

# **Solubilisierung stark lipophiler Arzneistoffe in mischmizellare Systeme und deren Einfluss auf den Resorptionsprozess**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn

**Bashar Hunien**

geb. am 19. Juni 1970 in Syrien

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. habil. Dr. h. c. Reinhard Neubert
2. Prof. Dr. rer. nat. habil. Dr. h. c. Bernd W. Müller
3. PD. Dr. rer. nat. habil. Matthias Brandsch

Halle (Saale), den 06.04.2005

**urn:nbn:de:gbv:3-000008343**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008343>]

Das Fehlen einer besonderen Kennzeichnung oder eines entsprechenden Hinweises auf ein Warenzeichen, ein Gebrauchsmuster oder einen Patentschutz lässt nicht den Schluss zu, dass über die in dieser Arbeit angegebenen Dinge frei verfügt werden kann.

Für meine Eltern,  
meine Frau,  
und meinen Bruder

*“Nullius addictus iurare in verba magistri,  
quo me cumque rapit tempestas,  
deferor hospes”*

*Horazens Briefe I. Buch, 1. Brief:14-15 (an Maecenas)*

*“Science is a wonderful thing  
if one does not have to earn one's living at it.”  
Albert Einstein*

## Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AK	Akzeptorkompartiment
ANOVA	<i>analysis of variances</i>
BG und NG	Bestimmungs- und Nachweisgrenzen bei einer analytischen Methode
Br35	Brij® 35 (Polyoxyethylen(23)laurylether)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BzOH	Benzylalkohol
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CAS	<i>Chemical Abstracts Service Registry Number (American Chemical Society)</i>
CE	Kapillarelektrophorese
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration
$D_M$	Diffusionskoeffizient einer Substanz in eine Membran
DAD	Dioden-Array-Detektor
d.h.	das heißt
DIN	Deutsche Industrie-Norm
DK	Donatorkompartiment
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DPSS	<i>Diode-Pumped Solid-State LASER Systems</i>
DTAB	Dodecyltrimethylammoniumbromid
EOF	Elektroosmotischer Fluss
$E_t$	Elektronenübergangsenergie ( <i>transition energy</i> )
EtOH	Ethanol
FS	Fettsäure
ggfs.	gegebenenfalls
GIT	Gastrointestinaler Trakt
GS	Gallensalz
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-ethansulfonsäure
HTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
ICMPI	1-Ethyl-4-Carbomethoxypyridiniumiodid
ILP	Igepal-Lysis-Puffer
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
K	Verteilungskoeffizient einer Substanz (Membran/Lösung)
KRBP	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer nach Saarbrücker Rezeptur
L	Lecithin/-e (allgemein)
LDH	zytosolische Lactatdehydrogenase
$\log D$	Logarithm des Verteilungskoeffizienten einer dessozierbaren Substanz im unmischbaren Octanol/Wasser-System [1]
$\log P$	Logarithm des Verteilungskoeffizienten einer undessozierbaren Substanz im unmischbaren Octanol/Wasser-System [1]
MAKE	Mizellare Affinitätskapillarelektrophorese
MeOH	Methanol
MG	Molmasse
$MG_d$	durchschnittliche Molmasse
MMS	Mischmizellare Systeme
MuS	Mukusschicht
MW	Mittelwert
NaDC	Natrium Deoxycholol
NaGDC	Natrium Glycodeoxycholol
NaTDC	Na Taurodeoxycholol
Nd:YAG LASERs	Neodymium:Yttrium Aluminum Granat
o.g.	oben genannte
OS	Ölsäure
P90G	Phospholipon ® 90 G (ungesättigte Sojalecithine)
P90H	Phospholipon ® 90 H (gesättigte Sojalecithine)

## Abkürzungsverzeichnis

---

<b>PB</b>	Saline-Phosphatpuffer
<b>PL</b>	Phospholipid/-e
<b>PEG</b>	Polyethylenglycol
<b>PP</b>	Packungsparameter
<b>PTFE</b>	Polytetrafluorethylen (Hydrophober Membranfilter)
<b>RP-HPLC</b>	Umkehrphase-Hochleistungs-Flüssigchromatographie
<b>rSA(%)</b>	relative Standardabweichung
<b>SA</b>	Standardabweichung
<b>SL</b>	Sojalecithin/-e
<b>SLS</b>	Statische Lichtstreuung
<b>sog.</b>	sogenannt
<b>SPB</b>	Sörensen-Phosphatpuffer
<b>SS</b>	Stearinsäure
<b>T</b>	Testosteron
<b>T%</b>	prozentuale Lichttransmission
<b>TE</b>	Testosteronenanthat
<b>TP</b>	Testosteronpropionat
<b>TU</b>	Testosteronundecanoat
<b>Tw20</b>	Tween®20 (Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaurat)
<b>Tw80</b>	Tween®80 (Polyoxyethylen(20)sorbitanmonooleat)
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>u.ä.</b>	und ähnliche
<b>VB</b>	statistischer Vertrauensbereich
<b>v.a.</b>	vor allem
<b>ÜWS</b>	ungerührte wässrige Grenzschicht
<b>WS</b>	Wirkstoff
$\bar{Y}$	arithmetischer Mittelwert der Messgröße
$\lambda_{\max}$	maximale UV-Absorptionswellenlänge
$\mu$	Molenbruch
$\mu_{br}$	Scheinbare Mobilität (Bruttomobilität)
$\mu_{eff}$	Effektive Mobilität
$\mu_{EOF}$	Elektroosmotische Mobilität
$\emptyset$	Durchmesser

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>v</b>
------------------------------	----------

---

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>vii</b>
---------------------------	------------

---

<b>KAPITEL I</b>	<b>Einleitung und Zielstellung</b>	<b>9</b>
------------------	------------------------------------	----------

---

<b>KAPITEL II</b>	<b>Grundlagen und Literaturübersicht</b>	<b>13</b>
-------------------	--	-----------

---

<b>II.1</b>	<b>Überblick über Methoden zur Löslichkeitsverbesserung</b>	<b>13</b>
<b>II.2</b>	<b>Das Phänomen der Mizellbildung</b>	<b>14</b>
<b>II.3</b>	<b>Modelle zur Untersuchung und Vorhersage des Wirkstofftransports im gastrointestinalen Trakt (GIT)</b>	<b>15</b>
<b>II.4</b>	<b>Die Grenzschichtbarriere bei den Transportuntersuchungen an Permeationsmodellen mit künstlichen Lipidmembranen</b>	<b>16</b>
<b>II.5</b>	<b>Barrieren beim Steroidtransport durch das Dünndarmepithel</b>	<b>17</b>
<b>II.6</b>	<b>Verwendete Steroide als Modellstoffe für den Transport</b>	<b>20</b>
<b>II.7</b>	<b>Mizellare Tensidsysteme beim Transportprozess im GIT</b>	<b>22</b>
<b>II.8</b>	<b>Mathematische Grundlagen des passiven Membrantransportes</b>	<b>26</b>
<b>II.9</b>	<b>Einführung in die Theorie relevanter Messmethoden</b>	<b>27</b>
II.9.1	Z-Wert-Bestimmung	27
II.9.2	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	28
II.9.3	Mizellare Affinitätskapillarelektrophorese (MAKE)	32

<b>KAPITEL III</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>35</b>
--------------------	-----------------------------	-----------

---

<b>III.1</b>	<b>Materialien und Puffer</b>	<b>35</b>
<b>III.2</b>	<b>Herstellung mizellarer und mischmizellarer Systeme</b>	<b>38</b>
<b>III.3</b>	<b>Herstellung intravenöser liposomaler Lösungen für das Kaninchen-Modell</b>	<b>39</b>
<b>III.4</b>	<b>UV/VIS-spektroskopische Untersuchungen</b>	<b>40</b>
III.4.1	Transmissionsuntersuchungen zur Entwicklung der MMS	40
III.4.2	Z-Wert-Bestimmungen	41
<b>III.5</b>	<b>Gehaltbestimmung mittels HPLC-Methoden</b>	<b>42</b>
III.5.1	Analytik in mizellaren Systemen	42
III.5.2	Analytik der BSA/KRBP-Lösung	43
III.5.3	Analytik in Humanplasma	45
<b>III.6</b>	<b>Untersuchungen mittels DLS</b>	<b>49</b>
<b>III.7</b>	<b>Untersuchungen mittels MAKE</b>	<b>50</b>
<b>III.8</b>	<b>Permeationsmodell nach Fürst-Neubert zur Untersuchung der passiven Diffusion</b>	<b>50</b>
<b>III.9</b>	<b>Transportuntersuchungen mit Hilfe der Ussing-Kammer mit isolierten Abschnitten aus Mäuse-Dünndärmen</b>	<b>52</b>
<b>III.10</b>	<b>Gehaltbestimmung mittels Flüssigszintillationsmessung</b>	<b>56</b>
<b>III.11</b>	<b>Statistische Auswertungsmethoden</b>	<b>57</b>

<b>KAPITEL IV</b>	<b>Untersuchungen zur Solubilisation und Mizellbildung</b>	<b>59</b>
<b>IV.1</b>	<b>Solubilisationsuntersuchungen zur Optimierung der mischmizellaren Systeme</b>	<b>59</b>
IV.1.1	Ergebnisse	59
IV.1.2	Diskussion	66
<b>IV.2</b>	<b>Bestimmung der mizellaren Größe mittels DLS</b>	<b>70</b>
IV.2.1	Ergebnisse	70
IV.2.2	Diskussion	72
<b>IV.3</b>	<b>Bestimmung der Kapazitätsfaktoren mittels MAKE</b>	<b>77</b>
IV.3.1	Ergebnisse	77
IV.3.2	Diskussion	78
<b>IV.4</b>	<b>Ermittlung der cybotaktischen relativen Polarität mittels Z- Wert-Bestimmungen</b>	<b>80</b>
<b>IV.5</b>	<b>Zusammenfassung zur Solubilisation und Mizellbildung</b>	<b>83</b>
<b>KAPITEL V</b>	<b>Resorptionsuntersuchungen</b>	<b>87</b>
<b>V.1</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>87</b>
V.1.1	Untersuchungen zur passiven Diffusion mithilfe des Permeationsmodells nach Fürst-Neubert	87
V.1.2	Resorptionsuntersuchungen mit Hilfe der Ussing-Kammer	90
V.1.3	Resorptionsuntersuchungen am Kaninchen-Modell	95
<b>V.2</b>	<b>Zusammenfassung der Resorptionsuntersuchungen</b>	<b>96</b>
<b>KAPITEL VI</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>99</b>
<b>Summary</b>		<b>103</b>
<b>Anhang</b>		<b>107</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>		<b>cix</b>

# KAPITEL I

## Einleitung und Zielstellung

Dank der großen Fortschritte der Genomik, der kombinatorischen Chemie und der pharmakologischen *high-throughput-screening*-Methoden liefert die pharmazeutische Entwicklung zahlreiche Verbindungen als potentielle Wirkstoffe. Diese sind allerdings meist große, stark lipophile Moleküle, die letzten Endes häufig aufgrund ihrer ungeeigneten physikochemischen Eigenschaften für die Resorption durch die Biomembranen und für die galenische Formulierung vor Erreichen der Marktreife scheitern. Bekanntlich hängt die Effektivität vieler Wirkstoffe von ihrer Wasserlöslichkeit ab. Wasser bleibt das Lösungsmittel der Wahl bei der galenischen Entwicklung nicht nur aufgrund der hohen Toxizität der meisten organischen Lösungsmittel, sondern auch, weil Wasser das native Medium für die biochemischen Vorgänge in den Organismen ist. Nach dem Arzneibuch z.B. muss Wasser als grundsätzliches Lösungsmittel für die Injektionszwecke (Ph. Eur.) verwendet werden. Außerdem weist Wasser gegenüber den anderen Lösungsmitteln charakteristische, sehr einzigartige und für die Lebensprozesse am besten geeignete Eigenschaften auf [2]. Trotz der großen Fortschritte im Bereich des Wirkstofftransports bleibt die orale Gabe der bevorzugte Verabreichungsweg. Die Wirksamkeit eines peroral verabreichten Medikamentes hängt in erster Linie von der Resorption der Wirkstoffe im gastrointestinalen Trakt (GIT) ab, so dass es ihnen letztendlich gelingt, sich in den Zielorganen in therapeutischen Konzentrationen anzureichern. Das Medikament muss daher den Wirkstoff ausreichend schnell freigeben. Mit anderen Worten, der Wirkstoff muss innerhalb der Verweilzeit im GIT in Lösung gehen, um mit möglichst großen Resorptionsflächen v.a. im Jejunum (Hauptresorptionsort im GIT) in Kontakt kommen zu können. Beim Resorptionsprozess lipophiler Arzneistoffe ist ihre Freisetzung meist der langsamste und daher auch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Bei gut wasserlöslichen Wirkstoffen ergeben sich selten Bioverfügbarkeitsprobleme. Mit schwerlöslichen Wirkstoffen (Wasserlöslichkeit  $< 0,5\%$ ) sind hingegen solche Probleme häufig zu erwarten [3]. Darüber hinaus ist eine gewisse Wasserlöslichkeit des Wirkstoffes erforderlich, damit die wässrige Grenzphase zur Epithelzellmembran zu keinem schwer zu überwindenden Hindernis wird [4]. *Wils et al.* (1994) demonstrierten, dass die Zunahme der Lipophilie nur unterhalb eines  $\log D$  von ca. 3 eine Verbesserung des transepithelialen Wirkstofftransports bewirkt. Über diesen Wert hinaus führt die hohe Lipophilie eines Wirkstoffes zur Abnahme seiner Permeabilität durch die intestinalen Epithelzellen [5].

Es ist daher nicht verwunderlich, dass Techniken der Löslichkeitsverbesserung in wässrigen Medien mit der zunehmenden Anzahl der o.g. Wirkstoffkandidaten aus der pharmazeutischen Entwicklung stark an Interesse gewonnen haben. Eine der interessantesten o.g. Techniken stellt die Solubilisation in mizellare Tensidsysteme dar. Die Natur selbst bietet Beispiele für die Anwendung der mizellaren Systeme für die Verbesserung der Löslichkeit und des Transports verschiedener Substanzen in den Organismen, wie das bekannte Beispiel der Gallensalzmischmizellen und ihrer Rolle beim Verdauungsprozess im GIT. Die Solubilisationsverbesserung mit Hilfe mischmizellarer Systeme (MMS) hat verschiedene Vorteile. Diese Systeme sind meist thermodynamisch stabile (weisen generell kleine CMC-Werte auf), isotrope, wässrige Systeme. Sie sind des Weiteren in der Lage, den Transport bzw. die Resorption [6] und die Bioverfügbarkeit [7] der solubilierten Wirkstoffe sowie möglicherweise deren Stabilität [8,9] zu verbessern. Daneben wächst die Anzahl der neu entwickelten Wirkstoffe ständig, bei denen eine

Selbstaggregation in wässrigen Medien und die Bildung von Mizellen beobachtet wird, da die strukturellen Anforderungen an diese Moleküle für effektive Wechselwirkungen mit zahlreichen Rezeptoren meist auch den strukturellen Voraussetzungen für Grenzflächenaktivität und Mizellbildung entsprechen [10]. Zur Verbesserung ihrer Löslichkeit in Wasser und ihres Transports wurden daher Wirkstoffe in Formulierungen auf der Basis von mizellaren Tensidsystemen verarbeitet, wobei sich die Eignung dieser Systeme für ein breites Spektrum von Applikationen wie nasale [11,12], gastrointestinale [12,13], i.v. [14,15] und sogar kosmetische [16] gezeigt hat. Einige Präparate, die auf MMS basieren, sind sogar schon auf dem Arzneimittelmarkt erhältlich, wie z.B. Valium® MM (i.v.) oder Konaktion® (i.v. und peroral).

Das Verstehen des Aggregationsverhaltens und seines Einflusses auf den Wirkstofftransport rückte deshalb zunehmend in den Blickpunkt der Forschung. Zahlreiche Arbeiten befassten sich mit der Mizellbildung und lieferten verschiedene Theorien über dieses Phänomen und Modellvorstellungen über den mizellaren Bau unterschiedlicher Tensidsysteme. Seltener hingegen sind die Faktoren auf molekularer Ebene untersucht worden, welche den mizellaren Transport, v.a. stark lipophiler Wirkstoffe, bzw. die Wirkstoffübergabe vom mizellaren Träger an die Biomembran beeinflussen können. Im Mittelpunkt der pharmazeutischen und medizinischen Forschung lagen weiterhin meist die Gallensalzmizellen und ihre Mischsysteme mit Lipiden, für deren mizellaren Bau in der Literatur auch unterschiedliche Modellvorstellungen zu finden sind [17-24]. Trotz der großen empirischen und theoretischen Fortschritte im Bereich der Mizellbildung sind bisher weder die molekulare Architektur eines vorgegebenen mizellaren Systems noch seine Solubilisationskapazität für einen bestimmten Wirkstoff voraussagbar [25-28].

Die Haupteinschränkung bei der Verwendung der mizellaren Präparate sind ihre unvorhersehbaren kurz- oder langfristigen Nebenwirkungen, die durch die oberflächenaktiven Komponenten selbst oder eine erhöhte Toxizität des Wirkstoffes und anderer Bestandteile wie Farbstoffe und Konservierungsmittel hervorgerufen werden können. Frühere Arbeiten erbrachten jedoch den Beweis, dass der Lipidzusatz v.a. von Phospholipiden (PL) in einem MMS einen Schutzeffekt gegen die tensidbedingten membrantoxischen Auswirkungen wie die Erythrozytenhämolyse oder Membranschädigungen der mukosalen Epithelen [29-32] ausüben kann. Weiterhin bewirkt die Lipidzugabe eine Verbesserung der Solubilisation lipophiler Arzneistoffe wie z.B. lipophiler steroidaler Verbindungen [34,35] in den MMS und kann zur Verbesserung der Resorption beitragen (siehe II.7). Die Entwicklung innovativer synthetischer Mizellbildner mit guter physiologischer Verträglichkeit, erhöhter Solubilisierungskraft und verbesserter thermodynamischer und kinetischer (verzögerter Abbau der Mizellen bei der Verdünnung in den Körperflüssigkeiten bis zu Konzentrationen unterhalb der CMC) mizellarer Stabilität wie z.B. die Gruppe der Block-Copolymere [36] (wozu die Poloxamere gehören) eröffnet neue Möglichkeiten zur Entwicklung von (u.a.) peroral verabreichten mizellaren Trägersystemen. Während die mizellaren und v.a. die lipidhaltigen MMS viel versprechende Eigenschaften aufweisen, die zur Bewältigung der zwei wichtigsten Probleme beim Einsatz stark lipophiler Arzneistoffe (ihrer Wasserlöslichkeit und ihres Transports) dienen können, ergaben manche Arbeiten einen negativen Einfluss des mizellaren Einschlusses auf den Resorptionsprozess einiger lipophiler Wirkstoffe (siehe dazu II.7).

Der Ausgangspunkt dieser Arbeit war daher, wie sich die intestinale Resorption der stark lipophilen Wirkstoffe bei der Verwendung mischmizellarer lipidhaltiger Tensidsysteme optimieren lässt. Dabei sollen die Einflussfaktoren auf molekularer Ebene näher betrachtet werden, welche bei der Resorption, v.a. stark lipophiler Wirkstoffe, bzw. bei der Wirkstoffübergabe vom mizellaren Träger an die Biomembran eine Rolle spielen können. Diese Untersuchungen benötigen zunächst die Optimierung der Solubilisation der untersuchten stark lipophilen Modellstoffe durch die Verwendung von binären oder ternären MMS auf der Basis jeweils von einem Tensid und einem Lipidzusatz (aus einem Lipid oder einem Lipidgemisch zweier Lipide). Dadurch ergibt sich eine Reihe anderer Fragen, die sich auf die Optimierung der Solubilisation und die Mizellbildung beziehen:

- Welche Lipide eignen sich bei Verwendung verschiedener Tenside am besten für die Bildung von MMS mit optimalen Lipidgehalten und optimalen Kapazitäten zur Solubilisierung der Modellwirkstoffe (Testosteron und seine Propionat-, Enanthat und Undecanoatester)?
- Ist durch die Verwendung ternärer Systeme (Tensid+PL+FS) eine bessere Solubilisation für die stark lipophilen Wirkstoffe als bei den binären Systemen (Tensid+PL bzw. Tensid+FS) erreichbar?
- Wie organisieren sich die solubilierten stark lipophilen Wirkstoffe innerhalb der untersuchten mizellaren Gebilde und welche strukturellen Faktoren können ihre Einordnung und damit ihre Solubilisation in diese Systeme beeinflussen?

Die vorliegende Arbeit gliedert sich daher in zwei Hauptabschnitte. Der erste Teil (KAPITEL IV) befasst sich mit Fragen der Solubilisation und der Mizellbildung. Gegenstand des zweiten Teils (KAPITEL V) ist es, die intestinale Resorption der in den optimierten MMS solubilierten Modellwirkstoffe zu untersuchen, und mögliche Einflussfaktoren aufzuzeigen.

Die gewonnenen grundsätzlichen Erkenntnisse durch die Untersuchungen in dieser Arbeit sollen einen Beitrag zum Verständnis der Solubilisation stark lipophiler Wirkstoffe und ihre Übergabe von mizellaren bzw. lipidhaltigen mischmizellaren Trägersystemen an die Biomembranen v.a. im GIT leisten. Dies kann zum effektiven Einsatz dieser Systeme als Arzneistoffträger bei der Entwicklung innovativer peroraler Verabreichungsformen für derartige Wirkstoffe führen.

*„Die besten Bücher sind die, die einem sagen,  
was man bereits weiß.“*

*George Orwell (1903-1950) „1984“*

*“If we knew what it was we were doing,  
it would not be called research, would it ?”*

*Albert Einstein*

## KAPITEL II

### Grundlagen und Literaturübersicht

#### II.1 Überblick über Methoden zur Löslichkeitsverbesserung

Die eingesetzten klassischen Methoden zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit von Arzneistoffen in der Pharmazie können allgemein in drei Hauptkategorien eingeordnet werden: die Manipulation der festen Phase, die chemische Modifikation des schwer löslichen Wirkstoffes und Methoden der Lösungsvermittlung [3,37,38].

Die erste Methode wird auf Substanzen angewandt, deren fester Zustand unterschiedliche Kristallstrukturen (Polymorphie) zeigt. Sie beruht im Prinzip auf der Verwendung der metastabilen kristallinen Formen bzw. der nichtkristallinen amorphen Formen dieser Substanzen, da diese auch die größeren freien Energien (G) beim Lösen in Wasser aufweisen. Dabei sollen Zusätze wie Polyvinylpyrrolidon (PVP), Methylcellulose, Gelatine und Tenside verhindern, dass diese Formen beim langen Kontakt mit dem Lösungsmittel in kristalline stabile Polymorphe transformiert werden.

Die chemische Modifikation der schwer löslichen Wirkstoffe erfolgt durch die Einführung hydrophiler Gruppen in die chemische Struktur wie  $-OH$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$  u.ä. zwecks Erhöhung der Wasserlöslichkeit der Verbindung. Durch Änderung der chemischen Struktur kann jedoch die pharmakologische Aktivität beeinflusst werden, wodurch sich Grenzen in der Anwendung dieser Methode ergeben. Nicht nur die physikochemischen und pharmakologischen Eigenschaften eines Wirkstoffes können durch die chemische Modifikation geändert werden, sondern auch ihre biopharmazeutischen und pharmakokinetischen. Dies führte zur Entwicklung des Begriffes der sog. *Prodrugs*. Diese sind in der Regel pharmakologisch inaktive Derivate des wirksamen Wirkstoffes. Sie werden chemisch so manipuliert, dass der Wirkform anschließend in der gewünschten Konzentration ans Wirkungsziel gelangen kann. Die Transformation der *Prodrugs* zur Wirkform erfolgt durch einen enzymatischen oder nichtenzymatischen Abbau innerhalb des Organismus.

Die angewandten Techniken der Lösungsvermittlung beinhalten die Veränderung der Lösungsmiteleigenschaften des Wassers durch die Mischung mit anderen Lösungsmitteln (Kosolventien) wie Glycerol, PEG, Ethanol (EtOH) und Propylenglycol (Polaritätsänderung) oder die Zugabe von Wasserstrukturbrechern (Hydrotropen) wie z.B. Harnstoff, PVP, Nicotinamid und Xanthinderivate, die Solubilisation in mizellaren Tensidsystemen und zuletzt die reversible Bildung von Komplexen mit verbesserter Löslichkeit. Zu den eingesetzten Komplexen zählen anorganische und organische (z.B. Chelate) Metall-Komplexe, organische Molekül-Komplexe (z.B. Coffein- und Polymerkomplexe) und Einschlussverbindungen (z.B. Cyclodextrine).

## II.2 Das Phänomen der Mizellbildung

Tenside sind amphiphile Stoffe, d.h., ihre Moleküle besitzen einen hydrophilen (ionischen oder nicht ionischen) Teil sowie einen lipophilen Teil (überwiegend Kohlenwasserstoffkettenabschnitte), und weisen dementsprechend Grenzflächenaktivität auf. In wässrigen Lösungen reichern sich Tenside deshalb bevorzugt an den Grenzflächen (z.B. Luft/Wasser, Gefäßwand/Wasser oder Öl/Wasser) an, indem ihre hydrophilen Teile mit der polaren wässrigen Phase assoziieren, während ihre hydrophoben Teile in Wechselwirkung mit den unpolaren Oberflächen treten. Dadurch bewirken sie eine Verringerung der Grenzflächenspannung zwischen den nicht mischbaren Phasen im betrachteten System. Mit zunehmender Tensidkonzentration werden die Grenzflächen mit Tensidunimern gesättigt, und somit werden mehr Tensidmoleküle gezwungen, in Lösung zu gehen. Da die Adhäsionskräfte zwischen den lipophilen Struktureinheiten des Tensidmoleküls und dem Wasser im Vergleich zu den Kohäsionskräften benachbarter Wassermoleküle sehr schwach sind, entwickeln sich im Endeffekt Abstoßungskräfte zwischen diesen Tensidteilen und den Wassermolekülen in ihrer Umgebung [38]. Daraufhin versuchen die Wassermoleküle, der wegen der Abstoßung energetisch angespannten Lage auszuweichen, indem sie untereinander zunehmend Wasserstoffbrücken aufbauen. Dadurch aber entstehen *Cluster*-Strukturen hoch geordneter Wassermoleküle (sog. Eisberg-Bildung) und es ergibt sich ein Entropieverlust im Lösungsmittel. Beim Versuch, sich aus der erzwungenen Überordnung zu befreien, drängen die Wassermoleküle die Tensidunimere zur Multimerisation. Dabei treten starke *Van-der-Waals'sche* Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Molekülteilen auf und erleichtern dadurch die Aggregatbildung. In der Lösung entstehen daher aus den Tensidmolekülen spontan prä-mizellare und mizellare Assoziate, die gleichzeitig wieder zerfallen, wie es bei einem normalen stöchiometrischen Gleichgewicht der Fall ist. In einem bestimmten Bereich der Tensidkonzentration erreicht die thermodynamische Instabilität der Wasserstruktur bzw. die Entropieabnahme einen kritischen Wert. Dies führt bei weiterer Zugabe zur Auslösung des Mizellbildungsprozesses. Die Solvensmoleküle (hier die Wassermoleküle) leiten dabei eine massive Abwehrreaktion ein und drängen die unpolaren Gruppen des Solvend (Tensid) zunehmend zum Assoziieren, um die Berührung mit ihnen möglichst zu vermindern bzw. ihre eigene Entropie wieder zu gewinnen. Auf diese Weise werden alle zusätzlichen Unimere sofort als Mizellen der stabilsten Größe „ausgeschieden“, so dass danach ihr molekulardispers verteilter Anteil in der Lösung konstant bleibt und das Gleichgewicht mit dem assoziierten Anteil wieder hergestellt wird. Die Mizellbildung ist daher „in erster Linie als die Folgeerscheinung eines Fehlordnungsprozesses im Lösungsmittel“ aufzufassen [39]. Der o.g. Konzentrationsbereich ist unter dem Begriff (CMC) „kritische Mizellbildungskonzentration“ bekannt, was zu einer irrtümlichen Auffassung über diesen Prozess führen kann. Ab dem Bereich der CMC werden die Mizellen stabiler und nachweisbar. Neben der zunehmenden Mizellbildung ändern sich die physikochemischen Eigenschaften der Lösung bei der CMC auch sprunghaft, was hauptsächlich auf Strukturveränderungen des Lösungsmittels zurückzuführen ist. Diese sprunghaften Änderungen in Eigenschaften wie Lichtstreuung, Leitfähigkeit, Gefrierpunkt und Grenzflächenspannung werden deshalb für die Bestimmung der CMC eingesetzt. Die resultierenden mizellaren Lösungen sind isotrop und optisch transparent, weshalb sie auch wie einphasige Systeme aussehen. Sie sind außerdem thermodynamisch stabil, insbesondere bei kleineren CMC-Werten. Die mizellaren Tensid-systeme sind weiterhin in der Lage, unterschiedliche Verbindungen innerhalb des mizellaren Gerüsts einzubetten und somit die Wasserlöslichkeit oder den Transport der Problemstoffe zu verbessern. Sie zeichnen sich auch bei der Applikation durch eine

schnelle Freisetzung und verbesserte Resorptionseigenschaften des eingebetteten Wirkstoffes aus. Die Mizellaren Systeme fanden daher Anwendung als Wirkstoffträgersysteme bei der Formulierung vieler fertigen Arzneiformen, insbesondere die auf GS-Lecithin/Fettsäure basierenden mischmizellaren Systeme [40]. Zu den Mizellbildnern gehören zahlreiche Gruppen amphiphiler Stoffe. Auf Grund der Toxizität und anderer unerwünschten Nebenwirkungen sind jedoch nur wenige davon von pharmazeutischer Relevanz. Die Gruppe der Block-Copolymere bietet viel versprechende physikochemische und physiologische (v.a. bezüglich der Verträglichkeit) Eigenschaften an und erwies sich deshalb in letzter Zeit als eine der pharmazeutisch interessantesten Mizellbildnergruppen für die Anwendung als Wirkstoffträgersysteme [36].

### **II.3 Modelle zur Untersuchung und Vorhersage des Wirkstoff- transports im gastrointestinalen Trakt (GIT)**

Unter den allgemeinen Begriff „Wirkstofftransport“ werden alle Transportvorgänge verstanden, die es dem Wirkstoff nach seiner Freisetzung aus der verabreichten Arzneiform ermöglichen, ans Wirkungsziel im Organismus zu gelangen. Dazu zählen ebenso die Transportvorgänge, welche die Ausscheidung des resorbierten Wirkstoffes bzw. seiner Metabolite aus dem Organismus ermöglichen. „Bei der Absorption (Resorption), Distribution und Exkretion von Pharmaka stehen als Prinzipien des Stofftransports allgemein die Konvektion und Diffusion im Vordergrund“. Weiterhin können auch aktive Transportprozesse wie z.B. Endozytose und carriervermittelter Transport eine wichtige Rolle beim Wirkstofftransport spielen [4].

Für die Untersuchung und Vorhersage des Wirkstofftransports im GIT (u.a.) bietet sich leider kein universelles Modell an, welches Antworten auf alle dazugehörigen Fragen geben kann. Dabei kommen deshalb unterschiedliche Untersuchungsmethoden zum Einsatz. Jede Methode hat ihre Stärken und Schwächen und kann nur im Zusammenhang mit bestimmten und spezifischen Fragen angewandt werden. Diese Methoden lassen sich in vier Hauptgruppen unterteilen, *in-vitro*, *in-situ*, *in-vivo* und *in-silico*.

*In-vitro*-Methoden können auch in zwei weitere Untergruppen geteilt werden, die nichtbiologischen bzw. die physikochemischen Methoden und die biologischen Methoden. Zur ersten Gruppe gehören Methoden wie die Bestimmung der Lipophilie des Wirkstoffes ( $\log P/\log D$ ), Die Bestimmung des Absorptionspotentials (AP), die Permeation durch künstliche Lipidmembranen einschließlich der Anwendung von Liposomen als Lipidmembranen und die IAM-Chromatographie (*Immobilized Artificial Membrane Chromatography*). Zu den biologischen Methoden zählen die auf isolierten Tiergeweben basierenden Modelle (*ex-vivo*) wie „*everted sac*“-Technik, *Ussing*-Kammer-Technik und isolierte Membranvesikel sowie Zellkulturtechnik (Caco-2 bzw. TC-7, HT29-Zelllinie, Dünndarmzelllinien fetaler und neugeborener Ratten und *Mandin-Darby*-Hundnierenzellen (MDCK)).

Mit den *In-situ*-Methoden sind alle Perfusionsuntersuchungen am Tiermodell wie „*single pass perfusion*“, „*recirculating perfusion*“, „*oscillating perfusion*“ und „*closed loop method*“ sowie die Perfusionsuntersuchungen am Menschen [41,42] gemeint.

Die genauesten Vorhersagen der pharmakokinetischen Eigenschaften eines verabreichten Medikamentes kommen aus Untersuchungen *in-vivo*. Diese sind jedoch ungeeignet als *Screening*-Methoden für eine große Anzahl neu entwickelter Verbindungen und benötigen eine große Anzahl von Versuchsobjekten (Tiere oder Menschen), um statistisch aussagekräftige Ergebnisse zu liefern, sowie auch große Wirkstoffmengen. Sie sind auch labor- und kostenintensiv und dürfen nur unter bestimmten Einschränkungen durch-

geführt werden. *In-vivo*-Methoden sind außerdem nicht in der Lage, Antworten auf spezifische Fragen und Details der Transportmechanismen anzubieten.

Die großen Fortschritte in den computergestützten virtuellen *Screening*-Methoden (*in-silico*) in den letzten Jahrzehnten eröffneten neue, wenig aufwendige Möglichkeiten für die Erforschung und Vorhersage der physikochemischen, pharmakologischen und biopharmazeutischen Eigenschaften potentieller Wirkstoffe sogar in frühen Phasen der Entwicklung. Diese Methoden gehen vom Zusammenhang zwischen den strukturellen Eigenschaften einer Verbindung und ihren physikochemischen Eigenschaften, sowie ihrer pharmakologischen Aktivität in den Organismen aus. Sie werden deshalb als QSAR- (*Quantitative Structure-Activity Relationship*) oder auch QSPR- (*Quantitative Structure-Property Relationship*) Methoden bezeichnet. QSAR/QSPR-Methoden nutzen konventionelle Eigenschaften – „*Descriptors*“ genannt – (wie Molmasse oder Anzahl und Art der Atome und Bindungen), topologische (2D) *Descriptors*, geometrische (3D) *Descriptors* (wie  $PSA = \text{Polar Surface Area}$ ,  $PSA_d = \text{Dynamic Polar Surface Area}$ ,  $NPSA_d = \text{Dynamic Non-Polar Surface Area}$ ,  $SASA = \text{Solvent Accessible Surface Area}$  und Molekularvolumen), elektrostatische *Descriptors* (z.B. Dipolmoment und partielle atomare Ladung), und quantenchemische *Descriptors* (von der molekularen Valenzstellen abhängig wie Ladungsverteilung, Kapazität der Wasserstoffbrückenbildung, Säure/Base-Stärke, Polarität, Lipophilie und elektrostatische Eigenschaften der molekularen Oberfläche). Mit Hilfe der rechnerischen und v.a. der auf quantenmechanischen Berechnungen basierten Methoden können auch wichtige Parameter für die Resorption einer Verbindung wie ihr  $\log P$  bzw.  $\log D$  vorausgesagt werden.

Eine Reihe von Publikationen [43-52] bietet einen sehr guten Überblick über die o.g. Methoden mit ihren Vor-/Nachteile und spezifischen Anwendungsgebieten an, weshalb hier darauf nicht weiter eingegangen wird.

#### II.4 Die Grenzschichtbarriere bei den Transportuntersuchungen an Permeationsmodellen mit künstlichen Lipidmembranen

Bekanntlich verbreiten sich grenzflächenaktive Moleküle wie Tenside in ihren Lösungen auf sämtlichen Grenzflächen in der Umgebung einschließlich der Lösung-Luft-Grenzflächen und der Innenwand des Gefäßes. Ein Teil der solubilisierten Wirkstoffmoleküle haftet auch mit diesen Tensidmonoschichten an den Grenzflächen. Die Lipidmembranen bilden dabei keine Ausnahme. Es entstehen daher Tensidmonoschichten auf den Kontaktflächen der Lipidmembranen mit der Tensidlösung (Abb. 1). Dadurch werden die Membranlipide in Kontakt mit der Lösung gebracht, und somit wird die Wirkstoffaufnahme in diesen Membranen erleichtert. Andererseits müssen sich die eingebetteten Wirkstoffe erst zwischen den Mizellen und dieser Monoschicht verteilen,

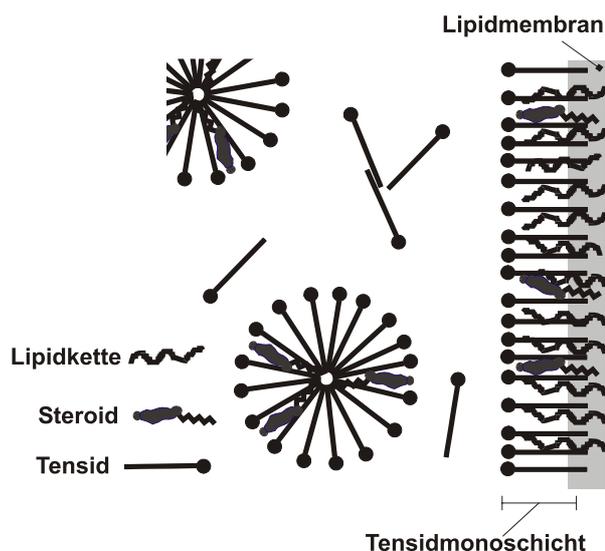


Abb. 1 Bildung der Tensidmonoschichten auf den Lipidmembranen in den Tensidlösungen

bevor sie in einen direkten Kontakt mit der Membran kommen können. Hierzu ergibt sich die Frage, wie derartige Vorgänge ablaufen und was hier für den Transport der

geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Die Frage stellt sich v.a. wegen der hier erwarteten elektrostatischen Abstoßung, wenn es sich um ionische, elektrisch identisch geladene Tensidmoleküle handelt. Higuchi und Mitarbeiter [53-55] untersuchten beispielsweise den Transport des Cholesterins in mizellaren Systemen aus elektrisch neutralen oder geladenen Tensiden durch künstliche Membranen. Sie erklärten den Transport hier mit Kollisionen der Mizellen mit der o.g. Monoschicht an der Membran. Sie stellten auch fest, dass dieser Schritt eine entscheidende Rolle beim Transport spielen könnte (*interface transfer-controlled transport*), v.a. wenn die Mizellen elektrisch geladen sind. Extrem lipophile Wirkstoffe gehen in Lösung bei der Verwendung der MMS ausschließlich durch ihre Einbettung in der mizellaren Phase. Sie sind daher nur über einen direkten Kontakt der Mizellen mit der Membran in der Lage, in die Membran aufgenommen zu werden bzw. sie zu verlassen. Die Kollision wird dementsprechend zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für den Transport (*interfacial barrier-limited transport*). Higuchi und Mitarbeiter vermuteten auch, dass diese Effekte unter vergleichbaren Bedingungen ebenso bei Untersuchungen *in-situ* oder *in-vivo* zu erwarten sind.

### **II.5 Barrieren beim Steroidtransport durch das Dünndarmepithel**

Beim Transport durch den nativen Dünndarm ergeben sich verschiedene wichtige Barrieren, die überwunden werden müssen, bevor ein lipophiler Wirkstoff an die Epithelzellen oder anschließend in die Blutbahn gelangen kann. Diese sind die ungerührte wässrige Grenzschicht (UWS) (*Unstirred Boundary Water Layer*) [56-62], die Schleimschicht bzw. die gebundene Glycocalyx (beide hier als Mukusschicht (MuS) bezeichnet) [63-66], die zellularen Lipidmembranen und die Membrantransporter sowie die verschiedenen enzymatischen Systeme der Phasen I und II.

Die UWS ist die wässrige, schwach durchmischte Schicht, die an einer Membran haftet. In ihr entsteht ein Konzentrationsgradient von diffundierenden schwachlöslichen Stoffen, wodurch sie sich deutlich vom Rest der Lösung unterscheidet. *In-vivo* ist die UWS praktisch nicht von der MuS zu unterscheiden [67,68]. Die UWS stellt eine sehr wichtige Barriere v.a. für die Resorption lipophiler Wirkstoffe dar [63,69,70]. Beispielsweise weist die Resorption lipophiler hoch resorbierbarer Wirkstoffe wie Testosteron (T) *in-vitro* eine Abhängigkeit von den Durchmischungsbedingungen bzw. Dicke der UWS auf [5,57,62,71]. Da die Dicke und der Einfluss der UWS in Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen sehr variieren, wird diese Schicht *in-vitro* durch mechanische Schüttelapparaturen oder Anwendung eines „bubble lift“-Systems mit dem Rest der Lösung durchmischt. *In-situ* (z.B. bei der intrainestinalen Perfusion) wird dies durch die Erhöhung der Durchflussrate erreicht.

Die native MuS hat eine hoch hydratisierte (ca. 90% Wasser) gelartige viskose Struktur. Neben den Muzinmolekülen (ca. 0,5-5% der gefriergetrockneten Masse) enthält sie eine Vielzahl anderer Komponenten wie Lipide, zelluläre bzw. serumische Makromoleküle, Elektrolyte, Mikroorganismen, abgelöste Darmzellen, Immunoglobuline und Peptide. Beim Schwein, beispielsweise, beträgt der Anteil der Lipide ca. 37%, Proteine ca. 39% und DNS ca. 6% der gefriergetrockneten Mukusmasse [72]. Die Muzinmoleküle sind Glycoproteine mit einer hohen Molmasse. Ihr Gerüst besteht aus stark glycosylierten Peptidketten und Zwischenabschnitten aus unglycosylierten Peptidketten. Die letzteren weisen eine große Anzahl an hydrophoben Stellen auf, die Lipide oder Proteine binden können [67,73,74]. Die molekulare Zusammensetzung des Muzins ist in den verschiedenen Teilen des GIT unterschiedlich [75]. Die Sialinsäure kann sich an der Bildung der Polysaccharidketten beteiligen [76] und der MuS dadurch eine negative elektrische Ladung [77] verleihen. Die unterschiedlich elektrisch geladenen Gruppen in der MuS

spielen die Rolle eines Ionenaustauschers, der den Transport von Ionen, Arzneistoffen, Nahrungsstoffen und bakteriellen Toxinen beeinflussen kann [78]. Die native MuS bekommt folglich ihre Funktion als Barriere für den Transport verschiedener Stoffe nicht nur durch ihre viskose gelartige Struktur [74], sondern auch durch ihren hohen Lipid- und Proteingehalt sowie durch die elektrisch geladenen Gruppen in ihrer Matrix. Beispielsweise zeigten Untersuchungen mit HT29-H-Monolayern, dass sich die Permeation des T nach der Entfernung der MuS ungefähr verdreifachte [79]. Die Glycocalyx ist die Gesamtheit aller Zuckermoleküle, die an Oberflächenproteine und Oberflächenphospholipide der äußeren Seite der Zellmembran gekoppelt sind [80].

Die Zellmembran zeigt die bekannte Struktur einer Lipiddoppelschicht mit den Eigenschaften einer zweidimensionalen Flüssigkeit, die mit dem *Fluid-Mosaic*-Membranmodell beschrieben werden kann [4]. Nach diesem Modell sind die einzelnen Lipidmoleküle auf der Ebene ihrer Monoschicht freibeweglich, in der sie einfach und schnell diffundieren können, während ihr Wechsel zur zweiten Monoschicht eingeschränkt ist. Bei den meisten Tierarten verteilen sich die Lipide asymmetrisch zwischen den beiden Monoschichten der Zellmembran. Die äußere Monoschicht besteht hauptsächlich aus zwitterionischen Lipiden wie Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin, während sich die innere Monoschicht überwiegend aus negativ geladenen Lipiden wie Phosphatidylserin bildet [48]. Die Innenseite der Zellmembran ist gegenüber der extrazellulären Seite elektrisch negativer geladen [81]. Während der pH-Wert in der unmittelbaren Nähe der extrazellulären Membranseite ca. 5,3 beträgt, weist das Zytoplasma der Enterozyten einen pH-Wert von ca. 7-7,2 auf. Dadurch entsteht ein Protonengradient über der Membran. Die MuS weist dementsprechend einen pH-Wert von 5,3-6 auf, während der pH-Wert des Dünndarminhalts durchschnittlich ca. 6,5 beträgt. Zuständig für das entstehende pH-Mikroklima auf der unmittelbaren extrazellulären Membranseite sind in erster Linie  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ - und  $\text{HCO}_3^-/\text{Nicotinat}$ -Austauscher im Bürstensaum [4,82]. Bei einer passiven transzellulären Diffusion ergeben sich nach der Verteilung der Stoffe in der apikalen Zellmembran zwei Diffusionswege. Entweder diffundiert der Stoff weiter innerhalb der Membrandoppelschicht bis zur basolateralen Seite oder er diffundiert durch die Doppelschicht ins Zytoplasma hinein, bevor er die Zelle auf der basolateralen Seite verlässt [48]. Die Plasmamembran des Bürstensaums (Mikrovilli) ist ca. 10-11 nm dick, während die Dicke der basolateralen Membran nur ca. 7 nm beträgt. Dies weist auf das hohe Protein/Lipid-Verhältnis in der ersten Membran hin [63]. Diese Proteine sind hauptsächlich integrierte Enzyme, Influx- oder Effluxtransporter, und Rezeptoren. Diese Proteingruppen überlappen sich gegenseitig. Ein Transportprotein kann z.B. eine Enzymaktivität aufweisen oder ein Hormonrezeptor an ein Enzym gekoppelt sein und selbst Transporteigenschaften besitzen [81]. Durch eine enzymatische Modifikation, eine erleichterte Diffusion, einen aktiven Transport in oder aus der Zelle oder eine rezeptorvermittelte Endozytose spielen diese Membranproteine eine große Rolle beim Transport vieler Wirkstoffe. Daher zählen sie ggfs. auch zu den Barrieren für den Wirkstofftransport [84-87].

Neben den Membranproteinen befindet sich auch eine ganze Reihe wichtiger mikrosomaler Enzyme der Phase I in der Darmmukosa. Diese können die transportierten Wirkstoffe transformieren bzw. inaktivieren und stellen somit auch eine wichtige Transportbarriere dar [83,84]. In der Darmmukosa konzentrieren sich die o.g. Proteine hauptsächlich in den Zottenspitzen [84,88]. Eine der wichtigsten Enzymgruppen stellt hier die Familie der Hämproteine vom Typ des Cytochrom P-450 (CYP) dar, insbesondere die Mitglieder der CYP3A-Subfamilie. Beim Wirkstoffmetabolismus beim Menschen ist CYP3A4 das Hauptenzym für Phase-I-Reaktionen in der Leber und im

Dünndarm [84]. Diese Enzyme zeigen Steroidhydroxylaseaktivitäten und bilden 6 $\beta$ -OH-Derivate als Hauptmetabolite. Solche Aktivitäten wurden in mikrosomalen Leber- oder Darm-Präparaten von Menschen [83,89-94] und anderen Säugetieren wie Ratten, Mäuse und Affen sowie auch von Regenbogenforellen nachgewiesen. Dabei wurde T als Marker für die 6  $\beta$ -Hydroxylationsaktivität verwendet. Bei Transportversuchen mittels *Ussing*-Kammer durch Jejunumabschnitte von Ratten gab es auch Beweise für die metabolische Umwandlung von T zu Androstenedion, 6-OH, 2  $\alpha$ -OH, und 16  $\alpha$ -OH-Derivate (geordnet nach abnehmender Ausbeute). Bei ähnlichen Untersuchungen an menschlichen Jejunumabschnitten entstanden Androstenedion und 7-OH-Derivate als Hauptmetabolite [95]. Bei Ratten (Präparate aus dem Dünndarm) konnten auch Hydroxylationsaktivitäten wie 16  $\alpha$ - und 16  $\beta$ -OH [96,97] *in-vitro* nachgewiesen werden. Weiterhin wurden bei mikrosomalen Leber- und Dünndarm-Präparaten von Menschen und Säugetieren Hinweise auf enzymatische Aktivitäten wie 17 $\beta$ -Hydroxysteroidoxidoreductase (17  $\beta$ -HSOR) [98], 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase (17  $\beta$ -HSD) [99-102] und Umwandlung des T zu 17  $\beta$ -hydroxy-5  $\alpha$ -androstane-3-one und 5  $\alpha$ -androstane-3  $\alpha$ , 17  $\beta$ -diol (Ratten) [103,104] gefunden. Die HSD-Aktivität wurde auch bei Caco-2-Monolayer (17  $\beta$ -HSD) [105] nachgewiesen. Interessanterweise wurden bei der Darmmikroflora aller Wirbeltiere inklusive der des Menschen neben den Hydroxylationsaktivitäten ebenso starke HSD-Aktivitäten (v.a. 3  $\alpha$ ) [106,107] festgestellt. Deshalb ist der GIT ein sehr wichtiges Organ für die Phase-I-Reaktionen der Sexualhormone [100]. Neben den o.g. Phase-I-Reaktionen zeigen Untersuchungen mit mikrosomalen Leber- oder Darm-Präparaten von Menschen [88,108-110], verschiedenen Säugetieren und Fischen die Anfälligkeit der Steroide beim Transport im GIT auch für eine ganze Reihe enzymatischer Aktivitäten der Phase-II-Art wie Steroid-Uridindiphosphoglucuronyltransferase (Steroid-UDPGT) und Steroid-Sulfotransferase (Steroid-ST). Diese Aktivitäten sind dafür zuständig, dass die Ausscheidung der metabolisierten Steroide hauptsächlich renal als Glucuronide und Schwefelsäurehalbeste erfolgt [108,111,112].

