

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Entwicklung eines chromatografischen Analyseverfahrens für die Echinocandine Micafungin und
Anidulafungin in Humanplasma und Aspekte des Therapeutischen Drug Monitorings (TDM) der
Echinocandine bei Patienten einer internistischen Intensivstation**

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. med.
(doctor medicinae)
an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**vorgelegt von
aus
Magdeburg**

**Victoria Rupprecht
Hannover
2013**

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Dokumentationsblatt	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Epidemiologie, Pathogenese und Kosten von Pilzinfektionen	1
1.2 Echinocandine	2
1.2.1 Wirkmechanismus und Wirkspektrum	2
1.2.2 Indikation und Dosierung	3
1.2.3 Pharmakokinetik.....	4
1.2.4 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) und Interaktionen	5
1.3 Therapeutisches Drug Monitoring (TDM)	6
1.4 Stand der Forschung.....	6
1.5 Zielsetzung der Arbeit	8
2. Material, Methoden und Patienten	9
2.1 Material	9
2.2 Methoden.....	9
2.2.1 Das Prinzip der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	9
2.2.2 Methoden der Probenaufbereitung	11
2.2.3 Vorbereitung der verwendeten Lösungen	12
2.2.4 Kalibrierlösungen und interner Standard	12
2.2.5 Kalibrier- und Qualitätskontrollproben	13
2.2.6 Lösungen für die Festphasenextraktion	14
2.2.7 Das HPLC–System: Säulen und Einstellungen	15
2.2.8 Validierung.....	17
2.3 Patienten	18
2.3.1 Patientenkollektiv.....	18
2.4 Statistische Auswertung.....	20
3. Ergebnisse	22
3.1 HPLC Methode.....	22
3.1.1 Probenaufarbeitung und Extraktionsausbeute	22
3.1.2 Chromatografische Auftrennung.....	22
3.1.3 Gradientenoptimierung.....	22
3.2 Detektionsverfahren	24
3.2.1 Fluoreszenzdetektion	24

3.2.2	Massenspektrometrie	24
3.2.3	UV-Detektion	25
3.3	Validierung	26
3.3.1	Kalibrierung	26
3.3.2	Bestimmungs- und Nachweisgrenze	28
3.3.3	Präzision und Richtigkeit	28
3.3.4	Stabilität.....	29
3.3.5	Matrixunabhängigkeit	29
3.4	Analyse des Patientenkollektivs	30
3.4.1	Demografische Übersicht	30
3.4.2	Aufnahmediagnose.....	31
3.4.3	Pilznachweis	31
3.4.4	Einteilungen.....	32
3.4.5	Laborwerte und Echinocandinspiegel	34
3.4.6	Dosierung, Dosisanpassungen und therapeutischer Bereich.....	36
4.	Diskussion	38
4.1	Analytik zur Quantifizierung von Micafungin und Anidulafungin	38
4.1.1	Probenaufarbeitung und Extraktionsausbeute	38
4.1.2	Interner Standard	38
4.1.3	Chromatografische Auftrennung und Gradientenoptimierung	39
4.2	Detektionsverfahren	40
4.2.1	Fluoreszenzdetektion	40
4.2.2	Massenspektrometrie	40
4.2.3	UV-Spektrometrie.....	41
4.3	Validierung	42
4.3.1	Kalibrierung	42
4.3.2	Präzision und Richtigkeit	43
4.3.3	Stabilität und Matrixunabhängigkeit.....	43
4.4	Eignung der entwickelten Methode für die Laborroutine	43
4.5	Analyse des Patientenkollektivs	44
4.5.1	Bewertung der Echinocandinspiegel in Zusammenhang mit der Patienteneinteilung	44
4.5.2	Zusammenhang zwischen Echinocandinspiegel und Laborwerten.....	46
4.5.3	Dosierung, Dosisanpassungen und therapeutischer Bereich.....	48
4.5.4	Limitation der retrospektiven Auswertung	49
4.6	Ausblick	49
5.	Zusammenfassung	51
6.	Literaturverzeichnis	53

7. Anhang.....	60
7.1 Eigenschaften der Echinocandine	60
7.2 Laborgeräte	61
7.3 Material	62
7.3.1 Chromatografische Säulen	62
7.3.2 Verbrauchsmaterial, Chemikalien und Referenzsubstanzen	62
7.3.3 Computersoftware	63
7.3.4 Definitionen in der Validierung	64
7.3.5 Laborwerte und Referenzbereiche.....	65
7.4 Detektionsverfahren	66
7.5 Isotopenverteilung von Micafungin und Anidulafungin	67
7.6 Kalibrierfunktionen.....	68
Danksagung.....	70
Selbständigkeitserklärung.....	71
Darstellung des Bildungsweges	72

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Rupprecht, Victoria

Entwicklung eines chromatografischen Analyseverfahrens für die Echinocandine Micafungin und Anidulafungin in Humanplasma und Aspekte des Therapeutischen Drug Monitorings (TDM) der Echinocandine bei Patienten einer internistischen Intensivstation
2013, 79 Bl., 17 Abb., 28 Tab., 102 Ref.

Kurzreferat

Die Echinocandine gehören zur Klasse der Antimykotika und sind erst seit kurzer Zeit in Deutschland zugelassen. Bei neueren Medikamenten fehlen trotz der Kenntnis der pharmakologischen Eigenschaften oftmals Aussagen zum pharmakokinetischen Verhalten innerhalb von besonderen Patientengruppen wie z. B. auf der Intensivstation (ITS).

Das Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines chromatografischen Messverfahrens zur Bestimmung der Echinocandine im Blutplasma. Zusätzlich erfolgte eine Analyse der Echinocandinkonzentration von Caspofungin und Micafungin bei Patienten der internistischen ITS des Universitätsklinikums Magdeburg unter verschiedenen Aspekten des Therapeutischen Drug Monitorings (TDM). Dafür wurden 45 Patienten mit insgesamt 108 gemessenen Echinocandinspiegeln untersucht.

Die Detektion der Echinocandine Anidulafungin und Micafungin erfolgte auf einem RP-HPLC (Reversed Phase-High-Performance Liquid Chromatography) System mit einem Acetonitril/Wasser-Gemisch als mobile Phase unter der Anwendung der Gradientenelution. Anidulafungin und Micafungin dienten jeweils gegenseitig als interner Standard. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Detektor bei Wellenlängen von 273 nm und 306 nm. Die Validierung der Messmethode erfolgte im Kalibrierbereich von 0,1 bis 20 µg/ml und zeigte eine Präzision und Richtigkeit in einer Serie und von Tag zu Tag innerhalb den von der Bundesärztekammer geforderten Richtlinien.

In der Korrelationsanalyse nach Spearman zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Caspofunginspiegel und dem Kreatininwert ($r_s = 0,516$; $p = 0,004$) sowie dem Micafunginspiegel und dem Bilirubinwert ($r_s = 0,321$; $p = 0,004$). Von den 29 % der Spiegelbestimmungen, die außerhalb des therapeutischen Bereichs von 1 bis 4 µg/ml lagen, waren 77 % unterhalb des Referenzbereichs. Die Dosisanpassungen wurden nach 20 % aller Spiegelbestimmungen durchgeführt. Die Ursache für die Dosisanpassungen waren bei 41 % von allen untersuchten Dosisanpassungen erhöhte bzw. verringerte Echinocandinspiegel und Veränderungen der Leberwerte ALAT, ASAT, GGT oder Bilirubin.

Das TDM von Echinocandinen ist mit dem entwickelten chromatografischen Messverfahren einfach und valide in der täglichen Laborroutine möglich. Es konnte gezeigt werden, dass das TDM von Echinocandinen vor allem bei intensivpflichtigen Patienten auf Grund ihrer variablen Pharmakokinetik zur individualisierten und sicheren Therapie der invasiven Candidiasis sinnvoll sein kann.

Schlüsselwörter: Antimykotika, Echinocandine, Therapeutisches Drug Monitoring (TDM), HPLC, Candida, Intensivmedizin

Abkürzungsverzeichnis

ALAT	Alanin-Aminotransferase
amu	Atomic Mass Unit (dt.: Atomare Masseneinheit)
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (dt.: Atmosphärendruckionisation)
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
AUC	Area-under-the-Curve
BMI	Body-Mass-Index
c	Konzentration
C.	Candida
CK	Kreatininkinase
C _{max}	maximale Medikamentenkonzentration
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
Crea	Kreatinin
CRP	C-reaktives Protein
CYP450	Cytochrom P450
DAD	Dioden-Array-Detektor
ESI	Elektro-Spray-Ionisation
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
g	Erdbeschleunigung
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (dt.: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
I.S.	Interner Standard
INR	International Normalized Ratio
ITS	Intensivstation
m/z	Masse-zu-Ladung Verhältnis
mAU	Milli Absorption Units
mAU·s	Milli Absorption Units · Sekunde ($\hat{=}$ Peakfläche)
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
n. a.	nicht anwendbar
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (dt.: Kernspinresonanz)
NP	normal phase (dt.: Normalphase)
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptide (dt.: Organo-Anion-Transporter)
PCT	Procalcitonin
RP	reversed phase (dt.: Umkehrphase)

r_s	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
RT	retention time (dt.: Retentionszeit)
SD	standard deviation (dt.: Standardabweichung)
SPE	Solid Phase Extraction (dt.: Festphasenextraktion)
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring
TFA	Trifluoressigsäure
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
UPLC	Ultra-Performance-Liquid-Chromatography
UV	Ultraviolettstrahlung
V_d	Volume of distribution (dt.: Verteilungsvolumen)
v/v	Volume to Volume
ZVK	Zentral Venöser Katheter

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie, Pathogenese und Kosten von Pilzinfektionen

Die Besiedelung des Menschen mit Pilzen ist stark verbreitet. Pilze der Gattung *Candida* gehören zur menschlichen Flora und werden regelmäßig auf der Haut, Schleimhaut und im Katheterurin nachgewiesen [1]. In den letzten Jahrzehnten ist es weltweit zu einem Anstieg der durch Pilze verursachten Septikämien gekommen [2] [3]. Die zentrale Ursache für die steigende Inzidenz von invasiven Mykosen ist die Zunahme von Patienten mit Stammzell-, Knochenmark- und Organtransplantationen und der damit verbundenen immunsuppressiven Therapie [4] [5].

Die meisten Fälle der invasiven Mykose werden durch *Candida* spp. gefolgt von *Cryptococcus neoformans* und *Aspergillus* spp. verursacht [2]. Regionale epidemiologische Studien zeigten, dass in Deutschland die invasiven Mykosen von 1993 bis 2003 stetig zunahmen [6] [7]. In den Krankenhäusern der USA ist *Candida* insgesamt der vierthäufigste Grund für eine nosokomiale Infektion und der dritthäufigste Grund für eine nosokomiale Infektion auf Intensivstationen (ITS) [8].

Bei Patienten auf einer ITS konnten Pilzkolonisierungen bei 64 % der nicht-neutropenischen Patienten gefunden werden [9]. Während des stationären ITS-Aufenthaltes entwickelt sich bei 50 % bis 86 % der schwer kranken Patienten eine Kolonisierung mit *Candida* [1]. Im Vergleich zur Kolonisierung beträgt die Inzidenz von invasiven Mykosen auf Intensivstationen für nicht-neutropenische Patienten 2 % bis 30 % [1] [9] [10].

Die Infektion mit *Candida* spp. kann sowohl exogen durch eine äußere Eintrittspforte, wie z.B. Katheter oder Wunden, als auch endogen bei vorbestehender Kolonisierung entstehen. Die meisten Infektionen mit *Candida* spp. erfolgen endogen durch die Überwindung der gastrointestinalen Barrierefunktion auf Grund von Schleimhautverletzungen und Immunsuppression [1] [11]. Die *Candida*-Kolonisierung ist somit ein Risikofaktor für die Entwicklung einer systemischen *Candida*-Infektion [12].

Die Adhäsion der Hyphen an epithelialen und endothelialen Zellen wird durch verschiedene Adhäsine wie z.B. Agglutinin-like Sequence (Als) oder Hyphal Wall Proteine (Hwp1), die auf der Oberfläche der *Candida*-Zellwand exprimiert werden, vermittelt [13]. Die Invasion in die Wirtszelle erfolgt durch Endozytose und aktive Penetration. *Candida* (*C.*) *albicans* induziert die eigene Endozytose in die Wirtszelle durch die Expression von Als3 auf der Oberfläche, welches zur Ausbildung von Pseudopoden der Epithelzelle dient. Eine Immunsuppression des Wirtes führt zu einem ist es durch den Verlust der zellulären Abwehrfunktion. Aus diesem Grund ist eine Penetration des Gewebes durch *C. albicans*

vereinfacht möglich. Dadurch können Infektionen des darunter liegenden Gewebes bewirkt oder eine hämatogen disseminierte invasive Mykose induziert werden [14].

Weitere Risikofaktoren für die Entstehung einer nosokomialen Candida-Infektion, neben der immunsuppressiven Therapie, sind die Behandlung mit Breitspektrum-Antibiotika, zentralvenöse (ZVK) oder arterielle Katheter, parenterale Ernährung, Granulozytopenie, ausgedehnte chirurgische Eingriffe und ein verlängerter ITS-Aufenthalt von mehr als neun Tagen [2] [12].

Trotz verbesserter intensivmedizinischer Therapien in den letzten Jahren ist die Mortalität von 39 % bis 61 % bei Patienten mit invasiver Candidiasis sehr hoch und spiegelt damit auch die Schwere der zu Grunde liegenden Erkrankung wieder [8] [15]. Die Mortalitätsrate (attributable mortality), die auf eine Candida-Infektion zurückgeführt werden kann, wird zwischen 5 % und 49 % angegeben [15] [16].

Die direkten Gesundheitskosten für die Behandlung der Sepsis in Deutschland liegen bei 1 bis 2,2 Milliarden Euro pro Jahr. Zusätzlich zu den direkten Kosten entsteht ein Produktionsausfall von 2,6 bis 5,7 Milliarden Euro pro Jahr. Somit liegen die jährlichen Gesamtkosten der Sepsisbehandlung zwischen 3,6 und 7,9 Milliarden Euro. Die durchschnittlichen indirekten Kosten pro Patient betragen 23.297 Euro in Deutschland [17]. Eine Episode einer Candiämie ist nach den geschätzten Kosten von 44.534 US-Dollar verglichen mit den Kosten einer bakteriellen Sepsisepisode von 22.100 US-Dollar fast doppelt so teuer [18] [19].

1.2 Echinocandine

Die Antimykotika Micafungin und Anidulafungin gehören mit Caspofungin zu der Klasse der Echinocandine und sind erst seit kurzer Zeit in Deutschland zugelassen.

1.2.1 Wirkmechanismus und Wirkspektrum

Echinocandine sind semisynthetische Lipopeptide und besitzen eine zentrale zyklische Hexapeptidstruktur (s. Abbildung 1.1). Ihre antimyketische Wirkung entfalten sie durch die Hemmung der Zellwandsynthese durch nichtkompetitive Inhibition des 1,3-Beta-D-Glucan-Synthase Komplexes. Die Glucane bilden ein Netzwerk aus Kohlenhydratpolymeren, das der Pilzzelle Struktur und Festigkeit verleiht und einem Aufblähen der Zellmembran bedingt durch hohe osmotische Druckdifferenzen entgegenwirkt. Das 1,3-Beta-D-Glucan ist eine wichtige Komponente der Zellwand von Candida und anderen Pilzen und ist ausschließlich in Pilzzellen vorhanden. Eine Hemmung des 1,3-Beta-D-Glucan-Synthase Komplexes und die daraus resultierenden Störungen im Zellwandgefüge führen zum Absterben der Pilzzelle. Der 1,3-Beta-D-Glucan-Synthase Komplex besteht aus zwei transmembranären Untereinheiten FSK1 und FSK2 und einer kleinen regulatorischen Untereinheit Rho1p [20].

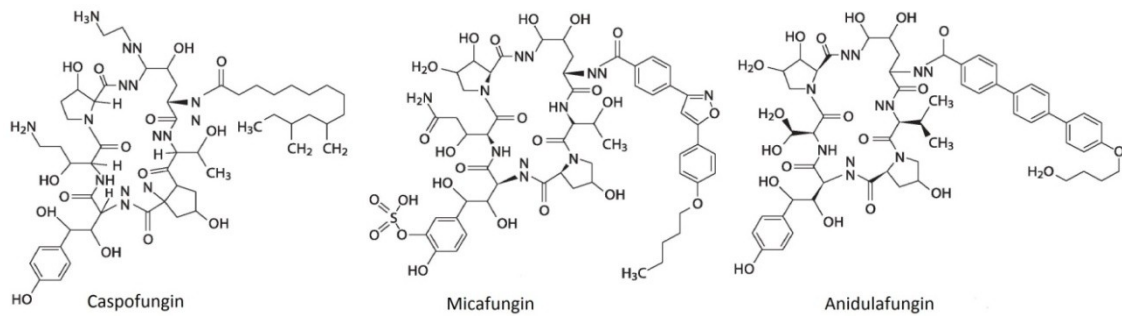


Abbildung 1.1: Strukturformel der Echinocandine [20]

Das Wirkspektrum der vorgestellten Antimykotika erfasst vor allem die Spezies *Candida*, sowie Fluconazol-resistente *C. glabrata*, *C. krusei* Stämme und Aspergillen. Sie wirken fungizid gegen *Candida* und fungistatisch gegen Aspergillen [21] [22].

1.2.2 Indikation und Dosierung

Alle Echinocandine gehören zur Erstlinientherapie bei invasiver Candidiasis. Micafungin und Caspofungin können zusätzlich zur Prophylaxe bei neutropenischen Patienten mit Fieber und erfolgloser antibiotischen Therapie nach 72 bis 96 Stunden angewendet werden. Eine Prophylaxe wird bei nicht-neutropenischen, nicht-immunsupprimierten Patienten im septischen Schock nicht empfohlen [23] [24]. Die Standarddosierung für erwachsene Patienten mit invasiver Candidiasis, sowie für Patienten mit Leber- und Niereninsuffizienz ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

Tabelle 1.1: Dosierung der Echinocandine für Erwachsene für die Therapie der invasiven Candidiasis [23]

Echinocandin	Dosierung Standard	Niereninsuffizienz	Leberinsuffizienz
Anidulafungin	1. Tag: 200 mg/d Loading-Dose Ab 2.Tag: 100 mg/d Erhaltungsdosis	Keine Dosisanpassung	Keine Dosisanpassung
Caspofungin	1. Tag 1: 70 mg/d Loading-Dose Ab 2.Tag: 1 x 50 mg/d Erhaltungsdosis	Keine Dosisanpassung	Reduktion auf 35 mg/d bei Child 7–9
Micafungin	100 mg/d	Keine Dosisanpassung	Ab Child-Pugh B nicht empfohlen, unzureichende Angaben bei schwerer Leberinsuffizienz

Bei der Anwendung von Caspofungin bei Patienten mit leichter Leberinsuffizienz ist keine Dosisanpassung erforderlich. Bei erwachsenen Patienten mit mäßiger Leberinsuffizienz (Child-Pugh-Score 7–9) wird eine Dosis von 35 mg/d empfohlen. Es sind noch keine Daten bei der Verwendung von Caspofungin bei Patienten mit schwerer Leberinsuffizienz vorhanden [25].

Bei der Therapie mit Micafungin ist bei Patienten mit leichter oder mäßiger Leberinsuffizienz leichte Dosisanpassung erforderlich. Über die Anwendung von Micafungin bei Patienten mit schwerer Leberinsuffizienz liegen gegenwärtig unzureichende Angaben vor. Die Behandlung solcher Patienten mit Micafungin wird aufgrund der in Tierexperimenten nachgewiesenen Toxizität nicht empfohlen [26]. Bisher sind bei Echinocandinen bei Überdosierung keine toxischen Wirkungen bei gesunden Probanden bekannt [27]. Bei zu niedrigen Medikamentenkonzentrationen besteht die Gefahr von unzureichenden Wirkspiegeln und damit einem fehlendem Therapieerfolg, sowie einem Risiko von Resistenzbildungen [28].

1.2.3 Pharmakokinetik

Die Echinocandine Anidulafungin und Micafungin zeigen nach intravenöser Applikation eine lineare Pharmakokinetik [29] [30]. Bei Caspofungin konnte eine nichtlineare Pharmakokinetik nachgewiesen werden [31].

Auf Grund des hohen Molekulargewichts von 1093 g/mol bis 1270 g/mol und der daraus resultierenden schlechten oralen Resorption ist die Therapie mit Echinocandinen ausschließlich parenteral möglich. Da die Echinocandine eine hohe Proteinbindung von bis zu 99 % aufweisen, befindet sich nur ein geringer Anteil an freiem Arzneistoff im Blut (s. Tabelle 1.2) [32] [20].

Die Elimination erfolgt über eine spontane Degradation (vor allem Anidulafungin und Caspofungin) und hepatisch über Acetylierung und Hydrolyse des Hexapeptidrings (vor allem Caspofungin), sowie über die Arylsulfatase und Catechol-O-Methyltransferase (COMT) (vor allem Micafungin) [33]. Die Ausscheidung erfolgt überwiegend biliär und nur zu einem geringen Anteil renal [20]. Weitere pharmakokinetische Parameter sind in Tabelle 1.2 beschrieben. Eine detaillierte tabellarische Übersicht weiterer Eigenschaften der Echinocandine sind im Anhang unter Tabelle 7.1 bis Tabelle 7.3 zu finden.

Tabelle 1.2: Pharmakokinetische Parameter der Echinocandine [20] [23]

Parameter	Anidulafungin	Caspofungin	Micafungin
Formulierung	i.v.	i.v.	i.v.
Orale Bioverfügbarkeit	<10 %	<10 %	<10 %
Plasmaproteinbindung [%]	84	97	99
V_d Steady state [l]	33,4	9,5	14,0
Substrat/Inhibitor von CYP450	Nein	Schwaches Substrat und schwacher Inhibitor	Schwaches Substrat und schwacher Inhibitor
Haupteliminationswege	Degradierung	Degradierung, Metabolisierung	Metabolisierung
C_{max} [µg/ml]	7,5	12	7,1
AUC [mg h/l]	104,5	93,5	59,9
Halbwertszeit t_{1/2} [h]	25,6	10	13
Clearance [ml/min/kg]	0,16	0,15	0,16
Ausscheidung	30% biliär, < 1 % renal	35 % biliär, 2 % renal	40 % biliär, < 1 % renal

1.2.4 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) und Interaktionen

Häufig beschriebene UAW der Echinocandine sind Fieber, Histamin induzierte Hautreaktionen, gastrointestinale und hepatische Effekte wie z.B. Bauchschmerzen, erhöhte Leberenzyme, Erbrechen und neurologische Effekte wie z.B. Kopfschmerzen [25] [26] [34].

Die Echinocandine Micafungin und Caspofungin sind schwache Hemmer und Substrate von CYP450 (Cytochrom P 450)-Enzymen, vor allem von Isoenzym 3A4. Aus diesem Grund ist die Interaktion mit Arzneimitteln, die über diese Enzyme abgebaut werden, möglich [20] [35] [36].

Eine andere Interaktion der Echinocandine erfolgt über die OATP 1 (Organic Anion Transporting Polypeptide), die die Aufnahme von Medikamenten zum Abbau in die Hepatozyten reguliert [37]. Bei gleichzeitiger Applikation von Caspofungin mit Ciclosporin und Rifampicin ist eine Vergrößerung der AUC (Area under the Curve) von Caspofungin beobachtet worden. Dies beruht wahrscheinlich auf einer Verringerung der Aufnahme von Caspofungin über die Leber durch Hemmung des OATP 1 Transporters durch Rifampicin und Ciclosporin [38] [39]. Auch bei Anidulafungin konnte eine erhöhte AUC auch bei gleichzeitiger Gabe von Ciclosporin festgestellt werden [40]. Die genauen Interaktionsmechanismen der Echinocandine sind jedoch noch nicht eindeutig geklärt.

Bei der Gabe von Micafungin wurden in Tierversuchen hepatozelluläre Tumore festgestellt. Deswegen wird empfohlen, Micafungin nicht bei vorbekannter Lebererkrankung zu geben und bei einer Erhöhung der Leberwerte abzusetzen [26].

Im Vergleich zu den Azolantimykotika wie z.B. Fluconazol sind die Echinocandine gut verträglich [41]. Sie zeigen durch ihren Wirkmechanismus ein vergleichbar geringes Interaktionspotential und sind im Vergleich zu Amphotericin B weniger nephro- und hepatotoxisch [20] [42] [43].

1.3 Therapeutisches Drug Monitoring (TDM)

Als Therapeutisches Drug Monitoring bezeichnet man die Messung von Serum- oder Plasmakonzentrationen eines zugeführten Arzneistoffs oder von dessen Metaboliten. Das Ziel des TDM ist die Verbesserung der Pharmakotherapie des individuellen Patienten, um einerseits unerwünschte Wirkungen und Intoxikationen durch zu hohe Plasmaspiegel zu vermeiden und um andererseits Resistenzbildungen durch zu geringe Plasmaspiegel vorzubeugen. Damit das gewährleistet ist, wird eine Einstellung des Wirkstoffspiegels eines Arzneimittels innerhalb eines empfohlenen Konzentrationsbereichs, dem sogenannten therapeutischen Bereich, angestrebt. Voraussetzung für das TDM ist ein zuverlässiges, valides, sensitives und ausreichend schnelles Nachweisverfahren [44].

