

MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Quantifizierung von Meropenem mittels HPLC-MS/MS in Peritonealdialysat und Serum

verfasst von | submitted by

Fatima Adigözel BSc

angestrebter akademischer Grad | in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra pharmaciae (Mag. pharm.)

Wien | Vienna, 2024

Studienkennzahl lt. Studienblatt |
Degree programme code as it appears on the
student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt | Degree pro-
gramme as it appears on the student record
sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von | Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Gottfried Reznicek

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	4
ABSTRACT	5
1. EINLEITUNG	6
1.1. Peritonealdialyse	7
1.1.1. Anatomie und Aufgaben des Peritoneums	7
1.1.2. Das Peritoneum als Dialysemembran	7
1.1.3. Methodik	8
1.1.4. Arten der Peritonealdialyse	8
1.1.5. Vorteile und Nachteile der Peritonealdialyse	10
1.1.5.1. Vorteile	10
1.1.5.2. Nachteile	10
1.1.6. Peritonitis	10
1.1.7. Meropenem	11
2. FRAGESTELLUNG	13
2.1. Problematik	13
2.2. Klinische Studie des Universitätsklinikums St. Pölten	13
3. MATERIALIEN UND METHODEN	14
3.1. Materialien und Geräte	14
3.2. Substanzen	16
3.2.1. Meropenem als Reinsubstanz	16
3.2.2. Doripenem als interner Standard	17
3.2.3. Precinorm U	17
3.2.4. Physioneal® und Extraneal®	18
3.3. Methoden	21
3.3.1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	21
3.3.1.1. Aufbau	21
3.3.1.2. Formen der HPLC	22
3.3.2. Massenspektrometrie	23
3.3.2.1. Aufbau	23
3.3.2.2. Funktion	24
3.3.2.3. Ionisation	24
3.3.2.4. Analysator	24
3.3.3. HPLC-MS/MS	26
3.3.4. Methode und Parameter	26
3.3.5. Eichgerade	29
3.3.6. Patientenproben	31
3.3.7. Probenaufarbeitung	32
3.3.7.1. Vortest des Serums	33
3.3.7.2. Auswahl des Fällungsreagens	33
3.3.7.3. Serum	34
3.3.7.4. Dialysat	34
4. ERGEBNISSE	35
4.1. Ergebnisse der Serumproben	35
4.1.1. Zusammenfassung aller Serumproben	35

4.1.2. Patient 1	36
4.1.3. Patient 2	37
4.1.4. Patient 3	38
4.1.5. Patient 4	39
4.1.6. Patient 5	40
4.1.7. Patient 6	41
4.2. Ergebnisse der Dialysatproben	42
4.2.1. Zusammenfassung aller Dialysatproben	42
4.2.2. Patient 1	44
4.2.1. Patient 2	45
4.2.2. Patient 3	46
4.2.1. Patient 4	47
4.2.1. Patient 5	48
4.2.1. Patient 6	49
5. DISKUSSION	50
6. CONCLUSIO	53
7. ANHANG	54
Abbildungs-, Tabellen- und Diagrammverzeichnis	54
Literaturverzeichnis	56

Zusammenfassung

Die Peritonealdialyse verbessert als Alternativdialyseverfahren die Lebensqualität der Patienten und besitzt viele Vorteile im Gegensatz zur Hämodialyse. Allerdings besteht hierbei auch die Gefahr einer häufigen Komplikation, die Peritonitis, auch Bauchfellentzündung genannt. Diese wird durch bakterielle Infektionen oder andere Organismen verursacht. Die falsche Behandlung von multiresistenten Erregern ist ein wachsendes Problem im Gesundheitswesen und die Infektionen mit MRE führen zunehmend zu vielen Todesfällen.

Aktuell gibt es keine allgemein empfohlenen Antibiotika für die Peritonealdialyse, jedoch sollten sie eine breite Palette von Pathogenen abdecken. Deshalb wird empfohlen, prophylaktisch Breitbandantibiotika in die Dialyseflüssigkeit zu geben, um Infektionen an der Katheteraustrittsstelle zu verhindern. Es wurden bereits Empfehlungen für Antibiotika gegen grampositive und gramnegative Keime herausgegeben. Unter anderem wird Meropenem als Zweitlinientherapie für PD-bedingte Peritonitis empfohlen, aber es gibt begrenzte Informationen zur intraperitonealen Verabreichung.

Meropenem gehört zu den Carbapenemen, einer Art von β -Laktam-Antibiotika. Es wurde erstmals 1985 in der klinischen Praxis eingesetzt und wirkt gegen eine breite Palette von grampositiven, gramnegativen, aeroben und anaeroben Bakterien. Mithilfe des β -Laktam-Rings von Meropenems wird die bakterielle Zellwandsynthese gehemmt.

Das Hauptziel dieser Masterarbeit bestand darin, den Meropenemgehalt in Dialysat- und Serumproben von sechs Probanden mithilfe der HPLC-MS/MS zu messen. Dabei wurde analysiert, welche Menge des Wirkstoffes durch das Bauchfell in den Blutkreislauf gelangte und ob ein wirksamer Plasmaspiegel erreicht wurde, um Peritonitiden zu behandeln. Die Resultate weisen auf deutliche Konzentrationssteigerungen in den Dialysatproben hin, die mit den berechneten Absorptionsraten der Patienten übereinstimmen.

Abstract

Peritoneal dialysis (PD) has been a common method of blood purification for a very long time, offering advantages over hemodialysis. The option to administer the treatment in the comfort of one's own home not only enhances the patients' quality of life, but also reduces the expenses associated with treatment.

Peritonitis, a frequent complication, poses a risk to treatment success. Antibiotic resistance complicates treatment, making it challenging to combat infections effectively. Meropenem, a potent carbapenem antibiotic, is recommended for intraperitoneal administration in peritoneal dialysis-associated peritonitis. The antibiotic is effective against a wide range of gram-positive, gram-negative, aerobic and anaerobic germs. Limited data exists on the pharmacokinetics of meropenem when administered intraperitoneally.

This master's thesis aimed to examine meropenem levels in dialysate and serum samples from six patients using HPLC-MS/MS. The results were used to determine how much meropenem was absorbed into the bloodstream through the peritoneum and whether a therapeutic plasma concentration could effectively treat peritonitis. The findings showed a significant rise in meropenem levels in the dialysate samples, matching the absorption rates of the patients.

1. Einleitung

Über 10% der Weltbevölkerung leidet an einer chronischen Nierenerkrankung, welche eine der häufigsten Todesursachen heutzutage darstellt. Im Jahr 2017 litten weltweit ungefähr 840 Millionen Menschen an einer chronischen Nierenerkrankung und mehr als 4500 Patienten waren im Jahr 2019 österreichweit dialysepflichtig.^{1,2} Von einer chronischen Nierenerkrankung spricht man, wenn die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) pro Minute weniger als 60mL beträgt und länger als drei Monate andauert. Die Kidney Disease Outcome Quality Initiative (KDOQI) und Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) teilten die chronische Nierenerkrankung je nach Schweregrad in Stadien ein. Die Stadieneinteilung richtet sich nach der glomerulären Filtrationsrate.³ Bei Bedarf einer Nierenersatztherapie oder bei einer GFR von 15mL/min/1,73m², ist man im Endstadium (Stadium 5) angelangt. Bestimmte Laborwerte und der Patientenzustand entscheiden über die Art und Zeit der Nierenersatztherapie.⁴

Die Niere ist eines der wichtigsten Organe mit zahlreichen essenziellen Funktionen. Sie reguliert den Säure-, Basen-, Elektrolyt- und Wasserhaushalt des menschlichen Körpers. Zudem werden schädliche harnpflichtige Substanzen über die Niere ausgeschieden. Die Elimination und Rückresorption von Zucker, Aminosäuren und weiteren wichtigen Stoffen wird ebenfalls über die Niere geregelt. Neben den exkretorischen Nierenfunktionen hat die Niere auch endokrine und metabolische Funktionen. Sie ist für die Hämatopoese (Bildung des Erythropoetins), das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und den Calciumstoffwechsel zuständig. Eine gesunde Niere reinigt in der Regel 90-120mL Blut pro Minute. Eine verminderte GFR geht mit einer verminderten Nierenfunktion einher und ist damit ein Indiz für eine chronische Nierenerkrankung.^{5,6}

Nachdem die Entscheidung für eine Nierenersatztherapie getroffen wurde, sollte die Behandlung frühestmöglich begonnen werden. Das allgemein bekannte Dialyseverfahren ist die Hämodialyse, bei welcher das Blut extrakorporal über ein Dialysegerät gereinigt wird.⁵ Das körpereigene Blut wird über das Gerät gereinigt und fließt wieder anschließend in den Blutkreislauf zurück. Der osmotische Stoffaustausch erfolgt über eine künstliche semipermeable Dialysemembran. Über eine Pumpe wird pro Minute ein Blutfluss von 250-350mL vorangetrieben. Im Normalfall findet dieses Dialyseverfahren in Krankenhäusern bzw. Dialysezentren statt, welches viele Patienten im Alltag einschränkt.⁷

Ein anderes Dialyseverfahren, welches immer mehr an Bedeutung gewinnt, ist die Peritonealdialyse. Dieses ist ein Heimdialyseverfahren und ist durch richtiges Einschulen einfach durchzuführen.⁷

1.1. Peritonealdialyse

Die Peritonealdialyse ist ein alternatives Dialyseverfahren zur Hämodialyse. Dieses wurde bereits in den 70er Jahren entwickelt. Aufgrund der seiner außergewöhnlichen Anatomie kann das Peritoneum bei der Nierenersatztherapie zum Einsatz kommen. Dabei bringt dieses Verfahren sowohl Vorteile als auch Nachteile mit sich.^{8,9}

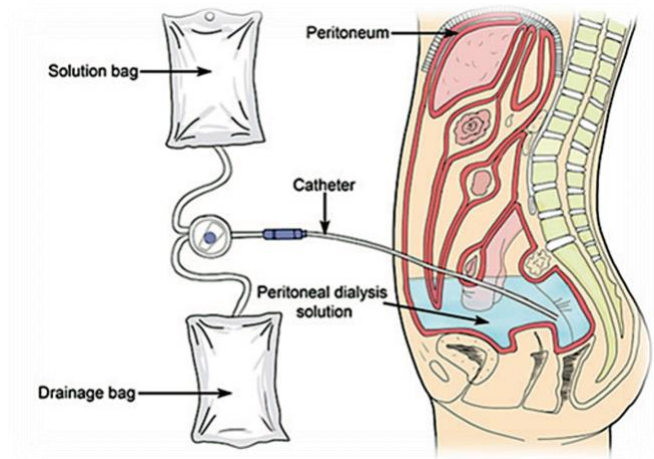


Abbildung 1: Peritonealdialyse¹⁷

1.1.1. Anatomie und Aufgaben des Peritoneums

Das Peritoneum, auch Bauchfell genannt, besteht aus einer dünnen Hautschicht, welche sich abwärts der Rippen bis zum Beckenbeginn erstreckt und dabei die inneren Organe abdeckt. Das viszerale Peritoneum bedeckt einen Teil der intraabdominellen Organe, wie Leber, Magen, Gallenblase, Dünn- und Dickdarm und das parietale Peritoneum überzieht die Peritonealhöhle (das Zwerchfell und die innere Bauchwand). Somit nimmt das Peritoneum die inneren Organe, vor allem im Verdauungstrakt, in Schutz, hält diese in Position und stellt die notwendige Verschiebbarkeit der Organe problemlos sicher. Außerdem verfügt das Peritoneum über eine Faltenstruktur, durch die das Bauchfell eine Größe von bis zu ungefähr zwei Quadratmeter erreichen kann. Zu den Aufgaben des Bauchfells gehören die Organversorgung und die Produktion einer viskösen Flüssigkeit. Diese dient dazu, den Reibungswiderstand bei der Bewegung der inneren Organe zu verringern. Die Versorgung der Organe erfolgt über Nerven, Lymph- und Blutgefäße.^{9,10,11,12}

1.1.2. Das Peritoneum als Dialysemembran

Das Peritoneum wird anatomisch in zwei verschiedene Räume, den Intra- und Extraperitonealraum eingeteilt. Der Intraperitonealraum befindet sich innerhalb des Peritoneums und ist mit dem viszeralen Blatt bekleidet, wohingegen der Extraperitonealraum außerhalb des Peritoneums liegt. Die Membran des Peritoneums besteht aus drei Hauptanteilen: das Mesothel, Interstitium und Lymph- und Blutgefäßsystem. Aufgrund der ausgezeichneten Durchblutung dient sie hervorragend als natürliche Dialysemembran. Dieses natürliche Filterorgan kann durch seine unterschiedlichen Poren, welche verschiedene Stoffe durchlassen, den Stoff- und

Flüssigkeitsaustausch durchführen. Somit findet ein bidirektionaler Stoffaustausch zwischen dem Peritoneum und der Dialyseflüssigkeit statt.^{10,13,14,15}

1.1.3. Methodik

Die Dialyse ist ein Verfahren, in dem das Blut gereinigt wird. Bei der herkömmlichen Hämodialyse wird das Blut extrakorporal (außerhalb des Körpers) gereinigt, wohingegen die Peritonealdialyse das Blut intrakorporal reinigt. Der peritoneale Zugang für den permanenten Kunststoff-Katheter wird operativ angelegt. Über diesen Katheter kann die Dialyseflüssigkeit in die Bauchhöhle eindringen und das Dialysat abfließen. Das Peritoneum dient hier als natürliche semipermeable Membran, wodurch der Austausch vieler Stoffe stattfindet. Dieser Stoffaustausch wird durch den osmotischen Druck, welcher aufgrund der hypertonen Glukosekonzentration in der Dialyseflüssigkeit erzeugt wird, vorangetrieben. Dabei kommt es zu einem bidirektionalen Austausch. Die harnpflichtigen

Stoffe und Elektrolyte wie zum Beispiel Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, Kalium und Phosphat wandern aus dem systemischen Kreislauf in das Dialysat und gleichzeitig diffundiert aus der hypertonen Dialyseflüssigkeit die Glukose in das Blut. Die Glukosediffusion führt nach einiger Zeit zur Abnahme des osmotischen Gradienten im Bauchraum. Infolgedessen wird die Ultrafiltrationsrate rückläufig. Die

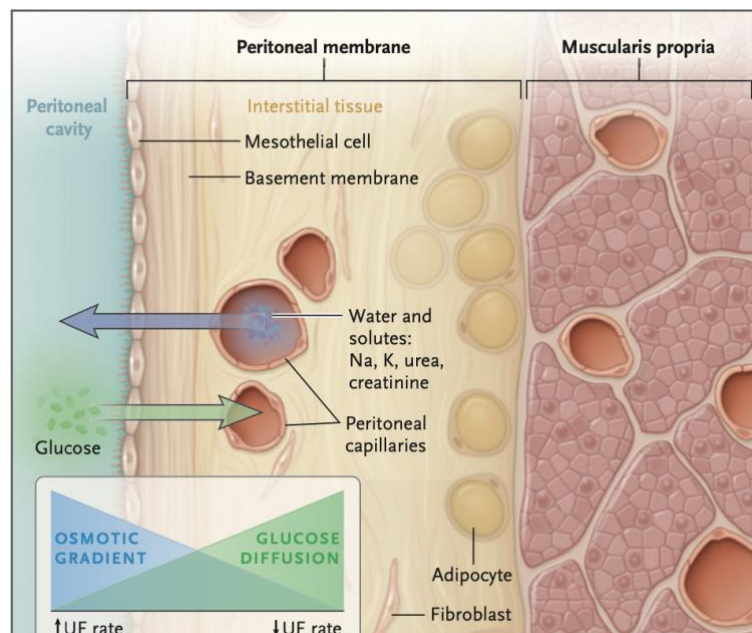


Abbildung 2: System des Stoffaustausches¹⁶

Geschwindigkeit dieses Prozesses hängt von den Patienten ab. Dabei spielen Alter, Körpergewicht und Schweregrad der Niereninsuffizienz eine wichtige Rolle.^{4,10,15,16,17}

1.1.4. Arten der Peritonealdialyse

Die Peritonealdialyse kann man auf zwei unterschiedliche Arten durchführen. Einerseits gibt es die Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis (CAPD) und andererseits die Automated

Peritoneal Dialysis (APD). Beide Methoden erfüllen im Prinzip denselben Zweck, jedoch auf unterschiedlicher Weise. Der wesentliche Unterschied ist ein programmierbares Gerät, welches Cycler genannt wird und bei der APD-Form zum Einsatz kommt. Der Cycler steuert das Füllvolumen, den Einlauf und Auslauf sowie die Verweildauer.¹⁸

Das CAPD Verfahren wurde erstmals von den Forschern Robert Popovich und Jack Moncrief in 1975 beschrieben.¹⁴ Hierzu wird kein Cycler benötigt und es werden täglich je nach Patient ca. 4-5 Beuteln gewechselt. Nachdem eine frische Dialyseflüssigkeit über den Katheter angeschlossen wird, läuft zunächst die in der Bauchhöhle verweilte Dialyselösung ab. Anschließend wird der Katheter mit der frischen Dialyseflüssigkeit gespült und der Einlauf findet statt. Nachdem sich das Peritoneum mit der neuen Dialyseflüssigkeit befüllt hat, können die Beuteln abgenommen und der Katheter mit einer Kappe abgedichtet werden. Der ganze Auswechselvorgang dauert ungefähr 20 Minuten. Der Einlauf der frischen Dialyseflüssigkeit geschieht über die Schwerkraft.^{18, 19}

Im Gegensatz zur CAPD, die manuell zu bedienen ist, läuft das APD-Verfahren automatisiert ab. Die exakte Menge an Dialyseflüssigkeit, der Ein- und Auslauf wird durch den Cycler gewährt. Eine Behandlung dauert ungefähr 8-12 Stunden und wird normalerweise nachts im Schlaf durchgeführt, wobei dies von der individuellen Nierenfunktion der Patienten abhängig ist und gegebenenfalls angepasst wird. Je nach Zustand der Nierenfunktion wird das Gerät an unterschiedliche Verfahren der APD wie CCPD, NIPD, usw. eingestellt.^{18,19}

Die nächtliche intermittierende Peritonealdialyse (NIPD) wird beispielsweise bei Patienten, deren Restnierenfunktion in gutem Zustand ist und schnelle Transportleistungen haben, angewandt. Die Behandlung findet nachts statt und untertags ist der Bauchraum leer.¹⁸

Eine kontinuierliche zyklische Peritonealdialyse (CCPD) wird bevorzugt bei Patienten mit einer schnellen bis durchschnittlichen Transportleistung und bei einer Verschlechterung der Restnierenfunktion angewandt. Über Nacht wird der Großteil der Behandlung durchgeführt, jedoch bleibt bei der CCPD noch ein wenig Dialyseflüssigkeit im Bauchraum übrig damit tagsüber die Entgiftung fortgesetzt wird. Die längere Dialysezeit hat eine verbesserte

Dialysequalität zur Folge.^{16,18,19}

1.1.5. Vorteile und Nachteile der Peritonealdialyse

Für dialysepflichtige Patienten stehen häufig die Peritonealdialyse oder Hämodialyse zur Auswahl. Wenn aus medizinischen Gründen keiner der beiden Methoden für den jeweiligen Patienten bevorzugt wird, stehen ihnen zwei Verfahren zur Wahl. Dabei werden sie über jegliche Vor- und Nachteile informiert und aufgeklärt.⁴

1.1.5.1. Vorteile

Durchschnittlich müssen Hämodialyse-Patienten 3-4x wöchentlich ins Krankenhaus, um die Behandlung durchzuführen. Diese Methode kostet zum einen Zeit und zum anderen schränkt sie die Patienten in ihrem Alltag ein, da sie öfters über einige Stunden im Krankenhaus verbringen müssen. Als Alternative zur Hämodialyse gibt es die Peritonealdialyse, wo Patienten selbstständig von zuhause ihre Behandlung fortsetzen können. Dies erspart einerseits Kosten und Personal und andererseits bietet die Peritonealdialyse den Patienten eine bessere Lebensqualität. Diese können nach einer entsprechenden Einschulung 3-4x täglich bequem und unabhängig vom Krankenhaus ihren Dialysatwechsel durchführen.^{19,20}

