



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Quantifizierung von Azithromycin in Patientenproben“

verfasst von / submitted by

Katja Feiken

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

Wien, 2018 / Vienna, 2018

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

A 449

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

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

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

Inhaltsverzeichnis

1	Danksagung	5
2	Zusammenfassung	6
3	Abstract	7
4	Abkürzungsverzeichnis	8
5	Problemstellung – Zielsetzung	9
6	Einleitung	10
6.1	Lymphom	10
6.2	Lymphomtypen	10
6.2.1	Gutartige Lymphome	11
6.2.2	Maligne Lymphome - Hodgkin Lymphom (HL)	11
6.2.3	Maligne Lymphome – Non-Hodgkin Lymphom (NHL)	11
6.3	Non Hodgkin Lymphom - MALT Lymphom	12
6.3.1	Allgemeines	12
6.3.2	Vorkommen und Entstehung	13
6.3.3	Therapie und Behandlung	13
6.4	Studie AKH Wien	14
6.4.1	Ziel der Studie	14
6.4.2	Antibiotikum Azithromycin	14
6.4.2.1	Allgemeines	14
6.4.2.2	Pharmakodynamik und Wirkspektrum	15
6.4.2.3	Pharmakokinetik	16
6.4.3	Minimale-Hemm-Konzentration	16
6.4.4	Studiendesign & Dosierungsregime	17

7	Spezieller Teil / Ergebnisse	18
7.1	Analyse der Patientenproben	18
7.1.1	Plasmakonzentrationen Patient 1.....	19
7.1.2	Plasmakonzentrationen Patient 2.....	20
7.1.3	Plasmakonzentrationen Patient 3.....	21
7.1.4	Plasmakonzentrationen Patient 4.....	22
7.1.5	Plasmakonzentrationen Patient 5.....	23
7.1.6	Plasmakonzentrationen Patient 6.....	24
7.1.7	Plasmakonzentrationen Patient 7.....	25
7.1.8	Plasmakonzentrationen Patient 8.....	26
7.1.9	Plasmakonzentrationen Patient 10.....	27
7.1.10	Plasmakonzentrationen Patient 11.....	28
7.1.11	Plasmakonzentrationen Patient 12.....	29
7.1.12	Plasmakonzentrationen Patient 14.....	30
7.1.13	Plasmakonzentrationen Patient 15.....	31
7.1.14	Plasmakonzentrationen Patient 16.....	32
8	Diskussion & Schlussfolgerung	33
9	Experimenteller Teil.....	35
9.1	Quantifizierungsmethode	35
9.1.1	HPLC-High Performance Liquid Chromatography	35
9.1.2	MS – Massenspektrometer	36
9.1.2.1	ESI – Elektronensprayionisation.....	37
9.1.2.2	Triple-Quadrupol-Analysator.....	38
9.2	Methodenoptimierung.....	40
9.2.1	Optimierung der HPLC Parameter	40
9.2.2	Carry-over-Effekt.....	41

9.2.2.1 Wechsel der Säule	41
9.2.2.2 Wechsel der mobilen Phasen	41
9.2.2.3 User-defined wash programm (Udp)	42
9.2.2.4 Gradienten verändern.....	43
9.2.2.5 Weitere Einstellungen.....	44
9.2.3 Interner Standard	45
9.2.4 Optimierung der Triple Quadrupol MS Parameter	47
9.2.5 Probenaufarbeitung.....	48
9.2.6 Erstellung einer Eichgerade	49
9.3 Validierung der Analysenmethode.....	50
9.3.1 Linearität	50
9.3.2 Systemeignung	50
9.3.3 Spezifität	51
9.3.4 Methodenpräzision	51
9.3.5 Wiederholbarkeit	51
9.3.6 Tag zu Tag Präzision	52
9.3.7 Test auf Temperaturstabilität.....	52
9.4 Lösungsmittel, Reagenzien	53
9.5 Geräte	54
10 Abbildungsverzeichnis.....	56
11 Tabellenverzeichnis.....	58
12 Anhang.....	60
13 Literaturverzeichnis	88

1 Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei Frau Univ.-Prof. Dr. Verena Dirsch für die Bereitstellung meines Diplomarbeitsplatzes am Department für Pharmakognosie der Universität Wien bedanken.

Als nächstes bei Herrn Univ. Prof. Mag. Dr. Gottfried Reznicek der mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist und das sowohl fachlich, als auch menschlich. Lieber Gottfried, DANKE für deine unermüdliche Hilfsbereitschaft, deine aufmunternden Worte bei kleinen Rückschlägen und deinen einzigartigen Humor.

Weiters möchte ich mich beim ganzen Department der Pharmakognosie für die herzliche Aufnahme und grenzenlose Hilfsbereitschaft bedanken. Meine Zeit als Diplomandin hätte ich mir nicht schöner vorstellen können und ich bin froh, in einem so kompetenten Team arbeiten haben zu dürfen.

Der größte Dank gilt natürlich noch meiner Familie, ohne die ich dieses Studium nicht bewältigt hätte. Vor allem meiner Mama, die bei jeder Prüfung meines Studiums mit mir mitgefiebert und später mitgefeiert hat und mir endlos zur Seite gestanden ist. DANKE liebe Mama, dass du zu jeder Tages- und Nachtzeit pausenlos für mich da warst und immer an mich geglaubt hast.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meinem Freund und Lebensgefährten Helmut bedanken, der alle Emotionen des Studiums hautnah miterleben durfte, oder eher musste. Auch dir, lieber Heli, ein großes DANKE, dass du mich ununterbrochen unterstützt hast und für mich da warst, wenn ich dich gebraucht habe.

2 Zusammenfassung

Da das MALT (mucosa assoziiertes lymphatisches Gewebe) Lymphom vor allem durch bakterielle Erreger wie *Helicobacter pylori*, Chlamydien, *Campylobacter*, Borrelien und vielen weiteren ausgelöst wird, versucht man neben den herkömmlichen Methoden wie Chemotherapie, Strahlentherapie oder operativen Eingriffen, eine hochdosierte Langzeit-Antibiotika Therapie zur Heilung. Dies funktioniert auch sehr gut und in den meisten Fällen erreicht man sogar eine komplette Rückbildung des Lymphomgewebes. Um den Erfolg einer antibakteriellen Therapie zu messen, braucht man Faktoren wie die Antibiotika (AB) Konzentration im Blutplasma (= Plasmaspiegel) oder Gewebe (= Gewebespiegel) um diese mit der Minimalen-Hemm-Konzentration (MHK) für das zu bekämpfenden Bakterium vergleichen zu können. Nur wenn diese Hemmkonzentration erreicht, oder sogar überschritten wird, kann man von einer wirksamen Behandlung ausgehen, da nur so alle Bakterien abgetötet oder im Wachstum gehemmt werden. Andernfalls könnten einige Bakterien überleben und die Chance einer Resistenzentwicklung und somit dem Versagen der Therapie ist sehr groß. Da man bereits AB wie Doxycyclin und das ebenfalls zur Familie der Makrolide gehörende Clarithromycin versucht hat, wollte man nun Azithromycin, ein weiteres Makrolid AB, ausprobieren. Man möchte sich hier vor allem die lange Halbwertszeit und somit das verringerte Dosierungsintervall zu Nutze machen.

Diese Arbeit beschäftigt sich also mit der Quantifizierung des Makrolid Antibiotikums Azithromycin in Patientenplasma mit bestehendem MALT - Lymphom. Dafür wurden insgesamt 15 Patienten, welche im AKH Wien in Behandlung sind und an besagtem Lymphom leiden, in diese Untersuchung eingeschlossen. Anhand der erhobenen Daten lässt sich schlussfolgern, dass das getestete Antibiotika nur in geringer Konzentration im Plasma verbleibt und die MHK für die Bakterien nur teilweise erreicht. Dies zeigt sich dadurch, dass nach oraler Gabe nur eine durchschnittliche Plasmakonzentration von 55,89 ng/ml erreicht wurde und die Hemmkonzentrationen der Bakterien im Bereich von 30- 250 ng/ml liegen. Über geringe Plasmakonzentrationen und die extrem hohe intrazelluläre Anreicherung wird allerdings auch in der Literatur berichtet [1].

3 Abstract

Due to the fact that MALT (mucosa associate lymphoid tissue) lymphoma often occurs due to the Bacteria *Helicobacter pylori*, Chlamydia, *Campylobacter*, Borrelia and counting, a longterm high-dose antibiotic therapy seems effective.

The efficacy of an antibiotic therapy is measured based on the MIC (minimal inhibitory concentration). It is the lowest concentration of a chemical which prevents visible growth of a bacterium. So only above this concentrations all bacteria are going to be killed or inhibited in growth. Otherwise there will be some bacteria surviving and developing resistance and in the end, the therapy will not be successful.

In the recent past antibiotics like Doxycyclin and Clarithromycin exhibited a good efficacy against MALT lymphoma and now the antibiotic Azithromycin will be tested by reasons of a long half live and a lower dosage interval.

The aim of this work was the quantification of Azithromycin in plasma samples of patients suffering from MALT lymphoma. A total of 15 patients were treated in the AKH Vienna and participated in this examination.

Based on the results it can be shown that Azithromycin reaches only a low plasma concentration. There was only an average concentration of 55,89 ng/ml detected in the plasma samples. This means, the MIC of the bacteria which ranges from 30 to 250 ng/ml is only partially reached. The low plasma concentration of Azithromycin is often cited in literature [1].

4 Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotika/Antibiotikum
Abnahmedat.	Abnahmedatum
cA	Konzentration von Azithromycin
CALC.	Kalkulierte
cE	Konzentration von Erythromycin
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Lsg.	Lösung
MHK	Minimale-Hemm-Konzentration
MeOH	Methanol
MW	Mittelwert
NHK	Non-Hodgkin-Lymphom
Pat.	Patient
PF A	Peakfläche Azithromycin
PF E	Peakfläche Erythromycin
Pr.	Probe
RSD	Relative Standardabweichung
SD	Standardabweichung
STABWN	Standardabweichung
Temp.	Temperatur

5 Problemstellung – Zielsetzung

Aufgrund der Tatsache, dass der Therapieerfolg wie anfangs schon erwähnt, stark von den Konzentrationen des Antibiotikums in Gewebe und Plasma abhängt, kann man nur mit Hilfe entsprechender Analysen entscheiden, wie wirksam eine Therapie ist. Da manche Patienten besser auf die hochdosierte Langzeit-Antibiotika Therapie ansprechen als andere, müssen hier Untersuchungen durchgeführt werden. Daher wurde im Rahmen dieser Diplomarbeit eine Methode zur Quantifizierung der Plasmakonzentrationen des AB Azithromycins entwickelt. Anhand der ermittelten Mengen im Plasma kann man dann Rückschlüsse auf die Effizienz der Anwendung von Azithromycin zur Behandlung des MALT- Lymphoms ziehen.

Weiters wäre es wichtig, nicht nur die Konzentration von Azithromycin im Plasma sondern auch jene intrazellulär zu quantifizieren. Nur so bekommt man eine aussagekräftige und hilfreiche Einschätzung zur Wirksamkeit dieser hochdosierten Langzeit-Antibiotika Therapie. Eine niedrige Plasmakonzentration ist nämlich nicht gleichzusetzen mit einer geringen Wirksamkeit, wenn die Konzentration im Gewebe dafür deutlich höher ist. Darüber hinaus ist es auch wichtig, zuvor abzuklären, welches Bakterium für das Lymphom verantwortlich ist, um so die Dosierung der jeweiligen MHK anpassen zu können.

Ebenfalls sehr wichtig ist eine korrekte und gleichbleibende Plasmaabnahme und spätere Weiterverarbeitung. Dies sollte wenn möglich immer von derselben Person durchgeführt werden um so eine weitere Fehlerquelle zu verhindern. Auch sollte man darauf achten immer die gleichen Abnahmezeiten einzuhalten, da man natürlich auch so die Plasmakonzentrationen beeinflussen kann.

6 Einleitung

6.1 Lymphom

Unter dem Begriff „Lymphom“ versteht man bösartige Erkrankungen, die sich von Zellen des Abwehrsystems, genauer den B- oder T-Lymphozyten, herleiten. Daher treten sie, wie der Name schon vermuten lässt, meistens in Lymphknoten aber auch im Knochenmark und in der Milz auf. Allerdings können sie auch jedes andere menschliche Organ befallen [2].

Ein Lymphom zeigt sich normalerweise durch eine Anschwellung der Lymphknoten die von ein bis zwei Zentimeter bis hin zu zehn Zentimeter reichen kann. Bei aggressiveren Formen können durchaus auch Schmerzen auftreten. Grundsätzlich kommt es durch die Schwächung des Immunsystems zu typischen Anzeichen wie Gewichtsverlust, Übelkeit, ständige Müdigkeit, Blässe, anhaltendes Fieber, Nachtschweiß und Juckreiz am ganzen Körper [3].

Derzeit kann man anhand Gewebecharakteristik (Biopsie) oder Oberflächeneigenschaften der Lymphomzellen über 70 verschiedenen Unterarten unterscheiden. Diese Differenzierung erfolgt vor allem durch Eigenschaften wie Geschwindigkeit der Erkrankungsver schlechterung, Aggressivität, benötigte Therapie und Erfolgsaussichten. Somit bildet die Zuordnung der Erkrankung, zu einem bestimmten Lymphomtyp, eine entscheidende Basis in der Diagnose [2].

6.2 Lymphomtypen

Eine grobe Klassifikation erfolgt mit Hilfe der Einteilung in Hodgkin- und Non-Hodgkin Lymphomen. Wobei hier die Unterscheidung nur aufgrund des histologischen Nachweises von Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen beruht. Diese kommen nämlich nur beim Hodgkin Lymphom vor. Am wichtigsten ist allerdings die Einteilung nach der Bösartigkeit des Lymphoms, in gutartige, indolente (niedrig maligne), aggressive (hochmaligne) und sehr aggressive Formen [2].

6.2.1 Gutartige Lymphome

Nicht jede Lymphknotenschwellung bedeutet die Diagnose malignes Lymphom, da auch harmlose Infektionen Auslöser dieser Vergrößerung sein können. Jene gutartigen Schwellungen entstehen in der Regel durch eine Abwehrreaktion des Körpers auf die eingedrungenen Viren und Bakterien. Mit dem Abklingen der Infektion bilden sich in der Regel auch die Schwellungen zurück. Wichtig ist hier aber abzuschätzen, wie lange die Schwellung schon besteht und ob sie sich in sehr kurzen Abständen wieder rückbildet. Auch sehr harte, schmerzlose Vergrößerungen sind ein ernstzunehmendes Warnsignal und bedürfen einer dringlichen ärztlichen Abklärung.

6.2.2 Maligne Lymphome - Hodgkin Lymphom (HL)

Wie oben schon erwähnt, sind für diesen malignen Lymphom Typ die einkernigen Hodgkin- und die mehrkernigen Sternberg-Reed-Zellen charakteristisch. Dabei handelt es sich um Immunglobulin-Genumlagerungen und somatische Hypermutationen in den malignen Zellen. Diese, vor allem von den B-Lymphozyten ausgehende Krankheit, wurde nach ihrem Erstbeschreiber Thomas Hodgkin benannt. Hodgkin Lymphome machen ungefähr 30% aller Lymphomtypen aus wobei die Prävalenz bei 2-4/100.000/Jahr liegt. Es tritt vor allem um das 25. Lebensjahr, als ersten Häufigkeitsgipfel, und um das 60. Lebensjahr, als zweiten Gipfel, auf [4].

6.2.3 Maligne Lymphome – Non-Hodgkin Lymphom (NHL)

Obwohl die Ätiologie des NHL noch eher unbekannt ist, kann man sicher davon ausgehen, dass genetische Ursachen sowie Rauchen und verschiedenste Umweltnoxen die Entwicklung begünstigen. Durch eine gestörte Funktion des Immunsystems bei gleichzeitiger Immunstimulation wird die Entstehung des Lymphoms vorangetrieben. Weiters wird auch ein Zusammenhang zwischen einer Infektion mit onkogenen Viren wie Epstein-Barr-Viren, *Borrelia-burgdorferi*-Viren, Hepatitis-C-Viren oder dem Bakterium *Helicobacter pylori* (vor allem bei MALT Lymphom) und dem Auftreten eines NHL beschrieben [4] [5].

Folgende Noxen erhöhen das Risiko ebenfalls [5]:

- Autoimmunerkrankungen (wie Sjögren-Syndrom, rheumatoide Arthritis, Lupus- erythematoses, Zöliakie, Dermatitis herpetiformis)
- genetische Immundefekterkrankungen (Wiskott-Aldrich-Syndrom)
- erworbene Immundefekte (wie HIV)
- Immunsuppression (Azathioprin, Cyclosporin, Prednison)
- Rauchen
- Umweltnoxen (Herbizide, UV-Strahlung, organische Lösungsmittel)

Die Inzidenz für das NHL beträgt 12-15/100.000/ Jahr mit steigender Tendenz. Im Gegensatz zum HL liegt hier der Häufigkeitsgipfel aber im höheren Lebensalter, das heißt 50.-70. Lebensjahr. Außerdem sind Männer etwas häufiger betroffen als Frauen (Verhältnis: 1,2:1) und Patienten mit einer HIV-Infektion haben ein 1.000-fach erhöhtes Risiko an einem NHL zu erkranken [4].

6.3 Non Hodgkin Lymphom - MALT Lymphom

6.3.1 Allgemeines

Lymphome des mukosaassoziierten lymphatischen Gewebes (MALT, „mucosa-associated lymphoid tissue“) treten primär außerhalb von Lymphknoten auf. Sie stellen eine spezielle Form der NHL dar und gehören zur Gruppe der Marginalzonen Lymphome. Diese haben ihren Ursprung in B-Zellen der Marginalzone sekundärer Lymphofollikel. Sie entstehen im schleimhaut-assoziierten Lymphgewebe und zählen daher zu den extranodalen NHL. Mit etwa 7% aller neu diagnostizierten Lymphome gehören sie zu den relativ oft vorkommenden Lymphomtypen und der häufigste Entstehungsort ist der Magen mit 50% [6]. Der Magen besitzt eigentlich physiologisch kein organisiertes MALT, es wird jedoch durch chronische Antigenstimulation (vor allem durch *H. pylori*) gebildet.

Daher kann man auch bei 90% aller MALT-Lymphome das Bakterium *H. pylori* nachweisen [7]. Erstmals beschrieben wurde es 1983 von P. Isaacson, blieb aber lange unberücksichtigt. Grundsätzlich ist es durch einen sehr langsamen Verlauf gekennzeichnet, sodass es auch in fortgeschrittenen Stadien noch gut behandelbar ist und die Lebenserwartung nicht wesentlich einschränkt [8].

6.3.2 Vorkommen und Entstehung

Obwohl die Hälfte aller MALT Lymphome im Magen diagnostiziert wird, kann es auch in jedem anderen Organ des menschlichen Körpers auftreten. Zum Beispiel in Speicheldrüsen, Auge, Lunge, Schilddrüse sowie Darm um nur einige zu nennen [8]. Auslöser dafür sind vor allem chronische, entzündliche Infektionen, die durch die Bakterien *Helicobacter pylori* (Magen), *Campylobacter jejuni* (Dünndarm), *Borrelia burgdorferi* (Haut) und *Chlamydia psittaci* (Augen – Tränendrüsen) hervorgerufen werden [7] [9] [10]. Aber auch das lange Bestehen von Autoimmunerkrankungen (Sjögren Syndrom, Hashimoto Thyreoiditis) ist ausschlaggebend [8].

6.3.3 Therapie und Behandlung

Da vor allem verschiedene Bakterien die Ursache der Entstehung darstellen, ist es naheliegend, eine Antibiotika Therapie zur Heilung in Erwägung zu ziehen. Mit Hilfe dieser Methode wird das Bakterium nämlich nicht nur abgetötet, sondern auch das Magenlymphom in 75% der Fälle zur Rückbildung gebracht. Daher wird die Antibiotikatherapie bei MALT-Lymphomen mittlerweile auch schon als Standardtherapie angesehen [8].

Da die Rückbildung des Lymphoms bis zu 18 Monate lang dauern kann, ist eine Mindestbeobachtungszeit von einem Jahr unerlässlich. Bei fehlendem Ansprechen auf die Eradikationsbehandlung für *H. pylori* und andere Bakterien oder auch bei MALT-Lymphomen im fortgeschrittenen Stadium (Stadium II-III) spielt die Strahlentherapie, aber auch die Chemotherapie in Kombination mit einem monoklonalen Antikörper (z.B. Anti-CD20 Antikörper Rituximab) eine wichtige und hochwirksame Rolle [6]. Eine chirurgische Therapie ist mittlerweile nicht mehr Mittel der 1. Wahl, sondern wird nur mehr in Notfällen wie Perforation, Stenosen oder unstillbaren Blutungen des Lymphoms in Erwägung gezogen [11].

6.4 Studie AKH Wien

6.4.1 Ziel der Studie

Nachdem, wie oben schon erwähnt, die Antibiotikagabe die Standardtherapie bei MALT-Lymphomen darstellt und hier mit Hilfe des Tetracyclin Antibiotikums Doxycyclin und des Makrolid Antibiotikum Clarithromycin schon sehr vielversprechende Erfolge erreicht wurden, wollte man nun ein neues Antibiotikum ausprobieren.