In der Klasse der Antimykotika ist das TDM bei Flucytosin wegen seiner geringen therapeutischen Breite indiziert [45]. Wegen der hohen interindividuellen Variabilität ihrer Plasmaspiegel sowie der erhöhten toxischen Risiken und verschiedenen Medikamenteninteraktionen konnte gezeigt werden, dass TDM auch bei den Azolantimykotika sinnvoll sein kann [46].

Insbesondere ist TDM für Patienten der ITS notwendig, die unter Insuffizienzen der arzneimittelmetabolisierenden und -eliminierenden Organe (Leber, Nieren) leiden. Die optimale Dosierung ist bei diesen Patienten deswegen im Allgemeinen schwierig. Durch eine Veränderung des Verteilungsvolumens im Rahmen eines septischen Geschehens ist die individuelle Anpassung der Dosierung zusätzlich erschwert [47] [48]. Die Wirkspiegel von Medikamenten sind bei Patienten mit schwerer Sepsis schlecht vorhersehbar und oftmals zu niedrig [49].

1.4 Stand der Forschung

Für die Bestimmung von Caspofungin sind in der Literatur mehrere quantitative Methoden beschrieben worden. Die HPLC-Fluoreszenz-Methode, adaptiert nach Schwartz et al., konnte gut validiert und im Laborbetrieb des Instituts für Klinische Pharmakologie etabliert werden [50].

Zum Nachweis von Micafungin gibt es bisher mehrere fluoreszenzbasierte Methoden. Die gleichzeitige Erfassung von zwei aktiven Metaboliten von Micafungin wurde von Tabata et. al. beschrieben [30]. Die Metaboliten M1, als Catechol-Form und M2, als Methoxyl-Form, entstehen durch die Catechol-O-Methyltransferase. Beide sind pharmakologisch aktive Komponenten. Allerdings wurden diese Metaboliten auf Grund ihrer niedrigen Konzentrationen im Plasma als von geringer therapeutischer Relevanz betrachtet. Zusätzlich wurde eine Tandem-Massenspektrometrie Methode zur Bestimmung von Micafungin von Muraki et al. publiziert [51]. Von den Autoren wurden jedoch keine Validierungsdaten angegeben.

Im Gegensatz zu Caspofungin weisen Micafungin und Anidulafungin nur eine schwache native Fluoreszenz auf. Daher sind fluoreszenzbasierte Methoden nicht gut anwendbar. Allerdings sind mehrere auf UV-Detektion basierende Verfahren in der Literatur beschrieben worden [52] [53]. Diese wurden jedoch vor allem zur Bestimmung der Pharmakokinetik von Anidulafungin bei gesunden Probanden und in Tierversuchen entwickelt.

Ein generelles Problem bei der Quantifizierung der Echinocandine ist die Identifizierung eines brauchbaren internen Standards. In der Literatur wurden bisher speziell synthetisierte, teure und kommerziell nicht erhältliche Standards verwendet [54] [55] [56]. Aus diesem Grund waren sie für eine Methode, die in der täglichen Laborroutine angewendet werden soll, ungeeignet.

In vielen bisherigen Veröffentlichungen, in denen Quantifizierungsmethoden für Echinocandine beschrieben wurden, liegt der Schwerpunkt der Untersuchungen auf der klinischen Diagnostik und weniger auf der Analytik, so dass die verwendeten Verfahren oft nur knapp und unvollständig beschrieben wurden [51] [52] [57].

In mehreren Publikationen wurden Schwierigkeiten bei der Dosierung der Echinocandine für besondere Patientengruppen beschrieben.

Für Caspofungin und Micafungin konnten in mehreren Studien eine Abhängigkeit vom Körpergewicht gezeigt werden. Je höher das Körpergewicht war, desto geringer war der Echinocandinspiegel [58] [59]. Die Echinocandine sind bis zu 99 % an Albumin gebunden. Bei der Gabe von Caspofungin führte eine verringerte Albuminkonzentration zu einem erhöhten Caspofunginspiegel im Blut [59].

Weiterhin soll die Dosis von Caspofungin nach Empfehlungen der Fachinformation bei Patienten mit leichter und bis mäßiger Leberinsuffizienz angepasst werden [25] [60]. Für Patienten mit schwerer Leberinsuffizienz zeigte sich bei der Reduktion der Dosis auf 35 mg/d eine ähnliche AUC wie bei Patienten mit normaler Leberfunktion [61]. Es gibt jedoch Hinweise, dass die Pharmakokinetik von Caspofungin bei intensivpflichtigen leberinsuffizienten Patienten kaum verändert ist [62].

Micafungin soll nur bei Patienten ohne schwere Leberschädigung angewendet werden, da es in Tierversuchen zur Entwicklung von hepatozellulären Tumoren gekommen ist [26]. Bezüglich der Pharmakokinetik von Micafungin bei Patienten mit Leberinsuffizienz gibt es bisher nur wenige, kontroverse Studien. So konnten Hebert et al. in einer Studie bei acht Patienten mit Leberdysfunktion eine Reduktion der AUC von Micafungin im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen [57]. In einer anderen Publikation wurde über ein signifikant höheren Micafunginspiegel bei Patienten mit Hyperbilirubinämie sowie Leberinsuffizienz nach Lebertransplantation berichtet [51].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die therapeutischen Erfahrungen mit Echinocandinen sind bis heute begrenzt. Plasmaspiegel zur Therapiekontrolle werden bisher kaum erhoben. Trotz einiger Kenntnis der physikochemischen Eigenschaften der Echinocandine gab es bisher noch kein einfaches Verfahren zur Bestimmung der Echinocandine im Rahmen des TDM [20] [52] [54]. Um die Echinocandine in der Therapie wirkungsvoll nutzen zu können, soll im Rahmen dieser Arbeit ein einfaches und robustes Verfahren entwickelt werden, welches eine quantitative Bestimmung der Echinocandine im menschlichen Plasma ermöglicht. Dabei liegt der Fokus auf der praktischen Durchführbarkeit der Methode in der täglichen Laborroutine. Außerdem soll die therapeutische Konsequenz der Echinocandinspiegelbestimmung ermittelt werden.

Zusammengefasst sind die Ziele der vorliegenden Arbeit:

- Entwicklung einer HPLC-Methode zur Bestimmung von Micafungin und Anidulafungin
- Erfassung des Einflusses von Echinocandinspiegeln auf verschiedene Laborwerte von Patienten der Intensivstation
- Möglichkeiten der Therapieoptimierung durch das TDM von Echinocandinen bei Patienten auf der ITS

2. Material, Methoden und Patienten

2.1 Material

Ein Verzeichnis der verwendeten Materialien und deren Herstellerangaben sind im Anhang in Kapitel 7 von Tabelle 7.4 bis Tabelle 7.10 zu finden.

2.2 Methoden

Die im Folgenden beschriebenen Methoden für die Bestimmung von Anidulafungin- und Micafunginkonzentrationen sind im Labor des Instituts für Klinische Pharmakologie entwickelt und für den routinemäßigen Laborbetrieb validiert worden. Für die Bestimmung der Caspofunginkonzentration wurde die Methode von Schwartz et al. modifiziert und ebenfalls validiert [50].

2.2.1 Das Prinzip der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC ist ein analytisches Trennverfahren, das der Auftrennung eines Stoffgemischs unter Nutzung des Verteilungsgleichgewichts zwischen einer stationären und einer mobilen Phase dient.

Ein HPLC-System besteht aus einer Säule (stationäre Phase) durch die mit Pumpen das Elutionsmittel (mobile Phase) und die analysierende Probe geleitet werden. Die Vorsäule hat eine Filterfunktion, die zum Schutz vor Verunreinigungen der analytischen Säule dient. Die Probenaufgabe auf die Säule erfolgt mit einem Autosampler automatisiert über eine Dosierschleife. Das Säulentermostat sorgt für eine gleichbleibende Temperatur während des Trennvorgangs in der Säule. Im Anschluss erfolgt die Messung der aufgetrennten Substanzen mit einem Detektor. Die Auswertung und Integration der entstandenen chromatografischen Peaks erfolgt mit einem PC-System und einer Messsoftware, um die Konzentration des Analyten zu ermitteln.

Die stationäre Phase bei der HPLC besteht aus porösen Silicagelpartikeln mit einer Größe von 1,7 bis 5 µm, die in einer Stahlsäule dicht gepackt sind. Kleinere Partikel führen dabei zu einer besseren Trennleistung der Säule, wobei allerdings der Gegendruck der mobilen Phase stark ansteigt.

Die reversed phase (RP)- oder Umkehrphasen-Chromatografie ist heutzutage eine häufig genutzte Methode zur Trennung von organischen Substanzen. Bei der RP-Chromatografie ist die stationäre Phase unpolar und die mobile Phase polar geladen. Um die Wechselwirkung zwischen stationärer und mobiler Phase bei der Auftrennung zu nutzen, haben die Elutionsmittel eine entgegengesetzte Polarität zur stationären Phase. Bei der RP-Chromatografie werden polare Elutionsmittel wie Methanol/Wasser- oder Acetonitril/Wasser-Gemische verwendet, in denen sich polare Substanzen gut lösen.

An das Silicagel der stationären Phase sind je nach Polarität zusätzliche Kohlenstoffketten von unterschiedlicher Länge gebunden. Es gilt, je länger die Kohlenstoffkette ist, die an das Silicagel gebunden ist, desto unpolarer ist die stationäre Phase.

Die chromatografische Trennung kann isokratisch oder als Gradientenelution erfolgen. Bei der isokratischen Trennung bleibt die Zusammensetzung des Elutionsmittels während des Trennvorgangs unverändert. Im Gegensatz dazu ändert sich bei der Gradientenelution kontinuierlich die Zusammensetzung und damit die Polarität des Elutionsmittels. Je nach Anzahl der zu verwendenden Elutionsmittel unterscheidet man zwischen binären, ternären oder quaternären Gradienten.

Die Detektion wurde mit einem UV-Detektor, einem Dioden-Array-Detektor (DAD), einem Fluoreszenz-Detektor und einem Massenspektrometer (MS) durchgeführt.

Die Funktion des UV-Detektors beruht auf der Grundlage des Lambert-Beer'schen Gesetzes $E = \varepsilon \cdot c \cdot d$ (E = Extinktion; ε = Extinktionskoeffizient; c = Konzentration der absorbierenden Substanz; d = Schichtdicke der Messzelle). Beim UV-Detektor wird die Extinktion der Probe, während sie durch die Messzelle fließt, bei einer voreingestellten Wellenlänge gemessen. Eine Fotodiode registriert die Änderung der Extinktion und wandelt sie in ein elektrisches Signal um. Die UV-Quelle besteht aus einer Deuteriumlampe, die ein kontinuierliches UV-Spektrum aussendet. Der Dioden-Array-Detektor funktioniert nach demselben Grundprinzip wie der UV-Detektor. Jedoch wird das UV-Spektrum erst nach dem Durchtritt durch die Messzelle zerlegt. Somit gibt es die Möglichkeit, durch Verwendung einer Vielzahl von Fotodioden die Extinktion über das gesamte UV-Spektrum darzustellen. Es ist dadurch möglich, die analytische Aussagekraft der chromatografischen Peaks zu erhöhen. Der Fluoreszenz-Detektor eignet sich für die Detektion von Substanzen, die durch UV-Licht zu Fluoreszenz angeregt werden können. Beim Zurückfallen der Elektronen aus dem angeregten Zustand wird die aufgenommene Energie als Lichtquantum mit einer spezifischen Wellenlänge wieder abgegeben und von der Fotodiode aufgenommen. Das Verfahren eignet sich vor allem für den Nachweis von organischen Verbindungen mit freien π -Elektronen wie zum Beispiel aromatischen Kohlenwasserstoffverbindungen. Es ist sehr selektiv, da nur fluoreszierende Substanzen erfasst werden.

Eine weitere Möglichkeit der Detektion ist die Massenspektrometrie. Durch die Elektronen-Spray-Ionisation (ESI) wird der Analyt in ein Aerosol verwandelt und durch ein elektrisches Spannungsfeld ionisiert. Die Ionen gelangen zum Massenspektrometer und werden dort nach dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis aufgetrennt. Das Massenspektrometer verwendet Quadrupol-Massenfilter, die aus vier quadratisch angeordneten Metallstäben, zwischen denen ein elektrisches Feld angelegt wird, bestehen. Durch die elektrischen Wechselfelder kommt es zu einer Ionenablenkung, die abhängig von der Ladung und Masse des Ions ist.

Um die Selektivität innerhalb dieses Detektionsverfahrens noch weiter zu erhöhen, können in der Tandem-Massenspektrometrie mehrere Massenspektrometerstufen hintereinander verwendet werden. Dabei wird ein Ion eines bestimmten Masse-zu-Ladungs (m/z)-Verhältnisses selektiert und in einer Stoßkammer fragmentiert, um anschließend die Fragmente in einer weiteren Massenspektrometerstufe zu analysieren [63]. In Abbildung 2.1 ist der Aufbau des verwendeten HPLC Agilent 1100 Systems zu sehen.

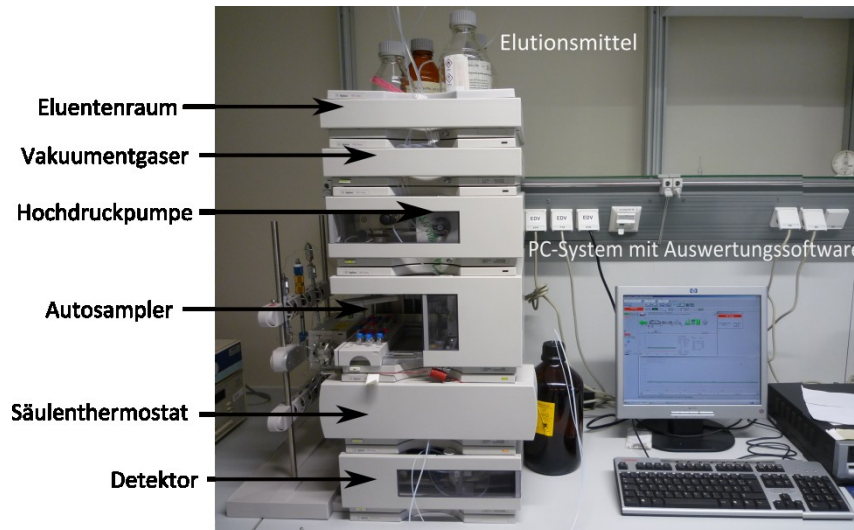


Abbildung 2.1: Das HPLC Agilent 1100 System

2.2.2 Methoden der Probenaufbereitung

Ein Ziel der Probenaufbereitung ist die Trennung der Analyten von der Matrix, um ein Gemisch zu erhalten, das für eine HPLC-Trennung geeignet ist. Dieser Vorgang erfolgt z.B. durch Proteinfällung indem der Probenlösung ein organisches Lösungsmittel wie Acetonitril oder Methanol zugesetzt wird. Anschließend werden die Proben zentrifugiert und der klare proteinfreie Überstand der HPLC zugeführt.

Eine andere Möglichkeit der Probenvorbereitung ist die Festphasenextraktion. Der Transport der Proben und Lösungsmittel durch die Festphasenextraktionsröhrchen kann mittels Vakuum, Zentrifugalkraft oder Druck erfolgen. Die Festphasenextraktionsröhrchen, bestehend aus einer festen Phase wie z.B. modifiziertes Silicagel, werden mit Lösungsmittel konditioniert, um Wechselwirkungen zwischen stationärer und mobiler Phase zu ermöglichen. Der Analyt in der aufgegebenen Probenlösung hat dabei eine höhere Affinität zu der stationären Phase als die Matrix, die durch die Extraktionsröhrchen gesaugt wird. Der gesuchte Analyt verbleibt auf der festen Phase und wird dann mit Hilfe eines Elutionsmittels herausgewaschen. Dabei kann der Analyt aufkonzentriert werden, um schließlich bei der chromatografischen Trennung eine erhöhte Empfindlichkeit zu erlangen [63].

2.2.3 Vorbereitung der verwendeten Lösungen

Im Folgenden werden die angewendeten methodischen Schritte detailliert dargestellt. Diese beinhalten die Herstellung der verwendeten Lösungen und Standards und die zur chromatografischen Trennung benötigten Einstellungen an den Geräten.

Stammlösungen

Die Stammlösungen dienen zur Herstellung aller folgenden Kalibrierlösungen und des internen Standards. Die Konzentrationen wurden entsprechend den Packungsbeilagen der Fertigarzneimittel berechnet (s. Tabelle 7.9).

Stammlösung Anidulafungin (c = 1000 µg/ml): 100 mg Anidulafungin wurde in 100 ml von einem Methanol/Wasser-Gemisch (v/v; 1:1) gelöst.

Stammlösung Micafungin (c = 500 µg/ml): 50 mg Micafungin wurde in 100 ml Wasser gelöst.

Stammlösung Caspofungin (c = 500 µg/ml): 50 mg Caspofungin wurde in 10,5 ml Wasser gelöst. Von diesem Gemisch wurden genau 10 ml abgenommen und mit einem Wasser/Methanol-Gemisch zu jeweils gleichen Teilen auf 100 ml aufgefüllt.

Alle hergestellten Stammlösungen wurden in 4 ml Kryoröhrchen portioniert und bei -80 °C eingefroren.

2.2.4 Kalibrierlösungen und interner Standard

Die Proben wurden jeweils, wie folgend beschrieben, aus den jeweiligen Stammlösungen hergestellt.

Anidulafungin

Kalibrierlösung 1 (Konzentration c = 100 µg/ml Anidulafungin): Die Kalibrierlösung 1 bestand zu 100 µl aus der Stammlösung Anidulafungin und zu 900 µl aus Wasser.

Kalibrierlösung 2 (c = 10 µg/ml Anidulafungin): Die Kalibrierlösung 2 setzte sich zu 100 µl aus der Kalibrierlösung 1 und zu 900 µl aus Wasser zusammen.

Interner Standard-Lösung (I.S.; c = 100 µg/ml Micafungin): Zur Herstellung wurden 200 µl der Stammlösung Micafungin wurden mit 800 µl Wasser verdünnt.

Micafungin

Kalibrierlösung 1 (c = 100 µg/ml Micafungin): 200 µl von der Stammlösung Micafungin wurden mit 800 µl Wasser verdünnt und es entstand eine Konzentration von 100 µg/ml Micafungin in der Kalibrierlösung 1.

Kalibrierlösung 2 (c = 10 µg/ml Micafungin): Zur Herstellung der Kalibrierlösung 2 wurden 100 µl der Kalibrierlösung 1 mit 900 µl Wasser verdünnt.

Interner Standard-Lösung (c = 100 µg/ml Anidulafungin): Es wurden 100 µl der Stammlösung Anidulafungin mit 900 µl Wasser verdünnt.

Caspofungin

Kalibrierlösung 1 (c = 200 µg/ml Caspofungin): 200 µl der Stammlösung Caspofungin wurden mit 300 µl Leerplasma verdünnt.

Kalibrierlösung 2 (c = 20 µg/ml Caspofungin): 100 µl der Kalibrierlösung 1 wurden mit 900 µl Leerplasma verdünnt.

2.2.5 Kalibrier- und Qualitätskontrollproben

Zur Bestimmung der Kalibrierfunktion von Anidulafungin und Micafungin wurden je sechs Kalibrierproben hergestellt. Eine Kalibrierreihe bestand aus folgenden Proben entsprechend der in Tabelle 2.1 angegebenen Reihenfolge.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Kalibrierproben zur Bestimmung von Anidulafungin und Micafungin

Level	Zugabe Kalibrierlösung [µl]	Kalibrierlösung (Nummer)	Zugabe Plasma [µl]	Konzentration [µg/ml]
1	50	2	950	0,5
2	100	2	900	1
3	20	1	980	2
4	50	1	950	5
5	100	1	900	10
6	200	1	800	20

Für die Bestimmung der Kalibrierfunktion von Caspofungin erfolgte die Herstellung von fünf Kalibrierproben, deren Zusammensetzung in Tabelle 2.2 beschrieben ist.

Zur Herstellung der Kalibrierproben wurde Citratplasma verwendet, das von gesunden Probanden aus der Blutbank des Universitätsklinikums Magdeburg stammte. Die Kalibrierproben wurden der Probenaufbereitung, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, unterzogen und anschließend analysiert. Die Qualitätskontrollproben wurden nach demselben Prinzip wie die Kalibrierproben in den Konzentrationen 1 µg/ml und 20 µg/ml für alle Micafungin- und Caspofunginproben hergestellt und bei -80 °C eingefroren.

Tabelle 2.2: Zusammensetzung der Kalibrierproben zur Bestimmung von Caspofungin

Level	Zugabe Kalibrierlösung [µl]	Kalibrierlösung (Nummer)	Zugabe Plasma [µl]	Konzentration [µg/ml]
1	25	2	975	0,5
2	50	2	950	1
3	25	1	975	5
4	50	1	950	10
5	100	1	900	20

2.2.6 Lösungen für die Festphasenextraktion

Die Aufarbeitung der Proben für Caspofungin erfolgte durch Festphasenextraktion bei der folgende Lösungen verwendet wurden:

Extraktionspuffer: 13,6 g Natriumacetat-3-hydrat wurden mit 100 ml in Wasser gelöst und mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 4,9 eingestellt.

Elutionslösung: 100 ml Methanol wurden mit 1,9 ml 25 %-Ammoniak-Lösung und mit 100 µl Trifluoressigsäure vermischt.

Laufmittel

Die Herstellung der Laufmittel für die HPLC wurde wie nachfolgend beschrieben durchgeführt.

Das Laufmittel A für die Bestimmung von Micafungin und Anidulafungin bestand aus 250 mg Ammoniumacetat, das in 250 ml Wasser aufgelöst und anschließend mit Ammoniak-Lösung auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt wurde. Das Laufmittel B bestand aus Acetonitril.

Für die Herstellung von Laufmittel A zur Messung von Caspofungin wurden 500 ml Wasser mit 500 µl Trifluoressigsäure gemischt. Auch hier bestand das Laufmittel B aus Acetonitril.

Aufbereitung der Patientenproben

Die abgenommenen Blutproben wurden bei Laboreingang für 5 Minuten bei 1000 g zentrifugiert (Universal 32, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen), um das Plasma von den zellulären Blutbestandteilen zu trennen. Die nativen Blutproben für die Konzentrationsbestimmung im Serum konnten in Serumröhrchen mit Gerinnungsfaktoren 30 Minuten bei Raumtemperatur gerinnen und wurden danach für 10 Minuten bei 960 g zentrifugiert.

Für die Bestimmung von Anidulafungin und Micafungin erfolgte die Probenaufbereitung in 1,5 ml Eppendorfgefäßen. Die Probenaufbereitung für Anidulafungin und Micafungin waren identisch.

Die Vorbereitung für Caspofungin wurde in SPE (Solid Phase Extraction) Extraktionsröhrchen für die Festphasenextraktion durchgeführt.

Für die Bestimmung von Anidulafungin und Micafungin wurden von den Kalibrierproben, bzw. Patientenproben 100 µl Plasma mit 20 µl der jeweiligen I.S.-Lösung vermischt und anschließend die Proteine durch Zugabe von 200 µl Acetonitril ausgefällt. Im Anschluss wurden die Proben 5 Minuten bei 10 000 g (Biofuge pico Heraeus, DJB Labcare Ltd, Buckinghamshire, England) zentrifugiert. Von dem klaren Überstand wurden 100 µl abgenommen und im Autosamplergläschen mit 100 µl von Laufmittel A für die HPLC-Messung gemischt.

Die Versuche zur Probenvorbereitung von Anidulafungin und Micafungin durch Festphasenextraktion wurden mit OASIS HLB mixed mode cartridges (Waters, Eschborn) durchgeführt. Auf die Extraktionsröhrchen wurden 500 µl der Plasmaprobe aufgetragen und anschließend mit 1 ml Wasser und mit 1 ml Wasser/Methanol Gemisch (50:50; v/v) gewaschen. Die Elution, das Herauslösen des Analyten aus der stationären Phase, erfolgte mit 1 ml Methanol/ Ammoniumhydroxid Gemisch (98:2; v/v).

Zur Aufbereitung der Proben für die Caspofunginmessung wurden zu 0,3 ml Kalibrier- oder Patientenplasma 0,7 ml Extraktionspuffer zugesetzt. Die SPE Diol Extraktionsröhrchen (J.T. Baker, Deventer, Niederlande) wurden erst mit 3 ml Methanol und danach mit 3 ml Wasser konditioniert. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Säule nicht trocken lief, da sonst die Benetzung der stationären Phase mit der mobilen Phase aufgehoben wird. Anschließend wurden die Serumproben aufgegeben, die in 5 bis 10 Minuten durch die Extraktionsröhrchen gesogen wurden. Danach wurden die Extraktionsröhrchen mit 3 ml Wasser und anschließend mit 3 ml Methanol gewaschen und trocken gesaugt, um die restlichen Verunreinigungen und die Probenmatrix zu entfernen. Die Elution erfolgte mit 1 ml Elutionslösung. Die Eluate wurden anschließend in der Vakuumzentrifuge bei 100 g (UniEquip Univapo 150 ECH, Progen Scientific London, England) eingedampft. Der Rückstand wurde mit 30 µl Methanol angelöst und dann mit 300 µl von Laufmittel A für die HPLC aufgenommen. Zuletzt wurde das Gemisch in Autosamplergläschen mit Einsatz überführt. Daraufhin waren die Proben für die HPLC Messung fertig präpariert.