1.1.5.2. Nachteile

Um eine erfolgreiche Therapie zu erzielen, muss jeder Patient in dieses Verfahren eingeschult werden. Zudem sind hierbei Patienten auf sich selbst gestellt und müssen mit Disziplin und Eigenverantwortung die Dialyse durchführen. Ein großes Problem kann vor allem eine Entzündung des Bauchfells, auch Peritonitis genannt, bereiten. Diese Infektion kann sich im Laufe der Therapie aufgrund schlechter Hygienebedingungen entwickeln. Des Weiteren können nicht-infektiöse, mechanische oder metabolische Komplikationen wie Katheterstörungen, Abflussstörungen oder der Beginn eines metabolischen Syndroms etc. auftreten.^{10,16,21,22}

1.1.6. Peritonitis

Die Entzündung des Bauchfells, kurz Peritonitis, kann durch unterschiedliche Gründe entstehen. Peritonitiden sind die häufigste Ursache für das Scheitern der Peritonealdialyse,

weshalb Patienten auf eine Umstellung auf die Hämodialyse angewiesen sind. Sie können mit schweren Komplikationen einhergehen und in einigen schlimmen Fällen sogar letal enden. Laut der International Society for Peritoneal Dialysis (ISPD) wird die Diagnose einer Peritonitis gestellt, wenn: 1) ein trüber Dialysat abfließt, 2) entsprechende klinische Symptome, wie Bauchschmerzen bei Patienten auftreten oder 3) die Anzahl der Leukozyten im Dialysat $>100/\mu\text{L}$ entspricht. Streptokokken, Escherichia coli, Enterokokken, Staphylokokken und Candida sind die häufigsten Keime, die eine Peritonitis verursachen. Zurzeit gibt es keine allgemein empfohlenen Antibiotika, jedoch sollten diese grampositive, gramnegative, aerobe und anaerobe Pathogene abdecken. Daher wird eine prophylaktische Zugabe von Weitspektrumantibiotika in die Dialyseflüssigkeit empfohlen, um Infektionen an der Katheterausstrittsstelle vorzubeugen. Die ISPD hat Antibiotika-Empfehlungen für grampositive und gramnegative Keime veröffentlicht. Außerdem soll, sofern keine Sepsis vorliegt, der intraperitonealer Verabreichungsweg bevorzugt werden.^{22,23,24,25,26,27}

1.1.7. Meropenem

Meropenem ist ein Breitband Carbapenem- β -Laktam-Antibiotikum und hat ein Molekulargewicht von 383,46 g/mol. Alle β -Laktam-Antibiotika enthalten in ihrer Struktur den typischen viergliedrigen β -Laktam-Ring, welcher das aktive Zentrum für die antibakterielle Wirkung ist. Meropenem zählt zu den Carbapenemen, welche eine Untergruppe der β -Laktam-Antibiotika ist. Der Name leitet sich aus der chemischen Grundstruktur, welche dem Penicillin ähnelt, jedoch besitzen sie anstatt des Schwefel-Atoms ein Kohlenstoff-Atom („Carba-“) und in dem 5er-Ring kommt eine Doppelbindung vor („penem“).^{28,29}

Dieses Antibiotikum fand zum ersten Mal im Jahr 1985 in der Klinik Anwendung und ist gegen eine weite Palette von grampositiven, gramnegativen, aeroben und anaeroben Keimen wirksam. Meropenem

ist eine stabile Substanz gegen

die Hydrolyse durch viele β -

Laktamasen. Diese Enzyme spalten den β -Laktam-Ring der Antibiotika und machen sie somit unwirksam. Der β -Laktam-Ring des Meropenems ist für die Inhibition der bakteriellen

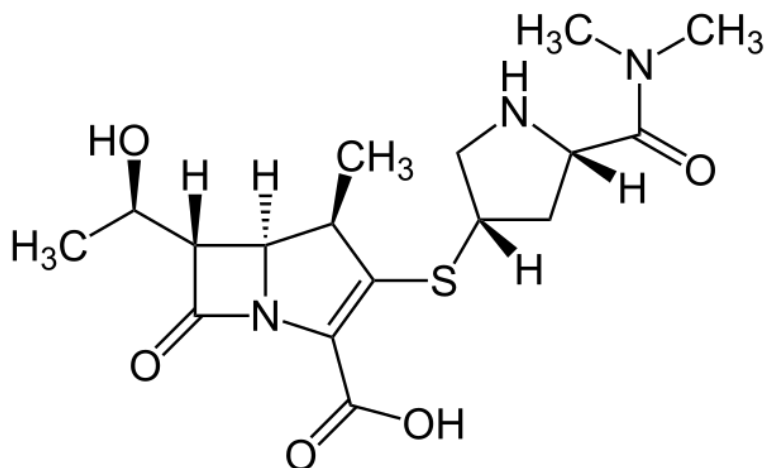


Abbildung 3: Meropenem Struktur³⁰

Zellwandsynthese verantwortlich. Dabei hemmen sie die Peptidoglykanquervernetzung der Bakterien und wirken so zeitabhängig bakterizid. Das heißt, solange die minimale Hemmkonzentration (MHK) im Plasmaspiegel überschritten ist, wirkt diese Antibiotikagruppe auf die wachsende Bakterienpopulation. Mittels der minimalen Hemmkonzentration (MHK/MIC) kann man auf die Wirksamkeit eines Wirkstoffs schließen. Sie gibt die geringste Konzentration eines Wirkstoffs an, bei der er wirksam ist bzw. das Wachstum des Bakteriums hemmt. Des Weiteren wird das wertvolle Breitbandantibiotikum als Reserveantibiotikum gehalten, welches bei schweren, lebensbedrohlichen Infekten eingesetzt wird. Meropenem kommt vor allem bei Hospitalinfektionen, abdominalen Infektionen wie Blinddarmentzündung, Peritonitis sowie bakterielle Meningitis zum Einsatz. Aufgrund der geringen neurotoxischen Wirkung ist Meropenem für die Therapie einer bakteriellen Hirnhautentzündung (Meningitis) erlaubt. Das Antibiotikum wird renal ausgeschieden und hat bei Erwachsenen eine Halbwertszeit von ungefähr einer Stunde. Außerdem ist Meropenem sehr stabil gegen die renale Dihydropeptidase (DHP-1), welche andere Antibiotika wie Imipenem inaktiviert und kann daher als Monotherapie verabreicht werden. Wegen seiner geringen Resorbierbarkeit aus dem Magen-Darm-Trakt, wird das Antibiotikum hauptsächlich parenteral verabreicht. Bei der Meropenem-Therapie ist eine Kombination mit Valproinsäure und Probenecid Vorsicht geboten. Die Verabreichung mit Probenecid führt zu einer verminderten Ausscheidung des Meropenems, wodurch sich die Wirkung des Wirkstoffs verstärkt. Überdies hat eine Meropenem-Valproinsäure-Kombination einen verminderten Plasmaspiegel der Valproinsäure zur Folge.^{29,30,31,32,33,34,35,36,37}

2. Fragestellung

2.1. Problematik

Obwohl die Peritonealdialyse eine enorme Erleichterung im Patientenalltag gewährleistet und die Lebensqualität verbessert, ist die häufigste Komplikation, die Peritonitis, der Hauptgrund, weshalb es zu einem Versagen kommt.³⁸ Nahezu allen PD-assoziierten Peritonitiden liegen bakterielle Infektionen zugrunde, allerdings können auch andere Organismen eine Peritonitis verursachen.³⁹ Laut dem ECDC (European Center for Disease Prevention and Control) führen multiresistente Erreger (MRE) in Europa jährlich zu 25.000 Todesfällen. Das Problem der multiresistenten Erreger im Gesundheitswesen nimmt somit immer weiter zu. Besonders problematisch ist die falsche anfängliche Behandlung, die bei MRE-Infektionen eingeleitet wird. Oft müssen Ärzte mit der antimikrobiellen Therapie empirisch beginnen, das heißt, bevor ein Nachweis des Erregers erfolgt ist.⁴⁰

Meropenem ist aufgrund seiner selteneren Nebenwirkung auf das zentrale Nervensystem das Mittel der zweiten Wahl bei der Therapie von PD-bedingter Peritonitis. Bisher gibt es jedoch nur begrenzte Informationen zur Pharmakokinetik von intraperitoneal verabreichtem Meropenem bei nierenerkrankten Patientengruppen.^{41,42} Die ISPD hat 2022 eine Antibiotikalistik mit den jeweiligen empfohlenen Dosierungen für die Behandlung von PD-assoziiierter Peritonitis veröffentlicht. Diese beruhen jedoch auf Kenntnissen der klinischen und pharmakokinetischen Studien, die hauptsächlich eine CAPD durchgeführt haben.⁴³

2.2. Klinische Studie des Universitätsklinikums St. Pölten

Das Universitätsklinikum St. Pölten führt eine pharmakokinetische Studie durch, in der die Serum- und Dialysatproben von sechs PD-Patienten untersucht werden. Den Patienten wurde das Antibiotikum Meropenem intraperitoneal verabreicht. In Zusammenarbeit mit der Abteilung für Pharmakognosie der Universität Wien wurden diese Proben vermessen und analysiert.

Das Hauptziel dieser Masterarbeit bestand darin, die Patientenproben mithilfe der HPLC-MS/MS zu analysieren. Dabei wurde untersucht, wie viel und wie schnell vom verabreichten Antibiotikum in den Blutkreislauf gelangt. Des Weiteren soll man mit den erhaltenen Auswertungen feststellen können, ob über die intraperitoneale Gabe ein ausreichend hoher Serumspiegel des Meropenems erreicht wird, um eine Bauchfellentzündung prophylaktisch zu behandeln.

3. Materialien und Methoden

In diesem Kapitel werden zunächst die verwendeten Materialien und Methoden beschrieben.

3.1. Materialien und Geräte

Zur Quantifizierung von Meropenem in den Proben wurde das HPLC/MS-System der Firma SCIEX verwendet. Die Bestandteile des Geräts und weitere Materialien werden in der Tabelle 1 aufgezählt.

Die mobile Phase bestand aus zwei Komponenten, welche als Gradientenelution eingesetzt wurden. Detaillierte Angaben und Parameter der verwendeten Methode werden in Kapitel 3.3.4 geschildert.

Geräte/ Software/ Materialien	Name	Hersteller
HPLC	ExionLC™ Controller	AB Sciex Instruments
	ExionLC™ Degasser	AB Sciex Instruments
	ExionLC™ AD Autosampler	AB Sciex Instruments
	ExionLC™ AD Pump	AB Sciex Instruments
	ExionLC™ AC Column Oven	AB Sciex Instruments
	Kinetex® 2.6 µm PS C18 100 A LC Column 100 x 2.1 mm	Kinetex
MS	QTRAP® 4500	AB Sciex Instruments
Software	Analyst Instrument Control and Data Processing Software Version 1.7.2.	AB Sciex Instruments
Zentrifuge	Heraeus Pico 21 Centrifuge	Thermo Electron Corporation
Laborkühlschrank	Lagerkühlschrank Mediline KU1710	Liebherr GmbH
Kühltruhe (-20°C)	Gefriertruhe GT 2102	Liebherr GmbH

Kühltruhe (-70°C)	TSX Series	Thermo Scientific TM
Vortexer	REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG
Analysenwaage	Mettler AE 240 Elektronische Feinwaage	Mettler Toledo GesmbH
Kolbenhubpipetten	Rendorf® Research® plus Pipette 1000 µL, 200 µL, 20 µL	Eppendorf SE
Pipettenspitzen	Pipettenspitze 1000 µL, blau	Sarstedt AG & Co. KG
	Pipettenspitze 200 µL, gelb	Sarstedt AG & Co. KG
HPLC Vials	Vials N9, mit 0,2 mL integ. Insert	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
	Vials N9, 1,5 mL	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Vial-Deckel	N 9 PP, rot/gelb/grün/blau, Loch, Silikon-Septum	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Eppendorf Reagensvials	Reagiergefäß 1,5 mL	Sarstedt AG & Co. KG
Pasteurpipetten	Volac Disposable Glass Pasteur Pipettes 230 mm	Poulsen & Graf Ltd
Vollpipetten	Silberbrand Eterna, Klasse B Ex 20°C DIN, 1 mL, 2 mL	Brand GmbH + Co. KG

Tabelle 1: verwendete Geräte, Software und Materialien

3.2. Substanzen

Folgende Substanzen waren für die Probenaufarbeitung und Quantifizierung des Antibiotikums notwendig.

Substanzen/Reagentien	Name	Hersteller
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser	Abteilung für Pharmakognosie, Universität Wien
Ameisensäure	Ameisensäure ROTIPURAN® >98%, p.a., ACS	Carl Roth GmbH + Co. KG
Acetonitril	Acetonitril >99,9% HiPerSolv CHROMANORM®	VWR Chemicals
Methanol	Methanol >99,9% HiPerSolv CHROMANORM®	VWR Chemicals
Isopropanol	2-Propanol > 99,7% AnalaR NORMAPUR® ACS	VWR Chemicals
Meropenem	Meropenem 500mg (PHR 1772)	Sigma-Aldrich Handels GmbH
Doripenem	Doripenem Monohydrat 25mg (32138)	Sigma-Aldrich Handels GmbH
Precinorm U	Künstliches Serum	Roche Diagnostics GmbH

Tabelle 2: verwendete Chemikalien und Substanzen

3.2.1. Meropenem als Reinsubstanz

Die Reinsubstanz Meropenem (Produktnummer: PHR 1772) von der Firma Sigma-Aldrich Handels GmbH ist ein festes, weißes Pulver, welches im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt wird. Die Quantifizierung erfolgte durch eine Eichgerade, wobei Meropenem als externer Standard diente.

3.2.2. Doripenem als interner Standard

Doripenem (Produktnummer: 32138) wurde ebenfalls von der Firma Sigma-Aldrich Handels GmbH bezogen. Das feste, weiße Pulver wurde unter denselben Bedingungen wie Meropenem gelagert und sollte als interner Standard dienen. Es zeigte sich jedoch eine Instabilität von Doripenem in Lösung. Aus diesem Grund wurde Meropenem als externer Standard herangezogen.

3.2.3. Precinorm U

Das Lyophilisat Precinorm U von der Firma Roche Diagnostics GmbH wurde im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt und diente als künstliches Humanserum. Das Lyophilisat enthält diverse chemische und biologische Zusätze. Die genaue Zusammensetzung ist in der Tabelle 3 ersichtlich. In dieser Arbeit wurde es sowohl für die Auswahl der Fällungsreagentien als auch für die Wiederfindungsrate des Meropenems herangezogen. Der Arbeitsprozess wird in Kapitel 3.3.7.1 näher erläutert.⁴⁴

Bestandteile	Herkunft
ALT (GPT)	Herz (Schwein)
AST (GOT)	human, rekombinant
Albumin	Rinderplasma
Aldolase	Muskel (Kaninchen)
Alkalische Phosphatase	Plazenta (human, rekombinant)
Amylase, gesamt	Speichel (human) / Pankreas (Schwein)
Amylase, Pankreas	Pankreas (Schwein)
Creatinkinase	Muskel (Kaninchen)
γ -GT	human, rekombinant

GLDH	bakteriell, rekombinant
LD (LDH)	Herz (Schwein)
Lipase	Pankreas (human, rekombinant)
saure Phosphatase	Prostata (human) / Kartoffel
Gesamtprotein	Rinderplasma

Tabelle 3: Zusammensetzung von Precinorm U⁴⁴

3.2.4. Physioneal® und Extraneal®

Physioneal® und Extraneal® sind zwei Dialyseflüssigkeiten, die im Rahmen der klinischen Studie des Universitätsklinikums St. Pölten benutzt wurden. Physioneal® wird als Doppelbeutel verpackt, wobei sich in der kleinen Kammer A die Elektrolytlösung und in der großen Kammer B die Pufferlösung befinden. Diese werden vor der Verwendung miteinander vermischt. Die Arzneimittel, wie Meropenem werden in die obere Kammer des Beutels zugesetzt. Die genaue Zusammensetzung der Dialyseflüssigkeit ist aus den Tabellen 4 und 5 zu entnehmen. Während die Peritonealdialyselösung *Physioneal® 40 Glucose 1,36 % w/v / 13,6 mg/mL* oder *2,27 % w/v / 22,7 mg/mL* mit einer bestimmten Konzentration an Meropenem versetzt worden ist, blieb die Extraneal-Lösung unbehandelt. Extraneal® wurde einmal tagsüber verwendet.⁴⁵

In dieser Studie wurde nur die mit 2 g Meropenem versetzte Dialyseflüssigkeit Physioneal® zu bestimmten Zeiten während der APD entnommen und im Rahmen dieser Arbeit vermessen.

Physioneal® vor dem Mischen	Kammer A (Elektrolytlösung)		
		1,36%	2,27%
	Glucose Monohydrat	41,25 g	68,85 g
	entspr. wasserfreier Glucose	37,5 g	62,6 g
	Calciumchlorid Dihydrat	0,507 g	
	Magnesiumchlorid Hexahydrat	0,140 g	
	Kammer B (Pufferlösung)		
	Natriumchlorid	8,43 g	8,43 g
	Natriumhydrogencarbonat	3,29 g	3,29 g
	Natrium-(S)-Laktat-Lösung	2,63 g	2,63 g

Tabelle 4: Physioneal® Zusammensetzung vor dem Mischen⁴⁵

Physioneal® nach dem Mischen (pH= 7,4)		1,36%	2,27%
	Osmolarität (mOsmol/L)	344	395
	Glucose Monohydrat	15,0 g	25,0 g
	entspr. wasserfreier Glucose	13,6 g	22,7 g
	Natriumchlorid	5,38 g	
	Calciumchlorid Dihydrat	0,184 g	
	Magnesiumchlorid Hexahydrat	0,051 g	
	Natriumhydrogencarbonat	2,10 g	
	Natrium-(S)-Laktat-Lösung	1,68 g	

Tabelle 5: Physioneal® Zusammensetzung nach dem Mischen⁴⁵

3.3. Methoden

In diesem Abschnitt werden die im Rahmen dieser Arbeit angewandten Methoden ausführlich erklärt.

