Konz. VV_B [mg/L]	finale Konz. (hoch) [mg/L]	finale Konz. (niedrig) [mg/L]
AMP	5000	200	800	1000	200	50	10
CAZ	5000	200	800	1000	200	50	10
CFC	5000	200	800	1000	200	50	10
CFZ	5000	200	800	1000	200	50	10
CIP	2000	30	970	60	12	3	0,6
CLI	5000	40	960	200	40	10	2
CLZ	5000	200	800	1000	200	50	10
CRO	5000	200	800	1000	200	50	10
CTX	5000	200	800	1000	200	50	10
CXM	5000	200	800	1000	200	50	10
ETP	5000	200	800	1000	200	50	10
FEP	5000	200	800	1000	200	50	10
FLC	5000	200	800	1000	200	50	10
FXN	5000	200	800	1000	200	50	10
LVX	2000	30	970	60	12	3	0,6
LZD	2000	100	900	200	40	10	2
MEM	2000	500	500	1000	200	50	10
MIN	1000	20	980	20	4	1	0,2
MTZ	5000	80	920	400	80	20	4
MXF	2000	30	970	60	12	3	0,6
PCM	5000	200	800	1000	200	50	10
PEN	5000	200	800	1000	200	50	10
PIP	5000	200	800	1000	200	50	10
SMX/TMP	5000/1000	200	800	1000/200	200/40	50/10	10/2
TGC	1000	20	980	20	4	1	0,2
TMP	5000	200	800	1000	200	50	10
TZD	2000	25	975	50	10	2,5	0,5
VAN	2000	500	500	1000	200	50	10
VPA	5000	480	520	2400		120	
	5000	160	840		800		40
VRC	2000	50	950	100	20	5	1

2.4.4 Matrix

Als Matrix wurde Serum von gesunden Probanden verwendet, das aus venösem Blut mit Hilfe von Serum-Monovetten gewonnen wurde. Direkt nach der Blutabnahme und unmittelbar vor der Zentrifugation (10 min bei $3800 \times g$), wurde durch mehrmaliges Kippen der Monovetten gemischt. Danach wurde das überstehende Serum abdekantiert und in Aliquots von 6-8 mL

bei -70 °C bis zur Verwendung gelagert. Am jeweiligen Versuchstag wurde das Serum in Eiswasser aufgetaut, gemischt und zentrifugiert (10 min, 3800 × g), um evtl. nachgefälltes Fibrin abzutrennen.

2.5 Probenvorbereitung des Serums

2.5.1 Bestimmung der freien Konzentration und Berechnung der freien Fraktion

Die Probenvorbereitung erfolgte analog zu einem durch den Arbeitskreis entwickelten Protokoll (Kratzer et al. 2014). Dafür wurde Serum in Eiswasser aufgetaut, gemischt und anschließend zentrifugiert (3800 × g/4 °C/10 min, Heraeus Megafuge), um potenziell nachgefälltes Fibrin abzutrennen. Zur weiteren Probenvorbereitung des Serums wurden 10 µL 3 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) in den Vivafree-Ultrafiltereinsatz vorgelegt – nicht direkt auf die Membran pipettiert, sondern an den Rand des Ultrafilter-Einsatzes – und anschließend 300 µL Serum zupipettiert. Durch dreimaliges Aufsaugen und Ausstoßen mit der Pipette wurde gemischt. Ein Kontakt zwischen der Pipettenspitze und der Membran musste hierbei vermieden werden, um die Membran nicht zu beschädigen. Für die Temperierung auf 37 °C wurde die Ultrafiltrationseinheit in einer vortemperierten Eppendorf-Zentrifuge (5417R, mit Kühlfunktion) für 10 min bei 100 × g/37 °C inkubiert. Die eigentliche Zentrifugation und damit Gewinnung des Ultrafiltrates erfolgte im Anschluss bei 1000 × g/37 °C für 20 min. Das so erhaltene Ultrafiltrat wurde vollständig in *Vial Inserts* überführt und davon wurde 1 µL für die chromatographische Analyse injiziert.

Bei der Bestimmung des Einflusses der experimentellen Bedingungen auf die f_u wurde auf die Messung der totalen Konzentrationen verzichtet, da dotierte Serumproben verwendet wurden und damit Bezug zur nominalen Konzentration genommen wurde, um die f_u zu bestimmen. In den Ergebnissen wird die freie Fraktion angegeben. Der nachfolgenden Formel kann zusätzlich der Zusammenhang zwischen der freien Fraktion und der proteingebundenen Fraktion (der gebundene Anteil, f_b) entnommen werden:

$$f_b [\%] = (1 - f_u) \cdot 100 = \left(1 - \frac{c_{frei}}{c_{total}}\right) \cdot 100 = \left(1 - \frac{c_{frei}}{c_{nominal}}\right) \cdot 100$$

2.5.2 Adaption der Methode zur Bewertung der Einflussparameter

Die unter 2.5.1 beschriebene Methode wurde zur Untersuchung der Einflussgrößen – Temperatur, pH, Puffer und Zentrifugationskraft – entsprechend adaptiert und für die Analyse von dotierten Serumproben angewendet (Abbildung 5).

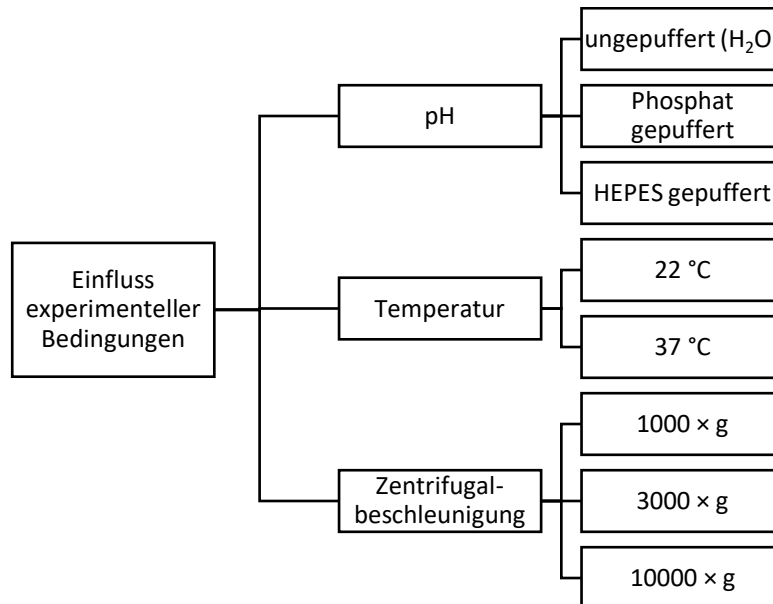


Abbildung 5: Untersuchte experimentelle Faktoren der Ultrafiltration

Da der pH-Wert des Serums bei der Lagerung und Probenvorbereitung anstieg, wurde nach dem Auftauen, Mischen und Zentrifugieren ein Teil des Serums abgetrennt und mit geringen Mengen an 1 M HCl versetzt, um „frisch abgenommenes“ Serum zu imitieren. Der pH wurde dabei auf 7,6-7,7 eingestellt und nicht auf den physiologischen pH von 7,35-7,45, da der pH-Shift bereits kurz nach Blutabnahme stattfindet und frisch hergestelltes Serum einen pH-Wert von ca. 7,6-7,7 aufweist (Fura et al. 2003; Kirschbaum 2003). In dem übrigen Serum wurde der pH mit 1 M NaOH auf pH 8,0-8,2 eingestellt, um „altes“, sprich länger gelagertes Serum zu imitieren. Zur Beurteilung des Einflusses des pH-Wertes und Puffers auf die freie Fraktion wurde die oben beschriebene Ultrafiltrationsmethode statt mit 10 µL Kaliumphosphatpuffer auch mit 10 µL HEPES-Puffer (pH 7,5 bei Raumtemperatur) oder mit 10 µL H₂O (entspricht ungepuffert) durchgeführt. Der pKs-Wert von HEPES-Puffer zeigt eine Temperaturabhängigkeit ($\Delta pK_s/^\circ C = -0,014$), die bei der Herstellung berücksichtigt wurde, um bei 37 °C den gewünschten pH zu erreichen (Good et al. 1966). Für die Messung des Serum-pH-Wertes nach der Ultrafiltration wurden zwei bis drei Retentate aus dem Reservoir (Ultrafiltereinsatz) vereinigt.

Um zu prüfen, welche Bedeutung die Temperatur bei der Ultrafiltration hat, wurde die Zentrifugation außerdem bei $1000 \times g/22\text{ °C}$ für 30 min durchgeführt. Die Temperatureinstellung erfolgte in der Kühlzentrifuge Eppendorf 5417 R, welche schon vor der Ultrafiltration entsprechend temperiert wurde. Damit die gleiche Menge an Ultrafiltrat gewonnen werden konnte, wie unter Anwendung der Referenzmethode, wurde die Zentrifugationszeit auf 30 min verlängert.

Des Weiteren wurde die Ultrafiltration nach einer Vorinkubation im Heizblock (1 h, 37 °C) vorgenommen. Die Zentrifugation im Anschluss erfolgte bei $1000 \times g/37\text{ °C}$, entweder unter Zusatz von Phosphatpuffer, der nach der Inkubation ergänzt wurde, oder ohne diesen.

Zusätzlich wurde die Methode auch unter Variation der relativen Zentrifugalbeschleunigung ausgeführt. D.h. nach 10 min Temperierung bei $100 \times g/37\text{ °C}$ wurde entweder mit $3000 \times g/37\text{ °C}$ für 10 min oder mit $10000 \times g/37\text{ °C}$ für 5 min zentrifugiert.

2.6 Charakterisierung der Ultrafiltrationsmethode

2.6.1 Probenstabilität

Zur Bewertung der Stabilität der prozessierten Proben wurden die Ultrafiltrate nach Injektion für 18-24 h im Autosampler bei 6 °C gelagert und dann erneut injiziert. Die Proben konnten als ausreichend stabil angesehen werden, wenn die Konzentration der Proben nicht unter 90 % der Ausgangskonzentration gesunken ist. Die Auswertung erfolgte über den Vergleich der Peakflächen.

2.6.2 Eignung der Ultrafilter

Das Material der Wahl waren Vivafree-Filter mit einer Vivafree Hydrosart Membran aus regenerierter Cellulose, einem Probenreservoir aus Polycarbonat sowie einem Auffangbehälter aus Polypropylen (Abbildung 6).

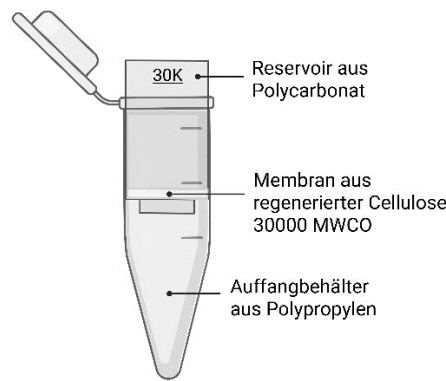


Abbildung 6: Schematische Darstellung und Materialien der Ultrafiltrationseinheit

MWCO: Molekulargewichtsausschlussgrenze, (engl. Molecular Weight Cut-Off), Angabe in Dalton

Im Hinblick auf seine Eignung für die Versuche wurde das Material getestet. Um das Ausmaß der unspezifischen Bindung (NSB = *nonspecific binding*) für die jeweiligen Substanzen zu bewerten, wurden 500 µL Substanz in Ringerlösung (RIL) bei 37 °C/1000 × g für 3-5 min ultrafiltriert und die Konzentration im Ultrafiltrat (UF) und in der Ringerlösung (RIL) bestimmt. Für jede Substanz erfolgte die Bestimmung der unspezifischen Adsorption bei zwei Konzentrationen (vgl. finale Konzentrationen; vgl. Tabelle 9) und je Konzentration in Mehrfachbestimmung ($n \geq 4$). Die unspezifische Bindung kann aus dem Verhältnis der Konzentration im Ultrafiltrat (c_{UF}) und der Konzentration in der dotierten Ringerlösung (c_{RIL}) nach der folgenden Gleichung berechnet werden:

$$NSB = \left(1 - \frac{c_{UF}}{c_{RIL}}\right) \cdot 100 \%$$

Für Tigecyclin, Minocyclin und Tedizolid erfolgte die Bestimmung zusätzlich im Probenreservoir (Retentat, ohne HCl (RIL)) sowie im Auffanggefäß (UF) nach der Zugabe von Salzsäure (100 µL; 0,1 M HCl) versetzt mit 2,5 mg/L Metronidazol (MTZ) (als interner Standard). Das Volumen des Filtrates wurde über die Verdünnung des internen Standards (MTZ) berechnet, um die Berechnung der Konzentration der Substanz über deren Verdünnungsfaktor zu ermöglichen (Dorn et al. 2018). Exemplarisch für Tigecyclin:

$$c_{TGC} = \frac{c_{TGC, \text{ im verdünnten UF}}}{\left(1 - \frac{c_{MTZ, \text{ im UF}}}{2,5 \text{ mg/L}}\right)}$$

Die Prüfung der Membran umfasste zusätzlich die Bestimmung des Proteingehaltes im Ultrafiltrat, um möglicherweise auftretende Defekte der Membran zu detektieren. Dafür erfolgte eine Proteinbestimmung mit dem Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Life Science Group, USA) nach der Bradford-Methode. Bei dieser Methode handelt es sich um eine kolorimetrische Methode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen, die auf einer Verschiebung des Coomassie-Absorptionsmaximums von 470 nm nach 595 nm, im Anschluss an die Komplexbildung mit Proteinen, beruht. Durch die Erstellung einer Kalibriergerade kann die Proteinkonzentration in unbekannten Proben aus deren Absorption bestimmt werden (Bradford 1976).

Die Bestimmung erfolgte in Mikrotiterplatten in Anlehnung an die Originalanleitung von Bio-Rad. Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurde Bovines Serumalbumin (BSA) als Standard verwendet. Die Standards wurden in Doppelbestimmung vermessen. Dafür wurde eine BSA-Stammlösung 2 g/L mit Wasser auf 50 mg/L vorverdünnt. Das Pipettierschema für die Bestimmung in Mikrotiterplatten ist in Tabelle 10 zu finden.

Tabelle 10: Pipettierschema für die Kalibrierung der Proteinbestimmung nach Bradford

Probe [µL]	20								
BSA 50 mg/L [µL]	0	10	20	40	80	120	160	200	
H ₂ O [µL]	200	190	180	160	120	80	40	0	180
Konz. [mg/L]	0,0	2,5	5,0	10,0	20,0	30,0	40,0	50,0	X

Nach Zugabe von 50 µL unverdünntem Bradford-Reagenz wurde die Platte mit dem Mikrotiterplattenschüttler (bei 750-900 rpm) gemischt. Im Anschluss erfolgte nach kurzer Inkubation innerhalb von 30 min die Messung bei 595 nm mit dem TECAN-Photometer. Eine Doppelbestimmung war aufgrund der geringen Menge an Probenmaterial nicht möglich.

2.7 Ceftazidim/Avibactam – Methode

2.7.1 Probenvorbereitung zur Bestimmung der totalen Konzentrationen von Ceftazidim und Avibactam

Die Probenvorbereitung erfolgte mit geringfügigen Änderungen nach einem veröffentlichten Protokoll (Kratzer et al. 2019). Dafür wurden 100 µL Serum in einem 1,5 mL Eppendorf-Cup vorgelegt und 200 µL 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,0 zupipettiert. Für die Enteiweißung wurden anschließend 500 µL Acetonitril zugegeben und mittels Vortexer gemischt. Nach 15 min Inkubation im Kühlschrank und erneutem Mischen wurden die ausgefällten Proteine durch Zentrifugation (12000 × g, Hettich Mikro 22) abgetrennt und der Überstand in 4 mL Polypropylen Röhrchen dekantiert, in die 1,3 mL Dichlormethan vorgelegt waren. Anschließend wurde 10 min im REAX 2 Überkopf-Schüttler gemischt und danach für 10 min bei 3800 × g zentrifugiert, um das Acetonitril in Dichlormethan zu extrahieren und eine Phasentrennung zu erzielen. Im Anschluss wurden 70 µL der oberen, wässrigen Phase in *Vial Inserts* abgefüllt und 1 µL in das HPLC-System injiziert.

2.7.2 Serumstandards und Qualitätskontrollproben

Die Kalibrierungsstandards (STD) wurden durch Dotierung von Serum mit Ceftazidim/Avibactam hergestellt, um sechs Konzentrationen von 300/150 bis 1/0,5 mg/L zu erhalten. Für Konzentrationen von 100/50 mg/L und darunter wurden die Stammlösungen mit Wasser vorverdünnt und anschließend 1:20 mit Serum verdünnt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Pipettierschema der Kalibrierungsstandards für die totalen Konzentrationen

Konz. [A] CAZ/AVI [mg/L]	Vol. [A] [µL]	Vol. H ₂ O [µL]	Konz. [B]CAZ/AVI [mg/L]	Vol. [B] [µL]	Vol. Serum [µL]	finale Konz. STD CAZ/AVI [mg/L]
			5000 (CAZ) 2000 (AVI)	60 75	865	300/150
5000 (CAZ) 2000 (AVI)	120 150	730	600/300	50	950	30/15
600/300	100	900	60/30	50	950	3/1,5
5000 (CAZ) 2000 (AVI)	200 250	50	2000/1000	50	950	100/50
2000/1000	100	900	200/100	50	950	10/5
200/100	100	900	20/10	50	950	1/0,5

Die Anfertigung der Serum-Qualitätskontrollproben (QKs) erfolgte in ähnlicher Weise mit Konzentrationen von 80/20, 20/5 oder 4/1 mg/L Ceftazidim/Avibactam für die Bestimmung der totalen Konzentrationen (Tabelle 12).

Tabelle 12: Pipettierschema der Serum-Qualitätskontrollproben für die totalen Konzentrationen

Konz. [A] CAZ/AVI [mg/L]	Vol. [A] [μL]	Vol. H ₂ O [μL]	Konz. [B] CAZ/AVI [mg/L]	Vol. [B] [μL]	Vol. Serum [μL]	finale Konz. QK CAZ/AVI [mg/L]
5000 (CAZ) 2000 (AVI)	320 200	480	1600/400	50	950	80/20
1600/400	200	600	400/100	50	950	20/5
5000 (CAZ) 2000 (AVI)	16 10	974	80/20	50	950	4/1

Für die freien Konzentrationen wurden Standards (Tabelle 13) und Qualitätskontrollproben (Tabelle 14) in 0,9 %iger NaCl-Lsg., die als Surrogat für Ultrafiltrat diente, hergestellt.

Tabelle 13: Pipettierschema der Kalibrierungsstandards für die freien Konzentrationen (in 0,9 % NaCl-Lsg., als Surrogat für Ultrafiltrat)

Konz. [A] CAZ/AVI [mg/L]	Vol. [A] [μL]	Vol. 0,9 % NaCl [μL]	finale Konz. STD CAZ/AVI [mg/L]
5000 (CAZ) 2000 (AVI)	60 75	865	300/150
300/150	100	900	30/15
30/15	100	900	3/1,5
5000 (CAZ) 2000 (AVI)	16 20	764	100/50
100/50	100	900	10/5
10/5	100	900	1/0,5

Tabelle 14: Pipettierschema der Qualitätskontrollproben für die freien Konzentrationen (in 0,9 % NaCl-Lsg., als Surrogat für Ultrafiltrat)

Konz. [A] CAZ/AVI [mg/L]	Vol. [A] [µL]	Vol. 0,9 % NaCl [µL]	finale Konz. QK CAZ/AVI [mg/L]
5000 (CAZ)	16	974	80/20
2000 (AVI)	10		
80/20	100	900	8/2

Zur Bewertung der Gesamtpräzision und zur Bestimmung der freien Fraktion von Ceftazidim und Avibactam in Serum von gesunden Probanden, wurden zusätzlich Serum-Qualitätskontrollproben für die Bestimmung der freien Konzentrationen mitgeführt (Tabelle 15).

Tabelle 15: Pipettierschema der Serum-Qualitätskontrollen für die Bestimmung der freien Fraktionen

Konz. [A] CAZ/AVI [mg/L]	Vol. [A] [µL]	Vol. H ₂ O [µL]	Konz. [B] CAZ/AVI [mg/L]	Vol. [B] [µL]	Vol. Serum [µL]	finale Konz. QK CAZ/AVI [mg/L]
5000 (CAZ)	320	480	1600/400	50	950	80/20
2000 (AVI)	200					
1600/400	100	900	160/40	50	950	8/2

Bis zur Analyse wurden die Aliquote bei -70 °C gelagert.

2.7.3 Validierung

Die HPLC-Methode wurde in Anlehnung an die ICH-Richtlinie M10 validiert (ICH 2023). Die Selektivität der Methode wurde durch die Vermessung von Leerserum-Proben von neun gesunden Probanden evaluiert, um zu prüfen, dass keine Interferenzen mit den Komponenten der Matrix auftreten. Für die Demonstration der Eignung der Ceftazidim/Avibactam-Methode zur klinischen Anwendung wurde Restplasma von Patienten verwendet, die sich einer elektiven abdominalen Operation unterzogen hatten. Der Kalibrierbereich der Methode wurde entsprechend den zu erwartenden Serumkonzentrationen von Ceftazidim und Avibactam ausgewählt. Für die lineare Regression wurde der Wichtungsfaktor $1/y^2$ verwendet. Die untere Nachweisgrenze (*Lower Limit of Detection*, LLOD „on-column“) wurde als die Menge der in die Säule injizierten Substanz definiert, die ein Signal mit einem Signal-Rausch-

Verhältnis von 3:1 verursachte. Die Bestimmung des *Lower Limit of Quantitation* anhand der Kalibrierfunktion ($LLOQ_{10\sigma}$) erfolgte mithilfe der Steigung S der Kalibriergeraden und der Standardabweichung SD des Signals:

$$LLOQ_{10\sigma} = \frac{10 \cdot SD}{S}$$

Die Wiederfindung (*Recovery*) wurde mithilfe rein wässriger Standards als prozentuales Verhältnis zwischen dem Detektorsignal nach Probenvorbereitung für die totalen Konzentrationen und dem Signal des entsprechenden rein wässrigen Standards bestimmt (unter Berücksichtigung der bei der Probenvorbereitung erfolgten Verdünnung). Präzision und Richtigkeit wurden durch prozessbegleitende Qualitätskontrollen bewertet. Der Variationskoeffizient diente zur Beschreibung der Präzision der Methode. Die Bewertung der Reproduzierbarkeit der Methode erfolgte durch Reanalyse von Studienproben, die für elf Monate bei -70 °C gelagert wurden. Durch Wiederholungsinjektion nach 20 h Lagerung bei 6 °C im Autosampler und durch Reanalyse der bei -70 °C gelagerten Serumstandards, Qualitätskontrollen und Stammlösungen nach vier bis fünf Monaten, wurde die Stabilität geprüft.

2.8 Software – Chromatographische und statistische Auswertung

Alle chromatographischen Daten der vorliegenden Arbeit wurden mittels LabSolutions (Version: 5.110, Shimadzu Deutschland GmbH, 47269 Duisburg, www.shimadzu.com) generiert. Die quantitative Auswertung erfolgte sowohl über die Peakflächen als auch über die Peakhöhen mit Microsoft Office Excel 365 (Version 2308, Microsoft Deutschland GmbH, 80807 München, www.microsoft.com), wobei für die Stabilitätsuntersuchungen immer die Peakflächen verwendet wurden. Die statistische Auswertung und Visualisierung wurde mit GraphPad Prism 10 für Windows (Version 10.2.3, GraphPad Software, Boston, MA USA, www.graphpad.com) durchgeführt. Illustrationen wurden mit BioRender (Science Suite Inc., Toronto, ON, Canada, www.biorender.com) und Zeichnungen chemischer Strukturen mit ChemDraw 20.0.41 (PerkinElmer Informatics Inc., Waltham, MA, USA) erstellt. Mithilfe eines KI-basierten Sprachmodells erfolgte die Überprüfung von Rechtschreibung, Grammatik und sprachlichem Stil. Sämtliche inhaltliche Aussagen, wissenschaftliche Auswertungen und Interpretationen stammen ausschließlich vom Autor.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der experimentellen Bedingungen der Ultrafiltration auf die freie Fraktion von Antibiotika

3.1.1 HPLC-Trennsystem

Insgesamt wurden 28 Antiinfektiva sowie Paracetamol und Valproinsäure mit der Umkehrphasenchromatographie, unter Verwendung von Natriumphosphatpuffer/Acetonitril als mobile Phase, analysiert. Der Acetonitrilgehalt schwankte zwischen 2,5 und 40 % (Tabelle 16). Es wurden mit je einem System bis zu drei Substanzen mit Laufzeiten unter zehn Minuten bestimmt.

Tabelle 16: Detektionswellenlänge (Det.), Retentionszeit (RT) sowie der pH-Wert und der finale prozentuale Anteil Acetonitril der mobilen Phase.

Subst.	Det. [nm]	RT [min]	Mobile Phase	
			pH	% Acetonitril
Mobile Phase: 0,1 M Na-Phosphatpuffer/Acetonitril				
FEP	260	7,5		
CLZ	260	10	3,0	2,5
PCM	244	6,1		
MTZ	313	2,9		
CAZ	260	3,9	3,0	7,5
MEM	300	4,4		
TGC	350	2,5		
MIN	350	5,9	2,8	8,6
VAN	240	3,7	3,5	9,1
AMP	215	4,7		
CRO	260	3,8	2,5	11
LVX	294	7,7		
CIP	294	8,8	2,7	11
CFC	285	3,3		
CRO	285	3,0	3,0	12
ETP	300	6,7		
CTX	260	3,4		
CFZ	272	4,3	3,0	13
CXM	272	5,0		
MXF	294	4,0	3,5	20
TZD	300	3,3		
FXN	225	6,0	4,3	28
VPA	215	4,5	2,5	40

Mobile Phase: 20 mM Na-Phosphatpuffer/Acetonitril				
FLC	210	3,5		
PEN	225	4,3	6,5	18
PIP	225	5,4		
LZD	254	5,5		
SMX	260	2,1	6,5	18
TMP	225	3,5		
FXN	225	2,3	6,0	33
CLI	205	4,7		
VRC	255	3,4	7,0	40
CLI	205	4,7		

Abbildung 7 zeigt exemplarisch, wie sich das Retentionsverhalten von Flucloxacillin in Abhängigkeit vom pH-Wert des Eluenten verändert. Bei niedrigem pH-Wert retiniert Flucloxacillin stärker als bei höherem pH-Wert.

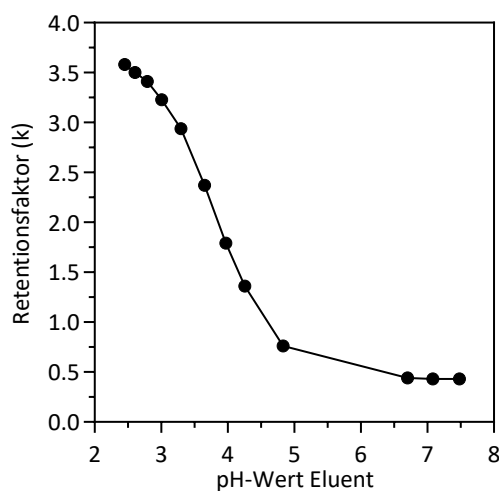
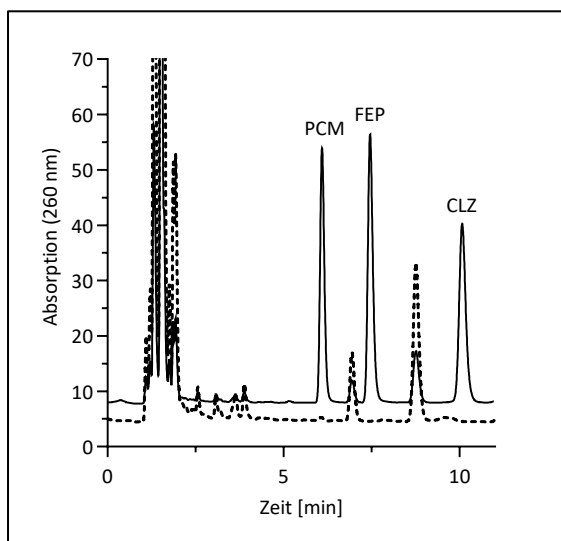


Abbildung 7: pH-Abhängigkeit der Retention von Flucloxacillin

Eluent (A) 20 mM H_3PO_4 /Acetonitril 60:40 pH 2,50 und Eluent (B) 20 mM Na_2HPO_4 /Acetonitril 60:40 pH 8,00. Der Anteil B wurde von 0 % (pH 2,50) auf 80 % (pH 7,48) erhöht.

Nachfolgend dargestellt sind die Chromatogramme der freien Konzentrationen der Substanzen in dotiertem Serum von gesunden Probanden (durchgezogene Linien) sowie die dazugehörigen Leerseren (gestrichelte und gepunktete Linien). Um die Größe etwaiger vorhandener kleiner Störpeaks besser abschätzen zu können, wurden die Chromatogramme der Leerseren um Faktor ≥ 3 gegenüber den dotierten Proben vergrößert. Zusätzlich werden alle relevanten chromatographischen Parameter mit aufgelistet.

Paracetamol, Cefepim und Ceftolozan

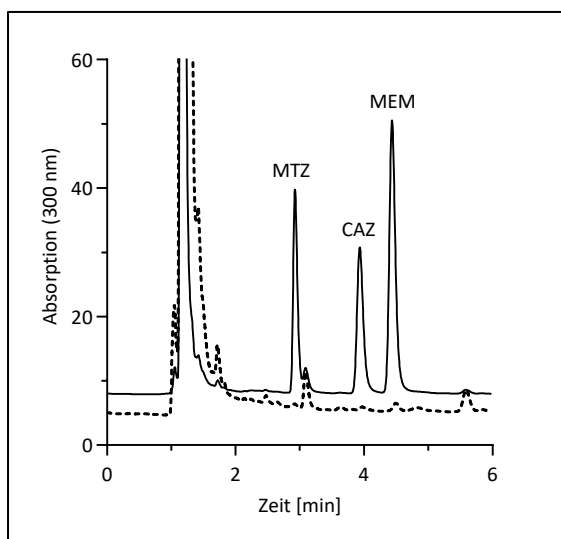


Detektor: SPD-M30A
λ: 244 nm und 260 nm
Säule: Cortecs T3 2,7 μ 100 × 3 mm
Eluent: 0,1 M NaPP/Acetonitril 975:25, pH 3,0

Abbildung 8: Chromatogramm von Paracetamol (PCM), Cefepim (FEP) und Ceftolozan (CLZ)

in Serum dotiert mit je 10 mg/L PCM, FEP und CLZ sowie von Leerserum (gestrichelte Linie, 3 × vergrößert). Retentionszeiten: PCM 6,1 min, FEP 7,5 min und CLZ 10,1 min. Freie Konzentrationen: PCM 8,39 mg/L, FEP 9,97 mg/L und CLZ 10,1 mg/L.

