

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

“Quantifizierung von Aztreonam mittels HPLC-MS/MS in
Peritonealdialysat und Serum“

verfasst von / submitted by

Magdalena Gmeiner, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra pharmaciae (Mag. pharm.)

Wien, 2022 / Vienna, 2022

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

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

Danksagung

Ich möchte mich hiermit sehr herzlich bei allen Personen bedanken, die mir die Anfertigung meiner Masterarbeit ermöglicht beziehungsweise mich dabei unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich der Leiterin der Pharmakognosie-Division Univ.-Prof. Dr. Verena Dirsch danken, dass mir ein Arbeitsplatz für die Durchführung meiner Masterarbeit bereitgestellt wurde.

Ein besonderer Dank gebührt meinem Betreuer ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Gottfried Reznicek. Vielen Dank für das angenehme Arbeitsumfeld, die aufbauenden Worte und die auflockernden Witze, ich hätte mir keinen besseren Abschluss für meine Studienzeit wünschen können.

Ich möchte ebenfalls Dr. Ammar Tahir, MSc ein großes Dankeschön aussprechen, der mir oft mit Rat und Tat zur Seite stand, wenn die MS belüftet oder die HPLC neu gestartet werden musste.

Weiters möchte ich mich im Speziellen bei meinen Kolleginnen Seraina, Tina, Madeleine und Dunja, aber auch bei all anderen Kolleg:innen der Pharmakognosie-Division bedanken, durch die die Arbeitszeit und insbesondere die Mittagspausen immer voller Spaß und guten Gesprächen waren. Auch meinen Studienfreund:innen, die mich jahrelang begleitet und unterstützt haben, gebührt ein großer Dank. Ich hätte meine Zeit an der Uni nicht so sehr genossen, hätte ich nicht immer jemanden gehabt, der mit mir gelacht und gelitten hat.

Außerdem möchte ich meinen Geschwistern Teresa, Johannes und Klara und meinem Schwager Klemens danken, die mich durch ihren Humor und ihre Freundschaft auch in frustrierenden Zeiten immer wieder aufgemuntert haben. Auch bei meinem Freund Sebastian möchte ich mich für das gegenseitige Anspornen und die Hilfe während des Studiums bedanken.

Schlussendlich geht mein tiefster Dank an meine Eltern Birgitta und Günter, die mir meine Ausbildung durch ihre immerwährende Unterstützung und Liebe ermöglicht haben. Sie sind mir ein großes Vorbild und ich freue mich, sie durch die Beendigung meines Studiums mit Stolz erfüllen zu dürfen.

VIELEN DANK

Zusammenfassung

Die Peritonealdialyse stellt seit 60 Jahren eine Alternativmethode der Blutreinigung dar. Verglichen mit der Hämodialyse bringt sie viele Vorteile mit sich, da durch die Möglichkeit der Durchführung zu Hause nicht nur die Lebensqualität der Patienten erhöht, sondern auch Behandlungskosten gespart werden können. Doch die einhergehende Komplikation einer Entzündung des Bauchfells, auch Peritonitis genannt, ist ein gefürchtetes Risiko, da es dadurch zum Versagen der Dialysemethode kommen kann.

Aufgrund der Vielfalt der Peritonitis-assoziierten Bakterien wird zur Behandlung eine Kombination von Wirkstoffen empfohlen, welche sowohl das gram-positive als auch das gram-negative Spektrum abdecken. Durch die über die Jahre immer stärker aufkommende Resistenzentwicklung speziell von Bakterien, gestaltet sich die antibakterielle Therapie jedoch zunehmend schwieriger.

Das Antibiotikum Aztreonam gehört zu der Gruppe der Monobactame und gilt als Reserveantibiotikum für den gram-negativen Bereich. Zur Behandlung einer Peritonealdialyse-assoziierten Peritonitis wird eine intraperitoneale Antibiotika-Applikation empfohlen. Bezüglich der Pharmakokinetik intraperitoneal appliziertem Aztreonam liegen jedoch sehr wenig Daten vor.

Ziel der vorliegenden Masterarbeit war die Messung des Aztreonamgehalts in Dialysat- und Serumproben von sechs Studienteilnehmern mittels HPLC-MS/MS. Es sollte bestimmt werden, wie viel Wirkstoff in welchem Zeitraum über das Bauchfell in das Blut aufgenommen wurde und ob ein relevanter Plasmaspiegel zur Behandlung von Peritonitiden aufgebaut werden konnte.

Die Ergebnisse zeigen markante Konzentrationsanstiege in den Dialysatproben der Patienten, welche mit den errechneten Absorptionsraten der Patienten korrelieren. Des Weiteren erreichen alle Patienten ausreichende Serumspiegel, welche nötig wären, um drei ausgewählte, gram-negative Beispielkeime zu eliminieren. Somit könnten solche Peritonitiden möglicherweise auch mittels intraperitoneal appliziertem Aztreonam behandelt werden.

Abstract

Peritoneal dialysis (PD) has been an alternative method of blood purification for over 60 years. Compared to hemodialysis, PD shows many advantages. The possibility to perform the treatment at home not only increases quality of life of the patients, but also minimizes cost of treatment. However, the common complication of peritonitis is a dreaded peril as it can lead to method failure.

Peritonitis-associated bacteria show a wide diversity, so a combination of antibiotics covering both the gram-positive and gram-negative spectrum is recommended for treatment. However, due to the increase of resistance mechanisms, especially within bacteria, antibacterial therapy is becoming increasingly more difficult over the years.

Aztreonam is a bactericide drug which belongs to the group of monobactams and is used as a reserve antibiotic in gram-negative infections. For treatment of peritoneal dialysis-associated peritonitis, intraperitoneal antibiotic administration is recommended. However, only very little data is available on the pharmacokinetics of aztreonam when administered via the intraperitoneal route.

The aim of this master's thesis was the analysis of aztreonam within dialysate and serum samples of six patients using HPLC-MS/MS. The analytical results were used to elucidate how much aztreonam could be absorbed into the systemic circulation via the peritoneum and whether a relevant plasma concentration for the treatment of peritonitis could be achieved.

The results show distinctive increases within the dialysate samples, which correlate with the calculated absorption rates of the patients. Furthermore, all patients achieve sufficient serum levels to eradicate three gram-negative bacteria, which were chosen as an example for this thesis. Thus, it could be stated that intraperitoneal administration of aztreonam presents a new possibility of therapy for gram-negative peritonitis.

DANKSAGUNG	I
ZUSAMMENFASSUNG	II
ABSTRACT	III

EINLEITUNG **1**

1.1. PERITONEALDIALYSE	2
1.1.1. METHODIK	2
1.1.2. DAS PERITONEUM ALS MEMBRAN	3
1.1.3. FORMEN DER PERITONEALDIALYSE	4
1.1.4. VORTEILE UND NACHTEILE	5
1.1.5. PERITONITIS	6
1.1.6. AZTREONAM	8

2. FRAGESTELLUNG **11**

2.1. PROBLEMSTELLUNG	11
2.2. KLINISCHE STUDIE DES UK ST. PÖLTEN	11

3. MATERIALIEN UND METHODEN **13**

3.1. MATERIALIEN	13
3.1.1. GERÄTE UND MATERIALIEN	13
3.1.1.1. HPLC-MS	13
3.1.1.2. DIVERSE GERÄTE UND MATERIALIEN	13
3.2. SUBSTANZEN	14
3.2.1.1. REINSUBSTANZ AZTREONAM	14
3.2.1.2. PHYSIONEAL®	14
3.2.1.3. REFLOTRON® PRECINORM U	15
3.2.1.4. DIVERSE SUBSTANZEN UND REAGENTIEN	16
3.3. METHODEN	17
3.3.1. HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE	17
3.3.1.1. FORMEN DER HPLC	18
3.3.2. MASSENSPEKTROMETRIE	19
3.3.2.1. ELEKTROSPRAYIONISATION	20
3.3.2.2. TRIPLEQUAD	21
3.3.3. VORTEILE DER HPLC-MS/MS	23
3.3.4. PARAMETER DER ANGEWANDTEN METHODE	23
3.3.5. ERSTELLUNG DER EICHGERADE	25
3.3.5.1. EICHGERADE A	25
3.3.5.2. EICHGERADE B	26
3.3.5.3. EICHGERADE C	27
3.3.6. PATIENTENPROBEN	28
3.3.7. PROBENAUFARBEITUNG	30
3.3.7.1. DIALYSAT	30
3.3.7.2. SERUM VORTESTS	30
3.3.7.3. SERUM	31

4. ERGEBNISSE	32
4.1. OPTIMIERUNG DER PROBENAUFARBEITUNG	32
4.1.1. VERDÜNNUNGSFAKTOR DER DIALYSATPROBEN	32
4.1.2. WAHL DES FÄLLUNGSREAGENS	33
4.1.3. VERIFIZIERUNG DER WIEDERFINDUNGSRATE	33
4.2. ERGEBNISSE DER DIALYSATPROBEN	35
4.2.1. PATIENT 1	35
4.2.2. PATIENT 2	36
4.2.3. PATIENT 3	37
4.2.4. PATIENT 4	38
4.2.5. PATIENT 5	39
4.2.6. PATIENT 6	40
4.2.7. ZUSAMMENFASSUNG DER DIALYSATPROBEN	41
4.3. ERGEBNISSE DER SERUMPROBEN	42
4.3.1. PATIENT 1	42
4.3.2. PATIENT 2	43
4.3.3. PATIENT 3	44
4.3.4. PATIENT 4	45
4.3.5. PATIENT 5	46
4.3.6. PATIENT 6	47
4.3.7. ZUSAMMENFASSUNG DER SERUMPROBEN	48
5. DISKUSSION	49
6. CONCLUSIO	55
7. ANHANG	56
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	56
ABBILDUNGS-, DIAGRAMM- UND TABELLENVERZEICHNIS	59
QUELLENANGABE	61
DATEN	64

Einleitung

Terminales Nierenversagen (End-stage Renal Disease, ESRD) zählt zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Therapeutisch entgegenwirkend wird bei Patienten die sogenannte Nierenersatztherapie (Renal Replacement Therapy, RRT) eingesetzt, welche entweder Dialyse oder gar Nierentransplantation vorsieht.

Im Jahr 2013 benötigten schätzungsweise bis zu 9,7 Millionen Personen weltweit eine Form der Nierenersatztherapie. Durch den stetigen Anstieg des Altersdurchschnittes der Gesellschaft und die rapide Erhöhung der Prävalenz der Hauptursachen für Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus Typ 2 und Hypertonie, wird sich die Zahl der nierenersatztherapie-pflichtigen Patienten in den kommenden Jahrzehnten voraussichtlich noch weiter drastisch erhöhen. Zwar gilt die RRT bei terminalen Nierenversagen als eine effektive, lebensverlängernde Maßnahme, jedoch ist sowohl die konventionelle Hämodialyse (HD) als auch die Nierentransplantation sehr kostspielig und benötigt speziell geschultes, medizinisches Personal für die Durchführung. Besonders in weniger entwickelten Ländern in Asien und Afrika stellen diese Therapiewege eine große Herausforderung dar [1].

Die Nieren spielen eine große Rolle in der effektiven Metabolisierung und Ausscheidung von endogenen und exogenen Substanzen, sind aber auch an der Regulation des Blutdrucks und -volumens, der Produktion von Erythropoietin und der Regulierung des Säure-Basen-Haushaltes beteiligt. Die Nierengesundheit von Patienten steht somit oftmals im Fokus, jedoch stellt sich die Abschätzung der Nierenfunktion meist als komplex heraus. In der Regel basiert eben diese Einschätzung auf der Berechnung der glomerulären Filtrationsrate (GFR), eine Größe, die beschreibt, wieviel Milliliter Blut pro Zeiteinheit von den Nieren gereinigt werden [2]. Zwar ist die GFR für jeden Patienten individuell, jedoch weisen gesunde, junge Patienten für gewöhnlich Werte von 100 bis 125 mL/min pro 1,73 m² Körperoberfläche (KO) auf.

Eine Verringerung der GFR deutet auf eine verminderte Nierenfunktion hin, ab einer GFR von unter 60 mL/min pro 1,73 m² KO spricht man von chronischem Nierenversagen. Fällt die GFR gar unter 15 mL/min pro 1,73 m² KO, handelt es sich um eine Niereninsuffizienz. In diesem Fall kommt es zu einem krankhaften Anstieg der Serumkonzentration harnpflichtiger Stoffe wie Harnstoff, Harnsäure und Kreatinin, da die Nieren nicht mehr in der Lage sind, das Blut ausreichend von diesen zu reinigen [3]. Der Patient gilt als dialysepflichtig und benötigt eine Nierenersatztherapie, entweder in Form einer Transplantation oder einer Dialyse.

Die Hämodialyse gilt als die klassische Methode der Dialyse. Hier wird das Blut des Patienten extrakorporal an einer synthetischen, semipermeablen Membran (Dialysator) entlang geleitet. Durch eine hypertone Dialyselösung an der anderen Seite der Membran, werden auf Grund Diffusionsprozesse harnpflichtige Stoffe und Toxine aus dem Blut entfernt. Je nach Nierenfunktion des Patienten wird die Hämodialyse bis zu dreimal die Woche für drei bis vier Stunden pro Sitzung durchgeführt, wofür die Patienten meist spezielle Dialysezentren aufsuchen müssen. Zwar gibt es ebenfalls die Option der Heimhämodialyse, doch ist für die Durchführung speziell geschultes Personal und ausreichend Platz für das Equipment im Wohnbereich notwendig [4].

Als Alternative zur Hämodialyse wird seit über sechs Jahrzehnten die Peritonealdialyse (PD) eingesetzt [5].

1.1. Peritonealdialyse

1.1.1. Methodik

Bei der Peritonealdialyse wird im Gegensatz zu der Hämodialyse das Blut intrakorporal gereinigt. Hierbei wird ein permanenter Katheter in den Peritonealraum implantiert, über den die hypertone Dialyseflüssigkeit in den Bauchraum eingebracht wird (siehe Abbildung 1).

Wo bei der Hämodialyse eine synthetische Membran als semipermeable Barriere eingesetzt wird, dient bei der Peritonealdialyse das ausgeprägte Kapillarnetz des Bauchfells als Dialysemembran (siehe Kapitel 1.1.2) [6].

Über das Peritoneum kommt es zu einem bidirektionalen Stoffaustausch durch Osmose. Einerseits findet die Ultrafiltration von Wasser und die Diffusion diverser Substanzen und Elektrolyte wie zum Beispiel Harnstoff, Kreatinin und Kalium aus dem Blut in das Dialysat statt, andererseits gelangt Glucose aus der hypertonen Flüssigkeit in das Blut. Dadurch nimmt der osmotische Gradient der Dialyseflüssigkeit im Bauchraum ab, wodurch sich die Filtrationsrate der Substanzen aus dem Blut ebenfalls stetig verringert (siehe Abbildung 2) [6].

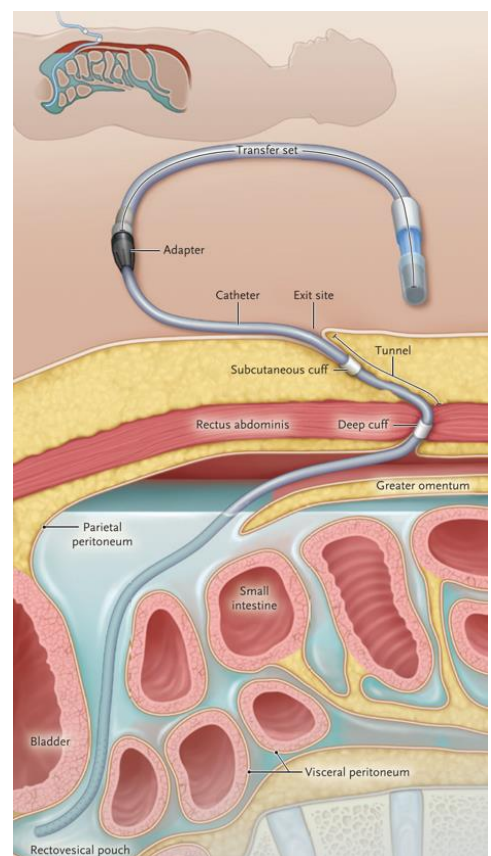


Abbildung 1- System der Peritonealdialyse [6]

Aus diesem Grund sieht die Technik der Peritonealdialyse einen mehrmaligen Wechsel der Flüssigkeit vor, in der Regel drei- bis fünfmal pro Tag je nach angewandter Form der Peritonealdialyse und Nierenfunktion des Patienten. Bei den meisten Erwachsenen wird pro Durchgang zwei Liter Dialyseflüssigkeit in den Bauchraum eingebracht, wobei hier Rücksicht auf die Körpergröße und das Körpergewicht der Patienten genommen wird. Kleinere Patienten benötigen weniger Dialyseflüssigkeit für eine adäquate Blutreinigung, vice versa benötigen größere Patienten ein größeres Volumen [6]. Generell wurde aufgezeigt, dass bis zu 1,25 Liter pro m² KO gut vertragen werden [7].

1.1.2. Das Peritoneum als Membran

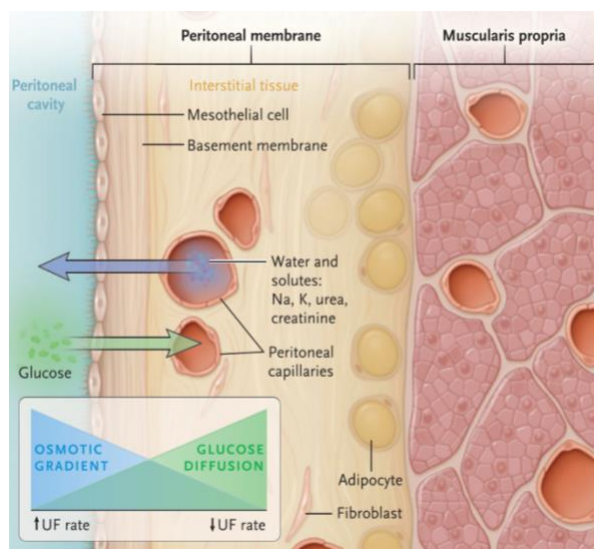


Abbildung 2 - Physiologischer Aufbau des Peritoneums [6]

Das menschliche Peritoneum setzt sich aus zwei sogenannten Blättern zusammen: dem Peritoneum viscerale (viszerales Blatt), welches die inneren Organe bedeckt und 60 bis 80% der peritonealen Fläche ausmacht, und dem Peritoneum parietale (parietales Blatt), welches die Bauchwand bekleidet (siehe Abbildung 1) [4], [6]. Die Fläche des Bauchfells eines Erwachsenen entspricht annähernd seiner Körperoberfläche (also 1 bis 2 m²), im Gegensatz dazu besitzt das Peritoneum bei Kindern eine größere relative Fläche [8].

Das viszerale Blatt wird über die Bauchdecke und der Zwischenrippen- und Oberbauchregion mit Blut versorgt, welches daraufhin in die Vena cava mündet. Im Gegensatz dazu erfolgt die Blutversorgung des parietalen Blattes über die Arteria mesenterica und wird über die Pfortader abgeleitet [4]. Histologisch gesehen zählt das Peritoneum zu den Tunica serosa und besteht aus einem einschichtigen Mesothel und einem submesothelialen Bindegewebe, welches Fibroblasten, Adipozyten, Nerven, Kollagenfasern, lymphatische Gefäße und Kapillaren beinhaltet (siehe Abbildung 2) [8], [9].

Die zwei Blätter werden durch eine geringe Menge klarer, leicht gelblicher Flüssigkeit (circa 50 bis 100 mL in Erwachsenen) voneinander getrennt. Diese Peritonealflüssigkeit dient sozusagen als Schmieröl für die inneren Organe, wodurch sich zum Beispiel die

Darmschlingen während der Peristaltik der Gastrointestinaltrakts reibungslos bewegen können. Sie setzt sich zusammen aus Wasser, gelösten Substanzen, Elektrolyten, Proteinen und Zellen, und gelangt über die Mesothelschicht in das Interstitium, wo sie in weiterer Folge über die Lymphgefäße abtransportiert wird [8].

Wie in Kapitel 1.1.1 erwähnt, dient das Endothel der Kapillaren im Bindegewebe des Bauchfells als Membran für den Stoffaustausch während der Peritonealdialyse. Die Diffusionsrate der zu entfernenden Stoffe ist stark abhängig von der Physiologie des peritonealen Kapillarnetzwerks des Patienten. Ist die Vaskularität nicht so stark ausgeprägt, kommt es zu einer niedrigeren Durchblutung des Bauchfells und harnpflichtige Stoffe sammeln sich langsamer im Dialysat an. Der osmotische Gradient nimmt jedoch ebenfalls langsamer ab, wodurch es länger zu Ultrafiltration von Wasser kommt. Umgekehrt kommt es bei Patienten mit einer hohen Durchblutung des Peritoneums zu einer sehr schnellen Ansammlung der Abfallprodukte und einer rapiden Abnahme des osmotischen Drucks, weshalb sich zu lange Verweilzeiten des Dialysats im Bauchraum sogar negativ auf die Ultrafiltration auswirken können [6].

1.1.3. Formen der Peritonealdialyse

Die Peritonealdialyse kann in zwei Hauptformen eingeteilt werden, die CAPD (Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis) und die APD (Automated Peritoneal Dialysis).

Bei der CAPD tauschen die Patienten die Dialyseflüssigkeit drei- bis viermal täglich manuell. Die Flüssigkeit verweilt über mehrere Stunden („Verweilzeit“, dwell) im Bauchraum, bis sich das Stoffgleichgewicht zwischen Dialysat und Blut eingestellt hat. Dadurch, dass die Patienten beim Tausch der Flüssigkeit nicht auf eine Maschine angewiesen sind, können sie sich frei bewegen und ihrem Alltag nachgehen [6].

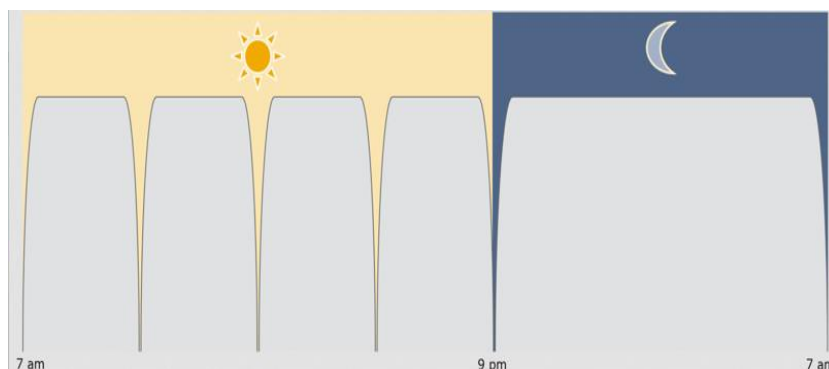


Abbildung 3 - Regimen einer CAPD [10]

Die zweite Form der Peritonealdialyse ist die APD. Hier wird der Tausch der Dialyseflüssigkeit durch eine Maschine durchgeführt, einem sogenannten „Cycler“. Die Patienten schließen ihren Peritonealkatheter an den Cycler an und über einen Zeitraum mehrerer Stunden wird die Flüssigkeit in das Peritoneum hinein und wieder hinaus gepumpt [6].

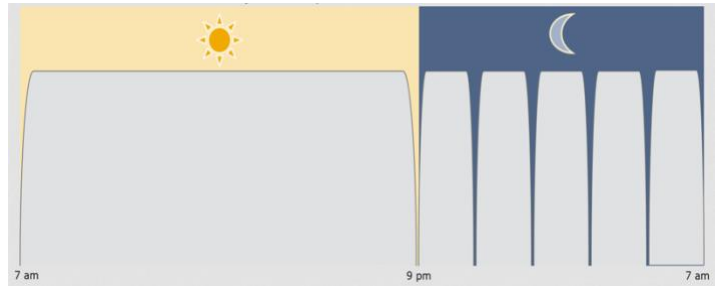


Abbildung 4 - Regimen einer APD [10]

Besteht ausreichend Restfunktion der Nieren, ist es möglich, die Blutreinigung mittels eines mehrstündigen Dialysevorgangs ausschließlich über Nacht durchzuführen zu lassen. Die Patienten tragen untertags keine Dialyseflüssigkeit im Bauchraum und müssen sich somit nicht nach der Dialyse richten. Diese Form der APD nennt sich NIPD (Nocturnal Intermittent Peritoneal Dialysis) und ermöglicht den Patienten ebenfalls eine erhöhte Lebensqualität [6].

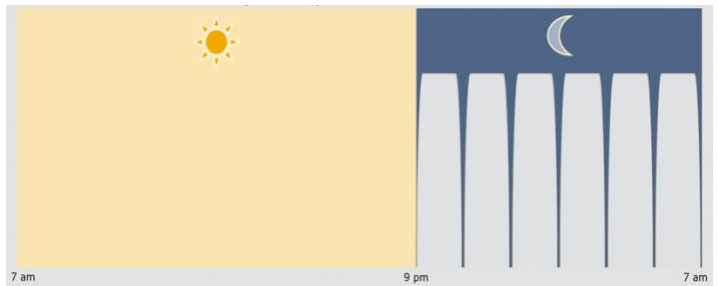


Abbildung 5 - Regimen einer NIPD [10]

Ist jedoch die Niereninsuffizienz schon weit fortgeschritten, benötigen die Patienten oftmals einen Wechsel der Dialyseflüssigkeit sowohl untertags als auch in der Nacht. Diese Patienten müssen auf die Form der CCPD (Continuous Cycling Peritoneal Dialysis) zurückgreifen [6].

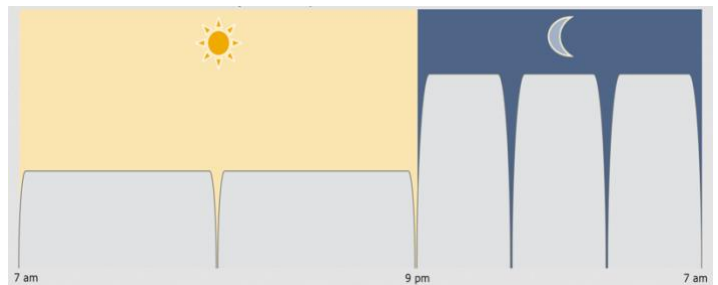


Abbildung 6 - Regimen einer CCPD [10]

1.1.4. Vorteile und Nachteile

Weltweit erhalten schätzungsweise 11% aller dialysepflichtigen Patienten die Therapie der Peritonealdialyse. Die jährliche Wachstumsrate der PD-Prävalenz liegt bei 8%, verglichen dazu liegt die Rate für Hämodialyse nur bei 6-7%. Länder wie Hongkong, Thailand, China, Australien und Neuseeland treiben mit entsprechenden nationalen Regulationen die Entwicklung des Gesundheitssystems in Richtung Peritonealdialyse bzw. Heimdialyse voran,

wodurch es in diesen Regionen zu einer deutlichen Steigerung der PD-Patientenzahl kommt [11].

Gründe hierfür sind vorrangig die Kosteneffektivität der PD im Vergleich zur Hämodialyse, doch deuten einige Studien auch darauf hin, dass die Lebensqualität von Dialysepatienten durch Anwendung von Peritonealdialyse gesteigert werden kann. Aufgrund der Durchführung im eigenen Wohnbereich entfällt der mehrstündige, ambulante Aufenthalt der Patienten mehrmals pro Woche. Die Patienten können zeitgleich mit der Durchführung der Dialyse ihrer Arbeit oder ihren Freizeitaktivitäten nachgehen. Außerdem ist der Therapieort nicht auf den Wohnbereich beschränkt; jeder Ort, an dem ein steriler Wechsel der Flüssigkeit durchgeführt werden kann, eignet sich für die Peritonealdialyse. Die tägliche Dialyse imitiert zudem die physiologische Nierenfunktion wesentlich besser als eine Hämodialyse, bei welcher das Blut nur drei- bis viermal pro Woche gereinigt wird. Auch berichten PD-Patienten kaum von einer Kreislaufbelastung, welche typischerweise mit der Hämodialyse einher geht [12].

Jedoch ist die Peritonealdialyse nicht ohne Nachteile. Die tägliche Durchführung der Dialyse bedarf ein Verantwortungsbewusstsein von Seiten der Patienten, außerdem müssen die durchführenden Personen (Patient oder Pflegekraft) eine Einschulung im Wechsel der Flüssigkeit erhalten, da eine sterile Durchführung äußerst wichtig ist, um Infektionen vorzubeugen. Einige Patienten berichten über Schmerzen an der Inzisionsstelle des Katheters beim Wechsel des Dialysats oder über Rückenschmerzen, welche oft durch den erhöhten intraabdominellen Druck zustande kommen. Auch metabolische Störungen wie Hypokaliämie oder metabolisches Syndrom zählen zu den Nebenwirkungen der PD [6].

1.1.5. Peritonitis

Neben den nicht-infektiösen Nebenwirkungen der PD (siehe Kapitel 1.1.4), stehen die infektiösen Komplikationen im klinischen Alltag meist im Vordergrund. Zu diesen zählt die Entzündung des Bauchfells, auch genannt Peritonealdialyse-assoziierte Peritonitis (PDAP). Patienten, die unter einer Peritonitis leiden, zeigen meist Schmerzen im Bauchraum und eine Trübung des abgelassenen Dialysats.