Hier hat man sich im AKH Wien für das Makrolid Antibiotikum Azithromycin entschieden, bei dem man sich durch die lange Halbwertszeit und starke intrazelluläre Anreicherung einen besseren Therapieerfolg erhoffte.

6.4.2 Antibiotikum Azithromycin

6.4.2.1 Allgemeines

Das Makrolid Antibiotikum Azithromycin zählt zu den neuen, synthetisch hergestellten Makroliden und ist ein Abkömmling des Erythromycins. Dieses wurde erstmals 1952 aus Stoffwechselprodukten von *Streptomyces erythreus* isoliert. Leider ist Erythromycin bei saurem pH, bedingt durch eine Ketalbildung zweier funktioneller Gruppen sehr instabil. Verantwortlich dafür sind die Alkoholgruppe in C6 und die Ketogruppe in C9-Stellung (gekennzeichnet in Abbildung 1).

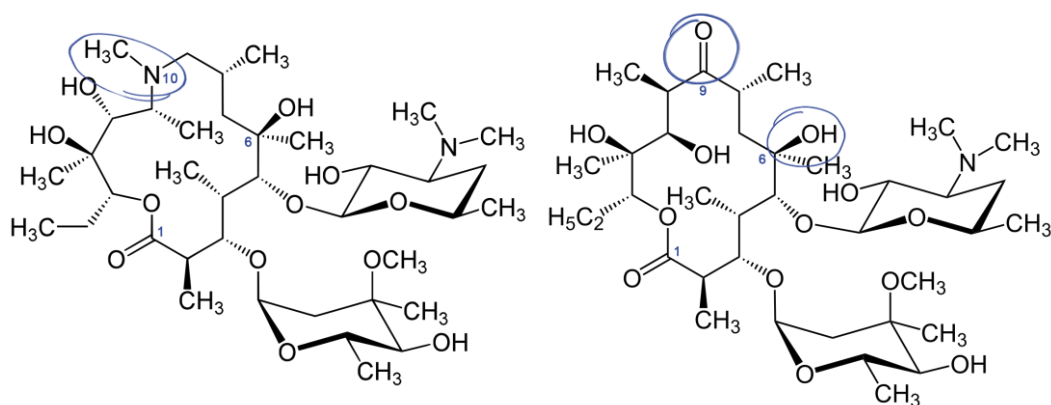


Abbildung 1: Azithromycin [12] und Erythromycin [13]

Es wurde versucht, bei den neueren Makroliden diese „Schwachstelle“ zu modifizieren, indem man den 14-gliedrigen Lactonring, durch eine zusätzliche N-Methylaminomethylen-Gruppe in Position 10, zu einem 15-gliedrigen Lactonring erweitert hat (siehe Abbildung 1).

Somit wird die Ketalbildung im Säuren verhindert und Azithromycin weist eine deutlich höhere Stabilität als die 14-gliedrigen Makrolide, zu denen das Erythromycin zählt, auf [1].

6.4.2.2 Pharmakodynamik und Wirkspektrum

Durch die bereits oben erläuterte positive chemische Modifikation weisen alle Derivate des Makrolidantibiotikums Erythromycins eine deutlich bessere Säurestabilität und Bioverfügbarkeit auf.

Das ist auch der Grund warum man bei oraler Therapie vor allem auf die neueren Makrolide zurückgreift. Sie wirken bakteriostatisch indem sie an die 50S Untereinheit der bakteriellen 70S Ribosomen binden und somit die Synthese von Proteinen hemmen. Es kommt also zum Abbruch der Eiweißsynthese und unfertige Polypeptide entstehen, welche zur wachstumshemmenden (=bakteriostatische) Wirkung führen.

Ihr Wirkspektrum ist sehr vielfältig und umfasst im Wesentlichen 4 Bereiche:

- Grampositive Bakterien
- Gramnegative Bakterien (*Neisseria*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Legionella*)
- Zellwandlose Bakterien (Mykoplasman, Chlamydien [verantwortlich für MALT Lymphom in den Augen], Rickettsien)
- Schraubenförmige Bakterien (Treponemen, Borrelien [verantwortlich für MALT Lymphom auf der Haut [10] [9]], *Campylobacter* [verantwortlich für MALT Lymphom des Dünndarms [14]]) [1].

6.4.2.3 Pharmakokinetik

Verschiedenste Einflüsse bestimmen die antibakterielle Aktivität der Makrolide. So kann es bei niedrigem pH-Wert zu einer Wirkungsabschwächung, die aber je nach Präparat unterschiedlich stark ausgeprägt ist, kommen. Weiters muss man auch berücksichtigen, dass sich jedes Makrolid unterschiedlich stark im Gewebe oder in Phagozyten anreichert und somit unterschiedlich hohe Konzentrationen am Ort der Infektion auftreten können. Azithromycin gehört zu jenen, die eine sehr hohe intrazelluläre Anreicherung haben, aufgrund der erhöhten Basizität. Somit bleiben die Plasmakonzentrationen von Azithromycin relativ niedrig und liegen nach oraler Einnahme von 250-500 mg nach 2 Stunden bei nur etwa 0,2-0,4 mg/L. Die Konzentration in der Magenmukosa beträgt dagegen zwischen 18,5-24,6 mg/kg [1] [15] [16].

Außerdem werden diese hohen Konzentrationen auch im Schleim gefunden, wo sie nach einer einzigen 500-mg-Dosis sogar bis zu 5 Tage in der Schleimhaut und im Schleim persistieren [15]. Charakteristisch für Azithromycin ist allerdings seine extrem lange Plasmahalbwertszeit von etwa 40 Stunden [1].

6.4.3 Minimale-Hemm-Konzentration

Die Minimale-Hemm-Konzentration (MHK) ist die niedrigste Antibiotikakonzentration, ab der eine bakteriostatische Hemmung auftritt. Liegt die Konzentration eines Antibiotikums nun über dieser MHK, so kann man einen chemotherapeutischen Erfolg erwarten. Demnach kommt es zu einem Misserfolg, wenn die MHK nicht überschritten wird. Daher sollte man vor einer Therapie wissen, welche Antibiotikakonzentration erreicht werden muss, um die Bakterien möglichst vollzählig abzutöten [1]. Im Fall von Azithromycin wird in der Literatur eine MHK im Plasma von 0,12-0,25 mg/L gegenüber *Helicobacter pylori* beschrieben. Die MHK 50 von Azithromycin, also jene Konzentration die die Vermehrung von zumindest 50% der Bakterien hemmt, beträgt 0,12 mg/L und die MHK 90 hingegen 0,25 mg/L [17]. Die MHK für *Chlamydia spp.* (*C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*) beträgt für Azithromycin 0,03-0,125 mg/L [18].

6.4.4 Studiendesign & Dosierungsregime

Durch ihr hohes Wirkungsspektrum haben Makrolid Antibiotika einen breiten therapeutischen Einsatz und stellen in vielen Fällen eine Alternative zu Penicillinen oder Tetracyclinen dar.

Die Standarddosierung bei Azithromycin beträgt 0,5 g/Tag für 3 oder 5 Tage. Aufgrund der langen Halbwertszeit und der hohen Anreicherung im Gewebe reicht bei den meisten Indikationen aber eine 3-tägige Therapie aus [16].

Bei der Studie am AKH Wien versuchte man, mithilfe einer hochdosierten-Langzeit Antibiotika Therapie das MALT-Lymphom zu bekämpfen. Hier verabreichte man den Patienten einmal in der Woche 1,5 g Azithromycin und das für mehrere Monate.

Bei der Studie und den weiteren Untersuchungen im Rahmen dieser Diplomarbeit nahmen 15 Patienten, welche alle an einem MALT-Lymphom leiden, teil. Während der ganzen Studiendauer wurde kein anderes Antibiotikum verabreicht und die Blutabnahme erfolgte immer einmal im Monat direkt vor einer neuerlichen Antibiotika Gabe. Das heißt, die letzte Antibiotika Verabreichung lag also genau 1 Woche zurück und demnach konnte man sogenannte Talspiegel erwarten. Darunter versteht man die am Ende eines Dosierungsintervalls gemessene Serumkonzentration. Diese würde bei einer Unterdosierung dementsprechend zu niedrig und bei einer Überdosierung oder einer Ausscheidungsinsuffizienz zu hoch sein [16].

7 Spezieller Teil / Ergebnisse

Alle Messwerte der Analysen der verschiedenen Patientenproben sind im Anhang ab Seite 60 in Tabelle 17 bis Tabelle 30 ersichtlich.

7.1 Analyse der Patientenproben

Bei den vom AKH Wien zur Verfügung gestellten Patientenproben handelte es sich um Plasmaproben von 15 Patienten mit einem MALT Lymphom, die bei -20 Grad C° gelagert wurden. Die Lymphome der Patienten traten in folgenden Körperregionen auf:

- im Magen
- in der Tränendrüse
- in der Lunge
- in der Parotis
- im Lymphknoten
- in der Niere
- subcutan

Die Proben wurden mit Hilfe eines speziellen Verfahrens aufgereinigt, um dann mittels LC-MS-MS quantifiziert werden zu können (Genaue Schritte im Kapitel 9.2.5).

Von jedem Patienten (außer Patienten 1, 4, 8 und 16) lagen 7 verschiedene, mit Abnahmedatum beschriftete Plasmaproben vor, die wie oben erwähnt, jeweils immer 1-mal im Monat, vor einer neuerlichen Gabe abgenommen wurden. Das heißt, diese Proben enthielten die niedrigste, erreichbare Plasmakonzentration, da nach Abnahme des Plasmas sofort wieder die neue Dosis des Antibiotikums verabreicht wurde.

7.1.1 Plasmakonzentrationen Patient 1

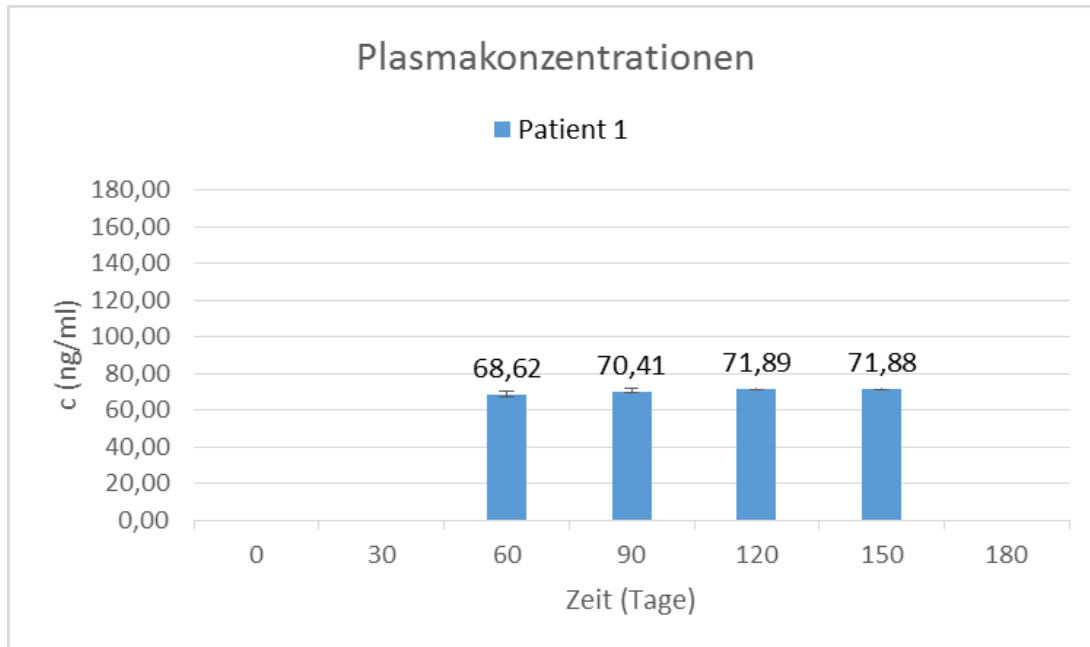


Abbildung 2: Plasmakonzentrationen Patient 1

Tabelle 1: Ergebnisse Patient 1

Zeit (Tage)	MW c (ng/ml)	STABWN
0	Probe fehlt	
30	Probe fehlt	
60	68,62	0,71
90	70,41	0,89
120	71,89	1,49
150	71,88	1,66
180	Probe fehlt	

7.1.2 Plasmakonzentrationen Patient 2

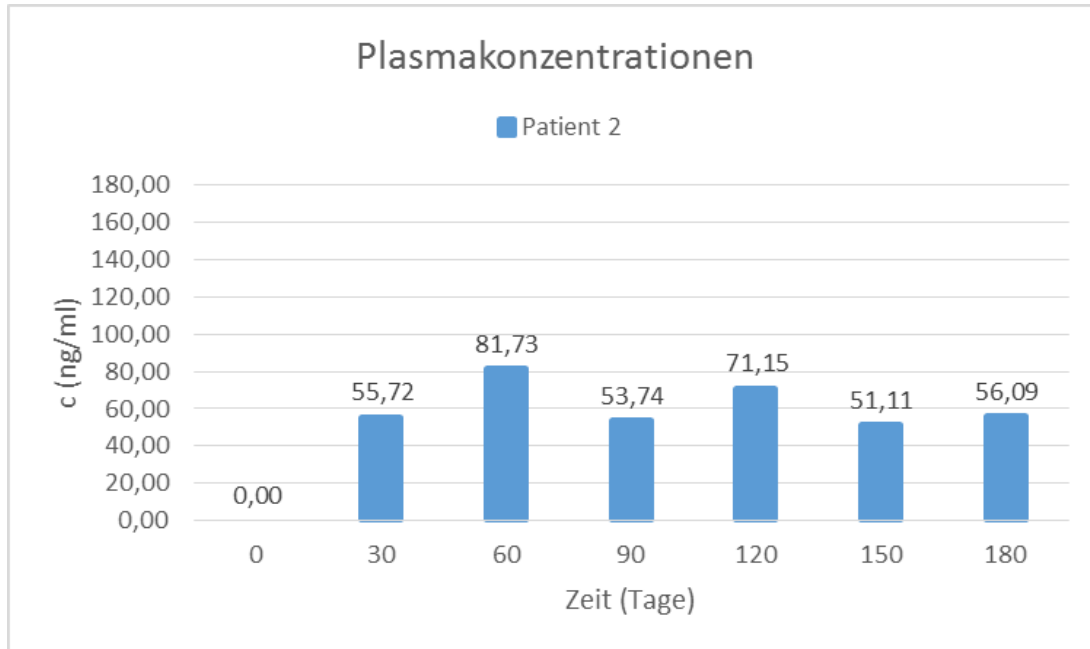


Abbildung 3: Plasmakonzentrationen Patient 2

Tabelle 2: Ergebnisse Patient 2

Zeit (Tage)	MW c (ng/ml)	STABWN
0	0,00	0,00
30	55,72	0,58
60	81,73	0,34
90	53,74	0,36
120	71,15	0,54
150	51,11	0,36
180	56,09	0,26

7.1.3 Plasmakonzentrationen Patient 3

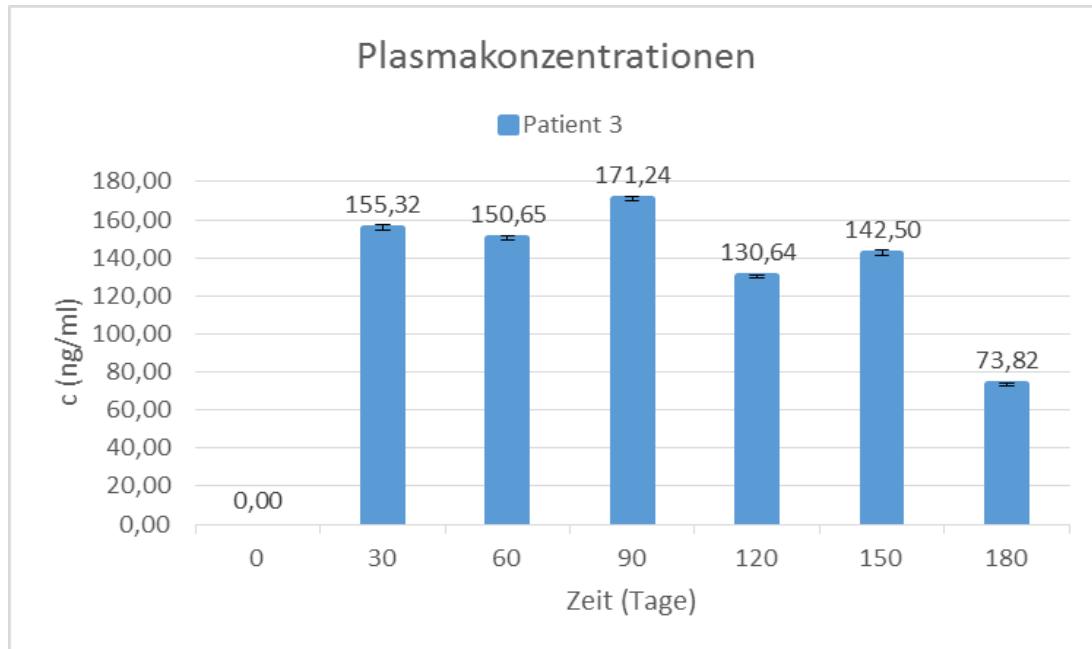


Abbildung 4: Plasmakonzentrationen Patient 3

Tabelle 3: Ergebnisse Patient 3

Zeit (Tage)	MW c (ng/ml)	STABWN
0	0,00	0,00
30	155,32	2,06
60	150,65	1,25
90	171,24	0,96
120	130,64	0,28
150	142,50	1,52
180	73,82	0,58

7.1.4 Plasmakonzentrationen Patient 4

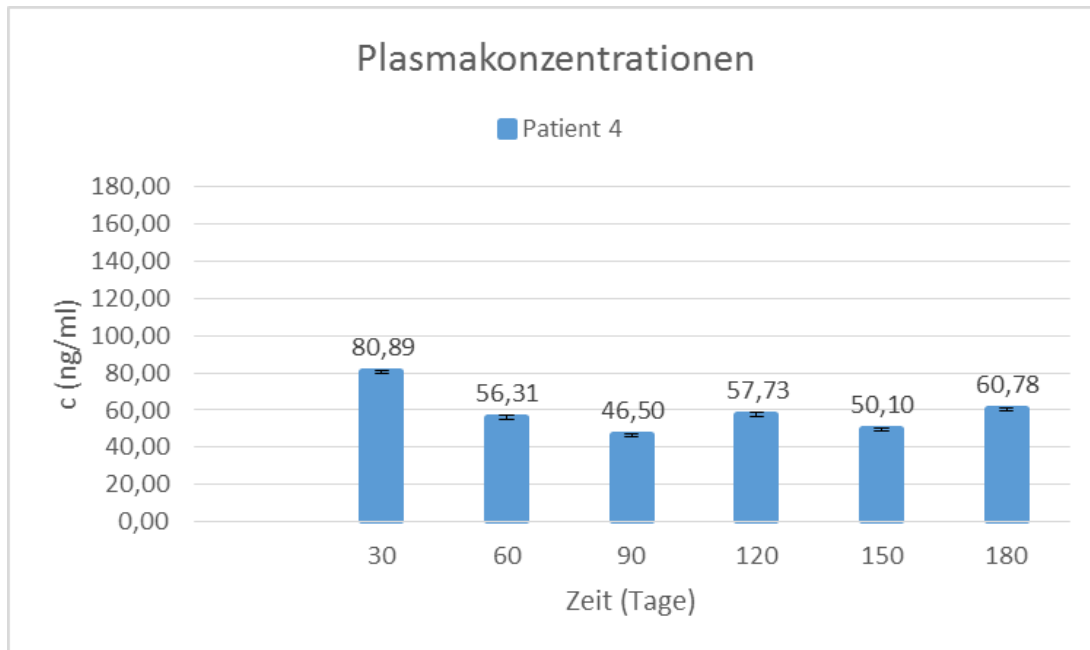


Abbildung 5: Plasmakonzentrationen Patient 4

Tabelle 4: Ergebnisse Patient 4

Zeit (Tage)	MW c (ng/ml)	STABWN
0	Probe fehlt	
30	80,89	0,07
60	56,31	0,85
90	46,50	0,38
120	57,73	0,77
150	50,10	0,03
180	60,78	0,42

