Aus dem Virchow-Klinikum
Medizinische Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin
II. Medizinische Klinik
Kommissarischer Leiter: Dr. med. E. Klein
(Ehemaliger Leiter: Prof. Dr. med. H. D. Pohle)

Simultane Bestimmung von Dapson, Monoacetyldapson und Pyrimethamin mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) im Blutplasma HIV-seropositiver Patienten

Digitale Dissertation

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
am Virchow-Klinikum
Medizinische Fakultät der
Humboldt-Universität zu Berlin

vorgelegt von
Jan Padberg
aus Münster

Gutachter: Prof. Dr. med. Bernhard Ruf

Datum der Einreichung: 1.Mai 1997

Datum der Promotion: 17. April 1998

In Auszügen publiziert in:

Eljaschewitsch J.; Padberg J.; Schürmann D.; Ruf B. High-performance liquid chromatography determination of pyrimethamine, dapsone, monoacetyldapsone, sulfadoxine, and N-acetyl-sulfadoxine after rapid solid-phase extraction. Ther Drug Monit 1996; 18: 592-7.

Gedruckt mit der Genehmigung des Virchow-Klinikums, Medizinische Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin

INHALTSVERZEICHNIS Seite

1.	**EINLEITUNG**	6
1.1.	**Opportunistische Infektionen bei HIV-seropositiven Patienten**	6
1.1.1.	Infektionen durch Pneumocystis carinii	7
1.1.2.	Prävention der Pneumocystis carinii-Pneumonie	8
1.1.3.	Infektionen durch Toxoplasma gondii	10
1.1.4.	Prävention der Toxoplasma gondii-Enzephalitis	10
1.1.5.	Compliance von HIV-seropositiven Patienten	11
1.2.	**Dapson**	12
1.2.1.	Pharmakodynamik von Dapson	12
1.2.2.	Pharmakokinetik von Dapson	13
1.2.3.	Acetyliererphänotyp	13
1.3.	**Pyrimethamin**	15
1.3.1.	Pharmakodynamik von Pyrimethamin	15
1.3.2.	Pharmakokinetik von Pyrimethamin	16
1.4.	**Antiprotozoale Aktivität von Dapson und Pyrimethamin**	16
1.5.	**Methoden der Plasmakonzentrationsbestimmung**	19
1.6.	**Zielsetzung**	20
2.	**MATERIAL UND METHODE**	21
2.1.	**Material**	21
2.1.1.	Geräte der Probenaufbereitung	21
2.1.2.	Aufbau der Probenaufbereitung	21
2.1.2.1.	Präparation der Plasmaproben	21
2.1.2.2.	Extraktionsröhrchen und Konditionierung	21
2.1.2.3.	Vakuumabsaugeinheit und Extraktion der Plasmaproben	22
2.1.2.4.	Weiterverarbeitung der Proben	22
2.1.3.	Geräte der HPLC	22
2.1.4.	Aufbau der HPLC	23
2.1.4.1.	Filtration der Eluenten	23
2.1.4.2.	Entgasung der Eluenten	23
2.1.4.3.	HPLC-Pumpen	23

2.1.4.4.	Mischkammer	24
2.1.4.5.	Injektionssystem	24
2.1.4.6.	Verbindungselemente	24
2.1.4.7.	Autosampler	24
2.1.4.8.	Vorsäule	24
2.1.4.9.	Chromatographische Trennsäule	25
2.1.4.10.	Lambda-Selektor und Spektralphotometer	25
2.1.4.11.	Integrator und Software	25
2.1.4.12.	Übersicht der HPLC-Anlage	25
2.1.5.	Chemikalien	26
2.1.6.	Stamm- und Standardlösungen	26
2.2.	**Entwicklung der Probenaufbereitung**	27
2.2.1.	Auswahl der grundlegenden Methode	27
2.2.2.	Chromatographische Bedingungen und Konditionierung	28
2.2.3.	Kapazitätsprüfung mit DDS, MADDS, PYR und IS in Wasser	28
2.2.4.	Retentionsprüfung mit DDS, MADDS, PYR und IS in Wasser	28
2.2.5.	Elutionsversuche mit DDS, MADDS, PYR und IS in Wasser	28
2.2.6.	Verarbeitung von Plasmaproben	29
2.2.7.	Prüfung verschiedener Waschlösungen	29
2.2.8.	Retentions- und Elutionsprüfung mit Plasmaproben	29
2.2.9.	Zusammenfassung der Probenaufbereitung	30
2.3.	**Entwicklung der HPLC-Methode**	31
2.3.1.	Variation der mobilen Phase mit Pic B5	31
2.3.2.	Variation der Pic B5 Konzentration	33
2.3.3.	Erfolgreiche Variation der mobilen Phase mit Pic B6	34
2.3.4.	Gradientenelution	35
2.3.5.	Detektionswellenlängen für DDS, PYR und IS	35
2.3.6.	Zusammenfassung der HPLC-Methode	37
2.4.	**Validierung der Methode**	37
2.4.1.	Kalibration und Auswertung	37
2.4.2.	Überprüfung der Methode	38
2.5.	**Prophylaxe mit Pyrimethamin und Dapson**	39
2.5.1.	Patientenkollektiv	39
2.5.2.	Abnahme der Proben	40
2.5.3.	Compliance	41

3. ERGEBNISSE 42

3.1. Validität der Methode 42
3.1.1. Wiederfindung 42
3.1.2. Präzision 43
3.1.3. Sensitivität 44
3.1.4. Spezifität 44
3.1.5. Linearität 44
3.2. Compliance 46
3.3. Medikamentenspiegel 47
3.4. Acetyliererphänotyp 50
3.5. Wirksamkeit der Prophylaxe 51
3.5. Routineeinsatz der Methode 52

4. DISKUSSION 53

5. ZUSAMMENFASSUNG 59

6. LITERATUR 60

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

AIDS	acquired immune deficiency syndrome
AP	aerosoliertes Pentamidin
bid	zweimal täglich
biw	zweimal wöchentlich
CD4	cluster of differentiation four
CMV	Zytomegalievirus
DDS	Dapson (Diaminodiphenylsulphon)
DHFR	Dihydrofolsäure-Reduktase
DHPS	Dihydropteroin-Synthetase
DS	Doppelte Stärke
ES	Einfache Stärke
Fa	Firma
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HIV	human immunodeficiency virus
HPLC	high pressure liquid chromatography
HSV	Herpes simplex-Virus
IF	Interferenz
IS	Interner Standard
KS	Kaposi-Sarkom
MADDS	Monoacetyldapson (Monoacetyldiaminodiphenylsulphon)
MAC	Mycobacterium avium complex
MG	Molekulargewicht
mV	Millivolt
N	Anzahl
OI	Opportunistische Infektionen
PCP	Pneumocystis carinii-Pneumonie
PTFE	Polytetrafluoräthylen
PYR	Pyrimethamin
qd	jeden Tag
qod	jeden zweiten Tag
qm	jeden Monat
q14d	alle zwei Wochen
qw	jede Woche
SD	Standardabweichung

SDX	Sulfadimethoxin
SMX	Sulfamethoxazol
TBC	Tuberkulose
TE	Toxoplasma gondii-Enzephalitis
tiw	dreimal wöchentlich
TMP	Trimethoprim
UKRV	Universitätsklinikum Rudolf Virchow
ZNS	zentrales Nervensystem

1. EINLEITUNG

1.1. Opportunistische Infektionen bei HIV-seropositiven Patienten

Das erworbene Immundefektsyndrom AIDS ist das letzte Stadium der HIV-Infektion. Es ist definiert durch das Auftreten von sekundären Infektionen, Tumorerkrankungen, neurologischen Störungen und konstitutionellen Symptomen (Centers For Disease Control 1992; Royce et al. 1991). Das Erregerspektrum der sekundären Infektionen läßt sich in die bei immunkompetenten Patienten üblichen pathogenen Keime und die opportunistischen Erreger aufteilen. Sekundäre Infektionen sind die Hauptursache der Morbidität und Mortalität von HIV-seropositiven Patienten. So sterben annähernd 80% der AIDS-Patienten in direkter Folge von sekundären Infektionen. Von diesen Infektionen wird der überwiegende Anteil durch opportunistische Erreger ausgelöst (Stein et al. 1992). Folglich stellt neben der antiretroviralen Therapie, die Prophylaxe opportunistischer Infektionen das wichtigste Behandlungskonzept der fortgeschrittenen HIV-Infektion dar. Opportunistische Infektion verursachen auch in Deutschland unverändert den Hauptanteil der Erstmanifestationen AIDS-definierender Krankheiten (Tabelle 1).

TABELLE 1: Erstmanifestation von AIDS in den aufgeführten Zeiträumen in der BRD (Quartalsbericht II/96 des AIDS-Zentrums im Robert Koch-Institut)

Klinische Erstmanifestationen	bis 1988	7/1995 bis 6/1996
Opportunistische Infektionen (OI)	66,8%	73,5%
Kaposi-Sarkom (KS)	19,1%	8,6%
OI und KS	6,7%	5,3%
Maligne Lymphome	3,3%	5,4%
Neurologische Symptomatik	2,5%	3,7%
Wasting-Syndrom	1,2%	3,4%
Interstitielle Pneumonie	0,4%	0,1%

Das klinische Spektrum der durch sekundäre Infektionen ausgelösten Krankheiten verändert sich kontinuierlich, da die Lebenserwartung von AIDS-Patienten zunimmt und wirkungsvollere Ansätze zu Therapie und Prophylaxe Anwendung finden (Lemp et al. 1990; Rothenberg et al. 1987). Zur Zeit werden prophylaktische Regime gegen Pneumocystis carinii-Pneumonie (PCP), Toxoplasma gondii-Enzephalitis (TE), nicht tuberkulöse Mykobakteriose, Tuberkulose und Pilzinfektionen klinisch geprüft (Decker und Masur 1994). Ein weiterer entscheidender Faktor für die Inzidenz und Prävalenz der unterschiedlichen sekundären Infektionen ist die geographische Position und der sozioökonomische Status der untersuchten Population. In Deutschland gehören die Pneumocystis carinii-Pneumonie und die Toxoplasma gondii-Enzephalitis zu den häufigsten opportunistischen Infektionen. Die Einführung der inhalativen und systemischen Prophylaxe der PCP hat jedoch mittlerweile zu einer deutlichen Reduktion der Inzidenz geführt (Tabelle 2).

TABELLE 2: Opportunistische Infektionen in den aufgeführten Zeiträumen in der BRD (Quartalsbericht II/96 des AIDS-Zentrums im Robert Koch-Institut)

Opportunistische Infektionen	bis 1988	7/1995 bis 6/1996
Pneumocystis carinii-Pneumonie	58,6%	37,7%
Candidiasis	16,4%	18,0%
Toxoplasmosa gondii-Enzephalitis	9,4%	12,9%
TBC/MAC	4,0%	14,1%
CMV	4,0%	6,2%
HSV	3,8%	2,3%
andere	3,8%	5,6%

1.1.1. Infektionen durch Pneumocystis carinii

PCP ist eine häufige opportunistische Erkrankung, die nahezu ausschließlich bei Personen mit einer ausgeprägten Immundefizienz auftritt (Walzer 1991). Bei einem immunkompetenten Wirt verläuft die Infektion im allgemeinen asymptomatisch, mutmaßlich aufgrund der geringen Pathogenität des Erregers. So haben serologische Studien gezeigt, daß 65 bis 100% der Kinder im Alter von zwei bis vier Jahren Antikörper gegen Pneumocystis carinii besitzen, obwohl die manifeste Erkrankung bei Kleinkindern sehr selten ist (Meuwissen et al. 1977; Pifer et al. 1978).

Die Taxonomie von Pneumocystis carinii wird kontrovers beurteilt. Obwohl der Erreger lange als Protozoon eingestuft wurde, zeigen neuere Studien der ribosomalen DNA eine größere Homologie zu Pilzen, was eine Reklassifizierung des Krankheitserregers nahelegt (Edman et al. 1988; Stringer et al. 1989). Pathogenetisch ist die hohe Affinität von Pneumocystis carinii zu Alveolarzellen Typ 1 zu erwähnen. Es kommt zunächst zu einer interstitiellen Entzündungsreaktion, in deren weiterer Verlauf auch alveoläre Exsudate auftreten können. Hierdurch wird vor allem die Diffusionskapazität der Lunge drastisch herabgesetzt. Das klinische Bild der PCP verläuft sehr protrahiert, vom Auftreten der Symptome bis zur Diagnosestellung vergehen häufig mehrere Wochen. Die Symptome sind unspezifisch: allgemeine Leistungsschwäche, trockener Husten, Fieber und zunehmende Dyspnoe.

1.1.2. Prävention der Pneumocystis carinii-Pneumonie

PCP ist die häufigste lebensbedrohende sekundäre Infektion bei HIV-infizierten Patienten. In der ersten Dekade der weltweiten AIDS-Epidemie war bei 60% aller Patienten PCP die AIDS-definierende Erkrankung (Centers For Disease Control 1989). Ohne die Anwendung einer geeigneten Prophylaxe entwickelten über 80% der HIV-infizierten Patienten einmal oder mehrmals eine PCP. In Anbetracht dieser Daten wurde das Konzept der antiprotozoalen Prophylaxe entwickelt. Durch die kontinuierliche Einnahme entsprechender Antibiotika soll eine manifeste Infektion, trotz nachlassender körpereigener Abwehrfähigkeit, dauerhaft verhindert werden. In diesem Zusammenhang wird die primäre Prophylaxe als Schutz vor einer Erstmanifestation, von der sekundären Prophylaxe, welche ein Rezidiv verhindern

soll, abgegrenzt. Die mit einer initialen PCP assoziierten Letalität lag bei 5 bis 20% (Moss et al. 1984). Die allgemeine Einführung der primären und sekundären Prophylaxe hat zu einem Abfall der PCP-Inzidenz unter einnahmetreuen Patienten mit Zugang zu medizinischer Versorgung geführt (Kovacs und Masur 1992). So fiel der Anteil der Pneumocystis carinii-Pneumonie an den in Deutschland gemeldeten opportunistischen Infektion von dem Zeitraum vor 1988 bis zu dem Zeitraum von Juli 1995 bis Juni 1996 von 58,6% auf 37,7% (Robert Koch-Institut 1996).

Prospektive und retrospektive Studien haben gezeigt, daß die Zahl der CD4-positiven Lymphozyten ein gute Bemessungsgrundlage für das Risiko an PCP zu erkranken darstellt. Das Erkrankungsrisiko beträgt 18% innerhalb von zwölf Monaten für Patienten mit einer CD4-Zellzahl unter 200/µl, weshalb für diesen Personenkreis eine primäre PCP-Prophylaxe generell befürwortet wird (Masur et al. 1989; Phair et al. 1990). Ohne sekundäre Prophylaxe erkranken mindestens 66% der HIV-seropositiven Patienten erneut an PCP in einem Zeitraum von zwölf Monaten nach der initialen Episode (Fischl et al. 1990). Um diese erneuten Episoden zu verhindern wird für diese Individuen eine sekundäre PCP-Prophylaxe allgemein empfohlen. Die orale Gabe von Trimethoprim/Sulfamethoxazol (TMP/SMX) und die monatliche Inhalation mit aerosoliertem Pentamidin (AP) sind in der primären und sekundären Prophylaxe wirksam und werden am häufigsten verwendet (Girad et al. 1993; Hirschel et al. 1991; Hughes et al. 1994). Andere Kombinationen enthalten Pyrimethamin mit Sulfadoxin oder Dapson. Regime mit oraler Applikation wirken auch prophylaktisch gegen zerebrale Toxoplasmose. In Tabelle 3 sind die randomisierten Studien, welche verschiedene prophylaktische Regime gegeneinander oder gegenüber einer Placebogruppe verglichen haben, zusammengefaßt.

TABELLE 3: Randomisierte Studien zur Prophylaxe der Pneumocystis carinii-Pneumonie

QUELLE	MEDIKATION*	MODUS	PAT.
Antinori 1992	TMP/SMX (DS qod), DDS/PYR (100 qw/25 biw), AP (300 qm)	P	197
Blum 1992	TMP/SMX (DS qd), DDS (100 qd)	P	86
Bozzette 1995	TMP/SMX (2xDS qd), DDS (100 qd), AP (300 qm)	P	842

Fischl 1988	TMP/SMX (2xDS qod), Placebo	P	60
Girad 1993	DDS/PYR (50 qd/25 biw), AP (300 qm)	P	349
Golden 1993	AP (300 q14d), AP (600 qm)	P/S	146
Grünewald 1993	DDS/PYR (100 biw/25 biw), SDX/PYR (500 biw/25 biw)	P/S	50
Hardy 1992	TMP/SMX (DS qod), AP (300 qm)	S	310
Hirschel 1991	AP (300 qm), Placebo	P	223
Jensen 1993	AP (60 q14d), Placebo	P	209
Leoung 1990	AP (300 qm), AP (150 q14d), AP (30 q14d)	P/S	408
Mallolas 1993	TMP/SMX (DS tiw), DDS/PYR (100 qw/25 qw), AP (300 qm)	P	331
May 1994	TMP/SMX (ES qd), AP (300 qm)	P	214
Montaner 1991	AP (60 q14d), Placebo	S	162
Opravil 1995	DDS/PYR (200 qw/75 qw), AP (300 qm)	P/S	533
Podzamczer 1993	TMP/SMX (2xDS tiw), DDS/PYR (100 qw/25 qw)	P	166
Schneider 1992	TMP/SMX (DS qd), AP (300 qm)	P	213
Slavin 1992	DDS (100 biw), AP (400 qm)	P/S	96
Torres 1993	DDS (100 biw), AP (400 qm)	P/S	278

*alle Angaben in mg

DS = Doppelte Stärke (TMP160mg/SMX800mg); ES = Einfache Stärke (TMP80mg/SMX400mg)

bid = zweimal täglich; qd = jeden Tag; qod = jeden zweiten Tag; tiw = dreimal wöchentlich;

biw = zweimal wöchentlich; qw = jede Woche; q14d = alle zwei Wochen; qm = jeden Monat.

MODUS: P = primär; S = sekundär; PAT.: Anzahl der Patienten in der Studie

1.1.3. Infektionen durch Toxoplasma gondii

Toxoplasmose ist eine Zoonose mit der Katze als Hauptwirt. Zur primären Infektion bei Menschen kommt es durch a) Genuß von zystenhaltigem rohen Fleisch, b) Ingestion von durch Katzen ausgeschiedenen Oozysten und c) diaplazentare, vertikale Übertragung (McCabe und Oster 1989). Toxoplasma gondii gehört zu den obligat intrazellulären Protozoen der Gattung Coccidia. Es existieren drei Formen: die Tachyzoiten (Trophozoiten), die Gewebezysten und die Oozysten.

Das klinische Spektrum bei primärer Infektion reicht von dem häufigsten asymptomatischen Verlauf über die transiente zervikale Lymphadenopathie, den pränatalen Infektionen bis zu den schweren disseminierten Verläufen bei immunkompromittierten Patienten.

1.1.4. Prävention der Toxoplasma gondii-Enzephalitis

Bei HIV-seropositiven Patienten ist die Toxoplasma gondii-Enzephalitis (TE) eine der häufigsten ZNS-Infektionen. Sie ist ein Lokalrezidiv einer chronisch latenten Infektion, ausgelöst durch den progressiven Verlust der zellulären Immunität. Der überwiegenden Anteil der Erkrankungen manifestiert sich bei einer CD4-Zellzahl unter 100/µl (Luft und Remington 1992, Ruf und Pohle 1995). Die Inzidenz der TE wird unter anderem durch die regional unterschiedliche Toxoplasma-Seroprävalenz unter HIV-infizierten Personen bestimmt. Sie ist in den USA mit 10-40% niedrig, in endemischen Regionen wie Europa, Lateinamerika und Afrika dagegen mit 50-95% relativ hoch (Grant et al. 1990, Israelski et al. 1993, Wong et al. 1984). Ein weiterer Faktor ist der proportionale Anstieg der Seroprävalenz mit dem Alter. Sie beträgt bei Dreißigjährigen in Deutschland ungefähr 70% (Sandow et al. 1989). Die Symptome der Toxoplasma gondii-Enzephalitis richten sich vor allem nach der Lokalisation der Entzündung im zentralen Nervensystem. Häufig sind Fieber, Kopfschmerzen, fokale oder generalisierte Krampfanfälle und sensible oder motorische Defizite (Porter und Sande 1992).

In Deutschland entwickelten bis zu 50% der HIV-seropositiven Patienten eine zerebrale Toxoplasmose. Nach weitgehender Verbreitung der chemotherapeutischen Primärprophylaxe ist die Häufigkeit auf unter 20% gesunken (Ruf und Pohle 1995). Weitere Hinweise auf den Nutzen einer TE-Prophylaxe gaben

zahlreiche Studien zur PCP-Prophylaxe (Carr et al. 1992; Hardy et al. 1992 u.a.). Toxoplasma gondii-seronegative, HIV-seropositive Patienten haben nur ein geringes Risiko an akuter Toxoplasmose zu erkranken. Sie sollten regelmäßig serologisch kontrolliert werden und auf die Ingestion von rohem Fleisch verzichten (Luft und Remington 1992). Im klinischen Einsatz zur primären und sekundären Prophylaxe der zerebralen Toxoplasmose stehen Trimethoprim/Sulfamethoxazol, Pyrimethamin, Sulfadoxin und Dapson als Einzelsubstanzen oder als Kombinationen (Antinori et al. 1992; Mallolas et al. 1993; Opravil et al. 1995; Podzamczer et al. 1993; Pohle 1987; Ruf et al. 1993). Weitere Chemotherapeutika wie Atovaquone und die neueren Makrolide werden klinisch geprüft (Fernandez-Martin et al. 1991; Kovacs et al. 1992).

1.1.5. Compliance von HIV-seropositiven Patienten

Compliance wird im allgemeinen als Maß der Übereinstimmung zwischen dem Verhalten von Patienten und den medizinischen Empfehlungen ihres Therapeuten definiert (Rudd et al. 1992). Einen Teilaspekt der Compliance stellt die Einnahmetreue, d.h. die Ingestion der korrekten Medikamentendosis im richtigen Intervall, dar. Es besteht ein breiter Konsens, daß fehlende Compliance (Non-Compliance) die häufigste Ursache eines ambulanten Therapieversagens ist (Kruse 1992; Pullar und Feely 1990).

Herkömmliche Methoden zur Ermittlung der Compliance sind die Zählung von zurückgegebenen Tabletten oder Packungen, Patienteninterviews und Einnahmeprotokolle, die von den Patienten während der Behandlung erstellt werden (Urquhart 1994). Diese Verfahren ermöglichen es jedoch dem Patienten leicht die Kontrolle über die Informationen zu behalten, die der Untersucher erhält. Es folgt daraus eine starke Tendenz zur Überschätzung der Compliance. Neuere Verfahren sind die elektronischen Tablettenbehälter, bei denen jede Entnahme elektronisch gespeichert wird, und die Bestimmung der Medikamente oder additiver Marker im Blut (Aronson und Hardman 1992). Sowohl für die Marker als auch für die Pharmaka ist eine lange Eliminationshalbwertszeit die Voraussetzung für eine adäquate Messung der Compliance. Bei Medikamenten mit kurzen Halbwertszeiten gibt die Plasmakonzentration nur die Tabletteneinnahme ein oder weniger Tage vor der Blutentnahme wieder. Ferner wird die Compliancebestimmung durch den “white coat effect” gestört. So wird die häufige Tatsache bezeichnet, daß Patienten kurz vor und

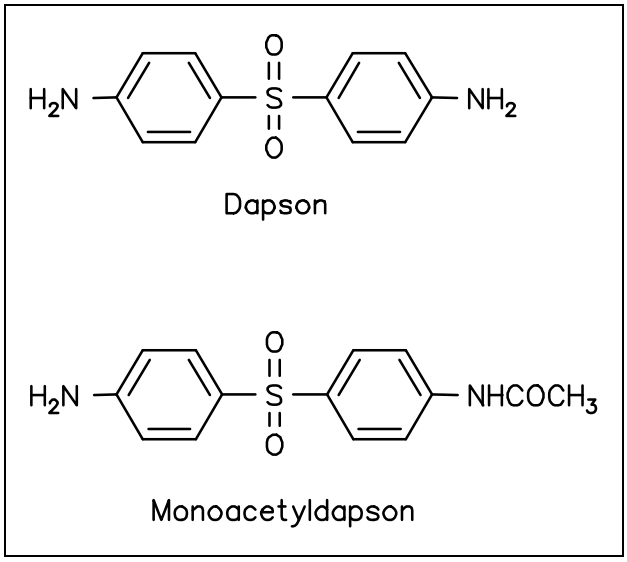
nach einem vereinbarten Arzttermin Medikamente einnehmen, die sie im Intervall nicht oder nur unregelmäßig zu sich nehmen. Pharmaka mit kurzen Eliminationshalbwertszeiten führen in diesen Fällen zu Plasmaspiegeln im Normalbereich, nur Pharmaka mit langen Eliminationshalbwertszeiten zeigen dann mit niedrigen oder fehlenden Plasmaspiegeln mangelnde Einnahmetreue an (Cramer et al. 1989). Über die Compliance von HIV-seropositiven Patienten sind keine gesicherten Erkenntnisse verfügbar. Besonders zu der korrekten Bewertung von verschiedenen Regimen zur Prophylaxe sekundärer Infektionen ist die Bestimmung der Compliance ein integraler Bestandteil.