Eine PDAP bakteriellen Ursprungs gehört zu den häufigsten Komplikationen im Rahmen einer PD-Behandlung. Im Speziellen die *Pseudomonas aeruginosa*-assoziierte Peritonitis führt meist zu schweren Krankheitsverläufen und ist mit einer höheren Hospitalisierungsrate verbunden [13]. Sobald abgeklärt ist, welche Art von Bakterium die Infektion hervorruft, kann

die antibakterielle Therapie eingeleitet werden. Hierbei ist es wichtig, sowohl das gram-positive, als auch das gram-negative Bakterienspektrum abzudecken und ebenfalls die *Pseudomonas*-Spezies, die zu komplizierten Infektionen führen können. Die aktuelle Empfehlung der International Society for Peritoneal Dialysis (ISPD) sieht eine Behandlung mit Vancomycin oder Cephalosporinen erster Generation gegen gram-positive Keime und eine Gabe von Cephalosporinen dritter Generation oder Aminoglykosiden zur Abdeckung des gram-negativen Spektrums vor. Um die Antibiotika-Konzentration direkt an der Infektionsstelle zu maximieren, wird des Weiteren empfohlen, die Therapie intraperitoneal zu applizieren, es sei denn, der Patient zeigt Zeichen einer Sepsis. Auch wenn die intraperitoneale Applikation nicht zeitgerecht durchgeführt werden kann, wird eine systemische Gabe vorgezogen, um so schnell wie möglich einen relevanten systemischen Spiegel zu erreichen [14].

Die seltener vorkommende, fungale Peritonitis ist jedoch eine weitaus gefürchteterer dialyseverbundene Infektion, da sie unausweichlich mit einer Entfernung des Katheters einher geht. Darum empfiehlt die ISPD ebenfalls, bei Auftreten einer bakteriellen Peritonitis zusätzlich eine antifungale Prophylaxe zu verabreichen, um diese Sekundärinfektion zu vermeiden [14].

Generell gilt es eine Peritonitis eher vorzubeugen als behandeln zu müssen. Zwar liegt die Mortalitätsrate der Bauchfellentzündung unter 5%, doch bei 16% der Inzidenzen ist sie die Hauptursache des Ablebens. In den meisten Fällen führt das Auftreten einer Peritonitis zum Versagen der PD-Technik, die Patienten müssen oft langfristig auf eine Behandlung mittels Hämodialyse umsteigen [14]. Dies ist größtenteils auf eine strukturelle Veränderung des Peritoneums zurückzuführen, welche meist nach einer schwerwiegenden Peritonitis auftreten. Doch solche Veränderungen können ebenfalls eine physiologische Antwort auf jahrelange PD-Therapie sein. Sowohl eine Entzündung als auch eine langanhaltende Exposition der peritonealen Membran mit der hypertonen Dialyseflüssigkeit kann in vaskulärer Proliferation, Gefäßerkrankungen und Peritonealfibrose resultieren. Durch die erhöhte Oberfläche der Gefäße kommt es zu einer schnelleren Diffusion der harnpflichtigen Stoffe aus dem Blut und zu einer raschen Abnahme des osmotischen Drucks der Flüssigkeit, was in weiterer Folge zum Verlust der Ultrafiltrationskapazität des Peritoneums führt [14], [15].

Liegt eine starke Fibrose im Peritoneum vor, spricht man von einer enkapsulierenden peritonealen Sklerose (EPS). Das Krankheitsbild ist von ausgeprägten Fibrosen des Peritoneums kombiniert mit einer Obstruktion des Darms gekennzeichnet. Diese schwerwiegende Komplikation betrifft nur einen Bruchteil der PD-Patienten (0,9 bis 3,5%), doch die Sterberate der Betroffenen liegt bei beinahe 50%. Das Risiko dieser Komplikation stellt für

einige Dialysepatienten den ausschlaggebenden Grund dar, sich gegen eine Peritonealdialyse zu entscheiden [15].

Aus den Nachteilen und Nebenwirkungen der Peritonealdialyse ergeben sich auch die wenigen, jedoch wesentlichen Kontraindikationen für diese Behandlung. Fibrotische Veränderungen des Peritoneums limitieren die Austauschkapazität löslicher Stoffe im Bauchraum drastisch, was meist zum Versagen der Technik führt. Auch eine unzureichend hygienische Umgebung für den Wechsel der Flüssigkeit beziehungsweise ein fehlendes kognitives oder physisches Vermögen für die Durchführung der Peritonealdialyse stellen absolute Kontraindikationen dar [6].

1.1.6. Aztreonam

Aztreonam gehört zu der Gruppe der Monobactame, einer monozyklischen Untergruppe der β -Lactam-Antibiotika. Monobactame können von einigen natürlichen Bodenorganismen gebildet werden, wie zum Beispiel den *Chromobacterium*-, *Agrobacterium*-, *Gluconobacterium* und *Pseudomonas*-Spezies [16]. Zwar zeigen diese natürlich vorkommende Substanzen nur geringe antimikrobielle Aktivität, doch kann durch semisynthetische Modifikation sowohl das Spektrum erweitert als auch die Stabilität erhöht werden, sodass die Monobactame ähnliche biologische Eigenschaften aufweisen wie bityklische β -Lactam Antibiotika [17].

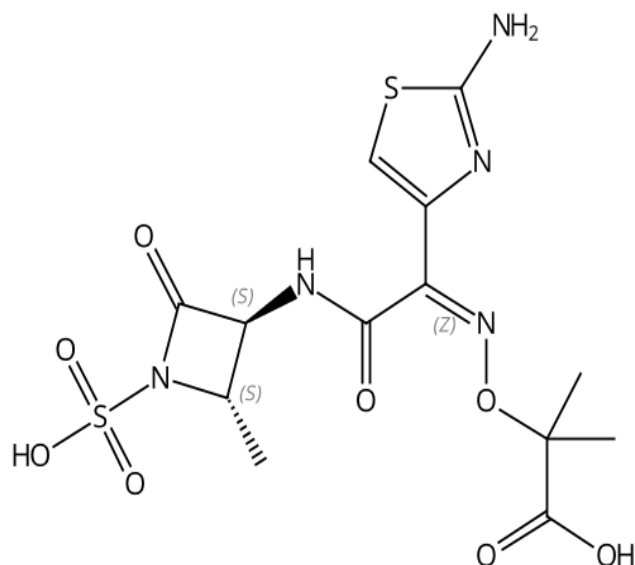


Abbildung 7 - Struktur des Monobactams Aztreonam [18]

In der Struktur von Aztreonam sind die verschiedenen funktionellen Gruppen für die Aktivitäten gegen diverse Erreger verantwortlich. Der eingliedrige, basische Ring enthält eine Sulfonsäuregruppe an der Position N-1, wodurch der β -Lactam-Ring aktiviert wird. Die Aminothiazolyloxim-Seitenkette ist für die Aktivität gegenüber gram-negativen Bacilli verantwortlich. Durch die Carboxyl-Seitenkette zeigt das Antibiotikum eine verstärkte Aktivität gegen *Pseudomonas aeruginosa* auf, jedoch kommt es durch eben diese Seitenkette auch zu

einer verminderten Aktivität gegenüber gram-positiven Organismen. Die Methyl-Gruppe an Position 4 verleiht der Substanz ihre β -Lactamase-Stabilität [19].

Wie auch bei Penicillinen und Cephalosporinen entsteht die bakterizide Wirkung von Aztreonam durch den Eingriff in die Zellwandsynthese. Präziser gesagt bindet Aztreonam vorrangig mit seinem β -Lactam-Ring an das Penicillin-bindende Protein 3 (PBP 3) von gram-negativen Bakterien, wodurch es zu Entstehung von Filamenten und elongierter Bakterienzellwände kommt. Durch diese Veränderung sind die Mikroorganismen nicht mehr lebensfähig, schlussendlich kommt es durch die Lyse der Zellwand zum Untergang der Einzeller. Gegenüber PBPs gram-positiver Bakterien weist Aztreonam nur eine geringe Affinität auf; das schmale Wirkspektrum begrenzt sich somit fast ausschließlich auf aerobe, gram-negative Erreger [17], [19], [20].

Wie andere Beta-Lactame gehört auch Aztreonam zu den zeitabhängigen Antibiotika. Das bedeutet, dass die bakterizide Wirkung gegeben ist, solange sich die freie Konzentration des Wirkstoffes im Blut über der minimalen Hemmkonzentration (MHK oder auch MIC, Minimal Inhibitory Concentration) des Erregers befindet. Im Gegensatz zu konzentrationsabhängigen Antibiotika führt eine Zunahme der Konzentration bei zeitabhängigen Wirkstoffen nicht zu einer erhöhten Wirksamkeit [21].

Die MIC beschreibt die minimale Konzentration eines Antibiotikums oder einer mikrobiellen Substanz, bei der das Keimwachstum noch unterdrückt wird. Sie ist sowohl wirkstoff- als auch erregerspezifisch und wird oftmals als MIC₅₀ (Konzentration die nötig ist, um das Wachstum 50% der Stämme zu verhindern) oder MIC₉₀ (Konzentration die nötig ist, um 90% der Stämme im Wachstum zu hindern) angegeben. Je nach Erreger kann die MIC stark variieren. So zeigen bei Aztreonam Stämme wie *Escherichia coli* oder *Klebsiella pneumoniae* eine MIC₉₀ von 0,25 mg/L, wohingegen *Pseudomonas aeruginosa* erst bei einer Konzentration von 8 mg/L (MIC₉₀) gehemmt wird und der Hospitalismuskkeim *Staphylococcus aureus* gar eine MIC₉₀ von 132 mg/L aufweist [19].

Zurzeit ist Aztreonam das einzige, sich auf dem Markt befindliche Monobactam und wird bei unterschiedlichen Infektionen wie Bakteriämien, Harnwegsinfektionen, abdominale und respiratorische Infektionen eingesetzt [22]. Aufgrund der Limitierung auf gram-negative Bakterien wird Aztreonam jedoch meist in Kombination mit weiteren Antibiotika verabreicht, um das Wirkspektrum zu erweitern. Klinische Vorteile erzielt es durch eine ausgeprägte β -Lactamase-Stabilität und eine hohe Verträglichkeit bei Penicillin-Allergie, was es zu einer

guten Alternative für Cephalosporine und Penicilline macht. Weiters kann Aztreonam auch anstatt von Aminoglykosiden eingesetzt werden, da es weder zur unerwünschten Ototoxizität noch Nephrotoxizität führt [19].

Zwar sind meist gram-positive Bakterien, wie Staphylokokken und Streptokokken, die Erreger einer Peritonealdialyse-assoziierten Peritonitis, jedoch weisen gram-negative Peritonitiden in der Regel schlechtere Behandlungsergebnisse auf [23]. Zur Zeit der Zulassung von Aztreonam zeigte sich das Monobactam gegen alle damals geläufigen β -Lactamasen stabil. Jedoch nahm diese Lactamasestabilität ab aufgrund des vermehrten Aufkommens von β -Lactamasen mit erweitertem Spektrum (Extended-Spectrum- β -Lactamase, ESBL), welche in Stämmen wie *Escherichia* und *Klebsiella ssp.* vorkommen. Allerdings ist das Monobactam-Gerüst kein gutes Hydrolyse-Substrat für Metallo- β -Lactamasen (MBL), was Aztreonam mit Serin- β -Lactamase-Inhibitoren, wie zum Beispiel Avibactam, zu einer effektiven Kombinationstherapie gegen multi- β -Lactamase bildende Organismen macht [20], [21].

Die Bioverfügbarkeit von Aztreonam nach oraler Gabe liegt bei <1%, was eine parenterale Gabe notwendig macht. In der Regel wird das Antibiotikum intravenös (iv), intramuskulär (im), inhalativ oder intraperitoneal (ip) verabreicht. Bei einer iv Gabe von 2 g innerhalb von 3 Minuten zeigten gesunde Patienten eine durchschnittliche maximale Plasmakonzentration ($C_{\max}$) von 242 mg/L. Die durchschnittliche Zeit zum Erreichen eben dieser maximalen Plasmakonzentration ($t_{\max}$) lag bei 0,08 h, also rund 5 Minuten. Mit einer intravenösen Verabreichung von Aztreonam erlangten die Patienten zwar die höchste $C_{\max}$, jedoch zeigte die intravenöse Gabe verglichen mit der intramuskulären Gabe nach 1 h vergleichbare Plasmakonzentrationen in den Patienten. Das lässt darauf schließen, dass auch die intramuskuläre Applikation eine beinahe vollständige systemische Aufnahme des Wirkstoffes möglich macht. Aztreonam zeigt in nierengesunden Patienten eine Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von 2 h und liegt zu 56% an Plasmaproteine gebunden vor [22].

2. Fragestellung

2.1. Problemstellung

Die Peritonealdialyse trägt bei vielen Patienten maßgeblich zur Erhöhung der Lebensqualität bei, doch die Komplikation der Peritonitis führt oftmals zum Versagen des Verfahrens oder ist gar der Grund, weshalb sich Patienten im Vorfeld gegen diese Methode der Blutreinigung entscheiden.

Der Großteil der PD-assoziierten Peritonitiden sind bakteriellen Ursprungs, doch der Einsatz von Antibiotika wird durch die stetige Resistenzentwicklung der Erreger immer weiter limitiert, wodurch eine adäquate Behandlung komplizierter Entzündungen oftmals eine Herausforderung darstellt [23]. Aufgrund dessen ist die medizinische Forschung veranlasst, sowohl neue antimikrobielle Wirkstoffe zu entwickeln als auch das Wissen über die Wirksamkeit und Pharmakokinetik bereits bestehender Arzneimittel zu vertiefen.

Das Antibiotikum Aztreonam befindet sich bereits seit knapp 40 Jahren in Verwendung, demnach ist die Datenlage über die Anwendung umfangreich [22]. Die Pharmakokinetik des Wirkstoffes nach intravenöser und intramuskulärer Gabe ist weitestgehend erforscht, doch die ISPD empfiehlt speziell bei milderer Formen der Peritonitis die Antibiotika-Applikation über das Peritoneum, um eine möglichst hohe Wirkstoff-Konzentration an der Infektionsstelle zu erzielen [14]. Der Wissenstand über die Pharmakokinetik von Aztreonam nach peritonealer Verabreichung zeigt jedoch Lücken auf, insbesondere bei nierenkranken Patienten unter Peritonealdialyse.

2.2. Klinische Studie des UK St. Pölten

Das Universitätsklinikum St. Pölten beschäftigt sich mit der Erkenntnisgewinnung über die Pharmakokinetik von Aztreonam nach intraperitonealer Gabe. Hierfür wurde in der Abteilung für Innere Medizin I am UK St. Pölten eine monozentrische Studie mit sechs PD-Patienten ohne Peritonitis durchgeführt.

Im Rahmen dieser Studie wurde die Division für Pharmakognosie der Universität Wien beauftragt, die Vermessung der Dialysat- und Serumproben der Patienten durchzuführen.

Das Ziel der vorliegenden Masterarbeit war demnach die Analyse der Patientenproben mittels HPLC-MS/MS. Es sollte bestimmt werden, in welchem Ausmaß und in welcher Zeit die zugesetzte Aztreonam-Dosis in den systemischen Kreislauf gelangt und ob über den peritonealen Weg ein signifikanter Serumspiegel des Antibiotikums für die Prophylaxe und Behandlung von gram-negativen Peritonitiden erreicht werden kann.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Geräte und Materialien

3.1.1.1. HPLC-MS

Für die Vermessung der Proben wurde ein HPLC-System von der Firma SCIEX angewendet. Eine Auflistung der Bestandteile des Systems findet sich in Tabelle 1.

Als mobile Phase wurden sowohl ddH₂O als auch Acetonitril in Form einer Gradientenelution angewendet. Eine genaue Beschreibung befindet sich in Kapitel 3.3.4.

Tabelle 1 - Bestandteile des Analysen-Systems

Name	Bezeichnung	Hersteller
<i>HPLC</i>	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 mm PS C18 100 A LC Column 100 x 2.1 mm	Kinetex
<i>MS</i>	QTRAP® 4500	AB Sciex Instruments
<i>Software</i>	Analyst Instrument Control and Data Processing Software Version 1.7.2.	AB Sciex Instruments

3.1.1.2. Diverse Geräte und Materialien

Tabelle 2 - Verwendete Geräte und Materialien

Name	Bezeichnung	Hersteller
<i>Ultraschallbad</i>	SONOREX RK 510 H Ultraschallbad	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG
<i>Zentrifuge</i>	Heraeus Pico 21 Centrifuge	Thermo Electron Corporation

<i>Laborkühlschrank</i>	Lagerkühlschrank Mediline KU1710	Liebherr GmbH
<i>Kühltruhe (-20°C)</i>	Gefriertruhe GT 2102	Liebherr GmbH
<i>Kühltruhe (-70°C)</i>	TSX Series	Thermo Scientific TM
<i>Vortexer</i>	REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG
<i>Analysenwaage</i>	Mettler AE 240 Elektronische Feinwaage	Mettler Toledo GesmbH
<i>Kolbenhubpipetten</i>	Eppendorf® Research® plus Pipette 1000 µL, 200 µL, 20 µL	Eppendorf SE
<i>Pipettenspitzen</i>	Pipettenspitze 1000 µL, blau	Sarstedt AG & Co. KG
	Pipettenspitze 200 µL, gelb	Sarstedt AG & Co. KG
<i>HPLC Vials</i>	Vials N9, mit 0,2 mL integ. Insert	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
	Vials N9, 1,5 mL	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
<i>Vial-Deckel</i>	N 9 PP, rot/gelb/grün/blau, Loch, Silikon-Septum	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
<i>Eppendorf Reagensvials</i>	Reagiergefäß 1,5 mL	Sarstedt AG & Co. KG
<i>Pasteurpipetten</i>	Volac Disposable Glass Pasteur Pipettes 230 mm	Poulten & Graf Ltd
<i>Vollpipetten</i>	Silberbrand Eterna, Klasse B Ex 20°C DIN, 1 mL, 2 mL	Brand GmbH + Co. KG

3.2. Substanzen

3.2.1.1. Reinsubstanz Aztreonam

Für die Quantifizierung mittels einer Eichgerade wurde in dieser Arbeit ein externer Standard verwendet. Hierfür wurde die Reinsubstanz Aztreonam von der Firma Sigma-Aldrich Handels GmbH (Produktnummer PHR 1785) bezogen. Dieses feste, weiße Pulver wurde bei -20°C gelagert und für die Herstellung der Standardlösungen herangezogen.

3.2.1.2. Physioneal®

Im Rahmen der klinischen Studie des UK St. Pölten wurden den Patienten als beimpfte Dialyseflüssigkeit entweder *Physioneal® 40 Glucose 1,36 % w/v / 13,6 mg/mL* oder *Physioneal® 40 Glucose 2,27 % w/v / 22,7 mg/mL* verabreicht.

Physioneal® ist ein Zweikammerbeutel-System und hat nach dem Mischen von Kammer A und B einen pH-Wert von 7,4. Die Osmolarität und die Zusammensetzung der beiden Dialyseflüssigkeiten sind in Tabelle 3 ersichtlich [24].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch nicht die reine Dialyseflüssigkeit vermessen, sondern das Dialysat, welches vor der Durchführung der APD mit Aztreonam beimpft, den Patienten intraperitoneal appliziert und zu definierten Zeitpunkten wieder entnommen wurde.

Tabelle 3 - Zusammensetzung der Dialyseflüssigkeit Physioneal® [24]

Physioneal®	1,36%	2,27%
Osmolarität (mOsmol/L)	344	395
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	
Natriumchlorid	8,43 g	
Natriumhydrogencarbonat	3,29 g	
Natrium-(S)-Laktat-Lösung	2,63 g	

3.2.1.3. Reflotron® Precinorm U

Um ein geeignetes Fällungsreagens für die Denaturierung des Serums und die Wiederfindungsrate von Aztreonam zu eruieren, wurden im Vorfeld Experimente mit künstlichem Serum durchgeführt. Diese Vortests sind in den Kapiteln 4.1.2 und 4.1.3 beschrieben.

Als künstliches Serum wurde im Rahmen dieser Arbeit das Lyophilisat Reflotron® Precinorm U der Firma Roche Diagnostics GmbH verwendet. Das Produkt imitiert Humanserum mit Enzymzusätzen humanen und tierischen Ursprungs. Der Tabelle 4 ist eine Auflistung der Bestandteile und deren Herkunft zu entnehmen. Die Konzentrationen der einzelnen Bestandteile sind chargenspezifisch [25].

Sowohl vor als auch nach der Rekonstruktion wurde das Lyophilisat im Laborkühlschrank bei 4 °C gelagert.

Tabelle 4 – Zusammensetzung des künstlichen Serums Reflotron® Precinorm U [25]

ALT (GPT)	Herz (Schwein)
AST (GOT)	Herz (Schwein)
Alkalische Phosphatase	E. coli, rec.
Amylase, gesamt	Speichel (human)/Pankreas (Schwein)
Amylase, Pankreas	Pankreas (Schwein)
Cholesterin	Rinderserum
Creatinkinase	Muskel (Kaninchen)
γ -GT	Niere (Schwein)
Triglyceride	Hühnerei

3.2.1.4. Diverse Substanzen und Reagentien

Tabelle 5 - Verwendete Substanzen und Reagentien

Name	Bezeichnung	Hersteller
<i>ddH₂O</i>	Bidestilliertes Wasser	Division für Pharmakognosie, Universität Wien
<i>dH₂O</i>	Destilliertes Wasser	Division für Pharmakognosie, Universität Wien
<i>Ameisensäure</i>	Ameisensäure ROTIPURAN® >98%, p.a., ACS	Carl Roth GmbH + Co. KG
<i>MeCN</i>	Acetonitril >99,9% HiPerSolv CHROMANORM®	VWR Chemicals
<i>MeOH</i>	Methanol >99,9% HiPerSolv CHROMANORM®	VWR Chemicals
<i>Isopropanol</i>	2-Propanol > 99,7% AnalaR NORMAPUR® ACS	VWR Chemicals

3.3. Methoden

3.3.1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ist eine chromatographische Methode zur Trennung, Identifizierung und Quantifizierung einzelner Komponenten (auch genannt Analyten) in einem Stoffgemisch. Sie besteht aus einer stationären Phase (Säule) und einer mobilen Phase (Fließmittel) mit variierender Polarität. Aufgrund von feinen Unterschieden der physikochemischen Eigenschaften der Analyten zeigen diese eine höhere Affinität zu einer der beiden Phasen, wodurch es zu einer effektiven Auftrennung des Stoffgemisches kommt. Diese Unterschiede liegen zum Beispiel in der Polarität, einer vorhandenen Ladung oder auch der Größe der Substanzen [26], [27].

Das typische HPLC-System besteht aus mehreren Komponenten, wie einem *Fließmittelreservoir*, welches die Lagerung der unterschiedlichen Lösungsmittel ermöglicht und meist mit einem Filtersystem und einem Entgaser (Degasser) ausgestattet ist. Des Weiteren beinhaltet es eine bis mehrere *Pumpen*, die für den kontinuierlichen Fluss und die Zusammensetzung der mobilen Phase zuständig sind und einem *Injektor*, der ein definiertes Volumen des Analyten in die mobile Phase einbringt. Die meisten modernen Injektoren sind Autosampler, die ein im Vorfeld festgelegtes Volumen aus den Vials im Autosampler-Gestell entnehmen.

Die eigentliche Auftrennung des Substanzgemisches erfolgt an der *Säule*, hier kommt die mobile Phase in Kontakt mit der stationären und die Substanzen werden je nach ihren Eigenschaften unterschiedlich lang retiniert. Am Ende des Systems steht der *Detektor*, ein Gerät, welches die verschiedenen Stoffe des Gemisches registriert und in ein messbares Signal umwandelt. Im

Falle dieser Arbeit handelt es sich hierbei um ein Massenspektrometer, welches in Kapitel 3.3.2 näher beschrieben wird. Um sowohl alle Komponenten des Systems zu bedienen als auch die generierten Daten des Detektors zu verarbeiten, benötigt man außerdem einen *Computer* und eine entsprechende *Software* zur Auswertung [28].

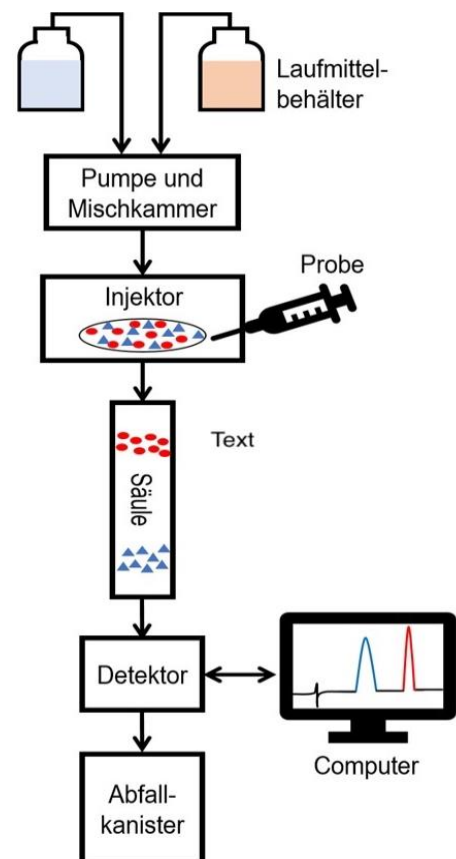


Abbildung 8 - Schematischer Aufbau eines HPLC-Systems [29]

3.3.1.1. Formen der HPLC

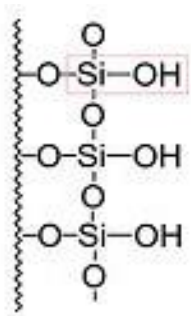


Abbildung 9 - Struktureller Aufbau des Silicagels [30]

Die Methode der HPLC teilt sich in verschiedene Formen, die durch den Aufbau und die Art der Interaktion der Analyten mit der stationären Phase definiert sind. Bei der Normalphasen-Chromatographie (NP-HPLC) besteht die stationäre Phase aus einer gepackten Silicagelsäule (Kieselgelsäule). Durch die hohe Dichte an Silanolgruppen können sich hier ausgeprägte polare Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, u.ä.) ausbilden. Die Analyten adsorbieren durch eben solche Wechselwirkungen an der Oberfläche der stationären Phase; je stärker die ausgebildete Bindung,

desto länger werden sie zurückgehalten und desto länger ist die Retentionszeit der Substanzen. Jedoch konkurrieren die Analyten mit der mobilen Phase um die Bindungsplätze an der stationären Phase, weshalb sich bei der NP-HPLC das Fließmittel aus größtenteils apolaren Lösungsmitteln zusammensetzt [28].

Im Gegensatz zu der NP-HPLC sind bei der Umkehrphasen-Chromatographie (Reversed-Phase Chromatography, RP-HPLC) hauptsächlich hydrophobe Wechselwirkungen wie Van-der-Waals-Kräfte oder Dispersionskräfte für die Interaktion der Analyten mit der stationären Phase verantwortlich. Hierbei handelt es sich um eine Säule gefüllt mit modifiziertem Silicagel. Durch kovalente Bindung von hydrophoben Alkylketten an die Silanolgruppen des Kieselgels verringert sich die Polarität der stationären Phase, wodurch apolare Stoffe länger retiniert werden. Je nach Länge der Alkylketten werden die Säulen als C₁₈-, C₈- oder C₃₀-Säulen bezeichnet. Aufgrund von sterischen Limitationen kann jedoch nicht jede Silanolgruppe mit einem hydrophoben Rest alkyliert werden. Damit die „freien“ Silanolgruppen keine polaren Wechselwirkungen mit den Analyten ausbilden können, werden diese mit kleinen funktionellen Gruppen, wie zum Beispiel Trimethylsilyl versehen. Dieser Vorgang nennt sich Endcapping [31].

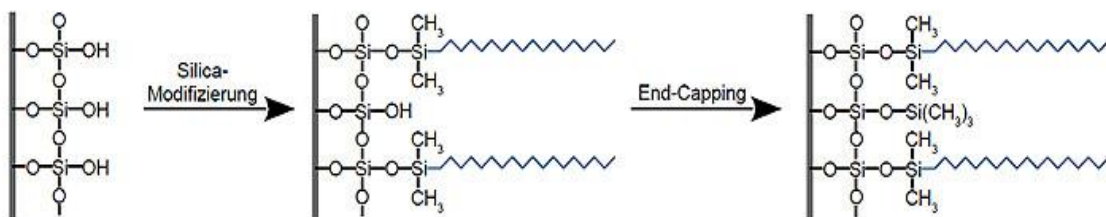


Abbildung 10 - Prozessschritte der chemischen Modifizierung von Silicagel [30]

Die mobile Phase der RP-HPLC besteht in der Regel aus polaren Lösungsmitteln unterschiedlicher Elutionskraft wie zum Beispiel Wasser mit einer niedrigen Elutionskraft oder Acetonitril, welches eine weitaus höhere Elutionskraft aufweist. Oftmals wird eine sogenannte Gradientenelution durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine variable Zusammensetzung des Fließmittels, welche mit einem hohen Wasseranteil startet und graduell an Acetonitril zunimmt. Dies führt dazu, dass hydrophobe Substanzen zunächst an der Reversed-Phase-Säule zurückgehalten und erst durch Zunahme der Elutionskraft des Fließmittels eluiert werden [27].