Metronidazol, Ceftazidim und Meropenem

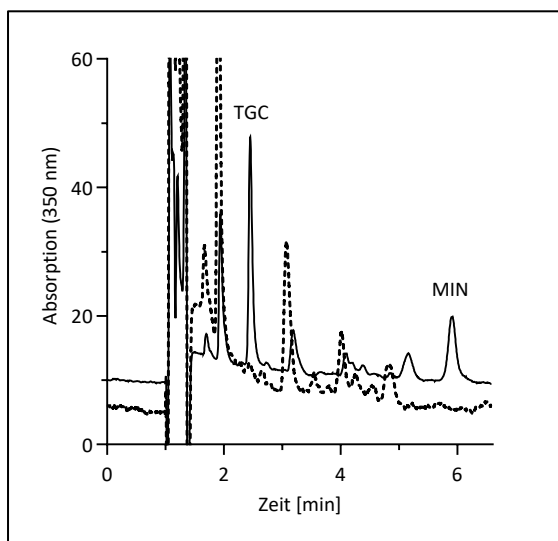


Detektor: SPD-M30A
λ: 300 nm
Säule: Cortecs T3 2,7 μ 100 × 3 mm
Eluent: A: 0,1 M NaPP/Acetonitril 975:25, pH 3,0
 B: dto = 700:300, pH 3,0
 Anteil B: 18 %

Abbildung 9: Chromatogramm von Metronidazol (MTZ), Ceftazidim (CAZ) und Meropenem (MEM)

in Serum dotiert mit 4 mg/L MTZ und je 10 mg/L CAZ und MEM sowie von Leerserum (gestrichelte Linie, 5 × vergrößert). Retentionszeiten: MTZ 2,9 min, CAZ 3,9 min und MEM 4,4 min. Freie Konzentrationen: MTZ 3,87 mg/L, CAZ 9,89 mg/L und MEM 10,1 mg/L.

Tigecyclin und Minocyclin

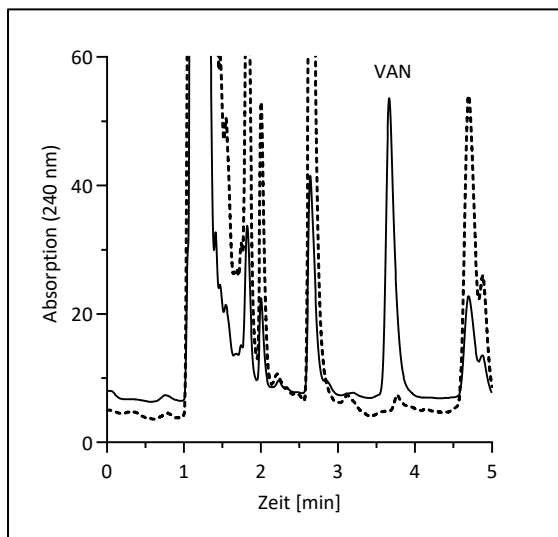


Detektor: SPD-M30A
 λ : 350 nm
Säule: Cortecs T3 2,7 μ 100 \times 3 mm
Eluent: A: 0,1 M NaPP/Acetonitril 975:25, pH 2,8
B: dto = 700:300, pH 2,8
Anteil B: 22 %

Abbildung 10: Chromatogramm von Tigecyclin (TGC) und Minocyclin (MIN)

in Serum dotiert mit je 0,2 mg/L TGC und MIN sowie von Leerserum (gestrichelte Linie, 3 \times vergrößert). Retentionszeiten: TGC 2,5 min und MIN 5,9 min. Freie Konzentrationen: TGC 0,14 mg/L und MIN 0,08 mg/L.

Vancomycin

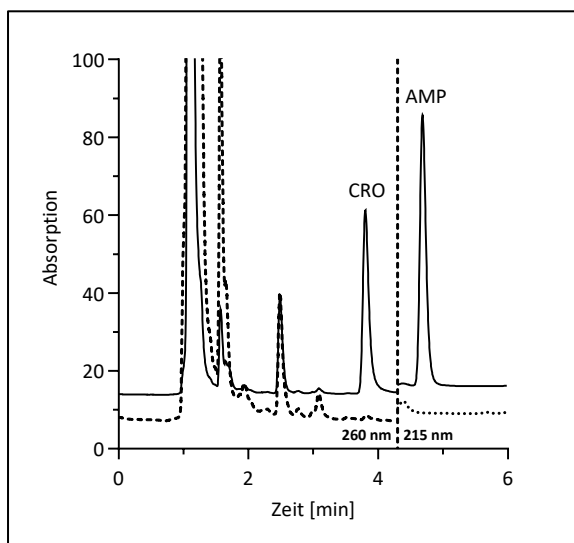


Detektor: SPD-M30A
 λ : 240 nm
Säule: Cortecs T3 2,7 μ 100 \times 3 mm
Eluent: A: 0,1 M NaPP/Acetonitril 975:25, pH 3,5
B: dto = 700:300, pH 3,5
Anteil B: 24 %

Abbildung 11: Chromatogramm von Vancomycin (VAN)

in Serum dotiert mit 10 mg/L VAN sowie von Leerserum (gestrichelte Linie, 3 \times vergrößert). Retentionszeit: VAN 3,7 min. Freie Konzentrationen: VAN 8,04 mg/L.

Ampicillin und Ceftriaxon

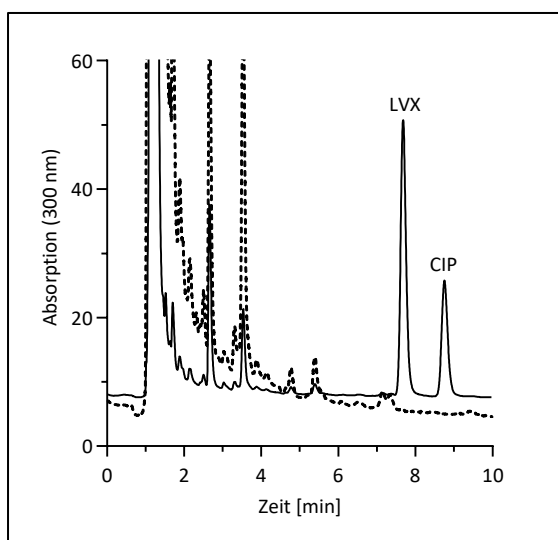


Detektor: SPD-M30A
λ: 215 nm und 260 nm
Säule: Cortecs T3 2,7 μ 100 × 3 mm
Eluent: A: 0,1 M NaPP/Acetonitril 970:30, pH 2,5
 B: dto = 600:400, pH 2,5
 Anteil B: 22 %

Abbildung 12: Chromatogramm von Ampicillin (AMP) und Ceftriaxon (CRO)

in Serum dotiert mit je 10 mg/L AMP und CRO sowie von Leerserum (gestrichelte/gepunktete Linie, 5 × vergrößert). Retentionszeiten: CRO 3,8 min und AMP 4,7 min. Freie Konzentrationen: CRO 0,86 mg/L und AMP 8,86 mg/L.

Levofloxacin und Ciprofloxacin

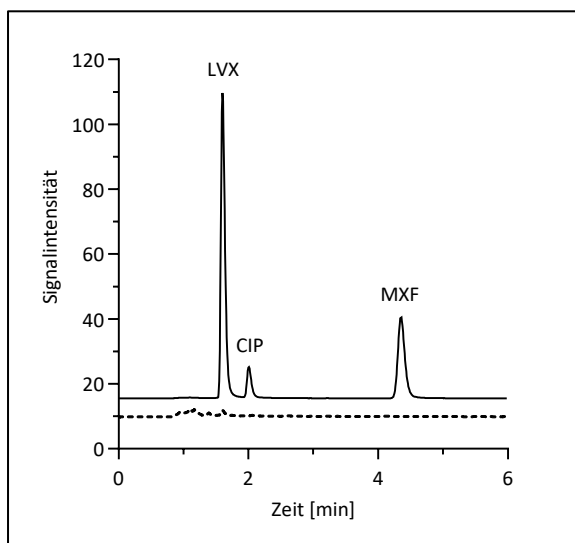


Detektor: SPD-M30A
λ: 300 nm
Säule: Cortecs T3 2,7 μ 100 × 3 mm
Eluent: A: 0,1 M NaPP/Acetonitril 975:25, pH 2,7
 B: dto = 700:300, pH 2,7
 Anteil B: 30 %

Abbildung 13: Chromatogramm von Levofloxacin (LVX) und Ciprofloxacin (CIP)

in Serum dotiert mit je 0,6 mg/L LVX und CIP sowie von Leerserum (gestrichelte Linie, 5 × vergrößert). Retentionszeiten: LVX 7,7 min und CIP 8,8 min. Freie Konzentrationen: LVX 0,58 mg/L und CIP 0,54 mg/L.

Levofloxacin, Ciprofloxacin und Moxifloxacin

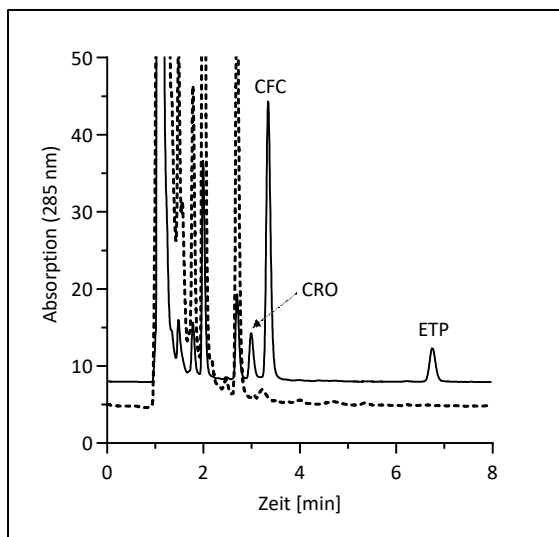


Detektor: RF-20A
Ex/Em: 296 nm/504 nm
Säule: Nucleodur HTec 3 μ 125 \times 4 mm
Eluent: 15 mM NaPP/Acetonitril 840:160, pH 3,3 + 10 mM TBA

Abbildung 14: Chromatogramm von Levofloxacin (LVX), Ciprofloxacin (CIP) und Moxifloxacin (MXF)

in Serum dotiert mit je 0,6 mg/L LVX, CIP und MXF sowie von Leerserum (gestrichelte Linie, 10 \times vergrößert). Retentionszeiten: LVX 1,6 min, CIP 2,0 min und MXF 4,4 min. Freie Konzentrationen: LVX 0,57 mg/L, CIP 0,54 mg/L und MXF 0,53 mg/L.

Ceftriaxon, Cefiderocol und Ertapenem

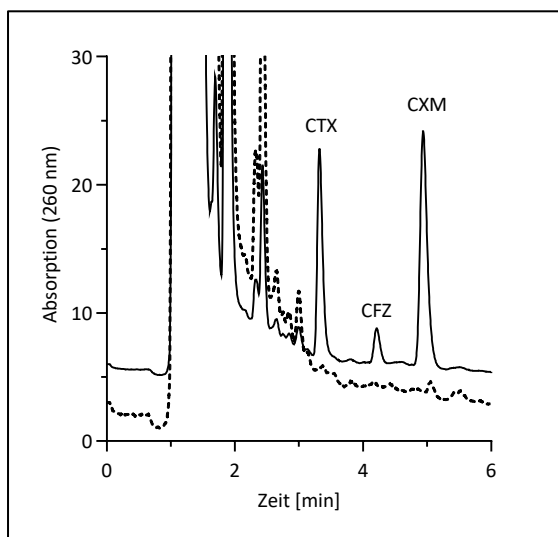


Detektor: SPD-M30A
 λ : 285 nm und 300 nm
Säule: Cortecs T3 2,7 μ 100 \times 3 mm
Eluent: A: 0,1 M NaPP/Acetonitril 975:25, pH 3,0
 B: dto = 700:300, pH 3,0
 Anteil B: 35 %

Abbildung 15: Chromatogramm von Ceftriaxon (CRO), Cefiderocol (CFC) und Ertapenem (ETP)

in Serum dotiert mit je 10 mg/L CRO, CFC und ETP sowie von Leerserum (gestrichelte Linie, 5 \times vergrößert). Retentionszeiten: CRO 3,0 min, CFC 3,3 min und ETP 6,7 min. Freie Konzentrationen: CRO 1,01 mg/L, CFC 7,72 mg/L und ETP 2,57 mg/L.

Cefotaxim, Cefazolin und Cefuroxim

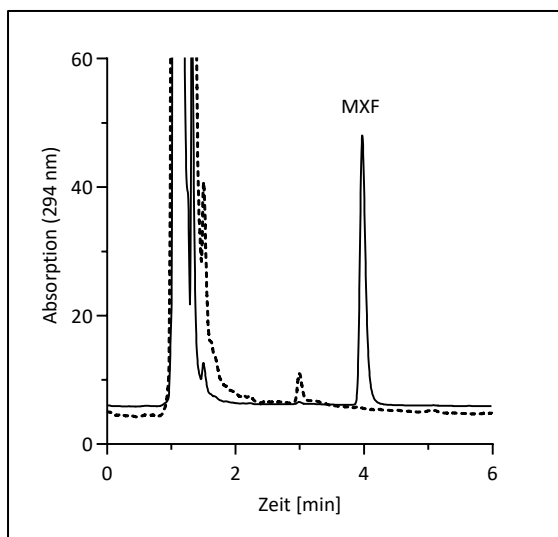


Detektor: SPD-M30A
λ: 260 nm und 272 nm
Säule: Cortecs T3 2,7 μ 100 × 3 mm
Eluent: A: 0,1 M NaPP/Acetonitril 975:25, pH 3,0
 B: dto = 600:400, pH 3,0
 Anteil B: 29 %

Abbildung 16: Chromatogramm von Cefotaxim (CTX), Cefazolin (CFZ) und Cefuroxim (CXM)

in Serum dotiert mit je 10 mg/L CTX, CFZ und CXM sowie von Leerserum (gestrichelte Linie, 3 × vergrößert). Retentionszeiten: CTX 3,4 min, CFZ 4,3 min und CXM 5,0 min. Freie Konzentrationen: CTX 6,95 mg/L, CFZ 1,79 mg/L und CXM 8,27 mg/L.

Moxifloxacin

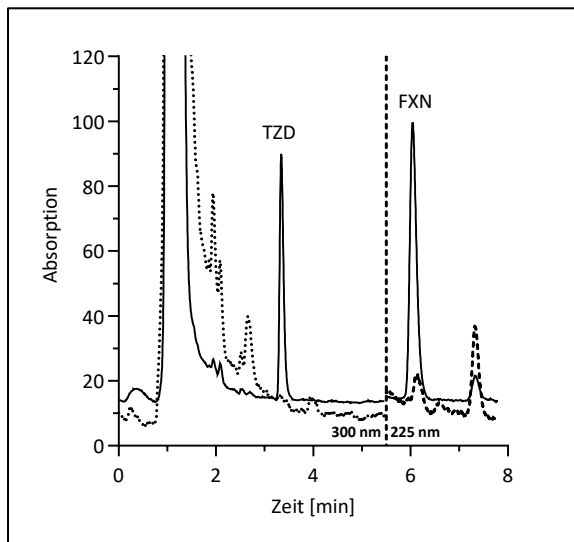


Detektor: SPD-M30A
λ: 294 nm
Säule: Cortecs T3 2,7 μ 100 × 3 mm
Eluent: A: 0,1 M NaPP/Acetonitril 970:30, pH 3,5
 B: dto = 600:400, pH 3,5
 Anteil B: 47 %

Abbildung 17: Chromatogramm von Moxifloxacin (MXF)

in Serum dotiert mit 0,6 mg/L MXF sowie von Leerserum (gestrichelte Linie, 5 × vergrößert). Retentionszeiten: MXF 4,0 min. Freie Konzentration: MXF 0,51 mg/L.

Tedizolid und Flucloxacillin

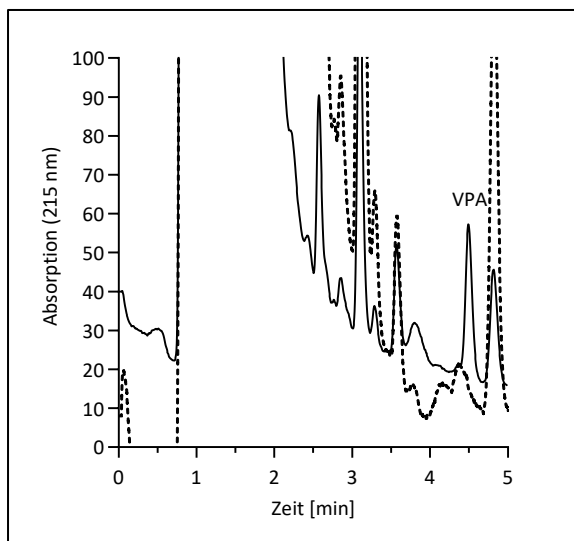


Detektor: SPD-M30A
λ: 300 nm und 225 nm
Säule: Cortecs T3 2,7 μ 100 × 3 mm
Eluent: A: 0,1 M NaPP/Acetonitril 975:25, pH 4,5
 B: dto = 600:400, pH 4,3
 Anteil B: 67 %

Abbildung 18: Chromatogramm von Tedizolid (TZD) und Flucloxacillin (FXN)

in Serum dotiert mit 0,5 mg/L TZD und 10 mg/L FXN sowie von Leerserum (gepunktete/gestrichelte Linie, 3 × vergrößert). Retentionszeiten: TZD 3,3 min und FXN 6,0 min. Freie Konzentrationen: TZD 0,12 mg/L und FXN 0,40 mg/L.

Valproinsäure

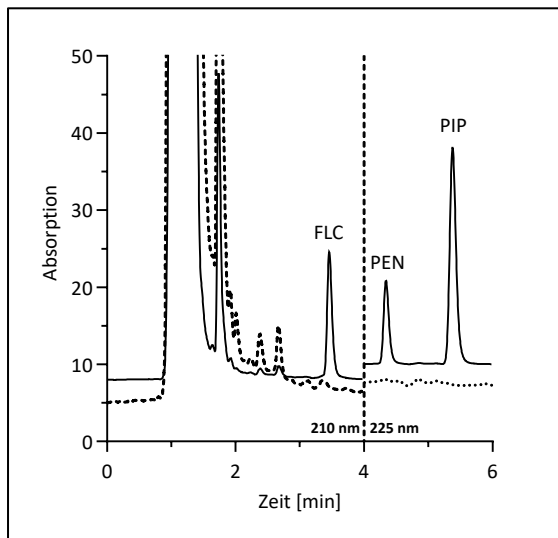


Detektor: SPD-M30A
λ: 215 nm
Säule: Cortecs T3 2,7 μ 100 × 3 mm
Eluent: 0,1 M NaPP/Acetonitril 600:400, pH 2,5

Abbildung 19: Chromatogramm von Valproinsäure (VPA)

in Serum dotiert mit 40 mg/L VPA sowie von Leerserum (gestrichelte Linie, 3 × vergrößert). Retentionszeit: VPA 4,5 min. Freie Konzentration: VPA 5,9 mg/L.

Fluconazol, Benzylpenicillin und Piperacillin

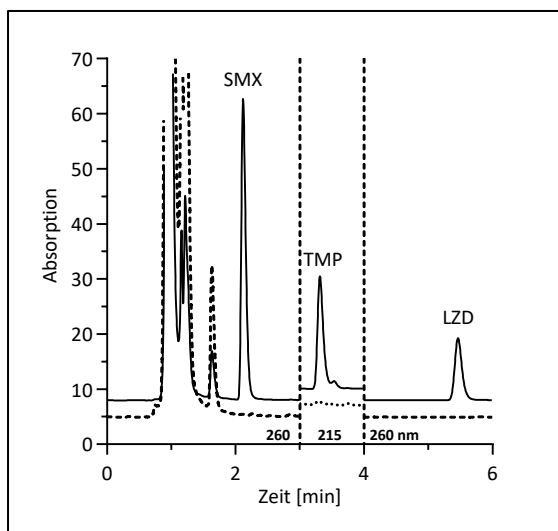


Detektor: SPD-M30A
λ: 210 nm und 225 nm
Säule: Cortecs T3 2,7 μ 100 × 3 mm
Eluent: A: 20 mM NaPP/Acetonitril 970:30, pH 6,5
 B: dto = 600:400, pH 6,5
 Anteil B: 40 %

Abbildung 20: Chromatogramm von Fluconazol (FLC), Benzylpenicillin (PEN) und Piperacillin (PIP)

in Serum dotiert mit 4 mg/L FLC und je 10 mg/L PEN und PIP sowie von Leerserum (gestrichelte/gedunkelte Linie, 5 × vergrößert). Retentionszeiten: FLC 3,5 min, PEN 4,3 min und PIP 5,4 min. Freie Konzentrationen: FLC 3,61 mg/L, PEN 5,86 mg/L und PIP 8,97 mg/L.

Sulfamethoxazol, Trimethoprim und Linezolid

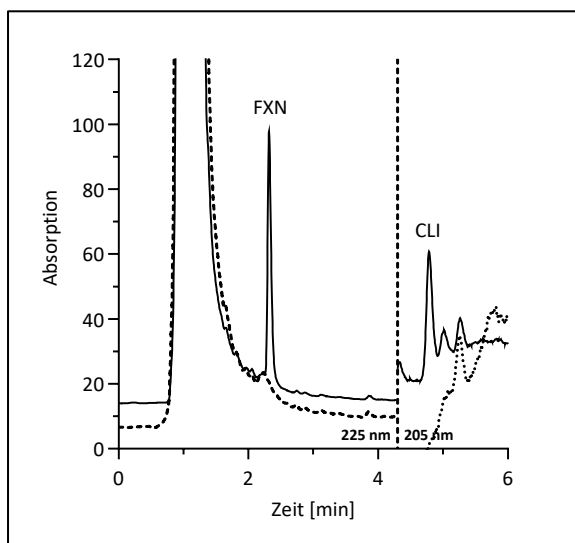


Detektor: SPD-M30A
λ: 260 nm und 215 nm
Säule: Nucleoshell RP 18 2,7 μ 100 × 3 mm
Eluent: A: 20 mM NaPP/Acetonitril 970:30, pH 6,5
 B: dto = 600:400, pH 6,5
 Anteil B: 40 %

Abbildung 21: Chromatogramm von Sulfamethoxazol (SMX), Trimethoprim (TMP) und Linezolid (LZD)

in Serum dotiert mit 20 mg/L SMX und je 2 mg/L TMP und LZD sowie von Leerserum (gestrichelte/gedunkelte Linie, 3 × vergrößert). Retentionszeiten: SMX 2,1 min, TMP 3,5 min und LZD 5,5 min. Freie Konzentrationen: SMX 7,16 mg/L, TMP 1,25 mg/L und LZD 1,74 mg/L.

Flucloxacillin und Clindamycin

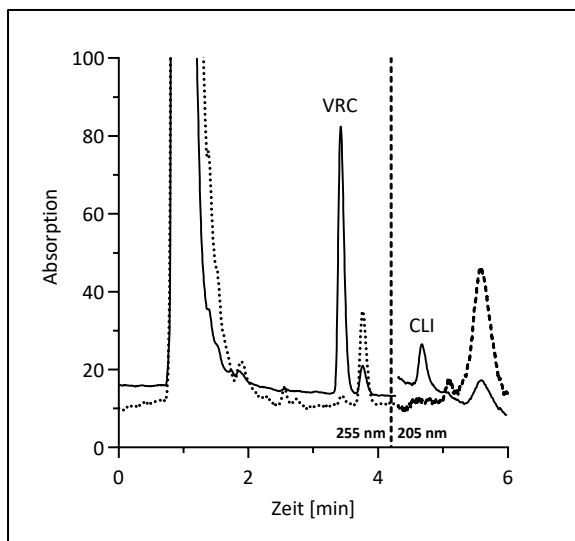


Detektor: SPD-M30A
λ: 225 nm und 205 nm
Säule: Cortecs T3 2,7 μ 100 × 3 mm
Eluent: A: 20 mM NaPP/Acetonitril 970:30, pH 6,0
 B: dto = 600:400, pH 6,0
 Anteil B: 80 %

Abbildung 22: Chromatogramm von Flucloxacillin (FXN) und Clindamycin (CLI)

in Serum dotiert mit 10 mg/L FXN und 2 mg/L CLI sowie von Leerserum (gestrichelte/gedunkelte Linie, 3 × vergrößert). Retentionszeiten: FXN 2,3 min und CLI 4,8 min. Freie Konzentrationen: FXN 0,36 mg/L und CLI 0,30 mg/L.

Voriconazol und Clindamycin



Detektor: SPD-M30A
λ: 255 nm und 205 nm
Säule: Cortecs T3 2,7 μ 100 × 3 mm
Eluent: 20 mM NaPP/Acetonitril 600:400, pH 7,0

Abbildung 23: Chromatogramm von Voriconazol (VRC) und Clindamycin (CLI)

in Serum dotiert mit 1 mg/L VRC und 2 mg/L CLI sowie von Leerserum (gedunkelte/gestrichelte Linie, 3 × vergrößert). Retentionszeiten: VRC 3,4 min und CLI 4,7 min. Freie Konzentrationen: VRC 0,30 mg/L und CLI 0,30 mg/L.

3.1.2 Probenstabilität

Alle Substanzen erwiesen sich über Nacht (18-24 h/6 °C im Autosampler) in den gepufferten Ultrafiltraten als ausreichend stabil. Die 90 % Stabilitätsgrenze wurde nicht unterschritten. Die geringste Stabilität zeigten Ertapenem (90,8 %) und Ampicillin (93,8 %). Bei den Ultrafiltraten, bei denen keine Pufferung des Serums erfolgte, fielen die Konzentrationen mancher Betalactame unter die 90 % Stabilitätsgrenze. Hiervon betroffen waren Cefiderocol (89,8 %), Ampicillin (84,1 %), Meropenem (81,7 %), Piperacillin (80,4 %) und Ertapenem (78,4 %) (Abbildung 24).

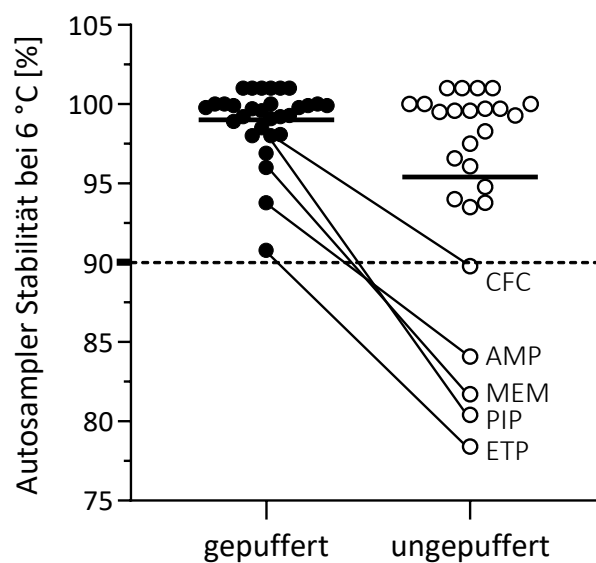


Abbildung 24: Autosampler-Stabilität (18-24 h/6 °C)

der prozessierten Proben nach Ultrafiltration von gepuffertem oder ungepuffertem Serum.
AMP: Ampicillin, CFC: Cefiderocol, ETP: Ertapenem, MEM: Meropenem, PIP: Piperacillin.

Die Mittelwerte inklusive Stichprobenumfang und Standardabweichung zur Autosampler-Stabilität aller Substanzen sind Tabelle 17 zu entnehmen.

Tabelle 17: Stabilität der Proben im Autosampler

Subst.	Stabilität (18-24 h/6 °C) in Ultrafiltrat von gepuffertem Serum			Stabilität (18-24 h/6 °C) in Ultrafiltrat von ungepuffertem Serum		
	n	MW [%]	± SD [%]	n	MW [%]	± SD [%]
AMP	24	93,8	3,0	12	84,1	3,6
PEN	12	99,1	0,33	6	94,8	1,2
CFZ	20	101	1,9	12	100	2,0
FEP	24	98,9	4,0	N/A	N/A	N/A
CFC	10	98,5	0,29	6	89,8	0,48
CTX	20	99,8	0,81	12	96,6	0,55
CAZ	10	99,2	0,48	8	93,8	1,1
CLZ	12	101	0,73	N/A	N/A	N/A
CRO	10	101	1,5	6	97,5	2,5
CXM	20	99,7	0,98	12	98,3	0,57
CIP	8	99,8	1,3	6	101	0,57
CLI	23	99,9	3,8	11	99,6	3,5
ETP	10	90,8	0,78	6	78,4	0,63
FXN	45	99,2	1,4	24	93,5	2,4
FLC	12	100	0,41	6	101	0,22
LVX	8	100	0,49	6	100	0,26
LZD	12	100	0,67	6	100	0,76
MEM	10	96,0	0,70	8	81,7	1,9
MTZ	10	99,9	0,55	8	99,3	0,56
MIN*	24	96,9	3,0	6	94,0	3,0
MXF	8	101	1,3	N/A	N/A	N/A
PCM	24	98,0	3,2	N/A	N/A	N/A
PIP	12	98,0	0,44	6	80,4	3,4
SMX	24	99,9	0,53	12	99,6	0,49
TZD	21	99,3	0,85	12	99,7	0,73
TGC*	24	98,1	5,0	6	96,1	3,6
TMP	24	99,6	1,2	12	99,7	2,6
VPA	10	101	3,5	3	101	2,0
VAN	24	100	1,6	6	99,5	1,1
VRC	17	101	0,99	10	101	0,80

*Ultrafiltrat mit 0,1 M HCl angesäuert

3.1.3 Unspezifische Bindung an der Ultrafiltrationseinheit

Durch den Vergleich der Konzentration im Ultrafiltrat mit der Konzentration in der jeweiligen Ausgangsverdünnung der Referenzstandards, wurde die Wiederfindung (*Recovery*) der einzelnen Substanzen und damit die unspezifische Bindung an die Oberflächen der Ultrafiltrationseinheit bestimmt (vgl. 2.6.2 Eignung der). Bei 27 von 30 Substanzen lag die Wiederfindung in Ringerlösung bei > 95 % und somit die unspezifische Bindung an das Material des Ultrafilters bei < 5 %. Die Wiederfindung betrug 92,8 % für Tedizolid, 71,9 % für Tigecyclin und für Minocyclin 69,1 %. Damit beträgt die unspezifische Adsorption für Tedizolid

7,2 %, für Tigecyclin 28,1 % und für Minocyclin 30,9 % (Abbildung 25 (A)). Für diese drei Substanzen wurden die Adsorptionsphänomene genauer untersucht. Der direkte Vergleich der Konzentration im Ultrafiltrat mit derjenigen im Retentat zeigte, dass Tedizolid überwiegend an das Wandmaterial des Probenreservoirs, das aus Polycarbonat besteht, adsorbiert. Auf die Konzentration im Retentat bezogen lag die Wiederfindung für Tedizolid bei 97,5 %, für Tigecyclin bei 77,1 % und für Minocyclin bei 74,8 % (Abbildung 25 (B)).