3.3.1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography) ist eine Art der Säulenchromatographie und somit eine chromatographische Auftrennungsmethode von Substanzgemischen, welche sowohl qualitativ als auch quantitativ analysiert werden können.^{46,47,48}

3.3.1.1. Aufbau

Für die Durchführung einer HPLC sind folgende Komponente (Abbildung 4) notwendig:

- mobile Phase (Fließmittel)
- Pumpsystem
- Injektor
- stationäre Phase (Trennsäule)
- Detektor
- Auswertsystem (PC, usw.)⁴⁶

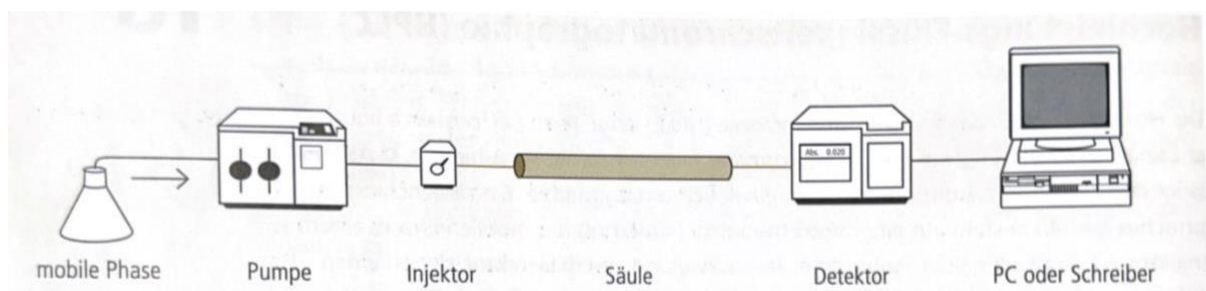


Abbildung 4: schematischer Aufbau einer HPLC⁴⁶

Die Auswahl der Fließmittel für die HPLC wird anhand der Analyteigenschaften und der

stationären Phase bestimmt. Um Störsignale beim Detektieren zu vermeiden, muss das Fließmittel hochrein sein. Aus diesem Grund sind im HPLC-System zur Entfernung von jeglichen Verunreinigungen oder gelösten Gasen engporige Filter- und Entgasersysteme eingerichtet. Aus Vorratsgefäßen wird das Fließmittel über die Pumpen zur stationären Phase gepumpt. Das Pumpsystem besteht aus mehreren Pumpen, die eine konstante Fließgeschwindigkeit gewährleisten. Der Injektor ist für die Applikation des Analyten mit einem definierten Volumen zuständig. Modernere HPLC-Systeme besitzen Autosampler, die bereits eingestellte Volumina aus den Vials, welche im Autosampler-Tablett stehen, entnehmen. Die chromatographische Trennung des Analyten erfolgt in der Trennsäule bzw. stationären Phase. Die Trenneffizienz der Säule ist von der Korngröße und Korngrößenverteilung abhängig. Je kleiner und gleichmäßiger diese Parameter sind, desto besser ist die Trennleistung. Die zu analysierenden Substanzen werden, nachdem sie die Säule verlassen, von einem Detektor, welcher an ein Auswertsystem gekoppelt ist, erfasst. Der Detektor kann je nach Eigenschaften des Analyten ausgewählt werden. Für diese Arbeit wurde ein Massenspektrometer als Detektor verwendet.^{46,47,48}

3.3.1.2. *Formen der HPLC*

Die vier Hauptformen der HPLC sind:

- Normal-Phase Chromatography (NP HPLC)
- Reversed-Phase Chromatography (Umkehrphasenchromatographie, RP HPLC)
- Ion-Exchange Chromatography (Ionenaustauschchromatographie, IEX)
- Size-Exclusion Chromatography (Größenausschlusschromatographie, SEC)⁴⁸

Bei der NP HPLC handelt es sich um eine polare stationäre Phase und eine unpolare mobile Phase. Das Trennverfahren basiert auf unterschiedliche Polaritäten des Analyten und dessen Wechselwirkung mit der stationären Phase. Die Analytenretention ist umso länger, je stärker die Wechselwirkung zwischen diesen ist.⁴⁸

Im Gegensatz dazu besitzt die RP HPLC eine unpolare stationäre Phase und eine polare mobile Phase. Die RP HPLC kann sehr ähnliche Verbindungen voneinander differenzieren. Aus diesem Grund ist sie die weit verbreitete und beliebteste HPLC-Art.⁴⁸

Die IEX trennt die Analytionen auf Basis ihrer Ladung. Die unterschiedliche Affinität und Ladung der Ionen zum Harz ermöglichen die Trennung.⁴⁸

Bei der SEC wird die Molekülgröße als Basis gesetzt. Dabei wandern unterschiedlich große Moleküle über ein poröses Gel, worin kleinere Moleküle länger zurückgehalten werden und größere Moleküle die Säule schneller passieren.⁴⁸

3.3.2. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine analytische Methode, mit der man die Masse von Molekülen bestimmt und Hinweise auf die Struktur von Molekülen erhält. Somit kann man anhand der Massenspektrometrie Verbindungen identifizieren und Substanzen in Proben quantifizieren.^{48,49,50}

3.3.2.1. *Aufbau*

Das klassische Massenspektrometer besteht aus folgenden Komponenten:

- Hochvakuum-Anlage
- Einlasssystem
- Ionenquelle
- Massenfilter
- Detektor^{48,49,50}

Das Massenspektrometer wird im Hochvakuum betrieben, um jegliche Störfaktoren für die Ionen auszuschließen. Die Probe kann entweder direkt mittels einer Spritze oder über ein gekoppeltes chromatographisches Verfahren eingeführt werden. Für die anschließende Ionisierung und Fragmentierung gibt es unterschiedliche Verfahren, welche in Kapitel 3.3.2.3. beschrieben sind. Je nach Ionisierungsmethode entstehen positiv oder negativ geladene Ionen. Beim Analysator angekommen, werden die gebildeten Ionen je nach Massenspektrometer in einem magnetischen und elektrischen Feld abgelenkt. So wird die Trennung der Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) ermöglicht. Zuletzt werden diese Ionen von einem Detektor erfasst, welcher das Signal für einen besseren Nachweis verstärken und daraus wird ein Massenspektrum generiert.^{48,49,50}

3.3.2.2. *Funktion*

Hierfür wird die Probe zunächst ionisiert. Danach erfolgt die Fragmentierung der entstandenen Ionen. Im Massenfilter werden sie in einem elektrischen Feld beschleunigt und aufgrund ihrer Masse und Ladung getrennt. Der Massenanalysator selektiert daraufhin die Ionen nach ihrer Masse und lenkt sie in die Richtung des Detektors. Abschließend misst der Detektor die Ionenanzahl und erstellt ein Massenspektrum, welches die relative Intensität (y-Achse) gegen das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis der Ionen (x-Achse) abbildet.^{48,49,50}

3.3.2.3. *Ionisation*

Die Auswahl der Ionisierungstechnik richtet sich nach der Probenart und der gewünschten Analyse. Man unterscheidet zwischen einer harten und weichen Ionisation. Die harte Ionisation beruht auf einer Ionisierung mit hoher Energie. Die Elektronenstoß-Ionisation (EI) zählt zur harten Ionisierungsmethode. Durch diese werden mithilfe von Elektronen die Moleküle in der Probe ionisiert. Dabei entstehen instabile positiv geladene Ionen und viele Fragmente. Im Gegensatz dazu werden bei der weichen Ionisation auf die Moleküle eine niedrigere Energie übertragen, sodass keine bis wenige Fragmente entstehen. Beispiele hierfür wären die chemische Ionisation (CI) und Elektrospray-Ionisation (ESI). Bei der ESI wird die Probe, welche in Lösung ist, aus einer schmalen Kapillare in ein elektrisches Feld gesprüht. Durch die angelegte Hochspannung an der Spitze der Kapillare zerfällt die Lösung in Tröpfchen. Es entsteht ein feiner Sprühnebel aus kleinen elektrisch geladenen Tröpfchen. Ein Inertgas, wie zum Beispiel Stickstoff, wird genutzt, um die Verneblung der Lösung und Lösungsmittelverdampfung zu fördern. Eine Wärmequelle trägt der Desolvatisierung ebenfalls bei. Beim Verdampfen des Lösungsmittels wird die elektrische Ladung auf ein kollabierendes Volumen begrenzt und schließlich kommt es zur Explosion der Tröpfchen (= Coulomb'sche Explosion). Nach vollständigem Abdampfen des Lösungsmittels werden die Ionen gasförmig und wandern in die Richtung der Gegenelektrode. Die ESI-Technik bietet außerdem eine Kopplungsmöglichkeit mit einem LC-System, welches die Probe zuerst auftrennt. In dieser Arbeit wurde ebenfalls die Elektrospray-Ionisationstechnik angewandt.^{51,52}

3.3.2.4. *Analysator*

Mithilfe eines Analysators werden die Ionen nach ihrer Masse und Ladung getrennt. Es gibt unterschiedliche Arten von Massenanalysatoren, die für die Ionentrennung eine andere

Methode verwenden. Beispielsweise misst der Flugzeit-Analysator (TOF, time of flight) die Flugzeit der einzelnen Ionen, ohne sie dabei abzulenken. Je kleiner die Ionenmasse ist, desto schneller erreichen die Ionen den Detektor, der anschließend beginnend mit der kleineren Ionenmasse das Massenspektrum aufzeichnet. Ein weiterer Analysator ist die Ionenfalle (ion trap), welcher die Ionen in einem elektrischen Feld einschließt. Die Ionen wandern innerhalb der Falle auf spiralförmigen Flugbahnen (Lissajous-Bahnen). Somit können Ionen mit einer bestimmten Masse in der Falle gefangen werden. Durch die Veränderung des elektrischen Feldes können Ionen aus der Falle austreten und werden in Folge detektiert. Ein spezieller Analysator, der auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, ist der Triple-Quadrupol. Ein Quadrupol-Analysator besteht aus vier parallel angeordneten Stäben, die aufgrund der Wechsel- und Gleichspannung unterschiedlich geladen sind. Jeweils zwei der Metallstäbe liegen parallel gegenüber. Es wird ein elektrisches Feld zwischen den Stäben geschaffen. Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis erreichen im elektrischen Feld auf stabilen Flugbahnen den Detektor, wohingegen jene mit unterschiedlichen m/z -Verhältnissen sich auf instabilen Flugbahnen bewegen und aus dem elektrischen Feld ausgestoßen werden. Der Triple-Quadrupol (TripleQuad, QqQ) enthält drei hintereinander geschaltete Quadrupol-Elemente, die in Abbildung 5 schematisch dargestellt sind. Im ersten Quadrupol (Q1), welches als Massenanalysator fungiert, werden die Ionen nach ihrem m/z -Verhältnis getrennt. Dabei ist das Q1 auf das m/z -Verhältnis des gesuchten Moleküls, auch Precursor-Ion oder Vorläuferion genannt, eingerichtet, sodass nur das Vorläuferion selektiv in das zweite Quadrupol (Q2) gelangt. Der Q2 fungiert als Kollisionszelle, wo ein Inertgas (beispielsweise Stickstoff, Argon, Helium) eingeleitet wird. In dieser kollidieren die Vorläuferionen mit den Gasmolekülen und werden fragmentiert. Dies hat die Bildung von den sogenannten Product-Ionen oder Fragmenten zur Folge, die ganz typisch für ein bestimmtes Vorläuferion sind. Dabei sind Parameter, wie die Kollisionsenergie ausschlaggebend für die Fragmentbildung und -größe. Anschließend werden die Fragmenten in den dritten Quadrupol (Q3) weitergeleitet. Dieser dient ebenfalls wie Q1 als Massenfilter, lässt jedoch nur jene Ionen durch, die das m/z -Verhältnis des Fragmenten besitzen. Diese selektive Fragmentierung und Auftrennung der Ionen in den gezielten Übergängen Q1 und Q3 wird auch als multiple reaction monitoring (MRM) oder selected reaction monitoring (SRM) bezeichnet. Durch die Verwendung von drei Quadrupolen ist das Triple-Quadrupol-Analysator-System sehr selektiv und bietet eine hohe Empfindlichkeit und Genauigkeit bei der Analyse von Proben. Da es sich um eine Kopplung von zwei Analysatoren (Massenspektrometer) handelt, spricht man von Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS).^{49,50,53,54}

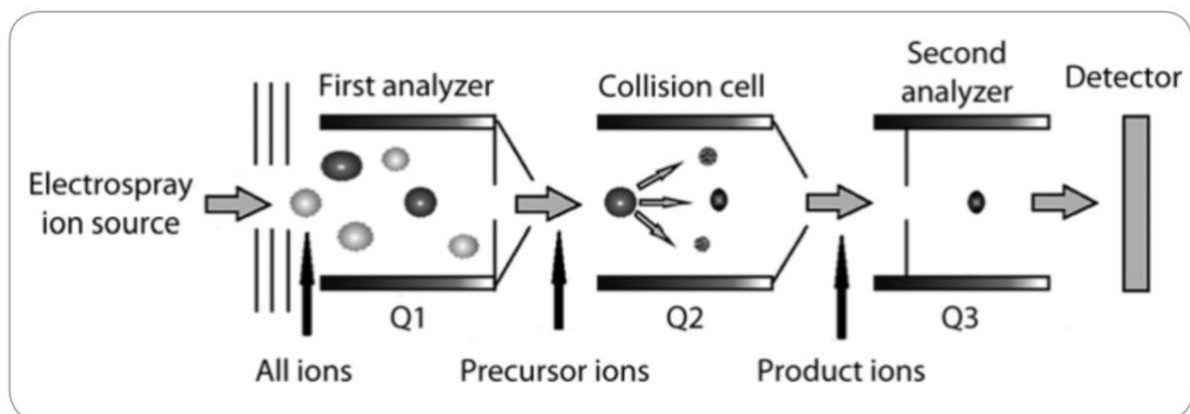


Abbildung 5: Schema eines TripleQuadropols⁵⁴

3.3.3. HPLC-MS/MS

Die Kopplung von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) hat eine zunehmende Bedeutung in vielen Gebieten der Forschung. Die beiden gekoppelten Geräte sind teuer, jedoch bieten sie mehrere Vorteile. Die HPLC-MS/MS ermöglicht die Detektion von niedrigen Analytkonzentrationen in biologischen Proben mit hoher Genauigkeit und Spezifität. Sie hat ein breites Anwendungsspektrum und kann somit für die Analyse von verschiedenen Analyten und Verbindungen eingesetzt werden. Des Weiteren kann die HPLC-MS/MS automatisiert werden, was zu einer höheren Effizienz und Standardisierung der Analyse führt. Eine gleichzeitige Analyse mehrerer Analyten in einer Probe kann genauso durchgeführt werden, welches jedoch zu einer höheren Durchsatzrate und Kosteneffizienz führt.⁵⁵

3.3.4. Methode und Parameter

Zur Quantifizierung von Meropenem wurde eine Methode entwickelt, in welcher bestimmte Parameter im HPLC-MS/MS optimiert wurden. Diese HPLC-Parameter wurden im Wesentlichen von Magdalena Gmeiner zur Quantifizierung von Aztreonam bereits verwendet.⁵⁶

Die Säulenofentemperatur, in der die HPLC-Säule eingebaut ist, hatte 30°C. Die mobile Phase bestand aus zwei Komponenten. Das bidestillierte Wasser (ddH₂O) mit 0,1%iger Ameisensäure (Formic acid, FA) bilden das Lösungsmittel A und Acetonitril (MeCN) mit 0,1%iger Ameisensäure (FA) das Lösungsmittel B. In dieser Methode wurde ein Lösungsmittelgradient verwendet, bei der die Reinsubstanz Meropenem eine Retentionszeit

von ca. 2,5 Minuten hatte. Bei der Gradientenelution verändert sich während der Trennung die Fließmittelzusammensetzung, wohingegen bei der isokratischen Elution diese konstant bleibt. Alle Parameter der HPLC-Analyse sind der Tabelle 6 zu entnehmen.⁵⁷

HPLC-Säule		Kinetex PS C18 100Å (2,6µm , 100 x 2,1mm)	
Guard cartridge		Security Guard Ultra Cartridge PS-C18	
Flussrate		0,5mL/min	
Säulentemperatur		30°C	
Flussgeschwindigkeit	Zeit (min)	Konzentration A (%)	Konzentration B (%)
0,5 mL/min	0,00	95,0	5,0
	0,50	95,0	5,0
	7,50	75,0	25,0
	7,60	5,0	95,0
	10,00	95,0	5,0
	15,00	95,0	5,0

Tabelle 6: Lösungsmittel-Zusammensetzung und HPLC-Parameter

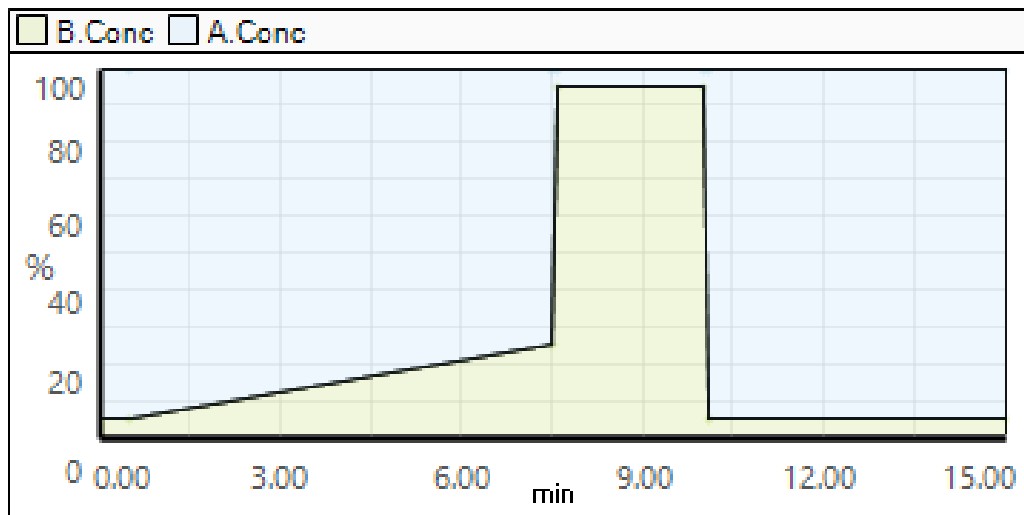


Abbildung 6: Gradientenelution

Die MS-Parameter wurden an die Reinsubstanz Meropenem angepasst und optimiert. Hierfür wurde die verdünnte Meropenem- Standardlösung in das Massenspektrometer mit einer Pumpenspritze infundiert. Die Optimierung wurde im negativen und positiven Modus durchgeführt. Im positiven Modus zeigte Meropenem eine höhere Empfindlichkeit aufgrund der Stickstoffprotonierung. Aus diesem Grund wurde weiterhin im Positiv-Modus gearbeitet. Bei der Optimierung wird zunächst versucht, eine möglichst hohe Intensität des Vorläuferions zu erhalten. Danach wird die Fragmentierung optimiert, um Produktionen in möglichst hoher Empfindlichkeit zu generieren. Das Produktion mit der höchsten Intensität wird als „Quantifier“ bezeichnet und zum Quantifizieren verwendet. Das Produktion mit der zweithöchsten Intensität ist das „Qualifier“-Ion, welches der Absicherung der Identität dient. Für Meropenem ist das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) für das Precursor-Ion (m/z)= 384,0 Da $[M+H]^+$. Die Masse-zu-Ladungsverhältnisse (m/z) für die zwei Produkt-Ionen sind (m/z)= 141,0 Da („Quantifier“) und (m/z)= 254,2 Da („Qualifier“). Durch die MRM- Technik, wie in Kapitel 3.3.2.4. erklärt, wurde das Precursor-Ion und die beiden Produkt-Ionen für Meropenem selektiv bestimmt. In der Abbildung 7 erkennt man das Precursor-Ion bei (m/z = 384,0 Da) sowie den Quantifier (m/z = 141,0 Da) und Qualifier (m/z = 254,2 Da). Dabei waren folgende Parameter im MS eingestellt: MRM (Quantifier) m/z = 383,9/141,1, MRM (Qualifier) m/z = 383,9/254,0, ESI pos., IS 5500.00, EP 10.00, CUR 20.00, GS1 30.00, GS2 30.00, TEM 500.00°C, CAD medium, CEM 2600.0, DP 1.00, CE 23.00 (Quantifier), CE 23.00 (Qualifier), CXP 12.00 (Quantifier), CXP 10.00 (Qualifier), dwell jeweils 150 ms.