In den letzten Jahrzehnten erwies sich die Rolle der Membrantransporter als sehr wichtig bei Transportprozessen vieler Wirkstoffe durch die Biomembranen und rückte deshalb zunehmend in den Blickpunkt der Wissenschaft. Zu den wichtigsten Membrantransportern, die am Lipidtransport aktiv beteiligt sind, zählen die MDR-Familie (*Multidrug-Resistance Proteins*), zu der die P-Glycoproteine (P-gp) gehören, und die MRP-Familie (*Multidrug-Resistance associated Proteins*). Beide Gruppen sind strukturell verwandt und werden den sog. ABC-Transportern (*ATP-Binding Casette*) zugeordnet. Substrate dieser Pumpen decken ein breites Spektrum von strukturell sehr heterogenen Substanzen ab. Dazu gehören beispielsweise neben den Lipiden zahlreiche Xenobiotika und verschiedene Metabolite. Diese Proteine sind in der Lage, die Exkretion ihrer Substrate aus der Blutbahn zu vermitteln und sie aus dem Inneren der Enterozyten durch die Zellmembran ins intestinale Lumen herauszupumpen. Dadurch reduzieren sie im Endeffekt die gesamt resorbierte Menge und beeinflussen die Bioverfügbarkeit der betroffenen Substrate [85,113-116]. Im menschlichen GIT wurde nur ein wirkstofftransportierendes P-gp gefunden und zwar das MDR1 [113]. Verschiedene Steroide, Lipidmetabolite und lipophile Wirkstoffe zeigen eine hohe Affinität zu P-gp und werden infolgedessen aus der Enterozyten zurück zum Darmlumen transportiert [113,114]. Interessanterweise ließ sich hier auch feststellen, dass P-gp und CYP3A4 häufig in denselben Zellen vorkommen. Darüber hinaus werden viele Verbindungen, die als Substrate oder Hemmstoffe für P-gp dienen, auch zugleich von CYP3A4 als Substrat erkannt. Es wird folglich angenommen, dass beide Proteine Teil eines kombinierten Entgiftungsmechanismus in den Zellen sind [83-86,112,113,117]. Wie bereits oben

erwähnt, stellen Steroide ein wichtiges Substrat für CYP3A4-Aktivitäten dar. Daher wird vermutet, dass ABC-Proteine auch eine Rolle beim Transport von Steroiden spielen. Obwohl Oka *et al.* [118] keinen Beweis für einen Einfluss der MDR1 auf den Transport des T im Rattendünndarm finden konnten, bleibt immerhin der Einfluss des MRP2-Proteins auf die Ausscheidung der Steroide denkbar, denn diese Pumpe beteiligt sich aktiv an der Exkretion der konjugierten Metabolite wie Glucuronide oder Sulfate [86]. Dadurch kann sie das Reaktionsgleichgewicht zugunsten der Kopplung verschieben und folglich eine Zunahme der Inaktivierung bzw. der Ausscheidung der Steroide bewirken.

## II.6 Verwendete Steroide als Modellstoffe für den Transport

Als Modellstoffe in dieser Arbeit wurden T und eine Reihe seiner Ester (*Prodrugs*) ausgewählt. T stellt quantitativ und qualitativ das wichtigste im männlichen Organismus synthetisierte Androgen dar. In Abhängigkeit vom Zielorgan zeigt das T beim Mann ein androgenes (z.B. Prostata, Samenbläschen, Nebenhoden) oder proteinanaboles (z.B. Muskulatur, Knochen, Leber) Wirkungsspektrum. Die normale Produktion bzw. Freisetzung des T beträgt 7 mg/Tag [119]. Das T wird dabei in einem circadianen Rhythmus freigesetzt und zu etwa 98% an Trägerproteine (SHBG = Sexualhormon-bindendes Globulin) gebunden. Der Testosteronserumspiegel bei Männern liegt bei 2,8 – 8 ng/ml (9,9-27,8 nM). Die Plasmahalbwertszeit beträgt ca. 10 Minuten. Der Abbau erfolgt hauptsächlich in der Leber. Die wichtigsten Metabolite sind 5  $\alpha$ -Dihydrotestosteron, Androstandiol, Androstandion und Androsten [112,120,121]. Ziel einer Testosteron-*Replacement*-Therapie im Falle des Hypogonadismus ist es normalerweise, den Blutspiegel wieder auf ein normales physiologisches Niveau einzustellen.

Das T weist *in-vitro*, *in-situ* und auch *in-vivo* sehr gute Permeationseigenschaften auf. Es wurde deshalb häufig bei Resorptionsuntersuchungen *in-vitro* als Vergleichsstandard (*Ussing*-Kammer) oder für die Schätzung der Dicke der UWS (mit der Caco-2-Zelllinie) eingesetzt. Allerdings ist diese Anwendung aufgrund des metabolischen Abbaus des T umstritten [95,105]. Der Metabolismus fängt in der Darmmukosa an, die wahrscheinlich auch die Hauptverstoffwechslungsseite für T bei der oralen Gabe ist [99,122]. T und seine Metabolite werden dann hauptsächlich über die Pfortader zur Leber weiter transportiert [123], wo sie metabolisch abgebaut werden. Aufgrund der Inaktivierung des T durch den *First-Pass*-Effekt erwies sich seine orale oder parenterale Gabe als unwirksam [121,124-126]. Mit oraler Verabreichung des T in mikronisierter kristalliner Form gelang es aber, einen therapeutisch wirksamen Plasmaspiegel zu erreichen. Allerdings werden hier hohe Dosierungen benötigt, was der Leber Schäden zufügen kann [127]. Es wurden auch andere Strategien verfolgt, bei denen es das Ziel war, den Weg über die Leber bzw. den *First-Pass*-Effekt möglichst zu umgehen. Dabei kamen rektale [128,129], sublinguale [130] oder transdermale [131] Verabreichungen zum Einsatz. Auch bei der transdermalen Applikation wird T in der Epidermis zum Teil enzymatisch abgebaut [132]. Mazer vertritt trotzdem die Ansicht, dass dieser der beste Weg bei der Testosteron-*Replacement*-Therapie bleibt [131]. Zur Verhinderung des enzymatischen Abbaus, wurde eine Methylgruppe an der Position 17  $\alpha$  eingeführt. Allerdings sprachen verschiedene Nebenwirkungen wie der Verdacht einer krebserregenden und hepatotoxischen Wirkung sowie die kurze Plasmahalbwertszeit des Methyltestosterons gegen seine Anwendung [130,131]. Die chemische Derivatisierung ging einen Schritt weiter mit der Veresterung des T mit Fettsäuren. Die Bioverfügbarkeit konnte durch die Erhöhung der Lipophilie des Esterrestes und Verabreichung in Verbindung mit einer fettreichen Diät oder in einem lipophilen Vehikel wie Erdnussöl erhöht werden [127,133]. Als Fettsäuren wurden u.a. Propion-, Enanthan- und Undecansäure verwendet. Diese Testos-

teronester werden oral in Tabletten oder Weichgelatine kapseln oder i.m. in einem lipophilen Vehikel verabreicht. Durch die Veresterung des T-Moleküls lässt sich auch ein Retardeffekt erzielen. Die Wirkungsdauer eines intramuskulär injizierten Esters nimmt mit steigender Länge der veresterten Seitenkette des Steroidmoleküls zu. Mit Zunahme der Kettenlänge kommt es auch zur Erhöhung der Lipophilie (Tabelle 1). Im Falle einer i.m. Applikation werden diese Ester aus den intramuskulären Depots freigesetzt [119] und durch Serumesterasen zum aktiven T hydrolysiert.

Bei der oralen Verabreichung zeigte sich das TU anhand seiner pharmakokinetischen Eigenschaften im Vergleich zu den anderen Testosteronestern überlegen [133,135-137] und wurde deshalb zum Objekt zahlreicher Untersuchungen. Testosteronester wie TU zeigen *in-vitro* und *in-vivo* Stabilität gegen die Hydrolyse im Magen- oder Darmsaft, weshalb sie auch oral verabreicht werden können. Jedoch ist oral verabreichtes TU unwirksam, wenn es einem

**Tabelle 1 Verteilungskoeffizient (Octanol/Wasser) von Testosteron und Testosteronestern [134]**

Wirkstoff	Verteilungskoeffizient (Octanol/Wasser) <i>log P</i>
Testosteron (T)	3,22
Testosteronacetat	4,16
Testosteronpropionat (TP)	4,69
Testosteronenanthat (TE)	6,81
Testosteronundecanoat (TU)	8,4

Probanden während einer Fastenzeit in seiner kristallinen Form verabreicht wird. Erst nach der Gabe in einem öligen Vehikel wie Erdnussöl oder mit einer fettreichen Diät kann eine deutliche Erhöhung des Plasmaspiegels sowie die Verbesserung der Bioverfügbarkeit vom stark lipophilen TU und seinen effektiven Metaboliten erreicht werden. Der lipophile Anteil dieser Androgene erreicht den Blutkreislauf ausschließlich über den lymphatischen Weg. Nur dieser Anteil bleibt auch intakt. Diese Androgene machen jedoch nur einen sehr kleinen Anteil der gesamt verabreichten Dosis aus. Mehr als 90% der resorbierten Menge wird während der Darm-Leber-Passage (*First-Pass-Effekt*) inaktiviert und meist als hydrophile Metabolite ausgeschieden. Es lässt sich daraus schließen, dass nur der lymphatisch transportierte lipophile Anteil im Endeffekt für die androgene Wirkung des Medikaments verantwortlich ist [138]. *Noguchi et al.* (1985) fanden einen linearen Zusammenhang zwischen dem lymphatischen Transport der Testosteronester und ihrer Lipophilie, ausgedrückt in ihren Verteilungskoeffizienten (*P*), d.h., je lipophiler ein Testosteronester ist, um so wirksamer kann er sein. Denn er ist in der Lage, sich nach der Resorption im GIT mehr in den Chylomikronen einzubetten und sich dadurch vor weiterer Verstoffwechslung in den Darmzellen abzuschirmen sowie mittels des lymphatischen Transports den *First-Pass-Effekt* zu vermeiden. Da eine fettreiche Nahrung oder die Verabreichung in Vehikeln wie Erdnussöl die Produktion der Chylomikronen fördern, bewirken sie eine Verbesserung der Verfügbarkeit der lipophilen Testosteronester [119,121,126,127,130,133,139].

Die Biotransformation eines Testosteronesters fängt in der Darmwand an, vermutlich mit der Hydrolyse des Esters [139-141]. Beim Transport vom TU werden in der Lymphe hauptsächlich TU und sein Metabolit 5  $\alpha$ -Dihydrotestosteronundecanoat (5  $\alpha$ -DHTU) nachgewiesen [139,140]. Alle anderen Metabolite werden über die Pfortader zur Leber transportiert [139]. TU und 5  $\alpha$ -DHTU lassen sich auch im Plasma nachweisen [130,139,140]. Sie werden dort hauptsächlich in Chylomikronen oder in Lipoproteinen eingebettet, wie es auch für lipophile Steroide und einen Teil des T üblich ist [139,142,143]. Polare Steroidhormone und ihre Metabolite lassen sich normalerweise an 4 Arten der Trägerproteine im Plasma der Säugetiere reversibel binden und werden dadurch transportiert. Diese sind das humane Serumalbumin (HSA), die  $\alpha$ 1-Glyco-

proteinsäure (AAG), das Corticosteroid-bindendes Globulin (CBG) und das testosteron- oder estradiol-bindendes Globulin (SBP, SSBG oder auch als SHBG bekannt) [144-147]. Nach oraler Gabe des TU werden auffallend hohe Plasmaspiegel vom T und seinen Metaboliten Androstenedion [126] und v.a. 5 alpha-Dihydrotestosteron (5  $\alpha$ -DHT) [130,136,137,148] erreicht. Daneben können auch andere Metabolite wie Estradiol und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEA-S) im Plasma identifiziert werden [137,148]. Fast alle polaren Metabolite im Plasma sind vermutlich in ihrer konjugierten Form zu finden [140] und werden zum großen Teil an Plasmaproteine gebunden [139]. Die Ausscheidung im Harn erfolgt überwiegend in Form von T- und Androsteron-Glucuroniden [140]. Auch die Ausscheidung der 17- Ketosteroide im Harn nimmt nach Verabreichung von TU deutlich zu [130].

### **II.7 Mizellare Tensidsysteme beim Transportprozess im GIT**

Die Natur bietet viele Beispiele für die Anwendung amphiphiler Stoffe und Mizellen in den lebendigen Organismen. Eines der interessantesten Beispiele im Zusammenhang mit der Resorption im GIT ist die physiologische Rolle der Gallensalzmischmizellen im Verdauungsprozess. Untersuchungen hinsichtlich des Transportes lipophiler Wirkstoffe in einer lipidreichen Verdauungsmischung wiesen darauf hin, dass die Resorption hauptsächlich aus den mizellaren oder wässrigen Phasen und nicht aus der öligen erfolgt [149,150]. In Anlehnung an die Natur wurden Gallensalze sowie andere künstliche Tenside wie Polysorbate (z.B. Tween®) oder Poloxamere (z.B. Pluronic®) in der Galenik für die Verbesserung der Löslichkeit und der Bioverfügbarkeit der Arzneistoffe verwendet.

Bei einer peroralen Einnahme können Tenside die gastrointestinale Resorption eines Wirkstoffes auf verschiedene Art und Weise beeinflussen. In Abhängigkeit vom verwendeten Tensid und seiner Konzentration kann es zu einer Änderung der gastro-intestinalen Motilität und der Verweilzeit im Magen kommen. Dies kann wiederum je nach Wirkstoff eine Änderung der Bioverfügbarkeit hervorrufen. Der Tensideffekt hier wurde auf die Zunahme der Viskosität des Mageninhalts (v.a. bei Polyoxyethylen-derivaten) oder auf einen pharmakologischen Einfluss der Tenside auf den GIT zurückgeführt. Durch Verringerung der Grenzflächenspannung, daraus folgt u.a. die Benetzung der festen Körper, oder durch die Mizellbildung kommt es zur Verbesserung der Lösungsgeschwindigkeit und der Löslichkeit. Die Änderung der Lösungsgeschwindigkeit ist dabei nicht unbedingt proportional zur Änderung der Löslichkeit. Anhand dieser Effekte ergibt sich eine Verbesserung der Wirkstofffreigabe aus der Arzneiform und eine Zunahme des Kontakts mit den Resorptionsflächen im GIT. Dadurch kann sich der Wirkstofftransport verbessern, v.a. wenn die Wirkstofffreigabe den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für den Transport darstellt [7,151]. Durch ihre Wechselwirkungen mit den Biomembranen spielen die mizellaren Tensidsysteme auch eine direkte Rolle beim Resorptionsprozess. Wie in II.5 erwähnt wurde, stellen die UWS und MuS sehr wichtige Transportbarrieren im GIT dar, v.a. für lipophile Substanzen. Die mizellaren Systeme fungieren als Transportvehikel für Arzneistoffe und ermöglichen dadurch die Überwindung dieser Barrieren [77,152], was beim Transportprozess als Hauptrolle dieser Systeme betrachtet wird [153-155]. Auf Grund ihrer Viskosität, Struktur und ggfs. Ladung und in Abhängigkeit von ihrem Hydratationsgrad hindert die MuS den Transport großer Moleküle oder Mizellen [72,74,77,156]. Tenside können aber zum Zusammenbruch der Struktur des Mukus und zur Modifizierung seiner Viskosität führen [151,157-160]. Die Hauptbarriere für den passiven Transport lipophiler Substanzen und v.a. der extrem lipophilen bleibt jedoch die intestinale Epithelmembran unabhängig von der MuS oder den Durchmischungsbedingungen [5]. Auch in diese Barriere können die

mizellaren Systeme eingreifen und durch ihre Wechselwirkung mit der Zellmembran einen direkten Beitrag zur Resorption leisten. Tenside können Fluidität und Polarität der Membran beeinflussen und dadurch einen Einfluss auch auf ihre Funktion und Permeabilität ausüben [7,159,161,162]. Bei aggressiven oder hoch konzentrierten Tensiden kann es deshalb zur Schädigung oder sogar vollständigen Auflösung der Membran kommen [163]. Es wurden auch Hinweise auf einen Einfluss der Tenside auf die Proteine, Transporter und den Metabolismus in der Membran gefunden [7,159,162,164,165]. Zur Erklärung der Funktion der Mizellen als Transportvehikel für Arzneistoffe bei der Resorption an den Zellmembranen wurden verschiedene Theorien entwickelt. Einige davon erklären die Resorption mit einer Kollision der Mizellen mit der Bürstensaummembran oder einer Endozytose der ganzen Mizelle von den Enterozyten. Dafür liegen jedoch bisher keine Beweise vor. Man hält es für wahrscheinlicher, dass die Resorption durch eine Aufnahme freier Unimere der transportierten Substanzen erfolgt, die in Gleichgewicht mit der mizellaren Phase in unmittelbarer Nähe der Zellmembran stehen [150,153-155]. Eine Aufnahme der Tensidunimere in den Enterozyten konnte auch bei verschiedenen Tensiden [7] und v.a. bei den Gallensalzen nachgewiesen werden. Dies wurde auch bei anderen Zelltypen vermutet und mit den membran-toxischen Tensideigenschaften verbunden [166]. Durch diese Aufnahme kommt es vermutlich zu einer Verdünnung der Tensidkonzentration in der unmittelbaren Nähe der Zellmembran, was möglicherweise zum Abbau der mizellaren Struktur und damit zur Freisetzung der eingebetteten Moleküle direkt an der Membran führen kann [161]. Weiterhin können Tenside auch den lymphatischen [167,168] und den parazellulären (Einfluss auf die „*Tight-Junctions*“) [159,169,170] Transport fördern. Durch die Abschirmung der eingebetteten Wirkstoffmoleküle innerhalb der mizellaren Struktur kann es zur Erhöhung der Wirkstoffstabilität innerhalb der Arzneiform oder während der Verweilzeit im GIT [8,9] kommen. Hierdurch kann eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit empfindlicher Wirkstoffe bei gleicher Dosis erreicht werden.

Die Tensidsysteme können aber auch Nachteile und negative Wirkungen zeigen. Auf kurze oder lange Sicht können bei ihrer Verwendung unvorhersagbare Nebenwirkungen auftreten, die direkt aus der Toxizität des Tensids selbst resultieren oder auch aus einer tensidbedingten Verbesserung der Toxizität anderer Arzneiformkomponenten wie des Wirkstoffes, des Farbstoffes oder des Konservierungsmittels. Je nach chemischer Struktur, Expositionszeit, und Konzentration (u.a.) wirken die Tenside unterschiedlicher Art membranschädlich und zelltoxisch, insbesondere in Konzentrationen oberhalb ihrer CMC. Sie führen bei Untersuchungen *in-vitro* zur Apoptose, Nekrose, Zellyse und Hämolyse [29-31,33,159,163,166,171-174]. Weiterhin stehen fettsäurehaltige Gallensalzmischmizellen im Verdacht, krebserregende Wirkung auf das Grimmdarmepithel zu haben. Es wird diesbezüglich vermutet, dass die lytische Aktivität der Mizellen zu Epithelschäden führt, woraufhin die Epithelzellen mit abnormaler bzw. bösartiger Proliferation reagieren [172]. Es wurden zudem andere mögliche negative Auswirkungen diskutiert wie die Beteiligung erhöhter Tensidkonzentration im Magen an der Entstehung von Magengeschwüren [32]. Die Mechanismen der zelltoxischen Wirkungen unterschiedlicher Tenside sind unterschiedlich und sehr tensidspezifisch. Allgemein wird angenommen, dass die Toxizität der Tenside in folgender Reihenfolge zunimmt: Nichtionische < Anionische < Kationische [175,176]. Zwischen der Ladung der hydrophilen Gruppe der Tenside und ihrer Toxizität besteht jedoch kein nachgewiesener Zusammenhang und es liegen genug Ausnahmen von dieser Regel vor, so dass diese Verallgemeinerung beträchtlich eingeschränkt wird [163]. Die Membranschädigung manifestiert sich in einer Zunahme der Freisetzung der Membranlipide, Membran-

proteine und zytosolischen Lactatdehydrogenase (LDH) [11,33,171,177,178]. Es kommt auch dabei zu einer Zunahme der Ablösung des Darmmukus und zu deutlichen negativen Änderungen im histologischen Erscheinungsbild der mukosalen Oberfläche [7,33,171,179]. Der Widerstand der Zellmembran gegen den lytischen Tensideffekt weist anhand von Untersuchungen mit Gallensalzen eine gewisse Abhängigkeit vom Membrangehalt an Glycolipiden auf [172,180]. Die freigesetzte Menge der Membranproteine und -lipide sowie der LDH bei unterschiedlichen Tensidkonzentrationen korreliert mit Änderungen in der Wirkstoffpermeabilität [11,33,177,178]. Diese u.ä. Beobachtungen brachten beide Phänomene in Zusammenhang und führten zur Annahme, dass die erreichte Verbesserung der Wirkstoffpermeabilität größtenteils auf lokale tensidbedingte Membranschädigung zurückzuführen ist [7,33,159,181]. Untersuchungen *in-situ* zeigten, dass derartige Schädigungen in der intestinalen Mukosa meist reversibel sind [29,33,159,171]. Darüber hinaus kann die Einbettung eines Arzneistoffes in mizellaren Systemen zwecks der Verbesserung seiner Löslichkeit und seines Transports in einigen Fälle genau das Gegenteil bewirken und einen negativen Einfluss auf den Resorptionsprozess haben. Dies trifft besonders auf Wirkstoffe zu, die sehr starke Affinitäten zur mizellaren Phase bzw. hohe Verteilungskoeffizienten Mizellen/Wasser zeigen [149,151,159,182-185].

Bei der Wechselwirkung der mizellaren Tensidsysteme mit der Darmmukosa spielen die Lipide eine sehr wichtige Rolle. Die Lipide werden als Bestandteil der Gallenflüssigkeit sezerniert oder entstehen einfach aus der Fettverdauung im GIT. Lipide stellen auch den zweitgrößten Bestandteil des nativen intestinalen Mukus dar. Diese Lipide bestehen zum Teil aus ungesättigten Fettsäuren (Schwein: ca. 35 %) wie Linol- und Ölsäure, gesättigten Fettsäuren wie Palmitin- und Stearinsäure (Schwein: ca. 34 %) und zum anderen Teil u.a. aus Cholesterin (Schwein: ca. 12 %) und PL (Schwein: 4-6 %), insbesondere dem Lyso-Phosphatidylcholin [72]. PL werden auch regelmäßig von den Mukus produzierenden Zellen im GIT wie Gobletzellen (Becherzellen) hergestellt, gespeichert und sezerniert [186]. Außerdem bilden PL bekanntlich das Hauptgerüst der Zellmembranen. Einen gewissen Anteil der Mikrovillimembranlipide bilden auch die ungebundenen Fettsäuren (2,6-14,2 %). Ein großer Anteil davon ist vermutlich ungesättigt [64]. Der Mukus *per se* hat keinen bedeutenden Einfluss auf den Transport von Substanzen mit relativ kleinen Molmassen. Er verdankt seine Barrierefunktion (v.a. gegen lipophile Substanzen) sowie seine lipophilen/hydrophoben Eigenschaften, hauptsächlich seinem Lipidgehalt, insbesondere an PL, von denen sich ein Anteil als Monoschicht auf der Mukusoberfläche verteilt und ihr die Unbenetzbarkeit verleiht [29,65,69,72,77,152,156,186,187]. Auch die Diffusion der Wassermoleküle nimmt innerhalb der MuS ab, insbesondere bei zunehmendem Lipidgehalt [77,156]. Bei kleineren Konzentrationen werden PL vorzugsweise vom Muzin gegenüber der mizellaren Phase aufgenommen. Hingegen werden PL bei größeren Konzentrationen vom Muzin ausgeschlossen. Dadurch reguliert die MuS anscheinend die Lipidkonzentration, die an die Oberfläche der Epithelzellen gelangen kann [77]. Einfache Tensidmizellen sind klein und diffundieren relativ schnell innerhalb der MuS. Der PL-Zusatz führt zur Entstehung von mischmizellaren Systemen (MMS) mit meist verbesserter Solubilisierungskraft für die lipophilen Wirkstoffe, das mit zunehmendem PL/Tensid-Verhältnis meist auch steigt. Weiterhin dient diese Zugabe bzw. die Lipid-Zugabe allgemein bei einer reduzierten Resorption infolge einer mizellaren Assoziation (siehe vorherigen Absatz), v.a. bei dem Einschluss von Wirkstoffen mit gewisser Hydrophilie wie Nitrazepam, Atenolol und Nadolol, zur Herabsetzung des Verteilungskoeffizienten des Wirkstoffes in der mizellaren Phase und möglicher Beschleunigung der Verteilungskinetik. Dadurch erhöht sich der Anteil verfügbarer freier Wirkstoffmoleküle in

der Lösung und die Resorption wird verbessert [183,184]. Im Gegensatz zu den einfachen Mizellen sind Mischmizellen zumeist groß und weisen in Abhängigkeit von Hydratationsgrad und Konzentration des Muzins aufgrund räumlicher und elektrostatischer Ausschlusseffekte der Muzinmatrix verminderte Diffusion auf [77]. Auch als Unimere wird die Diffusion der Tensidmoleküle aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen mit den elektrisch geladenen Stellen in der MuS oder der Bildung von Wasserstoffbrücken erschwert [152]. Die Anwesenheit der gebundenen PL innerhalb der MuS bewirkte aber bei Untersuchungen *in-vitro* eine bedeutende Erhöhung der Permeabilität der Gallensalzmoleküle. Es wurde demnach vermutet, dass dies auch für Wirkstoffe gilt, die vergleichbare Verbindungen mit den PL in der MuS herstellen können [152]. Der Muzin hindert nicht nur die Diffusion der Mizellen, vielmehr beeinflusst er auch ihren Aggregationszustand und ihre Größe. Er konkurriert mit den Mischmizellen um die Bindung der PL, was in einer Abnahme der verfügbaren PL für die Mizellbildung resultiert. Infolgedessen nimmt das PL/Tensid-Verhältnis in den Mizellen und damit auch ihre Größe ab [156]. Eine effektive Permeation der lipophilen Wirkstoffe durch die MuS bleibt dennoch weitgehend durch die Anwesenheit mizellarer Tensidsysteme und v.a. PL/Tensid-Mischmizellen bedingt. Hierdurch kehrt sich auch die Rolle der gebundenen PL als Hauptgrund für den Widerstand in der MuS um, und ihre Anwesenheit wird entscheidend für die effektive Aufnahme und Diffusion der lipophilen Wirkstoffe innerhalb der MuS. Bei den hydrophilen Wirkstoffen haben Muzin *per se* und die Anwesenheit der Tensidmizellen hingegen keinen bedeutenden Einfluss auf die Wirkstoffdiffusion innerhalb der MuS. D.h., ohne die Mitwirkung der Lipide (v.a. PL) können allgemein weder einfache Mizellen noch Mischmizellen den Wirkstofftransport merklich beeinflussen [77,185,188]. Weiterhin demonstrieren zahlreiche Arbeiten einen sehr wichtigen Schutzeffekt der PL gegen tensidbedingte Membranschädigungen und Zelltoxizität, insbesondere jene PL mit langkettigen ungesättigten Fettsäureresten. Der Schutzmechanismus ist bisher noch nicht geklärt. Es wird aber vermutet, dass PL mit den Tensiden Mischmizellen bilden, deren Solubilisierungskraft für die Membrankomponente abgeschwächt ist und somit wird ihre Aggressivität gemildert. Außerdem werden PL für die Reparatur der beschädigten Membran und den Ersatz ihrer abgelösten Lipidmoleküle benötigt [7,29-32]. Fettsäuren weisen in Abhängigkeit von ihrer Kettenlänge, Sättigungsgrad und Verwendung mit oder ohne Einbettung in mischmizellaren Tensidsystemen unterschiedlich starke zelllytische oder membrantoxische Effekte auf [30,159,172]. Ihr Einfluss auf die Resorption der Wirkstoffe ist auch sehr unterschiedlich. Durch ihre Verwendung in mischmizellaren Tensidsystemen kam es zur Erhöhung oder Reduzierung der Resorption sowohl lipophiler als auch hydrophiler Wirkstoffe [151,159,161,169,188-191]. Allgemein wird jedoch angenommen, dass solche Mischsysteme v.a. mit ungesättigten Fettsäuren meist eine Zunahme der Resorption hydrophiler Wirkstoffe bewirken [159,188,191]. Der Einfluss der Fettsäuren auf die Permeabilität wurde mit einer Erhöhung der Membranpolarität und -fluidität begründet [64,161]. Auch Glyceride verschiedener Arten zeigen interessante Einflüsse auf den Resorptionsprozess, weshalb ihr Potential als Wirkstoffvehikel oder Permeabilitätsverstärker „*Enhancer*“ ein Objekt zahlreicher Arbeiten war [133,150,166,188,191-197]. Nennenswert in diesem Zusammenhang ist auch der mögliche Schutzeffekt der Triglyceride hochmolekularen Volumens gegen die Tensidtoxizität bzw. den membranlytischen Tensideffekt [166].

## II.8 Mathematische Grundlagen des passiven Membrantransportes

Die treibende Kraft für den Wirkstofftransport bei den verwendeten Modellen ist das Konzentrationsgefälle zwischen den verschiedenen Phasen (Donator, Membran und Akzeptor). Der Verlauf der Transportprozesse durch die Membran kann anhand Gl. II.8-1 gut beschrieben werden, die sich unter bestimmten Annahmen aus dem ersten Fick'schen Diffusionsgesetz ableiten lässt [38].

$$\frac{dM_A}{dt} = -\frac{dM_D}{dt} = P_s \cdot F \cdot (C_D - C_A)_t \quad \text{Gl. II.8-1}$$

Darin ist  $(C_D - C_A)_t$  die Konzentrationsdifferenz zwischen dem Donatorkompartiment (DK) und dem Akzeptorkompartiment (AK) zum Zeitpunkt  $t$ ,  $F$  die Membranfläche,  $P_s$  der scheinbare Permeabilitätskoeffizient,  $dM_A/dt$  die zeitabhängige Stoffmengenzunahme in der Akzeptorphase und  $-dM_D/dt$  die zeitabhängige Stoffmengenabnahme in der Donatorphase.  $dM_A/dt$  und  $dM_D/dt$  können bei der Fließgleichgewichtsphase „steady-state“ aus der Steigung der Konzentrations-Zeit-Kurve errechnet werden. Die dabei zu geltenden Annahmen sind: ein quasi-stationärer Zustand (konstanter Konzentrationsgradient) in der Membran, kein wesentlicher Einfluss der ruhenden Schichten an den Grenzflächen bzw. kleine Übergangswiderstände sowie vergleichbare Verteilungskoeffizienten auf den beiden Membranseiten. Wird eine Substanz in einer mizellaren Lösung solubilisiert, lassen sich zwei Permeabilitätskoeffizienten für die Permeation der Substanz durch die ungerührte Wasserschicht unterscheiden:  $P_{aq}$  für die Substanz in der wässrigen Phase und  $P_{aq}^*$  für sie in der mizellaren Phase (Gl. II.8-2) [55]. Dabei wird angenommen, dass alle Mizellen in der Lösung identisch sind.

$$P_s = \left( \left( P_{aq}^* + \frac{P_{aq} - P_{aq}^*}{1 + KC_t} \right)^{-1} + \frac{1 + KC_t}{P_M} \right)^{-1} \quad \text{Gl. II.8-2}$$

$C_t$  = Tensidkonzentration

$K$  = Bindungskonstante (Substanz-Mizellen)

$P_M$  = Permeabilitätskoeffizient der Substanz in der lipophilen Membran

Ist die Membran zu dick oder die Diffusion der Substanz sehr langsam (z.B. Bindung in der Membran), verhält sich die Membran so, als wäre sie fast undurchdringlich. Hier wird kein quasi-stationärer Zustand erreicht und der Diffusionsstrom (Flux)  $J$  wird an der Kontaktfläche durch Gl. II.8-3 beschrieben, die sich vom zweiten Fick'schen Diffusionsgesetz ableiten lässt [198].

$$J = -\frac{dM_D}{dt \cdot F} = \sqrt{\frac{D_M}{\pi t}} KC_D \quad \text{Gl. II.8-3}$$

$D_M$  = Diffusionskoeffizient in die Membran laut des Fick'schen Diffusionsgesetzes

$K$  = Verteilungskoeffizient der Substanz (Membran/Lösung)

$C_D$  = Ausgangskonzentration im Donator

$t$  = Zeit

## II.9 Einführung in die Theorie relevanter Messmethoden

### II.9.1 Z-Wert-Bestimmung

Mit Hilfe dieser Methode wurde die cybotaktische (= in der unmittelbaren molekularen Umgebung um die Chromophore der gelösten Moleküle) relative Polarität des Lösungsmittels bei der Solubilisierung des T und seiner Ester in den mizellaren Systemen ermittelt. Das Messprinzip geht im Allgemeinen von einer Beziehung zwischen dieser relativen Polarität und der im UV-Bereich ermittelten maximalen Absorptionswellenlänge des solubilierten Stoffes aus. Basierend auf Änderungen im Absorptionsspektrum war es für *Riegelman et al.* (1958) [199] und *Guttman et al.* (1961) [200] möglich, bestimmte qualitative Rückschlüsse über die Lokalisierung solubilisierter Moleküle in mizellaren Lösungen zu ziehen. Die Z-Wert-Methode wurde erst in einer Arbeitsreihe von *Kosower* [201-205] eingeführt. Der Z-Wert wurde als die Energie des Elektronenübergangs (Transition) der Substanz 1-Ethyl-4-Carbomethoxyppyridiniumiodid (ECMPI) definiert, deren UV-Spektrum eine starke Empfindlichkeit gegenüber Änderungen in der Lösungsmittelpolarität zeigt, und wurde nach Gl. II.9-1 errechnet [206].

$$Z = 2,859 \times 10^4 / \lambda_{\max} \quad \text{Gl. II.9-1}$$

Dabei wird  $Z$  in kcal/mol und  $\lambda_{\max}$  in nm angegeben. Letzters stellt die maximale Wellenlänge der UV-Absorption vom ECMPI im Lösungsmittel dar.

Die Methode wurde auf Untersuchungen des schwach intensiven Übergangs ( $n \rightarrow \pi^*$ ) bei zyklischen Ketonen angewandt [204], der eine Empfindlichkeit gegen die Lösungsmittelpolarität zeigte und damit ermöglichte, ein Analogon und zwar das Cyclohexanon als einen sekundären Standard für die Bestimmung der Z-Werte eines Lösungsmittels anzuwenden. Ausgehend von der Annahme, dass die dielektrische Konstante der ersten unmittelbaren Schicht des Lösungsmittels um ein Molekül oder Ion herum (die sog. Cybotaktische Region [207]) sich merklich von derjenigen des Rests des Lösungsmittels unterscheiden müsste, setzte Kosower seine Z-Wert-Methode ein, um die relative Polarität dieser Schicht zu ermitteln. *Bijaastad* und *Hall* erweiterten die Anwendung der Methode später für die Untersuchung der Umgebung verschiedener solubilisierter Ketone in wässrigen einfachen mizellaren Tensidlösungen [208]. Bei der Anwendung der Z-Wert-Methode auf solubilierte Systeme wird angenommen, dass der elektronische Übergang in diesen Systemen (festgestellt anhand des Peakmaximums des UV-Absorptionsspektrums) den gleichen Wechselwirkungskräften zwischen dem gelösten Stoff und seiner cybotaktischen Umgebung unterworfen ist, wie beispielsweise die Wechselwirkungen, die bei einem einfachen Alkohol-Wasser-Gemisch zu finden sind. In Abwesenheit von gegensätzlichen Informationen wurde weiter angenommen, dass die elektronischen Übergänge in den solubilierten Stoffen nur von den Z-Werten des Lösungsmediums abhängig sind. Die Methode wurde dann bei Solubilisationsuntersuchungen von T in mizellaren Systemen in Arbeiten von *Thakkar* und *Hall* auf die ketonische Funktion des T-Moleküls übertragen, wobei ebenso festgestellt wurde, dass das UV-Absorptionsspektrum der  $\alpha, \beta$ -ungesättigten Ketone lösungsmittlempfindlich ist [209,210].

### II.9.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die Licht- und Röntgenstremethoden nutzen die Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit der Ladungsverteilung der Materie aus, um Mikrostrukturen gelöster Teilchen zu charakterisieren, und sind deswegen von anderen Stremethoden mit korpuskularer Strahlung (z.B. Neutronen- oder Positronenstreuung) zu unterscheiden. Der Unterschied besteht hauptsächlich in der Art der Wechselwirkung mit der Materie sowie den zugänglichen Wellenlängenbereichen und den daraus resultierenden Auflösungsvermögen von Strukturen verschiedener Größe und Zusammensetzung. Auf Grund der guten Kontrastverhältnisse eignen sich diese Methoden für die Charakterisierung von Teilchen, die hauptsächlich aus Kohlenwasserstoffen bestehen und sich in wässrigen Lösungen befinden. Ladungsverteilungen reagieren auf elektrische Felder durch Ladungsverchiebungen. Die Stärke dieser Polarisation wird durch die Polarisierbarkeit  $\alpha$  der Probe bestimmt. Diese steht in direktem Zusammenhang mit der Dielektrizitätszahl  $\epsilon$  und dem Brechungsindex  $n$ . Wenn die Probe einem definierten elektromagnetischen Primärstrahl ausgesetzt wird, dessen Eigenschaften wie z.B. Intensität, Wellenlänge und Divergenz bekannt sind, werden sich diese Eigenschaften beim Passieren des Strahls durch die Probe und der Wechselwirkung mit ihr mehr oder weniger ändern. Im allgemeinen passiert nur ein gewisser Teil der Primärstrahlung  $I_p$  die Probe unverändert, der als transmittierte Intensität  $I_t$  bezeichnet wird. Ein anderer Teil  $I_a$  wird von der Probe absorbiert und der Dritte  $I_s$  von ihr gestreut (Abb. 2). Für Streuexperimente stellt  $I_s$  den wichtigen Anteil dar und ist dabei mit einer Richtungsänderung gekennzeichnet. Die abhängigen Variablen hier sind die Streuintensität, Polarisation und Wellenlänge der Streustrahlung. Der durchschnittliche Betrag der Streuintensität  $\langle I \rangle$  ist im allgemeinen eine Funktion der Beobachtungswinkel und anderer Faktoren wie Primärintensität und Frequenz.

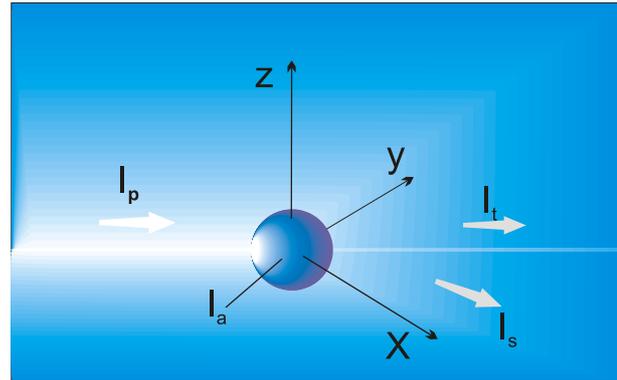


Abb. 2 Darstellung der Intensitätsanteile, die bei der Wechselwirkung von Strahlung mit einer Probe auftreten können;  $I_p$ ,  $I_t$ ,  $I_s$  und  $I_a$  bezeichnen die primäre, transmittierte, gestreute und absorbierte Intensitäten in der Reihenfolge

Die zeitlichen Schwankungen der Streuintensität resultieren aus Konzentrationsfluktuationen durch die Diffusion der Teilchen infolge der *Brown'schen* Bewegung, die ihrerseits von Teilchenform, -größe und -wechselwirkung abhängt. Polarisationsänderungen treten auf, wenn das die Streuung verursachende Medium anisotrope Moleküle oder Teilchen enthält. Änderungen der Wellenlänge kommen auf Grund von *Doppler*-Effekten infolge der Bewegungsprozesse im Medium oder auch bei inelastischen Streuprozessen vor, bei denen sich ein Energieübertrag ereignet. Hier unterscheidet man zwischen statischen (SLS) und dynamischen (DLS) Lichtstreuungsexperimenten. Die SLS geht auf elastische Streuprozesse zurück und eignet sich besonders für die Ermittlung der zeitlich und räumlich gemittelten Streuintensität, die bei Kenntnis der Lösungskonzentration in die Masse der Teilchen oder bei mizellaren Systemen in die Aggregationszahl der *Cluster* umgerechnet werden kann. Bei der DLS, die auch unter dem Begriff „Photokorrelationsspektroskopie“ bekannt ist, spielt die o.g. *Doppler*-Verschiebung eine Rolle, und die Streuung erfolgt nicht ganz elastisch sondern quasielastisch, was ihren dritten Namen „Quasielastische Lichtstreuung“ rechtfertigt.

Hierbei werden hauptsächlich Informationen über die Größenverteilung der Partikel einer Probe gewonnen. Bei Lichtstreuuntersuchungen kommt *LASER*-Licht als Primärstrahl zum Einsatz. Es liefert einen kollimierten monochromatischen Strahl im sichtbarem Bereich von 450-700 nm mit optimal definierter Polarisierung und Divergenz und bietet gleichzeitig hohe Intensitäten, was die Messgenauigkeit verbessert und die Messzeit kurz hält. Die typischen Durchmesser von Mizellen sind etwa 2 bis 30 nm, also deutlich kleiner als die Wellenlängen des verwendeten *LASER*-Lichts, deshalb liefern Lichtstreuexperimente an mizellaren Lösungen keine direkten Aussagen über die Größe der Teilchen. Mit ihnen gewinnt man jedoch globale Parameter über das System, die mit geeigneten Modellannahmen Rückschlüsse auf die Größe der Teilchen zulassen. Hier gilt die sog. *Rayleigh-Gans-Debye* Theorie, die das Streuverhalten einer Probe beschreibt, bei der die Anwesenheit von Streuteilchen unterschiedlicher Dielektrizitätszahl keine Verzerrung des Primärfeldes zur Folge hat. Diese Bedingung ist immer dann erfüllt, wenn die Größe der gelösten Teilchen sehr klein gegenüber der Lichtwellenlänge ist oder der Brechungsindex der Teilchen sich nur wenig von dem des Lösungsmittels unterscheidet. Der folgende Ansatz formuliert die Bedingung mathematisch.

$$\frac{2\pi\sigma}{\lambda} \left| \frac{n_p}{n_s} - 1 \right| \ll 1 \quad \text{Gl. II.9-2}$$

$\sigma$  = Teilchendurchmesser  
 $\lambda$  = Wellenlänge des Primärstrahles  
 $n_p$  und  $n_s$  = Brechungsindizes der Teilchen und des Lösungsmittels.

Bei DLS wird ein sehr kleiner Bereich des Streuvolumens ausgeblendet und die zeitlichen Schwankungen der Streuintensität dieses Volumens  $I(t)$  bis hinunter in den Zeitbereich einiger Nanosekunden detektiert (Abb. 3).

Das Messsignal schwankt um so schneller, je schneller sich die Zahl der Streuteilchen im Streuvolumen durch Bewegung ändert, was seinerseits von ihrem Diffusionskoeffizienten  $D$  abhängt. Der Photomultiplier bzw. die Photodioden detektieren die Streuintensitäten ( $I$ ) zu zwei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten  $t$  und  $t + \tau$  und liefern das Ergebnis in Form der sog. normierten Autokorrelationsfunktion  $g_2(\tau)$  (Gl. II.9-3).

$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(0) \cdot I(\tau) \rangle}{\langle |I|^2 \rangle} \quad \text{Gl. II.9-3}$$

Allerdings ist die sog. normierte Feldautokorrelationsfunktion  $g_1(\tau)$  die informationshaltige Funktion bezüglich der Teilchenbewegung (Gl. II.9-4).

$$g_1(\tau) = \frac{\langle E^*(0) \cdot E(\tau) \rangle}{\langle |E|^2 \rangle} \quad \text{Gl. II.9-4}$$

$|E|^2$  ist das Amplitudenquadrat des elektrischen Streufeldes  $E$  und  $E^*$  ist seine konjugiert komplexe Größe.

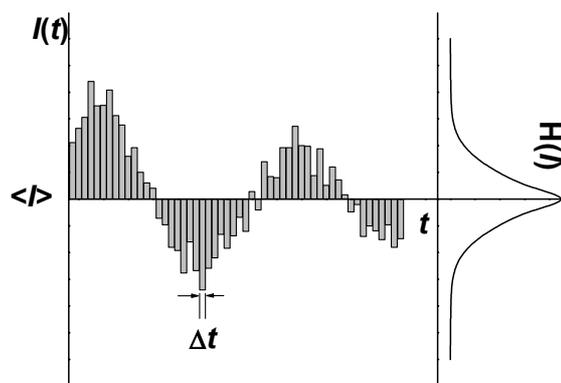


Abb. 3 Die zeitliche Schwankung der Streuintensität eines kleinen Streuvolumens um ihren Mittelwert und ihre Häufigkeitsverteilung  $H(I)$  für statistisch unabhängig ablaufende Prozesse.  $\Delta t$  ist in der Größenordnung einiger Nano- bis weniger Millisekunden (nach Janich 1998 [211]).

Vorausgesetzt, dass nur gestreutes Licht auf den Detektor fällt, dieses gaußverteilt ist, die Teilchenzahl im Streuvolumen genügend groß ist, und es sich nicht um nichtergodische Systeme wie z.B. Gele handelt, kann man  $g_2(\tau)$  über die *Siegert* Gleichung (Gl. II.9-5) in  $g_1(\tau)$  umrechnen.

$$g_1(\tau) = C \sqrt{1 - g_2(\tau)} \quad : C \leq 1 \tag{Gl. II.9-5}$$

Hier ist  $C$  eine von den experimentellen Gegebenheiten abhängige Konstante (im idealen Fall  $C=1$ ), die auf Abweichungen von idealer Korrelation hinweist. Die typische Zeitautokorrelationsfunktion folgt einem exponentiellen Gesetz (Abb. 4).

Für ein monodisperses System von Teilchen, die sich wechselwirkungsfrei bewegen, lässt sich  $g_1(\tau)$  mit einer einfachen abfallenden exponentiellen Funktion beschreiben. Die Abklingrate  $\Gamma$  steht in Zusammenhang mit dem Diffusionskoeffizienten wechselwirkungsfreier Teilchen  $D_0$  gemäß folgender Gleichungen:

$$|g_1(\tau)| = \exp(-\Gamma \tau) \tag{Gl. II.9-6}$$

$$\Gamma = D_0 q^2 \tag{Gl. II.9-7}$$

In den Streuvektor  $q$  fließen die Wellenlänge  $\lambda$ , die Brechzahl des Mediums  $n$  und der Streuwinkel  $\theta$  ein.

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \tag{Gl. II.9-8}$$

Handelt es sich im betrachteten System um eine kontinuierliche Verteilung von polydispersen oder untereinander wechselwirkenden Teilchen, dann kann man nicht alle Teilchen durch denselben Term  $\Gamma = D_0 q^2$  in der Exponentialfunktion beschreiben und der Abfall der Funktion  $g_1(\tau)$  wird von einer Verteilung  $G(\Gamma)$  von  $\Gamma$ -Werten bestimmt.

$$|g_1(\tau)| = \int G(\Gamma) \exp[-\Gamma \tau] d\Gamma \tag{Gl. II.9-9}$$

$$\text{mit } \int G(\Gamma) d\Gamma = 1 \tag{Gl. II.9-10}$$

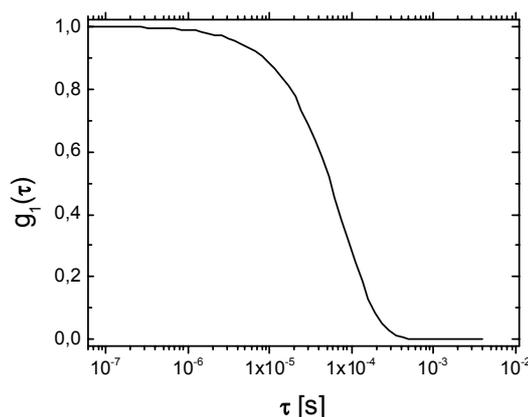


Abb. 4 Typische Korrelationsfunktion  $g_1(\tau)$  in halblogarithmischer Auftragung

Zur Auswertung dieser Verteilung kommen verschiedene Lösungsvorschläge zum Einsatz. In dieser Arbeit wurden 2 Methoden angewandt: Eine Nichtregularisierungsmethode mit Exponentialanalyse sowie hauptsächlich das numerische lineare Regularisierungsverfahren *CONTIN* [212] mit einer kontinuierlichen inversen Laplace-Transformation, basierend auf der Annahme, dass  $g_1(\tau)$  lediglich eine Laplace-Transformation von  $G(\Gamma)$  ist. Bei der letzten Routine wird die Korrelationsfunktion einer beliebigen Größenverteilung an die Messdaten angepasst. Diese Routine hat den Vorteil, dass dabei breite Verteilungen nicht als Überlagerung mehrerer Peaks interpretiert werden. Sie liefert das Ergebnis mit der einfachen und besten Anpassung und eignet sich somit für multimodale Verteilungen. Hinzu kommt es, dass *CONTIN* eine gute

Genauigkeit bietet und kein Fittingmodell voraussetzt. Allerdings muss bei der Anwendung der Routine auf spezifische Einschränkungen geachtet werden, auf die ausführlich bei Johnson und Brown [213,214] eingegangen wurde. Dadurch wird der scheinbare Diffusionskoeffizient  $D_{app}$  errechnet und es wird dementsprechend möglich, den hydrodynamischen Radius  $R_h$  über *Stokes-Einstein*-Beziehung für das Modell der „Harten Kugel“ ( $D_{app} = D_o$ ) unter Verwendung der Boltzmann-Konstante  $k_B$ , der absoluten Temperatur  $T$  und der Viskosität  $\eta$  des Mediums zu berechnen.

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_o} \quad \text{Gl. II.9-11}$$

Handelt es sich hier jedoch um Teilchen anderer Formen (z.B. Ellipsoide, Stäbchen) oder um keine wechselwirkungsfreien Teilchen, erfordert dies eine andere mathematische Behandlung für die Errechnung der Teilchendimensionen über modifizierte *Stokes-Einstein*-Beziehung (Gl. II.9-12), auf die hier aber nicht eingegangen wird.

$$D_{app} = \frac{k_B T}{f(c)} = D_o(1 + A'c + B'c^2 + \dots) \quad \text{Gl. II.9-12}$$

Dabei ist  $f(c)$  der verallgemeinerte Reibungskoeffizient, der Informationen über Teilchendimensionen beinhaltet, und die Koeffizienten  $A'$  und  $B'$  hängen von den hydrodynamischen und statischen Wechselwirkungen der Teilchen untereinander ab.

Eine ausführliche Ausführung der DLS-Theorie findet man bei Pecora (1985) [215], Berne (1990) [216] und Maier (1996) [217]. Ausführungen mit Anwendung auf Systeme pharmazeutisches Interesses findet man beispielsweise bei Janich (Gallensalzmizellen, 1998) [211] und Shukla (Mikroemulsionen, 2003) [218], die u.a. als Grundlagen dieses Abschnitts dienen.