2.2.7 Das HPLC-System: Säulen und Einstellungen

Die Bestimmung der Konzentration der Echinocandine im Blutplasma und Blutserum erfolgte mit dem Agilent 1100 HPLC System (Agilent Technologies, Böblingen).

Als Vorsäule kam für alle Proben ein Phenomenex Security Guard System mit einem 4 × 2 mm C18 Filter zum Einsatz. Als analytische Säule wurde jeweils für Anidulafungin und Micafungin eine Zorbax Eclipse XDB-C18 2,1 mm x 150 mm (Agilent Technologies, Böblingen) verwendet. Für Anidulafungin betrug die Partikelgröße 5 µm und für Micafungin 3,5 µm. Die Temperatur des Säulentermostats lag bei 35 °C.

Für die Bestimmung von Caspofungin wurde eine Zorbax Eclipse SB-C18 2.1 mm × 150 mm Säule mit einer Partikelgröße von 5 µm eingebaut. Die stationäre Phase bestand bei allen Säulen aus Silicagel mit Octadecyl (C18) Kohlenstoffketten.

Die Fließgeschwindigkeit betrug für die Analyse von Micafungin und Anidulafungin 0,35 ml/min und für Caspofungin 0,4 ml/min. Die Injektionsvolumina betragen bei allen Echinocandinen 25 µl.

Gradientenprogramm

Während der chromatografischen Auftrennung von Anidulafungin und Micafungin wurde eine Gradientenelution durchgeführt. Zu Beginn der Auftrennung bestand die mobile Phase aus 70 % Pufferlösung (0,1 % Ammoniumacetat und 0,1 % Essigsäure in Wasser) und 30 % Acetonitril. Innerhalb einer Laufzeit von 11 Minuten wurde der Anteil von Acetonitril auf 65 % gesteigert. Die Retentionszeit betrug 12,1 Minuten für Anidulafungin und 8,1 Minuten für Micafungin. Die gesamte Laufzeit für die Trennung von einer Probe betrug 17 Minuten und 4 Minuten Nachlaufzeit zur Reäquilibration der stationären Phase auf Startbedingungen.

Die chromatografische Trennung von Caspofungin erfolgte isokratisch mit einem Mischungsverhältnis von 65 % von Laufmittel A und 35 % von Laufmittel B. Die Retentionszeit betrug 6,6 Minuten. Die Laufzeit für die Trennung von einer Probe betrug 10 Minuten ohne Nachlaufzeit.

Detektion, Auswertung und Integration

Die Detektion zur Bestimmung von Anidulafungin und Micafungin erfolgte mit einem Dioden-Array-Detektor (DAD), in dem eine Semimikromesszelle (Agilent Technologies, Böblingen) eingebaut wurde. Die Messung der UV-Spektren der beiden Substanzen ergaben Absorptionsmaxima von 273 nm für Micafungin und 306 nm für Anidulafungin.

Für die durchgeführten massenspektrometrischen Messungen wurden ein Thermo Fisher Scientific Finnigan TSQ Quantum-Discovery-Max-Triple-Quadrupole-Massenspektrometer und eine ESI-Quelle verwendet. Die Ionisation erfolgte bei positiver Spannung von 4,5 kV. Die Einstellungen an der ESI-Quelle betragen: Sheath Gas (Hüllgas): 49 AU (Arbitrary Units), Auxiliary Gas (Hilfsgas): 24 AU, Kapillartemperatur: 250 °C. Die Filterbreite des Quadrupol-Massenfilters betrug 2,5 amu (atomic mass units).

Für die Bestimmung von Caspofungin wurde ein Fluoreszenz-Detektor bei einer Exzitationswellenlänge von 229 nm und einer Emissionswellenlänge von 311 nm genutzt.

Die Auswertung und Integration der Chromatogramme erfolgte mit der Agilent ChemStation LC 3D (Revision A 09.03) Software.

2.2.8 Validierung

Die Validierung von Labormethoden richtete sich nach den Empfehlungen von nationalen und internationalen Organisationen, wie dem Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [64], den Bioanalytical Method Validation Guidelines der Food and Drug Administration (FDA) [65] und nach den Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen [66].

Zur Validierung des Verfahrens wurden die Parameter Linearität, Präzision, Richtigkeit, Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze und Selektivität, wie in Kapitel 7.3.4 beschrieben, erhoben.

Die verwendeten chromatografischen Methoden wurden nach den oben genannten Richtlinien validiert und anschließend im Labor des Instituts für Klinische Pharmakologie am Universitätsklinikum Magdeburg innerhalb des Routinebetriebs im Rahmen des Therapeutischen Drug Monitorings angewendet.

Kalibrierung

Für die Quantifizierung der Analytenmenge wurde die mengenproportionale Größe Peakfläche (A) verwendet. Eine Kalibrierung wird benötigt, um den jeweiligen Proportionalitätsfaktor zwischen der gemessenen Größe und der dieser Größe zugrunde liegenden Konzentration des Analyten zu bestimmen [67]. Es wurde die Peakfläche durch Integration der chromatografischen Funktion bestimmt. Mit Hilfe der Kalibrierfunktion kann die Konzentration der Analyten in unbekanntem Proben bestimmt werden. Es wurden sowohl interne als auch externe Standards zur Kalibrierung verwendet.

Für die Erstellung einer Kalibrierfunktion mit einem externen Standard wurden aus der jeweiligen Stammlösung durch Verdünnung mit Blutplasma Kalibrierproben mit unterschiedlichen Konzentrationen des zu bestimmenden Analyten, hier Caspofungin, erstellt. Diese wurden dann in aufeinanderfolgenden Analyseläufen in das Trennsystem injiziert. Von den gemessenen Kalibrierproben wurde die jeweilige Peakfläche (y-Achse) bestimmt und in Abhängigkeit von der bekannten Konzentration (x-Achse) aufgetragen und so die Kalibrierfunktion bestimmt (s. Abbildung 3.6 und Abbildung 7.3).

Bei der Verwendung des internen Standards wurden allen Kalibrierlösungen und den Patientenproben der interne Standard in bekannter und konstanter Menge zugesetzt. Micafungin und Anidulafungin dienten jeweils gegenseitig als interner Standard. Zur Berechnung der Konzentration der zu analysierenden Substanz wurde die integrierte Peakfläche ins Verhältnis mit der integrierten Peakfläche des internen Standards gesetzt. Diese berechnete relative dimensionslose Peakfläche diente als Grundlage zur Berechnung der Konzentration des gesuchten Analyten.

Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Die Bestimmungsgrenze für alle Echinocandine betrug 0,5 µg/ml. Die Nachweisgrenzen wurden jeweils bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von größer als 3 ermittelt.

Präzision und Richtigkeit

Für die Bestimmung aller Echinocandine wurde die Methode im Messbereich von 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 20 µg/ml mit dem UV-Detektor durch die Bestimmung von Präzision und Richtigkeit validiert. Für die Bestimmung von Präzision und Richtigkeit von Caspofungin im Messbereich von 0,1 µg/ml und 20 µg/ml wurde der Fluoreszenz-Detektor verwendet.

Stabilität

Es wurde die Stabilität für Proben vor und nach der Probenaufarbeitung bei Raumtemperatur ermittelt. Dafür wurden der eine Teil der Proben für die HPLC aufgearbeitet, der andere Teil der Proben wurde keiner Aufarbeitung unterzogen und für 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert und dann erst aufgearbeitet und analysiert. Zusätzlich wurden Serumproben hergestellt, um die Echinocandinkonzentration (Anidulafungin und Micafungin) im Serum und Plasma zu vergleichen.

2.3 Patienten

2.3.1 Patientenkollektiv

Im Zeitraum vom 14. Dezember 2010 bis 14. November 2011 wurden 45 Patienten der internistischen ITS am Universitätsklinikum Magdeburg für die Datenerhebung herangezogen, bei denen im Rahmen des TDM die Echinocandine Caspofungin oder Micafungin bestimmt wurden. Bei diesen Patienten wurden insgesamt 108 Plasmaspiegelbestimmungen durchgeführt. In der Caspofungin-Gruppe waren 14 Patienten und 30 Spiegelbestimmungen. In der Micafungin-Gruppe wurden 31 Patienten und 78 Spiegelbestimmungen berücksichtigt. Die Patienten, die mit Anidulafungin therapiert wurden, konnten auf Grund einer zu geringen Gruppengröße von vier Patienten nicht in der Auswertung berücksichtigt werden. Die Erhebung der Daten erfolgte retrospektiv. Ausgeschlossen waren Patienten mit primär chirurgischen Diagnosen und Patienten deren Krankheitsverlauf nicht in der elektronischen Patientenakte einsehbar war.

Probenentnahme und Transport

Die venöse Blutentnahme von 4 ml in Serumröhrchen wurde jeweils vor der folgenden Echinocandingabe durchgeführt (Talspiegel). Für die Bestimmung aus Plasma wurden Serumröhrchen ohne Gerinnungsfaktoren und für die Bestimmung aus Serum wurden Serumröhrchen mit

Gerinnungsfaktoren verwendet. Der Probentransport erfolgte bei Raumtemperatur innerhalb von 1 bis 6 Stunden in das Institut für Klinische Pharmakologie am Universitätsklinikum Magdeburg.

Zu jeder Blutprobe gehörte ein ausgefüllter Anforderungsschein. Er enthielt die folgenden Angaben:

- Patientenetikett mit Name, Patientennummer und Geburtsdatum
- Diagnose
- Grund der Anforderung und Dosierung des Medikaments, dessen Konzentration gemessen werden soll, sowie dessen letzte Verabreichung
- Begleitmedikamente.

Die erhobenen Laborwerte wurden vom Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie am Universitätsklinikum Magdeburg im Rahmen der routinemäßigen Kontrolle auf Anordnung der diensthabenden Ärzte auf der ITS bestimmt. Die verwendeten Referenzwerte sind im Anhang unter Tabelle 7.11 zu finden. Der mikrobiologische Nachweis erfolgte im Institut für Medizinische Mikrobiologie am Universitätsklinikum Magdeburg ebenfalls auf Anordnung der diensthabenden Ärzte auf der ITS.

Erfassung der klinischen Daten

Die Patientendaten wurden aus dem auf der ITS verwendeten Krankenhausinformationssystem IMESO (IMESO-Innovative Medizinische Software GmbH, Gießen, Deutschland) entnommen. Es wurden alle personenbezogenen Merkmale anonymisiert und jedem Patienten eine Auswertungsnummer zugeordnet. Die Zustimmung der Patienten, bzw. deren gesetzlichen Vertreter zur anonymisierten wissenschaftlichen Auswertung der Daten lag mit Unterschrift des Behandlungsvertrags jeweils vor. Es wurden folgende Daten erhoben:

- Biometrische Daten (Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht, Körperoberfläche, Body-Mass-Index)
- Daten zum Therapieverlauf (Aufenthaltsdauer, Therapiedauer, Pilzspezies, Dialyse, Dialysedauer, Umsetzung auf andere Antimykotika, Dosisanpassungen)
- Aufnahme diagnose, Hauptdiagnosen, Nebendiagnosen
- Begleitmedikamente

Während der Therapie mit Echinocandinen auf der ITS wurde die Entwicklung von Laborwerten dokumentiert. In der Verlaufsdokumentation wurde für jeden Patienten täglich folgende Daten erhoben:

- Laborwerte (Protein, Albumin, ALAT, ASAT, Bilirubin, CK, Kreatinin, CRP, PCT, INR, GGT, Leukozyten)
- Temperatur

- Tagesdosis (Caspofungin und Micafungin)
- Zeitpunkt der Dosisanpassung (Dosiserhöhung, Dosiserniedrigung, Dosispause)

Wurden mehrere Labor- oder Temperaturwerte pro Tag gemessen, dann wurde jeweils der erste am Tag gemessene Laborwert als repräsentativer Laborwert für diesen Tag verwendet.

In folgender Tabelle sind die Definitionen für die jeweiligen Einteilungen des Patientenkollektives aufgelistet (s. Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: Einteilungen des Patientenkollektivs

Einteilung	Definition
Immunsuppression	Aktive maligne Erkrankungen (Tumoren, Leukämien), Autoimmunerkrankungen, Zustand nach Knochenmark bzw. Stammzelltransplantation, AIDS, vorhergehende Chemotherapie oder Radiatio und Therapie mit Glucocorticoiden über der Schwellendosis.
Hyperbilirubinämie	Bilirubinmittelwert $\geq 17 \mu\text{mol/l}$
Hypoalbuminämie	Albuminmittelwert $\leq 35 \text{g/l}$
Glucocorticoide	Gabe von Prednisolon, Cortison oder Hydrocortison (oral oder i.v.)

2.4 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden in einer Datenbank des Programms Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) tabellarisch erfasst und in das Statistikprogramm SPSS (Version 20) eingelesen und ausgewertet.

Für die deskriptive Statistik wurden folgende Parameter berechnet: Mittelwert, Median, Standardabweichung, Varianz und Spannweite (Range).

Die grafische Darstellung von Tabellen und Diagrammen und der Ergebnisse einschließlich der Berechnungen von Korrelationsfaktoren und Regressionsfunktionen erfolgte mit Microsoft Office Excel 2007 und der Messsoftware Agilent ChemStation LC 3D (Revision A 09.03).

Für die explorative Statistik wurden folgende Tests verwendet: Als verteilungsunabhängiger Test für unverbundene Stichproben wurde der zweiseitige U-Test von Mann und Whitney durchgeführt. Der zweiseitige t-Test mit verschiedenen Varianzen für zwei verbundene Stichproben wurde zur Analyse der Matrixunabhängigkeit und der Stabilität angewendet. Zur Analyse von Häufigkeitsunterschieden zwischen zwei Merkmalen wurde der zweiseitige Pearson-Chi Quadrat Test angewendet. Wenn die erwartete Häufigkeit beim Chi-Quadrat Test kleiner als 5 war wurde der Fischer-Exakt Test verwendet.

Für die Korrelationsanalyse wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) berechnet.

Eine statistische Signifikanz bezüglich eines Zusammenhangs wurde bei einem p-Wert von $\leq 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 HPLC Methode

3.1.1 Probenaufarbeitung und Extraktionsausbeute

Bei der Aufarbeitung durch eine einfache Proteinfällung mit Acetonitril lag die Extraktionsausbeute bei durchschnittlich 94 % und ist für die einzelnen Konzentrationen in Tabelle 3.1 dargestellt. Im Gegensatz dazu konnte durch die Festphasenextraktion nur eine geringe Extraktionsausbeute von circa 40 % erreicht werden.

Tabelle 3.1: Extraktionsausbeute von Anidulafungin und Micafungin durch Proteinfällung

Echinocandin	Konzentration	Extraktionsausbeute [%]	Standardabweichung
Micafungin	0,1 µg/ml	96,0	12,82
	1 µg/ml	91,6	4,31
	20 µg/ml	92,3	3,27
Anidulafungin	0,1 µg/ml	93,3	7,29
	1 µg/ml	98,3	12,64
	20 µg/ml	93,4	2,04

3.1.2 Chromatografische Auftrennung

Unter Verwendung der Umkehrphasen-Chromatografie war eine eindeutige chromatografische Trennung möglich, so dass diese in den folgenden Versuchen zur Gradientenoptimierung verwendet wurde.

3.1.3 Gradientenoptimierung

Erste Versuche zur Entwicklung des eines effizienten Gradienten wurden mit Methanol als Elutionsmittel auf einer 50 mm langen Säule durchgeführt. Methanol wurde als Elutionsmittel gewählt, da es preisgünstiger und weniger toxisch als Acetonitril ist. Das Optimierungsverfahren wurde mit einem Methanolgradient von 20 % auf 60% innerhalb von 5 Minuten begonnen (s. Abbildung 3.1 [A]). Hierbei zeigte sich, dass Anidulafungin und Micafungin gut getrennt waren. Allerdings fanden sich vor den Peaks kleine Zusatzsignale. Diese waren von den Analytpeaks nicht basisliniengetrennt. Eine langsamere Steigerung des Methanolgehaltes verbesserte die Auflösung zwischen den Störpeaks und den Echinocandinpeaks nicht wesentlich (s. Abbildung 3.1 [B]).

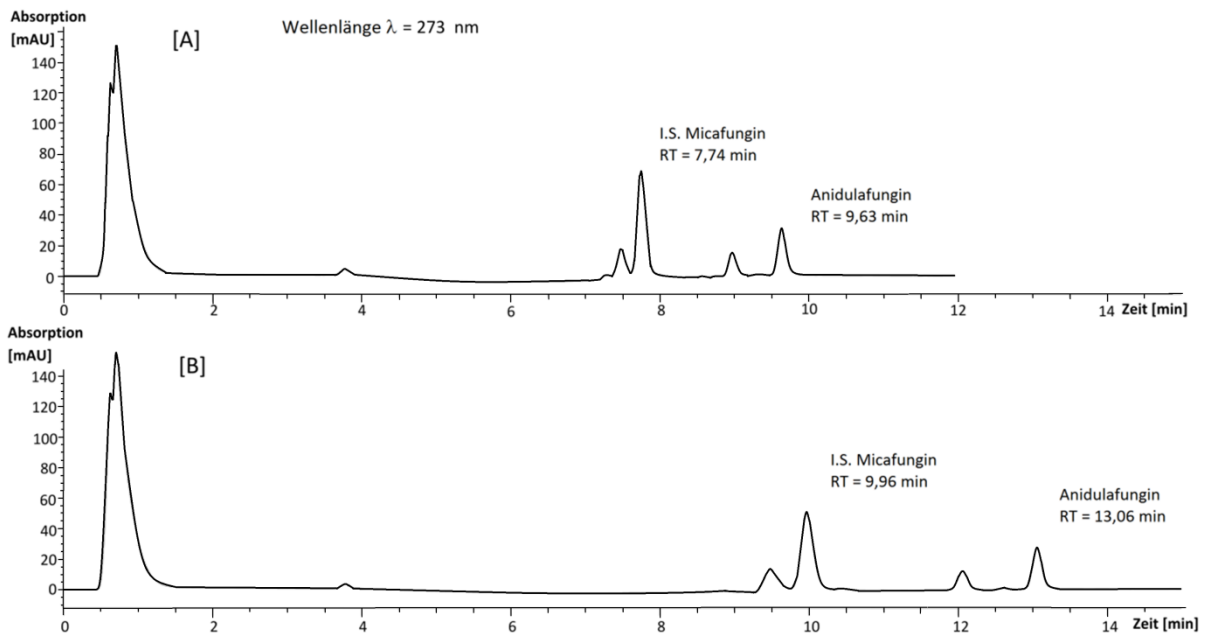


Abbildung 3.1: UV-Spektrometer: Wellenlänge $\lambda = 273 \text{ nm}$; Gradientenelution mit 20 % bis 60 % Methanol mit Gradientenwechsel [A] in 5 Minuten und [B] in 10 Minuten auf Zorbax Eclipse XBD-C18 2,1 x 50 mm 3,5 μm

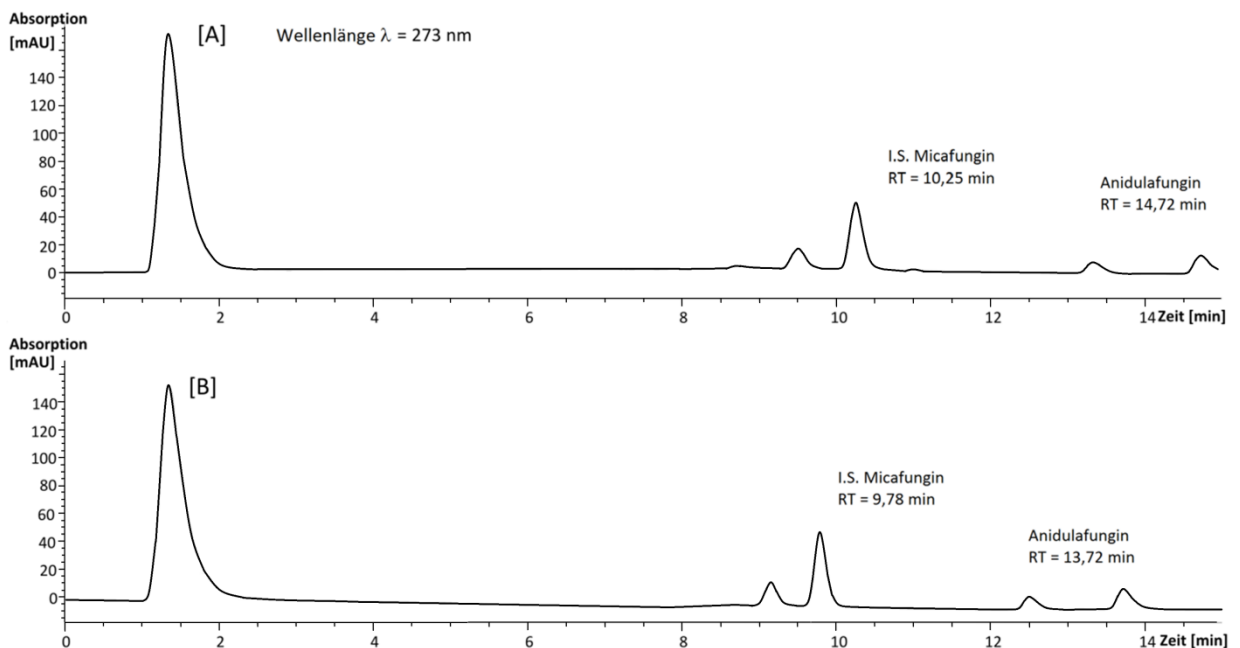


Abbildung 3.2: UV-Spektrometer: Wellenlänge $\lambda = 273 \text{ nm}$; [A] Gradientenelution mit 20 % bis 60 % Acetonitril und [B] 20 % bis 65 % Acetonitril bei 10 Minuten auf Zorbax Eclipse XDB-C18 2,1 x 150 mm 3,5 μm

Zur Verbesserung der Auflösung wurde bei der Verwendung von Acetonitril als Elutionsmittel statt einer 50 mm langen Säule eine 150 mm lange Säule verwendet. Da der Methanolgradient auf dieser

langen Säule einen starken Gegendruck erzeugte, wurde bei Verwendung der längeren Säule auf das geringer viskose Acetonitril zurückgegriffen. Ein Chromatogramm mit einer Steigerung des Acetonitrilgehaltes von 20 % auf 60 % in 10 Minuten ist in Abbildung 3.2 [A] dargestellt. Die Stör- und Analytpeaks sind jetzt basisliniengetrennt. Eine weitere Optimierung des Gradienten von 20 % auf 65 % in 10 Minuten ergab kürzere Retentionszeiten bei gleichbleibender guter Trennleistung (s. Abbildung 3.2 [B]). Alle Versuche erfolgten bei einer Flussrate von 0,35 ml/min.

3.2 Detektionsverfahren

3.2.1 Fluoreszenzdetektion

Durch die native Fluoreszenz von Caspofungin ist eine störungsfreie Detektion dieses Echinocandins mit dem selektiven Fluoreszenz-Detektor möglich. Caspofungin fluoresziert bei einer Exzitationswellenlänge von 229 nm und einer Emissionwellenlänge von 311 nm. Es wurde kein interner Standard verwendet, da Caspofungin auch ohne internen Standard in unserem Labor valide und sicher messbar war (s. Abbildung 3.3). Im Gegensatz zu Caspofungin zeigen Anidulafungin und Micafungin nur geringe native Fluoreszenz und sind deswegen mit dieser Methodik nicht optimal nachzuweisen.

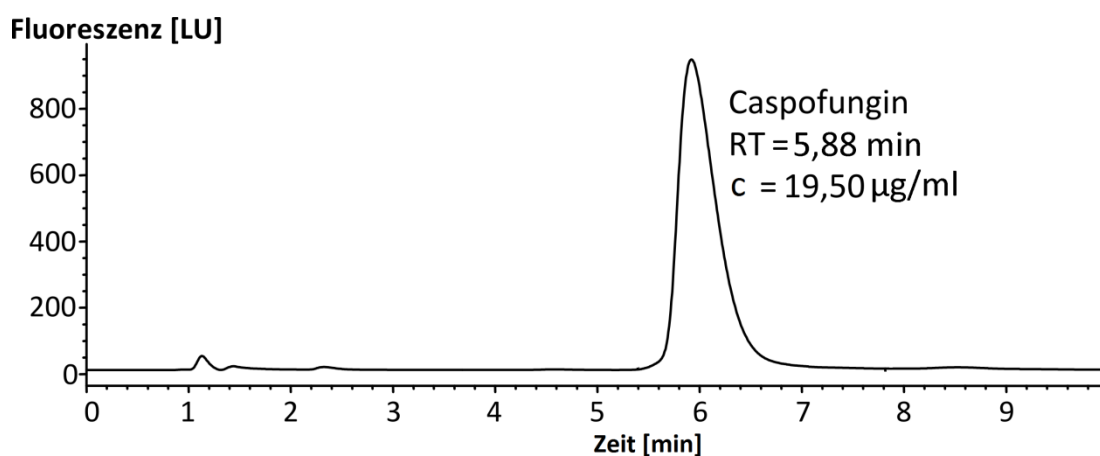


Abbildung 3.3: Fluoreszenz-Detektor: Detektion von Caspofungin ($\lambda_{Em} = 311 \text{ nm}$, $\lambda_{Ex} = 229 \text{ nm}$); $RT = 5,88 \text{ min}$, $c = 19,50 \text{ µg/ml}$

3.2.2 Massenspektrometrie

Eine bessere Selektivität als die Fluoreszenzdetektion bietet ein massenspektrometrischer Detektor. In der ESI-Quelle wurden Anidulafungin und Micafungin sowohl zu einfach geladenen Quasimolekülonen ($[M+H]^+$) mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) von 1270,4 bei Micafungin und 1141,5 bei Anidulafungin als auch zu doppelt geladenen Quasimolekülonen ($[M+2H]^{2+}$) mit einem m/z von 635,7 bei Micafungin und 570,8 bei Anidulafungin ionisiert. Auch bei der massenspektrometrischen

Detektion wurden zusätzliche Peaks bei einer Retentionszeit von 7,22 Minuten für Micafungin und 10,75 Minuten für Anidulafungin mit praktisch identischem Massenspektrum aufgefunden (s. Abbildung 3.4) Daher konnte die Selektivität der Messung im Vergleich zur UV-Detektion nicht verbessert werden. Des Weiteren ergab ein Kalibrationsversuch nichtlineare Kalibrierfunktionen für beide Analyten, weswegen weitere Versuche der Methodenentwicklung mittels Massenspektrometrie eingestellt worden sind.