Die RP-HPLC ist die geläufigste Form der HPLC, beinahe 90% alle niedermolekularen Proben werden mit dieser Methode analysiert. Grund für diese Popularität ist die Möglichkeit, sogar zwischen sehr ähnlichen Stoffen differenzieren zu können. Dieser Vorteil lässt sich durch die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Analyten und den Phasen erklären. Die hydrophoben Wechselwirkungen zählen zu den schwächsten intermolekularen Kräften, wodurch die Hintergrundenergie im RP-HPLC-System im Vergleich zu anderen HPLC-Formen sehr niedrig ist. Dadurch können auch sehr geringe Abweichungen im Interaktionsmuster der verschiedenen Stoffe registriert werden, was eine effektive Differenzierung der Substanzen ermöglicht [28].

3.3.2. Massenspektrometrie

Das Massenspektrometer (MS) dient als Detektor im Analysensystem. Vereinfacht gesagt besteht es aus drei Komponenten: einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Ionendetektor. Für die Analyse mittels MS ist es notwendig, dass die Substanzen ionisiert vorliegen, aber auch, dass sie in die Gasphase übergetreten sind. Um die Analyten aus dem Lösungsmittel in eben diesen Zustand zu bringen, werden sogenannte Ionisierungsmethoden angewendet [32]. Mittels einer Ionenquelle werden entweder positiv oder negativ geladene Ionen generiert. Dies geschieht entweder durch harte oder weiche Ionisierung. Bei einer harten Ionisierungsmethode kommt es nicht nur zur Ionisierung der Substanzen, sondern auch zur Fragmentierung durch energiereiche Elektronen. Weiche Ionisierungsmethoden hingegen erzeugen die Ionen schonender durch thermische oder elektrische Kräfte oder energiearme Ionen. So wird die Bildung von Fragmenten weitgehend vermieden und es entstehen sogenannte Quasimolekülionen, die gemeinsam mit dem eigentlichen Molekülpeak die Zuordnung der Substanz ermöglichen. Diese Art von Ionen können zum Beispiel durch Protonierung oder Deprotonierung entstehen und werden entweder als $[M+H]^+$ im positiven Modus oder als $[M-H]^-$ im negativen Modus angegeben [33].

Ionisierte Moleküle besitzen die Eigenschaft aufgrund ihrer Ladung in einem elektrischen Feld beschleunigt werden zu können. In einem Massenspektrometer befindet sich zudem ebenfalls ein Magnetfeld, was die Auftrennung der Ionen nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) ermöglicht. Durch diese Ablenkung werden sie zu einem Detektor geleitet, welcher die Zahl der Ionen gemäß ihres (m/z)-Verhältnisses registriert und das Signal für eine intensivierte Detektion amplifizieren kann [32], [34].

3.3.2.1. Elektrosprayionisation

Eine der geläufigsten Ionisierungstechniken ist die weiche Ionisierung mittels Elektrosprayionisation (ESI). Die Analyten befinden sich bei dieser Methode noch in Lösung und werden durch eine Kapillare unter Hochspannung in ein elektrisches Feld eingebracht. Durch den engen Durchmesser der Kapillare entsteht ein feiner Sprühkegel, in dessen Tröpfchen die Moleküle elektrisch aufgeladen werden. Das Lösungsmittel wird durch Anlegen einer Wärmequelle abgedampft, was zu einer Einengung der Tröpfchen und einem Aneinanderrücken der ionisierten Moleküle führt. Je näher sich die Moleküle an der Oberfläche der Tröpfchen kommen, desto stärker werden die Abstoßungskräfte zwischen den Ladungen. Schlussendlich kommt es zu einer Aufspaltung der Tröpfchen, sogenannte Coulomb-Explosionen. Die Ionen werden so in die Gasphase übergeführt und wandern in Richtung Elektrode, welche gegenüber der Kapillare liegt [35], [36].

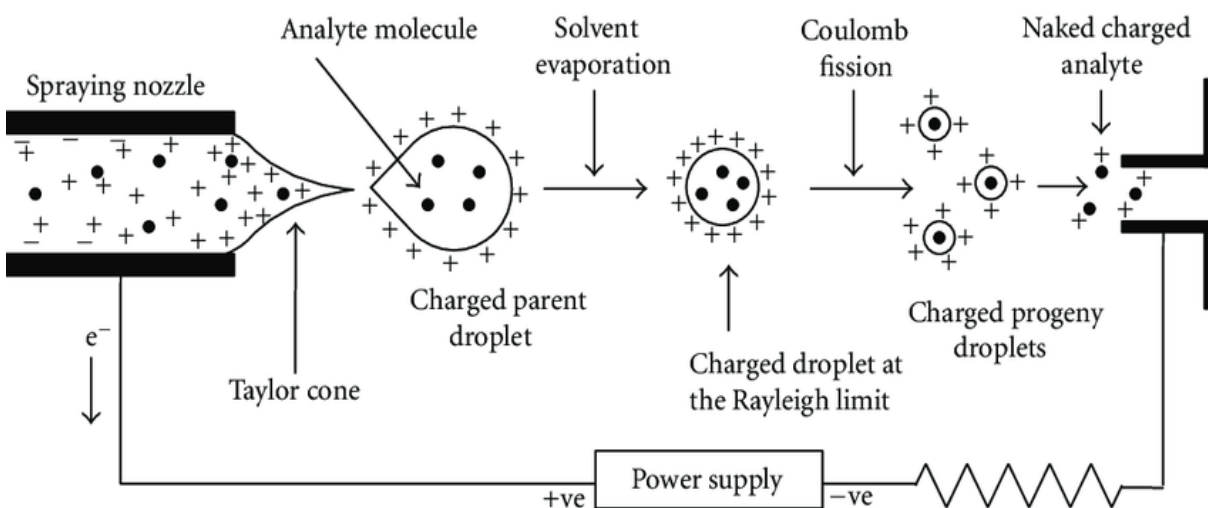


Abbildung 11 - Schematische Darstellung der Elektrosprayionisation [35]

Die ESI-Technik stellt eine ideale Ionisationsmethode für die Kopplung mit LC-MS dar, denn die Analyten können direkt aus der flüssigen mobilen Phase in das Massenspektrometer eingebracht werden [33]. In Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls mit ESI gearbeitet.

3.3.2.2. TripleQuad

Der Massenanalysator dient dem Auftrennen der Ionen gemäß ihres (m/z)-Verhältnisses. Es gibt verschiedene Methoden, die sich die Massenunterschiede der Ionen für die Auftrennung zu Nutze machen. Der Time-of-Flight (TOF) Massenanalysator nutzt zum Beispiel die Tatsache, dass sich Ionen aufgrund ihrer Masse unterschiedlich schnell durch das Magnetfeld bewegen. Bei der Ionenfalle (Ion Trap) werden Ionen einer bestimmten Masse in einem Quadrupol-Feld zurückgehalten. Durch Veränderung der Felder können jedoch auch bestimmte Ionen aus dieser Falle entlassen und detektiert werden [33]. In dieser Arbeit wurde ein Triple-Quadrupol als Massenanalysator verwendet.

Ein Quadrupol besteht aus vier gegenüberliegenden Magnetstäben, die als Elektroden fungieren. Die jeweils gegenüberliegenden Stabpaare sind miteinander verbunden und durch Anlegen einer Wechsel- und einer Gleichspannung entweder positiv oder negativ geladen. Auf diese Weise entsteht zwischen den Stäben ein Quadrupol-Feld. Gelangen nun ionisierte Moleküle in eben dieses Feld des Quadrupols, werden sie durch die Spannungsverhältnisse in spiralförmige Bahnen gedrängt. Je nach Frequenz und Amplitude der angelegten Spannung, passieren nur Ionen mit einem bestimmten (m/z)-Verhältnis den Analysator. Ionen mit abweichenden (m/z)-Werten schlagen instabile Flugbahnen ein, über die sie den Analysator jedoch nicht durchqueren können und zerschellen letztendlich an den Metallstäben [33], [37].

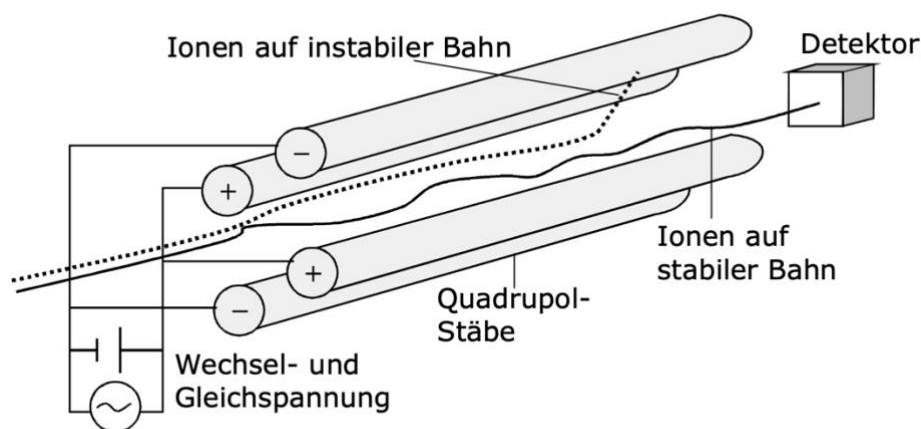


Abbildung 12 - Schematische Darstellung eines Quadrupols [33]

Bei einem Triple-Quadrupol (TripleQuad, QqQ) sind drei Quadrupol-Einheiten hintereinander geschaltet. Der Quadrupol 1 (Q1) dient als Massenanalysator; in der Regel ist er auf das (m/z)-Verhältnis des Precursor Ions eingestellt. Das Precursor Ion, zu deutsch auch Vorläufer-Ion genannt, stellt das gesuchte Quasimolekölion des Analyten dar [38].

Unter dem zweiten Quadrupol (Q2, q) versteht man eine Kollisionszelle. Hier kommt es zu Fragmentierung des Vorläufer-Ions, indem ein Inertgas (zum Beispiel N_2 oder Ar) gegen den Strom der Ionen in die Kammer eingelassen wird. Die Gas-Moleküle kollidieren mit den Vorläufer-Ionen und es kommt zur Bildung charakteristischer Fragmente, auch Product Ions bzw Produkt-Ionen genannt. Die Größe und Vielfalt der gebildeten Produkt-Ionen ist stark von der angewandten Kollisionsenergie (Collision Energy, CE) abhängig. Ist sie zu niedrig eingestellt, entstehen nur sehr große Fragmente oder es kommt zu überhaupt keiner Fragmentierung und es wird somit nur das Vorläufer-Ion weitergeleitet. Wenn die CE zu stark ist, entstehen viele Produkt-Ionen mit kleiner Masse. Beide Kollisionsvarianten können erwünscht sein; so kann es vorkommen, dass während einem Analysenlauf die Parameter laufend variieren, um die generierte Datenmenge zu maximieren [38].

So wie Q1 ist auch der dritte Quadrupol (Q3) ein Massenanalysator. Jedoch ist dieser Analysator darauf eingestellt, nur Ionen mit dem (m/z)-Verhältnis der Produkt-Ionen, welche im Q2 durch Fragmentierung entstanden sind, passieren zu lassen. So können nur Substanzen das Trennsystem durchqueren, welche sowohl das (m/z)-Verhältnis des Vorläufer-Ions als auch das korrekte Fragmentierungsmuster aufweisen [38]. Diese sehr selektive Art der Ionen-Auftrennung sowohl im Q1 als auch im Q3 nennt sich Multiple Reaction Monitoring (MRM) oder auch Selected Ion Monitoring (SIM). Die Kopplung zweier Massenspektrometer, welche als Massenanalysatoren dienen, bezeichnet man als mehrdimensionale Massenspektrometrie, MS/MS oder auch Tandem-Massenspektrometrie [33], [39].

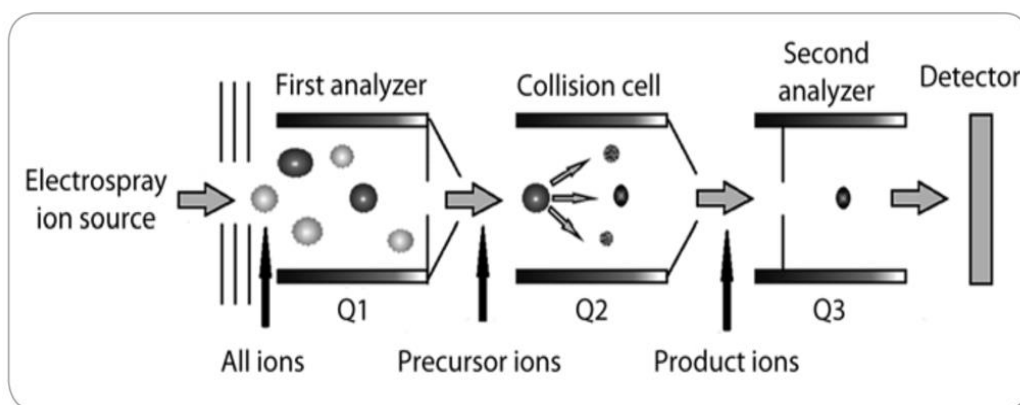


Abbildung 13 - Abbildung eines Triple Quadrupols [39]

3.3.3. Vorteile der HPLC-MS/MS

Die HPLC-MS/MS gilt als eine der wichtigsten Analysenmethoden sowohl in der biomedizinischen Forschung als auch in der klinischen Analytik. Zwar ist die Anschaffung des Systems kostenintensiv, jedoch geht die Technik mit zahlreichen Vorteilen einher. Durch den Einsatz von SIM in zwei hintereinandergeschalteten Quadrupolen erreicht man eine sehr hohe Spezifität und Selektivität, da nicht nur das Molekulargewicht der eigentlichen Substanz, sondern auch das charakteristische Fragmentierungsmuster zur Detektion herangezogen wird [40].

Durch die vorangegangene Kopplung mit HPLC als initiale Trennmethode wurde im Gegensatz zu GC-MS (Gaschromatographie-Massenspektrometrie) auch eine wesentlich breitere Anwendbarkeit erreicht, da die HPLC nicht auf die Analyse kleiner, gasförmiger Moleküle beschränkt ist. Die Probenaufarbeitung gestaltet sich bei der Flüssigchromatographie in der Regel wesentlich simpler und benötigt keine Derivatisierung, um die Flüchtigkeit der Moleküle zu verbessern. Außerdem dauern MS-detektierte HPLC-Analysen meist wesentlich kürzer als GC-MS-Analysen, wodurch es zu einem wesentlich höheren Probendurchsatz kommt [40].

Ebenfalls von Vorteil ist die Flexibilität der HPLC-MS/MS, denn innerhalb kurzer Zeit können neue Assays für unbekannte Proben entwickelt werden. Des Weiteren ist es möglich, durch nur einen Analysenvorgang eine große Informationsvielfalt zu erlangen, sowohl qualitativer als auch quantitativer Natur [40].

3.3.4. Parameter der angewandten Methode

Die in dieser Arbeit angewandte Methode zu Quantifizierung von Aztreonam wurde im Vorfeld von Christina Pinter, BSc optimiert und validiert [41].

Die HPLC-Säule befand sich in einem Säulenofen, welcher auf eine Temperatur von 30°C eingestellt war. Die mobile Phase im HPLC-System hatte eine Flussgeschwindigkeit von 0,5 mL/min und setzte sich aus einem Gemisch zweier Lösungsmittel zusammen. Lösungsmittel A bestand aus bidestilliertem Wasser (ddH₂O) mit einem Zusatz von 0,1% Ameisensäure (FA, formic acid) und Lösungsmittel B war Acetonitril (MeCN) + 0,1% FA. Die Lösungsmittel wurden in Form folgender Gradientenelution eingesetzt:

Tabelle 6 - Fließmittelzusammensetzung der Gradientenelution

Flussgeschwindigkeit	Konzentration A (%)	Konzentration B (%)	Zeit (min)
0,5 mL/min	91,0	9,0	0,00
	80,0	20,0	4,00
	2,0	98,0	4,10
	2,0	98,0	6,00
	91,0	9,0	6,10
	91,0	9,0	15,00

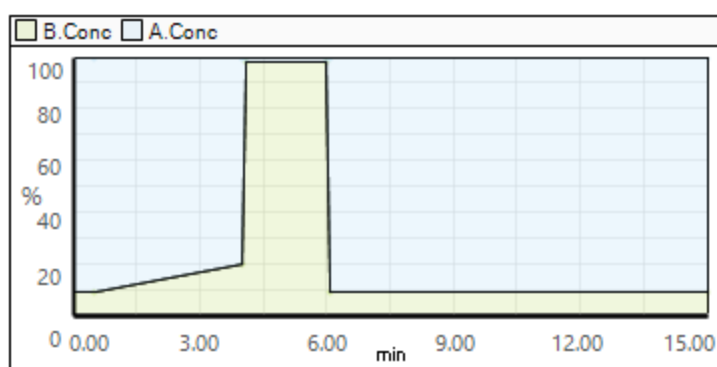


Abbildung 14 - Darstellung der Gradientenelution
Blau: ddH₂O + 0,1% FA; Grün: MeCN + 0,1% FA

Unter diesen Elutionsbedingungen zeigte die Reinsubstanz Aztreonam in wässriger Lösung eine Retentionszeit von ca. 2,7 Minuten.

Die MS/MS-Analyse fand im negativen Modus statt, da der azide Wasserstoff an der Sulfonsäuregruppe sehr gut deprotoniert werden kann und somit eine hohe Empfindlichkeit des Detektors gewährleistet ist. Das Quasimolekülion $[M-H]^-$ von Aztreonam lag bei $(m/z) = 434,0$ Da, dementsprechend wurde der Q1 auf dieses Molekulargewicht eingestellt. Für die MRM-Analyse im Q3 wurden zwei Produkt-Ionen ausgewählt, der Quantifier und der Qualifier. Das (m/z) -Verhältnis des Quantifiers lag bei $(m/z) = 79,9$ Da, das des Qualifiers bei $(m/z) = 95,9$ Da.

Das Massenspektrometer war auf die folgenden, optimierten Parameter eingestellt:

ESI neg., IS -4500.00, EP -10.00, CUR 10.00, GS1 30.00, GS2 30.00, TEM 500.00°C, CAD medium, CEM 2600.0, DP -80.00, CE -96.00 (Quantifier), CE -24.00 (Qualifier), CXP -11.00 (Quantifier), CXP -7.00 (Qualifier), dwell jeweils 150 ms

3.3.5. Erstellung der Eichgerade

Die Quantifizierung von Aztreonam wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Eichgeraden durchgeführt. Als externer Standard wurde die Reinsubstanz Aztreonam (siehe Kapitel 3.2.1.1) verwendet.

Für die Erstellung der Eichgeraden wurde zunächst eine Verdünnungsreihe einer Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL hergestellt. Um eine erleichterte Einwaage zu gewährleisten, wurden 0,005 g Aztreonam in einem tarierten Messkolben eingewogen und mit ddH₂O auf 50 mL aufgefüllt. Die genauen Einwaagen der verwendeten Eichgeraden sind den folgenden Kapiteln zu entnehmen. Durch Schütteln des Kolbens konnte die Substanz vollständig gelöst werden. Anschließend sind aus der Stammlösung sieben Verdünnungen jeweils im Faktor 1:10 erstellt worden.

Jede Verdünnung wurde gemäß der angeführten Methode in Kapitel 3.3.4 7-fach vermessen, wobei zwischen den Verdünnungen je drei Messungen mit Wasser durchgeführt wurden, um potenzielle Carry-Over-Effekte zu detektieren. Während der Vermessung der Patientenproben wurden ebenfalls routinemäßig Standardlösungen der Reinsubstanz Aztreonam (Quality Control-Samples, QC-Samples) vermessen, um die Richtigkeit der Analysen zu prüfen. Im Falle einer Konzentrationsabweichung der gemessenen Werte von der im Vorfeld bekannten Konzentration des Standards wurde eine neue Eichgerade erstellt.

3.3.5.1. Eichgerade A

Die Eichgerade A diente der Quantifizierung der initialen Messwerte von den Dialysatproben der Patienten 1, 2 und 3. Die Einwaagen der Stammlösung und auch der Verdünnungen sind in der Tabelle 7 ersichtlich.

Tabelle 7 - Konzentrationen der Eichgerade A

Stammlösung (SL)	108000 ng/mL
Verdünnung 1 (V1)	10800 ng/mL
Verdünnung 2 (V2)	1080 ng/mL
Verdünnung 3 (V3)	108 ng/mL
Verdünnung 4 (V4)	10,8 ng/mL
Verdünnung 5 (V5)	1,08 ng/mL
Verdünnung 6 (V6)	0,108 ng/mL
Verdünnung 7 (V7)	0,0108 ng/mL

Über die Analyst Instrument Control and Data Processing Software (Version 1.7.2.) wurde mit den Messdaten eine quadratische Eichgerade mit der Gleichung $y = -0.107x^2 + 4,45e+003 x + 1,06e+004$ und einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9999$ erstellt.

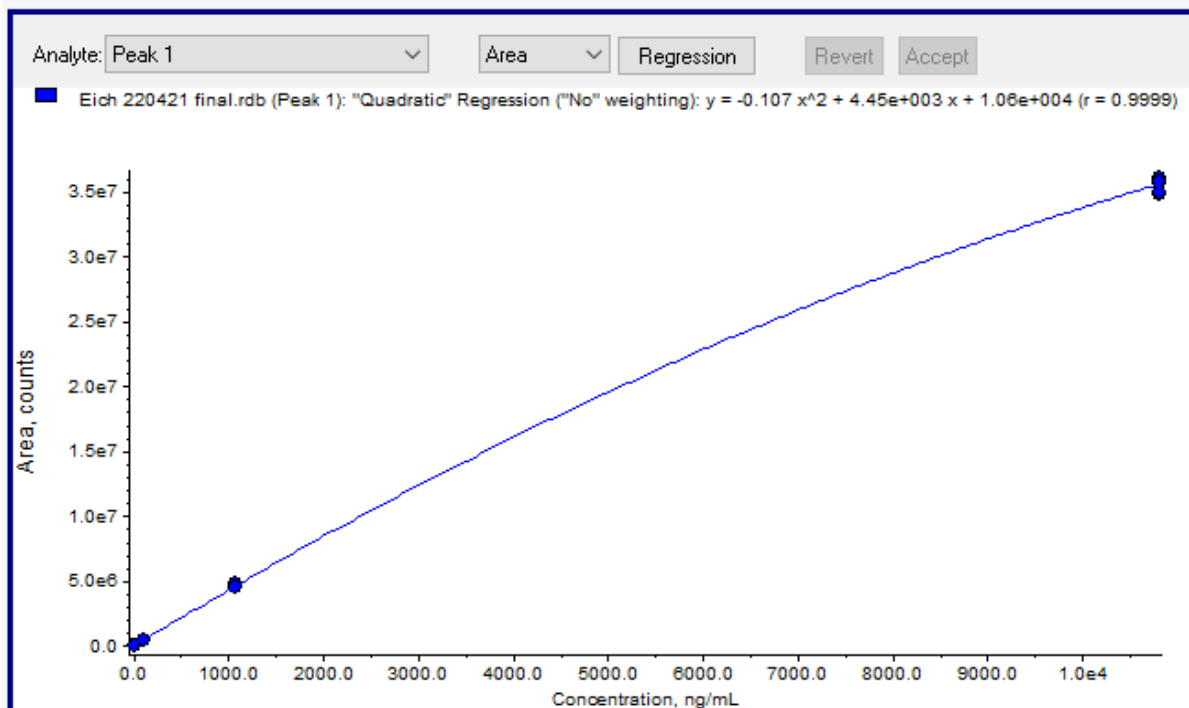


Abbildung 15 - Eichgerade A

3.3.5.2. Eichgerade B

Mit Hilfe der Eichgerade B wurden die Messdaten der Dialysatproben der Patienten 4, 5 und 6 quantifiziert. In Tabelle 8 sind die Konzentrationen der Stammlösung und der Verdünnungen angegeben.

Tabelle 8 - Konzentrationen der Eichgerade B

Stammlösung (SL)	102400 ng/mL
Verdünnung 1 (V1)	10240 ng/mL
Verdünnung 2 (V2)	1024 ng/mL
Verdünnung 3 (V3)	102,4 ng/mL
Verdünnung 4 (V4)	10,24 ng/mL
Verdünnung 5 (V5)	1,024 ng/mL
Verdünnung 6 (V6)	0,1024 ng/mL
Verdünnung 7 (V7)	0,01024 ng/mL

Erneut wurde mittels dieser Messdaten über die Analyst Software (Version 1.7.2.) eine quadratische Eichgerade berechnet. Die Gerade wies mit der Gleichung $y = -0,41x^2 + 1,13e+004 x + 2,44e+004$ ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 1,000$ auf.

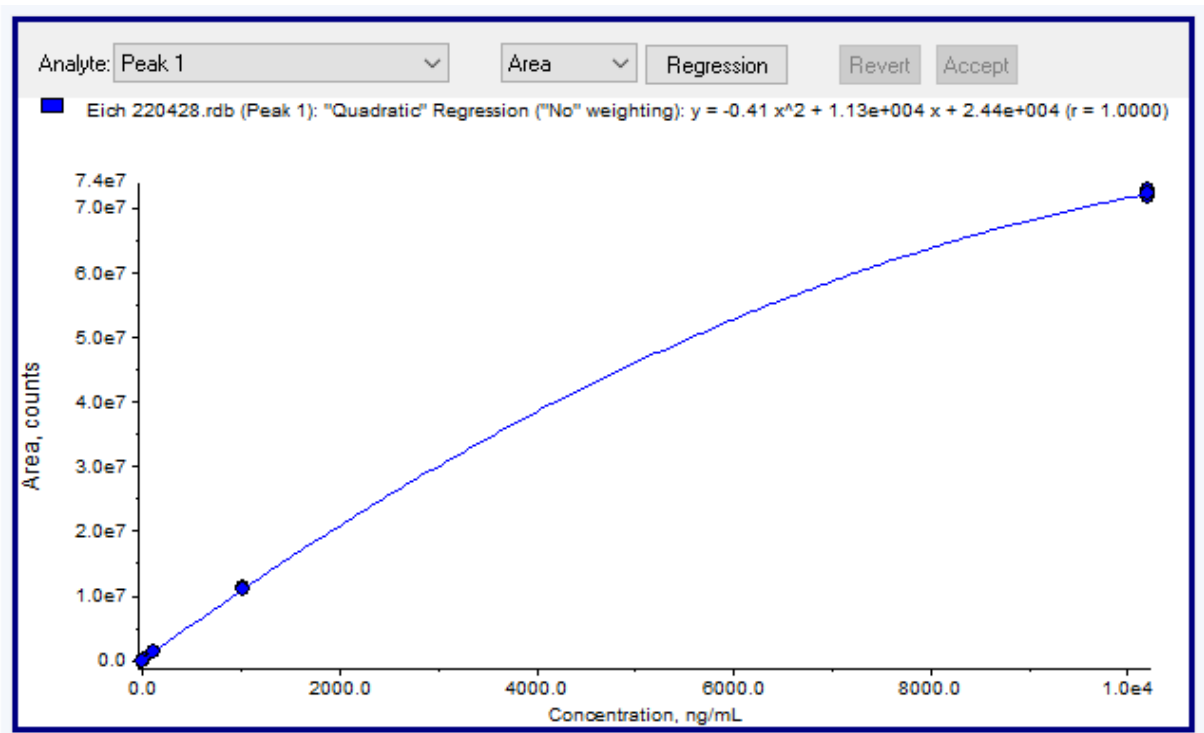


Abbildung 16 - Eichgerade B

3.3.5.3. Eichgerade C

Über die Eichgerade C wurden die Serumproben aller sechs Patienten und die Daten der zweiten Aufarbeitung der Dialysatproben von den Patienten 1, 2 und 3 quantifiziert. Die Einwaage der Stammlösung und die entsprechenden Konzentrationen der Verdünnungen sind in Tabelle 9 zu finden.

Tabelle 9 - Konzentrationen der Eichgerade C

Stammlösung (SL)	105000 ng/mL
Verdünnung 1 (V1)	10500 ng/mL
Verdünnung 2 (V2)	1050 ng/mL
Verdünnung 3 (V3)	105 ng/mL
Verdünnung 4 (V4)	10,5 ng/mL
Verdünnung 5 (V5)	1,05 ng/mL
Verdünnung 6 (V6)	0,105 ng/mL
Verdünnung 7 (V7)	0,0105 ng/mL

Analog zu den Eichgerade A und B wurde auch hier die Analyst Software (Version 1.7.2.) herangezogen, um aus den Messdaten der Verdünnungen eine Eichgerade zu berechnen. Die Geraden-Gleichung lautete $y = -0,158x^2 + 6,01e+003 x + 4,23e+004$ und ergab ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9994$.