1.2. Dapson

1.2.1. Pharmakodynamik von Dapson

Dapson (DDS) wurde im Rahmen der Entwicklung von Azofarbstoffen entdeckt. Seine strukturelle Verwandtschaft zu den Sulfonamiden führte zu ersten erfolgreichen Versuchen bei experimentellen Streptokokkeninfektionen von Mäusen (Huikeshoven 1981). Die Substanz ist ein Sulfon, das vergleichbar mit den Sulfonamiden die bakterielle Folsäuresynthese auf der Stufe der Dihydropteroin-Synthetase hemmt.

ABBILDUNG 1: Strukturformeln von Dapson und Hauptmetabolit Monoacetyldapson



Dabei wird der Einbau der p-Aminobenzoesäure blockiert (Kovacs et al. 1989). Dapson ist seit über fünfzig Jahren das wichtigste Antibiotikum in der Behandlung der Lepra (Shepard 1982; Waters 1983). Die Substanz wird ebenfalls eingesetzt in der Malariaprophylaxe (Powell et al. 1967) und in der Therapie dermatologischer Erkrankungen autoimmuner Genese, z.B. Dermatitis herpetiformis (Revesz et al. 1995; Swain et al. 1983). Seit Beginn der weltweiten Verbreitung der HIV-

Infektion kam Dapson in verschiedenen Kombinationen zur Prophylaxe und Therapie opportunistischer Infektionen zum Einsatz. Das Nebenwirkungsprofil von Dapson umfaßt vor allem dosisabhängige hämatologische Alterationen, wie Methämoglobinbildung und Hämolyse mit der Bildung von Heinz-Körpern (Waller und Goehrs 1980). Bei Patienten mit erheblichem Mangel an Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase ist das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen deutlich erhöht.

1.2.2. Pharmakokinetik von Dapson

Die Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt ist nahezu vollständig. Ungefähr 70 bis 90% von Dapson sind an Plasmaproteine gebunden. Im Vergleich dazu ist der Hauptmetabolit Monoacetyldapson 20 bis 25 mal stärker plasmaproteingebunden. Seine Eiweißbindung ist fast vollständig (99%) (Ahmad und Rogers 1980; Biggs et al. 1971; Modderman et al. 1983; Peters et al. 1981). Die maximalen Plasmaspiegel werden zwei bis sechs Stunden nach oraler Gabe erreicht (Ahmad und Rogers 1980; Alexander et al. 1970). Die Eliminationshalbwertszeit t½ liegt im Bereich von 18 bis 31 Stunden (Gelber et al. 1971; Jones und Ovenell 1979; Swain et al. 1983). Einer der zwei Hauptabbauwege ist die Acetylierung von Dapson. Das Enzym N-Acetyltransferase, welches in Hepatozyten und Mukosazellen des Jejunums lokalisiert ist, ist verantwortlich für diesen metabolischen Prozeß (Karim et al. 1981). Den zweite Abbauweg stellt die Hydroxylierung dar. Sie findet in der Leber durch gemischtfunktionelle Oxidasen im endoplasmatischen Retikulum in Anwesenheit von Sauerstoff und NADPH statt. Dieser Metabolisierungsprozeß ist vermutlich für die hämatologischen Nebenwirkungen verantwortlich (Cucinell et al. 1972; Hjelm und de Verdier 1965; Scott und Rasbridge 1973).

1.2.3. Acetyliererphänotyp

Der Polymorphismus der hepatischen Acetylierung spielt eine Rolle in der Metabolisierung zahlreicher Pharmaka, wie z.B. bei Isoniazid, Hydralazin und den Sulfonamiden (Drayer und Reidenberg 1977; du Souich und Lambert 1981; Paxton 1984). Bei einigen Substanzen konnte eine Assoziation zwischen Acetylierungs-kapazität und unerwünschten Nebenwirkungen demonstriert werden. Dieser Zusammenhang konnte bei Dapson jedoch nicht nachgewiesen werden. Bei Dapson erfolgt die Acetylierung einer Aminogruppe zu Monoacetyldapson (MADDS) durch

die N-Acetyltransferase. Zu einer Acetylierungsreaktion der zweiten Aminogruppe kommt es in keinem signifikanten Ausmaß (Jones und Ovenell 1979, Murray et al. 1975, Peters et al. 1970). Neben der Acetylierung von DDS findet gleichzeitig die Deacetylierung von MADDS zu DDS statt. So entsteht ein konstantes Equilibrium innerhalb weniger Stunden nach der Gabe von sowohl DDS als auch MADDS (Gelber et al. 1971). Der Acetylierungsquotient, d.h. die Plasmakonzentration von MADDS geteilt durch die Plasmakonzentration von DDS, zeigt eine starke interindividuelle Variation mit Werten von 0,1 bis 2,0. Die Quotienten zeigen ein bimodales Verteilungsmuster. Personen mit einem Quotienten < 0,35 werden im allgemeinen als langsame Acetylierer klassifiziert, während solche mit einem Quotienten > 0,35 als schnelle Acetylierer bezeichnet werden. Die Klassifikation wurde teilweise modifiziert (Gelber et al. 1971; Hanson et al. 1981; Peters et al. 1978; Philip et al. 1984), einige Autoren haben sogar eine intermediäre Gruppe definiert (Wiggan et al. 1991). Die polymorphe Acetylierung ist Folge der genetischen Determination der Aktivität der N-Acetyltransferase. Die Frequenz der entsprechenden Gene variiert deutlich unter den weltweit verschiedenen ethnischen Gruppen (Karim et al. 1981). Folglich ist die Verteilung der Acetyliererphänotypen in schnelle und langsame Acetylierer stark von der geographischen Position des Untersuchungskollektives abhängig. Über das Verteilungsmuster der Phänotypen in dem Kollektiv der HIV-seropositiven Patienten liegen nur wenige Informationen vor (Opravil et al. 1994).

1.3. Pyrimethamin

1.3.1. Pharmakodynamik von Pyrimethamin

Pyrimethamin wurde im Rahmen einer systematischen Synthese von 2-4-Diamino-pyrimidin-Derivaten als wirksamer Inhibitor von Plasmodium falciparum entdeckt (Falco et al. 1951). Es ist ein Hemmstoff der Dihydrofolsäure-Reduktase und greift damit in den C_1-Stoffwechsel ein.

ABBILDUNG 2: Strukturformeln von Pyrimethamin und Sulfadimethoxin (IS)

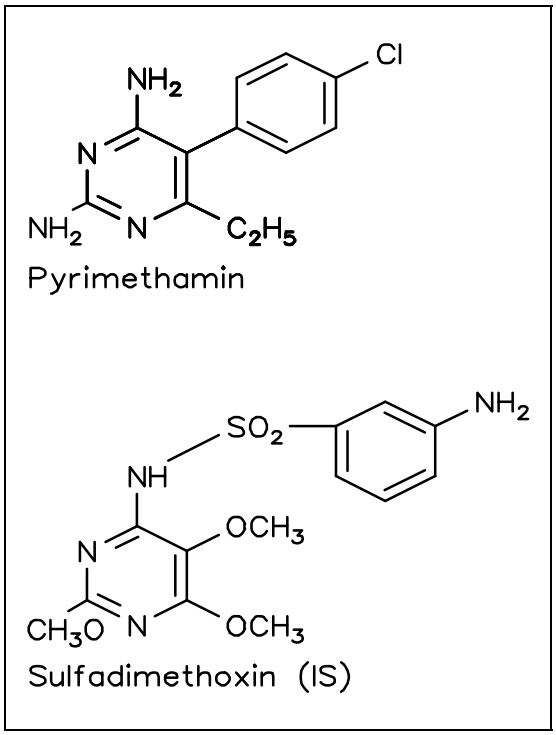


Abbildung 2 zeigt die Strukturformeln von Pyrimethamin und dem internen Standard (IS) der hier vorgestellten Methode, Sulfadimethoxin. Der molekulare Aufbau verdeutlicht die Verwandtschaft zwischen Pyrimethamin und Sulfadimethoxin. Pyrimethamin wird in der Therapie und Prophylaxe der Malaria sowohl als Einzelstoff, als auch in Kombination mit dem Sulfonamid Sulfadoxin eingesetzt (Panisko und Keystone 1990). Auch findet die Substanz eine breite Anwendung in verschiedenen prophylaktischen und therapeutischen Regimen opportunistischer Infektionen bei immunkompromittierten Patienten (Antinori et al. 1992, Girad et al. 1993, Mallolas et al. 1993). Die Nebenwirkungen aufgrund der Hemmung des C_1-Stoffwechsel führen häufig zu einer Suppression der Hämatopoese im Knochenmark. Sie kann sich als Thrombozytopenie, Granulozytopenie oder megaloblastäre Anämie manifestieren (Kaufmann und Geisler 1960). Durch die parallele Gabe von Folinsäure können diese Nebenwirkungen weitgehend verhindert werden. Folsäure sollte nicht zur Substitution verwendet werden, da es die antibiotische Wirkung von Pyrimethamin antagonisiert (Frenkel und Hitchings 1957). Weitere Nebenwirkungen sind gastrointestinale Störungen wie Übelkeit und Erbrechen sowie Haarausfall und Neuropathien.

1.3.2. Pharmakokinetik von Pyrimethamin

Die Absorption aus dem Dünndarm ist nahezu vollständig. Die Plasmaeiweißbindung liegt bei über 90% (Weidekamm et al. 1982; White 1985). Die maximalen Plasmakonzentrationen werden ungefähr zwei bis acht Stunden nach Einnahme erreicht. Die Eliminationshalbwertszeit t½ liegt im Bereich von 35 bis 175 Stunden (Cook et al. 1986; Weiss et al. 1988). Es gibt Hinweise auf erhöhte zerebrale Gewebespiegel (Remington und Desmonts 1983). Pyrimethamin wird in den Hepatozyten durch N-Oxidasen metabolisiert und renal eliminiert.

1.4. Antiprotozoale Aktivität von Dapson und Pyrimethamin

Zur Bestimmung der Wirksamkeit von Chemotherapeutika gegen Erkrankungen durch Pneumocystis carinii und Toxoplasma gondii in der präklinischen Phase sind drei prinzipielle Verfahren beschrieben worden. Die erste Option ist die Analyse der Aktivität der pharmakodynamisch entscheidenen Enzyme. Dafür muß die Dihydropteroin-Synthetase (DHPS) bzw. die Dihydrofolsäure-Reduktase (DHFR) aus den Protozoen isoliert werden (Allegra et al. 1987). Für Antagonisten der Paraaminobenzoesäure, wie Dapson oder den Sulfonamiden, wird die Reduktion der DHPS-Aktivität gemessen, während für Diaminopyrimidine, wie Pyrimethamin, die Aktivitätsminderung der DHFR analysiert wird. Die IC_{50}, d.h. die eine 50% Inhibiton bewirkende Konzentration, der Pneumocystis carinii-DHFR beträgt für Pyrimethamin 690 bis 940 ng/ml (Broughton und Queener 1991; Allegra et al. 1987). Die entsprechenden Dapsonkonzentrationen für die Pneumocystis carinii-DHPS lagen mit 2230 ng/ml deutlich höher (Merali et al. 1990). Für die Enzymhemmung von Toxoplasma gondii waren insgesamt niedrigere Konzentrationen notwendig. Als IC_{50} von Pyrimethamin der DHFR wurde 59 ng/ml bestimmt (Chio und Queener 1993). Dapson zeigte analog eine gute Hemmung der DHPS mit einer IC_{50} von 62 ng/ml (Allegra et al. 1990).

Die zweite Option ist die Anzüchtung von Protozoen auf Zellkulturen. Nach Zugabe der Chemotherapeutika wird die quantitative Veränderung der befallenen Zellen im zeitlichen Verlauf ausgewertet. Eine Wachstumshemmung von Pneumocystis carinii wurde bei einer Dapsonkonzentration von 100 ng/ml beschrieben (Cushion et al. 1985). Die Hemmkonzentration für Toxoplasma gondii lagen im Bereich von

500 ng/ml für Dapson (Derouin et al. 1991) und 40 ng/ml für Pyrimethamin (Derouin et al. 1989).

Als dritte Möglichkeit werden in vivo Untersuchungen an Ratten beschrieben. Zur Etablierung einer Pneumocystis carinii-Pneumonie wurden die Nagetiere mit Kortikoiden immunsuppressiv behandelt und die spontane Infektion abgewartet. Der Therapieerfolg wurde durch die pulmonale Histologie und Parasitendichte bestimmt. Dapson bewirkte in der Dosis 100 mg/kg/Tag eine weitgehende Abheilung. Pyrimethamin zeigte als Einzelsubstanz nur eine geringe therapeutische Wirkung, in der Kombination mit einem Sulfonamid konnte jedoch ein additiver Effekt demonstriert werden (Walzer et al. 1988; Walzer et al. 1992).

Als Tiermodell für die akute Toxoplasmose wurden ebenfalls Ratten eingesetzt, bei denen Toxoplasma-Tachyzoiten in die Peritonealhöhle inokuliert wurden. Dapson in einer Dosis von 100 mg/kg/Tag konnte eine fortgeschrittene Erkrankung nicht aufhalten, zeigte jedoch einen guten prophylaktischen Effekt (Derouin et al. 1991). Für Pyrimethamin wurde eine komplette Heilung aller Tiere bei Plasmaspiegeln größer 500 ng/ml (25 mg/kg/Tag) gezeigt. Plasmaspiegel von kleiner 100 ng/ml führten zu einer Letalität von 100% (Weiss et al. 1992). Zusammenfassend beurteilt, wirkt Dapson also stärker gegen Pneumocystis carinii, während Pyrimethamin seine Hauptwirkung gegen Toxoplasma gondii entfaltet. Durch die sequentielle Hemmung der protozoalen Folsäuresynthese kommt zusätzlich ein additiver Effekt der Kombinationsbehandlung zum Tragen.

Für die antiprotozoale Prophylaxe bei HIV-seropositiven Patienten wurden 100 bis 350 mg Dapson plus 25 bis 75 mg Pyrimethamin pro Woche gegeben (Antinori et al. 1995; Girad et al. 1993; Grünewald et al. 1993; Mallolas et al. 1993; Opravil et al. 1995; Podzamczer et al. 1993). Die allgemein verordnete Dosis zur Prophylaxe der Malaria ist eine Tablette Maloprim® (100 mg DDS + 12,5 mg PYR) pro Woche. Im Rahmen pharmakokinetischer Studien wurden die resultierenden Plasmaspiegel einiger dieser Regime analysiert. Um repräsentative Daten für die Plasma-konzentrationen in der Langzeitprophylaxe zu gewinnen, wurden die Blutentnahmen mindestens vier Wochen nach Beginn der Tabletteneinnahme begonnen. Durch diese Maßnahme ist das Gleichgewicht zwischen Absorption und Elimination der Pharmaka, der sogenannte steady-state, bei der Materialgewinnung erreicht.

Die Mittelwerte der Dapson und Pyrimethamin-Plasmaspiegel unter Dauertherapie 24, 72 und 120 Stunden nach der Ingestion der Pharmaka sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

TABELLE 4: Mittelwerte der steady-state Plasmakonzentrationen von Dapson und Pyrimethamin nach 24, 72 und 120 Stunden

Autor (Ziel der Prophylaxe)	Mittlere Plasmakonzentration nach:		
{Wöchentliche Dosis}	24h	72h	120h
Edstein 1990 (Malaria)			
{Dosis: 100 mg DDS + 12,5 mg PYR}			
Dapson (ng/ml):	515	107	41
Pyrimethamin (ng/ml):	95	74	48
Jones 1979 (Malaria)			
{Dosis: 100 mg DDS + 12,5 mg PYR}			
Dapson (ng/ml):	710	180	26
Pyrimethamin (ng/ml):	68	57	40
Lee 1985 (Malaria)			
{Dosis: 100 mg DDS + 12,5 mg PYR}			
Dapson (ng/ml):	374	134	38
Pyrimethamin (ng/ml):	121	80	53
Opravil 1994 (PCP und TE)			
{Dosis: 200 mg DDS + 75 mg PYR}			

Dapson (ng/ml):	1038	258	44
Pyrimethamin (ng/ml):	356	281	195

Im Gegensatz zur prophylaktischen Behandlung sind in der Akuttherapie deutlich höhere Plasmaspiegel erforderlich. Pyrimethaminplasmakonzentrationen von über 750 ng/ml waren notwendig, um die Toxoplasma gondii-Enzephalitis bei AIDS-Patienten wirksam zu behandeln (Weiss et al. 1988). Die Maximalkonzentrationen von Dapson bei der erfolgreichen Therapie der Pneumocystis carinii-Pneumonie lagen zwischen 900 und 2300 ng/ml (Lee et al. 1989).

1.5. Methoden der Plasmakonzentrationsbestimmung

Die ersten Methoden zur Bestimmung von Sulfonen in biologischen Medien basierten auf der Kolorimetrie (Levy und Higgins 1966). Diese Methoden waren jedoch nicht spezifisch für einzelne Substanzen. In Folge gelangen dann erste separate Bestimmungen von Dapson und Monoacetyldapson durch fluorimetrische Analyse (Glatzko et al. 1968, Mannan et al. 1977). Es wurden eine Reihe von HPLC (High pressure liquid chromatography)-Methoden entwickelt zur Bestimmung von entweder nur Pyrimethamin (Coleman et al. 1984; Timm und Weidekamm 1982) oder ausschließlich Dapson (Abuirjeie et al. 1991; Carr et al. 1978; Gidoh et al. 1981; Horai et al. 1985; Philip et al. 1984; Pieters et al. 1987; Zuidema et al. 1980). Die simultane Quantifizierung von Dapson, Monoacetyldapson und Pyrimethamin in einer Analyse konnte ebenfalls als HPLC-Technik etabliert werden (Edstein et al. 1984; Jones und Ovenell 1979; Lee et al. 1985; Lemnge et al. 1993; Rønn et al. 1995).

Eine Probenaufbereitung bei der Analyse von Blutplasma mit Hilfe der HPLC ist notwendig, um eine Vorreinigung der Proben zu erzielen und dadurch die chromatographische Säule vor Verunreinigungen zu schützen. Dazu müssen die zu bestimmende(n) Substanze(n) aus der komplexen Matrix (hier Plasma) möglichst selektiv isoliert werden. Zu den klassischen Methoden der Probenaufbereitung zählen die Destillation und Kristallisation. Als weiteres Verfahren wird die Flüssig-Flüssig-Extraktion herangezogen, die bei allen bisher veröffentlichten Methoden zur

simultanen Bestimmung von DDS, MADDS und PYR eingesetzt wurde. Der Nachteil dieser Art von Probenaufbereitung ist ein hoher Zeitaufwand durch aufwendige Misch- und Trocknungsschritte. Edstein et al. setzen dieses Verfahren mit Ethylendichlorid als organischer Phase ein. Nach dem zehnminütigen Mischen der Plasmaprobe mit der organischen Phase ist eine Zentrifugation für fünf Minuten notwendig. In dem nächsten Schritt wird die wässerige Phase entfernt und der organische Anteil mit Heißluft eingetrocknet. Dieser Anteil wird dann in der mobilen Phase (Methanol-Acetonitril-Wasser/ 25 : 15 : 60) gelöst und kann dann auf die chromatographische Säule gebracht werden. Im Gegensatz zu der Methode von Edstein et al. kommt in der hier vorgestellten Arbeit die Festphasenextraktion, auch Flüssig-Fest-Extraktion genannt, als Probenaufbereitung zum Einsatz. Um die Selektivität gegenüber der Flüssig-Flüssig-Extraktion zu erhöhen, werden bei diesem Verfahren Adsorbenzien verwendet, die auch in der HPLC zur Trennung genutzt werden.

1.6. Zielsetzung

1) Entwicklung einer einfachen und zeitsparenden HPLC-Methode zum simultanen Nachweis von Dapson, Monoacetyldapson und Pyrimethamin mit Hilfe der Festphasenextraktion in der Probenaufbereitung.

2) Bestimmung der Chemotherapeutikakonzentrationen im Plasma HIV-seropositiver Patienten unter antiprotozoaler Prophylaxe mit 100 mg Dapson + 25 mg Pyrimethamin zweimal wöchentlich.

3) Ermittlung der Verteilung der hepatischen Acetyliererphenotypen durch Analyse der individuellen Monoacetyldapson/Dapson-Quotienten in diesem Kollektiv.

4) Überprüfung der Einnahmetreue (Compliance) HIV-infizierter Patienten in der Prophylaxe der Toxoplasma gondii-Enzephalitis und der Pneumocystis carinii-Pneumonie.

5) Darstellung der klinische Wirksamkeit der Prophylaxe bei HIV-seropositiven Patienten mit Plasmaspiegelüberwachung.

2. MATERIAL UND METHODE

2.1. Material

2.1.1. Geräte der Probenaufbereitung

Extraktionsröhrchen: Varian Bond Elut®, (Fa. Varian, Harbor City, USA); Vakuumextraktionsgerät: Adsorbex® SPU-Absaugeinheit (Fa. E. Merck, Darmstadt, BRD); Zentrifuge: Megafuge 1.0 (Rotor 3360) (Fa. Heraeus Sepatech, Osterode, BRD); Schüttelgerät: (Fa. Heidolph, Kelheim, BRD). Weiterhin sind zur Probenaufbereitung Eppendorfpipetten, Pasteurpipetten und Probengefäße notwendig.

2.1.2. Aufbau der Probenaufbereitung

2.1.2.1. Präparation der Plasmaproben

Die Plasmaproben werden aus venös entnommenen, heparinisierten Blutproben gewonnen. Das heparinisierte Blut wird fünf Minuten bei 3000 U/min. zentrifugiert. Jeweils 1 ml Plasma wird in 10 ml-Röhrchen gefüllt und dient entweder der direkten Weiterverarbeitung oder der Aufbewahrung bei -40°C.

2.1.2.2. Extraktionsröhrchen und Konditionierung

Die Wand der Extraktionsröhrchen besteht aus chemisch inertem PTFE. Das Säulenvolumen beträgt 2,8 ml. Die Füllung (500 mg) setzt sich aus modifiziertem Kieselgel ($-Si-C_{18}H_{37}$) mit einer Partikelgröße von 40 µm zusammen, welches in einer Silanisierungsreaktion mit hydrophoben n-Octadecyl Liganden chemisch gebunden wurde. Dieses Füllungsmaterial macht eine reversed-phase Extraktion möglich. Die bis zu 24 Extraktionsröhrchen werden auf die SPU-Absaugeinheit gesteckt und mit 3 ml Methanol und danach mit 3 ml Wasser gefüllt. Diese Konditionierung ist nötig, um die Adsorbentien vollständig zu benetzen und damit auf der gesamten Oberfläche der Kieselgele ein System zwischen fester Phase (Octadecyl-Gruppe) und mobiler Phase (Wasser) zu schaffen.