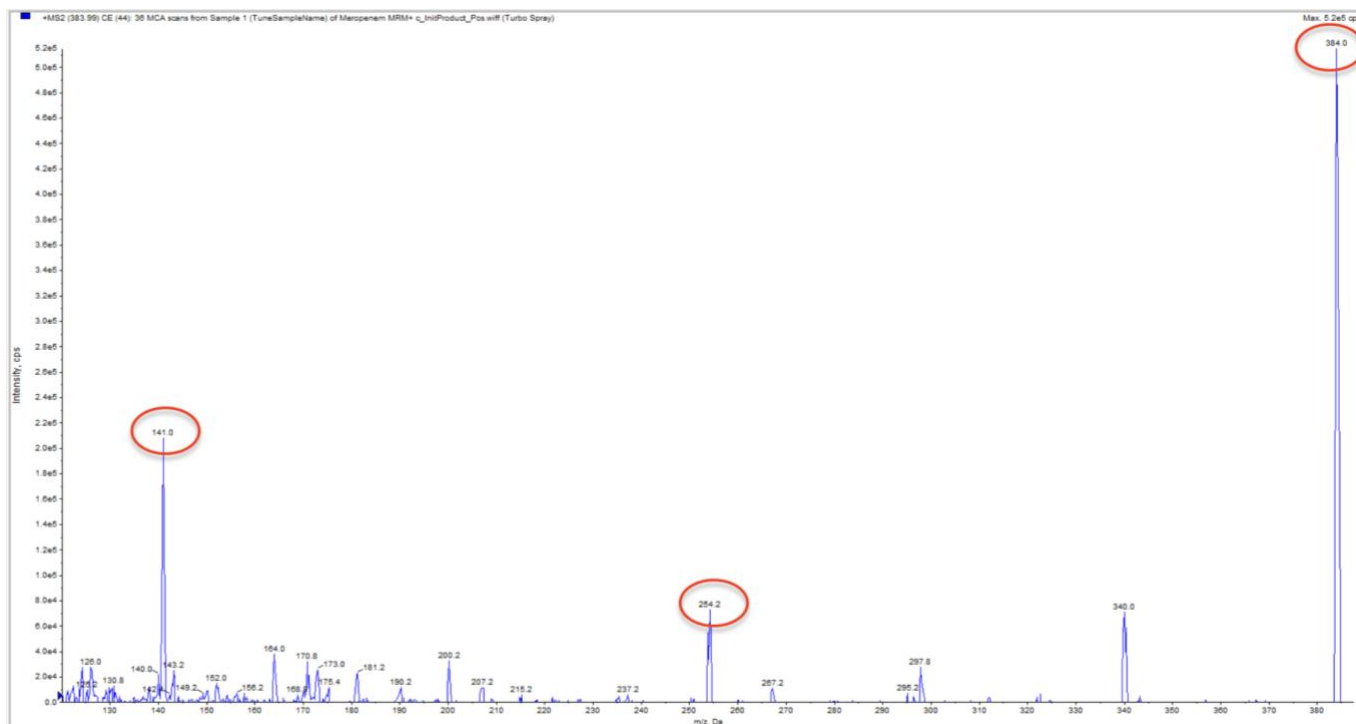


Abbildung 7: MRM: Precursor-Ion ($m/z = 384,0$ Da), Quantifier ($m/z = 141,0$ Da) und Qualifier ($m/z = 254,2$ Da)

3.3.5. Eichgerade

In dieser Arbeit wurde mithilfe einer Eichgerade das Antibiotikum Meropenem, welches als externer Standard herangezogen wurde, quantifiziert. Zu diesem Zweck wurde vorerst eine Stammlösung vom Analyten mit einer bekannten Konzentration (ca. $1\text{mg}/100\text{mL}$) hergestellt. Dafür wurden $0,00131\text{g}$ Meropenem in einem tarierten 100mL Messkolben eingewogen, anschließend mit ddH_2O auf 100mL verdünnt. Durch vorsichtiges Schütteln löste sich die Substanz. Im Anschluss wurden von dieser Stammlösung fünf Verdünnungen jeweils im Verhältnis von $1:10$ hergestellt. Aus Tabelle 7 sind die Konzentrationen der Verdünnungsreihe zu entnehmen.

Aliquote jeder Verdünnungsreihe wurden jeweils in mehreren Eppendorf Reagensvials abgefüllt und anschließend bei -70°C eingefroren. Diese dienten später als sogenannte Quality- Control- Samples („QC-Samples“) bei der Vermessung von Patientenproben. Sie wurden regelmäßig vermessen um eine fehlerfreie Analyse und Richtigkeit der Ergebnisse zu zeigen.

Stammlösung	13100ng/mL
Verdünnung 1	1310ng/mL
Verdünnung 2	131ng/mL
Verdünnung 3	131ng/mL
Verdünnung 4	1,31ng/mL
Verdünnung 5	0,131ng/mL

Tabelle 7: Konzentration der Stammlösung und Verdünnungen

Zur Erstellung der Eichgerade wurde jede einzelne Verdünnung jeweils sechs Mal vermessen. Um einen Carry-Over-Effekt und somit fehlerhafte Messungen zu vermeiden, wurde vor und nach jeder Verdünnungsreihe eine Messung mit bidestilliertem Wasser durchgeführt. Es zeigte sich, dass bei der Analyse von Wasser kein Peak bei der Retentionszeit von Meropenem zu sehen war und damit kein Carry-Over-Effekt aufgetreten ist. Nach den Vermessungen wurden die Konzentrationen vom Analyten gegen die ermittelten Peakflächen aufgetragen. Es wurden mehrere Eichgeraden erstellt, wovon die mit der besten Übereinstimmung ausgewählt wurde. Daraus resultierte eine quadratische Eichgerade mit folgender Geradengleichung $y = -0,134x^2 + 6,67e+003x - 3,25e+003$ und einem Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,9999$, die in Abbildung 8 dargestellt ist. Mithilfe dieser Eichgerade wurden die Messdaten der Serumproben aller Patienten quantifiziert.

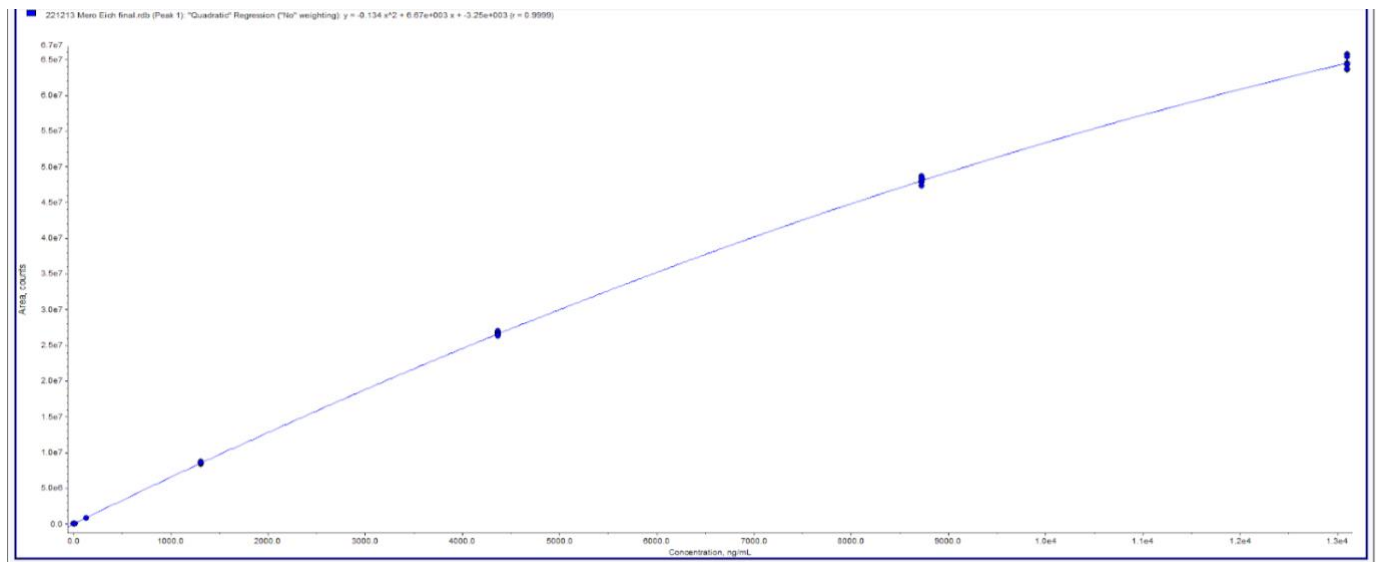


Abbildung 8: Eichgerade

3.3.6. Patientenproben

Das Universitätsklinikum St. Pölten führt eine Studie durch, in der dialysepflichtige Patienten mithilfe der Peritonealdialyse in Behandlung sind. Von sechs ausgewählten Patienten wurden innerhalb von 24 Stunden zu bestimmten Zeitpunkten 10 Blutproben und 17 Dialysatproben entnommen. Die konkreten Zeiten sind in der Tabelle 8 zu sehen. Außerdem litten die Patienten zu den Probeentnahmezeiten unter keiner Peritonitis. Während des Krankenhausaufenthalts der Patienten wurde das APD-Verfahren angewandt. Es liefen fünf Zyklen mit zwei Beuteln der Physioneal®-Lösung (5000mL) und ein Beutel Extraneal®-Dialyselösung (1500mL) wurde tagsüber verabreicht.

Zeit (hh:mm)	Ablauf	Blutabnahme	Dialysatabnahme
00:00	APD Beginn	X	X
01:00			
01:30	Auslauf 1. Zyklus		X
02:00	Einlauf 2. Zyklus	X	X

03:00	Auslauf 2.Zyklus		X
03:30	Einlauf 3. Zyklus		X
04:30	Auslauf 3. Zyklus	X	X
05:00	Einlauf 4. Zyklus		X
06:00	Auslauf 4. Zyklus		X
06:30	Einlauf 5. Zyklus	X	X
07:45	Auslauf 5. Zyklus		X
08:30	Einlauf Extraneal		X
09:00		X	X
10:00		X	X
12:00		X	X
16:00		X	X
20:00			X
24:00	APD Ende	X	X

Tabelle 8: Blut- und Dialysatabnahmezeiten

3.3.7. Probenaufarbeitung

Sowohl die Serumproben als auch Dialysatproben wurden bei -70°C im Kühlschrank aufbewahrt. Für die Vermessung wurden die jeweiligen Proben bei Raumtemperatur aufgetaut. Die erforderliche Menge der jeweiligen Proben wurde entnommen und die restlichen

aufgetauten Proben anschließend wieder im Kühlschrank gelagert.

3.3.7.1. *Vortest des Serums*

Nachdem das Serum sehr viele für die Analyse störende Begleitstoffe, wie z.B: Proteine enthält, müssen die Proben entsprechend vorbereitet werden. Damit bei dieser Probenvorbereitung (Ausfällen der Proteine) kein Verlust an Analyten entsteht, müssen diese Arbeitsschritte optimiert werden. Für die Fällung des Serums wurde vorerst ein Versuch für das geeignete Fällungsreagens durchgeführt. Dies wird im weiteren Kapitel 3.3.7.2. erläutert.

1g an künstliches Serum Precinorm U, welches als weißes Pulver vorliegt, wurde mit 5mL destilliertem Wasser aufgefüllt und daraufhin vorsichtig geschwenkt, bis eine homogene Lösung entstand. Damit konnte die Optimierungsversuche zur Aufarbeitung vom Serum durchgeführt wurde.

Als erster Schritt wurde 300µL Methanol (MeOH) in Eppendorf Reagensvials pipettiert und auf Eis gelegt. In zwei separaten Eppendorf Reagensvials wurde 135µL Precinorm vorgelegt. In das eine Eppendorf Reagensvial wurde 15µL Meropenem von bekannter Konzentration und in das andere 15µL ddH₂O zugesetzt. In ein weiteres Eppendorf Reagensvial wurde nur 135µL ddH₂O und 15µL Meropenem hinzugefügt. Somit entstanden drei Proben: 1) 135µL Precinorm + 15µL Meropenem, 2) 135µL Precinorm + 15µL ddH₂O und 3) 135µL ddH₂O + 15µL Meropenem. Durch kurzes Vortexen wurden sie homogenisiert und anschließend jeweils 100µL der Seren in das eiskalte MeOH langsam übertragen. Ein weißer Niederschlag entstand und die Proben wurden diesmal für 30 Sekunden gevortext. Im Anschluss konnten die Zellbestandteile durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 14.000 rpm von den gelösten Substanzen getrennt werden. In ein 200 µl HPLC-Vial wurden 100µL vom klaren Überstand pipettiert und danach vermessen. Jede Probe wurde insgesamt drei Mal hergestellt und doppelt vermessen. Um einen Carry-Over-Effekt zu vermeiden, wurde zwischen den Proben ddH₂O vermessen.

3.3.7.2. *Auswahl des Fällungsreagens*

Vor der Bearbeitung und Analyse der Serumproben wurden zunächst Vortests mit dem künstlichen Serum Precinorm U durchgeführt. Dafür wurde das in Kapitel 3.2.3. beschriebene Precinorm U verwendet. Sowohl Acetonitril (MeCN) als auch Methanol (MeOH) zeigten bisher gute Resultate, weshalb eine Entscheidung bezüglich des Fällungsreagens getroffen werden

musste. Zuerst wurde das Precinorm U mit zwei verschiedenen Meropenem-Konzentrationen (10480ng/mL und 13100ng/mL) versetzt. Anschließend wurden zwei parallele Versuchsreihen mit MeCN und MeOH durchgeführt, wobei gemäß der Anleitung in Kapitel 3.3.7.1. aufgearbeitet und in dreifacher Ausführung vermessen wurde. Aus diesem Vortest konnte festgestellt werden, dass die ddH₂O + Meropenem-Proben übereinstimmende Ergebnisse wie die Precinorm + Meropenem-Probenreihe lieferten. Folglich wurde bestätigt, dass die Versuchsreihe mit MeOH eine hohe Wiederfindungsrate (ca. 97%-99%) zeigte und somit wurde Methanol als Fällungsreagens ausgewählt.

3.3.7.3. Serum

Die Serumproben wurden nach dem Auftauen vorerst für ca. 10 Sekunden gevortext. Danach wurden 100µl von jeder Probe entnommen und in 300µl eiskaltes MeOH pipettiert, wodurch wieder ein deutlicher Niederschlag ersichtlich war. Der weitere Verlauf lief analog zum Vortest ab (siehe Kapitel 3.3.7.1.). Jede Probe wurde zweifach aufgearbeitet und wiederholt mit der in Kapitel 3.3.4. erklärten Methode dreifach vermessen. Nach jeder Probe wurde das ddH₂O doppelt vermessen. Durch diese Probenaufbereitung wurden die Serumproben 1:4 verdünnt, was bei der Berechnung zu berücksichtigen war.

3.3.7.4. Dialysat

Die Dialysatproben enthalten kaum störende Begleitstoffe, wie zum Beispiel Proteine, wodurch die Probenvorbereitung entfallen konnte. Sie wurden entsprechend verdünnt, um in den linearen Bereich der Eichgerade zu kommen. Zuerst wurden sie gemäß den Serumproben aufgetaut und gevortext. Anschließend wurden 50 µl aller Proben in einzelne 20mL Messkolben pipettiert und mit destilliertem Wasser auf 20mL aufgefüllt. Parallel wurde dieser Vorgang für jede Probe wiederholt, so dass pro Probe zwei Versuchsansätze bestanden. Somit wurden die Proben im Verhältnis 1:400 verdünnt und daraufhin durch vorsichtiges Schwenken homogenisiert. Das verdünnte Dialysat wurde mithilfe von Pasteurpipetten in 1500µl HPLC-Vials übertragen und mittels der Methode (Kapitel 3.3.4.) jeweils zweifach vermessen. Zwei „Blank- Analysen“ (Analyse von bidestilliertem Wasser) folgten nach jeder Probenvermessung.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der Serumproben

4.1.1. Zusammenfassung aller Serumproben

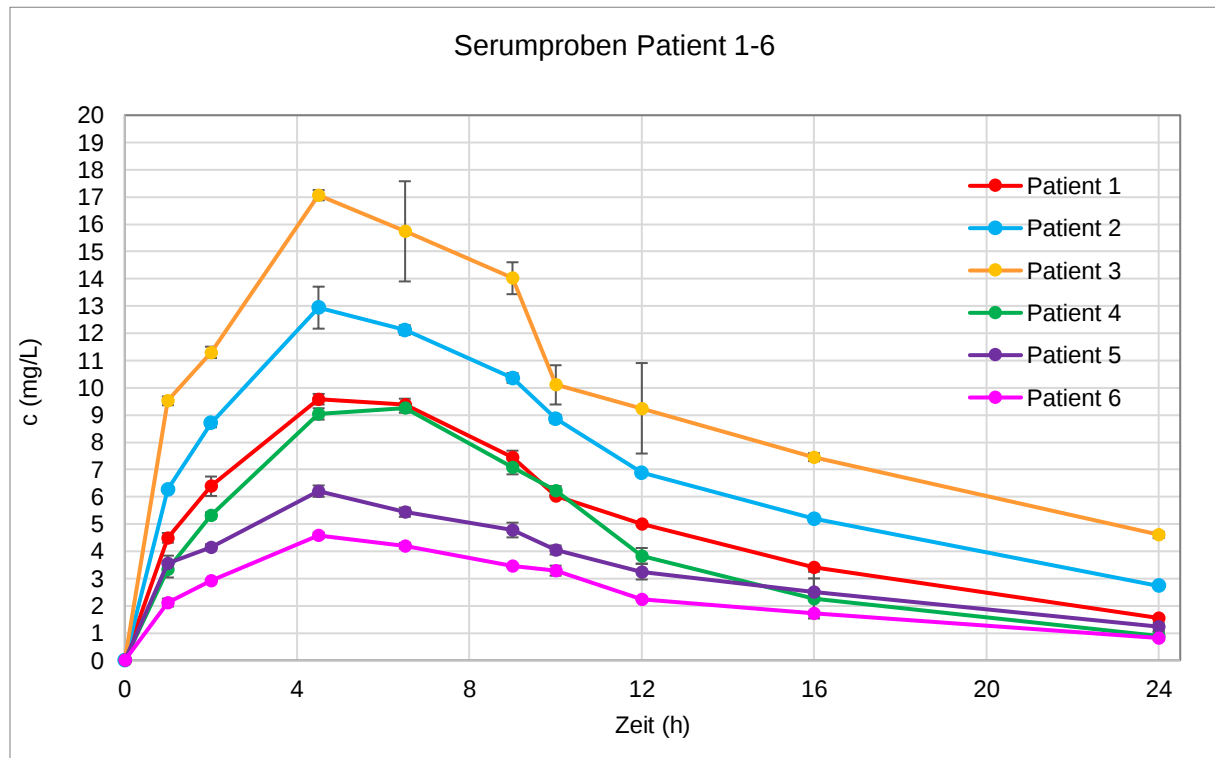


Diagramm 1: Zusammenfassung der Serumproben von Patient 1-6

In Diagramm 1 ist eine Zusammenfassung der Serumproben aller Patienten abgebildet. Während der Blutabnahme wurde das Antibiotikum Meropenem (400mg/L) intraperitoneal appliziert. Anhand der Abbildung sieht man, wie der Wirkstoff in den Körper aufgenommen und gleichzeitig aus dem Blut eliminiert wird. Diese Konzentrationszunahme und -abnahme des Antibiotikums im Serum könnte durch die Bateman-Funktion beschrieben werden. Sie folgt einer Kinetik 1.Ordnung und wird häufig verwendet, um die gleichzeitige Resorption und Elimination eines Arzneimittels zu beschreiben. Jede Serumprobe wurde jeweils in zwei parallelen Abläufen vorbereitet und je dreifach vermessen. Die durchschnittlichen Werte von sechs Messungen wurden für jeden Patienten in einer Tabelle zusammengefasst.

Nur zwei Patienten (Patient 1 und 3) zeigten eine Maximalkonzentration ($C_{\max}$) über 10 mg/L. Die orangene Kurve von Patient 3 zeigte mit 17,1 mg/L die höchste $C_{\max}$ an Meropenem, gefolgt von der roten Kurve von Patient 1, die eine $C_{\max}$ von 12,9 mg/L erreichte. Bei Patient 6 wurde die geringste $C_{\max}$ (4,6 mg/L) gemessen. Die Zeit, in der die $C_{\max}$ erzielt wurde, lag fast bei allen Patienten bei 4,5h. Nur Patient 4 hatte eine $t_{\max}$ bei 6,5h.