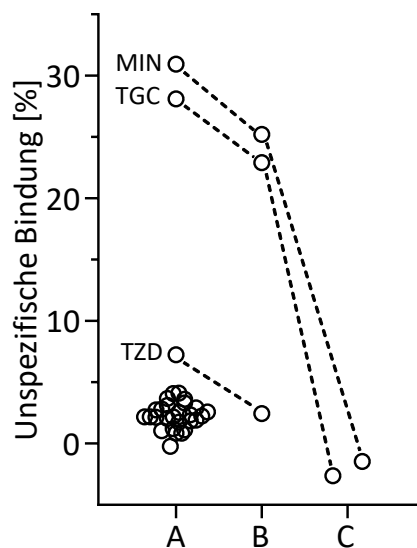


Abbildung 25: Unspezifische Bindung [%]

der Substanzen berechnet nach (A) $(1 - c_{UF}/c_{RIL}) \cdot 100 \%$, (B) $(1 - c_{UF}/c_{RET}) \cdot 100 \%$ und (C) $(1 - c_{UF_HCl}/c_{RET}) \cdot 100 \%$. c_{UF} : Konzentration im Ultrafiltrat, c_{RIL} : Konzentration in der dotierten Ringerlösung, c_{RET} : Konzentration im Retentat, c_{UF_HCl} : Konzentration im angesäuerten Ultrafiltrat. MIN: Minocyclin, TGC: Tigecyclin und TZD: Tedizolid.

Tigecyclin und Minocyclin zeigten zusätzlich Adsorption am Auffanggefäß aus Polypropylen. Durch Ansäuerung des Ultrafiltrates mit 0,1 M HCl wurde, bezogen auf das Retentat, eine Recovery von 102,6 % für Tigecyclin und 101,5 % für Minocyclin (Abbildung 25 (C)) erzielt.

3.1.4 Integrität der Ultrafiltermembran

Insgesamt wurden etwa 800 Ultrafiltrationen durchgeführt. Mittels Bradford-Assay wurde in 525 Ultrafiltraten die Proteinkonzentration bestimmt, wovon bei 497 Ultrafiltraten (94,7 %) die Proteinkonzentration unter 0,0075 g/dL lag. In den verbleibenden 28 Proben (5,3 %) wurden Proteinkonzentrationen gemessen, die mit 0,0092-0,0747 g/dL unter 0,075 g/dL lagen und damit unter 1 % der normalen Plasmaproteinkonzentration (ca. 7,5 g/dL) (Abbildung 26).

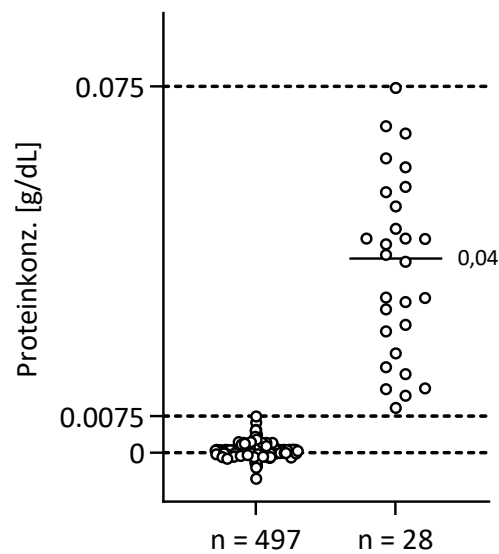


Abbildung 26: Proteinkonzentration [g/dL] in den Ultrafiltraten

bestimmt mittels Bradford-Assay ($n = 525$). Bei 497 Proben lag die Proteinkonzentration unter 0,0075 g/dL ($< 0,1$ % der Gesamtplasmaproteinkonzentration = 6–8 g/dL) und bei 28 Proben im Median bei 0,04 g/dL und zwischen 0,0075 g/dL und 0,075 g/dL (≤ 1 % der Gesamtplasmaproteinkonzentration).

3.1.5 Bestimmung der freien Konzentrationen der Substanzen und anschließende Berechnung der freien Fraktion

Die Methode des Arbeitskreises zur Bestimmung der freien Konzentrationen beinhaltete das Puffern des Serums mit Kaliumphosphatpuffer, die Inkubation in der Zentrifuge bei 37 °C für 10 min bei $100 \times g$ und eine anschließende Zentrifugation für 20 min bei $1000 \times g/37$ °C (s. 2.5.1 Bestimmung der freien Konzentration) (Kratzer et al. 2014). Für die nachfolgenden Vergleiche wurde sie als Referenzmethode verwendet. In Tabelle 18 sind die zugehörigen freien Fraktionen aufgeführt, die sich aus der gemessenen freien Konzentration und nominalen totalen Konzentration der dotierten Proben errechnen lässt. Die Mittelwerte basieren auf mindestens sechs Messungen und wurden aus mindestens zwei Assays mit jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen (hoch/niedrig) ermittelt. Da manche Versuche noch öfters wiederholt und einige Substanzen zudem in unterschiedlichen Kombinationen mehrfach analysiert wurden, war die tatsächliche Anzahl der Messungen pro Substanz in der Regel höher als sechs Messungen. Die Variationskoeffizienten reichten von 1,9 % für Linezolid bis 46,3 % für Valproinsäure. Bei Substanzen mit konzentrationsabhängiger Plasmaproteinbindung war die Streuung der Ergebnisse, bedingt durch die Verwendung von jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen, teils stärker ausgeprägt. Besonders

hervorzuheben sind die Variationskoeffizienten von Valproinsäure, Clindamycin, Minocyclin, Tigecyclin, Ceftriaxon und Flucloxacillin, die eine konzentrationsabhängige Plasmaproteinbindung aufweisen.

Tabelle 18: Freie Fraktion f_u [%] nach Ultrafiltration mit Phosphatpuffer/ 1000 × g/37 °C/20 min.

Subst.	Abkürzung	Konz. hoch/niedrig [mg/L]	f_u [%] Phosphat gepuffert		
			n	MW [%]	CV [%]
Ampicillin	AMP	50/10	8	88	5,4
Benzylpenicillin	PEN	50/10	10	59	4,7
Cefazolin	CFZ	50/10	21	18	11
Cefepim	FEP	50/10	11	99	2,4
Cefiderocol	CFC	50/10	9	80	2,0
Cefotaxim	CTX	50/10	21	67	4,0
Ceftazidim	CAZ	50/10	14	99	2,4
Ceftolozan	CLZ	50/10	11	100	3,2
Ceftriaxon*	CRO	50/10	17	11	16
Cefuroxim	CXM	50/10	21	78	3,8
Ciprofloxacin	CIP	3/0,6	8	91	3,1
Clindamycin*	CLI	10/2	16	16	22
Ertapenem	ETP	50/10	9	27	13
Flucloxacillin*	FXN	50/10	16	4,1	12
Fluconazol	FLC	20/4	10	91	2,8
Levofloxacin	LVX	3/0,6	8	96	2,2
Linezolid	LZD	10/2	12	86	1,9
Meropenem	MEM	50/10	14	100	2,3
Metronidazol	MTZ	20/4	14	97	2,0
Minocyclin*	MIN	1/0,2	12	39	18
Moxifloxacin	MXF	3/0,6	8	85	2,4
Paracetamol	PCM	50/10	11	84	2,7
Piperacillin	PIP	50/10	10	92	2,7
Sulfamethoxazol	SMX	100/20	12	36	6,2
Tedizolid*	TZD	2,5/0,5	8	25	5,7
Tigecyclin*	TGC	1/0,2	12	67	18
Trimethoprim	TMP	10/2	12	62	3,5
Valproinsäure*	VPA	120/40	8	12	46
Vancomycin	VAN	50/10	12	77	3,6
Voriconazol	VRC	5/1	8	46	6,3

* konzentrationsabhängige Plasmaproteinbindung

Die Parameter Temperatur, Zentrifugalkraft, pH-Wert und der verwendete Puffer wurden variiert und mit den Ergebnissen des Referenzverfahrens verglichen, um ihren Einfluss auf die freie Konzentration systematisch zu analysieren. Zur Identifizierung von Unterschieden zwischen zwei Messparametern oder Einflussgrößen wurde eine Akzeptanzgrenze für die prozentuale Abweichung definiert. In Anlehnung an die Toleranzgrenze für die Präzision bei

bioanalytischen HPLC-Methoden wurde ein Toleranzbereich von $\pm 15\%$ für die Methodenvergleiche festgelegt (Beijer et al. 2023; ICH 2023).

3.1.6 Abhängigkeit der freien Fraktion von der Temperatur

In Tabelle 19 sind die Werte für die freie Fraktion aufgeführt, die sich ergeben, wenn die Ultrafiltration bei Raumtemperatur ($f_{u, 22^\circ\text{C}}$) durchgeführt wird sowie der Quotient Q dieser Werte in Bezug auf die Standardmethode ($f_{u, 37^\circ\text{C}}$).

Tabelle 19: Freie Fraktion f_u [%] bestimmt bei 22 °C (Phosphatpuffer/1000 × g/30 min) und der Quotient $Q = f_{u, 22^\circ\text{C}}/f_{u, 37^\circ\text{C}}$

Subst.	f_u [%] 22 °C			Q 22 °C/37 °C
	n	MW [%]	CV [%]	
AMP	4	92	2,8	1,05
PEN	4	60	2,6	1,02
CFZ	6	12	13	0,67
FEP	4	99	1,4	1,00
CFC	4	71	1,3	0,89
CTX	6	67	5,5	1,00
CAZ	6	96	3,0	0,97
CLZ	2	99	1,6	0,99
CRO	8	10	18	0,87
CXM	6	72	7,1	0,93
CIP	4	87	3,4	0,95
CLI	8	25	23	1,50
ETP	4	15	27	0,57
FXN	8	3,3	16	0,82
FLC	4	88	1,1	0,97
LVX	4	94	2,7	0,98
LZD	6	85	2,0	0,99
MEM	6	99	3,1	0,99
MTZ	6	94	2,4	0,97
MIN	6	42	8,8	1,07
MXF	4	82	1,9	0,96
PCM	4	80	0,5	0,95
PIP	4	93	3,0	1,01
SMX	6	29	7,2	0,81
TZD	4	17	7,0	0,70
TGC	6	66	18	0,97
TMP	6	58	4,4	0,93
VPA	4	11	54	1,14
VAN	6	69	7,0	0,89
VRC	4	47	3,7	1,02

Der Einfluss der Temperatur bei der Ultrafiltration ist in Abbildung 27 in einem Bland-Altman-Diagramm visualisiert. In dem Diagramm ist die mittlere f_u der jeweiligen Substanz gegen den Quotienten

$$Q = \frac{f_{u, 22^\circ\text{C}}}{f_{u, 37^\circ\text{C}}}$$

aufgetragen.

Die relative Abweichung der gemessenen freien Fraktion lag für die meisten Substanzen innerhalb von $\pm 15\%$ (Toleranzbereich vgl. 2.5.2). Der relative Unterschied in der freien Fraktion war bei Cefazolin, Clindamycin, Ertapenem, Flucloxacillin, Sulfamethoxazol und Tedizolid größer als $\pm 15\%$. Für Clindamycin wurde bei Raumtemperatur eine f_u gemessen, die um 50 % höher war als bei 37 °C. Hingegen wurde für Flucloxacillin, Sulfamethoxazol, Cefazolin, Ertapenem und Tedizolid bei Raumtemperatur eine niedrigere f_u gemessen, die außerhalb des vordefinierten Toleranzbereichs lag.

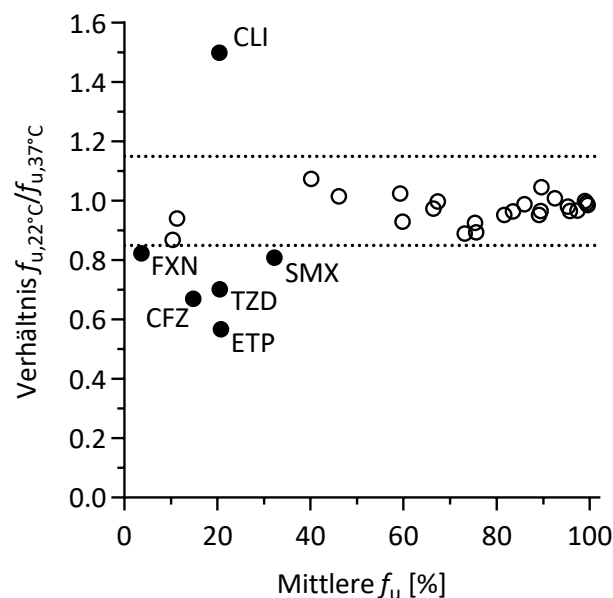


Abbildung 27: Bland-Altman-Diagramm – Temperaturabhängigkeit

Der Einfluss der Temperatur dargestellt im Bland-Altman-Diagramm. Gezeigt ist das Verhältnis der f_u [%], die bei 22 °C gemessen wurde, zu der f_u [%], die bei 37 °C bestimmt wurde. Als gefüllte Kreise sind die Substanzen gekennzeichnet, die außerhalb des vordefinierten Toleranzbereiches von $\pm 15\%$ (gepunktete Linien) lagen. CFZ: Cefazolin, CLI: Clindamycin, ETP: Ertapenem, FXN: Flucloxacillin, SMX: Sulfamethoxazol und TZD: Tedizolid.

In Tabelle 20 sind die Werte aufgeführt, die sich nach Inkubation im Heizblock (1 h/37 °C) ergeben haben. Die nachfolgende Zentrifugation wurde entweder unter Zusatz von Puffer (+), oder ohne Puffer (-) vorgenommen. Des Weiteren können aus Tabelle 20 die Quotienten Q_1 und Q_2 entnommen werden. Q_1 stellt den Quotienten aus der f_u dar, die nach Vorinkubation mit anschließender Pufferung ermittelt wurde und der f_u , die durch die Anwendung der Referenzmethode gemessen wurde. Q_2 bezieht sich ebenfalls auf die f_u der Referenzmethode, jedoch wurde hier dem Serum nach der Inkubation im Heizblock kein Puffer zugesetzt. Der pH-Wert stieg während der Vorinkubation auf $8,54 \pm 0,20$ (n = 202) an.

Tabelle 20: Freie Fraktion f_u [%], die sich durch Ultrafiltration nach Vorinkubation (1 h/37 °C) im Heizblock mit (+) Puffer und ohne (-) Puffer anschließende Pufferung ergab und der Quotient $Q_1 = f_{u, 1h\ 37\ ^\circ C (+) Puffer} / f_{u, Referenzmethode}$ und $Q_2 = f_{u, 1h\ 37\ ^\circ C (-) Puffer} / f_{u, Referenzmethode}$

Subst.	f_u [%] 1 h 37 °C, (+) Puffer			Q_1	f_u [%] 1 h 37 °C, (-) Puffer			Q_2
	n	MW [%]	CV [%]		n	MW [%]	CV [%]	
AMP	4	85	4,2	0,97	4	80	4,4	0,91
PEN	6	57	4,2	0,98	6	53	6,1	0,91
CFZ	2	20	5,9	1,13	6	19	13	1,05
FEP	2	98	0,7	0,99	6	92	1,4	0,93
CFC	2	75	0,2	0,93	10	63	7,3	0,79
CTX	2	68	0,9	1,01	6	64	5,1	0,94
CAZ	2	98	0,1	0,99	8	94	2,7	0,95
CLZ	2	100	1,3	1,00	4	92	2,7	0,92
CRO	6	10	17	0,90	14	8,3	19	0,75
CXM	2	78	0,6	1,00	6	73	4,2	0,94
CIP	4	93	2,9	1,02	6	76	5,4	0,84
CLI	7	17	24	1,03	8	8,9	25	0,54
ETP	2	30	13	1,13	10	15	15	0,55
FXN	8	4,0	7,1	0,98	8	5,0	6,8	1,23
FLC	6	92	3,8	1,01	6	93	3,5	1,02
LVX	4	97	2,1	1,01	6	81	5,0	0,84
LZD	6	87	1,7	1,00	6	89	1,7	1,03
MEM	2	97	0,1	0,96	8	90	3,0	0,90
MTZ	2	96	0,4	0,99	8	98	1,1	1,00
MIN	6	39	10	1,01	6	10	46	0,26
MXF	4	86	1,4	1,01	6	70	8,0	0,82
PCM	2	84	1,5	1,01	6	88	1,1	1,05
PIP	6	90	3,5	0,97	6	84	5,5	0,92
SMX	6	36	6,4	1,01	6	32	6,7	0,90
TZD	4	23	4,4	0,97	4	23	3,9	0,95
TGC	6	70	7,8	1,04	6	6,7	75	0,10
TMP	6	63	3,2	1,01	6	56	4,3	0,91
VPA	4	12	51	1,00	4	14	47	1,22
VAN	6	78	3,9	1,00	6	76	3,8	0,98
VRC	3	46	4,2	1,01	4	46	3,1	1,01

Abbildung 28 stellt den Quotienten Q_1 aufgetragen gegen die durchschnittlichen f_u der jeweiligen Substanz in einem Bland-Altman-Diagramm dar. Die relative Abweichung lag für alle Substanzen innerhalb des Toleranzbereiches, wenn das Serum nach der Inkubation im Heizblock gepuffert wurde.

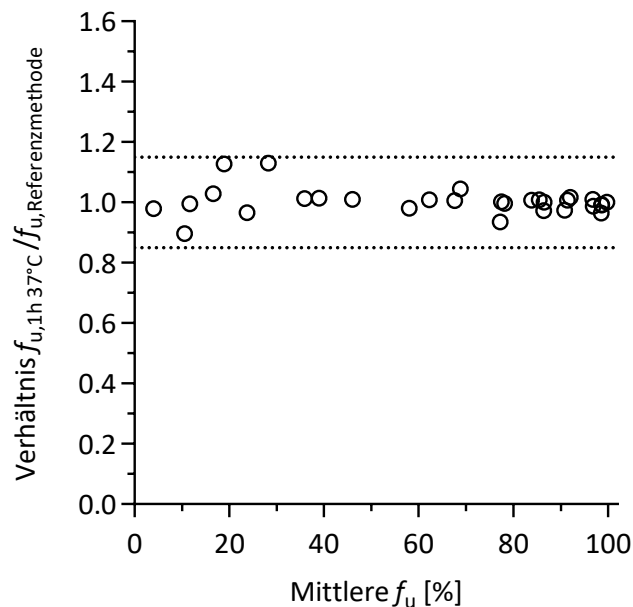


Abbildung 28: Bland-Altman-Diagramm – Vorinkubation

Dargestellt ist das Verhältnis der f_u [%], die nach Inkubation im Heizblock (1 h/37 °C und anschließender Zentrifugation für 20 min, 1000 × g, 37 °C) gemessen wurde, zu der f_u [%], die mittels Referenzmethode bestimmt wurde (Inkubation in der Zentrifuge: 10 min, 100 × g, 37 °C; dann 20 min, 1000 × g, 37 °C). Die gepunkteten Linien zeigen eine relative Abweichung der f_u um ± 15 %.

3.1.7 Abhängigkeit der freien Fraktion von der Zentrifugalkraft

In Tabelle 21 sind die freien Fraktionen, die durch Variation der Zentrifugalbeschleunigung (3000 × g und 10000 × g) im Vergleich zu 1000 × g gemessen wurden sowie die jeweiligen Molekulargewichte der Substanzen aufgeführt. Zudem lässt sich der Tabelle der jeweilige Quotient $Q_{(1/2)}$ in Bezug auf die mit der Referenzmethode (1000 × g) bestimmten freien Fraktionen entnehmen.

Tabelle 21: Freie Fraktion f_u [%], die sich durch Ultrafiltration bei einer Zentrifugalbeschleunigung von $3000 \times g$ (Phosphatpuffer/37 °C/10 min) oder $10000 \times g$ ergibt (Phosphatpuffer/37 °C/5 min) und der Quotient $Q_1 = f_{u, 3000 \times g} / f_{u, 1000 \times g}$ sowie $Q_2 = f_{u, 10000 \times g} / f_{u, 1000 \times g}$

Subst.	M [g/mol]	f_u [%] $3000 \times g$			Q_1	f_u [%] $10000 \times g$			Q_2
		n	MW [%]	CV [%]		n	MW [%]	CV [%]	
AMP	349,4	4	87	1,2	1,00	4	82	2,5	0,94
PEN	334,4	4	58	1,6	1,00	4	55	3,7	0,94
CFZ	454,5	6	17	9,5	0,98	6	16	8,0	0,93
FEP	480,6	4	100	0,8	1,01	4	94	0,7	0,95
CFC	752,2	4	77	0,5	0,96	4	67	0,5	0,84
CTX	455,5	6	65	3,6	0,96	6	60	3,5	0,90
CAZ	546,6	6	95	2,2	0,96	6	86	2,3	0,87
CLZ	666,7	4	100	0,1	1,00	4	85	2,7	0,86
CRO	554,6	8	11	19	0,95	8	9,4	17	0,84
CXM	424,4	6	76	3,8	0,98	6	72	3,9	0,92
CIP	331,3	4	92	2,6	1,00	4	87	3,5	0,95
CLI	425	8	17	23	1,06	8	16	27	0,98
ETP	475,5	4	25	11	0,92	4	21	12	0,78
FXN	453,9	8	3,9	10	0,96	7	4,3	30	0,95
FLC	306,3	4	89	0,8	0,98	4	88	0,9	0,97
LVX	361,4	4	96	2,3	1,00	4	92	2,6	0,95
LZD	337,4	6	86	1,8	0,99	6	84	3,2	0,97
MEM	383,5	6	97	2,2	0,97	6	91	2,9	0,90
MTZ	171,2	6	95	1,8	0,98	6	95	1,9	0,97
MIN	457,5	6	38	16	0,99	6	93	1	1,03
MXF	401,4	4	84	2,2	0,99	4	80	2,5	0,94
PCM	151,2	4	85	1,2	1,01	4	83	1,0	1,00
PIP	517,6	4	92	3,2	0,99	4	84	3,0	0,91
SMX	253,3	6	35	7,3	0,98	6	35	9,1	0,97
TZD	370,3	4	23	7,4	0,97	3	24	7,0	0,95
TGC	585,7	6	66	9,4	0,99	6	53	9,7	0,98
TMP	290,3	6	62	3,2	1,00	6	61	5,3	0,98
VPA	144,2	4	11	55	0,96	4	11	55	0,97
VAN	1449,3	6	71	5,4	0,92	6	59	8,1	0,76
VRC	349,3	4	47	3,8	1,03	4	45	4,6	0,98

Aus Abbildung 29 kann man entnehmen, dass sich durch eine Erhöhung der Zentrifugalkraft von $1000 \times g$ auf $3000 \times g$ für keine der Substanzen eine Abweichung ergab, die außerhalb des vordefinierten Toleranzbereichs von $\pm 15 \%$ lag. Die maximale relative Abnahme der freien Fraktion zeigte Vancomycin (-8%). Für Clindamycin wurde die maximale relative Zunahme der freien Fraktion gemessen ($+6 \%$). Eine Erhöhung der Zentrifugalkraft von $1000 \times g$ auf $3000 \times g$ hatte somit nur einen geringen Einfluss auf die ermittelten freien Fraktionen; über alle Substanzen ergab sich ein mittlerer Quotient Q_1 von $0,98 \pm 0,03$ ($\pm SD$).

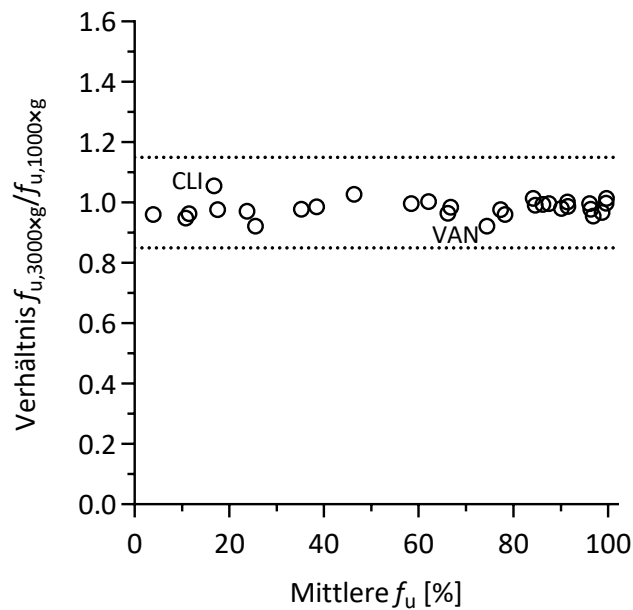


Abbildung 29: Bland-Altman-Diagramm – Einfluss der Zentrifugalkraft (3000 × g gegen 1000 × g)

Bland-Altman-Diagramm der freien Fraktion, bestimmt bei 3000 × g in Relation zu 1000 × g. Die gepunkteten Linien zeigen eine relative Abweichung der f_u um $\pm 15\%$. Alle Werte liegen im Bereich von 0,92 (VAN: Vancomycin) bis 1,06 (CLI: Clindamycin).

In Abbildung 30 ist der Einfluss der Zentrifugalkraft (Verhältnis 10000 × g/1000 × g) in Abhängigkeit der molaren Masse (M) der Substanzen dargestellt. Für Substanzen mit geringem Molekulargewicht, wie Paracetamol, Valproinsäure und Metronidazol, konnte bei der Bestimmung der f_u nur ein geringer Unterschied zwischen der Zentrifugation bei 10000 × g und der Zentrifugation bei 1000 × g festgestellt werden. Es handelt sich hierbei um die drei Substanzen mit der geringsten molaren Masse. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den drei Substanzen mit dem höchsten Molekulargewicht, Vancomycin, Cefiderocol und Ceftolozan, ein deutlicher Einfluss der Zentrifugalkraft auf das Ergebnis der f_u .

Bei 10000 × g konnte eine negative Korrelation zwischen der Variable

$$Q = \frac{f_{u, 10000 \times g}}{f_{u, 1000 \times g}}$$

und der molaren Masse der Substanzen festgestellt werden (Abbildung 30). Dabei erscheinen Ertapenem, Minocyclin und Tigecyclin unvereinbar mit dem negativen Trend der restlichen Werte. Während die relative Abnahme von Ertapenem (-22 %, M 475,5 g/mol) vergleichbar mit der Abnahme von Vancomycin ist (-24 %, M 1450 g/mol), ist die f_u von Tigecyclin (-2 %, M

585,6 g/mol) und Minocyclin (+3 %, M 457,5 g/mol) durch die Erhöhung der Zentrifugalkraft von $1000 \times g$ auf $10000 \times g$ kaum beeinflusst.

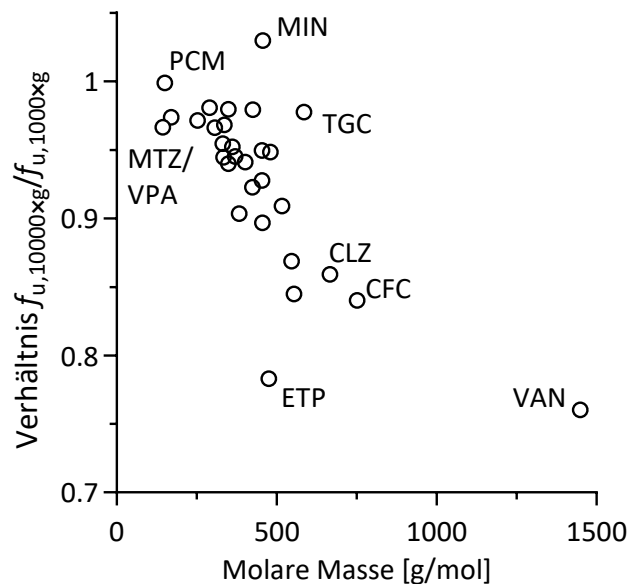


Abbildung 30: Einfluss der Zentrifugalkraft in Abhängigkeit von der molaren Masse

Veranschaulicht ist das Verhältnis der f_u [%], die bei $10000 \times g$ im Vergleich zu der f_u [%], die bei $1000 \times g$ gemessen wurde. Dieses Verhältnis ist aufgetragen gegen die molare Masse [g/mol] der Substanzen. CFC: Cefiderocol, CLZ: Cefotolozan, MIN: Minocyclin, MTZ: Metronidazol, PCM: Paracetamol, TGC: Tigecyclin, ETP: Ertapenem, VPA: Valproinsäure und VAN: Vancomycin.

Aufgrund der kürzeren Zentrifugationszeit (5 min) war bei $10000 \times g$ der pH-Wert des Serums nach der Ultrafiltration etwas geringer $pH = 7,50 \pm 0,09$ ($n = 153$) als unter Anwendung der Referenzmethode $pH = 7,65 \pm 0,08$ ($n = 363$).

3.1.8 Abhängigkeit der freien Fraktion vom Puffer

Während der Ultrafiltration ohne Puffer stieg der pH-Wert in „frischem“ Serum von $pH = 7,69 \pm 0,05$ ($n = 48$) auf $pH = 8,47 \pm 0,13$ ($n = 182$) und in „altem“ Serum von $pH = 8,16 \pm 0,14$ ($n = 64$) auf $pH = 8,69 \pm 0,09$ ($n = 177$) an. In Tabelle 22 sind die freien Fraktionen, die entweder in „frischem“ und/oder „altem“ Serum gemessen wurden, wenn nicht gepuffert wurde, aufgeführt.