2.1.2.3. Vakuumabsaugeinheit und Extraktion der Plasmaproben

Die frisch gewonnenen oder wiederaufgetauten 1 ml Plasmaproben werden mit 200 µl internem Standard und 1 ml 0,1 molarer Salzsäure versetzt und mit dem Vortex-Mischer für ungefähr zehn Sekunden gemischt. Die Proben haben nach diesem Schritt ein Volumen von 2,2 ml. Das Zentrifugieren der wiederaufgetauten Proben mit der Zentrifuge bei 3000 U/min. für zwei Minuten ist zur Abtrennung von Eiweißgerinnseln von der Probenmatrix notwendig. Von den 2,2 ml Proben werden jeweils 2,0 ml auf die vorher konditionierten Röhrchen mit der Eppendorfpipette gegeben, welche auf dem SPU-Vakuumextraktionsgerät senkrecht fixiert sind. Der Unterdruck entsteht durch ein Wasserhahnventil und läßt sich stufenlos regulieren. Das Eluat fließt aus den Säulen in der Position “Collect” in 5 ml-Glasröhren und in der Position “Waste” in einen Abfallbehälter ab. Nachdem die 2,0 ml Proben vollständig durch die Extraktionsröhrchen geflossen sind, werden jeweils 3 ml Waschlösung auf die Röhrchen pipettiert. Anschließend werden aus dem Säulenbett mit einem Unterdruck von ca. 20 mmHg die Reste der Waschlösung abgesaugt. Die SPU-Absaugeinheit wird nun von “WASTE” auf “COLLECT” umgestellt, so daß im letzten Schritt, der Elution, der Durchfluß aus den Extraktionsröhrchen in den 10 ml-Glasgefäßen aufgefangen wird. Die Elution erfolgt durch Gabe von 1 ml Elutionsgemisch auf die Extraktionsröhrchen und nachfolgendes vollständiges Leersaugen des Säulenbettes.

2.1.2.4. Weiterverarbeitung der Proben

Aus den 10 ml-Glasgefäßen werden mit Hilfe von Pasteurpipetten die 1 ml-Glasgefäße mit Eluat gefüllt und mit Gummistopfen und Aluminiumkappe verschlossen und stehen anschließend für die Analyse im Autosampler bereit.

2.1.3. Geräte der HPLC

Filtrationseinheit SM 16309 Volumen: 250/1000 ml, mit Membranfilter: SM 11606 (Porengröße 0,45 mm) aus regenerierter Zellulose (Fa. Sartorius, Göttingen, BRD); Ultraschallgerät Sonorex TK 52 (Fa. Bandelin, Berlin, BRD); 2 HPLC-Pumpen Typ 364.00, Dynamische Mischkammer Typ 73249, Injektionsventil A0258, Verbindungselemente, Lambda-Selektor , Spektralphotometer Typ 87 (Fa. Knauer,

Berlin, BRD); Autosampler Marathon (Fa. Spark Holland, Emmen, Niederlande); Vorsäule Guard-Pak (Fa. Waters, Milford, USA); Analytische Säule Typ µBondapak C18, 300 x 3,9 mm, Partikelgröße 10 µm (Fa. Waters, Milford, USA); Integrator Chrom-a-Set und Software (Fa. Barspec, Rehovot, Israel); Rechnereinheit: Personal System/2 (Fa. IBM/Deutschland, Frankfurt, BRD).

2.1.4. Aufbau der HPLC

2.1.4.1. Filtration der Eluenten

Die Filtration sämtlicher, in der HPLC eingesetzter Lösungsmittel durch 0,45 µm regenerierte Zellulose dient dem Schutz der Pumpen und der Trennsäule vor größeren Schmutzpartikeln. Die Zellulosefilter eignen sich gleichermaßen für Wasser und organische Lösungsmittel.

2.1.4.2. Entgasung der Eluenten

Es standen zwei Methoden der Entgasung der mobilen Phase zur Wahl: die kontinuierliche Einleitung von Helium in die Eluenten und das zehnminütiges Ultraschallbad der Eluenten. Beide Methoden lieferten mit dieser HPLC-Anlage einwandfreie Ergebnisse. Aufgrund des geringeren apparativen Aufwands, kommt die Entgasung mit dem Ultraschallbad zum Einsatz.

2.1.4.3. HPLC-Pumpen

Die verwendeten Pumpen (Fa. Knauer, Typ 64) sind Zweikolbenpumpen mit Förder- und Ausgleichskolben, die einen Förderhub von nur 20 µl aufweisen. Pulsationen, also Schwankungen des Förderdrucks, werden durch den kleinen Hub und die damit verbundene hohe Pumpfrequenz weitgehend reduziert (<1% bei Maximaldruck), was letztlich zu einem geringeren Grundrauschen bei der Detektion führt. Die parallele Anordnung der Pumpen erlaubt sowohl isokratische (konstantes Verhältnis der Eluenten), als auch Gradientenelution (variables Verhältnis der Eluenten). Die Flußsteuerung durch ein externes Signal macht auch mehrteilige, zeitgesteuerte Gradientenelutionen möglich.

2.1.4.4. Mischkammer

Die dynamische Mischkammer ist in der beschriebenen Anlage erforderlich, um während der Gradientenelution eine möglichst homogene Mischung der unterschiedlichen Lösungsmittel bei kleinstmöglichem Volumen zu erzielen.

2.1.4.5. Injektionssystem

Das Injektionssystem besteht aus einem Sechswegeventil und einer Probenschleife mit einem Volumen von 100 µl. Die Probenaufgabe erfolgt mit dem automatischen Probengeber. Das Injektionssystem ist in den Autosampler integriert.

2.1.4.6. Verbindungselemente

Es kommen ausschließlich Edelstahlkapillaren zum Einsatz. Alle Verbindungen des Hochdruckteils der Anlage zeichnen sich durch einen niedrigen Innendurchmesser aus, um ein möglichst geringes Volumen zu erzielen.

2.1.4.7. Autosampler

Der eingesetzte Autosampler macht die serielle Analyse von bis zu 96 verschiedenen Proben möglich. Vor jeder Injektion einer Probe wird die Probenschleife automatisch mit 100 µl Wasser gereinigt und mit 230 µl Probe durchflossen, um Verunreinigungen aus vorangegangenen Probeninjektionen auszuschließen.

2.1.4.8. Vorsäule

Die Vorsäule kommt zum Einsatz, um die Trennsäule vor Verschmutzung chemischer oder mechanischer Art zu schützen. Die Vorsäule wird direkt vor die Trennsäule geschaltet. Das Füllungsmaterial der Vorsäule entspricht dem der Trennsäule (C 18-gebundenem Kieselgel).

2.1.4.9. Chromatographische Trennsäule

Die µBondapak C18-Säule mit einer Länge von 300 mm und einem Innendurchmesser von 3,9 mm gewährleistet bei einer Partikelgröße vom 10 µm eine optimale Trennung in reversed-phase Technik bei einem adäquaten Pumpendruck.

2.1.4.10. Lambda-Selektor und Spektralphotometer

Der Lambda-Selektor erlaubt eine zeitabhängig programmierbare Wellenlängenumschaltung während einer singulären chromatographischen Untersuchung. Das Spektralphotometer stellt einen Detektor mit variabler Wellenlänge dar, der die Lichtabsorption im UV-Bereich (190 - 400 nm) bei einer vom Lambda-Selektor gesteuerten Wellenlänge mißt.

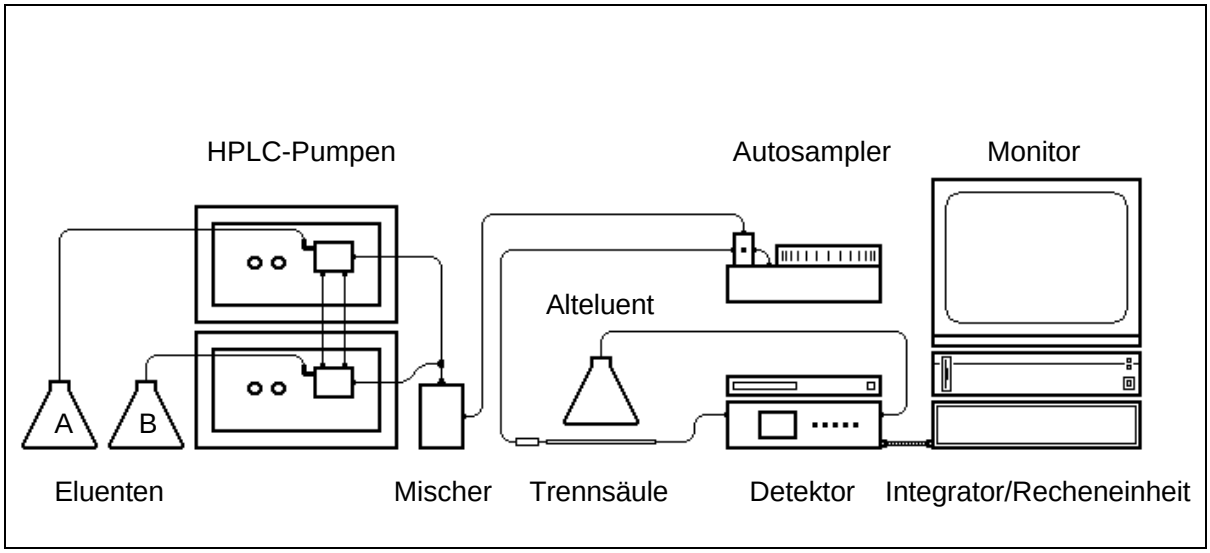
2.1.4.11. Integrator und Software

Die quantitative Auswertung des Detektorensignals erfolgt durch den Integrator und die nachgeschaltete Recheneinheit. Der Integrator wandelt das analoge Signal des Spektralphotometers in ein digitales Signal um. In der Recheneinheit erfolgt die Speicherung und Analyse der Chromatogramme.

2.1.4.12. Übersicht der HPLC-Anlage

In Abbildung 3 ist der schematische Aufbau der HPLC-Anlage dargestellt. Die Verbindungslinien entsprechen den Edelstahlkapillaren. Die Steuerung der Pumpen, der Detektoreinheit und des Autosamplers erfolgt automatisch über die Recheneinheit.

ABBILDUNG 3: Schematische Darstellung des chromatographischen Meßplatzes



2.1.5. Chemikalien

Pyrimethamin [2,4-diamino-5-(4-chlorophenyl)-6-ethylpyrimidine] (zur Verfügung gestellt von Fa. Wellcome, Beckenham, England); Dapson (4,4'-diaminodiphenyl sulphone) (zur Verfügung gestellt von Fa. Wellcome, Beckenham, England); Monoacetyldapson (4-N-acetylamino-4'-aminodiphenyl sulphone) (zur Verfügung gestellt von Fa. Wellcome, Beckenham, England); Sulfadimethoxin (interner Standard) (N^1-3,5-dimethoxy-4-pyrimidinyl-sulphanilamide) (zur Verfügung gestellt von Fa. Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, BRD); Salzsäure (Fa. E. Merck, Darmstadt, BRD); Methanol (LiChrosolv, gradient grade) (Fa. E. Merck, Darmstadt, BRD); Acetonitril (LiChrosolv, gradient grade) (Fa. E. Merck, Darmstadt, BRD); Wasser (bidestilliert) (Fa. Braun, Melsungen, BRD); PIC-B5 (Wasser, Methanol, Pentansulfonsäure, Kalziumazetat) (Fa. Waters, Milford, USA); PIC-B6 (Wasser, Methanol, Hexansulfonsäure, Kalziumazetat) (Fa. Waters, Milford, USA).

2.1.6. Stamm- und Standardlösungen

Die Stammlösungen der Pharmaka und des internen Standards (IS) wurden mit einer Präzisionswaage eingewogen. Als Lösungsmittel diente Methanol. Die Stammlösungen wiesen folgende Konzentrationen auf: Pyrimethamin 0,5 mg/ml; Dapson 1,0 mg/ml; Monoacetyldapson 0,25 mg/ml; Sulfadimethoxin (interner Standard) 1,0 mg/ml. Diese Grundverdünnungen dienen zur Herstellung wässeriger

Standardlösungen (Tabelle 5), aus denen die für die Kalibration benötigten Konzentrationen ausgewählt werden. Sämtliche Lösungen werden bei +4°C aufbewahrt.

TABELLE 5: Standardlösungen von PYR, DDS und MADDS

STANDARD	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Verdünnung	1:5	1:10	1:20	1:50	1:100	1:200	1:500	1:1000	1:5000
PYR	100	50	25	10	5	2,5	1,0	0,5	0,1
DDS	200	100	50	20	10	5	2	1	0,2
MADDS	50	25	12,5	5	2,5	1,25	0,5	0,25	0,05

Alle Konzentrationsangaben in µg/ml

2.2. Entwicklung der Probenaufbereitung

2.2.1. Auswahl der grundlegenden Methode

Als Probenaufbereitung wurde bei den bisher beschriebenen Methoden zur Bestimmung von DDS, MADDS und PYR die zeitaufwendige Flüssig-Flüssig-Extraktion eingesetzt. Daher sollte eine Flüssig-Fest-Extraktion als Probenaufbereitung mit einmal verwendbaren reversed-phase Extraktionsöhrchen etabliert werden. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften von DDS, MADDS und PYR wurde als Füllungsmaterial (Adsorbens) ein ebenfalls hydrophobes reversed-phase Kieselgel gewählt. Dieses gewährleistet eine möglichst starke, jedoch reversible Bindung zwischen der stationären Phase und den zu analysierenden Substanzen.

Die reversed-phase Festphasenextraktion gliedert sich prinzipiell in drei Teile. 1.) RETENTION: Hydrophobe Substanzen in einem wässerigem Medium fließen durch ein Säulenbett mit einem ebenfalls hydrophoben Adsorbens. Die hydophoben

Substanzen lagern sich an das Adsorbens an. 2.) WASCHEN: Mit einer Spülflüssigkeit werden hydrophile Verunreinigungen entfernt. 3.) ELUTION: In dem letzten Schritt trennt ein stark hydrophobes Lösungmittel die Bindung der gesuchten Substanzen mit dem Adsorbens. Das so gewonnene Eluat enthält die gesuchten Substanzen und nur noch wenige Verunreinigungen, und kann so einer quantitativen Analyse zugeführt werden.

2.2.2. Chromatographische Bedingungen und Konditionierung

Die Entwicklung der Probenaufbereitung als Festphasenextraktion für DDS, MADDS und PYR erforderte konstante chromatographische Bedingungen für die HPLC. Diese Bedingungen basierten auf der von Edstein et al. beschriebenen Methode. (Analytische Säule: µBondapak C18, 300 x 3,9 mm, Mobile Phase: Wasser/Methanol/Acetonitril = 65/25/15, 0,005 M Pic B5 low UV, Fließgeschwindigkeit: 1,5 ml/min.). Während der Entwicklung der Methode der Probenaufbereitung wurde jeder Schritt der Festphasenextraktion (RETENTION, WASCHEN, ELUTION) isoliert erarbeitet. Die Analyse im wässerigen Medium diente der Optimierung und Überprüfung der einzelnen Probenaufbereitungsschritte.

2.2.3. Kapazitätsprüfung mit DDS, MADDS, PYR und IS in Wasser

Um einen Verdünnungseffekt bei der finalen Elution der Substanzen aus den Extraktionsröhrchen zu vermeiden, mußte das Füllungsvolumen dieser Säulen gering sein. Andererseits galt es eine ausreichende Kapazität des Säulenbettes zu gewährleisten. Die Füllungsmenge von 500 mg der Varian Bond Elut®-Röhrchen sicherte eine zufriedenstellende Kapazität bei kleinem Volumen. Eine Überschreitung der Kapazität der vorher konditionierten Röhrchen trat erst ab einer Konzentration von 500 mg DDS, 500 mg MADDS oder 500 mg PYR pro ml auf.

2.2.4. Retentionsprüfung mit DDS, MADDS, PYR und IS in Wasser

1 ml einer wässerigen Lösung mit 10 mg DDS, 10 mg MADDS, 10 mg PYR und 10 mg IS wurde auf die Extraktionsröhrchen gegeben und der Durchfluß analysiert. Es waren keine spezifischen Peaks nachweisbar, d.h. die Retention der Substanzen auf den Extraktionsröhrchen war vollständig.

2.2.5. Elutionsversuche mit DDS, MADDS, PYR und IS in Wasser

Ziel der Elutionsversuche war es, einen Eluent zu entwickeln, der die zu analysierenden Substanzen mit nur 1 ml Volumen vollständig eluiert. Unter dieser Voraussetzung (Elutionsvolumen gleich Probenvolumen) wurde eine Verdünnung, und damit Verluste der Empfindlichkeit vermieden. Eine weitere Forderung war, den Eluenten nach Durchfluß durch die Extraktionsröhrchen direkt auf die Säule geben zu können, um ein zeitaufwendiges Verdampfen zu umgehen. Ferner sollte der Eluent möglichst polar sein, um geringe Peakbreiten und damit gute Trennungskoeffizienten für die gesuchten Substanzen zu erhalten. Als geeignetster Eluent konnte eine Mischung von Methanol/Acetonitril/0,1 N Salzsäure = 1/1/1 ermittelt werden. Mit diesem Eluent konnten über 98% von DDS, MADDS, PYR und IS in 1 ml eluiert werden.

2.2.6. Verarbeitung von Plasmaproben

Zur Ermittlung der optimalen Probenaufbereitung von Plasmaproben wurden “spiked” Plasma (1000 ml Plasma, 100 ml DDS/MADDS/PYR-Lösung, 200 ml IS-Lösung, 900 ml 0,1 N HCl) und Leerplasma (1000 ml Plasma, 300 ml Wasser, 900 ml 0,1 N HCl) verwendet. Als “spiked” Plasma bezeichnet man Blutplasma, welches mit einer definierten Menge Pharmaka versetzt wurde. Leerplasma dagegen enthält keine Medikamente. Die Ansäuerung der Plasmaproben war notwendig, um die hohe Proteinbindung der Pharmaka zu lösen.

2.2.7. Prüfung verschiedener Waschlösungen

Es wurden jeweils 3 ml der Waschlösungen a) 100% Wasser, b) 90% Wasser/10% Methanol, c) 80% Wasser/20% Methanol auf konditonierte und mit “spiked” Plasma bzw. Leerplasma beladene Extraktionsröhrchen gegeben. Bei den Waschlösungen mit organischem Anteil zeigte sich eine zusätzliche Interferenz im Retentionsbereich des Pyrimethamin-Peaks. Folglich wurde weiterhin auf Wasser als Waschsubstanz bei der Probenaufbereitung zurückgegriffen.

2.2.8. Retentions- und Elutionsprüfung mit Plasmaproben

Die Überprüfung der Probenaufbereitungsmethode für Plasmaproben erfolgte mit der Retentionsprüfung und Elutionsprüfung in Plasma. In diesem Versuchsabschnitt wurde jeder Schritt (1-7) der Probenaufbereitung einzeln kontrolliert. Die Analyse der Probenschritte zeigte Verluste von weniger als 5 % bei DDS, MADDS, PYR und IS.

(Schritt 1) Die angesäuerten Proben wurden auf die zuvor konditionierten Extraktionsröhrchen gebracht. Ohne Unterdruck aus der Absaugeinheit traten die Proben durch die Extraktionsröhrchen. Der Durchfluß enthielt keine der Pharmaka. Auch eine nochmalige Ansäuerung des Durchflusses mit 900 ml 0,1 N HCl setzte keine der gesuchten Substanzen frei, die Retention war also vollständig. (Schritt 2-4) Auf die C18-Säulen wurden dreimal je 1 ml Wasser gegeben, wodurch polare Verunreinigungen aus dem Säulenbett gewaschen wurden. Der nachweisbare Verlust der Pharmaka betrug bei

Schritt 2: DDS 0,4 %, MADDS 0,9 %, PYR 1,8 %, IS 0,0 %,
Schritt 3: DDS 0,0 %, MADDS 0,0 %, PYR 0,5 %, IS 0,0 %,
Schritt 4: DDS 0,0 %, MADDS 0,0 %, PYR 0,5 %, IS 0,0 %.

(Schritt 5) Danach wurde das in dem Säulenbett verbliebene Wasser unter Sog entfernt. Auch hier waren keine Verluste nachweisbar. (Schritt 6) Nun wurden mit 1 ml Eluent (Methanol/Acetonitril/0,1 N Salzsäure = 1/1/1) die Substanzen, zuerst nur unter Schwerkraft und dann der auf den Säulen verbleibende Rest unter Sog, eluiert. (Schritt 7) Bei einer zweiten Elution mit 1 ml Eluent (Methanol/Acetonitril/0,1 N Salzsäure = 1/1/1) waren keine Peaks mehr detektierbar, die erste Elution war also vollständig.

2.2.9. Zusammenfassung der Probenaufbereitung

Zunächst werden die Varian Bond Elut® Extraktionsröhrchen auf die Adsorbex® SPU-Absaugeinheit gesteckt. Die 500 mg Extraktionsröhrchen werden mit zuerst 3 ml Methanol und dann mit 3 ml Wasser konditioniert. Danach wird 1 ml Plasma mit 1 ml 0.1 molarer Salzsäure und 200 ml internem Standard (2 mg Sulfadimethoxin) versetzt und anschießend 10 Sekunden mit dem Vortex-Mischer geschüttelt. 2 ml

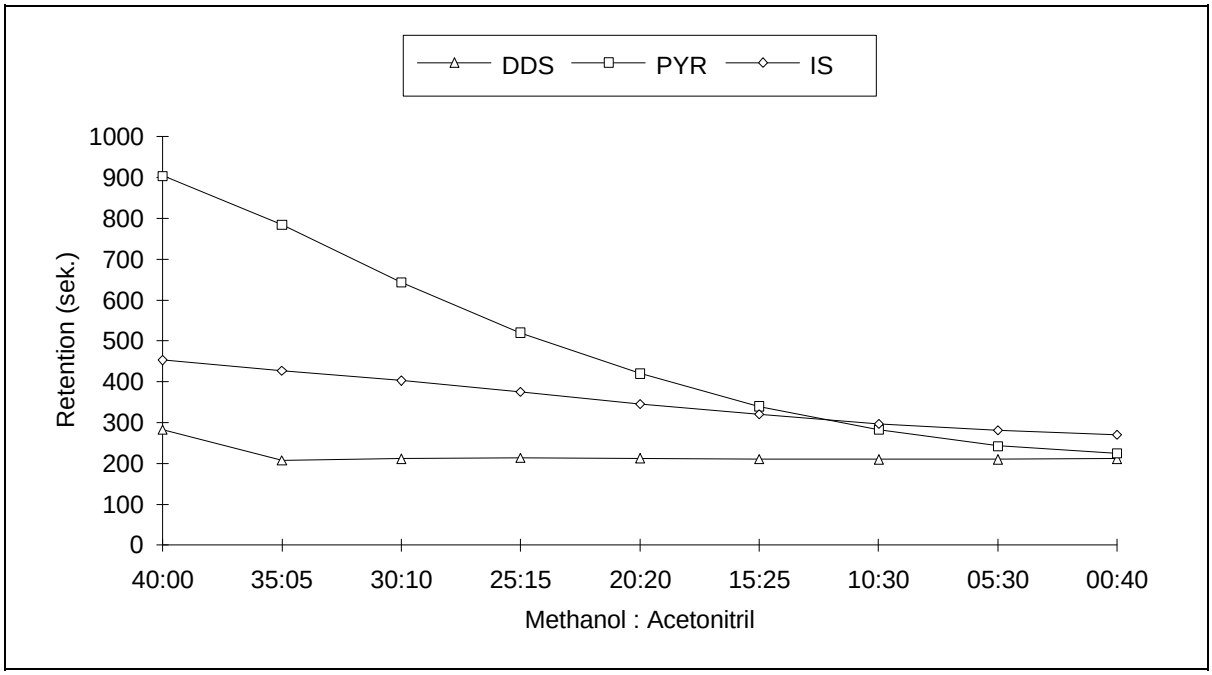
der Probe werden in das Extraktionsröhrchen pipettiert. Im nächsten Schritt wird das Röhrchen mit 3 ml Wasser gewaschen. Die Elution erfolgt mit 1 ml Methanol/ Acetonitril/0,1 N Salzsäure. 100 µl des durch das Extraktionsröhrchen geflossenen Eluats werden in die HPLC-Säule injiziert.