### II.9.3 Mizellare Affinitätskapillarelektrophorese (MAKE)

Wie bei allen elektrophoretischen Methoden erfolgt bei MAKE eine Wanderung geladener Teilchen (Moleküle und Mizellen) in einem elektrischen Feld, das proportional zur Ladung der Teilchen und der elektrischen Feldstärke auf die Ladungsträger wirkt. Die Reibungskraft ist dabei entgegengesetzt gerichtet und hängt mit der Viskosität des Mediums, der Größe und Form der Teilchen zusammen. Basierend auf diesem Phänomen kann eine Trennung der Teilchen erfolgen, die dann mittels eines UV- oder Fluoreszenzdetektors durch ein Fenster in der Kapillarwand nahe der Kapillarendung (normalerweise neben der Kathode) erfasst wird. Da es sich dabei um ionische Moleküle handelt, bestimmen Faktoren wie  $pK_s$ , pH-Wert und Leitfähigkeit bzw. Ionenstärke des Mediums den elektroosmotischen Fluss (EOF) und die Ladung der Teilchen und sie sind demzufolge mit einzubeziehen. Die Selektivität der Trennung wird auch durch Zusätze bestimmter Gegenionen bzw. Komplexbildner oder oberflächenaktiver Substanzen sowie über Wechselwirkungen mit der inneren Kapillaroberfläche beeinflusst. Die Trennung bei MAKE erfolgt in dünnen Kapillaren ( $\varnothing$  20-100  $\mu\text{m}$ ), um aufgrund des großen Oberfläche/Volumen-Verhältnisses ein möglichst flaches stempelförmiges Flussprofil zu erhalten. Bei solchen Durchmessern entstehen auch geringe Stromflüsse. Dies erlaubt u.a., bei relativ hohen Trennspannungen zu arbeiten (10-30 kV), mit denen eine angemessene Flussgeschwindigkeit erreicht werden kann, jedoch ohne bei diesen Spannungen zu einer bedeutenden Temperaturerhöhung zu kommen. Bei  $\text{pH} \geq 9$  sind die Silanolgruppen auf der Innenoberfläche der typischen Quarzkapillaren (*fused silica*) vollständig ionisiert und der EOF ist am effektivsten. Bei  $\text{pH} \leq 4$  nimmt die Dissoziation und dadurch der EOF stark ab (Abb. 5). Durch Deprotonierung der Silanolgruppen in der Pufferlösung wird die Innenoberfläche negativ geladen und es bildet sich eine elektrische Doppelschicht aus einer dichten festen positiven Gegenionenschicht und einer Diffusionsschicht (*Stern'sches Modell*, Abb. 6). Das Zetapotential nimmt exponentiell mit der Entfernung von der Kapillarinnenwand ab. In der Diffusionsschicht sind die Kationen freibeweglicher als andere Teilchen. Wenn die Kapillare einer Spannung ausgesetzt wird, werden alle Teilchen der Lösung in Bewegung gesetzt, insbesondere die Kationen. Sie reißen das Lösungsmittel mit sich und es erfolgt der gesamte Transport (EOF) daher in Richtung Kathode. Der effektiven elektrophoretischen Mobilität  $\mu_{\text{eff}}$  der Analyte (auch Nettomobilität genannt) ist die elektroosmotische Mobilität  $\mu_{\text{EOF}}$  (v.a. bei  $\text{pH} > 7$ ) immer

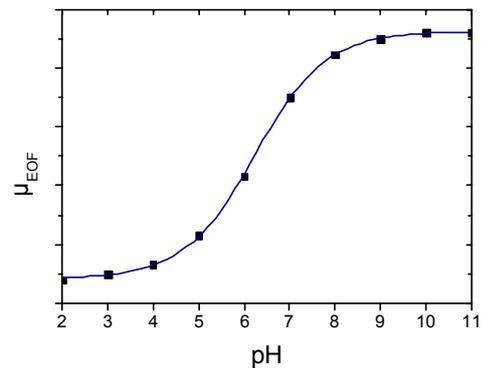


Abb. 5 Änderung der EOF-Mobilität in Abhängigkeit von pH bei typischen Quarzkapillaren (*fused silica*) (simulierte Daten)

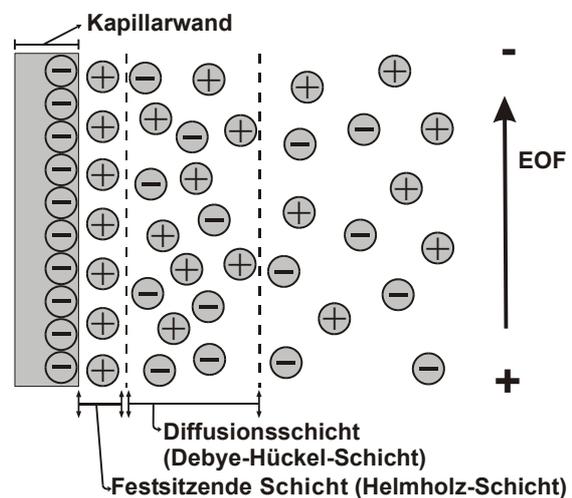


Abb. 6 *Stern'sches Modell* zur Ladungsverteilung der Doppelschicht bei negativ geladenen Kapillarwänden, die zur Erzeugung des Zetapotentials und EOF führt.

überlagert. Die scheinbare Mobilität  $\mu_{\text{br}}$  der Substanz (Bruttomobilität) ist somit die Vektorensumme aus  $\mu_{\text{eff}}$  und  $\mu_{\text{EOF}}$ :

$$|\vec{\mu}_{\text{br}}| = |\vec{\mu}_{\text{eff}} + \vec{\mu}_{\text{EOF}}| = \frac{L_G \cdot L_D}{U \cdot t_R} \quad \text{Gl. II.9-13}$$

Darin ist  $L_G$  die Gesamtlänge der Kapillare,  $L_D$  die effektive Länge der Kapillare bis zum Detektorfenster,  $U$  die Trennungsspannung und  $t_R$  die Migrationszeit des Wirkstoffes. Die Geschwindigkeit des EOF ( $v_{\text{EOF}}$ ) ist eine Funktion der dielektrischen Konstante des Puffers  $\varepsilon$ , des Zetapotentials  $\zeta$  und der Pufferviskosität  $\eta$ :

$$v_{\text{EOF}} = \mu_{\text{EOF}} \cdot E = \left( \frac{\varepsilon_0 \varepsilon \zeta}{4\pi\eta} \right) E \quad \text{Gl. II.9-14}$$

Dabei ist  $E$  das angelegte elektrische Feld und  $\varepsilon_0$  die dielektrische Konstante des Vakuums. Durch Einsetzen von  $v_{\text{EOF}}$  und  $E$  aus Gl. II.9-15 und Gl. II.9-16 in Gl. II.9-14 kann  $\mu_{\text{EOF}}$  berechnet werden (Gl. II.9-17), wobei  $t_0$  die Migrationszeit des EOF darstellt.

$$v_{\text{EOF}} = \frac{L_D}{t_0} \quad \text{Gl. II.9-15} \quad E = \frac{U}{L_G} \quad \text{Gl. II.9-16}$$

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{L_G \cdot L_D}{U \cdot t_0} \quad \text{Gl. II.9-17}$$

Das stempelförmige flache Strömungsprofil und die dadurch erzielte hohe Auflösung der Methode sind nicht nur eine Folge der Anwendung kleiner Kapillardurchmesser sondern auch eine spezifische Eigenschaft des EOF. Unter dem EOF gibt es effektiv keine Reibung der Teilchen an den Wänden. Es ist sogar die Wandschicht, welche die Flüssigkeit in Bewegung setzt. Mit einer günstigen Beschichtung der inneren Kapillarwand oder der Zugabe eines Flussmodifikators ist es möglich, eine Abschwächung oder auch Umpolung des inneren Oberflächenpotentials und damit eine Unterbindung oder Umkehrung des EOF zu erzielen. Diese Maßnahmen erwiesen sich als besonders geeignet, wenn die Moleküle an der Kapillaroberfläche vollständig adsorbiert werden. Dies trifft meistens auf die kationischen Moleküle zu, insbesondere Proteine. Kationische oberflächenaktive Substanzen wie HTAB verursachen durch Interaktionen mit der Kapillarinnenwand und die Entstehung von Tensiddoppelschichten mit positiv geladener Oberfläche bei weiterer Erhöhung der Tensidkonzentration eine Umkehrung des EOF, so dass eine Wanderung der Analyten in Richtung Anode erfolgt.

*„I have often said that when you can measure  
what you are speaking about and can express it in numbers  
you know something about it;  
when you can not express it in numbers,  
your knowledge is of meagre and unsatisfactory kind”.*  
*Sir W.J. Thompson, Lord Kelvin (1834-1907)*

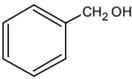
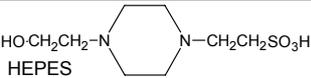
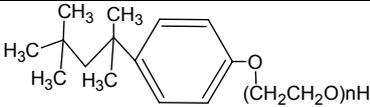
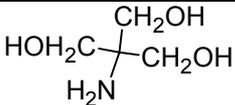
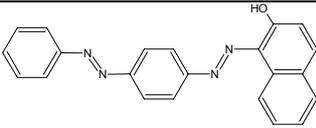
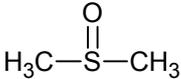
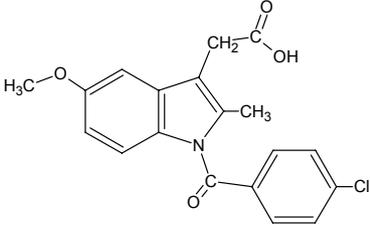
*Statistics: The only science that enables different experts  
using the same figures to draw different conclusions.*  
*Evan Esar (1899 - 1995), Esar's Comic Dictionary*

# KAPITEL III

## Experimenteller Teil

### III.1 Materialien und Puffer

<b>Testosteron</b> CAS: 58-22-0 Jenapharm GmbH & Co. KG (Jena, Deutschland)																																														
<b>[<sup>3</sup>H]Testosteron</b> NET-370 Testosteron, [1,2,6,7- <sup>3</sup> H(N)]- Katalognummer: NET370 <sup>TM</sup> Life Science Products, Inc., Perkin-Elmer (Boston, MA, USA)																																														
<b>Testosteron-</b> R= <b>Propionate</b> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> CAS: 57-85-2 <b>Enanthat</b> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub> CAS: 315-37-7 <b>Undecanoate</b> (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH <sub>3</sub> CAS: 5949-44-0 Jenapharm GmbH & Co. KG (Jena, Deutschland)																																														
<table border="0"> <thead> <tr> <th>Gallensalz</th> <th>X<sub>1</sub></th> <th>X<sub>2</sub></th> <th>X<sub>3</sub></th> <th>R</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>Na Glycodeoxycholat</b></td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>NHCH<sub>2</sub>COONa</td> </tr> <tr> <td>CAS: 16409-34-0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>Na Deoxycholat</b></td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>ONa</td> </tr> <tr> <td>CAS: 145224-92-6</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>Na Taurodeoxycholat</b></td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na</td> </tr> <tr> <td>CAS: 1180-95-6</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>Na Glycocholat</b></td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>NHCH<sub>2</sub>COONa</td> </tr> <tr> <td>CAS: 863-57-0</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Deutschland)	Gallensalz	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	R	<b>Na Glycodeoxycholat</b>	OH	H	OH	NHCH <sub>2</sub> COONa	CAS: 16409-34-0					<b>Na Deoxycholat</b>	OH	H	OH	ONa	CAS: 145224-92-6					<b>Na Taurodeoxycholat</b>	OH	H	OH	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	CAS: 1180-95-6					<b>Na Glycocholat</b>	OH	OH	OH	NHCH <sub>2</sub> COONa	CAS: 863-57-0					
Gallensalz	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	R																																										
<b>Na Glycodeoxycholat</b>	OH	H	OH	NHCH <sub>2</sub> COONa																																										
CAS: 16409-34-0																																														
<b>Na Deoxycholat</b>	OH	H	OH	ONa																																										
CAS: 145224-92-6																																														
<b>Na Taurodeoxycholat</b>	OH	H	OH	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na																																										
CAS: 1180-95-6																																														
<b>Na Glycocholat</b>	OH	OH	OH	NHCH <sub>2</sub> COONa																																										
CAS: 863-57-0																																														
<b>Tween<sup>TM</sup> 20</b> : R= Laurat, CAS: 9005-64-5, M <sub>Gd</sub> =1385 g/mol [8] <b>Tween<sup>TM</sup> 80</b> : R= Oleat, CAS: 9005-65-6, M <sub>Gd</sub> =1270 g/mol [8] Merck (Schuchardt, Deutschland)																																														
<b>Brij® 35</b> , CAS: 9002-92-0, M <sub>Gd</sub> =1179 g/mol [8] Merck (Schuchardt, Deutschland)	$C_{12}H_{25}(OCH_2CH_2)_nOH$ ; n~23																																													
<b>Dodecyltrimethylammoniumbromid</b> , CAS: 1119-94-4 Fluka Chemie AG (Ulm, Deutschland)	$H_3C(CH_2)_{11}N^+(CH_3)_3 Br^-$																																													
<b>Hexadecyltrimethylammoniumbromid</b> , CAS: 57-09-4 Fluka Chemie AG (Ulm, Deutschland)	$H_3C(CH_2)_{15}N^+(CH_3)_3 Br^-$																																													
<b>Phospholipon®90H</b> (M <sub>Gd</sub> =783 g/mol [219]) und <b>Phospholipon®90G</b> (M <sub>Gd</sub> =775 g/mol [220]) Geschenk von Nattermann Phospholipid GmbH (Köln, Deutschland)	Gesättigte bzw. ungesättigte Sojalecithine																																													
<b>Ölsäure</b> , CAS: 112-80-1 Sigma-Aldrich GmbH (Deutschland)	$H_3C(CH_2)_6CH=CHCH_2(CH_2)_6COOH$																																													
<b>Stearinsäure</b> , CAS: 57-11-4 Sigma-Aldrich GmbH (Deutschland)	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$																																													
<b>Bovine-Serum-Albumine</b> , CAS: 9048-46-8 Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe, Deutschland)																																														

<b>Benzylalkohol</b> , CAS: 100-51-6 Carl Roth GmbH &Co (Karlsruhe, Deutschland)	
<b>Pufferan® (HEPES)</b> , CAS: 7365-45-9 Carl Roth GmbH &Co (Karlsruhe, Deutschland)	
<b>Igepal CA-630 (Triton® X 100)</b> , CAS: 9036-19-5 Carl Roth GmbH &Co (Karlsruhe, Deutschland)	
<b>Pufferan® (Tris)</b> , CAS: 77-86-1 Carl Roth GmbH &Co (Karlsruhe, Deutschland)	
<b>Sudan III (Cerasin Rot)</b> , CAS: 85-86-9 Sigma-Aldrich GmbH (Deutschland)	
<b>DMSO (Dimethylsulfoxide)</b> , CAS: 67-68-5 Sigma-Aldrich GmbH (Deutschland)	
<b>Methanol</b> , CAS: 67-56-1 Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland	$\text{CH}_3\text{OH}$
<b>Acetonitril</b> , CAS: 75-05-8 Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland	$\text{CH}_3\text{CN}$
<b>Ethanol</b> , CAS: 64-17-5 Sigma-Aldrich GmbH (Deutschland)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$
<b>Isopropanol</b> , CAS: 67-63-0 neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland	$\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$
<b>Diethylether</b> , CAS: 60-29-7 neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$
<b>n-Hexane</b> , CAS: 110-54-3 neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$
<b>Natriumchlorid</b> , CAS: 7647-14-5 Carl Roth GmbH &Co (Karlsruhe, Deutschland)	$\text{NaCl}$
<b>Glucose</b> , CAS: 50-99-7 Carl Roth GmbH &Co (Karlsruhe, Deutschland)	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$
<b>Kaliumchlorid</b> , CAS: 7447-40-7 Carl Roth GmbH &Co (Karlsruhe, Deutschland)	$\text{KCl}$
<b>Natriumbicarbonat (Natron)</b> , CAS: 144-55-8 Carl Roth GmbH &Co (Karlsruhe, Deutschland)	$\text{NaHCO}_3$
<b>Magnesiumchlorid</b> , CAS: 7791-18-6 Carl Roth GmbH &Co (Karlsruhe, Deutschland)	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
<b>Natriumdihydrogenphosphat</b> , CAS: 7558-80-7 Carl Roth GmbH &Co (Karlsruhe, Deutschland)	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
<b>Calciumchlorid</b> , CAS: 10035-04-8 Carl Roth GmbH &Co (Karlsruhe, Deutschland)	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
<b>Indomethacin</b> , CAS: 53-86-1 Sigma-Aldrich GmbH (Deutschland)	

**Verwendete Puffer:****1- Phosphatpuffer nach Sørensen (SPB) (pH= 7,4; M≈0,067) [221]:**

Für die Herstellung von 1 l Puffer werden 1,651 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 9,706 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in etwa 900 ml destilliertem Wasser in einem 1L-Maßkolben im Ultraschalbad bei Raumtemperatur gelöst. Der pH-Wert wird ggfs. mit Natronlauge oder Salzsäure (0,1 N) korrigiert. Anschließend wird die Lösung auf einen Liter aufgefüllt und durchmischt.

**2 – Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer (KRBP) nach Saarbrücker Rezeptur (pH=7,4) [222]:**

Substanz	Summenformel	MG	mM/l	mg/l
Kochsalz	NaCl	58,44	116,4	6802
Glucose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$	198,18	5,55	1100
Kaliumchlorid	KCl	74,56	5,4	403
HEPES	$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$	238,31	1	238
Natriumbicarbonat (Natron)	$\text{NaHCO}_3$	84,01	2	168
Magnesiumchlorid	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	203,3	0,81	165
Natriumdihydrogenphosphat	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	137,99	0,78	108
Calciumchlorid	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	147,02	1,8	265
Indomethacin*	$\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{ClNO}_4$	357,8	$1,4 \cdot 10^{-3}$	≈ 5

**3 – Isotonischer Saline-Phosphatpuffer (PB) (pH=6; M≈0,154):**

Dieser Puffer setzt sich aus 0,72 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 4,88 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 6,59 g NaCl zusammen. Die Substanzen werden in etwa 900 ml destilliertem Wasser in einem 1L-Maßkolben im Ultraschalbad bei Raumtemperatur gelöst. Der pH-Wert wird ggfs. mit Natronlauge oder Salzsäure (0,1 N) korrigiert. Anschließend wird die Lösung auf ein Liter aufgefüllt und durchmischt.

**4 – Igepal-Lysis-Puffer (ILP):**

Tris	500,- mM	6,06 g/l
NaCl	140,- mM	8,18 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 mM	0,4 g/l
Igepal Ca-630	0,5% (V/V)	5,- ml
pH=8,0, mit HCL einstellen		

\* Indomethacin gehört nicht zur originalen Rezeptur des Puffers. Es dient aber zur Linderung des Gewebestresses, der durch die Isolierung des Gewebes verursacht wird. Experimentell führte seine Verwendung bei den *Ussing*-Kammer-Untersuchungen zum Erhalt von stabileren Kurven des transepithelialen elektrischen Widerstands (Rt) während des Versuchs.

### III.2 Herstellung mizellarer und mischmizellarer Systeme

Die Gallensäuren kommen im Dünndarm in Form der  $\text{Na}^+$ -Salze vor. Ihre Konzentration beträgt im Duodenum und oberen Jejunum durchschnittlich 5 mM (Bereich: 0-14 mM) unter Fastenbedingungen und steigt bis zu ca. 10-15 mM (Bereich: 3-35 mM) nach dem Essen an [223-226]. Basierend auf diesen Werten wurde für alle hergestellten mizellaren Systeme in dieser Arbeit eine Tensidkonzentration von 20 mM ausgewählt.

**Methode 1 (M1):** Sojalecithinhaltige Systeme wurden nach der Kopräzipitationsmethode [8] folgendermaßen hergestellt: Die entsprechenden Mengen von Tensid und dem Sojalecithin (SL) (ggfs. auch vom Steroid) werden in einer Mischung aus  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (1:1) in einem mit Schliffhals versehenen Rundkolben gelöst. Das Lösungsmittel wird mittels eines Rotationsverdampfers (angeschlossen an eine Vakuumpumpe und versehen mit einem auf 40 °C temperierten Wasserbad bei etwa 200 mbar und 150 U/min) vollständig abgedampft. Dadurch entsteht ein Film an der inneren Wand des Kolbens. Dieser wird in der Pufferlösung SPB (Untersuchungen zur Mizellbildung) oder KRBP (*Ussing*-Kammer-Untersuchungen) im Ultraschallbad bei 40 °C gelöst, bis die Lösung ganz klar wird (etwa 15 min.). Dabei wird der Kolben mit einem Glasstopfen dicht verschlossen, um Verdunstung zu vermeiden. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird die klare mizellare Lösung durch 0,45  $\mu\text{m}$  Membranfilter (Rotalibo®, Nylon, Carl Roth GmbH & Co. Karlsruhe, Deutschland) filtriert.

**Methode 2 (M2):** Fettsäurehaltige MMS oder einfache lipidfreie Systeme wurden nach der Dispersionsmethode [8] hergestellt: Zunächst werden die entsprechenden Mengen von Tensid in der Pufferlösung gelöst. Die festen Bestandteile, wie z.B. Wirkstoffe oder SS, werden mit den anderen flüssigen Bestandteilen wie OS benetzt bzw. gemischt und dann bei 55 °C im Ultraschallwasserbad in der Tensidlösung dispergiert, bis zum Erhalt einer klaren Lösung (ca. 45 min). Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird die klare mizellare Lösung durch 0,45  $\mu\text{m}$  Spritzenmembranfilter filtriert.

**Variante 1 (V1):** Sollten die mit ungesättigten Bestandteilen hergestellten Lösungen für gewisse Zeit gelagert und nicht sofort verwendet werden (wie z.B. bei den Sättigungskonzentrationsbestimmungen), mussten sie nach der Filtration in Ampullen oder in dicht verschließbare lichtdichte Vials abgefüllt werden. Die Gefäße wurden vor dem Verschluss mit Helium oder Argon als Schutzgas befüllt, um den Sauerstoff zu verdrängen.

**Variante 2 (V2):** Nach V1 hergestellte Lösungen ließen sich im Kühlschrank monatelang stabil lagern, wenn sie mit 1%(W/V)-benzylalkoholhaltigem Puffer hergestellt wurden. Bei Systemen, die nach M2 hergestellt wurden, wurde die benötigte Menge an Benzylalkohol (BzOH) (flüssig) in einem Maßkolben mit den festen Bestandteilen gemischt. Nach der Dispersion im Ultraschallbad wurde die Mischung mit Puffer auf das Endvolumen aufgefüllt.

Die nach den o.g. Methoden hergestellten MMS müssen optisch klar sein (Transmission  $\approx$  99% bei 660 nm gegen reinen bzw. tensidfreien Puffer als Blindwert).

**Herstellung gesättigter Systeme zwecks Bestimmung der Sättigungskonzentrationen:**

Die zu untersuchenden wirkstofffreien mizellaren Systeme wurden frisch hergestellt, mit einem Überschuss vom Wirkstoff in braune lichtgeschützte Vials gefüllt, dicht verschlossen und ca. 48 h in einem auf 40 °C temperierten Wasserbad eines Rüttelgeräts ausgeschüttelt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte die Filtration durch 0,45 µm Spritzenmembranfilter und anschließend die Analytik nach den in III.5 beschriebenen HPLC Methoden.

**Stabilität der hergestellten mizellaren Systeme:**

Die Faktoren, welche die Stabilität der nach den o.g. Methoden hergestellten Gallensalz-Lecithin-Mischmizellen beeinflussen können, wurden ausführlich von *Hammad* (1998) [8] untersucht. Diese wurden auch bei den o.g. Herstellungsmethoden der vorliegenden Arbeit berücksichtigt. Die Hauptgefahr für die Stabilität der MMS, die ungesättigte Fettverbindungen enthalten, stellt der oxidative Abbau der Doppelbindungen und die Entstehung als erstes von Hydroperoxide mit konjugierten Doppelbindungen (Diene oder Triene in den lecithinhaltigen Systemen) in einer sauerstoffreichen, nicht lichtgeschützten Umgebung dar. Dies demonstrierte sich beispielsweise bei den lecithinhaltigen Systemen durch Änderungen im UV-Absorptionsspektrum bei 233 nm und 265-285 nm sowie allgemein durch eine Zunahme der Peroxidzahl und die Entstehung von Malonaldehyden ( $\lambda_{\max} \approx 245$  nm). Bei den Systemen der ethoxylierten Tenside besteht die Gefahr der atmosphärischen Oxidation und Bildung von ethoxylierten Aldehyden mit allergieauslösender Wirkung [227]. Die optische Prüfung auf Phasentrennung, die Spektrenaufnahmen im UV-Bereich sowie die Transmissionseigenschaften (bei 660 nm) der Systeme zeigten keine signifikante Änderung der nach den o.g. Methoden hergestellten Systeme innerhalb einer Lagerungszeit von einer Woche bei ca. 4 °C.

**III.3 Herstellung intravenöser liposomaler Lösungen für das Kaninchen-Modell**

Für die Ermittlung pharmakokinetischer Parameter bei den Tierversuchen ist der Wirkstoff durch eine i.v. Bolusinjektion zu verabreichen. Für die Solubilisation ausreichender Mengen von untersuchten Steroiden in wässriger Injektionslösung wurde das folgende liposomale System verwendet. Zur Herstellung von 20 ml der i.v. Lösung wurden 100 mg P90G, ca. 1 mg NaDC oder NaGDC und die Menge des Steroids in einer CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1:1) Mischung in einem mit Schliffhals versehenen Rundkolben gelöst. Das Lösungsmittel wurde mittels eines Rotationsverdampfers entsprechend M1 vollkommen abgedampft. Dadurch entstand ein Film an der inneren Wand des Kolbens. Dieser wurde bei 40 °C (etwa 30 min) im Ultraschallwasserbad mit PB gelöst. Dabei musste der Kolben mit Helium oder Argon befüllt und mit einem Glasstopfen dicht verschlossen werden, um Oxidation der ungesättigten Fettsäurereste sowie eine Verdunstung der Lösung möglichst zu vermeiden. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung durch einen 0,2-µm-Membranfilter filtriert, mit langsamer Heliumzufuhr entgast und dicht verschlossen. Die Zugabe von Alkoholen, Glycerolderivaten oder alkoholischen Konservierungsmitteln wie z.B. BzOH führt zur Instabilität solcher Systeme [228]. Die Lösung wurde frisch hergestellt und innerhalb von 24 h verwendet. Die Bestimmung der Vesikelgröße dieses Systems (mit eingebettetem TE, 3 mg/ml) durch Lichtstreuung mit einem *Malvern Autosizer II C* (*Malvern Instruments*, Herrenberg, Deutschland) zeigte eine relativ schmale Ein-Peak-Verteilung um 92,4 nm (siehe Anhang).

### III.4 UV/VIS-spektroskopische Untersuchungen

#### III.4.1 Transmissionsuntersuchungen zur Entwicklung der MMS

Das Messprinzip bei den Solubilisationsuntersuchungen in dieser Arbeit beruht auf der optischen Transparenz und Isotropie der mizellaren Systeme und wurde bereits in früheren Arbeiten von *Dürr et al.* (1994) [228] und *Hammad* (1998) [8] beschrieben und angewandt.

Nach der Filtration der hergestellten MMS wird die Transmission (T%,  $\lambda = 660$  nm) bei 25 °C mittels UV/Vis-Spektrophotometer SPECTRONIC 601 (Milton Roy, Rochester, NY, USA) gegen die reine Tensidlösung in SPB als Blindwert ermittelt.

Die Absorption aller bei diesen Messungen verwendeten Stoffe in ihren Lösungen bei  $\lambda = 660$  nm ist in einem Vorversuch (Spektrenaufnahme) auszuschließen.

Der mizellare Durchmesser liegt meist im Bereich von 1-15 nm [38] und erreicht sogar bei einigen MMS eine Größe von 30 bis 200 nm [229]. Bei einem Überschuss der zu solubilisierenden Bestandteile entstehen größere instabile Aggregatformen in der Lösung und führen durch Phänomene wie z.B. Lichtstreuung zur Abnahme der Transmission. Im Laufe dieses Prozesses soll sich die Transmission bei einem bestimmten Molenbruch schlagartig ändern. Die theoretische Transmissionskurve soll sich idealerweise wie in Abb. 7 verhalten.

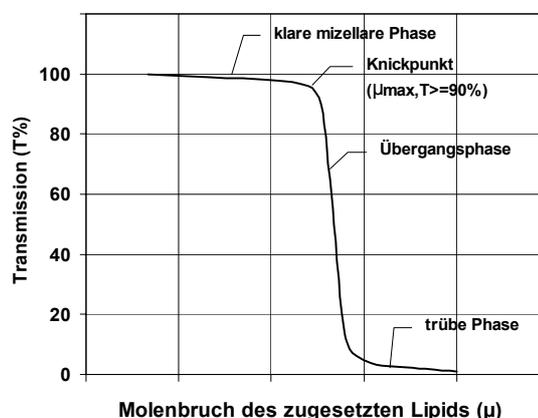


Abb. 7 Theoretische Transmissionskurve

Während des Phasenübergangs bzw. im Bereich über die Solubilisationskapazität des Systems hinaus entstehen allerdings verschiedene, meist undefinierbare Aggregatmischungen unterschiedlicher Natur und Größe. Sie flocken manchmal in der Lösung oder fallen aus, wirken zumeist negativ auf die Reproduzierbarkeit der Transmissionskurve und auf die Standardabweichung der Messungen nach dem Knickpunkt oder verhindern eine schlagartige Änderung in der Transmissionskurve. Infolgedessen wird der Knickpunkt nicht immer deutlich erkennbar. Es war aus diesem Grund erforderlich, eine mathematische Definition für die Erkennung des Knickpunktes und damit des Endes der homogenen mischmizellaren Phase anzuwenden. Für diesen Zweck wurden die Steigungen ( $S_1$  und  $S_2$ ) bei je drei aufeinander folgenden Transmissionsmessungen ( $\mu_1, T\%_1$ ), ( $\mu_2, T\%_2$ ) und ( $\mu_3, T\%_3$ ) im Bereich des Knickpunktes folgendermaßen errechnet:

$$S_1 = \frac{|T\%_2 - T\%_1|}{\mu_2 - \mu_1} \quad \text{und} \quad S_2 = \frac{|T\%_3 - T\%_1|}{\mu_3 - \mu_1} \quad \text{Gl. III.4-1}$$

wobei T% die prozentuale Lichttransmission und  $\mu$  der Molenbruch der zugegebenen Komponente sind. Für die erste Messreihe, in der  $S_2 \geq S_1$  war, wurde  $\mu_1 = \mu_{\max}$  (der Grenzwert) betrachtet, vorausgesetzt, dass  $S_1 \geq 0,6$  und  $T\%_1 \geq 90$  vorlag. Anderenfalls wurde  $\mu_2 = \mu_{\max}$  angenommen, wenn  $S_2 \geq 0,6$  und  $T\%_2 \geq 90$  auftrat. Insbesondere in den Fällen, wo das Tensidsystem sehr geringe Solubilisationskapazität für den zu

solubilisierenden Bestandteil hat, endete der Zugabeprozess einfach mit einer Phasentrennung von mizellarer Lösung und klarem feinem Niederschlag oder Ausflockungen, ohne einen deutlich erkennbaren Phasenübergang aufzuweisen.

### III.4.2 Z-Wert-Bestimmungen

Bei der Durchführung der Messungen wurden zunächst die spektralen Eigenschaften des gelösten Stoffes in einer Reihe von Lösungsmitteln mit bekannten Z-Werten bzw. Polaritäten (Tabelle 3) im UV-Bereich ermittelt, um die Beziehung zwischen den Z-Werten und den über die maximalen Absorptionswellenlängen ermittelten Übergangsenergien zu bestimmen.

Alle für dieses Experiment verwendeten Chemikalien und Lösungsmitteln waren vom Reinheitsgrad für HPLC-Anwendungen geeignet. Lösungen des Testosterons oder der Testosteronester TP, TE, und TU in diesen Lösungsmitteln wurden in Konzentrationen von ca. 10 µg/ml hergestellt und durch 0,2 µm Membranfilter (Rotalibo®, Nylon, Carl Roth GmbH & Co. Karlsruhe) filtriert. Die Aufnahme der UV-Spektren und die Datenverarbeitung erfolgten mit dem UV/VIS/NIR Spektrometer Lambda 19 und dem Software UV WinLab - Version 2.80.03

von PERKIN ELMER Corporation, USA. Einstellungen des Gerätes und Angaben zum Versuch sind in Tabelle 2 aufgelistet. In einem Vorversuch wurden erst die günstigsten Verdünnungen und der Bereich der Absorptionsmaxima mit einer Scangeschwindigkeit von 100 nm/min zwischen 210-360 nm bestimmt. Um optimale Absorptionssignale zu erhalten und zugleich Verluste an Lichtintensität außer Absorption möglichst auszuschließen bzw. im linearen Bereich des Lambert-Beerschen Gesetzes messen zu können, wurden die Verdünnungen so ausgewählt, dass das Absorptionsmaximum möglichst 1 beträgt. Es erfolgten danach präzisere Dreifachbestimmungen der maximalen Absorptionswellenlängen im Bereich ±7 nm vom erwarteten  $\lambda_{\max}$ . Wenn nötig, wurden die Spektren mit der o.g. Software vom Rauschen befreit, geglättet und bearbeitet, um den Mittelwert der erhaltenen Absorptionsmaxima bestimmen zu können. Die Energien des elektronischen Übergangs  $E_t$  wurden nach Gl. III.4-2 berechnet [209] und graphisch gegen die entsprechenden Z-Werte der Lösungsmitteln aufgetragen.

$$E_t = 2,859 \times 10^4 / \lambda_{\max} \quad \text{Gl. III.4-2}$$

Dabei ist  $E_t$  die elektronische Übergangsenergie in kcal/mol und  $\lambda_{\max}$  die maximale Wellenlänge der UV-Absorption der betreffenden Substanz im Lösungsmittel in nm.

Mit den Daten wurde eine lineare Regressionsanalyse (Methode der kleinsten Quadrate) durchgeführt und eine lineare Funktionsgleichung in Form von  $Z = aE_t + b$  erstellt.

Tabelle 2 Versuchsbedingungen und Geräteeinstellungen beim Z-Wert-Versuch

Temperatur	25 °C
UV/VIS-Quarzküvette	Perkin Elmer Corp., 10 mm
Messintervall	0,2 nm
Spaltenbreite	0,25 nm
Messgeschwindigkeit	0,9 nm/min
Lamp UV, Lamp VIS	ein
Glätte	0

Tabelle 3 Z-Werte [kcal.mol<sup>-1</sup>] verschiedener Lösungsmittel nach [208]

Z-Wert	Lösungsmittel	Z-Wert	Lösungsmittel
94,6	Destilliertes Wasser	83,6	MeOH
87,1	80% MeOH (V/V)	79,6	EtOH
84,5	70% EtOH	76,6	Isopropanol
85,5	90% MeOH	71,3	ACN
84,8	80% EtOH	66,1	Diethylether, wassergesättigt
84,5	95% MeOH	60,4	n-Hexane
82,5	90% EtOH		
81,2	95% EtOH		

In früheren ähnlichen Arbeiten [208,209] wiesen die ermittelten Z-Werte eine Unabhängigkeit von der Solubilisatkonzentration in den mizellaren Lösungen auf und der Einfluss der Verdünnung war nur auf Verschiebungen der gemessenen Maxima innerhalb des  $\pm 0,5$ -nm-Bereiches der ausgerechneten Versuchspräzision beschränkt. Dies wurde in dieser Arbeit als geltend angenommen und war deswegen kein Objekt weiterer Untersuchungen. Die mit T bzw. seinen Estern gesättigten mizellaren Systeme wurden dem gleichen beschriebenen Verfahren unterworfen, wodurch die optimalen Verdünnungen (mit dem entsprechenden steroidfreien System) bestimmt und die maximalen Absorptionswellenlängen ermittelt wurden, die wiederum in entsprechende Übergangsenergien nach Gl. III.4-2 umgerechnet wurden. Über die für jedes Derivat herausgefundenen linearen Regressionsgleichungen wurden dann die Z-Werte aus den entsprechenden Übergangsenergien rechnerisch ermittelt.

### **III.5 Gehaltbestimmung mittels HPLC-Methoden**

#### **III.5.1 Analytik in mizellaren Systemen**

Der Gehalt verschiedener solubilisierter Steroide in den mizellaren Systemen wurde mit Hilfe der RP-HPLC bestimmt.

Die mizellare Struktur wurde erst durch Verdünnung (mehr als zehnfach) mit einem organischen HPLC-kompatibeln Lösungsmittel (meist MeOH) zerstört. Dadurch fallen die Puffersalze aus und es wird möglich, die Probelösung für die HPLC-Analytik mit Hilfe eines  $0,45 \mu\text{m}$  Nylon (oder PTEF je nach Lösungspolarität) Spritzenfilters (Rotalibo®, Carl Roth GmbH & Co. Karlsruhe, Deutschland) vom Niederschlag zu befreien. Die Blindwertprobe und die Verdünnungsreihe wurden entsprechend der Proben angesetzt und zur Analyse vorbereitet.

Die Anwendung der RP-HPLC war notwendig, da ein Teil der Komponente der mizellaren Systeme eine Absorption im benötigten UV-Bereich zeigte (v.a. Tween™ Produkte), weshalb sie bei der Gehaltsbestimmung von den Steroiden getrennt werden musste. Mit Ausnahme von den untersuchten Steroiden eluierten alle großen, hydrophilen oder amphiphilen Moleküle kurz nach der Injektion und fast zusammen mit dem sog. Lösungsmittelpeak (gegen  $t_0$ ) und ermöglichten damit eine saubere Trennung und Gehaltsbestimmung der untersuchten Steroide. Es erfolgte für jede Probe eine Dreifachbestimmung. Zur quantitativen Auswertung wurden die Peaks der Substanzen bei der entsprechenden Wellenlänge integriert und die erhaltenen Flächen statistisch ausgewertet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hauptsächlich zwei HPLC Methoden für die Gehaltsbestimmung von T und seinen Estern in mizellaren Systemen und den anderen Lösungen eingesetzt, die im Folgenden in Details geschildert werden.

**Methode HPLC-1 (isokratische Elution):** Die Messungen erfolgten mit der Säule Knauer, 100x4 mm, Nucleosil®-100, RP-C18, B612 Y76,  $5\mu\text{m}$  von KNAUER GmbH, (Berlin, Deutschland) an HPLC/UV MERCK-HITACHI (L-6200A Intelligent Pump, D-6000A Interface Module, AS-4000A Intelligent Autosampler, L-4250 UV-Vis Detector) und mit der Software (Model D-6000; CHROMATOGRAPHY DATA STATION SOFTWARE, HPLC MANAGER Version 2). Die Funktionsparameter der HPLC Methode sind in der Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 4 Angewandte isokratische HPLC-Methode für die Gehaltsbestimmung der verschiedenen untersuchten Steroide in mizellaren Tensidsystemen**

TD	$\lambda_{\max}$ [nm]	Eluent MeOH/H <sub>2</sub> O	Durchflussrate [ml.min]	Temperatur [°C]
T	244	70:30	1,2	40
TP	242	85:15	1,2	40
TE	242	90:10	1,2	30
TU	242	95:5	1,3	45

**Methode HPLC-2 (Gradientelution):** Die Methode wird in der Tabelle 5 zusammengefasst.

**Tabelle 5 Funktionsparameter der HPLC-Analyse und Programm der Laufmittelpumpe**

Säule (Stationäre Phase)	XTerra® RP <sub>18</sub> 3,5 $\mu$ m, 3,9x100 mm, Waters, USA	Messzeit [min]	Anteil Laufmittel B [%]	Flussrate [ml.min <sup>-1</sup> ]
Laufmittel (mobile Phase)	A: ACN/H <sub>2</sub> O (25:75) B: ACN/H <sub>2</sub> O (95:5)	0	0	0,8
Flussrate	0,8 ml.min <sup>-1</sup>	1	100	0,8
Säulentemperatur	40 °C	7	100	0,8
Pumpensystem	Waters Delta 600 + Waters 600 Controller	8	100	0,9
Autosampler	Waters 717 Plus Autosampler	9	0	0,9
Detektion	Waters 2996, Photodiode Array Detector, $\lambda=230-260$ nm	15	0	0,9
Injektionsvolumen	20 $\mu$ l	16	0	0,8
Software	Masslynx V3.5, Micromass Ltd., Manchester, UK	18	0	0,8

### III.5.2 Analytik der BSA/KRBP-Lösung

Die Modellierung des Transports *in-vitro* erfolgte mit Hilfe der *Ussing*-Kammer-Technik. Für die Aufnahme transportierter Steroide im AK wurde eine BSA-Lösung (BSA = *bovine serum albumin*) in KRBP benutzt. Die Anwendung von BSA (4%) auf der basolateralen Seite sorgte für notwendige Absorptionskräfte, die dadurch ein Konzentrationsgefälle wie *in-vivo* bewirkten. Außerdem sollte dies laut *Krishna et al.* [230] eine bessere Wiederfindung (*recovery*) und  $P_{app}$  (scheinbare Permeabilität) für stark lipophile protein-bindende Stoffe ergeben.

#### III.5.2.1 Entwicklung der Aufarbeitungsmethode

Bei Versuchen in der *Ussing*-Kammer musste aus dem o.g. Grund eine HPLC-Methode für die Konzentrationsbestimmung von T, TP, TE und TU in der BSA/KRBP-Lösung entwickelt werden. Bei der Probenvorbereitung mussten die Wiederfindungsraten und die Wiederholpräzision optimiert werden. Dafür wurde zunächst die BSA-Lösung im KRBP (4% W/V) hergestellt. Eine Lösung von T bzw. Testosteronestern in EtOH (10 mg/ml) wurde mit BSA/KRBP im Verhältnis 1:500 versetzt (entsprechend einer Endkonzentration von 20  $\mu$ g/ml) und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Änderung an Probevolumen war hier geringfügig und wurde deshalb vernachlässigt. Für die Auswahl des am besten geeigneten organischen Lösungsmittels für die Aufarbeitung der BSA-

Proben wurden ACN, MeOH und EtOH miteinander verglichen. Die Proben wurden jeweils mit 100 mg/ml Harnstoff versetzt und 30 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Harnstoff diente zur Denaturierung bzw. Entfaltung der Albumine und sollte deswegen die Extraktion der gebundenen Moleküle verbessern. Harnstoff sollte auch die Dichte der Endprobe erhöhen und damit zu schmalere Peaks im Chromatogramm führen [231]. Die Proben wurden anschließend 60 min bei 40 °C im Ultraschallbad mit dem organischen Lösungsmittel 1:1 oder 1:2 (V/V) inkubiert, um BSA und Puffersalze zu fällen und die gebundenen Steroide zu extrahieren. Die Mischung wurde danach 30 min bei 2500 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der klare Überstand durch einen Spritzenfilter (0,45 µm) filtriert. Die Proben wurden nach der Methode HPLC-2 gemessen. Zur quantitativen Auswertung wurden die Peaks der Substanzen bei der entsprechenden Wellenlänge integriert. Die erhaltenen Flächen wurden dann statistisch ausgewertet. Daraus ergaben sich die folgenden Retentionszeiten ( $t_R$ ) (Tabelle 6). Das resultierende Chromatogramm ist in Abb. 10 dargestellt.

**Tabelle 6** ermittelte Retentionszeiten verschiedener Testosteronderivate in den aufgearbeiteten BSA/KRBP-Proben nach Methode HPLC-2

T	TP	TE	TU
$t_{R, 243 \text{ nm}} \pm \text{SA}, n$	$t_{R, 241 \text{ nm}} \pm \text{SA}, n$	$t_{R, 240 \text{ nm}} \pm \text{SA}, n$	$t_{R, 240 \text{ nm}} \pm \text{SA}, n$
8,52±0,03 min, 32	9,89±0,02 min, 32	11,16±0,03 min, 29	13,01±0,16 min, 29

Für die Erstellung der Kalibrierkurve in dieser Phase der Arbeit wurden 6 Konzentrationen im Bereich von 2-12 µg/ml ausgehend von einer Stammlösung in ACN als Lösungsmittel hergestellt. Die Kalibrierproben wurden mit der o.g. HPLC-Methode analysiert (Abb. 9). Es erfolgte dabei eine Dreifachbestimmung. Die Wiederfindungsraten sind in Abb. 8 dargestellt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Methoden A2 und E2 für die Aufarbeitung der Proben ausgewählt. Mit dem lipophileren ACN war allerdings die Fällung der Puffersalze effektiver. Daher war seine Verwendung bei der Extraktion sicherer für die HPLC-Anlage. Außerdem wies die Methode mit ACN eine rauschfreiere Basislinie auf, da es auch im Laufmittel verwendet wurde. Da der Unterschied zwischen den Wiederfindungsraten beider Methoden klein war, während die Kosten und die anderen o.g. praktischen Gründe gegen den Einsatz vom EtOH sprachen, wurde die Methode A2 schließlich vorgezogen.

### III.5.2.2 Analytik der BSA/KRBP-Proben und Überprüfung der Wiederholpräzision

Als Blindwert diente hier die reine testosteronfreie BSA/KRBP-Lösung. Der Blindwert und eine BSA/KRBP-Probe mit T oder einem seiner Ester in Konzentration von 20 µg/ml wurden wie in III.5.2.1 hergestellt und anschließend nach A2 vorbereitet. Die Aufarbeitung wurde für die Bestimmung der Wiederholpräzision sechs mal pro die 20 µg/ml steroidhaltige BSA/KRBP-Probe wiederholt. Die Kalibrierproben in BSA/KRBP wurden unabhängig von einander in Konzentrationen von 5, 10, 15, 20, 25 und 30 µg/ml ebenso wie in III.5.2.1 hergestellt und nach Methode A2 vorbereitet. Weiterhin wurden BSA/KRBP-Proben 6 h bei 37 °C mit einem Überschuss von T bzw. seinen Estern zum Sättigen geschüttelt. Anschließend wurden sie filtriert (0,45 µm Spritzenfilter) und danach für die Messung je nach Bedarf mit BSA/KRBP verdünnt.

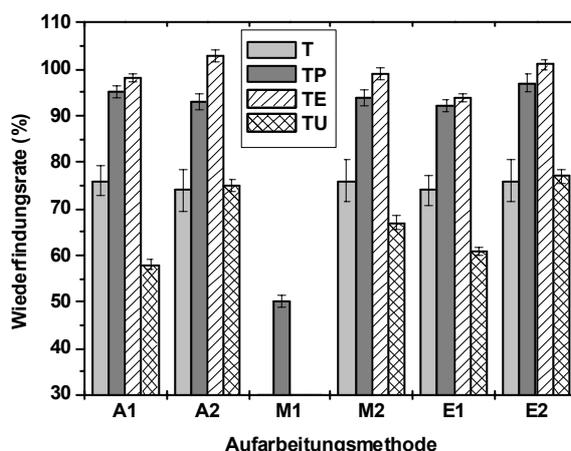


Abb. 8 Vergleich zwischen verschiedenen Aufarbeitungsmethoden für die Analytik in BSA/KRBP. A1: ACN (1:1), A2: ACN (2:1), M1: MeOH (1:1), M2: MeOH (2:1), E1: EtOH (1:1), E2: EtOH (2:1)

Tabelle 7 S.k.: Sättigungskonzentrationen der untersuchten Steroide im BSA/KRBP. VB: Vertrauensbereich, n: Anzahl der Bestimmungen, NG und BG: nach DIN 32 645 errechnete Nachweis- und Bestimmungsgrenzen,  $R^2$ : Regressionskoeffizient,  $ax+b$ : lineare Regressionsgleichung,  $S_y$ : Reststandardabweichung der linearen Anpassung

	S.k. ± VB [ $\mu\text{g/ml}$ ]	n	NG [ $\mu\text{g/ml}$ ]	BG [ $\mu\text{g/ml}$ ]	$R^2$	$ax+b$	$S_y$
T	367,9 ± 13,8	3	1	3	0,9985	403,8x + 195,9	186,52
TP	161,3 ± 11,9	3	4,1	8,6	0,9933	359,3x + 520,8	349,79
TE	5000,8 ± 535,2	3	4,8	10	0,9909	250,8x + 398,7	284,60
TU	20,7 ± 1,6	3	3,53	7,5	0,995	258,7x + 242,8	217,32

Die Proben wurden ebenso nach der Methode A2 vorbereitet und nach der oben beschriebenen Methode HPLC-2 (Abb. 10) analysiert. Es erfolgte dabei eine Dreifachbestimmung pro Probe. Tabelle 7 fasst die Ergebnisse zusammen. Die Wiederholpräzision wurde durch Zweifachbestimmung der aufgearbeiteten 20  $\mu\text{g/ml}$ -Proben ermittelt. Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse des Tests.

Tabelle 8 Einfaktorieller ANOVA-Test für die Überprüfung der Wiederholpräzision der Aufarbeitungsmethode A2 mit BSA/KRBP-Proben anhand der ermittelten Peakflächen für 6 Wiederholungen/Probe, Zweifachbestimmung und Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$

Wirkstoff	MW(MW)	SA (MW)	rSA(%)	ANOVA P-Wert
T	8269	27,3	0,33	0,999
TP	8610	91,6	1,06	0,951
TE	5806	70,1	1,21	0,973
TU	5310	69,3	1,3	0,99

### III.5.3 Analytik in Humanplasma

#### III.5.3.1 Entwicklung der Aufarbeitungsmethode

Die Bestimmung der Plasmakonzentrationen von T, TP, TE und TU wurde für die pharmakokinetischen Versuche am Kaninchenmodell benötigt. Diese Bestimmung erfolgte durch HPLC. Die Entwicklung einer Vorbereitungsmethode der Plasmaproben

mit möglichst hoher Wiederfindungsrate und Wiederholpräzision war hier notwendig für die Entwicklung der Analytik mittels HPLC.

Humanplasma aus Blutspenden wurde von der Universitätsklinik zur Verfügung gestellt, im Gefrierschrank bei  $-25\text{ °C}$  gelagert und direkt vor der Vorbereitung bei Raumtemperatur aufgetaut. Eine Lösung von T bzw. Testosteronestern in EtOH (10 mg/ml) wurde mit Plasmaproben im Verhältnis 1:500 versetzt (entsprechend einer Endkonzentration von  $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) und 30 min bei  $37\text{ °C}$  inkubiert. Die Änderung an Probenvolumen war hier geringfügig und wurde deshalb vernachlässigt.

Hier wurden auch ACN, MeOH und EtOH als organische Lösungsmittel für die Aufarbeitung der Plasmaproben miteinander verglichen. Die testosteronhaltige Plasmaprobe wurde wie die BSA/KRBP Proben (III.5.2.1) vorbereitet. Die Proben wurden nach Methode HPLC-2 analysiert (Tabelle 5). Das resultierende Chromatogramm ist in (Abb. 12) zu sehen. Zur quantitativen Auswertung wurden die Peaks der Substanzen bei der entsprechenden Wellenlänge integriert und die erhaltenen Flächen statistisch ausgewertet. Daraus ergaben sich die folgenden Retentionszeiten ( $t_R$ ) (Tabelle 9). Für die Erstellung der Kalibrierkurve in dieser Phase der Arbeit wurden 6 Konzentrationen im Bereich von  $2\text{--}12\text{ }\mu\text{g/ml}$  ausgehend von einer Stammlösung in ACN als Lösungsmittel hergestellt. Das resultierende Chromatogramm ist in Abb. 9 zu sehen. Die Proben wurden ebenso dreifach nach Methode HPLC-2 analysiert.

Zusätzlich zu den in III.5.2 diskutierten praktischen Gründen zeigte die Methode A2 hier deutlich bessere Wiederfindungsraten gegenüber den anderen verglichenen Methoden (Abb. 11), weswegen sie hier für die weitere Analytik ausgewählt wurde.