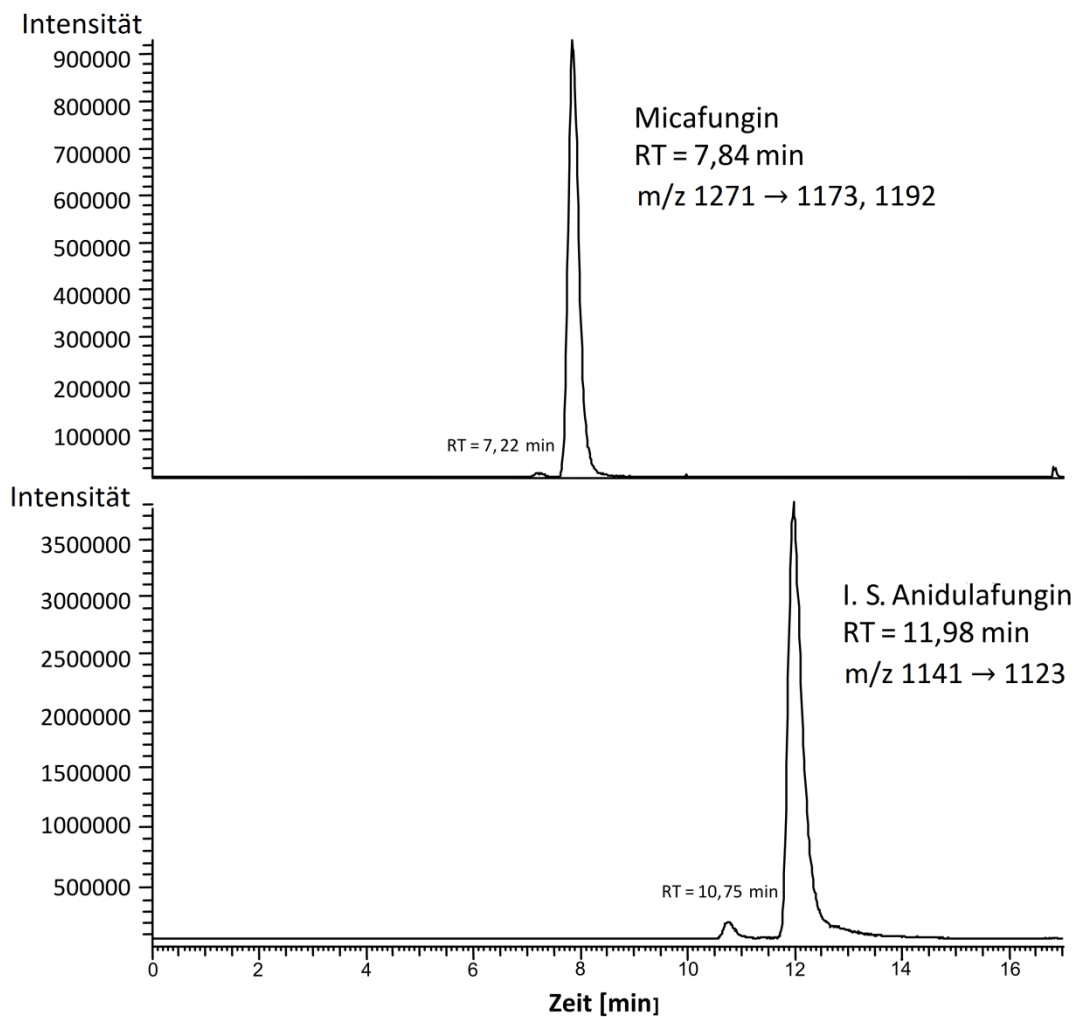


Abbildung 3.4: Massenspektrometer: Detektion von Micafungin, RT = 7,84 min m/z 1271 \rightarrow 1173, 1192, mit I.S. Anidulafungin ($c = 20 \mu\text{g/ml}$), zusätzliche Peaks bei RT = 7,22 min und 10,75 min

3.2.3 UV-Detektion

Die Absorptionsmaxima von Micafungin und Anidulafungin lagen im UV-Spektrum bei 273 nm beziehungsweise 306 nm. In Abbildung 3.5 sind die Chromatogramme bei diesen Wellenlängen dargestellt (Peak 1: 273 nm, Peak 2: 306 nm). Es wurde ein kleiner Peak kurz vor dem Micafungin- und Anidulafunginpeak mit identischem UV-Spektrum bei einer Retentionszeit von 7,3 Minuten für

Micafungin und 10,75 Minuten bei Anidulafungin beobachtet. Dabei handelt es sich um die selben Substanzen, die auch in der Massenspektrometrie detektiert wurden (s. Kapitel 4.2.3).

Die Kalibrierfunktionen waren bei Verwendung eines UV-Detektors linear. Weiterhin zeigte die UV-Detektion eine ähnliche Selektivität wie die Massenspektrometrie. Somit ergibt sich aus der Verwendung der teureren Massenspektrometrie kein Vorteil.

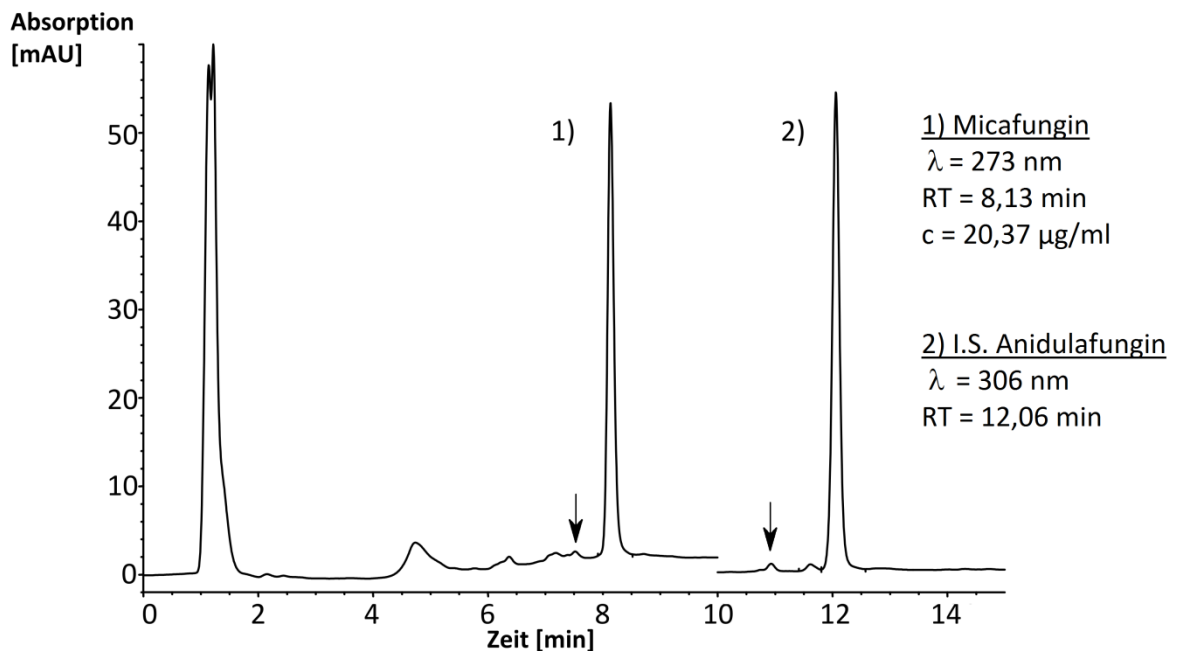


Abbildung 3.5: UV-Spektrometer: Detektion von Micafungin ($\lambda = 273 \text{ nm}$, $RT = 8,13 \text{ min}$, $c = 20,37 \mu\text{g/ml}$) mit I.S. Anidulafungin ($\lambda = 306 \text{ nm}$, $c = 20,00 \mu\text{g/ml}$); \downarrow = zusätzliche Peaks

3.3 Validierung

3.3.1 Kalibrierung

Die $1/x$ gewichteten Kalibrierfunktionen für Micafungin (s. Abbildung 3.6) und Anidulafungin (s. Abbildung 7.3) zeigten einen linearen Verlauf bei der Detektion mit dem UV-Spektrometer. Der Korrelationskoeffizient betrug $r = 0,994$ für Micafungin und $r = 0,999$ für Anidulafungin. Die Abweichung der Kalibrierfunktion vom Nullpunkt war mit einem $p = 0,489$ für Micafungin und $p = 0,160$ für Anidulafungin nicht signifikant und wurden daher durch Null gezwungen.

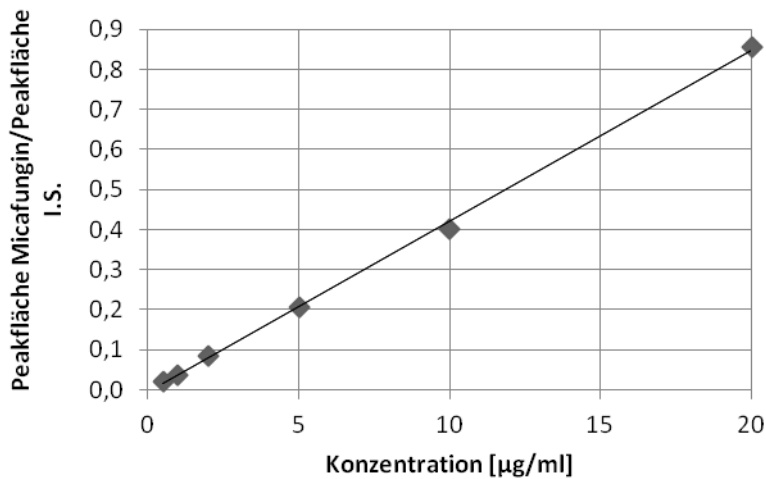


Abbildung 3.6: $1/x$ gewichtete Kalibrierfunktion von Micafungin mit dem UV-Spektrometer; I.S. Anidulafungin, (Korrelationskoeffizient $r = 0,994$; Kalibrierfunktion $y = 0,0426x$)

Ebenso ergab sich eine lineare Kalibrierfunktion für Caspofungin bei Messung mit dem Fluoreszenzdetektor. Im Gegensatz zu Micafungin und Anidulafungin erfolgte die Kalibrierung auch ohne internen Standard problemlos (s. Abbildung 7.5).

Der Versuch der Kalibrierung von Micafungin und Anidulafungin mit dem Massenspektrometer zeigten einen nichtlinearen Verlauf. Die dem Punktverlauf am nächsten kommende Funktion war ein quadratisches Polynom (s. Abbildung 3.7 für Micafungin und Abbildung 7.4 für Anidulafungin). Auf Grund der nichtlinearen Kalibrierung wurden die Versuche mit dem Massenspektrometer eingestellt.

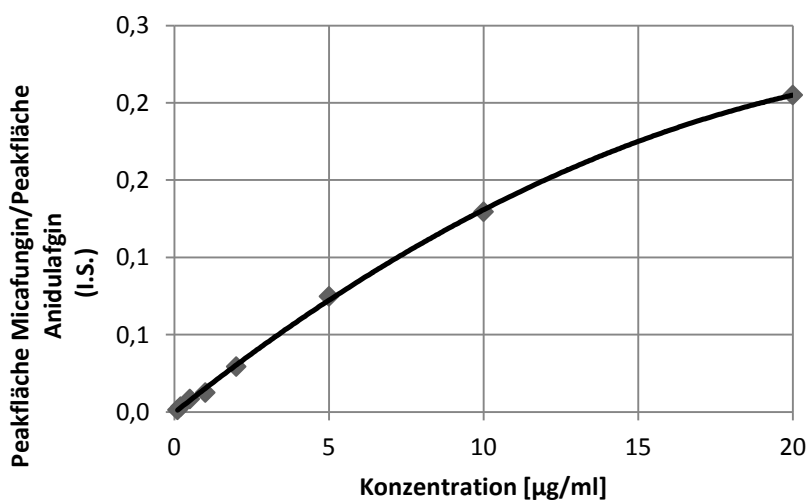


Abbildung 3.7: Quadratische Kalibrierfunktion von Micafungin mit dem Massenspektrometer, I.S. Anidulafungin; (Kalibrierfunktion $y = -0,0003x^2 + 0,016x - 0,0004$)

3.3.2 Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Die Bestimmungsgrenze ist definiert als das untere Ende des Kalibrierbereichs. Diese Werte betragen für Anidulafungin, Micafungin und Caspofungin jeweils 0,5 µg/ml bei relativen Standardabweichungen von 4,3 %, 1,8 % und 4,9%.

Die Nachweisgrenzen bei einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 3 betragen jeweils 0,03 µg/ml für Anidulafungin und Micafungin sowie 0,01 µg/ml für Caspofungin.

3.3.3 Präzision und Richtigkeit

Die Präzision und Richtigkeit in Serie sind für alle Echinocandine in Tabelle 3.2 dargestellt. In Tabelle 3.3 sind die Werte für die Präzision und Richtigkeit von Tag zu Tag angegeben.

Tabelle 3.2: Präzision (= Relative Standardabweichung) und Richtigkeit in Serie für die Bestimmung von Micafungin, Anidulafungin und Caspofungin

Echinocandin	Mittelwert	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
Micafungin			
0,1 µg/ml	0,10	2,65	1,80
1 µg/ml	0,99	-0,83	2,25
20 µg/ml	19,40	-2,98	0,97
Anidulafungin			
0,1 µg/ml	0,11	10,44	4,30
1 µg/ml	0,98	-1,85	4,35
20 µg/ml	21,13	4,74	1,04
Caspofungin			
0,1 µg/ml	0,10	1,45	4,99
20 µg/ml	19,43	-2,86	1,89

Tabelle 3.3: Präzision und Richtigkeit von Tag zu Tag für die Bestimmung von Micafungin, Anidulafungin und Caspofungin

Echinocandin	Mittelwert	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
Micafungin			
0,1 µg/ml	0,11	8,09	9,27
1 µg/ml	0,97	-3,35	3,39
20 µg/ml	19,59	-2,03	3,81
Anidulafungin			
0,1 µg/ml	0,11	12,57	8,36
1 µg/ml	1,04	4,40	7,45
20 µg/ml	19,87	-0,63	4,45
Caspofungin			
0,1 µg/ml	0,95	-5,75	3,26
20 µg/ml	18,85	-5,29	7,63

Die erhaltenden Werte für Präzision und Richtigkeit sind in allen Konzentrationen ausreichend gut und entsprechen den Richtlinien der Bundesärztekammer [66].

3.3.4 Stabilität

Für alle Echinocandine wurde die Stabilität bei Raumtemperatur im Plasma bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Dabei ergab sich insbesondere in nicht aufgearbeiteten Plasmaproben ein erheblicher Konzentrationsabfall aller Echinocandine innerhalb von 24 Stunden.

*Tabelle 3.4: Konzentrationsabfall von aufgearbeiteten und nicht aufgearbeiteten Proben bei Raumtemperatur nach 24 Stunden; c = 20 µg/ml; * = signifikant ($\alpha \leq 0,05$); n. a. = nicht anwendbar*

Echinocandin	Anidulafungin	Micafungin	Caspofungin
Konzentrationsabfall aufgearbeitete Proben [%] (p-Wert)	11,9 (0,00)*	6,5 (0,007)*	0,6 (0,327)
Konzentrationsabfall für aufgearbeitete Proben [%] mit Einrechnung des I.S. (p-Wert)	5,4 (0,11)	5,1 (0,09)	n.a.
Konzentrationsabfall für nicht aufgearbeitete Proben[%](p-Wert)	20,4 (0,00)*	21,0 (0,00)*	26,4 (0,027)*

Die Stabilität der fertig aufgearbeiteten Proben wurde ebenfalls über 24 Stunden bei Raumtemperatur bestimmt. Dabei zeigten sich absolute Konzentrationsabfälle von 11,9 % für Anidulafungin und 6,5 % für Micafungin. Da jedoch jeweils Anidulafungin und Micafungin als gegenseitiger interner Standard fungierten, und die Abbauraten ähnlich schnell waren, ergaben sich rechnerisch keine signifikanten Veränderungen in der Konzentrationsbestimmung über 24 Stunden. Bei Caspofungin zeigte sich ein Abfall von 0,6 % ($p = 0,327$) für die aufgearbeiteten Proben nach 24 stündiger Lagerung bei Raumtemperatur. Alle Echinocandine zeigten nach Aufarbeitung bei Raumtemperatur über 24 Stunden eine ausreichende Stabilität.

3.3.5 Matrixunabhängigkeit

Das beschriebene Verfahren zur Bestimmung der Echinocandine soll sowohl in Blutplasma- als auch in Blutserumproben angewendet werden. Aus diesem Grund wurde die Matrixunabhängigkeit der Methode untersucht. Es wurden die Peakflächen der Serum- und Plasmaproben verglichen. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Matrizen für Micafungin und Anidulafungin (Micafungin: $n = 13$, $p = 0,19$; Anidulafungin: $n = 7$, $p = 0,21$).

3.4 Analyse des Patientenkollektivs

3.4.1 Demografische Übersicht

Das Alter der Patienten lag im Median bei 57 Jahren mit einer Spannweite von 21 bis 84 Jahren. 73 % der Patienten waren männlich mit einem Durchschnittsalter von 60 Jahren (Median = 57) und 27 % waren weiblich und hatten ein Durchschnittsalter von 59 Jahren (Median = 61,5). Die Letalität innerhalb der gesamten Stichprobe betrug während des Aufenthalts auf der ITS 24 %. Der Anteil der Patienten, der mit Caspofungin therapiert wurden betrug 31 %. Der Anteil, der mit Micafungin behandelt wurde betrug 69 % (s. Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Geschlecht, Altersverteilung und Letalität des Patientenkollektivs sortiert nach Patientengruppen

Parameter	Caspofungin	Micafungin
Patientenzahl	14 (31 %)	31 (69 %)
Patientenzahl (männlich/weiblich)	11/3	22 /9
Verlegt [%]	79	74
Verstorben [%]	21	26
Alter:		
Spannweite [Jahre]	50 - 80	21 - 84
Median [Jahre]	62,5	56,0
MW± SD [Jahre]	63,1 ± 10,0	58,0 ± 18,2

Es wurden für die einzelnen Patientengruppen folgende Parameter erhoben bzw. berechnet: Alter, Therapiedauer, Aufenthaltsdauer, Gewicht, Größe, BMI. Die Daten sind jeweils mit Mittelwert und Standardabweichung in Tabelle 3.6 dargestellt.

Tabelle 3.6: Parameter der deskriptiven Statistik mit Mittelwerten und Standardabweichung; *= signifikant ($\alpha \leq 0,05$)

	Gesamtkollektiv	Caspofungin	Micafungin	p-Wert
Alter [Jahre]	59,6 ± 16,1	63,1 ± 10,0	58,0 ± 18,2	0,531
Aufenthaltsdauer [Tage]	24,1 ± 18,2	27,3 ± 19,1	22,7 ± 17,9	0,211
Therapiedauer mit Echinocandinen [Tage]	13,6 ± 8,2	14,8 ± 7,3	13,1 ± 8,2	0,155
Körperoberfläche [m ²]	1,9 ± 0,3	1,8 ± 0,2	2,0 ± 0,3	0,044*
Körpergröße [cm]	171,6 ± 9,7	170,5 ± 6,8	172,1 ± 10,9	0,424
Körpergewicht [kg]	77,1 ± 22,0	67,7 ± 14,8	81,3 ± 23,6	0,023*
BMI [kg/cm ²]	26,1 ± 7,0	22,7 ± 4,4	27,5 ± 7,4	0,024*

In der Analyse der erhobenen Patientendaten zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Alter, der Aufenthaltsdauer, der Therapiedauer und der Körpergröße zwischen den Patientengruppen

(Micafungin, Caspofungin). Bezüglich der Körperoberfläche, des BMI und des Körpergewichts zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen beiden Patientengruppen (s. Tabelle 3.6).

Bei 27 Patienten begann die Therapie mit Echinocandinen während des Aufenthalts auf der ITS, bei 6 Patienten zeitgleich mit der Aufnahme auf die ITS und 11 Patienten wurden schon mit Echinocandinen auf Normalstationen oder auf Intermediate Care Units anbehandelt. Im Mittel vergingen $8,2 \pm 10,8$ Tage zwischen dem Beginn des ITS Aufenthalts bis zum Beginn der Echinocandintherapie.

Die Patientengruppe, die mit Anidulafungin therapiert wurde, war mit insgesamt 4 Patienten zu klein, um ausgewertet zu werden.

3.4.2 Aufnahmediagnose

Bei 33 % der Patienten war eine respiratorische Insuffizienz der häufigste Grund für die stationäre Aufnahme auf die ITS. Danach folgte der Zustand nach einer Reanimation mit 18 %, Sepsis mit 16 % und Pneumonie mit 9 % wie in Abbildung 3.8 zu sehen ist.

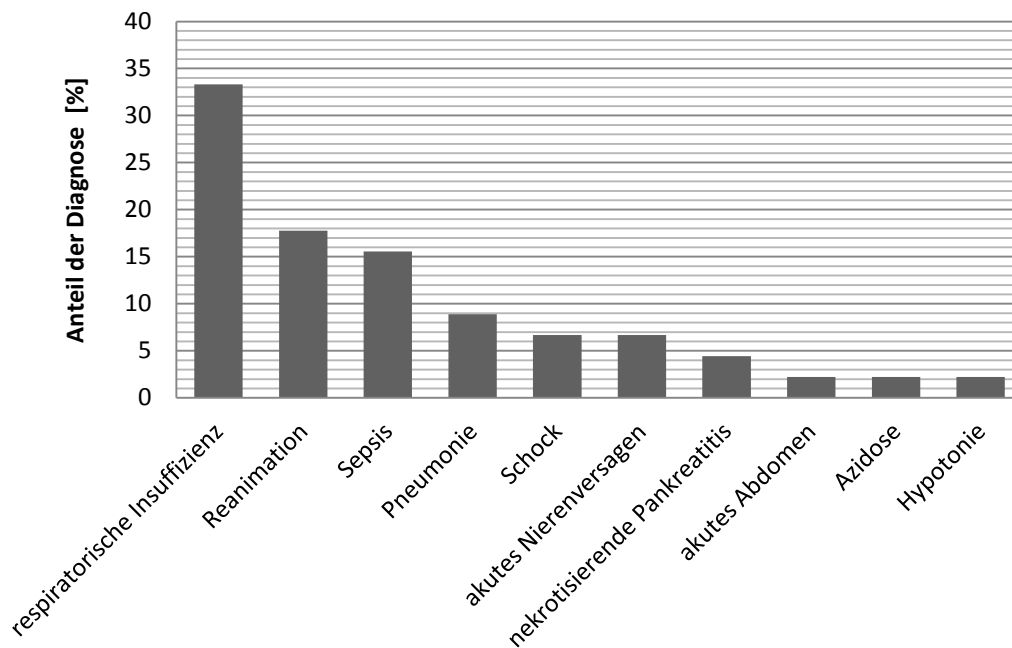


Abbildung 3.8: Aufnahmediagnosen des Patientenkollektivs

3.4.3 Pilznachweis

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Medikamentengruppen bezüglich eines Pilznachweises gezeigt werden ($p = 0,365$).

Besiedlung

Es wurde von allen Patienten jeweils der erste in der Pilzkultur positive mikrobiologische Befund ermittelt. Wie in Tabelle 3.7 zu sehen ist konnte bei den analysierten Patienten bei 56 % eine positive

Pilzkultur nachgewiesen werden. Bei den übrigen 44 % der Patienten erfolgte eine empirische Therapie. Der serologische Nachweis von Candida-Antikörpern wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Tabelle 3.7: Pilznachweis nach Patientengruppen

Patientengruppe	Caspofungin	Micafungin	Gesamtergebnis
Patientenzahl Pilznachweis	9	16	25
Pilznachweis [%]	64	52	56
Patientenzahl kein Pilznachweis	5	15	20
kein Pilznachweis [%]	36	48	44

Pilzgattung und -art

In allen mikrobiologischen Befunden wurden insgesamt 34 Pilzarten bei 25 Patienten nachgewiesen. Hierbei wurden alle gefundenen Pilzarten bei den Patienten mit positivem Pilznachweis berücksichtigt. Den größten Anteil hat *Candida albicans* mit 53 % gefolgt von *C. tropicalis* mit 17 % und *C. glabrata* mit 12 % (s. Tabelle 3.8). Insgesamt erfolgte der Nachweis der Pilzgattung *Candida* in 97 % der analysierten Fälle.