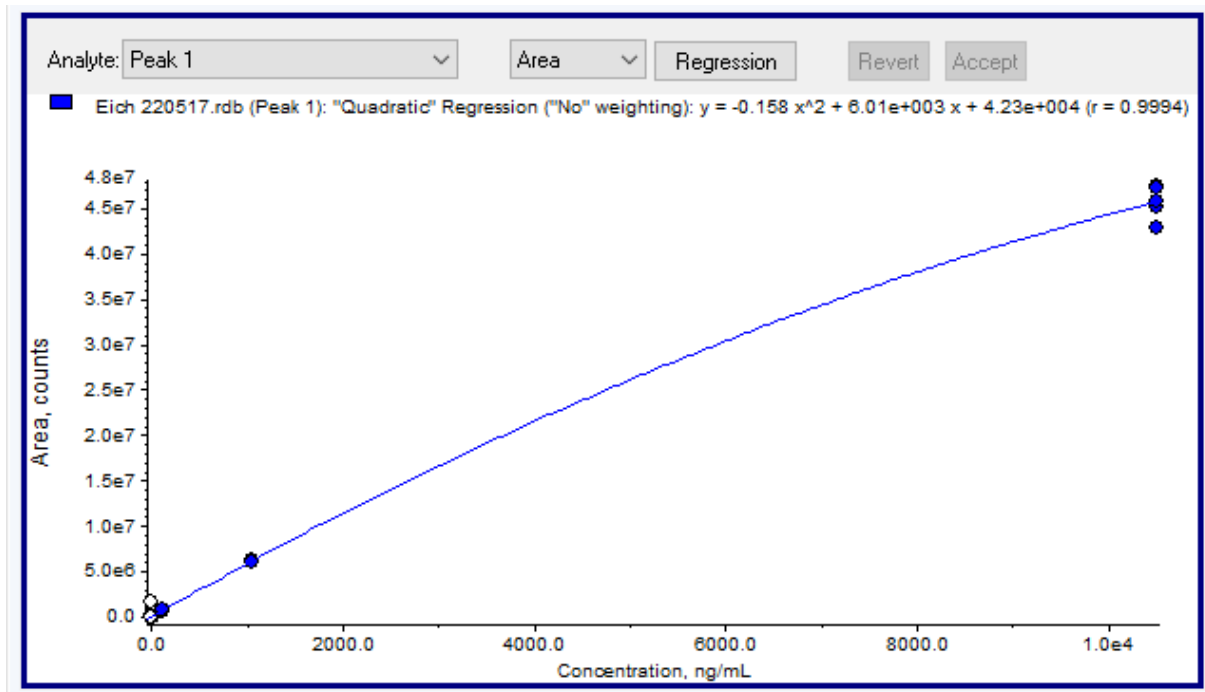


Abbildung 17 - Eichgerade C

3.3.6. Patientenproben

Die Patientenproben entstammten einer pharmakokinetischen Studie des Universitätsklinikums St. Pölten. Hierfür wurden sechs Patienten mit milder Niereninsuffizienz ausgewählt, die zu der Zeit der Probenentnahme jedoch nicht an einer Peritonitis litten.

Während eines stationären Aufenthalts wurde an den Patienten ein Standard-APD-Regime durchgeführt. Dieses Cycler-Regime bestand aus zwei Beuteln 5000 mL Physioneal®-Dialyselösung (entweder 1,36% oder 2,27%) in fünf Zyklen am Cycler und anschließend einer Gabe 1500 mL Extraneal®-Dialyselösung für den Tageszyklus. Dem ersten Beutel Physioneal®-Lösung wurden 2 g Azactam® (Trockenstechampulle Aztreonam, Firma Bristol Myers Squibb GesmbH) zugesetzt, was einer Konzentration von 400 mg/L entspricht.

Über einen Zeitraum von 24 Stunden wurden den Patienten in definierten Abständen sowohl Dialysatproben als auch über eine Venenverweilkanüle Blutproben entnommen. Insgesamt

wurden je 9 Blutabnahmen und 17 Dialysatabnahmen pro Patienten durchgeführt. Die genauen Abnahmezeiten können der Tabelle 10 entnommen werden.

Tabelle 10 - Abnahmezeitpunkte der Patientenproben

Zeit (hh:mm)	Ablauf	Blutabnahme	Dialysatabnahme
00:00	Beginn der APD	x	x
01:00		x	
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	Ende der APD	x	x

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde folgendes Abkürzungsmuster für die Bezeichnung der Proben gewählt:

Tabelle 11 - Abkürzungen der Proben

Abkürzung	Erklärung
P 1-6	Patient 1-6
IPD	Dialysatproben
IPS	Serumproben

3.3.7. Probenaufarbeitung

Alle Proben wurden bei -70°C gelagert. Zur Vermessung wurden sie bei Raumtemperatur aufgetaut und nach Verwendung entweder temporär auf Eis gelegt oder wieder bei -70°C gelagert.

Das verwendete Fällungsreagens wurde bei -20°C gelagert und bei Verwendung auf Eis gelegt.

3.3.7.1. *Dialysat*

Das Patientendialysat wurde für die Vermessung im Verhältnis 1:400 mit ddH₂O verdünnt. Die Begründung des gewählten Verdünnungsfaktors ist in Kapitel 4.1.1 ausführlich beschrieben.

Für die Aufarbeitung wurden die Proben aufgetaut und gevortext. Danach wurden dem Probengefäß 50 µl mit einer Eppendorf-Pipette entnommen und in einen 20 mL Messkolben transferiert. Dieser Messkolben wurde ebenfalls mit ddH₂O auf die entsprechende Marke aufgefüllt.

1000 µl dieser Verdünnung wurden in ein 1500 µl-HPLC-Vial überführt und gemäß der angeführten Methode in Kapitel 3.3.4 vermessen. Es erfolgten jeweils drei Messungen pro Vial, wobei zwischen den Proben je zwei Messungen mit Wasser durchgeführt wurden.

3.3.7.2. *Serum Vortests*

Die Auswahl des geeigneten Fällungsreagens und die Ermittlung der Wiederfindungsrate können den Kapiteln 4.1.2 und 4.1.3 entnommen werden.

Einer Flasche Reflotron® Precinorm U wurden 5 mL dH₂O (destilliertes Wasser) hinzu pipettiert. Der Inhalt wurde durch leichtes Schwenken gelöst, wobei hier auf Vermeidung von Schaumbildung geachtet wurde.

Es wurden 300 µl Methanol (MeOH) in ein Eppendorf-Reagens-Gefäß (Eppi) pipettiert und auf Eis gelegt. In einem separaten Eppi sind 135 µl Precinorm U vorgelegt und mit 15 µl einer wässrigen Aztreonam-Lösung von definierter Konzentration versetzt worden. Analog dazu wurden 135 µl Reflotron® Precinorm U mit 15 µl ddH₂O versetzt. Diese Proben sind als

Normalisierungswerte herangezogen worden. Jeweils 100 µl der dotierten Seren wurden daraufhin langsam in das kalte MeOH transferiert, wodurch sich ein deutlicher, weißer Niederschlag gebildet hat. Sofort nach der Ausfällung ist das Eppli geschüttelt und anschließend 30 Sekunden gevortext worden. Zur weiteren Denaturierung der Plasmaproteine wurden die Proben 10 Minuten in einem Ultraschallbad behandelt. Anschließend sind die Proben 15 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert worden, um die Zelltrümmer von den gelösten Bestandteilen zu trennen.

100 µl des klaren Überstandes sind in ein 200 µl-HPLC-Vial transferiert und gemäß der angeführten Methode in Kapitel 3.3.4 vermessen worden. Alle Proben wurden in Triplikaten vermessen und zwischen den einzelnen Vials wurden jeweils zwei Messungen mit Wasser durchgeführt.

3.3.7.3. *Serum*

Jede Serumprobe wurde in zwei Versuchsansätzen parallel aufgearbeitet.

Analog zu den Vortests wurden 300 µl MeOH in ein Eppli pipettiert und auf Eis gelegt. Um den Verdünnungsfaktor 1:4 zu erreichen, sind 100 µl des aufgetauten Serums langsam in das kalte MeOH transferiert worden. Dies führte ebenfalls zu einem deutlichen, weißen Niederschlag. Die weiteren Aufarbeitungsschritte verliefen analog zu der Beschreibung in Kapitel 3.3.7.2.

Die Serumproben wurden ebenfalls gemäß der angeführten Methode in Kapitel 3.3.4 vermessen. Auch hier sind alle Proben dreifach vermessen worden und zwischen den Proben wurden jeweils zwei Wassermessungen durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Optimierung der Probenaufarbeitung

4.1.1. Verdünnungsfaktor der Dialysatproben

Da das entnommene Dialysat der Patienten eine wässrige Lösung aus Glucose und diversen Salzen darstellt (Zusammensetzung siehe Tabelle 3), wurden diese Proben mit ddH₂O verdünnt. Die erste Messung von P1 IPD wurde mit dem Verdünnungsfaktor 1:10 durchgeführt. Doch die Messergebnisse zeigten, dass die Konzentrationen der Proben an den Zeitpunkten 00:00, 01:30, 02:00, 03:00 und 03:30 trotz Verdünnung noch zu hoch waren. Über die erstellte Eichgerade (Eichgerade A) konnten die Proben nicht quantifiziert werden, da sie sich außerhalb des Konzentrationsbereiches der Gerade befanden. Deshalb wurden diese fünf Proben mit dem Verdünnungsfaktor 1:30 aufgearbeitet und erneut vermessen. Bei P2 IPD und P3 IPD sind alle 17 Messzeiten jeweils 1:30 verdünnt und so vermessen worden. Auch die Zeitpunkte mit den niedrigsten Konzentrationen (20:00 und 24:00) lagen noch im Bereich der Eichgerade.

Nach der Probenvermessung von P 1-3 ergab die routinemäßige Messung einer wässrigen Aztreonam-Standardlösung mit bekannter Konzentration eine stark erniedrigte Detektion. Das Massenspektrometer erkannte nur noch ein Zehntel der erwarteten Konzentration. Diese Ergebnisse wurden durch die Vermessung einer weiteren Aztreonam-Standardlösung bestätigt. Da eine Verschmutzung der elektrischen Linse des Massenspektrometers vermutet wurde, sollte das unter Hochvakuum-stehende Gerät belüftet werden. Sobald Normaldruck im Gerät herrschte, wurden mittels einer Mikroskop-Kamera tatsächlich Salz-ähnliche Ablagerungen im Ionenpfad festgestellt. Unter Anwendung von Methanol und Isopropanol sind diese Verschmutzungen entfernt und das Gerät erneut evakuiert worden.

Aufgrund der Zusammensetzung des Dialysats wurde darauf geschlossen, dass diese Ablagerungen durch eine zu hohe Konzentration an Salzen in der Flüssigkeit zustande kamen. Deshalb wurde die P4 IPD Proben mit einem Verdünnungsfaktor von 1:400 aufgearbeitet, da sich nach Berechnung die niedrigsten Konzentrationen der Proben immer noch im Bereich der Eichgerade befinden sollten. Nach Vermessung der Proben und erneuter Kontrolle der Detektion durch Standardlösungen konnte keine Verschmutzung mehr festgestellt werden. P5 IPD und P6 IPD wurden demnach gleichsam wie P4 IPD aufgearbeitet und vermessen.

4.1.2. Wahl des Fällungsreagens

Vor der Aufarbeitung und Vermessung der Serumproben sind zunächst Vorversuche mit künstlichem Serum durchgeführt worden, um einen optimalen Aufarbeitungsablauf zur Proteindenaturierung und Lösung der Plasmaproteinbindung zu eruieren. Hierfür wurde das künstliche Serum Reflotron® Precinorm U herangezogen. Eine Beschreibung der Zusammensetzung des Präparats findet sich im Kapitel 3.2.1.3.

Die zentrale Fragestellung drehte sich hierbei um die Wahl des Fällungsreagens, da sowohl Methanol als auch Acetonitril in vorangegangenen Arbeiten gute Ergebnisse lieferten. Zunächst ist das künstliche Serum mit zwei verschiedenen, aber bekannten Konzentrationen einer wässrigen Aztreonam-Lösung (100000 ng/mL und 10000 ng/mL) versetzt worden, um einen systemischen Spiegel des Antibiotikums zu imitieren. Daraufhin wurden zwei Versuchsreihen parallel aufgearbeitet, wobei die Proben der einen Reihe mit MeOH und die der anderen mit MeCN ausgefällt wurden. Die Proben wurden dann gemäß der Beschreibung in Kapitel 3.3.7.2 aufgearbeitet und in Triplikaten vermessen. In diesem ersten Vorversuch zeigten die Proben der MeOH-Reihe deutlich höhere Wiederfindungsraten (MeOH 93,64% vs. MeCN 64,39%), weshalb MeOH als Fällungsreagens gewählt wurde.

Insgesamt wurden noch zwei weitere Versuchsreihen mit MeOH angefertigt, hierbei wurde das künstliche Plasma jedoch mit drei unterschiedlichen Konzentrationen (100000 ng/mL, 10000 ng/mL und 1000 ng/mL) dotiert. Die beiden Vorversuche ergaben Wiederfindungsraten von 75,40% ($\pm 5,79\%$ SD, 7,68% RSD) und 80,25% ($\pm 7,99\%$ SD, 9,96% RSD), was mit dem Ergebnis des ersten MeOH-Vorversuchs insgesamt eine mittlere Wiederfindungsrate von 83,10% ($\pm 9,45\%$ SD, 11,37% RSD) ergab.

Da die Werte dieser Vorversuche mit einem künstlichen Serum nur einen ungefähren Richtwert der zu erwartenden Wiederfindungsrate darstellten, wurde nach Vermessung der Patientenproben die Wiederfindungsrate verifiziert.

4.1.3. Verifizierung der Wiederfindungsrate

Obwohl das verwendete, künstliche Serum Reflotron® Precinorm U auch Komponenten humanen Ursprungs enthält, ist es nicht mit humanem Serum gleichzusetzen. Aus diesem Grund wurden nach erfolgter Vermessung aller Proben weitere Experimente zur Feststellung

der Wiederfindungsrate durchgeführt; jedoch nicht wiederholt mit künstlichem Serum, sondern mit den eigentlichen Patientenproben.

Hierfür wurden zunächst zwei wässrige Standardlösungen (Reinsubstanz Aztreonam in ddH₂O) mit den Konzentrationen 50000 ng/mL (Verdünnung 1, V1) und 5000 ng/mL (Verdünnung 2, V2) hergestellt. Aus den Humanproben wurden pro Patienten jeweils zwei Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen ausgewählt: eine Probe, welche annähernd der Konzentration der V1 entsprach und eine Probe, welche sich im Konzentrationsbereich der V2 bewegte. Mit diesen Proben wurden je zwei Versuchsreihen angelegt: die eine Reihe wurde mit einem bekannten Volumen der entsprechenden Verdünnung dotiert, die andere Reihe mit dem gleichen Volumen ddH₂O. So konnte die ddH₂O-Reihe als Leerwert für die Berechnungen der Wiederfindungsrate dienen.

Nach Dotierung der Proben, entweder mit einer Aztreonam-Lösung oder bidestilliertem Wasser, wurden sie gemäß der Beschreibung in Kapitel 3.3.4 in Duplikaten aufgearbeitet und in Triplikaten vermessen. Zwischen den Messungen sind Wassermessungen durchgeführt worden, um Carry-Over-Effekte zu detektieren.

Da die Wiederfindungsversuche mit den Proben von Patient 2 gestartet wurden, wurden hier zunächst vier Proben vermessen. In weiterer Folge wurden nur mehr je zwei Proben ausgewählt, jedoch wurden zuzüglich Versuche mit künstlichem Serum durchgeführt.

Tabelle 12 - Wiederfindungsraten pro Versuchsreihe

Versuchsreihe	Wiederfindungsrate (%)
P2 06:00	106,25
P2 09:00	105,65
P2 02:00	99,89
P2 16:00	109,23
P4 04:30	101,67
P4 16:00	100,26
P6 10:00	122,28
P6 01:00	103,79
P3 10:00	122,28
P3 01:00	103,79
P1 06:30	93,85
P1 16:00	104,03
P5 06:30	81,87
P5 16:00	101,74

Die Ergebnisse der Experimente finden sich in Tabelle 12. Anzumerken ist hier, dass sich beinahe alle Wiederfindungsraten über dem Maximum von 100% befinden. Die mittlere Wiederfindungsrate der Experimente mit Humanserum liegt bei 104,04% ($\pm 10,14\%$ SD, 9,75% RSD). Aus den Versuchen mit künstlichem Serum geht eine durchschnittliche Wiederfindung von 78,45% ($\pm 9,02\%$ SD, 11,49% RSD) hervor. Diese Ergebnisse unterstützen die initial bestimmte Wiederfindungsrate der Vorversuche im Kapitel 4.1.2.

4.2. Ergebnisse der Dialysatproben

4.2.1. Patient 1

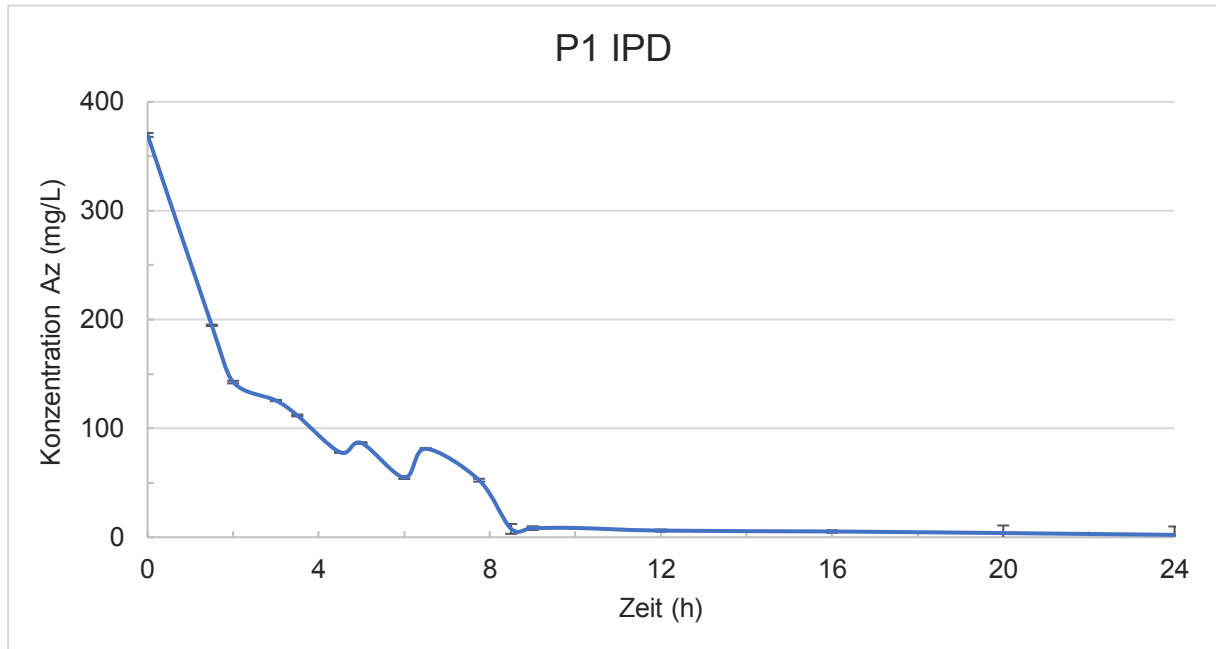


Diagramm 1 - Aztreonamkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 1

Tabelle 13 - Ergebnisse P1 IPD

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	369,60	1,78
1,5	194,67	0,66
2	142,53	1,17
3	125,60	0,55
3,5	111,87	0,83
4,5	78,00	0,51
5	86,53	0,71
6	54,80	1,26
6,5	81,33	0,57
7,75	52,40	1,32
8,5	7,67	4,56
9	8,36	1,73
10	8,53	0,72
12	6,11	1,00
16	5,31	1,15
20	3,83	6,99
24	2,17	7,74

angegebenen Werten um die Mittelwerte der drei Messergebnisse. Die relative

Der erste Beutel Peritonealdialyseflüssigkeit Physioneal® (5000 mL) wurde für die intraperitoneale Applikation mit 2 g Aztreonam versetzt. Das entspricht einer Konzentration von 400 mg/L. In Diagramm 1 ist erkennbar, dass das entnommene Dialysat zum Zeitpunkt 00:00 die höchste Konzentration der Messpunkte aufweist, die Maximalkonzentration (C_{max}) bei 369,60 mg/L. Durch systematische Aufnahme des Antibiotikums über das gut durchblutete Peritoneum nimmt die Konzentration wie zu erwarten ab. Zu beachten sind jedoch die Zeitpunkte 05:00 (5 h) und 06:30 (6,5 h), an denen es zu einem latenten Anstieg der Aztreonamkonzentration kommt. Ab dem Zeitpunkt 08:30 (8,5 h) bewegen sich die Konzentrationen nur mehr im einstelligen mg/L-Bereich. Da alle Proben in Triplikaten vermessen wurden, handelt es sich hier bei den

Standardabweichung (RSD) befindet sich bei allen Proben <5%, außer bei den Zeitpunkten 20:00 (20 h) und 24:00 (24 h).

4.2.2. Patient 2

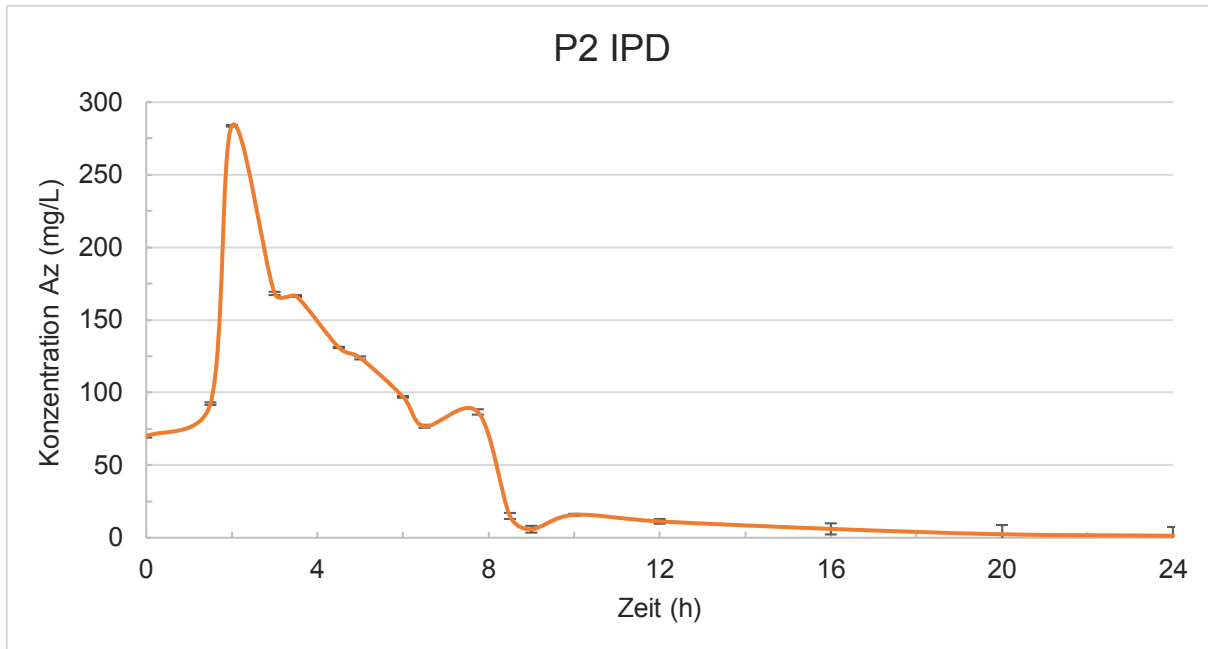


Diagramm 2 - Aztreonamkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 2

Tabelle 14 - Ergebnisse P2 IPD

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	69,87	0,87
1,5	92,40	0,87
2	283,73	0,53
3	168,27	1,12
3,5	166,53	0,60
4,5	131,07	0,47
5	123,87	1,04
6	97,07	0,63
6,5	76,80	1,04
7,75	86,67	1,87
8,5	15,00	2,08
9	5,88	2,36
10	15,75	0,78
12	11,28	1,63
16	6,11	3,84
20	2,39	6,38
24	1,38	6,03

Im Gegensatz zu Diagramm 1 zeigen die Proben von Patient 2 hier zum Startzeitpunkt 00:00 nicht die höchste Konzentration. Erst ab Stunde 2 ($t_{\max}$ 02:00) wird ein Maximum der Aztreonamkonzentration ($C_{\max}$ 283,73 mg/L) im Peritonealdialysat erreicht. Daraufhin nimmt die Konzentration stetig ab, wobei es erneut zu einem Anstieg bei den Zeitpunkten 06:00 (6 h), 07:45 (7,75 h) und 10:00 (10 h) kommt. Die RSD liegt bis zur Stunde 16 bei <5%, bei den zwei letzten Messpunkten übersteigt sie diesen Wert jedoch leicht.

4.2.3. Patient 3

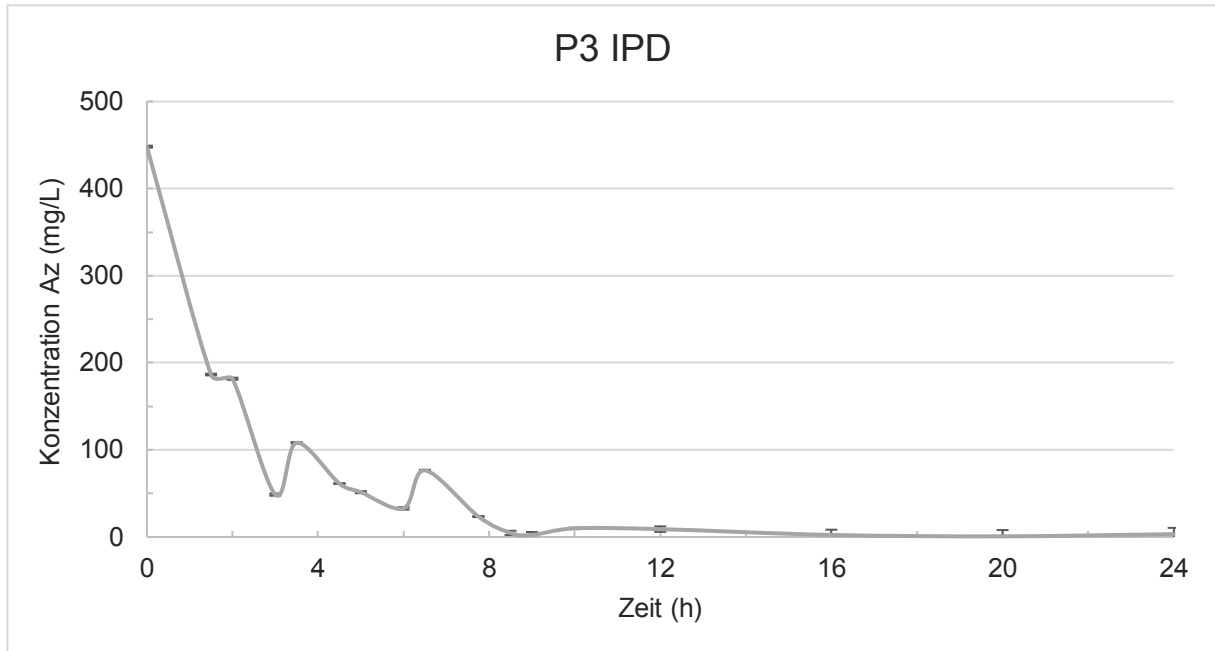


Diagramm 3 - Aztreonamkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 3

Tabelle 15 - Ergebnisse P3 IPD

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	448,00	0,89
1,5	186,53	0,97
2	181,73	1,21
3	48,67	1,26
3,5	108,13	0,77
4,5	61,33	0,38
5	51,47	1,19
6	32,83	1,34
6,5	76,53	0,60
7,75	23,44	0,59
8,5	4,67	2,47
9	2,35	3,36
10	9,88	0,81
12	8,99	3,16
16	2,32	6,06
20	0,75	7,21
24	3,28	7,23

Die Messdaten von Patient 3 entsprechen erneut dem erwarteten Trend der Konzentrationsabnahme, welcher schon bei Patient 1 beobachtet werden konnte. Die Maximalkonzentration ($C_{\max}$ 448,00 mg/L) findet sich bereits im ersten Zeitpunkt der Probennahme ($t_{\max}$ 00:00); ihr folgen sinkende Konzentrationsspiegel im Peritonealdialysat. Diese Abnahme der Konzentration ist jedoch auch hier nicht konstant. Auch bei Patient 3 kann eine Konzentrationszunahme zu den Zeitpunkten 03:30 (3,5 h), 06:30 (6,5 h) und 10:00 (10,0 h) beobachtet werden. Die RSD befindet sich bei den Werten 00:00 bis 12:00 (12 h) unter 5%, bei 16:00 (16 h) bis 24:00 (24 h) liegt sie über 5%.