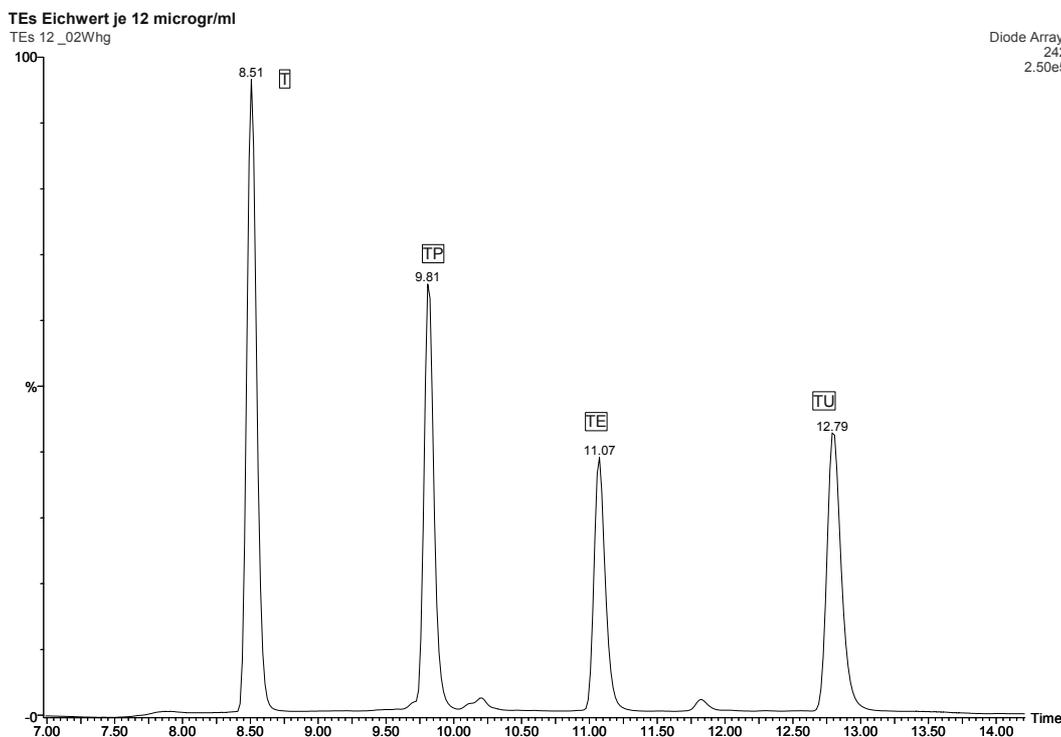


Abb. 9 HPLC-Chromatogramm des Testosterons und seiner Ester in ACN

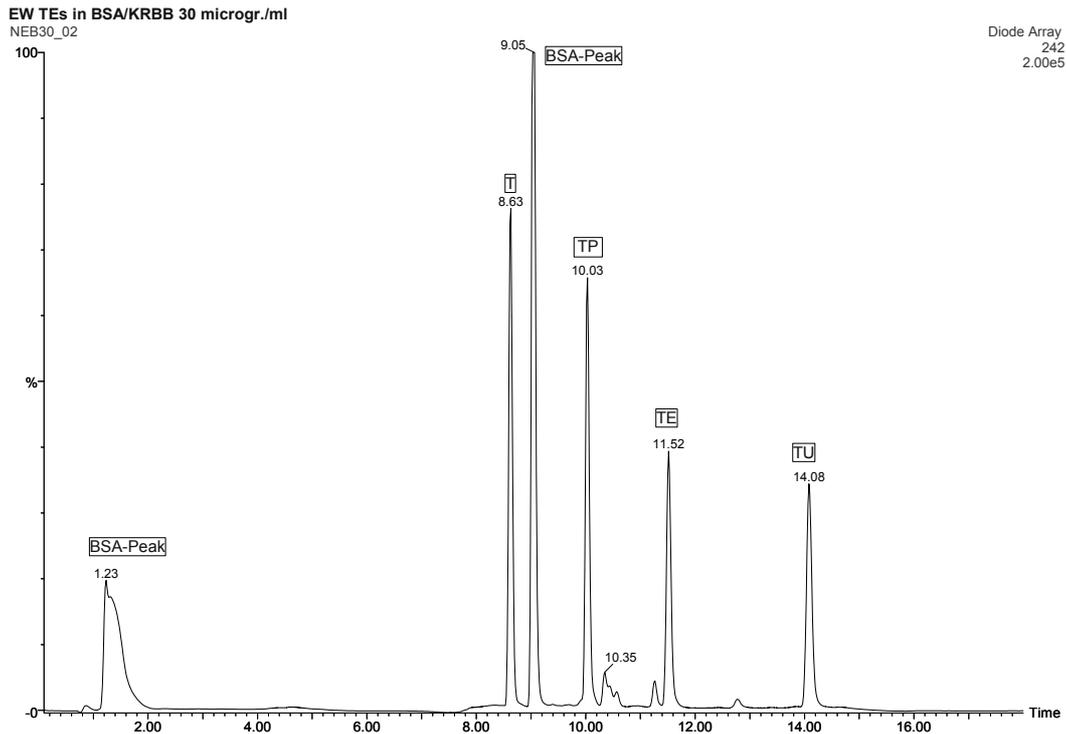


Abb. 10 HPLC-Chromatogramm des T und seiner Ester in BSA/KRBP-Lösung nach Aufarbeitung mit Methode A2

Tabelle 9 ermittelte Retentionszeiten verschiedener Testosteronderivate bei der Analytik der aufgearbeiteten Plasmaproben nach Methode HPLC-2

T	TP	TE	TU
$t_{R, 243 \text{ nm}} \pm SA, n$	$t_{R, 241 \text{ nm}} \pm SA, n$	$t_{R, 240 \text{ nm}} \pm SA, n$	$t_{R, 240 \text{ nm}} \pm SA, n$
8,57±0,01 min, 66	9,94±0,04 min, 36	11,31±0,17 min, 36	13,41±0,3 min, 36

### III.5.3.2 Analytik der Plasmaproben und Überprüfung der Wiederholpräzision

Als Blindwert diente reines wirkstoff-freies Plasma. Der Blindwert und die Plasmaproben verschiedener unter-suchter Steroide in Konzentrationen von 20 µg/ml wurden wie in III.5.2.1 hergestellt und anschließend mit A2 aufgearbeitet. Die Probenvorbe-reitung nach der angegebenen Methode A2 wurde für die Über-prüfung der Wiederholpräzision fünf mal pro Plasmaprobe wiederholt. Die Kalibrierproben in Konzentra-tionen von 5, 10, 15, 20, 25 bzw. 30 µg/ml wurden unabhängig von einander hergestellt und ebenfalls nach Methode A2 vorbereitet. Dazu wurden Plasmaproben 6 h bei 37 °C mit einem Überschuss von T bzw.

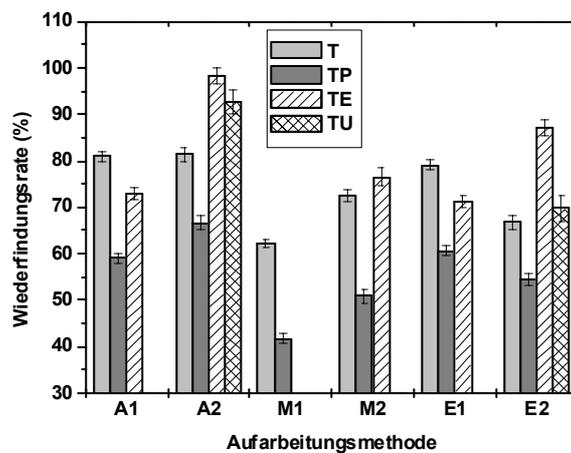
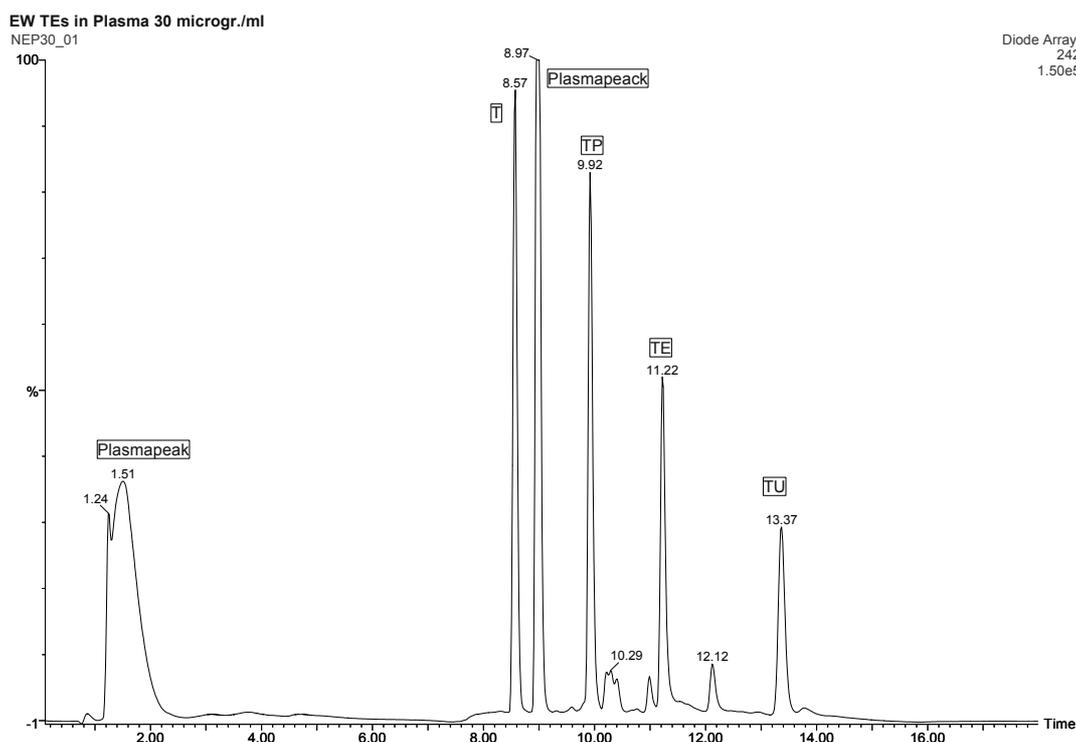


Abb. 11 Vergleich zwischen verschiedenen Aufarbeitungsmethoden in Plasma. A1: ACN(1:1), A2: ACN(2:1), M1: MeOH(1:1), M2: MeOH(2:1), E1: EtOH(1:1), E2: EtOH(2:1)

von seinen Estern zum Sättigen geschüttelt. Danach wurden die Proben filtriert (0,45  $\mu\text{m}$  Spritzenfilter) und je nach Bedarf mit reinem Plasma verdünnt. Anschließend wurden die Proben nach der oben beschriebenen Methode A2 vorbereitet und nach der Methode HPLC-2 gemessen. Es erfolgte dabei eine Dreifachbestimmung pro Probe. Die Gleichungen der erhaltenen Bezugsgeraden nach der linearen Anpassung mit der Methode der kleinsten Quadrate und die ermittelten Sättigungskonzentrationen sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Die Wiederholpräzision wurde durch Dreifachbestimmung mit den aufgearbeiteten 20- $\mu\text{g/ml}$ -Proben geprüft (Tabelle 11).

**Tabelle 10 S.k.:** Sättigungskonzentrationen der verschiedenen untersuchten Steroide im Humanplasma. VB: Vertrauensbereich, n: Anzahl der Bestimmungen, NG und BG: nach DIN 32 645 errechneter Nachweis- und Bestimmungsgrenzen,  $R^2$ : Regressionskoeffizient,  $ax+b$ : lineare Regressionsgleichung,  $S_y$ : Reststandardabweichung der linearen Anpassung

	S.k. $\pm$ VB [ $\mu\text{g/ml}$ ]	n	NG [ $\mu\text{g/ml}$ ]	BG [ $\mu\text{g/ml}$ ]	$R^2$	$ax+b$	$S_y$
<b>T</b>	309,2 $\pm$ 4	3	0,35	1,14	0,9998	419,4x - 101,2	68,63
<b>TP</b>	273 $\pm$ 4,3	3	0,43	1,29	0,9997	364,2x - 68,8	74,4
<b>TE</b>	409,3 $\pm$ 12,9	3	0,89	2,78	0,9987	241,5x - 110,7	101,15
<b>TU</b>	35,5 $\pm$ 2,3	3	2,56	7,65	0,9949	189,8x - 22,3	161,46



**Abb. 12 HPLC-Chromatogram von Testosteron und seinen Estern im Plasma**

**Tabelle 11** einfaktorier ANOVA-Test für die Überprüfung der Wiederholpräzision der Aufarbeitungsmethode A2 mit Plasmaproben anhand der ermittelten Peakflächen für fünf Wiederholungen/Probe, Dreifachbestimmung u. Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$

Wirkstoff	MW(MW)	SA (MW)	rSA(%)	ANOVA P-Wert
<b>T</b>	8239	4,4	0,05	0,909
<b>TP</b>	7227	20,6	0,29	0,991
<b>TE</b>	4724	20,1	0,43	0,956
<b>TU</b>	3783	16,3	0,43	0,997

### III.6 Untersuchungen mittels DLS

Das Lichtstreuungsinstrument wurde von ALV-LASER Vertriebsgesellschaft mbH, Langen (Frankfurt), Deutschland, für die simultane statische und dynamische Untersuchungen der Lichtstreuung ausgestattet, das auf einem speziellen optischen Vibrationsdämpfungstisch montiert ist (Abb. 13).

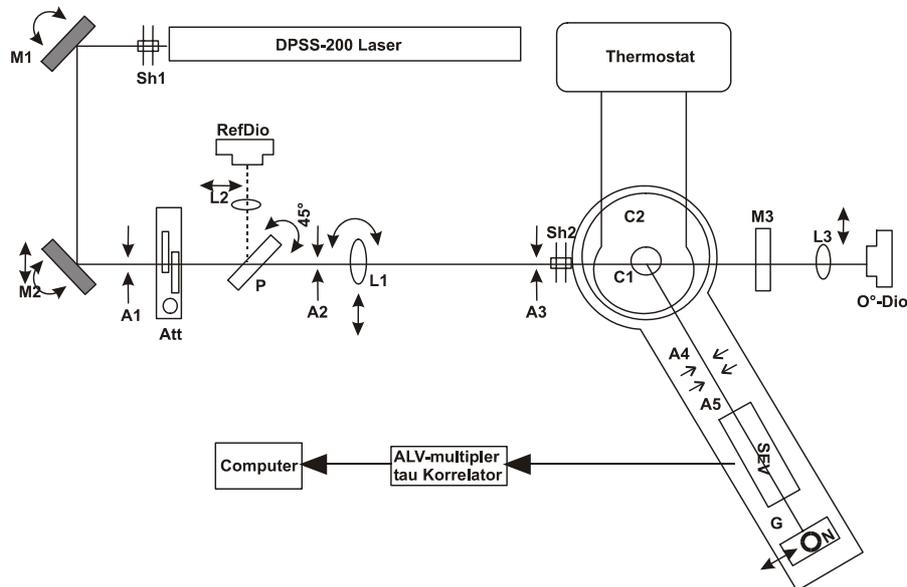


Abb. 13 Schematische Darstellung des Lichtstreuungsmessgeräts: Sh<sub>1</sub> und Sh<sub>2</sub> (Verschlüsse), M<sub>1</sub> und M<sub>2</sub> Spiegel, A<sub>1</sub>-A<sub>5</sub> (Blenden), P (Strahlteiler), Att (Strahlabschwächer), RefDio (Reflektions-Quadrantphotodiode), L<sub>1</sub>-L<sub>3</sub> (bispähische Linsen), C<sub>1</sub> (Probenhalter), C<sub>2</sub> (temperiertes Wasserbad), G (Goniometer), SEV (Photomultiplier).

Das Messgerät arbeitet mit senkrecht polarisiertem Nd:YAG DPSS-LASER-Licht von *Coherent, Auburn, USA* der Wellenlänge 532 nm und einer Leistung von 200 mW als Primärstrahl. Im Falle von höheren Intensitäten des gestreuten Lichtes kann die Primärintensität mit dem Einsatz von einem flüssigkristallinen optischen Abschwächer (*attenuator*) reduziert und den Streueigenschaften der Probe angepasst werden. Strahlposition und variable Strahlintensität werden mittels einer mit Strahlteiler (*beam splitter plate*) gekoppelten Reflektions-Quadrantphotodiode (RefDio) analysiert. Die Probenzelle wird mit Toluol ausgefüllt, um die Spiegelungen an Grenzflächen möglichst zu verringern. Die Probenzelle ist in einem mit Motorantrieb ausgerüsteten Präzisionsgoniometer ( $\pm 0,01^\circ$ ) ALV/SP-86 eingebaut, der es ermöglicht, den Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) in Streuwinkeln zwischen  $20^\circ$  und  $150^\circ$  einzustellen, und wird mit zirkuliertem Wasser des Thermostats Laudatype® RC6 temperiert. Die Intensitätsautokorrelationsfunktion  $g_2(\tau)$  wurde mit Hilfe eines „ALV-5000/E multiple tau digital correlator“ der (Fast) Option und einer minimalen Samplingzeit von 12,5 ns aufgenommen. Für die Messung dienten die zylindrischen Quarzglas-Küvetten Suprasil® (HELLMA GmbH & Co. KG, Müllheim) mit 10 mm Durchmesser. Die Messungen wurden bei  $25^\circ\text{C}$  mit festem Streuwinkel von  $90^\circ$  durchgeführt. Erst wurde die ganze optische Vorrichtung unter Einbeziehung der Küvettenposition justiert, durch Kalibriermessungen kontrolliert und der Faktor C (Gl. II.9-5) ermittelt. Die Güte der durchgeführten Kontrolle wurde mit reinem Toluol als Streumedium überprüft. Die Brechzahl des Mediums wurde bei  $\lambda = 589,3\text{ nm}$  und  $298,15 \pm 0,1\text{ K}$  mit einem Abbé Refraktometer ABBEMAT der Firma *Dr. Kernchen GmbH, Seelze, Deutschland* ermittelt.

### III.7 Untersuchungen mittels MAKE

Für die Messungen wurden ein <sup>3D</sup>CE-System der Firma Hewlett-Packard (Waldbronn, Deutschland) mit integriertem Autosampler und DAD (190-600 nm) sowie einer unbeschichteten Quarzkapillare ( $\varnothing$  50  $\mu$ m) eingesetzt und die Einstellungen +15 kV, 25 °C und 10 mbar.s Druck der hydrodynamischen Injektion gewählt. Die Gesamtlänge der Kapillare ( $L_G$ ) betrug 48,5 cm; die effektive Länge der Kapillare bis zum Detektorfenster ( $L_D$ ) war 40 cm. Die Kapillare wurde vor dem ersten Lauf 12 min und vor jedem weiteren Lauf 3 min mit einer 0,1 M NaOH-Lösung gespült. Bei den Untersuchungen mit HTAB wurde Salzsäure 0,1 M zum Spülen statt NaOH eingesetzt. Die Detektion erfolgte kathodenseitig (NaGDC- und Br35-Systeme) bei 220 und 243 nm. Beim Einsatz von kationischen Tensiden als Mizellbildner mussten die Polaritäten der Elektroden bzw. die Detektionsseite auf Grund der Richtungsumkehr des EOF im Vergleich zu Messungen mit anionischen Mizellbildnern auch ausgetauscht werden. Die Probenaufgabe der HTAB-Systeme erfolgte daher am kathodischen Ende der Kapillare und die Detektion am anodischen Ende.

Sudan III (SIII) lässt sich ausschließlich in den Mizellen lösen und wurde deshalb als Mizellmarker verwendet. Als spezifischer Marker für die wässrige Phase kam DMSO zum Einsatz. Es wurde dabei versucht, sowohl die Konzentrationen der Marker als auch des T so gering wie möglich zu halten, um störende Effekte wie Veränderungen in mizellarer Struktur und Größe möglichst auszuschließen [232].

Die Berechnung des Kapazitätsfaktors  $k'$  und der effektiven Mobilität  $\mu_{\text{eff}}$  erfolgte über die folgenden Gleichungen:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0 \left(1 - \frac{t_R}{t_{mc}}\right)} \quad \text{Gl. III.7-1}$$

Dabei ist  $t_0$  die Migrationszeit des DMSO-Peaks,  $t_R$  des Wirkstoffs und  $t_{mc}$  der mizellaren Phase (Sudan III) in Minuten.

$\mu_{\text{eff}}$  lässt sich durch die Gleichungen Gl. II.9-13 und Gl. II.9-17 direkt aus den Elektropherogrammen ermitteln (Gl. III.7-2).

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{L_G \cdot L_D}{U} \left( \frac{1}{t_R} - \frac{1}{t_0} \right) \quad \text{Gl. III.7-2}$$

wobei  $\mu_{\text{eff}}$  in [ $\text{cm}^2 \cdot \text{S}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ ],  $U$  in Volt [V] und  $L_G$  sowie  $L_D$  in [cm] sind.

### III.8 Permeationsmodell nach Fürst-Neubert zur Untersuchung der passiven Diffusion

Für die Transportuntersuchungen durch künstliche Membranen kam das Permeationsmodell von Fürst und Neubert [233] zur Anwendung (Abb. 14). Das Modell besteht aus zu einem Block nebeneinander angeordneter Polyacrylpermeationszellen, die mit einer Halterung an einer Vibrationseinrichtung befestigt sind und sich in einem auf 37 °C temperierten Wasserbad befinden. Eine Rüttelapparatur sorgt für eine waagerechte Bewegung mit einer einstellbaren Frequenz und dient zur reproduzierbaren Bildung der Diffusionsschichten durch ständiges Durchmischen der Flüssigkeit in den Kompartimenten und der unbewegten an der Membran haftenden Nernst'schen wässrigen Grenzschichten [234]. Die künstliche Membran kommt zwischen die beiden Zellhälften

und wird dort dicht befestigt. So entstehen zwei Kompartimente (Donatorkompartiment DK und Akzeptorkompartiment AK) mit aktiver Permeationsfläche von 5 cm<sup>2</sup> bei einem Lösungsvolumen von jeweils 5 ml (institutseigene Herstellung).

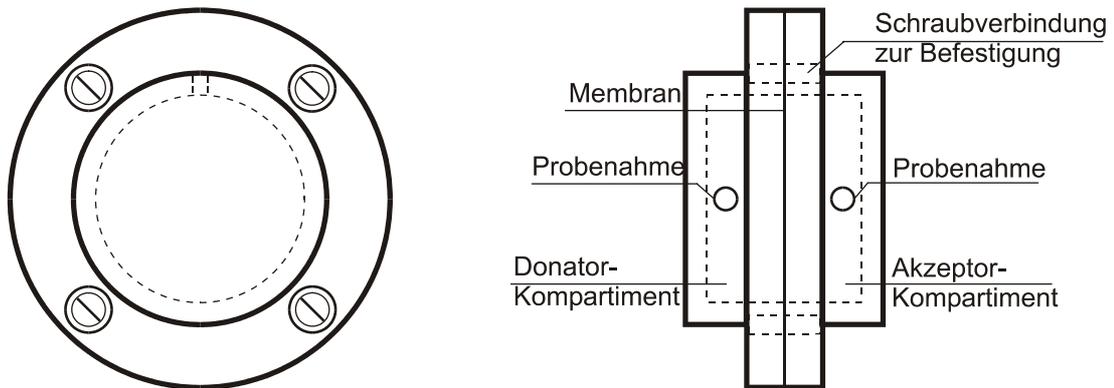


Abb. 14 Aufbau einer Permeationszelle des Modells nach Fürst und Neubert

Die treibende Kraft für den Wirkstofftransport bei diesem Modell ist das Konzentrationsgefälle zwischen den verschiedenen Phasen (Donator, Lipidmembran und Akzeptor). Für die Beschreibung des Permeationsprozesses wird Gl. II.8-1 in der Regel eingesetzt.

Die Herstellung der Dodecanol-Collodium-Membranen erfolgte wie im folgenden beschrieben: 4 g Dodecanol-Octanol-Gemisch (10% W/W Octanol) wurde auf 100 g durch einem Ether-EtOH-Gemisch (8,5 VT+1,5 VT) ergänzt und schließlich mit 100 g 4%-iger Collodiumlösung (DAC 1986, Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland) vermischt. Davon wurden anschließend 110 ml auf die plangeschliffene Glasplatte eines Filmziehgerätes (institutseigene Herstellung) gegeben und weiter wie bei *Fritsch* beschrieben [235] vorbereitet und aufbewahrt.

Nach Temperierung der Vorrichtung und der Lösungen auf 37 °C wurde das untersuchte wirkstoffhaltige Mizellare System in das DK und eine gleiche aber wirkstofffreie Lösung in das AK eingefüllt. Danach erfolgten die 200- $\mu$ l-Probenahmen in Probezeiten von 0, 20, 40, 60, 90, 120 und 180 min. Das entnommene Volumen wurde sofort entsprechend durch wirkstofffreie Lösung auf beiden Seiten ersetzt. Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten nach der Methode HPLC-1 (III.5.1). Durch Probenahmen auf den beiden Membranseiten kam es zu einer Verringerung der vorliegenden Wirkstoffkonzentrationen. Dies wurde durch eine Korrektur um die entsprechenden Mengen gemäß Gl. III.8-1 ausgeglichen.

$$C_{t(n)}^{(\text{korr})} = C_{t(n)} + \frac{C_{t(n-1)}^{(\text{korr})} \cdot V_{\text{Probe}}}{V_{\text{Akzeptor}}} \quad \text{Gl. III.8-1}$$

$C_{t(n)}^{(\text{korr})}$  ist die korrigierte Konzentration zum Zeitpunkt  $t(n)$ ,  $C_{t(n)}$  die zu korrigierende Konzentration,  $C_{t(n-1)}^{(\text{korr})}$  die korrigierte Konzentration zum Zeitpunkt  $t(n-1)$ ,  $V_{\text{Probe}}$  Probevolumen und  $V_{\text{Akzeptor}}$  Akzeptorvolumen.

Jeder Versuch wurde mittels drei parallelen Wiederholungen in drei Zellen und der Ermittlung der Mittelwerte durchgeführt.

Die Membranen wurden nach Ablauf des Versuches vorsichtig aus den Zellen entfernt und je drei mal mit 5 ml bidestilliertem Wasser ausgeschüttelt, dann zwischen Filterpapier getrocknet und schließlich in mit Schliffhals versehene Reagenzgläser überführt. Nach Zugabe von je 2 ml EtOH wurden die Reagenzgläser mit einem Glasstopfen dicht verschlossen und 3 h bei 30 °C im Ultraschallbad extrahiert. Von den ethanolschen

Lösungen wurden dann jeweils 100- $\mu$ l-Proben entnommen und durch MeOH auf 1 ml ergänzt. Die Aufarbeitung der Blindprobe erfolgte auf gleiche Weise mit einer nicht benutzten Membran von gleicher Größe. Für die Gehaltbestimmung kam anschließend die Methode HPLC-2 (III.5) zum Einsatz.

Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate bei der zuletzt beschriebenen Extraktionsmethode wurde ein kleines Volumen hoch konzentrierter ethanolischer Wirkstofflösung mit vorbestimmtem Wirkstoffinhalt auf drei nicht benutzte Membranen gegeben und 1 h unter Abzug zur Verdunstung gebracht. Danach schlossen sich die zuvor genannten Extraktionsschritte und die Analytik mit drei Parallelbestimmungen je Probe an.

### **III.9 Transportuntersuchungen mit Hilfe der Ussing-Kammer mit isolierten Abschnitten aus Mäuse-Dünndärmen**

Die von *Ussing* und *Zerhan* entwickelte Methode [236] wurde erst 1950 zur Untersuchung des transepithelialen Natriumtransportes an Froschhaut eingeführt. Mit Hilfe dieser Technik werden heute elektrophysiologische Experimente und Untersuchungen zu unterschiedlichen Transportprozessen und Wirkstoffmetabolismen an isolierten Epithelen (*ex-vivo*) durchgeführt.

Die Methode hat zahlreiche Vorteile und ist mittlerweile zu einer der Standardmethoden bei den o.g. Untersuchungen geworden. Beispielsweise bei passiv transportierten Substanzen mit sowohl hoher als auch niedriger Permeabilität wurde eine gute Korrelation [41] zwischen den über diese Technik ermittelten Permeabilitätskoeffizienten und denen *in-vivo* für Humanjejunum festgestellt. Damit ist es auch möglich, zuverlässige Vorhersagen über den Wirkstofftransport durch andere Epithelen (bukale, nasale, esophageale, gastrische, rektale und dermale) zu machen. Die Methode ist ebenso auf humane Gewebeselemente aus Biopsien u.ä. als auch auf Monoschichten aus Zellkulturen wie Caco-2-Zelllinie anwendbar. Neben der klassischen Verwendung chemischer Integritätsmarker wie Mannitol, Inulin oder Luzifergelb gestattet diese Technik auch, über die Ermittlung des transepithelialen elektrischen Widerstands die Membranintegrität bzw. Vitalität während der Messungen zu kontrollieren. Darüber hinaus kann man mit dieser Technik die transepitheliale Potentialdifferenz mit einer Spannungsklemme (*voltage clamp*) kompensieren, d.h. das Epithel elektrisch kurzzuschließen und somit alle äußeren Kräfte bzw. die Wirkung elektrochemischer Gradienten auszuschalten, die einen zusätzlichen passiven Transport durch das Epithel initiieren könnten. Dadurch wird es möglich, ausschließlich die nativen Transportprozesse durch das Epithel zu messen. Die Kammern können auf 37 °C temperiert werden und sind mit einem Einlass für Carbogen (95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>) versehen. Dies dient einerseits zur angenehmen Umwälzung der Badlösung (*bubble lift*) und Durchmischung der ungerührten Grenzschichten auf den jeweiligen Membranseiten, die apikale (mukosale) und die basolaterale (serosale); andererseits zur längst möglichen Aufrechterhaltung der Gewebe durch Begasung mit dem lebenswichtigen Sauerstoff und die damit verbundene Gewährleistung vom konstanten pH-Wert der Pufferlösung.

Der größte Nachteil dieser Methode [45] besteht darin, dass die Diffusion der Moleküle über unphysiologische Wege erfolgen kann, d.h. der Mangel an gewöhnlicher Blutversorgung durch Blutgefäße zwingt die Moleküle, durch das subepitheliale Bindegewebe der Schleimhaut (*Lamina Propria Mucosae*) und andere Schichten wie z.B. die Basalmembran, die Submukosa, und die verschiedenen Muskelschichten zu diffundieren (siehe Abb. 16). Allerdings weisen diese Gewebeteile diesbezüglich unterschiedliche Eigenschaften in Abhängigkeit von verwendeten Tierarten, Organen und Segmentort im

Organ auf. Des Weiteren zeigen die verwendeten Tiergewebe manchmal andere metabolische Eigenschaften als beim Menschen, was v.a. beim erleichterten trägervermittelten und metabolisch vermittelten Transport eine entscheidende Rolle spielen kann. Deshalb ist ihre Anwendung als Modell in bestimmten Fällen auf die Gültigkeit für Menschen zu prüfen.

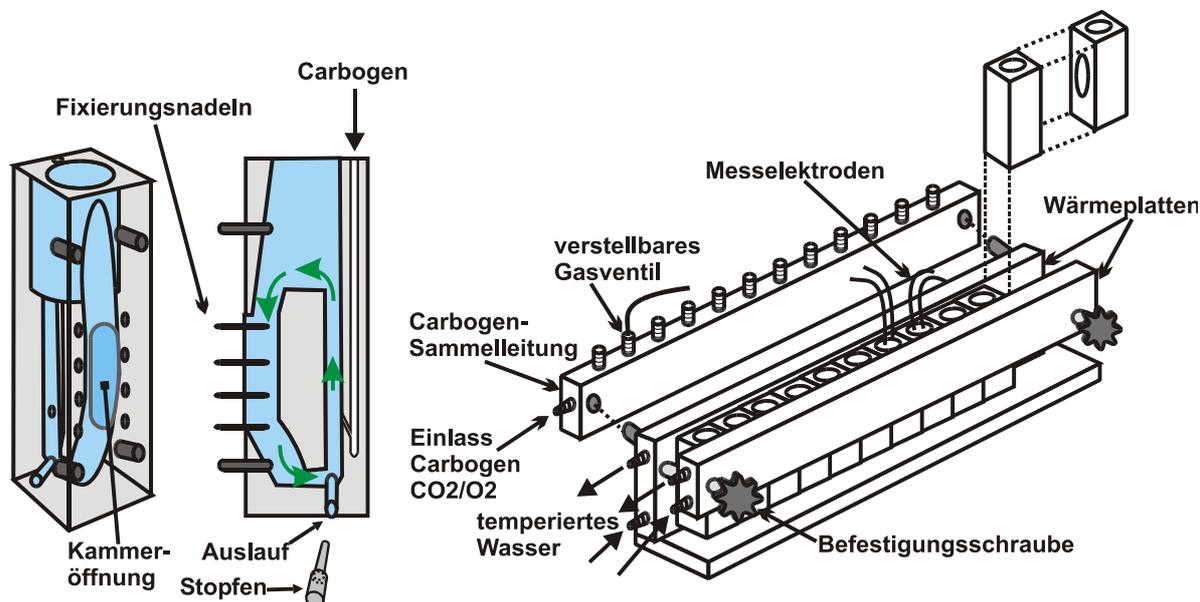


Abb. 15 Schematische Darstellung der *Ussing*-Kammer-Vorrichtung

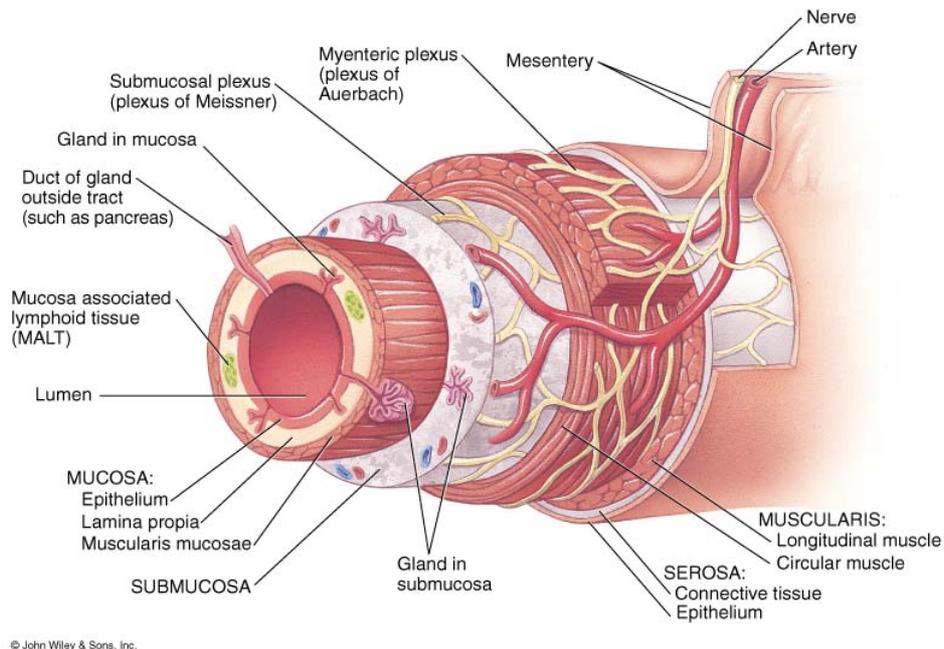
Da es sich bei der vorliegenden Arbeit um den Transport stark lipophiler Wirkstoffe handelt, war eine Modifizierung der Methode erforderlich, so dass die verwendeten Steroide in der Lösung der AK aufgenommen werden können. Für diesen Zweck wurde die KRBP Lösung für die AK mit Zugabe von 4% BSA hergestellt. BSA ist zum einen bekannt in zahlreichen Arbeiten für seine steroidbindende Eigenschaften [237-247]. Zum anderen schafft seine Zugabe im Akzeptor benötigte *in-vivo*-ähnliche Sinkbedingungen und verbessert somit die Aussagekraft der Permeabilitätsmessungen bei dieser Methode [230,248,249].

Ein Teil der Experimente erfolgte durch Verwendung radioaktivmarkierten Testosterons [ $^3\text{H}$ ]T, das zum Testosteron in der Probe gegeben und anschließend mittels Flüssigszintillationsmessungen bestimmt wurde (III.10). Für die anderen Untersuchungen standen im Handel keine radioaktivmarkierten Testosteronester zur Verfügung und die Synthese war zu kostenintensiv. Es war somit erforderlich, die Analytik für die Testosteronester im BSA/KRBP Medium zu entwickeln und damit die Löslichkeit sowie die Wiederfindungsrate der analytischen Methode zu bestimmen (III.5.2).

Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden mit einer nach *Grass* und *Sweetana* [250] modifizierten Technik (Dipl.-Ing. *K. Mussler Scientific Instruments*, Aachen) durchgeführt (Abb. 15). Die Versuchsapparatur ist mit sechs Plexiglaszellen versehen, die sechs parallele Untersuchungen erlauben, wenn die Membranintegrität erhalten bleibt. Eine der Zellhälften besitzt auf der Innenseite sechs Nadelspitzen. Die Kammeröffnung hat eine Fläche von  $0,7\text{ cm}^2$ . Ein an ein Wasserbad angeschlossenes Durchflusssystem mit Wärmeplatten sorgt für die notwendige Temperierung der Zellen. In einer Vorlaufphase vor dem Einspannen der Gewebe wurde die Eigenpotenzialdifferenz (dPe) bzw. der Eigenwiderstand ( $R_f$ ) der spannungsmessenden Elektroden und der sich in der Kammer befindlichen Flüssigkeit bestimmt. Die im Versuch ermittelten Daten wurden dann

jeweils durch den Computer um diese Werte korrigiert. Als elektrische Kenngrößen der Membran wurden der Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) und der Gewebewiderstand ( $R_t$ ) bzw. die Gewebeleitfähigkeit ( $G_t$ ) erfasst.

In den Versuchen wurden männliche und weibliche Mäuse mit einer Körpermasse zwischen 150 – 300 g aus der Versuchstierhaltungsanlage des Biozentrums der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg eingesetzt. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Futter und Wasser (*ad libitum*) und wurden unter einem 12 Stunden-hell-12 Stunden-dunkel-Rhythmus gehalten. Nach der Vorbereitung der Kammern, der Anlage und der vorgenannten Messungen wurden die Mäuse mit der Überstreckungsmethode getötet. Die Bauchhöhle wurde dann entlang der *Linea Alba* eröffnet. Das Darmnetz (*Omentum Majus*) wurde vorsichtig durchgeschnitten, dann wurden die Duodenum und Jejunum von den serösen Häuten des Peritoniums (*Omentum minus* und andere viszerale Mesenteriale) möglichst befreit, schließlich abgesetzt und sofort in eisgekühlter (4 °C) KRBP Lösung ins Versuchslabor transportiert, wo zunächst der Inhalt des Dünndarmes mit dem eiskalten KRBP ausgespült wurde. Bis zum Einspannen in die Versuchskammern, also während der Vorbereitungen, wurden die Darmstücke bei ca. 4 °C in der mit Carbogen ständig begasten KRBP Lösung aufbewahrt. Die weitere Verarbeitung der Darmsegmente erfolgte bei ca. 4 °C unter ständiger Befeuchtung mit KRBP auf flachen Plastikeisflaschen. Aufgrund der Klein- und Feinheit der inneren Mausorgane lässt sich die Darmschleimhaut von den darunter liegenden Bindegewebsschichten wie *Tunica Serosa* und *Muscularis* (Abb. 16) meistens nicht ohne weiteres abstreifen und die Membranintegrität wird dadurch stark beeinflusst.



**Abb. 16 Schematischer Querschnitt des Dünndarmaufbaus**

Bei Vorversuchen mit Schweinedarm wurde anhand der Konzentration/Zeit-Diagramme in den Kammern kein deutlicher Unterschied zwischen gestrippten und ungestrippten Segmenten festgestellt. Hingegen wiesen dabei die Messungen des elektrischen Widerstands der gestrippten Dünndarmsegmente auf stark reduzierte Vitalitätsdauer im Vergleich zu den ungestrippten hin. Es wurde deshalb bei den weiteren Untersuchungen auf das Strippen verzichtet. Dünndarmsegmente wurden am Mesenterialansatz aufgeschnitten und mit der mukosalen Seite nach unten, d.h. nicht zu den Kammernadeln

weisend, mit schrägen Nadeln auf einem Parafilmstück in einer Agarplatte eingespannt. Die mit Nadeln bestückte Kammerseite wurde dann auf das Darmstück gedrückt, so dass es anschließend nach Zusammensetzung der Kammerhälfte zwischen den beiden Hälften eingespannt blieb und eine Barriere dazwischen bildete. Auf diese Weise entstand eine serosale und eine mukosale Hälfte. Die Folie diente zur Gewährleistung gleichmäßiger Spannung der Membran und wurde vor der Zusammensetzung der Kammerhälfte entfernt. Nach dem Einspannen des Epithels wurde die Zelle unverzüglich in die Versuchsapparatur eingesetzt und an eine Carbogenflasche angeschlossen. 5 ml tensidfreie KRBP Lösung kam in die mukosale Seite und 5 ml BSA/KRBP in die Serosale. Danach schloss sich eine 15-minütige Equilibrierungsphase an. Die mizellaren Systeme für diese Untersuchungen wurden 24 h vor dem Versuch in KRBP Lösung hergestellt. Die Lösung auf der mukosalen Seite wurde durch das zu untersuchende, auf 37 °C temperierte mizellare System ersetzt. Gerade vor und nach Zugabe des Systems in die DK erfolgte mit einer *Eppendorf*-Pipette eine 200- $\mu$ l-Probenentnahme von der Donator- und der Akzeptorlösung und dann nach jeweils 20, 40, 60, 90, 120, 180 min ab Systemzugabe bzw. Versuchsbeginn ( $t=0$  min). Die entnommenen Lösungen aus den Kammern wurden dann sofort durch 200  $\mu$ l KRBP bzw. BSA/KRBP ersetzt. Die gerade vor Versuchsbeginn entnommene KRBP-Probe aus der DK und die ebenso BSA/KRBP-Probe aus der AK galten als Blindwerte der entsprechenden Proben.

Anhand der Leitfähigkeitsmessungen während der Vorversuche wurde festgestellt, dass die Spannungsklemme „*voltage clamp*“ einen negativen Einfluss auf die Vitalitätsdauer der Membranen hat. Davon ausgehend und da es sich in dieser Arbeit um die Resorption von nichtionischen Wirkstoffen handelte, bei denen normalerweise die passiven Transportprozesse die Hauptrolle spielen und hier deshalb zu untersuchen waren, wurden die Epithelzellen im Verlauf der Untersuchungen nicht kurzgeschlossen.

Durch Probenahmen auf beiden Membranseiten kam es zu einer Verringerung der vorliegenden Wirkstoffkonzentrationen. Dies wurde durch Korrektur um die entsprechenden Mengen gemäß Gl. III.8-1 ausgeglichen. Jeder Versuch wurde mit drei parallelen Wiederholungen in drei Zellen durchgeführt. Für die Bestimmung des aufgenommenen Testosteronesters in den Membranen wurden die Dünndarmabschnitte möglichst schnell nach Versuchsende vorsichtig aus den ausgebauten Zellen entnommen, mit eiskaltem KRBP gespült und in mit Schliffhals versehene Reagenzgläser überführt, die nach Zugabe von Reagenzien mit Glasstopfen dicht verschlossen wurden. Die Dünndarmstücke wurden 30 min bei 60 °C jeweils mit 1 ml harnstoffhaltigem (100 mg/ml) ILP in einem Ultraschallwasserbad inkubiert. Danach wurde die Mischung mit 3 ml *n*-Hexan (HPLC-Grad) versetzt und 60 min in einer Rüttelapparatur geschüttelt. Nach Abkühlung im Kühlschrank wurden die Reagenzgläser 40 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde durch Spritzenmembranfilter (PTFE, 0,45  $\mu$ m) filtriert. Dabei wurde angenommen, dass sich die untersuchten Steroide vollständig in der organischen Phase befanden. Davon wurde eine 1,5-ml-Probe in HPLC-Fläschchen eingefüllt und in einem Exikkator unter Vakuum zum Verdunsten belassen. Anschließend wurde der Rückstand in MeOH aufgelöst und mit Hilfe der Methode HPLC-2 (III.5) analysiert.

### III.10 Gehaltbestimmung mittels Flüssigszintillationsmessung

Transportuntersuchungen mit Hilfe der *Ussing*-Kammer-Methode wurden teilweise mit tritiummarkiertem Testosteron [ $^3\text{H}$ ]T der spezifischen Radioaktivität 3515 GBq/mM von <sup>TM</sup>*Life Science Products, Inc. (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA)* durchgeführt. Die frisch hergestellte radioaktive Verbindung wurde in ethanolischer Lösung der durchschnittlichen Radioaktivität 37 MBq/ml (1 mCi/ml) geliefert und bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Etwa 24 h vor dem Versuch wurden  $2\ \mu\text{l}$  der ethanolischen radioaktiven Lösung mit Hilfe einer Mikropipette entnommen, die dann mit 16 ml Probelösung versetzt und durchmischt (Vortex®-Gerät) wurden. Die Mischung wurde daraufhin bis zum nächsten Tag zur Equilibrierung im Kühlschrank gelagert.

Direkt vor Zugabe des Systems in das Donatorkompartiment ( $t = 0\ \text{min}$ ) wurden 200- $\mu\text{l}$ -Proben aus ihm entnommen und für die Radioaktivitätsmessungen wie die restlichen Proben vorbereitet. Während des Versuchsverlaufes wurden in den vorgesehenen Zeiten mithilfe einer *Eppendorf*-Pipette aus Donator- und Akzeptorkompartimenten jeweils 200  $\mu\text{l}$  entnommen und durch gleiches Volumen vom wirkstofffreien Lösungsmittel ersetzt. Die Proben wurden direkt in 5 ml Szintillationsgefäße (Packard, USA) gefüllt, mit 3 ml Szintillationscocktail Rotiszint® eco plus (*Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe*) versetzt, durchmischt (Vortex®) und vermessen. Für die Bestimmung des Gehalts an aufgenommenem [ $^3\text{H}$ ]T in den Membranen wurden die Dünndarmabschnitte möglichst schnell nach Versuchsende vorsichtig aus den ausgebauten Zellen entnommen, mit eiskaltem KRPB gut gespült und in die Szintillationsgefäße überführt. Die Dünndarmstücke wurden mit je 1 ml ILP lysiert, mit 3 ml Flüssigszintillator versetzt, durchmischt und vermessen.

Die Radioaktivitätsmessungen erfolgten mit Flüssigszintillationszähler TRI-CARB 2100 TR *Liquid Scintillation Analyzer* von Packard (USA).

Beim Zerfall eines  $\beta$ -Strahlers wie des Isotops Tritium entstehen Elektronen, deren Energien im Flüssigszintillatoren Lichtblitze (Lumineszenzen) erzeugen. Das Lumineszenzlicht trifft auf die Photokathode des Photovervielfachers und erzeugt dort Photoelektronen, die in Spannungsimpulse umgewandelt werden. Das Signal wird als CPM (*Counts Per Minute*) oder nach Quench-Korrektur als DPM (*Decays Per Minute*) registriert, von dem schließlich die Hintergrundaktivität (Leerwert) subtrahiert wird.

Das Gehalt an T in der Probe ist proportional zu ihrer gemessenen Radioaktivität und kann deshalb direkt daraus errechnet werden, ohne das vorhergehende Aufnehmen von Verdünnungsreihen. Dafür werden jedoch die Radioaktivität im untersuchten System vor dem Versuchsbeginn und die Vorkenntnis seiner ursprünglichen Konzentration von T benötigt.

### III.11 Statistische Auswertungsmethoden

Bei allen Versuchen betrug die Anzahl der Messwerte mindestens drei ( $n=3$ ). Bei den aufgeführten Mittelwerten handelt es sich, falls nicht anders angegeben, um arithmetische Mittelwerte mit ihrem Vertrauensbereich ( $\bar{Y} \pm VB_{\bar{Y}}$ ).

Nach einem F-Test auf Varianzhomogenität wurde zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen verschiedenen Mittelwerten ein *Student* t-Test für ungepaarte Stichproben durchgeführt. Wenn ein zuvor durchgeführter F-Test signifikante Abweichungen zwischen den Varianzen der zu vergleichenden Mittelwerte ergab oder die zu erhaltenden Werte nicht normalverteilt waren (Wahrscheinlichkeitsnetz oder *Kolmogorov-Smirnov*-Test), kam stattdessen ein nichtparametrischer zweiseitiger *Mann-Whitney* -U-Test zum Einsatz, wobei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  zugrunde gelegt wurde.

Die Regressionsanalyse, die statistische Auswertung der erhaltenen Daten, die Standardisierung der Messmethoden und die Ermittlung der Verfahrenskenndaten erfolgten nach den in [251] beschriebenen Vorgehensweisen.

Prüfung der Messdaten auf Ausreißer erfolgte falls  $n \in ]2-30[$  nach *Nalimov* sonst nach *Grubb* ( $n \geq 30$ ).

Bestimmung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen erfolgte nach DIN 32 645.

Die Prüfung verschiedener Gruppen bzw. ihrer Mittelwerte auf Gleichheit wurde mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse ANOVA durchgeführt. Bei Zweifel an der Homogenität der Varianzen infolge eines *Bartlett*-Tests und somit an der Aussagekraft der sich anschließenden Varianzanalyse kam ein parameterfreien H-Test nach *Kruskal-Wallis* zum Einsatz.

Die statistische Bearbeitung und Auswertung der Messdaten sowie die graphische Darstellungen der erhaltenen Ergebnisse erfolgten mit Hilfe folgender Programme:

- Microsoft® Excel 2000 (USA)
- Microcal™ Origin® Version 6.0 (Microcal Software, Inc., USA)
- STATISTICA® Version 6 (StatSoft Inc, Tulsa, USA)

*„Es ist nicht richtig , dass es in der Wissenschaft nur auf das logische Denken ankommt. In Wirklichkeit spielt die Phantasie im Reich der Wissenschaft und gerade auch der Naturwissenschaft eine entscheidende Rolle. Denn selbst wenn viel nüchterne, sorgfältige, experimentelle Arbeit nötig ist, so gelingt das Zusammenordnen der Tatsachen doch nur, wenn man sich in die Phänomene eher hinein fühlen als hineindenken kann.“*

*Werner Heisenberg „Der Teil und das Ganze“*

*„Jede Wissenschaft ist, unter anderem, ein Ordnen, ein Vereinfachen, ein Verdaulichmachen des Unverdaulichen für den Geist.“*

*Hermann Hesse (1877-1962)*

## KAPITEL IV

### Untersuchungen zur Solubilisation und Mizellbildung

#### IV.1 Solubilisationsuntersuchungen zur Optimierung der mischmizellaren Systeme

In diesem Teil der Arbeit werden die Versuche beschrieben, über die die Auswahl bzw. die Optimierung einfacher, binärer und ternärer mizellarer Systeme erfolgte, deren Einfluss auf die Resorption des T bzw. seiner Ester später untersucht wurde.