4.1.2. Patient 1

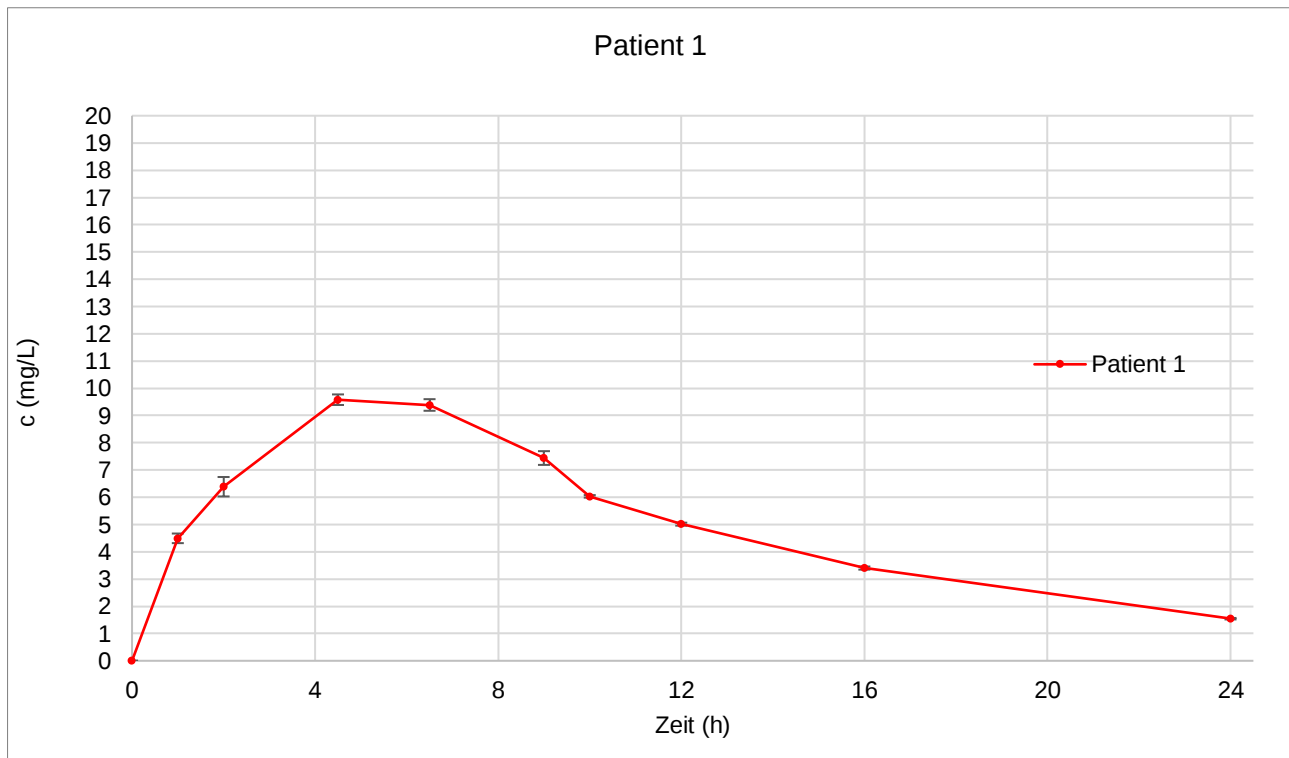


Diagramm 2: Meropenemkonzentrationen der Serumproben von Patient 1

Das Diagramm 2 stellt ein Musterbeispiel für die Meropenemkonzentrationen im Serum über verschiedene Zeiten (Tabelle 9) hinweg dar. Die Konzentration des Wirkstoffs erreicht nach 4,5 Stunden ($t_{\max}$) einen Spitzenwert ($C_{\max}$) von 12,9 mg/L. Danach sinkt die Konzentration allmählich ab, wobei sie nach 24 Stunden bei 2,7 mg/L liegt. Dies entspricht einer Wirkstoffabsorptionsrate von ca. 3,2%. Eine relative Standardabweichung (RSD) über 5% ist nur zum Zeitpunkt 04:30 ersichtlich.

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	0,0	0,00
1	6,3	1,02
2	8,7	1,71
4,5	12,9	5,95
6,5	12,1	1,43
9	10,4	1,71
10	8,9	1,68
12	6,9	1,00
16	5,2	0,93
24	2,7	1,13

Tabelle 9: Daten der Serumproben von Patient 1

4.1.3. Patient 2

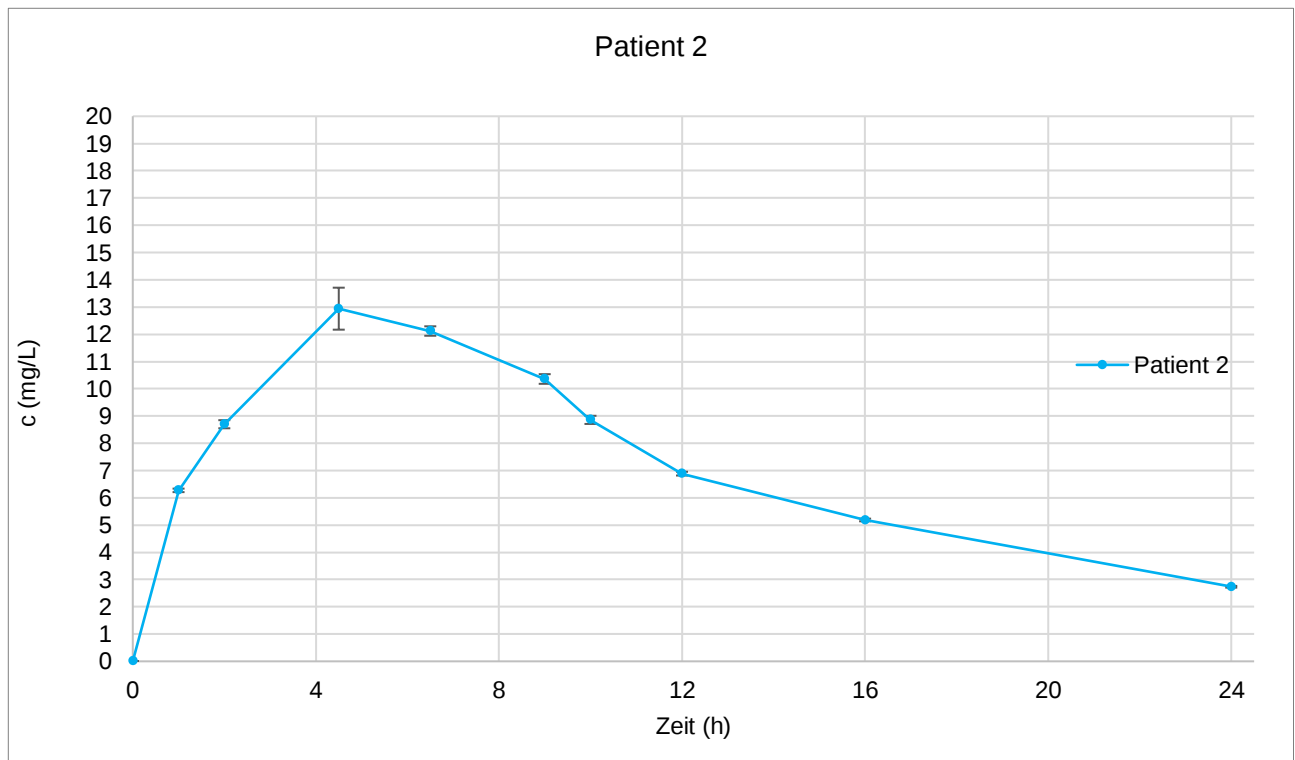


Diagramm 3: Meropenemkonzentrationen der Serumproben von Patient 2

Bei Patient 2 sieht man ebenfalls einen idealen Kurvenverlauf, der seine $C_{\max}$ mit 9,6 mg/L ebenso zum Zeitpunkt 04:30 hat. Damit wird eine Wirkstoffabsorption von etwa 2,4% erzielt. Nur der Wert bei Zeitpunkt 02:00 zeigt eine RSD über 5%.

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	0,0	0,00
1	4,5	3,93
2	6,4	5,58
4,5	9,6	2,02
6,5	9,4	2,27
9	7,4	3,38
10	6,0	0,78
12	5,0	1,09
16	3,4	1,66
24	1,5	1,79

Tabelle 10: Daten der Serumproben von Patient 2

4.1.4. Patient 3

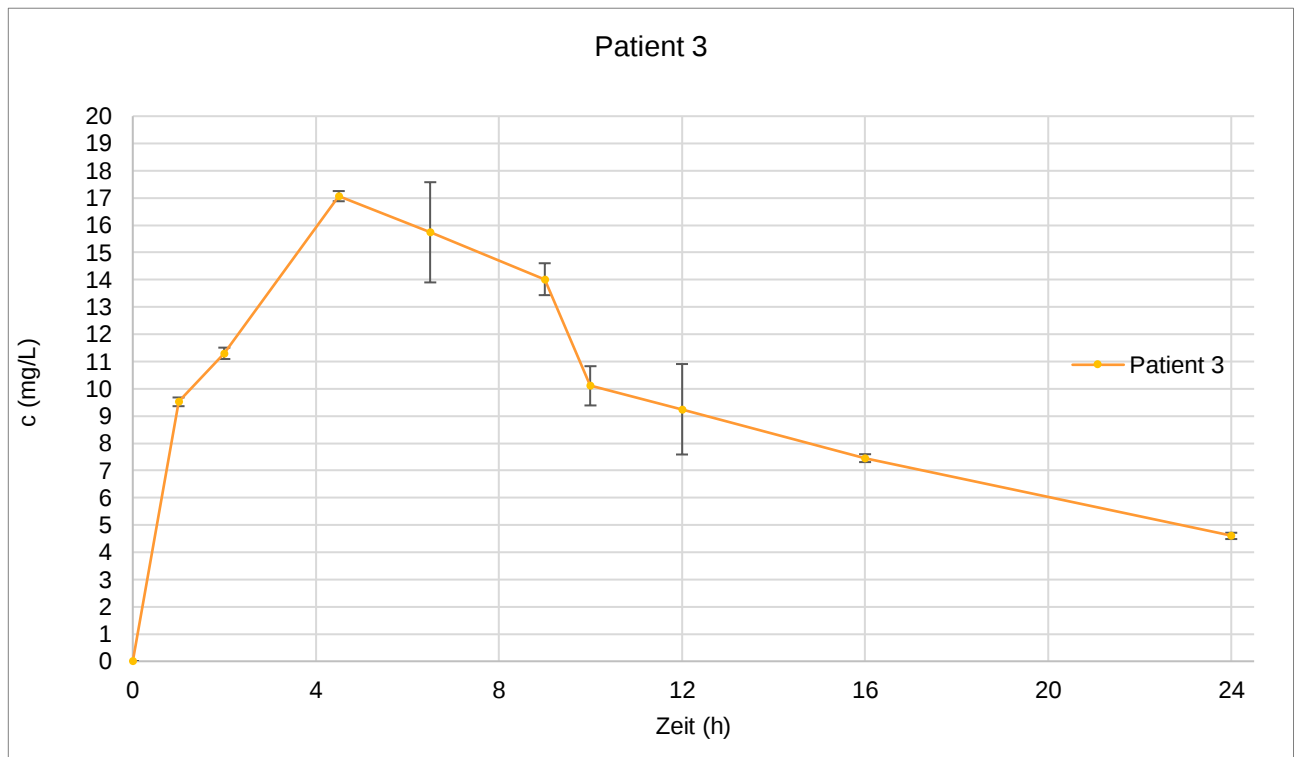


Diagramm 4: Meropenemkonzentrationen der Serumproben von Patient 3

In Diagramm 4 ist zu sehen, dass die $C_{\max}$ mit 17,1 mg/L erneut nach 4,5h erreicht wurde. Danach fällt die Konzentration an Meropenem kontinuierlich ab. Der Anteil an absorbiertem Wirkstoff beträgt somit etwa 4,3%. Außerdem liegt die RSD außer zu den Zeitpunkten 06:30 und 09:00 unterhalb von 5%.

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	0,0	0,00
1	9,5	1,68
2	11,3	1,84
4,5	17,1	1,10
6,5	15,7	11,68
9	14,0	4,18
10	10,1	7,12
12	9,2	17,95
16	7,5	1,94
24	4,6	2,52

Tabelle 11: Daten der Serumproben von Patient 3

4.1.5. Patient 4

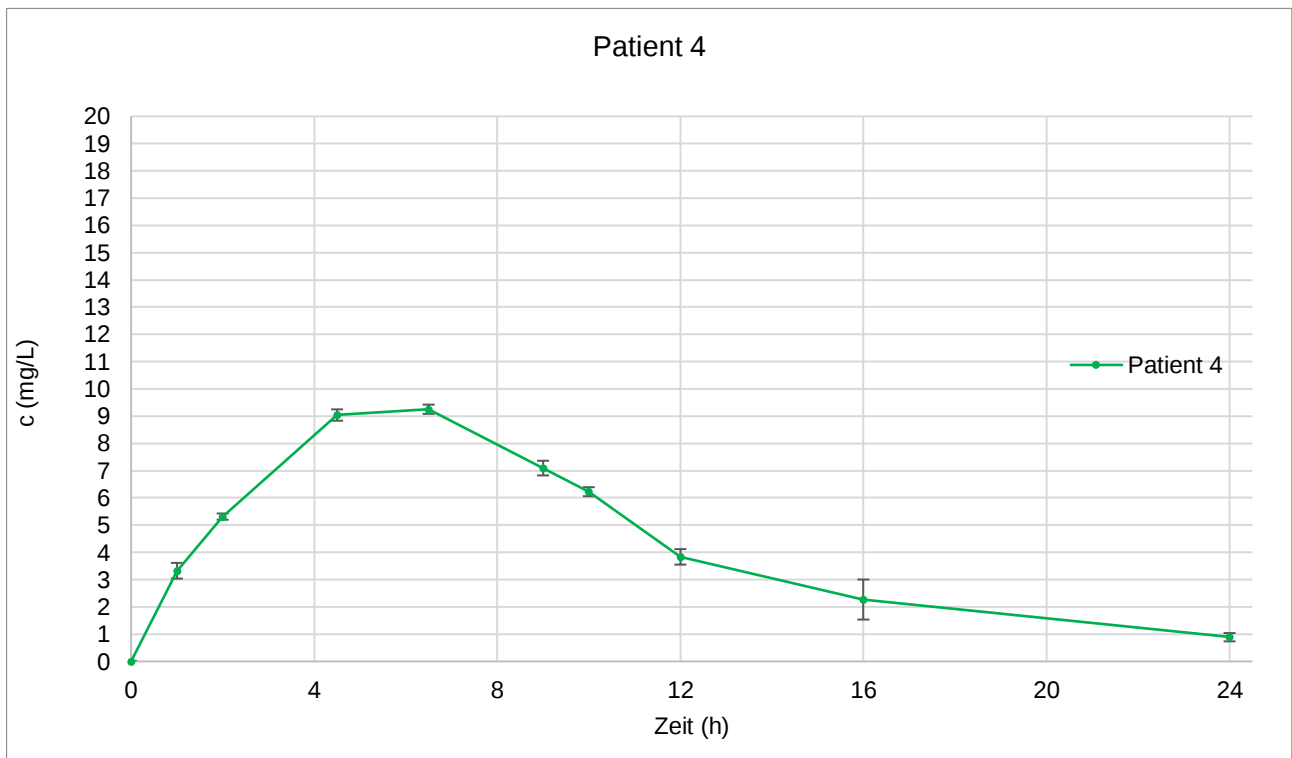


Diagramm 5: Meropenemkonzentrationen der Serumproben von Patient 4

Bei Patient 4 wurde nach 6,5h ($t_{\max}$) eine $C_{\max}$ bei 9,3 mg/L erzielt. Das Diagramm 5 spiegelt ebenso einen ideal Kurvenverlauf der Wirkstoffkonzentration im Serum wieder. Die Absorptionsrate von Meropenem bei Patient 4 beträgt 2,3%. Die RSD befindet sich zu vier verschiedenen Zeitpunkten (01:00, 12:00, 16:00 und 24:00) über 5%.

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	0,0	0,00
1	3,3	8,65
2	5,3	2,15
4,5	9,0	2,31
6,5	9,3	1,83
9	7,1	3,80
10	6,2	2,65
12	3,8	7,42
16	2,3	32,35
24	0,9	17,14

Tabelle 12: Daten der Serumproben von Patient 4

4.1.6. Patient 5

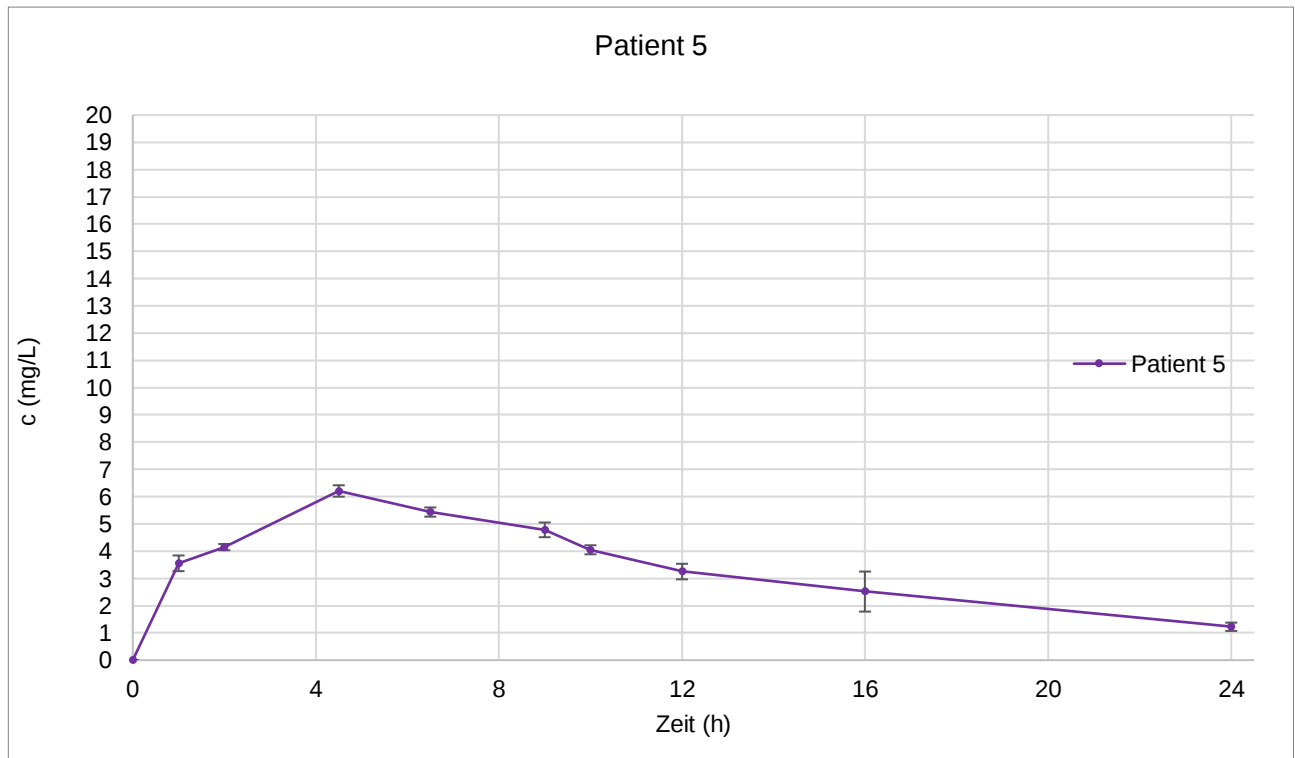


Diagramm 6: Meropenemkonzentrationen der Serumproben von Patient 5

Die gemessenen Werte von Patient 5 zeigen, dass eine Maximalkonzentration von 6,2 mg/L nach 4,5h erzielt wird und die Absorptionsrate somit ca. 1,6% beträgt. Abgesehen von den Werten bei 06:30 Uhr und 24:00 Uhr liegt die RSD unter 5%.