Tabelle 3.8: Gattung, Art und Anzahl der Pilznachweise

Candida-Art	Anzahl	Anteil [%]
<i>Candida albicans</i>	18	53
<i>Candida tropicalis</i>	6	17
<i>Candida glabrata</i>	4	12
<i>Candida valida</i>	2	6
<i>Candida kefyr</i>	2	6
<i>Candida famata</i>	1	3
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	3
Gesamtergebnis	34	100

Lokalisation

48 % des Nachweises durch Pilzkultur gelang durch eine bronchoalveoläre Lavage. Bei 12 % der Patienten konnte der Pilz in der Blutkultur nachgewiesen werden und bei 8 % der Patienten im Trachealsekret. Damit machen die Lunge und die Atemwege mit zusammen 56 % über die Hälfte der Foki für einen positiven Pilznachweis aus. Alle weiteren Foki, wie z.B. Wundabstriche, Katheterurin oder Pankreassekret, waren jeweils für 4 % der Pilzlokalisationen verantwortlich.

3.4.4 Einteilungen

Immunsuppression

Innerhalb des Patientenkollektivs (n = 45) zeigte sich, dass insgesamt 60 % der Patienten immunsupprimiert waren. In der Micafungin-Gruppe waren mit 71 % mehr Patienten

immunsupprimiert als in der Caspofungin-Gruppe mit 36 % der Patienten. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen bezüglich einer Immunsuppression ($p = 0,580$).

Lebererkrankungen

Von den 45 untersuchten Patienten waren 14 Patienten (31 %) von einer Lebererkrankung betroffen. Von diesen Patienten waren 64 % in der Micafungin-Gruppe und 36 % in der Caspofungin-Gruppe. Bei 50 % der Patienten war eine Leberzirrhose und bei 14 % war eine Leberinsuffizienz die Ursache für die Lebererkrankung. Die restlichen Ursachen verteilen sich mit jeweils 7 % auf die Erkrankungen Leberinfarkt, primär biliäre Zirrhose, Schockleber, hepatozelluläres Karzinom und Lebermetastasen. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Patientengruppen Micafungin und Caspofungin bezüglich einer Lebererkrankung ($p = 0,645$).

Hypoalbuminämie

Die Albuminwerte wurden während der Therapie mit Echinocandinen bei insgesamt 82 % (37 Patienten) aller untersuchten Patienten erhoben. Von den 37 Patienten hatten insgesamt 2 Patienten (5 %) keine Hypoalbuminämie. Diese 2 Patienten wurden ausschließlich mit Micafungin therapiert. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen bezüglich einer Hypoalbuminämie ($p = 0,532$).

Hyperbilirubinämie

38 % der aller untersuchten Patienten hatten während der Echinocandintherapie eine Hyperbilirubinämie. Im Gruppenvergleich konnte bei 36 % in der Caspofungin-Gruppe und 39% in der Micafungin-Gruppe eine Hyperbilirubinämie festgestellt werden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen bezüglich einer Hyperbilirubinämie ($p = 0,848$).

Glucocorticoide

Insgesamt 24 % der untersuchten Patienten wurden während der Therapie mit Echinocandinen zusätzlich mit Glucocorticoiden behandelt. In der Caspofungin-Gruppe befanden sich 21 % der Patienten und in der Micafungin-Gruppe 29 % der Patienten, die zusätzlich mit Glucocorticoiden behandelt wurden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen bezüglich der Therapie mit Glucocorticoiden ($p = 0,593$).

Dialyse und Dialysedauer

Insgesamt erhielten mit 53 % etwas mehr als die Hälfte der Patienten eine Dialyse. In der Micafungin-Gruppe betrug der Anteil der Patienten, die eine Dialyse erhielten 36 %. In der Caspofungin-

Gruppe erhielten 61 % eine Dialyse. Die Dialysedauer betrug im Mittel 10,2 Tage. In der Caspofungin- und der Micafungin-Gruppe dauerte sie im Durchschnitt jeweils 6,9 Tage und 11,7 Tage. Es gab keine signifikanten Zusammenhang zwischen der Patientengruppe und der Durchführung einer Dialyse ($p = 0,111$).

Body-Mass-Index (BMI)

Die Einteilung des BMI erfolgte modifiziert nach den Kriterien der World Health Organisation [68]. Insgesamt hatten 47 % aller Patienten Normalgewicht und 45 % aller Patienten Übergewicht (s. Tabelle 3.9).

Tabelle 3.9: Verteilung des BMI für das Patientenkollektiv

Kategorie	BMI [kg/m ²]	Anzahl der Patienten	Anteil der Patienten [%]
Untergewicht	< 18,5	4	9
Normalgewicht	18,5 – 24,9	21	47
Übergewicht	>25	20	45
Gesamtergebnis		45	100

3.4.5 Laborwerte und Echinocandinspiegel

In der nachfolgenden Korrelationsanalyse wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der ermittelten Echinocandinkonzentration und der gegebenen Dosis zum Zeitpunkt der Spiegelbestimmung gab. Weiterhin wurde der Zusammenhang zwischen der Echinocandinkonzentration und den Laborwerten (ALAT, ASAT, Bilirubin, GGT, Crea, Ck und CRP) ebenfalls in einer Korrelationsanalyse analysiert.

Es zeigte sich eine Korrelation zwischen der Tagesdosis und dem Plasmaspiegel in beiden Patientengruppen (s. Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10).

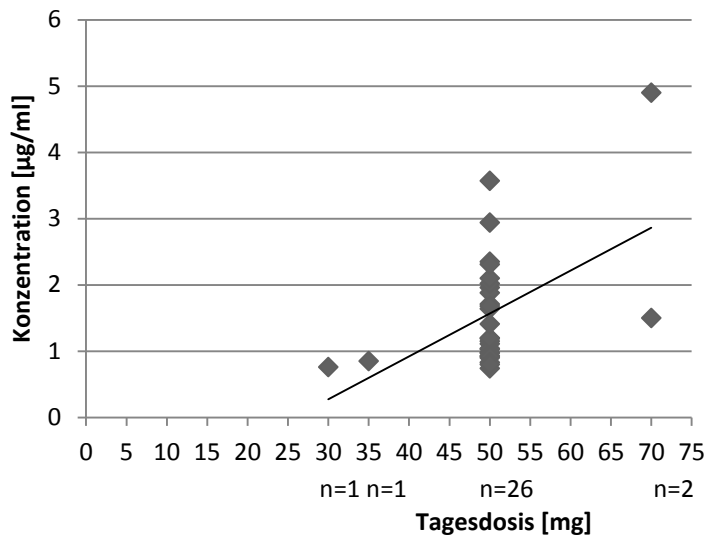


Abbildung 3.9: Streudiagramm: Korrelation der Caspofunginkonzentration zur Tagesdosis, (lineare Regressionsfunktion $y = 0,065x - 1,67$; Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,240$)

Der Korrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) zwischen Tagesdosis und Konzentration war sowohl in der Caspofungin-Gruppe ($r_s = 0,433$; $p = 0,008$) als auch in der Micafungin-Gruppe ($r_s = 0,225$; $p = 0,024$) signifikant.

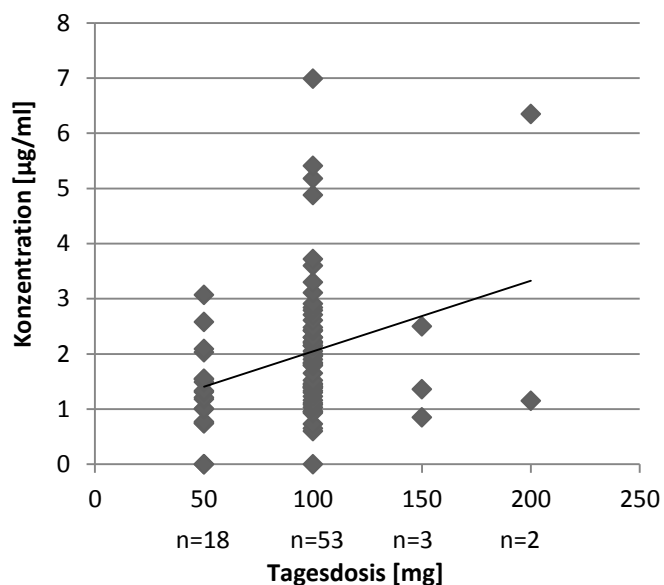


Abbildung 3.10: Streudiagramm: Korrelation der Micafunginkonzentration zur Tagesdosis, (lineare Regressionsfunktion $y = 0,0128x + 0,76$; Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,087$)

In der Korrelationsanalyse wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem jeweiligen Plasmaspiegel am fünften Therapietag und den Mittelwerten der Laborwerte bestand. Der Mittelwert der erhobenen Laborwerte wurde über fünf vorhergehende Therapietage einschließlich des Tages der Plasmaspiegelbestimmung berechnet.

Der Plasmaspiegel von Caspofungin zeigte in der Korrelationsanalyse nach Spearman einen signifikanten positiven Zusammenhang zum Kreatininmittelwert ($r_s = 0,516$; $p = 0,004$). Für den Plasmaspiegel von Micafungin zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zum Bilirubinmittelwert ($r_s = 0,321$; $p = 0,004$) (s. Tabelle 3.10). Alle anderen Ergebnisse zeigten keine Abhängigkeit zwischen dem Plasmaspiegel und dem betrachteten Mittelwert des Laborwerts.

*Tabelle 3.10: Korrelationsanalyse nach Spearman zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Micafungin- und Caspofunginspiegel und dem Mittelwert der Laborwerte; * = zweiseitig signifikant ($\alpha \leq 0,05$); $n = 45$*

Patientengruppe	Laborwert (Mittelwert)	r_s	p-Wert
Caspofungin	ALAT	-0,113	0,553
	ASAT	0,089	0,640
	Bilirubin	-0,039	0,837
	Ck	-0,057	0,767
	Crea	0,516	0,004*
	CRP	-0,163	0,390
	GGT	-0,083	0,662
Micafungin	ALAT	0,148	0,199
	ASAT	0,122	0,291
	Bilirubin	0,321	0,004*
	Ck	0,011	0,921
	Crea	0,014	0,905
	CRP	-0,079	0,492
	GGT	0,047	0,688

3.4.6 Dosierung, Dosisanpassungen und therapeutischer Bereich

Es wurde während des Beobachtungszeitraums durchschnittlich pro Tag und Patient 49 mg Caspofungin und 94 mg Micafungin verabreicht. Die Dosis pro kg Körpergewicht betrug pro Tag 0,7 mg für Caspofungin und 1,2 mg für Micafungin.

Bei 27% ($n = 12$) der beobachteten Patienten wurden Dosisanpassungen durchgeführt. Von den Patienten mit Dosisanpassung wurden 10 Patienten (83 %) mit Micafungin und 2 Patienten (17 %) mit Caspofungin therapiert. Dieser Unterschied zwischen den Patientengruppen bezüglich einer Dosisanpassung war nicht signifikant ($p = 0,104$).

Bei den 12 Patienten wurden insgesamt 22 Dosisanpassungen durchgeführt. Die 22 Dosisanpassungen entsprechen 20 % der insgesamt gemessenen Spiegel ($n = 108$). Retrospektiv wurden bei den Patienten mit Dosisanpassungen (Patientenzahl = 12; Messungen = 22) nach laborchemischen Ursachen für die Dosisanpassungen gesucht. Insgesamt war bei 27 % der Messungen die Spiegelbestimmung ausschlaggebend für die Dosisanpassung. Bei 14 % der Dosisanpassungen waren sowohl der

Echinocandinspiegel als auch der Leberwert erhöht. Bei 41 % der Dosisanpassungen wurden sowohl Spiegel als auch Laborwerte bei der Dosisanpassung berücksichtigt. Weitere 36 % der Dosisanpassungen wurden bei Veränderungen der Leberwerte (ALAT, ASAT, Bilirubin und GGT) durchgeführt, obwohl die Echinocandinspiegel im therapeutischen Bereich lagen. Bei 23 % der Spiegelbestimmungen war keine Ursache für die Dosisanpassung aus den Leberwerten oder den Echinocandinspiegeln ersichtlich.

Von 108 Messungen lagen 29 % außerhalb des therapeutischen Bereichs von 1 bis 4 µg/ml. Von diesen Messungen außerhalb des therapeutischen Bereichs lagen 77 % unterhalb und 23 % oberhalb des Referenzbereichs. Innerhalb der Gruppe die unterhalb des therapeutischen Bereichs lag, war bei 50 % aller gemessenen Spiegel der Patient normalgewichtig, in 33 % der Fälle übergewichtig und in 17 % der Fälle untergewichtig. Bei den Patienten, die einen Echinocandinspiegel oberhalb des therapeutischen Bereichs hatten, lag das Gewicht bei 71 % der durchgeführten Spiegelbestimmungen im Bereich des Normalgewichts und bei 29 % der Patienten im Bereich des Übergewichts. Von den Messungen deren Echinocandinspiegel innerhalb des therapeutischen Bereichs lagen, hatten in 54 % der Fälle die Patienten Normalgewicht, in 42 % der Fälle hatten die Patienten Übergewicht und 4 % hatten sie Untergewicht. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem therapeutischen Bereich und der jeweiligen BMI-Kategorie für Micafungin ($p = 0,392$) und Caspofungin ($p = 0,192$) gezeigt werden. Das Minimum aller gemessenen Plasmaspiegel lag unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,5 µg/ml und das Maximum betrug 7,6 µg/ml

4. Diskussion

4.1 Analytik zur Quantifizierung von Micafungin und Anidulafungin

4.1.1 Probenaufarbeitung und Extraktionsausbeute

Die Probenaufarbeitung für die HPLC ist abhängig von der Art der Probe, dem verwendeten Chromatografieverfahren und dem Detektionsverfahren. Eine Möglichkeit der Probenaufarbeitung für die Bestimmung von Caspofungin ist die Festphasenextraktion, die von Egle et al. beschrieben wurde [69]. Jedoch konnte mit diesem Verfahren in den durchgeführten Experimenten, durch eine hohe Wechselwirkung von Micafungin und Anidulafungin mit der stationären Phase der Festphasenextraktionsröhrchen, nur eine geringe Extraktionsausbeute von circa 40 % erreicht werden. Eine andere Möglichkeit zur Probenaufarbeitung ist die einfache Proteinfällung mit organischen Lösungsmitteln wie zum Beispiel Acetonitril. In der Aufarbeitung der Proben für die Analyse von Anidulafungin und Micafungin zeigte dieses Verfahren eine hohe und konstante stabile Extraktionsausbeute (s. Tabelle 3.1) und bewies damit seine Robustheit.

4.1.2 Interner Standard

Für die Entwicklung eines einfachen und validen chromatografischen Analyseverfahrens ist ein gut verfügbarer interner Standard notwendig. Ein guter interner Standard sollte dem Analyt möglichst chemisch ähnlich sein. Er darf allerdings nicht in der zu messenden Probe vorkommen und sollte in der Nähe zum Analytenpeak eluiert werden. Dabei darf es jedoch nicht zu einer Peaküberlappung kommen, um die Unterscheidbarkeit der Analyte zu gewährleisten.

In der Vergangenheit hatten die internen Standards für die Analyse von Echinocandinen entweder keine strukturelle Ähnlichkeit zum Analyt oder sie waren kommerziell nicht erhältlich [56] [54] [51]. Aufgrund der ähnlichen physikochemischen Eigenschaften eignet sich Anidulafungin als interner Standard für die Bestimmung von Micafungin und umgekehrt.

Für die Bestimmung von Caspofungin ist ein speziell synthetisierter interner Standard vorhanden, der jedoch nicht kommerziell erhältlich ist. Allerdings zeigte die Methode nach Schwartz et al. zur Bestimmung der Caspofunginkonzentration auch ohne internen Standard eine vergleichbar gute Präzision und Richtigkeit [50] (s. Kapitel 3.3.3).

4.1.3 Chromatografische Auftrennung und Gradientenoptimierung

Bei dissoziierbaren Molekülen spielt der pH-Wert der mobilen Phase bezüglich der Retentionseigenschaften der Analyte eine entscheidende Rolle. Liegt der pH-Wert der mobilen Phase im neutralen Bereich, so liegt Micafungin als saure Substanz ionisiert vor und kann in kürzerer Retentionszeit eluiert werden. Umgekehrt braucht das basische Caspofungin ein saures Laufmittel, um ionisiert zu werden. Bei Anidulafungin (neutral) findet durch die Variation des pH-Werts keine Änderung in der chromatografischen Auftrennung statt, da es nicht ionisierbar ist. Caspofungin und Micafungin brauchen durch ihre chemischen Eigenschaften jeweils Laufmittel mit gegensätzlichen pH-Werten. Zur Bestimmung der Konzentration von Micafungin und Caspofungin sind in der Literatur schon mehrere Verfahren veröffentlicht worden, die jeweils verschiedene Schwierigkeiten aufwiesen. So wurde eine Methode beschrieben, in der Micafungin, Caspofungin und Azole simultan quantifiziert worden [70]. Durch die Deionisation des sauren Micafungins, bei der Verwendung der mobilen Phase, mit einem niedrigen pH-Wert zeigten sich verzerrte Micafungin-Peaks mit einem großen Tailing [70]. Dieses Problem wurde durch Decosterd et al. vermieden, indem Micafungin nicht in ihrer Ultra-Performance-Liquid-Chromatography Tandem-Massenspektrometrie (UPLC-MS/MS) Methode untersucht wurde [71].

Auf Grund der unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften von Micafungin und Caspofungin wurden in dieser Arbeit beide Echinocandine in unterschiedlichen Verfahren getrennt. Micafungin und Anidulafungin wurden zusammen in einem weiteren, auf diese beiden Substanzen optimierten Verfahren analysiert. Eine gute Differenzierung dieser beiden Echinocandine zeigte sich in den zwei gut abgetrennten symmetrischen Peaks in den Chromatogrammen (s. Abbildung 3.5).

Entscheidend für die Trennleistung ist das Mischungsverhältnis der mobilen Phase mit den verwendeten organischen Modifikatoren (unpolar) und dem Lösungsmittel wie z.B. Wasser (polar). Durch die Anwendung der Gradientenelution können Analyte mit unterschiedlicher Polarität in einem chromatografischen Durchlauf zügig getrennt werden. Die chromatografische Trennung der Echinocandine durch die Gradientenelution wurde schon mehrfach in der Literatur beschrieben [69] [70] [71].

Eine optimale Trennung der einzelnen Peaks bei der chromatografischen Auftrennung konnte, mit dem in Kapitel 2 beschriebenen Verfahren, bei einer Steigerung des Acetonitrilanteils auf 65 % innerhalb einer Laufzeit von 11 Minuten erreicht werden. Methanol hat bei der Verwendung auf der unpolaren stationären Phase im Vergleich zu Acetonitril eine schwächere Elutionskraft und besitzt eine hohe Viskosität. Als Folge ist die Trennleistung schlechter und es entstehen breitere Peaks. Diese schlechtere Selektivität von Methanol bei der Trennung resultiert wahrscheinlich aus einer Interaktion mit den vielen OH-Gruppen der Echinocandine. Es zeigte sich, dass Acetonitril durch seine geringere Viskosität

und größere Elutionskraft im Vergleich zu Methanol sehr gute Stoffaustauschigenschaften hatte und zu einer besseren Trennleistung als Methanol führte. Bei der Verwendung der 50 mm Säulen zeigten sich schlecht abgrenzbare Peaks. Die Abgrenzung der Peaks konnte durch die Verwendung einer längeren Säule von 150 mm verbessert werden (s. Abbildung 3.2)

Durch die Gradientenelution kam es insgesamt zu einer Verkürzung von Analysezeiten bei stark retardierten Substanzen und spät eluierende Peaks erscheinen deutlich schmaler und höher, wodurch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verbessert wurde. Für die Bestimmung von Caspofungin wurde keine Gradientenoptimierung benötigt, da in dem beschriebenen Verfahren nur eine Substanz aufgetrennt wurde.

4.2 Detektionsverfahren

4.2.1 Fluoreszenzdetektion

Die Fluoreszenzdetektion ermöglicht die selektive Detektion von fluoreszierenden Analyten. Durch die native Fluoreszenz von Caspofungin ist eine störungsfreie Abbildung dieses Echinocandins in der Detektion mit dem Fluoreszenz-Detektor gut möglich. Micafungin und Anidulafungin sind auf Grund einer nicht ausreichenden Fluoreszenz für dieses Verfahren nicht geeignet.

4.2.2 Massenspektrometrie

Für die Detektion des Analyten in der Massenspektrometrie gibt es verschiedene Verfahren [70] [71]. Die Echinocandine sind wegen ihrer großen Molmasse nicht für die thermische Verdampfung durch die Atmosphärendruckionisation (APCI; Atmospheric Pressure Chemical Ionization) geeignet, da diese auf Grund der hohen Temperaturen von bis zu 400 °C bei der Verdampfung die Molekularstruktur zerstört. Aus diesem Grund wurde zur Ionisation das schonendere Elektronen-Spray Verfahren (ESI; Elektrospray-Ionisation) verwendet.

Micafungin und Anidulafungin haben ein hohes Molekulargewicht von 1270 g/mol bzw. 1140 g/mol, wodurch es durch die ESI zu einfachen und doppelt geladenen Molekülonen kommen kann. So entstehen neben einfach geladenen Quasimolekülonen ($[M+H]^+$) mit m/z 1270,4 (Micafungin) bzw. m/z 1141,5 (Anidulafungin) auch doppelt geladene Quasimolekülonen ($[M+2H]^{2+}$) mit m/z 636,3 (Micafungin) bzw. m/z 571,3 (Anidulafungin) (s. Abbildung 3.4 und Abbildung 7.1). Echinocandine behalten durch ihr hohes Molekulargewicht eine große Anzahl an Kohlenstoffatomen. Kohlenstoff besteht aus dem Hauptisotop ^{12}C und zu 1 % aus dem Isotop ^{13}C . Durch die große Anzahl an Kohlenstoffatomen (Micafungin: 56, Anidulafungin: 58) der Echinocandine kommt es durch die natürliche Isotopenverteilung von ^{12}C und ^{13}C zu unterschiedlichen Verteilungen der Isotope innerhalb der jeweiligen Quasimolekülonen. Ein Massenspektrum einer Verbindung mit einem einzigen C-Atom

weist daher einen $[M+H+1]^+$ -Peak mit etwa 1/100 der Intensität des $[M+H]^+$ -Peaks auf. Abhängig von der Zahl der ^{13}C Atome kommt es so zu schwereren Ionen und es entsteht für jedes Quasimolekül ein spezifisches Isotopenmuster. Bei Micafungin zeigt sich eine Isotopenverteilung von 63,44 % $[M+H+1]^+$ und 29,04 % $[M+H+2]^+$ (s. Tabelle 7.12; Isotopenverteilung für Anidulafungin s. Tabelle 7.13). Durch diese Verteilung der Intensität eines Moleküls auf verschiedene Signale konnte kein einheitliches Produkt detektiert werden. Um Intensitätsverluste zu vermeiden, wurde die Massenauflösung des Quadrupol-Massenspektrometers auf den $[M+H+1]^+$ -Peak des Isotopenmusters gerichtet und auf 2,5 amu gesetzt. Durch diese große Filterbreite des Quadrupol-Massenspektrometers, im Vergleich zu typischen Filterbreiten von 0,5 amu, sank jedoch die Selektivität in der Detektion der Echinocandine [72].

In der massenspektrometrischen Detektion zeigten sich zusätzliche Peaks kurz vor den Retentionszeiten von Micafungin und Anidulafungin mit einem ähnlichen Massenspektrum (s. Abbildung 3.4 und Abbildung 7.1). Eine mögliche Erklärung für diese Peaks ist im folgenden Abschnitt beschrieben.

4.2.3 UV-Spektrometrie

Je kürzer die Wellenlänge ist, die bei der Detektion der Analyten verwendet wird, desto größer ist die Energie mit der die Valenzelektronen angeregt werden. Je größer die Energie ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass viele Moleküle unselektiv detektiert werden. Je mehr konjugierte Doppelbindungen oder aromatische Ringe im Molekül vorhanden sind, desto weniger Anregungsenergie wird benötigt, um sie zu detektieren. Die Echinocandine gehören mit ihren Amino- und Carbonylgruppen im aromatischen Ring zu den wenigen Molekülen, die ihr Absorptionsmaximum bei relativ langen Wellenlängen von 273 nm und 306 nm aufweisen. Die Verwendung dieser langen Wellenlängen zur Detektion von Micafungin und Anidulafungin machen eine ungestörte und selektive Detektion möglich.

In den Chromatogrammen zeigten sich zusätzliche Peaks in der Nähe des zu eluierenden Analyten (s. Abbildung 3.5 und Abbildung 7.2). Die Substanzen, die sich in diesen zusätzlichen Peaks darstellten, zeigten praktisch identische UV-Absorptionsspektren und Massenspektren. Daraus lässt sich schlußfolgern, dass sie eine große strukturelle Ähnlichkeit zu Micafungin bzw. Anidulafungin haben.