7.1.5 Plasmakonzentrationen Patient 5

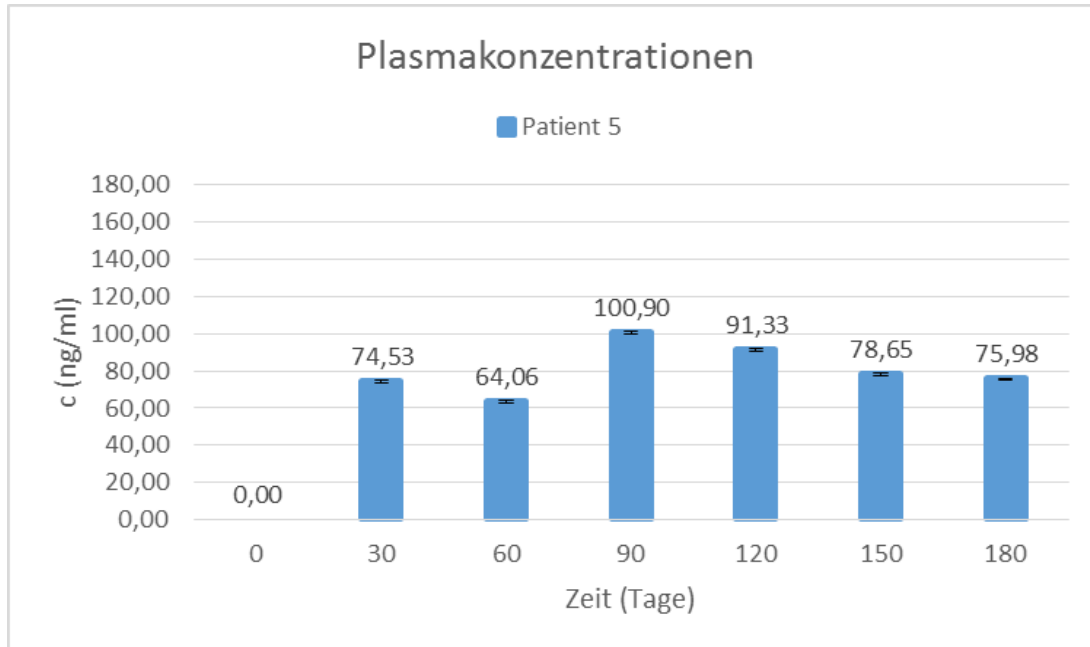


Abbildung 6: Plasmakonzentrationen Patient 5

Tabelle 5: Ergebnisse Patient 5

Zeit (Tage)	MW c (ng/ml)	STABWN
0	0,00	0,00
30	74,53	0,16
60	64,06	0,47
90	100,90	0,25
120	91,33	0,90
150	78,65	0,63
180	75,98	0,21

7.1.6 Plasmakonzentrationen Patient 6

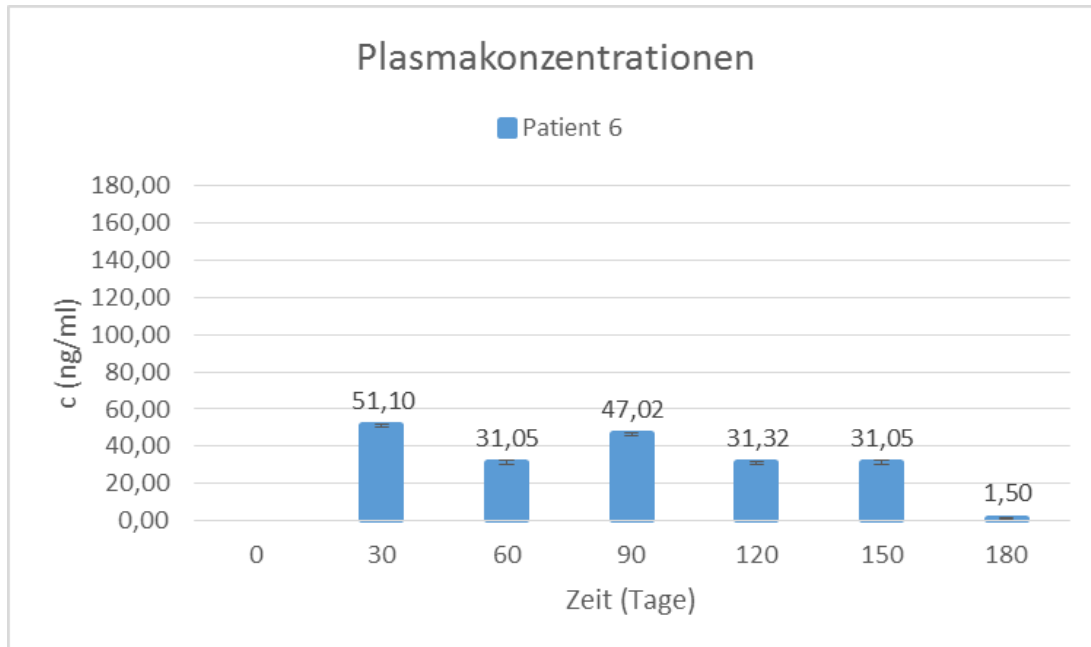


Abbildung 7: Plasmakonzentrationen Patient 6

Tabelle 6: Ergebnisse Patient 6

Zeit (Tage)	MW c (ng/ml)	STABWN
0	0,00	0,00
30	51,10	0,71
60	31,05	1,65
90	47,02	0,16
120	31,32	0,62
150	31,05	1,24
180	1,50	0,05

7.1.7 Plasmakonzentrationen Patient 7

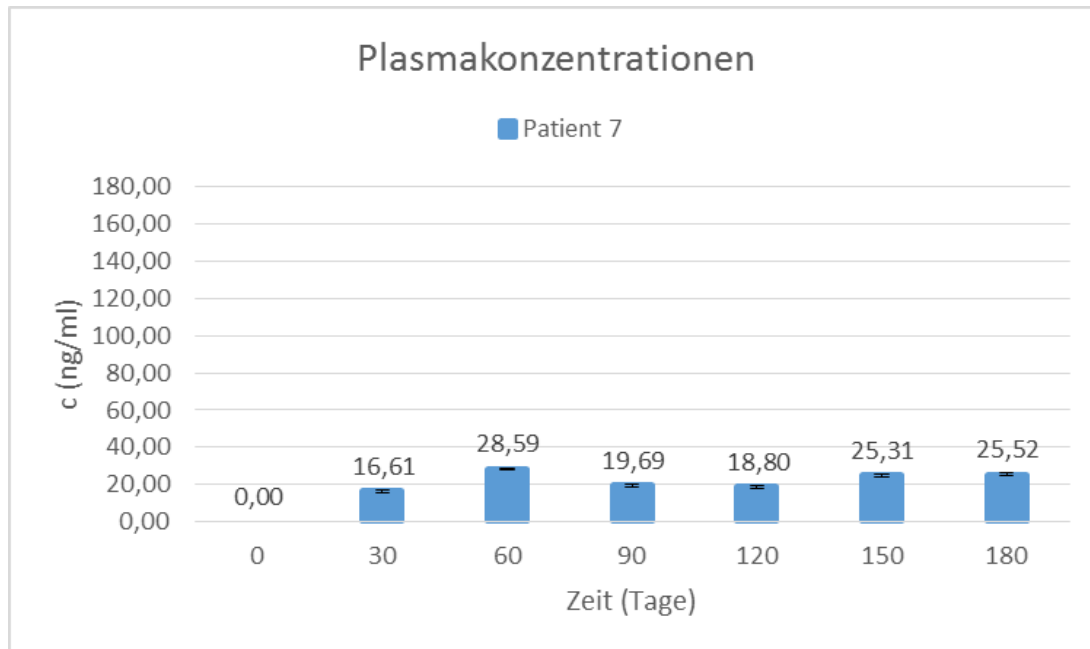


Abbildung 8: Plasmakonzentrationen Patient 7

Tabelle 7: Ergebnisse Patient 7

Zeit (Tage)	MW c (ng/ml)	STABWN
0	0,00	0,01
30	16,61	0,79
60	28,59	0,22
90	19,96	0,76
120	18,80	0,74
150	25,31	0,50
180	25,52	0,79

7.1.8 Plasmakonzentrationen Patient 8

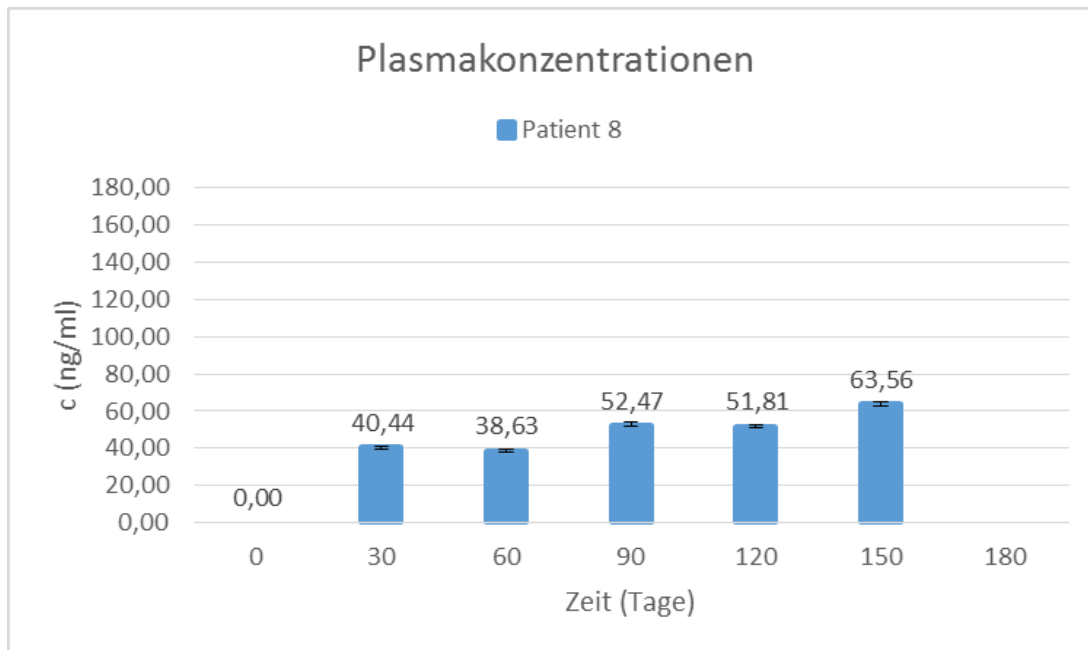


Abbildung 9: Plasmakonzentrationen Patient 8

Tabelle 8: Ergebnisse Patient 8

Zeit (Tage)	MW c (ng/ml)	STABWN
0	0,00	0,04
30	40,44	0,35
60	38,63	0,71
90	52,47	1,42
120	51,81	0,86
150	63,56	1,23
180	Probe fehlt	

7.1.9 Plasmakonzentrationen Patient 10

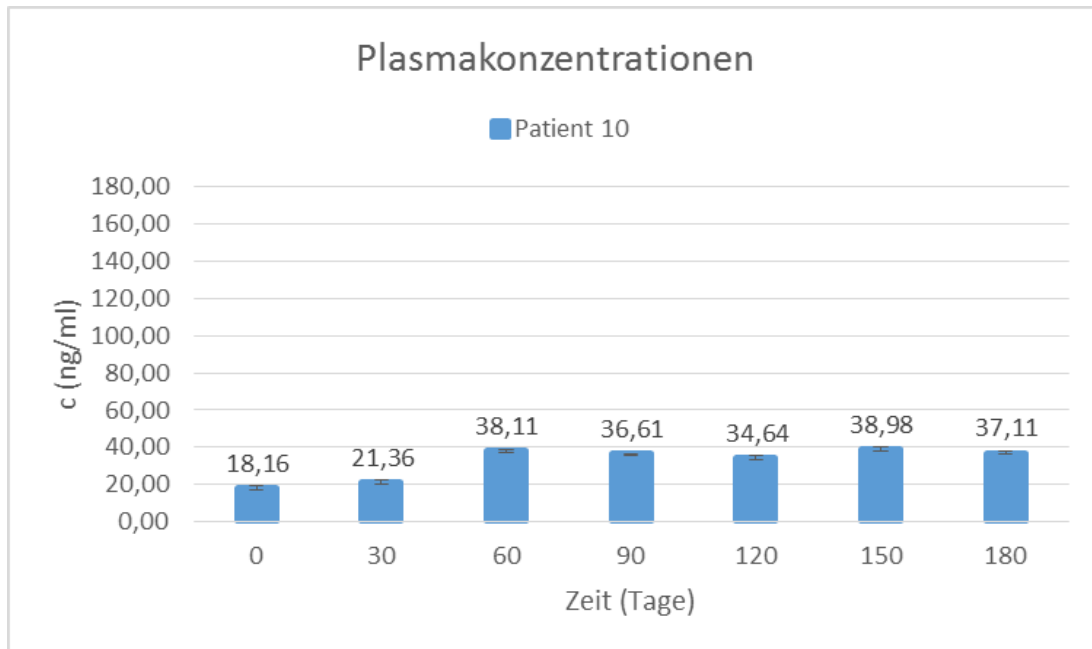


Abbildung 10: Plasmakonzentrationen Patient 10

Tabelle 9: Ergebnisse Patient 10

Zeit (Tage)	MW c (ng/ml)	STABWN
0	18,16	1,55
30	21,36	1,30
60	38,11	0,97
90	36,61	0,00
120	34,64	1,20
150	39,98	1,03
180	37,11	0,46

7.1.10 Plasmakonzentrationen Patient 11

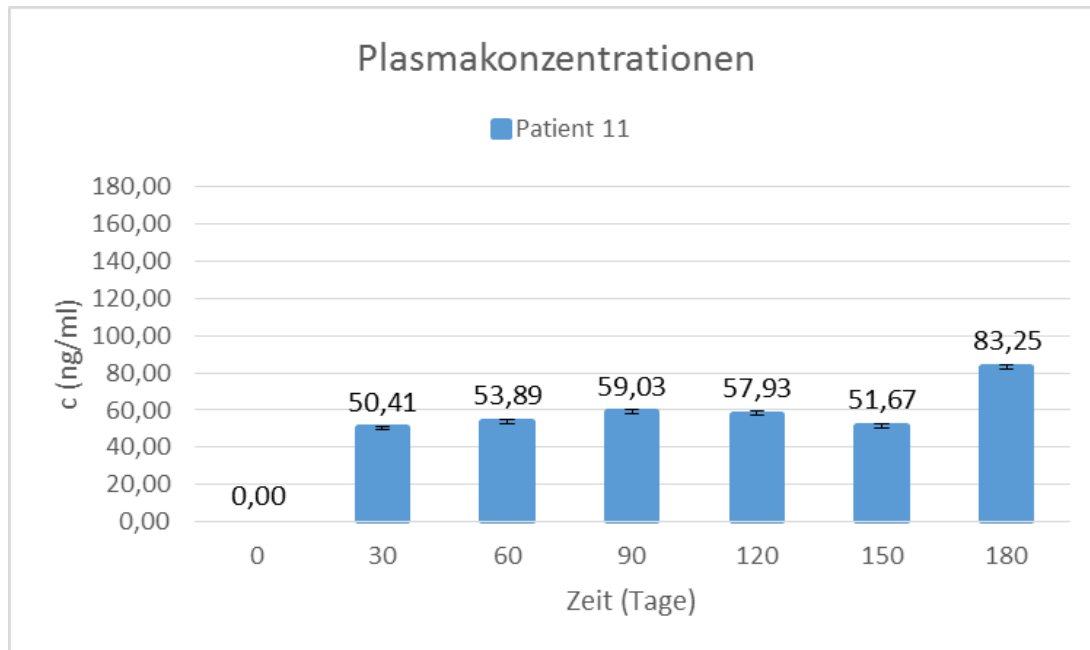


Abbildung 11: Plasmakonzentrationen Patient 11

Tabelle 10: Ergebnisse Patient 11

Zeit (Tage)	MW c (ng/ml)	STABWN
0	0,00	0,00
30	50,41	1,04
60	53,89	1,06
90	59,03	1,40
120	57,93	1,40
150	51,67	0,91
180	83,25	1,20

7.1.11 Plasmakonzentrationen Patient 12

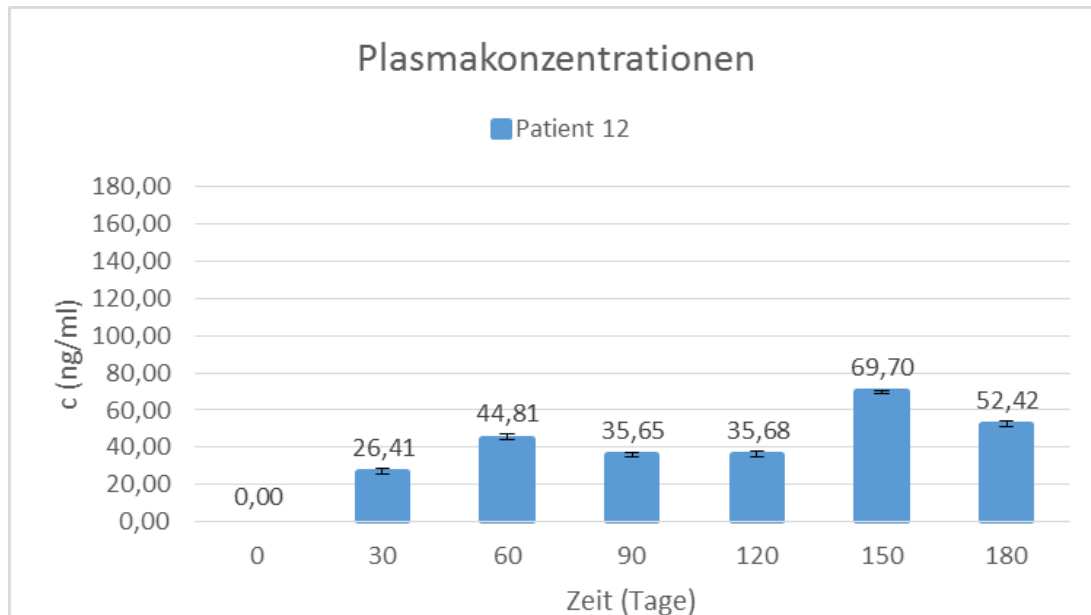


Abbildung 12: Plasmakonzentrationen Patient 12

Tabelle 11: Ergebnisse Patient 12

Zeit (Tage)	MW c (ng/ml)	STABWN
0	0,00	0,00
30	26,41	2,35
60	44,81	2,14
90	35,65	1,70
120	35,68	2,08
150	69,70	1,06
180	52,42	1,92

7.1.12 Plasmakonzentrationen Patient 14

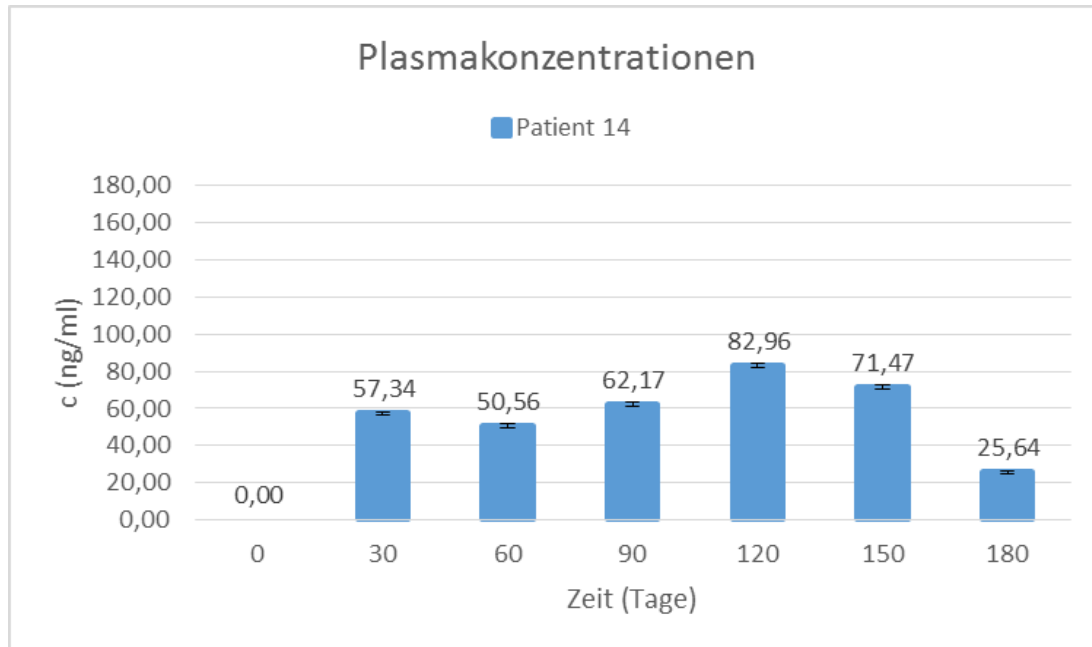


Abbildung 13: Plasmakonzentrationen Patient 14

Tabelle 12: Ergebnisse Patient 14

Zeit (Tage)	MW c (ng/ml)	STABWN
0	0,00	0,00
30	57,34	0,71
60	50,56	1,22
90	62,17	1,15
120	82,96	1,48
150	71,47	1,45
180	25,64	0,58