2.3. Entwicklung der HPLC-Methode

2.3.1. Variation der mobilen Phase mit Pic B5

Bei der von Edstein et al. etablierten Methode handelt es sich bei der HPLC um eine Reversed-Phase-Ion-pair-Chromatographie. Als Ion-pairing Substanz wurde PIC B5 (Hauptbestandteil Pentansulfonsäure) gewählt. Die geänderte Probenaufbereitung machte die Entwicklung neuer geeigneter chromatographischer Bedingungen notwendig. Um diesen Prozeß zu vereinfachen wurde von einem weitgehend identischem chromatographischem Verhalten von DDS und seinem Hauptmetaboliten MADDS ausgegangen. Daher wurde bei der systematischen Ermittlung der optimalen mobilen Phase nur DDS, PYR und IS eingesetzt. Bei konstantem Anteil von Wasser (60%) und konstanter Konzentration von Pic B5 (5 mmol/l) wurde das Verhältnis von Methanol zu Acetonitril systematisch variiert. Die resultierenden Retentionszeiten sind in Abbildung 4 wiedergegeben.

ABBILDUNG 4: Retentionszeiten bei Variation der organischen Eluenten

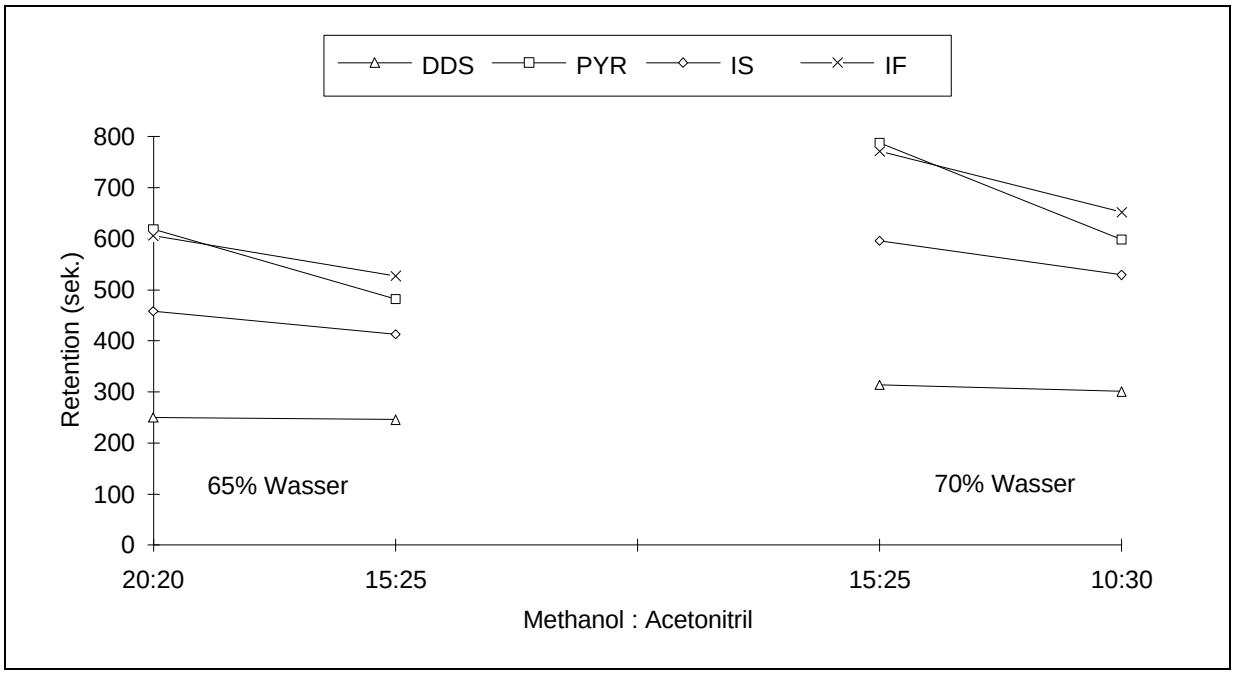


Wie aus der Abbildung 4 ersichtlich, nimmt die Retentionszeit von PYR mit zunehmendem Anteil von Acetonitril ab. Der gleiche Effekt läßt sich auch für IS nachweisen. Die Retentionszeit von DDS hingegen bleibt von der Variation des Methanol/Acetonitril-Quotienten weitgehend unbeeinflußt. Mit der in dieser Arbeit

etablierten Probenaufbereitung waren stets Peaks aus polaren Plasmabestandteilen zu Beginn der Chromatogramme zu beobachten. Die Retentionszeiten dieser Plasmapeaks bewegten sich etwa im Bereich von 110-190 Sekunden. Bei Retentionszeiten um 210 Sekunden für DDS war eine ausreichende Trennung von diesen frühen Plasmapeaks nicht gewährleistet. Nur die mobile Phase mit ausschließlich Methanol als organischem Anteil ergab Retentionszeiten für DDS von 283 Sekunden. Jedoch brachte diese mobile Phase einen zu späten Peak von Pyrimethamin hervor.

Aufgrund der unbefriedigenden Trennung von DDS und Plasmapeaks wurde eine Verminderung der Fließmittelstärke erforderlich, um längere Retentionszeiten für DDS zu erhalten. Das konnte durch eine Erhöhung des Wasseranteils von 60% auf 65% bzw. 70% erreicht werden. Die Retentionszeiten der Substanzen und einem interferierenden Peak (IF) für den jeweiligen Wasseranteil, bei optimalem Methanol/ Acetonitril-Quotienten, sind in Abbildung 5 dargestellt.

ABBILDUNG 5: Retentionszeiten bei höherem Wasseranteil



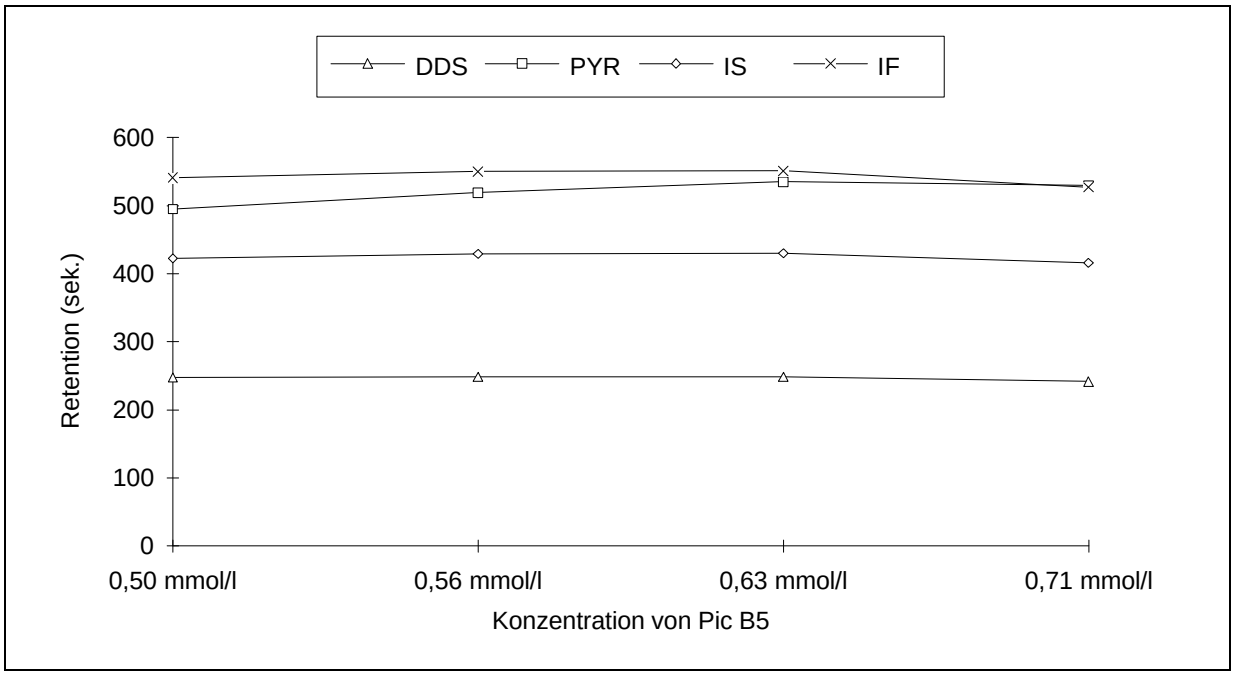
Die Trennung von DDS und den frühen Plasmapeaks war teilweise akzeptabel. Die Interferenz (IF) im Bereich von Pyrimethamin (Abbildung 5) machte diese Eluenten jedoch ungeeignet. Daher war mit dem Ionenpaar-Reagenz Pic B5 (Hauptbestandteil

Pentansulfonsäure), bei einer Konzentration von 5 mmol/l, ein ausreichende Trennung der Pharmaka von den angrenzenden Interferenzen nicht möglich.

2.3.2. Variation der Pic B5 Konzentration

In diesem Reihenversuch wurde bei konstantem Verhältnis der drei Lösungsmittelkomponenten (Wasser/Methanol/Acetonitril:65/15/25) die Konzentration von Pic B5 in der mobilen Phase systematisch variiert (Abbildung 6).

ABBILDUNG 6: Retentionszeiten bei Variation der Konzentration von Pic B5

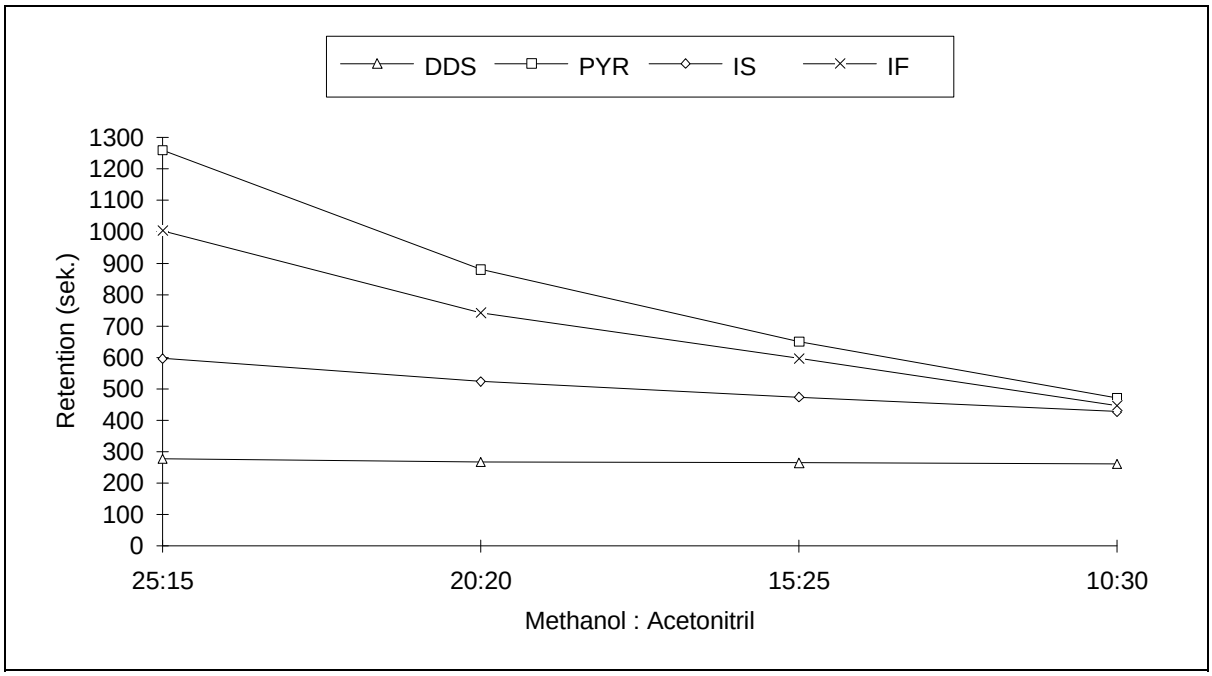


Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, verschlechterte eine Erhöhung der Pic B5-Konzentration die Trennung von PYR und der endogenen Interferenz (IF). Eine niedrigere Pic B5 Konzentration war durch die dann unzureichende Trennung von DDS und MADDS ebenfalls ungeeignet.

2.3.3. Erfolgreiche Variation der mobilen Phase mit Pic B6

Aufgrund der Retentionszeiten der auftretenden endogenen Interferenzen, bei Verwendung des Ionenpaar-Reagenz Pic B5, wurde Pic B6 (Hauptbestandteil Hexansulfonsäure) in der Konzentration von 5 mmol/l eingesetzt. Bei konstantem Anteil von Wasser (65 %) und konstanter Konzentration von Pic B6 (5 mmol), wurde das Verhältnis von Methanol und Acetonitril in Anlehnung an die Ergebnisse aus den Reihenversuchen mit Pic B5 variiert. Die Retentionszeiten in Abhängigkeit von dem Verhältnis der organischen Anteile der mobilen Phase sind in Abbildung 7 wiedergegeben.

ABBILDUNG 7: Retentionszeiten unter Variation der organischen Eluenten mit Pic B6



Eine optimale Trennung bei möglichst kurzen Analysenzeiten wurde bei einem Verhältnis von Methanol zu Acetonitril (20 : 20) erreicht. Eine endogene Interferenz in dem Retentionszeitenbereich von PYR war nicht mehr zu beobachten. Das Ionenpaar-Reagenz PIC B6 und ein Methanol/Acetonitril-Verhältnis von 1 : 1 wurde damit für die mobile Phase der HPLC-Methode festgelegt.

2.3.4. Gradientenelution

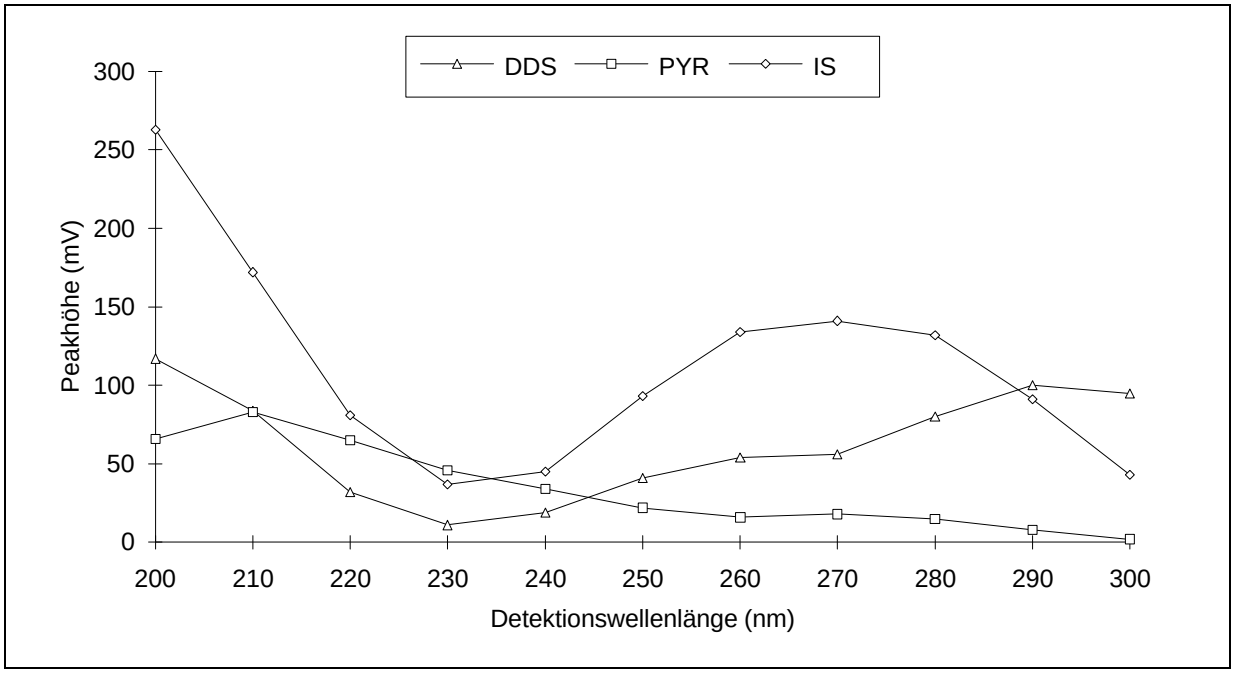
Um die Analysenzeit zu verkürzen und die Empfindlichkeit für Pyrimethamin zu erhöhen, wurde eine Gradientenelution eingesetzt. Als optimal erwies sich folgender Gradient: Lösung A: 5,0 mmol/l Pic B6 (Hexansulfonsäure) in Wasser; Lösung B: Methanol : Acetonitril = 1 : 1.

0-5	Minuten	Lösung A: 65 %; Lösung B: 35 %
5-15	Minuten	Lösung A: von 65 % auf 55 % linear abfallend
		Lösung B: von 35 % auf 45 % linear ansteigend
15-20	Minuten	Lösung A: 65 %; Lösung B: 35 %

2.3.5. Detektionswellenlängen für DDS, PYR und IS

Um die Empfindlichkeit der Methode zu erhöhen, wurde die optimale Detektionswellenlänge von DDS, PYR und IS ermittelt. “Spiked” Plasma wurde nach beschriebener Probenaufbereitung auf die Säule gegeben und die Wellenlänge im Bereich von 200 nm bis 300 nm systematisch variiert (Abbildung 8).

ABBILDUNG 8: Peakhöhen bei Variation der Detektionswellenlänge



Als Detektionswellenlänge für Dapson wurde das relative Absorptionsmaximum 295 nm gewählt. Ein weiterer Vorteil dieser Wellenlänge war die geringe Absorption der endogenen Interferenzen in dem Retentionsbereich von Dapson. Die Detektionswellenlänge 295 nm wurde auch für IS beibehalten, um ein häufiges Wechseln der Wellenlänge und damit Sprünge in der Basislinie, zu verhindern. Als Wellenlänge für Pyrimethamin wurde das Absorptionsmaximum 210 nm eingesetzt.

Für die Routineanalyse von Patientenplasmaproben wird der Lambda-Selektor auf folgende Detektionswellenlängen programmiert: 0-10 Minuten: 295 nm und 10-20 Minuten: 210 nm. In den Abbildungen 9 und 10 sind zwei repräsentative Chromatogramme wiedergegeben. Die Abbildung 9 zeigt ein Chromatogramm einer Plasmaprobe ohne Pharmaka und internen Standard. Dem ist in Abbildung 10 das Chromatogramm einer Probe mit “spiked” Plasma gegenübergestellt. Es zeigt sich eine ausreichende Trennung der Substanzen und die Abwesenheit von störenden Interferenzen. Unter diesen chromatographischen Bedingungen ergeben sich folgende Retentionszeiten: Dapson (4,62 Min.), Monoacetyldapson (5,95 Min.), Sulfadimethoxin (9,42 Min.) und Pyrimethamin (14,23 Min.).

ABBILDUNG 9: Chromatogramm einer Plasmaprobe ohne Pharmaka

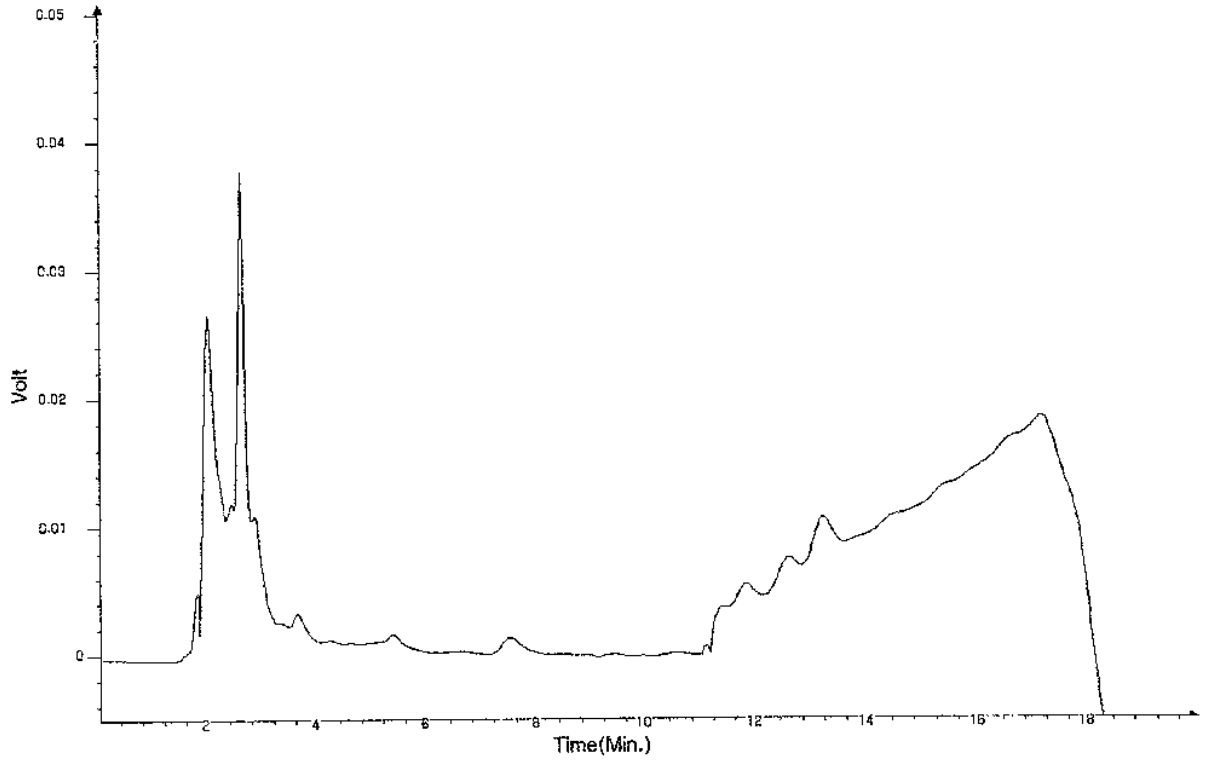
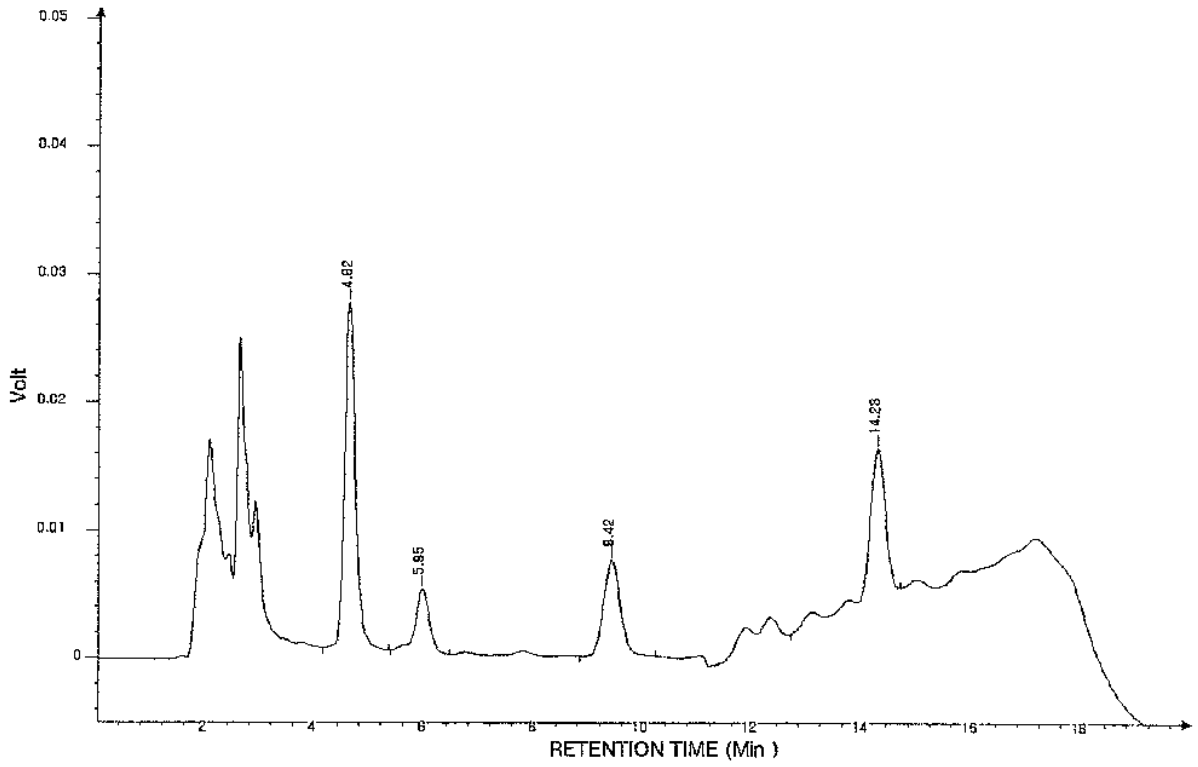


ABBILDUNG 10: Chromatogramm einer Plasmaprobe mit DDS (1,0 µg/ml), MADDS (0,25µg/ml), IS und PYR (0,5 µg/ml). Die Retentionszeiten von DDS (4,62 Min.), MADDS (5,95 Min.), IS (9,42 Min.) und PYR (14,23 Min.) sind entsprechend notiert.