Tabelle 22: Die freie Fraktion f_u [%], die bei Verwendung von „frischem“ oder „altem“ Serum unter nicht gepufferten Bedingungen bestimmt wurde (ohne Puffer/37 °C/1000 × g/20 min), sowie der Quotient $Q_1 = f_{u, \text{„altes“ Serum}} / f_{u, \text{„frisches“ Serum}}$ und die gepoolte Auswertung (von „frischem“ und „altem“ Serum), sowie der Quotient $Q_2 = f_{u, \text{Serum, gepoolt}} / f_{u, \text{phosphatgepuffertes Serum}}$

Subst.	f_u [%] „frisches“ Serum ohne Puffer			f_u [%] „altes“ Serum ohne Puffer			Q_1	f_u [%] ohne Puffer gepoolt			Q_2
	n	MW [%]	CV [%]	n	MW [%]	CV [%]		n	MW [%]	CV [%]	
AMP	4	83	1,8	4	81	2,6	0,98	8	82	2,3	0,94
PEN	4	55	5,3	4	55	6,5	1,00	8	55	5,5	0,93
CFZ	10	19	9,9	5	19	9,7	1,00	15	19	9,4	1,05
FEP	4	94	1,2	5	91	2,9	0,97	9	92	2,7	0,93
CFC	4	71	6,4	4	73	6,3	1,02	8	72	5,9	0,90
CTX	10	66	3,4	5	68	2,8	1,02	15	67	3,3	0,99
CAZ	6	98	2,2	6	96	3,1	0,98	12	97	2,7	0,98
CLZ	4	94	0,5	5	89	3,6	0,95	9	91	3,8	0,92
CRO	8	8,1	22	8	8,9	18	1,10	16	8,5	20	0,76
CXM	10	77	3,5	5	79	3,5	1,02	15	78	3,5	0,99
CIP	4	76	3,5	4	74	3,7	0,98	8	75	3,5	0,82
CLI	8	9,8	27	8	7,5	30	0,77	16	8,7	31	0,53
ETP	4	14	16	4	14	17	0,99	8	14	15	0,52
FXN	8	4,8	7,8	8	5,4	8,6	1,13	16	5,1	10	1,25
FLC	4	95	2,6	4	92	2,7	0,97	8	93	2,9	1,02
LVX	4	81	2,4	4	77	2,9	0,96	8	79	3,4	0,82
LZD	6	89	1,8	6	89	2	0,99	12	89	1,9	1,03
MEM	6	95	2,9	6	93	3,3	0,98	12	94	3,2	0,94
MTZ	6	98	0,9	6	97	2,1	0,99	12	98	1,7	1,00
MIN	6	11	50	6	7,2	47	0,64	12	9,2	53	0,24
MXF	4	69	5,7	4	58	11	0,84	8	63	12	0,74
PCM	4	88	0,8	5	87	1,6	0,98	9	87	1,6	1,04
PIP	4	90	2,5	4	82	2,0	0,92	8	86	5,1	0,93
SMX	6	31	7,2	6	33	7,2	1,07	12	32	7,6	0,90
TZD	4	25	4,2	4	24	2,8	0,97	8	24	3,7	1,00
TGC	6	8,1	76	6	3,2	87	0,40	12	5,6	92	0,08
TMP	6	56	4,7	6	55	5,8	0,97	12	55	5,3	0,89
VPA	4	13	50	4	17	43	1,27	8	15	44	1,29
VAN	12	77	3,9	6	79	2,8	1,04	12	78	3,7	1,01
VRC	8	47	2,7	4	44	1,3	0,94	8	46	3,8	1,00

Wenn „altes“ statt „frisches“ Serum verwendet und kein Puffer eingesetzt wurde, war die f_u von Clindamycin, Minocyclin und Tigecyclin deutlich niedriger, die von Moxifloxacin knapp außerhalb des $\pm 15\%$ Toleranzbereichs, während für Valproinsäure eine höhere f_u gemessen wurde (Abbildung 31).

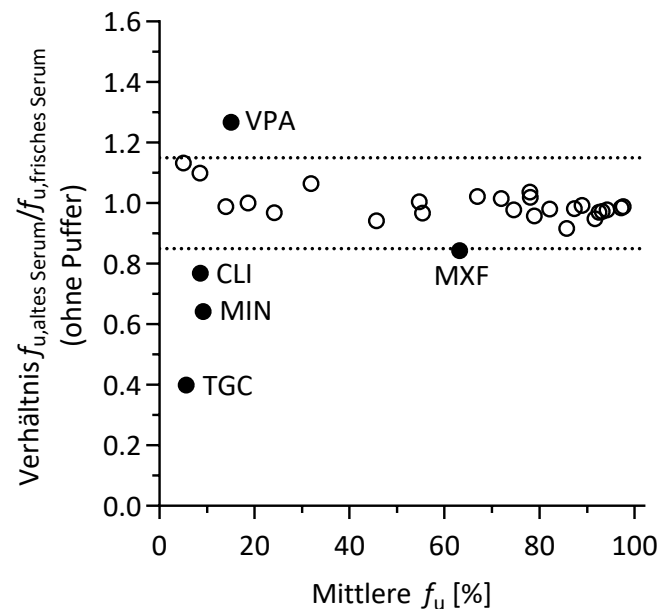


Abbildung 31: Bland-Altman-Diagramm – Vergleich „altes“ Serum gegen „frisches“ Serum, ohne Puffer

Bland-Altman-Diagramm der freien Fraktion bestimmt in „altem“ Serum in Relation zu der freien Fraktion in „frischem“ Serum, wenn kein Puffer eingesetzt wird. Die gepunkteten Linien zeigen eine relative Abweichung der f_u um $\pm 15\%$. Als gefüllte Kreise sind die Substanzen gekennzeichnet, die außerhalb des vordefinierten Toleranzbereichs liegen. CLI: Clindamycin, MIN: Minocyclin, MXF: Moxifloxacin, TGC: Tigecyclin und VPA: Valproinsäure.

Tabelle 23 zeigt ebenfalls den Vergleich der freien Fraktion, die in „frischem“ oder „altem“ Serum gemessen wurde. Im Unterschied zu Tabelle 22 wurde hier jedoch mit Phosphat gepuffert, sodass die Messung gemäß der Referenzmethode erfolgte.

Tabelle 23: Die freie Fraktion f_u [%], die bei Verwendung von „frischem“ oder „altem“ Serum gemessen wurde, wenn das Serum mit Phosphat gepuffert wurde (Phosphatpuffer/37 °C/1000 × g/20 min), sowie der Quotient

$$Q = f_{u, \text{„altes“ Serum + Puffer}} / f_{u, \text{„frisches“ Serum + Puffer}}$$

Subst.	f_u [%] „frisches“ Serum			f_u [%] „altes“ Serum			Q
	Phosphat gepuffert			Phosphat gepuffert			
	n	MW [%]	CV [%]	n	MW [%]	CV [%]	
AMP	8	87	1,3	4	88	2,3	1,01
PEN	10	59	4,3	6	57	5,1	0,96
CFZ	21	18	11	14	18	9,6	1,00
FEP	11	100	0,6	6	98	1,3	0,98
CFC	9	80	1,2	6	80	1,2	1,01
CTX	21	67	3,7	14	68	3,0	1,01
CAZ	14	100	2,1	8	98	3,7	0,98
CLZ	11	100	0,9	6	99	1,9	0,98
CRO	17	11	18	10	11	19	1,02
CXM	21	78	3,4	14	79	2,8	1,01
CIP	8	92	3,2	4	90	3,4	0,98
CLI	16	17	21	8	15	25	0,88
ETP	9	27	13	6	27	14	0,98
FXN	16	4,0	7,9	8	4,1	7,4	1,01
FLC	10	92	3,3	6	89	2,5	0,96
LVX	8	97	2,6	4	95	2,1	0,98
LZD	12	87	2,2	6	86	2,4	0,99
MEM	14	101	2,0	8	99	3,3	0,98
MTZ	14	98	1,7	8	97	2,6	0,99
MIN	12	41	11	6	37	8,7	0,91
MXF	8	85	1,4	4	85	2,8	0,99
PCM	11	84	1,2	6	83	1,4	0,99
PIP	10	94	2,5	6	89	0,8	0,95
SMX	12	36	7,0	6	36	6,8	1,00
TZD	8	24	2,9	4	24	2,5	0,97
TGC	12	70	4,5	6	65	4,5	0,92
TMP	12	63	3,7	6	61	3,7	0,98
VPA	8	11	57	4	12	48	1,10
VAN	12	78	3,6	6	77	3,9	0,99
VRC	8	48	4,0	4	44	4,1	0,91

Aus Abbildung 32 geht hervor, dass der Zusatz von Phosphatpuffer bei Verwendung von „altem“ oder „frischem“ Serum zu vergleichbaren Werten führte (Verhältnis im Mittel über alle Substanzen: $0,98 \pm 0,04$). Durch die Zugabe von Kaliumphosphatpuffer wurde im Mittel ein pH-Wert von $7,55 \pm 0,10$ ($n = 361$) in „frischem“ Serum und ein pH-Wert von $7,69 \pm 0,08$ ($n = 164$) in „altem“ Serum nach der Ultrafiltration erzielt.

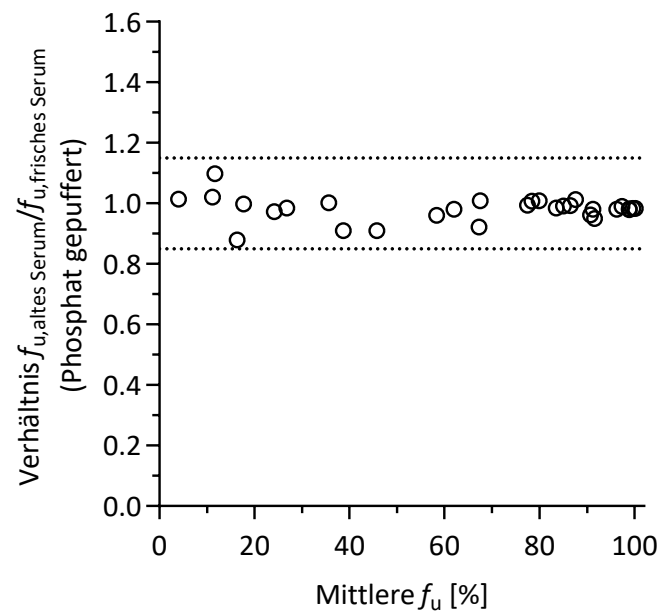


Abbildung 32: Bland-Altman-Diagramm – Vergleich „altes“ Serum gegen „frisches“ Serum, mit Puffer

Bland-Altman-Diagramm der freien Fraktion bestimmt in „altem“ Serum in Relation zu der freien Fraktion in „frischem“ Serum, wenn nach Standardprotokoll mit Kaliumphosphat gepuffert wird. Die gepunkteten Linien zeigen eine relative Abweichung der f_u um $\pm 15\%$.

Die Abhängigkeit der f_u vom pH-Wert ist in Abbildung 33 visualisiert. Gezeigt ist das Bland-Altman-Diagramm, das den Vergleich der f_u darstellt, wenn die Ultrafiltration entweder mit (entspricht phosphatgepuffert, vgl. Tabelle 18) oder ohne (entspricht ohne Puffer, vgl. Tabelle 22) pH-Kontrolle durchgeführt wurde. Ohne die pH-Kontrolle stieg der pH-Wert während der Ultrafiltration auf $\text{pH} = 8,58 \pm 0,16$ an (pH-Werte aus „frischem“ und „altem“ Serum kombiniert). Für Flucloxacillin und Valproinsäure wurde eine höhere freie Fraktion gemessen, während für Ciprofloxacin, Clindamycin, Ceftriaxon, Ertapenem, Levofloxacin, Minocyclin, Moxifloxacin und Tigecyclin eine niedrigere freie Fraktion festgestellt wurde, wenn keine pH-Kontrolle erfolgte.

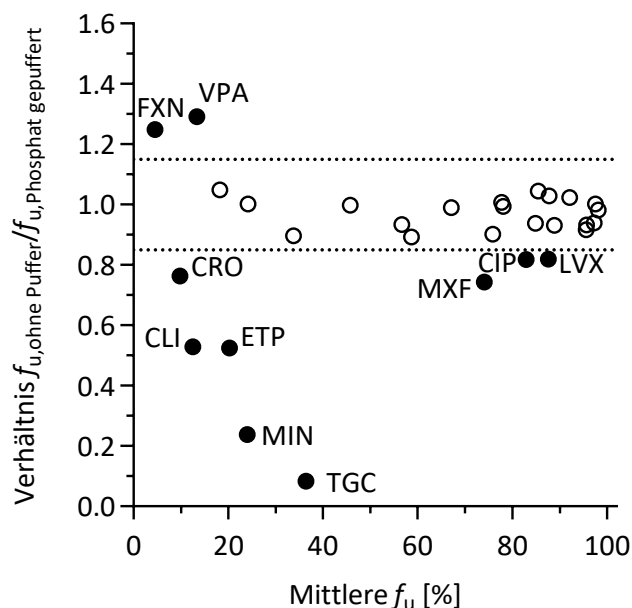


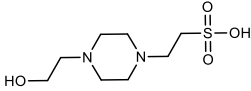
Abbildung 33: Bland-Altman-Diagramm – pH-Abhängigkeit

Bland-Altman-Diagramm der freien Fraktion, bestimmt in ungepuffertem Serum im Vergleich zu phosphatgepuffertem Serum. Die gepunkteten Linien zeigen eine relative Abweichung der f_u um $\pm 15\%$. CIP: Ciprofloxacin, CLI: Clindamycin, CRO: Ceftriaxon, ETP: Ertapenem, FXN: Flucloxacillin, LVX: Levofloxacin, MIN: Minocyclin, MXF: Moxifloxacin, TGC: Tigecyclin und VPA: Valproinsäure.

3.1.9 Einfluss der Auswahl des Puffers

Um den pH-Wert während der Ultrafiltration konstant zu halten, ist die Zugabe eines Puffers erforderlich. In Analogie zur Equilibriumdialyse (ED) wurde für die Referenzmethode Kaliumphosphatpuffer verwendet. Zur Bewertung des Einflusses des Puffersystems wurden ergänzende Messungen mit HEPES-Puffer durchgeführt. Dieser Good's-Puffer wird häufig in biologischen Untersuchungen eingesetzt und fand auch Anwendung bei der Equilibriumdialyse und bei der Ultrafiltration (Van Houcke et al. 2011; Dorn et al. 2018). Die Eigenschaften der verwendeten Puffer sind Tabelle 24 zu entnehmen.

Tabelle 24: Eigenschaften der verwendeten Puffer

Puffer	Relevante Dissoziation/ Struktur	pKs (20 °C)	Temperaturkoeffizient $\Delta\text{pH}/^\circ\text{C}$
Phosphat	$\text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}_3\text{O}^+$	2,1; 7,2; 12,3	-0,0028
HEPES		7,55	-0,014

Eine detailliertere Untersuchung des Einflusses des verwendeten Puffersystems erfolgte für das Cephalosporin Cefiderocol, das eine Katecholseitenkette besitzt (Abbildung 34).

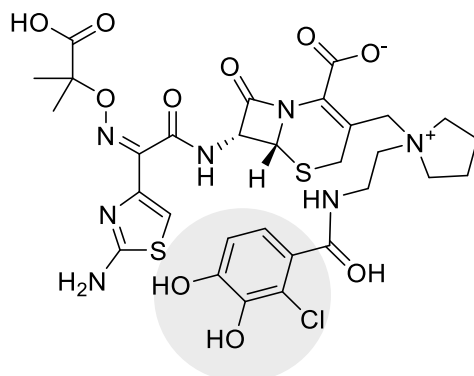


Abbildung 34: Struktur von Cefiderocol.

Grau hinterlegt ist das Chlorkatechol-Strukturelement.

Aus Abbildung 35 A ist zu entnehmen, dass sich für Cefiderocol bei Verwendung von HEPES gepuffertem Serum eine $f_{u, CFC\ HEPES}$ von 67,0 % ergab. Hingegen führte der Einsatz von Phosphatpuffer (100 mM, vgl. Referenzmethode) zu einer deutlich höheren freien Fraktion ($f_{u, CFC\ KPP} = 80,7\%$). Es wurde ein konzentrationsabhängiger Effekt beobachtet, wobei Phosphatkonzentrationen von 100 mM bis 8 mM untersucht wurden. Abbildung 35 B zeigt den Einfluss der Zugabe von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, resultierende Konzentration 10 mM) auf die f_u im jeweiligen Puffersystem. Die Verwendung von HEPES-Puffer ohne EDTA-Zusatz resultierte in einer f_u von 67,8 %, während mit Phosphatpuffer eine f_u von 77,6 % gemessen wurde. Durch die Zugabe von EDTA bei Verwendung von HEPES-Puffer erhöhte sich die f_u auf 74,2 %. Hingegen zeigte die EDTA-Zugabe beim Phosphatpuffer kaum einen Effekt ($f_{u, KPP + 10\text{ mM EDTA}} = 78,5\%$).

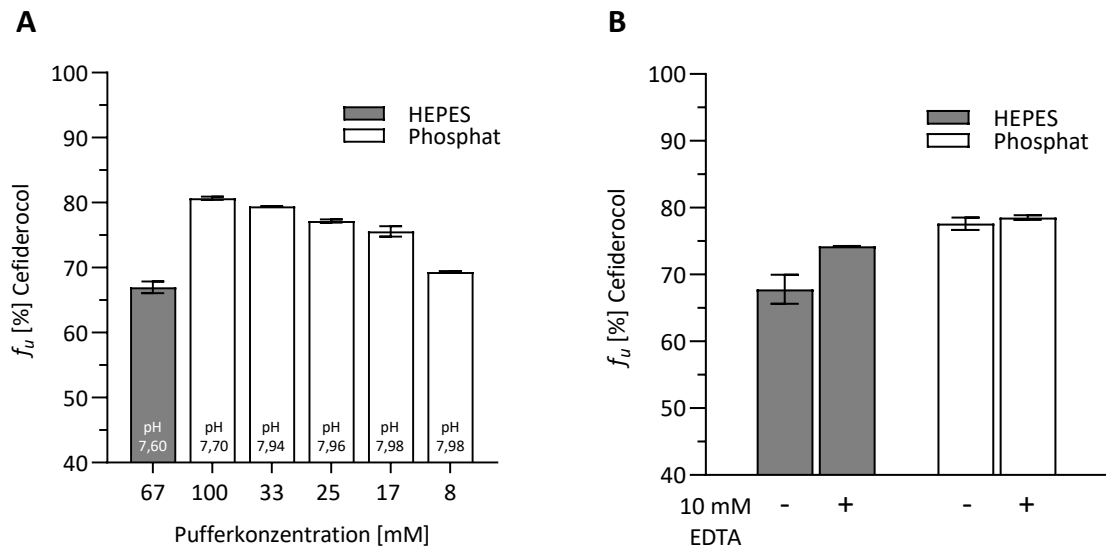


Abbildung 35: Einfluss des Puffersystems – Interaktion von Cefiderocol mit Calciumionen

A Mittlere $f_u \pm SD$ von Cefiderocol in Serum, mit HEPES gepuffert (2 M, final: 67 mM) und mit variierenden Phosphatkonzentrationen gepuffert (final: 100 mM (entspricht der Referenzmethode), 33 mM, 25 mM, 17 mM und 8 mM).

B Mittlere $f_u \pm SD$ von Cefiderocol gepuffert mit HEPES- (67 mM) oder Phosphatpuffer (100 mM); ohne (-)/mit (+) 10 mM EDTA.

Der Effekt von EDTA auf die Plasmaproteinbindung wurde auch für Ertapenem untersucht (Abbildung 36).

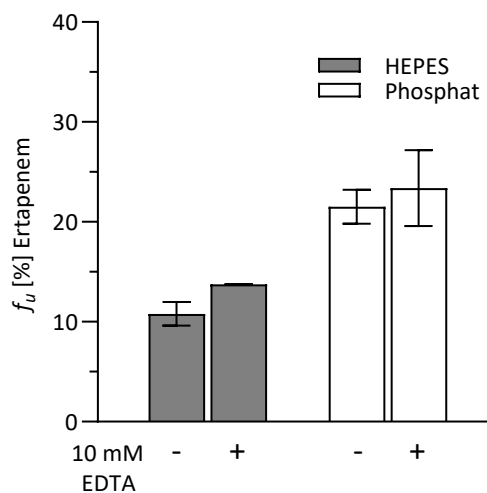


Abbildung 36: Einfluss des Puffersystems auf die f_u von Ertapenem

Mittlere $f_u \pm SD$ von Ertapenem gepuffert mit HEPES- oder Phosphatpuffer; ohne (-)/mit (+) 10 mM EDTA.

Mit HEPES-gepuffertem Serum wurde ohne EDTA eine f_u von 10,8 % gemessen und unter Einsatz von Phosphatpuffer eine f_u von 21,5 %. Unter EDTA-Zusatz konnte im HEPES-gepufferten Serum eine f_u von 13,7 % und im phosphatgepufferten Serum eine f_u von 23,4 % bestimmt werden (Abbildung 36). Der direkte Vergleich der freien Fraktion nach HEPES- und Phosphatpufferung lieferte für die meisten Substanzen ähnliche Ergebnisse (Tabelle 25).

Tabelle 25: Freie Fraktion f_u [%] in mit HEPES- oder phosphatgepuffertem Serum ($1000 \times g/37^\circ\text{C}/20 \text{ min}$) sowie der Quotient $Q = f_{u, \text{HEPES}}/f_{u, \text{Phosphat}}$ und die absolute Differenz (Diff.) = $f_{u, \text{HEPES}} - f_{u, \text{Phosphat}}$

Subst.	f_u [%]			f_u [%]			Q	Diff. [%]
	HEPES-gepuffert			Phosphat-gepuffert				
	n	MW [%]	CV [%]	n	MW [%]	CV [%]		
AMP	6	78	5,1	6	81	5,3	0,96	-3,1
PEN	6	53	1,1	6	55	1,1	0,96	-2,4
CFZ	6	22	9,9	6	20	9,9	1,14	2,7
FEP	12	101	1,8	12	102	2,4	1,00	-0,4
CFC	10	67	6,1	6	77	1,1	0,86	-10,5
CTX	6	69	3,5	6	71	3,2	0,97	-1,8
CAZ	6	98	0,6	6	100	0,6	0,99	-1,3
CLZ	12	94	3,2	12	99	3,9	0,95	-5,0
CRO	10	8	18	6	11	12	0,69	-3,4
CXM	12	80	3,0	12	82	2,8	0,98	-1,7
CIP	10	83	3,4	6	92	2,9	0,90	-9,0
CLI	8	15	20,0	8	14	18	1,07	1,0
ETP	10	13	18	6	25	15	0,52	-12,0
FXN	6	3,9	14	6	4,1	7,2	1,17	0,6
FLC	6	92	0,6	6	90	0,4	1,02	1,8
LVX	10	88	2,9	6	97	2,3	0,91	-8,3
LZD	6	89	0,5	6	85	0,2	1,05	3,9
MEM	6	98	0,4	6	102	0,3	0,96	-3,7
MTZ	6	96	0,4	6	95	0,4	1,01	0,9
MIN	12	36	17	12	39	10,6	0,93	-2,6
MXF	10	78	2,5	6	86	1,9	0,91	-7,9
PCM	6	91	0,6	6	88	1,0	1,03	3,0
PIP	6	91	0,6	6	91	0,9	1,01	0,5
SMX	6	29	4,1	6	34	3,9	0,86	-4,8
TZD	6	25	2,9	6	26	7,0	0,99	-0,1
TGC	12	51	17	12	67	6,0	0,76	-16,0
TMP	6	64	2,3	6	60	3,5	1,06	3,4
VPA	6	11	42	6	9,7	43	1,00	0,0
VAN	12	74	3,5	12	77	3,6	0,96	-3,4
VRC	2	51	3,5	2	47	1,2	1,09	4,2

Für die Fluorchinolone, Tigecyclin, Cefiderocol und Ertapenem war die freie Fraktion unter Verwendung von HEPES-Puffer deutlich niedriger (Abbildung 37).

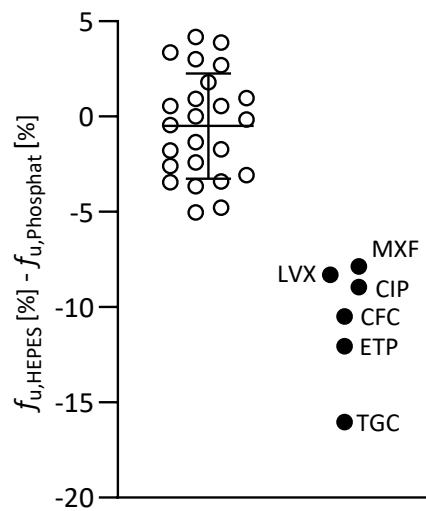


Abbildung 37: Absoluter Unterschied der f_u [%] zwischen HEPES- bzw. phosphatgepuffertem Serum

Die horizontale Linie und die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert \pm SD. CIP: Ciprofloxacin, CFC: Cefiderocol, ETP: Ertapenem, LVX: Levofloxacin, MXF: Moxifloxacin und TGC: Tigecyclin.

3.2 Isokratische HPLC-Methode zur simultanen Bestimmung von Ceftazidim und Avibactam

3.2.1 Chromatographie und Methodenetablierung

Der Abbildung 38 sind die UV-Spektren von Ceftazidim und Avibactam zu entnehmen. Ceftazidim hat sein Absorptionsmaximum bei 255 nm und Avibactam zeigt aufgrund eines fehlenden Chromophors nur Absorption im kurzwelligen Bereich.

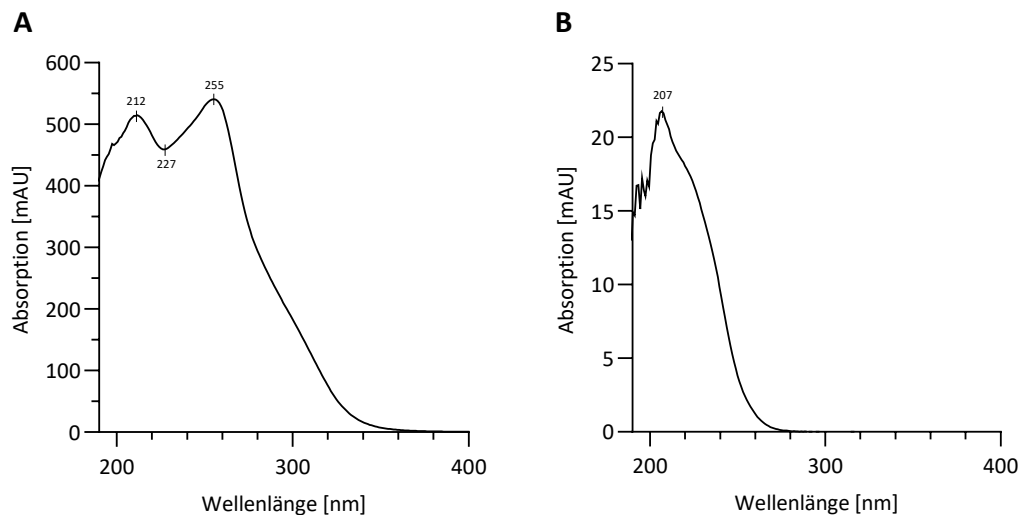


Abbildung 38: UV-Spektren von Ceftazidim und Avibactam

A Ceftazidim: $\lambda_{\max 1} = 212 \text{ nm}$, $\lambda_{\max 2} = 255 \text{ nm}$. **B** Avibactam: $\lambda_{\max} = 207 \text{ nm}$.

Um ein geeignetes System zu finden, wurde das Retentionsverhalten von Ceftazidim und Avibactam in Abhängigkeit von der Tetrabutylammonium-Konzentration (TBA-Konzentration) bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht (Abbildung 39 A und B). Bei pH 2,5 stieg die Retention von Avibactam mit zunehmender TBA-Konzentration (0-10 mM) steil an, während die Retention von Ceftazidim abnahm. Hingegen zeigten beide Substanzen eine Zunahme der Retention mit steigender TBA-Konzentration, wenn der pH-Wert des Eluenten 6,5 betrug. Diese Zunahme war bei Avibactam stärker ausgeprägt, während Ceftazidim bei 2-5 mM TBA ein Plateau erreichte, gefolgt von einer leichten Abnahme der Retention bei noch höherer TBA-Konzentration (besser erkennbar bei halblogarithmischer Skalierung, Abbildung 39 B).

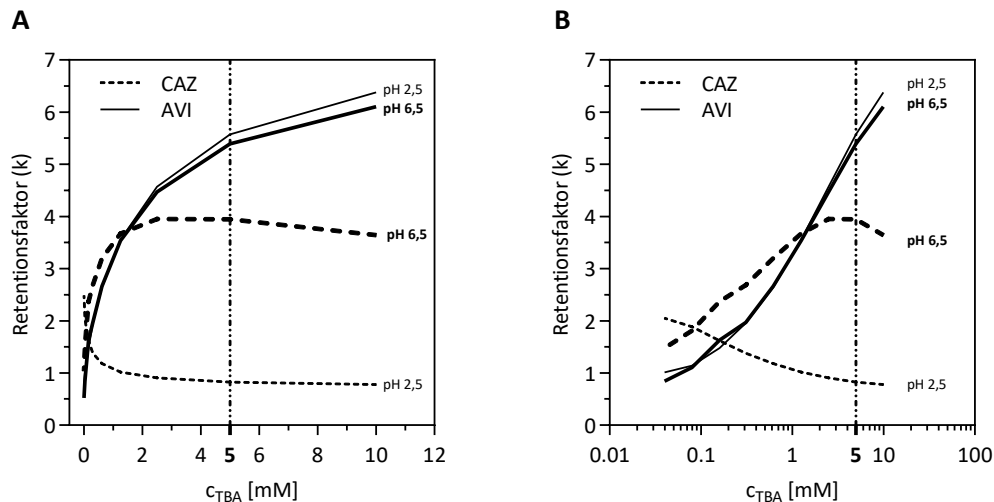


Abbildung 39: Retentionsfaktoren von CAZ und AVI als Funktion der TBA-Konzentration

Abhängigkeit des Retentionsfaktors (k) von Cefprozid (CAZ, gestrichelte Linie) und Avibactam (AVI, durchgezogene Linie) von der Tetrabutylammoniumhydrogensulfat-Konzentration (c_{TBA}) bei pH 2,5 und pH 6,5 (breitere Linien). Eluent: 20 mM Natriumphosphatpuffer/Acetonitril 92:8 (V/V) mit 0-10 mM TBA. Finale $c_{TBA} = 5$ mM. **A** Lineare Skalierung. **B** Halblogarithmische Skalierung.

Obwohl die starke Änderung des Retentionsfaktors (k) bei niedrigen TBA-Konzentrationen großes Potenzial für die Einflussnahme auf die Selektivität versprach, gelang es nicht, interferenzfreie Chromatogramme zu erzielen (Abbildung 40). Chromatogramm A zeigt eine Interferenz bei der Retentionszeit von Cefprozid und Chromatogramm B eine Interferenz an der Stelle, an der Avibactam zu erwarten wäre.