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	0,0	0,00
1	3,6	3,27
2	4,1	1,17
4,5	6,2	3,77
6,5	5,4	6,17
9	4,8	2,52
10	4,0	3,95
12	3,3	4,83
16	2,5	1,68
24	1,2	29,22

Tabelle 13: Daten der Serumproben von Patient 5

4.1.7. Patient 6

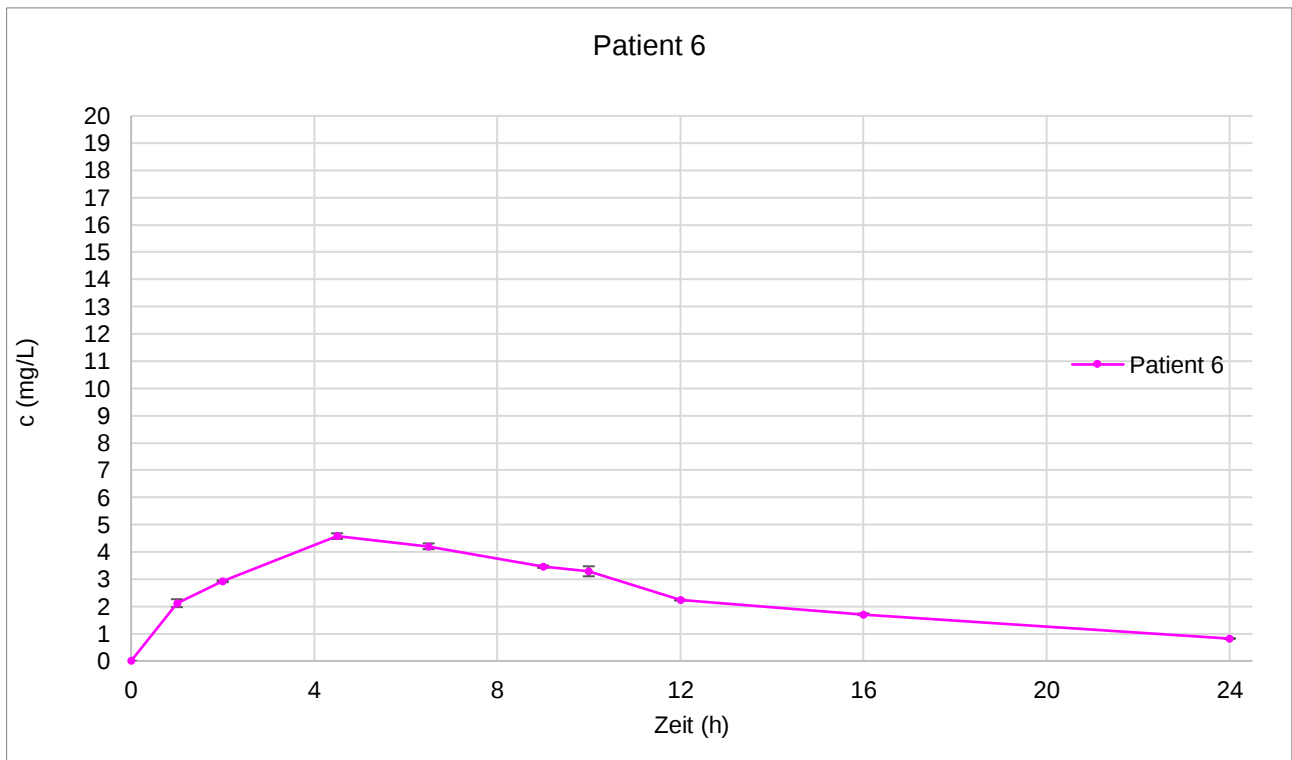


Diagramm 7: Meropenemkonzentrationen der Serumproben von Patient 6

Das vorliegende Diagramm veranschaulicht die Daten des letzten Patienten. Patient 6 zeigt eine $C_{\max}$ von 4,6 mg/L bei einer $t_{\max}$ von 4,5h. Daraus ergibt sich die niedrigste Maximalkonzentration und infolgedessen auch die niedrigste Absorptionsrate von etwa 1,2% unter diesen sechs Patienten. Zudem liegt die RSD nach 1h und 10h knapp über 5%.

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	0,0	0,00
1	2,1	6,87
2	2,9	1,18
4,5	4,6	2,26
6,5	4,2	2,51
9	3,5	1,21
10	3,3	5,58
12	2,2	0,71
16	1,7	1,82
24	0,8	1,53

Tabelle 14: Daten der Serumproben von Patient 6

4.2. Ergebnisse der Dialysatproben

4.2.1. Zusammenfassung aller Dialysatproben

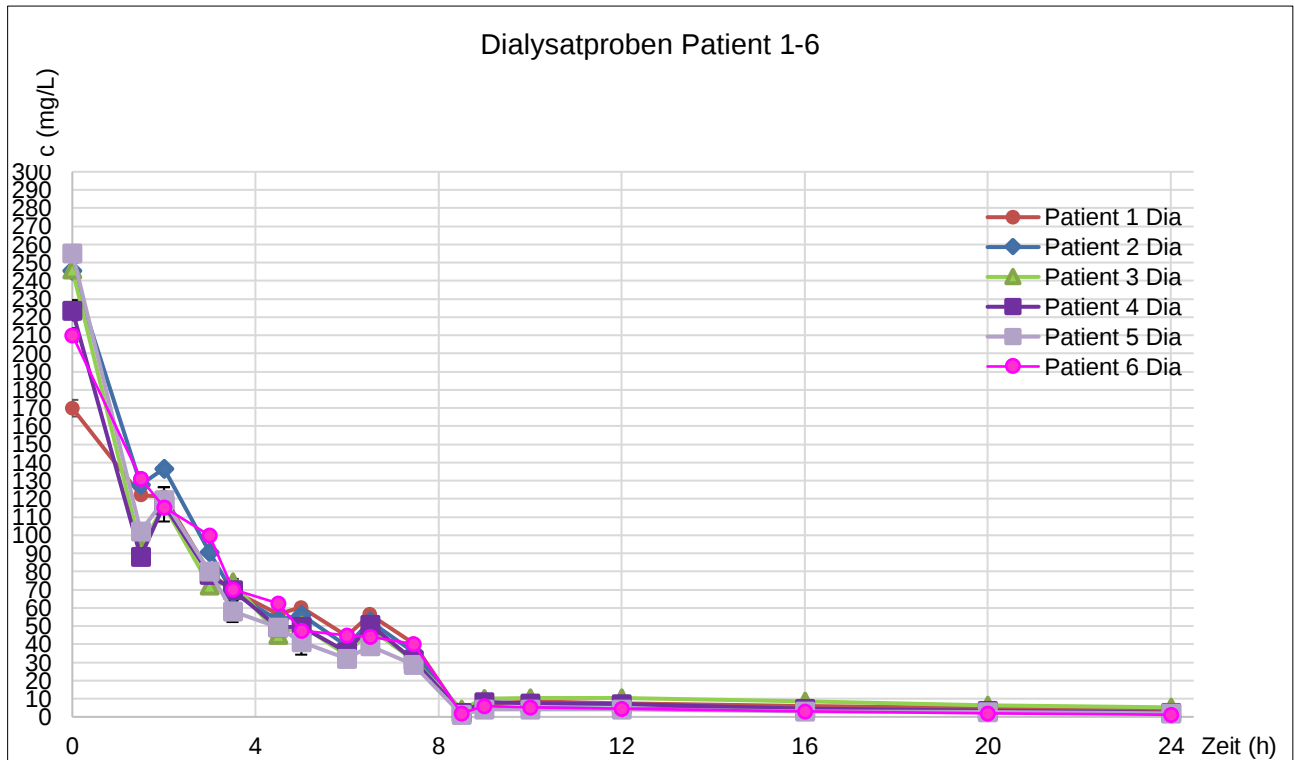


Diagramm 8: Zusammenfassung der Dialysatproben von Patient 1-6

In Diagramm 8 sind die Konzentration-Zeit-Kurven aller Dialysatproben von Patient 1-6 übereinander abgebildet. Es gibt Informationen über die Konzentration von Meropenem in der Peritonealdialyseflüssigkeit und wie sich diese im Laufe der Zeit verändert. Es ist wichtig, die Konzentration des Antibiotikums im Körper aufrechtzuerhalten, um eine wirksame Behandlung sicherzustellen. Für die intraperitoneale Anwendung wurde die Peritonealdialyseflüssigkeit Physioneal® (5000mL) zunächst mit 2g Meropenem zusammengestellt, welches einer Meropenemkonzentration von 400 mg/L entspricht. Das abgebildete Diagramm 8 zeigt, dass Dialysatproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen wurden. Erwartungsgemäß liegt die maximale Wirkstoffkonzentration zum Zeitpunkt 00:00 ($t_{\max}$) und nimmt durch die kontinuierliche Resorption des Antibiotikums über das stark durchblutete Peritoneum wieder ab. Den maximalen Wirkstoffspiegel zeigte Patient 5 mit 255,3 mg/L und den niedrigsten Patient 1 mit 169,9 mg/L. Außerdem ist zu erwähnen, dass bei allen Patienten nach 8,5h die Konzentration in den einstelligen mg/L-Bereich sinkt und daraufhin ein kleiner Anstieg folgt,

welcher allerdings erneut abnimmt. Jede Dialysatprobe wurde jeweils in zwei parallelen Ansätzen vorbereitet und in Duplikaten vermessen. Der Durchschnitt von vier Messungen wurde wiederholt für die einzelnen Patienten in einer Tabelle zusammengefasst.

4.2.2. Patient 1

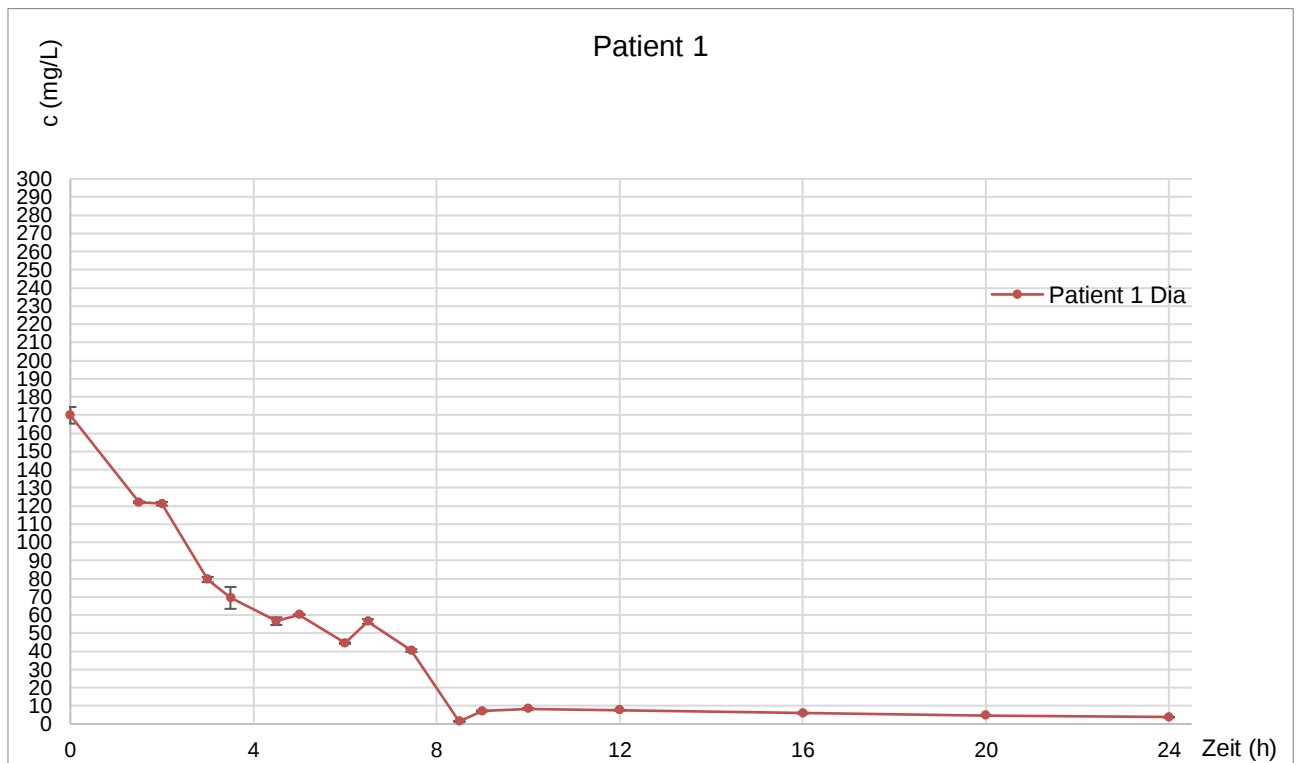


Diagramm 9: Meropenemkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 1

Das Diagramm 9 zeigt den Konzentrationsverlauf von Patient 1 über die Zeit. Wie erwartet liegt die $C_{\max}$ mit 169,9 mg/L zum Zeitpunkt 00:00 ($t_{\max}$). Danach folgt bis 04:30 ein latenter Abfall, wobei es zu bestimmten Zeitpunkten (05:00, 06:30, 09:00 und 10:00) zu erhöhten Konzentrationen kommt. Nach 8,5h kommt es zu einem signifikanten Konzentrationsabfall, allerdings steigt sie danach bis zum Zeitpunkt 10:00 an. Nach 12h nimmt sie wieder kontinuierlich ab. Ab 08:30 Uhr befinden sich alle Konzentrationen im einstelligen Bereich. Die RSD zeigt zu zwei Zeitpunkten (03:30 und 16:00) einen höheren Wert als 5%.

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	169,9	2,69
1,5	122,0	0,38
2	121,2	0,81
3	79,5	1,81
3,5	69,4	8,68
4,5	56,6	3,72
5	60,2	0,38
6	44,5	0,86
6,5	56,4	2,24
7,75	40,4	1,78
8,5	1,4	2,55
9	7,2	3,87
10	8,4	4,64
12	7,6	3,60
16	6,0	5,11
20	4,7	0,82
24	3,7	1,33

Tabelle 15: Daten der Dialysatproben von Patient 1

4.2.1. Patient 2

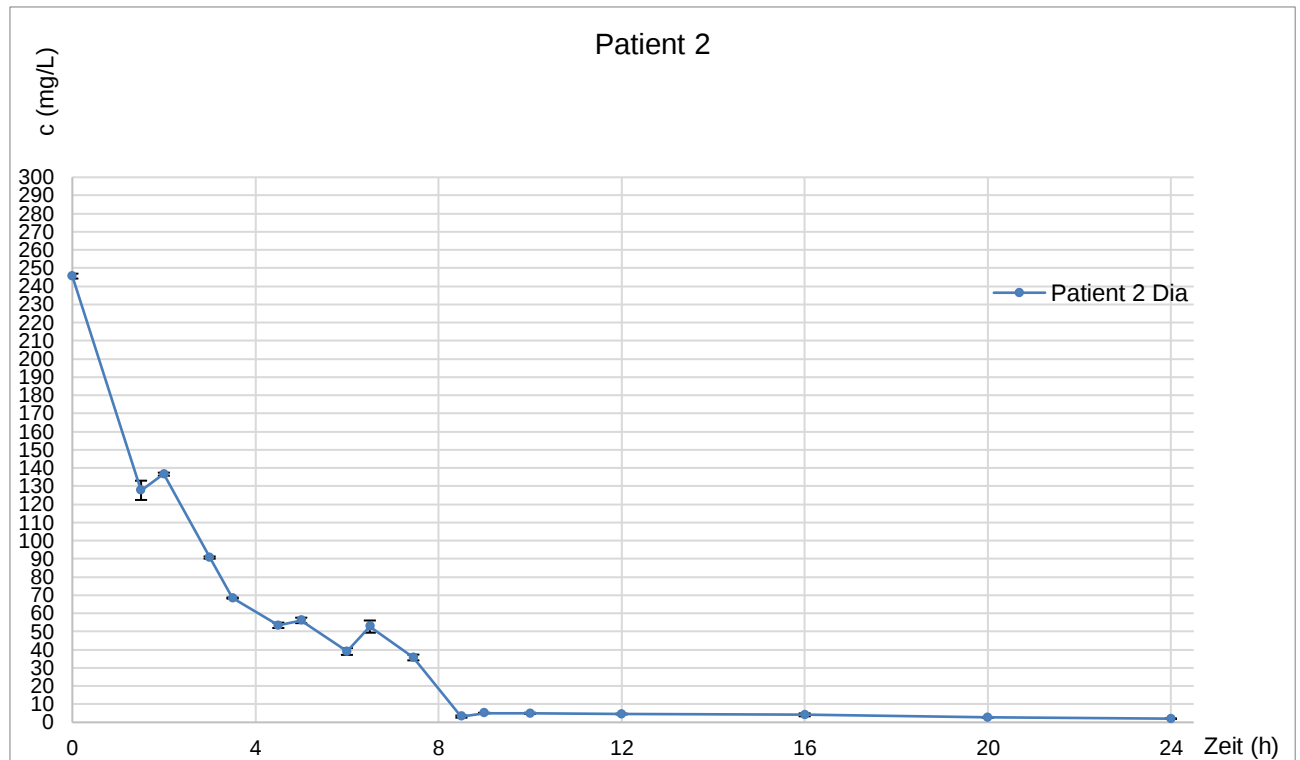


Diagramm 10: Meropenemkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 2

Bei Patient 2 sinkt die Konzentration erwartungsgemäß bis zur 2. Stunde ab, jedoch zeigt sich nach 2h einen Anstieg der Konzentration, gefolgt von Stunde 5, 6,5 und 9. Ab 10h nimmt sie wieder kontinuierlich ab. Bis zur 6. Stunde bleibt die RSD <5%. Danach übersteigt sie den Wert zu den Zeitpunkten 06:30, 08:30, 10:00, 16:00, 20:00 und 24:00.

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	245,6	0,55
1,5	127,7	4,16
2	136,6	0,61
3	90,7	0,66
3,5	68,4	0,48
4,5	53,4	2,77
5	56,1	2,69
6	39,0	4,80
6,5	52,7	6,36
7,75	35,7	4,45
8,5	3,2	18,92
9	5,1	3,01
10	5,0	6,84
12	4,6	4,65
16	4,1	19,21
20	2,7	8,64
24	2,0	6,70

Tabelle 16: Daten der Dialysatproben von Patient 2

4.2.2. Patient 3

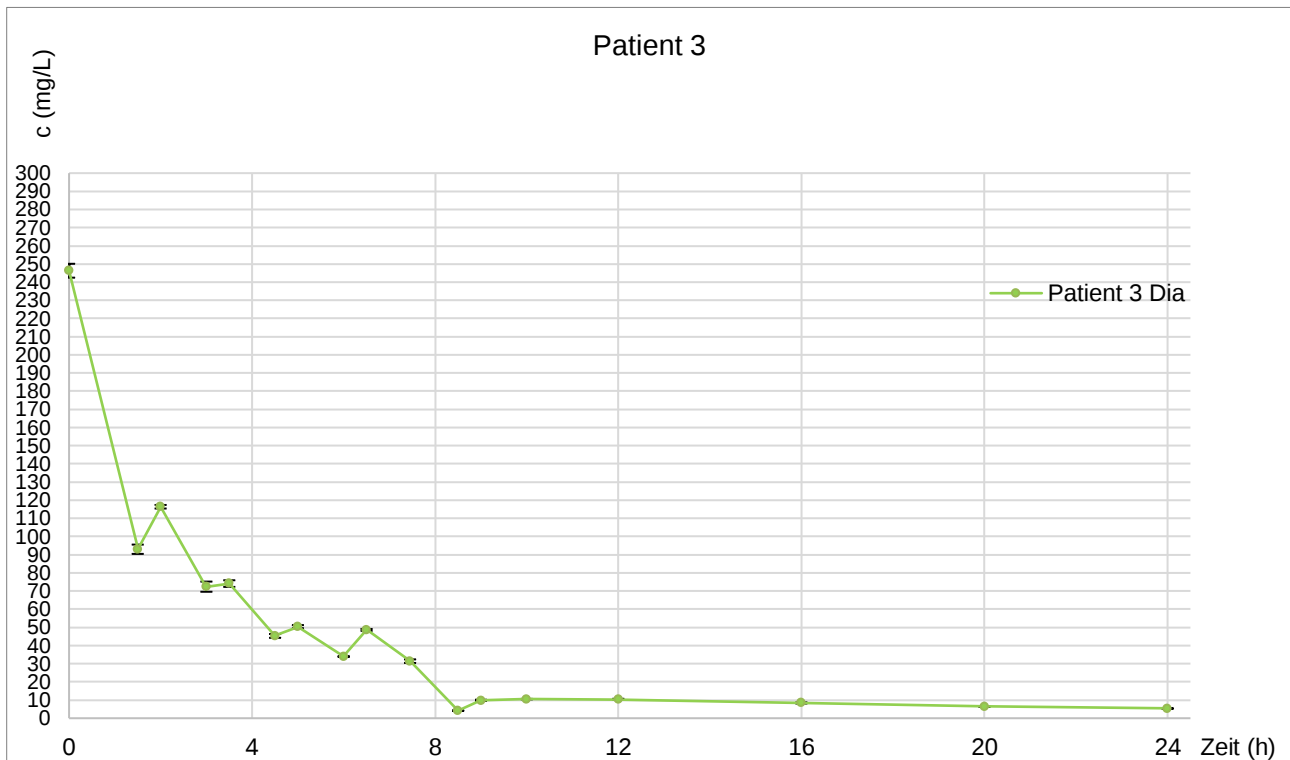


Diagramm 11: Meropenemkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 3

Das abgebildete Diagramm veranschaulicht die Meropenemkonzentration im Dialysat von Patient 3. Die Wirkstoffkonzentration steigt wiederholt nach 2h an und schwankt abwechselnd bis zum Zeitpunkt 12:00. Zwischen 09:00 Uhr und 10:00 Uhr nimmt sie wieder zu, jedoch kommt es ab 12:00 Uhr erneut zu einem Rückgang. Diese Konzentrationsanstiege sind auf die verschiedenen Einläufe der Dialyseflüssigkeit zurückzuführen, da diese genau zu diesen Zeitpunkten (1. Einlauf 00:00 Uhr, 2. Einlauf 02:00 Uhr, 3. Einlauf 03:30 Uhr, 4. Einlauf 05:00 Uhr, 5. Einlauf 06:30 Uhr) stattfanden. Die RSD befindet sich stets unter 5%.