##### IV.1.1 Ergebnisse

##### IV.1.1.1 Solubilisation des Testosterons und verschiedener Testosteronester in unterschiedlichen Tensidlösungen

Die bei diesen Untersuchungen verwendeten Tenside gehören zu den pharmazeutisch relevantesten Tensiden und lassen sich je nach Ladung der hydrophilen Kopfgruppe in drei Gruppen unterteilen: Kationische, anionische und neutrale Tenside. Für die Auswahl des am besten geeigneten Tensids in jeder Gruppe hinsichtlich der Solubilisationskapazität für das T und seine Ester wurden die gesättigten Tensidlösungen in SPB vorbereitet (III.2) und die Sättigungskonzentrationen mit der Methode HPLC-1 (III.5) ermittelt. Die Solubilisationsergebnisse sind in Abb. 17 graphisch dargestellt.

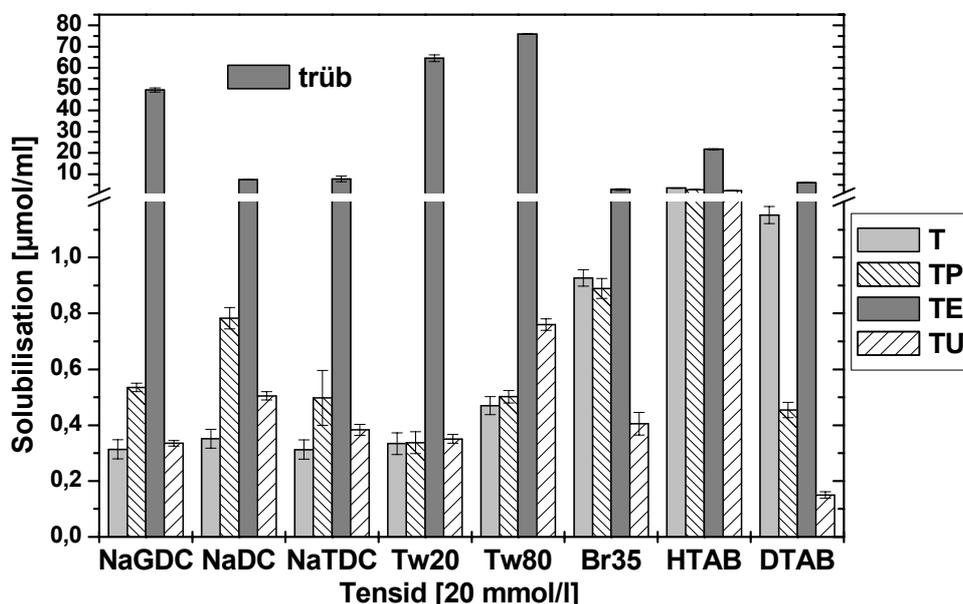


Abb. 17 Solubilisation des Testosterons und verschiedener Testosteronester in verschiedenen mizellaren Tensidlösungen (20 mmol/l) in Sørensen-Phosphatpuffer (SPB) bei 25 °C, ermittelt mit HPLC/UV

Die Löslichkeit des T bzw. seiner Ester in SPB wurde bereits vorher wie bei den mizellaren Lösungen ermittelt. Die Solubilisationswerte in den mizellaren Lösungen wurden dann um diese Werte korrigiert. Bei T betrug die Sättigungskonzentration in SPB 20,1 µg/ml und bei TP 1,5 µg/ml. Die ermittelten Sättigungskonzentrationen für TE und

TU in SPB waren sehr gering (unterhalb der BG) und wurden deshalb bei der o.g. Korrektur vernachlässigt.

TE ließ sich in den hier untersuchten Tensidlösungen in großen Konzentrationen solubilisieren. Allerdings waren die mit TE gesättigten Tensidlösungen auch nach der Filtration trüb, so dass man hier von keinem rein mizellaren System ausgehen konnte. Während die anderen verwendeten Steroide unterschiedlich hohe Solubilisationen in den verschiedenen Systemen zeigten, wies TP eine gute Solubilisation in allen Systemen auf und wurde deshalb als Modellstoff in IV.1.1.5 verwendet.

#### IV.1.1.2 Entwicklung binärer Systeme aus Tensiden und Fettsäuren

Die Herstellung der binären Systeme erfolgte nach den in III.2 beschriebenen Methoden. Für die Herstellung binärer MMS mit einer unverzweigten Fettsäure als zweite Komponente kamen die ungesättigte Ölsäure C18:1 (OS) und ihr gesättigtes Analogon, die Stearinsäure C18 (SS), zum Einsatz. OS ist ein sehr wichtiger Bestandteil der Lipidverdauung im GIT. Darüber hinaus ermöglichte ihre Kettenlänge den Vergleich mit den ähnlichen Fettsäurereste der verwendeten SL bei der Herstellung der MMS. Durch die Verwendung von SS wurde auch der Einfluss der Sättigung der Fettsäuren (bei gleicher Kettenlänge) auf die Solubilisation geprüft. Für diesen Zweck wurden die Transmissionseigenschaften verschiedener Tensidlösungen in SPB mit zunehmendem Fettsäuregehalt (Molenbrüche) verglichen. Die dafür verwendete Untersuchungsmethode wurde in III.4.1 beschrieben. Abb. 18 und Abb. 19 zeigen die Ergebnisse. Die Berechnung des Molenbruches erfolgte nach Gl. IV.1-1

$$\mu_L = \frac{C_L}{C_{\text{Tensid}} + C_L}$$

Gl. IV.1-1

Darin ist  $\mu_L$  der Molenbruch des zugegebenen Lipids,  $C_L$  die molare Lipidkonzentration und  $C_{\text{Tensid}}$  die molare Tensidkonzentration (=0,02 mol).

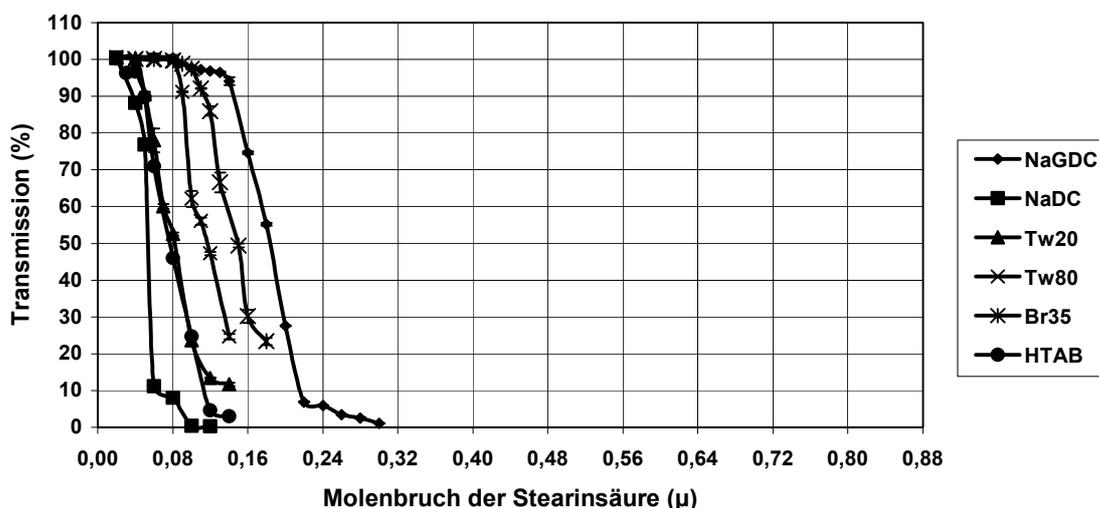


Abb. 18 Transmissionseigenschaften ( $n=3$ ,  $\bar{Y} \pm SA$ ) verschiedener Tensidlösungen (20 mmol/l) in Sørensen-Phosphatpuffer (SPB) bei 25 °C und  $\lambda=660$  nm mit zunehmenden Molenbrüchen der Stearinsäure (SS)

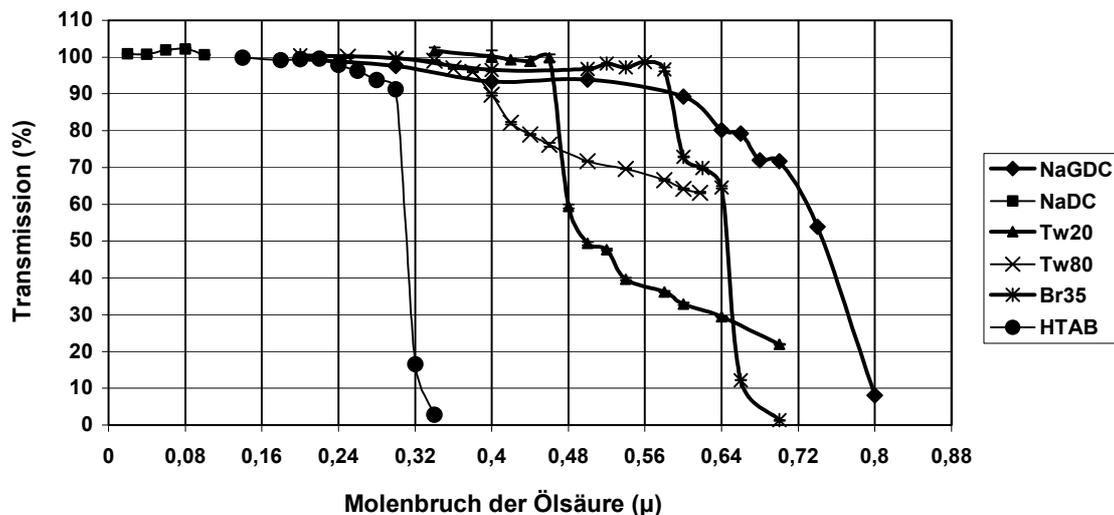


Abb. 19 Transmissionseigenschaften ( $n=3$ ,  $\bar{Y} \pm SA$ ) verschiedener Tensidlösungen (20 mmol/l) in Sörensen-Phosphatpuffer (SPB) bei 25 °C und  $\lambda=660$  nm mit zunehmenden Molenbrüchen der Ölsäure (OS)

#### IV.1.1.3 Entwicklung binärer Systeme aus Tensiden und Lecithinen

Die Herstellung dieser Systeme erfolgte nach den in III.2 beschriebenen Methoden. Als Lecithine kamen hier das ungesättigte SL Phospholipon® 90 G (P90G) und das gesättigte Analogon Phospholipon® 90 H (P90H) zum Einsatz. Die Solubilisation dieser SL in den hier verwendeten Tensidsystemen wurde anhand der Transmissionseigenschaften ihrer Lösungen mit zunehmenden Lecithin-Molenbrüchen bei 25 °C und  $\lambda=660$  nm nach der in III.4.1 beschriebenen spektroskopischen Methode untersucht. Hierbei konnte auch der Einfluss der Sättigung auf die Solubilisation geprüft werden. Die Berechnung der Molenbrüche erfolgte nach Gl. IV.1-1. Abb. 20 und Abb. 21 zeigen die Ergebnisse.

P90H ergab ein instabiles System in NaDC-Lösungen und fiel während des Abkühlens des Systems sogar bei der kleinsten Zugabe von ihm aus, weshalb es in Abb. 20 nicht dargestellt wurde.

#### IV.1.1.4 Ternäre Systeme: Tensid- Lecithin- Fettsäure

Basierend auf den o.g. Untersuchungen (siehe Diskussion IV.1.2) wurden die Tenside NaGDC, Br35 und HTAB sowie das ungesättigte Lecithin P90G in den den optimalen Molenbrüchen  $\mu_{\max}$  entsprechenden Konzentrationen (Abb. 21) für die Herstellung ternärer MMS ausgewählt. Diese wurden dann mit zunehmender Konzentration der OS nach einer geeigneten Herstellungsmethode (III.2) angesetzt. Die optimale Konzentration der OS wurde in jedem System anhand der Transmissionsmessungen bei 25 °C und  $\lambda=660$  nm (siehe III.4.1) ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 22 aufgeführt. Eine schlagartige Phasentrennung in Form von Ausflockungen war in den Systemen (NaGDC+P90G) bei OS-Konzentrationen oberhalb 1  $\mu\text{l/ml}$  zu beobachten. Die Zugabe der OS endete deshalb an diesem Punkt.

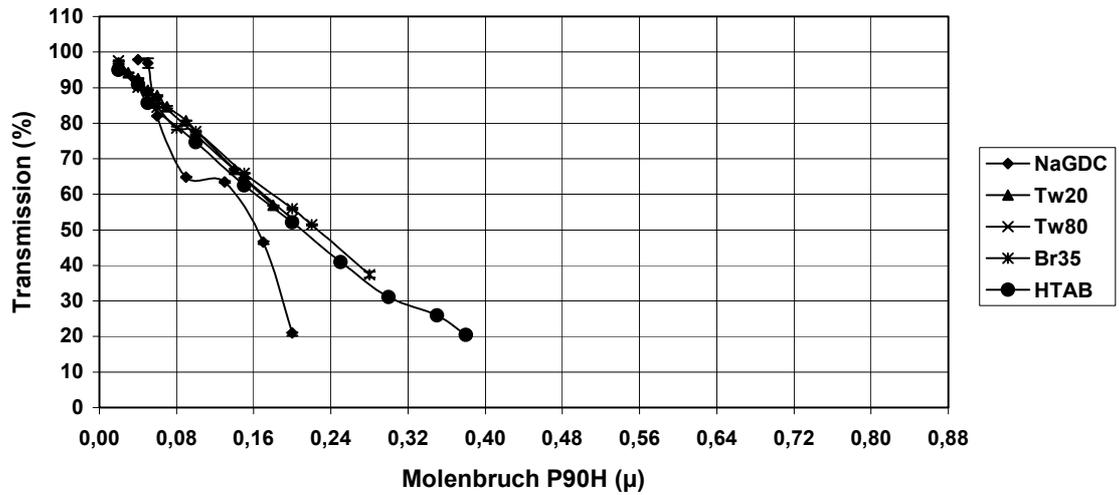


Abb. 20 Transmissionseigenschaften ( $n=3, \bar{Y} \pm SA$ ) verschiedener Tensidlösungen (20 mmol/l) in Sörensen-Phosphatpuffer (SPB) bei 25 °C und  $\lambda=660$  nm mit zunehmenden Molenbrüchen des gesättigten Sojalecithins P90H

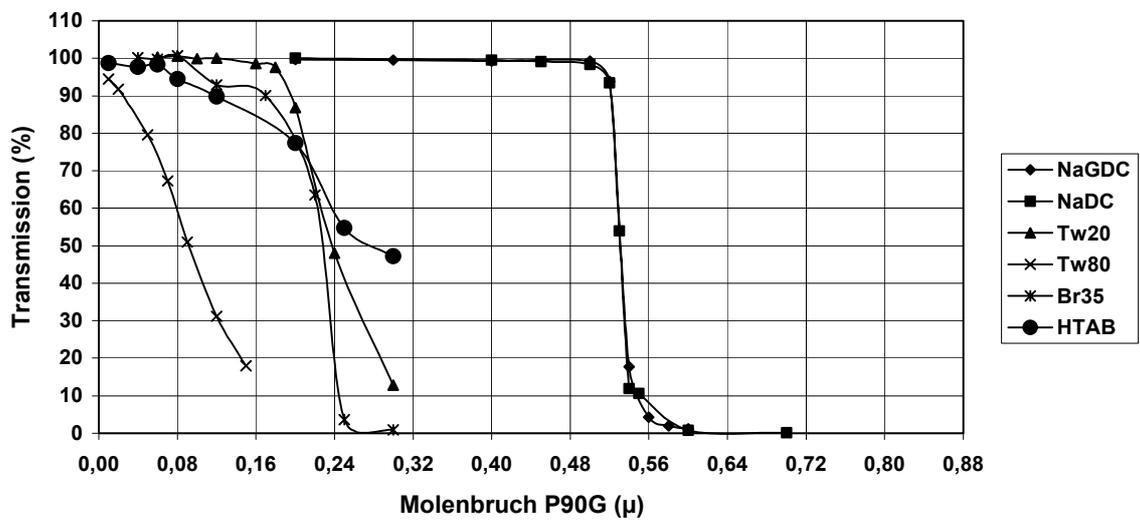


Abb. 21 Transmissionseigenschaften ( $n=3, \bar{Y} \pm SA$ ) verschiedener Tensidlösungen (20 mmol/l) in Sörensen-Phosphatpuffer (SPB) bei 25 °C und  $\lambda=660$  nm mit zunehmenden Molenbrüchen des ungesättigten Sojalecithins P90G

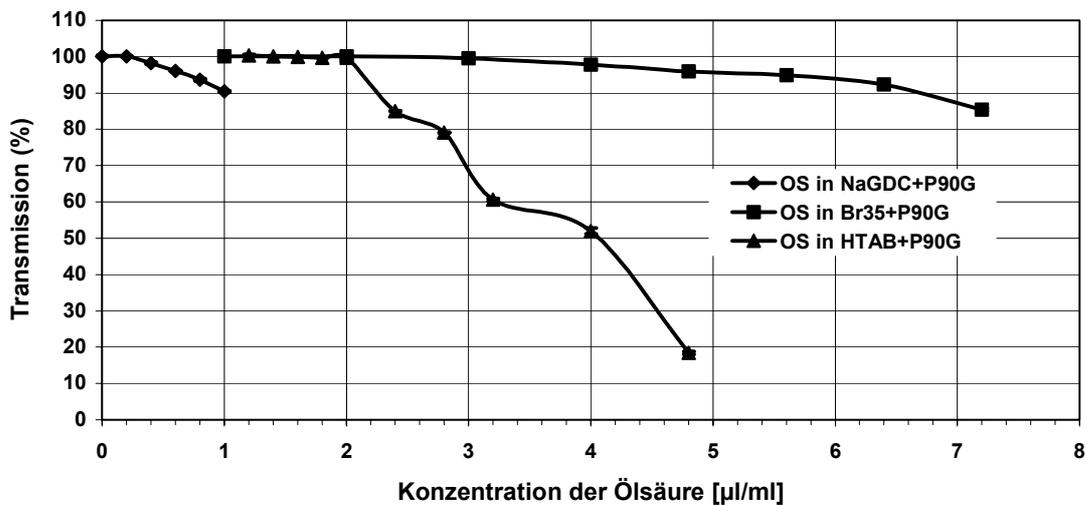


Abb. 22 Transmissionseigenschaften ( $n=3$ ,  $\bar{Y} \pm SA$ ) ternärer mischmizellerer Systeme aus ausgewählten Tensiden und dem ungesättigten Lecithin P90G mit zunehmenden Ölsäure-Konzentrationen in SPB, 25 °C,  $\lambda=660$  nm

#### IV.1.1.5 Solubilisation verschiedener Steroide in binären und ternären mischmizellaren Systemen

Für die Auswahl der optimalen MMS hinsichtlich ihrer Solublierungskapazität für T bzw. Testosteronester zwecks Verwendung in weiteren Untersuchungen wurde TP aufgrund der Ergebnisse in IV.1.1.1 eingesetzt.

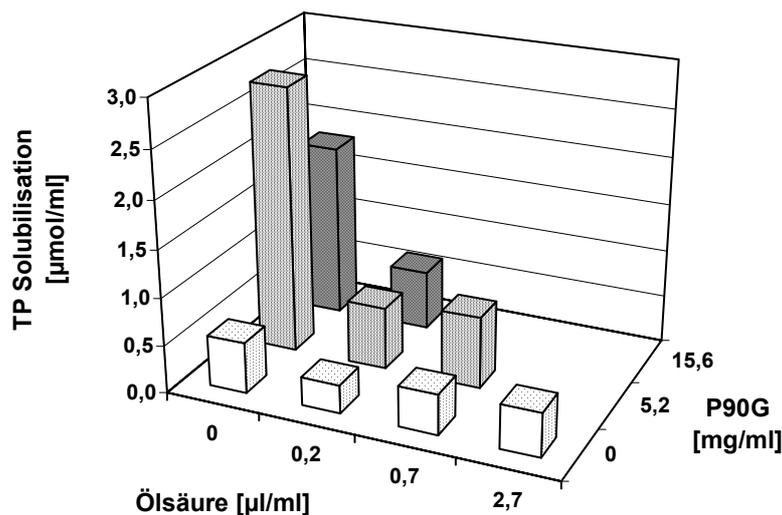


Abb. 23 Solubilisation von TP in ausgewählten einfachen, binären oder ternären mizellaren Systemen (mit P90G und/oder OS) des Tensids NaGDC bei 25 °C, Bestimmung mittels HPLC/UV

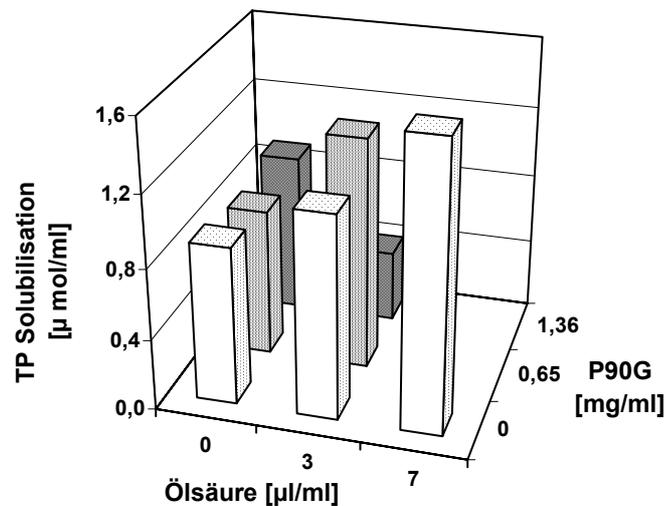


Abb. 24 Solubilisation von TP in ausgewählten einfachen, binären oder ternären mizellaren Systemen (mit P90G und/oder OS) des Tensids Br35 bei 25 °C, Bestimmung mittels HPLC/UV

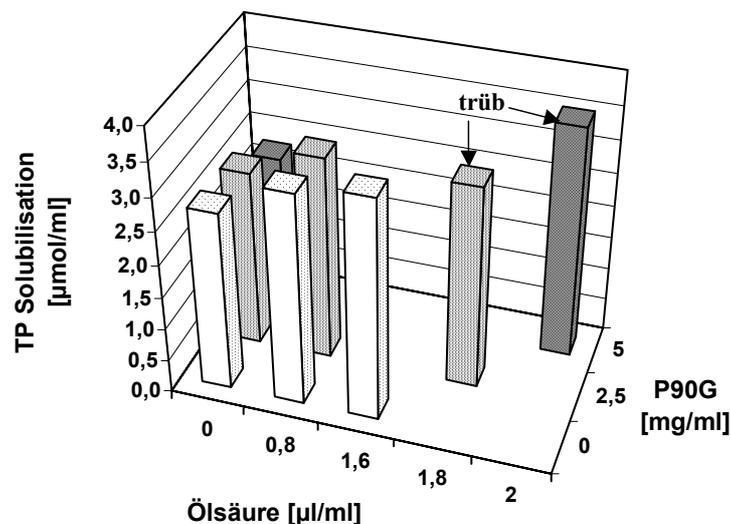


Abb. 25 Solubilisation von TP in ausgewählten einfachen, binären oder ternären mizellaren Systemen (mit P90G und/oder OS) des Tensids HTAB bei 25 °C, Bestimmung mittels HPLC/UV

Dabei wurden mischmizellare Lösungen der drei ausgewählten Tenside, NaGDC, Br35 und HTAB mit unterschiedlichem Gehalt an P90G und OS mit TP gesättigt (III.2). Die Gehaltsbestimmung des TP erfolgte nach der Verdünnung mithilfe der Methode HPLC-1 (III.5.1). Die hier ausgewählten maximalen Konzentrationen von P90G und OS (Abb. 23, Abb. 24 und Abb. 25) richteten sich nach den Ergebnissen der vorherigen Solubilisationsuntersuchungen (IV.1.1.2 bis IV.1.1.4). Nur bei Zunahme des P90G-Gehaltes nahm die Solubilisation von TP in NaGDC Systemen deutlich zu. Hingegen war dies bei den Br35- und HTAB-Systemen nur bei Zunahme des OS-Gehaltes der Fall.

Ausgehend von den letzten Ergebnissen wurden diejenigen MMS ausgewählt (Tabelle 12), in denen TP die besten Solubilisationen zeigte, und jeweils mit T, TE oder TU gesättigt. Die Bestimmung der Sättigungskonzentrationen erfolgte nach der Verdünnung mit HPLC-1 (III.5.1). Die Ergebnisse sind in Abb. 26 dargestellt.

Die Transmission wies bei allen mizellaren Systemen nach der Sättigung mit T bzw. mit seinen Estern außer TE keine signifikante Änderung auf. Alle mizellaren Systeme wurden aber bei der Sättigung mit TE milchig trüb. Die Sättigungskonzentrationen von TE sind deshalb in Abb. 26 nicht abgebildet.

Tabelle 12 ausgewählte mizellare Lösungen für die Untersuchungen in Abb. 26

System	Tensid (20 mmol/l in SPB)	OS [ $\mu$ l/ml]	P90G [mg/ml]
G	NaGDC	-	-
GP	NaGDC	-	5,2
GPmax	NaGDC	-	15,6
B	Br35	-	-
BO	Br35	7	-
BOP	Br35	3	0,65
H	HTAB	-	-
HO	HTAB	1,6	-
HOP	HTAB	0,8	0,5

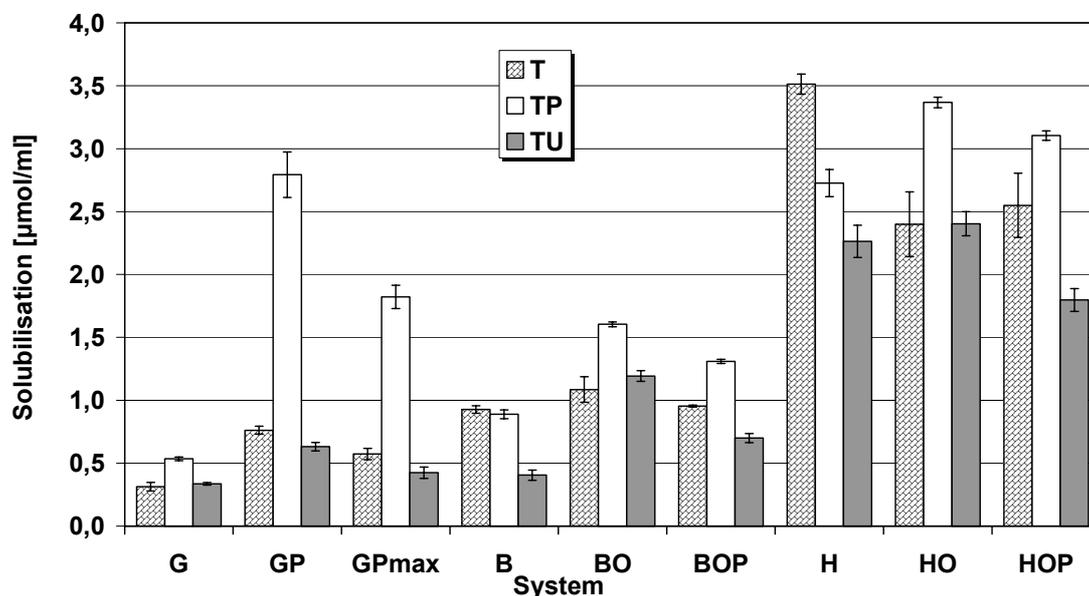


Abb. 26 Vergleich der Sättigungskonzentrationen von T, TP, und TU in ausgewählten einfachen, binären oder ternären mizellaren Systemen (Tabelle 12), Bestimmung mit Hilfe der HPLC/UV

Mit Ausnahme der Solubilisation von T im System H zeigten die Solubilisationen des T und seiner Ester in den verschiedenen Systemen ein sehr ähnliches Verhalten, d.h. eine bessere Solubilisation in den binären als in den einfachen oder den ternären Systemen. Mit Zunahme der Esterkettenlänge bis TE ( $R=6C$ ) nahm des Weiteren die Solubilisation zu (außer der Solubilisation im System H) und dann mit weiterer Verlängerung der Esterkette wieder ab.

### IV.1.2 Diskussion

Die in dieser Arbeit ermittelten Solubilisationseigenschaften der SL und der Fettsäuren zeigten eine gute Übereinstimmung mit *Cohen & Cary* [252] und *Booker et al.* [253]. Die Letzteren untersuchten die Verteilung verschiedener PL zwischen Mischmizellen und Vesikeln der menschlichen Galle und stellten fest, dass die Tendenz der Verteilung vorzugsweise in die Richtung der Mizellen geht (Verbesserung der Solubilisierung der Lipide in den Mizellen), wenn sich ungesättigte Fettsäurereste auf der Position 1 oder 2 der Diacylglyceride befinden. Analog dieser Resultate wurde in der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass diese Solubilisationsverbesserung unabhängig von dem verwendeten Tensid beobachtet werden kann und sich dementsprechend einfach auf den Sättigungszustand der Fettsäure bzw. der Kohlenwasserstoffkette des Lipids (Lecithin oder Fettsäure) zurückführen lässt (vergleiche Abb. 18 bis Abb. 21). Dieser Effekt lässt sich mit besseren Einordnungseigenschaften der ungesättigten Fettsäure zwischen den Tensidmoleküle innerhalb der mizellaren Struktur begründen [252]. Ungesättigte Kohlenwasserstoffketten mit *cis* Doppelbindungen benötigen aufgrund sterischer Effekte mehr Platz in den Monoschichten (mehr Fläche pro Molekül), und lockern somit die Packung der Moleküle auf [254]. SS weist beispielsweise eine Fläche pro Molekül von ca.  $20 \text{ \AA}^2$  auf [255,256], während diese bei OS ca.  $41 \text{ \AA}^2$  beträgt [256,257]. Im Vergleich zu SS-Molekülen scheint die Einbettung der OS-Moleküle zwischen den Tensidmolekülen dem mizellaren Bau dementsprechend Flexibilität zu verleihen. Diese bietet den Molekülen in dem mizellaren Gerüst vermutlich eine bessere Anpassungsmöglichkeit für optimale intermolekulare Wechselwirkungen, und so verbessert dies schließlich die Mizellbildung sowie die Solubilisierung. Das gilt auch, wenn die Einbettung im hydrophoben öligen Kern eines Aggregats erfolgt, denn statt der dichten Packung im Aggregatkern wird hier eine gewisse Flexibilität für die Einpassung der Kohlenwasserstoffketten benötigt. Ähnliche Schlüsse lassen sich analogerweise auch bei der Einbettung der ungesättigten und gesättigten SL in den Mizellen ziehen. Deshalb ist neben der Rolle der Kettenlänge des Tensids und des Lipids [253,258] die Verwendung ungesättigter Lipide als ein sehr wichtiger Faktor für die Verbesserung ihrer Solubilisation in den mizellaren Tensidsystemen zu betrachten. Basierend darauf wurden bei weiteren Optimierungsuntersuchungen nur die ungesättigten OS und P90G für die Herstellung der MMS eingesetzt.

Bemerkenswert hinsichtlich der Optimierung der ternären Systeme war, dass die Solubilisierungen der OS in den ausgewählten binären Systemen der Tenside Br35 und HTAB (Abb. 22) mit diesen in den entsprechenden einfachen Systemen (Abb. 19) beinahe identisch waren (Molenbrüche der OS wurden über eine Dichte von  $886.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  und unter Betracht ihrer Molmasse in die entsprechenden Konzentrationen in  $\mu\text{l}/\text{ml}$  umgerechnet). Daraus wurde geschlossen, dass sich diese Lipide bei der Anwesenheit zusammen in den o.g. mizellaren Lösungen hinsichtlich ihrer Solubilisierungen nicht gegenseitig beeinflussen. Bei den NaGDC-Systemen hingegen führt die Solubilisation eines Lipids zu einer deutlichen Verringerung der Solubilitätskapazität des Systems für das andere Lipid. Durch die binären Systeme konnte die Solubilisation der hier verwendeten Steroide weiterhin stärker verbessert werden, als mit den ternären Systemen (Abb. 26). Obwohl die Zugabe der einzelnen Lipide zu den einfachen Tensidsystemen (OS zu Br35- oder HTAB-Systemen, und P90G zu NaGDC-System) eine Verbesserung der Solubilisation der verwendeten Steroide bewirkt, wird die Einbettung der Steroidmoleküle in die Mizelle durch die Zugabe weiterer Lipide nicht begünstigt. Dies liegt wahrscheinlich darin begründet, dass die zugegebenen Lipidmoleküle mit den Steroiden um die Solubilitätsstellen innerhalb der mizellaren Matrix konkurrieren. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Verwendung zweier Lipide zu einer für die

Solubilisation ungünstigen Strukturänderung innerhalb der mizellaren Gebilde oder zur Entstehung von Vesikelstrukturen mit den Steroiden führt. Vermutlich konkurrieren hier insbesondere die polaren Kopfgruppen um die hydrophilen Seiten innerhalb der Mizellen. Durch die zugesetzten Lipide wird die mizellare Struktur bei den mischmizellaren NaGDC- oder HTAB-Systeme daher dichter gepackt und höher geordnet, insbesondere in der Kopfgruppenregion. Im Falle der Br35-Systeme hat die untere Schicht der unhydratisierten Zone [259] der Polyoxyethylengruppen nur eine begrenzte Kapazität bezüglich der Wechselwirkung mit den polaren Kopfgruppen der solubilisierten Stoffe. Folglich verringert sich die Solubilisation der verwendeten Steroide in den ternären Systemen gegenüber den binären Systemen.

Aus den erreichten hohen Solubilisationen von TE in allen untersuchten Systemen und zugleich den daraus trotz Filtration entstandenen milchig trüben Lösungen lässt sich ein anderer Mechanismus für die Solubilisation des TE in diesen Konzentrationen vermuten. Durch die amphiphile Struktur und die günstig mittelgroße Esterkette des TE-Moleküls in Gegenwart der Tenside mit ggfs. den anderen amphiphilen Lipiden ist hier die Entstehung anderer solubilisierter Aggregate wie z.B. Vesikel begünstigt und somit sehr wahrscheinlich.

Br35 zeigte die besten Solubilisationen mit T und dem kurzkettigen TP sowie gute Solubilisationen mit den langkettigeren TE und TU gegenüber den anderen untersuchten nichtionischen Tensiden Abb. 17. Entscheidend für die Auswahl von Br35 für die weiteren Optimierungen war aber nicht nur dieser Befund, sondern auch, dass er die beste Solubilisation von OS gegenüber Tw20 aufwies, dessen Molekül einen vergleichbaren Seitenkette wie Br35 hat (C12), sowie gegenüber Tw80, welches selber einen Monooleatseitenkette in seiner chemischen Struktur enthält. Nichtionische Tenside wie *n*-Alkyl-Polyoxyethylenether besitzen die Fähigkeit, auch ohne Verwendung eines Cotensids stabile Microemulsionen zu bilden [259]. Basierend auf dieser Eigenschaft kann man hier im Falle von Br35 und mit dem Molenbruch der OS von  $\mu_{OS} \approx 0,55$  (ca. 30% W/W OS/Br35) von einem Mikroemulsionssystem ausgehen. Ausgehend von der Tatsache, dass eine definierte physikochemische Unterscheidung zwischen Mikroemulsionen und solubilisatgeschwollenen Mizellen (*solute-swollen micelles*) als noch weit umstritten gilt [259], durfte dieses System bei der Optimierung weiter eingesetzt werden. Etwa 80 % Verbesserung der Solubilisation von TP in diesem System gegenüber dem ölsäurefreien mizellaren Br35 System rechtfertigte des Weiteren diese Entscheidung (Abb. 24). Die Erhöhung des OS-Gehalts im Falle von TP (Abb. 24) sowie die Zunahme der Kettenlänge bzw. der Lipophilie der Testosteronester in den OS-haltigen Lösungen (Abb. 26) resultierten bei Br35 Systemen in einer Verbesserung der Solubilisation. Dies deutet darauf hin [259], dass die OS-Moleküle größtenteils nicht weit in die unhydratisierte Polyoxyethylengruppe eindringen, wo sie mit den Wirkstoffen um die Solubilitätsstellen innerhalb dieser Schicht konkurrieren. Stattdessen wechselwirken ihre hydrophilen Kopfgruppen über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem untersten Teil der Polyoxyethylenschicht, während ihre Kohlenwasserstoffketten zusammen mit den hydrophoben Seitenketten der Tensidmoleküle eine Ölmasse im Kern des Aggregats bilden (siehe Abb. 36). Durch die hohe Löslichkeit lipophiler Wirkstoffe in dieser Ölmasse, die wiederum mit Erhöhung der Esterkettenlänge (bis zu einer bestimmten Länge; hier bei TE R=6C) bzw. der Lipophilie zunimmt, kommt es im Endeffekt zur beobachteten Verbesserung der Solubilisation. Diese Auffassung wurde später durch DLS- und MAKE- Untersuchungen bekräftigt.

Naylor *et al.* [34,35] stellten fest, dass ungesättigte Lecithine die Solubilisation stark lipophiler Steroide in GS-Mischmizellen verbessern. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen damit überein (Abb. 26). NaDC- und NaGDC-Systeme zeigten identische Solubilitätskapazitäten für das ungesättigte P90G (Abb. 21). Weiterhin ließ sich herausstellen (Abb. 17), dass sich das NaDC-System am besten unter den untersuchten GS-Systemen für die Solubilisation der verwendeten Steroide eignet. Aus Kostengründen und unter Einbeziehung der mit ihm erhaltenen guten Solubilitäten der Steroide wurde jedoch NaGDC in den weiteren Untersuchungen eingesetzt. Martis *et al.* [260] schließen aus ihrer Untersuchung für die Solubilisation von T im Trihydroxygallensalz, Natriumglycocholat, dass T dabei höchstwahrscheinlich nicht in der unpolaren Innenregion der Mizelle solubilisiert wird, die sich aus den hydrophoben Rückseiten der Glycocholatmoleküle bildet, und damit von der Mizelle eingeschlossen wird, sondern sich aktiv an der Bildung komplexer solubilisierter Aggregate mischmizellarer Natur beteiligt. Diese Schlussfolgerung stützte sich auf eigene Ergebnisse sowie ähnliche Befunde anderer bei ihnen zitierter Arbeiten, bei denen eine Solubilisation von T unterhalb der scheinbaren binären kritischen mizellaren Konzentration (*apparent Critical Micelle Concentration*) des Systems beobachtet wurde. Dies wurde von ihnen auf eine Oberflächenaktivität der T-Moleküle zurückgeführt, welche auch eine aktive Beteiligung des T an der Bildung mischmizellarer oder eventuell prä-mizellarer Aggregate bedingt.

Das Solubilitätsverhalten des T und seiner Ester zeigte in fast allen untersuchten mizellaren Systemen große Ähnlichkeit mit dem Solubilitätsverhalten dieser Stoffreihe in den Lipiddoppelschichten der Ei-Lecithine, das von Stevens & Green [261] untersucht wurde. Die letzten bemerkten eine Zunahme der Solubilisation mit Zunahme der Esterkettenlänge bis zu 8-9 C-Atomen. Über diese Kettenlänge hinaus nahm die Solubilisation wieder ab. Über eine angenommene Ähnlichkeit mit der bekannten Solubilisation des Cholesterins in den Membranedoppelschichten (Abb. 27) begründeten sie ihre Befunde wie folgt: Die Esterketten der in den Lipiddoppelschichten eingebetteten Testosteronester können sich mit Zunahme der Kettenlänge von einer Seite der Doppelschicht bis zur anderen durch die Kontaktfläche hinweg nicht frei erstrecken. Die Packung der Kohlenwasserstoffketten in der Mitte der Doppelschichtregion wird sonst sehr dicht, und somit wird die Anpassungsfähigkeit der Lipidketten eingeschränkt, die für eine maximale Wechselwirkung zwischen den Schichten benötigt wird. Die Solubilisation der Steroide in der Lipiddoppelschicht wird im Endeffekt davon bestimmt. Nach Stevens & Green sollte dies daher im Falle der Monoschichten nicht gelten. Die o.g. Ähnlichkeit hinsichtlich des Solubilitätsverhaltens lässt sich im Falle der L-GS-Mischmizellen mit der Anwendung des bekannten Mischdiskmodells (*mixed disk model*) [19] oder des Modells der radialen Schale (*radial shell model*) [24] sowie auch anderer Modelle [22,23] erklären (Abb. 28). Diese Modelle führen alle zur Annahme, dass die Steroide in den Mischmizellen zwischen den Lecithinmolekülen solubilisiert werden, indem sich ihre Ketogruppen an der hydrophilen Seite der Mizelle verankern, während sich ihre steroidal Ringssysteme und Esterketten zwischen den Kohlenwasserstoffketten der Lipide einordnen. Dabei wird die Einbettung der Testosteronester in den Mischmizellen wahrscheinlich durch eine

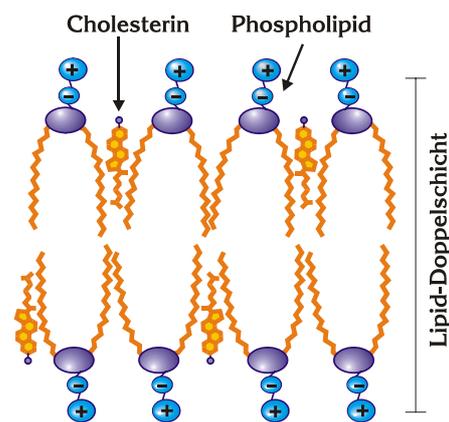


Abb. 27 Schematische Darstellung der bekannten Einbettung von Cholesterin in den Lipiddoppelschichten

Die Esterketten der in den Lipiddoppelschichten eingebetteten Testosteronester können sich mit Zunahme der Kettenlänge von einer Seite der Doppelschicht bis zur anderen durch die Kontaktfläche hinweg nicht frei erstrecken. Die Packung der Kohlenwasserstoffketten in der Mitte der Doppelschichtregion wird sonst sehr dicht, und somit wird die Anpassungsfähigkeit der Lipidketten eingeschränkt, die für eine maximale Wechselwirkung zwischen den Schichten benötigt wird. Die Solubilisation der Steroide in der Lipiddoppelschicht wird im Endeffekt davon bestimmt. Nach Stevens & Green sollte dies daher im Falle der Monoschichten nicht gelten. Die o.g. Ähnlichkeit hinsichtlich des Solubilitätsverhaltens lässt sich im Falle der L-GS-Mischmizellen mit der Anwendung des bekannten Mischdiskmodells (*mixed disk model*) [19] oder des Modells der radialen Schale (*radial shell model*) [24] sowie auch anderer Modelle [22,23] erklären (Abb. 28). Diese Modelle führen alle zur Annahme, dass die Steroide in den Mischmizellen zwischen den Lecithinmolekülen solubilisiert werden, indem sich ihre Ketogruppen an der hydrophilen Seite der Mizelle verankern, während sich ihre steroidal Ringssysteme und Esterketten zwischen den Kohlenwasserstoffketten der Lipide einordnen. Dabei wird die Einbettung der Testosteronester in den Mischmizellen wahrscheinlich durch eine

Wechselwirkung ihrer Esterfunktion mit der Doppelbindung der ungesättigten Fettreste im Lecithinmolekül besonders begünstigt. Die Einbettung der Testosteronester mit längeren Esterketten in diesen Strukturen ist nach dieser Vorstellung nur begrenzt möglich. Dies hängt ebenfalls von der Esterkettenlänge ab und kann möglicherweise wie bei der oben beschriebenen Solubilisation in den Lipiddoppelschichten zur Instabilität des Systems führen und somit zur Reduzierung der Solubilisation.

Bei den HTAB-Systemen scheint die Esterkettenlänge bzw. die Lipophilie des Testosteronesters die Hauptrolle in der Verbesserung der Solubilisation unterhalb einer Kettenlänge von ca. 7 C-Atomen zu spielen. Dies kann innerhalb dieses Bereiches auf eine Verbesserung der Solubilisation des Moleküls im hydrophoben Kern der Mizelle zurückgeführt werden. Oberhalb dieser Esterkettenlänge scheint der sterische Faktor (die Molekülgröße) und ihr Störungseffekt für die Stabilität der Aggregate die anderen Faktoren wie die Lipophilie zu überwiegen und die Hauptrolle als solubilisationsbestim-

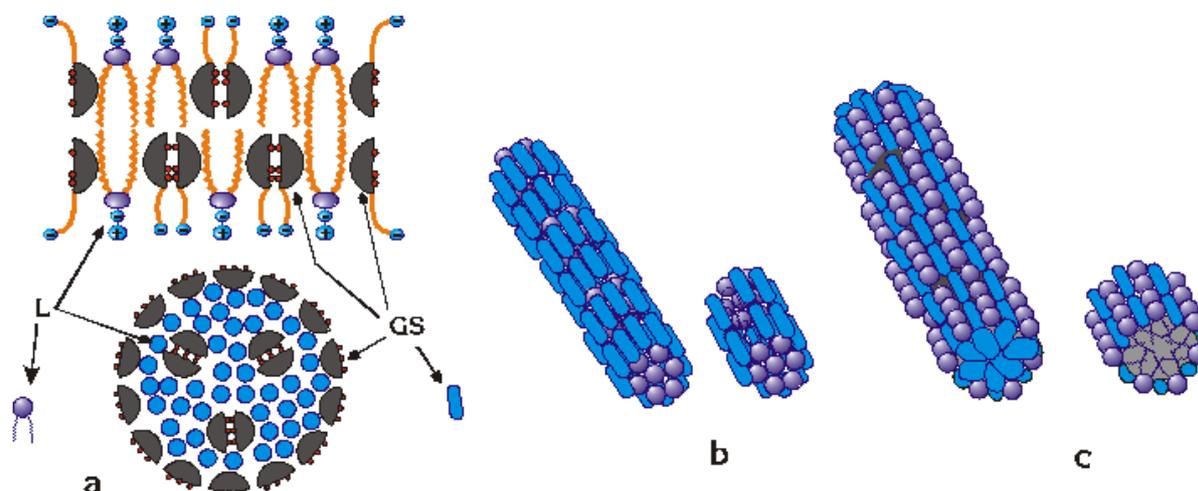


Abb. 28 Modellvorstellungen zur Struktur von Lecithin(L)-Gallensalz(GS)-Mischmizellen, a: „mixed disk“-Modell nach Mazer *et al.* [19], b: „stacked disk“-Modell nach Shankland [18], c: „radial shell“-Modell nach Ulmius *et al.* [20]

mender Faktor wieder zu übernehmen. Das abweichende Solubilisationsverhalten des T in den HTAB-Systemen (Abb. 26) steht im Einklang mit der „Theorie der regulären Lösung“, nach deren Aussagen eine Abnahme der Solubilisation in binären MMS zweier oberflächenaktiven Stoffe mit starker gegenseitiger Anziehung gegenüber den einfachen Tensidsystemen erwartet wird. Dies kann auch analog zu Treiner *et al.* [262] durch die Polarität der T-Moleküle erklärt werden. Ein T-Molekül ist fast halb so lang wie ein HTAB-Molekül und besitzt im Gegensatz zu den anderen hier verglichenen Steroiden keine Esterkette, die das Molekül wegen ihrer Lipophilie tiefer in die Mizelle zieht. Wegen ihrer gewissen Amphiphilie ordnen sich die neutralen T-Moleküle vermutlich in einer voranschreitenden Position in der oberen mizellaren Schicht ein. Sie lindern dadurch die Abstoßung zwischen den gleich positiv geladenen HTAB-Kopfgruppen und füllen durch ihre relativ kleine Größe die Räume dazwischen (siehe Abb. 33, IV.2.2). Damit fungieren sie wie ein Cotensid und tragen zur Stabilisierung des Systems bei. Hingegen bewirken die OS-Kopfgruppen im Falle der binären HTAB-Systeme möglicherweise wegen ihrer gegensätzlichen negativen Ladungen eine Zunahme der Ordnung bzw. der Packung in der Kopfgruppenregion und somit die Senkung der Solubilisation des T. Eine weitere geringe Verbesserung der Solubilisation des T mit Zugabe von P90G bei dem ternären System HOP bekräftigt diese Vermutung (Entspannung in der Kopfgruppenregion).

### IV.2 Bestimmung der mizellaren Größe mittels DLS

Die Änderung der mizellaren Größe in Abhängigkeit vom Inhalt des mizellaren Systems an den verschiedenen Komponenten wurde hier untersucht. Die dadurch erhaltenen Informationen dienen zur Unterstützung einiger in IV.1 gezogenen Schlüsse sowie anschließend zur Entwicklung einer Modellvorstellung über den Bau der resultierenden mizellaren Systeme.