4.2.4. Patient 4

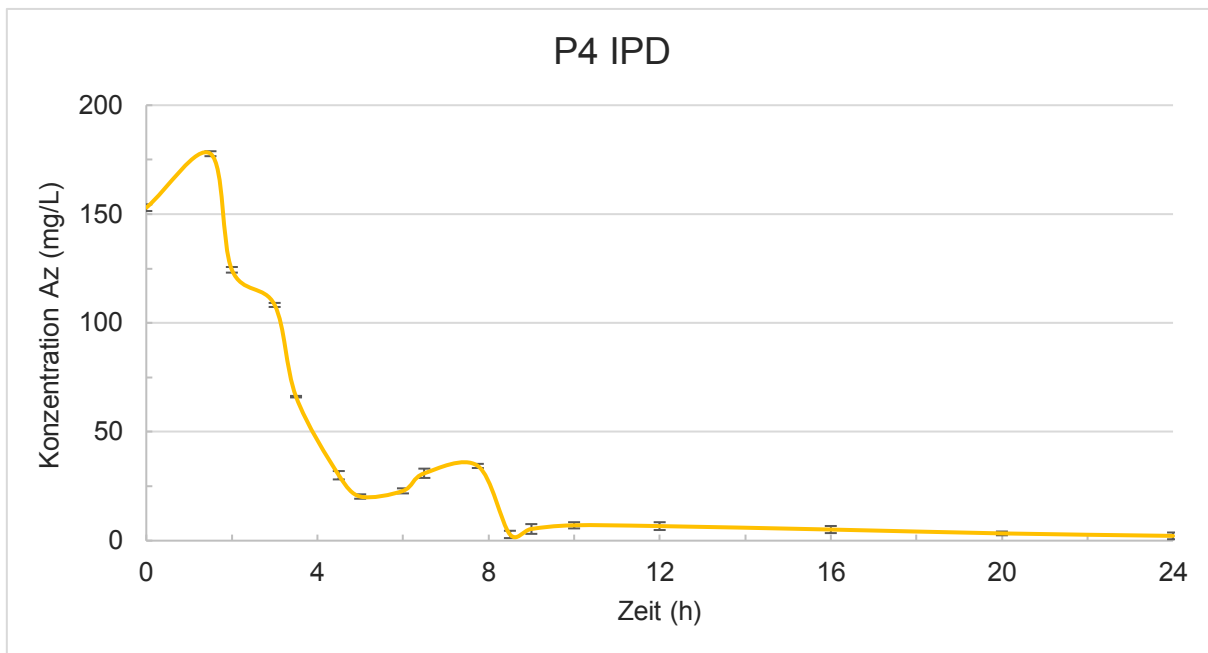


Diagramm 4 - Aztreonamkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 4

Tabelle 16 - Ergebnisse P4 IPD

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	152,93	1,53
1,5	177,73	1,13
2	124,40	1,29
3	108,27	0,93
3,5	66,13	0,35
4,5	30,05	1,93
5	20,27	1,01
6	22,87	1,16
6,5	30,95	2,13
7,75	34,32	0,95
8,5	2,87	1,68
9	5,36	2,24
10	7,05	1,43
12	6,68	1,80
16	5,11	1,63
20	3,33	0,87
24	2,19	1,55

Ähnlich wie bei Patient 2, liegt das Konzentrationsmaximum auch bei Patient 4 nicht bei der initialen Probenentnahme zum Zeitpunkt 00:00, sondern erst bei 01:30 ($t_{\max}$ 1,5 h) mit 177,73 mg/L. Danach fällt die Konzentration bis zu dem Zeitpunkt 05:00 (5,0 h), zwischen Stunde 6 (06:00) und 7,75 (07:45) kommt es zu einem Anstieg der Konzentration. Ab dem Zeitpunkt 08:30 (8,5 h) stellt sich erneut ein Konzentrationsplateau ein, das zunächst eine leicht ansteigende und ab Zeitpunkt 10:00 (10,0 h) eine sinkende Tendenz aufweist. Die RSD aller Messwerte von Patient 4 liegt bei <5%.

4.2.5. Patient 5

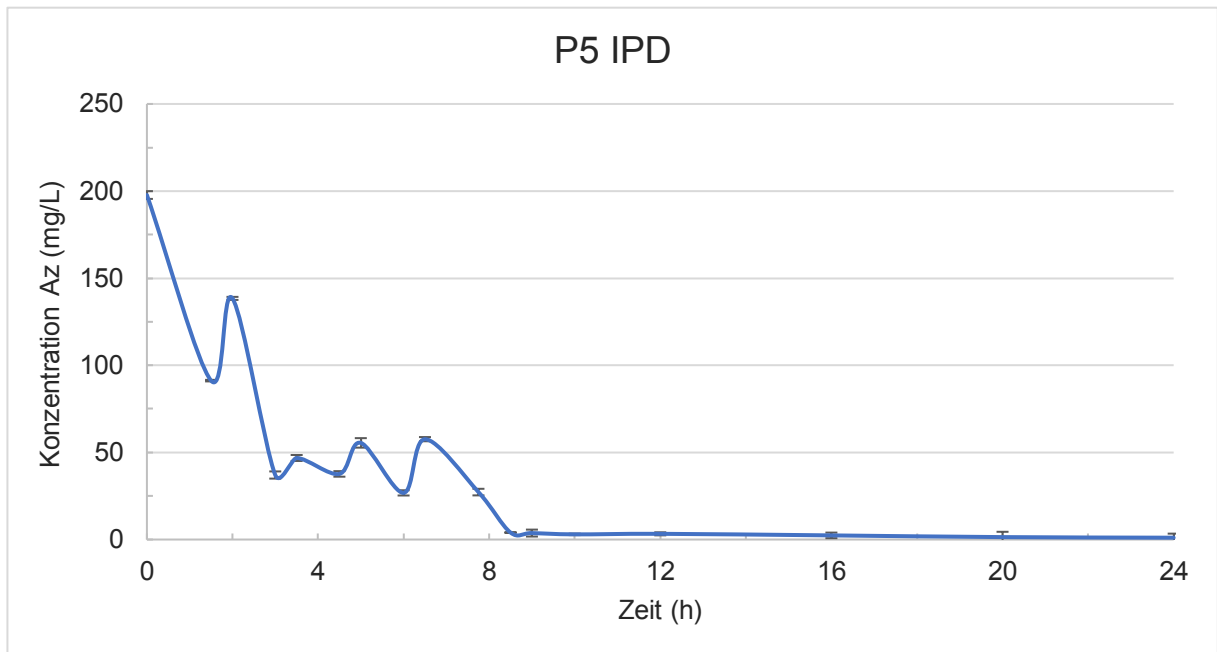


Diagramm 5 - Aztreonamkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 5

Tabelle 17 - Ergebnisse P5 IPD

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	197,73	2,22
1,5	91,20	0,44
2	138,40	0,87
3	37,03	2,06
3,5	46,80	1,71
4,5	37,65	1,59
5	55,47	2,73
6	26,77	1,50
6,5	57,60	1,20
7,75	27,23	1,89
8,5	4,00	0,00
9	3,70	1,98
10	2,97	0,41
12	3,27	0,87
16	2,38	1,61
20	1,38	3,06
24	1,05	2,32

Bei Patient 5 zeigt sich erneut das Konzentrationsmaximum von 197,73 mg/L ($C_{\max}$) im ersten Messwert 00:00 ($t_{\max}$). Daraufhin folgt zwar eine Abnahme der Konzentration, jedoch kommt es bis zum Zeitpunkt 06:30 bei jedem zweiten Messpunkt zu einem latenten Anstieg der Antibiotikakonzentration (02:00, 03:30, 05:00 und 06:30). Ab Stunde 8,5 befinden sich die Konzentrationswerte erneut in einem Plateau, wobei es bei Zeitpunkt 12:00 zu einer minimalen Erhöhung kommt. Die RSD befindet sich bei allen Messpunkten bei <5%.

4.2.6. Patient 6

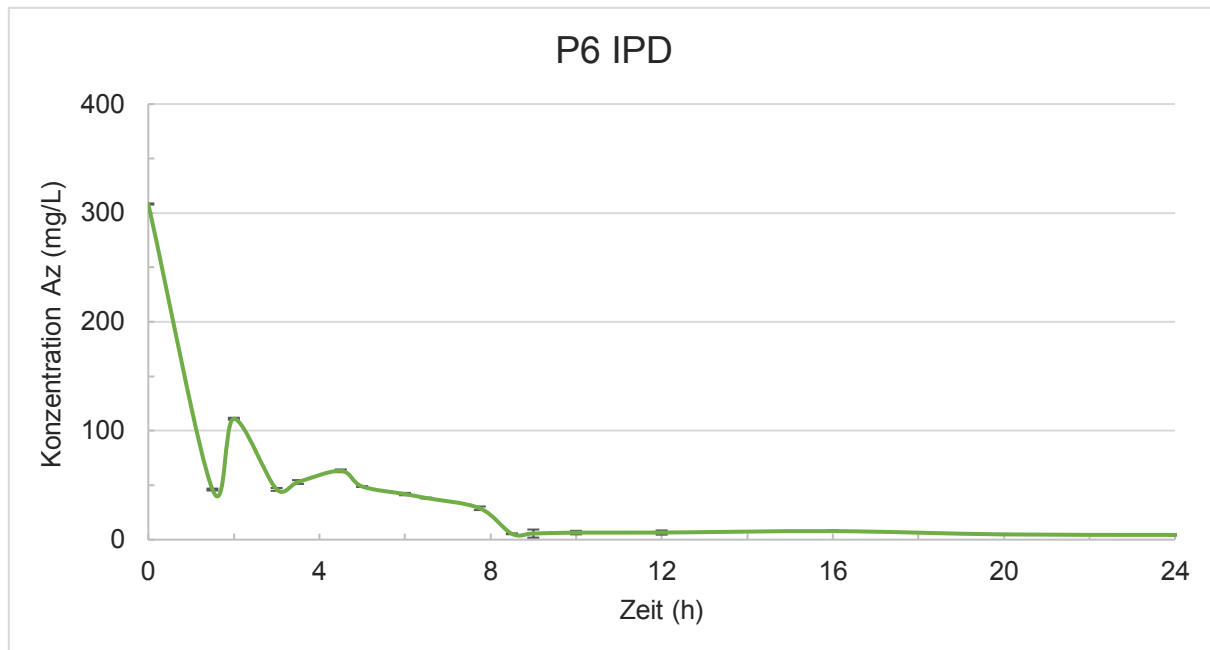


Diagramm 6 - Aztreonamkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 6

Tabelle 18 - Ergebnisse P6 IPD

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	308,27	0,54
1,5	46,00	0,87
2	111,07	0,91
3	46,13	1,32
3,5	52,93	1,75
4,5	63,20	1,27
5	48,80	0,00
6	41,87	1,10
6,5	38,20	0,42
7,75	28,81	1,62
8,5	5,39	0,43
9	5,60	3,71
10	6,48	1,63
12	6,53	1,97
16	7,83	0,78
20	4,83	0,48
24	4,37	0,53

Diagramm 6 veranschaulicht die Dialysatkonzentrationen von Patient 6. Hier liegt $C_{\max}$ mit einer Konzentration von 308,27 mg/L wie erwartet bei Zeitpunkt 00:00 ($t_{\max}$). Die Kurve verzeichnet bei 02:00 (2 h) und 03:30 (3,5 h) jeweils Konzentrationsanstiege, ansonsten nehmen die Werte chronologisch bis zum Zeitpunkt 16:00 (16 h) ab. Hier kommt es erneut zu einer leichten Erhöhung der Aztreonamkonzentration im Dialysat. Die RSD der Werte befindet sich durchwegs bei <5%.

4.2.7. Zusammenfassung der Dialysatproben

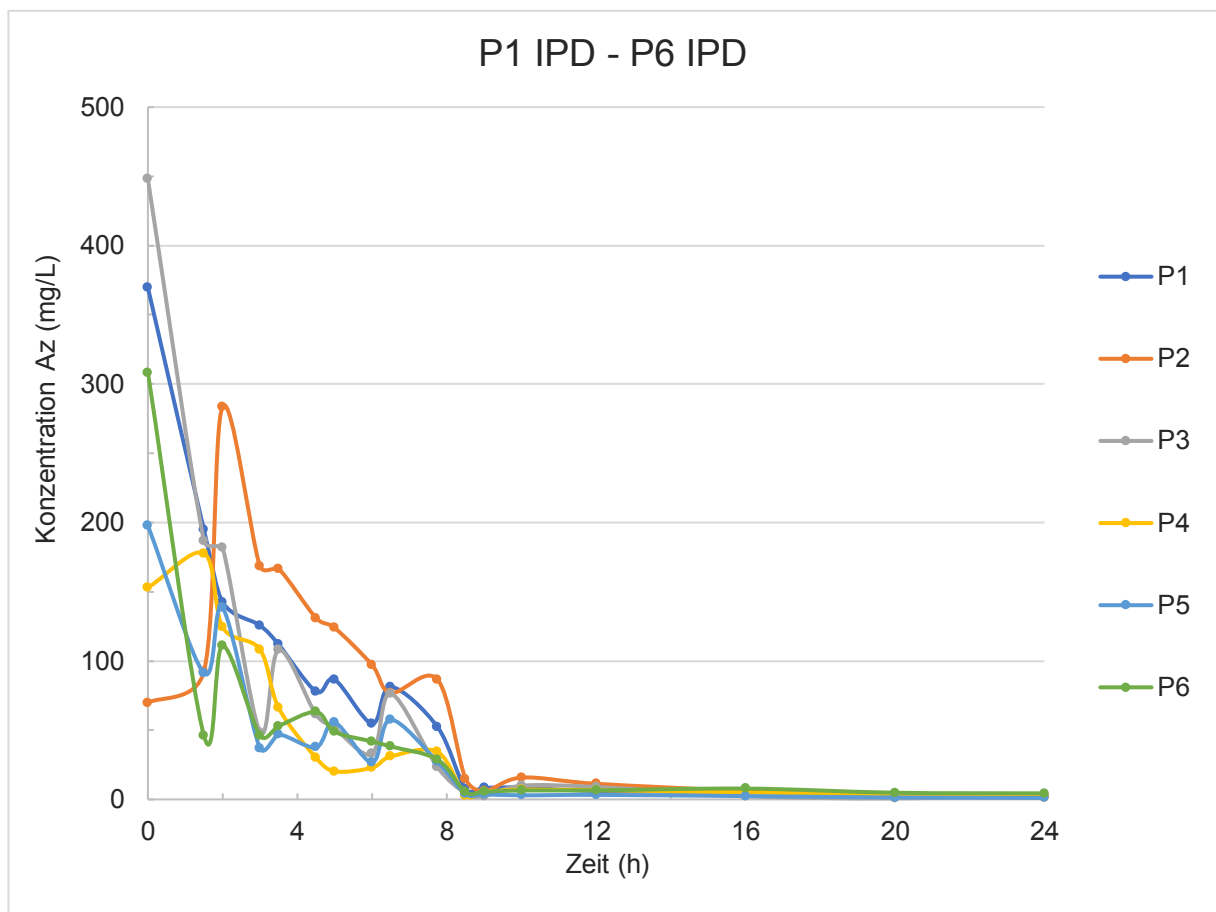


Diagramm 7 - Überblick der Dialysatmesswerte von Patient 1 bis Patient 6

Dem vorliegenden Diagramm kann entnommen werden, dass P3 die höchste initiale Dialysatkonzentration (448,00 mg/L) aufweist. Es zeigt ebenfalls, dass die Maximalkonzentration von P2 und P4 nicht im ersten Messpunkt bei 00:00 liegt, sondern bei 02:00 (P2) und 01:30 (P4). Weiters ist im Anstieg der Konzentrationskurve ein Trend zu erkennen: die Konzentrationen tendieren zu den Zeiten 02:00, 03:30, 05:00 und 06:30 zu steigen (02:00: P2, P5, P6; 03:30: P3, P5, P6; 05:00: P1, P5; 06:30: P1, P3, P4, P5). Ab Zeitpunkt 08:30 kommt es in allen Kurven zu einem starken Abfall der Konzentration und weitestgehend zur Einstellung eines Plateaus.

4.3. Ergebnisse der Serumproben

4.3.1. Patient 1

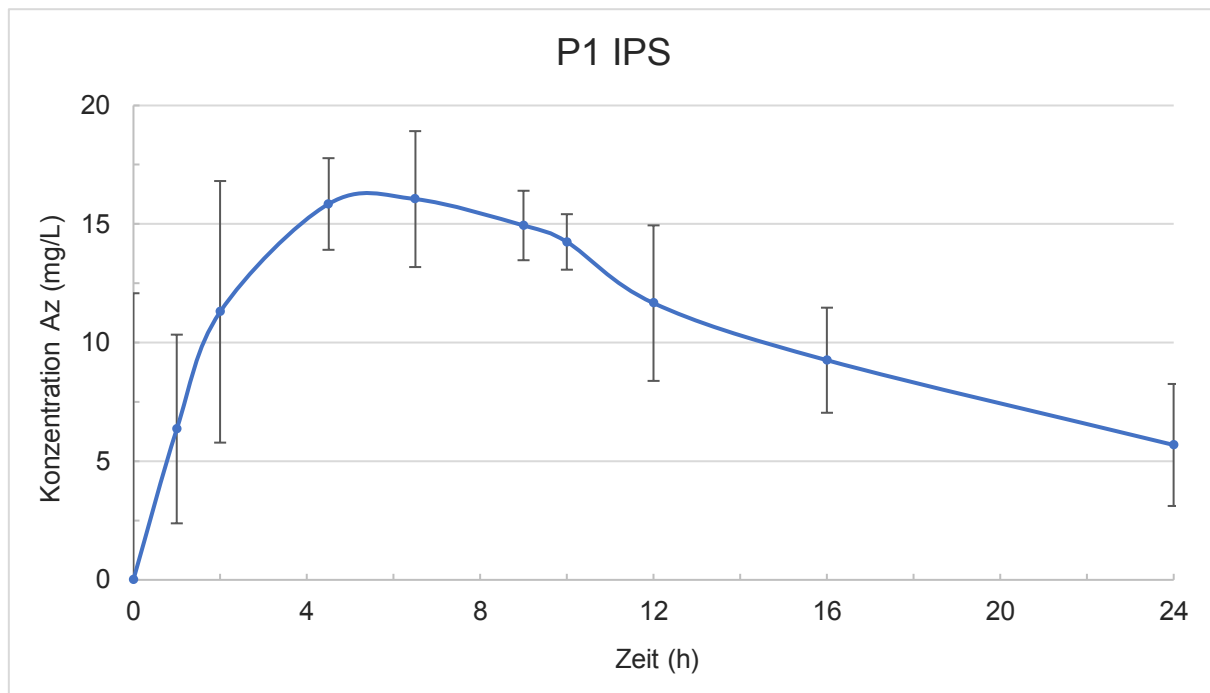


Diagramm 8 - Aztreonamkonzentrationen der Serumproben von Patient 1

Tabelle 19 - Ergebnisse P1 IPS

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	0,02	12,07
1	6,36	3,98
2	11,30	5,51
4,5	15,85	1,93
6,5	16,05	2,87
9	14,94	1,46
10	14,25	1,17
12	11,67	3,28
16	9,26	2,22
24	5,69	2,57

Die Entnahme der Serumproben erfolgte während der intraperitonealen Gabe einer Aztreonam-Lösung mit einer Konzentration von 400 mg/L. Die Kurve der Messwerte zeigt eine Bateman-Funktion, welche typisch für extravaskuläre Applikationswege ist. Sie veranschaulicht das Zusammenspiel der Absorption des Wirkstoffes in den systemischen Kreislauf und der gleichzeitigen Elimination aus dem Blut. Die Serumproben wurden je in zwei Ansätzen parallel aufgearbeitet und jeder Ansatz in Triplikaten

vermessen, die angegebenen Werte sind somit der mittlere Durchschnitt von sechs Messungen. Patient 1 zeigt eine Maximalkonzentration ($C_{\max}$) von 16,05 mg/L mit einer $t_{\max}$ von 6,5 h, wobei die zweithöchste Konzentration zum Zeitpunkt 04:30 mit 15,85 mg/L nur sehr knapp unter der $C_{\max}$ liegt. Von der initial applizierten Aztreonamkonzentration (400 mg/L) finden sich maximal 16,05 mg/L im Serum wieder, das entspricht einer errechneten intraperitonealen Absorption des Wirkstoffes von 4,01%.

4.3.2. Patient 2

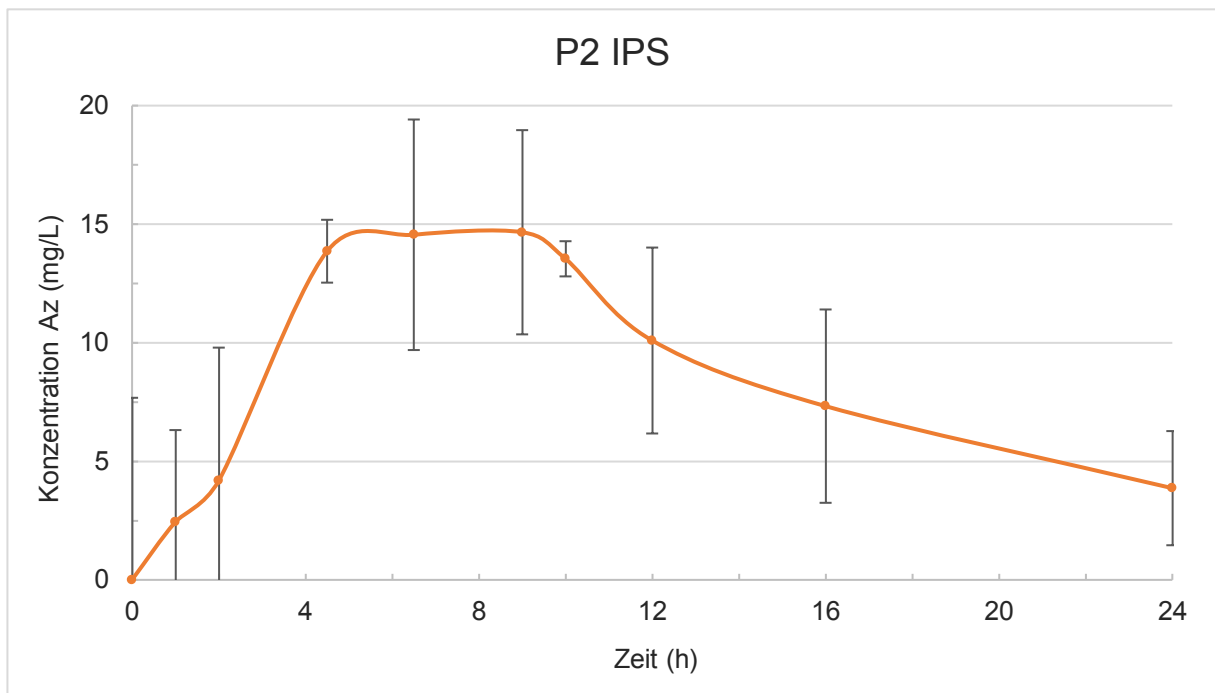


Diagramm 9 - Aztreonamkonzentrationen der Serumproben von Patient 2

Tabelle 20 - Ergebnisse P2 IPS

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	0,01	7,67
1	2,44	3,87
2	4,18	5,61
4,5	13,86	1,33
6,5	14,55	4,86
9	14,66	4,31
10	13,54	0,74
12	10,09	3,92
16	7,33	4,08
24	3,87	2,41

Die Messwerte von Patient 2 zeigen keine eindeutige Maximalkonzentration. Die höchste Konzentration befindet sich mit 14,66 mg/L zwar am Zeitpunkt 09:00, jedoch besteht nur ein marginaler Unterschied zu dem vorangegangenen Wert (14,55 mg/L, 06:30). Das lässt darauf schließen, dass sich in dieser Zeitspanne eine Art Gleichgewicht zwischen Absorption und Elimination des Wirkstoffes eingestellt hat. Für diese Messreihe wird jedoch $C_{\max}$ als 14,66 mg/L und $t_{\max}$ als 9 h festgelegt. Dadurch ergibt sich eine Absorptionsrate von 3,67%. Erneut zeigen die Werte der Zeitpunkte 00:00 und 02:00 eine RSD über 5%, die anderen Messwerte liegen unterhalb dieses Wertes.

4.3.3. Patient 3

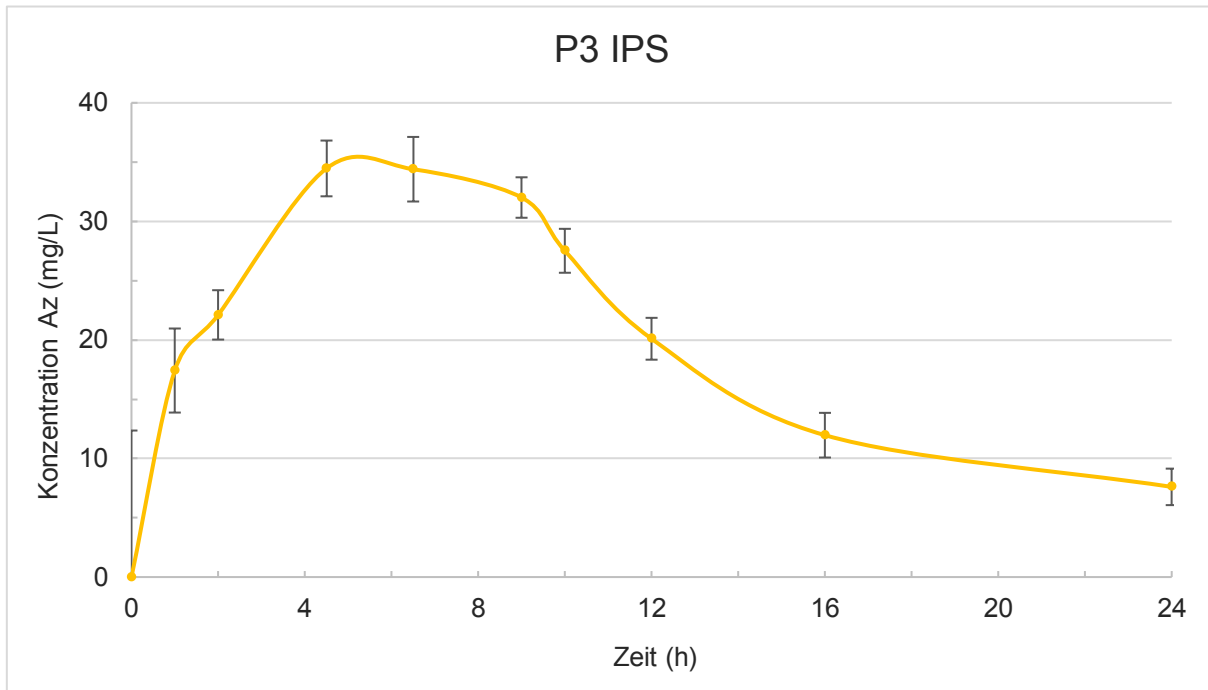


Diagramm 10 - Aztreonamkonzentrationen der Serumproben von Patient 3

Tabelle 21 - Ergebnisse P3 IPS

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	0,01	12,35
1	17,42	3,54
2	22,11	2,08
4,5	34,47	2,35
6,5	34,40	2,72
9	32,01	1,71
10	27,52	1,85
12	20,10	1,77
16	11,97	1,88
24	7,61	1,54

Wie auch schon bei Patient 2, hat sich auch hier um die Maximalkonzentration eine Art Plateau eingestellt. Die $C_{\max}$ liegt mit 34,47 mg/L zum Zeitpunkt 04:30 ($t_{\max} = 4,5$ h) nur mit einer minimalen Differenz über dem zweithöchsten Konzentrationswert, welcher bei 06:30 mit 34,40 mg/L gemessen wurde. Damit zeigt Patient 3 eine weitaus höhere $C_{\max}$ als die beiden vorangegangenen Patienten, was sich auch in der Absorptionsrate von 8,62% widerspiegelt. Die RSD aller Werte befindet sich <5%, abgesehen von dem Wert am Zeitpunkt 00:00.