2.3.6. Zusammenfassung der HPLC-Methode

Es wird eine µBondapak C-18 Säule eingesetzt. Die Gradientenelution erfolgt mit Methanol, Acetonitril, Wasser und Pic B6. Die Detektionswellenlänge beträgt 295 nm (DDS, MADDS, IS) und 210 nm (PYR). Die Retentionszeiten liegen im Bereich von 4,62 bis 14,23 Minuten.

2.4. Validierung der Methode

2.4.1. Kalibration und Auswertung

Die Kalibration erfolgt zu Anfang jeder Meßserie. Es werden vier Plasmaproben eingesetzt. Somit stehen für jedes der drei Pharmaka vier Eichpunkte zu Verfügung (Tabelle 6). Zur Herstellung werden 0.9 ml Plasma mit 0,1 ml der Standardlösungen

D-G (Tabelle 5, Seite 27) vermischt. Die weitere Verarbeitung vollzieht sich analog der Probenaufbereitung für die Patientenproben.

TABELLE 6: Kalibrationspunkte von PYR, DDS und MADDS.

EICHPUNKT	1	2	3	4
PYR (ng/ml)	100	250	500	1000
DDS (ng/ml)	200	500	1000	2000
MADDS (ng/ml)	50	125	250	500

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe der Barspec-Software auf der HPLC-Recheneinheit. Nach Basislinienbestimmung und Lokalisation der Peaks wird der Quotient Peakhöhe der Substanz geteilt durch Peakhöhe des internen Standards gebildet. Für jede Substanz wird aus den Quotienten der vier Eichpunkte mit Hilfe der linearen Regression eine Eichgerade errechnet. Anhand dieser Eichgerade werden die Spiegel der Patientenproben bestimmt.

2.4.2. Überprüfung der Methode

Wiederfindung: Die Wiederfindung der Probenaufbereitung ist ein Maß für die Vollständigkeit der Extraktion der gesuchten Substanzen aus der Probe. Die Wiederfindung wurde durch den Vergleich der Peakhöhen der Pharmaka nach Probenaufbereitung mit den Peakhöhen der Standardlösungen gleicher Konzentrationen in einem Leerplasmaextrakt ermittelt. Das Leerplasmaextrakt konnte durch Probenaufbereitung von Leerplasma gewonnen werden. Durch die Probenaufbereitung entstand eine Verdünnung von 10/11, da von 2,2 ml Plasma/interner Standard/Salzsäure nur 2,0 ml auf die präparativen Säulen gegeben wurden. Der Verdünnungsfaktor von 10/11 wurde bei der Bestimmung der Wiederfindung korrigiert.
Präzision: Die Bestimmung der Präzision erfolgte a) als Mehrfachanalyse (n=5) in einem Meßgang und b) als Analyse von Tag-zu-Tag (n=10). Bei beiden Teilen der

Präzisionsprüfung stammten alle Proben einer Serie aus der selben, mit Standard-lösung versetzten Plasmaportion.

Sensitivität: Als untere Erfassungsgrenze einer HPLC-Methode für eine Substanz ist die Konzentration festgelegt, deren Peakhöhe den Rauschpegel um das zweifache überschreitet. Die Signalhöhe der Peaks von DDS, MADDS und PYR in der Konzentration von 10 ng/ml wurde mit der Höhe des Detektorrauschens verglichen. Die Quantifizierungsgrenze hingegen definiert sich als die minimale Plasma-konzentration, bei der die Präzision von Tag-zu-Tag unter 15% liegt.

Spezifität: Die Spezifität der Methode wurde durch den Ausschluß von Interferenzen demonstriert. Es wurde Plasma von zwanzig verschiedenen HIV-seropositiven Patienten ohne Dapson/Pyrimethamin-Einnahme auf interferierende Peaks getestet.

2.5. Prophylaxe mit Pyrimethamin und Dapson

2.5.1. Patientenkollektiv

Die HIV-seropositiven Patienten wurden im Rahmen einer vergleichenden Studie (100 mg DDS + 25 mg PYR oder 500 mg SDX + 25 mg PYR) an der II. Medizinischen Klinik (Infektiologie) des UKRV, Berlin per Zufallsverteilung dem Dapson/Pyrimethamin-Prophylaxeregime zugeordnet. Einschlußkriterien waren primäre Pneumocystis carinii-Pneumonie oder primäre Toxoplasma gondii-Enzephalitis in der Krankengeschichte oder eine CD4-Zellzahl von unter 200/µl.

Das Prophylaxeregime sah eine Gabe von 100 mg DDS (2 Tabletten Dapson-Fatol®), 25 mg PYR (1 Tablette Daraprim®) und 15 mg Folinsäure (1 Tablette Leukovorin 15®) zweimal pro Woche vor. Die Tabletteneinnahme am Montag/Donnerstag oder Dienstag/Freitag wurde empfohlen. Der Abstand zwischen den Einnahmen betrug demnach abwechselnd drei und vier Tage.

Von 31 AIDS-Patienten wurden die Plasmaspiegel von DDS, MADDS und PYR aus 224 Blutproben bestimmt. Die Geschlechtsverteilung war 27 (87,1%) männliche zu 4 weiblichen (12,9%) Patienten. Von den 31 Patienten nannten 20 (64,5%) Homosexualität, 7 (22,6%) i.v.-Drogenabusus und 3 (9,7%) Heterosexualität als Risikofaktor. Ein Patient gab sowohl Homosexualität, als auch i.v.-Drogenabusus an. Bei vier Patienten war eine primäre zerebrale Toxoplasmose und bei sieben Patienten eine Pneumocystis carinii-Pneumonie der Anlaß zu Beginn einer

antiprotozoalen Prophylaxe. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich von Januar 1991 bis Juli 1995.

Die quantitativen Daten des Patientenkollektivs sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Anzahl der Leukozyten und der CD4 positiven Lymphozyten im Blut wurde bei Einschluß in die Studie bestimmt. Bei den Parametern Beobachtungszeitraum und mittlerer Probenabstand wurden nur Patienten mit mehr als einer Probe analysiert.

TABELLE 7: Charakteristische Daten der Patientenkollektivs

	Mittelwert	Median	SD*	Minimum	Maximum
Alter der Patienten (Jahre)	36,9	34	9,5	26	54
Beobachtungs-zeitraum (Tage)	445,2	375	357,2	22	1154
Anzahl der Proben	7,2	4	7,2	1	28
Mittlerer Proben-abstand (Tage)	72,4	64	39,6	22	222
CD4+ Zellzahl bei Beginn (Zellen/µl)	47,3	47	6,0	2	143
Leukozyten bei Beginn (Zellen/nl)	3,75	3,7	0,26	1,4	6,4

*Standardabweichung

2.5.2. Abnahme der Proben

Die Abnahme der Proben erfolgte im Rahmen von ambulanten Routineuntersuchungen in der Tagesklinik der II. Medizinischen Klinik oder während stationärer Aufenthalte. 224 Proben wurden analysiert. Die Proben wurden in fünf aufeinanderfolgenden Zeitabschnitten gewonnen: a) 4-12, b) 20-28, c) 44-52, d) 68-76 und e) 92-100 Stunden nach der Tabletteneinnahme.

2.5.3. Compliance

In der hier vorgestellten Arbeit wurde als Teilaspekt der Compliance die Einnahmetreue der HIV-seropositiven Patienten bei dem untersuchten Prophylaxeregime gemessen. Die Compliance der Tabletteneinnahme konnte anhand der Plasmaspiegel von DDS und PYR bestimmt werden. Pyrimethamin war mit einer Halbwertszeit von ca. 100 Stunden geeignet, die durch den “white coat effect” vorgespiegelte vollständige Medikamenteneinnahmetreue zu widerlegen. In die Auswertung der Medikamentenspiegel und der Einnahmetreue wurden nur Patienten mit vier oder mehr Blutprobenmessungen aufgenommen. Dieser Probenumfang war notwendig, um zwischen Compliance und Non-Compliance zu differenzieren.

3. ERGEBNISSE

3.1. Validität der Methode

3.1.1. Wiederfindung

Die Bestimmung der Wiederfindung der zu analysierenden Substanzen nach der Probenaufbereitung erfolgte als Mehrfachmessung (n=5) in dem jeweils relevanten Konzentrationsbereich. Die ermittelten Meßwerte zeigten eine Wiederfindung von 89 - 98% für Pyrimethamin, 85 - 90% für Dapson und 85 - 91% für Monoacetyldapson. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

TABELLE 8: Wiederfindung von PYR, DDS, und MADDS

Substanz	Konzentration (µg/ml)	Wiederfindung*(%)
PYR	0,05	98
	0,2	94
	1,0	89
	2,0	89
	5,0	89
Mittelwert ### SD		92 ### 4
DDS	0,05	89
	0,2	87
	1,0	90
	2,0	85
	5,0	87
Mittelwert ### SD		88 ### 2

MADDS	0,05	85
	0,2	89
	1,0	87
	2,0	86
	5,0	91
Mittelwert ### SD		88 ### 3

* Mittelwerte von fünf Bestimmungen für jede Konzentration
Die Umrechnung von µg/ml zu µmol/l erreicht man durch die Multiplikation mit dem Faktor 3,5 für MADDS (MG 290) und 4,0 für DDS (MG 248) und PYR (MG 249).

3.1.2. Präzision

Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde durch die Bestimmung der Präzision in der Serie und von Tag-zu-Tag ermittelt. Der Mittelwert der Variationskoeffizienten in den Serienversuchen lag bei 3,51 für Pyrimethamin, 1,21 für Dapson und 1,89 für Monoacetyldapson. In den Versuchen an aufeinanderfolgenden Tagen zeigten sich mit 4,13 für Pyrimethamin, 4,92 für Dapson und 5,15 für Monoacetyldapson erwartungsgemäß größere mittlere Variationskoeffizienten. Die vollständigen Daten der Präzisionsversuche sind in Tabelle 9 dargestellt.

TABELLE 9: Variationskoeffizienten von PYR, DDS und MADDS in Serie und von Tag-zu-Tag

	Konzentration (###g/ml)	Variationskoeffizient in Serie (n = 5)	Variationskoeffizient von Tag-zu-Tag (n = 10)
PYR	0,10	5,59	4,36
	0,25	4,71	5,16
	0,50	1,91	4,69

	1,00	1,84	2,31
Mittelwert ### SD		3,51 ### 1,92	4,13 ### 1,26
DDS	0,20	1,26	6,92
	0,50	0,89	4,92
	1,00	1,47	4,00
	2,00	1,20	3,84
Mittelwert ### SD		1,21 ### 0,24	4,92 ### 1,42
MADDS	0,05	3,87	6,99
	0,125	1,24	5,08
	0,25	1,52	4,08
	0,50	0,93	4,43
Mittelwert ### SD		1,89 ### 1,34	5,15 ### 1,30

Die Umrechnung von µg/ml zu µmol/l erreicht man durch die Multiplikation mit dem Faktor 3,5 für MADDS (MG 290) und 4,0 für DDS (MG 248) und PYR (MG 249).

3.1.3. Sensitivität

Um die untere Erfassungsgrenze (Signal/Rauschpegel > 2) zu ermitteln, wurden die Substanzpeaks bei 10 ng/ml gemessen. Daraus resultierte eine konzentrationsabhängige Signalhöhe von 0,017 mV*ml/ng für PYR, 0,021 mV*ml/ng für DDS und 0,020 mV*ml/ng MADDS. Das Detektorrauschen lag unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen bei 0,05 mV. Als Nachweisgrenze (limit of detection) ergaben sich somit 6 ng/ml für Pyrimethamin und 5 ng/ml für Dapson und Monoacetyldapson.

Als Quantifikationsgrenze (Präzision < 15%) für die drei Substanzen konnte eine Konzentration von 15 ng/ml bei Verwendung von 1,0 ml Plasmaproben ermittelt werden. Die mittleren Variationskoeffizienten (n=10) betrugen 14,8 (PYR), 13,8 (DDS) und 12,3 (MADDS).

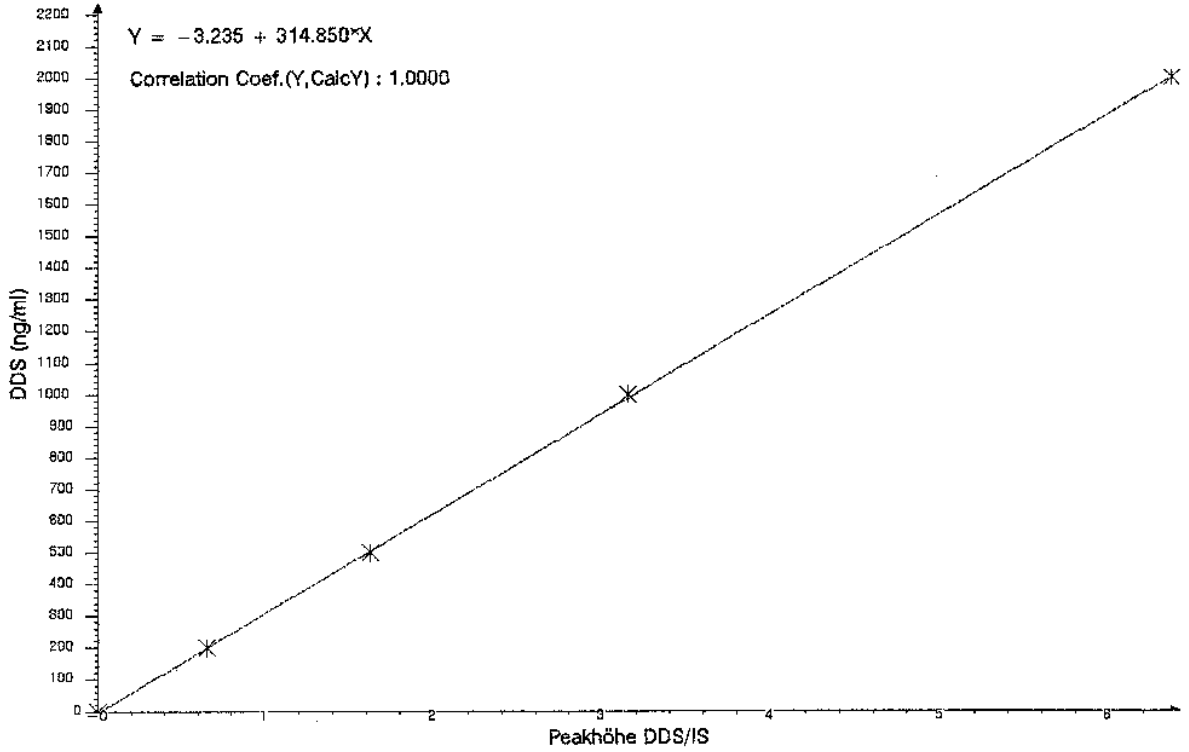
3.1.4. Spezifität

Die Spezifität konnte durch die Analyse von zwanzig Plasmaproben HIV-infizierter, und medikamentös behandelter Patienten nachgewiesen werden. Es fanden sich keine Interferenzen mit Aciclovir, Clindamycin, Ketoconazol, Levomethadon, Ofloxacin, Pentamidin, Phenytoin oder Zidovudin. Lediglich das in der Prophylaxe mit Fansidar® enthaltene Sulfadoxin interferierte mit dem Dapsonpeak.

3.1.5. Linearität

Die Kalibration erfolgt mit Hilfe von vier relevanten Eichpunkten für jede der drei Substanzen. Die Eichpunkte zeigen einen linearen Verlauf in der Regressionsanalyse. Die Korrelationskoeffizienten liegen bei 0,9995 - 1,0. In Abbildung 11 und Abbildung 12 sind repräsentative Kalibrationskurven wiedergegeben.

ABBILDUNG 11: Repräsentative Kalibrationskurven von DDS und MADDS



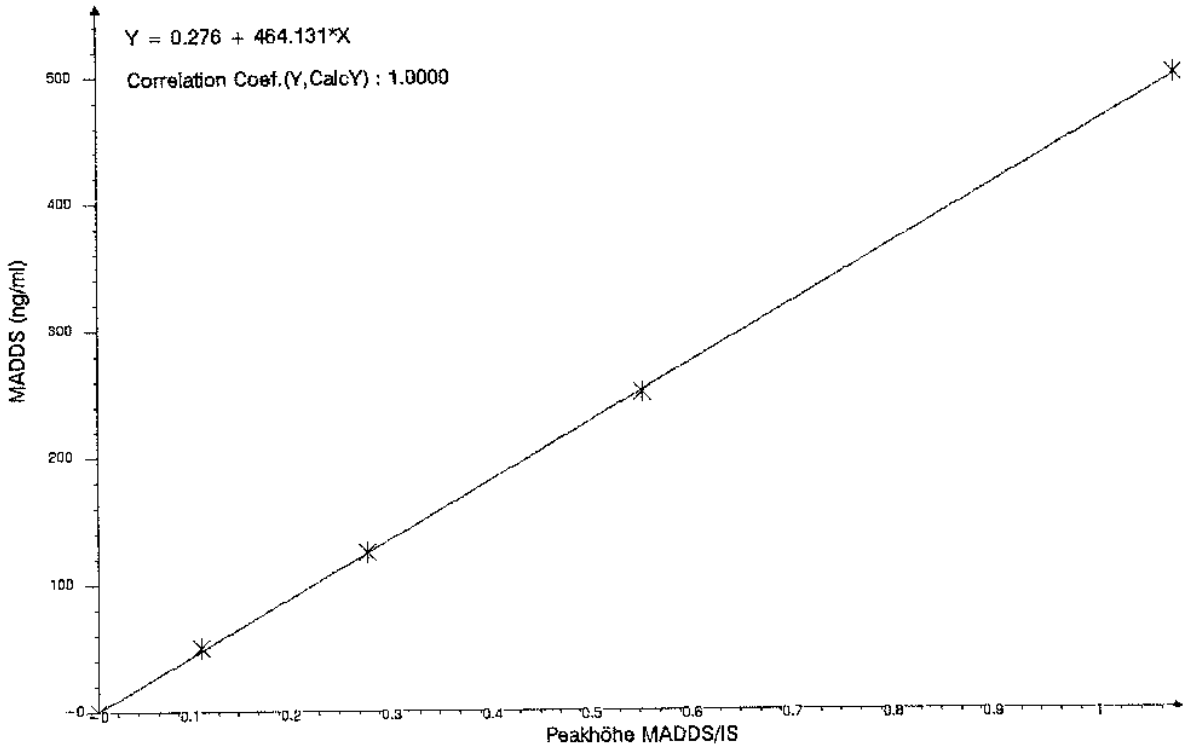
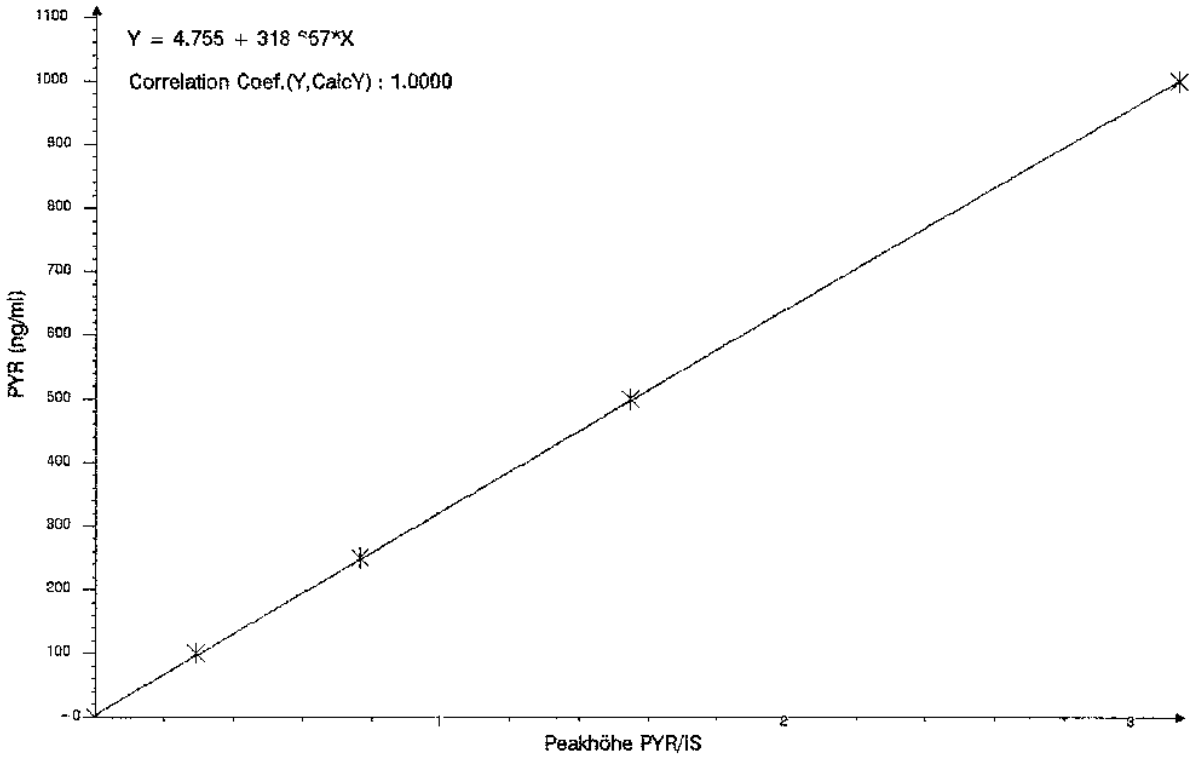


ABBILDUNG 12: Repräsentative Kalibrationskurve von Pyrimethamin



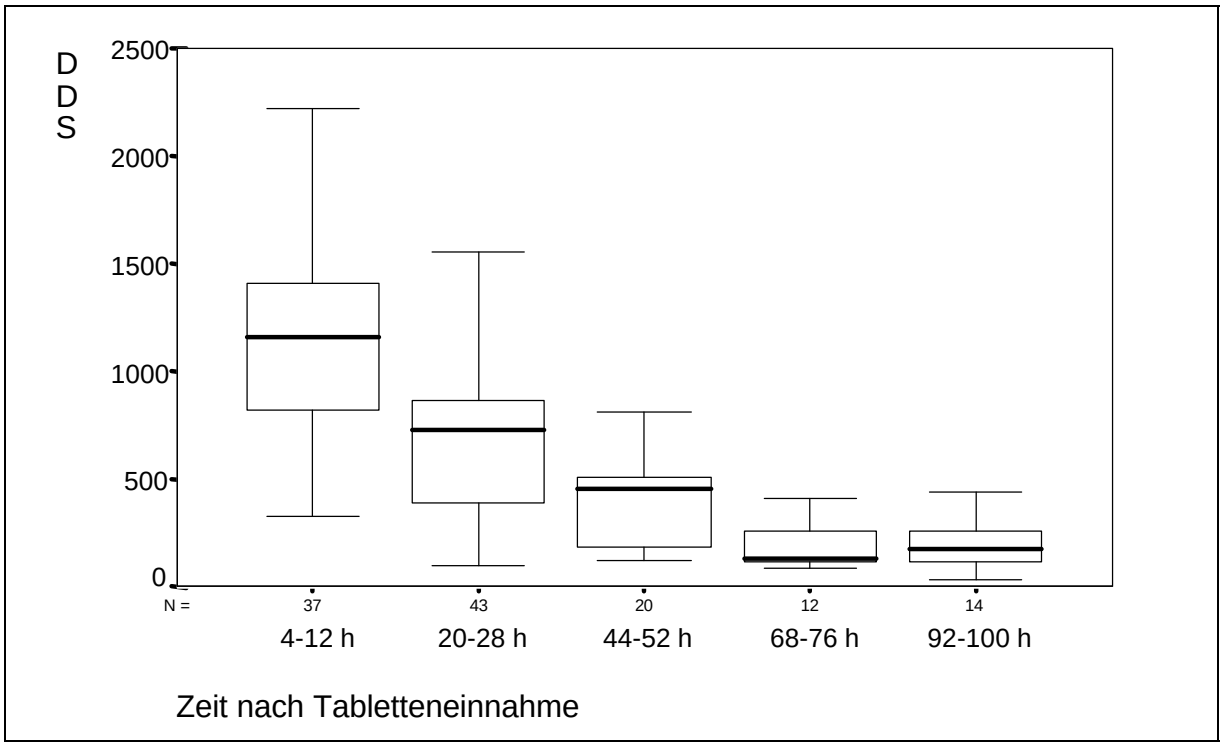
3.2. Compliance

In die Auswertung der Medikamentenspiegel und der Einnahmetreue wurden nur Patienten mit vier oder mehr Blutprobenmessungen aufgenommen. Dieser Probenumfang war notwendig, um zwischen Compliance und Non-Compliance zu differenzieren. 20 der 31 Patienten erfüllten dieses Kriterium. Von elf Patienten waren weniger als vier Blutproben vorhanden. Sechzehn Patienten (80%) wurden als compliant klassifiziert. Vier Patienten (20%) wurden als non-compliant eingestuft.