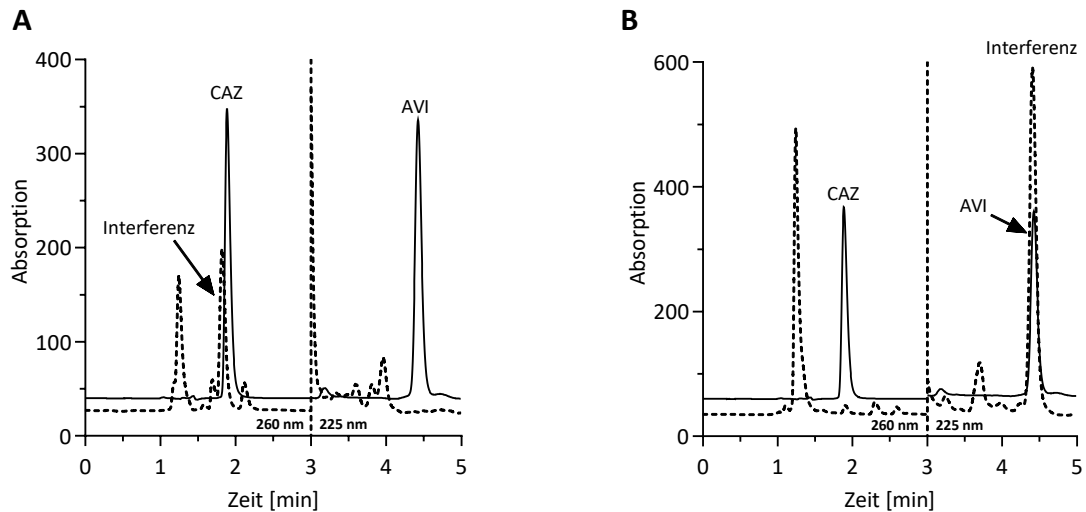


Abbildung 40: Chromatogramme von CAZ und AVI, die interferierende Matrixbestandteile zeigen

Chromatogramme von Ceftazidim (CAZ) und Avibactam (AVI) 30/15 mg/L in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,0 (durchgezogene Linie) und Leerserum eines gesunden Probanden (gestrichelte Linie) nach **A** Probenvorbereitung für die totalen Konzentrationen und **B** Ultrafiltration für die freien Konzentrationen. Das Signal bei 225 nm (ab der Retentionszeit von 3 min und damit auch das Avibactam-Signal) wurde um den Faktor 20 verstärkt. Eluent: 0,1 M Natriumphosphatpuffer/Acetonitril 92:8 (v/v), 1 mM TBA, pH 2,5. Säule: XBridge BEH C18 2,5 μ 100 \times 3 mm.

Durch Erhöhung der TBA-Konzentration auf 5 mM konnte bei pH 6,5 sowohl für die totalen als auch für die freien Konzentrationen ein interferenzfreies Chromatogramm erzielt werden (Abbildung 41, n = 9). Daher bestand die endgültige mobile Phase aus 20 mM Natriumphosphatpuffer/Acetonitril 90:10 (v/v) mit 5 mM TBA und einem pH-Wert von 6,5.

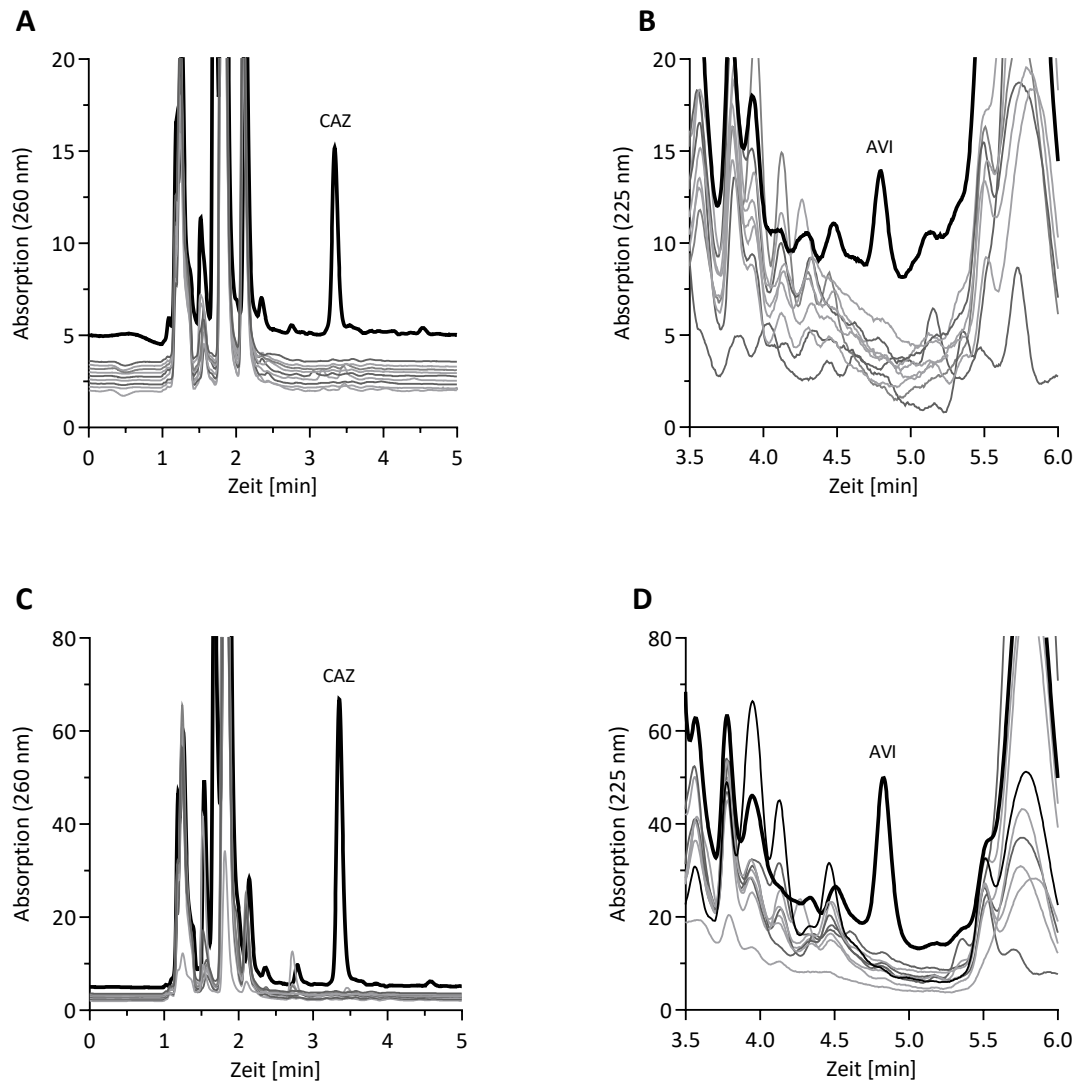


Abbildung 41: Chromatogramme von CAZ und AVI in Serum und von Leerserum gesunder Probanden

Chromatogramme von Leerserum gesunder Probanden (n = 9, graue Linien) nach der Probenvorbereitung für die Bestimmung der totalen Konzentrationen **A & B** bzw. nach der Ultrafiltration für die Bestimmung der freien Konzentrationen **C & D**. Schwarze Linie: Chromatogramm von Leerserum, das mit 4/1 mg/L (A/B) oder 8/2 mg/L (C/D) Ceftazidim/Avibactam dotiert wurde. Eluent: 20 mM Natriumphosphatpuffer/Acetonitril 90:10 (v/v), 5 mM TBA, pH 6,5. Säule: XBridge BEH C18 2,5 μ 100 \times 3 mm.

3.2.2 Methodenvalidierung

Eine Übersicht der Validierungsparameter ist Tabelle 26 zu entnehmen. Als Nachweisgrenze (*Lower Limit of Detection*, LLOD) wurde für Ceftazidim 10 pg *on column* und für Avibactam 50 pg *on column* experimentell bestimmt (Signal-Rausch-Verhältnis = 3). Ein linearer Zusammenhang zwischen Signal und Konzentration wurde für Ceftazidim/Avibactam in Serum ($R > 0,9996 / > 0,9995$) und in 0,9 %iger NaCl-Lsg. ($R > 0,9997 / > 0,9998$) nachgewiesen, für Konzentrationen von 1-300 mg/L für Ceftazidim und von 0,5-150 mg/L für Avibactam.

Die niedrigsten Konzentrationen der Kalibriergeraden wurden jeweils als konservative Werte für die Bestimmungsgrenzen festgesetzt (*Lower Limit of Quantitation*, LLOQ). Zudem erfolgte eine Bestimmung auf Grundlage der Standardabweichung und Steigung der Kalibriergeraden (LLOQ_{10σ}). Die Wiederfindung aus dem Serum war für Ceftazidim und Avibactam bei $97,7 \pm 1,8 \%$ und $98,7 \pm 1,4 \%$. Basierend auf In-Prozess-Qualitätskontrollproben (QK) lag der Variationskoeffizient (Coefficient of Variation, CV) der Intra- und Inter-Assay-Präzision in Serum bei $< 2 \%$ bzw. $< 3 \%$. Die Richtigkeit der Bestimmung der totalen Konzentrationen von Ceftazidim und Avibactam in Serum lag zwischen 99,0 % und 104 %.

Es wurden freie Fraktionen von $97,9 \pm 2,0 \%$ (CV 2,0 %) für Ceftazidim und $99,4 \pm 3,2 \%$ (CV 3,2 %) für Avibactam in den QK-Proben ($n = 12$) gemessen. Die Intra-Assay-Präzision der Bestimmung der freien Konzentrationen betrug $< 1 \%$. Für die Bestimmung der freien Konzentrationen kann die Richtigkeit nicht angegeben werden, da das Ausmaß der Plasmaproteinbindung in einer bestimmten Probe nicht bekannt ist (Nilsson 2013).

Tabelle 26: Validierungsdaten (Mittelwert \pm SD) für die Bestimmung (A) der totalen und (B) der freien Konzentrationen von Ceftazidim und Avibactam.

(A)		Totale Konzentrationen	
		Ceftazidim	Avibactam
Standards in		Serum	
Linearität ^{a)} [mg/L]		1-300	0,5-150
R		> 0,9996	> 0,9995
LLOQ _{10σ} ^{b)} [mg/L]		0,33	0,27
LLOQ ^{b)} [mg/L]		1	0,5
CV _{inter} ^{c)} [%]		0,27-1,3	0,74-2,4
Recovery [%]		97,7 ± 1,8	98,7 ± 1,4
In-Prozess Validierung			
AS-Stabilität ^{d)} [%]		102 ± 2,9	99,9 ± 5,5
Re-Analyse [%]		104 ± 2,5	101 ± 2,6
QKs in		Serum	
CV _{intra} [%]		80 mg/L: 0,86	20 mg/L: 0,85
		20 mg/L: 0,78	5 mg/L: 0,52
		4 mg/L: 1,6	1 mg/L: 1,3
CV _{inter} [%]		80 mg/L: 0,76	20 mg/L: 0,88
		20 mg/L: 0,77	5 mg/L: 1,2
		4 mg/L: 1,5	1 mg/L: 3,0
Richtigkeit [%]		80 mg/L: 102	20 mg/L: 104
		20 mg/L: 101	5 mg/L: 102
		4 mg/L: 103	1 mg/L: 99,0

a) Kalibrierung nach $y = B_0 + B_1 \cdot x$ mit Wichtungsfaktor $(1/y^2)$.

b) Lower Limit of Quantification (LLOQ_{10σ}) berechnet mit der 10-Sigma-Methode und „konservativ“ bestimmter Lower Limit of Quantification (LLOQ).

c) Variationskoeffizient (CV) der rückberechneten Konzentrationen der Kalibrierungsstandards.

d) Autosampler-Stabilität (AS-Stabilität) der prozessierten Proben (6 °C/16-24 h).

e) 0,9 % NaCl-Lsg. wurde als Surrogat für Serumultrafiltrat verwendet.

f) Gemessen in gepooltem Serum von zwei gesunden Probanden (je n = 6).

g) ND = nicht durchgeführt: Kontrollproben in Einfachbestimmung.

h) NA = nicht anwendbar: Richtigkeit kann nicht angegeben werden, da das Ausmaß der Plasmaproteinbindung in der dotierten Serumprobe unbekannt ist.

(B)		Freie Konzentrationen		
		Ceftazidim	Avibactam	
Standards in		0,9 % NaCl ^{e)}		
Linearität ^{a)} [mg/L]		1-300	0,5-150	
R		> 0,9997	> 0,9998	
LLOQ _{10σ} ^{b)} [mg/L]		0,26	0,14	
LLOQ ^{b)} [mg/L]		1	0,5	
CV _{inter} ^{c)} [%]		0,20-1,3	0,20-2,0	
Recovery [%]		NA	NA	
In-Prozess Validierung				
f_u ^{f)} [%]		80 mg/L: 97,1 ± 1,7 8 mg/L: 98,7 ± 2,1	20 mg/L: 99,4 ± 3,0 2 mg/L: 99,4 ± 3,7	
AS-Stabilität ^{d)} [%]		99,0 ± 1,1	102 ± 3,0	
Re-Analyse [%]		ND	ND	
QKs in	Serum	0,9 % NaCl ^{a)}	Serum	0,9 % NaCl ^{a)}
CV _{intra} [%]	ND ^{g)}	ND ^{g)}	ND ^{g)}	ND ^{g)}
CV _{inter} [%]	80 mg/L: 1,7	80 mg/L: 1,8	20 mg/L: 3,0	20 mg/L: 1,5
	8 mg/L: 2,1	8 mg/L: 2,3	2 mg/L: 3,7	2 mg/L: 2,3
Richtigkeit [%]	NA ^{h)}	80 mg/L: 99,5 ± 1,6	NA ^{h)}	20 mg/L: 101 ± 1,6
		8 mg/L: 100 ± 2,2		2 mg/L: 101 ± 2,6

a) Kalibrierung nach $y = B_0 + B_1 \cdot x$ mit Wichtungsfaktor $(1/y^2)$.

b) Lower Limit of Quantification (LLOQ₁₀₀) berechnet mit der 10-Sigma-Methode und „konservativ“ bestimmter Lower Limit of Quantification (LLOQ).

c) Variationskoeffizient (CV) der rückberechneten Konzentrationen der Kalibrierungsstandards.

d) Autosampler-Stabilität (AS-Stabilität) der prozessierten Proben (6 °C/16-24 h).

e) 0,9 % NaCl-Lsg. wurde als Surrogat für Serumultrafiltrat verwendet.

f) Gemessen in gepooltem Serum von zwei gesunden Probanden (je n = 6).

g) ND = nicht durchgeführt: Kontrollproben in Einfachbestimmung.

h) NA = nicht anwendbar: Richtigkeit kann nicht angegeben werden, da das Ausmaß der Plasmaproteinbindung in der dotierten Serumprobe unbekannt ist.

3.2.3 Stabilität von Ceftazidim und Avibactam

Die Autosampler-Stabilität (6 °C/20-24 h) von Ceftazidim und Avibactam in prozessierten Serumproben betrug $102 \pm 2,9 \%$ bzw. $99,9 \pm 5,5 \%$ für die totalen Konzentrationen sowie $99,0 \pm 1,1 \%$ bzw. $102 \pm 3,0 \%$ für die freien Konzentrationen.

Zusätzlich wurden Studienproben von Patienten ($n = 12$), die über einen Zeitraum von elf Monaten bei -70 °C gelagert wurden reanalysiert. Die gemessenen totalen Konzentrationen betrugen für Ceftazidim $104 \pm 2,5 \%$ und für Avibactam $101 \pm 2,6 \%$ der ursprünglichen Werte.

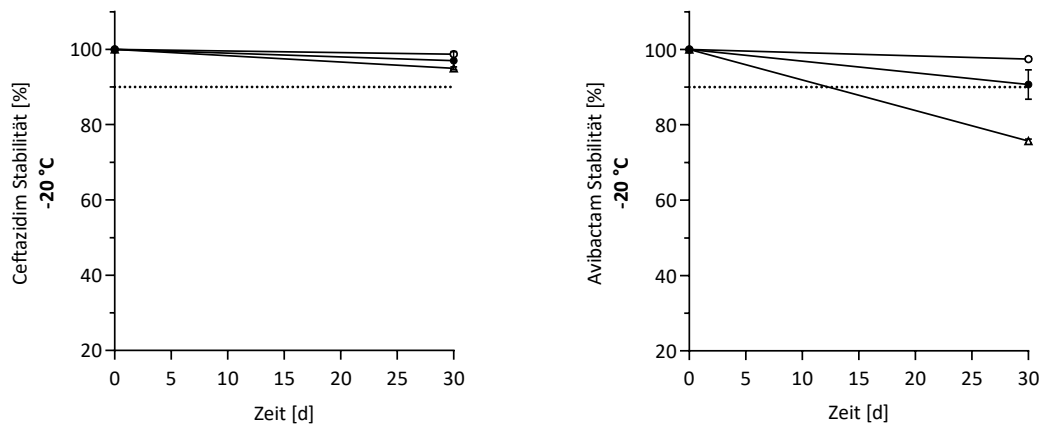
Bei -70 °C waren die Serumstandards für die beiden Substanzen mindestens über einen Zeitraum von vier Monaten stabil (Ceftazidim: $101 \pm 3,0 \%$, Avibactam: $94,6 \pm 4,8 \%$). Die Stammlösungen (in 10 mM Phosphatpuffer, pH 6) wiesen über einen Zeitraum von fünf Monaten eine Stabilität von $101 \pm 0,55 \%$ für Ceftazidim und $99,0 \pm 1,4 \%$ für Avibactam auf.

Weitere Ergebnisse zur Stabilität von Ceftazidim und Avibactam bei -20 °C (für einen Monat), bei 6 °C (für eine Woche) sowie bei Raumtemperatur (für vier Tage) sind in Abbildung 42 dargestellt. Diese Daten umfassen Stabilitätsmessungen in Serum, in 0,9 %iger NaCl-Lsg. sowie in 10 mM Phosphatpuffer (pH 6), der für die Herstellung der Stammlösungen verwendet wurde. In 0,9 %iger NaCl-Lsg. sowie in 10 mM Phosphatpuffer (pH 6) erwiesen sich beide Substanzen unter allen getesteten Bedingungen als stabil.

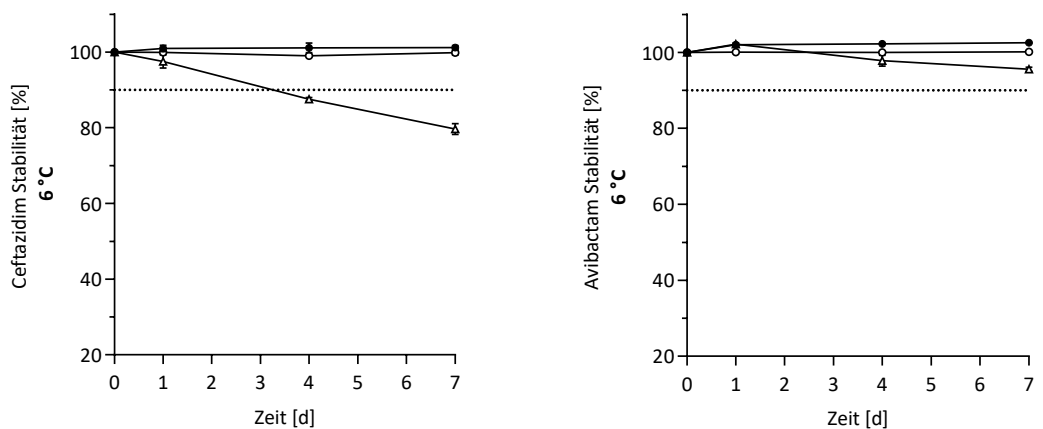
Ceftazidim war in Serum für 30 Tage bei -20 °C stabil, unterschritt jedoch bei 6 °C bereits nach vier Tagen die 90 % Stabilitätsgrenze (Stabilität (4 d): $87,5 \pm 0,44 \%$, Stabilität (7 d): $79,7 \pm 1,4 \%$). Bei Raumtemperatur wurde diese Grenze schon nach 24 Stunden unterschritten (Stabilität (24 h): $71,2 \pm 1,2 \%$, Stabilität (4 d): $30,8 \pm 0,32 \%$).

Avibactam zeigte im Serum über einen Zeitraum von bis zu sieben Tagen bei 6 °C sowie bis zu vier Tagen bei Raumtemperatur stabile Konzentrationen. Nach Lagerung bei -20 °C über 30 Tage wurden hingegen nur noch $75,7 \pm 0,52 \%$ der Ausgangskonzentration gemessen.

Stabilität bei -20 °C



Stabilität bei 6 °C



Stabilität bei Raumtemperatur

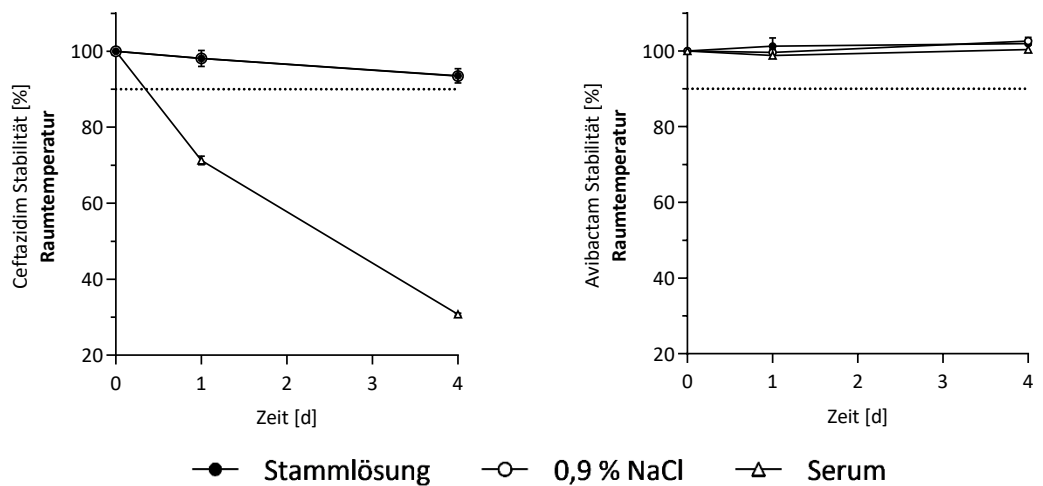


Abbildung 42: Lagerstabilität von Ceftazidim und Avibactam

Stabilität (Mittelwerte \pm SD) von Ceftazidim (links) und Avibactam (rechts) in 10 mM Phosphatpuffer (Stammlösung; Konzentrationen: 5 g/L Ceftazidim, 2 g/L Avibactam, $n = 3$), 0,9 %iger NaCl-Lsg. und dotiertem Probandenserum (Konzentrationen: 80/20 mg/L Ceftazidim/Avibactam, je $n = 3$). Lagerbedingungen: -20 °C, 6 °C und Raumtemperatur. Die Ergebnisse werden in Prozent der Ausgangskonzentration angegeben. Als gepunktete Linie ist die 90 %-Stabilitätsgrenze eingezeichnet.

3.2.4 Analyse von Ceftazidim und Avibactam in Patientenplasma

Plasmaproben von Patienten wurden mittels der beschriebenen Methode vermessen. Ceftazidim und Avibactam eluierten nach 3,3 min bzw. 4,8 min. Für Ceftazidim und Avibactam konnten bei der gewählten Fließmittelzusammensetzung keine Interferenzen beobachtet werden (Abbildung 43).

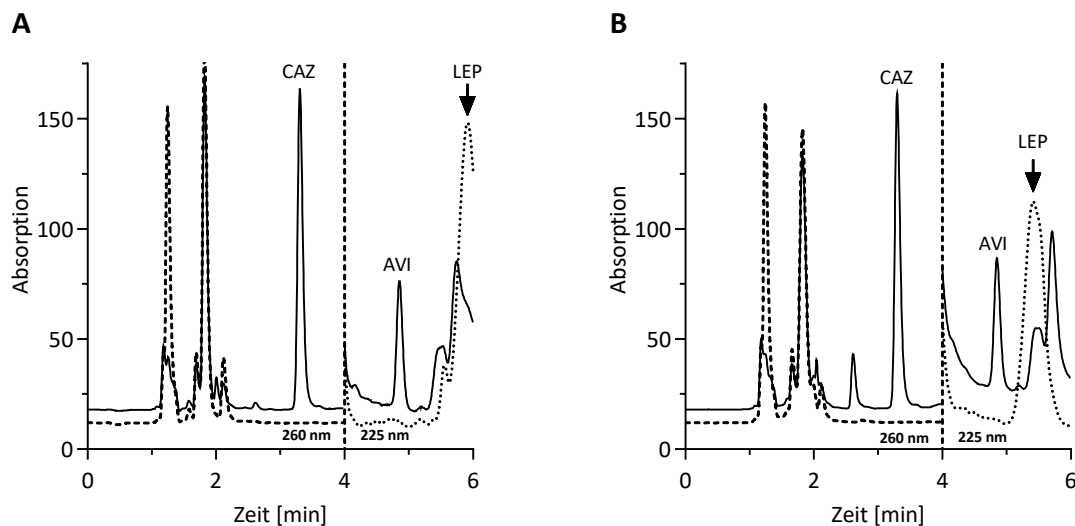


Abbildung 43: Chromatogramme von Patientenplasma

vor (gestrichelte/gepunktete Linie) oder acht Stunden nach intravenöser Infusion von Ceftazidim/Avibactam (CAZ/AVI) 2,0/0,5 g (durchgezogene Linie). **A** Totale Konzentrationen 20,3/3,6 mg/L, **B** freie Konzentrationen 19,5/3,6 mg/L von CAZ/AVI. Das Signal bei 225 nm (ab der Retentionszeit von 3 min und damit auch das Avibactam-Signal) wurde um den Faktor 20 verstärkt. Eluent: 20 mM Natriumphosphatpuffer/Acetonitril 90:10 (v/v), 5 mM TBA, pH 6,5. Säule: XBridge BEH C18 2,5 μ 100 \times 3 mm. LEP: Late Eluting Peak.

Abbildung 44 zeigt den Plasmakonzentrations-Zeit-Verlauf von Ceftazidim und Avibactam im Plasma eines Patienten nach einer Infusion von 2,0/0,5 g/L Ceftazidim/Avibactam. Es wurde zudem die freie Fraktion in Patientenplasma bestimmt. Die freie Fraktion (MW \pm SD) lag bei $95,9 \pm 1,5$ % für Ceftazidim und bei $98,8 \pm 4,0$ % für Avibactam (n = 12).

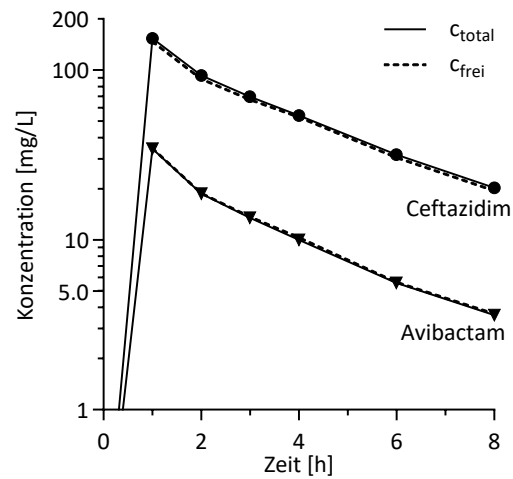


Abbildung 44: Konzentrations-Zeit-Verlauf von Ceftazidim und Avibactam

Repräsentativer Konzentrations-Zeit-Verlauf von Ceftazidim (Kreise) und Avibactam (Dreiecke) im Plasma eines Patienten, der eine Infusion von Ceftazidim/Avibactam 2/0,5 g erhielt. Durchgezogene Linie: Totale Konzentration (C_{total}) und gestrichelte Linie: Freie Konzentration (C_{frei}).

4 Diskussion

4.1 Chromatographische Trennung

4.1.1 HPLC-Trennsystem

Für die vorliegende Arbeit wurden auf Basis früherer Untersuchungen isokratische HPLC-Methoden mit photometrischer Detektion entwickelt, mit denen bis zu drei Substanzen gleichzeitig bestimmt werden konnten, sodass gegenüber einer einzelnen Analyse Zeit und Kosten eingespart werden konnten (McWhinney et al. 2010; Kratzer et al. 2014; Kratzer, Kees und Dorn 2016; Dorn et al. 2018; Dorn et al. 2019; Dorn et al. 2020; Schießler et al. 2021). Dazu wurden anhand von Literaturdaten und Daten des Arbeitskreises die Substanzen nach ihrem Retentionsverhalten sortiert. Der Acetonitrilgehalt wurde so gewählt, dass der Retentionsfaktor der einzelnen Substanzen zwischen 2 und 10 betrug, was einer Analysenzeit von ca. zehn Minuten entsprach (vgl. Tabelle 16). Große Retentionsfaktoren bedeuten nicht nur lange Analysenzeiten, sondern auch kleinere und breitere Peaks, d.h. geringere Empfindlichkeit. Gleichzeitig wurde für die Trennung der Substanzen nicht die kürzestmöglichen Analysenzeiten gewählt, da die Auflösung geringer ist, je geringer der Retentionsfaktor ist. In biologischer Matrix gilt als Faustregel, dass der Retentionsfaktor (k) ≥ 2 sein sollte. Bei geringem Retentionsfaktor droht, dass die Substanzen mit der Front eluieren oder dass die Auflösung zu gering ist, insbesondere in Serum von Intensivpatienten mit Polymedikation oder Organversagen.

Betalactame sind sehr hydrophile Substanzen. Die für die pharmakologische Wirkung essenzielle Carbonsäuregruppe liegt bei physiologischem pH deprotoniert vor, d.h. Betalactame haben ionischen Charakter und werden an *reversed-phase* Kieselgel kaum retiniert. Exemplarisch ist für Flucloxacillin gezeigt, wie sich der Retentionsfaktor in Abhängigkeit vom pH-Wert bei einer Substanz mit Carboxylgruppe ändert (vgl. Abbildung 7). Die Carboxylgruppe von Flucloxacillin liegt bei niedrigem pH-Wert undissoziiert vor. Dadurch nimmt das Molekül lipophileren Charakter an und die Wechselwirkungen mit der stationären Phase sind stärker ausgeprägt als bei einem höherem pH-Wert, bei welchem das Dissoziationsgleichgewicht auf der Seite der dissoziierten, anionischen Form liegt. Cephalosporine und Carbapeneme wurden bei pH 2,5-3 analysiert. Analog sinkt die Retention von Substanzen (Clindamycin, Trimethoprim, Tigecyclin und Minocyclin) mit einer

Aminfunktion, die bei physiologischem pH teilweise unprotoniert, d.h. lipophil, vorliegt, mit fallendem pH-Wert. Die amphoteren Fluorchinolone haben das Maximum ihrer Lipophilie im Bereich des physiologischen pH-Wertes und eluieren früher bei niedrigem oder höherem pH. Dabei sind der Erhöhung des pH-Wertes des Eluenten über 8, um eine schnellere Elution zu erreichen, aufgrund der Instabilität der meisten *reversed phase* Kieselgelmaterialien im alkalischen Bereich Grenzen gesetzt. Bei der Analyse von Serum von Intensivpatienten hat sich die Modulation des pH-Wertes auch als nützliches Instrument erwiesen, um Interferenzen zu vermeiden (Budvári-bárány et al. 1991).