4.3.4. Patient 4

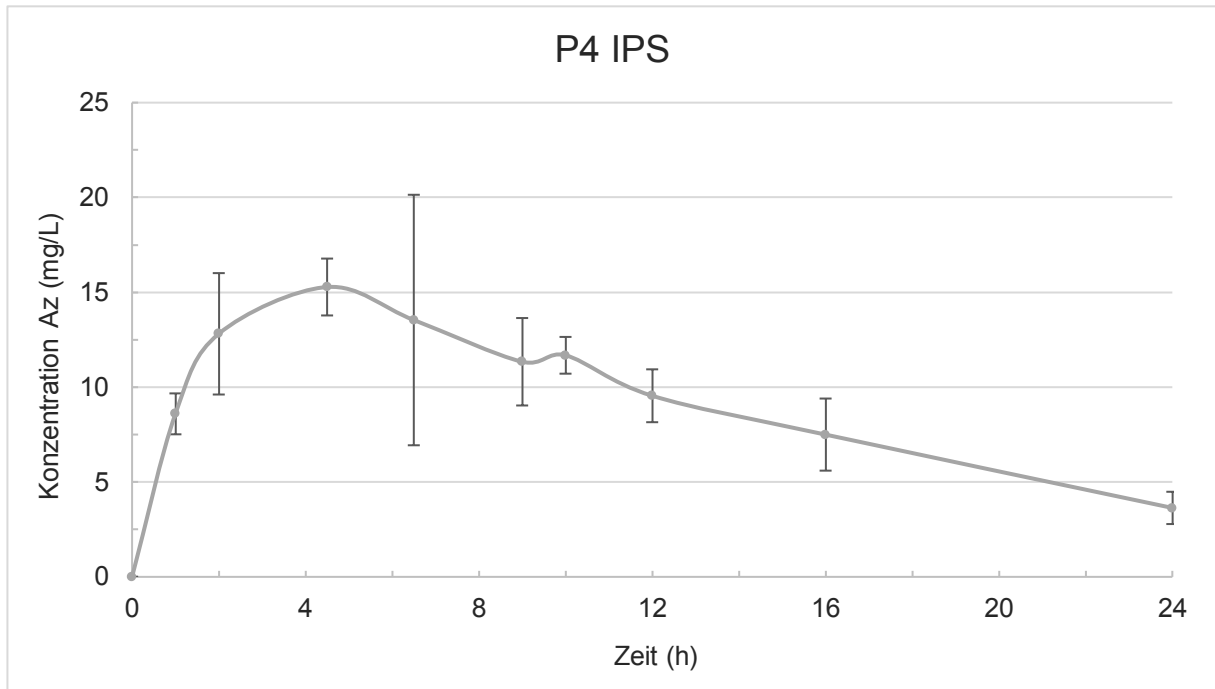


Diagramm 11 - Aztreonamkonzentrationen der Serumproben von Patient 4

Tabelle 22 - Ergebnisse P4 IPS

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	0,00	0,00
1	8,59	1,08
2	12,81	3,20
4,5	15,28	1,50
6,5	13,54	6,60
9	11,34	2,30
10	11,68	0,97
12	9,55	1,39
16	7,50	1,90
24	3,64	0,85

In Diagramm 11 ist zu sehen, dass die $C_{\max}$ von Patient 4 bei 15,28 mg/L liegt und nach 4,5 h ($t_{\max}$) erreicht ist. Zum Zeitpunkt 10:00 kommt es zu einem latenten Anstieg der Serumkonzentration im Vergleich zum vorherigen Messpunkt. Die Absorptionsrate liegt bei 3,82%. Abgesehen vom Zeitpunkt 06:30 (RSD 6,60%), liegt die RSD aller Messwerte unter 5%.

4.3.5. Patient 5

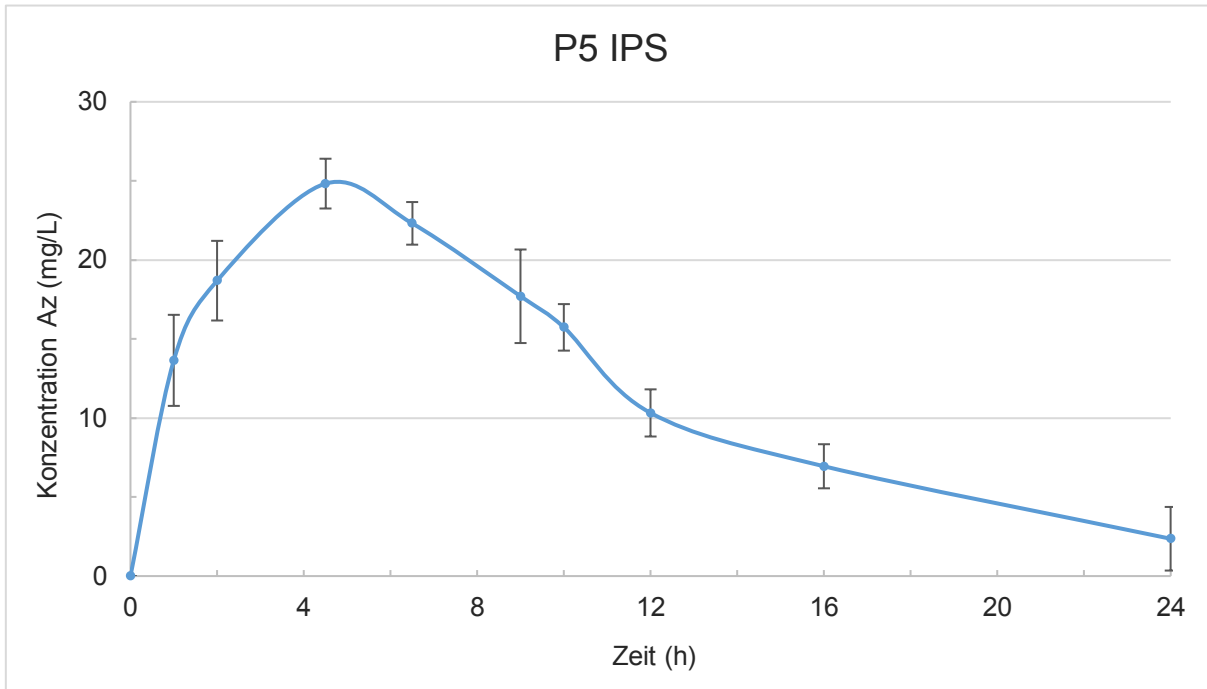


Diagramm 12 - Aztreonamkonzentrationen der Serumproben von Patient 5

Tabelle 23 - Ergebnisse P5 IPS

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	0,00	0,00
1	13,65	2,88
2	18,69	2,52
4,5	24,83	1,57
6,5	22,31	1,35
9	17,70	2,96
10	15,73	1,47
12	10,32	1,49
16	6,95	1,39
24	2,36	2,01

Die Kurve von Patient 5 stellt ein Vorzeigexemplar einer extravasalen Absorptionskurve dar: Vom Nullpunkt ausgehend kommt es zu einem starken Anstieg der Aztreonamkonzentration im Serum bis sich eine klar abgehobene Maximalkonzentration bei 24,83 mg/L am Zeitpunkt 04:30 ($t_{\max} = 4,5$ h) abzeichnet. Daraufhin fällt die Konzentration stetig. Die Absorptionsrate des vorliegenden Patienten beträgt 6,21%. Alle Messwerte zeigen eine RSD von <5%.

4.3.6. Patient 6

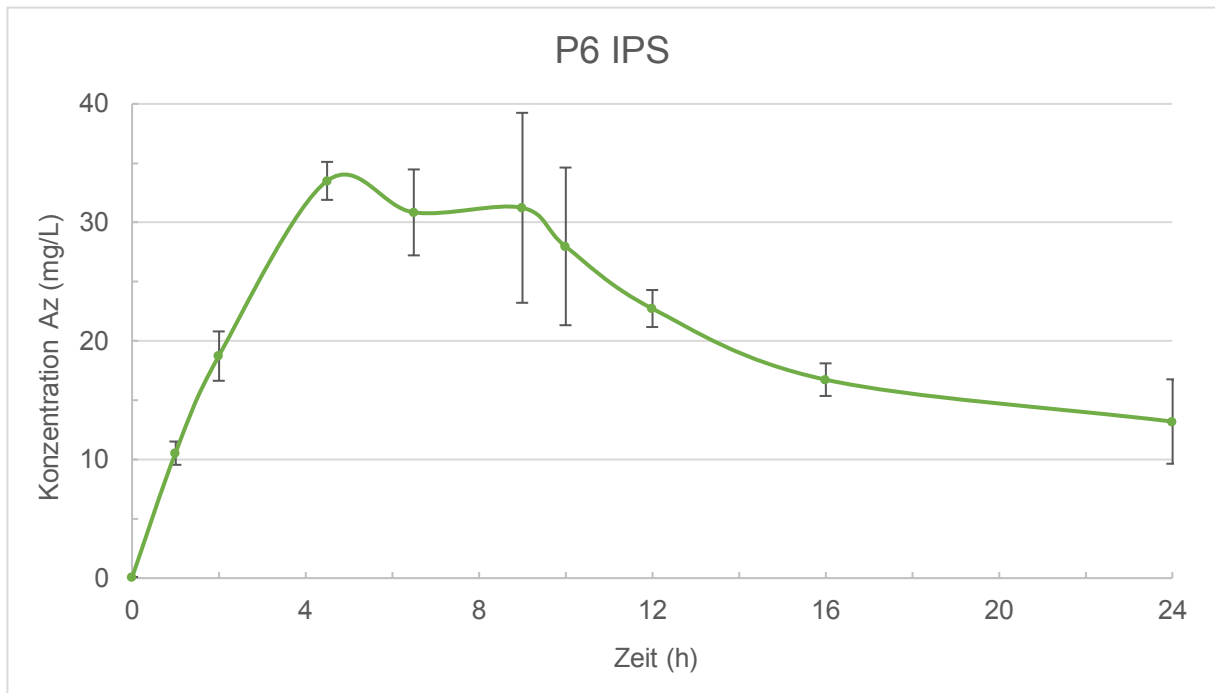


Diagramm 13 - Aztreonamkonzentrationen der Serumproben von Patient 6

Tabelle 24 - Ergebnisse P6 IPS

Zeit (h)	c (mg/L)	RSD
0	0,06	0,00
1	10,54	0,98
2	18,73	2,08
4,5	33,51	1,60
6,5	30,85	3,62
9	31,23	8,01
10	27,98	6,65
12	22,74	1,56
16	16,74	1,37
24	13,21	3,56

Die Messdaten von Patient 6 zeigen eine eindeutige $C_{\max}$ von 33,51 mg/L bei einer $t_{\max}$ von 4,5 h, was eine maximale Absorptionsrate von 8,38% ergibt. Anzumerken ist jedoch auch hier, dass es zum Zeitpunkt 09:00 zu einem leichten Anstieg der Blutkonzentration im Gegensatz zum vorangegangenen Messwert kommt, doch dieser Wert (31,23 mg/L) übersteigt nicht die Maximalkonzentration. Die RSD der vermessenen Werte an den Zeitpunkten 09:00 und 10:00 liegt bei 8,01% bzw. 6,65%, die restlichen RSD liegen unter 5%.

4.3.7. Zusammenfassung der Serumproben

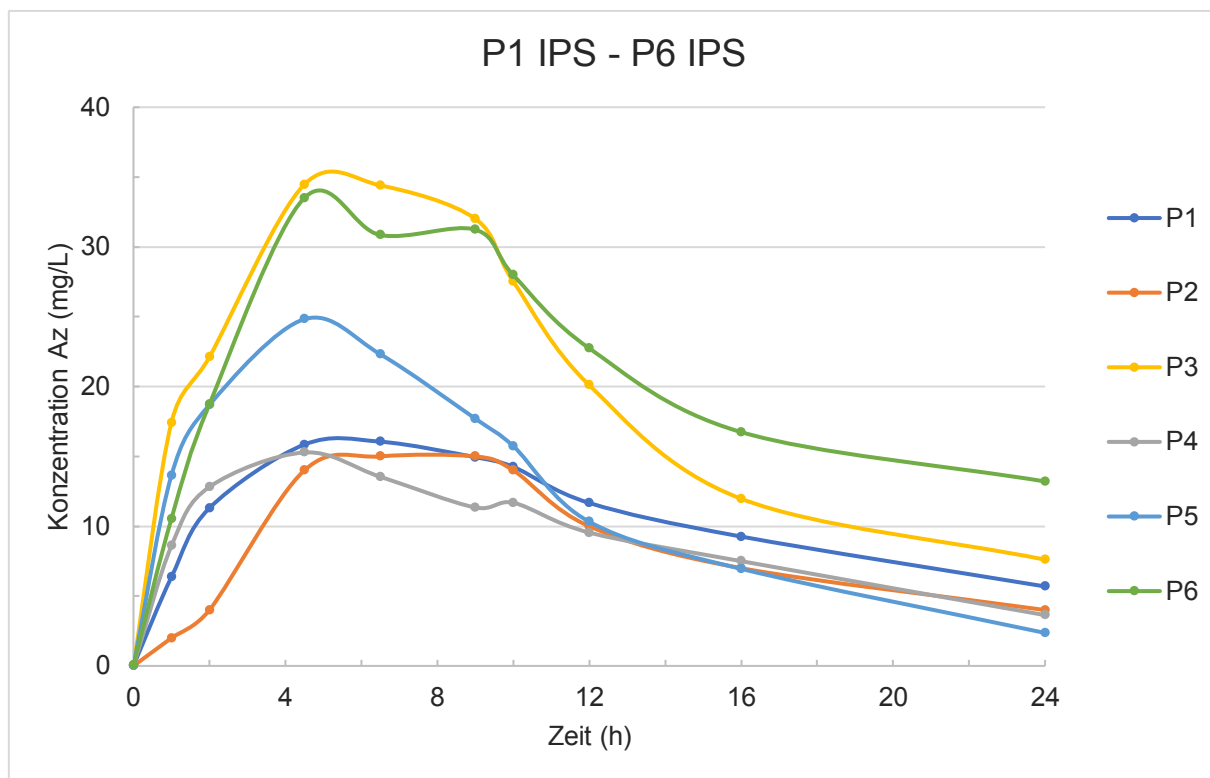


Diagramm 14 - Überblick der Serummesswerte von Patient 1 bis Patient 6

Das Diagramm 14 zeigt die Konzentration-Zeit-Kurven aller Patienten übereinander dargestellt. Die gelbe Kurve von Patient 3 weist mit 34,47 mg/L die höchste C_{max} der sechs Kurven auf, dicht gefolgt von Patient 6 mit 33,51 mg/L. Die niedrigste C_{max} zeigt Patient 2 mit 14,66 mg/L. Die durchschnittliche Maximalkonzentration der sechs Patienten ist 23,13 mg/L mit einer Standardabweichung von $\pm 9,19$ mg/L, jedoch liegt die RSD bei 39,75%. Abgesehen von Patient 1 (6,5 h) und Patient 2 (9 h), liegen alle t_{max} -Werte bei 4,5 h, die durchschnittliche Zeit bis zum Auftreten der Maximalkonzentration liegt bei 5,58 h (SD $\pm 1,86$ h, RSD 33,23%). Die Spanne der Absorptionsrate reicht von 3,82% (Patient 4) bis hin zu 8,62% (Patient 3), die durchschnittliche Rate der Absorption ist 5,78% (SD $\pm 2,30$ %, RSD 39,75%)

5. Diskussion

Die Blutreinigung niereninsuffizienter Patienten über das Peritoneum bringt viele Vorteile gegenüber der Hämodialyse mit sich. Nicht nur stehen die niedrigen Kosten durch Reduktion des benötigten Pflegepersonals und der ambulanten Aufenthalte im Vordergrund, sondern auch die erhöhte Lebensqualität der Patienten durch die mögliche Durchführung außerhalb des Krankenhauses [12]. Dem gegenüber steht jedoch das Risiko durch den permanenten Katheter in der Bauchdecke eine schwerwiegende Peritonitis zu entwickeln. Insbesondere fungale Peritonitiden sind gefürchtet, wobei auch die weitaus häufiger vorkommenden Bauchfellentzündungen bakteriellen Ursprungs eine Entfernung des Katheters zur Folge haben können. Solche Komplikationen führen oftmals zu einer fibrotischen Umstrukturierung des Peritoneums, welche schlussendlich im Versagen der Methode resultiert [14].

Zur Behandlung einer bakteriellen Peritonitis wird eine Kombinationstherapie aus mehreren antibiotischen Wirkstoffen empfohlen, welche sowohl das gram-positive als auch gram-negative Spektrum effizient abdecken. Durch den Aufschwung von Resistenzentwicklungen bakterieller Organismen kann die Abdeckung dieses breiten Spektrums oftmals nicht ausreichend gewährleistet werden [14]. Daher muss immer häufiger auf Reservewirkstoffe in der antibiotischen Therapie zurückgegriffen werden. Eines dieser Reserveantibiotika ist Aztreonam, ein monozyklisches β -Lactam-Antibiotikum, dessen Wirkspektrum sich beinahe ausschließlich auf gram-negative Keime begrenzt [16].

Das Ziel dieser Arbeit war die Vermessung der Dialysat- und Serumproben von sechs Patienten mittels HPLC-MS/MS. Diese Patienten haben sich im Vorfeld dieser Arbeit einer intraperitonealen Gabe von Aztreonam im Rahmen einer klinischen Studie des UK St. Pölten unterzogen. Die Studie diente der weiteren Erkenntnisgewinnung über die Pharmakokinetik von Aztreonam nach Applikation über das Bauchfell. Hierbei stellten sich die wesentlichen Fragen, in welchem Ausmaß und in welcher Zeit das Antibiotikum das Peritoneum passieren kann und ob über diesen Weg eine ausreichende Plasmakonzentration aufgebaut wird, um eine bakteriell verursachte Peritonitis zu behandeln.

Bei den Dialyseflüssigkeiten handelte es sich um zwei verschiedene wässrige, hypertone Glucose- und Elektrolytlösungen (Physioneal® und Extraneal®), welche zu bestimmten Zeitpunkten des APD-Regimes in den Bauchraum eingebracht wurden. Der ersten Flüssigkeit (Physioneal®) ist das Antibiotikum Aztreonam hinzugesetzt und die Peritonealdialyse daraufhin gestartet worden. Anzumerken ist hier, dass dieses Regime aus mehreren Cycler-

Durchläufen, also Einläufen frischer Dialyseflüssigkeit und Ausläufen des im Bauchraum verweilten Dialysats, bestand (1. Einlauf 00:00, 2. Einlauf 02:00, 3. Einlauf 03:30, 4. Einlauf 05:00, 5. Einlauf 06:30). Des Weiteren wurde zum Zeitpunkt 08:30 die zweite Dialyseflüssigkeit (Extraneal®) appliziert, welche nicht mit Aztreonam versetzt wurde und bis zum Zeitpunkt 24:00 im Peritonealraum verweilte. Im Verlauf dieser 24 Stunden erfolgten zu definierten Zeitpunkten die Probeabnahmen sowohl des Dialysats als auch des Serums.

Zuerst erfolgte die Analyse der Dialysatproben. Die Ergebnisse dieser Messungen weisen größtenteils den zu erwartenden Trend auf: die höchste Konzentration an Aztreonam findet sich im ersten Messpunkt 00:00, an dem die Flüssigkeit gerade erst in den Bauchraum eingebracht wurde und demnach nur ein Bruchteil über das Kapillarnetz des Peritoneums absorbiert werden konnte. Es folgt ein bidirektionaler Stoffaustausch über das Bauchfell, wobei Aztreonam stetig entlang des Konzentrationsgradienten in den Blutkreislauf aufgenommen wird. Unter optimalen Bedingungen würde sich mit der Zeit ein Gleichgewicht einstellen, was zu einer stetigen Abnahme der Konzentrations-Zeit-Kurve führen würde. Da der periodische Auslauf des verbrauchten Dialysats und Einlauf der neuen Dialyseflüssigkeit jedoch einer Mehrfachgabe des Wirkstoffes gleicht, finden sich wiederkehrende Anstiege der Konzentration in den Dialysatkurven aller Patienten wieder. Hierbei ist insbesondere auf die Kurve von Patient 5 zu verweisen (siehe Diagramm 5), da diese Kurve einen korrespondierenden Konzentrationsanstieg zu jeder der definierten Einlaufzeiten neuer Dialyseflüssigkeit zeigt. Die restlichen Patienten zeigen ebenfalls Anstiege der Dialysatkonzentration, wobei diese entweder nicht bei jeder Einlaufzeit (P1, P3, P6) oder erst zeitversetzt (P2, P4) auftreten.

Diese Abweichung der Konzentrationsanstiege mit den Einlaufzeiten kann möglicherweise durch die pharmakokinetische Individualität der ADME-Parameter (Absorption, Distribution, Metabolismus, Elimination) der einzelnen Personen erklärt werden. Die Patienten, die eine schnelle Entfernung von Aztreonam aus der Dialyseflüssigkeit zeigen, weisen womöglich eine stärkere Vaskularität des Peritoneums (bessere Absorption) oder höhere Plasmaproteinbindungskapazität (bessere Distribution) für den Wirkstoff im Blut auf. Ebenso könnte eine rapide Entfernung von Aztreonam aus dem Blut durch Metabolisierung oder Elimination zu einer höheren Absorptionsrate aus dem Dialysat führen. Je schneller das Blut von dem Wirkstoff gereinigt wird, desto größer ist erneut das Konzentrationsgefälle zwischen Dialysat und Blut, was wiederum zu einer erhöhten Aufnahme von Aztreonam über die Peritonealmembran in den systemischen Kreislauf führt. Die Konzentration im Dialysat vor dem Auslaufzeitpunkt ist demnach niedriger, was in einer höheren Konzentrationsdifferenz zu der neu eingelaufenen Dialyseflüssigkeit resultiert und sich einem steileren Anstieg der Kurve zeigt. Bei Patienten mit niedrigerer Absorptionskapazität, sei es durch verminderte

Durchblutung des Bauchfells oder niedrigere Plasmaproteinbindung, kommt es in der gegebenen Zeit des Cycler-Durchlaufs zu einer geringeren Aufnahme von Aztreonam über das Peritoneum. Der Unterschied in der Konzentration vor dem Auslauf und nach dem Einlauf ist kaum oder gar nicht vorhanden, was sich in der Konzentrations-Zeit-Kurve widerspiegelt.

Ab Zeitpunkt 08:30 fällt die Dialysatkonzentration bei allen Patienten drastisch in den einstelligen mg/L-Bereich aufgrund der Einbringung der Extraneal®-Flüssigkeit, welche kein Aztreonam enthielt. Obwohl demnach in der Flüssigkeit eigentlich kein Wirkstoff mehr nachgewiesen werden dürfte, gibt es mögliche Erklärungen für das Vorkommen von Aztreonam in dem entnommenen Dialysat. Zum einen ist davon auszugehen, dass nach dem letzten Cycler-Durchlauf die eingebrachte Menge Physioneal® mit Aztreonam nicht vollständig entfernt werden kann, da anzunehmen ist, dass durch den verzweigten Aufbau des Bauchraums immer ein Restvolumen zurückbleiben wird. Zum anderen verläuft der Stoffaustausch über die Peritonealmembran bidirektional. Sobald das wirkstofffreie Extraneal® in den Bauchraum eingebracht wird, stellt das Blut das Kompartiment mit der höheren Aztreonamkonzentration dar. Demnach könnte es aufgrund dieser Bidirektionalität möglich sein, dass es zu einer Rückresorption aus dem Blut in das Dialysat kommt.

Ebenfalls zu erwähnen ist die Abweichung der $t_{\max}$ bei den Patienten 2 und 4. Wie eingangs beschrieben, müsste die höchste Konzentration des Dialysats bei der Einbringung in den Bauchraum am Zeitpunkt 00:00 liegen. Doch beide Patienten zeigen ihre $C_{\max}$ zeitversetzt (P2 02:00, P4 01:30). Diese Irregularität lässt sich eventuell durch einen menschlichen Fehler erklären. Es ist möglich, dass die Proben nicht zeitgerecht gezogen werden konnten und demnach ein gewisser Teil des Wirkstoffes bereits absorbiert wurde. Ebenfalls denkbar wäre, dass es nach der Probennahme zu einer Verwechslung oder fehlerhaften Beschriftung der Proben gekommen ist. Um einen internen Fehler der Universität Wien auszuschließen, wurden die Proben ein weiteres Mal in der Division analysiert; das Phänomen der zeitversetzten $C_{\max}$ zeigte sich jedoch auch in der wiederholten Messung.

In weiterer Folge wurden die Serumproben vermessen. Die Konzentrations-Zeit-Kurven aller sechs Patienten zeigen den typischen Verlauf eines Stoffes mit einer Kinetik 1. Ordnung, welcher extravasal appliziert wurde. Diese sogenannte Bateman-Funktion veranschaulicht das Zusammenspiel von Absorption und Elimination eines Wirkstoffes im Organismus. Die Kurve zeigt einen steilen Anstieg der Konzentration aus dem Nullpunkt heraus, da es anfangs fast ausschließlich zu Absorptionsprozessen und noch quasi keiner Elimination kommt. Sobald das Konzentrationsmaximum erreicht ist, wendet sich die Kurve und es folgt ein Abfall der

Plasmakonzentration, da nun die Eliminationsrate des Stoffes überwiegt. Die vorliegenden Kurven folgen diesem Trend ausnahmslos, doch bildet sich bei P1, P2 und P3 eine Art Konzentrationsplateau um die $C_{\max}$. Bei diesen Patienten weisen zwei Zeitpunkte nacheinander beinahe idente Messwerte auf, was zu der Annahme führt, dass sich über diesen Zeitraum Absorption und Elimination die Waage halten. Die wahren $C_{\max}$ - und $t_{\max}$ -Werte dieser Patienten liegen womöglich innerhalb dieses Bereiches. Am Zeitpunkt 08:30 zeigen alle Kurven einen steilen Konzentrationsabfall, da hier den Patienten die Flüssigkeit Extraneal® verabreicht wurde, welche nicht mit Aztreonam versetzt war. Ab diesem Punkt kann kein Aztreonam mehr über das Peritoneum absorbiert haben, es finden also nur mehr Eliminationsprozesse aus dem Blut statt.

Die in dieser Arbeit angeführten Absorptionsraten von Aztreonam errechnen sich aus der $C_{\max}$ dividiert durch die initiale Konzentration der eingebrachten Dialyseflüssigkeit. Sie sind demnach nur ein ungefährender Richtwert für die Absorptionskapazität, da viele beeinflussende Faktoren nicht in die Berechnung miteinbezogen werden konnten. Zum einen erfolgt bereits während der Absorption eine Elimination aus dem Blut, die individuelle Eliminationsrate der Patienten müsste demnach bestimmt und in die Berechnung inkludiert werden. Auch die Mehrfachapplikation des Wirkstoffes durch die periodische Einbringung neuer Dialyseflüssigkeit und die daraus resultierende erneute Einstellung eines Stoffgleichgewichts zwischen Dialysat und Blut beeinflusst die Absorptionsrate. Schlussendlich spielt auch die Wiederfindungsrate eine entscheidende Rolle, da nur die Menge an Wirkstoff, deren Plasmaproteinbindung im Zuge der Aufarbeitung gelöst wurde, mittels der Analysenmethode erfasst werden kann. Da jedoch in den Wiederfindungsexperimenten (siehe Kapitel 4.1.3) eine mittlere Wiederfindungsrate von 104,04% festgestellt wurde, kann in diesem Fall von einer Wiederfindungsrate von 100% ausgegangen werden.

Doch trotz dieser approximativen Absorptionsrate korrelieren die Ergebnisse der Serummessungen mit den aufgestellten Hypothesen der Dialysatwerte. Diejenigen Patienten, welche Konzentrationsanstiege zu den Einlaufzeiten neuer Dialyseflüssigkeit zeigen, weisen ebenfalls eine höhere Absorptionsrate und $C_{\max}$ auf (P3 und P5). Das verfestigt die Annahme, dass diese Anstiege der Konzentrationskurve durch eine schnelle Absorption über das Peritoneum zusammenhängen könnten. Somit sieht sich der erste Teil der Fragestellung dieser Arbeit als beantwortet: das Antibiotikum Aztreonam kann über das Peritoneum aufgenommen werden. Bei einer Gabe von 2 g in 5000 mL ($c = 400 \text{ mg/L}$) zeigen die Patienten eine mittlere $C_{\max}$ von 23,13 mg/L und eine mittlere $t_{\max}$ von 5,58 h.

Der zweite Teil der Fragestellung dreht sich um die Möglichkeit der Therapie einer Peritonitis bakteriellen Ursprungs über intraperitoneale Gabe von Aztreonam. Um solch eine Entzündung effektiv zu behandeln, muss die minimale Hemmkonzentration erreicht werden, daher ist ein ausreichender systemischer Spiegel notwendig, welcher für jeden bakteriellen Erreger, aber auch für jedes eingesetzte Antibiotikum individuell ist.

Tabelle 25 - MIC₉₀ diverser Keime [17]

Beispielkeim	MIC ₉₀
<i>Escherichia coli</i> (EC)	0,25 mg/L
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (KP)	0,25 mg/L
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA)	8 mg/L
<i>Staphylococcus aureus</i> (SA)	132 mg/L

In dieser Arbeit sind zur Veranschaulichung vier Beispielkeime gewählt worden, welche häufig mit der Entstehung einer Peritonitis assoziiert werden. In Tabelle 25 sind die korrespondierenden MIC₉₀ dieser Erreger gelistet.