3.3. Medikamentenspiegel

Zur pharmakokinetischen Auswertung wurden nur Meßwerte der sechzehn als compliant klassifizierten Patienten herangezogen. Die Plasmakonzentrationen für Dapson lagen im Bereich von 36,1-2220,2 ng/ml. Der arithmetische Mittelwert aller Meßwerte betrug 675,9 ng/ml, der Median 557,2 ng/ml. Der zeitliche Verlauf der medianen Plasmakonzentrationen im steady-state Bereich zeigte eine Kinetik erster Ordnung mit einer Halbwertszeit von t½ = 30,4 Stunden. In Abbildung 13 sind die Plasmawerte in Abhängigkeit von der Anzahl an Stunden nach der Medikamenteneinnahme als Boxplots dargestellt.

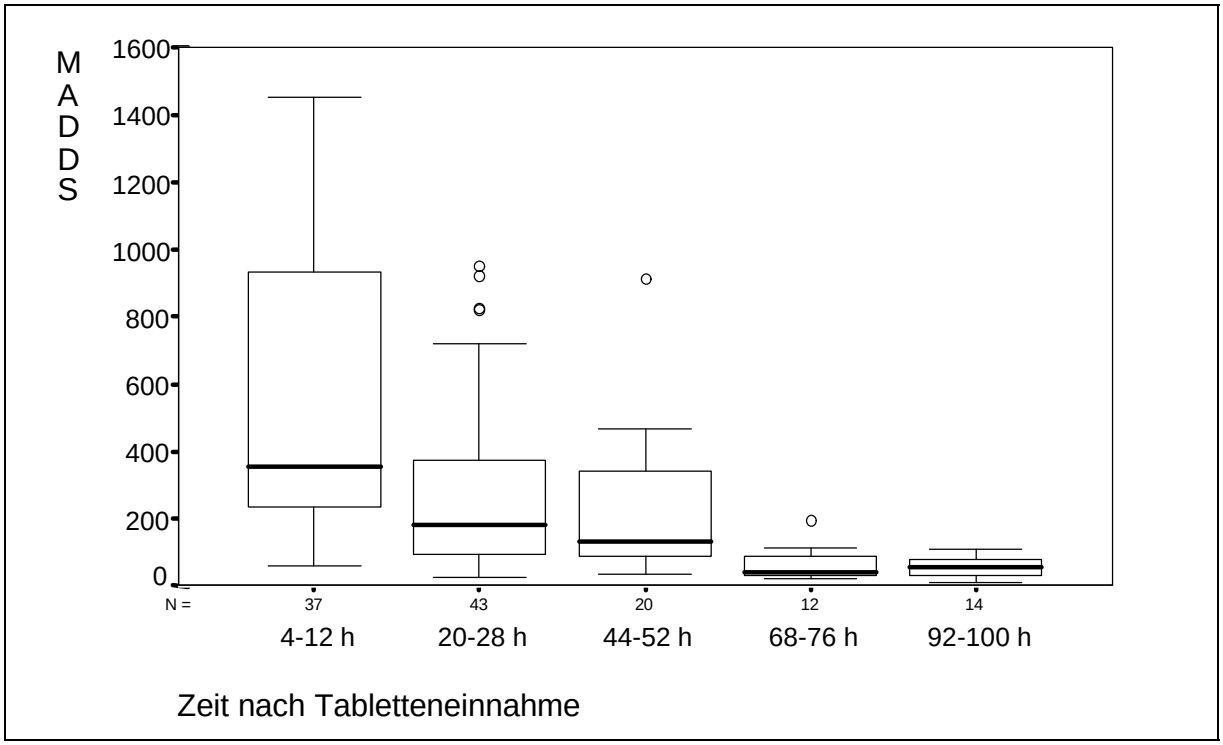
ABBILDUNG 13: Boxplots der steady-state Plasmaspiegel von Dapson in ng/ml



Die sogenannten Boxplots bestehen aus Rechtecken, die 50% der Werte zwischen der 25. und 75. Perzentile beinhalten und Extensionslinien, welche die Minimal- und Maximalwerte darstellen. Die Mediane sind durch horizontale Balken innerhalb der Rechtecke angegeben. Extremwerte sind als Kreise und Sterne eingetragen.

Der Hauptmetabolit Monoacetyldapson war im Konzentrationsbereich von 13,2-1452,3 ng/ml nachweisbar. Der arithmetische Mittelwert war 675,9 ng/ml, der Median 557,2 ng/ml. Der zeitliche Verlauf der medianen MADDS-Werte zeigte ebenfalls eine Kinetik erster Ordnung. Die Halbwertszeit belief sich auf t½ = 31,4 Stunden.
Abbildung 14 zeigt die entsprechenden Boxplots.

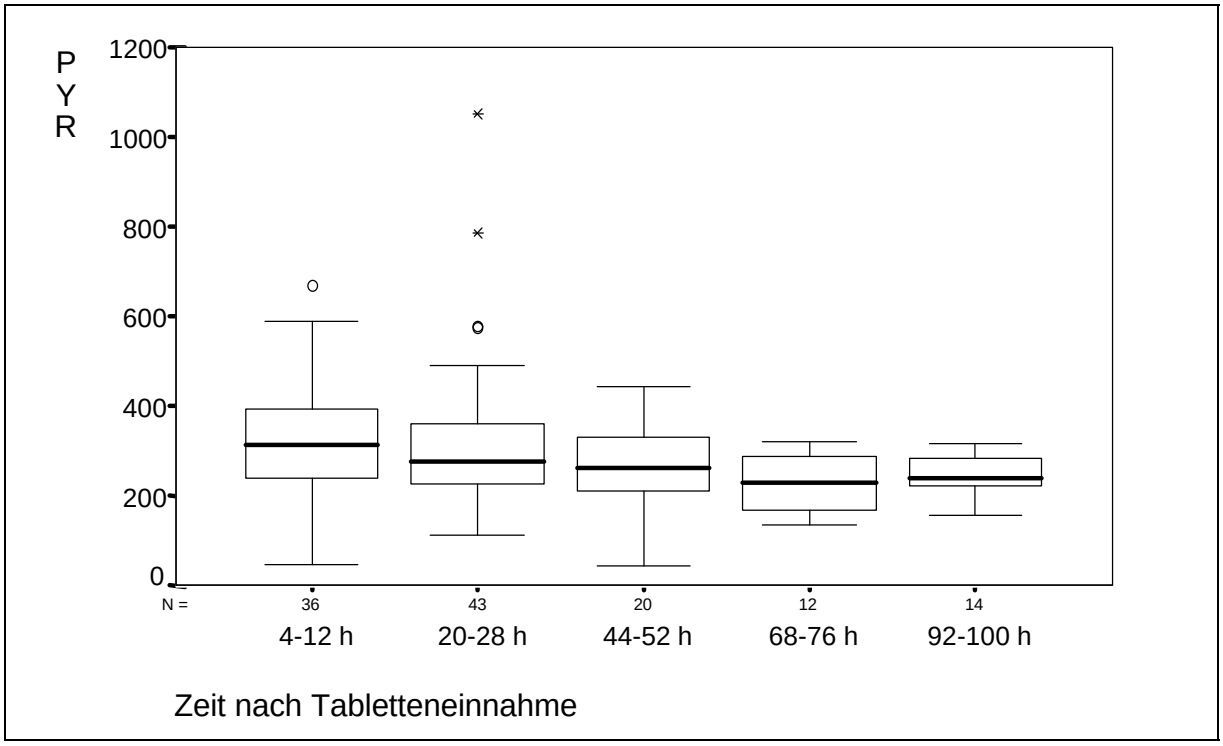
ABBILDUNG 14: Boxplots der steady-state Plasmaspiegel von Monoacetyldapson in ng/ml



Erklärung der Boxplots siehe Abbildung 13

Die Pyrimethaminspiegel lagen zwischen 44,0 und 1053,2 ng/ml (Arithmetischer Mittelwert 300,2 ng/ml, Median 277,8 ng/ml). Die Plasmakonzentrationen fielen im zeitlichen Verlauf nur diskret ab, was durch die lange Halbwertszeit von t½ = 232,9 Stunden demonstriert wird. Die Plasmakonzentrationen für Pyrimethamin sind in Abbildung 15 gezeigt.

ABBILDUNG 15: Boxplots der steady-state Plasmaspiegel von Pyrimethamin in ng/ml



Erklärung der Boxplots siehe Abbildung 13

In Tabelle 10 sind die statistischen Daten (arithmetischer Mittelwert, Median, Minimum, Maximum, Standardabweichung) der gemessenen Plasmakonzentrationen in Abhängigkeit zu der Dauer nach Tabletteneinahme in Stunden zusammengefaßt.

TABELLE 10: Plasmakonzentrationen von Pyrimethamin, Dapson und Monoacetyl-dapson

	4-12 h	20-28 h	44-52 h	68-76 h	92-100 h
PYRIMETHAMIN					
Mittelwert	336,0	324,9	263,9	229,9	244,3
Median	313,3	279,3	265,0	230,7	241,2
Minimum	50,6	113,4	44,0	137,8	159,2
Maximum	672,6	1052,2	444,5	323,4	316,6
Standardabweichung	130,5	172,1	98,7	64,0	48,8
DAPSON					
Mittelwert	1183,9	666,5	379,4	194,1	198,6
Median	1162,4	731,0	456,1	135,7	174,7
Minimum	331,2	104,4	127,0	84,6	36,1
Maximum	2220,2	1558,0	813,8	409,2	446,8
Standardabweichung	492,1	360,4	191,5	109,7	108,3
MONOACETYLDAPSON					
Mittelwert	555,2	293,2	225,7	64,5	53,6
Median	358,6	181,8	135,0	41,4	53,4
Minimum	59,6	28,5	34,6	24,0	13,2

Maximum	1452,3	951,3	911,7	196,7	109,6
Standardabweichung	405,1	268,5	212,3	51,0	27,5

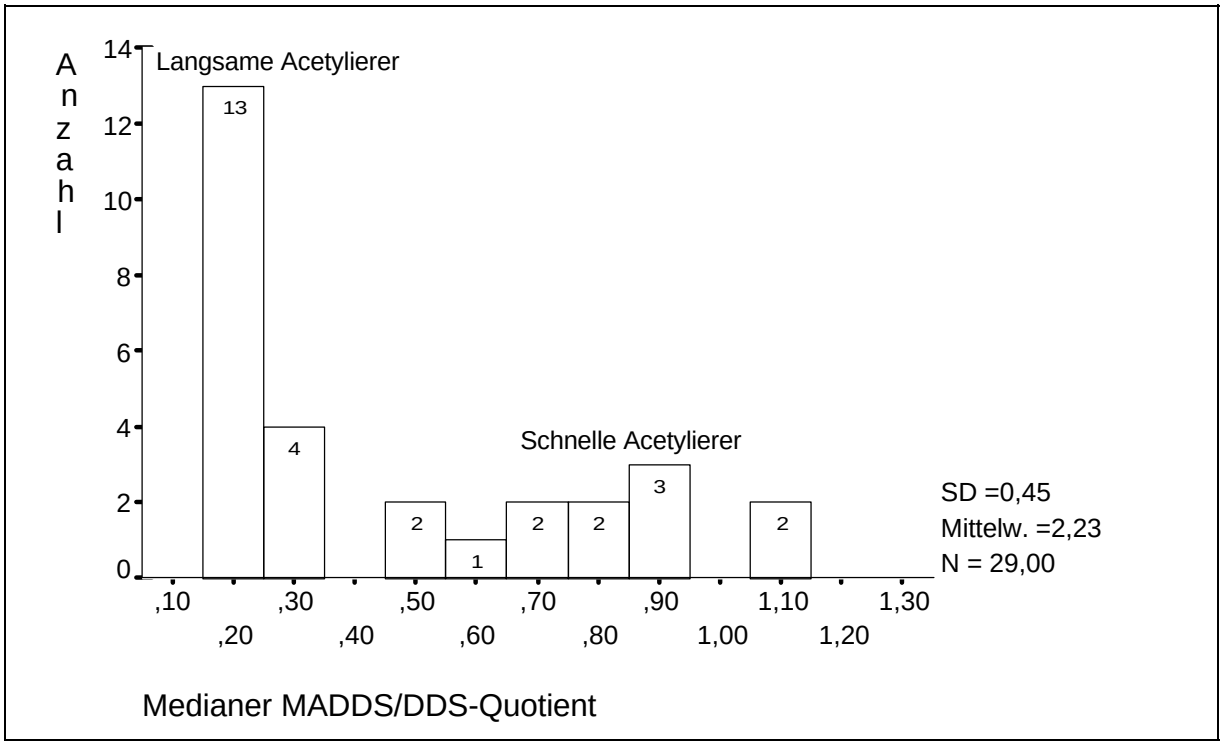
Alle Konzentrationsangaben in ng/ml.

3.4. Acetyliererphänotyp

Der Acetyliererphänotyp der HIV-seropositiven Patienten wurde anhand des individuellen medianen Plasmaspiegelquotienten aus MADDS zu DDS bestimmt. Der Median der Quotienten für jeden Patienten berechnete sich aus allen für MADDS und DDS positiven Plasmaproben. Patienten mit einem Verhältnis von MADDS zu DDS kleiner 0,35 konnten als langsame Acetylierer und Patienten mit einem Verhältnis von MADDS zu DDS größer 0,35 als schnelle Acetylierer klassifiziert werden.

Von den klassifizierbaren Patienten (n=29) waren siebzehn (58,6%) langsame und zwölf (41,4%) schnelle Acetylierer. Der arithmetische Mittelwert der medianen Plasmaspiegelquotienten erreichte 0,230 für die langsamen und 0,793 für die schnellen Acetylierer. In Abbildung 15 sind die individuellen medianen Plasma-spiegelquotienten der Patienten dargestellt. Hier zeigt sich die deutliche bimodale Verteilung in langsame und schnelle Acetylierer.

ABBILDUNG 16: Anzahl von Patienten mit bestimmten MADDS/DDS-Plasmaspiegel-quotienten



Die Verteilung des Acetyliererstatus der untersuchten HIV-seropositiven Patienten entspricht dem Verhältnis in der Normalbevölkerung weißer Hautfarbe. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Acetyliererphänotyp und Alter, Geschlecht oder Risikogruppenzugehörigkeit der Patienten war nicht vorhanden.

3.5. Wirksamkeit der Prophylaxe

In dem Kollektiv der 31 in die Studie aufgenommenen Patienten entwickelte ein Patient eine sekundäre, zerebrale Toxoplasmose und ein zweiter Patient eine sekundäre Pneumocystis carinii-Pneumonie innerhalb des Beobachtungszeitraumes. Der an Toxoplasmose erkrankte Patient war als non-compliant klassifiziert. In der non-compliant Gruppe (n=4) bezifferte sich die Häufigkeit der sekundären, zerebralen Toxoplasmose folglich mit 25%.

Der an Pneumocystis carinii-Pneumonie erkrankte Patient hingegen war als compliant eingestuft. Die Medikamentenspiegel dieses Patienten war über einen Beobachtungszeitraum von 1154 Tagen mit 28 Plasmaproben gut dokumentiert. Der mittlere Abstand zwischen den Blutentnahmen lag bei 43 Tagen. Die Plasmakonzentrationen der beiden antiprotozoalen Wirkstoffe lagen bei dem betreffenden Patienten in einem relativ hohen Bereich. So erreichte die mittlere

Pyrimethaminkonzentration 406,9 ng/ml mit einem Minimalwert von 216,4 ng/ml und einem Maximalwert von 672,6 ng/ml. Der Mittelwert der Dapsonspiegel bezifferte sich auf 866,2 ng/ml mit einem Minimalwert von 132,8 ng/ml und einem Maximalwert von 1727,2 ng/ml. Die Häufigkeit der sekundären Pneumocystis carinii-Pneumonie lag in der compliant Gruppe (n=16) somit bei 6,3%.

3.5. Routineeinsatz der Methode

Die Methode wurde von den medizinisch-technischen Mitarbeitern der II. Inneren Abteilung des Virchow-Klinikums übernommen und bewährt sich im klinischen Routineeinsatz. Das Verfahren dient in erster Linie der Überprüfung der Medikamentenspiegel von ambulanten HIV-seropositiven Patienten unter Pyrimethamin/Dapson-Prophylaxe.

4. DISKUSSION

In der hier vorgestellten Arbeit konnte erstmals eine HPLC-Methode mit Festphasen-extraktion zur simultanen Bestimmung von Dapson, dessen Hauptmetabolit Monoacetyldapson und Pyrimethamin entwickelt werden. Die bislang in der Literatur beschriebenen chromatographischen Methoden haben als gemeinsamen Nachteil die Flüssig-Füssig-Extraktion als Probenaufbereitung. Dieses Extraktionsverfahren setzt eine organische und eine anorganische Phase zur Trennung der Pharmaka von den Plasmabestandteilen ein. Durch mehrere aufeinanderfolgende Arbeitsschritte wie Mischung, Zentrifugation, Trennung, Evaporation und Redilution ist dieses Verfahren relativ komplex und zeitaufwendig (Edstein et al. 1984; Jones und Ovenell 1979; Lee et al. 1985; Lemnge et al. 1993; Opravil et al. 1994; Rønn et al. 1995). Zusätzlich waren einige der beschriebenen Verfahren wegen flüchtiger Bestandteile in der mobilen Phase nur schlecht zu standardisieren (Jones und Ovenell 1979) oder erreichten nur eine eingeschränkte Präzision mit Variationskoeffizienten zwischen 12,9 und 15,8% (Lee et al. 1985). Die analogen Variationskoeffizienten der hier präsentierten Methode lagen mit 4,1% (PYR), 4,9% (DDS) und 5,2% (MADDS) deutlich niedriger und weisen auf eine gute Reproduzierbarkeit hin. In den meisten der bisher veröffentlichen Nachweis-methoden wurde nur die Standarddetektionswellenlänge 254 nm verwendet (Edstein et al. 1984; Jones und Ovenell 1979; Opravil et al. 1994). Im Gegensatz dazu wurden hier durch die systematische Analyse der Detektionswellenlängen in dem Bereich von 200 bis 300 nm die relativen Absorptionsmaxima 210 nm und 295 nm für Pyrimethamin und Dapson bestimmt und zur Quantifizierung genutzt. Um die Dauer der chromatographischen Analyse auf zwanzig Minuten zu verkürzen und die Sensitivität weiter zu erhöhen, wurde in der hier beschriebenen Methode eine Gradientenelution herangezogen. So lag die untere Nachweisgrenze mit 5 ng/ml für DDS, MADDS und 6 ng/ml für PYR in einem zufriedenstellend niedrigen Bereich. Andere HPLC-Methoden waren deutlich weniger sensitiv mit Nachweisgrenzen von 20 ng/ml für DDS und MADDS bis 30 ng/ml für PYR (Opravil et al. 1994). Durch die Anwendung der Festphasenextraktion können bis zu 24 Plasmaproben parallel vorbereitet werden. Die Wiederfindung der Substanzen war konstant und reproduzierbar und lag nach dieser Probenaufbereitung zwischen 88 und 92%. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die beschriebene Methode sensitiv, präzise, spezifisch und einfach durchzuführen ist. So konnte das Verfahren problemlos im klinischen Routineeinsatz verwendet werden. Die beschriebene chromatographische Methode wurde zusammen mit einem parallel entwickelten Verfahren zur simultanen

Bestimmung von Pyrimethamin, Sulfadoxin und N-Acetylsulfadoxin bereits veröffentlicht (Eljaschewitsch E; Padberg J; Schürmann D; Ruf B 11/1996).

Die steady-state Plasmaspiegel der HIV-seropositiven Patienten wurden unter antiprotozoaler Prophylaxe mit zweimal wöchentlich 100 mg Dapson plus 25 mg Pyrimethamin ermittelt. Die medianen Plasmakonzentrationen von Dapson lagen mit 731 ng/ml circa 24 Stunden nach der Tabletteneinnahme nur geringfügig höher als die analogen Konzentrationen von 374 bis 710 ng/ml in der Malariaprophylaxe mit 100 mg Dapson plus 12,5 mg Pyrimethamin pro Woche (Edstein et al. 1990; Jones und Ovenell 1979; Lee et al. 1985). Eine Ursache dieser relativ niedrigen Plasmaspiegel könnte der Umstand sein, daß es bei einer Gabe zweimal pro Woche aufgrund der relativ kurzen Eliminationshalbwertszeit von ungefähr 24 Stunden bei Dapson nicht zu einer ausgeprägten Akkumulation kommt. Die Plasmakonzentrationen von Pyrimethamin nach ungefähr 24 Stunden lagen mit 325 ng/ml dagegen drei- bis fünfmal höher als die Spiegel in der Malariaprophylaxe (68-121 ng/ml). Diese Pyrimethaminplasmaspiegel korrelieren einerseits mit der etwa vierfachen Wochendosis, legen andererseits auch eine Akkumulation aufgrund der langen Eliminationshalbwertszeit von circa 100 Stunden nahe. Die minimalen medianen Plasmaspiegel vor der nächsten Tabletteneinnahme lagen bei 136 ng/ml für Dapson und 230 ng/ml für Pyrimethamin. Als Vergleich eignet sich die Studie von Opravil et al. 1994, in der Plasmakonzentrationen unter einerer antiprotozoalen Prophylaxe mit 200 mg Dapson plus 75 mg Pyrimethamin einmal pro Woche ermittelt wurden. Hierbei zeigten sich minimale Pyrimethaminkonzentrationen von 125 ng/ml sechs bis sieben Tage nach Tabletteneinnahme. Die mediane Dapsonkonzentration war zu diesem Zeitpunkt unter die Nachweisgrenze von 20 ng/ml gesunken. Diese Daten verdeutlichen, daß zu einer Aufrechterhaltung der Dapsonplasmaspiegel in diesem Dosisbereich, mindestens eine Gabe zweimal pro Woche notwendig ist. Ein weiterer Kritikpunkt an der Arbeit von Opravil et al. 1994 ist die geringe Anzahl von nur 36 Plasmaproben bei 33 eingeschlossenen HIV-seropositiven Patienten. Als mögliche Ursache für die relativ niedrigen Plasmaspiegel von Dapson wurde bereits die geringgradige Akkumulation genannt. Andere Gründe könnten die bei AIDS-Patienten häufigen gastrointestinale Absorptionsstörungen sein, verursacht z.B. durch die HIV-assozierte Enteropathie, die CMV-Enteritis oder die intestinale Kryptosporoidose. In diesem Zusammenhang könnte der enterohepatischer Kreislauf bei der Exkretion von Dapson von Bedeutung sein. So konnte gezeigt werden, daß bei Patienten nach der oralen Applikation von Aktivkohle sich die Eliminationshalbwertszeit von Dapson ungefähr

halbiert (Endre et al. 1983; Neuvonen et al. 1980). Eine weitere potentielle Ursache stellt die Interaktion mit anderen Medikamenten dar. So wurde beispielsweise Didanosine mit einem Versagen der antiprotozoalen Dapsonprophylaxe bei HIV-seropositiven Patienten assoziiert (Metroka et al. 1991). Rifampicin hingegen reduziert vermutlich durch Enzyminduktion die Eliminationshalbwertszeit von Dapson um ca. 50% (Gelber und Rees 1975).