Die simultane Bestimmung von Ceftazidim und Avibactam bei niedrigem pH gelang nicht. Zwar lag Ceftazidim bei pH 3 und einem Acetonitrilgehalt von 8 % in der mobilen Phase mit einem Retentionsfaktor von 2,5 im gewünschten Bereich, jedoch eluierte Avibactam noch immer mit der Front (McWhinney et al. 2010; Jin, Jin und Maeng 2014). Dies liegt an der stark sauren Hydrogensulfatgruppe des Avibactams, die auch bei pH 2,5 noch dissoziiert ist. Andererseits eröffnete dies jedoch die Möglichkeit, die Retention von Avibactam selektiv durch Ionenpaarbildung mit einem Tetrabutylammonium (TBA) Salz als Gegenion selektiv zu erhöhen, weil unter diesen Bedingungen die Carboxylgruppe von Ceftazidim protoniert ist und kein Ionenpaar mit TBA bilden kann. Tatsächlich bewirkten schon 1 mM TBA eine starke Erhöhung der Retention von Avibactam auf einen Retentionsfaktor von 2,5. Leider verringerte sich die Retention von Ceftazidim aufgrund einer Abstoßungsreaktion zwischen dem positiv geladenen TBA, welches über die Alkylketten an die stationäre Phase gebunden ist, und der positiv geladenen Pyridinium-Gruppe von Ceftazidim (vgl. Abbildung 39 und Abbildung 45). Dieser Mechanismus wird auch als dynamischer Ionenaustauschmechanismus beschrieben, weil die Retention sowohl durch die lipophilen Wechselwirkungen des nach außen ungeladenen Ionenpaars mit der stationären Phase als auch durch direkte Interaktionen mit dem an der stationären Phase „verhakten“ TBA bestimmt wird, wodurch die stationäre Phase zu einer Art Ionenaustauscher wird. Die Abstoßung geladener Moleküle von der mit Ionenpaarreagenz beladenen stationären Phase wird in der Literatur auch als „*charge exclusion phenomenon*“ beschrieben (Bidlingmeyer et al. 1979).

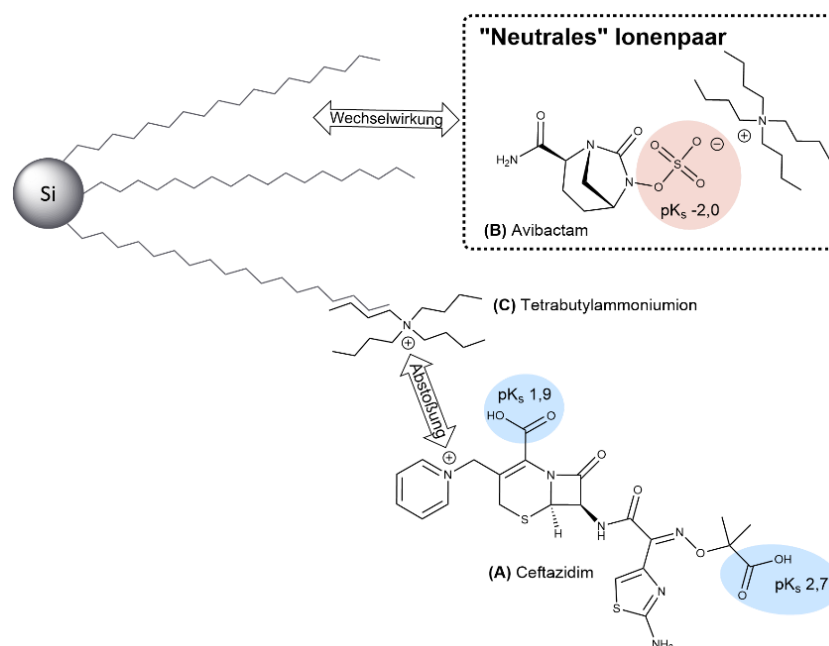


Abbildung 45: Ionenpaarchromatographie von Ceftazidim und Avibactam

Chemische Strukturen und pK_s -Werte von (A) Ceftazidim und (B) Avibactam und die Wechselwirkung der Substanzen mit dem reversed-phase Kieselgel und (C) dem Tetrabutylammoniumion bei niedrigem pH-Wert.

Bei pH 6,5, dem klassischen pH-Bereich für die Ionenpaarchromatographie organischer Moleküle mit Carboxylgruppen, erhöhte die Zugabe von TBA die Retention beider Analyten. Für Ceftazidim wurde ein Plateau zwischen 2 mM und 5 mM TBA erreicht (vgl. Abbildung 39). Die folgende moderate Abnahme bei höheren Konzentrationen kann auf den oben erwähnten Ladungsausschlusseffekt zurückgeführt werden. Obwohl die signifikanten Änderungen des Retentionsfaktors bei niedrigen TBA-Konzentrationen eine günstige Selektivität des chromatographischen Systems versprochen, gelang es nicht, im Serum Chromatogramme zu erzielen, die frei von Interferenzen waren (vgl. Abbildung 40). Die Herausforderung interferierende Störpeaks zu vermeiden, bestand bei Avibactam insbesondere darin, dass der Wirkstoff einerseits mit einem schwachen Chromophor eine geringe Absorption aufweist (vgl. Abbildung 38) und andererseits in niedrigerer Dosierung als Ceftazidim verabreicht wird. Interferenzfreie Chromatogramme wurden bei 5 mM TBA-Konzentration erreicht (vgl. Abbildung 41 und Abbildung 43), leider zu Lasten der Empfindlichkeit von Avibactam, dass nun später als Ceftazidim eluierte. Im Hinblick auf die Robustheit und Reproduzierbarkeit der Herstellung der mobilen Phase dürfte diese TBA-Konzentration jedoch von Vorteil sein, weil sich die Retention beider Substanzen nur geringfügig bei geringer Änderung der TBA-Konzentration ändert.

Als finale mobile Phase wurde 20 mM Natriumphosphatpuffer/Acetonitril 90:10 (v/v) mit 5 mM TBA und einem pH-Wert von 6,5 verwendet.

Die Ionenpaarchromatographie wurde in den 1980er Jahren für die Analyse sehr hydrophiler Substanzen wie den Betalactamen häufiger eingesetzt, weil die C18-Ketten der damaligen *reversed-phase* Materialien in Eluenten mit geringem Methanol oder Acetonitrilgehalt (< 10 %) kollabierten und die Retention der Substanzen binnen weniger Stunden stark abnahm (Crombez, Van Den Bossche und De Moerloose 1979; Huang, Wu und Chen 1991; Przybyciel und Majors 2002). In Zwischenzeit wurden modifizierte C18-Kieselgelmaterialien ohne diesen Nachteil entwickelt. Dazu gehören die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Cortex T3 oder XBridge Materialien.

Als Standardsäule wurde die Cortecs T3 verwendet. Die Säule kann über den pH-Bereich von 2-8 eingesetzt werden und ist kompatibel mit 100 % wässriger Phase und damit ideal für die Methodenentwicklung inklusive sehr polarer Substanzen geeignet. In Ausnahmefällen wurden alternative Säulen verwendet. So wurde die Nucleoshell RP 18 für Valproinsäure, Sulfamethoxazol, Trimethoprim oder Linezolid verwendet, die eine geringfügig günstigere Selektivität für diese Substanzen zeigte. Für die Fluorchinolone wurde die Nucleodur C18 HTec verwendet. Diese Säule unterscheidet sich zur verwendeten Cortecs T3 in den Säulendimensionen (125 × 4 mm statt 100 × 3 mm). Wegen des größeren Innendurchmessers wurde die Flussrate auf 0,8 mL/min statt 0,4 mL/min gesetzt, um eine ähnliche lineare Geschwindigkeit zu erreichen. Das Säulenmaterial der Nucleodur C18 HTec erwies sich als sehr gut geeignet; die Substanzen eluierten mit noch geringerem *Tailing* als bei der Cortecs T3-Säule. Trotz des größeren Säulendurchmessers und des damit einhergehenden Verlusts an Empfindlichkeit, war die Empfindlichkeit durch die verwendete Detektionsmethode hoch (Atamna, Muschick und Issaq 1989).

In der Regel wurde ein Photodioden-Array Detektor eingesetzt, für die Fluorchinolone ein Fluoreszenzdetektor, da diese Substanzen eine hohe intrinsische Fluoreszenz aufweisen und damit eine besonders empfindliche und selektive Art der Detektion möglich war (Lingeman et al. 1985). Die klassische HPLC-UV ist der modernen LC-MS/MS hinsichtlich Sensitivität und Selektivität unterlegen. Dennoch waren die vom Arbeitskreis publizierten HPLC-Methoden bisweilen alle hinreichend empfindlich, um die Pharmakokinetik der untersuchten Substanzen

im Serum von Patienten, einschließlich Intensivpatienten, zu bestimmen oder um sie im Rahmen eines TDM einzusetzen (Kees et al. 2010; Kees et al. 2013; Martin G. Kees et al. 2014; Kratzer et al. 2014; Kratzer, Kees und Dorn 2016; Dorn et al. 2018; Dorn et al. 2019). Ein wesentlicher Vorteil der HPLC-UV liegt neben den geringeren Anschaffungs- und Betriebskosten in der Möglichkeit, wässrige Kalibratoren zur Bestimmung freier Konzentrationen einzusetzen, da im Gegensatz zur LC-MS/MS hierbei keine Matrixeffekte auftreten (Taylor 2005; Zhou, Yang und Wang 2017; Martens-Lobenhoffer, Angermair und Bode-Böger 2022).

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden müssten für die Analyse von Patientenserum möglicherweise modifiziert werden, beispielsweise durch eine Anpassung der Laufzeit, um den Zeitpunkt des Auftretens spät eluierender Peaks gezielt zu beeinflussen, oder gegebenenfalls durch Adaption des pH-Wertes des Eluenten. Als Faustregel zur Vermeidung von Interferenzen durch spät eluierende Peaks gilt eine doppelt so lange Analysenzeit wie die Retentionszeit der Substanz(en). Sollten dennoch spät eluierende Peaks mit der zu analysierenden Substanz koeluieren, so ist i.d.R. die Integration der Substanz als Aufsetzer des wesentlich breiteren spät eluierenden Peaks möglich.

4.1.2 Probenstabilität

Untersuchungen zur Stabilität sind zwingend erforderlich, um sicherzustellen, dass während der Probenvorbereitung, Analyse und Lagerung keine Konzentrationsveränderungen des Analyten auftreten (ICH 2023). Für die routinemäßige Untersuchung von Patientenproben im Rahmen des TDMs ist insbesondere die präanalytische Stabilität von zentraler Bedeutung, d.h. vor allem der Zeitraum von der Blutabnahme bis zur Ankunft im Labor. Entscheidende Einflussfaktoren sind hierbei die Art des Untersuchungsmaterials, die Transportzeit sowie die Lagertemperatur (Magreault et al. 2024). Die gezielte Evaluierung der präanalytischen Stabilität der untersuchten Substanzen hätte jedoch den Rahmen dieser Arbeit überschritten und war nicht Gegenstand der Zielsetzung, zumal die entsprechenden Stabilitätsdaten für die meisten Substanzen bereits hinreichend in der Literatur dokumentiert sind (Magreault et al. 2024).

Für diese Arbeit war hingegen die Stabilität der bereits prozessierten Proben von Interesse, da bekannt ist, dass unter anderem der pH-Wert einen entscheidenden Einfluss auf den

hydrolytischen Abbau bestimmter Substanzen, beispielsweise auf Betalactame, haben kann (Deshpande, Baheti und Chatterjee 2004). Zudem ist bekannt, dass der pH-Wert in Serum über die Zeit durch den Verlust von CO₂ ansteigt (Boink et al. 1991). Aus diesem Grund wurde die Autosampler-Stabilität von Ultrafiltraten, bei denen eine Pufferung des Serums vorgenommen wurde, mit der Stabilität von Proben verglichen, bei denen im Rahmen der Ultrafiltration keine Pufferung erfolgte. Stabilitätsprobleme zeigten sich bei den Betalactam-Antibiotika Cefiderocol, Ampicillin, Meropenem, Piperacillin und Ertapenem, wenn das Serum nicht mit Puffer versetzt wurde. Ursächlich hierfür ist die ausgeprägte Reaktivität des Beta-Lactamrings, die auf der Bayerschen Ringspannung sowie der Elektrophilie der Carbonylgruppe beruht (Müller, Prinz und Lehr 2022). Diese Reaktivität ist für den Wirkmechanismus der Arzneistoffgruppe essenziell, bedingt jedoch gleichzeitig eine geringere chemische Stabilität der Substanzen. Durch die Pufferung des Serums konnte der pH-Wert auch in den Ultrafiltraten stabil gehalten werden, wodurch der pH-abhängige Abbau reduziert wurde. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen wider. Die 90 %-Stabilitätsgrenze wurde im Autosampler über Nacht bei gepufferten Proben, unabhängig davon, ob HEPES- oder Phosphatpuffer verwendet wurde, nicht unterschritten (vgl. Abbildung 24).

4.1.3 Applikation der Ceftazidim-Avibactam-Methode

Die entwickelte Methode zeigte im Leerserum von gesunden Probanden keine Interferenzen (vgl. Abbildung 41). Sie erfüllte die Anforderungen der ICH Richtlinie an Linearität, Wiederfindung, Präzision und Richtigkeit (vgl. 3.2.2 Methodenvvalidierung) (ICH 2023).

Für die simultane Bestimmung von Ceftazidim und Avibactam in Serum existieren bis dato nur LC-MS/MS Methoden mit Gradientenelution (Cheng et al. 2022; Magréault et al. 2022; Martens-Lobenhoffer, Angermair und Bode-Böger 2022; Mula et al. 2023). Die vorliegende isokratische HPLC-UV Methode erlaubt die gleichzeitige Bestimmung von Ceftazidim und Avibactam in Plasma von Patienten, welche therapeutische Dosen von Ceftazidim/Avibactam erhalten haben. Sie war ausreichend sensitiv, um den Konzentrations-Zeit-Verlauf von Ceftazidim/Avibactam nach einer Infusion von 2,0/0,5 g/L über einen Zeitraum von acht Stunden zu erfassen. Ceftazidim und Avibactam eluierten interferenzfrei nach 3,3 bzw. 4,8 min (vgl. Abbildung 43). Die Laufzeit wurde auf 6 min festgelegt, was einer Injektionssequenz von 6,5 min entspricht, um Störungen durch spät eluierende Peaks (LEP) zu vermeiden (vgl.

Abbildung 43). Da beide Substanzen nicht signifikant an Plasmaproteine gebunden sind, sind die Messungen der totalen und der freien Konzentration für TDM-Zwecke als gleichwertig anzusehen.

Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen (vgl. 3.2.3 Stabilität von Ceftazidim und Avibactam) stehen in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Sillén et al. (2015), die den Zusatz von Natriumfluorid/Kaliumoxalat zu Plasmaproben für eine Verbesserung der Stabilität von Avibactam bei -20 °C vorschlagen. Aus den gewonnenen Stabilitätsdaten lässt sich folgende Empfehlung für die Handhabung von Serumproben, die Ceftazidim und Avibactam enthalten ableiten. Die Probenvorbereitung sollte auf Eis, idealerweise in einem Aluminiumkühlblock, erfolgen. Für die Analyse sollte der Autosampler gekühlt werden (6 °C), um eine hinreichende Stabilität für 24 h zu gewährleisten; eine Langzeitlagerung sollte bei -70 °C erfolgen.

4.2 Bestimmung der freien Fraktionen von Antibiotika mittels Ultrafiltration

4.2.1 Unspezifische Bindung und Membranintegrität

Nicht alle Ultrafilter bzw. Membranmaterialien sind gleichermaßen für Plasmaproteinbindungsuntersuchungen geeignet. Insbesondere bei der Analytik lipophiler Wirkstoffe wird die unspezifische Bindung (NSB) an das Material, vor allem an die Membran der Filter, als Nachteil der Ultrafiltration genannt (Zhang et al. 2012; Nilsson 2013).

In älteren Publikationen des Arbeitskreises wurden Nanosep Omega Ultrafilter (VWR, Ismaning, Deutschland) mit einer Membran aus modifiziertem Polyethersulfon verwendet (Kratzer et al. 2014; Kratzer, Kees und Dorn 2016; Dorn et al. 2018; Dorn et al. 2019; Dorn et al. 2020). Untersuchungen zu Linezolid, Tedizolid und Flucloxacillin zeigten, dass dieses Material im Hinblick auf die unspezifische Adsorption für die genannten Analyten nicht geeignet ist, da so falsch niedrige freie Konzentrationen gemessen wurden. Dieser Effekt war bei niedrigen Konzentrationen stärker ausgeprägt als bei höheren, vermutlich aufgrund eines Sättigungseffekts bei der Adsorption (Kratzer, Kees und Dorn 2016; Dorn et al. 2020). Durch den Vergleich mit Vivafree-Ultrafiltern stellte sich heraus, dass die Hydrosart-Membran aus regenerierter Cellulose, bezogen auf die unspezifische Adsorption das besser geeignete Material darstellt. Es handelt sich um das hydrophilere Material im Vergleich zur Polyethersulfon-Membran. In der vorliegenden Arbeit wurden alle 30 Substanzen auf unspezifische Adsorption an Vivafree-Ultrafiltern geprüft. Für die Untersuchungen wurde Ringerlösung verwendet, da eine Bestimmung von Adsorptionsphänomenen in Serum nicht sinnvoll ist. Der Grund hierfür liegt darin, dass das genaue (tatsächliche) Ausmaß der Proteinbindung nicht bekannt ist und damit nicht exakt zwischen proteingebundenem und adsorbiertem Arzneistoff differenziert werden kann (Nilsson 2013).

Die Ergebnisse zeigen, dass keine der Substanzen in signifikanter Weise an die Hydrosart-Membran adsorbierte. Für die meisten Substanzen lag die unspezifische Bindung (NSB) in Ringerlösung bei < 5 %. Tedizolid, Minocyclin und Tigecyclin adsorbierten am Wandmaterial des Reservoirs, welches aus Polycarbonat besteht. Für die Serumproben sind moderate Adsorptionsverluste am Wandmaterial des Reservoirs allerdings vernachlässigbar, da die Oberfläche des Reservoirs durch Serumproteine und Fettsäuren passiviert wird und somit

weniger anfällig für Adsorption ist (Wang und Williams 2013). Durch den Vergleich der Konzentration im Ultrafiltrat (C_{UF}) mit der Konzentration im Probenreservoir (C_{RET}), statt mit der Ausgangsverdünnung (C_{RIL}), stellte sich heraus, dass Tedizolid vorwiegend an das Wandmaterial des Probenreservoirs adsorbiert (C_{RET}/C_{UF} ca. 1 vs. C_{RIL}/C_{UF} ca. 0,92). Minocyclin und Tigecyclin hingegen adsorbierten zusätzlich am Polypropylen-Auffangbehälter (C_{RET}/C_{UF} (MIN/TGC): 0,77/0,75). Diese Beobachtung stimmt mit bereits publizierten Ergebnissen überein, die zeigten, dass bei einer Verdünnung in Wasser oder in Wasser:Methanol-Gemischen (50:50) mit hohen Substanzverlusten in Eppendorfgefäßen zu rechnen ist, während bei Verwendung einer sauren Lösung (0,1 M HCl) kaum Verluste auftraten (Dorn et al. 2018). Für Tigecyclin und Minocyclin wurde die unspezifische Adsorption im Auffanggefäß (Filtrat) nach Zugabe von 100 µL 0,1 M Salzsäure, dotiert mit 2,5 mg/L Metronidazol als interner Standard, bestimmt. Metronidazol wurde als interner Standard verwendet, da die Substanz keine unspezifische Adsorption zeigt und sich im selben isokratischen System in einem Lauf mitbestimmen ließ. Durch das Ansäuern des Ultrafiltrats wurden die Arzneistoffe in ihre hydrophilere, protonierte Form überführt, wodurch die Adsorption verhindert werden konnte. Mithilfe des internen Standards ließ sich das exakte Ultrafiltratvolumen bestimmen und daraus die um die Verdünnung korrigierte freie Konzentration berechnen. Grundsätzlich ist das Ausmaß der unspezifischen Adsorption abhängig vom verwendeten Material und der Lipophilie der untersuchten Substanz. Ein beschriebener Ansatz zur Kompensation der unspezifischen Bindung besteht darin die Membran mit Tween 20 oder Tween 80 vorzubehandeln (Lee et al. 2003; Illamola et al. 2014; Kratzer, Kees und Dorn 2016). Dieser Ansatz ist jedoch für die Routineanalytik wenig praktikabel, da die Vorbehandlung mit einem erheblichen Zeitaufwand verbunden ist und zugleich eine zusätzliche Fehlerquelle mit eingeführt wird. Nichtsdestotrotz ist dieser Ansatz interessant, jedoch eher für sehr stark lipophile Substanzen, die trotz des Einsatzes einer hydrophilen Membran ausgeprägt adsorbieren.

Bei den verwendeten Vivafree-Ultrafiltern werden im Rahmen der Produktspezifikationen von Seiten des Herstellers keine Angaben zur Proteinleckage gemacht werden. Nach Nilsson (2013) handelt es sich dabei jedoch um einen bei der Bestimmung der freien Fraktion häufig vernachlässigten, aber hochrelevanten Faktor. Insbesondere bei Arzneistoffen mit starker Plasmaproteinbindung, wie z.B. Flucloxacillin, kann die Proteinleckage zu verfälschten

Messergebnissen führen, da proteingebundener Arzneistoff in das Ultrafiltrat gelangen und somit die freie Konzentration überschätzt werden kann. Um das Ausmaß der Proteinleckage bei Vivafree-Ultrafiltern zu bestimmen, wurde die Proteinkonzentration in 525 Ultrafiltraten mittels Bradford-Assay quantifiziert (vgl. 2.6.2 Eignung der) und in Relation zur normalen Proteinkonzentration (7,5 g/dL) gesetzt (Busher 1990). In 94,7 % der Ultrafiltrate wurden Proteinkonzentrationen unter 0,0075 g/dL gemessen, was weniger als 0,1 % des Gesamtplasmaproteins entspricht. Solche Konzentrationen würden selbst bei stark proteingebundenen Substanzen nur zu einem geringen Messfehler führen. Flucloxacillin, mit einer freien Fraktion von ca. 4 %, weist unter den untersuchten Substanzen die höchste Plasmaproteinbindung auf. Eine Proteinleckage von 0,1 % würde bei dieser Substanz zu einem relativen Fehler von lediglich 2,6 % in der Bestimmung der freien Fraktion führen. In 5,3 % der Ultrafiltrate wurden zwar höhere Proteinkonzentrationen gemessen, diese lagen jedoch immer noch unter 0,075 g/dL und damit unter 1 % der Gesamtplasmaproteinkonzentration. Für die meisten Substanzen mit geringer bis moderater Plasmaproteinbindung ist dies nicht relevant. Bei stark proteingebundenen Substanzen sollte diese Fehlerquelle jedoch beachtet werden und gegebenenfalls die Proteinkonzentration in den Ultrafiltraten bestimmt werden.

4.2.2 Abhängigkeit der freien Fraktion von der Temperatur

In der Literatur finden sich unterschiedliche Ansätze zur Durchführung von Ultrafiltrationsmethoden. Die Ultrafiltration wurde aus Stabilitätsbedenken bei 4 °C und zur Vereinfachung des methodischen Aufwands häufig auch bei Raumtemperatur (22-25 °C) durchgeführt. Die Literatur diskutiert zudem die Ultrafiltration bei physiologischen 37 °C, mit und ohne Vorinkubation (Berthoin et al. 2009; Raaij et al. 2020; Rehm und Rentsch 2020). Obwohl allgemein bekannt ist, dass die Plasmaproteinbindung den Gesetzen der Thermodynamik folgt und das Gleichgewicht zwischen gebundenem und freiem Arzneistoff gemäß der van-'t-Hoff-Gleichung temperaturabhängig ist, besteht in der Literatur bislang kein einheitliches Protokoll für die Temperierung bei der Ultrafiltration (Berezhkovskiy 2010). Exemplarisch wurde in einer jüngeren Studie zur Messung der freien Konzentrationen von Flucloxacillin eine bessere Übereinstimmung mit der *in vivo*-Mikrodialyse als Referenzmethode erzielt, wenn die Ultrafiltration bei 22 °C statt bei 37 °C durchgeführt wurde (Beijer et al. 2023). Es erscheint jedoch wenig plausibel, dass die freie Fraktion, die bei 22 °C gemessen wurde, den physiologischen Zustand korrekt widerspiegelt. Vermutlich lieferte der

geringere Anstieg des pH-Wertes bei 22 °C, die Ursache für dieses kontroverse Ergebnis, da die f_u von Flucloxacillin bei pH > 8 höher ist (Dorn et al. 2020).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Ultrafiltration sowohl bei 37 °C als auch bei Raumtemperatur (ca. 22 °C) durchgeführt und die dabei gemessenen freien Fraktionen miteinander verglichen. Auf eine Untersuchung bei 4 °C wurde bewusst verzichtet, da diese Temperatur keineswegs den physiologischen Gegebenheiten entspricht. Diese Entscheidung wird auch durch Literaturdaten gestützt. So berichteten Stove et al. (2015), dass die freie Fraktion von Vancomycin nach Ultrafiltration bei 4 °C im Vergleich zur Bestimmung bei 37 °C um 30,6 % niedriger war. Die Ergebnisse nach Ultrafiltration bei 37 °C stimmten gut mit den Werten überein, die mittels Equilibriumdialyse bei 37 °C ermittelt wurden. Abbildung 27 zeigt, dass die bei Raumtemperatur gemessene freie Fraktion für die meisten Substanzen entweder unverändert blieb oder niedriger war als bei 37 °C. Diese Ergebnisse stimmen mit dem theoretischen Hintergrund überein, wonach eine Erhöhung der Temperatur und die damit einhergehende verstärkte Molekülbewegung zu einem Anstieg des freien Anteils führen.

Eine Ausnahme lieferte Clindamycin, dessen f_u bei Raumtemperatur deutlich höher war als bei 37 °C (vgl. Abbildung 27). Diese inverse Korrelation der f_u mit der Temperatur wurde für die Bindung von Clindamycin-Phosphat an Humanserumalbumin beschrieben. Eine Zunahme der Bindungskonstanten mit steigender Temperatur konnte fluoreszenzspektroskopisch nachgewiesen werden (Meti, Nandibewoor und Chimatadar 2014). Eine weitere mögliche Ursache für dieses Ergebnis liefert der etwas geringere Anstieg des pH-Wertes, wenn die Ultrafiltration bei Raumtemperatur statt bei 37 °C durchgeführt wird. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen den Effekten von pH und Temperatur ist kaum möglich, da selbst durch Pufferung ein leichter – Temperatur- und Zeit-abhängiger – Anstieg des pH-Wertes während der Ultrafiltration nicht vermieden werden kann. Geringe Schwankungen um den physiologischen pH-Wert von 7,4 sind für die meisten Substanzen irrelevant, jedoch besitzt Clindamycin einen pKs-Wert, der mit 7,55 sehr nahe am physiologischen pH-Wert liegt und wechselt damit in diesem Bereich zwischen der protonierten, hydrophilen Form und der deprotonierten, ungeladenen freien Base (Newton und Kluza 1978). Dadurch steigt die Lipophilie der Substanz und die Affinität zu Plasmaproteinen nimmt zu (Valko et al. 2003). Auch wenn bei Substanzen, deren freie Fraktion besonders empfindlich auf pH-Änderungen um den Bereich von pH 7,4 reagiert, eine eindeutige Differenzierung zwischen pH- und

Temperatureffekten nur schwer möglich ist, konnte bei Wirkstoffen, deren freie Fraktion weitgehend unabhängig vom pH-Wert ist, wie zum Beispiel Tedizolid, ein ausgeprägter Temperatureinfluss nachgewiesen werden. Für Tedizolid zeigte sich bei 37 °C eine f_u von etwa 24 %, während bei 22 °C ein f_u von etwa 17 % gemessen wurde, was einer Abnahme von rund 30 % entspricht. Für Substanzen, wie z.B. Tedizolid (und andere, vgl. Abbildung 27) ist es somit entscheidend, die Ultrafiltration bei physiologischen 37 °C durchzuführen.

4.2.3 Abhängigkeit der freien Fraktion von der Zentrifugalkraft

Die Ultrafiltration bei 3000 × g statt 1000 × g hatte keinen relevanten Einfluss auf die freie Fraktion. Die maximale relative Abweichung betrug -8 % für Vancomycin. Ein nicht relevanter Einfluss bedeutet jedoch nicht, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede vorlagen. So war beispielsweise der geringe Unterschied von 8 % bei Vancomycin durchaus hoch signifikant ($p = 0,00064$; ungepaarter t-Test). Jedoch ist es klinisch irrelevant, ob im Falle von Vancomycin 77 % (1000 × g) oder 71 % (3000 × g) als freie Fraktion vorliegt. Aufgrund der hohen Präzision, die daraus resultiert, dass bei der Bestimmung der freien Konzentrationen mittels Ultrafiltration im Vergleich zur Bestimmung der totalen Konzentrationen kaum eine Probenmanipulation erfolgt, können bereits geringe Unterschiede signifikant werden. Diese sind aber für den praktische Gebrauch, insbesondere bei Substanzen mit geringer Plasmaproteinbindung, nicht relevant. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher vorrangig solche Unterschiede herausgestellt, die potenziell von praktischer Bedeutung sind.

Wurde bei 10000 × g zentrifugiert, ließ sich eine molekulargewichtsabhängige Abnahme der freien Fraktion beobachten (vgl. Abbildung 30). Bei Substanzen mit hohem Molekulargewicht, wie beispielsweise Vancomycin (M 1449 g/mol), war dieser Effekt am deutlichsten ausgeprägt. Vancomycin, als schwerste der untersuchten Substanzen, zeigte eine relative Abnahme von -24 %. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Beobachtungen zum Einfluss der Zentrifugalbeschleunigung auf die f_u (Martin G Kees et al. 2014). Als Ursache wird der sogenannte *Pressure*-Effekt diskutiert, der erstmals beim Vergleich der f_u von Digoxin (M 781 g/mol) und Ouabain (M 586 g/mol) beschrieben wurde (Spector, Vernick und Lorenzo 1973). Dabei wurde der Einfluss des Filtrationsdrucks auf die freie Fraktion dieser Substanzen untersucht und festgestellt, dass mit steigendem Filtrationsdruck vorwiegend die freie Fraktion von Digoxin abnimmt. Es wird angenommen, dass bei erhöhtem Filtrationsdruck die

Membran für Arzneistoffe und Wasser nicht mehr im gleichen Ausmaß durchlässig ist (Whitlam und Brown 1981; Seyfinejad, Ozkan und Jouyban 2021). Dieses Phänomen wird auch als Konzentrationspolarisation bezeichnet und durch die Anhäufung kolloidaler Partikel (z.B. Serumproteine) an der Membranoberfläche verursacht (Wang, Li und Waite 2011).