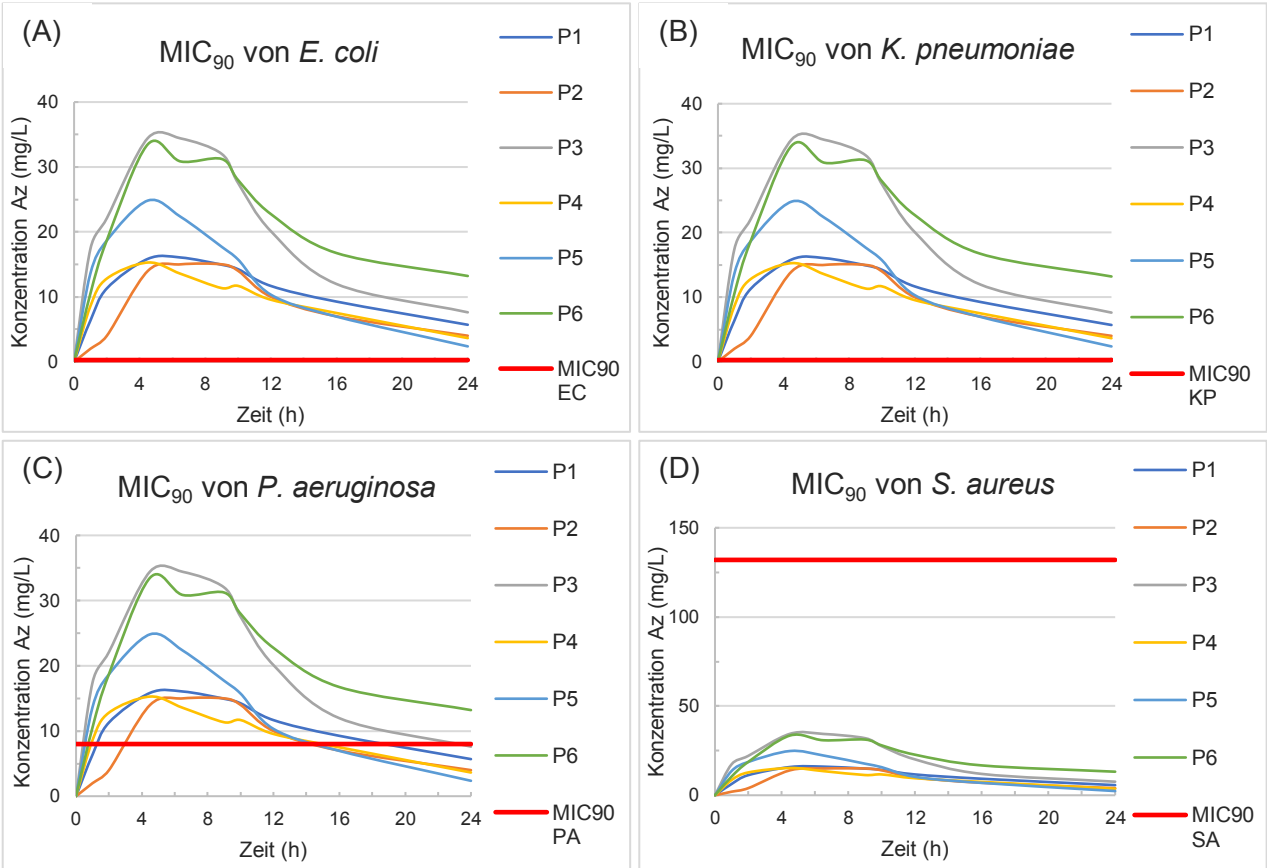


Abbildung 18 - Darstellung der MIC₉₀ der Beispielkeime in den Serumkurven

Wie in Abbildung 18 erkennbar, erreicht Aztreonam die MIC₉₀ von *Escherichia coli* (A) sowie von *Klebsiella pneumoniae* (B) bei allen Patienten bereits ab Zeitpunkt 01:30. Bauchfellinfektionen, welche durch den Erreger *Pseudomonas aeruginosa* hervorgerufen wurden, zeigen oftmals schwerer Krankheitsverläufe und höhere Hospitalisierungsraten als Peritonitiden anderen Ursprungs, weshalb hier eine effektive Behandlung ausschlaggebend ist [13]. Auch hier zeigt die intraperitoneale Gabe bei allen Patienten innerhalb von drei Stunden nach der initialen Applikation einen ausreichenden Plasmaspiegel zur Behandlung von *P. aeruginosa* (C). Zwar werden meisten Peritonealdialyse-assoziierten Peritonitiden durch Staphylokokken oder Streptokokken ausgelöst [23], aber Abbildung 18 zeigt auf, dass die MIC₉₀ des Hospitalismuskeims *Staphylococcus aureus* bei weitem nicht durch die Gabe der gegebenen Konzentration an Aztreonam über das Peritoneum erreicht werden kann (D). Hier ist anzumerken, dass es sich bei *S. aureus* um einen gram-positiven Keim handelt. Besitzt zwar Aztreonam eine geringe bakterizide Aktivität gegenüber gram-positiven Erregern, doch zeigt (D) sehr anschaulich, dass eine ausgesprochen hohe Plasmakonzentration benötigt wird, um diesen Erreger im Körper zu vernichten. Aztreonam kann bei solch einer Infektion also nicht als Mittel der Wahl gegeben werden; im Falle gram-negativer Peritonitiden, zeigt es dennoch auch über die intraperitoneale Gabe vielversprechende Ergebnisse. Es ist allerdings zu bedenken, dass die teilnehmenden Patienten der Studie keine bestehende Peritonitis aufweisen durften. Durch die Belastung des Körpers während einer solchen Infektion könnten sich jedoch wichtige pharmakokinetische Parameter wie Absorption und Elimination verändern. Aus diesem Grund ist es wichtig, weitere Untersuchungen mit einem größerem und möglicherweise erkranktem Patientenkollektiv durchzuführen, um konkrete Aussagen über die Eignung intraperitoneal applizierten Aztreonams treffen zu können.

6. Conclusio

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die beobachteten Konzentrationsanstiege in den Dialysatkurven bei allen Patienten mehr oder minder mit den Einlaufzeiten neuer Dialyseflüssigkeit decken. Bei zeitversetztem oder ausbleibendem Anstieg wird eine niedrigere Absorptionsrate des betreffenden Patienten vermutet. Ab dem Zeitpunkt 08:30 kommt es bei allen Patienten zu einem klaren Abfall der Aztreonamkonzentration in den Dialysatproben, da hier reine Dialyseflüssigkeit ohne Wirkstoff in den Bauchraum eingebracht wurde. Daher konnten nur mehr Rückstände von Aztreonam in den Proben detektiert werden.

Die Serumproben aller sechs Patienten zeigen den Verlauf einer Bateman-Funktion. Die Hälfte der Patienten weisen keine klare $C_{\max}$ auf, daher ist anzunehmen, dass sich das wahre Konzentrationsmaximum zwischen zwei Messpunkten befindet. Die Ergebnisse der Serumwerte decken sich mit der Annahme, dass die Konzentrationsanstiege im Dialysat mit der Absorptionsrate zusammenhängen, da die Patienten, die eine hohe Absorption vorweisen ebenfalls die Anstiege der Kurven zu den tatsächlichen Einlaufzeiten zeigen.

Über die intraperitoneale Applikation einer Dialyseflüssigkeit mit der Konzentration 400 mg/L wird die MIC_{90} von den drei gram-negativen Beispielkeimen *E. coli*, *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* mit Leichtigkeit erreicht, die MIC_{90} des gram-positiven *S. aureus* jedoch nicht. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Literatur über die geringe, jedoch vorhandene Aktivität Aztreonams gegenüber gram-positiven Erregern.

Abschließend lässt sich sagen, dass bei Patienten mit gesundem Peritoneum Aztreonam in relevanten Mengen über das Bauchfell in das Blut aufgenommen und somit womöglich ein weiterer Behandlungsweg gram-negativer Peritonitiden geschaffen werden kann.

7. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

(<i>m/z</i>)	Masse/Ladungs-Verhältnis
APD	Automated Peritoneal Dialysis
Az	Aztreonam
CAPD	Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis
CE	Collision Energy, Kollisionsenergie
C _{max}	Maximale Plasmakonzentration
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser, doppelt-deionisiertes Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser, deionisiertes Wasser
EPS	Enkapsulierende peritoneale Sklerose
ESBL	Extended Spectrum β -Lactamase
ESI	Elektrosprayionisation
ESRD	End-stage Renal Disease
FA	Formic Acid, Ameisensäure
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HD	Hämodialyse
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
im	intramuskulär
ip	intraperitoneal
ISPD	International Society for Peritoneal Dialysis
iv	intravenös
KO	Körperoberfläche

MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MHK, MIC	Minimale Hemmkonzentration, Minimal Inhibitory Concentration
MIC ₅₀	Minimale Konzentration, die nötig ist um 50% der Bakterienstämme zu hemmen
MIC ₉₀	Minimale Konzentration, die nötig ist um 90% der Bakterienstämme zu hemmen
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrometer
NIPD	Nocturnal Intermittent Peritoneal Dialysis
NP HPLC	Normal-Phase HPLC, Normalphasen-Chromatographie
PBP3	Penicillin-bindendes Protein 3
PD	Peritonealdialyse
PDAP	Peritonealdialyse-assoziierte Peritonitis
Q1	Quadrupol 1
Q2, q	Quadrupol 2
Q3	Quadrupol 3
QC	Quality Control
QqQ	Triple Quadrupol
RP HPLC	Reversed-Phase HPLC, Umkehrphasen-Chromatographie
RRT	Renal Replacement Therapy
RSD	Relative Standardabweichung
SD	Standardabweichung
SIM	Selected Ion Monitoring
t _{1/2}	Halbwertszeit
t _{max}	Zeit, in der die maximale Plasmakonzentration erreicht wurde

TOF Time-Of-Flight

UK Universitätskrankenhaus

Abbildungs-, Diagramm- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1 - System der Peritonealdialyse [6]	2
Abbildung 2 - Physiologischer Aufbau des Peritoneums [6].....	3
Abbildung 3 - Regimen einer CAPD [10]	4
Abbildung 4 - Regimen einer APD [10]	5
Abbildung 5 - Regimen einer NIPD [10].....	5
Abbildung 6 - Regimen einer CCPD [10]	5
Abbildung 7 - Struktur des Monobactams Aztreonam [18].....	8
Abbildung 8 - Schematischer Aufbau eines HPLC-Systems [29].....	17
Abbildung 9 - Struktureller Aufbau des Silicagels [30].....	18
Abbildung 10 - Prozessschritte der chemischen Modifizierung von Silicagel [30]	18
Abbildung 11 - Schematische Darstellung der Elektrosprayionisation [35].....	20
Abbildung 12 - Schematische Darstellung eines Quadrupols [33]	21
Abbildung 13 - Abbildung eines Triple Quadrupols [39]	22
Abbildung 14 - Darstellung der Gradientenelution.....	24
Abbildung 15 - Eichgerade A.....	26
Abbildung 16 - Eichgerade B.....	27
Abbildung 17 - Eichgerade C	28
Abbildung 18 - Darstellung der MIC ₉₀ der Beispielkeime in den Serumkurven	53
Diagramm 1 - Aztreonamkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 1	35
Diagramm 2 - Aztreonamkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 2	36
Diagramm 3 - Aztreonamkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 3	37
Diagramm 4 - Aztreonamkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 4	38
Diagramm 5 - Aztreonamkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 5	39
Diagramm 6 - Aztreonamkonzentrationen der Dialysatproben von Patient 6	40
Diagramm 7 - Überblick der Dialysatmesswerte von Patient 1 bis Patient 6	41
Diagramm 8 - Aztreonamkonzentrationen der Serumproben von Patient 1	42
Diagramm 9 - Aztreonamkonzentrationen der Serumproben von Patient 2	43
Diagramm 10 - Aztreonamkonzentrationen der Serumproben von Patient 3	44
Diagramm 11 - Aztreonamkonzentrationen der Serumproben von Patient 4	45
Diagramm 12 - Aztreonamkonzentrationen der Serumproben von Patient 5	46
Diagramm 13 - Aztreonamkonzentrationen der Serumproben von Patient 6	47
Diagramm 14 - Überblick der Serummesswerte von Patient 1 bis Patient 6	48

Tabelle 1 - Bestandteile des Analysen-Systems.....	13
Tabelle 2 - Verwendete Geräte und Materialien	13
Tabelle 3 - Zusammensetzung der Dialyseflüssigkeit Physioneal® [24].....	15
Tabelle 4 – Zusammensetzung des künstlichen Serums Reflotron® Precinorm U [25]	16
Tabelle 5 - Verwendete Substanzen und Reagentien	16
Tabelle 6 - Fließmittelzusammensetzung der Gradientenelution	24
Tabelle 7 - Konzentrationen der Eichgerade A	25
Tabelle 8 - Konzentrationen der Eichgerade B	26
Tabelle 9 - Konzentrationen der Eichgerade C	27
Tabelle 10 - Abnahmezeitpunkte der Patientenproben.....	29
Tabelle 11 - Abkürzungen der Proben	29
Tabelle 12 - Wiederfindungsraten pro Versuchsreihe.....	34
Tabelle 13 - Ergebnisse P1 IPD	35
Tabelle 14 - Ergebnisse P2 IPD	36
Tabelle 15 - Ergebnisse P3 IPD	37
Tabelle 16 - Ergebnisse P4 IPD	38
Tabelle 17 - Ergebnisse P5 IPD	39
Tabelle 18 - Ergebnisse P6 IPD	40
Tabelle 19 - Ergebnisse P1 IPS	42
Tabelle 20 - Ergebnisse P2 IPS	43
Tabelle 21 - Ergebnisse P3 IPS	44
Tabelle 22 - Ergebnisse P4 IPS	45
Tabelle 23 - Ergebnisse P5 IPS	46
Tabelle 24 - Ergebnisse P6 IPS	47
Tabelle 25 - MIC ₉₀ diverser Keime [17]	53

Quellenangabe

- [1] T. Liyanage *et al.*, “Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: A systematic review,” *Lancet*, vol. 385, no. 9981, pp. 1975–1982, 2015.
- [2] L. A. Inker and S. Titan, “Measurement and Estimation of GFR for Use in Clinical Practice: Core Curriculum 2021,” *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 78, no. 5, pp. 736–749, 2021.
- [3] A. C. Webster, E. V. Nagler, R. L. Morton, and P. Masson, “Chronic Kidney Disease,” *Lancet*, vol. 389, no. 10075, pp. 1238–1252, 2017.
- [4] J. Perl and J. Bargman, “Peritoneal dialysis: From bench to bedside and bedside to bench,” *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.*, vol. 311, no. 5, pp. 999–1004, 2016.
- [5] M. H. Maxwell, R. E. Rockney, C. R. Kleeman, and M. R. Twiss, “Peritoneal dialysis. 1. Technique and applications,” *J. Am. Med. Assoc.*, vol. 170, no. 8, pp. 917–924, 1959.
- [6] I. Teitelbaum, “Peritoneal dialysis,” *N Engl J Med*, vol. 385, no. 19, pp. 1786–1795, 2021.
- [7] M. S. Paniagua R, Ventura Mde J, Rodríguez E, Sil J, Galindo T, Hurtado ME, Alcántara G, Chimalpopoca A, González I, Sanjurjo A, Barrón L, Amato D, “Impact of fill volume on peritoneal clearances and cytokine appearance in peritoneal dialysis,” *Perit Dial Int.*, vol. 24, no. 2, pp. 156–62, 2004.
- [8] S. C. Blackburn and M. P. Stanton, “Anatomy and physiology of the peritoneum,” *Semin. Pediatr. Surg.*, vol. 23, no. 6, pp. 326–330, 2014.
- [9] I. Teitelbaum and J. Burkart, “Peritoneal Dialysis,” *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 42, no. 5, pp. 1082–1096, 2003.
- [10] “<https://advancedrenaeducation.com/wp/parep/article/peritoneal-dialysis-pd-modalities/>.” .
- [11] P. K. T. Li *et al.*, “Changes in the worldwide epidemiology of peritoneal dialysis,” *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 13, no. 2, pp. 90–103, 2017.
- [12] L. Zazzeroni, G. Pasquinelli, E. Nanni, V. Cremonini, and I. Rubbi, “Comparison of Quality of Life in Patients Undergoing Hemodialysis and Peritoneal Dialysis: A Systematic Review and Meta-Analysis,” *Kidney Blood Press. Res.*, vol. 42, no. 4, pp. 717–727, 2017.
- [13] J. Bernardini, B. Piraino, and M. Sorkin, “Analysis of continuous ambulatory peritoneal dialysis-related *Pseudomonas aeruginosa* infections,” *Am. J. Med.*, vol. 83, no. 5, pp. 829–832, 1987.
- [14] P. K. T. Li *et al.*, “ISPD Peritonitis Recommendations: 2016 Update on Prevention and Treatment,” *Perit. Dial. Int.*, vol. 36, no. 5, pp. 481–508, 2016.
- [15] J. Morelle *et al.*, “Interstitial fibrosis restricts osmotic water transport in encapsulating peritoneal sclerosis,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 26, no. 10, pp. 2521–2533, 2015.

- [16] H. C. Neu, "Aztreonam: the first monobactam," *Med. Clin. North Am.*, vol. 72, no. 3, pp. 555–566, 1988.
- [17] N. H. Georgopapadakou, S. A. Smith, and R. B. Sykes, "Mode of Action of Azthreonam," *Biochemistry*, vol. 21, no. 6, pp. 950–956, 1982.
- [18] "<https://scifinder-n-cas-org.uaccess.univie.ac.at/search/substance/62b1e6880884c04aa777baec/1>."
- [19] D. H. Johnson and B. A. Cunha, "Aztreonam," *Med. Clin. North Am.*, vol. 79, no. 4, pp. 733–743, 1995.
- [20] K. Bush and P. A. Bradford, " β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview," *Cold Spring Harb. Perspect. Meddicine*, no. Table 1, p. 22, 2016.
- [21] C. Ramsey and A. P. MacGowan, "A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of aztreonam," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 71, no. 10, pp. 2704–2712, 2016.
- [22] E. A. Swabb, "Review of the clinical pharmacology of the monobactam antibiotic aztreonam," *Am. J. Med.*, vol. 78, no. 2A, pp. 11–18, 1985.
- [23] S. A. Zelenitsky *et al.*, "Microbiological trends and antimicrobial resistance in peritoneal dialysis-related peritonitis, 2005 to 2014," *Perit. Dial. Int.*, vol. 37, no. 2, pp. 170–176, 2017.
- [24] Baxter Deutschland GmbH, "PHYSIONEAL 40 Glucose: Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels." 2017.
- [25] Roche Diagnostics GmbH, "Reflotron Precinorm U." 2008.
- [26] I. M. Bird, "High performance liquid chromatography: Principles and clinical applications," *Br. Med. J.*, vol. 299, no. 6702, pp. 783–787, 1989.
- [27] F. Blum, "High performance liquid chromatography," *Br. J. Hosp. Med.*, vol. 75, no. 2, pp. 18–21, 2014.
- [28] R. Kazakevich, Yuri; LoBrutto, *HPLC For Pharmaceutical Scientists*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2007, pp. 9-13.
- [29] "<https://mpl.loesungsfabrik.de/blog/hplc/hplc-anlage-einfach-erklart>."
- [30] "<https://mz-at.de/chromatographie/fluessigchromatographie/fuellmaterialien/silica-trennsaeulen/>."
- [31] R. Kazakevich, Yuri; LoBrutto, *HPLC For Pharmaceutical Scientists*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2007, pp. 100.
- [32] I. C. Guerrera and O. Kleiner, "Application of mass spectrometry in proteomics," *Biosci. Rep.*, vol. 25, no. 1–2, pp. 71–93, 2005.
- [33] M. H. Gey, *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*, (2. überar.) Springer, Berlin, Heidelberg, 2008, pp. 261-276.
- [34] U. Ritgen, *Analytische Chemie II*. Springer Spektrum Berlin, Heidelberg, 2020, pp. 12.

- [35] U. H. Kebarle, Paul; Verkerk, "Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now," *Mass Spectrom Rev*, vol. 28, no. 6, pp. 898–917, 2009.
- [36] S. Banerjee and S. Mazumdar, "Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte," *Int. J. Anal. Chem.*, vol. 2012, pp. 1–40, 2012.
- [37] J. F. March, Raymond E.; Todd, *Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry*, 2. Edition. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2005.
- [38] G. Hopfgartner, E. Varesio, V. Tschäppät, C. Grivet, E. Bourgogne, and L. A. Leuthold, "Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules," *J. Mass Spectrom.*, vol. 39, no. 8, pp. 845–855, 2004.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] C. Pinter, "Masterarbeit in Vorbereitung," Universität Wien, 2022.

Daten

Vollständige Messdaten zu den Kapiteln 4.2. Ergebnisse der Dialysatproben und 4.3. Ergebnisse der Serumproben.

P1 IPD		PA (peak area)	c (ng/ml) 1:400	c (mg/L)	Mean (mg/L)	SD (mg/L)	RSD (%)
00:00	a	5.41e+006	914,00	365,60	369,60	6,58	1,78
	b	5.41e+006	915,00	366,00			
	c	5.57e+006	943,00	377,20			
01:30	a	2.91e+006	483,00	193,20	194,67	1,29	0,66
	b	2.94e+006	488,00	195,20			
	c	2.94e+006	489,00	195,60			
02:00	a	2.15e+006	353,00	141,20	142,53	1,67	1,17
	b	2.19e+006	361,00	144,40			
	c	2.16e+006	355,00	142,00			
03:00	a	1.90e+006	312,00	124,80	125,60	0,69	0,55
	b	1.92e+006	315,00	126,00			
	c	1.92e+006	315,00	126,00			
03:30	a	1.72e+006	281,00	112,40	111,87	0,92	0,83
	b	1.70e+006	277,00	110,80			
	c	1.72e+006	281,00	112,40			
04:30	a	1.22e+006	196,00	78,40	78,00	0,40	0,51
	b	1.20e+006	194,00	77,60			
	c	1.21e+006	195,00	78,00			
05:00	a	1.33e+006	215,00	86,00	86,53	0,61	0,71
	b	1.33e+006	216,00	86,40			
	c	1.34e+006	218,00	87,20			
06:00	a	8.59e+005	136,00	54,40	54,80	0,69	1,26
	b	8.54e+005	136,00	54,40			
	c	8.74e+005	139,00	55,60			
06:30	a	1.26e+006	204,00	81,60	81,33	0,46	0,57
	b	1.26e+006	204,00	81,60			
	c	1.25e+006	202,00	80,80			
07:45	a	8.34e+005	132,00	52,80	52,40	0,69	1,32
	b	8.17e+005	129,00	51,60			
	c	8.31e+005	132,00	52,80			
08:30	a	1.52e+005	18,20	7,28	7,67	0,35	4,56
	b	1.62e+005	19,90	7,96			
	c	1.59e+005	19,40	7,76			
09:00	a	1.66e+005	20,50	8,20	8,36	0,14	1,73
	b	1.68e+005	21,00	8,40			
	c	1.69e+005	21,20	8,48			
10:00	a	1.71e+005	21,30	8,52	8,53	0,06	0,72
	b	1.70e+005	21,20	8,48			
	c	1.71e+005	21,50	8,60			
12:00	a	1.33e+005	15,10	6,04	6,11	0,06	1,00
	b	1.35e+005	15,40	6,16			

	c	1.34e+005	15,30	6,12			
16:00	a	1.21e+005	13,10	5,24	5,31	0,06	1,15
	b	1.23e+005	13,40	5,36			
	c	1.22e+005	13,30	5,32			
20:00	a	1.03e+005	10,10	4,04	3,83	0,27	6,99
	b	9.54e+004	8,82	3,53			
	c	1.01e+005	9,80	3,92			
24:00	a	7.33e+004	5,15	2,06	2,17	0,17	7,74
	b	7.78e+004	5,91	2,36			
	c	7.37e+004	5,22	2,09			

P2 IPD		PA (peak area)	c (ng/ml) 1:400	c (mg/L)	Mean (mg/L)	SD (mg/L)	RSD (%)
00:00	a	1.09e+006	175,00	70,00	69,87	0,61	0,87
	b	1.08e+006	173,00	69,20			
	c	1.10e+006	176,00	70,40			
01:30	a	1.43e+006	233,00	93,20	92,40	0,80	0,87
	b	1.41e+006	229,00	91,60			
	c	1.43e+006	231,00	92,40			
02:00	a	4.24e+006	711,00	284,40	283,73	1,51	0,53
	b	4.25e+006	712,00	284,80			
	c	4.20e+006	705,00	282,00			
03:00	a	2.52e+006	417,00	166,80	168,27	1,89	1,12
	b	2.54e+006	419,00	167,60			
	c	2.58e+006	426,00	170,40			
03:30	a	2.52e+006	416,00	166,40	166,53	1,01	0,60
	b	2.51e+006	414,00	165,60			
	c	2.54e+006	419,00	167,60			
04:30	a	1.98e+006	326,00	130,40	131,07	0,61	0,47
	b	2.00e+006	328,00	131,20			
	c	2.01e+006	329,00	131,60			
05:00	a	1.90e+006	311,00	124,40	123,87	1,29	1,04
	b	1.91e+006	312,00	124,80			
	c	1.87e+006	306,00	122,40			
06:00	a	1.50e+006	243,00	97,20	97,07	0,61	0,63
	b	1.50e+006	244,00	97,60			
	c	1.48e+006	241,00	96,40			
06:30	a	1.18e+006	190,00	76,00	76,80	0,80	1,04
	b	1.19e+006	192,00	76,80			
	c	1.20e+006	194,00	77,60			
07:45	a	1.31e+006	213,00	85,20	86,67	1,62	1,87
	b	1.33e+006	216,00	86,40			
	c	1.36e+006	221,00	88,40			
08:30	a	2.70e+005	37,90	15,16	15,00	0,31	2,08
	b	2.62e+005	36,60	14,64			
	c	2.71e+005	38,00	15,20			
	a	1.33e+005	15,10	6,04			

09:00	b	1.29e+005	14,50	5,80	5,88	0,14	2,36
	c	1.29e+005	14,50	5,80			
10:00	a	2.77e+005	39,10	15,64	15,75	0,12	0,78
	b	2.78e+005	39,30	15,72			
	c	2.81e+005	39,70	15,88			
12:00	a	2.11e+005	28,10	11,24	11,28	0,18	1,63
	b	2.15e+005	28,70	11,48			
	c	2.10e+005	27,80	11,12			
16:00	a	1.30e+005	14,60	5,84	6,11	0,23	3,84
	b	1.35e+005	15,50	6,20			
	c	1.36e+005	15,70	6,28			
20:00	a	7.60e+004	5,61	2,24	2,39	0,15	6,38
	b	7.80e+004	5,94	2,38			
	c	8.07e+004	6,37	2,55			
24:00	a	6.42e+004	3,64	1,46	1,38	0,08	6,03
	b	6.34e+004	3,50	1,40			
	c	6.18e+004	3,23	1,29			

P3 IPD		PA (peak area)	c (ng/ml) 1:400	c (mg/L)	Mean (mg/L)	SD (mg/L)	RSD (%)
00:00	a	6.59e+006	1120,00	448,00	448,00	4,00	0,89
	b	6.62e+006	1130,00	452,00			
	c	6.55e+006	1110,00	444,00			
01:30	a	2.84e+006	471,00	188,40	186,53	1,80	0,97
	b	2.81e+006	466,00	186,40			
	c	2.79e+006	462,00	184,80			
02:00	a	2.74e+006	454,00	181,60	181,73	2,20	1,21
	b	2.71e+006	449,00	179,60			
	c	2.77e+006	460,00	184,00			
03:00	a	7.72e+005	122,00	48,80	48,67	0,61	1,26
	b	7.62e+005	120,00	48,00			
	c	7.82e+005	123,00	49,20			
03:30	a	1.64e+006	268,00	107,20	108,13	0,83	0,77
	b	1.66e+006	271,00	108,40			
	c	1.67e+006	272,00	108,80			
04:30	a	9.67e+005	154,00	61,60	61,33	0,23	0,38
	b	9.57e+005	153,00	61,20			
	c	9.56e+005	153,00	61,20			
05:00	a	8.15e+005	129,00	51,60	51,47	0,61	1,19
	b	8.04e+005	127,00	50,80			
	c	8.20e+005	130,00	52,00			
06:00	a	5.28e+005	81,00	32,40	32,83	0,44	1,34
	b	5.42e+005	83,20	33,28			
	c	5.35e+005	82,00	32,80			
06:30	a	1.18e+006	190,00	76,00	76,53	0,46	0,60
	b	1.19e+006	192,00	76,80			
	c	1.19e+006	192,00	76,80			

07:45	a	3.96e+005	58,80	23,52	23,44	0,14	0,59
	b	3.92e+005	58,20	23,28			
	c	3.95e+005	58,80	23,52			
08:30	a	1.15e+005	12,00	4,80	4,67	0,12	2,47
	b	1.12e+005	11,50	4,60			
	c	1.12e+005	11,50	4,60			
09:00	a	7.84e+004	6,01	2,40	2,35	0,08	3,36
	b	7.63e+004	5,65	2,26			
	c	7.82e+004	5,97	2,39			
10:00	a	1.90e+005	24,50	9,80	9,88	0,08	0,81
	b	1.91e+005	24,70	9,88			
	c	1.92e+005	24,90	9,96			
12:00	a	1.81e+005	23,10	9,24	8,99	0,28	3,16
	b	1.78e+005	22,60	9,04			
	c	1.73e+005	21,70	8,68			
16:00	a	7.74e+004	5,83	2,33	2,32	0,14	6,06
	b	7.92e+004	6,13	2,45			
	c	7.50e+004	5,43	2,17			
20:00	a	5.41e+004	1,96	0,78	0,75	0,05	7,21
	b	5.39e+004	1,92	0,77			
	c	5.26e+004	1,71	0,68			
24:00	a	9.39e+004	8,58	3,43	3,28	0,24	7,23
	b	8.75e+004	7,52	3,01			
	c	9.35e+004	8,51	3,40			