In der kombinierten antiprotozoalen Prophylaxe hat Pyrimethamin den Wirkungs-schwerpunkt in der Suppression von Toxoplasma gondii, während das Sulfon Dapson hauptsächlich gegen Pneumocystis carinii gerichtet ist. So lagen die für Toxoplasma gondii inhibitorischen Pyrimethaminkonzentrationen bei in-vitro Studien (Enzymaktivität der DHFS/Zellkultur) im Bereich von 40 bis 60 ng/ml (Derouin et al. 1989; Chio und Queener 1993). In der Behandlung der tierexperimentellen akuten Toxoplasmose hingegen waren Plasmaspiegel von mindestens 500 ng/ml zur Heilung erforderlich (Weiss et al. 1992). Die Therapie der akuten Toxoplasma gondii-Enzephalitis machte sogar Plasmakonzentrationen von über 750 ng/ml notwendig (Weiss et al. 1988). Diese Diskrepanz erklärt sich unter anderem durch die unterschiedliche Verteilung der Substanz in verschiedenen Kompartimenten. So beträgt beispielsweise der Liquorspiegel von Pyrimethamin nur 13 bis 28% des korrespondierenden Plasmaspiegels (McLeod et al. 1992; Weiss et al. 1988). Die medianen Plasmaspiegel von Pyrimethamin in der hier vorgestellten Arbeit (230-336 ng/ml) lagen deutlich unter den angenommenen therapeutischen Minimalspiegeln. Der beobachtete prophylaktische Effekt ist vermutlich durch die additive Wirkung von Dapson und die Akkummulation von Pyrimethamin im zentralen Nervensystem während der Langzeitmedikation bedingt.

Eine reversible Wachstumshemmung von Pneumocystis carinii konnte in Zellkulturen mit 100 ng/ml Dapson beobachtet werden (Cushion et al. 1985). In der Behandlung der tierexperimentellen Pneumocystis carinii-Pneumonie zeigte Dapson in einer täglichen Dosis von 100 mg/kg einen guten therapeutischen Effekt. Eine Dosis von 15 mg/kg pro Tag hingegen reichte nicht zu einer signifikanten Reduktion der intrapulmonalen Pneumocystis carinii Dichte aus (Walzer et al. 1988; Walzer et al. 1992). Unter der Prophylaxe mit 100 mg Dapson zweimal wöchentlich lagen die medianen Plasmaspiegel mit 136 bis 1184 ng/ml über den zur Wachstumshemmung von Pneumocystis carinii notwendigen Minimalspiegeln. Die hier applizierte Dapsonquantität entspricht umgerechnet circa 0,5 mg/kg pro Tag und beträgt daher nur ein Bruchteil der tierexperimentellen wirksamen Dosis. Grundsätzlich jedoch sind

die zur Therapie erforderlichen Chemotherapeutikagewebespiegel höher als die der Prophylaxe. Die prophylaktische Wirkung ist vermutlich noch stärker als die therapeutische Wirkung abhängig von dem Zustand der Immunabwehr des Patienten.

Im Rahmen der quantitativen Analyse der Plasmaspiegel von Dapson und Monoacetyldapson konnte der individuelle Acetyliererphänotyp der HIV-infizierten Patienten anhand des Quotienten aus MADDS und DDS bestimmt werden. Dapson ist als Testsubstanz zur Ermittlung des hepatischen Acetyliererstatus seit geraumer Zeit eingeführt (Gelber et al. 1971; Philip et al. 1984; Wiggan et al. 1991). Die Messung des MADDS/DDS-Quotienten kann weitgehend unabhängig von der Tabletteneinnahme durchgeführt werden, da das Verhältnis zwischen MADDS und DDS im Blutplasma wenige Stunden nach der Ingestion annähernd konstant bleibt (Gelber et al. 1971). Andere Pharmaka wie Procainamid und Isoniazid wurden alternativ zur Bestimmung des Acetyliererstatus eingesetzt (Reidenberg et al. 1975; du Souich und Lambert 1981). In dem hier untersuchten Kollektiv konnten 58,6% der Patienten als langsame und 41,4% als schnelle Acetylierer klassifiziert werden. Die Verteilung der Acetyliererphänotypen bei gesunden Probanden weißer Hautfarbe lag mit 43 bis 56% langsame Acetylierer und 44 bis 57% schnelle Acetylierer in einem korrespondierenden Bereich (Carr et al. 1978; May et al. 1990). Probanden asiatischer Herkunft hingegen sind überwiegend schnelle Acetylierer. So konnten z.B. bei einer Studie von Lee et al. 1985 die thailändischen Testpersonen zu 97% dem schnellen Acetyliererphänotyp zugeordnet werden. Opravil et al. 1994 konnten bei 18 von 33 eingeschlossenen HIV-infizierten Patienten den MADDS/DDS-Quotient bestimmen und eine gleichmäßige Verteilung mit neun langsamen und neun schnellen Acetylierern in diesem Kollektiv demonstrieren. Für einige Pharmaka konnte ein Zusammenhang zwischen Acetyliererstatus einerseits und therapeutischer Wirkung und unerwünschten Nebenwirkungen anderseits nachgewiesen werden. Auch die Plasmaspiegel der Ausgangssubstanzen waren teilweise von der Acetylierungskapazität abhängig. Bei Dapson hingegen ist der therapeutische Effekt, die Nebenwirkungsrate und die Dapsonplasmakonzentration unabhängig von dem Acetyliererphänotyp (May et al. 1990; Zuidema et al. 1986). Die Bestimmung des Acetyliererstatus scheint also für die Behandlung mit Dapson eine untergeordnete Rolle zu spielen. Der Einfluß der Acetylierungskapazität auf die Wirkung der in der Therapie der fortgeschrittenen HIV-Erkrankung verordneten Medikamente ist jedoch fast vollständig unbekannt. Die Einmalgabe von Dapson als Testsubstanz wäre für weiterführende Untersuchungen geeignet.

In dieser Arbeit wurde als Teilaspekt der Compliance die Einnahmetreue der HIV-infizierten Patienten anhand der Plasmaspiegel von Pyrimethamin und Dapson ermittelt. Die zur Bestimmung der Compliance notwendige Probenanzahl wurde auf minimal vier festgelegt. 64,5% der Patienten erfüllten dieses Kriterium. Von diesen Patienten wurden wiederum 80% als compliant und 20% als non-compliant eingestuft. In Studien zur ambulanten Therapie der arteriellen Hypertonie stellte sich eine Compliance von 50 bis 70% heraus. Das Maß an Compliance in verschiedenen Studien ist von zahlreichen Faktoren abhängig. Es wird z.B. durch die Nachweismethode der Einnahmetreue, die Applikationsform und -frequenz, das Wirkungs- und Nebenwirkungsspektrum der Medikamente, die Motivation der Patienten und vor allem durch die eigentliche Krankheit beeinflußt (Aronson und Hardman 1992). Da in dieser Arbeit minimal vier Plasmaproben für die Bestimmung der Einnahmetreue obligat waren, nahmen Patienten, die nicht oder nur selten an Routineuntersuchungen partizipierten, nicht an der Analyse der Compliance teil. Dieser methodische Aufbau führt mutmaßlich zu einer starken Selektion einnahmetreuer Patienten und damit insgesamt zu einer Überschätzung der wirklichen Compliance. Bei Patienten in fortgeschrittenen Stadien der HIV-Infektion kann durch zahlreiche Faktoren die Einnahmetreue eingeschränkt sein. So können sich eine hohe tägliche Tablettenmenge, eine HIV-assoziierte Enzephalopathie, die insgesamt infauste Prognose und die fehlende unmittelbare Verbesserung der Lebensqualität negativ auf die Motivation zu einer prophylaktischen Pharmakotherapie auswirken. Da im Gegensatz zu der Akuttherapie die Compliance in der Prophylaxe nicht unmittelbar am klinischen Erfolg verifiziert werden kann, liefert die Überwachung von Plasmaspiegeln in der krankheitsverhütenden Therapie wichtige Informationen für die behandelnden Therapeuten. Auch zur einwandfreien Bewertung wissenschaftlicher Studien zur prophylaktischen Therapie sekundärer Infektionen ist die Berücksichtigung der Compliance unabdingbar.

Die Kombination von Dapson und Pyrimethamin zur Prophylaxe der Pneumocystis carinii-Pneumonie und der Toxoplasma gondii-Enzephalitis hat sich in mehreren Studien als hoch wirksam erwiesen (Girad et al. 1993; Grünewald et al. 1993; Opravil et al. 1995; Podzamczer et al. 1993). So konnte in einer statischen Analyse verschiedener Studien gezeigt werden, daß das Risiko an PCP zu erkranken bei den auf Dapson basierenden Prophylaxen gegenüber der Inhalation mit Pentamidin mit einem relativen Risiko von 0,93 in etwa gleich war. Für die zerebrale Toxoplasmose zeigte sich im Vergleich mit Trimethoprim/Sulfamethoxazol ebenfalls eine ähnliche Wirksamkeit (Ioannidis et al. 1996). Die Kombinationsprophylaxe mit Dapson und

Pyrimethamin ist jedoch mit teilweise gravierenden, dosisabhängigen Nebenwirkungen wie Arzneimittelexanthemen, Fieber, Hämatotoxizität und Hepatitis belastet. Die Reduktion der Dosis auf 100 mg Dapson/50 mg Pyrimethamin pro Woche führte jedoch zu einer höheren PCP-Inzidenz und einer verkürzten Überlebenszeit (Antinori et al. 1992; Antinori et al. 1995). In diesen Studien wurde jedoch auf eine Komedikation mit Folinsäure verzichtet. In der hier dargestellten Arbeit wurde eine antiprotozoale Prophylaxe mit 100 mg Dapson plus 25 mg Pyrimethamin plus 15 mg Folinsäure zweimal wöchentlich durchgeführt. In der Gruppe, der als compliant klassifizierten Patienten trat keine zerebrale Toxoplasmose auf. Die bei einem nicht einnahmetreuen Patienten beobachtete Toxoplasma gondii-Enzephalitis ist als spontanes Lokalrezidiv im natürlichen Verlauf der fortgeschrittenen HIV-Infektion zu werten. Die Prophylaxe der Pneumocystis carinii-Pneumonie hingegen versagte bei einem Patienten aus der als compliant eingestuften Gruppe. In der vorhandenen Literatur wurde der Mißerfolg der PCP-Prophylaxe bisher weitgehend auf zu niedrige Plasmakonzentrationen aufgrund einer Interaktion mit anderen Pharmaka oder mangelnder Compliance zurückgeführt. (Horowitz et al. 1992; Huengsberg et al. 1993). Die gut dokumentierten Plasma-spiegel von Dapson und Pyrimethamin lagen bei dem an PCP erkrankten Patienten während des gesamten Beobachtungszeitraums in einem relativ hohen Bereich. Im Gegensatz zu der bisherigen Annahme lag also die Ursache für den Mißerfolg der Prophylaxe zumindest in diesem Fall nicht in zu niedrigen Plasmaspiegeln. Mögliche Ursachen für das Versagen könnten in einer extrem beeinträchtigten Immunabwehr des Patienten, einer gestörten Penetration der Medikamente in das Lungengewebe oder in einer Resistenz der Erreger gegen die prophylaktisch eingesetzten Medika-mente liegen. Um den Hintergrund für den Erfolg bzw. Mißerfolg von antiprotozoalen Pharmaka in der Prophylaxe von opportunistischen Infektionen zu erforschen, sind weitere auf Konzentrationsbestimmungen basierende Studien notwendig.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Eine HPLC-Methode zur simultanen Bestimmung des Sulfons Dapson, dem Hauptmetabolit Monoacetyldapson und dem Dihydrofolsäurereduktasehemmer Pyrimethamin wurde entwickelt. Als Probenaufbereitung konnte eine Festphasen-extraktion mit C18-Röhrchen etabliert werden. Konsekutiv wurden die Parameter der HPLC systematisch variiert und optimiert. Die chromatographische Trennung erfolgte als Gradientenelution mit Methanol, Acetonitril und 5,0 mmol/l Hexansulfonsäure als mobile Phase. Sulfadimethoxin kam als interner Standard zum Einsatz. Als optimale Detektionswellenlängen wurden 295 nm (DDS, MADDS, IS) und 210 nm (PYR) ermittelt. Die gesamte analytische Methode zeichnet sich durch einen effizienten Probendurchsatz sowie eine hohe Spezifität, Sensibilität und Präzision aus (Eljaschewitsch E; Padberg J; Schürmann D; Ruf B 11/1996).

Zur Prophylaxe der bei HIV-infizierten Patienten häufigen opportunistischen Infektionen Pneumocystis carinii-Pneumonie und Toxoplasma gondii-Enzephalitis wurden 100 mg Dapson, 25 mg Pyrimethamin und 15 mg Folinsäure zweimal pro Woche gegeben. Die steady-state Plasmaspiegel von DDS, MADDS und PYR wurden aus 224 Blutproben von 31 HIV-seropositiven Patienten bestimmt. Die medianen Plasmakonzentrationen der als compliant klassifizierten Patienten erreichten 1162 ng/ml für DDS und 331 ng/ml für PYR am Einnahmetag. Die medianen Talspiegel vor der nächsten Tabletteneinnahme lagen bei 136 ng/ml für DDS und 230 ng/ml für PYR. Insgesamt zeigten die Plasmakonzentrationen der HIV-seropositiven Patienten eine Übereinstimmung mit den pharmakokinetischen Daten gesunder Probanden. Lediglich absolute Höhe der Dapsonspiegel war vergleichsweise niedrig.

Aus dem MADDS/DDS-Quotienten konnte der individuelle Acetyliererphänotyp der Patienten ermittelt werden. Die Verteilung in 58,6% langsame und 41,4% schnelle Acetylierer entspricht der Häufigkeit in der Normalbevölkerung weißer Hautfarbe.

In der als non-compliant klassifizierten Gruppe erkrankte ein Patient an zerebraler Toxoplasmose. Bei den als compliant eingestuften Patienten hingegen trat keine Toxoplasma gondii-Enzephalitis auf. Die Prophylaxe der Pneumocystis carinii-Pneumonie versagte jedoch bei einem als compliant bestimmten Patienten. Die gut dokumentierten Plasmaspiegel von DDS und PYR lagen bei dem betreffenden Patienten kontinuierlich in einem hohen Bereich.

6. LITERATUR

1. Abuirjeie MA; Irshaid YM; Al Hadidi HF; Rawashdeh NM. Simultaneous high performance liquid chromatographic determination of dapsone and monoacetyldapsone in human plasma and urine. J Clin Pharm Ther 1991; 16(4): 247-55.

2. Ahmad RA; Rogers HJ. Pharmacokinetics and protein binding interactions of dapsone and pyrimethamine. Br J Clin Pharmacol 1980; 10(5): 519-24.

3. Alexander JO; Young E.; McFadyen T.; Fraser NG; Duguid WP; Meredith EM. Absorption and excretion of 35S dapsone in dermatitis herpetiformis. Br J Dermatol 1970; 83(6): 620-31.

4. Allegra CJ; Boarman D.; Kovacs JA; Morrison P.; Beaver J.; Chabner BA; Masur H. Interaction of sulfonamide and sulfone compounds with Toxoplasma gondii dihydropteroate synthase. J Clin Invest 1990; 85(2): 371-9.

5. Allegra CJ; Kovacs JA; Drake JC; Swan JC; Chabner BA; Masur H. Activity of antifolates against Pneumocystis carinii dihydrofolate reductase and identification of a potent new agent. J Exp Med 1987; 165(3): 926-31.

6. Antinori A.; Murri R.; Ammassari A.; De Luca A.; Linzalone A.; Cingolani A.; Damiano F.; Maiuro G.; Vecchiet J.; Scoppettuolo G; Tamburrini E; Ortona L. Aerosolized pentamidine, cotrimoxazole and dapsone pyrimethamine for primary prophylaxis of Pneumocystis carinii pneumonia and toxoplasmic encephalitis. AIDS 1995; 9(12): 1343-50.

7. Antinori A.; Murri R.; Tamburrini E.; De Luca A.; Ortona L. Failure of low dose dapsone pyrimethamine in primary prophylaxis of Pneumocystis carinii pneumonia. Lancet 1992; 340(8822): 788.

8. Aronson JK; Hardman M. ABC of monitoring drug therapy. Patient compliance. BMJ 1992; 305(6860): 1009-11.

9. Biggs JT; Gordon GR; Peters JH. Disappearance rates and plasma protein binding of dapsone (DDS) and monoacetyldapsone (MADDS) in animals and man. Federation Proceedings 1971; 30: 629.

10. Blum RN; Miller LA; Gaggini LC; Cohn DL. Comparative trial of dapsone versus trimethoprim/sulfamethoxazole for primary prophylaxis of Pneumocystis carinii pneumonia. J Acquir Immune Defic Syndr 1992; 5(4): 341-7.

11. Bozzette SA; Finkelstein DM; Spector SA; Frame P.; Powderly WG; He W.; Phillips L.; Craven D.; Van der Horst C.; Feinberg J. A randomized trial of three antipneumocystis agents in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. NIAID AIDS Clinical Trials Group. N Engl J Med 1995; 332(11): 693-9.

12. Broughton MC; Queener SF. Pneumocystis carinii dihydrofolate reductase used to screen potential antipneumocystis drugs. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35(7): 1348-55.

13. Carr A.; Tindall B.; Brew BJ; Marriott DJ; Harkness JL; Penny R.; Cooper DA. Low dose trimethoprim sulfamethoxazole prophylaxis for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. Ann Intern Med 1992; 117(2): 106-11.

14. Carr K.; Oates JA; Nies AS; Woosley RL. Simultaneous analysis of dapsone and monoacetyldapsone employing high performance liquid chromatography: a rapid method for determination of acetylator phenotype. Br J Clin Pharmacol 1978; 6(5): 421-7.

15. Centers For Disease Control. Guidelines for prophylaxis against Pneumocystis carinii pneumonia in patients infected with human immunodeficiency virus. MMWR 1989; Supp S-5: 1-9.

16. Centers For Disease Control. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition of AIDS among adolescents and adults. MMWR 1992; 41: RR-17.

17. Chio LC; Queener SF. Identification of highly potent and selective inhibitors of Toxoplasma gondii dihydrofolate reductase. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37(9): 1914-23.

18. Coleman MD; Edwards G.; Mihaly GW; Howells RE; Breckenridge AM. High performance liquid chromatographic method for the determination of pyrimethamine and its 3 N oxide metabolite in biological fluids. J Chromatogr 1984; 308(363-9).

19. Cook IF; Cochrane JP; Edstein MD. Race linked differences in serum concentrations of dapsone, monoacetyldapsone and pyrimethamine during malaria prophylaxis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1986; 80(6): 897-901.

20. Cramer JA; Mattson RH; Prevey ML. How often is medication taken as prescribed? A novel assessment technique. JAMA 1989; 261: 3273-7.

21. Cucinell SA; Israili ZH; Dayton PG. Microsomal N oxidation of dapson as a cause of methemoglobin formation in human red cells. Am J Trop Med Hyg 1972; 21(3): 322-31.

22. Cushion MT; Stanforth D.; Linke MJ; Walzer PD. Method of testing the susceptibility of Pneumocystis carinii to antimicrobial agents in vitro. Antimicrob Agents Chemother 1985; 28(6): 796-801.

23. Decker CF; Masur H. Current status of prophylaxis for opportunistic infections in HIV infected patients. AIDS 1994; 8(1): 11-20.

24. Derouin F.; Chastang C. In vitro effects of folate inhibitors on Toxoplasma gondii. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33(10): 1753-9.

25. Derouin F.; Piketty C.; Chastang C.; Chau F.; Rouveix B.; Pocidalo JJ. Anti Toxoplasma effects of dapsone alone and combined with pyrimethamine. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35(2): 252-5.

26. Drayer DE; Reidenberg MM. Clinical consequences of polymorphic acetylation of basic drugs. Clin Pharmacol Ther 1977; 22(3): 251-8.

27. Du Souich P.; Lambert C. What is the clinical meaning of the acetylator phenotype? Trend Pharmacol Scien 1981; 2: 189-91.

28. Edman JC; Kovacs JA; Masur H.; Santi DV; Elwood HJ; Sogin ML. Ribosomal RNA sequence shows Pneumocystis carinii to be a member of the fungi. Nature 1988; 334(6182): 519-22.

29. Edstein M. Quantification of antimalarial drugs. II. Simultaneous measurement of dapsone, monoacetyldapsone and pyrimethamine in human plasma. J Chromatogr 1984; 307(2): 426-31.

30. Edstein MD; Rieckmann KH; Veenendaal JR. Multiple dose pharmacokinetics and in vitro antimalarial activity of dapsone plus pyrimethamine (Maloprim) in man. Br J Clin Pharmacol 1990; 30(2): 259-65.

31. Eljaschewitsch J.; Padberg J.; Schürmann D.; Ruf B. High-performance liquid chromatography determination of pyrimethamine, dapsone, monoacetyl-dapsone, sulfadoxine, and N-acetyl-sulfadoxine after rapid solid-phase extraction. Ther Drug Monit 1996; 18: 592-7.

32. Endre ZH; Charlesworth JA; MacDonald GJ; Woodbridge L. Successful treatment of acute dapsone intoxication using charcoal hemoperfusion. Aust N Z J Med 1983; 13(5): 509-12.

33. Falco EA; Goodwin LG; Hitchings GH; Rollo IM; Russell PB. 2:4-diaminopyrimidines - a new series of antimalarials. Br J Pharmacol Chem 1951; 6: 185-200.

34. Fernandez-Martin J.; Leport C.; Morlat P. et al. Pyrimethamine-Clarithromycin combination for therapy of acute toxoplasma encephalitis in patients with AIDS. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 2049-52.

35. Fischl MA; Dickinson GM; La Voie L. Safety and efficacy of sulfamethoxazole and trimethoprim chemoprophylaxis for Pneumocystis carinii pneumonia in AIDS. JAMA 1988; 259(8): 1185-9.

36. Fischl MA; Parker CB; Pettinelli C.; Wulfsohn M.; Hirsch MS; Collier AC; AntonIskis D.; Ho M.; Richman DD; Fuchs E. et al. A randomized controlled trial of a reduced daily dose of zidovudine in patients with the acquired

immunodeficiency syndrome. The AIDS Clinical Trials Group. N Engl J Med 1990; 323(15): 1009-14.

37. Frenkel JK; Hitchings GH. Relative reversal by vitamins (p-aminobenzoic, folic and folinic acids) of the effects of sulfadiazine and pyrimethamine on Toxoplasma, mouse and man. Antib Chemother 1957; 7: 630-8.

38. Garg SK; Kumar B.; Bakaya V.; Lal R.; Shukla VK; Kaur S. Plasma dapsone and its metabolite monoacetyldapsone levels in leprotic patients. Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol 1988; 26(11): 552-4.

39. Gelber R.; Peters JH; Gordon GR; Glazko AJ; Levy L. The polymorphic acetylation of dapsone in man. Clin Pharmacol Ther 1971; 12(2): 225-38.

40. Gelber RH; Rees RJ. Dapsone metabolism in patients with dapsone resistant leprosy. Am J Trop Med Hyg 1975; 24(6 Pt 1): 963-7.