Die lineare Tendenz zwischen dem Molekulargewicht und dem Verhältnis $f_{u, 10000 \times g} / f_{u, 1000 \times g}$ zeigte aber auch Ausreißer. Beispielsweise sollte demnach der Effekt für Minocyclin (M 557,5 g/mol) und Tigecyclin (M 585,7 g/mol) stärker ausgeprägt sein. Ähnlich wie bei der Ultrafiltration bei Raumtemperatur war der pH-Wert nach der Zentrifugation bei $10000 \times g$ aufgrund der kürzeren Zentrifugationszeit etwas niedriger als bei Anwendung der Referenzmethode. Dies könnte eine mögliche Erklärung darstellen, da bereits eine geringe Erhöhung des pH-Wertes zu einer deutlichen Abnahme der f_u von Minocyclin oder Tigecyclin führen kann. Ein Aspekt, der im folgenden Abschnitt (siehe 4.2.4) konkret diskutiert wird. Für Ertapenem hingegen zeigte sich, trotz einer molaren Masse von 475,5 g/mol, ein verhältnismäßig großer Unterschied der f_u , der nicht durch die geringe pH-Differenz erklärt werden kann und dessen Ursache bislang unklar bleibt.

Eine ausreichend hohe Zentrifugalbeschleunigung wird benötigt, um ausreichend Ultrafiltrat in möglichst kurzer Zeit zu gewinnen, da aus Stabilitätsgründen nicht beliebig lange zentrifugiert werden kann. Die Zentrifugation bei $1000 \times g$ stellt einen geeigneten Kompromiss dar, da mit dieser Zentrifugalkraft in kurzer Zeit (20 min) ausreichend Ultrafiltrat gewonnen werden kann und das Ausmaß des *Pressure*-Effekts geringgehalten wird.

4.2.4 Abhängigkeit der freien Fraktion vom Puffer

Neben der Temperatur und der Zentrifugalbeschleunigung kommt ein weiterer wichtiger Faktor bei der Ultrafiltration zum Tragen. Der physiologische pH-Wert des Blutes liegt bei $\text{pH} = 7,4$ und wird vorwiegend durch das Bicarbonat-Puffersystem konstant gehalten (Shaw und Gregory 2022). *Ex vivo* steigt der pH-Wert bereits direkt nach der Blutabnahme („frisches“ Serum) auf 7,6-7,7 an und kann typischerweise nach Aufbereitung, Lagerung und durch Gefrier-Auftau-Prozesse pH-Werte von 8 und höher erreichen („altes“ Serum). Der Anstieg des pH-Wertes ist auf den Verlust von Kohlendioxid (CO_2) zurückzuführen, der unter physiologischen Bedingungen durch die respiratorische Regulation kontrolliert wird (Boink et al. 1991). Eine Möglichkeit das Bicarbonat-Puffersystem *in vitro* aufrecht zu erhalten, liefert

die Inkubation mit CO₂. Doch der instrumentelle und experimentelle Aufwand und die damit verbundenen Anschaffungskosten sind deutlich höher als bei Verwendung üblicher Puffer. So wurde nach der Methode des Arbeitskreises das Serum mit 0,3 Vol.-% 3 M Kaliumphosphatpuffer auf pH 7,2-7,3 gepuffert, da dieser Puffer üblicherweise bei der Equilibriumdialyse zur Anwendung kommt (Curran et al. 2011; Zhang et al. 2012; Kratzer et al. 2014). Statt Natriumphosphatpuffer wurde Kaliumphosphatpuffer, aufgrund seiner besseren Lösungseigenschaften, eingesetzt (Aboufaris EL Alaoui et al. 2022).

Die Pufferkapazität des Phosphatpuffers war bei der angewandten Konzentration ausreichend, um den pH-Wert stabil im physiologischen Bereich zu halten. Die pH-Werte des gepufferten Serums lagen nach der Ultrafiltration zwischen 7,5-7,7, während der pH-Wert ohne Pufferung von 7,6/8,0 („frisches“/„altes“ Serum) auf 8,5/8,7 nach der Ultrafiltration anstieg. Beim Vergleich der f_u , die in „altem“ Serum bestimmt wurde, mit der f_u , von frischem ungepuffertem Serum, wurde für Valproinsäure eine höhere f_u und für Clindamycin, Minocyclin, Moxifloxacin und Tigecyclin eine niedrigere f_u bestimmt (vgl. Abbildung 31). Dieses Ergebnis zeigt, dass der pH-Wert das Equilibrium zwischen gebundenem und freiem Arzneistoff maßgeblich beeinflussen kann. Noch deutlicher präsentiert sich dieser Effekt beim Vergleich der f_u zwischen ungepuffertem und mit phosphatgepuffertem Serum (vgl. Abbildung 33). Der Anstieg des pH-Wertes in ungepuffertem Serum führte zu einem Anstieg der f_u von sauren Substanzen, wie Flucloxacillin oder Valproinsäure, und zu einer Abnahme der f_u von basischen und amphoteren Substanzen, wie Clindamycin, Fluorchinolone und Tigecyclin. Erklärt werden kann dieses Phänomen sowohl mit der Änderung des Dissoziationsgrads der Strukturen selbst als auch mit einer Veränderung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen in Abhängigkeit vom pH-Wert. So ist der Ionisierungsgrad von Carboxyl- und Aminogruppen der Proteine durch den Umgebungs-pH-Wert bestimmt (Ferreira et al. 2015). Im Bereich des physiologischen pH-Wertes können durch einen pH-Anstieg Konformationsänderungen, wie z.B. der Neutral-zu-Basen-Übergang von Albumin, stattfinden (Wanwimolruk und Birkett 1982). Beide Effekte liefern mögliche Ursachen für die beobachteten Ergebnisse.

Ob man bei der Pufferung des Serums frisches Serum (pH 7,6) oder älteres, gelagertes Serum (pH 8) als Ausgangsmatrix verwendet, die sich im pH-Wert vor der Pufferung unterscheiden, wirkt sich offensichtlich nur geringfügig auf die f_u aus (vgl. Abbildung 32). Ebenso wurde eine

vergleichbare f_u ermittelt ($97,9 \pm 4,0 \%$), wenn das Serum vor der Pufferung und Ultrafiltration eine Stunde lang bei 37°C im Heizblock inkubiert wurde (vgl. Abbildung 28). Dieser Inkubationsschritt ist häufig in der Literatur zu finden, um Serumproben auf physiologische 37°C zu temperieren (leider jedoch zumeist ohne nachfolgende Pufferung) (van Ewijk-Beneken Kolmer et al. 2017; Rehm und Rentsch 2020). Durch die erhöhte Temperatur stieg der pH-Wert während der Inkubation an. Wenn nach der Vorinkubation keine pH-Adjustierung mittels Puffer vorgenommen wurde, ergaben sich freie Fraktionen (vgl. Tabelle 20), die mit den Werten vergleichbar waren, die nach Ultrafiltration ohne Puffer (vgl. Tabelle 22) gefunden wurden ($100 \times \text{g}/37^\circ\text{C}/10 \text{ min}$; dann $1000 \times \text{g}/37^\circ\text{C}/20 \text{ min}$). Es bestand Grund zur Annahme, dass insbesondere die hydrolyselabilen Betalactame einer irreversiblen Degradation unterliegen könnten. Jedoch wurde nach anschließender Pufferung wieder die freien Fraktionen bestimmt, wie unter Anwendung der Methode des Arbeitskreises (Kratzer et al. 2014). Deshalb ist davon auszugehen, dass alle Analyten, während der einstündigen Vorinkubation, ausreichend stabil waren.

Um eine mögliche Degradation der Substanzen in den prozessierten Proben zu verhindern, wird vereinzelt in der Literatur vorgeschlagen, dass nach der Zentrifugation Puffer zugesetzt werden soll (Briscoe et al. 2012). Korrekt ist, dass eine mögliche weitere Degradation in den Ultrafiltraten durch einen nachträglichen Pufferzusatz verhindert werden kann. Etwaige Einflüsse des pH-Wertes auf das Gleichgewicht zwischen proteingebundenem und freiem Arzneistoff werden durch dieses Vorgehen jedoch nicht berücksichtigt. Zudem lässt sich eine während der Ultrafiltration unter Umständen auftretende Degradation, sofern diese irreversibel ist, hierdurch nicht verhindern.

Für viele Substanzen ist eine pH-Kontrolle des Serums notwendig. Die dafür erforderliche Pufferzugabe stellt einen Eingriff in die Zusammensetzung des Serums dar. Daher musste überprüft werden, ob der Puffer selbst einen Einfluss auf die Plasmaproteinbindung ausübt. Aus einer früheren Studie des Arbeitskreises ist bekannt, dass mit Phosphatpuffer für Tigecyclin unplausibel hohe Werte für die freie Fraktion ermittelt wurden (Dorn et al. 2018). Zurückzuführen ist dieses Ergebnis auf die Interaktion von Phosphat mit Serum-Calciumionen, welche am Bindungsmechanismus von Tigecyclin beteiligt sind (Estes und Derendorf 2010). Durch *in vitro* Versuche konnte gezeigt werden, dass Calcium die Bindung von Tigecyclin an Albumin, vermutlich aufgrund der Bildung von Tigecyclin-Calcium-Albumin-Komplexen,

verstärkt (Dorn et al. 2018). Daher lag es nahe, den Phosphatpuffer durch einen Puffer zu ersetzen, der keine Wechselwirkungen mit Calciumionen eingeht und gleichzeitig im physiologischen pH-Bereich einsetzbar ist. Für biologische Assays haben sich dafür die sogenannten Good's Puffer, zu denen unter anderen der HEPES-Puffer gehört, etabliert (Kragh-Hansen und Vorum 1993). Der pKs-Wert des Puffers liegt bei 7,55 und ist deshalb für den Bereich um den physiologischen pH-Wert geeignet. Einschränkungen in der Anwendung von HEPES-Puffer resultieren daher, dass er nicht für die Proteinbestimmung nach Lowry mit Folin-Reagenz verwendet werden kann (Peters und Fouts 1969). Für den Einsatz bei der Ultrafiltration ist das in der Regel nicht von Belang. Für den Fall, dass eine anschließende Proteinbestimmung im Ultrafiltrat durchgeführt werden soll, muss der Bradford-Protein-Assay verwendet werden. Bei der Ultrafiltration selbst ist zu berücksichtigen, dass HEPES-Puffer einen temperaturabhängigen pKs-Drift von $-0,14/10\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufweist (Good et al. 1966). Aufgrund der geringen Affinität Komplexe mit Calciumionen einzugehen, wurde von Dorn et al. (2018) HEPES-Puffer für die Analyse von Tigecyclin und Minocyclin eingesetzt. Bei diesen Tetrazyklin-Derivaten handelt es sich um Komplexbildner, die mit mehrwertigen Kationen interagieren können. Auch andere Antibiotika, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, weisen Strukturmerkmale zur Komplexbildung auf. Zum Beispiel handelt es sich bei Cefiderocol um ein Siderophor-Cephalosporin, welches nach Komplexbildung mit Eisenionen über aktiven Transport in den periplasmatischen Raum von Bakterien aufgenommen wird (Katsube et al. 2017). Diese Substanz besitzt somit auch die Fähigkeit durch das Chlorkatechol-Strukturelement Komplexe mit Calciumionen zu bilden. Folglich könnte auch hier der Phosphatpuffer über die Interaktion mit Calcium zu falsch hohen freien Fraktionen führen. Um das zu überprüfen, wurde für Cefiderocol die Ultrafiltration zusätzlich mit HEPES-Puffer und mit Phosphatpuffer in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt (vgl. Abbildung 35 A). Bei Gebrauch von HEPES-Puffer wurde eine freie Fraktion bestimmt, die um 17 % niedriger war als unter Einsatz von Phosphatpuffer ($f_{u, CFC\ HEPES} = 67,0\%$ vs. $f_{u, CFC\ KPP} = 80,7\%$). Zudem näherte sich die f_u mit abnehmender Phosphatkonzentration dem Wert an, der mit HEPES-Puffer bestimmt wurde. Phosphat hatte einen sichtbaren Effekt auf die freie Konzentration von Cefiderocol und führte scheinbar zu falsch hohen Werten. Ähnlich wie bei Tigecyclin und Minocyclin ist davon auszugehen, dass dieser Phosphateffekt auf die Wechselwirkung mit Calciumionen zurückzuführen ist. Um diese Vermutung zu bestätigen wurde ein Versuch unter

Zugabe von 10 mM EDTA durchgeführt (vgl. Abbildung 35 B). EDTA besitzt die Fähigkeit Metallionen zu komplexieren und kann diese damit aus dem System entfernen (Banfi, Salvagno und Lippi 2007). Die Zugabe von EDTA zu HEPES gepuffertem Serum führte zu einer f_u , die vergleichbar mit der f_u war, die mit Phosphatpuffer bestimmt wurde. Hingegen hatte der Zusatz von EDTA keinen relevanten Effekt, wenn das Serum mit Phosphat gepuffert wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch hier Calcium und andere mehrwertige Kationen, die durch EDTA entfernt wurden, an der Plasmaproteinbindung von Cefiderocol beteiligt sind.

Um mögliche systematische Fehler auszuschließen, die bei der Verwendung von Phosphatpuffer auftreten könnten, wurden alle Substanzen zusätzlich mit HEPES-Puffer analysiert (vgl. Tabelle 25). Für die meisten Analyten wurden vergleichbare Ergebnisse zur phosphatgepufferten Variante erzielt. Neben Tigecyclin und Cefiderocol wurden auch für die Fluorchinolone und Ertapenem deutlich niedrigere freie Konzentrationen mit HEPES-Puffer ermittelt (vgl. Abbildung 37). Die Ergebnisse zu den Fluorchinolonen stehen in Übereinstimmung mit der Fähigkeit dieser Substanzklasse, Chelatkomplexe zu bilden. Auch hier führte die Zugabe von EDTA (2,5 mM) bei Verwendung von HEPES-Puffer zu einer Erhöhung der f_u . Einen Spezialfall lieferte Ertapenem. Für die Substanz wurde in HEPES-gepuffertem Serum eine deutlich niedrigere f_u bestimmt als in phosphatgepuffertem Serum. In der Literatur finden sich jedoch keine Hinweise für die Interaktion von Ertapenem mit Calciumionen und der Zusatz von EDTA war im Falle von Ertapenem unwirksam (vgl. Abbildung 36). Die in dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen konnten nicht klären, welchen Effekt der Phosphatpuffer auf das Plasmaproteinbindungsverhalten von Ertapenem hat. Es bleibt zu untersuchen, welche Mechanismen für die Unterschiede im Ergebnis verantwortlich sind.

Für die Chelat-Komplex-bildenden Tetrazyklin-Derivate Tigecyclin und Minocyclin ist eine sogenannte „atypische“ Konzentrationsabhängigkeit der freien Fraktion beschrieben, d.h. bei höherer totaler Konzentration wird eine geringere freie Fraktion gemessen. Dieses konzentrationsabhängige Proteinbindungsverhalten wird durch hohe Phosphat-Konzentrationen oder Zusatz von EDTA (nicht jedoch durch HEPES) aufgehoben (Dorn et al. 2018). Vermutlich spielen auch hier Calcium-Ionen eine wichtige Rolle bei der Proteinbindung. Die Unterschiede in der Bestimmung der freien Fraktionen nach Pufferung mit entweder

Phosphat- oder HEPES-Puffer sind also je nach eingesetzter Konzentration unterschiedlich ausgeprägt. Für Tigecyclin konnte bei der hohen Konzentration von 1 mg/L eine Differenz von -44 % ($f_{u, \text{HEPES}} - f_{u, \text{Phosphat}}$), bei der niedrigen Konzentration von 0,2 mg/L eine Differenz von +10 % ermittelt werden. Für Minocyclin wurden Differenzen von -6,4 % (1 mg/L) und +1,2 % (0,2 mg/L) ermittelt. Bei jeweils gepoolter Auswertung beider Konzentrationen, wie Sie in Abbildung 37 dargestellt wird, ergaben sich folglich Differenzen von -16 % für Tigecyclin und lediglich -2,6 % für Minocyclin.

Der Einfluss von Phosphat auf die Proteinbindung bestimmter Substanzen ist nicht auf die Ultrafiltration beschränkt. So wird bei der Equilibriumdialyse zur Bestimmung von freiem Thyroxin, welches typischerweise Komplexe mit Calciumionen bildet, nach internationalem Referenzverfahren der IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*) 0,77 M HEPES-Puffer anstelle von Phosphatpuffer verwendet (Van Houcke et al. 2011).

5 Limitationen

Die freien Fraktionen wurden im Serum von gesunden Freiwilligen bestimmt und nicht im Serum von Patienten. Das primäre Ziel der Arbeit war es, den Einfluss der experimentellen Bedingungen der Ultrafiltration auf die freien Konzentrationen zu bestimmen und nicht die absoluten freien Fraktionen in einer Population, zumal das für kritisch Kranke aufgrund der hohen Variabilität in der Plasmaproteinbindung nicht allgemein möglich wäre (Wong et al. 2013). Faktoren wie Multimorbidität, Polymedikation, Hypoalbuminämie, Alter, Geschlecht und konzentrationsabhängige Effekte bei der Eiweißbindung können Einfluss auf die Plasmaproteinbindung nehmen (Roberts, Pea und Lipman 2013). Diese Effekte spiegeln sich teilweise auch in den Variationskoeffizienten der f_u der untersuchten Substanzen wider. Die Streuung der Ergebnisse war beispielsweise bei Substanzen mit konzentrationsabhängiger Plasmaproteinbindung – meist hoch Protein-gebundenen Substanzen (Deitchman, Singh und Derendorf 2018) – stärker ausgeprägt (Valproinsäure, Clindamycin, Minocyclin, Tigecyclin, Ceftriaxon und Flucloxacillin). Besonders hervorzuheben ist der Variationskoeffizient von Valproinsäure (CV: 46 %, vgl. Tabelle 18). Neben der limitierten Kapazität bei der Eiweißbindung, die in einer höheren f_u bei höheren Konzentrationen resultierte, kam hier das Alter (20 und 76 Jahre) der Probanden zum Tragen. Für Valproinsäure ist bekannt, dass der plasmaproteingebundene Anteil von der totalen Valproinsäurekonzentration und vom Alter des Patienten abhängig ist (Lin et al. 2022). Dennoch wurden die Ergebnisse für die vorliegende Arbeit, sowohl bei konzentrationsabhängigen Effekten als auch wenn interindividuelle Unterschiede vorlagen, gemittelt. Das Poolen hatte keinen Einfluss auf die Ergebnisse zum relativen Einfluss der experimentellen Bedingungen auf die f_u (Berechnungen nicht gezeigt).

Da das Ausmaß der Proteinbindung in einer bestimmten Probe nicht bekannt ist, sollte die Richtigkeit zur Bestimmung der freien Konzentrationen idealerweise durch den Vergleich mit einer etablierten Referenzmethode überprüft werden. Die Equilibriumdialyse gilt trotz einiger Vorbehalte als Standardmethode (Zhang et al. 2012). Da der Hauptfokus auf den Auswirkungen der Versuchsbedingungen der Ultrafiltration auf die freie Konzentration lag, wurde ein solcher Vergleich nicht durchgeführt.

Von den untersuchten Variablen – Temperatur, Zentrifugalkraft, pH-Wert – hatte der pH-Wert den größten Einfluss auf die gemessenen freien Konzentrationen. In der Literatur wird darauf verwiesen, dass es wichtig ist vor der Ultrafiltration den physiologischen pH-Wert einzustellen (Nilsson 2013). Im Gegensatz zur Equilibriumdialyse, bei der es Standard ist, dass man gegen eine Pufferlösung mit physiologischem pH-Wert dialysiert, wird der pH-Drift, der während der Ultrafiltration stattfindet, noch häufig außer Acht gelassen (Curran et al. 2011). Dies ist vermutlich auf die deutlich kürzere Dauer der Ultrafiltration im Vergleich zur Equilibriumdialyse zurückzuführen. Trotz einer Puffermolarität von 0,07-0,1 M wurde ein pH-Drift von 0,4-0,5 pH-Einheiten während des Prozesses beobachtet. Eine strengere Kontrolle des pH-Wertes wäre für basische Arzneistoffe wie Clindamycin oder Tigecyclin, die eine ausgeprägte pH-Abhängigkeit der Proteinbindung im Bereich des physiologischen pH-Wertes aufweisen, wünschenswert. Jedoch sind die möglichen Fehler gering im Vergleich zu den Fehlern, die bei Verwendung von ungepuffertem Serum auftraten.

6 Zusammenfassung

Auf Basis der vorgestellten Ergebnisse kann festgehalten werden, dass der pH-Wert bei der Ultrafiltration kontrolliert werden sollte, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten. Die pH-Kontrolle war wichtiger als die strikte Aufrechterhaltung der Körpertemperatur oder die Verwendung einer moderaten Zentrifugalbeschleunigung. Einen praktikablen Ansatz lieferte die Verwendung von Phosphat- oder HEPES-Puffer. Für die meisten der untersuchten Substanzen erwiesen sich beide Puffer zur pH-Einstellung als gleichermaßen geeignet. Jedoch ist HEPES-Puffer für Substanzen, die stabile Chelatkomplexe bilden, besser geeignet, da hohe Phosphatkonzentrationen die Calciumhomöostase im Serum stören.

Zur Einstellung und Aufrechterhaltung der Körpertemperatur hat sich der Einsatz einer Zentrifuge mit Kühlfunktion als nützlich erwiesen. Aber auch die Vorinkubation in einem Heizblock oder Wasserbad vermag für die meisten Substanzen ausreichend sein. Die Ultrafiltration kann auch nur bei Raumtemperatur durchgeführt werden, wenn die Ergebnisse zwischen Raumtemperatur und 37 °C vergleichbar waren.

In einigen wenigen Fällen wurden Verluste aufgrund von Adsorption an der Ultrafiltrationseinheit beobachtet, nicht aber an der Membran selbst. Allerdings lag die maximale Proteinbindung der untersuchten Substanzen bei 96 % und bei sehr lipophilen Substanzen (mit meist noch höherer Proteinbindung) sind möglicherweise noch umfangreichere Vorsichtsmaßnahmen erforderlich (Srivastava et al. 2021; Lee et al. 2003).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass für eine universelle Methode zur Bestimmung der freien Konzentrationen von Antibiotika in Serum eine Ultrafiltrationseinheit mit einer hydrophilen Membran aus regenerierter Cellulose verwendet werden sollte. Darüber hinaus sollte eine Pufferung des Serums auf pH 7,4 mit HEPES-Puffer sowie eine Zentrifugation bei 37 °C mit 1000 × g erfolgen.

7 Literaturverzeichnis

- Aboufaris EL Alaoui S. M., L. Ghallali, M. EL Guendouzi und A. Benbiyi. 2022. Solubility and Thermodynamic Properties of Dipotassium or Disodium Hydrogenphosphates in Aqueous Solutions at Various Temperatures. *Journal of Solution Chemistry* 51, Nr. 7 (1. Juli): 802-815. doi: 10.1007/s10953-022-01172-0.
- Åhman J., E. Matuschek und G. Kahlmeter. 2022. Evaluation of ten brands of pre-poured Mueller-Hinton agar plates for EUCAST disc diffusion testing. *Clinical Microbiology and Infection* 28, Nr. 11 (1. November): 1499.e1-1499.e5. doi: 10.1016/j.cmi.2022.05.030.
- Atamna I. Z., G. M. Muschick und H. J. Issaq. 1989. The Effect of Column Diameter on HPLC Separations Using Constant Length Columns. *Journal of Liquid Chromatography* 12, Nr. 3 (1. März): 285-298. doi: 10.1080/01483918908051734.
- Banfi G., G. L. Salvagno und G. Lippi. 2007. The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 45, Nr. 5: 565-576. doi: 10.1515/CCLM.2007.110.
- Beer, J., C. C. Wagner und M. Zeitlinger. 2009. Protein Binding of Antimicrobials: Methods for Quantification and for Investigation of its Impact on Bacterial Killing. *The AAPS Journal* 11, Nr. 1 (März): 1-12. doi: 10.1208/s12248-008-9072-1.
- Beijer G., L. Clarin, J. Östervall, V. Barclay und E. Eliasson. 2023. Reproducible Quantification of Unbound Fractions of Four Beta-Lactam Antibiotics: Ultrafiltration Versus Microdialysis of Spiked Healthy Donor Plasma. *Therapeutic Drug Monitoring* 45, Nr. 1 (1. Februar): 45-54. doi: 10.1097/FTD.0000000000001016.
- Berezhkovskiy L. M.. 2010. On the possibility of self-induction of drug protein binding. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99, Nr. 10: 4400-4405. doi: 10.1002/jps.22126.
- Berthoin K., E. Ampe, P. M. Tulkens und S. Carryn. 2009. Correlation between free and total vancomycin serum concentrations in patients treated for Gram-positive infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* 34, Nr. 6 (1. Dezember): 555-560. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.08.005.
- Bidlingmeyer B. A., S. N. Deming, W. P. Price, B. Sachok und M. Petrusek. 1979. Retention mechanism for reversed-phase ion-pair liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 186: 419-434. doi: 10.1016/S0021-9673(00)95264-6.
- Blot S. I., F. Pea und J. Lipman. 2014. The effect of pathophysiology on pharmacokinetics in the critically ill patient — Concepts appraised by the example of antimicrobial agents. *Advanced Drug Delivery Reviews* 77. Meeting the challenges of advanced drug delivery in critical illness (20. November): 3-11. doi: 10.1016/j.addr.2014.07.006.

- Boink A. B., B. M. Buckley, T. F. Christiansen, A. K. Covington, A. H. Maas, O. Müller-Plathe, C. Sachs und O. Siggaard-Andersen. 1991. IFCC recommendation on sampling, transport and storage for the determination of the concentration of ionized calcium in whole blood, plasma and serum. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 13, Nr. 5 (Januar): 235-239. doi: 10.1155/S1463924691000391.
- Bradford M. M.. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, Nr. 1 (7. Mai): 248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Briscoe, S. E., B. C. McWhinney, J. Lipman, J. A. Roberts und J. P. J. Ungerer. 2012. A method for determining the free (unbound) concentration of ten beta-lactam antibiotics in human plasma using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B* 907 (15. Oktober): 178–184. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.09.016.
- Bteich M.. 2019. An overview of albumin and alpha-1-acid glycoprotein main characteristics: highlighting the roles of amino acids in binding kinetics and molecular interactions. *Heliyon* 5, Nr. 11 (November): e02879. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02879.
- Budvári-bárány Z., G. Szász, K. Takács-novák, I. Hermecz und A. Lóre. 1991. The pH Influence on the HPLC-Retention of Chemotherapeutic Fluoroquinolone Derivatives. *Journal of Liquid Chromatography* 14, Nr. 18 (1. November): 3411-3424. doi: 10.1080/01483919108049399.
- Buscher B., S. Laakso, H. Mascher, K. Pusecker, M. Doig, L. Dillen, W. Wagner-Redeker, T. Pfeifer, P. Delrat und P. Timmerman. 2014. Bioanalysis for plasma protein binding studies in drug discovery and drug development: views and recommendations of the European Bioanalysis Forum. *Bioanalysis* 6, Nr. 5 (März): 673-682. doi: 10.4155/bio.13.338.
- Busher J. T.. 1990. Serum Albumin and Globulin. In: *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*, hg. von H. K. Walker, W. D. Hall, und J. W. Hurst. (3. Auflage) Boston: Butterworths., Kapitel 101, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK204/> (zugegriffen: 5. Juni 2025).
- Cheng Y., M. Chen, B. Zhang, H. Lin, X. Li, Y. Cai, H. Zhang, W. Que, M. Liu und H. Qiu. 2022. Rapid, simple, and economical LC-MS/MS method for simultaneous determination of ceftazidime and avibactam in human plasma and its application in therapeutic drug monitoring. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 47, Nr. 9 (September): 1426–1437. doi: 10.1111/jcpt.13693.
- Craig W. A.. 2003. Basic pharmacodynamics of antibacterials with clinical applications to the use of β -lactams, glycopeptides, and linezolid. *Infectious Disease Clinics of North America* 17, Nr. 3. (1. September): 479-501. doi: 10.1016/S0891-5520(03)00065-5.

- Crombez E., W. Van Den Bossche und P. De Moerloose. 1979. Separation of some cephalosporin derivatives by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 169 (1. Februar): 343–350. doi: 10.1016/0021-9673(75)85059-x.
- Curran R. E., C. R. J. Claxton, L. Hutchison, P. J. Harradine, I. J. Martin und P. Littlewood. 2011. Control and measurement of plasma pH in equilibrium dialysis: influence on drug plasma protein binding. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 39, Nr. 3 (März): 551-557. doi: 10.1124/dmd.110.036988.
- Deitchman A. N., R. S. P. Singh und H. Derendorf. 2018. Nonlinear Protein Binding: Not What You Think. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 107, Nr. 7 (Juli): 1754-1760. doi: 10.1016/j.xphs.2018.03.023.
- Deshpande A. D., K. G. Baheti und N. R. Chatterjee. 2004. Degradation of β -lactam antibiotics. *Current Science* 87, Nr. 12: 1684-1695. <http://www.jstor.org/stable/24109765>.
- Dorn C., A. Kratzer, U. Liebchen, M. Schleibinger, A. Murschhauser, J. Schlossmann, F. Kees, P. Simon und MG. Kees. 2018. Impact of Experimental Variables on the Protein Binding of Tigecycline in Human Plasma as Determined by Ultrafiltration. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 107, Nr. 2 (Februar): 739-744. doi: 10.1016/j.xphs.2017.09.006.
- Dorn C., A. Kratzer, S. Schießer, F. Kees, H. Wrigge und P. Simon. 2019. Determination of total or free cefazolin and metronidazole in human plasma or interstitial fluid by HPLC-UV for pharmacokinetic studies in man. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 1118–1119 (15. Juni): 51-54. doi: 10.1016/j.jchromb.2019.04.025.
- Dorn C., S. Schießer, B. Wulkersdorfer, F. Hitzenbichler, MG. Kees und M. Zeitlinger. 2020. Determination of free clindamycin, flucloxacillin or tedizolid in plasma: Pay attention to physiological conditions when using ultrafiltration. *Biomedical Chromatography* 34, Nr. 6 (Juni). doi: 10.1002/bmc.4820.
- EMA, European Medicines Agency. 2016. Guideline on the use of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of antimicrobial medicinal products, https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-use-pharmacokinetics-and-pharmacodynamics-development-antimicrobial-medicinal-products_en.pdf (zugegriffen: 20. Juni 2025)
- Estes K. S. und H. Derendorf. 2010. Comparison of the pharmacokinetic properties of vancomycin, linezolid, tigecyclin, and daptomycin. *European Journal of Medical Research* 15, Nr. 12 (30. November): 533-543. doi: 10.1186/2047-783X-15-12-533.