Für diese Peaks sind zwei Erklärungen möglich. Es können einerseits diastereomere Analoga und andererseits Zerfallsprodukte, die durch eine hydrolytische Ringspaltung entstanden sein könnten, vorhanden sein.

Diastereomere entstehen durch Inversion eines oder mehrerer chiraler Zentren eines Moleküls. Diese Inversion benötigt allerdings Aktivierungsenergie, die den Substanzen in diesem experimentellen

Umfeld nicht von außen zugeführt wurde. Somit ist die Entstehung eines diastereomere Analogons unwahrscheinlich.

Bei einer hydrolytischen Spaltung kommt es zur Addition eines Wassermoleküls. Das gespaltene Molekül ist somit schwerer als das Originalmolekül und wäre durch die Filtereinstellung, die auf die Masse des Originalmoleküls ausgerichtet ist, im Massenspektrometer nicht detektierbar. Trotzdem war ein zusätzlicher Peak im Chromatogramm sichtbar. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass es durch die Ionisation im Detektionsprozess zu einem Verlust dieses Wassermoleküls kommt, womit sich die Masse reduziert und in die Filterbreite des Originalmoleküls fällt. Für diese Erklärung spricht, dass die Intensität dieses Peaks zunahm, wenn die Probe mehr als 12 Stunden bei Raumtemperatur gelagert wurde. Für Caspofungin wurde in der Literatur der Abbau durch hydrolytische Ringspaltung beschrieben [60] [73]. Dieser Abbauprozess kann auf Grund der ähnlichen Molekularstruktur auch beim Abbau von Micafungin und Anidulafungin erwartet werden. Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei den zusätzlichen Peaks um hydrolytische Zerfallsprodukte handelt, welche sich im Laufe der Zeit in den Proben anreichern.

Mit anderen spektrometrischen Detektionsverfahren wie z.B. der NMR-Spektroskopie (NMR; Nuclear Magnetic Resonance) wäre es möglich, die genaue molekulare Zusammensetzung der zusätzlichen Peaks detailliert zu klären. Die genaue Strukturaufklärung dieser zusätzlichen Peaks war allerdings nicht das Ziel der Methodenentwicklung und wurde deswegen nicht weiter verfolgt.

4.3 Validierung

4.3.1 Kalibrierung

Bei der Verwendung der UV-Detektion konnten akzeptable Ergebnisse für Präzision und Richtigkeit entsprechend den Richtlinien der Bundesärztekammer erreicht werden [66]. Die Kalibrierfunktion, die sich aus den Messergebnissen bei der UV-Detektion berechnete, zeigte einen linearen Verlauf (s. Abbildung 3.6 und Abbildung 7.3).

Zur Berechnung der Kalibrierfunktionen wurde wegen des stetigen Anstiegs der absoluten Standardabweichungen eine $1/x$ gewichtete Regression verwendet.

Bei der Massenspektrometrie sind die Messdaten nur mit Hilfe einer nichtlinearen Funktion approximierbar. Die Ursachen dafür sind z. B. die selbstlimitierende Ionisationseffizienz und das schon beschriebene nicht konstante Verhältnis von einfach und doppelt geladenen Quasimolekülonen (s. Kapitel 4.2.2). Mit diesen nichtlinearen Kalibrierfunktionen ist keine akzeptable Richtigkeit und Präzision bei Verwendung der Massenspektrometrie erreichbar (s. Abbildung 3.7 und Abbildung 7.4). Deswegen wurde die Verwendung der Massenspektrometrie zur Detektion der Echinocandine nicht weiter verfolgt.

4.3.2 Präzision und Richtigkeit

Die Werte für die Präzision und Richtigkeit wurden mit dem UV-Detektor für Anidulafungin und Micafungin, jeweils als gegenseitiger I.S. und mit dem Fluoreszenzdetektor für Caspofungin, ohne I.S., bestimmt. Die Präzision und Richtigkeit entspricht den Richtlinien der Bundesärztekammer [66].

4.3.3 Stabilität und Matrixunabhängigkeit

Die Ergebnisse zeigten, dass die Proben auf dem Autosampler über 24 Stunden bei Raumtemperatur ausreichend stabil waren. Auf Grund des Konzentrationsabfalls bei Raumtemperatur für nicht aufgearbeitete Proben (s. Tabelle 3.4) ist die Haltbarkeit von Echinocandinen begrenzt und es ist notwendig, die Proben für das therapeutische Drug Monitoring so schnell wie möglich aufzuarbeiten, oder aber für den Transport bei -20 °C einzufrieren. Die Langzeitstabilität bei -20 °C wurde für Hundeplasmaproben von Zornes et al. beschrieben [53].

In den Untersuchungen zur Matrixunabhängigkeit zeigte sich, dass das beschriebene Verfahren zur Bestimmung der Echinocandine, sowohl in Blutplasma- als auch in Blutserumproben, angewendet werden kann.

4.4 Eignung der entwickelten Methode für die Laborroutine

Durch die Gradientenelution mit Steigerung des Acetonitrilgehalts auf dem RP-HPLC System wurde eine schnelle und detaillierte Auftrennung von Micafungin und Anidulafungin erreicht. Beide Echinocandine konnten auf Grund ihrer ähnlichen Molekularstruktur als gegenseitiger interner Standard verwendet werden.

Die Massenspektrometrie wird üblicherweise angewendet, wenn im Rahmen einer Quantifizierungsmethode die Selektivität und Sensitivität erhöht werden soll. Allerdings konnte bei der Verwendung der Massenspektrometrie zur Messung der Echinocandine die Selektivität im Vergleich zum UV-Detektor nicht verbessert werden und sie ist auf Grund der nichtlinearen Kalibrierung zur Bestimmung der Echinocandine nur bedingt geeignet (s. Kapitel 3.3).

Micafungin und Anidulafungin besitzen jeweils ein charakteristisches UV-Spektrum, welches eine selektive und sichere Bestimmung mittels des UV-Detektors möglich macht. Die Validierungsergebnisse zeigten, dass die Konzentrationsbestimmung von Anidulafungin und Micafungin in Patientenproben präzise und exakt möglich ist. Ungenauigkeiten bei der Probenaufarbeitung können durch den internen Standard ausgeglichen werden. Der verwendete interne Standard ist einfach zu erhalten und nicht teuer. Systematische Fehler bei der Verwendung des internen Standards können ausgeschlossen werden, da beide Medikamente nicht gleichzeitig verabreicht werden. Bei einem Wechsel innerhalb der Medikamentenklasse ist die Halbwertszeit der

einzelnen Echinocandine zu beachten, um die Genauigkeit der Messmethode zu garantieren. Die Methode ist außerdem für Plasma- und Serumproben geeignet und kann auf jedem Standard RP-HPLC-System angewendet werden.

4.5 Analyse des Patientenkollektivs

4.5.1 Bewertung der Echinocandinspiegel in Zusammenhang mit der Patienteneinteilung

Durch das in dieser Arbeit entwickelte Messverfahren ist das TDM von Echinocandinen einfach und valide in der täglichen Laborroutine möglich. Das TDM von Echinocandinen ist trotz der geringen Toxizität vor allem bei intensivpflichtigen Patienten auf Grund der variablen Pharmakokinetik sinnvoll. Das Ziel ist es, trotz der individuell unterschiedlichen Pharmakokinetik, durch ausreichend hohe Echinocandinspiegel eine optimale Therapie der invasiven Candidiasis zu ermöglichen.

Die Fachinformationen für Micafungin und Caspofungin empfehlen jedoch eine körperlgeichtsabhängige Dosierung [25] [26].

Einige Studien zeigen einen Einfluss des Körpergewichts bei der Dosierung von Micafungin. Es ist eine Zunahme der Micafungin-Clearance ab einem Körpergewicht von 66,3 kg bei 62 Patienten beschrieben worden [58]. Auch für Caspofungin konnten Nguyen et al. innerhalb einer prospektiven klinischen Studie bei 38 Patienten auf einer chirurgischen ITS einen signifikanten Effekt zwischen einem erhöhten Körpergewicht (> 75 kg) und einem erniedrigten Caspofunginspiegel im Blut zeigen [59].

In der in dieser Arbeit untersuchten Patientengruppe lag das Durchschnittsgewicht mit 77,1 kg höher als das in den o.g. Studien angegebene Durchschnittsgewicht für zu geringe Echinocandinspiegel.

In der Micafungin-Gruppe waren die Patienten signifikant schwerer als in der Caspofungin-Gruppe.

29 % der Messungen im Rahmen des TDM lagen außerhalb des therapeutischen Bereichs. Der größte Anteil (77 %) davon lag unterhalb des therapeutischen Bereichs und war somit offensichtlich unterdosiert. 33 % (8 Spiegelbestimmungen) wurden in dieser Gruppe bei übergewichtigen Patienten erhoben. Die Auswertung von acht Spiegelbestimmungen ist jedoch zu klein, um allgemeine Aussagen bezüglich eines zu geringen Echinocandinspiegels treffen zu können.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem therapeutischen Bereich und dem BMI in der untersuchten Patientenkohorte (s. Kapitel 3.4.6).

In der Fachinformation wird für Micafungin bei erwachsenen Patienten über 40 kg zur Therapie der invasiven Candidiasis eine Dosis von 100 mg/d empfohlen. Bei Patienten, die weniger als 40 kg wiegen entspricht die Dosis 2 mg/kg/d [26]. In der Fachinformation für Caspofungin wird für Patienten die unter 80 kg wiegen eine initiale Gabe von 70 mg am ersten Tag und 50 mg an den folgenden Tagen empfohlen. Patienten, mit einem Gewicht von über 80 kg sollte kontinuierlich eine Dosis von 70 mg/d

gegeben werden [25]. Die oben genannten Studien von Gumbo et al. und Nguyen et al. geben im Vergleich zu den aktuellen Fachinformationen andere Gewichtsbereiche für die Dosisanpassung an. Diese neueren Ergebnisse sind noch nicht in die Fachinformation eingegangen und müssen in weiteren Studien belegt werden. Es werden Studien mit größeren Patientengruppen benötigt, um in Zukunft eine optimale gewichtsabhängige Dosierung ermitteln zu können.

Sirohi et al. konnte bei 36 Patienten während einer Stammzelltransplantation zeigen, dass maximale Dosierungen von bis zu 8 mg/kg/d Micafungin ohne UAW toleriert werden können [27]. Diese Ergebnisse ermöglichen potentiell höhere Dosierungen bei übergewichtigen Patienten und bei Patienten mit einem hohem Risiko für eine Pilzinfektion [74]. Auf Grund der nicht vorhersehbaren Wirkspiegel erscheint, trotz der geringen Toxizität von Echinocandinen, vor allem bei höheren Dosierungen eine detaillierte Überwachung der Leberparameter und des Echinocandinspiegels zur sicheren Therapie von invasiven Pilzinfektionen sinnvoll.

In der untersuchten Patientengruppe konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen einer Hypoalbuminämie und der Medikation mit Caspofungin oder Micafungin gezeigt werden. Es wiesen mit 95 % fast alle Patienten eine Hypoalbuminämie auf. Daher ist die Vergleichsgruppe ohne eine Hypoalbuminämie für eine Auswertung zu klein.

In der Literatur wurden bisher diesbezüglich unterschiedliche Ergebnisse publiziert. Bei täglicher Messung des Caspofunginspiegels über 14 Tage konnte ein erhöhter Caspofunginspiegel bei Patienten mit Hypoalbuminämie festgestellt werden [59]. Für Micafungin konnte diese Abhängigkeit noch nicht beobachtet werden [57].

Eine Hypoalbuminämie ist bei ITS Patienten, wie auch in der untersuchten Kohorte, häufig und ist durch verschiedene Faktoren bedingt. Zu diesen Faktoren zählen eine erhöhte kapillare Permeabilität, Hämodilution, renale Verluste oder verringerte hepatische Synthese [48]. Es kann dadurch bei Medikamenten wie z.B. Phenytoin oder Ceftriaxon, die ebenfalls wie Echinocandine vorrangig an Albumin binden, zu einer Erhöhung des freien Anteils im Blut kommen [75] [76]. Eine weitere Ursache für die Erhöhung des Caspofunginspiegels ist der durch die Hypoalbuminämie verringerte kolloidosmotische Druck, der eine geringere Verteilung von Caspofungin in die Nachbarkompartimente verursachen könnte und somit die Caspofunginkonzentration im Blutplasma erhöhen würde [59].

In der untersuchten Patientengruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen bezüglich einer Lebererkrankung.

In der Fachinformation wird für Caspofungin bei mäßiger Leberinsuffizienz (Child-Pugh Score 7 - 9) eine Dosisreduktion auf 35 mg/d empfohlen. Für Micafungin gibt es laut Fachinformation keine Einschränkung der Dosierung bei leberinsuffizienten Patienten. Auf Grund der Entstehung von hepatozellulären Tumoren bei Ratten nach einer Behandlungsperiode mit Micafungin sollte die

Anwendung von Micafungin bei Patienten mit Lebererkrankungen ausschließlich nach sorgfältiger Nutzen-Risiko Abwägung erfolgen. Weiterhin wird das Absetzen von Micafungin bei Lebererterhöhung empfohlen [26].

In der bisherigen Literatur gibt es unterschiedliche Ergebnisse zu Auswirkungen von vorhandenen Lebererkrankungen auf den Caspofungin- oder Micafunginspiegel. In einer prospektiven Studie von Mistry et. al. wurde der Caspofunginspiegel an 49 Patienten mit Leberinsuffizienz und an einer gesunden Kontrollgruppe untersucht. Es zeigte sich bei Patienten mit milder Leberinsuffizienz eine signifikant erhöhte Caspofunginkonzentration um bis zu 26 % im Verhältnis zur Kontrollgruppe, weswegen die Patienten mit mäßiger Leberinsuffizienz eine reduzierte Tagesdosis von 35 mg/d erhielten. Unter der angepassten Dosis zeigte sich bei den Patienten mit mäßiger Leberinsuffizienz kein signifikanter Unterschied zu der Kontrollgruppe. Hierauf basiert die Empfehlung die Dosis für Patienten mit mäßiger Leberinsuffizienz zu reduzieren [61].

Hebert et al. zeigte in einer Studie von acht Patienten mit mäßiger Leberinsuffizienz eine Reduktion der AUC von Micafungin um 22 % im Vergleich zur Kontrollgruppe [57]. Diese nicht signifikante Reduktion der AUC wurde jedoch auf das erhöhte Gewicht in der Micafungingruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zurückgeführt [57].

In zwei verschiedenen Fallberichten wurden Patienten mit invasiver Aspergillose trotz schwerer Leberinsuffizienz mit höheren Caspofungindosierungen als in der Fachinformation therapiert. Hierbei zeigten sich normwertige Caspofunginspiegel mit intermittierenden Lebererterhöhungen [62] [77].

Auf Grund der hohen Mortalität der invasiven Pilzinfektionen muss man Nutzen und Risiko der Off-label Dosierung bei dieser Patientengruppe abwägen. Um die Sicherheit der Patienten zu verbessern, spielt das Therapeutische Drug Monitoring und die regelmäßige Laborwertanalyse dabei eine wichtige Rolle.

Die Metabolisierung von Micafungin und Caspofungin erfolgt hepatisch über die COMT, CYP450-Isoenzyme und über Acetylierung. Die Aufnahme in die Leber erfolgt über die OATP 1 (s. Kapitel 1.2.3). Aus diesem Grund hat die Leberfunktion einen Einfluss auf die Pharmakokinetik von Micafungin und Caspofungin im Blutplasma. Um diesen Einflüsse genauer zu bestimmen, werden jedoch noch weitere molekularbiologische und pharmakokinetische Untersuchungen benötigt.

4.5.2 Zusammenhang zwischen Echinocandinspiegel und Laborwerten

Die Abhängigkeit der Tagesdosis von dem gemessenen Spiegel konnte jeweils für Micafungin und Caspofungin in der Korrelationsanalyse nach Spearman gezeigt werden. Die Korrelation zwischen dem Plasmaspiegel und der gegebenen Dosis ist die Grundvoraussetzung für das TDM [44].

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Korrelation zwischen dem Caspofunginspiegel und dem Kreatininmittelwert ermittelt werden (s. Kapitel 3.4.5).

Im Vergleich zu Amphotericin B verursacht Caspofungin deutlich seltener eine Nierenfunktionsstörung [78] [42]. Es wurde jedoch beschrieben, dass Patienten mit Niereninsuffizienz eine erhöhte AUC unter der Therapie mit Caspofungin hatten [25]. Dies wurde jedoch nur bei niereninsuffizienten Patienten nach einer Einzeldosis von 70 mg beobachtet. Bei Patienten, die mehrmals eine Einzeldosis von 50 mg bekommen haben, konnte dieser Zusammenhang nicht gezeigt werden [25]. In der untersuchten Patientengruppe liegt der Mittelwert der Tagesdosis für Caspofungin bei 49 mg. Trotz der im Vergleich geringeren Tagesdosis konnte in der vorliegenden Arbeit eine Korrelation zwischen dem Caspofunginspiegel und dem Kreatininwert auch in der heterogenen Patientengruppe gezeigt werden, deren Patienten nicht ausschließlich niereninsuffizient waren.

In einer prospektiven Studie von Würthwein et. al. wurde die Pharmakokinetik von Tagesdosen bis zu 200 mg Caspofungin bei 46 immunsupprimierten Patienten zur Therapie der invasiven Aspergillose untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass hohe Dosen keine Auswirkung auf die Nieren- oder Leberfunktion hatten und eine Dosisanpassung nicht notwendig war. Nach Würthwein et al. ist es möglich höhere Dosen von Caspofungin sicher zur effektiven Therapie der Aspergillose einzusetzen [79]. Weitere klinische Studien konnten bei immunsupprimierten Patienten mit ösophagealer Candidiasis und invasiver Mykose keinen Einfluss der Caspofungindosis auf die Nierenfunktion ermitteln [43] [80].

In diesen Studien zeigten sich methodische Unterschiede zu der vorliegenden Arbeit. So erfolgte keine Konzentrationsbestimmung des Caspofunginspiegels und auch keine direkte Korrelation des Caspofunginspiegels mit dem Kreatininwert. Jedoch ist auch die in dieser Arbeit untersuchte Patientenzahl mit 14 Patienten sehr klein und lässt somit keine repräsentativen Aussagen zu.

In der Korrelationsanalyse nach Spearman konnte eine signifikante positive Korrelation zwischen dem Micafunginspiegel und dem Bilirubinmittelwert gezeigt werden. Im Gegensatz dazu zeigte Hebert et. al eine Reduktion der AUC von Micafungin um 22 % bei Patienten mit moderater Leberdysfunktion. Diese Reduktion wurde jedoch auf Grund des großen Körpergewichtsunterschieds zur Kontrollgruppe als nicht signifikant gewertet. Dabei wurden zudem sehr wenige Patienten (n = 8) untersucht [57]. Auch Nakagawa et. al. konnten bei 20 Patienten mit hämatologischen Erkrankungen keinen Einfluss des Micafunginspiegels auf die Bilirubinkonzentration feststellen [81].

Im Gegensatz dazu konnte in zwei weiteren Studien, wie auch in der vorliegenden Arbeit, eine Korrelation zwischen dem Micafunginspiegel und der Bilirubinkonzentration gezeigt werden [51] [54]. Muraki et. al. fanden bei 20 Patienten nach einer Lebertransplantation einen signifikant erhöhten Micafunginspiegel, wenn bei diesen Patienten der Bilirubinwert > 5 mg/dl (\cong 85,5 μ mol/l) lag [51]. Shimoeda et. al. zeigten ebenfalls einen Bilirubinanstieg nach Micafungingabe bei 29 Patienten mit hämatologischen Erkrankungen und konnten somit zeigen, dass dieser Zusammenhang nicht ausschließlich bei Patienten mit Leberinsuffizienz vorliegt [54]. Auch in Tierversuchen an Ratten konnte

ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Micafunginspiegel und der Bilirubinkonzentration durch eine experimentell induzierte Leberinsuffizienz gezeigt werden [82]. Dieser Zusammenhang und die in Tierversuchen nachgewiesene Hepatotoxizität von Micafungin demonstriert die Notwendigkeit des TDM von Micafungin bei ITS Patienten. Durch das TDM können zu hohe Spiegel vermieden werden, so dass die Leberfunktion der ITS Patienten nicht beeinträchtigt wird, die oft bedingt durch ihre Multimorbidität gleichzeitig mehrere hepatisch verstoffwechselte Medikamente bekommen.

4.5.3 Dosierung, Dosisanpassungen und therapeutischer Bereich

Das Ziel des TDM ist die Bestimmung der Arzneimittelkonzentration zur frühzeitigen Erfassung von Therapieversagen durch Unter- oder Überdosierung. Im Gegensatz zu den etablierten Antimykotika wie z. B. Flucytosin und Voriconazol ist für Echinocandine noch kein therapeutischer Bereich definiert [45] [83] [84].

Antibiotika erreichen ihren maximalen antibakteriellen Effekt vierfach oberhalb der jeweiligen MHK. Deswegen sollte die Konzentration am Infektionsort vierfach so hoch sein, um eine ausreichende Therapie zu gewährleisten. Die MHK_{90} der Echinocandine liegt für alle *Candida* spp. bei 0,25 µg/ml für Caspofungin, 1 µg/ml für Micafungin und bei 2 µg/ml für Anidulafungin [21] [85]. In weiteren Untersuchungen wird die Breakpoint MHK von 0,25 µg/ml bis 1 µg/ml für alle Echinocandine bei der Testung von *C. albicans*, *C. tropicalis* und *C. krusei* angegeben [86]. Die EUCAST definiert 0,03 mg/l als Breakpoint MHK für Anidulafungin [87] [88]. Analog zu der Berechnung des therapeutischen Bereichs der Antibiotika ergibt sich für die Echinocandine bei Verwendung der vierfachen MHK_{90} ein therapeutischer Bereich von 1 bis 4 µg/ml. Dieser errechnete therapeutische Bereich wurde in dieser vorliegenden Arbeit verwendet, da bisher für die Echinocandine noch kein therapeutischer Bereich definiert wurde.

Der häufigste Grund für eine Dosisanpassung waren Spiegel- und Laborwertveränderungen. Eine ähnlich hohe Anzahl von Dosisanpassungen wurde ausschließlich nach Laborwertveränderungen bei Echinocandinspiegeln, die innerhalb des therapeutischen Bereichs lagen, durchgeführt.

Insgesamt lagen 29 % der Echinocandinspiegel außerhalb des therapeutischen Bereichs. Vergleichende Daten zu Echinocandinen sind bisher noch nicht erhoben wurden. Von allen Messungen, die außerhalb des therapeutischen Bereichs lagen, waren drei Viertel der Spiegel unterhalb und ein Viertel der Spiegel oberhalb des definierten therapeutischen Bereichs. In der untersuchten Patientenkohorte ist das TDM wichtig, um ein Therapieversagen durch zu geringe Spiegel zu verhindern, da der Großteil der Spiegel unterhalb des therapeutischen Bereichs lag. Dies wurde in anderen Studien auch bei dem Azolantimykotikum Voriconazol gezeigt [89]. Ausreichend hohe Spiegel sind auch notwendig, um eine Resistenzbildung zu vermeiden und um eine optimale Versorgung trotz der veränderten Pharmakokinetik bei intensivmedizinischen Patienten zu gewährleisten [90] [91] [92] [93].

Bisher publizierte Studien sehen das TDM von Echinocandinen als nicht notwendig an [46] [94] [95]. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann das TDM trotz der geringen Toxizität von Echinocandinen auf Grund der vielfältigen nicht vorhersehbaren Veränderungen der Pharmakokinetik bei Patienten der Intensivstation als gerechtfertigt angesehen werden. Hohe Dosen von Echinocandinen können, wenn notwendig, gegeben und durch das TDM kontrolliert und gezielt angepasst werden.

4.5.4 Limitation der retrospektiven Auswertung

Die allgemeine Kritik an retrospektiven Analysen bezieht sich auf die oft unvollständigen Daten und auf die Verzerrung der Beziehung von Einfluss und Störgröße (Confounding). Die Qualität der retrospektiven Daten wird durch die Qualität des Ausgangsmaterials bestimmt [96]. Dazu zählen fehlende oder nicht lesbare Akteneinträge und fehlende Patientenakten.

Eine Limitation vieler klinischer Studien bezüglich der Untersuchung des Einflusses von Echinocandinspiegel auf Laborwertveränderungen ist die geringe Patientenzahl von weniger als 50 Patienten [51] [97] [57]. Weiterhin ist das Ausgangsmaterial bei der Datenerhebung zu beachten. Es handelt sich bei den untersuchten Patienten um keine repräsentative Zufallsstichprobe, da einige Patientendaten durch nicht vorhandene elektronische Akten auf peripheren Stationen oder durch die Behandlung auf anderen Intensivstationen nicht in die Stichprobe aufgenommen werden konnten. Für eine genauere Auswertung zur Detektion von UAW oder Laborwertveränderungen unter der Therapie fehlt eine Kontrollgruppe, die im selben Zeitraum kein Echinocandin bekommen hat.