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	246,3	1,55
1,5	93,0	2,75
2	116,4	0,84
3	72,4	3,85
3,5	74,1	2,47
4,5	45,3	2,32
5	50,4	1,71
6	34,0	0,72
6,5	48,6	1,06
7,75	31,4	3,16
8,5	4,2	4,45
9	9,9	3,37
10	10,5	1,34
12	10,4	3,05
16	8,4	3,99
20	6,4	1,14
24	5,4	1,06

Tabelle 17: Daten der Dialysatproben von Patient 3

4.2.1. Patient 4

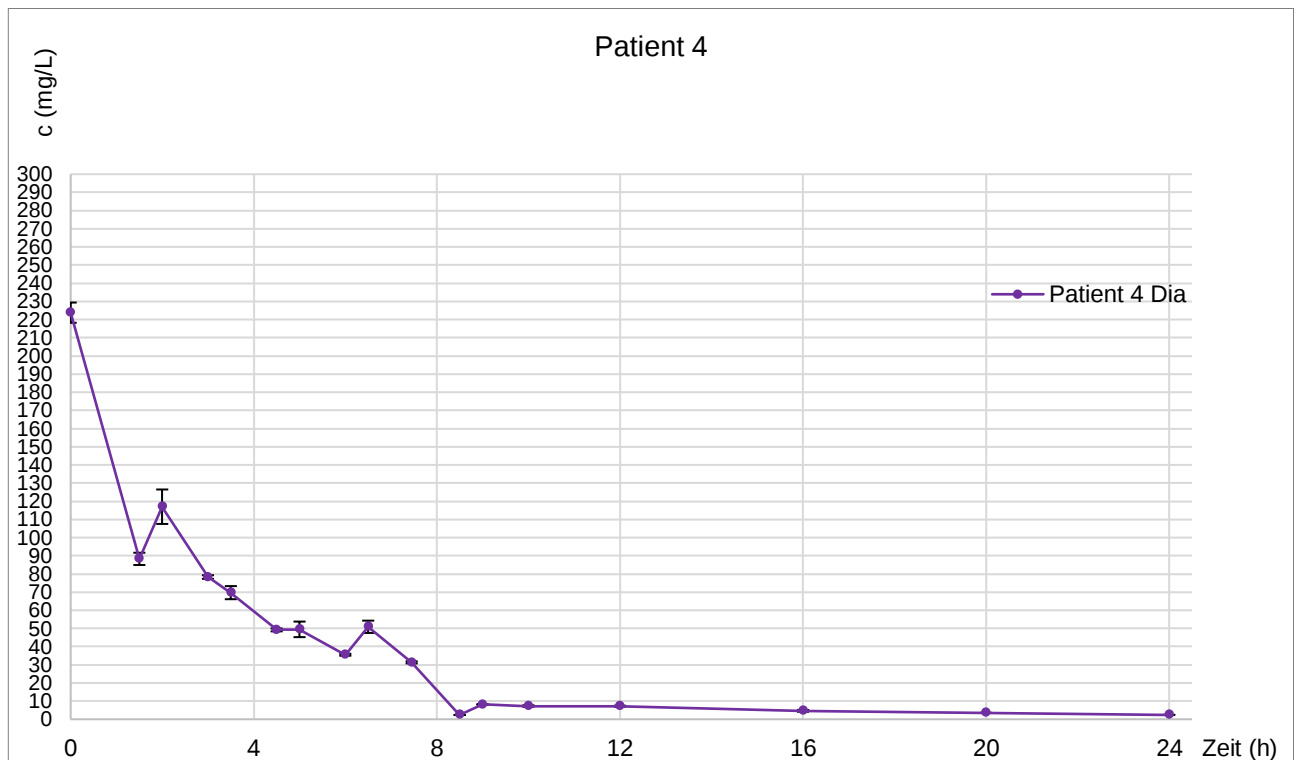


Diagramm 12: Meropenemkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 4

Die Messdaten vom 4. Patienten zeigen ein ähnliches Muster wie bei Patient 2. Anfänglich sinkt die Konzentration, jedoch nimmt sie nach 2h, 5h und 6,5h wieder zu. Der Konzentrationsaufschwung zum Zeitpunkt 09:00 besteht nach wie vor. Bei den Stunden 2, 3,5, 5, 6,5, 10, und 16 liegt die RSD >5%.

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	223,8	2,49
2	117,0	8,10
3	78,3	1,28
3,5	69,7	5,16
4,5	49,2	1,63
5	49,5	8,64
6	35,5	1,54
6,5	50,9	6,65
7,75	31,3	1,85
8,5	2,4	1,63
9	8,2	2,16
10	7,3	5,74
12	7,2	4,44
16	4,7	10,68
20	3,5	2,14
24	2,4	0,92

Tabelle 18: Daten der Dialysatproben von Patient 4

4.2.1. Patient 5

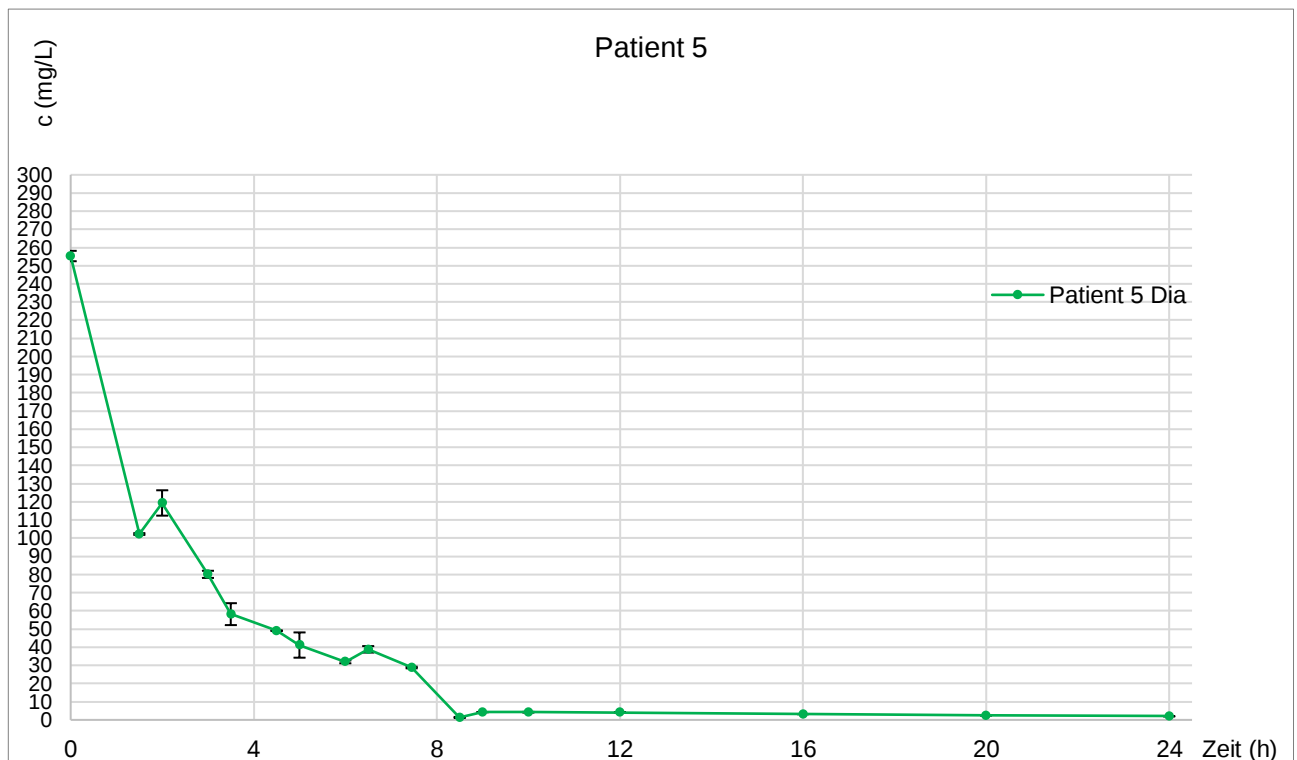


Diagramm 13: Meropenemkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 5

Die höchste Meropenemkonzentration mit 255,3 mg/L wurde bei Patient 5 bestimmt. Ein ähnliches Muster wie bei den Patienten 2 und 4 kann man auch in diesem Fall feststellen. Sowohl beim Zeitpunkt 02:00 als auch bei 06:30 kommt es zu einem Konzentrationsanstieg. Die Konzentration steigt nochmals nach 9h kurzfristig an und nimmt danach langsam ab. Zu sechs verschiedenen Zeitenpunkten (02:00, 03:30, 05:00, 08:30, 12:00 und 20:00) liegt die RSD über 5%.

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	255,3	1,12
1,5	102,3	0,49
2	119,4	5,84
3	80,1	2,46
3,5	58,2	10,35
4,5	49,1	0,41
5	41,2	16,88
6	31,9	2,43
6,5	38,8	4,57
7,75	28,8	1,57
8,5	1,3	22,10
9	4,3	1,63
10	4,2	4,89
12	4,1	5,26
16	3,2	1,58
20	2,5	5,88
24	2,0	0,36

Tabelle 19: Daten der Dialysatproben von Patient 5

4.2.1. Patient 6

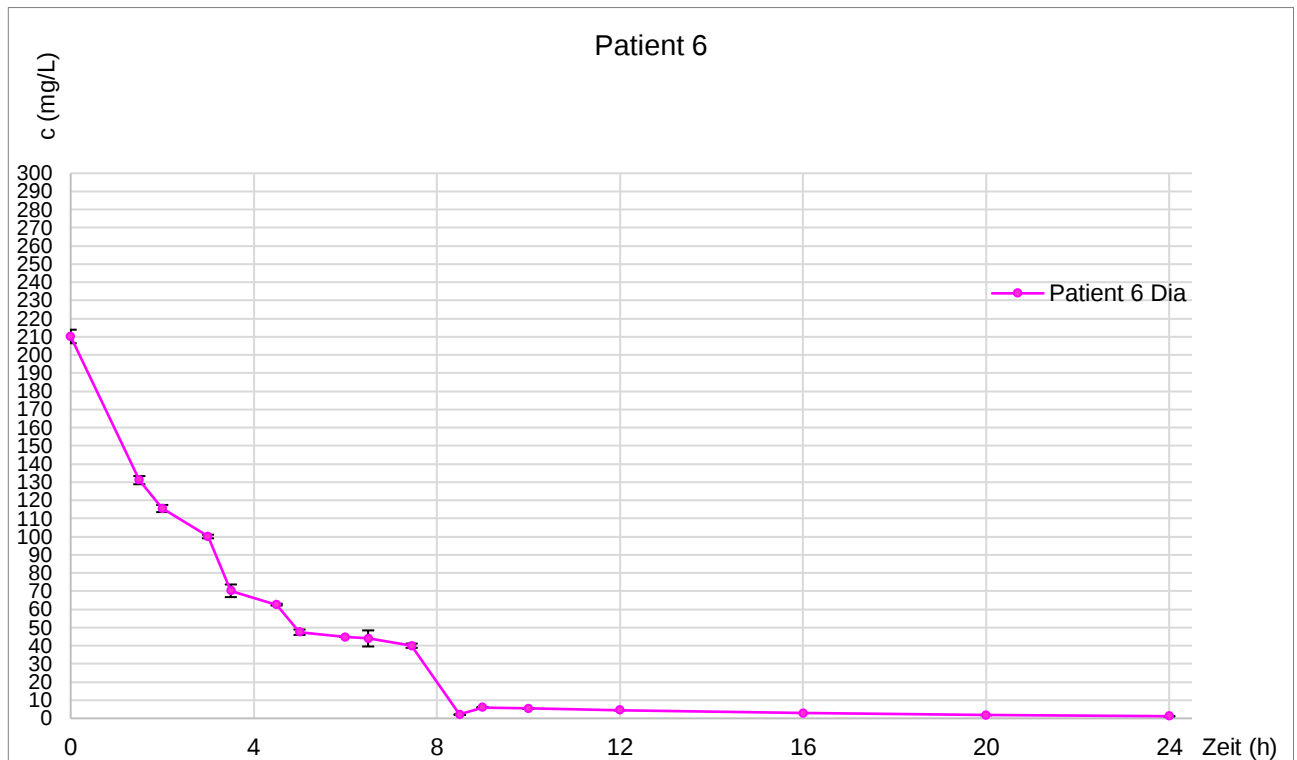


Diagramm 14: Meropenemkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 6

Die Messwerte des Patienten 6 zeigen eine kontinuierliche Konzentrationsabnahme im Dialysat. Ein wiederkehrender Konzentrationsanstieg findet um 09:00 Uhr statt, jedoch sinkt auch diese in den nächsten Stunden. Zu den Zeitpunkten 06:30 und 20:00 übersteigt die RSD 5%.

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	210,2	1,77
1,5	131,1	1,71
2	115,5	1,71
3	100,1	1,00
3,5	70,2	4,96
4,5	62,6	0,82
5	47,4	3,12
6	44,8	0,00
6,5	44,0	10,05
7,75	40,0	2,95
8,5	2,1	3,17
9	6,0	1,76
10	5,4	0,71
12	4,5	0,86
16	2,9	0,60
20	1,8	6,05
24	1,2	1,32

Tabelle 20: Daten der Dialysatproben von Patient 6

5. Diskussion

Für dialysepflichtige Patienten steht neben dem herkömmlichen Hämodialyseverfahren auch die Peritonealdialyse zur Auswahl. Dieses Alternativverfahren ermöglicht den Patienten mehr Flexibilität und eine bessere Lebensqualität. Die Möglichkeit, die Behandlung von Zuhause aus durchzuführen, erspart Zeit und Kosten. Allerdings ist es auch wichtig, auf mögliche Komplikationen wie Peritonitis oder andere Probleme zu achten und entsprechende Hygiene- und Pflegevorschriften einzuhalten.^{20,21} Die Peritonitis, eine Entzündung des Bauchfells, kann aus verschiedenen Gründen auftreten und ist die Hauptursache für das Versagen der Peritonealdialyse. Patienten müssen daher oft auf Hämodialyse umgestellt werden. Peritonitiden können schwerwiegende Komplikationen verursachen und in manchen Fällen sogar tödlich enden. Um Infektionen an der Katheteraustrittsstelle vorzubeugen, wird die Zugabe von Weitspektrumantibiotika zur Dialyseflüssigkeit empfohlen.^{24,25}

Die häufigste Ursache für PD-assoziierte Peritonitiden sind bakterielle Infektionen. Die steigende Prävalenz multiresistenter Erreger stellt eine wachsende Herausforderung dar. Besonders kritisch ist die Tatsache, dass bei MRE-Infektionen häufig eine falsche anfängliche Behandlung eingeleitet wird. Ärzte sind oft gezwungen, mit einer empirischen antimikrobiellen Therapie zu beginnen, bevor der Erreger identifiziert wurde.^{39,40} Demzufolge wird aufgrund der zunehmenden Resistenzentwicklung immer häufiger auf Reservewirkstoffe wie Meropenem zurückgegriffen. Als Breitbandantibiotikum ist dieses Antibiotikum gegen eine Vielzahl von Keimen wirksam und wird als Reserveantibiotikum bei schweren Infektionen eingesetzt.^{30,35,37}

In dieser Masterarbeit wurden im Rahmen einer klinischen Studie in St. Pölten Dialysat- und Serumproben von sechs Dialysepatienten zu definierten Zeitpunkten entnommen und untersucht. Diese erhielten über den intraperitonealen Weg das Antibiotikum Meropenem. Hierfür wurde die HPLC/MS-MS für die Quantifizierung der Proben herangezogen. Die Studie hatte unter anderem zum Ziel mehr über die Pharmakokinetik von Meropenem nach der intraperitonealen Verabreichung zu erfahren. Es wurde untersucht, in welcher Menge und innerhalb welcher Zeit das Antibiotikum das Peritoneum durchdringen und in den Blutkreislauf gelangen kann. Folglich wurde der Plasmaspiegel beobachtet, um festzustellen, ob die intraperitoneale Gabe von Meropenem ausreicht, um eine Peritonitis prophylaktisch zu behandeln.

Zunächst wurden die Serumproben analysiert. Die Blutproben von allen sechs Patienten zeigen einen charakteristischen Kurvenverlauf des Wirkstoffs im Serum, der sich nach dem Prinzip der Kinetik 1. Ordnung verhält. Zu Beginn wird der Wirkstoff hauptsächlich vom Körper aufgenommen, weshalb ein stetiger Konzentrationsanstieg bis zum Maximalplasmaspiegel stattfindet. Anschließend kommt es nach Erreichen des Höchstwertes zu einem Rückgang der

Konzentration, weil der Wirkstoff nun vermehrt abgebaut wird. Der maximale Plasmaspiegel wird bei allen Patienten, außer Patient 4, nach 4,5h gemessen. Patient 4 zeigt eine $C_{\max}$ nach 6,5h. Da zum Zeitpunkt 08:30 der Einlauf der zweiten hypertonen Elektrolyt- und Glucoselösung Extraneal® ohne Meropenem stattfand, flachte die Kurve ab dem Zeitpunkt 09:00 nur noch ab.

Die anfängliche Meropenemkonzentration in der Dialyseflüssigkeit war 400 mg/L, aus dem der Absorptionsanteil für jeden Patienten individuell berechnet wurde. Hierfür wurde eine Division der Maximalkonzentration durch die eingeleitete Konzentration durchgeführt. Dabei ergab sich eine mittlere Absorptionsraten von 2,5%. Patient 1 und 3 wiesen im Gegensatz zu den anderen Patienten die höchsten Absorptionsraten vor. Diese Raten dienen lediglich als grobe Schätzung für die Absorptionskapazität, da viele Einflussfaktoren, die die Pharmakokinetik beeinflussen, nicht berücksichtigt werden konnten. Anhand dieser Ergebnisse kann eine Korrelation zwischen den Dialysatwerten und den Serummessungen festgestellt werden. Beispielsweise erkennt man bei Patient 1 und 3, die zu den Einlaufzeiten ebenso höhere Messwerte aufweisen, höhere Absorptionsraten. Dies deutet darauf hin, dass das Antibiotikum Meropenem über das Peritoneum absorbiert werden kann.

Als nächstes wurden die Dialysatproben untersucht. In der Studie wurde einer 5000mL Physioneal®-Dialyseflüssigkeit 2g Meropenem zugesetzt, welches einer Meropenemkonzentration von 400 mg/L entspricht. Die Physioneal®-Lösung wird zu Beginn und zu fünf verschiedenen Zeiten über einen Cycler in das Peritoneum eingebracht. Während die frische Dialyseflüssigkeit in den Bauchraum strömt, läuft ebenso zu bestimmten Zeiten das verweilte Dialysat aus. Somit gab es insgesamt fünf Ein- und Ausläufe. Zum Zeitpunkt 08:30 startete der Einlauf der zweiten Extraneal®-Lösung über den Cycler. Diese Dialyselösung enthält kein Antibiotikum und verweilt bis zum Ende des APD-Regimes im Bauchraum.