- Evans L., A. Rhodes, W. Alhazzani, M. Antonelli, C. M. Coopersmith, C. French, F.R. Machado, et al. 2021. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Medicine* 47, Nr. 11 (1. November): 1181-1247. doi: 10.1007/s00134-021-06506-y.
- van Ewijk-Beneken Kolmer E. W. J., M. J. A. Teulen, E. C. A. van den Hombergh, N. E. van Erp, L. H. M. Te Brake und R. E. Aarnoutse. 2017. Determination of protein-unbound, active rifampicin in serum by ultrafiltration and Ultra Performance Liquid Chromatography with UV detection. A method suitable for standard and high doses of rifampicin. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 1063 (15. September): 42-49. doi: 10.1016/j.jchromb.2017.08.004.
- Ferreira C. M. H., I. S. S. Pinto, E. V. Soares und H. M. V. M. Soares. 2015. (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions – a review. *RSC Advances* 5, Nr. 39 (30. März): 30989-31003. doi: 10.1039/C4RA15453C.
- Fratoni, A. J., D. P. Nicolau und J. L. Kuti. 2021. A guide to therapeutic drug monitoring of β -lactam antibiotics. *Pharmacotherapy* 41, Nr. 2 (Februar): 220-233. doi: 10.1002/phar.2505.
- Fura A., T. W. Harper, H. Zhang, L. Fung und W. C. Shyu. 2003. Shift in pH of biological fluids during storage and processing: effect on bioanalysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 32, Nr. 3 (14. Juli): 513-522. doi: 10.1016/S0731-7085(03)00159-6.
- Good N. E., G. D. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, S. Izawa und R. M. M. Singh. 1966. Hydrogen Ion Buffers for Biological Research*. *Biochemistry* 5, Nr. 2 (1. Februar): 467-477. doi: 10.1021/bi00866a011.
- Grayson M. L., S. E. Cosgrove, S. Crowe, W. Hope, J. S. McCarthy, J. Mills, J. W. Mouton und D. L. Paterson. 2017. *Kucers' The Use of Antibiotics: A clinical review of antibacterial, antifungal, antiparasitic, and antiviral drugs.* (7. Auflage.). Boca Raton: CRC Press.
- Hoff B. M., J. H. Maker, W. E. Dager und B. H. Heintz. 2020. Antibiotic Dosing for Critically Ill Adult Patients Receiving Intermittent Hemodialysis, Prolonged Intermittent Renal Replacement Therapy, and Continuous Renal Replacement Therapy: An Update. *The Annals of Pharmacotherapy* 54, Nr. 1 (Januar): 43-55. doi: 10.1177/1060028019865873.
- Hosein S., A. A. Udy und J. Lipman. 2011. Physiological changes in the critically ill patient with sepsis. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 12, Nr. 12 (Dezember): 1991-1995. doi: 10.2174/138920111798808248.

- Huang H. S., J. R. Wu und M. L. Chen. 1991. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of amphoteric beta-lactam antibiotics: effects of columns, ion-pairing reagents and mobile phase pH on their retention times. *Journal of Chromatography* 564, Nr. 1 (8. März): 195–203. doi: 10.1016/0378-4347(91)80081-m.
- ICH, International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. 2023. Guideline on bioanalytical method validation and study sample analysis, <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline> (zugegriffen: 21. Januar 2025).
- Illamola S. M., L. Labat, S. Benaboud, R. Tubiana, J. Warszawski, J. M. Tréluyer und D. Hirt. 2014. Determination of total and unbound concentrations of lopinavir in plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry and ultrafiltration methods. *Journal of Chromatography B* 965 (15. August): 216–223. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.06.034.
- Israili Z. H. und P. G. Dayton. 2001. Human Alpha-1-Glycoprotein and Its Interactions with Drugs. *Drug Metabolism Reviews* 33, Nr. 2 (1. Januar): 161-235. doi: 10.1081/DMR-100104402.
- Jin H.E., S.E. Jin und H.J. Maeng. 2014. Recent bioanalytical methods for quantification of third-generation cephalosporins using HPLC and LC-MS(/MS) and their applications in pharmacokinetic studies. *Biomedical chromatography: BMC* 28, Nr. 11 (November): 1565-1587. doi: 10.1002/bmc.3330.
- Kaliszan R., A. Nasal und M. Turowski. 1995. Binding site for basic drugs on α 1-acid glycoprotein as revealed by chemometric analysis of biochromatographic data. *Biomedical Chromatography* 9, Nr. 5: 211-215. doi: 10.1002/bmc.1130090504.
- Katsube T., R. Echols, J. C. Arjona Ferreira, H. K. Krenz, J. K. Berg und C. Galloway. 2017. Cefiderocol, a Siderophore Cephalosporin for Gram-Negative Bacterial Infections: Pharmacokinetics and Safety in Subjects With Renal Impairment. *Journal of Clinical Pharmacology* 57, Nr. 5 (Mai): 584–591. doi: 10.1002/jcph.841.
- Kees MG., J. W. Hilpert, C. Gnewuch, F. Kees und S. Voegeler. 2010. Clearance of Vancomycin during Continuous Infusion in Intensive Care Unit Patients: Correlation with Measured and Estimated Creatinine Clearance and Serum Cystatin C. *International Journal of Antimicrobial Agents* 36, Nr. 6 (Dezember): 545–548. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.07.015.
- Kees MG., S. G. Wicha, A. Seefeld, F. Kees und C. Kloft. 2014. Unbound fraction of vancomycin in intensive care unit patients. *Journal of clinical pharmacology* 54, Nr. 3 (März): 318-323. doi: 10.1002/jcph.175.

- Kees MG., A. Schaeftlein, H. A. Haeberle, F. Kees, C. Kloft und A. Heininger. 2013. Population pharmacokinetics and pharmacodynamic evaluation of intravenous and enteral moxifloxacin in surgical intensive care unit patients. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68, Nr. 6 (Juni): 1331–1337. doi: 10.1093/jac/dkt040.
- Kirschbaum B.. 2003. Loss of carbon dioxide from serum samples exposed to air. Effect on blood gas parameters and strong ions. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 334, Nr. 1–2 (August): 241-244. doi: 10.1016/s0009-8981(03)00242-0.
- Kragh-Hansen U. und H. Vorum. 1993. Quantitative analyses of the interaction between calcium ions and human serum albumin. *Clinical Chemistry* 39, Nr. 2 (Februar): 202-208.
- Kratzer A., F. Kees und C. Dorn. 2016. Unbound fraction of fluconazole and linezolid in human plasma as determined by ultrafiltration: Impact of membrane type. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 1039 (15. Dezember): 74-78. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.10.040.
- Kratzer A., U. Liebchen, M. Schleibinger, MG. Kees und F. Kees. 2014. Determination of free vancomycin, ceftriaxone, cefazolin and ertapenem in plasma by ultrafiltration: impact of experimental conditions. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 961 (15. Juni): 97-102. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.05.021.
- Kratzer A., S. Schießler, P. Matzneller, B. Wulkersdorfer, M. Zeitlinger, J. Schlossmann, F. Kees und C. Dorn. 2019. Determination of total and free ceftolozane and tazobactam in human plasma and interstitial fluid by HPLC-UV. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 163 (Januar): 34-38. doi:10.1016/j.jpba.2018.09.044.
- Kunin C. M., W. A. Craig, M. Kornguth und R. Monson. 1973. Influence of Binding on the Pharmacologic Activity of Antibiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences* 226, Nr. 1: 214-224. doi: 10.1111/j.1749-6632.1973.tb20483.x.
- Lee K. J., R. Mower, T. Hollenbeck, J. Castelo, N. Johnson, P. Gordon, P. J. Sinko, K. Holme und Y. H. Lee. 2003. Modulation of nonspecific binding in ultrafiltration protein binding studies. *Pharmaceutical Research* 20, Nr. 7 (Juli): 1015-1021. doi: 10.1023/a:1024406221962.
- Levitt D. G. und M. D. Levitt. 2016. Human serum albumin homeostasis: a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements. *International Journal of General Medicine* 9 (15. Juli): 229-255. doi: 10.2147/IJGM.S102819.
- Lin K., V. F. S. Cao, C. Au und K. Dahri. 2022. Clinical Pharmacokinetic Monitoring of Free Valproic Acid Levels: A Systematic Review. *Clinical Pharmacokinetics* 61, Nr. 10 (1. Oktober): 1345-1363. doi: 10.1007/s40262-022-01171-w.

- Lingeman H., W. J. M. Underberg, A. Takadate und A. Hulshoff. 1985. Fluorescence Detection in High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography* 8, Nr. 5 (1. April): 789-874. doi: 10.1080/01483918508067120.
- Magreault S., D. Pierredon, J. Akinotcho-Relouzat, F. Méchaï, B. Lamy, F. Jaureguy und V. Jullien. 2024. From Bed to Bench: Pre-analytical Stability of 29 Anti-infective Agents in Plasma and Whole Blood to Improve Accuracy of Therapeutic Drug Monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring* 46, Nr. 6 (Dezember): 725-734. doi: 10.1097/FTD.0000000000001237.
- Magréault S., F. Jaureguy, J.-R. Zahar, F. Méchaï, D. Toinon, Y. Cohen, E. Carbonnelle und V. Jullien. 2022. Automated HPLC-MS/MS assay for the simultaneous determination of ten plasma antibiotic concentrations. *Journal of Chromatography B* 1211 (November): 123496. doi: 10.1016/j.jchromb.2022.123496.
- Martens-Lobenhoffer J., S. Angermair und S. M. Bode-Böger. 2022. Quantification of ceftazidime/avibactam in human plasma and dried blood spots: Implications on stability and sample transport. *Journal of Chromatography B* 1193 (März): 123164. doi: 10.1016/j.jchromb.2022.123164.
- McWhinney B. C., S. C. Wallis, T. Hillister, J. A. Roberts, J. Lipman und J. P. J. Ungerer. 2010. Analysis of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B* 878, Nr. 22 (15. Juli): 2039-2043. doi: 10.1016/j.jchromb.2010.05.027.
- Merrikin D. J., J. Briant und G. N. Rolinson. 1983. Effect of protein binding on antibiotic activity in vivo. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 11, Nr. 3 (März): 233-238. doi: 10.1093/jac/11.3.233.
- Meti M. D., S. T. Nandibewoor und S. A. Chimatadar. 2014. Binding studies of lincosamide antibiotic drug clindamycin phosphate to human serum albumin by fluorescence, 3D, and circular dichroism spectroscopy. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* 145, Nr. 9 (September): 1519-1527. doi: 10.1007/s00706-014-1207-8.
- Mouton J. W., M. N. Dudley, O. Cars, H. Derendorf und G. L. Drusano. 2005. Standardization of Pharmacokinetic/Pharmacodynamic (PK/PD) Terminology for Anti-Infective Drugs: An Update. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55, Nr. 5 (Mai): 601-607. doi: 10.1093/jac/dki079.
- Mula J., F. Chiara, A. Manca, A. Palermiti, D. Maiese, J. Cusato, M. Simiele, et al. 2023. Analytical validation of a novel UHPLC-MS/MS method for 19 antibiotics quantification in plasma: Implementation in a LC-MS/MS Kit. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 163 (1. Juli): 114790. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114790.

- Müller, K., H. Prinz und M. Lehr. 2022. *Pharmazeutische/Medizinische Chemie: Arzneistoffe - von der Struktur zur Wirkung*. (1. Auflage.). Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Musteata F. M.. 2017. Measuring and Using Free Drug Concentrations: Has There Been 'Real' Progress? *Bioanalysis* 9, Nr. 10 (1. Mai): 767-769. doi: 10.4155/bio-2017-0053.
- Newton D. W. und R. B. Kluza. 1978. pKa Values of Medicinal Compounds in Pharmacy Practice. *Drug Intelligence & Clinical Pharmacy* 12, Nr. 9 (1. September): 546-554. doi: 10.1177/106002807801200906.
- Nielsen E. I., O. Cars und L. E. Friberg. 2011. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic (PK/PD) Indices of Antibiotics Predicted by a Semimechanistic PKPD Model: a Step toward Model-Based Dose Optimization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, Nr. 10 (15. September): 4619-4630. doi: 10.1128/aac.00182-11.
- Nilsson L. B.. 2013. The bioanalytical challenge of determining unbound concentration and protein binding for drugs. *Bioanalysis* 5, Nr. 24 (Dezember): 3033-3050. doi: 10.4155/bio.13.274.
- Payne R. B., A. J. Little, R. B. Williams und J. R. Milner. 1973. Interpretation of serum calcium in patients with abnormal serum proteins. *British Medical Journal* 4, Nr. 5893 (15. Dezember): 643-646. doi: 10.1136/bmj.4.5893.643.
- Peters M. A. und J. R. Fouts. 1969. Interference by buffers and other chemicals with the lowry protein determination. *Analytical Biochemistry* 30, Nr. 2 (1. August): 299-301. doi:10.1016/0003-2697(69)90405-9.
- Plata-Menchaca E. P., R. Ferrer, J.C. Ruiz Rodríguez, R. Morais und P. Póvoa. 2022. Antibiotic treatment in patients with sepsis: a narrative review. *Hospital Practice* 50, Nr. 3 (27. Mai): 203-213. doi: 10.1080/21548331.2020.1791541.
- Przybyciel M. und R. Majors. 2002. Phase collapse in reversed-phase liquid chromatography. *Lc Gc North America*. , <https://www.semanticscholar.org/paper/Phase-collapse-in-reversed-phase-liquid-Przybyciel-Majors/dc49a41fd53da0dbd4eac6722530b7daf67fbd87> (zugegriffen: 14. September 2025).
- van Raaij J. J., N. J. D. Mabelis, K. N. Shudofsky, S.D. Meenks, J. L. M. L. le Noble und P. K. C. Janssen. 2020. Quantification of total and unbound cefuroxime in plasma by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry in a cohort of critically ill patients with hypoalbuminemia and renal failure. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* (17. Januar): e23100. doi: 10.1002/jcla.23100.
- Rehm S. und K. M. Rentsch. 2020. LC-MS/MS method for nine different antibiotics. *Clinica Chimica Acta* 511 (1. Dezember): 360-367. doi: 10.1016/j.cca.2020.11.001.

- Roberts J. A., F. Pea und J. Lipman. 2013. The Clinical Relevance of Plasma Protein Binding Changes. *Clinical Pharmacokinetics* 52, Nr. 1 (1. Januar): 1-8. doi: 10.1007/s40262-012-0018-5.
- Rudd K. E., S. C. Johnson, K. M. Agesa, K. A. Shackelford, D. Tsoi, D. R. Kievlan, D. V. Colombara, et al. 2020. Global, Regional, and National Sepsis Incidence and Mortality, 1990-2017: Analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet (London, England)* 395, Nr. 10219 (Januar): 200-211. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32989-7.
- Sanz-Codina M., H. Ö. Bozkir, A. Jorda und M. Zeitlinger. 2023. Individualized antimicrobial dose optimization: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinical Microbiology and Infection* 29, Nr. 7 (1. Juli): 845-857. doi: 10.1016/j.cmi.2023.03.018.
- Schießer S., F. Hitzenbichler, MG. Kees, A. Kratzer, M. Lubnow, B. Salzberger, F. Kees und C. Dorn. 2021. Measurement of Free Plasma Concentrations of Beta-Lactam Antibiotics: An Applicability Study in Intensive Care Unit Patients. *Therapeutic Drug Monitoring* 43, Nr. 2 (April): 264. doi: 10.1097/FTD.0000000000000827.
- Schleibinger M., C. L. Steinbach, C. Töpper, A. Kratzer, U. Liebchen, F. Kees, B. Salzberger und MG. Kees. 2015. Protein binding characteristics and pharmacokinetics of ceftriaxone in intensive care unit patients. *British Journal of Clinical Pharmacology* 80, Nr. 3 (September): 525-533. doi: 10.1111/bcp.12636.
- Seyfinejad B., S. A. Ozkan und A. Jouyban. 2021. Recent advances in the determination of unbound concentration and plasma protein binding of drugs: Analytical methods. *Talanta* 225 (1. April): 122052. doi: 10.1016/j.talanta.2020.122052.
- Shaw I. und K. Gregory. 2022. Acid–base balance: a review of normal physiology. *BJA Education* 22, Nr. 10 (Oktober): 396-401. doi: 10.1016/j.bjae.2022.06.003.
- Sillén H., R. Mitchell, R. Sleigh, G. Mainwaring, K. Catton, R. Houghton und K. Glendining. 2015. Determination of Avibactam and Ceftazidime in Human Plasma Samples by LC–MS. *Bioanalysis* 7, Nr. 12 (Juli): 1423-1434. doi: 10.4155/bio.15.76.
- Singer M., C. S. Deutschman, C. W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, et al. 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, Nr. 8 (23. Februar): 801. doi: 10.1001/jama.2016.0287.
- Spector R., R. Vernick und A. V. Lorenzo. 1973. Effects of pressure on the plasma binding of digoxin and ouabain in an ultrafiltration apparatus. *Biochemical Pharmacology* 22, Nr. 19 (1. Oktober): 2486-2487. doi: 10.1016/0006-2952(73)90350-x.

- Srivastava A., A. Pike, B. Williamson und K. Fenner. 2021. A Novel Method for Preventing Non-specific Binding in Equilibrium Dialysis Assays Using Solutol® as an Additive. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 110, Nr. 3 (März): 1412-1417. doi: 10.1016/j.xphs.2020.11.018.
- Stove V., L. Coene, M. Carlier, J. J. De Waele, T. Fiers und A. G. Verstraete. 2015. Measuring unbound versus total vancomycin concentrations in serum and plasma: methodological issues and relevance. *Therapeutic Drug Monitoring* 37, Nr. 2 (April): 180-187. doi: 10.1097/FTD.0000000000000122.
- Sudlow G., D. J. Birkett und D. N. Wade. 1975. The Characterization of Two Specific Drug Binding Sites on Human Serum Albumin. *Molecular Pharmacology* 11, Nr. 6 (1. November): 824-832. doi: 10.1016/S0026-895X(25)10691-3.
- Sy S. K. B., L. Zhuang, S. Sy und H. Derendorf. 2019. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Ceftazidime–Avibactam Combination: A Model-Informed Strategy for its Clinical Development. *Clinical Pharmacokinetics* 58, Nr. 5 (Mai): 545-564. doi: 10.1007/s40262-018-0705-y.
- Taylor P. J. 2005. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* 38, Nr. 4 (April): 328-334. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2004.11.007.
- Valko K., S. Nunhuck, C. Bevan, M.H. Abraham und D. P. Reynolds. 2003. Fast gradient HPLC method to determine compounds binding to human serum albumin. Relationships with octanol/water and immobilized artificial membrane lipophilicity. *Journal of pharmaceutical sciences* 92, Nr. 11 (November). doi: 10.1002/jps.10494.
- Van Houcke S. K., K. Van Uytendanghe, E. Shimizu, W. Tani, M. Umemoto und L. M. Thienpont. 2011. IFCC international conventional reference procedure for the measurement of free thyroxine in serum: International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) Working Group for Standardization of Thyroid Function Tests (WG-STFT)(1). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 49, Nr. 8 (August): 1275-1281. doi: 10.1515/CCLM.2011.639.
- Wallenburg E., R. J. M. Brüggemann, J. A. Roberts, N. G. L. Jager, M. Ulldemolins, S. Wilkes, J. Schouten, P.K. L. Chin und R. Ter Heine. 2022. A meta-analysis of protein binding of flucloxacillin in healthy volunteers and hospitalized patients. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 28, Nr. 3 (März): 446.e1-446.e7. doi: 10.1016/j.cmi.2021.06.039.
- Wang C. und N. S. Williams. 2013. 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. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 75 (5. März): 112-117. doi: 10.1016/j.jpba.2012.11.018.

- Wang X.M., X.Y. Li und T. David Waite. 2011. Quantification of solid pressure in the concentration polarization (CP) layer of colloidal particles and its impact on ultrafiltration. *Journal of Colloid and Interface Science* 358, Nr. 1 (1. Juni): 290-300. doi: 10.1016/j.jcis.2011.02.058.
- Wanwimolruk S. und D. J. Birkett. 1982. The effects of N-B transition of human serum albumin on the specific drug-binding sites. *Biochimica Et Biophysica Acta* 709, Nr. 2 (20. Dezember): 247-255. doi: 10.1016/0167-4838(82)90467-8.
- Whitlam J. B. und K. F. Brown. 1981. Ultrafiltration in Serum Protein Binding Determinations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 70, Nr. 2 (1. Februar): 146-150. doi: 10.1002/jps.2600700208.
- WHO, World Health Organization. 2017. Improving the prevention, diagnosis and clinical management of sepsis, https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/273181/B140_12-en.pdf?sequence=1&isAllowed=y (zugegriffen: 12. Juni 2025).
- Wong G., S. Briscoe, S. Adnan, B. McWhinney, J. Ungerer, J. Lipman und J. A. Roberts. 2013. Protein binding of β -lactam antibiotics in critically ill patients: Can we successfully predict unbound concentrations? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (30. September): AAC.00951-13. doi: 10.1128/AAC.00951-13.
- Wright, J. D., F. D. Boudinot und M. R. Ujhelyi. 1996. Measurement and analysis of unbound drug concentrations. *Clinical Pharmacokinetics* 30, Nr. 6 (Juni): 445-462. doi: 10.2165/00003088-199630060-00003.
- Yamasaki K., V. T. Chuang, T. Maruyama und M. Otagiri. 2013. Albumin–drug interaction and its clinical implication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830, Nr. 12. (1. Dezember): 5435-5443. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.05.005.
- Zhang F., J. Xue, J. Shao und L. Jia. 2012. Compilation of 222 drugs' plasma protein binding data and guidance for study designs. *Drug Discovery Today* 17, Nr. 9–10 (Mai): 475-485. doi: 10.1016/j.drudis.2011.12.018.
- Zhou W., S. Yang und P. G Wang. 2017. Matrix effects and application of matrix effect factor. *Bioanalysis* 9, Nr. 23 (Dezember): 1839-1844. doi: 10.4155/bio-2017-0214.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip der Equilibriumdialyse.....	2
Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Ultrafiltrationseinheit.....	3
Abbildung 3: PK/PD-Zielparameter	6
Abbildung 4: Strukturen von Ceftazidim und Avibactam	10
Abbildung 5: Untersuchte experimentelle Faktoren der Ultrafiltration.....	24
Abbildung 6: Schematische Darstellung und Materialien der Ultrafiltrationseinheit	26
Abbildung 7: pH-Abhängigkeit der Retention von Flucloxacillin.....	33
Abbildung 8: Chromatogramm von Paracetamol (PCM), Cefepim (FEP) und Ceftolozan (CLZ).....	34
Abbildung 9: Chromatogramm von Metronidazol (MTZ), Ceftazidim (CAZ) und Meropenem (MEM)	34
Abbildung 10: Chromatogramm von Tigecyclin (TGC) und Minocyclin (MIN)	35
Abbildung 11: Chromatogramm von Vancomycin (VAN).....	35
Abbildung 12: Chromatogramm von Ampicillin (AMP) und Ceftriaxon (CRO).....	36
Abbildung 13: Chromatogramm von Levofloxacin (LVX) und Ciprofloxacin (CIP).....	36
Abbildung 14: Chromatogramm von Levofloxacin (LVX), Ciprofloxacin (CIP) und Moxifloxacin (MXF)	37
Abbildung 15: Chromatogramm von Ceftriaxon (CRO), Cefiderocol (CFC) und Ertapenem (ETP)	37
Abbildung 16: Chromatogramm von Cefotaxim (CTX), Cefazolin (CFZ) und Cefuroxim (CMX).....	38
Abbildung 17: Chromatogramm von Moxifloxacin (MXF).....	38
Abbildung 18: Chromatogramm von Tedizolid (TZD) und Flucloxacillin (FXN)	39
Abbildung 19: Chromatogramm von Valproinsäure (VPA).....	39
Abbildung 20: Chromatogramm von Fluconazol (FLC), Benzylpenicillin (PEN) und Piperacillin (PIP)	40
Abbildung 21: Chromatogramm von Sulfamethoxazol (SMX), Trimethoprim (TMP) und Linezolid (LZD).....	40
Abbildung 22: Chromatogramm von Flucloxacillin (FXN) und Clindamycin (CLI).....	41
Abbildung 23: Chromatogramm von Voriconazol (VRC) und Clindamycin (CLI)	41
Abbildung 24: Autosampler-Stabilität (18-24 h/6 °C)	42
Abbildung 25: Unspezifische Bindung [%]	44
Abbildung 26: Proteinkonzentration [g/dL] in den Ultrafiltraten	45
Abbildung 27: Bland-Altman-Diagramm – Temperaturabhängigkeit.....	48
Abbildung 28: Bland-Altman-Diagramm – Vorinkubation.....	50
Abbildung 29: Bland-Altman-Diagramm – Einfluss der Zentrifugalkraft (3000 × g gegen 1000 × g).....	52
Abbildung 30: Einfluss der Zentrifugalkraft in Abhängigkeit von der molaren Masse	53
Abbildung 31: Bland-Altman-Diagramm – Vergleich „altes“ Serum gegen „frisches“ Serum, ohne Puffer	55
Abbildung 32: Bland-Altman-Diagramm – Vergleich „altes“ Serum gegen „frisches“ Serum, mit Puffer	57
Abbildung 33: Bland-Altman-Diagramm – pH-Abhängigkeit	58
Abbildung 34: Struktur von Cefiderocol.....	59

Abbildung 35: Einfluss des Puffersystems – Interaktion von Cefiderocol mit Calciumionen	60
Abbildung 36: Einfluss des Puffersystems auf die f_u von Ertapenem.....	60
Abbildung 37: Absoluter Unterschied der f_u [%] zwischen HEPES- bzw. phosphatgepuffertem Serum	62
Abbildung 38: UV-Spektren von Ceftazidim und Avibactam	63
Abbildung 39: Retentionsfaktoren von CAZ und AVI als Funktion der TBA-Konzentration.....	64
Abbildung 40: Chromatogramme von CAZ und AVI, die interferierende Matrixbestandteile zeigen	65
Abbildung 41: Chromatogramme von CAZ und AVI in Serum und von Leerserum gesunder Probanden.....	66
Abbildung 42: Lagerstabilität von Ceftazidim und Avibactam.....	70
Abbildung 43: Chromatogramme von Patientenplasma	71
Abbildung 44: Konzentrations-Zeit-Verlauf von Ceftazidim und Avibactam	72
Abbildung 45: Ionenpaarchromatographie von Ceftazidim und Avibactam	75

8.2 Publikationen im Rahmen der Dissertation

Lier C., A. Dejaco., A. Kratzer, MG. Kees, F. Kees, und C. Dorn (2024). Free serum concentrations of antibiotics determined by ultrafiltration: Extensive evaluation of experimental variables. *Bioanalysis*.

Lier C., F. Kees, A. Witowski, T. Rahmel, S. Pockes, C. Dorn (2025). Simultaneous determination of ceftazidime and avibactam in patients by isocratic HPLC with photometric detection using ion-pair chromatography. *Journal of Chromatography Open*.

Chen Z., M. Taubert, C. Chen, C. Dokos, U. Fuhr., T. Weig, M. Zoller, S. Heck, K. Dimitriadis, N. Terpolilli, C. Kinast, C. Scharf, **C. Lier**, C. Dorn und U. Liebchen (2023). Plasma and Cerebrospinal Fluid Population Pharmacokinetics of Vancomycin in Patients with External Ventricular Drain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

Dejaco A., C. Dorn, **C. Lier**, D. Fleischmann, A. Kratzer, K. Habler, M. Paal, M. Gruber, J. Rosenberger und MG. Kees (2024). Target-controlled dialysis for antibiotics (TCD-ABx). *Intensive Care Medicine Experimental*.

Hosmann, A., M. M Moser, W. van Os, L. Gramms, V. Al Jalali, M. Sanz Codina, W. Plöchl, **C. Lier**, F. Kees, C. Dorn, K. Rössler, A. Reinprecht und M. Zeitlinger (2024). Linezolid brain penetration in neurointensive care patients. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

Sanz-Codina, M., W. van Os, A.D. Pham, A. Jorda, M. Wölf-Duchek, F. Bergmann, E. Lackner, **C. Lier**, J. G. C. van Hasselt, I.K. Minichmayr, C. Dorn, M. Zeitlinger, & V. Al Jalali (2024). Target-site cefiderocol pharmacokinetics in soft tissues of healthy volunteers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

Witowski, A., L. Palmowski, I. K. Minichmayr, M. Zeitlinger, C. Dorn, **C. Lier**, M. Adamzik, H. Nowak und T. Rahmel (2024). Concentrations of ceftazidime and avibactam in bile fluid-a prospective phase IIb study. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

8.3 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei PD Dr. Christoph Dorn für die Bereitstellung des Themas und die ununterbrochene Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken. Durch die fachliche Unterstützung, die fortwährend intensive Betreuung und sein Engagement in der Forschung konnte diese Arbeit erst realisiert werden. Ein großes Dankeschön geht an Prof. Dr. Frieder Kees für die Einführung in die HPLC-Analytik und die vielen hilfreichen Tipps und Tricks für die Arbeit im Labor. Ich bin dankbar und beeindruckt von dem Enthusiasmus, mit dem Herr Prof. Dr. Kees noch immer im Labor tätig ist.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Prof. Dr. Steffen Pockes für die Betreuung der Weiterbildung zum Fachapotheker, die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Praktikumsleitung und für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Jens Schloßmann möchte ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Aufnahme in die Lehrstuhlseminare seiner Arbeitsgruppe und die damit verbundenen konstruktiven Diskussionen danken. Zudem möchte ich mich dafür bedanken, dass Herr Prof. Dr. Schlossmann als Mitglied des Prüfungsausschusses zur Verfügung steht.

Vielen herzlichen Dank an Dr. Michael Majer, der mich mit großer Sorgfalt bei der Korrektur und einem stets offenen Ohr in jeder Phase unterstützt hat. Zudem gebührt Herrn Dr. Majer großes Lob für die Bereitstellung beachtlicher Mengen an Blut.

Bei Astrid Seefeld und Simon Kerler möchte ich mich für ihre Unterstützung im Laboralltag, die Blutentnahmen sowie für den stets humorvollen, herzlich-bayerischen Austausch bedanken.

Bei meinen Kolleginnen und Kollegen, die zu Freundinnen und Freunden geworden sind – v.a. Alex, Bernadette, Denise, Jonas, Kathi, Laura, Leo, Lukas, Merlin, Philipp, Rieke, Robert und Sally – möchte ich mich besonders für die vielen gemeinsamen schönen Momente jenseits des universitären Alltags bedanken.

Zum Schluss gilt mein Dank meinen Eltern, meinem Bruder Lukas und meiner Freundin Sofia, die mir immer wertvollen Rückhalt gegeben haben.

8.4 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 24.09.2025

(Constantin Lier)