41. Gidoh M.; Tsutsumi S.; Takitani S. Determination of three main antileprosy drugs and their main metabolites in serum by high performance liquid chromatography. J Chromatogr; 1981 May 8 1981; 223(2): 379-92.

42. Girard PM; Landman R.; Gaudebout C.; Olivares R.; Saimot AG; Jelazko P.; Gaudebout C.; Certain A.; Boue F.; Bouvet E.; et al. Dapsone pyrimethamine compared with aerosolized pentamidine as primary prophylaxis against Pneumocystis carinii pneumonia and toxoplasmosis in HIV infection. The PRIO Study Group. N Engl J Med 1993; 328(21): 1514-20.

43. Glazko AJ; Dill WA; Montalbo RG; Holmes EL. A new analytical procedure for dapsone. Application to blood level and urinary excretion studies in normal men. Am J Trop Med Hyg 1968; 17(3): 465-73.

44. Golden JA; Katz MH; Chernoff DN; Duncan SM; Conte JE Jr. A randomized comparison of once monthly or twice monthly high dose aerosolized pentamidine prophylaxis. Chest 1993; 104(3): 743-50.

45. Grant I.; Gold J.; Rosenblum M.; Niedzwiecki D.; Armstrong D. Toxoplasma gondii serology in HIV infected patients: the development of central nervous system toxoplasmosis in AIDS. AIDS 1990; 4(6): 519-21.

46. Grünewald T.; Bergmann F.; Eljaschewitsch J.; Pohle HD; Ruf B. Antiprotozoal prophylaxis in AIDS patients: results of a prospective randomized study comparing dapsone/pyrimethamine and sulfadoxine/pyrimethamine. In: Progams and abstracts of the ninth International Conference on AIDS 1993; Abstract WS-B13-3.

47. Hanson A.; Melander A.; Wahlin Boll E. Acetylator phenotyping: a comparison of the isoniazid and dapsone tests. Eur J Clin Pharmacol 1981; 20(3): 233-4.

48. Hardy WD; Feinberg J.; Finkelstein DM; Power ME; He W.; Kaczka C.; Frame PT; Holmes M.; Waskin H.; Fass RJ; et al. A controlled trial of trimethoprim sulfamethoxazole or aerosolized pentamidine for secondary prophylaxis of Pneumocystis carinii pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. AIDS Clinical Trials Group Protocol 021. N Engl J Med 1992; 327(26): 1842-8.

49. Hirschel B.; Lazzarin A.; Chopard P.; Opravil M.; Furrer HJ; Ruttimann S.; Vernazza P.; Chave JP; Ancarani F.; Gabriel V.; et al. A controlled study of inhaled pentamidine for primary prevention of Pneumocystis carinii pneumonia. N Engl J Med 1991; 324(16): 1079-83.

50. Hjelm M.; Verdier CH. Biochemical effects of aromatic amines. I. Methaemoglobinaemia, haemolysis and Heinz body formation induced by 4,4' diaminodiphenylsulphone. Biochem Pharmacol 1965; 14(7): 1119-28.

51. Horai Y.; Ishizaki T. Rapid and sensitive liquid chromatographic method for the determination of dapsone and monoacetyldapsone in plasma and urine. J Chromatogr 1985; 345(2): 447-52.

52. Horowitz HW; Jorde UP; Wormser GP. Drug interactions in use of dapsone for Pneumocystis carinii prophylaxis. Lancet 1992; 339(8795): 747.

53. Huengsberg M.; Castelino S.; Sherrard J.; O'Farrell N.; Bingham J. Does drug interaction cause failure of PCP prophylaxis with dapsone?. Lancet 1993; 341(8836): 48.

54. Hughes WT. Opportunistic infections in AIDS patients. Current management and prevention. Postgrad Med 1994; 95(1): 81-93.

55. Huikeshoven H. Patient compliance with dapsone administration in leprosy. Int J Lepr Other Mycobact Dis 1981; 49(2): 228-58.

56. Ioannidis JP; Cappelleri JC; Skolnik PR; Lau J.; Sacks HS. A meta analysis of the relative efficacy and toxicity of Pneumocystis carinii prophylactic regimens. Arch Intern Med 1996; 156(2): 177-88.

57. Israelski DM; Chmiel JS; Poggensee L.; Phair JP; Remington JS. Prevalence of Toxoplasma infection in a cohort of homosexual men at risk of AIDS and toxoplasmic encephalitis . J Acquir Immune Defic Syndr 1993; 6(4): 414-8.

58. Jensen BN; Nielsen TL; Backer V.; Nelsing S.; Simonsen L.; Flaschs H.; Gaub J.; HOjlyng N.; Nielsen JO; Mathiesen L.; et al. Aerosolized pentamidine for primary prophylaxis of Pneumocystis carinii pneumonia: a controlled randomized trial. J Acquir Immune Defic Syndr 1993; 6(5): 472-7.

59. Jones CR; Ovenell SM. Determination of plasma concentrations of dapsone, monoacetyl dapsone and pyrimethamine in human subjects dosed with maloprim. J Chromatogr 1979; 163(2): 179-85.

60. Karim AK; Elfellah MS; Evans DA. Human acetylator polymorphism: estimate of allele frequency in Libya and details of global distribution. J Med Genet 1981; 18(5): 325-30.

61. Kaufman HE; Geisler PH. The hematologic toxicity of pyrimethamine (Daraprim) in man. Arch Ophthal 1960; 64: 140-6.

62. Kovacs JA and the NIAID-clinical center intramural AIDS program: Efficacy of atovaquonein treatment of toxoplasmosis in patients with AIDS. Lancet 1992; 340: 637-8.

63. Kovacs JA; Allegra CJ; Beaver J.; Boarman D.; Lewis M.; Parrillo JE; Chabner B. Masur H. Characterization of de novo folate synthesis in Pneumocystis carinii and Toxoplasma gondii: potential for screening therapeutic agents. J Infect Dis 1989; 160(2): 312-20.

64. Kovacs JA; Masur H. Prophylaxis for Pneumocystis carinii pneumonia in patients infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 1992; 14(5): 1005-9.

65. Kruse W. Patient compliance with drug treatment new perspectives on an old problem. Clin Investig 1992; 70(2): 163-6.

66. Lee BL; Medina I.; Benowitz NL; Jacob P.; Wofsy CB; Mills J. Dapsone, trimethoprim, and sulfamethoxazole plasma levels during treatment of Pneumocystis pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Evidence of drug interactions. Ann Intern Med 1989; 110(8): 606-11.

67. Lee HS; Ti TY; Lee PS; Yap CL. Simultaneous estimation of serum concentrations of dapsone, monoacetyldapsone, and pyrimethamine in Chinese men on maloprim for malaria prophylaxis using reversed phase high performance liquid chromatography. Ther Drug Monit 1985; 7(4): 415-20.

68. Lemnge MM; Ronn A.; Flachs H.; Bygbjerg IC. Simultaneous determination of dapsone, monoacetyldapsone and pyrimethamine in whole blood and plasma by high performance liquid chromatography. J Chromatogr 1993; 613(2): 340-6.

69. Lemp GF; Payne SF; Neal D.; Temelso T.; Rutherford GW. Survival trends for patients with AIDS. JAMA 1990; 263(3): 402-6.

70. Leoung GS; Feigal DW Jr; Montgomery AB; Corkery K.; Wardlaw L.; Adams M.; Busch D.; Gordon S.; Jacobson MA; Volberding PA; et al. Aerosolized pentamidine for prophylaxis against Pneumocystis carinii pneumonia. The San Francisco community prophylaxis trial. N Engl J Med 1990; 323(12): 769-75.

71. Levy L.; Higgins LJ. Dapsone assay based on Schiff base formation. Int J Lepr Other Mycobact Dis 1966; 34(4): 411-4.

72. Luft BJ; Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clin Infect Dis 1992; 15(2): 211-22.

73. Mallolas J.; Zamora L.; Gatell JM; Miro JM; Vernet E.; Valls ME; Soriano E.; SanMiguel JG. Primary prophylaxis for Pneumocystis carinii pneumonia: a randomized trial comparing cotrimoxazole, aerosolized pentamidine and dapsone plus pyrimethamine. AIDS 1993; 7(1): 59-64.

74. Mannan CA; Krol GJ; Kho BT. High speed liquid chromatographic analysis of dapsone and related compounds. J Pharm Sci 1977; 66(11): 1618-23.

75. Masur H.; Ognibene FP; Yarchoan R.; Shelhamer JH; Baird BF; Travis W.; Suffredini AF; Deyton L.; Kovacs JA; Falloon J.; et al. CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection. Ann Intern Med 1989; 111(3): 223-31.

76. May DG; Porter JA; Uetrecht JP; Wilkinson GR; Branch RA. The contribution of N hydroxylation and acetylation to dapsone pharmacokinetics in normal subjects. Clin Pharmacol Ther 1990; 48(6): 619-27.

77. May T.; Beuscart C.; Reynes J.; Marchou B.; Leclercq P.; Borsa Lebas F.; Saba J.; MIcoud M.; Mouton Y.; Canton P. Trimethoprim, sulfamethoxazole versus aerosolized pentamidine for primary prophylaxis of Pneumocystis carinii pneumonia: a prospective, randomized, controlled clinical trial. LFPMI Study Group. J Acquir Immune Defic Syndr 1994; 7(5): 457-62.

78. McCabe RE; Oster S. Current recommendations and future prospects in the treatment of toxoplasmosis. Drugs 1989; 38(6): 973-87.

79. McLeod R.; Mack D.; Foss R.; Boyer K.; Withers S.; Levin S.; Hubbell J. Levels of pyrimethamine in sera and cerebrospinal and ventricular fluids from infants treated for congenital toxoplasmosis. Toxoplasmosis Study Group. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36(5): 1040-8.

80. Merali S.; Zhang Y.; Sloan D.; Meshnick S. Inhibition of Pneumocystis carinii dihydropteroate synthetase by sulfa drugs. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34(6): 1075-8.

81. Metroka CE; Lewis NJ; Jacobus DP. Desensitization to dapsone in HIV positive patients. JAMA 1992; 267(4): 512.

82. Meuwissen JH; Tauber I.; Leeuwenberg AD; Beckers PJ; Sieben M. Parasitologic and serologic observations of infection with Pneumocystis in humans. J Infect Dis 1977; 136(1): 43-9.

83. Modderman ES; Merkus FW; Zuidema J.; Hilbers HW; Warndorff T. Dapsone levels after oral therapy and weekly oily injections in Ethiopian leprosy patients. Int J Lepr Other Mycobact Dis 1983; 51(2): 191-6.

84. Montaner JSG; Lawson LM; Gervais A; Aerosol Pentamidine for secondary prophylaxis of AIDS-related Pneumocystis carinii pneumonia. Ann Intern Med 1991; 114: 948-53.

85. Moss AR; McCallum G.; Volberding PA; Bacchetti P.; Dritz S. Mortality associated with mode of presentation in the acquired immune deficiency syndrome. J Natl Cancer Inst 1984; 73(6): 1281-4.

86. Murray JF Jr; Gordon GR; Gulledge CC; Peters JH. Chromatographic fluorometric analysis of antileprotic sulfones. J Chromatogr 1975; 107(1): 67-72.

87. Neuvonen PJ; Elonen E.; Mattila MJ. Oral activated charcoal and dapsone elimination. Clin Pharmacol Ther 1980; 27(6): 823-7.

88. Opravil M.; Hirschel B.; Lazzarin A.; Heald A.; Pechere M.; Ruttimann S.; Iten A.; Von Overbeck J.; Oertle D.; Praz G.; et al. Once weekly administration of dapsone/pyrimethamine vs. aerosolized pentamidine as combined prophylaxis for Pneumocystis carinii pneumonia and toxoplasmic encephalitis in human immunodeficiency virus infected patients. Clin Infect Dis 1995; 20(3): 531-41.

89. Opravil M.; Joos B.; Luthy R. Levels of dapsone and pyrimethamine in serum during once weekly dosing for prophylaxis of Pneumocystis carinii pneumonia and toxoplasmic encephalitis. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38(5): 1197-9.

90. Panisko DM; Keystone JS. Treatment of malaria - 1990. Drugs 1990; 39(2): 160-89

91. Paxton JW. Pharmacogenetic polymorphism of drug metabolism. N Z Med J 1984; 97(762): 567-9.

92. Peters JH; Gordon GR; Colwell WT Jr. The fluorometric measurement of 4,4' diaminodiphenyl sulfone and its acetylated derivatives in plasma and urine. J Lab Clin Med 1970; 76(2): 338-48.

93. Peters JH; Murray JF Jr; Gordon GR; Gelber RH. Dapsone in saliva and plasma of man. Pharmacology 1981; 22(3): 162-71.

94. Peters JH; Shepard CC; Gordon GR; Rojas AV; Elizondo DS. The incidence of DDS resistance in lepromatous patients in Costa Rica: their metabolic disposition of DDS. Int J Leprosy 1978. 44: 143-51.

95. Phair J.; Munoz A.; Detels R.; Kaslow R.; Rinaldo C.; Saah A. The risk of Pneumocystis carinii pneumonia among men infected with human immunodeficiency virus type 1. Multicenter AIDS Cohort Study Group . N Engl J Med 1990; 322(3): 161-5.

96. Philip PA; Roberts MS; Rogers HJ. A rapid method for determination of acetylation phenotype using dapsone. Br J Clin Pharmacol 1984; 17(4): 465-9.

97. Pieters FA; Vincken BJ; Zuidema J. Dapsone and monoacetyldapsone determined in serum and saliva by a sensitive high performance liquid chromatographic method with a single extraction step. J Chromatogr 1987; 422(322-7).

98. Pifer LL; Hughes WT; Stagno S.; Woods D. Pneumocystis carinii infection: evidence for high prevalence in normal and immunosuppressed children. Pediatrics 1978; 61(1): 35-41.

99. Podzamczer D.; Santin M.; Jimenez J.; Casanova A.; Bolao F.; Gudiol GR. Thrice weekly cotrimoxazole is better than weekly dapsone pyrimethamine for the primary prevention of Pneumocystis carinii pneumonia in HIV infected patients. AIDS 1993; 7(4): 501-6.

100. Pohle HD; Eichenlaub D. ZNS-Toxoplasmose bei AIDS-Patienten. AIFO 1987; 3: 122-35.

101. Porter SB; Sande MA. Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 1992; 327(23): 1643-8.

102. Powell RD; DeGowin RL; Eppes RB; McNamara JV; Carson PE. The antimalarial and hemolytic properties of 4,4 diaminodiphenyl sulfone (DDS). Int J Lepr Other Mycobact Dis 1967; 35(4): 590-604.

103. Pullar T.; Feely M. Problems of compliance with drug treatment: new solutions? Pharm J 1990; 245: 213-5.

104. Reidenberg MM; Drayer DE; Levy M.; Warner H. Polymorphic acetylation procainamide in man. Clin Pharmacol Ther 1975; 17(6): 722-30.

105. Remington JS; Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS and Klein JO (Eds) Infectious disease of the fetus and newborn infant. WB Saunders Philadelphia 1983; 143-263.

106. Revesz K.; Schneider I. Therapeutic use of dapsone in dermatitis herpetiformis (Duhring) and in certain inflammatory skin diseases. Orv Hetil 1995; 136(2): 59-62.

107. Robert Koch-Institut für Infektionskrankheiten und nicht übertragbare Krankheiten. 122. Bericht des AIDS-Zentrums im Robert Koch-Institut über aktuelle epidemiologische Daten. Quartalsbericht II/96

108. Rønn AM; Lemnge MM; Angelo HR; Bygbjerg IC. High performance liquid chromatography determination of dapsone, monoacetyldapsone, and pyrimethamine in filter paper blood spots. Ther Drug Monit 1995; 17(1): 79-83.

109. Rothenberg R.; Woelfel M.; Stoneburner R.; Milberg J.; Parker R.; Truman B. Survival with the acquired immunodeficiency syndrome. Experience with 5833 cases in New York City. N Engl J Med 1987; 317(21): 1297-302.

110. Royce RA; Luckmann RS; Fusaro RE; Winkelstein W. Jr. The natural history of HIV 1 infection: staging classifications of disease. AIDS 1991; 5(4): 355-64.

111. Rudd P.; Ahmed S.; Zachary V.; Barton C.; Bonduelle D. Issues in patient compliance: the search for therapeutic sufficiency. Cardiology 1992; 80 Supp: 1(2-10).

112. Ruf B.; Schürmann D.; Bergmann F.; Schüler-Maue W.; Grünewald T.; Gottschalk HJ; Witt H.; Pohle HD. Efficacy of pyrimethamine/sulfadoxine in the prevention of toxoplasmic encephalitis relapses and Pneumocystis carinii pneumonia in HIV infected patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1993; 12(5): 325-9.

113. Ruf B.; Pohle HD. Therapie und Prophylaxe der Toxoplasmose bei HIV-Infektion. AIFO 1995; 9: 479-90.

114. Sandow D.; Bretschneider R.; Bretschneider M.; Denkmann M.; Müller WA; Nass W.; Ockert G.; Röpke F.; Teichmann A. Hochrechnung zur Häufigkeit von primär Toxoplasma-infizierten Schwangeren und konnatalen Toxoplasmosen. Z Klin Med 1989; 44(21): 1869-73.

115. Schneider MM; Hoepelman AI; Eeftinck Schattenkerk JK; Nielsen TL; Van der Graaf Y.; Frissen JP; Van der Ende IM; Kolsters AF; Borleffs JC. A controlled trial of aerosolized pentamidine or trimethoprim sulfamethoxazole as primary prophylaxis against Pneumocystis carinii pneumonia in patients with human immunodeficiency virus infection. The Dutch AIDS Treatment Group. N Engl J Med 1992; 327(26): 1836-41.

116. Scott GL; Rasbridge MR. The in vitro action of dapsone and its derivatives on normal and G6PD deficient red cells. Br J Haematol 1973; 24(3): 307-17.

117. Shepard CC. Leprosy today [editorial]. N Engl J Med 1982; 307(26): 1640-1.

118. Slavin MA; Hoy JF; Stewart K.; Pettinger MB; Lucas CR; Kent SJ. Oral dapsone versus nebulized pentamidine for Pneumocystis carinii pneumonia prophylaxis: an open randomized prospective trial to assess efficacy and haematological toxicity. AIDS 1992; 6(10): 1169-74.

119. Stein M.; O'Sullivan P.; Wachtel T.; Fisher A.; Mikolich D.; Sepe S.; Fort G.; Carpenter C.; Skowron G.; Mayer K. Causes of death in persons with human immunodeficiency virus infection. Am J Med 1992; 93(4): 387-90.

120. Stringer SL; Hudson K.; Blase MA; Walzer PD; Cushion MT; Stringer JR. Sequence from ribosomal RNA of Pneumocystis carinii compared to those of four fungi suggests an ascomycetous affinity. J Protozool 1989; 36(1): 14S-16S.

121. Swain AF; Ahmad RA; Rogers HJ; Leonard JN; Fry L. Pharmacokinetic observations on dapsone in dermatitis herpetiformis. Br J Dermatol 1983; 108(1): 91-8.

122. Timm U.; Weidekamm E. Determination of pyrimethamine in human plasma after administration of fansidar of fansidar mefloquine by means of high performance liquid chromatography with fluorescence detection. J Chromatogr 1982; 230(1): 107-14.

123. Torres RA; Barr M.; Thorn M.; Gregory G.; Kiely S.; Chanin E.; Carlo C.; Martin M. Thornton J. Randomized trial of dapsone and aerosolized pentamidine for the prophylaxis of Pneumocystis carinii pneumonia and toxoplasmic encephalitis. Am J Med 1993; 95(6): 573-83.

124. Urquhart J. Role of patient compliance in clinical pharmacokinetics. A review of recent research. Clin Pharmacokinet 1994; 27(3): 202-15.

125. Waller E.; Goehrs H. Dapsone-induced hemolytic anemia in a patient with relapsing polychondritis. Drug Intell Clin Pharm 1980; 14: 412-4.

126. Walzer PD. Pneumocystis carinii new clinical spectrum?. N Engl J Med 1991; 324(4): 263-5.

127. Walzer PD; Foy J.; Steele P.; Kim CK; White M.; Klein RS; Otter BA; Allegra C. Activities of antifolate, antiviral, and other drugs in an immunosuppressed rat model of Pneumocystis carinii pneumonia. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36(9): 1935-42.

128. Walzer PD; Kim CK; Foy JM; Linke MJ; Cushion MT. Inhibitors of folic acid synthesis in the treatment of experimental Pneumocystis carinii pneumonia. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32(1): 96-103.

129. Waters MF. New approaches to chemotherapy for leprosy. Drugs 1983; 26(6): 465-7.

130. Weidekamm E.; Plozza Nottebrock H.; Forgo I.; Dubach UC. Plasma concentrations in pyrimethamine and sulfadoxine and evaluation of pharmacokinetic data by computerized curve fitting. Bull World Health Organ 1982; 60(1): 115-22.

131. Weiss LM; Harris C.; Berger M.; Tanowitz HB; Wittner M. Pyrimethamine concentrations in serum and cerebrospinal fluid during treatment of acute Toxoplasma encephalitis in patients with AIDS. J Infect Dis 1988; 157(3): 580-3.

132. Weiss LM; Luft BJ; Tanowitz HB; Wittner M. Pyrimethamine concentrations in serum during treatment of acute murine experimental toxoplasmosis. Am J Trop Med Hyg 1992; 46(3): 288-91.

133. White NJ. Clinical pharmacokinetics of antimalarial drugs. Clin Pharmacokinet 1985; 10: 187-215.

134. Wiggan EB; Dennis S.; Reele SB; Luke DR. Reassessment of dapsone as a marker of acetylator phenotypes. Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol 1991; 29(7): 262-8.

135. Wong B.; Gold JW; Brown AE; Lange M.; Fried R.; Grieco M.; Mildvan D.; Giron J.; Tapper ML; Lerner CW; et al. Central nervous system toxoplasmosis in homosexual men and parenteral drug abusers. Ann Intern Med 1984; 100(1): 36-42.

136. Zuidema J.; Hilbers Modderman ES; Merkus FW. Clinical pharmacokinetics of dapsone. Clin Pharmacokinet 1986; 11(4): 299-315.

137. Zuidema J.; Modderman ES; Hilbers HW; Merkus FW; Huikeshoven H. Rapid high performance liquid chromatographic method for the determination of dapsone and monoacetyldapsone in biological fluids. J Chromatogr 1980; 182(1): 130-5.

LEBENSLAUF

30/11/1966	geboren in Münster als Sohn des Diplom-Chemikers Günter Padberg und seiner Frau, Inglinde Padberg, geb. Schmölcke
08/73 - 06/77	Hakort-Grundschule in Marl/Westfalen
08/77 - 06/87	Albert-Schweitzer-Gymnasium in Marl/Westfalen
07/87 - 03/89	Zivildienst in dem Rehabilitationszentrum Stiftung Pfennigparade, München
04/89 - 03/91	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians Universität Würzburg
03/91	Ärztliche Vorprüfung
04/91 - 3/95	Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
03/92	1. Staatsexamen
09/94	2. Staatsexamen
04/95	Zuordnung an die Humboldt Universität zu Berlin
11/95	3. Staatsexamen
seit 12/95	Arzt im Praktikum in der II. Medizinischen Klinik (Infektiologie) im Virchow-Klinikum der Humboldt Universität zu Berlin

Danksagung

Ich danke zunächst Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Ruf für die freundliche Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit sowie Herrn Prof. Dr. med. Hans-Dieter Pohle, daß diese Untersuchung in der II. Medizinischen Klinik des Virchow-Klinikums durchgeführt werden konnte.

Ich danke allen Mitarbeitern der II. Medizinischen Klinik des Virchow-Klinikums für Anregung und Unterstützung. Besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Julius Eljaschewitsch für die fruchtbare wissenschaftliche Diskussion und Frau Ute Gläser für die zuverlässige Hilfe im Labor.

Mein außerordentlicher Dank gilt der SONNENFELD-STIFTUNG, ohne deren großzügige Finanzierung der HPLC-Anlage diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Nicht zuletzt danke ich herzlich meinen Freunden, Geschwistern, Eltern und meiner Frau Stephanie Padberg.