#### IV.2.1 Ergebnisse

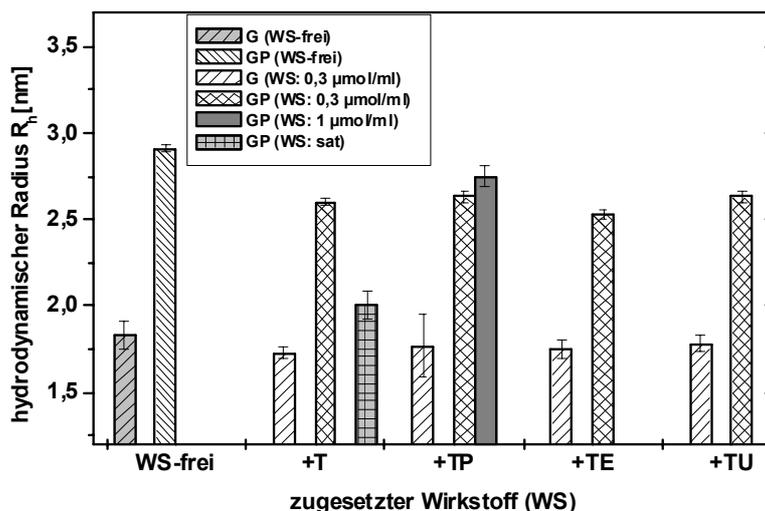


Abb. 29 Vergleich zwischen den mizellaren hydrodynamischen Radien verschiedener mizellarer Systeme des Tensids NaGDC bei 25 °C

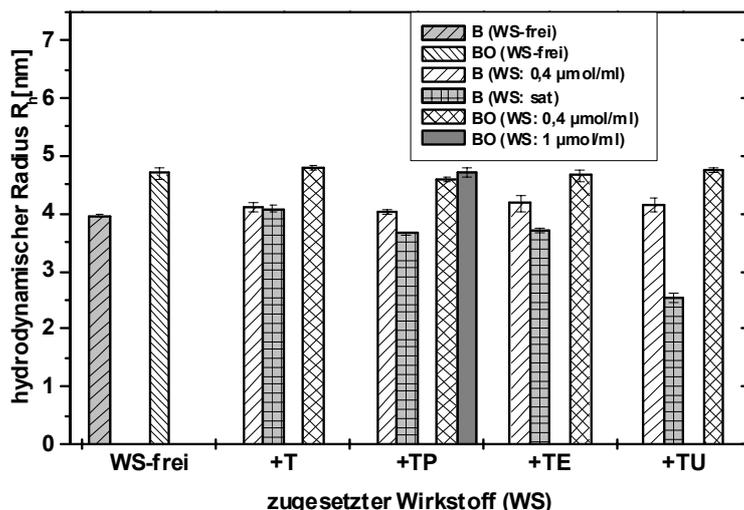


Abb. 30 Vergleich zwischen den mizellaren hydrodynamischen Radien verschiedener mizellarer Systeme des Tensids Br35 bei 25 °C

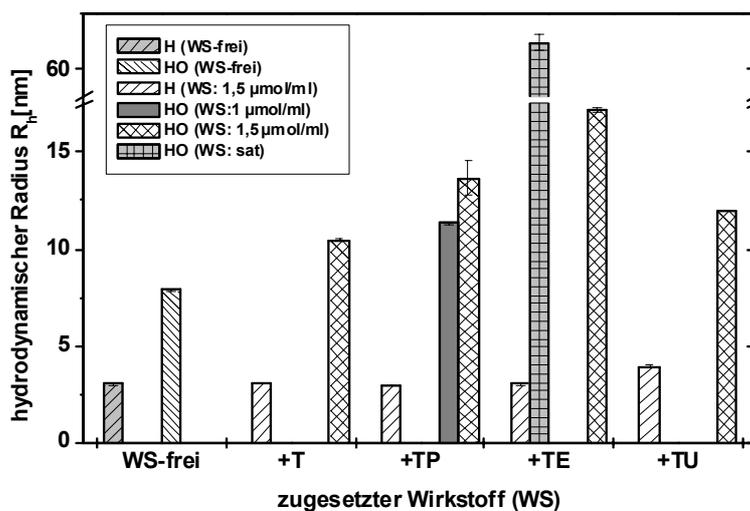


Abb. 31 Vergleich zwischen den mizellaren hydrodynamischen Radien verschiedener mizellarer Systeme des Tensids HTAB bei 25 °C

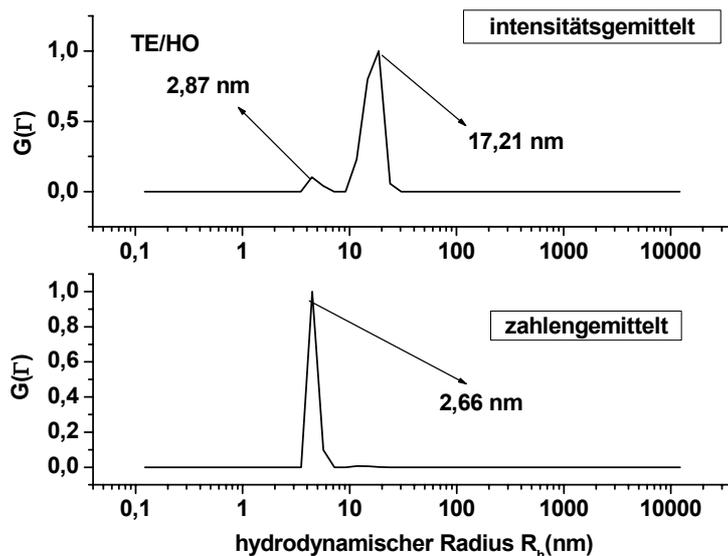


Abb. 32 Beispiel für die erhaltenen unterschiedlichen Verteilungen bei den zwei angewandten CONTIN-Verfahren

Für diese Untersuchungsreihe kamen die in IV.1 entwickelten MMS mit den optimalen Zusammensetzungen der Komponente zum Einsatz. Diese waren die Systeme GP, BO und HO (siehe Tabelle 12, IV.1.1.5). Die Versuche wurden dementsprechend je nach verwendetem Tensid in drei Gruppen unterteilt. Die für den Vergleich verwendete molare Wirkstoffkonzentration in allen Systemen wurde hauptsächlich von der kleinsten erhaltenen Wirkstoffsolubilisation unter den untersuchten Systemen bestimmt. Diese war die Solubilisation des T im System G der Gallensalzsysteme sowie TU-Solubilisationen in den Systemen B der Br35-Systeme und HO der HTAB-Systeme (Abb. 26, IV.1.1.5). Es wurden in einzelnen Fällen auch andere Wirkstoffkonzentrationen oder sogar gesättigte Systeme verwendet, um den Einfluss dieser Konzentrationsänderung auf die mizellare Größe zu untersuchen. Die Ergebnisse sind in Abb. 29, Abb. 30 und Abb. 31 dargestellt.

Die *CONTIN*-Analyse ergab im Falle aller ölsäurehaltigen HTAB -Systeme sowie fast aller mit Steroid gesättigten Systeme zwei Verteilungen (Abb. 32) der Funktion  $G(\Gamma)$  bei der intensitätsgemittelten Methode und eine Verteilung bei der zahlengemittelten Methode.

### IV.2.2 Diskussion

Ergebnisse über Untersuchungen von GS- bzw. L-GS-Mischmizellen sind in der Literatur häufig anzutreffen. Das resultiert in einer großen Anzahl an vorgeschlagenen Aggregationsmodellen und Strukturklärungstheorien [17,19,25-27,263,264]. Einige davon sind in IV.1.2 abgebildet (Abb. 28). *Small* zeigte in seiner Arbeit [17], dass NaGDC Moleküle unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen zur Bildung kleiner Aggregate mit einer Aggregationszahl von ca. 2 bis 10 neigen. Das Programm ACD/ChemSketch (Vr. 5.12, *Advanced Chemistry Development Inc.*, Canada) errechnet für das NaGDC-Molekül eine Länge von ca. 18 Å und eine Breite von ca. 5-6 Å. Unter Einbeziehung des von *Small* beschriebenen Aggregationsmodells kommt man durch den ermittelten hydrodynamischen mizellaren Radius ( $\approx 18$  Å) für das einfache G-System (Abb. 29) auf eine Aggregation von ca. 2-6 Molekülen pro Mizelle. In analoger Weise hängt der ermittelte große mizellare hydrodynamische Radius ( $R_h \approx 29$  Å) des binären GP-Systems mit der Entstehung größerer Aggregatformen, wie in Abb. 28 dargestellt, zusammen. Bei den einfachen und binären NaGDC-Systemen und nach Zugabe der verwendeten Steroide (0,3  $\mu\text{mol/ml}$ ) ergaben sich keine deutlichen Änderungen der mizellaren Größe in Gegenwart der Steroide oder in Abhängigkeit von der Esterkettenlänge, sondern nur eine kleine Größenabnahme gegenüber dem entsprechenden wirkstofffreien einfachen bzw. binären System. Daraus lässt sich schließen, dass die Steroidmoleküle durch ihre Amphiphilie höchstwahrscheinlich die Rolle eines Cotensids übernehmen, und somit eine bessere Packung der Mizellen bewirken. Im Endeffekt führt dies dazu, dass sich das Mizellvolumen nach Steroidzugabe nicht wesentlich ändert und sich sogar durch die dichtere Packung geringfügig reduziert. Die Unabhängigkeit der mizellaren Größe von der Esterkettenlänge weist auf identische Mizellstrukturen bzw. Solubilisierungsstellen innerhalb (siehe auch IV.4) der mizellaren Struktur hin und erklärt damit die Abnahme der Solubilitätskapazität der GP-Systeme nach einer bestimmten Esterkettenlänge des Steroids, die in IV.1.2 mit zunehmender Instabilität solcher Systeme erklärt wurde. Mit anderen Worten, diese Feststellung unterstützt die in IV.1.2 eingeführte Erklärung für das Solubilitätsverhalten der verwendeten Steroide in Abhängigkeit von ihrer Esterkettenlänge und somit die ihr zugrunde liegende Modellvorstellungen (Abb. 28, IV.1.2). Bei den Systemen, bei denen eine überdurchschnittliche aktive Beteiligung des Steroidmoleküls an der Mizellbildung erwartet (NaGDC-Systeme mit T) oder die beste Eignung der Steroidstruktur für die Solubilisierung vermutet wurde (TE) (siehe IV.1), kam es zu einer relativen kleinen Reduzierung der mizellaren Größe gegenüber den mit den anderen Estern (TP und TU) beladenen Systemen. Dies wurde in diesen Fällen als ein Hinweis auf verstärkte Packung der Mizellen betrachtet. Die deutliche Abnahme der mizellaren Größe nach der Sättigung des GP-Systems mit T sowie die o.g. allgemeine Abnahme der mizellaren Größen der einfachen und binären NaGDC-Systeme nach Zugabe der unterschiedlich amphiphilen Testosteronanaloga verstärkten diese Annahme. Beim T kann dies auch mit der Entstehung kleinerer Aggregatformen erklärt werden (siehe z.B. die starke Abnahme der Mizellgröße im GP-System nach der Sättigung mit T in Abb. 29), was wiederum mit der Amphiphilie des T zusammenhängt. Die Zunahme der mizellaren Größe mit steigenden TP-Konzentrationen beim GP-System spricht möglicherweise für eine zunehmende Anzahl an den eingebetteten TP-Molekülen in der Mizelle.

Nichtionische Tenside mit langen Polyoxyethylenketten bilden stäbchenförmige Mizellen [265], abgeplattete ellipsenförmige oder auch nichtklassische sphärische Mizellen [266]. Der Polyoxyethylenrest hat die Form einer ausgedehnten kegelförmigen Spirale, deren Spitze an der Grenzfläche mit dem Kohlenwasserstoffkern hängt. Ein theoretischer Querschnitt in den Mizellen dieses Tensids soll eine ganze Variation an Schichten zeigen, deren Polarität sich stufenweise ab der ganz polaren wässrigen Phase über die hochhydratisierte Oberschicht und die nächste mit zunehmend unhydratisierten Polyoxyethylenketten dicht gestaute Schicht hindurch bis zum ganz unpolaren Kohlenwasserstoffkern [267] ändert (siehe Abb. 36, IV.4). Die unterschiedlich polaren Schichten bieten dementsprechend ein breites Spektrum an Solubilisierungsstellen innerhalb der Mizelle für Stoffe unterschiedlicher Polaritäten [267,268]. Je unpolarer ein eingebettetes Steroid ist, umso mehr lässt es sich in diesen Tensidsystemen solubilisieren. Mit der Verlängerung der Polyoxyethylenkette des Tensids reduziert sich die Solubilisation unpolarer Steroide deutlich. Größe, Hydratationsgrad und Anzahl der Mizellen nehmen hingegen zu. Andererseits hat die Anwesenheit des Solubilisats bzw. Steroids im System kaum oder überhaupt keinen Einfluss auf diese Merkmale [267]. Die oben dargestellten Ergebnisse (Abb. 30) zeigten bei kleinen und identischen molaren Steroidkonzentrationen in guter Übereinstimmung mit *Barry & El Eini* (1976) auch keine Änderung der mizellaren Größe der steroidhaltigen einfachen oder binären Systeme gegenüber den entsprechenden wirkstofffreien Systemen. Laut *Malcolmson et al.* (1998) [259], je kleiner das Ölmolekül und länger die hydrophobe Tensidkette sind, umso tiefer dringt das Ölmolekül in die Polyoxyethylenschicht ein und übernimmt die Rolle eines Cotensids und somit ändert sich die Packung der Mizelle. Dies bewirkt vermutlich eine für die Solubilisation schädliche Verdünnung der unhydratisierten konzentrierten Polyoxyethylenschicht. Die Solubilisierung dieser kleinemolekularen Öle in diesen Tensidsystemen, auch in kleinen Konzentrationen, ergibt folglich asymmetrische ellipsenförmige Aggregate. Mit Erhöhung der Ölkonzentration oder bei der Solubilisierung von Ölen mit großem Molekularvolumen wachsen diese Aggregate in sphärische Formen hinein (siehe hierzu auch [269]). Bei den letztgenannten Aggregaten lagern sich die Ölmoleküle hauptsächlich im hydrophoben Inneren ein und bilden dadurch, zusammen mit den hydrophoben Teilen der Tensidmoleküle, einen ausgeprägten öligen Kern im Aggregat. Die beobachtete Zunahme der mizellaren Größe nach Zugabe von OS (Abb. 30) unterstützt diese Auffassung und steht im Einklang mit den Befunden und Schlussfolgerungen in IV.1. *Malcolmson et al.* (1998) vertreten die Ansicht, dass sich die meisten Wirkstoffe prinzipiell in der o.g. unhydratisierten konzentrierten Polyoxyethylenregion nahe beim hydrophoben mizellaren Kern solubilisieren. Dies wurde bereits zuvor im Falle der Steroide bestätigt [267,268]. Nur lipophile Wirkstoffe ( $\log P > 5-6$ ) zeigen ebenfalls eine signifikante Solubilisation im hydrophoben Kern dieser Aggregate [270]. Außer wenn ein Wirkstoff eine gewisse Solubilisation in der dispergierten öligen Phase aufweist und diese sich in den Kern des Aggregats lagert, bietet die Verwendung der binären Systeme solcher Art keinen Vorteil gegenüber dem einfachen Tensidsystem bezüglich der Solubilisationsverbesserung und erweist sich somit als zwecklos [259]. Trotz der deutlichen Erhöhung der TP-Konzentration im BO-System von  $0,4 \mu\text{mol/ml}$  auf  $1 \mu\text{mol/ml}$  kam es zu keiner deutlichen Zunahme der mizellaren Größe (Abb. 30). Betrachtet man die hohe Lipophilie des TP ( $\log P = 4,69$  [134]), deuten die o.g. Angaben auf eine gewisse Solubilisierung der TP-Moleküle im öligen hydrophoben Aggregatkern hin. Dadurch lässt sich wiederum die erhaltene Solubilisationsverbesserung der Steroide bei der Verwendung dieser Systeme (IV.1) erklären. Bemerkenswert war hier die Abnahme der Aggregatgröße der OS-freien, mit Steroiden gesättigten Systeme im Vergleich zu den ähnlichen weniger konzentrierten Systemen ( $0,4 \mu\text{mol/ml}$ ) sowie die

Steigerung dieses Effekts mit Zunahme der Esterkettenlänge der solubilisierten Steroide (Abb. 30). Möglicherweise teilen sich die Mizellen bei solchen hohen Konzentrationen der Steroide in kleinere Aggregate mit einem geringen Steroidinhalt pro Aggregat (z.B. 1-3 Steroidmoleküle), um möglichst in Wechselwirkung mit dem ganzen Überschuss der Steroidmoleküle zu treten. Dieser Effekt steigert sich dementsprechend mit Zunahme der Molekülgröße, da nun weniger Moleküle in ein Aggregat passen können. Beispielsweise errechnet die Software ACD/ChemSketch für TU-Moleküle eine theoretische Länge von ca. 23 Å, während die DLS-Messungen für die Mizellgrößen in diesem gesättigten System einen  $R_h$  von nur ca. 25,3 Å ergaben. Der Rückgang der Solubilisation der Testosteronester mit zunehmenden Esterkettenlängen (TU) gegenüber den kleinkettigen Estern im einfachen B-System (Abb. 26, IV.1.1.5) bekräftigte diese Schlussfolgerung und deutete auf eine erschwerte Solubilisation mit der Erhöhung der Esterkettenlänge des Steroids hin.

Tenside mit großen hydrophilen Kopfgruppen wie N-methylierte quaternäre Alkylammoniumhalogenide neigen vorzugsweise zur Bildung sphärischer Mizellen [271,272]. In zusatzfreien wässrigen Lösungen sind HTAB-Mizellen jedoch anisotrop [273,274]. Weiterhin nimmt ihre „scheinbare“ Größe nach geringem Zusatz von Benzol zu [273]. *Smith & Alexander* [275] stellten bei ihrer Untersuchung der Solubilisation verschiedener Aromaten in der Lösung des kationischen Tensids Cetylpyridiniumchlorid fest, dass Aromaten die Bildung von langen stäbchenförmigen Mischmizellen fördern. Dieses wurde auch von *Eriksson & Gillberg* [276] bestätigt und auf eine gewisse Polarisierbarkeit der Benzolmoleküle zurückgeführt, die einem Teil dieser Moleküle die Solubilisation in einer zu den polaren Tensidkopfgruppen sehr nahen Region sowie auch die Bildung von Wasserstoffbrücken mit den dort penetrierten Wassermoleküle ermöglicht. Die Autoren vermuteten auch bei der Solubilisation des Benzols in höheren Konzentrationen eine Steigerung der Wechselwirkung zwischen den Kohlenwasserstoffketten im Mizellinneren mit entsprechender Erniedrigung deren thermaler Mobilität bei der Entwicklung zu stäbchenförmigen Mischmizellen infolge der Solubilisation des Benzols in dieser Region. Mit zunehmender Konzentration des Tensids HTAB entstehen in seinen Systemen zumeist stäbchenförmige Mizellen [271,272,276-284]. Viele Faktoren wie pH, Temperatur und die Gegenwart anderer Zusätze in der Lösung wie z.B. Salze können diesen Vorgang beeinflussen. Besonders die Art und Konzentration solcher Salze beeinflussen die Entstehung der stäbchenförmigen Mizellen [279]. Über Mischungen von Fettsäuren wie OS mit Alkyltrimethylammoniumhalogeniden ist in der Literatur wenig bekannt. Jedoch findet man zahlreiche Publikationen, die von Mischungen gegensätzlich geladener Tenside wie z.B. HTAB und Natriumdodecylsulfat (NaDS) handeln [262,285-290]. *Tomašić et al.* [291] zitierten viele Arbeiten in diesem Zusammenhang. In Mischungen von entgegengesetzt geladenen Tensiden kann es zur Bildung von Niederschlägen (Ionenpaarbildung aus Tensiden), kristallinen Phasen, Vesikeln oder Mizellen kommen. Was sich bildet, hängt in erster Linie von der Konzentration der Tenside und ihrem molaren Verhältnis, Art der Gegenionen und strukturellen Eigenschaften der Tenside (wie elektrostatischer Wechselwirkung zwischen den Kopfgruppen und Asymmetrie in den Kettenlängen zwischen den beiden Tensiden) ab. Durch die Änderung eines dieser Faktoren kann es zu einer Phasenumwandlung von ebenen kristallinen zu gekrümmten lamellaren Phasen bis hin zu Vesikeln und Mischmizellen kommen. Dabei wurde auch eine gleichzeitige Koexistenz unterschiedlicher Phasen über einen breiten Bereich der Zusammensetzung festgestellt [291]. Bei der Solubilisation der Steroide in den einfachen H-Systemen (1,5 µmol/ml) zeigte sich nur im Falle von TU eine geringfügige Änderung der mizellaren Größe gegenüber dem wirkstofffreien System (Abb. 31).

Dies deutet darauf hin, dass die eingebetteten Steroidmoleküle keinen signifikanten Einfluss auf die mizellare Struktur der einfachen lipidfreien H-Systeme haben. Die Moleküle der Testosteronester ordnen sich innerhalb der mizellaren Gebilde höchstwahrscheinlich (im Gegensatz zu den T-Molekülen) mit der Ketofunktion nach außen an und richten damit ihre hydrophoben Esterketten nach innen. Bei den Solubilisationsuntersuchungen kam es zu einem ungewöhnlichen Solubilisationsverhalten (Abb. 26, IV.1.1.5), das sich in einer deutlich größeren Solubilisation von T gegenüber den Testosteronestern zeigte, was auch in IV.1.2 diskutiert wurde. Mit Veresterung des T steigt die Größe sowie die Lipophilie des Moleküls und verschiebt sich seine Solubilitätsstelle im Vergleich zum T mehr in Richtung Mizellkern. Dadurch wird die Dichte im Inneren der Mizellen größer und es steigt die Abstoßung zwischen den gleich geladenen HTAB Kopfgruppen sowie folglich die Krümmung der Mizelle wieder. Infolgedessen reduzieren sich die Lebensdauer und Beständigkeit der Aggregate und somit die Solubilisation der Testosteronester gegenüber der des T beträchtlich. Dies hat aber offenbar keinen Einfluss auf die mizellare Größe bis auf TU, dessen Größe anscheinend die Entstehung etwas größerer Mizellen bewirkt. Der Befund, dass die sehr große Solubilisation des T in dem einfachen H-System trotzdem keinen deutlichen Einfluss auf die Mizellgröße hat und mit Zugabe von OS sehr deutlich abnimmt, hängt wieder mit seiner Polarität und somit seiner voranschreitenden Solubilitätsstelle in der Mizelle zusammen und steht dementsprechend im sehr guten Einklang mit den Schlussfolgerungen von *Treiner et al.* [262]. Neben der Hydroxylgruppe im T-Molekül und der Esterfunktion in den Testosteronestern besitzt die Ketogruppe auch ein Dipolmoment und damit eine Polarität, die durch eine konjugierte Doppelbindung im selben Ring sogar noch verstärkt wird. Aus der Tatsache, dass sich diese polaren Funktionen an den gegenüberliegenden Enden des T-Moleküls befinden, lässt sich schließen, dass sich diese Moleküle vermutlich paarweise anordnen, um sich im mizellaren Gerüst integrieren zu können, besonders wenn keine andere Bindungsalternative von der Umgebung wie z.B. die Doppelbindung der ungesättigten Lipide angeboten wird. Hierbei lagern sich die polaren Funktionen auf der Innenseite des Molekülpaars möglicherweise aneinander, während die hydrophoben Außenseiten in Wechselwirkung mit den hydrophoben Alkylketten des Tensids treten und dadurch die Einbettung der Moleküle in die Mizellen ermöglichen (Abb. 33 ). Die Aggregatstruktur wird in erster Linie von der molekularen Struktur des Tensids bzw. von geometrischen Kenngrößen bestimmt. Diese Kenngrößen sind das Volumen ( $V$ ) und die Länge ( $L$ ) des hydrophoben Molekülteils sowie die effektive Querschnittsoberfläche der hydrophilen Kopfgruppe ( $A$ ). Gl. IV.2-1 fasst diese Faktoren unter dem Begriff Packungsparameter  $PP$  zusammen [292,293].

$$PP = \frac{V}{A \times L} \quad \text{Gl. IV.2-1}$$

Es ließ sich in diesem Zusammenhang herausstellen, dass sich Aggregate mit um so größerer Grenzflächenkrümmung bilden, je kleiner der  $PP$  des Tensids ist und umgekehrt. Bei großen Grenzflächenkrümmungen entstehen vorzugsweise Aggregatformen wie Mizellen, während sich bei kleinen Grenzflächenkrümmungen eher flache Doppelschichten und Vesikel bilden [294-296]. Wegen der Bildung dicht gepackter Ionenpaare zwischen den elektrisch entgegengesetzt geladenen Kopfgruppen in den Mischungen kationischer und anionischer Tenside, v.a. in den äquimolaren Mischungen, reduziert sich  $A$  und steigt  $V$  gegenüber ihren Werten für die einzelnen Tensidmoleküle. Dies resultiert in einem größeren  $PP$ -Wert und führt vorzugsweise zur Entstehung flacherer Aggregatstrukturen. Je symmetrischer die Kohlenwasserstoffkettenlängen der beiden

Tenside sind, desto dichter wird ihre Packung und desto flachere Strukturen wie kristalline Gerüste entstehen. Der Abstand zwischen den benachbarten Tensidmolekülen nimmt proportional zur Differenz in der Kettenlänge der beiden Tenside zu. Obwohl solche Änderungen normalerweise sehr klein sind, haben sie großen Einfluss auf die Aggregateigenschaften. Selbst kleine Abweichungen von der Äquimolarität können infolge einer Störung des elektrostatischen Gleichgewichts eine drastische Änderung der Aggregatstruktur hervorrufen. Mit einem Überschuss vom kationischen Tensid entwickelt sich eine positive elektrische Ladungsdichte auf der Aggregatoberfläche und wächst die elektrostatische Abstoßung in der Kopfgruppenregion. Es entstehen demzufolge vorzugsweise Aggregatstrukturen wie Mischmizellen oder Vesikel, bei denen die Kopfgruppen eine größere effektive Oberfläche als bei den flacheren Strukturen zur Verfügung haben [291].

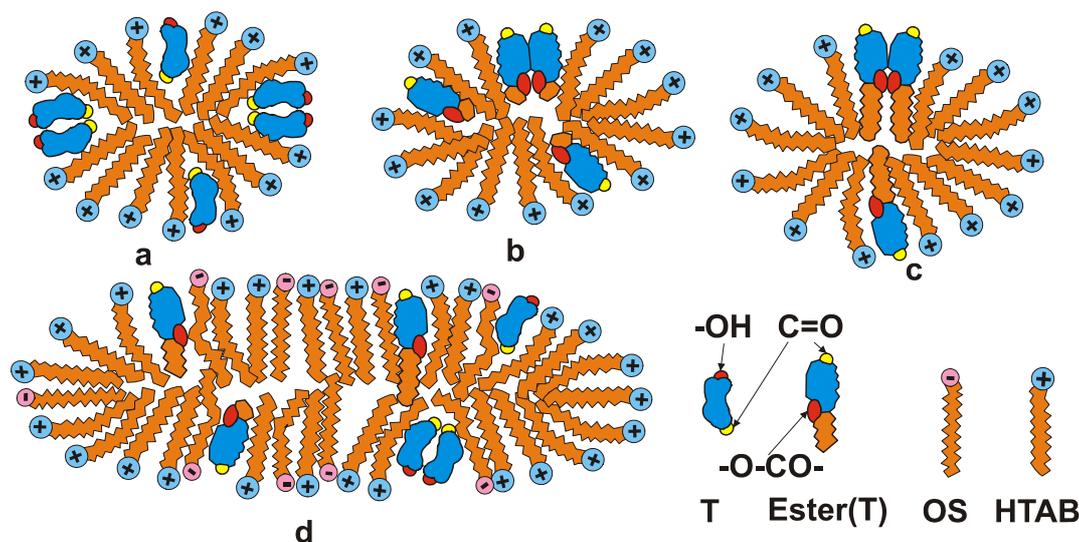


Abb. 33 Schematische Modellvorstellung zur Solubilisation in HTAB-Mizellen: einfache HTAB-Systeme mit Testosteron (a), einem kleinkettigen (b) oder einem langkettigen (c) Testosteronester; d: Solubilisation von Testosteron und seinen Estern in stäbchenförmigen HO-Mischmizellen

Die verschiedenen bei der *CONTIN*-Analyse erhaltenen Verteilungen (Abb. 32) weisen generell auf zwei mögliche Aggregatformen hin: Schnell diffundierende Aggregate, die mit separierten Mischmizellen assoziiert werden können, und langsam diffundierende Aggregate, die mit der Entstehung flacherer Makrostrukturen, wie langen ellipsenförmigen oder zylindrischen Mischmizellen, oder mit einer *Cluster*-Bildung aus mehreren Aggregaten verbunden werden können. Die Anhäufung der Aggregate stieg bei diesen Untersuchungen mit zunehmendem Gehalt an T bzw. Testosteronester und führte nach einer gewissen Lagerungszeit und Überschreitung der Solubilitätskapazität, v.a. im Falle der OS-haltigen HTAB-Systeme oder Systeme mit TE, zur *Cluster*-Bildung und zur Instabilität des Systems in Form von Ausflockung der angehäuften Aggregate oder Entwicklung schleimiger Lösungen. Die Mizellgrößen der HO-Systeme waren viel größer als die der entsprechenden OS-freien. Sie stiegen auch analog zum Solubilitätsverhalten der Testosteronestergruppe mit zunehmender Esterkettenlänge bzw. Größe und Lipophilie des Steroids bis zur Anzahl von etwa 7 C Atomen in der unverzweigten Esterkette und sanken wieder über diese Kettenlänge hinaus (Abb. 31). Zum einen fällt die Ähnlichkeit zwischen den hier untersuchten Steroiden und den o.g. Aromaten als auch lipophile Ringstrukturen mit Polarisierbarkeit auf. Zum anderen kommen die große Symmetrie zwischen den Kettenlängen von HTAB und OS und die gegensätzliche Ladung ihrer Kopfgruppen in Betracht. Betrachtet man zudem die erhaltenen zwei

verschiedenen Verteilungen bei der *CONTIN*-Analyse, ist diese drastische Änderung in der Mizellgröße basierend auf der oben eingeleiteten Diskussion höchstwahrscheinlich auf die Entstehung großer stäbchenförmiger (*rod-like*) Mischmizellen nach der Mischung mit OS zurückzuführen [262].

Die Solubilisation der hier untersuchten Steroide und die flache Struktur der stäbchenförmigen Aggregate scheinen sich auch gegenseitig zu begünstigen. Einerseits gibt es mehr Platz in den flacheren Strukturen der erhaltenen großen Mischmizellen mit OS v.a. für die größeren und lipophilen Estermoleküle (unterhalb ca. 7 C), deren Solubilisation wegen der Abnahme des *Laplace*-Drucks [262,285,297] im Mizellinneren mehr begünstigt wird. Dies spiegelt sich wiederum in einer Verbesserung der Solubilisation dieser Testosteronester in den HO-Systemen gegenüber den entsprechenden OS-freien (Abb. 25 und Abb. 26, IV.1.1.5) wider. Andererseits tragen diese Steroide mit ihren amphiphilen Strukturen zur Stabilisierung des Systems sowie zur Erhöhung des *PP* (v.a. die Testosteronester mit großem *V* der Esterketten) und somit der Entstehung flacherer Aggregatformen bei. Weiterhin kann die Solubilitätsverbesserung der Testosteronester in den HO-Systemen (siehe IV.1) auch auf eine Begünstigung ihrer Einbettung in den mizellaren Bau über die Wechselwirkung der polaren Esterfunktionen in ihrer Struktur mit der OS-Doppelbindung bzw. über *Van-der-Waals*'sche Bindungen auf dieser Ebene zurückgeführt werden. Die Mizelle wurde dementsprechend mit Zunahme der Größe, Konzentration (vergleiche TP in Abb. 31) oder Solubilisation des Steroides auch größer. Jedoch reduziert sich die Mizellgröße wieder oberhalb einer Esterkettenlänge von ca. 7 C parallel zur Abnahme der Steroidsolubilisation.

### IV.3 Bestimmung der Kapazitätsfaktoren mittels MAKE

Ziel dieser Untersuchungsreihe war es, den Unterschied zwischen den einfachen und den binären mizellaren Systemen hinsichtlich der Affinität des Steroids zu Mizellen zu charakterisieren. Dadurch war es aber auch möglich, Rückschlüsse auf die Verteilung der geladenen Zweitkomponente (OS) in der Mizelle zu ziehen, insbesondere im Falle der neutralen Br35-Systeme.

#### IV.3.1 Ergebnisse

Tabelle 13 Darstellung der mittels MAKE erhaltenen Ergebnisse und Vergleich mit der Solubilisation des T in den entsprechenden Systemen

System (+DMSO+SIII)	<i>n</i>	<i>k'</i> ± SA	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^{-4}$ [cm <sup>2</sup> /Sec.V]	SA( $\mu_{\text{eff}}$ ).10 <sup>-7</sup> [cm <sup>2</sup> /Sec.V]	Sol.(T) ± SA [μmol/ml]
G+T	4	4,19±0,05	-2,17	±16,48	0,31±0,03
GP+T	4	4,39±0,06	-2,16	±8,84	0,76±0,03
H+T	3	14,71±0,45	2,01	±7,90	3,51±0,08
HO+T	3	12,30±0,14	1,99	±6,86	2,4±0,26

Diese Versuche konnten nur mit T durchgeführt werden, da es das einzige unter den anderen hier verwendeten Steroiden ist, welches eine gewisse Löslichkeit in SPB aufweist und somit einen Substanzpeak im Elektropherogramm ergeben kann. Dabei wurde T in Konzentrationen von 45 μg/ml (ca. 156 μM) eingesetzt. Diese Konzentration wurde so ausgewählt, dass sie weit über der Löslichkeit des T im reinen SPB lag, aber trotzdem so gering blieb, dass deren Einfluss auf die mizellare Größe ausgeschlossen wurde. Dies traf v.a. bei Systemen wie z.B. HO-Systemen zu, deren Mizellgröße sich schon als empfindlich gegenüber der Steroidkonzentration erwiesen hat (IV.2). Die Ergebnisse der MMS

der ionischen Tenside NaGDC und HTAB sind in Tabelle 13 und Tabelle 14 zusammengefasst, während Abb. 34 die Elektropherogramme der MMS der BO-Systeme zeigt.

**Tabelle 14 Vergleich der erhaltenen Migrationszeiten in den Elektropherogrammen mischmizellarer Systeme ionischer Tenside mittels MAKE nach Einsatz von DMSO und SIII als Marker**

System (+DMSO+SIII)	$t_0 \pm SA: n$ (DMSO) [min]	$t_{mc} \pm SA: n$ (SIII) [min]
G+T	5,15±0,10: 5	16,25±0,82: 4
GP+T	5,17±0,05: 6	16,33±0,52: 4
H+T	6,26±0,10: 4	18,92±0,80: 3
HO+T	6,93±0,02: 7	26,40±0,36: 3

### IV.3.2 Diskussion

Kapazitätsfaktoren in MAKE geben eine Vorstellung über die Verteilung eines Wirkstoffes zwischen der wässrigen Phase und den Mizellen und nehmen normalerweise mit steigender „quantitativer“ Affinität zu den Mizellen zu. Tabelle 13 zeigt, dass diese Affinität mit der Solubilisation des Wirkstoffes in dem entsprechenden System korreliert. Bei der Bildung der L-GS-Mischmizellen nimmt die Mizellgröße (Abb. 29, IV.2.1) und somit bekanntlich die Aggregationszahl der GS-Moleküle gegenüber den einfachen GS-Mizellen deutlich zu. Dadurch kommt es zu einer Zunahme der negativen Ladung der Mizelle. Die Untersuchungen mittels MAKE lieferten jedoch beinahe identische Migrationszeiten ( $t_{mc}$ ) für beide Systeme (Tabelle 14). Nach der Lecithinzugabe zu den GS-Mizellen verringert sich die Nettoladungsdichte auf der mizellaren Oberfläche [184,298]. Diese Verringerung kommt möglicherweise durch die gemeinsame Einlagerung der GS- und der Lecithinmoleküle in die mizellare Struktur zustande, was zur Verringerung der Anzahl der GS-Moleküle pro Flächeneinheit führt. Dabei ist eine Beteiligung der eingebetteten Lecithinmoleküle an dieser Verringerung durch den positiv geladenen Trimethylaminkopf an ihrem hydrophilen Ende nicht ausgeschlossen (siehe Abb. 28). Möglicherweise gleichen die Verringerung der Nettoladungsdichte und die Zunahme der mizellaren Größe den Effekt der GS-bedingten Zunahme der negativen Oberflächenladung auf die erhaltenen Migrationszeiten bei der MAKE aus, weshalb es hier zu vergleichbaren Elektropherogramme bei der Untersuchung beider Systeme kam.

Bei den HTAB-Systemen zeigte sich hingegen ein großer Unterschied in  $t_{mc}$  zwischen den einfachen und den binären Systemen (Tabelle 14). In der Literatur findet man nur wenige und nicht zufriedenstellende Angaben zum pKs der OS in wässrigen Medien [254,299-307]. Außerdem handelt es sich bei den meisten der hier zitierten Arbeiten um die Ermittlung des scheinbaren (*apparent*) pKs der OS in bestimmten Mischungen oder unter bestimmten Bedingungen. Jedoch liegen die meisten erhaltenen pKs-Werte zwischen 4,8 und 5,2 bis auf *Kanicky & Shah* (2002) [254], die dafür einen Wert von 9,85 angeben. Die Software ACD/pKa v7.02 (ACD/I-Lab service, *Advanced Chemistry Development Inc.*, Canada) errechnet einen pKs für OS in H<sub>2</sub>O bei 20 °C von ca. 4,84. Ausgehend von einem pKs von ca. 5 sollte der größte Teil der OS-Moleküle in den hier verwendeten Tensidsystemen (pH=7,4) nach *Henderson-Hasselbalch* in seiner deprotonierten Form vorliegen. Dies gilt insbesondere im Falle der HTAB-Systeme, denn die elektrolytische Dissoziation der aliphatischen und v.a. der hydrophoben Carbonsäuren steigt deutlich in den mizellaren Lösungen von HTAB [308]. Es kam hier aber trotz der erwarteten Verringerung der positiven Ladung der mizellaren Oberfläche durch Zugabe der OS zu einer sehr signifikanten Zunahme der  $t_{mc}$  bei HO-Mizellen gegenüber den OS-freien Mizellen. Dies wurde in erster Linie auf die durch OS-Zugabe erzeugte signifikante

Änderung in der mizellaren Größe (Abb. 31, IV.2.1) und Struktur (IV.2.2) bzw. auf eine starke Zunahme der Aggregationszahl der positiv geladenen HTAB-Moleküle pro Mizelle zurückgeführt.

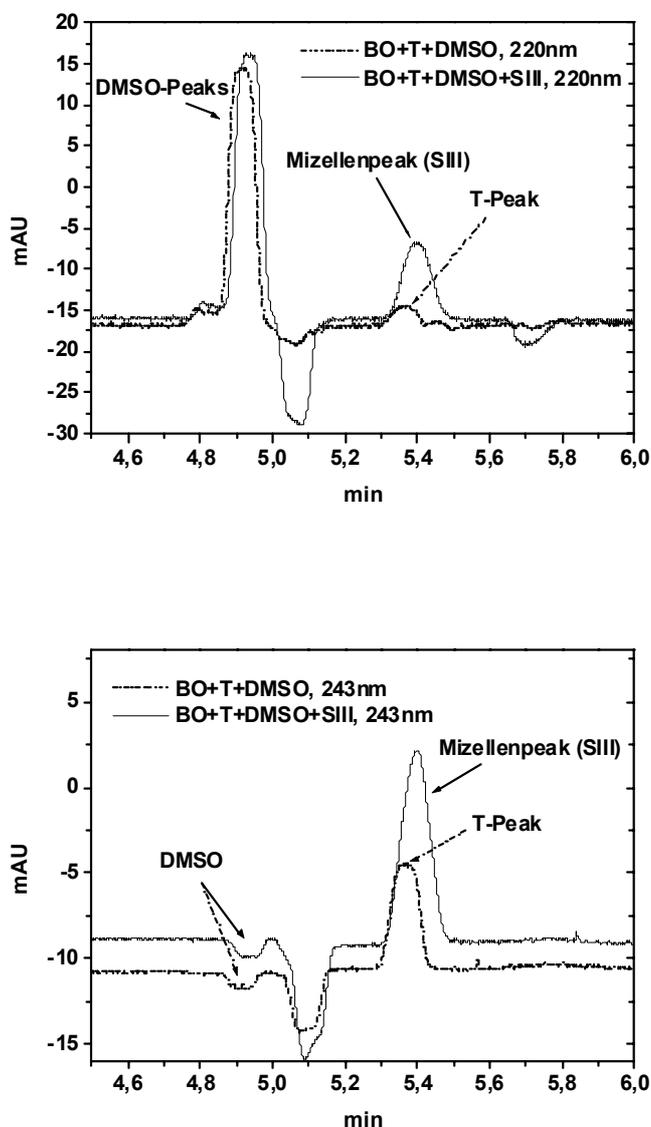


Abb. 34 Elektropherogramme des gleichen BO-Systems mit T mittels MAKE bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen, 220 nm (oben) und 243 nm (unten), und Zugabe von EOF- und Mizellenmarkern (DMSO und SIII)

Beim System BO sollte eine Trennung der verschiedenen Peaks auf Grund des großen Gehalts an den negativ geladenen OS-Molekülen in den Aggregaten erfolgen. Wie es aber aus den Elektropherogrammen der BO-Systeme in Abb. 34 zu ersehen ist, kam es hier trotzdem zu keiner beträchtlichen Trennung des mizellaren Peaks vom Peak des T und beide Peaks lagen in der unmittelbaren Nähe vom EOF-Peak. Dies steht im Einklang mit den aufgeführten Schlussfolgerungen in IV.1.2 bzw. IV.2.2 und beweist, dass die OS-Moleküle abgeschirmt tief und wahrscheinlich deswegen undissoziiert im Kern des Aggregats lagerten, so dass sie keinen Einfluss auf die Ladung der Aggregat-

oberfläche haben konnten. Demzufolge blieb diese Oberfläche elektrisch neutral und die Wanderung zum Detektor erfolgte nur auf Grund der EOF-Strömung.

#### IV.4 Ermittlung der cybotaktischen relativen Polarität mittels Z-Wert-Bestimmungen

Zusammen mit den Solubilisations-, MAKE- und Lichtstreuungsuntersuchungen sowie den verfügbaren Informationen über ähnliche Systeme aus der Literatur ermöglichte es diese Methode, Rückschlüsse über die Einordnung der solubilierten Steroide in den Mizellen zu ziehen und damit ihr Solubilisationsverhalten unter Einbeziehung der mizellaren Bau zu erklären.

##### Ergebnisse und Diskussion:

Negative Steigungen in den erhaltenen Regressionen ( $E_i$ , Z) (Tabelle 15) weisen auf einen elektronischen Übergang „Transition“ der Art  $\pi \rightarrow \pi^*$  hin [202,209], der hier mit der konjugierten Ketofunktion im Ring A der untersuchten Steroide zusammenhängt. Der Z-Wert steigt bekanntlich mit zunehmender Polarität in der unmittelbaren Umgebung der Chromophore.

Tabelle 15 errechnete Regressionsparameter (a, b) und Regressionskoeffizienten  $R^2$  nach der linearen Anpassung der ermittelten Übergangsenergien in verschiedenen Medien für die Berechnung der Z-Werte verschiedener Steroide

Steroid	$Z = aE_i + b$ ; $R^2$
T	$a = -3,73$ , $b = 523,64$ ; 0,97
TP	$a = -3,68$ , $b = 518,49$ ; 0,97
TE	$a = -3,70$ , $b = 522,31$ ; 0,96
TU	$a = -3,84$ , $b = 537,31$ ; 0,97

Die Position des solubilierten Moleküls innerhalb der Aggregatstruktur wird u.a. von geometrischen Faktoren bestimmt. Je nach chemischer Struktur der Tenside und eventuell der anderen beteiligten Moleküle ändert sich u.a. das Angebot an hydrophoben oder hydrophilen Bindungsstellen innerhalb des Aggregatgerüsts, die Packungsdichte und die resultierende Mizellgröße bzw. Mizellstruktur. Ein solubiliertes Molekül sucht sich locker gepackte Stellen im Aggregat, wo seine Einbettung möglichst durch Wechselwirkungen mit den o.g. Bindungsstellen besonders begünstigt wird und seine Position einen Kompromiss zwischen allen treibenden Kräften darstellt. Im Falle der Testosteronester zählt die Anziehungskraft ihrer polaren Ketofunktion in Richtung Mizelloberfläche zu diesen Kräften sowie auch die Anziehungskraft ihrer lipophilen Kohlenwasserstoffkette zum Mizellkern. Der Solubilisationsort soll genug Platz für diese relativ großen Moleküle und idealerweise Bindungsstellen für begünstigte Wechselwirkung mit ihrer polaren Esterfunktion bieten.

Die ermittelten Z-Werte für das T in den Systemen des Tensides NaGDC und v.a. in den binären MMS wiesen eine sehr hohe cybotaktische Polarität um die Ketofunktion auf (Abb. 35) und näherten sich sehr deutlich dem Z-Wert einer wässrigen Umgebung (Vergleich mit Tabelle 3, III.4.2). Dies zeigte in sehr guter Übereinstimmung mit den in IV.1.2 eingeführten Schlussfolgerungen von *Martis et al.* [260], dass hier die T-Moleküle nicht innerhalb der Mizellen eingeschlossen waren, sondern sie standen in unmittelbarem Kontakt mit der wässrigen Phase. Vermutlich ist die Anordnung der T-Moleküle in diesem Fall vergleichbar mit der Anordnung der Gallensalz-moleküle in diesen Strukturen. Hingegen zeigten die Z-Werte für die Testosteronester und v.a. das extrem lipophile TU, dass sich diese Moleküle im Gegensatz zum T innerhalb der Mizelle einbetten ließen. Die Z-Werte aller untersuchten Steroide in den GP-Systemen zeigten eine allgemeine Zunahme gegenüber denen in den einfachen G-Systemen. Die Einbettung in die binären Strukturen scheint hier den Steroiden einen größeren Kontakt mit der wässrigen Phase im Vergleich zu den einfachen Strukturen zu ermöglichen. Basierend auf den zuvor eingeführten Modellen zur Erschließung der Struktur von L-GS-

Mischmizellen (Abb. 28, IV.1.2) bietet sich die folgende Erklärung für das Verhalten der ermittelten Z-Werte der Testosteronester in den GP- Systemen an:

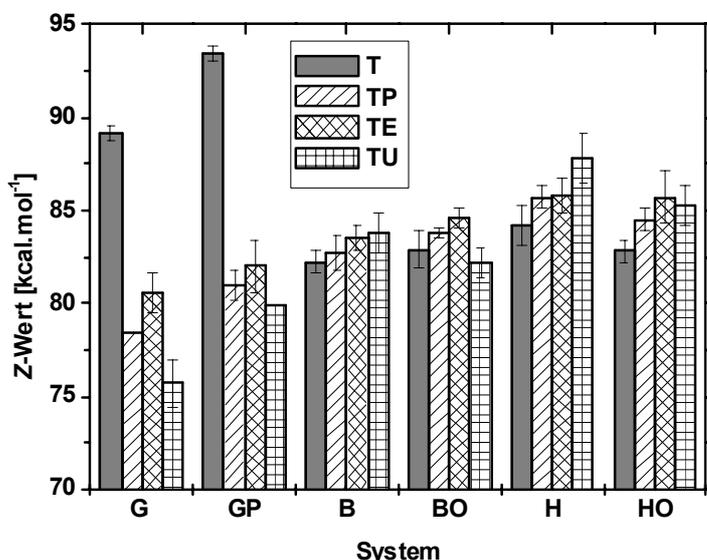


Abb. 35 Änderung der Z-Werte des Testosterons und seiner Ester in verschiedenen mizellaren Systemen

Mit Zunahme der aliphatischen Esterkettenlänge bis zu einer bestimmten Grenze (vermutlich ca. 7-9 C Atomen) wird das eingebettete Molekül in Richtung der mizellaren Oberfläche verschoben, bis die damit zunehmende Lipophilie des Moleküls die anderen Faktoren überwiegt und es somit tiefer in die Mizelle hineinzieht. Beim System G zeigen die ermittelten Z-Werte für die untersuchten Steroide ein ähnliches Verhalten wie beim System GP. Die Mizellgrößen der steroidhaltigen G-Systeme waren vergleichbar mit der des steroidfreien Systems G (Abb. 29, IV.2.1) (kein Hinweis auf eine Änderung der mizellaren Struktur durch die Einbettung der Testosteronester). In Abwesenheit ausreichender Informationen und Strukturvorstellungen zu den testosteronesterhaltigen GS-Mizellen kann die o.g. Erklärung jedoch auf die Ergebnisse der Testosteronester in den einfachen G-Systemen nicht übertragen werden.

In den Br35-Mizellen lassen sich die Steroide hauptsächlich in der unhydratisierten konzentrierten Polyoxyethylenregion solubilisieren. Bei der Verwendung binärer Br35-Systeme mit OS werden Br35-Aggregate etwas größer und es wird diesen Steroiden bei hoher Konzentration je nach ihrer Lipophilie ein zweiter Solubilisationsort im öligen lipophilen Aggregatkern angeboten; folglich verbessert sich ihre Solubilisation (IV.2.2). Wegen der hohen Polarität der Hydroxylfunktion lassen sich die T-Moleküle höchstwahrscheinlich umgekehrt im Vergleich zu den Testosteronestern im Aggregatgerüst ausrichten, wobei die Hydroxylgruppe nach außen und die Ketofunktion zum Aggregatzentrum orientiert werden. Verglichen mit den Ketofunktionen der Testosteronester platzierte sich die Ketofunktion des T auf Grund dieser umgekehrten Orientierung in der unpolarsten Umgebung bzw. der tiefsten Position innerhalb der o.g. Polyoxyethylen-schicht (Abb. 36), wie sich anhand der Z-Wert-Messungen gezeigt hat (Abb. 35). Bei den einfachen B-Systemen scheint die lipophile Alkylkettenregion im Mizellkern dicht gepackt zu sein, so dass der steroidale Ring und damit die Ketofunktion der Testosteronester mit zunehmenden Esterkettenlängen eher in die gegensätzliche Richtung

nach den polaren Polyoxyethylenschichten verschoben werden müssen. Mit Ausnahme vom TU zeigten die Z-Wert-Messungen allgemein eine polarere Umgebung der Ketofunktionen der Steroide bei den BO-Systemen als die bei den einfachen B-Systemen. Mit der Zunahme des mizellaren Radius oder auch eventuell durch die Penetration einiger OS-Moleküle in die unhydratisierte Polyoxyethylenschicht kommt es vermutlich zur Lockerung der Packung in dieser Schicht, wodurch einige Wassermolekülen in diese Schicht tiefer eindringen können und somit eine Zunahme der Hydratation bzw. der relativen Polarität in der Umgebung bewirken. Nach Zusatz der OS und Zunahme der Aggregatgröße mit der Lagerung der OS im öligen Aggregatkern überwiegt anscheinend die hohe Lipophilie des TU-Moleküls die anderen Faktoren. Infolgedessen wird es tiefer zum öligen lipophilen Aggregatkern gezogen und der hydrophobe Mizellkern wird zur Hauptsolubilisationsstelle für TU, wie sich anhand der deutlichen Senkung seines Z-Werts im System BO gegenüber dem System B herausstellen lässt. Mit einem Z-Wert von ca.  $82,2 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$  lag dennoch seine Ketofunktion immer noch in einer relativ polaren Region, die fast der Polarität eines 90%-igen EtOH-Wasser-Gemisches (V/V) entspricht (Tabelle 3, III.4.2). Aufgrund dieser Polarität und der hohen Lipophilie dieses Moleküls liegt die Vermutung nahe, dass es sich hier um die nächsten Polyoxyethylenschichten zur Kontaktschicht mit der Ölmasse im Aggregatkern handelt. Besonders durch die hohe Lipophilie des wegen der OS größeren und lockerer gepackten Aggregatkerns sowie auch eine mögliche Wechselwirkung der Doppelbindung der OS mit der Esterfunktion in der TU-Struktur wird die Solubilisation der großen und lipophilen TU-Moleküle hier begünstigt.