7.1.13 Plasmakonzentrationen Patient 15

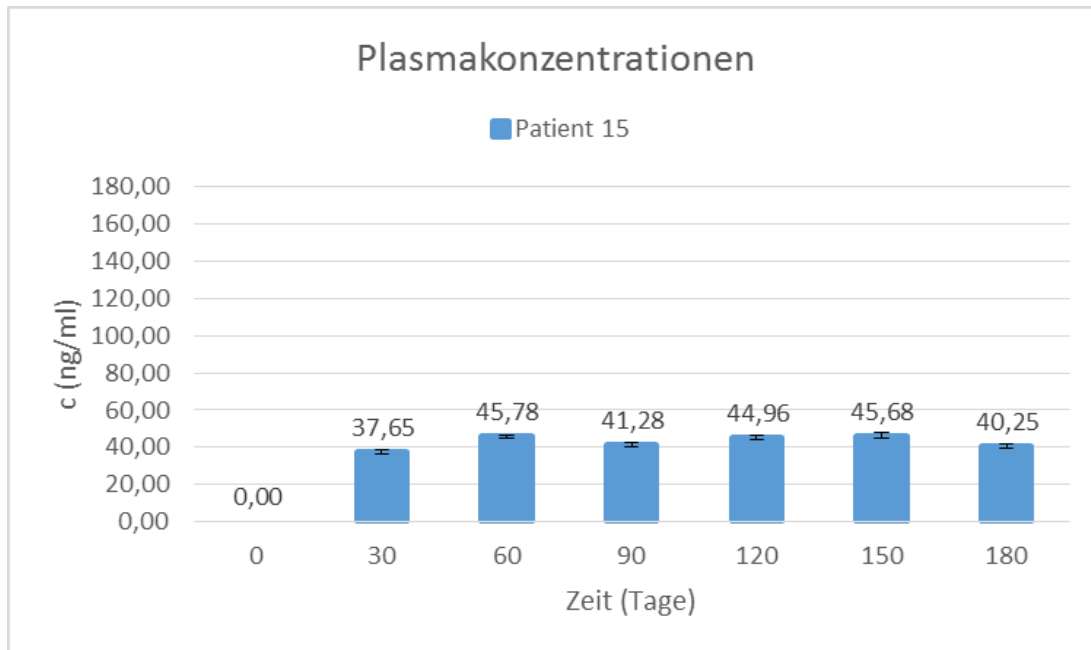


Abbildung 14: Plasmakonzentrationen Patient 15

Tabelle 13: Ergebnisse Patient 15

Zeit (Tage)	MW c (ng/ml)	STABWN
0	0,00	0,00
30	37,65	0,69
60	45,78	0,54
90	41,28	0,98
120	44,96	1,39
150	45,68	2,34
180	40,25	1,58

7.1.14 Plasmakonzentrationen Patient 16

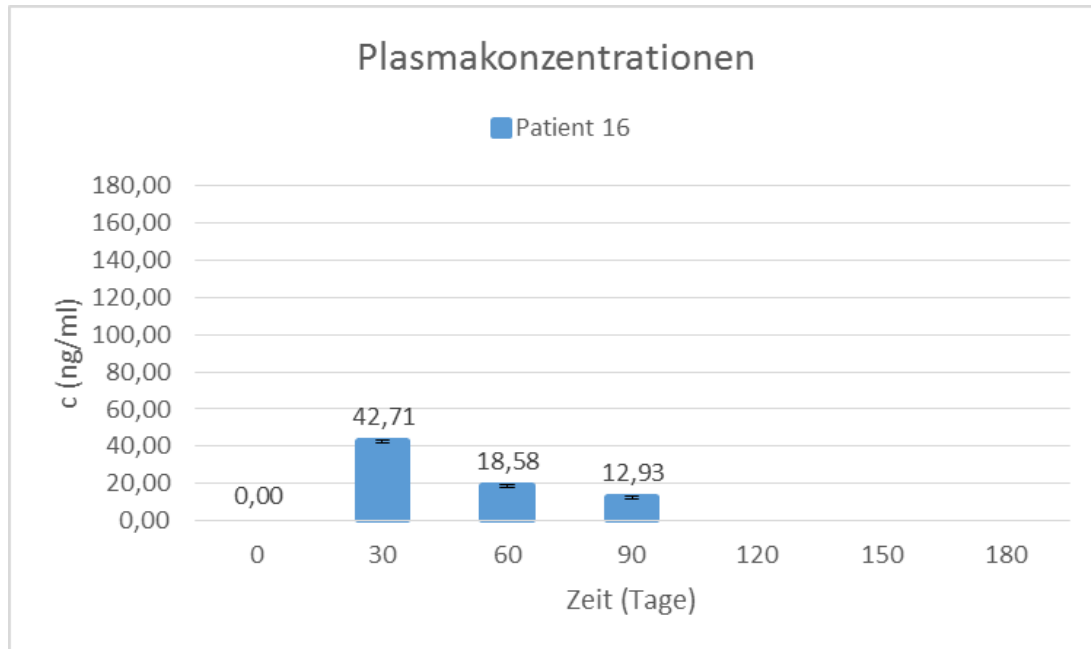


Abbildung 15: Plasmakonzentrationen Patient 16

Tabelle 14: Ergebnisse Patient 16

Zeit (Tage)	MW c (ng/ml)	STABWN
0	0,00	0,00
30	42,71	0,35
60	18,58	1,03
90	12,93	0,27
120	Probe fehlt	
150	Probe fehlt	
180	Probe fehlt	

8 Diskussion & Schlussfolgerung

Die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten einige interessante Aufschlüsse über die Wirkung von Azithromycin in der Therapie des MALT Lymphoms geben. Je nachdem, durch welches Bakterium das MALT Lymphom ausgelöst wurde, kann man bei einigen Patienten durchaus das Überschreiten der MHK des jeweiligen Bakteriums erkennen.

Vor allem bezüglich *Chlamydia spp.* scheint die Therapie durchaus erfolgreich zu sein, da hier die MHK von 0,03-0,125 mg/L bei so gut wie allen Patienten, außer bei Patient 7 (siehe Tabelle 7) überschritten wurde. Obwohl nur einer der Patienten die MHK von *Helicobacter pylori* erreicht hat, muss das nicht heißen, dass bei allen anderen die Therapie erfolglos war.

Einerseits ist Azithromycin ja bekannt für seine starke intrazelluläre Anreicherung und andererseits handelt es sich um Talspiegel, also jene Plasmakonzentrationen, die am Ende einer Dosierung während einer Therapie erreicht werden können. Das heißt, man könnte zum einen die Dosis beziehungsweise das Dosierungsintervall erhöhen, um so auch am Ende der Einnahme noch therapeutisch wirksame Plasmaspiegel zu erreichen und zum anderen könnte man auch die Dosierungsart ändern. Das heißt, statt oralen eine intravenösen Applikationsweg wählen. Somit kommt der Arzneistoff direkt und in vollem Umfang in den Blutkreislauf ohne First-Pass Effekt und Interaktionen mit dem Gastrointestinaltrakt. Obwohl die compliance bei einer intravenösen Gabe meistens sinkt, würde hier trotzdem die Bioverfügbarkeit des Antibiotikums steigen und jegliche Resorptionsunterschiede bei den Patienten ausgeschaltet werden.

Weiters wäre natürlich auch noch die intrazelluläre Konzentration des AB von großem Interesse. Wenn diese nämlich, wie in der Literatur beschrieben, um ein vielfaches höher als die Plasmakonzentration ist, kann man annehmen, dass die MHK der Bakterien mit Sicherheit bei allen überschritten werden würden. Zusätzlich sollte auch die Konzentration kurz nach der Verabreichung des Antibiotikums quantifiziert werden, um so die maximal erreichbaren Plasmaspiegel unter dieser Antibiotikatherapie zu erhalten.

Obwohl die Plasmaproben immer genau 7 Tage nach der letzten Antibiotika Gabe genommen wurden, kann man bei einigen Patienten trotzdem größere Schwankungen bei den Plasmakonzentrationen sehen. Grundsätzlich sollten sie ähnlich bleiben, derartige Schwankungen sind aber trotzdem als „normal“ zu betrachten, da jeder Tag verschieden ist und der Körper nicht immer gleich funktioniert. Außerdem wird die Resorption eines oral aufgenommenen Medikaments von sehr vielen Einflüssen geprägt. Je nachdem wie schnell der Magen entleert wird, gelangt ein Arzneistoff früher oder später in den Dünndarm, wo er dann resorbiert werden kann. Auch der pH Wert im Magen spielt eine bedeutende Rolle. Besonders basische oder saure Medikamente sind in ihrem Lösungsverhalten stark vom jeweiligen Milieu abhängig. Vor allem nach Mahlzeiten erhöht sich der pH-Wert des Magensaftes und es herrscht ein annähernd neutrales Milieu. Aber auch sehr fetthaltiges Essen, heiße oder eiskalte Getränke bewirken, dass der Speisebrei sich lange im Magen aufhält, bevor er in den Darm gelangt. Dadurch wirken gleichzeitig mit der Nahrung eingenommenen Arzneistoffe erst viel später. Genau aus diesem Grund werden viele Antibiotika wie zum Beispiel Penicilline und Cephalosporine nüchtern eingenommen [19].

Somit sollte man vor allem bei der Verabreichung des Antibiotikums darauf achten immer dieselben Grundbedingungen zu haben, das heißt zum Beispiel, immer morgens auf nüchternem Magen oder immer nach dem Frühstück/Mittagessen/Abendessen. Auch die Abnahme der Plasmaproben sollte am besten unter möglichst gleichen Bedingungen erfolgen und natürlich auch die Aufarbeitung des Blutes, da auch diese Schritte die Plasmakonzentration stark beeinflussen können.

Des Weiteren konnte bei den Voruntersuchungen gezeigt werden, dass Azithromycin in Wasser sehr schlecht bis gar nicht löslich und in Lösung sehr instabil ist. Allerdings wurde auch festgestellt, dass Azithromycin gelöst in Acetonitril (ACN) oder Methanol (MeOH) zwar bei Raumtemperatur nicht lange stabil ist, allerdings gelagert bei -20 Grad keine Verluste zu verzeichnen sind. Auch sehr interessant war die Tatsache, dass Azithromycin, gelöst in künstlichem Plasma, sowohl mehrere Stunden bei -20 Grad als auch bei Raumtemperatur keine Instabilität zeigte und die Konzentration gleich blieb (siehe Tabelle 37).

9 Experimenteller Teil

Bevor die Plasmaproben der 14 Patienten quantifiziert werden konnten, musste zuerst eine optimale Analysemethode entwickelt werden.

9.1 Quantifizierungsmethode

Zur Analyse wurde der “Goldstandard” für die Untersuchung von komplexen Matrices verwendet. Dabei handelt es sich um einen Hochleistungsflüssigkeitschromatographen gekoppelt an ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer. Damit wird die Quantifizierung äußerst selektiv aber auch sensitiv.

9.1.1 HPLC-High Performance Liquid Chromatography

HPLC steht für Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und ist ein chromatographisches Trennsystem, bei dem die Probe mit Hilfe einer stationären und einer mobilen Phase aufgetrennt wird und so von Matrixbestandteilen abgetrennt werden kann. Dabei transportiert man die mobile Phase mittels spezieller Pumpen durch eine, mit stationärer Phase dicht gepackte, Säule und trennt so die Inhaltsstoffe nach Polarität auf. Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Phasen führen dazu, dass die Komponenten des Analyten, die ja in der mobilen Phase gelöst sind, unterschiedlich lange in der Säule retentiert werden. Es kommt also zu unterschiedlichen Retentionszeiten und somit zu einer Trennung.



Abbildung 16: HPLC Ultimate 3000 [21]

Wesentlicher Vorteil gegenüber der GC ist das viel größere Einsatzgebiet, da die Substanzen hier nicht flüchtig sein müssen und sich die HPLC somit auch hervorragend für große Biopolymere eignet. Um die eigentliche Trennsäule vor Verschmutzungen zu schützen wird üblicherweise eine Vorsäule vor die Trennsäule vorgeschaltet. Bei dieser Arbeit wurde eine Dionex UltiMate 3000 HPLC der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. verwendet. Das Gerät verfügt über 2 Pumpen die eine Flussrate bis zu 10 ml/min und einen Druck bis zu 800 bar ermöglichen.

Neben einem Entgasungsmodul war vor allem der gekühlte Autosampler, welcher Platz für 120 HPLC Vials bietet, für diese Arbeit von großer Bedeutung und verhalf zu einem ökonomischen und rationellen Arbeiten [20].

9.1.2 MS – Massenspektrometer

Das Massenspektrometer dient im Wesentlichen zur qualitativen Identifizierung von Substanzen, sowie zur massenselektiven Detektion. Diese Methode ist nicht zerstörungsfrei und funktioniert, indem der zu untersuchende Analyt eingespritzt, durch spezielle Methoden ionisiert und letztlich durch ein elektrisches Feld geleitet wird. Am Ende dieses Feldes werden die Ionen nach dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) getrennt und mit Hilfe eines Detektors quantifiziert.

Die große Schwierigkeit bei der Kopplung von HPLC an MS besteht darin, den Analyten in die Gasphase und das Hochvakuum des MS zu überführen und das Lösungsmittel abzutrennen. Hier bedient man sich neuerer Methoden, die eine Ionisation bei Atmosphärendruck erlauben. Dazu zählen die Elektronensprayionisation (ESI) und die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (atmospheric pressure chemical ionisation = APCI) [22] [23].

9.1.2.1 ESI – Elektronensprayionisation

In den 1980er Jahren optimierte John Fenn diese weiche Ionisationsmethode und bekam 2002 auch den Nobel Preis dafür [24]. Hierbei wird das Eluat durch eine Metallkapillare geleitet, an die eine Hochspannung von etwa 3 kV angelegt ist. Durch diese Spannung entsteht ein elektrisches Feld zwischen der Kapillarenspitze und einer Gegenelektrode am Eingangspunkt zum Massenspektrometer.

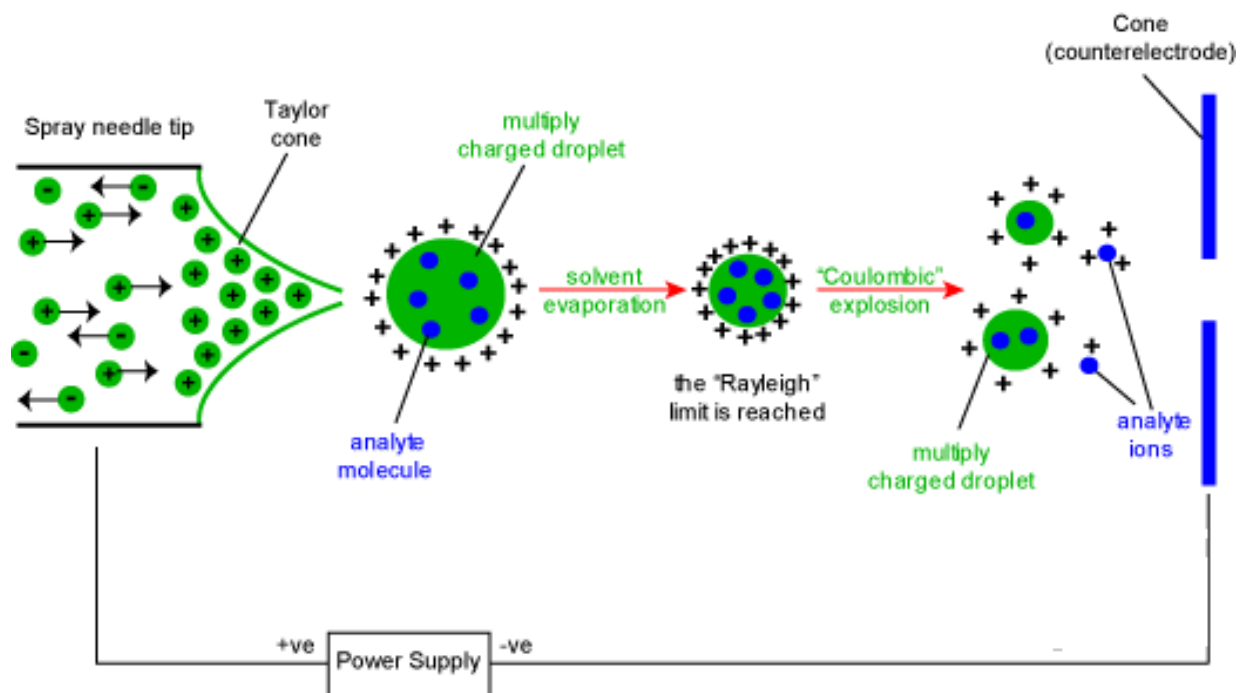


Abbildung 17: Ionisierungsschema durch ESI [25]

Damit ein feiner Sprühnebel entsteht, hilft ein sogenanntes Nebulizergas, welches meistens aus Stickstoff besteht. Außerdem dient ein stark erhitztes Trocknungsgas dazu, das überschüssige Lösungsmittel auf den hochgeladenen Tröpfchen am Weg zum MS nach und nach zu verdampfen. Somit verringert sich die Tropfengröße und die Konzentration der Ladungen auf den immer kleiner werdenden Teilchen führt zu sogenannten „Coulomb-Explosionen“. Hier explodieren die Tröpfchen zu einer Wolke aus ionisierten Analyt Molekülen und je nachdem, ob man im positiven oder negativen Modus arbeitet, bekommt man die Quasimolekülionen $[M+H]^+$ oder $[M-H]^-$ aus dem Mutterion $[M]$. Diese Form der Ionisation wird vor allem für polare Moleküle, die sich leicht protonieren oder deprotonieren lassen verwendet [22].

9.1.2.2 Triple-Quadrupol-Analysator

Nachdem die Moleküle mittels ESI ionisiert wurden, müssen sie nun mit Hilfe eines Massenfilters getrennt werden, um sie dann einzeln nach dem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) detektieren zu können. Dies kann einerseits durch Auftrennung im Magnetfeld oder elektrischen Feld und andererseits durch die Trennung über die Flugzeit erfolgen [23].

Im Falle des Quadrupoles erfolgt die Auftrennung mit Hilfe eines hochfrequenten elektrischen Feldes. Und zwar besteht diese aus 4 Stäben, die paarweise als Elektroden dienen. An die jeweils gegenüberliegenden Stäbe wird eine gleichartige Gleichspannung angelegt, die mit einer Wechselspannung überlagert ist. Dadurch entsteht im Inneren dieser vier Stäbe eine Flugbahn, durch die nur Ionen mit einem bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnis ungestört, mit oszillierenden Bewegungen, durchfliegen können (in Abbildung 18 orange gekennzeichnet). Alle anderen Ionen gelingt dies nicht, denn sie prallen auf die Stäbe und werden so entladen (in Abbildung 18 in grün gekennzeichnet). Allerdings können durch Änderung der angelegten Spannung dann auch Ionen mit einem anderen Masse-zu-Ladungsverhältnis durch [23] [26].

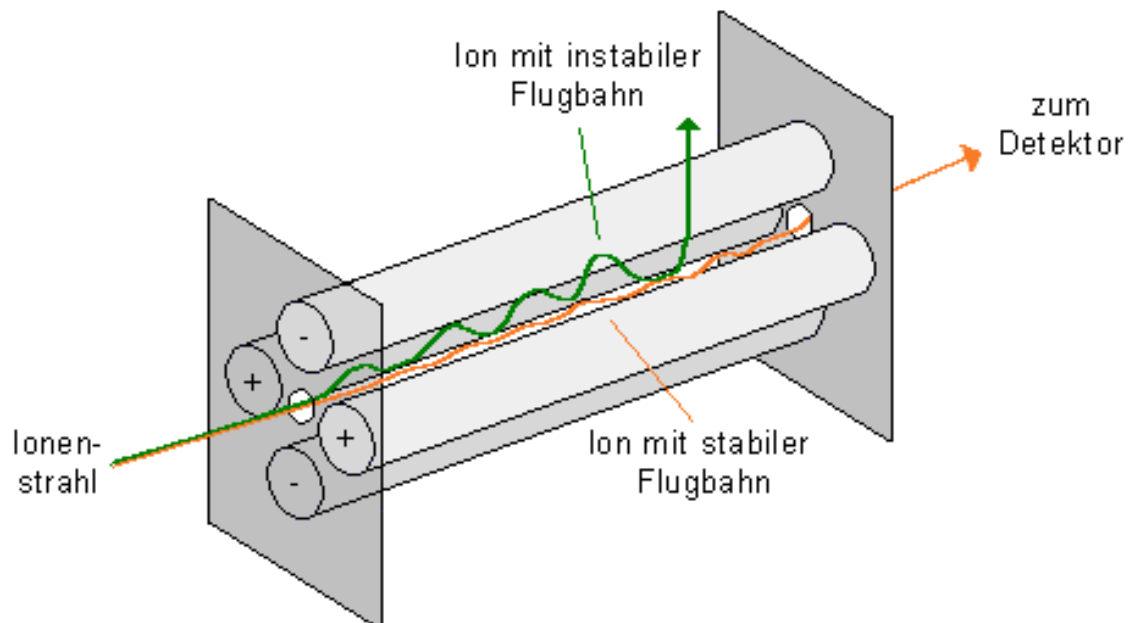


Abbildung 18: Aufbau eines Quadrupol Analysators [26]

Wie nun aber der Name schon erahnen lässt, besteht der Triple Quadrupol Analysator aus 3 aneinandergereihten Quadrupolen. Da eines der Hauptprobleme in der Spurenanalytik die mangelnde Selektivität bei Proben mit komplexen Matrices ist, braucht man ein Gerät um die Selektivität zu erhöhen. Dieses Problem kann man lösen, indem man einfach 2 Massenspektrometer hintereinander schaltet. Man spricht dann von einem Tandem MS oder MS/MS. Verwendet man nämlich nur ein Quadrupol Massenfilter in Kombination mit ESI Ionisierung, bekommt man als Information lediglich das Molgewicht der eigentlichen Zielsubstanz und keine typischen, hochselektiven Fragmente. Daher wurde ein Triple Quadrupol MS mit folgendem Aufbau verwendet:

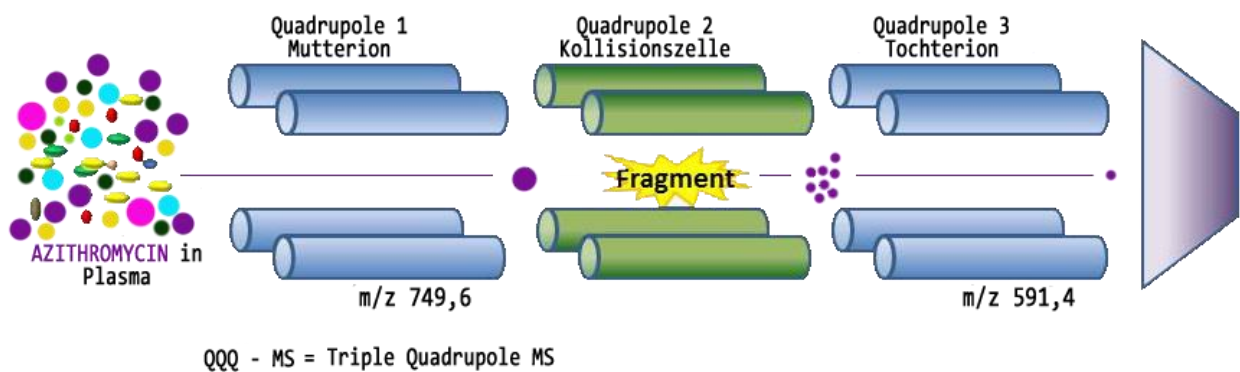


Abbildung 19: Triple Quadrupole MS [27]

Im ersten Quadrupol (Q1) wird wie oben erklärt durch das Anlegen einer bestimmten Spannung das Feld so verändert, dass nur ein bestimmtes Ion, man nennt es auch Precursorion oder Mutterion, den Quadrupol passieren kann. Diese Selektivität kann man vergleichen mit dem Beispiel: „Alle Personen mit 1,70 m, Größe die auf der Universität Wien studieren“.