Zusätzlich gibt es nur eine geringe Anzahl an Studien über den Zusammenhang von Laborwerten und Echinocandinspiegeln, die dann häufig noch von Pharmafirmen finanziell unterstützt werden und teilweise keine unabhängigen Aussagen ermöglichen. Eine weitere Schwierigkeit bei der Auswertung sind die unregelmäßigen Laborwertbestimmungen. So wurde z.B. Albumin im Verlauf sehr selten bestimmt, so dass nur wenige Laborwerte in dieser Kategorie berücksichtigt werden konnten. Die Aussagen sind deswegen nicht auf alle Patienten übertragbar und Schlussfolgerungen sind somit nur für Patienten der internistischen ITS des Universitätsklinikums Magdeburg möglich. Zusätzlich konnten nicht alle Echinocandine in der Auswertung berücksichtigt werden, da die Stichprobengröße der Anidulafungin-Gruppe mit vier Patienten zu gering war, um ausgewertet zu werden.

4.6 Ausblick

Fungämien und invasive Mykosen bedeuten eine beträchtliche finanzielle Belastung für das Gesundheitssystem [98]. Die meisten Kosten einer Candiämie sind assoziiert mit dem verlängerten Krankenhausaufenthalt von durchschnittlich 5,6 Tagen, verglichen mit Patienten ohne Candiämie [99]

[18]. Weiterhin gehen invasive Mykosen im Vergleich zu bakteriellen Infektionen mit einer erhöhten Mortalität von 49% einher [15]. Es ist daher das Ziel, die Behandlung der Patienten mit Fungämien durch eine frühe und effektive Therapie zu verbessern, um so Komplikationen und die damit verbundene verlängerte Liegedauer zu verhindern. Auf der ITS ist dafür eine ausreichend hochdosierte Therapie notwendig [49]. Durch das TDM kann gezielt die Medikamentenkonzentration bestimmt werden und die Dosis kann individuell angepasst werden, um so die Patientensicherheit auch bei hohen Medikamentendosierungen zu gewährleisten und die Therapie zu verbessern [100].

Ein weiterer Aspekt zur Verbesserung der Qualität des TDM ist die ständige, aktive Kommunikation zwischen klinischen Pharmakologen und behandelnden Ärzten [101]. Das Ziel sollte es daher sein, Ärzte hinsichtlich der Anwendung von TDM fortzubilden, um so die Patientensicherheit zu verbessern. Ob durch das TDM von Echinocandinen langfristig die Liegedauer verkürzt und so die Gesundheitskosten gesenkt werden können, müssen weitere Studien zeigen.

Die Pharmakokinetik unterliegt vor allem bei Patienten auf der ITS starken interindividuellen Schwankungen, die unter anderem durch ein verändertes Verteilungsvolumen, durch Insuffizienz der eliminierenden Organe und durch Medikamenteninteraktionen entstehen. Um die Pharmakokinetik von ITS Patienten besser verstehen zu können und um die medikamentöse Therapie zu optimieren, sind große prospektive Multizenterstudien wie z.B. die DALI-Studie notwendig. Das Ziel der Studie mit 500 Patienten von 70 verschiedenen Intensivstationen ist die Bestimmung von Plasmakonzentrationen diverser Antibiotika und Antimykotika bei kritisch kranken Patienten. Diese Konzentrationen sollen dann mit dem Therapieerfolg verglichen werden. Daraus soll eine Populationspharmakokinetik ermittelt werden, um in Zukunft Risikogruppen für zu hohe oder zu niedrige Spiegel im Vorfeld besser ermitteln zu können [102].

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines chromatografischen Analyseverfahrens zur Bestimmung der Echinocandine Micafungin und Anidulafungin und eine retrospektiven Analyse der von Laborwerten der Echinocandinspiegel von Micafungin und Caspofungin im Rahmen des TDM.

Die Echinocandine Anidulafungin und Micafungin konnten auf Grund ihrer ähnlichen Molekularstruktur als gegenseitiger interner Standard verwendet werden. Die chromatografische Auftrennung der Echinocandine erfolgte auf einem RP-HPLC-System mit einem Acetonitril/Wasser-Gemisch als mobile Phase. Durch die Verwendung der Gradientenelution konnte die Auftrennung verbessert werden.

Mit der UV-Detektion konnten Anidulafungin und Micafungin durch die Verwendung von langen Wellenlängen mit 273 nm und 306 nm ungestört detektiert werden. Die Verwendung der Massenspektrometrie konnte die Selektivität nicht verbessern. Eine Ursache dafür liegt einerseits an dem großen Molekulargewicht der Echinocandine, wodurch sich die Intensität auf einfach und doppelt geladene Quasimolekülonen verteilt. Eine weitere Ursache ist die natürliche Isotopenverteilung durch die es, bedingt durch die hohe Anzahl von Kohlenstoffatomen der Echinocandine, zu spezifischen Intensitätsmustern innerhalb der Quasimolekülonen kommt. Die daraus resultierende nichtlineare Kalibrierfunktion ermöglichte keine valide Quantifizierung mit dem Massenspektrometer.

Es konnten zusätzliche Peaks in der Nähe der Retentionszeit des Micafungin- und Anidulafunginpeaks sowohl in der Massenspektrometrie als auch in der UV-Spektrometrie detektiert werden. Da die Intensität der Peaks mit zunehmender Aufenthaltsdauer der Probe bei Raumtemperatur zunahm, ist am ehesten von einem hydrolytischen Zerfallsprodukt durch spontane Degradation auszugehen.

Das entwickelte Verfahren ist matrixunabhängig und kann sowohl in Serum- als auch in Plasmaproben auf jedem Standard HPLC-System angewendet werden. Die Validierung der Messmethode mit dem UV-Detektor erfolgte im Kalibrierbereich von 0,1 bis 20 µg/ml und zeigte eine Präzision und Richtigkeit in einer Serie (für 0,1 µg/ml Micafungin: 1,80 % und 2,65 % und für 0,1 µg/ml Anidulafungin: 4,30 % und 10,44 %) und von Tag zu Tag (für 0,1 µg/ml Micafungin: 9,27 % und 8,09 % und für 0,1 µg/ml Anidulafungin: 8,36 % und 12,57%) innerhalb der von der Bundesärztekammer geforderten Richtlinien. Innerhalb der retrospektiven Analyse wurden die Daten von 45 Patienten, die im Zeitraum vom 14. Dezember 2010 bis zum 14. November 2011 mit einem der Echinocandine, Micafungin oder Caspofungin, auf der internistischen ITS des Universitätsklinikums Magdeburg behandelt wurden, analysiert. Es wurden insgesamt 108 Echinocandinspiegel bestimmt. Von diesen Echinocandinkonzentrationen lagen 29 % außerhalb des therapeutischen Bereichs von 1 bis 4 µg/ml. Von allen Messungen, die außerhalb des therapeutischen Bereichs waren, lagen insgesamt 77 % unterhalb des therapeutischen Bereichs. Daher ist in der untersuchten Patientenkohorte das TDM

wichtig, um ein Therapieversagen durch zu geringe Spiegel zu verhindern und so das Risiko einer Resistenzbildung zu vermeiden.

In der Korrelationsanalyse nach Spearman konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Caspofunginspiegel und dem Kreatininwert ($r_s = 0,516$; $p = 0,004$) sowie dem Micafunginspiegel und dem Bilirubinwert ($r_s = 0,321$; $p = 0,004$) gezeigt werden. Diese Ergebnisse entsprechen den Resultaten mehrerer Studien und sind auch als unerwünschte Arzneimittelwirkung bei den jeweiligen Echinocandinen beschrieben.

Bei Patienten der Intensivstation unterliegt die Pharmakokinetik starken interindividuellen Schwankungen, die durch ein verändertes Verteilungsvolumen oder Insuffizienzen der eliminierenden Organe entstehen. Aus diesem Grund kommt es oft zu nicht vorhersehbaren Wirkspiegeln. Trotz der geringen Toxizität von Echinocandinen ist deswegen vor allem bei hohen Dosierungen das TDM der Echinocandine und die regelmäßige Laborwertkontrolle der Leber- und Nierenfunktion sinnvoll.

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten chromatografischen Messverfahren ist das TDM von Echinocandinen einfach und valide in der täglichen Laborroutine möglich. Die Plasmaspiegel können individuell überwacht werden, um so eine optimale, sichere und individualisierte Therapie der invasiven Candidiasis bei intensivmedizinischen Patienten zu ermöglichen.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* 2003;3:685–702.
- [2] Pfaller M, Diekema D. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:133–63.
- [3] Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:499–511.
- [4] Baddley JW, Stroud TP, Salzman D, Pappas PG. Invasive mold infections in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2001;32:1319–24.
- [5] Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. Invasive fungal pathogens: Current epidemiological trends. *Clin Infect Dis* 2006;43:3–14.
- [6] Koch S, Höhne FM, Tietz HJ. Incidence of systemic mycoses in autopsy material. *Mycoses* 2004;47:40–6.
- [7] Schwesinger G, Junghans D, Schröder G, Bernhardt H, Knoke M. Candidosis and aspergillosis as autopsy findings from 1994 to 2003. *Mycoses* 2005;48:176–80.
- [8] Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004;39:309–17.
- [9] Petri M, König J, Moecke H, Gramm H, Barkow H, Kujath P, et al. Epidemiology of invasive mycosis in ICU patients: A prospective multicenter study in 435 non-neutropenic patients. *Intensive Care Med* 1997;23:317–25.
- [10] León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Galván B, Blanco A, Castro C, et al. Usefulness of the “Candida score” for discriminating between candida colonization and invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill patients: A prospective multicenter study. *Crit Care Med* 2009;37:1624–33.
- [11] Denning D. Epidemiology and pathogenesis of systemic fungal infections in the immunocompromised host. *J Antimicrob Chemother* 1991;28:1–16.
- [12] Ostrosky-Zeichner L, Pappas PG. Invasive candidiasis in the intensive care unit. *Crit Care Med* 2006;34:857–63.
- [13] Zhu W, Filler S. Interactions of candida albicans with epithelial cells. *Cell Microbiol* 2010;12:273–82.
- [14] Schaller M, Borelli C, Kortling HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of candida albicans. *Mycoses* 2005;48:365–77.

- [15] Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* 2003;37:1172–7.
- [16] Blot S, Vandewoude K, Hoste E, Colardyn F. Effects of nosocomial candidemia on outcomes of critically ill patients. *Am J Med* 2002;113:480–5.
- [17] Schmid A, Burchardi H, Clouth J, Schneider H. Burden of illness imposed by severe sepsis in Germany. *Eur J Heal Econ* 2002;3:77–82.
- [18] Rentz AM, Halpern MT, Bowden R. The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. *Clin Infect Dis* 1998;27:781–8.
- [19] Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303–10.
- [20] Wagner C, Graninger W, Presterl E, Joukhadar C. The echinocandins: Comparison of their pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical applications. *Pharmacology* 2006;78:161–77.
- [21] Pfaller M, Diekema DJ, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Alexander BD, Andes D, et al. Correlation of MIC with outcome for candida species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: Analysis and proposal for interpretive MIC breakpoints. *J Clin Microbiol* 2008;46:2620–9.
- [22] Mukherjee P, Sheehan D. Echinocandins: Are they all the same? *J Chemother* 2011;23:319–25.
- [23] Groll AH, Buchheidt D, Cornely O, Glöckner A, Heinz W, Höhl R, et al. Diagnose und Therapie von Candida-Infektionen. *Chemother J* 2011;20:67–93.
- [24] Reinhart K, Brunkhorst F, Bone H-G, Bardutzky J, Dempfle C-E, Forst H, et al. Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis: 1. Revision der S2k-Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft eV (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI). *Sepsis* 2010:1–68.
- [25] Fachinformation für Arzneimittel-Candidas (Caspofungin). MSD 2011:September.
- [26] Fachinformation für Arzneimittel-Mycamine (Micafungin). Astellas Pharma 2011:August.
- [27] Sirohi B, Powles RL, Chopra R, Russell N, Byrne JL, Prentice HG, et al. A study to determine the safety profile and maximum tolerated dose of micafungin (FK463) in patients undergoing haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2006;38:47–51.
- [28] Perlin D. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat* 2007;10:121–30.
- [29] Estes KE, Penzak SR, Calis KA, Walsh TJ. Pharmacology and antifungal properties of anidulafungin, a new echinocandin. *Pharmacotherapy* 2009;29:17–30.
- [30] Tabata K, Katashima M, Kawamura A, Tanigawara Y, Sunagawa K. Linear pharmacokinetics of micafungin and its active metabolites in Japanese pediatric patients with fungal infections. *Biol Pharm Bull* 2006;29:1706–11.

- [31] Stone JA, Holland SD, Wickersham PJ, Sterrett A, Schwartz M, Bonfiglio C, et al. Single- and multipledose pharmacokinetics of Caspofungin in healthy men. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:739–45.
- [32] Glöckner A. Treatment and prophylaxis of invasive candidiasis with anidulafungin, caspofungin and micafungin-Review of the Literature. *Eur J Med Res* 2011;16:167–79.
- [33] Sucher AJ, Chahine EB, Balcer HE. Echinocandins: The newest class of antifungals. *Ann Pharmacother* 2009;43:1647–57.
- [34] Fachinformation für Arzneimittel-Ecalta (Anidulafungin). Pfizer 2011:Juli.
- [35] Colburn DE, Giles FJ, Oladovich D SJ. In vitro evaluation of Cytochrome P450-mediated drug interactions between cytarabine, idarubicin, itraconazole and caspofungin. *Hematology* 2004;9:217–21.
- [36] Niwa T, Shiraga T, Takagi A. Effect of antifungal drugs on cytochrome P450 (CYP) 2C9, CYP2C19, and CYP3A4 activities in human liver microsomes. *Biol Pharm Bull* 2005;28:1805–8.
- [37] Mikkaichi T, Suzuki T, Tanemoto M, Ito S AT. The Organic Anion Transporter (OATP) family 2004;19:171–9.
- [38] Sandhu P, Lee W, Xu X, Leake BF, Yamazaki M, Stone JA, et al. Hepatic uptake of the novel echinocandin caspofungin. *Drug Metab Dispos* 2005;33:676–82.
- [39] Stone J, Migoya E. Potential for interactions between caspofungin and nelfinavir or rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4306–14.
- [40] Dowell J, Stogniew M, Krause D, Henkel T, Weston IE. Assessment of the safety and pharmacokinetics of anidulafungin when administered with cyclosporine. *J Clin Pharmacol* 2005;45:227–33.
- [41] Fachinformation für Arzneimittel-Fluconazol (Diflucan). Pfizer 2012:Juli.
- [42] Bates DW, Su L, Yu DT, Chertow GM, Seger DL, Gomes DR, et al. Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin B therapy. *Clin Infect Dis* 2001;32:686–93.
- [43] Villanueva A, Arathoon EG, Gotuzzo E, Berman RS, Dinubile MJ, Sable CA. A randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin for the treatment of candidal esophagitis. *Clin Infect Dis* 2001;33:1529–35.
- [44] Kang JS, Lee MH. Overview of therapeutic drug monitoring. *Korean J Intern Med* 2009;24:1–10.
- [45] Pasqualotto AC, Howard SJ, Moore CB, Denning DW. Flucytosine therapeutic monitoring: 15 years experience from the UK. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:791–3.
- [46] Andes D, Pascual A, Marchetti O. Antifungal therapeutic drug monitoring: Reestablished and emerging indications. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:24–34.
- [47] Power BM, Forbes AM, van Heerden PV IK. Pharmacokinetics of drugs used in critically ill adults. *Clin Pharmacokinet* 1998;34:25–56.

- [48] Paepe P De, Belpaire FM, Buylaert WA. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations when treating patients with sepsis and septic shock. *Clin Pharmacokinet* 2002;41:1135–51.
- [49] Pletz MW, Bloos F, Burkhardt O, Brunkhorst FM, Bode-Böger SM, Martens-Lobenhoffer J, et al. Pharmacokinetics of moxifloxacin in patients with severe sepsis or septic shock. *Intensive Care Med* 2010;36:979–83.
- [50] Schwartz M, Kline W, Matuszewski B. Determination of a cyclic hexapeptide (L-743 872), a novel pneumocandin antifungal agent in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Instrumentation* 1997;352:299–307.
- [51] Muraki Y, Iwamoto T, Kagawa Y, Sakurai H, Usui M, Isaji S, et al. The impact of total bilirubin on plasma micafungin levels in living-donor liver transplantation recipients with severe liver dysfunction. *Biol Pharm Bull* 2009;32:750–4.
- [52] Dowell J, Stogniew M, Krause D, Damle B. Anidulafungin does not require dosage adjustment in subjects with varying degrees of hepatic or renal impairment. *J Clin Pharmacol* 2007;47:461–70.
- [53] Zornes LL, Stratford RE. Development of a plasma high-performance liquid chromatographic assay for LY303366, a lipopeptide antifungal agent, and its application in a dog pharmacokinetic study. *J Chromatogr B* 1997;695:381–7.
- [54] Shimoeda S, Ohta S, Kobayashi H, Saitou H, Kubota A, Yamato S, et al. Analysis of the blood level of micafungin involving patients with hematological diseases: New findings regarding combination therapy with tacrolimus. *Biol Pharm Bull* 2005;28:477–80.
- [55] Heresi GP, Gerstmann DR, Reed MD, van den Anker JN, Blumer JL, Kovanda L, et al. The pharmacokinetics and safety of micafungin, a novel echinocandin, in premature infants. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:1110–5.
- [56] Dowell J, Schranz J, Baruch A, Foster G. Safety and pharmacokinetics of coadministered voriconazole and anidulafungin. *J Clin Pharmacol* 2005;45:1373–82.
- [57] Hebert MF, Smith HE, Marbury TC, Swan SK, Smith WB, Townsend RW, et al. Pharmacokinetics of micafungin in healthy volunteers, volunteers with moderate liver disease, and volunteers with renal dysfunction. *J Clin Pharmacol* 2005;45:1145–52.
- [58] Gumbo T, Hiemenz J, Ma L, Keirns JJ, Buell DN, Drusano GL. Population pharmacokinetics of micafungin in adult patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;60:329–31.
- [59] Nguyen TH, Hoppe-Tichy T, Geiss HK, Rastall a C, Swoboda S, Schmidt J, et al. Factors influencing caspofungin plasma concentrations in patients of a surgical intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:100–6.
- [60] Stone E, Fung H, Kirschenbaum H. Caspofungin: An echinocandin antifungal agent. *Clin Ther* 2002;24:351–377; discussion 329.
- [61] Mistry GC, Migoya E, Deutsch PJ, Winchell G, Hesney M, Li S, et al. Single- and multiple-dose administration of caspofungin in patients with hepatic insufficiency: Implications for safety and dosing recommendations. *J Clin Pharmacol* 2007;47:951–61.

- [62] Spriet I, Meersseman W, Annaert P, de Hoon J, Willems L. Pharmacokinetics of caspofungin in a critically ill patient with liver cirrhosis. *Eur J Clin Pharmacol* 2011;67:753–5.
- [63] Böcker J. Chromatographie-Instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese. Würzburg: Vogel Buchverlag; 1997.
- [64] User protocol for evaluation of qualitative test performance: Approved guideline. Clin Lab Stand Inst 2008.
- [65] Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. US Dep Heal Hum Serv Adm Food Drug Serv (CDER), Cent Drug Eval Res Cent Vet Med 2001.
- [66] Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Bundesärztekammer 2011;108.
- [67] Kromidas S. Validierung in der Analytik. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 1999.
- [68] WHO (World Health Organisation). <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi> 2012.
- [69] Egle H, Trittler R, Kümmerer K. An advanced double column-switching technique (LC-LC) for liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry for fully automated analysis of caspofungin. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004;18:2871–7.
- [70] Farowski F, Cornely O, Vehreschild JJ, Hartmann P, Bauer T, Steinbach A, et al. Quantitation of azoles and echinocandins in compartments of peripheral blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:1815–9.
- [71] Decosterd LA, Rochat B, Pesse B, Mercier T, Tissot F, Widmer N, et al. Multiplex ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification in human plasma of fluconazole, itraconazole, hydroxyitraconazole, posaconazole, voriconazole, voriconazole-N-oxide and anidulafungin. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:5303–15.
- [72] Rochat B, Bolay S, Pascual A, Calandra T, Marchetti O. Liquid chromatograph-mass spectrometry method for quantification of caspofungin in clinical plasma samples. *Mass Spectrom* 2007;42:440–9.
- [73] Balani SK. Metabolites of caspofungin acetate, a potent antifungal agent, in human plasma and urine. *Pharmacology* 2000;28:1274–8.
- [74] Hiemenz J, Cagnoni P, Simpson D, Devine S, Chao N, Keirns J, et al. Pharmacokinetic and maximum tolerated dose study of micafungin in combination with fluconazole versus fluconazole alone for prophylaxis of fungal infections in adult patients undergoing a bone marrow or peripheral stem cell transplant. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1331–6.
- [75] Von Winckelmann SL, Spriet I WL. Therapeutic drug monitoring of phenytoin in critically ill patients. *Pharmacotherapy* 2008;28:1391–400.
- [76] Joynt GM, Lipman J, Gomersall CD, Young RJ, Wong EL, Gin T. The pharmacokinetics of once-daily dosing of ceftriaxone in critically ill patients. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:421–9.

- [77] Van der Elst KC, Brüggemann RJ, Rodgers MG AJ. Plasma concentrations of caspofungin at two different dosage regimens in a patient with hepatic dysfunction. *Transpl Infect Dis* 2012;14:440–3.
- [78] Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, Colombo AL, Thompson-Moya L, Smietana J, et al. Comparison of Caspofungin and Amphotericin B for invasive Candidiasis. *N Engl J Med* 2002;347:2020–9.
- [79] Würthwein G, Cornely OA, Trame MN, Vehreschild JJ, Vehreschild MJ, Farowski F, Müller C, Boos J, Hempel G, Hallek M, Groll AH. Würthwein G, Cornely OA, Trame MN, Vehreschild JJ, Vehreschild MJ, Farowski F, Müller C, Boos J, Hempel G, Hallek M GA. Population pharmacokinetics of escalating doses of caspofungin in a phase II study of patients with invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:1664–16671.
- [80] Glasmacher A, Cornely O, Orlopp K, Reuter S, Blaschke S, Eichel M, et al. Caspofungin treatment in severely ill, immunocompromised patients: a case-documentation study of 118 patients. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:127–34.
- [81] Nakagawa Y, Ichii Y, Saeki Y, Kodaka M, Suzuki K, Kishino S. Plasma concentration of micafungin in patients with hematologic malignancies. *J Infect Chemother* 2007;13:39–45.
- [82] Konishi H, Fukushima K, Sudo M, Sumi M, Minouchi T, Iga I, Shibata N, Takada K YA. Reduced elimination clearance of micafungin in rats with cholestatic hyperbilirubinemia. *Fundam Clinical Pharmacol* 2010;24:457–62.
- [83] Pascual A, Calandra T, Bolay S, Buclin T, Bille J, Marchetti O. Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin Infect Dis* 2008;46:201–11.
- [84] Begg EJ, Barclay ML, Kirkpatrick CM. The therapeutic monitoring of antimicrobial agents. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52 Suppl 1:35S–43S.
- [85] Alburquenque C, Silva V, Fuentes M, Taipa C, Silva V. In vitro anidulafungin susceptibility of 100 of candida strains obtained previously to the introduction of this echinocandin in Chile. *Rev Chil Infect* 2011;28:399–403.
- [86] Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D, Arendrup MC, Brown SD, Lockhart SR, et al. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist Updat* 2011;14:164–76.
- [87] Arendrup MC, Rodriguez-Tudela J-L, Lass-Flörl C, Cuenca-Estrella M, Donnelly JP, Hope W. EUCAST technical note on anidulafungin. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:E18–20.
- [88] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Antifungal Agents- Breakpoint tables for interpretation of MICs. Version 41 2012:2–6.
- [89] Trifilio S, Pennick G, Pi J, Zook J, Golf M, Kaniecki K, et al. Monitoring plasma voriconazole levels may be necessary to avoid subtherapeutic levels in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Cancer* 2007;109:1532–5.

- [90] Pfaller MA, Castanheira M, Lockhart SR, Ahlquist AM, Messer SA, Jones RN. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol* 2012;50:1199–203.
- [91] Thompson GR, Wiederhold NP, Vallor AC, Villareal NC, Lewis JS, Patterson TF. Development of caspofungin resistance following prolonged therapy for invasive candidiasis secondary to *Candida glabrata* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:3783–5.
- [92] Pea F, Viale P, Furlanut M. Antimicrobial therapy in critically ill patients: A review of pathophysiological conditions responsible for altered disposition and pharmacokinetic variability. *Clin Pharmacokinet* 2005;44:1009–34.
- [93] Pereira JM, Paiva JA. Antifungal Therapy in The ICU: The Bug, the Drug, and the Mug. *Annu Updat Intensive Care Emerg Med* 2011 2011;1:516–30.
- [94] Smith J, Andes D. Therapeutic drug monitoring of antifungals: Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Ther Drug Monit* 2008;30:167–72.
- [95] Lewis RE. Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clin Proc* 2011;86:805–17.
- [96] Hedderich J, Sachs L. *Angewandte Statistik: Methodensammlung mit R*. 14. Auflag. Springer Verlag Berlin Heidelberg; 2012.
- [97] Nakagawa Y, Ichii Y, Saeki Y, Kodama M, Kishino S, Suzuki K. Effect of liver and kidney function on migafungin disposition in patients with hematologic malignancies. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2008;33:191–8.
- [98] Zaoutis TE, Argon J, Chu J, Berlin JA, Walsh TJ, Feudtner C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: A propensity analysis. *Clin Infect Dis* 2005;41:1232–9.
- [99] Hassan I, Powell G, Sidhu M, Hart WM, Denning DW. Excess mortality, length of stay and cost attributable to candidaemia. *J Infect* 2009;59:360–5.
- [100] Touw DJ, Neef C, Thomson AH, Vinks AA. Cost-effectiveness of therapeutic drug monitoring: An update. *Eur J Hosp Pharm* 2007;13:83–91.
- [101] Schiff G, Klass D. Linking laboratory and pharmacy: Opportunities for reducing errors and improving care. *Arch Intern Med* 2003;163:893–900.
- [102] Roberts J, De Waele J, Dimopoulos G, Koulenti D, Martin C, Montravers P, et al. DALI: Defining antibiotic levels in intensive care unit patients: A multi-centre point of prevalence study to determine whether contemporary antibiotic dosing for critically ill patients is therapeutic. *BMC Infect Dis* 2012;12.