P4 IPD		PA (peak area)	c (ng/ml) 1:400	c (mg/L)	Mean (mg/L)	SD (mg/L)	RSD (%)
00:00	a	4.11e+006	389,00	155,60	152,93	2,34	1,53
	b	4.04e+006	380,00	152,00			
	c	4.02e+006	378,00	151,20			
01:30	a	4.48e+006	439,00	175,60	177,73	2,01	1,13
	b	4.55e+006	449,00	179,60			
	c	4.53e+006	445,00	178,00			
02:00	a	3.42e+006	307,00	122,80	124,40	1,60	1,29
	b	3.45e+006	311,00	124,40			
	c	3.48e+006	315,00	126,00			
03:00	a	3.10e+006	273,00	109,20	108,27	1,01	0,93
	b	3.05e+006	268,00	107,20			
	c	3.09e+006	271,00	108,40			
03:30	a	2.00e+006	165,00	66,00	66,13	0,23	0,35
	b	2.01e+006	166,00	66,40			
	c	2.00e+006	165,00	66,00			
04:30	a	9.48e+005	74,40	29,76	30,05	0,58	1,93
	b	9.45e+005	74,20	29,68			
	c	9.77e+005	76,80	30,72			
05:00	a	6.56e+005	50,80	20,32	20,27	0,21	1,01
	b	6.59e+005	51,10	20,44			

	c	6.47e+005	50,10	20,04			
06:00	a	7.44e+005	57,90	23,16	22,87	0,27	1,16
	b	7.28e+005	56,60	22,64			
	c	7.33e+005	57,00	22,80			
06:30	a	1.00e+006	79,00	31,60	30,95	0,66	2,13
	b	9.84e+005	77,40	30,96			
	c	9.63e+005	75,70	30,28			
07:45	a	1.08e+006	85,60	34,24	34,32	0,33	0,95
	b	1.08e+006	85,10	34,04			
	c	1.10e+006	86,70	34,68			
08:30	a	9.50e+004	7,17	2,87	2,87	0,05	1,68
	b	9.33e+004	7,04	2,82			
	c	9.64e+004	7,28	2,91			
09:00	a	1.76e+005	13,40	5,36	5,36	0,12	2,24
	b	1.73e+005	13,10	5,24			
	c	1.80e+005	13,70	5,48			
10:00	a	2.31e+005	17,60	7,04	7,05	0,10	1,43
	b	2.35e+005	17,90	7,16			
	c	2.29e+005	17,40	6,96			
12:00	a	2.20e+005	16,70	6,68	6,68	0,12	1,80
	b	2.15e+005	16,40	6,56			
	c	2.23e+005	17,00	6,80			
16:00	a	1.67e+005	12,70	5,08	5,11	0,08	1,63
	b	1.71e+005	13,00	5,20			
	c	1.67e+005	12,60	5,04			
20:00	a	1.11e+005	8,41	3,36	3,33	0,03	0,87
	b	1.10e+005	8,29	3,32			
	c	1.10e+005	8,28	3,31			
24:00	a	7.16e+004	5,40	2,16	2,19	0,03	1,55
	b	7.39e+004	5,57	2,23			
	c	7.28e+004	5,49	2,20			

P5 IPD		PA (peak area)	c (ng/ml) 1:400	c (mg/L)	Mean (mg/L)	SD (mg/L)	RSD (%)
00:00	a	4.91e+006	503,00	201,20	197,73	4,39	2,22
	b	4.88e+006	498,00	199,20			
	c	4.78e+006	482,00	192,80			
01:30	a	2.66e+006	228,00	91,20	91,20	0,40	0,44
	b	2.67e+006	229,00	91,60			
	c	2.65e+006	227,00	90,80			
02:00	a	3.75e+006	346,00	138,40	138,40	1,20	0,87
	b	3.73e+006	343,00	137,20			
	c	3.78e+006	349,00	139,60			
03:00	a	1.18e+006	93,30	37,32	37,03	0,76	2,06
	b	1.19e+006	94,00	37,60			
	c	1.14e+006	90,40	36,16			
	a	1.46e+006	117,00	46,80			

03:30	b	1.44e+006	115,00	46,00	46,80	0,80	1,71
	c	1.48e+006	119,00	47,60			
04:30	a	1.17e+006	92,90	37,16	37,65	0,60	1,59
	b	1.21e+006	95,80	38,32			
	c	1.18e+006	93,70	37,48			
05:00	a	1.75e+006	143,00	57,20	55,47	1,51	2,73
	b	1.69e+006	137,00	54,80			
	c	1.67e+006	136,00	54,40			
06:00	a	8.44e+005	66,00	26,40	26,77	0,40	1,50
	b	8.70e+005	68,00	27,20			
	c	8.54e+005	66,80	26,72			
06:30	a	1.75e+006	143,00	57,20	57,60	0,69	1,20
	b	1.75e+006	143,00	57,20			
	c	1.79e+006	146,00	58,40			
07:45	a	8.66e+005	67,70	27,08	27,23	0,52	1,89
	b	8.88e+005	69,50	27,80			
	c	8.58e+005	67,00	26,80			
08:30	a	1.32e+005	10,00	4,00	4,00	0,00	0,00
	b	1.33e+005	10,00	4,00			
	c	1.33e+005	10,00	4,00			
09:00	a	1.20e+005	9,04	3,62	3,70	0,07	1,98
	b	1.24e+005	9,38	3,75			
	c	1.23e+005	9,33	3,73			
10:00	a	9.77e+004	7,38	2,95	2,97	0,01	0,41
	b	9.82e+004	7,42	2,97			
	c	9.85e+004	7,44	2,98			
12:00	a	1.09e+005	8,25	3,30	3,27	0,03	0,87
	b	1.07e+005	8,11	3,24			
	c	1.08e+005	8,16	3,26			
16:00	a	7.90e+004	5,95	2,38	2,38	0,04	1,61
	b	7.75e+004	5,84	2,34			
	c	8.00e+004	6,03	2,41			
20:00	a	4.66e+004	3,50	1,40	1,38	0,04	3,06
	b	4.45e+004	3,34	1,34			
	c	4.71e+004	3,54	1,42			
24:00	a	3.54e+004	2,65	1,06	1,05	0,02	2,32
	b	3.59e+004	2,69	1,08			
	c	3.44e+004	2,57	1,03			

P6 IPD		PA (peak area)	c (ng/ml) 1:400	c (mg/L)	Mean (mg/L)	SD (mg/L)	RSD (%)
00:00	a	8.75e+006	774,00	309,60	308,27	1,67	0,54
	b	8.67e+006	766,00	306,40			
	c	8.73e+006	772,00	308,80			
01:30	a	1.46e+006	116,00	46,40	46,00	0,40	0,87
	b	1.44e+006	115,00	46,00			
	c	1.43e+006	114,00	45,60			

02:00	a	3.42e+006	280,00	112,00	111,07	1,01	0,91
	b	3.36e+006	275,00	110,00			
	c	3.40e+006	278,00	111,20			
03:00	a	1.44e+006	115,00	46,00	46,13	0,61	1,32
	b	1.43e+006	114,00	45,60			
	c	1.47e+006	117,00	46,80			
03:30	a	1.63e+006	131,00	52,40	52,93	0,92	1,75
	b	1.64e+006	131,00	52,40			
	c	1.68e+006	135,00	54,00			
04:30	a	1.95e+006	156,00	62,40	63,20	0,80	1,27
	b	1.99e+006	160,00	64,00			
	c	1.97e+006	158,00	63,20			
05:00	a	1.53e+006	122,00	48,80	48,80	0,00	0,00
	b	1.53e+006	122,00	48,80			
	c	1.53e+006	122,00	48,80			
06:00	a	1.30e+006	104,00	41,60	41,87	0,46	1,10
	b	1.33e+006	106,00	42,40			
	c	1.31e+006	104,00	41,60			
06:30	a	1.21e+006	95,90	38,36	38,20	0,16	0,42
	b	1.20e+006	95,50	38,20			
	c	1.20e+006	95,10	38,04			
07:45	a	9.06e+005	71,80	28,72	28,81	0,47	1,62
	b	9.25e+005	73,30	29,32			
	c	8.96e+005	71,00	28,40			
08:30	a	1.74e+005	13,50	5,40	5,39	0,02	0,43
	b	1.73e+005	13,40	5,36			
	c	1.74e+005	13,50	5,40			
09:00	a	1.76e+005	13,70	5,48	5,60	0,21	3,71
	b	1.87e+005	14,60	5,84			
	c	1.76e+005	13,70	5,48			
10:00	a	2.07e+005	16,10	6,44	6,48	0,11	1,63
	b	2.05e+005	16,00	6,40			
	c	2.11e+005	16,50	6,60			
12:00	a	2.13e+005	16,70	6,68	6,53	0,13	1,97
	b	2.07e+005	16,10	6,44			
	c	2.08e+005	16,20	6,48			
16:00	a	2.52e+005	19,70	7,88	7,83	0,06	0,78
	b	2.51e+005	19,60	7,84			
	c	2.49e+005	19,40	7,76			
20:00	a	1.55e+005	12,10	4,84	4,83	0,02	0,48
	b	1.55e+005	12,00	4,80			
	c	1.55e+005	12,10	4,84			
24:00	a	1.40e+005	10,90	4,36	4,37	0,02	0,53
	b	1.40e+005	10,90	4,36			
	c	1.42e+005	11,00	4,40			

P1 IPS		PA (peak area)	c (ng/ml) 1:4	c (mg/L)	Mean (mg/L)	SD (mg/L)	RSD (%)
00:00	a	6.33e+004	3,48	0,01	0,02	0,002	12,07
	b	6.14e+004	3,18	0,01			
	c	6.41e+004	3,61	0,01			
	d	6.73e+004	4,16	0,02			
	e	6.78e+004	4,23	0,02			
	f	6.80e+004	4,28	0,02			
01:00	a	8.85e+006	1530,00	6,12	6,36	0,253	3,98
	b	8.74e+006	1510,00	6,04			
	c	9.12e+006	1580,00	6,32			
	d	9.35e+006	1620,00	6,48			
	e	9.69e+006	1680,00	6,72			
	f	9.36e+006	1620,00	6,48			
02:00	a	1.64e+007	2950,00	11,80	11,30	0,623	5,51
	b	1.66e+007	2980,00	11,92			
	c	1.65e+007	2970,00	11,88			
	d	1.50e+007	2670,00	10,68			
	e	1.50e+007	2680,00	10,72			
	f	1.51e+007	2700,00	10,80			
04:30	a	2.09e+007	3860,00	15,44	15,85	0,306	1,93
	b	2.17e+007	4030,00	16,12			
	c	2.11e+007	3900,00	15,60			
	d	2.15e+007	3980,00	15,92			
	e	2.13e+007	3940,00	15,76			
	f	2.19e+007	4060,00	16,24			
06:30	a	2.23e+007	4150,00	16,60	16,05	0,460	2,87
	b	2.21e+007	4110,00	16,44			
	c	2.18e+007	4060,00	16,24			
	d	2.12e+007	3920,00	15,68			
	e	2.09e+007	3850,00	15,40			
	f	2.15e+007	3990,00	15,96			
09:00	a	2.03e+007	3740,00	14,96	14,94	0,219	1,46
	b	2.07e+007	3810,00	15,24			
	c	2.03e+007	3750,00	15,00			
	d	2.04e+007	3760,00	15,04			
	e	2.02e+007	3700,00	14,80			
	f	1.99e+007	3650,00	14,60			
10:00	a	1.94e+007	3550,00	14,20	14,25	0,167	1,17
	b	1.98e+007	3630,00	14,52			
	c	1.92e+007	3500,00	14,00			
	d	1.94e+007	3560,00	14,24			
	e	1.94e+007	3560,00	14,24			
	f	1.95e+007	3570,00	14,28			
12:00	a	1.63e+007	2940,00	11,76	11,67	0,383	3,28
	b	1.70e+007	3060,00	12,24			
	c	1.66e+007	2990,00	11,96			
	d	1.58e+007	2840,00	11,36			

	e	1.58e+007	2830,00	11,32			
	f	1.59e+007	2840,00	11,36			
16:00	a	1.29e+007	2270,00	9,08	9,26	0,205	2,22
	b	1.29e+007	2270,00	9,08			
	c	1.31e+007	2310,00	9,24			
	d	1.33e+007	2350,00	9,40			
	e	1.30e+007	2290,00	9,16			
	f	1.35e+007	2400,00	9,60			
24:00	a	8.14e+006	1400,00	5,60	5,69	0,146	2,57
	b	8.09e+006	1390,00	5,56			
	c	8.02e+006	1380,00	5,52			
	d	8.38e+006	1440,00	5,76			
	e	8.45e+006	1450,00	5,80			
	f	8.54e+006	1470,00	5,88			

P2 IPS		PA (peak area)	c (ng/ml) 1:4	c (mg/L)	Mean (mg/L)	SD (mg/L)	RSD (%)
00:00	a	2.43e+003	1,75	0,01	0,01	0,001	21,16
	b	3.17e+003	1,82	0,01			
	c	1.97e+004	0,94	0,00			
	d	2.45e+004	1,64	0,01			
	e	2.57e+004	1,81	0,01			
	f	2.36e+004	1,51	0,01			
01:00	a	4.14e+006	694,00	2,78	2,44	0,703	28,79
	b	4.13e+006	692,00	2,77			
	c	4.11e+006	689,00	2,76			
	d	1.57e+006	255,00	1,02			
	e	3.80e+006	635,00	2,54			
	f	4.17e+006	699,00	2,80			
02:00	a	5.53e+006	935,00	3,74	4,18	0,235	5,61
	b	6.38e+006	1090,00	4,36			
	c	6.42e+006	1090,00	4,36			
	d	6.09e+006	1030,00	4,12			
	e	6.25e+006	1060,00	4,24			
	f	6.31e+006	1070,00	4,28			
04:30	a	1.88e+007	3430,00	13,72	13,86	0,184	1,33
	b	1.89e+007	3460,00	13,84			
	c	1.88e+007	3430,00	13,72			
	d	1.94e+007	3550,00	14,20			
	e	1.89e+007	3440,00	13,76			
	f	1.91e+007	3480,00	13,92			
06:30	a	1.23e+007	2160,00	8,64	14,55	2,977	20,45
	b	2.06e+007	3800,00	15,20			
	c	2.12e+007	3920,00	15,68			
	d	6.34e+004	3700,00	14,80			
	e	2.22e+007	4140,00	16,56			
	f	2.21e+007	4110,00	16,44			

09:00	a	2.10e+007	3870,00	15,48	14,66	0,631	4,31
	b	2.02e+007	3720,00	14,88			
	c	1.99e+007	3650,00	14,60			
	d	1.86e+007	3390,00	13,56			
	e	1.98e+007	3640,00	14,56			
	f	2.02e+007	3720,00	14,88			
10:00	a	1.87e+007	3400,00	13,60	13,54	0,100	0,74
	b	1.87e+007	3400,00	13,60			
	c	1.85e+007	3370,00	13,48			
	d	1.86e+007	3400,00	13,60			
	e	1.84e+007	3340,00	13,36			
	f	1.87e+007	3400,00	13,60			
12:00	a	7.07e+006	1210,00	4,84	10,09	2,603	25,79
	b	1.57e+007	2810,00	11,24			
	c	1.60e+007	2870,00	11,48			
	d	1.46e+007	2600,00	10,40			
	e	1.59e+007	2860,00	11,44			
	f	1.56e+007	2790,00	11,16			
16:00	a	9.85e+006	1710,00	6,84	7,33	0,299	4,08
	b	1.04e+007	1810,00	7,24			
	c	1.03e+007	1800,00	7,20			
	d	1.10e+007	1920,00	7,68			
	e	1.08e+007	1880,00	7,52			
	f	1.07e+007	1870,00	7,48			
24:00	a	5.78e+006	980,00	3,92	3,87	0,093	2,41
	b	5.83e+006	987,00	3,95			
	c	5.83e+006	988,00	3,95			
	d	3.04e+004	928,00	3,71			
	e	5.70e+006	964,00	3,86			
	f	5.64e+006	954,00	3,82			

P3 IPS		PA (peak area)	c (ng/ml) 1:4	c (mg/L)	Mean (mg/L)	SD (mg/L)	RSD (%)
00:00	a	2.18e+004	1,24	0,00	0,01	0,001	12,35
	b	2.19e+004	1,26	0,01			
	c	2.25e+004	1,34	0,01			
	d	2.34e+004	1,48	0,01			
	e	2.47e+004	1,67	0,01			
	f	2.41e+004	1,58	0,01			
01:00	a	2.38e+007	4480,00	17,92	17,42	0,617	3,54
	b	2.39e+007	4500,00	18,00			
	c	2.39e+007	4490,00	17,96			
	d	2.24e+007	4180,00	16,72			
	e	2.24e+007	4180,00	16,72			
	f	2.30e+007	4300,00	17,20			
	a	2.83e+007	5500,00	22,00			
	b	2.78e+007	5380,00	21,52			

02:00	c	2.93e+007	5720,00	22,88	22,11	0,461	2,08
	d	2.83e+007	5490,00	21,96			
	e	2.83e+007	5490,00	21,96			
	f	2.87e+007	5590,00	22,36			
04:30	a	3.94e+007	8390,00	33,56	34,47	0,811	2,35
	b	4.00e+007	8600,00	34,40			
	c	3.96e+007	8460,00	33,84			
	d	4.13e+007	8970,00	35,88			
	e	4.01e+007	8600,00	34,40			
	f	4.03e+007	8680,00	34,72			
06:30	a	3.97e+007	8480,00	33,92	34,40	0,937	2,72
	b	3.93e+007	8370,00	33,48			
	c	3.93e+007	8360,00	33,44			
	d	4.03e+007	8690,00	34,76			
	e	4.06e+007	8760,00	35,04			
	f	4.12e+007	8940,00	35,76			
09:00	a	3.81e+007	8010,00	32,04	32,01	0,547	1,71
	b	3.89e+007	8250,00	33,00			
	c	3.81e+007	8030,00	32,12			
	d	3.78e+007	7950,00	31,80			
	e	3.75e+007	7850,00	31,40			
	f	3.78e+007	7930,00	31,72			
10:00	a	3.48e+007	7110,00	28,44	27,52	0,510	1,85
	b	3.38e+007	6850,00	27,40			
	c	3.40e+007	6900,00	27,60			
	d	3.40e+007	6890,00	27,56			
	e	3.34e+007	6750,00	27,00			
	f	3.35e+007	6780,00	27,12			
12:00	a	2.68e+007	5150,00	20,60	20,10	0,355	1,77
	b	2.64e+007	5050,00	20,20			
	c	2.59e+007	4930,00	19,72			
	d	2.62e+007	5020,00	20,08			
	e	2.58e+007	4920,00	19,68			
	f	2.65e+007	5080,00	20,32			
16:00	a	1.63e+007	2940,00	11,76	11,97	0,225	1,88
	b	1.63e+007	2930,00	11,72			
	c	1.64e+007	2960,00	11,84			
	d	1.68e+007	3030,00	12,12			
	e	1.70e+007	3070,00	12,28			
	f	1.68e+007	3020,00	12,08			
24:00	a	1.11e+007	1930,00	7,72	7,61	0,117	1,54
	b	1.11e+007	1930,00	7,72			
	c	1.10e+007	1920,00	7,68			
	d	1.09e+007	1890,00	7,56			
	e	1.08e+007	1880,00	7,52			
	f	1.07e+007	1860,00	7,44			

P4 IPS		PA (peak area)	c (ng/ml) 1:4	c (mg/L)	Mean (mg/L)	SD (mg/L)	RSD (%)
00:00	a	8.09e+003	< 0	0,00	0,00	0,000	0,00
	b	6.61e+003	< 0	0,00			
	c	8.10e+003	< 0	0,00			
	d	7.19e+003	< 0	0,00			
	e	6.52e+003	< 0	0,00			
	f	6.92e+003	< 0	0,00			
01:00	a	1.22e+007	2150,00	8,60	8,59	0,093	1,08
	b	1.24e+007	2180,00	8,72			
	c	1.24e+007	2170,00	8,68			
	d	1.22e+007	2140,00	8,56			
	e	1.21e+007	2120,00	8,48			
	f	1.21e+007	2130,00	8,52			
02:00	a	1.70e+007	3070,00	12,28	12,81	0,410	3,20
	b	1.81e+007	3290,00	13,16			
	c	1.84e+007	3350,00	13,40			
	d	1.76e+007	3190,00	12,76			
	e	1.73e+007	3130,00	12,52			
	f	1.76e+007	3190,00	12,76			
04:30	a	2.09e+007	3860,00	15,44	15,28	0,229	1,50
	b	2.06e+007	3810,00	15,24			
	c	2.11e+007	3910,00	15,64			
	d	2.04e+007	3750,00	15,00			
	e	2.05e+007	3780,00	15,12			
	f	2.07e+007	3810,00	15,24			
06:30	a	1.76e+007	3180,00	12,72	13,54	0,894	6,60
	b	1.75e+007	3160,00	12,64			
	c	1.77e+007	3210,00	12,84			
	d	1.98e+007	3640,00	14,56			
	e	1.94e+007	3550,00	14,20			
	f	1.95e+007	3570,00	14,28			
09:00	a	1.55e+007	2770,00	11,08	11,34	0,261	2,30
	b	1.58e+007	2820,00	11,28			
	c	1.54e+007	2760,00	11,04			
	d	1.58e+007	2840,00	11,36			
	e	1.62e+007	2910,00	11,64			
	f	1.62e+007	2910,00	11,64			
10:00	a	1.64e+007	2940,00	11,76	11,68	0,113	0,97
	b	1.64e+007	2950,00	11,80			
	c	1.60e+007	2870,00	11,48			
	d	1.63e+007	2920,00	11,68			
	e	1.62e+007	2910,00	11,64			
	f	1.63e+007	2930,00	11,72			
12:00	a	1.35e+007	2380,00	9,52	9,55	0,133	1,39
	b	1.34e+007	2370,00	9,48			
	c	1.33e+007	2340,00	9,36			
	d	1.35e+007	2380,00	9,52			

	e	1.37e+007	2420,00	9,68			
	f	1.37e+007	2430,00	9,72			
16:00	a	1.05e+007	1820,00	7,28	7,50	0,143	1,90
	b	1.08e+007	1880,00	7,52			
	c	1.06e+007	1850,00	7,40			
	d	1.09e+007	1900,00	7,60			
	e	1.10e+007	1920,00	7,68			
	f	5.39e+006	1880,00	7,52			
24:00	a	5.37e+006	911,00	3,64	3,64	0,031	0,85
	b	5.44e+006	908,00	3,63			
	c	5.31e+006	919,00	3,68			
	d	5.35e+006	897,00	3,59			
	e	5.41e+006	904,00	3,62			
	f	1.07e+007	914,00	3,66			

P5 IPS		PA (peak area)	c (ng/ml) 1:4	c (mg/L)	Mean (mg/L)	SD (mg/L)	RSD (%)
00:00	a	3.32e+003	< 0	0,00	0,00	0,000	0,00
	b	8.63e+003	< 0	0,00			
	c	9.09e+003	< 0	0,00			
	d	3.36e+003	< 0	0,00			
	e	2.95e+003	< 0	0,00			
	f	3.31e+003	< 0	0,00			
01:00	a	1.82e+007	3300,00	13,20	13,65	0,393	2,88
	b	1.84e+007	3350,00	13,40			
	c	1.83e+007	3320,00	13,28			
	d	1.91e+007	3490,00	13,96			
	e	1.91e+007	3500,00	14,00			
	f	1.92e+007	3510,00	14,04			
02:00	a	2.41e+007	4550,00	18,20	18,69	0,471	2,52
	b	2.49e+007	4710,00	18,84			
	c	2.45e+007	4630,00	18,52			
	d	2.55e+007	4850,00	19,40			
	e	2.50e+007	4740,00	18,96			
	f	2.41e+007	4550,00	18,20			
04:30	a	3.13e+007	6200,00	24,80	24,83	0,391	1,57
	b	3.13e+007	6210,00	24,84			
	c	3.09e+007	6110,00	24,44			
	d	3.20e+007	6390,00	25,56			
	e	3.12e+007	6190,00	24,76			
	f	3.10e+007	6140,00	24,56			
06:30	a	2.88e+007	5610,00	22,44	22,31	0,301	1,35
	b	2.81e+007	5440,00	21,76			
	c	2.90e+007	5660,00	22,64			
	d	2.86e+007	5560,00	22,24			
	e	2.88e+007	5610,00	22,44			
	f	2.87e+007	5590,00	22,36			

09:00	a	2.39e+007	4490,00	17,96	17,70	0,524	2,96
	b	2.43e+007	4600,00	18,40			
	c	2.40e+007	4510,00	18,04			
	d	2.31e+007	4320,00	17,28			
	e	2.33e+007	4380,00	17,52			
	f	2.28e+007	4250,00	17,00			
10:00	a	2.11e+007	3900,00	15,60	15,73	0,231	1,47
	b	2.10e+007	3890,00	15,56			
	c	2.11e+007	3900,00	15,60			
	d	2.14e+007	3960,00	15,84			
	e	2.18e+007	4040,00	16,16			
	f	2.11e+007	3910,00	15,64			
12:00	a	1.45e+007	2580,00	10,32	10,32	0,154	1,49
	b	1.48e+007	2630,00	10,52			
	c	1.47e+007	2610,00	10,44			
	d	1.44e+007	2560,00	10,24			
	e	1.42e+007	2520,00	10,08			
	f	1.45e+007	2580,00	10,32			
16:00	a	1.02e+007	1770,00	7,08	6,95	0,097	1,39
	b	1.00e+007	1740,00	6,96			
	c	1.01e+007	1750,00	7,00			
	d	1.00e+007	1740,00	6,96			
	e	9.81e+006	1700,00	6,80			
	f	9.92e+006	1720,00	6,88			
24:00	a	3.48e+006	580,00	2,32	2,36	0,048	2,01
	b	3.53e+006	590,00	2,36			
	c	3.45e+006	576,00	2,30			
	d	3.53e+006	590,00	2,36			
	e	3.58e+006	597,00	2,39			
	f	3.65e+006	609,00	2,44			

P6 IPS		PA (peak area)	c (ng/ml) 1:4	c (mg/L)	Mean (mg/L)	SD (mg/L)	RSD (%)
00:00	a	3.32e+003	12,60	0,05	0,06	0,008	0,00
	b	8.63e+003	12,60	0,05			
	c	9.09e+003	11,90	0,05			
	d	3.36e+003	16,20	0,06			
	e	2.95e+003	15,90	0,06			
	f	3.31e+003	16,50	0,07			
01:00	a	1.82e+007	2620,00	10,48	10,54	0,104	0,98
	b	1.84e+007	2600,00	10,40			
	c	1.83e+007	2620,00	10,48			
	d	1.91e+007	2650,00	10,60			
	e	1.91e+007	2650,00	10,60			
	f	1.92e+007	2670,00	10,68			
	a	2.41e+007	4620,00	18,48			
	b	2.49e+007	4550,00	18,20			

02:00	c	2.45e+007	4650,00	18,60	18,73	0,390	2,08
	d	2.55e+007	4690,00	18,76			
	e	2.50e+007	4760,00	19,04			
	f	2.41e+007	4820,00	19,28			
04:30	a	3.13e+007	8210,00	32,84	33,51	0,537	1,60
	b	3.13e+007	8590,00	34,36			
	c	3.09e+007	8280,00	33,12			
	d	3.20e+007	8460,00	33,84			
	e	3.12e+007	8360,00	33,44			
	f	3.10e+007	8360,00	33,44			
06:30	a	2.88e+007	8050,00	32,20	30,85	1,118	3,62
	b	2.81e+007	7950,00	31,80			
	c	2.90e+007	7780,00	31,12			
	d	2.86e+007	7720,00	30,88			
	e	2.88e+007	7360,00	29,44			
	f	2.87e+007	7410,00	29,64			
09:00	a	2.39e+007	8240,00	32,96	31,23	2,502	8,01
	b	2.43e+007	8360,00	33,44			
	c	2.40e+007	8520,00	34,08			
	d	2.31e+007	7280,00	29,12			
	e	2.33e+007	7230,00	28,92			
	f	2.28e+007	7220,00	28,88			
10:00	a	2.11e+007	7320,00	29,28	27,98	1,860	6,65
	b	2.10e+007	7460,00	29,84			
	c	2.11e+007	7470,00	29,88			
	d	2.14e+007	6560,00	26,24			
	e	2.18e+007	6590,00	26,36			
	f	2.11e+007	6570,00	26,28			
12:00	a	1.45e+007	5530,00	22,12	22,74	0,355	1,56
	b	1.48e+007	5780,00	23,12			
	c	1.47e+007	5670,00	22,68			
	d	1.44e+007	5720,00	22,88			
	e	1.42e+007	5750,00	23,00			
	f	1.45e+007	5660,00	22,64			
16:00	a	1.02e+007	4120,00	16,48	16,74	0,230	1,37
	b	1.00e+007	4120,00	16,48			
	c	1.01e+007	4200,00	16,80			
	d	1.00e+007	4270,00	17,08			
	e	9.81e+006	4210,00	16,84			
	f	9.92e+006	4190,00	16,76			
24:00	a	3.48e+006	3190,00	12,76	13,21	0,470	3,56
	b	3.53e+006	3160,00	12,64			
	c	3.45e+006	3250,00	13,00			
	d	3.53e+006	3430,00	13,72			
	e	3.58e+006	3360,00	13,44			
	f	3.65e+006	3420,00	13,68			