Das Q2 entspricht einer Kollisionszelle, das heißt, hier wird ein Stoßgas mit einem bestimmten Druck zugesetzt und die Mutterionen kollidieren mit den Stoßgasionen. Somit kommt es zu einer typischen Fragmentierung des Mutterions und es entstehen dann sogenannte Produktionen oder Tochterionen.

Im letzten Quadrupol dem Q3, welches wieder einem MS entspricht, kommt es durch Erstellen eines spezifischen Feldes zur Detektion dieser Fragmentationen. Nun kann man die Selektivität mit folgendem Beispiel sehr gut erläutern: „Alle Personen mit 1,70 m Größe, die auf der Universität Wien studieren und eine Armlänge von 63 cm haben (bei einem Fragmentation) und eine Zeigefingerlänge von 8 cm bei 2 Fragmentationen“. Wie man sieht erhöht man die Selektivität somit enorm, und je nachdem ob man sich dann für ein oder mehrere spezifische Fragmentationen entscheidet, steigt die Selektivität weiter. Diese Kombination ermöglicht also eine hochselektive, aber auch hochsensitive Quantifizierung.

Für diese Arbeit wurden das MS API 4000, Triple Quadrupol Mass Spectrometer der Firma AB Sciex Instruments mit der Software Analyst 1.5 verwendet.

9.2 Methodenoptimierung

Um eine reproduzierbare und empfindliche Quantifizierungsmethode für das Antibiotikum Azithromycin zu erhalten, war es notwendig, einige Parameter der Analysegeräte zu ändern und damit optimale Analysenergebnisse zu erhalten.

9.2.1 Optimierung der HPLC Parameter

Begonnen wurden die Untersuchungen mit einer Acclaim 120 C18 Säule (3 µm, 2,1x150mm) der Firma Thermo Fisher Scientific und 0,1 %igem Ameisensäurem Wasser als Fließmittel A und 0,1 %iges Ameisensäures Acetonitril als Fließmittel B. Nachdem einige Standardparameter wie der Fluss (0,5ml/min) und Fließmittelgradient optimal eingestellt worden sind, schien eine geeignete Methode gefunden worden zu sein. Nach der Analyse einiger Stammlösungen mit unterschiedlicher Konzentration von Azithromycin in 0,1 %igem Ameisensäurem Wasser, wurde versucht, eine erste Eichgerade zu erstellen. Schon nach den ersten 2 Verdünnungen tauchte das erste Problem auf: Der Carry-over-Effekt.

9.2.2 Carry-over-Effekt

Carry over bedeutet, dass vorhergehende Analysen die Folgenden beeinflussen, indem kleine Mengen von Azithromycin im System verbleiben und bei den nachfolgenden Analysen eluiert werden, was zu falschen (zu hohen) Werten führt. Azithromycin ist sehr lipophil und scheint starke unpolare WW mit der unpolaren C18 Säule einzugehen. Ist die Mobile Phase zu schwach und verdrängt Azithromycin nicht genug von der Säule, bleibt ein Teil davon hängen. Bei der nächsten Analyse wird dann etwas davon miteluiert und verfälscht somit das Ergebnis.

Man testet auf Carry-over, indem man zwischen den Einspritzungen der Probe immer 2- oder 3-mal reines Wasser einspritzt. Hier sollte dann natürlich kein Azithromycin Peak zu sehen sein. In den nächsten Unterpunkten werden weitere Optimierungsschritte für dieses Problem erläutert.

9.2.2.1 Wechsel der Säule

Barrett et al. (2005) berichteten über selbiges Carry-over Problem. Auch sie machten die hohe Lipophilie des Moleküls dafür verantwortlich und schlugen vor auf eine weniger unpolare RP C8 Säule umzusteigen [28].

Deshalb wurde eine Acclaim 120 C8 Säule (3 µm 2,1x150mm) der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet und natürlich wurde auch die Vorsäule auf eine Acclaim 120 C8 (5 µm 1x10mm) ausgetauscht.

9.2.2.2 Wechsel der mobilen Phasen

Des weiteren erklären Barrett et al. (2005), dass man eine gewissen Ionenstärke in der mobilen Phase brauchen würde, um Azithromycin vollständig von der Säule lösen zu können. Daher wurde die mobile Phasen wie folgt verändert [28].

Eluent A: 0,05M wässriges Ammoniumacetat

Eluent B: MeOH / MeCN 15:35

9.2.2.3 User-defined wash programm (Udp)

Der beschriebene Carry over Effekt kann nicht nur durch eine nicht vollständige Elution von Substanzen von der Säule hervorgerufen werden, sondern auch dadurch, dass Substanzen im HPLC System absorbiert werden, hier vorallem im Autosampler. Bei der verwendeten Software Dionex Chromatography MS Link der Firma Thermo Fisher Scientific, besteht die Möglichkeit, ein benutzerdefiniertes Waschprogramm für den Autosampler zu erstellen. Es wurde also ein Waschprogramm generiert, das die Injektionsnadel der HPLC sowohl außen, also auch innen für mehrere Sekunden wäscht. Zudem wird sie vor, aber auch nach jeder Probeninjektion gründlichst gespült. So sollte sichergestellt werden, dass auch wirklich keine Probenreste auf oder in der Nadel hängen bleiben und eventuell so die nächsten Proben verfälscht werden beziehungsweise das Carry-over erzeugt wird. Als Waschflüssigkeit wurde MeOH/MeCN/0,05M wässriges Ammoniumacetat im Verhältnis 2:3:5 verwendet. Im unten stehenden Bild kann man die einzelnen Schritte sehr gut nachvollziehen. Sowohl im ReagentAVial als auch im ReagentBVial befand sich die oben genannte Waschlösung. Mit Hilfe dieses Programmes und den zuvor genannten Modifizierungen konnte das Carry-over Problem deutlich reduziert werden.

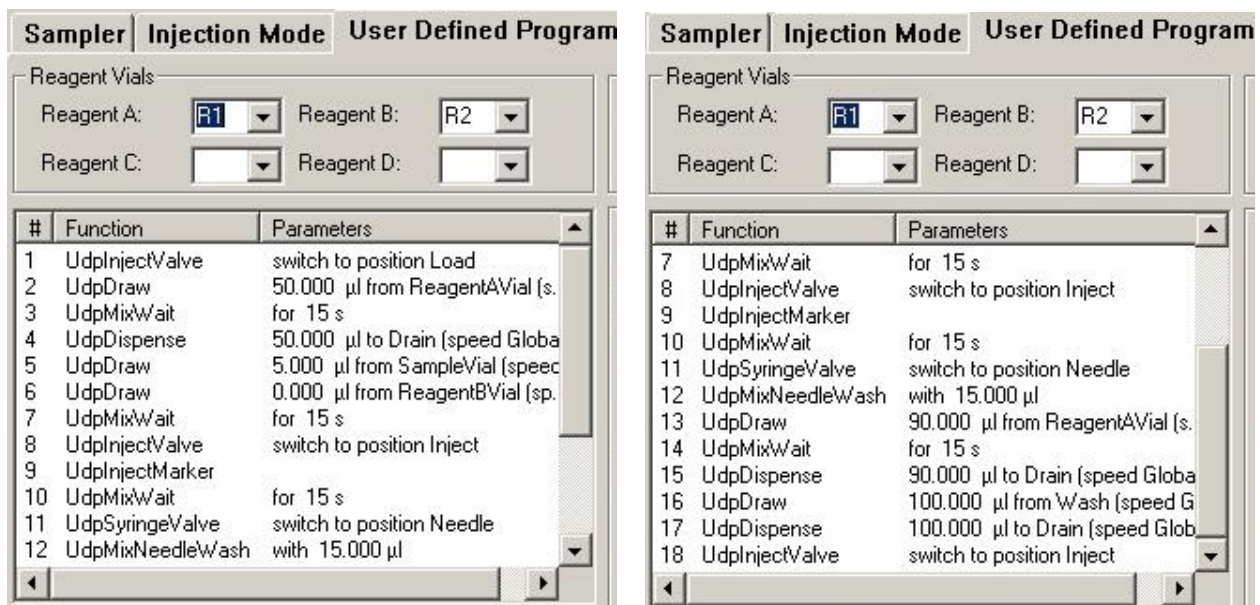


Abbildung 20: User defined wash programm

9.2.2.4 Gradienten verändern

Der letzte Schritt zum Lösen des Carry-over Problems war die Veränderung des Gradienten. Azithromycin löst sich ja bekanntlich sehr schlecht in Wasser.

Da mit einer sehr wässrigen Phase anfangs begonnen wurde, könnte es sein, dass dieser hohe Wasseranteil dazu geführt hat, dass Azithromycin durch die unzureichende Löslichkeit auf der Säule ausgefallen ist und somit nur schlecht miteluiert werden konnte. Dadurch verbleibt natürlich eine gewisse Menge des Antibiotikums auf der Säule welche bei den nachfolgenden Läufen mitgerissen werden kann. Daher wurde die Anfangskonzentration des Eluenten B auf 44% erhöht und somit verringerte sich der Wasseranteil auf 56%. Unter diesen Bedingungen sollte sich Azithromycin deutlich besser lösen beziehungsweise eluieren lassen.

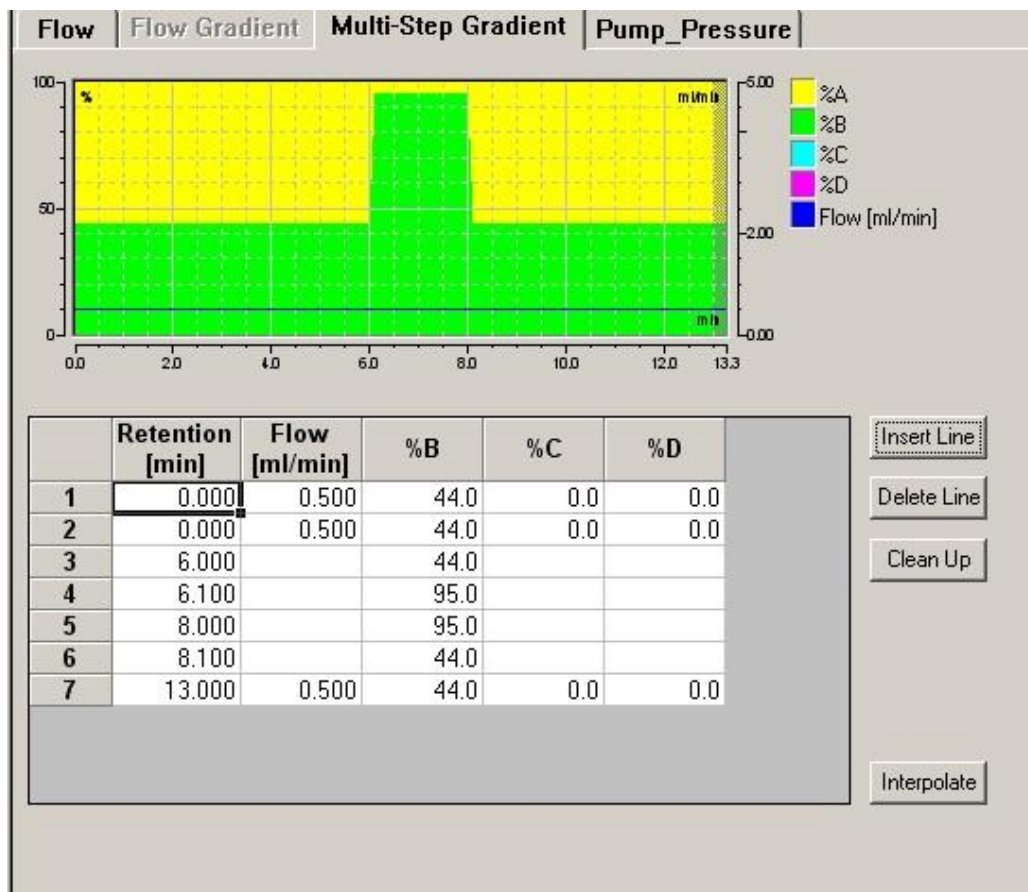


Abbildung 21: Verwendeter Elutionsgradient

9.2.2.5 Weitere Einstellungen

Mit diesen Einstellungen konnte ein regelmäßiger, schmaler und reproduzierbarer Peak der Substanz mit einer Retentionszeit von etwa 2,3 min erhalten werden. Die Peakbreite beträgt in etwa 0,65 min und der Symmetriefaktor gemäß EuAB liegt bei ca. 1,25 (siehe Kapitel 9.3.2). Ein gesamter Lauf dauert 13 Minuten und in der folgenden Abbildung 22 ist ein typischer Peak von Azithromycin bei den angeführten, optimierten Parametern zu sehen.

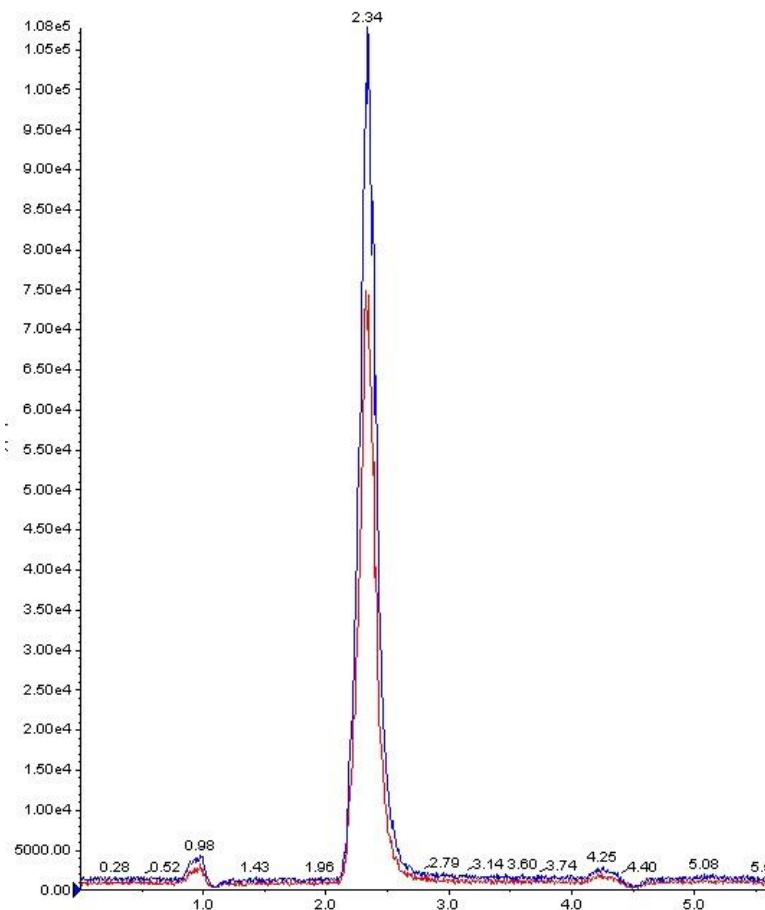


Abbildung 22: Azithromycin Peak

Des Weiteren wurde die Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min übernommen, die Temperatur des Autosamplers wurde auf 4 °C gekühlt und jene des Säulenofens betrug 25 °C. Für jede Analyse wurden immer 5 µl Probe injiziert.

9.2.3 Interner Standard

Ein weiterer sehr wichtiger Schritt war die Entscheidung für die Verwendung eines internen Standards. Da Azithromycin in Lösung leider eine sehr geringe Stabilität hat, konnte keine reproduzierbare Eichgerade erstellt werden. Die Konzentrationen nahmen sukzessive ab je länger die Proben im Autosampler standen. Das sah man auch sehr eindrucksvoll an den Peakflächen, die mit der Zeit immer kleiner wurden. Da ein Durchgang für eine Standardkurve mit 5-6 verschiedenen Konzentrationen mindestens einen Tag dauerte, stand die letzte Konzentration dann bis zu 24 h im Autosampler, bevor sie analysiert werden konnte. Bei Verwendung eines internen Standards gibt man den Proben mit dem Analyten eine chemisch sehr ähnliche Substanz in bekannter Konzentration zu und kann so mit Hilfe des Peakflächenverhältnisses auf die Konzentration des Analyten schließen. Dabei handelt es sich um die beste Qualitätskontrolle, da fast ohne Zusatzaufwand jede Analysenprobe individuell kontrolliert wird.

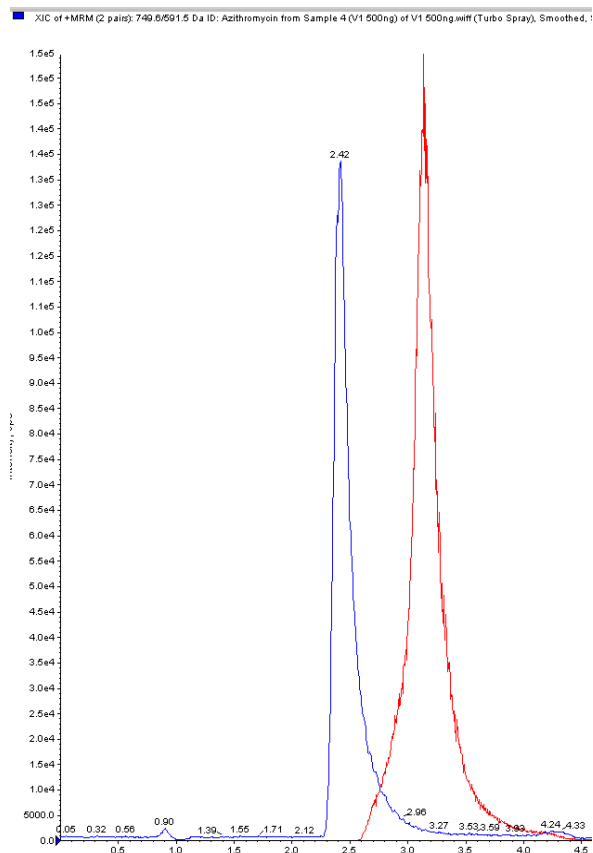


Abbildung 23: Azithromycin & Erythromycin Peak

Der interne Standard macht alle „potentiellen Fehler“, seien es Verluste bei der Aufarbeitung oder beim Einspritzen, Adsorption oder Abbau durch schlechte Stabilität mit und verringert sich so in gleichen Maßen wie der zu quantifizierende Analyt.

Absoluter „Goldstandard“ wäre hier ein deuterierter Interner Standard (also partiell deuteriertes Azithromycin) da dieser sich dem Moleküle nahezu ident verhält aber trotzdem aufgrund der Deuteriumionen eine andere Masse aufweist. Leider sind diese Standards sehr teuer und kamen für diese Diplomarbeit nicht in Frage.

Nach Recherchen in der Literatur schien das Antibiotikum Erythromycin sehr gut geeignet zu sein, da es in den Plasmaproben mit Sicherheit nicht vorkommt, ebenfalls ein Makrolid AB ist und sich ähnlich wie Azithromycin verhält [29]. Sowohl zu den Proben als auch zu den Kalibrierlösungen wurden immer die gleiche Menge Erythromycin mit bekannter Konzentration zugesetzt. Nachdem nicht davon ausgegangen werden kann, dass die unterschiedlichen Substanzen Azithromycin und Erythromycin vom Massenspektrometer gleich empfindlich detektiert werden, musste zunächst der Standardkorrekturfaktor (fst) ermittelt werden.