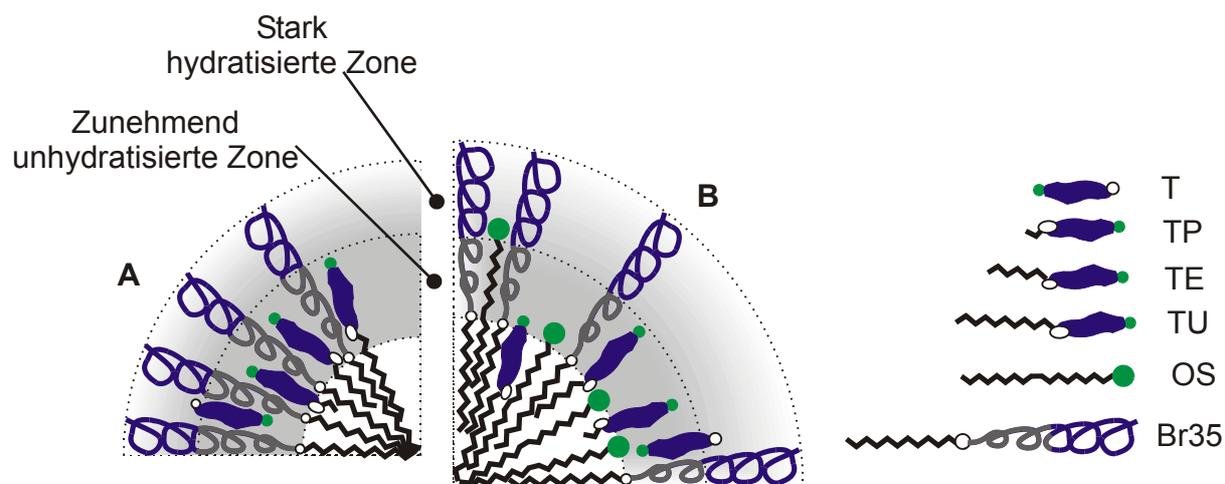


Abb. 36 Schematische Darstellung der wahrscheinlichen Anordnung verschiedener Komponenten in der mizellaren Struktur der einfachen Br35-Systeme (A) und der binären OS-Br35-Systeme (B)

Eine umgekehrte Orientierung der T-Moleküle wird ebenso in den HTAB-Systemen erwartet und erklärt hier ihre relativ kleinen Z-Werte gegenüber den untersuchten Testosteronestern (Abb. 35) trotz der erwarteten voranschreitenden Position zwischen den Tensidkopfgruppen (siehe IV.1.2). Die Mizellgröße bei den einfachen H-Systemen blieb größtenteils unabhängig von dem eingebetteten Steroid bzw. seiner Größe (Abb. 31, IV.2.1), während der Z-Wert mit zunehmender Esterkettenlänge stieg (Abb. 35). Dies führt zur Annahme, dass die lipophile Alkylkettenregion im Mizellkern so dicht gepackt ist, dass der steroidale Ring und damit die Ketofunktion der Testosteronester mit zunehmenden Esterkettenlängen in die gegensätzliche Richtung, d.h. in Richtung der mizellaren Oberfläche, verschoben werden muss (Abb. 33, a, b und c). Die Packung der Ketten im Mizellinneren wird mit Einfügung der OS-Moleküle vermutlich lockerer (siehe IV.1.2), was dementsprechend eine tiefere Penetration der untersuchten Steroide im

mizellaren Gerüst ermöglicht. Dies trifft aber ganz besonders auf Testosteronester erhöhter Lipophilie wie TU zu. Aufgrund der hohen Lipophilie dieser Steroide können ihre Moleküle den Packungswiderstand im Mizellinneren überwinden und somit vergleichsweise tiefer in die Mizelle eindringen (Abb. 35).

#### **IV.5 Zusammenfassung zur Solubilisation und Mizellbildung**

In diesem Teil der Arbeit wurden Formulierungen mizellarer bzw. mischmizellarer Systeme zum Einsatz in den Resorptionsuntersuchungen im zweiten Teil der Arbeit entwickelt. Weiterhin wurde der Versuch unternommen, durch den mizellaren Bau, Erklärungen für das Solubilitätsverhalten der untersuchten Steroide (T und Testosteronester) in diesen Systemen zu finden. Neben dem einen anionischen, kationischen oder neutralen Tensid sollten die Mischsysteme ein oder mehrere Lipide (Fettsäure und Lecithine) enthalten. Dafür kamen hier gesättigte und ungesättigte Sojalecithine sowie Ölsäure und Stearinsäure zum Einsatz. Neben den erhaltenen Ergebnissen der hier angewandten Messmethoden bauten die Erklärungen auch auf den vorhandenen Informationen und Modellvorstellungen zum mizellaren Bau ähnlicher Systeme aus der Literatur auf. Hierbei unterschieden sich bereits die angenommenen Modellvorstellungen je nach verwendeter Tensidart oder Systemmischung.

Es hat sich in diesem Zusammenhang herausgestellt, dass sich unabhängig vom verwendeten Tensid die ungesättigten Lipide besser als die gesättigten für die Mizellbildung eignen. Höchstwahrscheinlich wird die Einbettung der Steroide in die Aggregate über Wechselwirkungen ihrer polaren Funktionen mit der Doppelbindung der ungesättigten Lipide begünstigt. Weiterhin zeigte es sich, dass die optimierten binären Systeme besser als die einfachen und die ternären für die Solubilisierung lipophiler neutral geladener Steroide sind (Ausnahme: Solubilisierung des T in HTAB). Die besten Solubilitäten der untersuchten Steroidreihe wurden jedoch allgemein in den Systemen des kationischen Tensids HTAB erzielt. Bei der Entwicklung der ternären Systeme mit den Tensiden Br35 und HTAB konnte kein deutlicher gegenseitiger Einfluss der Lipide auf ihre Solubilitäten festgestellt werden, während die Mischung der NaGDC-Systeme mit dem einen Lipid zu einer deutlichen Verringerung der Solubilitätskapazität des Systems für den zweiten führte. Wegen seiner strukturellen Eigenschaften, insbesondere seiner mittelgroßen Esterkettenlänge, erwies sich TE als am besten geeignet für die Aggregatbildung unter den verglichenen Steroiden. Dies verdeutlichte sich in erster Linie durch seine deutlich höheren Sättigungskonzentrationen in allen untersuchten Systemen im Vergleich zu den anderen untersuchten Steroiden. Die Sättigung der untersuchten Systeme mit TE ergab jedoch trotz der Filtration solubilitätsmilchig trübe Aggregatssysteme. Dies bedeutet eine deutliche Abweichung von der mizellaren Struktur bei diesen Konzentrationen und weist womöglich auf die Entstehung von Vesikelsystemen hin.

Auch durch die Einbettung verschieden großer Steroide ließen sich die mizellaren Größen der einfachen Systeme nicht entscheidend ändern. Eine deutliche Zunahme der Aggregatgröße ergab sich aber erst nach Lipidzugabe zu den verschiedenen Systemen. Bei den Br35- und NaGDC-Systemen blieb diese Änderung im allgemeinen unabhängig von der Molekülgröße des Steroids, sie reduzierte sich jedoch geringfügig bei den NaGDC-Systemen gegenüber dem entsprechenden binären steroidfreien System. Die Zunahme der Mizellgröße bei den NaGDC-Systemen nach Zugabe des P90G steht im Zusammenhang mit der Entstehung großer L-GS-Mischmizellen, deren Eigenschaften und mögliche Strukturen in der Literatur noch umstritten sind. Bei den Br35-Systemen war diese Änderung der Aggregatgröße relativ klein im Vergleich zu den anderen unter-

suchten Systemen und wurde mit der Lagerung der OS im lipophilen Aggregatkern in Zusammenhang gebracht. Die deutliche Zunahme der Mizellgröße und der positiven Ladung der Mizelle bei den HTAB-Systemen nach Zugabe der OS wurde hier auf die Entstehung deutlich größerer stäbchenförmiger Mischmizellen zurückgeführt. Bemerkenswert war dabei aber, dass diese Änderung der Mizellgröße eine Abhängigkeit von der Molekülgröße des solubilisierten Steroids aufwies. Dies wurde basierend auf den amphiphilen Eigenschaften dieser Steroide mit ihrer aktiven Unterstützung der Bildung stäbchenförmiger Mischmizellen und Erhöhung des Packungsparameters ( $PP$ ) mit zunehmender Esterkettenlänge begründet.

Durch die Bildung der großen P90G-NaGDC-MMS bzw. die Zunahme der Anzahl von aggregierten negativ geladenen Tensidmolekülen pro Mizelle wird eine Zunahme der negativen Oberflächenladung erwartet. Die große Anzahl eingebetteter Lecithinmoleküle im mizellaren Gerüst ( $\mu_L \approx 0,5$ ) gleicht aber diesen Effekt durch die Verringerung der Nettoladungsdichte auf der mizellaren Oberfläche (siehe z.B. das „*radial shell*“-Modell nach *Ulmus et al.* (1982) in Abb. 28) und womöglich auch durch die positiv geladenen Trimethylaminkopfgruppen der PL aus. Es kommt daher schließlich zu keiner deutlichen Änderung der erhaltenen effektiven Mobilität der Mischmizellen gegenüber den einfachen lipidfreien NaGDC-Mizellen bei der MAKE. Die OS-Moleküle lagern sich bei den Br35-Systemen im lipophilen öligen Aggregatkern, so dass es zu keiner Änderung der elektrischen Oberflächenladung der Aggregate kommt. Bei den HTAB-Systemen nimmt die positive effektive Oberflächenladung durch die Bildung großer OS-HTAB-MMS bzw. durch die erhöhte Aggregationszahl der HTAB-Moleküle mit relativ kleiner Anzahl der eingebetteten OS-Moleküle deutlich zu.

Weiterhin führt die Lipidzugabe bei NaGDC- und Br35-Systemen zur Erhöhung der Polarität bzw. des Hydratationsgrades der äußeren Aggregatschicht im Vergleich zu den einfachen lipidfreien Systemen. Aufgrund der Änderungen im mizellaren Bau und Verringerung der Kettenadhäsion im hydrophoben Mizellinneren nach der OS-Zugabe bei den HTAB-Systemen verschieben sich die Solubilitätsstellen der eingebetteten Steroidmoleküle tiefer zu lipophileren Positionen innerhalb des mizellaren Gerüsts.

Wegen seiner gewissen amphiphilen Eigenschaften und relativ kleinen Molekülgröße unterscheidet sich das T wesentlich von seinen Estern hinsichtlich der Einbettung bzw. der Solubilitätsstellen im Aggregatgerüst. Während sich alle Testosteronester in den lipophilen Seiten innerhalb der Aggregatstrukturen einordnen, lässt sich T aus diesem Grund eher in den hydrophilen Seiten einbetten. Dies zeigte sich am deutlichsten in den NaGDC-Systemen, wobei sogar starke Hinweise auf seine vollständige Einordnung in der mizellaren Oberfläche gefunden wurden. Bei den HTAB-Systemen führte dies auch dazu, dass sich das T in einer voranschreitenden Position zwischen den sich gegenseitig abstoßenden Kopfgruppen des HTAB einordnete, wodurch sich wiederum die o.g. Abweichung des Solubilitätsverhaltens des T und seine große Solubilität im einfachen HTAB-System begründen ließen. Bei den Br35-Systemen ergaben sich aus dem gleichen Grund auch Hinweise, dass sich T hauptsächlich weiter außen in der unhydratisierten Polyoxyethylenschicht im Vergleich zu den Testosteronestern solubilisieren lässt. Darüber hinaus unterscheidet sich das T-Molekül von den untersuchten Testosteronestern auch in seiner umgekehrten Orientierung innerhalb der Aggregate, wobei die Ketofunktion zum Mizellkern und die Hydroxylgruppe zur mizellaren Oberfläche gerichtet werden.

Mit Ausnahme der Solubilisation des T im HTAB-System wurde ein einheitliches Solubilitätsverhalten der Steroide bei allen Systemen festgestellt. Dies zeigt sich in einer Zunahme der Solubilisation mit zunehmender Lipophilie bzw. Esterkettenlänge, bis die Größe des Moleküls eine Grenze erreicht (ca. 7-9 C-Atomen in der unverzweigten Esterkette), über die hinaus die Solubilisation wieder abnimmt. Ein Zusammenhang zwischen der Solubilisation und der Affinität des Steroids zur Mizellenphase wurde ebenfalls demonstriert. Neben Struktur und Größe der Aggregate spielen auch die strukturellen Eigenschaften des Steroids wie seine Größe, Lipophilie und Verteilung der polaren und lipophilen Stellen in seiner Struktur eine wichtige Rolle in seiner Solubilisation und bestimmen seine Einbettungsweise innerhalb der Aggregate. Während sich beispielsweise die polaren Funktionen des Steroids wie die Hydroxylgruppe oder die konjugierte Ketofunktion die hydrophilen Stellen in den Aggregaten suchen und das Steroidmolekül in die Richtung der Aggregatoberfläche ziehen, suchen sich sein hydrophober steroidaler Ring und ggfs. sein hydrophober Esterrest die lipophilen Stellen im Aggregatinneren und ziehen es dementsprechend tiefer in die Gegenrichtung. Die Einbettung wird daher auch besonders begünstigt, wenn die zweipolare Stelle in der Steroidstruktur wie die Ketogruppe oder ggfs. die Estergruppe in Wechselwirkung mit anderen polarisierbaren Stellen in der Umgebung wie z.B. der Doppelbindung der eingebetteten ungesättigten Lipide treten kann. Mit zunehmender Esterkettenlänge steigt die Lipophilie, aber auch die Größe des Testosteronesters an. Die letzten zwei Faktoren beeinflussen die Einbettung dieser Moleküle entgegengesetzt. Einerseits zieht die höhere Lipophilie das Molekül tiefer in das Aggregat und verbessert seine Solubilisation im lipophilen Aggregatinneren. Andererseits muss das Steroidmolekül aufgrund seiner wachsenden Größe weiter in Richtung Mizelloberfläche verschoben werden, v.a. wenn der lipophile Mizellenkern klein oder dicht gepackt ist. Infolgedessen verringert sich wieder die Solubilisation größerer Ester wie TU. Einen weiteren wichtigen Faktor stellt daher die Dichte der Packung der Kohlenwasserstoffreste im hydrophoben Mizelleninneren dar, die meist durch Einfügung der ungesättigten Lipide aufgelockert wird. Die Endposition des solubilitätsierten Steroids im Aggregatbau sowie sein Solubilitätsverhalten werden im Endeffekt von der Wirkungssumme all dieser Faktoren zusammen bestimmt und spiegeln demzufolge den Kompromiss zwischen ihnen wider.

*"Angesichts von Hindernissen mag die kürzeste Linie  
zwischen zwei Punkten die krumme sein."*

*aus Berthold Brecht "Leben des Galilei"*

## KAPITEL V

### Resorptionsuntersuchungen

Durch die Besonderheit des untersuchten Themas, die in der Verwendung stark lipophiler Arzneistoffe und mizellarer Tensidsysteme besteht, ergaben sich Schwierigkeiten in der Modellierung des Transports bei diesen Untersuchungen. Die klassischen *In-vitro*-Methoden basieren alle auf der Aufnahme des Wirkstoffes in die wässrige Lösung des AK, sowie auf einer durchschnittlichen Affinität des Wirkstoffes zur Modellmembran, wobei aber die Freigabe des diffundierenden Wirkstoffes an der Akzeptorseite trotzdem gewährleistet bleibt. Dabei baut sich anschließend ein quasi-stationärer Zustand im Permeationsmodell (*Steady-State*) auf, wodurch eine quantitative Beschreibung des Transports und die Errechnung der scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten mithilfe einer aus dem ersten *Fick'schen* Diffusionsgesetz abgeleiteten Funktion möglich werden. Die schlechte Löslichkeit der untersuchten Modellstoffe in einfachen wässrigen Medien erforderte die Suche nach einem wässrigen Lösungsmittel für das AK bei den Untersuchungen mit der *Ussing*-Kammer und die Entwicklung der dazugehörigen Analytik. Das ausgewählte Lösungsmittel im AK darf der verwendeten Membranen keine Schäden zufügen und muss zugleich für ausreichende Aufnahme der diffundierenden Wirkstoffe bzw. Sinkbedingungen auf der Akzeptorseite sorgen. Andere Schwierigkeiten bei der Modellierung der Resorption ergaben sich durch die zu hohe Affinität der stark lipophilen Wirkstoffe zu den verwendeten Membranen (erschwerter Freigabe an der Akzeptorseite), den membranschädlichen Effekt der mizellaren Tensidsystemen v.a. auf die biologischen Membranen (weshalb hier beispielsweise die Verwendung von Caco-2-Monolayern nicht möglich war [163,235,309]; siehe hierzu auch II.7), und durch den metabolischen Abbau der Steroide während der Resorption durch die Biomembranen. Dazu ergaben sich bei den pharmakokinetischen *In-situ*-Untersuchungen auch Schwierigkeiten, die später im betreffenden Abschnitt (V.1.3) diskutiert werden. Bei der Diskussion der erhaltenen Ergebnisse wird in der vorliegenden Arbeit von der Theorie ausgegangen, dass die Übergabe der stark lipophilen schwerlöslichen Steroide prinzipiell durch die Berührung oder Kollision der mizellaren Trägern mit der Epithelmembran erfolgt.

#### V.1 Ergebnisse und Diskussion

##### V.1.1 Untersuchungen zur passiven Diffusion mithilfe des Permeationsmodells nach Fürst-Neubert

Die Wirkstoffresorption im GIT ist ein komplizierter Prozess, der die Überwindung verschiedener Barrieren beinhaltet, wie es zuvor im KAPITEL II dargestellt wurde. Die Hauptbarriere für die Resorption nichtionischer lipophiler und v.a. extrem lipophiler Substanzen ist jedoch die intestinale Epithelmembran [5]. Die Resorption dieser Substanzen durch die Lipidmembranen der Epithelzellen in GIT erfolgt hauptsächlich über passive Transportvorgänge (Diffusion). Für die Untersuchung des Einflusses der Einbettung dieser Substanzen in mischmizellaren Trägern auf diese Vorgänge wurde hier das Permeationsmodell nach *Fürst-Neubert* eingesetzt, bei dem die Dodecanol-Collodium-Membranen als rein physikalische Lipidbarrieren dienen.

In den Proben des AK zu den verschiedenen Entnahmezeiten konnten keine Testosteronester nachgewiesen werden. Nur beim System TP/BO konnten nach einer gewissen Zeit sehr geringfügige Konzentrationen von TP im AK gefunden werden (unterhalb der

BG), deren Änderungen während des Versuchsverlaufes unsignifikant blieben. Da damit die Bedingung des quasi-stationären Zustands unerfüllt bleibt, kann Gl. II.8-1 für die Beschreibung der Permeation nicht angewandt werden, und es kommt hier an ihrer Stelle Gl. II.8-3 zum Einsatz. Durch die Umstellung der letzten Gleichung erhält man die Differentialgleichung Gl. V.1-1:

$$dM_D = \left( -FKC_D \sqrt{\frac{D_M}{\pi}} \right) t^{-\frac{1}{2}} \cdot dt \quad \text{Gl. V.1-1}$$

Die partikuläre Lösung dieser Gleichung für das Intervall  $[t_0=0 ; t_n=t]$  ergibt die Funktion Gl. V.1-2.

$$M_{D(t)} - M_{D(0)} = -2FKC_D \sqrt{\frac{D_M}{\pi}} t^{\frac{1}{2}} \quad \text{Gl. V.1-2}$$

Da  $M_{D(0)} = V_D C_D$ , wobei  $V_D$  das Lösungsvolumen im DK ist, kann Gl. V.1-2 in Gl. V.1-3 umgeformt werden.

$$M_{D(t)} = \left( -2FK \sqrt{\frac{D_M \cdot t}{\pi}} + V_D \right) C_D \quad \text{Gl. V.1-3}$$

Da die untersuchten stark lipophilen Wirkstoffe unlöslich in Wasser sind, wird  $K$  hier als der Verteilungskoeffizient (Membran/Mizellen) betrachtet. Mithilfe dieser Funktion und eines geeigneten Programms für nichtlineare Kurvenanpassung (hier wurde die Software Origin® angewandt) können dann die Parameter  $K$  und  $D_M$  über die Messdaten geschätzt werden. Abb. 37 zeigt die Messdaten mit den zugehörigen Anpassungskurven, während Abb. 38 die geschätzten Diffusions- und Verteilungskoeffizienten der untersuchten Testosteronester bei der Verwendung verschiedener MMS zusammenfasst. Die erhaltenen  $\chi^2$ - und  $R^2$ -Werte (Tabelle 16) zeigen eine sehr gute Anpassung der hier abgeleiteten Funktion (Gl. V.1-3) an die Messdaten.

Der nicht nachweisbare Diffusion der resorbierten Testosteronester zum AK kann einerseits auf die hohe Lipophilie dieser Stoffe und dementsprechend auf ihre hohe Affinität zur Lipidmembran zurückgeführt werden. Andererseits kann der Übergang der diffundierenden Testosteronester innerhalb der Membran zur mizellaren Phase auf der Akzeptor-seite möglicherweise durch die Grenzschichtbarriere auf der Membranoberfläche auf dieser Seite verhindert werden, insbesondere bei den elektrisch geladenen Mizellen (II.4).

Mit zunehmender Solubilisierungskraft des Tensides für die Steroide (siehe Abb. 17 oder Abb. 26) nahm die Resorption der Testosteronester ab (Abb. 37). Ebenso nahmen damit allgemein auch die Werte der Diffusions- und Verteilungskoeffizienten abgesehen vom verwendeten Testosteronester bzw. seiner Lipophilie ab (Abb. 38). Dieser Effekt zeigt sich jedoch noch deutlicher bei den lipophileren Estern (Abb. 37, Abb. 38). Bei den Untersuchungen mit dem System TE/HO ergaben sich während des Versuchsverlaufes keine signifikanten Änderungen der Konzentration vom TE im DK (weshalb dieser Versuch in der Abb. 37 nicht präsentiert wurde). Dies deutet allgemein auf eine zunehmend erschwerte Übergabe der Testosteronester von den Mischmizellen an die Membran wegen der erhöhten Affinität zur mizellaren Phase infolge der Erhöhung sowohl der Wirkstofflipophilie als auch der Solubilisierungskapazität des betrachteten mizellaren Systems hin. Allein durch die Solubilisierungskapazitäten der mizellaren Systeme kann man jedoch keine einheitliche Erklärung für die erhaltenen Resorptionsergebnisse bieten.

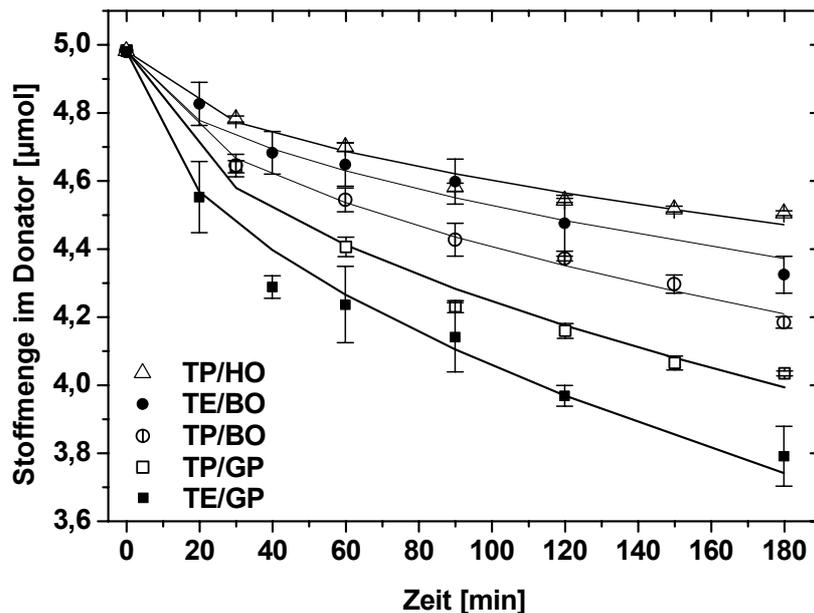


Abb. 37 Normiertes zeitabhängiges Abnahmeprofil der Konzentrationen solubilisierter Steroide in verschiedenen mischmizellaren Systemen im DK ( $n=3, \bar{Y} \pm SA$ ) bei 37 °C mittels des Transportmodells nach Fürst-Neubert

Tabelle 16 Erhaltene  $\chi^2$ - und  $R^2$ -Werte bei der nichtlinearen Kurvenanpassung der ermittelten Resorptionsdaten (Abb. 37) nach Gl. V.1-3 als Indikatoren für die Gute der Anpassung

	TP/GP	TP/BO	TP/HO	TE/GP	TE/BO
$\chi^2$	0,0017	0,0009	0,0006	0,0072	0,0039
$R^2$	0,985	0,986	0,98	0,952	0,917

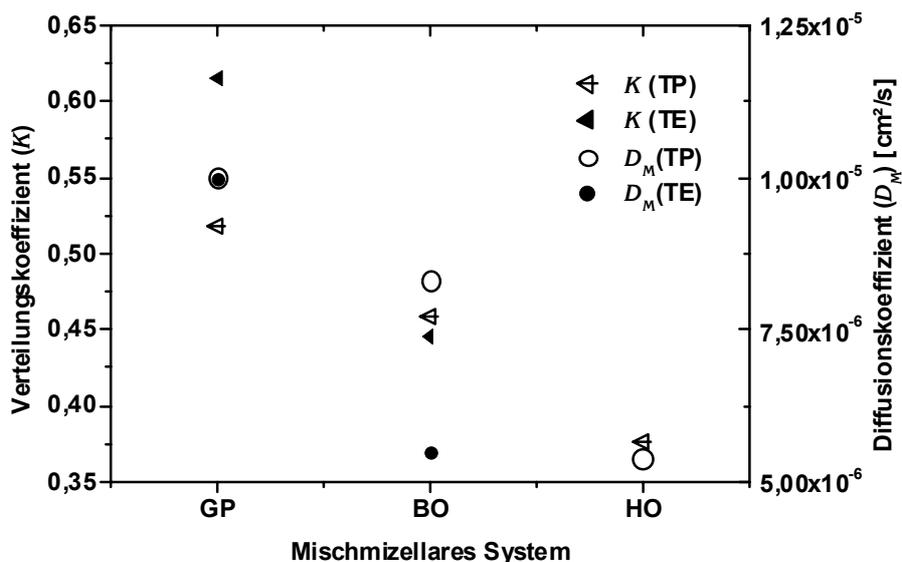


Abb. 38 Mithilfe der nicht linearen Regression nach Gl. V.1-3 (Abb. 37) bestimmten Verteilungs- und Diffusionskoeffizienten verschiedener Testosteronester in verschiedenen MMS

Obwohl nach der Lipidzugabe zu den mizellaren Systemen das NaGDC-System eine deutlich höhere Solubilisationskapazität für TP als das Br35-System aufwies (Abb. 26), wurde mit dem System GP einen besseren Wirkstofftransport als mit BO erreicht (Abb. 37). Dies führte zur Differenzierung zwischen einer quantitativen Affinität eines mizellaren Tensidsystems für einen gegebenen Wirkstoff im Sinne von der Solubilisierungskapazität und einer qualitativen im Sinne von der Stärke der wirkstoffbindenden Wechselwirkungen, wie die Diskussion später anhand des Beispiels mit den HTAB-Systemen in V.1.2.2 auch zeigen wird.

Beim System GP führte die Verwendung lipophileren Testosteronesters zur Verbesserung der Resorption. Möglicherweise kommt dies aufgrund einer entsprechend erhöhten Affinität zur Membran zustande. Diese Schlussfolgerung kann anhand der erhaltenen  $K$ - und  $D_M$ -Werte für dieses System (Abb. 38) bekräftigt werden. Bei GP blieb der  $D_M$ -Wert trotz der Verwendung eines lipophileren Esters konstant, während der  $K$ -Wert dadurch sehr deutlich zunahm, was eine Verschiebung der Wirkstoffverteilung zugunsten der Membran bedeutet.

Bei dem System BO hingegen bewirkte die Erhöhung der Lipophilie eine Verringerung der Resorption, möglicherweise, weil die Affinität zur mizellaren Phase höher wird. Anscheinend bieten die BO-Mizellen innerhalb ihrer Struktur eine lipophilere Umgebung oder stärkere intermolekulare Wechselwirkungen mit dem Wirkstoff als die Membran oder die NaGDC-Systeme an. Dies wird durch die erhaltenen  $K$ -Werte der Systeme TP/BO und TE/BO gestützt (beide waren unterhalb 0,5) (Abb. 38). Bei der Verwendung von lipophileren Estern ändert sich der  $K$ -Wert nur geringfügig, während sich unerwartet der  $D_M$  deutlich verringert. Neben der erwarteten Zunahme der Affinität zum lipophilen Mizellinneren bei Zunahme der Lipophilie des eingebetteten Wirkstoffes ist hier auch mit einem zunehmend erschwerten Übergang der Wirkstoffmoleküle vom Mizellinneren zur Membran zu rechnen, da diese bei ihrer Diffusion einen entsprechend erhöhten Widerstand der polaren, hoch hydratisierten, äußeren mizellaren Schale (siehe Abb. 36 und IV.2.2) und der Grenzschichtbarriere überwinden müssen. Dies kann hier eine entscheidende Rolle beim Transport spielen und möglicherweise der unerwarteten Herabsetzung des erhaltenen  $D_M$ -Wertes zugrunde liegen.

### **V.1.2 Resorptionsuntersuchungen mit Hilfe der Ussing-Kammer**

Die Untersuchung der Wechselwirkung der mischmizellaren Träger mit den natürlichen Barrieren der Darmmukosa und des dadurch bedingten Transports der eingebetteten Wirkstoffe erfordert die Verwendung von nativen Dünndarmsegmenten. Dies erfolgte mittels der Ussing-Kammer-Technik, die trotz gewisser Einschränkungen (siehe III.9) hinsichtlich des hier angestrebten Versuchszwecks eine zufriedenstellende Nachbildung des physiologischen intestinalen Transportprozesses ermöglichte.

#### **V.1.2.1 Einfluss des eingesetzten mizellaren Systems auf den Transport des Testosterons durch Mäuse-Dünndarm-Abschnitte**

Für diese Untersuchungsreihe wurde T als Modellstoff verwendet. Zum einen demonstrierte dieses bekanntlich anhand unterschiedlicher Untersuchungen (siehe II.5 und II.6) gute Permeationseigenschaften durch die Epithelmembranen und weist trotz seiner Lipophilie eine gewisse Wasserlöslichkeit (IV.1) auf. Dies ermöglichte es, den Transport durch Vermessen von Proben aus dem AK zu untersuchen und das transportierte T bei der Verwendung verschiedener mizellarer Lösungen mit seinem Transport in einer tensidfreien Lösung (Kontrolllösung, Ktrl.) zu vergleichen. Zum anderen ermöglicht die Verfügbarkeit von radioaktivmarkiertem T durch die hohe Empfindlichkeit der Flüssig-

szintillationsmethode, Messungen mit erhöhter Genauigkeit und kleinen NG vorzunehmen. Ohne Einbeziehung des Einflusses des metabolischen Abbaus und der Membrantransporter (II.5, II.6) auf die Konzentrationsprofile des T in beiden Kammern können hier aber keine quantitativen Aussagen über den Transport getroffen werden. D.h., die Gleichung Gl. II.8-1 konnte auch hier für die Berechnung des scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten  $P_s$  nicht angewandt werden. Der Vergleich der Transporteigenschaften der verschiedenen mizellaren Systeme erfolgte daher einfach anhand der Konzentrationsdiagramme des T (Abb. 39). Dabei wurde angenommen, dass die gemessene Radioaktivität im AK nur von den Transporteigenschaften der verglichenen mizellaren Träger abhängt. In anderen Worten, dass ggfs. Sondereinflüsse der Tensidsysteme auf Membrantransporter und Verstoffwechslung der Steroide bei diesen Untersuchungen alle gleich vernachlässigbar sind.

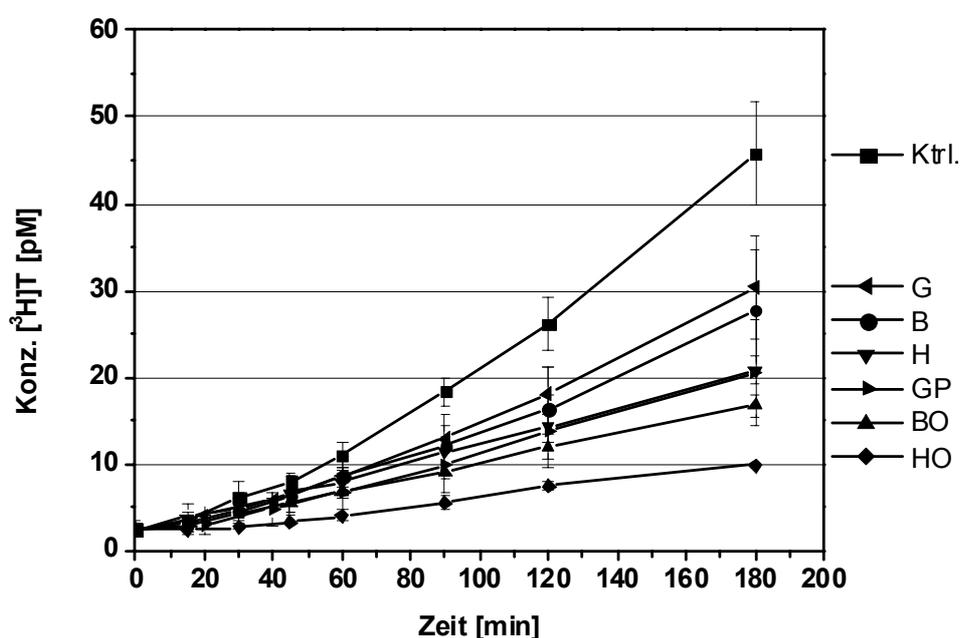


Abb. 39 Normierte Zunahmeprofile der  $[^3\text{H}]\text{T}$ -Konzentrationen in der Akzeptorkammer in Abhängigkeit vom verwendeten mizellaren System bei *Ussing*-Kammer-Untersuchungen durch Mäuse-Dünndarm-Abschnitte, Ktrl.: Kontrolle (reine KRBP Lösung)

Die Messungen zeigen eine deutliche Verringerung des Transports des T infolge des mizellaren Einschusses gegenüber seinem Transport in der einfachen KRBP-Lösung (Ktrl.), insbesondere bei den MMS. Frühere Arbeiten zeigten auch eine Verringerung der intestinalen Resorption lipophiler Arzneistoffe wie Griseofulvin, Ketoconazol und Dantrolene ( $\log D \approx 1,3-1,5$ ) bei der Anwesenheit von einfachen und mischmizellaren GS-Systemen gegenüber den wässrigen tensidfreien Lösungen [149,151,185]. Dies wurde bei den eben genannten Arbeiten auf die Zunahme der Solubilisation in den Mizellen zurückgeführt. Wie sich im Laufe der Diskussion zeigen wird, lässt sich diese Erklärung aber nicht bedingungslos auf alle anderen Systeme übertragen. Zwar ist die Solubilisierungskraft eines mizellaren Systems für einen eingebetteten Wirkstoff von entscheidender Bedeutung für seinen Transport, diese nimmt aber in der Regel mit zunehmender Affinität des Wirkstoffes zu den Mizellen zu (IV.3.1), wobei eine hohe Affinität zu den Mizellen auch eine erschwerte Freigabe des eingeschlossenen Wirkstoffes

beim Kontakt mit den Membranen und damit die Reduzierung seines Transports bedeutet. Zur Erhöhung des Anteils frei verfügbarer Wirkstoffmoleküle in der Lösung, v.a. in der unmittelbaren Nähe der Zellmembran (siehe II.7), ist die Herabsetzung des Verteilungskoeffizienten (Mizellen/Lösung) erforderlich. Dies kann bei hydrophilen Substanzen durch den Zusatz eines sog. Zweitsolubilisats (z.B. Lipide) erfolgen [182-184]. Extrem lipophile Arzneistoffe lassen sich jedoch nur in der mizellaren Phase solubilisieren und damit zur Epithelmembran der Darmmukosa transportieren, wobei ihre Solubilisation bzw. ihre Affinität zur mizellaren Phase durch den Lipidzusatz zumeist auch verbessert wird, weshalb die o.g. Methode des Zweitsolubilisats hier nicht angewandt werden kann. Da aber die Zugabe der OS zum HTAB-System zur Reduzierung der Solubilisation des T führt (Abb. 26), welches in seiner freien Form eine gewisse Löslichkeit im Wasser besitzt, wurde erwartet, dass seine Resorption bei der Verwendung des HO-Systems gegenüber dem einfachen H-System wieder zunimmt. Dies war aber hier nicht der Fall, was einen deutlichen Hinweis auf die Mitwirkung anderer wichtiger Faktoren neben der Solubilisation/Affinität bei diesem Transportprozess darstellt.

Schon die vorherigen Untersuchungen mittels des Permeationsmodells nach *Fürst-Neubert* (V.1.1) ergaben einen Hinweis darauf, dass die Diffusion der eingebetteten Wirkstoffmoleküle durch einen Hinderungseffekt der äußeren Mizellschicht und der Grenzschichtbarriere beeinflusst werden kann. Die Z-Wert-Messungen (IV.4) demonstrierten diesbezüglich, dass die eingebetteten Steroidmoleküle im HO-System im Vergleich zum einfachen H-System deutlich tiefer in die Mizellen eindringen, was hier eine dickere Umhüllung für diese Moleküle in den Mizellen und verstärkte hydrophobe Bindungen mit dem Mizellinneren bedeuten kann. Aus Untersuchungen mithilfe der MAKE kamen weiterhin Hinweise auf eine deutliche Zunahme der positiven Oberflächenladung der Mizellen analog der Zunahme ihrer Größe (IV.3). Dadurch lässt sich vermuten, dass die elektrostatische Abstoßungskraft zwischen diesen Mizellen und der positiv geladenen Oberfläche der Zellmembran (II.5) oder der Grenzschichtbarriere (II.4) auch deutlich ansteigt und den Transport demzufolge verhindert. Die Grenzschichtbarriere kann sich eventuell auf allen lipophilen Oberflächen in der Mukosa und v.a. auf der Mukosoberfläche bilden. Wie weit auch die Erhöhung der Mizellgröße des HO-Systems gegenüber dem einfachen H-System (Abb. 31) einen Einfluss auf die Diffusion der Mizellen durch die MuS ausüben kann (räumliche Verhinderung beim Durchgang in die MuS), ist anhand der hier verfügbaren Daten unmöglich zu beurteilen.

Die Abnahme der Resorption des T aus dem System BO im Vergleich zum System B (Abb. 39) kann ebenfalls mit einer erhöhten mizellaren Solubilisation (Abb. 26) erklärt werden. Aus den Z-Wert-Untersuchungen (IV.4) geht zudem eine Zunahme des Hydratationsgrades bzw. der Polarität sowie eventuell auch der Dicke der hydratisierten Polyoxyethylenschicht der Mischmizellen des Systems BO gegenüber den einfachen lipidfreien Br35-Mizellen hervor. Höchstwahrscheinlich trägt auch dies durch eine Verringerung der Diffusion an der Membran zur Reduzierung der Resorption bei, wie vorher diskutiert wurde (V.1.1).

Z-Wert-Messungen lieferten einen Beweis für eine deutlich erhöhte Polarität um die konjugierten Ketofunktionen der untersuchten Steroide beim System GP, was mit einer Erhöhung der Hydratation in der äußeren mizellaren Schicht bei diesen Systemen (IV.4) gegenüber den entsprechenden G-Systemen erklärt wurde. Auch die Solubilisation des T nimmt beim System GP deutlich zu (Abb. 26). Außerdem führt die Vergrößerung bzw. erhöhte Aggregationszahl der GP-Mizellen zu keiner effektiven Zunahme der negativen Oberflächenladung der Mizellen (IV.3), und somit ist keine Zunahme der Resorption auf

der Basis einer zunehmenden elektrostatischen Anziehung zur Membranoberfläche zu erwarten. Hingegen ist in Anlehnung an die vorher diskutierten Beispiele eine Herabsetzung der Resorption bei der Solubilisierung im binären System GP gegenüber dem einfachen System G aufgrund der Zunahme der Solubilisation und des Hydratationsgrades zu erwarten, was sich anhand der erhaltenen Ergebnisse (Abb. 39) als zutreffend erweist.

Die allgemein erhöhte Resorption bei den einfachen lipidfreien mizellaren Systemen gegenüber den binären lipidhaltigen Systemen kann darüber hinaus auf die erhöhte Aggressivität der ersten Systeme gegen die Epithelmembran zurückgeführt werden, die durch gewisse Membranschädigungen größere Änderungen in der Permeabilität als bei den binären Tensidsystemen hervorrufen kann (siehe II.7).

### V.1.2.2 Einfluss der Kettenlänge bzw. der Lipophilie des in mischmizellaren Systemen eingebetteten Steroids auf den Transport durch Mäuse-Dünndarm-Abschnitte

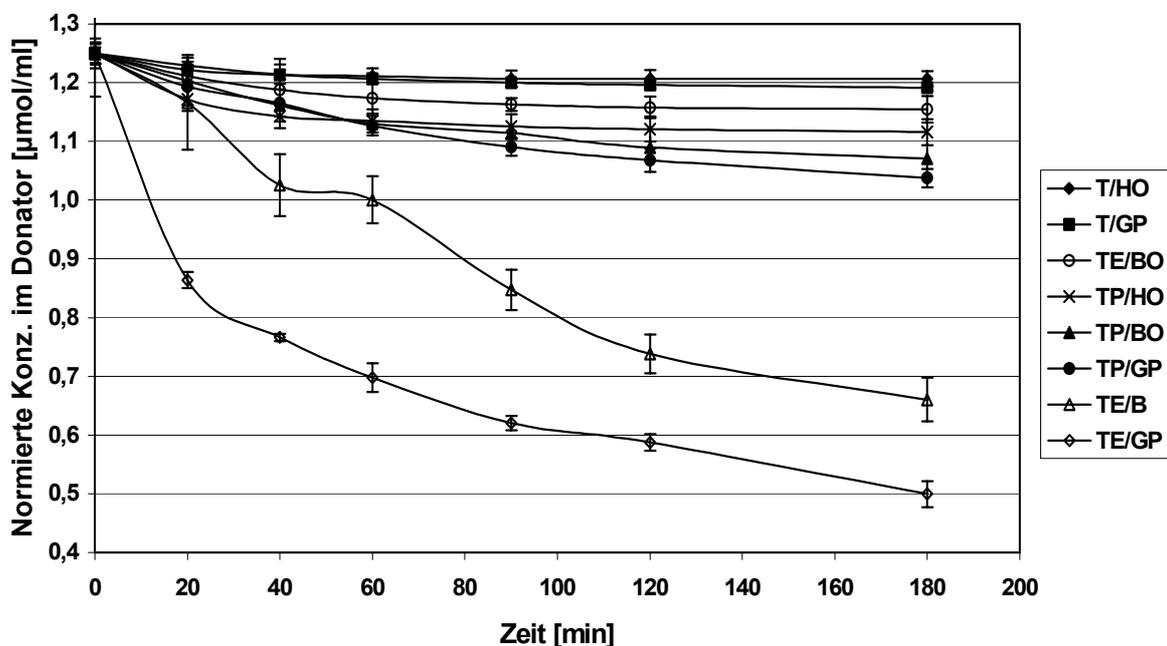


Abb. 40 Abnahmepprofile der Konzentrationen solubilisierter Steroide in verschiedenen mizellaren Systemen im Donatorkompartiment bei *Ussing*-Kammer-Untersuchungen an Mäuse-Dünndarm-Abschnitte

Bei diesen Untersuchungen konnten auch keine Testosteronester im AK nachgewiesen werden, was auf die hohe Affinität dieser stark lipophilen Stoffe zur Epithelmembran und mögliche Proteinbindungen in den Epithelzellen und den darunter liegenden Schichten zurückgeführt wird. Der Vergleich erfolgte daher mithilfe der Konzentrationsdigramme im DK. *In-vivo* werden die resorbierten Testosteronester von der Darmmukosa über den lymphatischen Weg in Form von Chylomikronen zur Blutbahn weiter transportiert (siehe II.6). Anhand von Messungen der in der Membran resorbierten Steroide am Versuchsende konnten leider keine Zusammenhänge zwischen diesen und den verwendeten mizellaren Systemen etabliert werden. Ab der Membranaufarbeitung am Versuchsende bis zu den Verfahren der Extraktion und Probearbeitung ergeben sich zahlreiche mögliche Fehlerquellen, deren Einfluss sich nur mit sehr großem Aufwand verringern lässt. Diese spiegeln sich in großen Schwankungen der Messdaten der Versuchs-

wiederholungen wider. Durch diese Messungen konnten aber geringe Mengen vom T in den Darmabschnitten nachgewiesen werden. Auch in den Akzeptorkompartimenten wurde T nachgewiesen. Beides brachte den Beweis für eine bedeutende Biotransformation der Testosteronester während des Transportsprozesses in diesen Untersuchungen, die mit der Abspaltung des T begann (siehe II.6). Im Einklang mit der vorherigen Versuchsreihe mit den künstlichen Lipidmembranen gab es hier bei der Untersuchung des TE-Transports im System HO auch keine signifikante Änderungen der Konzentration im DK.

Beim System GP stieg die Resorption mit Zunahme der Lipophilie des solubilisierten Steroids ( $T < TP < TE$ ), wie anhand Abb. 40 zu sehen ist. In Analogie zu den erhaltenen Ergebnissen in V.1.1 bietet sich die folgende Erklärung an. Der Affinität der Steroidreihe zur mizellaren Phase ist ihre Affinität zur Epithelmembran hier auch überlegen (möglicherweise aufgrund lipophilerer Eigenschaften der Membran), so dass sich die Wirkstoffverteilung mit zunehmender Lipophilie des solubilisierten Wirkstoffes ebenfalls zugunsten der Membran verschiebt.

Beim System BO hingegen verläuft die Verteilung zugunsten der Mischmizellen, so dass eine Erhöhung der Wirkstofflipophilie zur Verringerung der Resorption führt (Vergleich TP/BO und TE/BO in Abb. 40). Zur Überprüfung dieser Annahme wurde der Transport des stark lipophilen TE im System B untersucht, wobei es sich eine sehr deutliche Erhöhung der Resorption gegenüber dem System BO gezeigt hat (Vergleich TE/B und TE/BO in Abb. 40).

Das gleiche Prinzip gilt auch für die Erklärung der starken Transportabnahme beim HO-System nach Verwendung des lipophileren Steroids TE statt TP. Warum aber der Transport des TP bei diesem System trotz seiner erhöhten Lipophilie gegenüber dem T deutlich besser als der Transport des Letzteren blieb, lässt sich nur unter Einbeziehung der intermolekularen Wechselwirkungen dieser Steroide innerhalb der mizellaren Struktur erklären. Aus den Untersuchungen zur Mizellbildung im KAPITEL IV geht hervor, dass sich T hinsichtlich der Einbettung in den HTAB-Systemen von den anderen untersuchten Testosteronestern unterscheidet. Während der Einschluss der Testosteronester hier hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen der Moleküle innerhalb der Mizellen geht, erfolgt die Einbindung der T-Moleküle durch sowohl hydrophobe als auch starke hydrophile Wechselwirkungen seiner Hydroxylgruppe mit der polaren geladenen Region der Tensidkopfgruppen in der Mizelle. Daher haben die T-Moleküle eine sehr hohe Affinität zu den HTAB-Mizellen, wie sich anhand der Solubilisationsuntersuchungen (Abb. 26, IV.1) und der erschwerten Freigabe in dieser Untersuchungsreihe gezeigt hat. Die Einlagerung der OS-Moleküle in die mizellare Struktur führt durch die Verdichtung der Packung in der Kopfgruppenregion und ihre Konkurrenz mit dem T um die hydrophilen Bindungsstellen innerhalb der o.g. Kopfgruppenregion zur Verringerung seiner Solubilisation. Diese hat aber anscheinend keinen bedeutenden Einfluss auf die Affinität des T zu den Mizellen im Sinne von Qualität und Stärke der Bindungen. Vielmehr besteht auch die Möglichkeit, dass die Bindung des T durch *Van-der-Waals'* sche Wechselwirkungen seiner konjugierten Ketogruppe mit der Doppelbindung der OS noch verstärkt wird. Die erschwerte Freigabe der T-Moleküle aus den HO-Mizellen infolge dieser hohen Affinität ist unter diesem Gesichtspunkt hier auch leicht nachvollziehbar (hierzu siehe auch V.1.2.1). Offensichtlich bedingt die Veresterung des T-Moleküls nicht nur die Änderung seiner Polarität sondern auch seiner Bindungsstellen und -art innerhalb der mizellaren Struktur und trifft damit v.a. seine o.g. starken hydrophilen Wechselwirkungen mit der polaren Kopfgruppenregion. Möglicherweise verringert

sich deshalb die Gesamtaffinität des Moleküls zu den Mizellen, v.a. bei den kurzkettigen Estern, um wieder mit Erhöhung der Esterkettenlänge aufgrund wachsender hydrophober Wechselwirkungen mit dem Mizellinneren zu steigen, wie es bei TE der Fall ist.

Der Einfluss der Lipophilie des in den MMS eingebetteten Steroids auf seinen Transport hängt also in erster Linie von der resultierten Differenz zwischen seiner Affinitäten zu den Mizellen und zur Membran ab. Ob die Zunahme der Lipophilie zur Zunahme oder Abnahme der Wirkstoffaffinität zu der mizellaren Phase führt, bleibt eine Frage der molekularen Eigenschaften des Wirkstoffes und des verwendeten mizellaren Systems. Eine erhöhte Wirkstofflipophilie bedingt darüber hinaus nicht immer eine bessere Permeabilität durch die Epithelmembran, was ebenso von den molekularen Eigenschaften des Wirkstoffes abhängt. *Wils et al.* [5] beispielsweise berichteten von der Abnahme der Permeabilität ihrer untersuchten radioaktivmarkierten Substanzen durch die Epithelmembran der Caco-2-Monolayer unter guten Durchmischungsbedingungen mit Zunahme ihrer Lipophilie im Bereich 2,8-5,2 (ausgedrückt in  $\log D$ ). Daraus schließen sie, dass die hohe Lipophilie eines Wirkstoffes ( $\log D > \text{ca. } 3$ ) seinen intestinalen Transport durch die Epithelzellen verringert, und dass die Hauptbarriere für den Transport solcher stark lipophilen Wirkstoffe das intestinale Epithel ist. Im Zusammenhang mit der in diesem Abschnitt eingeleiteten Diskussion kann man hier bei den von *Wils et al.* untersuchten Verbindungen vermutlich von einem Beispiel einer verminderten Aufnahme oder Diffusion in der Epithelmembran trotz einer hohen Wirkstofflipophilie sprechen. Dieser Teil der Arbeit bietet andererseits Beispiele an, wo die Erhöhung der Lipophilie in Abhängigkeit vom verwendeten mizellaren System den Transport verbessern oder auch verschlechtern kann. Weiterhin zeigte dieser Abschnitt anhand des Beispiels mit T/HO und TP/HO, dass eine verbesserte Affinität im Sinne der Solubilisationskapazität eines mizellaren Systems für einen Wirkstoff nicht unbedingt eine bessere Affinität im Sinne der Stärke der Wirkstoffbindungen mit dem mizellaren Gerüst bedeuten muss.

### **V.1.3 Resorptionsuntersuchungen am Kaninchen-Modell**

Diese Untersuchungen wurden mit dem Ziel vorgenommen, die bei V.1.1 und V.1.2 gezogenen Schlussfolgerungen unter *In-situ*-Bedingungen zu überprüfen, die sich den physiologischen Bedingungen *in-vivo* sehr annähern. Die Versuchsanordnung wurde von *Fritzsche* [235] ausführlich beschrieben, weshalb hier im experimentellen Teil darauf nicht weiter eingegangen wurde. Die Aufarbeitung der Proben und die Analytik erfolgten nach den Methoden A2 und HPLC-2 (III.5.3) mit der Annahme, dass diese auf Proben aus Kaninchenplasma übertragbar sind. Für die i.v. Bolusinjektion der Kontrolldosis wurde ein liposomales System entwickelt (III.3), da liposomale Trägersysteme allgemein i.v. verträglicher als mizellare Systeme sind und ausreichende Mengen an lipophilen Wirkstoffen enthalten können. Bei der ersten Untersuchungsreihe handelte es sich um die Systeme TE/GP, TE/BO und TE/HO.