7. Anhang

7.1 Eigenschaften der Echinocandine

Tabelle 7.1: Eigenschaften von Anidulafungin

Anidulafungin	Eigenschaft
Handelsname:	ECALTA [®]
Hersteller:	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin
Zulassung in Deutschland:	2009
CAS (Chemical Abstracts Service) - Registriernummer:	166663-25-8
Molekulargewicht:	1140,2369 g/mol
Summenformel:	C ₅₈ H ₇₃ N ₇ O ₁₇

Tabelle 7.2: Eigenschaften von Caspofungin

Caspofungin	Eigenschaft
Handelsname:	CANCIDAS [®]
Hersteller:	MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar
Zulassung Deutschland:	2001
CAS (Chemical Abstracts Service) – Registriernummer:	179463-17-3
Molekulargewicht:	1093,3131 g/mol
Summenformel:	C ₅₂ H ₈₈ N ₁₀ O ₁₅

Tabelle 7.3: Eigenschaften von Micafungin

Micafungin	Eigenschaft
Handelsname:	Mycamine [®]
Hersteller:	Astellas Pharma GmbH, München
Zulassung in Deutschland:	2008
CAS (Chemical Abstracts Service) – Registriernummer:	235114-32-6
Molekulargewicht:	1270,274 g/mol
Summenformel:	C ₅₆ H ₇₁ N ₉ O ₂₃ S

Die Informationen zu den Summenformeln stammen von www.drugbank.ca, sowie von www.eudrapharm.eu (Version: Build 02.01.14_PR build 2011/12/07 10:50:01).

7.2 Laborgeräte

Tabelle 7.4: Laborgeräte für die HPLC und Detektion

Laborgerät	Hersteller
Analytische Pumpe	HPLC Agilent 1100 System, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen
Binäre Pumpe (1312A)	
Quaternäre Pumpe (1311A)	
Massenspektrometer	Finnigan TSQ Quantum Discovery Max Triple Quadrupole (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)
Elektro-Spray Ionisation (ESI)-Quelle	Finnigan TSQ Quantum Discovery Max Triple Quadrupole (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)
Dioden-Array Detektor (DAD) (G1315B) mit Semimikromesszelle	HPLC Agilent 1100 System, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen
Fluoreszenz-Detektor (G1321A)	HPLC Agilent 1100 System, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen
Autosampler (G1213A)	HPLC Agilent 1100 System, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen
Vakuumtgasler (G1379A)	HPLC Agilent 1100 System, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen

Tabelle 7.5: Zusätzliche Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller
Analysewaage	Sartorius research, Sartorius AG, Göttingen
pH-Meter	Microprozessor pH – Meter pH 537, Windaus, Clausthal-Zellerfeld
Reinstwassersystem	Milli-Q reference, Merck Millipore, MA, USA
Standzentrifuge	Universal 32, Hettich Zentrifugen, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Standzentrifuge	Biofuge pico Heraeus, DJB Labcare Ltd, Buckinghamshire, England,
Kreisschüttler	Reax 200, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Vakuumzentrifuge	UniEquip Univapo 150 ECH, Progen Scientific, London, England

7.3 Material

7.3.1 Chromatografische Säulen

Tabelle 7.6: Vorsäulen, Vorsäulenfilter und Analytische Säulen

Name	Hersteller
SecurityGuard C18 mit Vorsäulenfilter 4 x 2 mm	Phenomenex, Aschaffenburg
Zorbax Eclipse XDB-C18 2.1 mm x 150 mm 3,5 µm	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen
Zorbax Eclipse SB-C18 2.1 mm x 150 mm 5 µm	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen

7.3.2 Verbrauchsmaterial, Chemikalien und Referenzsubstanzen

Tabelle 7.7: Verbrauchsmaterial

Art/Name	Hersteller
Autosamplergläschen	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen,
Eppendorfgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Kryoröhrchen	Roth, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
Serumröhrchen (Vacutainer mit/ohne Gerinnungsaktivator)	BD, Heidelberg
SPE Diol Extraktionsröhrchen	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
OASIS HBL mixed mode cartridges	Waters, Eschborn

Tabelle 7.8: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acetonitril (Gradient Grade)	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniak (NH ₃)lösung (25 %; pro analysi)	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol (Gradient Grade)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat-3-hydrat (pro analysi)	Merck KGaA, Darmstadt
Trifluoressigsäure (TFA; 0,1 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Wasser ≙ Reinstwasser	Eigene Herstellung mit Reinstwasseranlage

Tabelle 7.9: Referenzsubstanzen

Referenzsubstanzen	Hersteller
Anidulafungin: (ECALTA®; Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung, enthält 100 mg Anidulafungin)	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin
Caspofungin (CANCIDAS®, Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung, enthält 50 mg Caspofungin)	MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar
Micafungin (MYCAMINE®, Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung, enthält 50 mg Micafungin)	Astellas Pharma GmbH, München
Citratplasma- und serum	Blutbank des Universitätsklinikums Magdeburg

7.3.3 Computersoftware

Tabelle 7.10: Computersoftware

Programmname	Verwendungszweck	Hersteller
Adobe Reader 9.5.0	Wiedergabe von PDF-(Portable Document Format) Dateien	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
Agilent ChemStation LC 3D (Revision A 09.03)	HPLC Gerätesteuerung und Chromatogramauswertung	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
ChemCalc	Berechnung der Isotopenverteilung	Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Institute of Chemical Sciences and Engineering (ISIC), Lausanne, Schweiz
IMESO	Elektronische Patientenakte	IMESO-Innovative Medizinische Software GmbH, Gießen, Deutschland
Inkscape	Erstellen von Grafiken und Fließdiagrammen; Bildbearbeitung	Opensource
Mendeley	Erstellen und Verwalten von Literaturverzeichnissen	Opensource
Microsoft Office Access	Datenbankverwaltung der eingegangenen Proben; Labor-EDV	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft Office Excel 2007	Diagramm- und Tabellenerstellung; deskriptive statistische Auswertung	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft Office Word 2007	Tabellen- und Textverarbeitung	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
SPSS (Version 20)	Statistische Auswertung	SPSS Inc., Chicago, IL, USA

7.3.4 Definitionen in der Validierung

Um die Validität des Verfahrens zu zeigen wurden die folgenden Parameter erfasst:

Linearität: Die Linearität beschreibt ein direkt proportionales Verhältnis zwischen der Konzentration der gemessenen Substanz und der Fläche des Peaks der Referenzsubstanz für verschiedene Konzentrationen. Je näher der Betrag des Korrelationskoeffizienten r an 1 liegt desto größer ist der lineare Zusammenhang (Kalibrierproben und Kalibrierfunktion s. Kapitel 3.3).

Richtigkeit: Die Richtigkeit ist ein Maß für das Verhältnis des gemessenen Werts zum wahren Wert. Die Einheit ist die Abweichung vom wahren Wert in Prozent.

Präzision: Die Präzision beschreibt, wie gut die Ergebnisse mehrerer Analysen untereinander übereinstimmen. Sie dient dem Nachweis der Qualität eines Messverfahrens und ist ein Bestandteil der Reproduzierbarkeit. Die Präzision wird angegeben als prozentualer Wert der relativen Standardabweichung.

Nachweisgrenze (LOD - limit of detection): Die Nachweisgrenze ist die geringste messbare Konzentration innerhalb eines Nachweisverfahrens, die vom Leerwert unterschieden werden kann.

Bestimmungsgrenze (Quantifizierungsgrenze; LOQ – limit of quantification):

Die Bestimmungsgrenze ist die Grenze, bei der ein Analysewert mit einer angegebenen Präzision ermittelt werden kann und ist definiert durch die unterste Grenze der Kalibrierfunktion

Selektivität: Die Selektivität sagt aus, dass der Nachweis des Analyten trotz verschiedener Störsubstanzen eindeutig zu erkennen und zu quantifizieren ist [67].

7.3.5 Laborwerte und Referenzbereiche

Tabelle 7.11: Laborwerte und Referenzbereiche

Laborwert	Referenzbereich
Protein [g/l]	66-87
Albumin [g/l]	35-52
Kreatinin [$\mu\text{mol/l}$]	59-104
Glukose [mmol/l]	3,1-6,4
Bilirubin [$\mu\text{mol/l}$]	<17
Cholinesterase [$\mu\text{mol/s.l}$]	88-215
ALAT [$\mu\text{mol/s.l}$]	0,17-0,85
ASAT [$\mu\text{mol/s.l}$]	0,17-0,85
CK [$\mu\text{mol/s.l}$]	<2,9
alk. Phosph. [$\mu\text{mol/s.l}$]	0,67-2,15
GGT [$\mu\text{mol/s.l}$]	0,17-1,19
LDH [$\mu\text{mol/s.l}$]	2,25-3,75
CRP [mg/l]	<5

7.4 Detektionsverfahren

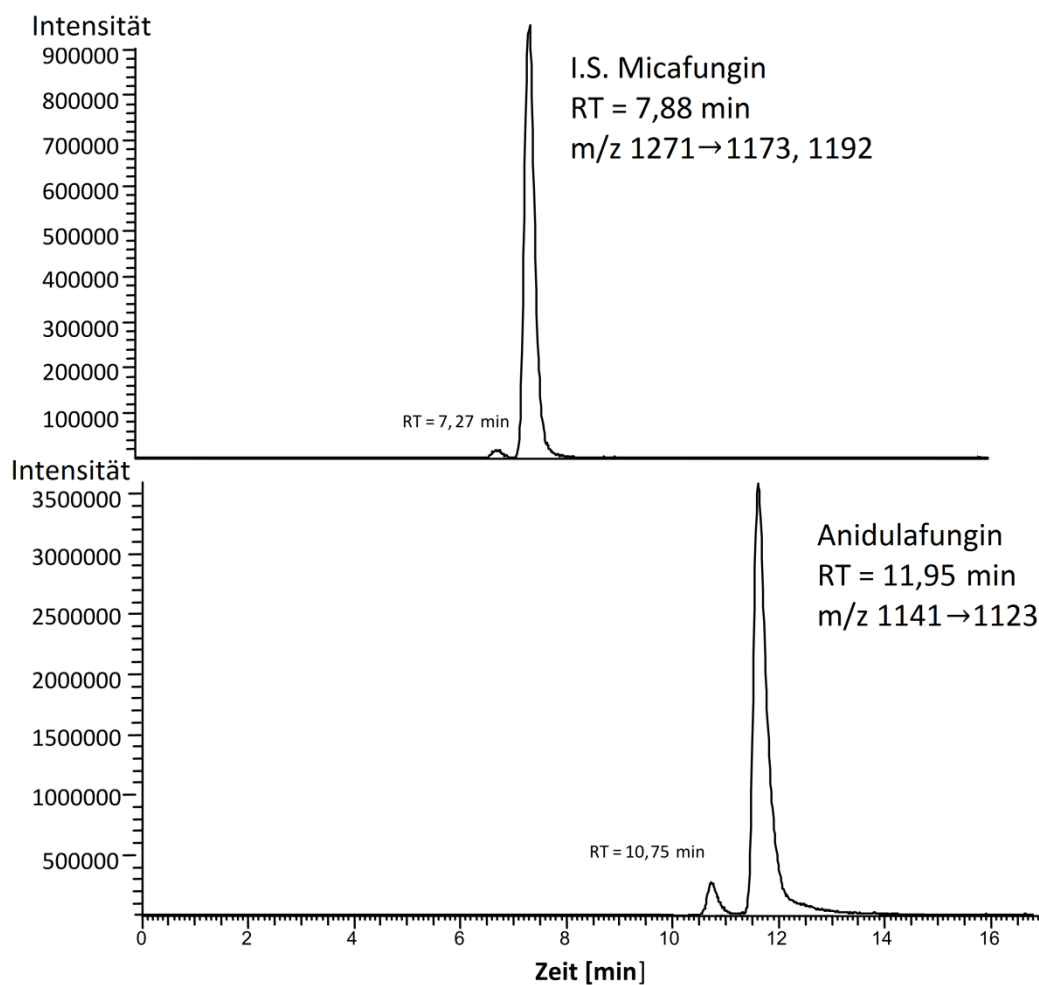


Abbildung 7.1: Massenspektrometer: Detektion von Anidulafungin, RT = 11,95 min, m/z 1141 → 1123 mit I.S. Micafungin (c = 20 µg/ml), zusätzliche Peaks bei RT = 7,27 min und 10,75 min

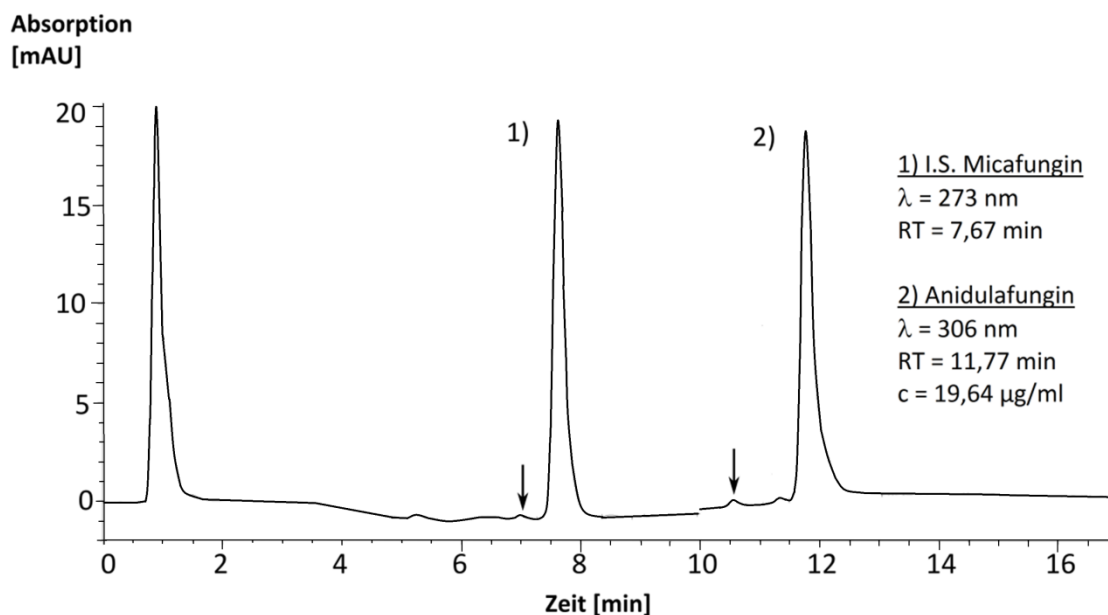


Abbildung 7.2: UV-Spektrometer: Detektion von Anidulafungin ($\lambda = 306 \text{ nm}$, $RT = 11,77 \text{ min}$, Konzentration = $19,64 \mu\text{g/ml}$) mit I.S. Micafungin ($\lambda = 273 \text{ nm}$, $c = 20 \mu\text{g/ml}$); \downarrow = zusätzliche Peaks

7.5 Isotopenverteilung von Micafungin und Anidulafungin

Tabelle 7.12: Prozentuale Anteile der Isotope der einfach geladenen Quasimolekülonen von Micafungin (nach www.chemcalc.org)

Micafungin [m/z]	Anteil [%]	Isotop
1270	100	$[\text{M}+\text{H}]^+$
1271	63,44	$[\text{M}+\text{H}+1]^+$
1272	29,04	$[\text{M}+\text{H}+2]^+$
1273	9,87	$[\text{M}+\text{H}+3]^+$

Tabelle 7.13: Prozentuale Anteile der Isotope der einfach geladenen Quasimolekülonen von Anidulafungin (nach www.chemcalc.org)

Anidulafungin [m/z]	Anteil [%]	Isotop
1141	100	$[\text{M}+\text{H}]^+$
1142	63,59	$[\text{M}+\text{H}+1]^+$
1143	24,02	$[\text{M}+\text{H}+2]^+$
1144	6,53	$[\text{M}+\text{H}+3]^+$
1145	1,43	$[\text{M}+\text{H}+4]^+$

7.6 Kalibrierfunktionen

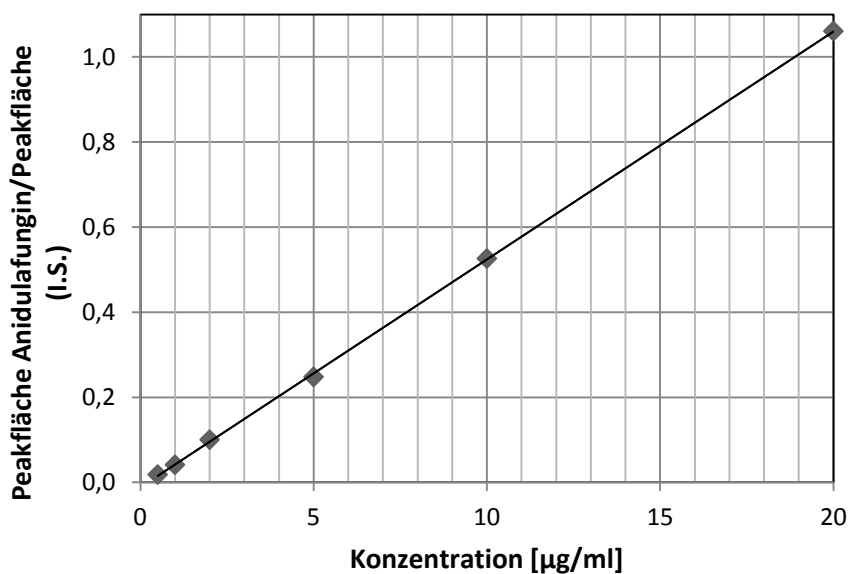


Abbildung 7.3: $1/x$ gewichtete Kalibrierfunktion von Anidulafungin mit dem UV-Spektrometer; I.S. Micafungin, (Korrelationskoeffizient $r = 0,999$; Kalibrierfunktion $y = 0,0535x$)

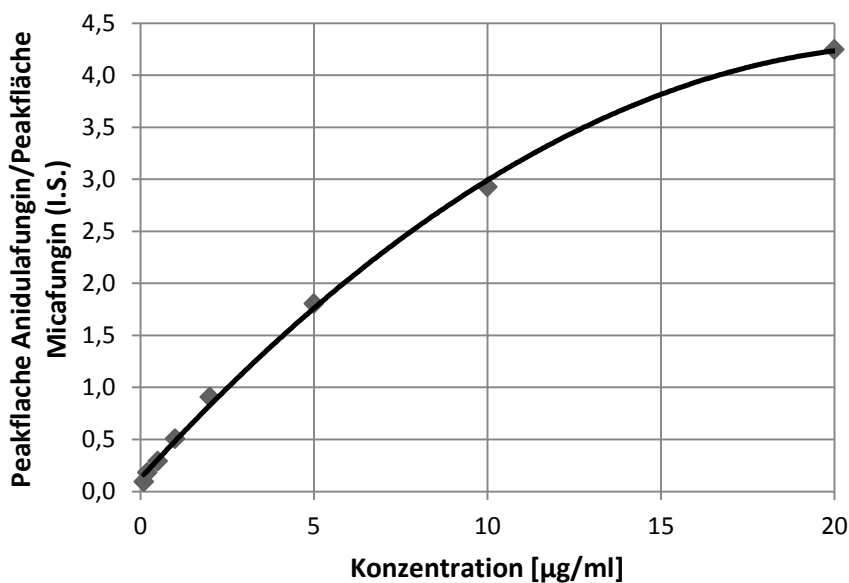


Abbildung 7.4: Quadratische Kalibrierfunktion von Anidulafungin mit dem Massenspektrometer, (Kalibrierfunktion $y = -0,0081x^2 + 0,3676x + 0,124$)

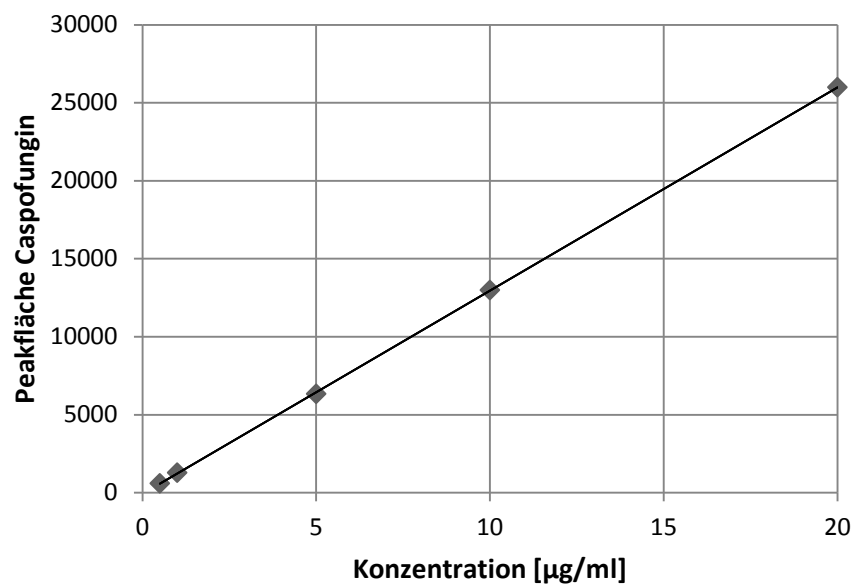


Abbildung 7.5: lineare Kalibrierfunktion von Caspofungin mit dem Fluoreszenzdetektor;
(Korrelationskoeffizient $r = 0,999$, Kalibrierfunktion $y = 1298x$)

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. med. Dr. h.c. Stefanie Bode-Böger für die Möglichkeit in ihrem Institut zu promovieren, für die Überlassung des interessanten Themas und die sehr gute Betreuung während der Zeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Jens Martens-Lobenhoffer für die engagierte Betreuung und für die vielen Diskussionen und Anregungen während der Durchführung und Auswertung der Dissertation danken.

Bei Herrn Dr. med. Uwe Tröger möchte ich mich für die Unterstützung bei dem klinischen Teil dieser Arbeit bedanken.

Auch bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Siegfried Kropf aus dem Institut für Biometrie möchte ich mich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten bedanken.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts für Klinische Pharmakologie, insbesondere Frau Dagmar Ratzmann, für die Unterstützung und Hilfe bei der Anfertigung des experimentellen Teils dieser Arbeit.

Ich danke meinen Eltern für die Unterstützung für die Geduld und die verständnisvolle Begleitung während des Studiums und bis zur Vollendung dieser Arbeit und meinem Bruder David vor allem für seine Hilfe bei der Bewältigung computertechnischer Schwierigkeiten.

Großer Dank gilt meinem Freund Christian Willberg für seinen unermüdlichen Optimismus und seinen ständigen Rückhalt in den vergangenen Jahren.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Entwicklung eines chromatografischen Analyseverfahrens für die Echinocandine Micafungin und Anidulafungin in Humanplasma und Aspekte des Therapeutischen Drug Monitorings (TDM) der Echinocandine bei Patienten einer internistischen Intensivstation

im Institut für Klinische Pharmakologie mit Unterstützung durch Frau Prof. Dr. med. Dr. h. c. Stefanie M. Bode-Böger, MPH und Dr. rer. nat. Jens Martens-Lobenhoffer, und Prof. Dr. rer. nat. Siegfried Kropf aus dem Institut für Biometrie und Medizinische Informatik ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Braunschweig, den 20.11.2013

Victoria Rupprecht

Darstellung des Bildungsweges

Name: Victoria Rupprecht

Geburtstag: 08.11.1986

Geburtsort: Hannover

Beruf	Seit 10/2012	Assistenzärztin, Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie, Klinikum Bielefeld-Mitte
Ausbildung	11/2011-09/2012:	Promotionssemester, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
	11/2011:	2. Staatsexamen
	09/2007:	1. Staatsexamen
	10/2005:	Studium der Humanmedizin, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
	07/2005:	Abitur, Christophorusschule - Gymnasium im CJD Braunschweig
Praktisches Jahr	03-07/2011:	Chirurgie, Johanniter Krankenhaus Stendal
	12-03/2010:	Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Magdeburg
	08-12/2010:	Innere Medizin, Kansas University Medical Center, Kansas City, USA
Publikation	2011:	<i>Determination of micafungin and anidulafungin in human plasma: UV-or mass spectrometric quantification?</i> , Martens-Lobenhoffer, Rupprecht, Bode-Böger, Journal of Chromatography B, 879 (2011), pp. 2051-2056
Stipendium	04 bis 07/2012:	Doktorandenstipendium im Rahmen der Leistungsorientierten Mittelvergabe (LOM) der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

Braunschweig, den 20.11.2013

Victoria Rupprecht