Mit Hilfe der Peakflächen von Azithromycin und Internem Standard Erythromycin samt dessen Konzentration konnte dieser berechnet werden. Dieser wurde aus Mittelwerten berechnet und betrug 1,99 für Konzentrationen im Bereich von 25-500 ng Azithromycin in Plasma.

$$\text{fst} = \frac{\text{ng Azithromycin}}{\text{Peakfläche (A) Azithromycin}} \times \frac{\text{Peakfläche (A) Erythromycin}}{\text{ng Erythromycin}}$$

Der Standardkorrekturfaktor wiederum erlaubt es dann, mit Hilfe der bekannten Konzentration von internem Standard und den Peakflächen der beiden Antibiotika, auf die unbekannte Konzentration von Azithromycin zu schließen.

$$\text{ng Azithromycin} = \frac{\text{ng Erythromycin}}{\text{Peakfläche (A) Erythromycin}} \times \text{Peakfläche (A) Azithromycin} \times \text{fst}$$

9.2.4 Optimierung der Triple Quadrupol MS Parameter

Um wichtige Optimierungsschritte der MS Parameter durchführen zu können, wurde anfangs eine Lösung der Reinsubstanz Azithromycin (0,01%ige Lösung) mittels Pumpenspritze in die ESI Quelle infundiert.

Mit Hilfe des Gerätes werden bei der automatischen Optimierung laufend Massenspektren der Substanz aufgenommen und alle Parameter so verändert, dass möglichst intensive Mutter- und Tochterionen detektiert werden können. Hier gibt es viele einflussreiche Einstellungsmöglichkeiten, die zu einem optimalen Peak führen können. Dazu zählen einerseits die Positionierung der Nadel, die Flussrate, Stärke des Stickstoffvorhanges, Ion Spray Voltage, Stärke des Heizgases aber auch das Nebulizer Gas spielt eine tragende Rolle. Hier wurde zu Beginn schon festgestellt, dass im positiven Modus bessere Empfindlichkeit als im Negativ Modus erzielt werden kann und somit wurden alle Analysen im ersteren durchgeführt.

Nach allen Optimierungsschritten wurde ein Mutterion für Azithromycin mit dem Masse-zu-Ladungsverhältnis von $m/z = 749.601$ Da und das inbegriffene Tochterion mit $m/z = 591.500$ Da gefunden. Für das Mutterion von Erythromycin eine $m/z = 734.599$ Da und das größte Tochterion $m/z = 576.200$. Dementsprechend wurde für die MRM-Übergänge (**M**ultiple **R**eaction **M**onitoring) 749,6/591,5 (Azithromycin) und 734,6/576,2 (Erythromycin) das Massenspektrometer mit folgenden Parametern optimiert: ESI pos., IS 4500,00, EP 10.00, CUR 10.00, GS1 40.00, GS2 40.00, TEM 500.00°C, CAD 4.00, CEM 2500, DF -100, DP 96.00 CE 41.00 und CXP 18.00 (für Azithromycin) DP 76.00 CE 31.00 und CXP 32.00 (für Erythromycin), dwell jeweils 150 ms.

9.2.5 Probenaufarbeitung

Das wichtigste bei allen Schritten der Probenaufarbeitung ist genaues Pipettieren und vor allem gründliches Mischen zwischen jedem Arbeitsschritt. Die Probenaufarbeitung ist beim Arbeiten mit Plasma von großer Bedeutung, da es sich hierbei um eine sehr komplexe Matrix mit vielen verschiedenen Bestandteilen wie Elektrolyten, Plasmaproteinen, Nährstoffen, Organischen Säuren, Abbauprodukten wie Harnsäure aber auch Hormonen handelt [30]. Es ist daher sehr wichtig, diese störenden Plasmabestandteile abzutrennen, da sonst die HPLC Säule extrem verschmutzt werden würde. Insbesondere könnte es aber auch zu Ionensuppression im MS kommen, wo die Analytionen durch verschiedenste Ionen aus der Matrix verdrängt werden können und damit zu geringe Werte erhalten werden.

Diese Abtrennung erreicht man mit Hilfe eines Fällungsschrittes mit Methanol. Dafür wurden immer 100 µl Proben Plasma mittels Eppendorf Pipetten genommen, mit 100 µl Internem Standard in einem Eppendorf Reaktionsgefäß vermischt (mittels Vortex) und weiters noch die dreifache Menge, also 600 µl, Methanol hinzugefügt. Schon nach kurzer Zeit kam es zu einer Ausfällung und die zuvor klare Lösung wurde immer trüber. Nach gründlichem Vortexen und 10-minütigem Stehenlassen bei Raumtemperatur, kamen die Eppendorf Reaktionsgefäße für 15 Minuten in die Zentrifuge bei 14.500 rpm. Zur Analyse wurde dann der Überstand verwendet und in ein HPLC Vial überführt.

9.2.6 Erstellung einer Eichgerade

Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines internen Standards. Daher wurden für die Eichgerade Konzentrationen von 28,5 – 550 ng/ml erstellt, da in diesem Bereich auch die erwarteten Plasmakonzentrationen der Patienten liegen. Jeder Konzentration wurde immer die gleiche Menge an internem Standard, mit bekannter Konzentration, zugefügt. Mit Hilfe einer quadratischen Regressionsgleichung mit der Formel $y=2951,8x + 23576$ und einem Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,9999$ wurde eine Eichgerade festgelegt. Pro Eichpunkt liegt der Mittelwert von 3 Messungen vor.

Zu guter Letzt wurde noch der Mittelwert aller berechneten Standardkorrekturfaktoren (Formel siehe 9.2.3) der Konzentrationen berechnet, mit dem auch später alle Berechnungen durchgeführt wurden. Dieser betrug 1,99. Im Programm Microsoft Excel wurden die Werte in ein Diagramm eingetragen wobei die x- Achse die Konzentration und die y-Achse die Peakfläche darstellten

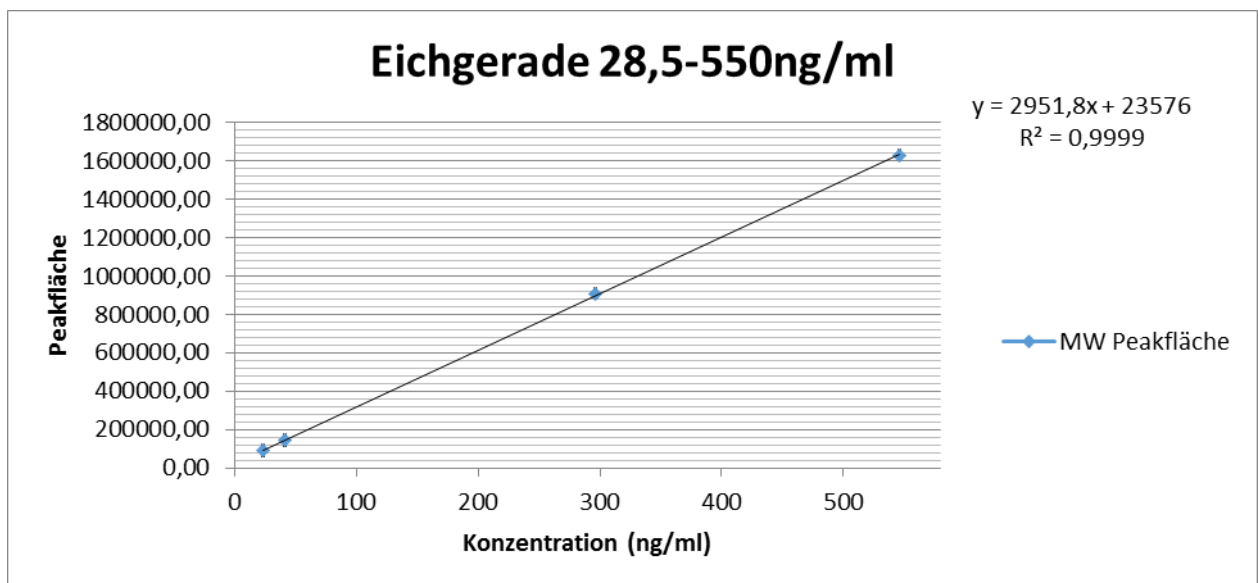


Abbildung 24: Eichgerade 28.5 bis 550 ng/ml

9.3 Validierung der Analysenmethode

Die erstellte LC-MS/MS Methode wurde mit Hilfe folgender Untersuchungen auf Brauchbarkeit geprüft. Dabei soll eine Zuverlässigkeit der verwendeten Methode gewährleistet werden und gezeigt werden, dass sie für den beabsichtigten Zweck geeignet ist.

9.3.1 Linearität

Linearität der Methode wurde schon in Kapitel 9.2.6 veranschaulicht. Dabei wurden Azithromycinlösungen mit den Konzentrationen 28,5-550 ng/ml mehrfach injiziert und so eine Eichgerade erstellt (Siehe Tabelle 31). Die EDQM, PA/PH/OMCL (11) 04-OMCL Guideline verlangt für die Eichgerade ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 \geq 0,999$. Die erhaltene Eichgerade hat folgende Gleichung: $Y=2951,8x + 23576$ ($r=0,999$).

➤ **ENTSPRICHT**

9.3.2 Systemeignung

Um die Systemeignung zu prüfen, wurden Azithromycin-Referenzlösungen 6-fach injiziert (Messdaten siehe Tabelle 32). Je nach gefordertem Gehalt werden eine maximale relative Standardabweichung (RSD) von 0,85-1,27% und bei komplexeren Proben üblicherweise maximal 2% toleriert. Bei der Retentionszeit werden maximal 5% RSD gefordert. Die RSD für Gehalt war bei keinem Wert höher als 2% und jene für die Retentionszeit überschritt den geforderten Wert von max 5% ebenfalls nicht.

➤ **ENTSPRICHT**

Des Weiteren verlangt das Ph.Eur. (7.Ausgabe), Grundwerk 2011, dass der Symmetriefaktor (A_s) des Hauptpeaks zwischen 0,8 und 1,5 liegen muss. Diese lag bei den Analysen bei 1,25 für Azithromycin und 0,86 für Erythromycin.

➤ **ENTSPRICHT**

9.3.3 Spezifität

Um die Spezifität der Methode zu überprüfen, wurde eine 6-fache Injektion von verschiedenen Azithromycin Konzentrationen erstellt und gleich darauf destilliertes Wasser eingespritzt (Werte siehe Tabelle 33). Bei der Analyse von destilliertem Wasser darf kein Signal bei der Retentionszeit von Azithromycin oder Erythromycin erscheinen. Damit wird der sogenannte Carry-over Effekt ausgeschlossen (siehe Kapitel 9.2.1.1). Bei den Wasseranalysen war kein Peak zu detektieren und somit ein carry over von 0%.

➤ **ENTSPRICHT**

9.3.4 Methodenpräzision

Die Methodenpräzision wurde durch je 6 Injektionen von 2 Referenzlösungen sowie von 2 Probelösungen gezeigt (Messdaten siehe Tabelle 34). Die EDQM, PA/PH/OMCL (11) 04-OMCL Guideline schlägt eine RSD von $\leq 1,5\%$ vor, üblicherweise werden maximal 2% relative Standardabweichung der Peakflächen akzeptiert, insbesondere wenn es sich um komplexe Proben handelt. Da bei allen erhaltenen Werten die RSD der Peakflächen unter 2% liegt wurden alle Voraussetzungen erfüllt.

➤ **ENTSPRICHT**

9.3.5 Wiederholbarkeit

Dieser Test dient dazu, die Wiederholbarkeit der Aufbereitungsmethode der Proben zu gewährleisten. Dazu wurde sechs Mal Probenplasma mit Azithromycin Verdünnungen und Internem Standard, wie in Kapitel 9.2.4 Probenaufarbeitung beschrieben, aufgearbeitet und dann jeweils drei Mal analysiert, sodass man 18 Messwerte erhält. Anstelle des beschriebenen Patientenplasmas wurde allerdings künstliches Precinorm U Probenplasma verwendet, welches mit einer bestimmten Konzentration an Azithromycin dotiert wurde. Dasselbe wurde zum Vergleich auch sechs Mal mit HPLC Wasser anstelle von Precinorm U Probenplasma durchgeführt (Siehe Tabelle 35).

Die Standardabweichung und die RSD über alle 18 erhaltenen Messwerte sollten maximal 5% betragen. Bei den durchgeführten Analysen betrug die RSD über alle erhaltenen Werte 1,40% und 0,97%.

➤ **ENTSPRICHT**

9.3.6 Tag zu Tag Präzision

Die Tag zu Tag Präzision soll zeigen, dass zwei Lösungen gleicher Konzentration an zwei aneinander folgenden Tagen gleiche Ergebnisse liefern. Es wurde also an Tag 1 die erste Azithromycinlösung sechs Mal hintereinander vermessen und am zweiten Tag die Zweite. Aus den Ergebnissen wurden dann Mittelwert, Standardabweichung und RSD des Gehaltes an Azithromycin berechnet (Messdaten siehe Tabelle 36).

Desweiteren wurde mittels F-Test (Test auf Varianzenhomogenität) geprüft, ob die jeweils 2 Varianzen s_1^2 und s_2^2 einer Grundgesamtheit entstammen. Der obere Signifikanzschranke der F-Verteilung bei 6 Freiheitsgraden (95% 6,6) wurde aus einer F-Wert Tabelle entnommen und beträgt 4,28 [31]. Anhand der Werte ist ersichtlich, dass bei beiden Proben der obere Signifikanzschranke nicht überschritten wird.

➤ **ENTSPRICHT**

9.3.7 Test auf Temperaturstabilität

Dieser Test ist sehr wichtig, weil die Patientenproben bei -20 °C gelagert wurden und zwischen den Aufarbeitungen und Vermessungen oft 24 h im temperierten Autosampler verweilten. Um diese zu bestimmen wurde eine Azithromycinlösung mit bekannter Konzentration jeweils für 24h im temperierten Autosampler, im Kühlschrank bei +5 °C und bei -20 °C aufbewahrt und anschließend je sechs Mal vermessen (Werte siehe Tabelle 37). Besonders interessant war hier die Tatsache, dass Azithromycin gelöst in MeOH/MeCN, wie es für die Eichgerade verwendet wurde, viel schlechter stabil war, als gelöst in Probenplasma Precinorm U. Schön zu sehen war aber, dass Azithromycin gelöst im Plasma, sowohl im Autosampler, KS also auch bei -20 °C sehr gute Stabilität aufwies und somit sichergestellt werden kann, dass die Patientenproben nicht unter dieser Aufbewahrungsform litten.

9.4 Lösungsmittel, Reagenzien

Tabelle 15: Verwendete Lösungsmittel & Reagenzien

Produkt	Name/Größe	Hersteller	CAS-Nr./Ref.-Nr.
Acetonitril	HiPerSolv CHROMANORM for HPLC Acetonitril	VWR Chemicals	75-05-8
Aqua. bidest		Department für Pharmakognosie Wien	
Ameisensäure	Rotipuran®	Carl Roth GmbH & Co KG	64-18-6
Ammoniumacetat	Ammoniumacetat p.a 1kg	E. Merck	1.01116.1000
Azithromycin	European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard	Sigma-Aldrich	
Erythromycin	European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard	Sigma-Aldrich	
HPLC Water		Department für Pharmakognosie Wien	
Methanol	HiPerSolv CHROMANORM for HPLC Acetonitril	VWR Chemicals	67-56-1
Probenplasma	Precinorm U / 5ml	Roche	186 436-02

9.5 Geräte

Tabelle 16: Verwendete Geräte

Produkt	Name/Größe	Hersteller	CAS-Nr./Ref.-Nr.
Deckel für Vials	Schraubkappen N9 rot	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	702.037
Eppendorf Tube	Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co	72.690.001
Eppendorf Pipetten	2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf	
Gefriergerät	UF 755 G	Dometic Medical Systems	
HPLC	Dionex Ultimate 3000	Thermo Fisher Scientific	
HPLC Software	Dionex LC/MS Link	Thermo Fisher Scientific	
HPLC Säule	Acclaim™ 120 C8 3 µm, 150*2,1 mm	Acclaim	
Kühlgerät	Liebherr Medline KU1710	Liebherr	
Messkolben	2 ml, 10 ml, 50 ml, 100 ml, 200 ml, 250 ml, 500 ml,	SCHOTT DURAN	

MS	AB Sciex Instruments API 4000	Sciex	
MS Software	Analyst 1.5		
Pasteurpipetten	Standard Pipetten Länge: 120 mm	Volac ®	
Pipettenspitzen	Pipettenspitzen 10 µl weiß Pipettenspitzen 200 µl gelb Pipettenspitzen 1000µl blau	Sarstedt AG & Co	70.1130 70.760.012 70.762.010
Tabellenkalkulation		Microsoft ® Office Excel 2016	
Vials	Vials N9 mit 0,2 ml integ. Insert, Gewinde	Macherey-Nagel GmbH & Co KG	702.007
Vollpipetten	1ml, 5ml, 10ml, 20ml, 25ml, 50ml,		
Vortexer	REAX 2000	Heidolph	541.19000.00
Waage	Analysenwaage KB BA 100	Sartorius AG Göttingen	
Zentrifuge	Heraeus Pico 21 Centrifuge	Thermo Electron Corporation	

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Azithromycin [12] und Erythromycin [13]	14
Abbildung 2: Plasmakonzentrationen Patient 1	19
Abbildung 3: Plasmakonzentrationen Patient 2	20
Abbildung 4: Plasmakonzentrationen Patient 3	21
Abbildung 5: Plasmakonzentrationen Patient 4	22
Abbildung 6: Plasmakonzentrationen Patient 5	23
Abbildung 7: Plasmakonzentrationen Patient 6	24
Abbildung 8: Plasmakonzentrationen Patient 7	25
Abbildung 9: Plasmakonzentrationen Patient 8	26
Abbildung 10: Plasmakonzentrationen Patient 10	27
Abbildung 11: Plasmakonzentrationen Patient 11	28
Abbildung 12: Plasmakonzentrationen Patient 12	29
Abbildung 13: Plasmakonzentrationen Patient 14	30
Abbildung 14: Plasmakonzentrationen Patient 15	31
Abbildung 15: Plasmakonzentrationen Patient 16	32
Abbildung 16: HPLC Ultimate 3000 [21]	35
Abbildung 17: Ionisierungsschema durch ESI [25]	37
Abbildung 18: Aufbau eines Quadrupol Analysators [26]	38

Abbildung 19: Triple Quadrupole MS [27].....	39
Abbildung 20: User defined wash programm.....	42
Abbildung 21: Verwendeter Elutionsgradient.....	43
Abbildung 22: Azithromycin Peak	44
Abbildung 23: Azithromycin & Erythromycin Peak.....	45
Abbildung 24: Eichgerade 28.5 bis 550 ng/ml	49

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ergebnisse Patient 1	19
Tabelle 2: Ergebnisse Patient 2	20
Tabelle 3: Ergebnisse Patient 3	21
Tabelle 4: Ergebnisse Patient 4	22
Tabelle 5: Ergebnisse Patient 5	23
Tabelle 6: Ergebnisse Patient 6	24
Tabelle 7: Ergebnisse Patient 7	25
Tabelle 8: Ergebnisse Patient 8	26
Tabelle 9: Ergebnisse Patient 10	27
Tabelle 10: Ergebnisse Patient 11	28
Tabelle 11: Ergebnisse Patient 12	29
Tabelle 12: Ergebnisse Patient 14	30
Tabelle 13: Ergebnisse Patient 15	31
Tabelle 14: Ergebnisse Patient 16	32
Tabelle 15: Verwendete Lösungsmittel & Reagenzien	53
Tabelle 16: Verwendete Geräte	54
Tabelle 17: Messdaten Plasmaproben Patient 1	60
Tabelle 18: Messdaten Plasmaproben Patient 2	61
Tabelle 19: Messdaten Plasmaproben Patient 3	62
Tabelle 20: Messdaten Plasmaproben Patient 4	63

Tabelle 21: Messdaten Plasmaproben Patient 5	64
Tabelle 22: Messdaten Plasmaproben Patient 6	65
Tabelle 23: Messdaten Plasmaproben Patient 7	66
Tabelle 24: Messdaten Plasmaproben Patient 8	67
Tabelle 25: Messdaten Plasmaproben Patient 10	68
Tabelle 26: Messdaten Plasmaproben Patient 11	69
Tabelle 27: Messdaten Plasmaproben Patient 12	70
Tabelle 28: Messdaten Plasmaproben Patient 14	71
Tabelle 29: Messdaten Plasmaproben Patient 15	72
Tabelle 30: Messdaten Plasmaproben Patient 16	73
Tabelle 31: Messdaten Eichgerade - Linearität	74
Tabelle 32: Messdaten Systemeignung.....	75
Tabelle 33: Messdaten Spezifität.....	76
Tabelle 34: Messdaten Methodenpräzision	78
Tabelle 35: Messdaten Wiederholbarkeit	80
Tabelle 36: Messdaten Tag zu Tag Präzision.....	84
Tabelle 37: Messdaten Temperaturstabilität.....	86