Aus den Ergebnissen kann man feststellen, dass der Kurvenverlauf sowohl bei den Serumproben als auch bei den Dialysatproben den Erwartungen entspricht. Mit dem APD-Beginn kommt die Dialyseflüssigkeit (Physioneal®) zunächst in das Peritoneum, wodurch sich die Spitzenwerte in allen Dialysatproben zu dieser Zeit zeigten. Demnach wurde sowohl $C_{\max}$ als auch $t_{\max}$ zum Zeitpunkt 00:00 bestimmt. Aufgrund des regelmäßigen Austauschs des verbrauchten Dialysats und das Einleiten neuer Dialyseflüssigkeit zeigen sich immer wieder Konzentrationsschwankungen. Diese fanden meistens zu den Einlaufzeiten (nach 0h, 2h, 3,5h, 5h und 6,5h) statt. An dieser Stelle ist der Kurvenverlauf von Patient 3 hervorzuheben, da die Messwerte zu den Einlaufzeiten der neuen Dialyseflüssigkeit einen entsprechenden Anstieg der Konzentrationen aufweisen. Bei den übrigen Patienten sind die Konzentrationsanstiege nicht bei jedem Einlauf aufgetreten. Die zweite Dialyseflüssigkeit

(Extraneal®) wurde nach 8,5h eingebracht, wodurch es zu einem starken Konzentrationsabfall kam. Anschließend steigt sie kurzfristig wieder zu und sinkt nach 10h bei den meisten Patienten wieder, da ab diesem Zeitpunkt der Wirkstoff nur mehr ausgeschieden wird. Da in der Extraneal®- Flüssigkeit kein Antibiotikum vorhanden ist, sollte in der Regel keine Meropenemkonzentration nachweisbar sein. Allerdings erhält man trotz dessen einen Spiegel im einstelligen Bereich. Ein möglicher Grund dafür könnte die unvollständige Elimination des Wirkstoffs aus dem Bauchraum sein. Da der letzte Auslauf der Physioneal®-Lösung zum Zeitpunkt 07:45 war, wurde der Wirkstoff offensichtlich in den nächsten Stunden nicht restlos beseitigt. Des Weiteren könnte es aufgrund des Konzentrationsunterschieds zwischen dem Blut und der Extraneal®-Lösung möglich sein, dass der Wirkstoff aus dem Blut ins Dialysat zurückgeführt wird. Aufgrund des neu entstandenen Konzentrationsgefälles ist es möglich, dass der Wirkstoff aus dem Blut ins Dialysat gewandert ist.

Die Konzentrationsanstiege zu unterschiedlichen (Einlauf-) Zeiten könnten auf die individuellen pharmakokinetischen Parameter zurückgeführt werden. Das sogenannte „ADME-Modell“ beschreibt die pharmakokinetischen Vorgänge, die ein Wirkstoff im Körper durchmacht. Diese Abkürzung steht für Absorption, Distribution, Metabolismus und Elimination. Patienten, welche den Wirkstoff schneller eliminieren, könnten ein ausgeprägtes „ADME-Modell“ besitzen. Beispielsweise können Unterschiede in der Durchblutung des Peritoneums die Aufnahme in den systemischen Kreislauf begünstigen. Auch die Bindung an Plasmaproteine kann zwischen einzelnen Patienten variieren. Eine niedrige Plasmaproteinbindung kann die Verteilung des Wirkstoffs im Körper beschleunigen. Des Weiteren spielen Leber- und Nierenfunktionen eine entscheidende Rolle bei der Verstoffwechselung und für die Ausscheidung von Medikamenten. Wenn der Wirkstoff schneller metabolisiert und aus dem Körper ausgeschieden wird, entsteht erneut ein Konzentrationsgefälle, welches zu einer verstärkten Absorption von Meropenem zur Folge hat.

6. Conclusio

Abschließend kann man sagen, dass alle Serumproben der teilnehmenden Patienten einer Bateman-Funktion mit 1.Ordnung-Kinetik folgen, welche die gleichzeitige Auf- und Abnahme eines Wirkstoffs in den Körper beschreibt. Nahezu alle der sechs Patienten weisen zur selben Zeit (04:30 Uhr) eine Maximalkonzentration auf. Die Resultate der Blutwerte unterstützen die Annahme, dass das Antibiotikum Meropenem über das Bauchfell absorbiert wird, da Patienten mit einer höheren Absorption auch die erhöhten Konzentrationen zu den Einlaufzeiten aufzeigen.

Des Weiteren lässt sich feststellen, dass die erhöhten Konzentrationen in den Dialysatproben auf den Einlauf der neuen Dialyseflüssigkeit zurückzuführen ist. Die zweite, wirkstofffreie Dialyseflüssigkeit wird um 08:30 Uhr verabreicht, weshalb es bei allen sechs Patienten zu einem abrupten Konzentrationsrückgang in den einstelligen mg/L-Bereich kommt. Da ab diesem Zeitpunkt kein Wirkstoff mehr appliziert wird, ist nur mehr ein Restbestand im Dialysat nachweisbar und der Wirkstoff befindet sich im Eliminationsprozess.

Zusammenfassend kann behauptet werden, dass das Reserveantibiotikum Meropenem bei dialysepflichtigen Patienten, die jedoch an keiner Peritonitis leiden, einen bemerkbaren Nutzen in Bezug auf die prophylaktische Behandlung bringt. Jedenfalls gelangt das Antibiotikum abhängig vom Patientenzustand in bestimmter Menge über das Peritoneum ins Blut und bietet somit eine weitere Behandlungsmöglichkeit gegen Peritonitis an.

.

7. Anhang

Abbildungs-, Tabellen- und Diagrammverzeichnis

Abbildung 1: Peritonealdialyse ¹⁷	7
Abbildung 2: System des Stoffaustausches	8
Abbildung 3: Stoffaustausch bei der Peritonealdialyse	8
Abbildung 4: schematischer Aufbau einer HPLC ⁴⁶	21
Abbildung 5: Schema eines TripleQuadropols ⁵⁴	26
Abbildung 6: Gradientenelution	28
Abbildung 7: MRM: Precursor-Ion (m/z= 384,0 Da), Quantifier (m/z= 141,0 Da) und Qualifier (m/z= 254,2 Da)	29
Abbildung 8: Eichgerade	31
Tabelle 1: verwendete Geräte, Software und Materialien	15
Tabelle 2: verwendete Chemikalien und Substanzen	16
Tabelle 3: Zusammensetzung von Precinorm U	18
Tabelle 4: Physioneal® Zusammensetzung vor dem Mischen	19
Tabelle 5: Physioneal® Zusammensetzung nach dem Mischen	20
Tabelle 6: Lösungsmittel-Zusammensetzung und HPLC-Parameter	27
Tabelle 7: Konzentration der Stammlösung und Verdünnungen	30
Tabelle 8: Blut- und Dialysatabnahmezeiten	32
Tabelle 9: Daten der Serumproben von Patient 1	36
Tabelle 10: Daten der Serumproben von Patient 2	37
Tabelle 11: Daten der Serumproben von Patient 3	38
Tabelle 12: Daten der Serumproben von Patient 4	39
Tabelle 13: Daten der Serumproben von Patient 5	40
Tabelle 14: Daten der Serumproben von Patient 6	41
Tabelle 15: Daten der Dialysatproben von Patient 1	44
Tabelle 16: Daten der Dialysatproben von Patient 2	45
Tabelle 17: Daten der Dialysatproben von Patient 3	46

Tabelle 18: Daten der Dialysatproben von Patient 4	47
Tabelle 19: Daten der Dialysatproben von Patient 5	48
Tabelle 20: Daten der Dialysatproben von Patient 6	49
Diagramm 1: Zusammenfassung der Serumproben von Patient 1-6	35
Diagramm 2: Meropenemkonzentrationen der Serumproben von Patient 1	36
Diagramm 3: Meropenemkonzentrationen der Serumproben von Patient 2	37
Diagramm 4: Meropenemkonzentrationen der Serumproben von Patient 3	38
Diagramm 5: Meropenemkonzentrationen der Serumproben von Patient 4	39
Diagramm 6: Meropenemkonzentrationen der Serumproben von Patient 5	40
Diagramm 7: Meropenemkonzentrationen der Serumproben von Patient 6	41
Diagramm 8: Zusammenfassung der Dialysatproben von Patient 1-6	42
Diagramm 9: Meropenemkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 1	44
Diagramm 10: Meropenemkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 2	45
Diagramm 11: Meropenemkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 3	46
Diagramm 12: Meropenemkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 4	47
Diagramm 13: Meropenemkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 5	48
Diagramm 14: Meropenemkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 6	49

Literaturverzeichnis

- ¹ Csaba P. Kovesdy, „Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022“, *Kidney International Supplements* 12, Nr. 1 (April 2022): 7–11, <https://doi.org/10.1016/j.kisu.2021.11.003>.
- ² Vorarlberger Krankenhaus-Betriebsgesellschaft.m.b.h, „Weltnierentag 2019: Erfolgsbilanz zum Vorsorgeprojekt „Gesunde Niere Vorarlberg““, Vorarlberger Krankenhaus-Betriebsgesellschaft.m.b.h (MASSIVE ART WebServices GmbH), zugegriffen 23. September 2023, <https://www.landeskrankenhaus.at/news/weltnierentag2019>.
- ³ Ute Schnittert, *Neu in der Dialyse* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2020), <https://doi.org/10.1007/978-3-662-61015-2>.
- ⁴ Rainer Nowack, Rainer Birck, und Thomas Weinreich, Hrsg., *Dialyse und Nephrologie für Fachpersonal*, 3., vollständig überarb. Aufl (Heidelberg: Springer Medizin Verl, 2009).
- ⁵ Franz-Josef Kretz und Jürgen Schäffer, *Anästhesie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie*, 4., korrigierte und neu bearbeitete Auflage (Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2006).
- ⁶ „Diagnostik“, zugegriffen 23. September 2023, <https://www.uniklinikum-leipzig.de/einrichtungen/medizinische-klinik-3/Seiten/nierenversagen-diagnostik.aspx>.
- ⁷ „Hämodialyse, Hämofiltration und Hämodiafiltration“, Gesundheitsportal, zugegriffen 23. September 2023, <https://www.gesundheit.gv.at/krankheiten/nieren-harnblase/dialyse/haemodialyse-haemofiltration-haemodiafiltration.html>.
- ⁸ „Peritonealdialyse (Bauchfelldialyse, CAPD)“, zugegriffen 23. September 2023, <https://www.uniklinikum-leipzig.de/einrichtungen/medizinische-klinik-3/Seiten/peritonealdialyse.aspx>.
- ⁹ „Peritoneum - Aufbau, Funktion & Krankheiten | MedLexi.de“, zugegriffen 23. September 2023, <https://medlexi.de/Peritoneum>.
- ¹⁰ Heidi Puttinger und Andreas Vychytil, „Peritonealdialyse (PD)“, *Wiener klinische Wochenschrift Education* 3, Nr. 1 (1. Mai 2008): 1–15, <https://doi.org/10.1007/s11812-008-0034-4>.
- ¹¹ „Bauchhöhle - Wissen @ AMBOSS“, zugegriffen 23. September 2023, <https://www.amboss.com/de/wissen/bauchhoehle>.
- ¹² Medizinexpert*innen bei DocCheck, „Peritoneum“, DocCheck Flexikon, zugegriffen 23. September 2023, <https://flexikon.doccheck.com/de/Peritoneum>.
- ¹³ Medizinexpert*innen bei DocCheck, „Extraperitonealraum“, DocCheck Flexikon, zugegriffen 23. September 2023, <https://flexikon.doccheck.com/de/Extraperitonealraum>.
- ¹⁴ https://www.freseniusmedicalcare.com/fileadmin/data/com/pdf/Media_Center/Bauchfelldialyse_verstehen.pdf zugegriffen 23. September 2023
- ¹⁵ Rainer Nowack, Rainer Birck, und Thomas Weinreich, Hrsg., *Dialyse und Nephrologie für Fachpersonal*, 3., vollständig überarb. Aufl (Heidelberg: Springer Medizin Verl, 2009). S. 233 ff.

-
- ¹⁶ Isaac Teitelbaum, „Peritoneal Dialysis“, hg. von Julie R. Ingelfinger, *New England Journal of Medicine* 385, Nr. 19 (4. November 2021): 1786–95, <https://doi.org/10.1056/NEJMra2100152>.
- ¹⁷ „diagram of how peritoneal dialysis works“, zugegriffen 24. September 2023, <https://mammothmemory.net/biology/organs-and-systems/kidney-disease-and-dialysis/how-peritoneal-dialysis-works.html>.
- ¹⁸ Christa Tast und Thomas Mettang, *Peritonealdialyse: Klinischer Leitfaden für Pflegekräfte*, 4. Aufl. (Hogrefe AG, 2020). S. 50 ff.
- ¹⁹ „Peritonealdialyse zuhause“, Therapy Example Site, zugegriffen 23. September 2023, <https://mykidneyjourney.baxter.at/de/behandlungsmoeglichkeiten/peritonealdialyse-zuhause>.
- ²⁰ Universitätsklinikum Würzburg, „Universitätsklinikum Würzburg: Nephrologie: Peritonealdialyse“, zugegriffen 23. September 2023, <https://www.ukw.de/medizinische-klinik-i/nephrologie/schwerpunkte/nierenersatzverfahren/peritonealdialyse/>.
- ²¹ Andreas Vychytil und Walter H. Hörl, „Peritonealdialyse – eine Alternative zur Hämodialyse im Zentrum“, *Wiener Medizinische Wochenschrift* 163, Nr. 11–12 (Juni 2013): 253–254, <https://doi.org/10.1007/s10354-013-0223-3>.
- ²² David F. Walker, *Peritonitis: Causes, Diagnosis and Treatment*, Emergency and Intensive Care Medicine (New York: Nova Medicine and Health, 2021), <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=2918960&site=ehost-live>.
- ²³ C.-C. Szeto u. a., „Are Peritoneal Dialysis Patients with and without Residual Renal Function Equivalent for Survival Study? Insight from a Retrospective Review of the Cause of Death“, *Nephrology Dialysis Transplantation* 18, Nr. 5 (1. Mai 2003): 977–982, <https://doi.org/10.1093/ndt/qfg027>.
- ²⁴ Neil Boudville u. a., „Recent Peritonitis Associates with Mortality among Patients Treated with Peritoneal Dialysis“, *Journal of the American Society of Nephrology* 23, Nr. 8 (August 2012): 1398, <https://doi.org/10.1681/ASN.2011121135>.
- ²⁵ Cheuk-Chun Szeto und Philip Kam-Tao Li, „Peritoneal Dialysis–Associated Peritonitis“, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 14, Nr. 7 (Juli 2019): 1100, <https://doi.org/10.2215/CJN.14631218>.
- ²⁶ C.-T. Germer und C. Eckmann, „Peritonitis“, *Der Chirurg* 87, Nr. 1 (Januar 2016): 3–4, <https://doi.org/10.1007/s00104-015-0118-5>.
- ²⁷ Philip Kam-Tao Li u. a., „ISPD Peritonitis Guideline Recommendations: 2022 Update on Prevention and Treatment“, *Peritoneal Dialysis International: Journal of the International Society for Peritoneal Dialysis* 42, Nr. 2 (März 2022): 110–53, <https://doi.org/10.1177/08968608221080586>.
- ²⁸ „Meropenem“, in *Wikipedia*, 4. Juli 2021, <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Meropenem&oldid=213548271>.
- ²⁹ Klaus Aktories u. a., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* - 9783437426223 | Elsevier GmbH, 12. Aufl., S. 708 ff. <https://shop.elsevier.de/allgemeine-und-spezelle-pharmakologie-und-toxikologie-9783437426223.html>.

³⁰ Northern Neonatal Network, *Neonatal Formulary: Drug Use in Pregnancy and the First Year of Life* (John Wiley & Sons, 2008). S. 152

Sean Ainsworth, „M“, in *Neonatal Formulary: Drug Use in Pregnancy and the First Year of Life*, hg. von Sean Ainsworth und Sean Ainsworth (Oxford University Press, 2020), 0, S. 492 ff. <https://doi.org/10.1093/med/9780198840787.003.0025>.

³¹ Medizinexpert*innen bei DocCheck, „Beta-Laktam-Antibiotikum“, DocCheck Flexikon, zugegriffen 23. September 2023, <https://flexikon.doccheck.com/de/Beta-Laktam-Antibiotikum>.

³² Medizinexpert*innen bei DocCheck, „Betalaktamase“, DocCheck Flexikon, zugegriffen 23. September 2023, <https://flexikon.doccheck.com/de/Betalaktamase>.

³³ Medizinexpert*innen bei DocCheck, „Meropenem“, DocCheck Flexikon, zugegriffen 23. September 2023, <https://flexikon.doccheck.com/de/Meropenem>.

³⁴ Diane S. Aschenbrenner und Samantha J. Venable, *Drug Therapy in Nursing* (Lippincott Williams & Wilkins, 2009). S.766 ff.

³⁵ T. Herdegen, „Kurzlehrbuch: Pharmakologie und Toxikologie“, S. 400 ff., Thieme, 2010.

³⁶ M. Freissmuth, S. Offermanns, S. Böhm, „Pharmakologie und Toxikologie“, 3. Auflage, Springer, S. 725 ff., 2019.

³⁷ T. Karow, R. Lang-Roth, „Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie“, 30.Auflage, 2022. S. 709 ff.

³⁸ R. Hausinger u. a., „Innovationen in der Peritonealdialyse“, *Der Nephrologe* 17, Nr. 2 (Februar 2022): 85–91, <https://doi.org/10.1007/s11560-021-00542-x>.

³⁹ Kuhlmann, Ulrich et al.: 2015 „Nephrologie“ (Kapitel 6 Peritonealdialyse – 16.3. Komplikationen der Peritonealdialyse) S.728 ff., 6.Auflage (DOI: 10.1055/b-0035-124818)

⁴⁰ C. Eckmann, „Antibiotikatherapie intraabdomineller Infektionen im Zeitalter der Multiresistenz“, *Der Chirurg* 87, Nr. 1 (Januar 2016): 26–33, <https://doi.org/10.1007/s00104-015-0106-9>.

⁴¹ Sami Ullah u. a., „Population pharmacokinetics of meropenem in patients undergoing automated peritoneal dialysis“, *Peritoneal Dialysis International* 43, Nr. 5 (September 2023): 402–10, <https://doi.org/10.1177/08968608231167237>.

⁴² Vlaar PJ, van Hulst M, Benne CA, Janssen WM. Intraperitoneal compared with intravenous meropenem for peritoneal dialysis-related peritonitis. *Perit Dial Int* 2013; 33(6):708–9.

⁴³ Philip Kam-Tao Li u. a., „ISPD Peritonitis Guideline Recommendations: 2022 Update on Prevention and Treatment“, *Peritoneal Dialysis International: Journal of the International Society for Peritoneal Dialysis* 42, Nr. 2 (März 2022): 110–53, <https://doi.org/10.1177/08968608221080586>.

⁴⁴ Roche Diagnostics GmbH, „Precinorm U.“ 2013.

⁴⁵ Baxter Deutschland GmbH, „PHYSIONEAL 40 Glucose: Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels.“ 2017.

⁴⁶ A. Dominik, D. Steinhilber, M. Wurglics, „Instrumentelle Analytik kompakt“ 3. Auflage, S.173 ff. (Abb.4 S. 244)

⁴⁷ G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, „Instrumentelle pharmazeutische Analytik“ 5. Auflage, S. 472 ff.

⁴⁸ R. Kazakevich, Yuri; LoBrutto, HPLC For Pharmaceutical Scientists. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2007. S.9 ff.

⁴⁹ A. Dominik, D. Steinhilber, M. Wurglics, „Instrumentelle Analytik kompakt“ 3. Auflage, S. 167 ff.

⁵⁰ G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, „Instrumentelle pharmazeutische Analytik“ 5. Auflage, S.323 ff.

⁵¹ „Elektrospray-Ionisation“, in *Wikipedia*, 18. Februar 2022, <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Elektrospray-Ionisation&oldid=220350457>.

⁵² <https://m.youtube.com/watch?v=-iLlvi-mMak> , zugegriffen am 12.06.2023 14:31Uhr

⁵³ R. Kazakevich, Yuri; LoBrutto, HPLC For Pharmaceutical Scientists. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2007. S. 297-611

⁵⁴ J. Faktor, M. Dvorakova, J. Maryas, I. Struharova, and P. Bouchal, “Identification and characterisation of pro-metastatic targets, pathways and molecular complexes using a toolbox of proteomic technologies,” *Klin. Onkol.*, vol. 25, no. SUPPL.2, 2012. (<https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/383/4134.pdf>)

⁵⁵ M. Vogeser and C. Seger, “A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory - Goals for further developments,” *Clin. Biochem.*, vol. 41, no. 9, pp. 649– 662, 2008.

⁵⁶ M. Gmeiner, „Quantifizierung von Aztreonam mittels HPLC-MS/MS in Peritonealdialysat und Serum“, Universität Wien, 2022

⁵⁷ Laboratory Instruments LAMBDA, „— Säulenchromatographie & Erfolgreiche Proteinreinigung“, Fraktionssammler, Probennehmer, Automatischer Liquidhandler & Dispenser, Laborgeräte 2023 (blog), 12. Juli 2017, <https://www.fraktionssammler.com/proteinreinigung-saeulenchromatographie-gradientenelution/>.