12 Anhang

Tabelle 17: Messdaten Plasmaproben Patient 1

Abnahmedat.	PF A	cA (ng/ml)	PF E	cE (ng/ml)	MW	SD
19.10.2016	2,54E+004	68,99	7,40E+005	1010	68,62	0,71
	2,51E+004	67,63	7,46E+005	1010		
	2,57E+004	69,24	7,46E+005	1010		
14.12.2016	2,56E+004	69,53	7,40E+005	1010	70,41	0,89
	2,59E+004	70,06	7,43E+005	1010		
	2,63E+004	71,63	7,38E+005	1010		
11.01.2017	2,72E+004	73,68	7,42E+005	1010	71,89	1,49
	2,65E+004	71,98	7,40E+005	1010		
	2,54E+004	70,03	7,29E+005	1010		
08.02.2017	2,72E+004	74,18	7,37E+005	1010	71,88	1,66
	2,63E+004	71,14	7,43E+005	1010		
	2,55E+004	70,31	7,29E+005	1010		

Tabelle 18: Messdaten Plasmaproben Patient 2

Abnahmedat.	PF A	cA (ng/ml)	PF E	cE (ng/ml)	MW	SD
06.09.2016	1,77E+003	0,00	7,31E+005	1010	0,00	0,00
	1,98E+003	0,00	7,12E+005	1010		
	2,53E+003	0,00	7,27E+005	1010		
04.10.2016	1,89E+004	55,13	6,89E+005	1010	55,72	0,58
	2,03E+004	56,51	7,22E+005	1010		
	2,03E+004	55,51	7,35E+005	1010		
31.10.2016	2,95E+004	82,12	7,22E+005	1010	81,73	0,34
	2,99E+004	81,76	7,35E+005	1010		
	2,90E+004	81,29	7,17E+005	1010		
29.11.2016	1,92E+004	53,45	7,22E+005	1010	53,74	0,36
	1,90E+004	54,24	7,04E+005	1010		
	1,87E+004	53,54	7,02E+005	1010		
28.12.2016	2,14E+004	70,40	6,11E+005	1010	71,15	0,54
	2,49E+004	71,60	6,99E+005	1010		
	2,45E+004	71,47	6,89E+005	1010		
24.01.2017	1,79E+004	51,62	6,97E+005	1010	51,11	0,36
	1,78E+004	50,89	7,03E+005	1010		
	1,81E+004	50,81	7,16E+005	1010		
22.02.2017	1,97E+004	56,00	7,07E+005	1010	56,09	0,26
	2,05E+004	56,44	7,30E+005	1010		
	2,10E+004	55,83	7,56E+005	1010		

Tabelle 19: Messdaten Plasmaproben Patient 3

Abnahmedat.	PF A	cA (ng/ml)	PF E	cE (ng/ml)	MW	SD
06.09.2016	2,30E+001	0,00	1,11E+006	1010	0,00	0,00
	-2,03E+001	0,00	1,07E+006	1010		
	-4,58E+000	0,00	1,02E+006	1010		
04.10.2016	8,03E+004	158,23	1,02E+006	1010	155,32	2,06
	7,59E+004	153,78	9,92E+005	1010		
	7,53E+004	153,96	9,83E+005	1010		
31.10.2016	7,25E+004	149,15	9,77E+005	1010	150,65	1,25
	7,26E+004	150,59	9,69E+005	1010		
	7,24E+004	152,21	9,56E+005	1010		
29.11.2016	8,47E+004	171,09	9,95E+005	1010	171,24	0,96
	8,35E+004	172,48	9,73E+005	1010		
	7,94E+004	170,13	9,38E+005	1010		
28.12.2016	6,32E+004	130,42	9,74E+005	1010	130,64	0,28
	6,16E+004	130,46	9,49E+005	1010		
	6,33E+004	131,03	9,71E+005	1010		
24.01.2017	6,67E+004	140,38	9,55E+005	1010	142,50	1,52
	6,92E+004	143,83	9,67E+005	1010		
	6,88E+004	143,30	9,65E+005	1010		
28.02.2017	3,43E+004	74,53	9,25E+005	1010	73,82	0,58
	3,46E+004	73,82	9,42E+005	1010		
	3,35E+004	73,11	9,21E+005	1010		

Tabelle 20: Messdaten Plasmaproben Patient 4

Abnahmedat.	PF A	cA (ng/ml)	PF E	cE (ng/ml)	MW	SD
08.12.2016	3,74E+004	80,83	9,30E+005	1010	80,89	0,07
	3,73E+004	80,96	9,26E+005	1010		
				1010		
06.12.2016	2,55E+004	55,11	9,30E+005	1010	56,31	0,85
	2,58E+004	56,92	9,11E+005	1010		
	2,55E+004	56,88	9,01E+005	1010		
03.01.2017	2,10E+004	46,23	9,13E+005	1010	46,50	0,38
	2,04E+004	46,23	8,87E+005	1010		
	2,05E+004	47,04	8,76E+005	1010		
31.01.2017	3,57E+004	58,81	1,22E+006	1010	57,73	0,77
	2,75E+004	57,22	9,66E+005	1010		
	2,65E+004	57,15	9,32E+005	1010		
28.02.2016	2,34E+004	50,09	9,39E+005	1010	50,10	0,03
	2,33E+004	50,14	9,34E+005	1010		
	2,27E+004	50,08	9,11E+005	1010		
28.03.2017	2,79E+004	60,23	9,31E+005	1010	60,78	0,42
	2,77E+004	61,25	9,09E+005	1010		
	2,77E+004	60,85	9,15E+005	1010		

Tabelle 21: Messdaten Plasmaproben Patient 5

Abnahmedat.	PF A	cA (ng/ml)	PF E	cE (ng/ml)	MW	SD
11.10.2016	1,12E+001	0,00	9,59E+005	1010	0,00	0,00
	1,10E+001	0,00	9,32E+005	1010		
	1,51E+001	0,00	8,92E+005	1010		
05.11.2016	3,32E+004	74,72	8,93E+005	1010	74,53	0,16
	3,31E+004	74,33	8,95E+005	1010		
	3,33E+004	74,53	8,98E+005	1010		
06.12.2016	2,84E+004	63,64	8,97E+005	1010	64,06	0,47
	2,94E+004	64,72	9,13E+005	1010		
	2,82E+004	63,83	8,88E+005	1010		
03.01.2017	4,33E+004	100,61	8,65E+005	1010	100,90	0,25
	4,14E+004	101,23	8,22E+005	1010		
	4,22E+004	100,85	8,41E+005	1010		
31.01.2017	3,97E+004	91,09	8,76E+005	1010	91,33	0,90
	3,95E+004	92,53	8,58E+005	1010		
	3,93E+004	90,38	8,74E+005	1010		
28.02.2017	3,49E+004	79,53	8,82E+005	1010	78,65	0,63
	3,39E+004	78,14	8,72E+005	1010		
	3,40E+004	78,28	8,73E+005	1010		
28.03.2017	3,30E+004	76,15	8,71E+005	1010	75,98	0,21
	3,37E+004	76,11	8,90E+005	1010		
	3,31E+004	75,69	8,79E+005	1010		

Tabelle 22: Messdaten Plasmaproben Patient 6

Abnahmedat.	PF A	cA (ng/ml)	PF E	cE (ng/ml)	MW	SD
31.10.2016	2,29E+004	50,36	9,14E+005	1010	51,10	0,71
	2,24E+004	50,87	8,85E+005	1010		
	2,23E+004	52,06	8,61E+005	1010		
29.11.2016	1,38E+004	32,07	8,65E+005	1010	31,05	1,65
	1,23E+004	28,71	8,61E+005	1010		
	1,37E+004	32,36	8,51E+005	1010		
28.12.2016	1,97E+004	46,97	8,43E+005	1010	47,02	0,16
	1,90E+004	46,86	8,15E+005	1010		
	1,93E+004	47,25	8,21E+005	1010		
25.01.2017	1,33E+004	30,90	8,65E+005	1010	31,32	0,62
	1,32E+004	31,40	8,45E+005	1010		
	1,33E+004	32,40	8,25E+005	1010		
22.02.2017	1,25E+004	30,16	8,33E+005	1010	31,05	1,24
	1,23E+004	30,19	8,19E+005	1010		
	1,33E+004	32,80	8,15E+005	1010		
26.04.2017	6,16E+002	1,49	8,30E+005	1010	1,50	0,05
	6,22E+002	1,56	8,00E+005	1010		
	5,85E+002	1,45	8,13E+005	1010		

Tabelle 23: Messdaten Plasmaproben Patient 7

Abnahmedat.	PF A	cA (ng/ml)	PF E	cE (ng/ml)	MW	SD
19.10.2016	9,00E+000	0,00	4,59E+005	1010	0,00	0,00
	7,03E+000	0,00	4,11E+005	1010		
	3,01E+000	0,00	4,15E+005	1010		
16.11.2016	3,90E+003	15,52	5,10E+005	1010	16,61	0,79
	3,52E+003	17,38	4,11E+005	1010		
	3,68E+003	16,94	4,41E+005	1010		
15.12.2016	6,25E+003	28,57	4,44E+005	1010	28,59	0,22
	6,17E+003	28,33	4,42E+005	1010		
	6,16E+003	28,88	4,33E+005	1010		
11.01.2017	4,16E+003	20,70	4,08E+005	1010	19,69	0,76
	3,84E+003	18,87	4,13E+005	1010		
	3,98E+003	19,51	4,14E+005	1010		
08.02.2017	4,74E+003	17,75	5,42E+005	1010	18,80	0,74
	4,18E+003	19,28	4,40E+005	1010		
	4,10E+003	19,35	4,30E+005	1010		
07.03.2017	4,87E+003	24,84	3,98E+005	1010	25,31	0,50
	5,03E+003	25,09	4,07E+005	1010		
	5,15E+003	26,00	4,02E+005	1010		
04.04.2017	4,91E+003	24,43	4,08E+005	1010	25,52	0,21
	5,20E+003	25,87	4,08E+005	1010		
	5,45E+003	26,28	4,21E+005	1010		

Tabelle 24: Messdaten Plasmaproben Patient 8

Abnahmedat.	PF A	cA (ng/ml)	PF E	cE (ng/ml)	MW	SD
07.11.2016	2,09E+001	0,00	4,62E+005	1020	0,00	0,04
	5,89E+000	0,00	4,72E+005	1020		
	2,45E+001	0,00	4,51E+005	1020		
06.12.2016	8,93E+003	40,46	4,48E+005	1020	40,44	0,35
	9,06E+003	40,87	4,50E+005	1020		
	8,77E+003	40,00	4,45E+005	1020		
03.01.2017	8,77E+003	39,39	4,52E+005	1020	38,63	0,71
	8,40E+003	38,84	4,39E+005	1020		
	8,00E+003	37,68	4,31E+005	1020		
31.01.2017	1,10E+004	50,52	4,42E+005	1020	52,47	1,42
	1,09E+004	53,06	4,17E+005	1020		
	1,09E+004	53,83	4,11E+005	1020		
27.02.2017	1,16E+004	52,67	4,47E+005	1020	51,81	0,86
	1,14E+004	52,12	4,44E+005	1020		
	1,09E+004	50,63	4,37E+005	1020		
27.03.2017	1,42E+004	64,05	4,50E+005	1020	63,56	1,23
	1,41E+004	64,75	4,42E+005	1020		
	1,39E+004	61,87	4,56E+005	1020		

Tabelle 25: Messdaten Plasmaproben Patient 10

Abnahmedat.	PF A	cA (ng/ml)	PF E	cE (ng/ml)	MW	SD
06.12.2016	2,95E+003 3,11E+003	19,89 16,79	3,01E+005 3,76E+005	1020 1020	18,16	1,55
03.01.2016	4,70E+003 4,15E+003 4,49E+003	23,16 20,10 20,81	4,12E+005 4,19E+005 4,38E+005	1020 1020 1020	21,36	1,30
31.01.2017	8,67E+003 8,70E+003 8,53E+003	39,28 38,41 36,92	4,48E+005 4,63E+005 4,69E+005	1020 1020 1020	38,11	0,97
28.02.2017	8,55E+003	36,61	4,74E+005	1020	36,61	0,00
27.03.2017	7,72E+003 8,27E+003 8,25E+003	33,70 36,33 33,90	4,65E+005 4,62E+005 4,94E+005	1020 1020 1020	34,64	1,20
24.04.2017	9,16E+003 8,63E+003 8,92E+003	41,13 36,88 38,94	4,52E+005 4,75E+005 4,65E+005	1020 1020 1020	38,98	1,03
22.05.2017	8,88E+003 8,81E+003 8,45E+003	36,64 37,73 36,97	4,92E+005 4,74E+005 4,64E+005	1020 1020 1020	37,11	0,46

Tabelle 26: Messdaten Plasmaproben Patient 11

Abnahmedat.	PF A	cA (ng/ml)	PF E	cE (ng/ml)	MW	SD
23.03.2017	1,18E+000	0,00	4,61E+005	1020	0,00	0,0
	1,13E+001	0,00	4,49E+005	1020		
	1,34E+001	0,00	4,20E+005	1020		
19.04.2017	1,02E+004	51,37	4,03E+005	1020	50,41	1,04
	9,89E+003	48,96	4,10E+005	1020		
	9,83E+003	50,90	3,92E+005	1020		
10.05.2017	1,01E+004	52,43	3,91E+005	1020	53,89	1,06
	1,03E+004	54,30	3,85E+005	1020		
	1,05E+004	54,93	3,88E+005	1020		
07.06.2017	1,22E+004	59,53	4,16E+005	1020	59,03	1,40
	1,20E+004	61,05	3,99E+005	1020		
	1,15E+004	56,52	4,13E+005	1020		
05.07.2017	1,18E+004	58,28	4,11E+005	1020	57,93	1,40
	1,08E+004	56,07	3,91E+005	1020		
	1,11E+004	59,45	3,79E+005	1020		
02.08.2017	9,69E+003	51,35	3,83E+005	1020	51,67	0,91
	9,02E+003	52,92	3,46E+005	1020		
	8,95E+003	50,75	3,58E+005	1020		
06.09.2017	1,47E+004	84,53	3,53E+005	1020	38,25	1,20
	1,47E+004	83,58	3,57E+005	1020		
	1,48E+004	81,63	3,68E+005	1020		

Tabelle 27: Messdaten Plasmaproben Patient 12

Abnahmedat.	PF A	cA (ng/ml)	PF E	cE (ng/ml)	MW	SD
27.03.2017	1,24E+001	0,00	3,58E+005	1020	0,00	0,0
	1,06E+001	0,00	3,46E+005	1020		
	9,85E+000	0,00	3,44E+005	1020		
24.04.2017	4,28E+003	24,27	3,58E+005	1020	26,41	2,35
	4,20E+003	25,30	3,37E+005	1020		
	4,62E+003	29,68	3,16E+005	1020		
22.05.2017	7,17E+003	44,78	3,25E+005	1020	44,81	2,14
	7,41E+003	47,45	3,17E+005	1020		
	6,84E+003	42,20	3,29E+005	1020		
19.06.2017	5,79E+003	37,31	3,15E+005	1020	35,65	1,70
	5,07E+003	33,30	3,09E+005	1020		
	5,53E+003	36,33	3,09E+005	1020		
17.07.2017	5,27E+003	33,53	3,19E+005	1020	35,68	2,08
	5,67E+003	38,49	2,99E+005	1020		
	5,07E+003	35,00	2,94E+005	1020		
14.08.2017	1,05E+004	70,34	3,03E+005	1020	69,70	1,06
	9,94E+003	70,55	2,86E+005	1020		
	9,98E+003	68,21	2,97E+005	1020		
11.09.2017	7,95E+003	54,15	2,98E+005	1020	52,42	1,92
	7,94E+003	49,74	3,24E+005	1020		
	7,60E+003	53,38	2,89E+005	1020		

Tabelle 28: Messdaten Plasmaproben Patient 14

Abnahmedat.	PF A	cA (ng/ml)	PF E	cE (ng/ml)	MW	SD
24.04.2017	4,65E+000	0,00	1,68E+005	1020	0,00	0,0
	1,13E+001	0,00	3,08E+005	1020		
	1,33E+001	0,00	3,22E+005	1020		
22.05.2017	9,49E+003	56,99	3,38E+005	1020	57,34	0,71
	9,89E+003	56,71	3,54E+005	1020		
	1,00E+004	52,24	3,48E+005	1020		
19.06.2017	8,75E+003	52,25	3,40E+005	1020	50,56	1,22
	8,36E+003	50,06	3,39E+005	1020		
	8,37E+003	49,39	3,44E+005	1020		
17.07.2017	1,02E+004	62,55	3,31E+005	1020	62,17	1,15
	1,03E+004	63,35	3,30E+005	1020		
	1,06E+004	60,61	3,55E+005	1020		
16.08.2017	1,48E+004	80,97	3,71E+005	1020	82,96	1,48
	1,45E+004	83,38	3,53E+005	1020		
	1,47E+004	84,53	3,53E+005	1020		
11.09.2017	1,19E+004	72,32	3,34E+005	1020	71,47	1,45
	1,21E+004	72,66	3,38E+005	1020		
	1,18E+004	69,43	3,45E+005	1020		
18.10.2017	4,07E+003	25,58	3,23E+005	1020	25,64	0,58
	4,64E+003	26,38	3,57E+005	1020		
	4,34E+003	24,96	3,53E+005	1020		

Tabelle 29: Messdaten Plasmaproben Patient 15

Abnahmedat.	PF A	cA (ng/ml)	PF E	cE (ng/ml)	MW	SD
27.03.2017	2,23E+000	0,00	3,53E+005	1020	0,00	0,00
	1,42E+001	0,00	3,34E+005	1020		
24.04.2017	5,36E+003	36,88	2,95E+005	1020	37,65	0,69
	5,64E+003	38,55	2,97E+005	1020		
	5,12E+003	37,52	2,77E+005	1020		
22.05.2017	6,85E+003	46,50	2,99E+005	1020	45,78	0,54
	6,88E+003	45,64	3,06E+005	1020		
	6,48E+003	45,20	2,91E+005	1020		
19.06.2017	6,09E+003	42,63	2,90E+005	1020	41,28	0,98
	6,00E+003	40,33	3,02E+005	1020		
	5,40E+003	40,90	2,68E+005	1020		
17.07.2017	6,95E+003	43,01	3,28E+005	1020	44,96	1,39
	6,42E+003	45,72	2,85E+005	1020		
	6,64E+003	46,16	2,92E+005	1020		
14.08.2017	6,48E+003	42,43	3,10E+005	1020	45,68	2,34
	6,43E+003	47,81	2,73E+005	1020		
	6,55E+003	46,81	2,84E+005	1020		
11.09.2017	5,32E+003	38,02	2,84E+005	1020	40,25	1,58
	6,04E+003	41,28	2,97E+005	1020		
	6,25E+003	41,46	3,06E+005	1020		

Tabelle 30: Messdaten Plasmaproben Patient 16

Abnahmedat.	PF A	cA (ng/ml)	PF E	cE (ng/ml)	MW	SD
03.07.2017	1,16E+001	0,00	2,90E+005	1020	0,00	0,00
	8,56E+000	0,00	3,17E+005	1020		
	1,24E+001	0,00	2,95E+005	1020		
31.07.2017	6,05E+003	42,64	2,88E+005	1020	42,71	0,35
	5,86E+003	42,33	2,81E+005	1020		
	6,21E+003	43,17	2,92E+005	1020		
04.09.2017	2,93E+003	19,50	3,05E+005	1020	18,58	1,03
	2,85E+003	19,09	3,03E+005	1020		
	2,66E+003	17,14	3,15E+005	1020		
09.10.2017	1,84E+003	12,66	2,95E+005	1020	12,93	0,27
	1,99E+003	13,20	3,06E+005	1020		

Tabelle 31: Messdaten Eichgerade - Linearität

Messung	PF A	c A (ng/ml) CALC.	c A (ng/ml) SOLL	Acc. In %
V1 550 ng/ml (1)	1,78E+006	597	550	109
V1 550 ng/ml (2)	1,65E+006	552	550	100
V1 550 ng/ml (3)	1,46E+006	489	550	88,9
MW	1,63E+006	546		
SD	160934,77	54,25		
V2 285 ng/ml (1)	9,45E+005	313	285	110
V2 285 ng/ml (2)	8,70E+005	288	285	101
V2 285 ng/ml (3)	8,69E+005	287	285	101
MW	9,07E+005	296		
SD	53033,01	14,73		
V3 55 ng/ml (1)	1,60E+005	47,1	55	85,6
V3 55 ng/ml (2)	1,41E+005	40,5	55	73,6
V3 55 ng/ml (3)	1,31E+005	37,2	55	67,6
MW	1,44E+005	41,6		
SD	14730,92	5,04		
V4 28,5 ng/ml (1)	9,33E+004	24,5	28,5	86
V4 28,5 ng/ml (2)	9,27E+004	24,3	28,5	85,2
V4 28,5 ng/ml (3)	8,74E+004	22,5	28,5	79
MW	9,11E+004	23,77		
SD	3247,05	1,10		

Tabelle 32: Messdaten Systemeignung

Messung	Name	PF A	PF E (1030ng/ml)	c A (ng/ml) IST	c A (ng/ml) SOLL	Ret.Time (min)
1	A1a	1,09E+004	1,89E+005	112,27	102,00	3,41
2	A1b	1,04E+004	1,86E+005	111,99	102,00	3,43
3	A1c	1,06E+004	1,84E+005	112,15	102,00	3,42
4	A1d	1,07E+004	1,86E+005	111,99	102,00	3,39
5	A1e	1,06E+004	1,87E+005	110,35	102,00	3,39
6	A1f	1,05E+004	1,85E+005	110,49	102,00	3,40
MW		1,07E+004	1,86E+005	111,54		3,41
SD		124,72	1572,33	0,80		0,01
RSD in %		1,17	0,84	0,72		0,44
1	A2a	5,35E+003	1,77E+005	58,84	51,00	3,41
2	A2b	5,36E+003	1,84E+005	56,71	51,00	3,38
3	A2c	5,33E+003	1,84E+005	56,39	51,00	3,40
4	A2d	5,34E+003	1,81E+005	57,43	51,00	3,39
5	A2e	5,37E+004	1,85E+005	56,51	51,00	3,45
6	A2f	5,31E+003	1,85E+005	55,88	51,00	3,44
MW		5,34E+003	1,83E+005	56,96		3,41
SD		19,72	2867,44	0,96		0,03
RSD in %		0,37	1,57	1,69		0,75
1	A3a	4,79E+004	1,83E+005	509,55	510,00	3,40
2	A3b	4,95E+004	1,89E+005	509,85	510,00	3,38
3	A3c	5,00E+004	1,89E+005	515,00	510,00	3,41

4	A3d	5,00E+004	1,91E+005	509,61	510,00	3,42
5	A3e	5,03E+004	1,92E+005	509,99	510,00	3,43
6	A3f	4,98E+004	1,90E+005	510,24	510,00	3,43
MW		4,96E+004	1,89E+005	510,71		3,41
SD		790,39	2886,75	1,93		0,02
RSD in %		1,59	1,53	0,38		0,52

Tabelle 33: Messdaten Spezifität

Messung	Name	PF A	PF E (1030 ng/ml)	c A (ng/ml) IST	c A (ng/ml) SOLL
1	A1a	4,79E+004	1,83E+005	112,27	102,00
2	A1b	4,95E+004	1,89E+005	111,99	102,00
3	A1c	5,00E+004	1,89E+005	112,15	102,00
4	A1d	5,00E+004	1,91E+005	111,99	102,00
5	A1e	5,03E+004	1,92E+005	110,35	102,00
6	A1f	4,98E+004	1,90E+005	110,49	102,00
MW		49583,33	189000,00	111,54	
SD		790,39	2886,75	0,80	
RSD in %		1,17	1,53	1,59	
H2O nach 6. Messung		Kein Peak		< 0	
Carry over in %		0			
1	A2a	1,09E+00	1,89E+005	112,27	51,00
2	A2b	1,07E+004	1,86E+005	111,99	51,00
3	A2c	1,06E+004	1,84E+005	112,15	51,00

4	A2d	1,07E+004	1,86E+005	111,99	51,00
5	A2e	1,06E+004	1,87E+005	110,35	51,00
6	A2f	1,05E+004	1,85E+005	110,49	51,00
MW		10666,67	186166,67	111,54	
SD		124,72	1572,33	0,80	
RSD in %		1,17	0,84	0,72	
H20 nach 6. Messung		Kein Peak		< 0	
Carry over in %		0			
1	A3a	5,99+003	1,93E+005	60,42	510,00
2	A3b	5,95E+003	1,91E+005	60,64	510,00
3	A3c	5,99E+003	1,94E+005	60,11	510,00
4	A3d	5,97E+003	1,88E+005	61,82	510,00
5	A3e	5,96E+003	1,82E+005	63,75	510,00
6	A3f	4,93E+003	1,85E+005	62,40	510,00
MW		5965,00	188833,33	61,52	
SD		21,41	4297,93	1,28	
RSD in %		0,36	2,28	2,08	
H20 nach 6. Messung		Kein Peak			
Carry over in %		0			

Tabelle 34: Messdaten Methodenpräzision

Messung	Name	PF A	PF E (1030 ng/ml)	c A (ng/ml) IST
1	R 102 ng/ml a	1,09+004	1,89E+005	112,27
2	R 102 ng/ml b	1,07E+004	1,86E+005	111,99
3	R 102 ng/ml c	1,06E+004	1,84E+005	112,15
4	R 102 ng/ml d	1,07E+004	1,86E+005	111,99
5	R 102 ng/ml e	1,06E+004	1,87E+005	110,35
6	R 102 ng/ml f	1,05E+004	1,85E+005	110,49
MW		10666,67	1,86E+005	111,54
SD		124,72	954,60	0,80
RSD in %		1,17	0,51	0,72
1	R 51 ng/ml a	5,35E+003	1,77E+005	58,84
2	R 51 ng/ml b	5,36E+003	1,84E+005	56,71
3	R 51 ng/ml c	5,33E+003	1,84E+005	56,39
4	R 51 ng/ml d	5,34E+003	1,81E+005	57,43
5	R 51 ng/ml e	5,37E+003	1,85E+005	56,51
6	R 51 ng/ml f	5,31E+003	1,85E+005	55,88
MW		10666,67	1,83E+005	56,96
SD		124,72	2867,44	0,96
RSD in %		1,17	1,57	1,69
1	Patient 14.7 a	1,34E+004	3,78E+005	73,75
2	Patient 14.7 b	1,36E+004	3,78E+005	74,29
3	Patient 14.7 c	1,38E+004	3,75E+005	75,43
4	Patient 14.7 d	1,38E+004	3,76E+005	75,23

5	Patient 14.7 e	1,38E+004	3,77E+005	75,03
6	Patient 14.7 f	1,38E+004	3,76E+005	75,23
MW		13650,00	3,77E+005	74,65
SD		152,75	1105,54	0,84
RSD in %		1,12	0,29	1,12
1	Patient 15.7 a	1,69E+004	3,47E+005	50,16
2	Patient 15.7 b	1,73E+004	3,55E+005	50,19
3	Patient 15.7 c	1,69E+004	3,50E+005	49,73
4	Patient 15.7 d	1,70E+004	3,47E+005	50,46
5	Patient 15.7 e	1,67E+004	3,53E+005	48,73
6	Patient 15.7 f	1,70E+004	3,47E+005	50,46
MW		16966,67	3,50E+005	49,69
SD		179,51	3184,16	0,60
RSD in %		1,06	0,91	1,20

Tabelle 35: Messdaten Wiederholbarkeit

Probenplasma					
	Messung	PF A	PF E (1030ng/ml)	c A (ng/ml) IST	c A (ng/ml) SOLL
1	P1a	1,01E+004	1,83E+005	107,44	102,00
	P1b	1,02E+004	1,84E+005	107,91	102,00
	P1c	1,02E+004	1,85E+005	107,33	102,00
	MW			107,56	
	STABW			0,25	
	RSD in %			0,24	
2	P2a	9,89E+003	1,77E+005	108,77	102,00
	P2b	9,85E+003	1,77E+005	108,33	102,00
	P2c	5,89E+003	1,75E+005	110,02	102,00
	MW	10666,67		109,04	
	SD	124,72		0,71	
	RSD in %	1,17		0,65	
3	P3a	9,49E+003	1,72E+005	107,41	102,00
	P3b	8,66E+003	1,63E+005	103,43	102,00
	P3c	8,90E+003	1,62E+005	106,95	102,00
	MW	13650,00		105,93	
	SD	152,75		1,75	
	RSD in %	1,12		1,68	
	P10	8,52E+003	1,58E+005	104,97	102,00
	P11	8,68E+003	1,58E+005	106,95	102,00

4	P12	8,50E+003	1,53E+005	108,15	102,00
	MW	16966,67		106,69	
	SD	179,51		1,60	
	RSD in %	1,06		1,50	
5	P13	8,84E+003	1,58E+005	104,97	102,00
	P14	8,83E+003	1,58E+005	106,95	102,00
	P15	8,75E+003	1,57E+005	108,15	102,00
	MW	16966,67		108,73	
	SD	179,51		0,22	
	RSD in %	1,06		0,20	
6	P16	8,70E+003	1,56E+005	108,57	102,00
	P17	8,72E+003	1,57E+005	108,12	102,00
	P18	8,71E+003	1,58E+005	107,31	102,00
	MW	16966,67		108,00	
	SD	179,51		0,63	
	RSD in %	1,06		0,59	
GESAMT					
	MW			107,66	
	STABW			1,51	
	RSD %			1,40	
Wasser					
	Messung	PF A	PF E (1030ng/ml)	c A (ng/ml) IST	c A (ng/ml) SOLL
	H201a	8,37E+003	1,59E+005	102,48	102,00
	H201b	8,31E+003	1,60E+005	101,11	102,00

1	H201c	8,16E+003	1,55E+005	102,48	102,00
	MW			102,02	
	STABW			0,79	
	RSD in %			0,78	
2	H202a	8,41E+003	1,60E+005	102,32	102,00
	H202b	8,41E+003	1,63E+005	100,44	102,00
	H202c	8,41E+003	1,62E+005	101,06	102,00
	MW			101,27	
	SD			0,69	
	RSD in %			0,95	
3	H203a	8,43E+003	1,64E+005	100,07	102,00
	H203b	8,40E+003	1,63E+005	100,32	102,00
	H203c	8,49E+003	1,62E+005	102,02	102,00
	MW			100,80	
	SD			1,06	
	RSD in %			1,05	
4	H204a	8,41E+003	1,62E+005	101,06	102,00
	H204b	8,24E+003	1,57E+005	102,17	102,00
	H204c	8,36E+003	1,58E+005	103,00	102,00
	MW			102,08	
	SD			0,97	
	RSD in %			0,95	
5	H205a	8,42E+003	1,63E+005	100,56	102,00
	H205b	8,45E+003	1,64E+005	100,30	102,00

	H205c	8,35E+003	1,62E+005	100,34	102,00
	MW			100,40	
	SD			0,14	
	RSD in %			0,14	
6	H206a	8,10E+003	1,57E+005	100,43	102,00
	H206b	8,20E+003	1,59E+005	100,40	102,00
	H206c	8,20E+003	1,56E+005	102,33	102,00
	MW			101,05	
	SD			1,10	
	RSD in %			1,09	
GESAMT					
	MW			101,27	
	STABW			0,98	
	RSD %			0,97	

Tabelle 36: Messdaten Tag zu Tag Präzision

Tag	Probe	PF A	PF E (1030 ng/ml)	cA (ng/ml) IST	cA (ng/ml) SOLL
Probe 1					
1	A 51 – 26.1	4,75E+004	1,77E+005	58,84	51,00
	A 51 – 26.1	4,75E+004	1,84E+005	56,71	51,00
	A 51 – 26.1	4,68E+004	1,84E+005	56,39	51,00
	A 51 – 26.1	4,45E+004	1,81E+005	57,43	51,00
	A 51 – 26.1	4,42E+004	1,85E+005	56,51	51,00
	A 51 – 26.1	4,43E+004	1,85E+005	55,88	51,00
MW				59,96	
STABW				0,96	
RSD				1,69	
Varianz s_1^2				0,92	
2	A51 - 29.1	5,99E+003	1,93E+005	60,42	51,00
	A51 - 29.1	5,95E+003	1,91E+005	60,64	51,00
	A51 - 29.1	5,99E+003	1,94E+005	60,11	51,00
	A51 - 29.1	5,97E+003	1,88E+005	61,82	51,00
	A51 - 29.1	5,96E+003	1,82E+005	63,75	51,00
	A51 - 29.1	5,96E+003	1,85E+005	62,40	51,00
MW				61,52	
STABW				1,28	
RSD				2,08	
Varianz s_2^2				1,64	

F- Test (95% 6,6) = 1,77					
Probe 2					
1	A510 – 26.1	4,75E+004	1,80E+005	513,71	510,00
	A510 – 26.1	4,75E+004	1,81E+005	510,87	510,00
	A510 – 26.1	4,68E+004	1,78E+005	511,83	510,00
	A510 – 26.1	4,45E+004	1,68E+005	515,64	510,00
	A510 – 26.1	4,42E+004	1,69E+005	509,14	510,00
	A510 – 26.1	4,43E+004	1,70E+005	507,29	510,00
MW				511,41	
STABW				3,03	
RSD				0,59	
Varianz s ₁ ²				9,17	
	A510 - 29.1	4,79E+004	1,83E+005	509,55	
	A510 - 29.1	4,95E+004	1,89E+005	509,85	
	A510 - 29.1	5,00E+004	1,89E+005	515,00	
	A510 - 29.1	5,00E+004	1,91E+005	509,61	
	A510 - 29.1	5,03E+004	1,92E+005	509,99	
	A510 - 29.1	4,98E+004	1,90E+005	510,24	
MW				510,71	
STABW				1,93	
RSD				0,38	
Varianz s ₂ ²				3,74	
F- Test (95% 6,6) = 2,45					

Tabelle 37: Messdaten Temperaturstabilität

Probe	Temp.	PF A	PF E (1030ng/ml)	c (ng/mL) IST	c (ng/ml) SOLL	Abbau %
A1	- 20 °C	2,74E+004	1,77E+005	301,35	300,00	-0,45
A2	- 20 °C	2,79E+004	1,81E+005	300,07	300,00	-0,02
A3	- 20 °C	2,75E+004	1,80E+005	297,41	300,00	0,86
A4	- 20 °C	2,78E+004	1,79E+005	302,34	300,00	-0,78
A5	- 20 °C	2,73E+004	1,78E+005	298,57	300,00	0,48
A6	- 20 °C	2,78E+004	1,81E+005	299,00	300,00	0,33
	MW	27616,67	179333,33	299,79		0,07
	STABW	226,69	1490,71	1,67		0,56
	RSD %	0,82	0,83	0,56		794,63
A1	KS 5-6 °C	1,99E+004	1,35E+005	286,96	300,00	4,35
A2	KS 5-6 °C	2,20E+004	1,49E+005	287,43	300,00	4,19
A3	KS 5-6 °C	2,25E+004	1,53E+005	286,28	300,00	1,57
A4	KS 5-6 °C	2,37E+004	1,60E+005	288,35	300,00	3,88
A5	KS 5-6 °C	2,47E+004	1,66E+005	289,66	300,00	3,45
A6	KS 5-6 °C	2,54E+004	1,65E+005	299,67	300,00	0,11
	MW	23033,33	154666,67	289,73		3,42
	STABW	1825,44	10687,48	4,58		1,53
	RSD	7,93	6,91	1,58		44,54

A1	AS 4 °C	2,34E+004	1,52E+005	299,69	300,00	0,10
A2	AS 4 °C	2,37E+004	1,55E+005	297,66	300,00	0,78
A3	AS 4 °C	2,34E+004	1,52E+005	299,69	300,00	0,10
A4	AS 4 °C	2,37E+004	1,54E+005	299,59	300,00	0,14
A5	AS 4 °C	2,33E+004	1,53E+005	296,46	300,00	1,18
A6	AS 4 °C	2,33E+004	1,52E+005	298,41	300,00	0,53
	MW	23466,67	153000,00	298,58		0,47
	STABW	169,97	1154,70	1,22		0,41
	RSD	0,72	0,75	0,41		85,71

13 Literaturverzeichnis

- [1] Aktories, K., Forth, W. (2013). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker, 11. Aufl. Elsevier Urban & Fischer, München, S. 747, 780-782.
- [2] Lymphome im Überblick. <http://www.krebsimfokus.at/ueber-krebs/lymphome/im-ueberblick.html> (letzter Zugriff am 22.5.2018).
- [3] Lymphome, Ein Leitfaden für Betroffene und Angehörige. <https://www.lymphome.ch/leitfaden/Leitfaden-deutsch/Leitfaden-deutsch.html#p=30> (letzter Zugriff am 22.5.2018).
- [4] Michl, M. (2016). BASICS Hämatologie, 4. Aufl. Elsevier Urban & Fischer, München, S. 78-80.
- [5] Dreyling, M. (2012). Maligne Lymphome. [Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge], 9. Aufl. Zuckschwerdt, München, S. 1-6.
- [6] Eck, M., Fischbach, W. (2010). Magenlymphome vom MALT-Typ. Pathologie, Pathogenese, Diagnostik und Therapie. Der Pathologe **31**/3, 188–194.
- [7] Berger, D. P., Engelhardt, R., Mertelsmann, R., Engelhardt, M. (2010). Das Rote Buch. Hämatologie und Internistische Onkologie, 4. Aufl. ecomed Medizin, Heidelberg, Hamburg, S. 28, 687.
- [8] MALT-Lymphom. <http://myelom-lymphom.at/krankheitsformen/lymphom/krankheitsbilder/malt-lymphom/> (letzter Zugriff am 26.5.2018).
- [9] Schöllkopf, C., Melbye, M., Munksgaard, L., Smedby, K. E., Rostgaard, K., Glimelius, B., Chang, E. T., Roos, G., Hansen, M., Adami, H.-O., Hjalgrim, H. (2008). Borrelia infection and risk of non-Hodgkin lymphoma. Blood **111**/12, 5524–5529.

- [10] Roggero, E., Zucca, E., Mainetti, C., Bertoni, F., Valsangiacomo, C., Pedrinis, E., Borisch, B., Piffaretti, J. C., Cavalli, F., Isaacson, P. G. (2000). Eradication of *Borrelia burgdorferi* infection in primary marginal zone B-cell lymphoma of the skin. *Human pathology* **31**/2, 263–268.
- [11] Antonie Dragosics, B. (2004). Das primäre maligne Lymphom des Magens: Die Zeit der Reife. *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen* **2**/1, 5–9.
- [12] Strukturformel - Azithromycin. <https://de.wikipedia.org/wiki/Azithromycin> (letzter Zugriff am 25.5.2018).
- [13] Strukturformel - Erythromycin. <https://de.wikipedia.org/wiki/Erythromycin> (letzter Zugriff am 25.5.2018).
- [14] Du, M.-Q. (2007). MALT Lymphoma. *Recent Advances in Aetiology and Molecular Genetics. JCEH* **47**/2, 31–42.
- [15] Caspary, W. F., Kist, M., Stein, J. (2006). *Infektiologie des Gastrointestinaltraktes*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S. 178.
- [16] Brodt, H.-R., Stille, W., Smollich, M. (2013). *Antibiotika-Therapie. Klinik und Praxis der antiinfektiösen Behandlung*, 12. Aufl. Schattauer, Stuttgart, S. 16,20, 174-175.
- [17] Scarpignato, C. (2004). *Clinical pharmacology and therapy of Helicobacter pylori infection*. Karger, Basel.
- [18] Donati, M., Rodríguez Fermepin, M., Olmo, A., D'Apote, L., Cevenini, R. (1999). Comparative in-vitro activity of moxifloxacin, minocycline and azithromycin against *Chlamydia* spp. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **43**/6, 825–827.

- [19] Ernährung und Arzneimittelwirkung.
<http://www.medizinfo.de/arzneimittel/pharmakokinetik/ernaehrung.shtml>
(letzter Zugriff am 25.5.2018).
- [20] Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 Standard Systems (2017).
<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/brochures/BR-70154-LC-UltiMate-3000-Standard-BR70154-EN.pdf> (letzter Zugriff am 24.5.2018).
- [21] Thermo Fisher Scientific Inc. UltiMate 3000.
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ULTIM3000RSLCNANO>
(letzter Zugriff am 24.5.2018).
- [22] Analytische Chemie (für Biol. / Pharm. Wiss.).
http://www.analytik.ethz.ch/vorlesungen/biopharm/Trennmethoden/AnalytischeChemie_Skript_3_LC.pdf (letzter Zugriff am 25.5.2018).
- [23] Aufbau eines Massenspektrometers.
http://www.vias.org/tmanalytik_germ/hl_ms_princschema.html
(letzter Zugriff am 22.5.2018).
- [24] Grebe, S. K., Singh Ravinder J (2011). LC-MS/MS in the Clinical Laboratory - Where to From Here. Clin Biochem Rev **32**/1, 5–31.
- [25] High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry (HPLC/MS).
<http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/hplcms.html>
(letzter Zugriff am 25.5.2018).
- [26] Massenfilter - Quadrupol.
http://www.vias.org/tmanalytik_germ/hl_ms_quadrupol.html
(letzter Zugriff am 22.5.2018).
- [27] Proteomics methods.
<http://research.bmh.manchester.ac.uk/endocrinologyanddiabetes/cadet/proteomics/protmethods/> (letzter Zugriff am 22.5.2018).

- [28] Barrett, B., Borek-Dohalský, V., Fejt, P., Vaingátová, S., Huclová, J., Nemec, B., Jelínek, I. (2005). Validated HPLC-MS-MS method for determination of azithromycin in human plasma. *Analytical and bioanalytical chemistry* **383**/2, 210–217.
- [29] Beringer, P., Huynh, K. M. T., Kriengkauykiat, J., Bi, L., Hoem, N., Louie, S., Han, E., Nguyen, T., Hsu, D., Rao, P. A., Shapiro, B., Gill, M. (2005). Absolute bioavailability and intracellular pharmacokinetics of azithromycin in patients with cystic fibrosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**/12, 5013–5017.
- [30] Blutplasma. <http://flexikon.doccheck.com/de/Blutplasma> (letzter Zugriff am 24.5.2018).
- [31] Wätzig, H., Mehnert, W., Bühler, W. (2009). *Mathematik und Statistik kompakt. Grundlagen und Anwendungen in Pharmazie und Medizin*, Wiss. Verl.-Ges, Stuttgart, S. 202-214, 273-316.