Messungen der Konzentrationen vom Wirkstoff im Plasma nach der i.v. Verabreichung der liposomalen Kontrolllösung und den intestinalen Perfusionsuntersuchungen ergaben während des Versuchsverlaufes nur Spuren von TE und T, die im Bereich der NG der analytischen Methode (III.5.3.2) lagen. Die Verfolgung der Konzentrationsänderung im Plasma war aus diesem Grund nicht möglich. Dies führte zur Annahme, dass der stark lipophile Wirkstoff schnell nach der i.v. Injektion von den Fettgeweben aufgenommen wird oder die Liposomen werden von den endothelialen Leberzellen aufgenommen und dadurch aus dem Blutkreislauf schnell entfernt. Bezüglich der Perfusionsuntersuchungen wird angenommen, dass der Anteil des resorbierten stark lipophilen Testos-

teronesters in der Darmmukosa entweder verstoffwechselt oder intakt lymphatisch transportiert wird, wie in II.5 und II.6 aufgeführt wurde. Der lymphatisch transportierte Anteil wird v.a. in den Fettgeweben gespeichert und allmählich in die Blutbahn – höchstwahrscheinlich in einer hydrolysierten Form – freigesetzt. Eine Langzeitbeobachtung des Plasmaspiegels des freigesetzten T war aber leider nicht möglich, da die Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen des Versuchstieres über Tage nach der Durchführung der intraduodenalen Perfusion nicht möglich ist. Es wird deshalb für die Bestimmung der transportierten Wirkstoffmenge bei derartigen Untersuchungen empfohlen, Messungen des Wirkstoffes und seiner Metabolite in der afferenten intestinalen Lymphsekretion vorzunehmen, die durch eine Kanülierung des mesenterialen Lymphgangs oder des Brustlymphgangs gewonnen wird.

## **V.2 Zusammenfassung der Resorptionsuntersuchungen**

Die im ersten Teil der Arbeit optimierten und charakterisierten mischmizellaren Systeme für die Verbesserung der Solubilisation lipophiler wasserunlöslicher Steroide wurden in diesem Teil auf ihren Einfluss auf die Resorption der eingebetteten Wirkstoffe geprüft. Dadurch wurde die Vermutung überprüft, ob die Verbesserung der wässrigen Solubilisation dieser Stoffe und ihr Einschluss in mischmizellaren Trägersystemen auch zur Verbesserung ihres Transports durch die Darmmukosa führen kann.

Aus diesen Untersuchungen und mit Hilfe der im ersten Teil der Arbeit (KAPITEL IV) gewonnenen Informationen über den möglichen molekularen Aufbau der verwendeten mischmizellaren Systeme ließen sich Schlussfolgerungen über die Faktoren ziehen, die Einflüsse auf den Transport ausüben können. Gemeinsamkeit all dieser Faktoren ist, dass sie vom mizellaren Bau des verwendeten Systems sowie der Lipophilie und den molekularen Eigenschaften des eingebetteten Wirkstoffes abhängen, und dass ihre Wirkungen durch Änderungen in den Verteilungskoeffizienten Membran/Mizellen ( $K$ ) und/oder der Diffusionskoeffizienten des Wirkstoffes in der Membran ( $D_M$ ) zum Ausdruck kommen. Eine auf dem zweiten Fick'schen Diffusionsgesetz basierende nichtlineare Funktion wurde hier abgeleitet, welche die Resorption stark lipophiler Wirkstoffe in mizellaren Systemen beim Permeationsmodell nach Fürst-Neubert in Abhängigkeit von Zeit beschreiben kann. Die abgeleitete Funktion zeigte eine sehr gute Anpassung an die erhaltenen Messdaten und eignet sich mithilfe des o.g. Permeationsmodells für die Untersuchung möglicher Änderungen in  $K$  und  $D_M$  in Abhängigkeit vom verwendeten mizellaren System und den Eigenschaften des eingebetteten stark lipophilen Wirkstoffes. Einen der wichtigsten o.g. Faktoren stellt die Differenz zwischen den jeweiligen Wirkstoffaffinitäten zur Membran und zur mizellaren Phase dar, die besonders durch  $K$  zum Ausdruck kommt. Die Affinität soll nicht nur quantitativ im Sinne der Solubilisierungskapazität für den Wirkstoff aufgefasst werden, sondern auch qualitativ im Sinne der Stärke der molekularen Bindungen zwischen der betrachteten Phase und dem Wirkstoff. Zu den hier diskutierten Faktoren, die besonders  $D_M$  beeinflussen können, zählen Polarität bzw. Hydratation und Dicke der mizellaren Umhüllung, die effektive elektrische Oberflächenladung der Mizellen und der Widerstand der Grenzschichtbarriere.

Die Untersuchungen zeigten eine Verringerung des Transports des T infolge der Verwendung mizellarer Systeme im Vergleich zu einer einfachen Pufferlösung des T, wobei dieser Effekt bei der Verwendung binärer mischmizellarer Systeme weiter steigt. Auch bei den stark lipophilen Testosteronestern verringert sich die Resorption in den binären mischmizellaren Systemen gegenüber den einfachen lipidfreien Systemen. Dieser Effekt hängt in erster Linie mit der Erhöhung der Affinität des Wirkstoffes zur

mizellaren Phase zusammen. Möglicherweise spielt dabei auch der erhöhte membran-schädliche Effekt der lipidfreien mizellaren Systemen gegenüber den lipidhaltigen Mischsystemen eine Rolle. Anhand der Untersuchungen v.a. mit den HTAB-Systemen oder mittels des Permeationsmodells zeigte sich jedoch, dass daran auch andere wichtige Faktoren wie der Hydratationsgrad der äußeren Aggregatschicht, die mizellare Oberflächenladung oder die Bildung einer Grenzschichtbarriere beteiligt sein können.

Der Einfluss der Wirkstofflipophilie auf den mizellaren Wirkstofftransport ändert sich weitgehend in Abhängigkeit vom verwendeten mizellaren System. Bei den L-GS-Mischmizellen bewirkt die Erhöhung der Lipophilie des Wirkstoffes die Zunahme seiner Resorption, während diese bei den ölsäurehaltigen Br35- oder HTAB-Systemen in der Regel zur Verringerung der Resorption führt. Der o.g. Einfluss hängt aber auch von den physikochemischen bzw. strukturellen Eigenschaften des Wirkstoffes ab, die seine Aufnahme in den jeweiligen Phasen (Membran oder Mizellen) sowie seinen Durchgang durch die polaren hydratisierten Schichten der Mizellen oder eventuell der Grenzschichtbarriere beeinflussen können.

Aus den intraduodenalen Perfusionsuntersuchungen am Kaninchenmodell ließen sich Schlussfolgerungen ziehen, die zur Entwicklung der Methodik bei der Anwendung auf Untersuchungen des Transports stark lipophiler Arzneistoffe in mizellaren Tensidsystemen *in-situ* dienen können.

*“The search for truth is more precious than its possession.”*

*Albert Einstein*

*“The important thing in science is not so much to obtain new facts  
as to discover new ways of thinking about them.”*

*Sir William Bragg (1862 - 1942)*

## KAPITEL VI

### Zusammenfassung

Bekanntlich können die lipidhaltigen mischmizellaren Systeme auf Grund ihrer vielfältigen und vorteilhaften Eigenschaften als Wirkstoffträgersysteme zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit und des Transports lipophiler Arzneistoffe eingesetzt werden. Weniger bekannt sind jedoch die Faktoren, die zur Verbesserung der Solubilisation stark lipophiler Arzneistoffe oder ihrer Resorption an den biologischen Membranen und v.a. der intestinalen Mukosa mit Hilfe dieser Systeme führen können. In der vorliegenden Arbeit wird daher der Versuch unternommen, die Solubilisation stark lipophiler Modellwirkstoffe durch die Optimierung lipidhaltiger mischmizellarer Systeme (MMS) der drei Haupttensidgruppen (je nach elektrischer Ladung der hydrophilen Kopfgruppe, kationische, anionische oder neutrale Tenside) zu verbessern, den Einfluss der optimierten Systeme auf den intestinalen Resorptionsprozess dieser Wirkstoffe zu untersuchen, und Einflussfaktoren von Bedeutung aufzuzeigen. Als stark lipophile Modellwirkstoffe dienen hier das Testosteron (T) und seine Propionat-, Enanthat und Undecanoatester. Als Lipide kommen die Sojalecithine P90G (ungesättigt) und P90H (gesättigt) sowie die Stearin- und Ölsäure (OS) zum Einsatz.

Die optimalen mizellaren Lipidsolubilisationen erreicht man durch die Verwendung der ungesättigten Lipide (P90G und OS) unabhängig vom verwendeten Tensid. Die ungesättigten Lipide begünstigen möglicherweise die Einbettung der Steroide in die Aggregate durch Wechselwirkungen ihrer Doppelbindungen mit den polaren Funktionen der Steroide, Lockerung der Packung und Erhöhung der Lipophilie innerhalb der Mizellen. Die besten Solubilisationen der untersuchten Steroidreihe erzielt man in den Systemen des kationischen Tensids HTAB (unter den untersuchten Tensidsystemen). Bei der Herstellung der ternären MMS der Tenside HTAB und Br35 haben die solubilisierten Lipide (P90G und OS) jeweils keinen deutlichen Einfluss auf ihre gegenseitige Solubilisation. Hingegen beim Tensid NaGDC führt die Einlagerung des einen Lipids in die Mizellen zu einer deutlichen Verringerung der Solubilitätskapazität des Systems für das andere Lipid. Für die Verbesserung der Solubilisation der untersuchten Steroide sind die binären MMS besser geeignet als die ternären. Unter den untersuchten lipidhaltigen MMS ergeben sich die optimalen Solubilisationen der Modellwirkstoffe in der optimierten mizellaren Mischung des Tensids NaGDC mit P90G sowie in den optimierten mizellaren Mischungen der Tenside Br35 und HTAB jeweils mit OS.

Eine deutliche Zunahme der Aggregatgröße ergibt sich erst nach Lipidzugabe zu den verschiedenen Systemen. Diese Größenänderung steht in Zusammenhang mit Änderungen in der mizellaren Struktur aller Systeme. Bei NaGDC entstehen die bekannten großen L-GS-Mischmizellen (umstrittene Modellvorstellungen für den mizellaren Bau in der Literatur). Bei Br35 kommt es zur Vergrößerung der Aggregate durch die Einlagerung der OS-Moleküle in den lipophilen Aggregatkern, bei HTAB durch die Entstehung großer stäbchenförmiger Mischmizellen. Die Änderung der mizellaren Größe bleibt bei den binären NaGDC- und Br35-Systemen im allgemeinen unabhängig von der Molekülgröße des eingeschlossenen Steroids. Aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften unterstützen die eingebetteten Steroide innerhalb der binären HTAB-MMS die o.g. stäbchenförmige mischmizellare Bildung durch ihren Einfluss auf den Packungsparameter (*PP*). Bei diesen Systemen weist die mizellare Größe deshalb eine Abhängigkeit vom eingebetteten Steroid auf. Durch die Einbettung der Lecithinmoleküle in das

mizellare Gerüst der P90G-NaGDC-MMS kommt es bei der MAKE trotz der erhöhten Aggregationszahl der negativ geladenen Tensidmoleküle zu keiner deutlichen Änderung der effektiven Mobilität der Mischmizellen gegenüber den einfachen lipidfreien NaGDC-Mizellen. Wegen der Einlagerung der OS-Moleküle innerhalb des Aggregatkerns beim Br35-System ergibt sich keine Änderung der elektrischen Oberflächenladung der Aggregate. Hingegen nimmt bei HTAB-Systemen die positive effektive Oberflächenladung durch die Entstehung großer MMS mit einer hohen Aggregationszahl der Tensidmoleküle und relativ kleiner Anzahl der eingebetteten OS-Moleküle deutlich zu. Durch die Lipidzugabe kommt es weiterhin bei den NaGDC- und Br35-Systemen zur Erhöhung des Hydratationsgrades in der äußeren Aggregatschicht. Bei HTAB-Systemen führt diese Zugabe zu einer tieferen Penetration der Steroide im mizellaren Gerüst.

Während sich alle Testosteronester in den lipophilen Stellen innerhalb der Aggregatstrukturen einordnen, lässt sich T wegen seiner gewissen Polarität und relativ kleinen Molekülgröße eher in den hydrophilen Stellen einbetten. Des Weiteren richtet T seine Ketofunktion nach dem Aggregatkern und seine Hydroxylgruppe nach der Aggregatoberfläche aus, wodurch sich eine umgekehrte Orientierung der T-Moleküle in den Aggregaten im Vergleich zu den Testosteronestern ergibt. Diese Unterschiede erklären das abweichende Solubilisationsverhalten des T in den HTAB-Systemen und spiegeln sich in den ermittelten cybotaktischen Polaritäten um die Ketofunktion dieser Steroide wider.

Mit nur einer Ausnahme (Solubilisation des T im HTAB-System) wird bei allen Tensid-systemen ein einheitliches Solubilisationsverhalten der untersuchten Steroide beobachtet. Dies zeigt sich in einer Zunahme der Solubilisation mit zunehmender Lipophilie bzw. Esterkettenlänge, bis die Größe des Moleküls eine Grenze erreicht (ca. 7-9 C-Atomen in der unverzweigten Esterkette), über die hinaus die Solubilisation wieder abnimmt. Neben Struktur und Größe der Aggregate spielen auch andere wichtige Faktoren wie die Packungsdichte oder die Verteilung der polaren und lipophilen Solubilisationsstellen innerhalb des Aggregatgerüsts eine wichtige Rolle bei der Einbettung der solubilierten Wirkstoffe. Die Lipophilie und andere Eigenschaften des Wirkstoffes wie seine Größe und die Verteilung der polaren und lipophilen Stellen in seiner Struktur sind auch Faktoren von wichtiger Bedeutung für die Solubilisation bzw. den mizellaren Einschluss des Wirkstoffes. Mit zunehmender Lipophilie eines Wirkstoffes steigt seine Affinität zu den lipophilen Solubilisationsstellen innerhalb der Aggregate. Folglich verbessert sich seine Solubilisation im System. Stark lipophile und zu große Moleküle lassen sich jedoch in den mizellaren Systemen schwerer einschließen und stören allgemein durch ihre Größe die gesamte Aggregatstruktur. Sie dringen tiefer in die lipophilen Stellen im Aggregatkern ein. Dort erhöhen sie die Packungsdichte und verringern die Anpassungsfähigkeit der Ketten, die für eine optimale intermolekulare Wechselwirkung benötigt wird. Die Aggregate werden demzufolge instabiler und es verringert sich vergleichsweise die Solubilisierungskapazität des Systems. Das Solubilisationsverhalten der untersuchten Steroidreihe bietet ein gutes Beispiel dafür, wie die Gegen- oder Mitwirkung der o.g. Faktoren die Solubilisation der Wirkstoffe beeinflussen kann. Bei der Entwicklung der MMS und ggfs. der Auswahl des zu solubilisierenden Wirkstoffes ist daher ein Kompromiss zwischen den o.g. Faktoren nötig, um eine optimale Solubilisation für den Wirkstoff zu erreichen. Unter den verglichenen Steroiden zeigt TE folglich durch seine Struktur bzw. seine mittelgroße Esterkettenlänge, die am besten geeigneten Eigenschaften für den mizellaren Einschluss und die Aggregatbildung. TE ergibt demnach die besten Solubilisationen in den untersuchten mizellaren Systemen. Aus dem gleichen Grund aber können Substanzen mit vergleichbaren

Eigenschaften wie TE in Konzentrationen oberhalb der mizellaren Kapazität zur Bildung hoch aggregierter Strukturen wie z.B. Vesikelsysteme führen.

Beim mizellaren Transport stark lipophiler Wirkstoffe an die biologischen Epithelmembranen stellt die Differenz zwischen den Wirkstoffaffinitäten zu der Membran und der mizellaren Phase einen der wichtigsten Einflussfaktoren dar. Dieser Faktor kommt besonders durch den Verteilungskoeffizienten  $K$  (Membran/Mizellen) zum Ausdruck. Änderungen, die zu einer Zunahme der Solubilisation oder Stärke der Wirkstoffbindung zur mizellaren Phase ohne parallele Zunahme der Wirkstoffaffinität zur Membran führen (wie z.B. Lipidzugabe), bewirken deshalb eine Verringerung der mizellaren Wirkstofffreigabe an die Membran. Eine Zunahme der Wirkstofflipophilie führt daher bei  $K > 0,5$  meist zur Verbesserung des mizellaren Transports an die Membran (wie bei den NaGDC-Systemen), bei  $K < 0,5$  hingegen zur Verschlechterung (Br35- und HTAB-Systeme).

Eine in der vorliegenden Arbeit abgeleitete nichtlineare Funktion dient mit Hilfe des Permeationsmodells nach *Fürst-Neubert* zur Bestimmung der Parameter  $K$  und  $D_M$  (Diffusionskoeffizient des Wirkstoffes in die Membran) und zur Untersuchung ihrer möglichen Änderungen in Abhängigkeit vom verwendeten mizellaren Trägersystem. Die Funktion zeigte eine gute Anpassung an die erhaltenen Messdaten in dieser Arbeit.

Die ermittelten  $K$ -Werte für TP und TE bei den Br35-MMS sind vergleichbar, während sich  $D_M$  für TE gegenüber TP deutlich verringert. Dies deutet auf die wichtige Rolle eines anderen Faktors hier als nur die wachsende Wirkstoffaffinität zur mizellaren Phase hin. Dieser ist die hohe Polarität der hydratisierten Zone der Polyoxyethylenschicht, deren Widerstand beim Übergang des Wirkstoffes zur Membran mit zunehmender Wirkstofflipophilie auch wächst.

Nach OS-Zugabe und Bildung der HTAB-MMS nimmt die hohe Solubilitätskapazität (Affinität) dieser Systeme für die untersuchten stark lipophilen Wirkstoffe sowie ihre Größe und effektive Oberflächenladung (wie oben erwähnt) deutlich zu, während der Wirkstofftransport noch schlechter wird. Des Weiteren besitzen die HTAB-Mizellen eine vergleichsweise hoch polare äußeren Schicht. Diese Beobachtungen weisen auf eine mögliche Beteiligung dieser Faktoren neben der hohen Wirkstoffaffinität an der Verschlechterung des Wirkstofftransports hin. Insbesondere die Oberflächenladung kann hier aufgrund elektrostatischer Abstoßung mit der positiv geladenen Epithelmembran oder mit der Grenzschichtbarriere den Transport negativ beeinflussen.

Ein ideales mizellares Trägersystem für den Transport stark lipophiler Wirkstoffe soll daher möglichst eine kleinere oder vergleichbare Affinität zum Wirkstoff gegenüber der Membran und einen kleinen Hydratationsgrad der obersten mizellaren Schicht, sowie eventuell eine neutrale oder negative Oberflächenladung aufweisen. Daraus ergibt sich allerdings ein Problem bei der Entwicklung dieser Systeme, denn von einem idealen mizellaren System wird in diesem Fall auch eine möglichst erhöhte Solubilitätskapazität für diese Problemstoffe erwartet. Weiterhin erfordert die Verbesserung der physiologischen Verträglichkeit der mizellaren Tensidsysteme die Mischung mit einem Lipidzusatz, was zumeist auch zur Erhöhung der Affinität der stark lipophilen Wirkstoffe zur mizellaren Phase bzw. zur Erhöhung ihrer Solubilisation sowie in mehreren Fällen zur Erhöhung des Hydratationsgrades der oberen mizellaren Schicht führt. Es ist demzufolge hier auch ein Kompromiss zwischen diesen Faktoren nötig, um durch die Verwendung dieser Trägersysteme eine optimierte Resorption zu erreichen. Solange die erhöhte Solubilisation nicht zur vollständigen Blockierung der Wirkstofffreigabe an der Membran führt, bleibt die Verbesserung der Solubilisation sehr vorteilhaft. Sie ist bei

diesen Problemarzneistoffen unerlässlich zur Überwindung der MuS und eine wichtige Voraussetzung für die Transportverbesserung, v.a. wenn die Freisetzung des Wirkstoffes den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für den Transport darstellt.

## **Solubilization of Highly Lipophilic Drugs in Mixed Micellar Systems and its Influence upon Drug Absorption Process**

It is well known that lipid containing mixed micelles show many beneficial features as pharmaceutical carrier systems, especially because of their ability to improve drug absorption in general and the aqueous solubility of lipophilic compounds in particular. This in turn implies their use as very promising carrier systems for highly lipophilic drugs. However, it is less known about the factors which may influence the incorporation of such drugs within the structure of such systems and thus may affect drug solubility in them. The same applies also to the factors, which may affect the delivery process of highly lipophilic drugs carried by these vehicles at biological membranes, especially the mucosal membrane of the gastrointestinal Tract. Therefore, these factors were subject of investigation throughout the present thesis work.

Surface active agents used to develop the micellar systems were chosen among the frequently used surfactants for pharmaceutical purposes. Systematical solubilization tests were conducted to select one representative of each of the main three surfactant groups, the anionics, the cationics and the nonionics, for further experimentation. Lipids added to form binary and ternary mixed micellar systems were saturated and unsaturated Soya lecithins (P90H and P90G respectively) as well as stearic acid (SS) and oleic acid (OS). The most important used surfactants were Brij® 35 (Br35), sodium glycodeoxycholate (NaGDC) and hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB). Testosterone and its propionate, enanthate and undecanoate esters (T, TP, TE, and TU) were used as model drugs to investigate the solubilization and absorption of highly lipophilic drugs.

First, the solubilization of lipids in simple surfactant systems and in binary (lipid+surfactant) systems was tested. The solubilization of the unsaturated lipids (P90G and OS) in the studied micellar systems was distinctly higher than it was for their saturated analogues (P90H and SS), regardless of the used surfactant. In the case of HTAB or Br35, added P90G and OS in order to form ternary systems were found to have no significant interactive influence on their mutual solubilization values. In contrast, the addition of one lipid to the micellar system of sodium glycodeoxycholate (NaGDC) decreased considerably its solubilizing capacity for the other added lipid.

Based on the results of first experiment series the solubilization of the drugs was investigated in micellar systems (drug/surfactant) and in binary mixed micellar systems (drug/lipid+surfactant). Among the studied surfactants, the highest solubilization results of testosterone and its esters were achieved in the micellar and the developed mixed micellar systems of HTAB. With the exception of one case, which is the solubilization of testosterone in the micellar systems of HTAB, a marked improvement in the solubilization of the studied steroids was achieved using the mixed micellar systems in comparison with their lipid free analogues. This was ascribed mainly to an increased lipophilicity in the interior of aggregates as well as to the growth in aggregate sizes following the lipid addition. Moreover, the double bonds of the added unsaturated lipids were accounted for a facilitated embedding of the steroid molecules within the aggregates by reducing the adhesion of the hydrocarbon chains or the Laplace pressure inside the aggregates, and by interacting with the polar functions of embedded steroids. The optimized binary systems showed the best solubilizing capacities toward the tested model drugs, as compared to their corresponding ternary mixed micellar systems. These optimized binary Systems were mixtures of OS with HTAB or Br35 as well as the mixture of P90G with NaGDC.

In all selected surfactant systems, no substantial changes in aggregate sizes were noticed after the addition of steroids in concentrations adequately below the saturation values. A remarkable increase in aggregate sizes was first obtainable after lipid addition. This was associated in the case of NaGDC with the formation of the well known large bile salt-lecithin mixed micelles whose structure is still to date a subject of wide argument. In the case of Br35, the aggregate growth was interpreted by the incorporation of OS molecules into the region of surfactant hydrocarbon moieties to form together a distinct fluid-like hydrophobic core in the aggregate interior, and thereby leading to an enlargement of the whole aggregate. The increase of the micellar size following OS addition to the HTAB system was attributed to the formation of rod-like mixed micelles.

The change in the micellar size was independent of the added model drugs to the lipid-containing binary systems of NaGDC or Br35, whereas it showed a dependency on the molecular characteristics of added steroids (i.e. ester chain length and lipophilicity) in the case of OS containing HTAB mixed systems. The last observation was considered to confirm an active contribution of the added testosterone derivatives to the formation of the rod-like micellar structure, brought about most likely by increasing the packing parameter (*PP*) in the micellar assembly as a direct result of the amphiphilic character of these drugs.

Although the growth in the micellar size in the case of the mixed micellar systems of NaGDC is coupled with an increase in the aggregation number of the surfactant molecules, the measurements with micellar affinity capillary electrophoresis indicated no significant change in the effective mobility of the micelles. This was ascribed, in compliance with other works, to a decrease in the net surface charge density of the micelles, induced by the incorporation of lecithin molecules. Despite the high amount of solubilized OS in Br35 systems, no significant change was detected in the surface electric charge of aggregates. Accordingly, this confirmed the inclusion of almost all OS molecules into the aggregate core, in a way that they were not able to effectively influence the surface electric charge. In contrast, the low amounts of solubilized OS molecules in HTAB systems induced a considerable increase of surface positive electric charge of micelles due to the formation of large rod-like structures with a high aggregation number of surfactant molecules.

Furthermore, measurements of the cybotactic polarity in the vicinity of the conjugated cyclic ketone functions of the solubilized steroids indicated an increase in the polarity of the surrounding environment after lipid addition to NaGDC and Br35 systems (except for solubilizing TU in Br35 systems), whereas this addition in the case of HTAB systems led to a decrease in the cybotactic polarity around the mentioned ketone functions. The first observation was attributed to an increased hydration grade at the superficial layers of aggregates, whereas the second observation pertained most likely to a shift of steroids embedding sites to deeper positions in the micellar structure due to a reduced adhesion between the hydrocarbon chains in the micellar interior following the lipid addition.

The obtained results suggested also that testosterone differs entirely from its esters in their arrangement ways within the aggregates. Whereas its polarity and relatively small molecular size cause testosterone to be embedded in the more hydrophilic solubilizing sites adjacent to the layer of polar surfactant head groups in the aggregates, its esters incorporate themselves deeper in more hydrophobic sites within the aggregate interior due to their increased lipophilicity and molecular sizes. It was additionally concluded, that the testosterone molecule arranges itself within the aggregates in an entirely opposite way as compared with its esters by directing its ketone group toward the aggregate interior while its hydroxyl group remains anchored within the superficial polar

layers of aggregates. These differences reflected themselves particularly in the obtained cybotactic polarity results and they were accounted for the aforementioned exceptional solubilization behavior of testosterone in HTAB systems.

Except for the last case (testosterone in HTAB systems), the results revealed a similar solubilization behavior for steroids in all studied surfactant systems. That is an increasing solubilization of the testosterone derivatives along with the increase in their side chain length, and thus their lipophilicity, up to a defined number of carbon atoms in the straight side chain (about 7-9 C atoms) after which any further increase in the side chain length leads to a decline in the solubilization. Discussing this finding in the light of other results in this work, especially the corresponding cybotactic polarity changes, it was stated that, besides the structure and size of aggregates and the distribution of polar and apolar sites in drug and aggregate structures, other structural factors could play here an important role in the solubilization of studied model drugs. These factors are the size and lipophilicity of drug molecules as well as the strength of adhesion between the different hydrocarbon moieties within the aggregate interior. With increasing drug lipophilicity, the drug affinity to the lipophilic solubilizing sites within the aggregates grows too, leading accordingly to an improvement of drug solubilization in the aggregate system. However, it becomes more difficult to incorporate highly lipophilic drugs with very large molecules, since they may hereby disturb the whole aggregate structure. They may penetrate deep into the aggregate core, causing the packing of hydrocarbon moieties there to become very tight, and thus hinder the conformational adaptations needed for optimal molecular interactions within the aggregate structure. Consequently, the aggregates become less stable and the solubilization of drug molecules in the system declines. In conclusion, a compromise between all above-mentioned factors should be achieved, while developing such mixtures, in order to obtain optimal drug solubilization. Among the compared testosterone esters, TE best fulfills the structural requirements for the incorporation within the studied aggregate systems due to its medium side chain length and it gives accordingly the best solubilization results. However, for the same reason, the saturation of the different micellar surfactant systems with TE gave despite the filtration ( $\varnothing$  45  $\mu\text{m}$ ) milky, over days stable dispersions, indicating thus the formation of highly aggregated structures such as vesicles at such high drug concentrations.

One of the most important factors influencing the micellar delivery of highly lipophilic drugs to lipid membranes was found to be the difference in drug affinities between both phases, the membrane and the micellar phase. This factor finds particularly an expression in the drug partition coefficient  $K$  (membrane/micelles). Accordingly, changes leading to an increase in drug solubilization or rather in drug binding interactions with the aggregate phase without a similar increase in drug affinity to the membrane (i.e. lipid addition to the micellar system) brought about a decrease in drug delivery to the membrane. Furthermore, increasing drug lipophilicity while  $K > 0.5$  led in general to an enhancement of the micellar drug delivery to the membranes (i.e. NaGDC systems) The same increase in drug lipophilicity led to a decrease in drug absorption when  $K < 0.5$  (i.e. Br35 and HTAB systems).

A known equation based on the second *Fick's* law describing the unsteady diffusion into an almost impermeable membrane for a given compound was used in this work to derive a nonlinear function describing time dependant changes in drug concentrations at the donator side of a diffusion model. Using the permeation model of *Fürst-Neubert*, the function was applied to estimate the values of  $K$  and  $D_M$  (Diffusion coefficient of drug in the membrane) and to test their possible changes in relationship to the used micellar

carriers. The derived function demonstrated an excellent fitting to the absorption data obtained in this work by using the mentioned permeation model. The obtained  $K$  values for TP and TE carried by Br35 mixed micellar systems were almost identical, whereas detected  $D_M$  for TE was, unexpectedly, significantly smaller as compared with it for TP. This revealed that besides the increased drug affinity to the micellar phase, other important factors are possibly involved in this case. The most likely ones are the high polarity of the hydrated polyoxyethylen layer of Br35 micelles or an interfacial surfactant boundary layer developed on the membrane surface which may exhibit upon an increase in drug lipophilicity an increasing resistance to drug transfer from the aggregate interior into the membrane.

Further experiments were conducted using the *Ussing* chamber and excised segments from mice small intestine in order to study the influence of drug lipophilicity and used micellar carriers on drug delivery in small intestine. The above mentioned rule of differences in drug affinities proved to be valid here as well, both quantitatively, in term of drug solubilization, and qualitatively, in term of strength of drug binding interactions with a considered phase. Accordingly, a weak drug delivery was obtained by using the micellar systems of HTAB as drug carriers for testosterone and TP, whereas no delivery was detected with the more lipophilic esters such as TE. This was simply attributed to the aforementioned high solubilizing capacity of those systems toward the studied highly lipophilic drugs, which naturally increases with lipid addition or increasing drug lipophilicity. However, other factors were believed to contribute to the reduced drug delivery here such as the high polarity of the superficial micellar layer, as indicated by the cybotactic polarity measurements, and the electrostatic repulsion between the positively charged micelles and membrane surfaces.

In summary, an ideal micellar carrier system for the delivery of highly lipophilic drugs to a mucosal membrane should demonstrate an almost identical affinity to the drug as compared to the epithelial cell membrane, and a rather small hydration grade or polarity in its superficial layers as well as a possibly neutral or negative surface electric charge. This may seem contradictory for the development of such systems, since one expects in this case from an ideal micellar system to present also a high solubilizing capacity for such drugs. Furthermore, the membrane damaging effect known to be induced by surfactants and in particular their micellar systems gives rise to lipid addition to these systems, based on the known protective or mitigating role of lipids in such cases. However, this addition leads in most cases to an enhancement of the solubilization of highly lipophilic drugs (increasing drug affinity to the micelles) and to a possible increase in the hydration grade of the superficial micellar layers, as seen in cases studied in this work. Therefore, the formulation of the mixture should take those factors also into account and try to find a compromise between them in order to achieve an optimal drug delivery by means of these carrier systems. Nevertheless, the improvement of the solubilization of highly lipophilic drugs by using such lipid-containing mixed micellar systems as drug carriers remains beneficial and particularly attractive under many aspects and as long as the drug inclusion within the micelles does not lead to a strong hindrance of the drug delivery to the membranes. One of the most important reasons is that these systems enable highly lipophilic drugs to overcome the mucus layer, one of the most crucial barriers to their transport to the epithelial cell membrane in the gastrointestinal tract. Furthermore, these Systems usually help to solubilize such drugs in sufficient amounts and to improve drug dissolution rate, which could be in many instances, and particularly here in the case of such drugs, the rate limiting step for drug transport, thereby leading finally to a substantial improvement of drug absorption.

## Anhang

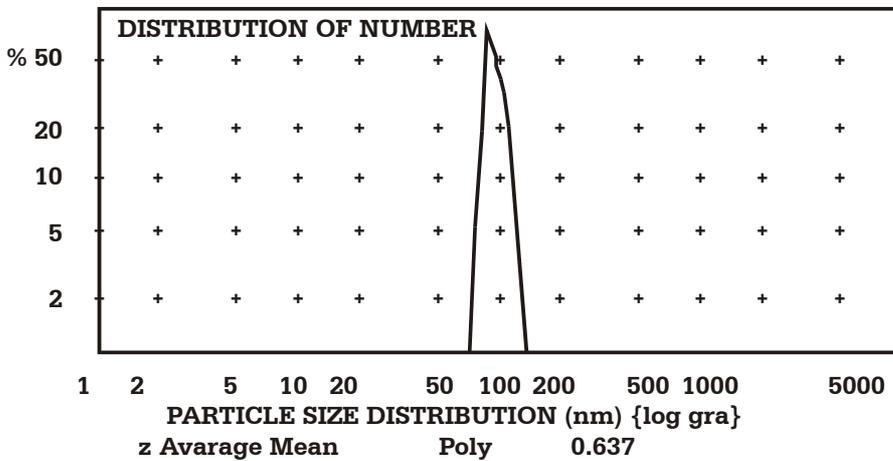
Bestimmung der Vesikelgröße des für das Kaninchenmodell entwickelten liposomalen Systems: Messgerätsausdruck

### MALVERN ANALYSIS REPORT

---

Calculated from Data from accumulation file

Temperature 20.5 Viscosity 0.9910 Refractive Index (Liquid) 1.000 Angle 90.0  
 Particle Refractive Index (real) 0,000 (imag) %0.331E+%9  
 Count rate 81,8 (1000's /sec)



PARTICLE SIZE DISTRIBUTION (nm)				PARTICLE SIZE DISTRIBUTION (nm)			
DISTRIBUTION OF NUMBER				DISTRIBUTION OF NUMBER			
Class	:	amount	% below	Class	:	amount	% below
20.6	-	25.7	0.0	291.1	-	363.0	0.0
25.7	-	32.0	0.0	363.0	-	452.6	0.0
32.0	-	39.9	0.0	452.6	-	564.5	0.0
39.9	-	49.8	0.0	564.5	-	703.9	0.0
49.8	-	62.1	0.0	703.9	-	877.8	0.0
62.1	-	77.4	0.0	877.8	-	1094.6	0.0
77.4	-	96.5	71.9	1094.6	-	1365.0	0.0
96.5	-	120.4	28.0	1365.0	-	1702.2	0.0
120.4	-	150.1	0.0	1702.2	-	2122.7	0.0
150.1	-	187.2	0.0	2122.7	-	2647.1	0.0
187.2	-	233.4	0.0	2647.1	-	3301.0	0.0
233.4	-	291.1	0.0	3301.0	-	4116.4	0.0

Dist. Mean 93.9 St.Dev. 51.0  
 Analysis Range 200 Fit 2.65E-02 Channels 18 Spacing 1.20  
 Peaks : 92.4 [99.9] fwhm 429.8 [ 0.0] fwhm 114.2 1665.7

*“I often quote myself, it adds spice to my conversation.”*

*George Bernard Shaw*

*“When you steal from one author, it's plagiarism;  
if you steal from many, it's research.”*

*Wilson Mizner (1876-1933)*

## Literaturverzeichnis

1. Pliška, V., Testa, B. und van de Waterbeemd, H., *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*, VCH, Weinheim, DE & NY, USA, (1996).
2. Buurma, N. J., *Water, a Unique Medium for Organic Reactions*, Diss., University of Groningen, Neth., (2003).
3. Bauer, K. H., Froemming, K.-H., Fuehrer, C., Graf, E., Leuenberger, H., Merkle, H. P., Mielck, J. B. und Schilcher, H., *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie*, (6. Auflage), Wiss. Verl.-Ges. mbH (WVG), Stuttgart, DE, (1999), S. 209.
4. Pfeifer, S., Pflugel, P. und Borchert, H.-H., *Biopharmazie*, (3. Auflage), Ullstein/Mosby GmbH & Co. KG, Berlin/Wiesbaden, DE, (1995), S. 47.
5. Wils, P., Warnery, A., Phung-Ba, V., Legrain, S., und Scherman, D., High lipophilicity decreases drug transport across intestinal epithelial cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269 (1994) 654-658.
6. Bretschneider, B., *Charakterisierung und Beeinflussung des intestinalen Cephalosporintransportes*, Diss., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, DE, (1999).
7. Gibaldi, M. und Feldman, S., Mechanisms of surfactant effects on drug absorption, *J. Pharm. Sci.* 59 (1970) 579-589.
8. Hammad, M. A., *Solubility and stability of drugs in mixed micelles*, Diss., Christian-Albrecht-Universität Kiel, DE, (1998).
9. Swarbrick, J., Solubilized systems in pharmacy, *J. Pharm. Sci.* 54 (1965) 1229-1237.
10. Borrego, E., Sicilia, D., Rubio, S., und Pérez-Bendito, D., Determination of drugs based on the formation of mixed aggregates with surfactants, *Analytica Chimica Acta* 362 (1998) 285-297.
11. Shao, Z. und Mitra, A. K., Nasal membrane and intracellular protein and enzyme release by bile salts and bile salt-fatty acid mixed micelles: correlation with facilitated drug transport, *Pharm. Res.* 9 (1992) 1184-1189.
12. Park, G. B., Shao, Z., und Mitra, A. K., Acyclovir permeation enhancement across intestinal and nasal mucosae by bile salt-acylcarnitine mixed micelles, *Pharm. Res.* 9 (1992) 1262-1267.
13. Gershanik, T. und Benita, S., Self-dispersing lipid formulations for improving oral absorption of lipophilic drugs, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000) 179-188.
14. Son, K., *Detergent and Phospholipid mixed micelles as proliposomes for an intravenous delivery of water-insoluble drugs*, Diss., University of Illinois at Chicago, Health Sciences Center, USA, (1991).
15. Pace, S. N., Pace, G. W., Parikh, I., und Mishra, A. K., Novel injectable formulations of insoluble drugs, *Pharmaceutical Technology* 23 (1999) 116-135.
16. Bader, S., Guarneri, M., Fini, A., Fazio, G., und Rabasco, A. M., Cosmetic applications of lecithin/bile salt mixed micelles, *Cosmet. Toiletries* 108 (1993) 63-68.
17. Small, D. M., Size and structure of bile salt micelles. Influence of structure, counterion, pH, and temperature., *Adv. Chem. Ser.* 84 (1968) 31-52.
18. Shankland, W., The equilibrium and structure of lecithin-cholesterol mixed micelles, *Chem. Phys. Lipids* 4 (1970) 109-130.
19. Mazer, N. A., Benedek, G. B., und Carey, M. C., Quasielastic light-scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Mixed micelle formation in bile salt-lecithin solutions, *Biochemistry* 19 (1980) 601-615.
20. Ulmius, J., Lindblom, G., Wennerstrom, H., Johansson, L. B., Fontell, K., Soderman, O., und Arvidson, G., Molecular organization in the liquid-crystalline phases of lecithin-sodium cholesterol-water systems studied by nuclear magnetic resonance, *Biochemistry* 21 (1982) 1553-1560.
21. Nichols, J. W. und Ozarowski, J., Sizing of lecithin-bile salt mixed micelles by size-exclusion high-performance liquid chromatography, *Biochemistry* 29 (1990) 4600-4606.

22. Hjelm, R. P., Jr., Thiyagarajan, P., und Alkan-Onyuksel, H., Organization of phosphatidylcholine and bile salt in rodlike mixed micelles, *J. Phys. Chem.* 96 (1992) 8653-8661.
23. Cohen, D. E., Thurston, G. M., Chamberlin, R. A., Benedek, G. B., und Carey, M. C., LASER light scattering evidence for a common wormlike growth structure of mixed micelles in bile salt- and straight-chain detergent-phosphatidylcholine aqueous systems: relevance to the micellar structure of bile, *Biochemistry* 37 (1998) 14798-14814.
24. Marrink, S. J. und Mark, A. E., Molecular dynamics simulations of mixed micelles modeling human bile, *Biochemistry* 41 (2002) 5375-5382.
25. Roda, A., Cerre, C., Fini, A., Sipahi, A. M., und Baraldini, M., Experimental Evaluation of a Model for Predicting Micellar Composition and Concentration of Monomeric Species in Bile Salt Binary Mixtures, *J. Pharm. Sci.* 84 (1995) 593-598.
26. Coello, A., Mejjide, F., Núñez, E. R., und Tato, J. V., Aggregation Behavior of Bile Salts in Aqueous Solution, *J. Pharm. Sci.* 85 (1996) 9-15.
27. Haque, M. E., Das, A. R., Rakshit, A. K., und Moulik, S. P., Properties of Mixed Micelles of Binary Surfactant Combinations, *Langmuir* 12 (1996) 4084-4089.
28. Penfold, J., Staples, E., Thompson, L., Tucker, I., Hines, J., Thomas, R. K., Lu, J. R., und Warren, N., Structure and Composition of Mixed Surfactant Micelles of Sodium Dodecyl Sulfate and Hexaethylene Glycol Monododecyl Ether and of Hexadecyltrimethylammonium Bromide and Hexaethylene Glycol Monododecyl Ether, *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 5204-5211.
29. Barrios, J. M. und Lichtenberger, L. M., Role of biliary phosphatidylcholine in bile acid protection and NSAID injury of the ileal mucosa in rats, *Gastroenterology* 118 (2000) 1179-1186.
30. El-Hariri, L., Marriott, C., und Martin, G. P., The mitigating Effects of Phosphatidilcholines on Bile Salt- and Lysophosphatidylcholine-induced Membrane Damage, *J. Pharm. Pharmacol.* 44 (1992) 651-654.
31. Gould, L. A., Lansley, A. B., Brown, M. B., Forbes, B., und Martin, G. P., Mitigation of surfactant erythrocyte toxicity by egg phosphatidylcholine, *J. Pharm. Pharmacol.* 52 (2000) 1203-1209.
32. Martin, G. P. und Marriott, C., Membrane damage by bile salts: the protective function of phospholipids, *J. Pharm. Pharmacol.* 31 (1981) 745-759.
33. Scott Swensen, E., Milisen, B., und Curatolo, W., Intestinal Permeability Enhancement: Efficacy, Acute Local Toxicity, and reversibility, *Pharm. Res.* 11 (1994) 1132-1142.
34. Naylor, L. J., Bakatselou, V., und Dressman, J. B., Comparison of the mechanism of dissolution of hydrocortisone in simple and mixed micelle systems, *Pharm. Res.* 10 (1993) 865-870.
35. Naylor, L. J., Bakatselou, V., Rodriguez-Hornedo, N., Weiner, N. D., und Dressman, J. B., Dissolution behaviour of steroids in bile salt solutions is modified by the presence of lecithin, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (1995) 346-353.
36. Torchilin, V. P., Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems, *J. Contr. Release* 73 (2001) 137-172.
37. Yalkowsky, S. H., Amidon, G. L., Florence, A. T., Repta, A. J., Roseman, T. J. und Shefter, E., *Techniques of Solubilisation of drugs*, Marcel Dekker, Inc., NY, USA, (1981).
38. Martin, A. N. und Leuenberger, H., *Martin Physikalische Pharmazie. Pharmazeutisch angewandte physikalisch-chemische Grundlagen*, (4. Auflage), Wiss. Verl.-Ges. mbH (WVG), Stuttgart, DE, (2002).
39. Huettenrauch, R., Mizellbildung als Fehlrdnungsprozeß des Lösungsmittels, *Acta Pharm. Technol.* 30 (1984) 181-203.
40. Hildebrand, A., *Physikochemische Charakterisierung von Gallensalz-Mischmizellen als Grundlage für innovative Arzneistoffträgersysteme*, Diss., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, DE, (2002).
41. Lennernäs, H., Nylander, S., und Ungell, A.-L., Jejunal permeability: a comparison between the ussing chamber technique and the single-pass perfusion in humans, *Pharm. Res.* 14 (1997) 667-671.

42. Lennernäs, H., Human Intestinal Permeability, *J. Pharm. Sci.* 87 (1998) 403-410.
43. Hillgren, K. M., Kato, A., und Borchardt, R. T., In-vitro systems for studying intestinal drug absorption, *Med. Res. Rev.* 15 (1995) 83-109.
44. Stewart, B. H., Chan, O. H., Jezyk, N., und Fleisher, D., Discrimination between drug candidates using models for evaluation of intestinal absorption, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23 (1997) 27-45.
45. Ungell, A.-L., In Vitro absorption studies and their relevance to absorption from GI tract, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 23 (1997) 879-892.
46. Stewart, B. H. und Chan, O. H., Use of Immobilized Artificial Membrane Chromatography for Drug Transport Applications, *J. Pharm. Sci.* 87 (1998) 1471-1478.
47. Barthe, L., Woodley, J., und Houin, G., Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 13 (1999) 154-168.
48. Pagliara, A., Reist, M., Geinoz, S., Carrupt, P. A., und Testa, B., Evaluation and prediction of drug permeation, *J. Pharm. Pharmacol.* 51 (1999) 1339-1357.
49. Stenberg, P., Luthman, K., und Artursson, P., Virtual screening of intestinal drug permeability, *J. Contr. Release* 65 (2000) 231-243.
50. Balimane, P. V., Chong, S., und Morrison, R. A., Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 44 (2001) 301-312.
51. Hidalgo, I. J., Assessing the absorption of new pharmaceuticals, *Curr. Top. Med. Chem.* 1 (2001) 385-401.
52. Le Ferrec, E., Chesne, C., Artusson, E., Brayden, D., Fabre, G., Gires, P., Guillou, F., Rousset, M., Rubas, W., und Scarino, M.-L., In Vitro Models of the Intestinal Barrier. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 46, *Alternatives to Animal Testing on the Web*, (2002), <http://altweb.jhsph.edu/publications/ECVAM/ecvam46.htm>.
53. Karth, M. G., Ho, N. F., und Higuchi, W. I., Quantitative analysis of the interfacial barrier to membrane transport of cholesterol solubilized in a charged micellar system, *J. Pharm. Sci.* 74 (1985) 618-620.
54. Karth, M. G., Higuchi, W. I., und Fox, J. L., Direct membrane method for the study of interface-controlled transport of cholesterol in aqueous media, *J. Pharm. Sci.* 74 (1985) 612-617.
55. Higuchi, W. I. und Ho, N. F. H., Membrane transfer of drugs, *Int. Pharm. J.* 2 (1988) 10-15.
56. Komiya, I., Park, J. Y., Kamani, A., Ho, N. F. H., und Higuchi, W. I., Quantitative mechanistic studies in simultaneous fluid flow and intestinal absorption using steroids as model solutes, *Int. J. Pharm.* 4 (1980) 249-262.
57. Karlsson, H. und Artursson, P., A method for the determination of cellular permeability coefficients and aqueous boundary layer thickness in monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells grown in permeable filter chambers, *Int. J. Pharm.* 71 (1991) 55-64.
58. Westergaard, H. und Dietschy, J. M., Delineation of the dimensions and permeability characteristics of the two major diffusion barriers to passive mucosal uptake in the rabbit intestine, *J. Clin. Invest.* 54 (1974) 718-732.
59. Thomson, A. B. und Dietschy, J. M., Intestinal kinetic parameters: effects of unstirred layers and transport preparation, *Am. J. Physiol.* 239 (1980) G372-G377.
60. Thomson, A. B. und Dietschy, J. M., Experimental demonstration of the effect of the unstirred water layer on the kinetic constants of the membrane transport of D-glucose in rabbit jejunum, *J. Membr. Biol.* 54 (1980) 221-229.
61. Thomson, A. B. und Dietschy, J. M., Derivation of the equations that describe the effects of unstirred water layers on the kinetic parameters of active transport processes in the intestine, *J. Theor. Biol.* 64 (1977) 277-294.
62. Karlsson, J. und Artursson, P., A new diffusion chamber system for the determination of drug permeability coefficients across the human intestinal epithelium that are independent of the unstirred water layer, *Biochim. Biophys. Acta* 1111 (1992) 204-210.

63. Larhed, A. W., *The Mucus Layer and Other Barriers to Intestinal Drug Absorption*, Diss., Faculty of Pharmacy, Uppsala, Sweden, Almquist & Wiksell International, Stockholm, Sweden, (1997).
64. Mizuno, M., Yoshida, M., Hashida, M., Kimura, T., und Sezaki, H., Effect of mucosal lipid components on the membrane permeation of water -soluble drugs, *Chem. Pharm. Bull.* 33 (1985) 2932-2940.
65. Behrens, I., Stenberg, P., Artursson, P., und Kissel, T., The effect of mucus on the transepithelial transport of lipophilic drugs in a mucus-producing cell line HT29-MTX, *Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater.* 27<sup>th</sup> (2000) 1218-1219.
66. MacAdam, A., The effect of gastro-intestinal mucus on drug absorption, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 11 (1993) 201-220.
67. Nimmerfall, F. und Rosenthaler, J., Significance of the goblet-cell mucin layer, the outermost luminal barrier to passage through the gut wall, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94 (1980) 960-966.
68. Smithson, K. W., Millar, D. B., Jacobs, L. R., und Gray, G. M., Intestinal diffusion barrier: unstirred water layer or membrane surface mucous coat?, *Science* 214 (1981) 1241-1244.
69. Behrens, I., Stenberg, P., Artursson, P., und Kissel, T., Transport of lipophilic drug molecules in a new mucus-secreting cell culture model based on HT29-MTX cells, *Pharm. Res.* 18 (2001) 1138-1145.
70. Jackson, M. J., Drug transport across gastrointestinal epithelia, In: Johnson, L. R. [Hrsg.], *Physiology of the gastrointestinal tract* (2<sup>nd</sup> Edn.), Raven Press, NY, USA, (1987), S. 1795-1621.
71. Hidalgo, I. J., Hillgren, K. M., Grass, G. M., und Borchardt, R. T., Characterization of the unstirred water layer in Caco-2 cell monolayers using a novel diffusion apparatus, *Pharm. Res.* 8 (1991) 222-227.
72. Larhed, A. W., Artursson, P., und Bjork, E., The influence of intestinal mucus components on the diffusion of drugs., *Pharm. Res.* 15 (1998) 66-71.
73. LaMont, J. T., Mucus: the front line of intestinal mucosal defense, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 664 (1992) 190-201.
74. Bhat, P. G., Flanagan, D. R., und Donovan, M. D., The limiting role of mucus in drug absorption: Drug permeation through mucus solution, *Int. J. Pharm.* 126 (1995) 179.
75. Mantle, M. und Thakore, E., Rabbit intestinal and colonic mucins: isolation, partial characterization, and measurement of secretion using an enzyme-linked immunoassay, *Biochem. Cell Biol.* 66 (1988) 1045-1054.
76. Champe, P. C. und Harvey, R. A., *Biochemistry*, (2<sup>nd</sup> Edn.), Lippincott, Philadelphia, PA, USA, (1994), S. 157-162.
77. Wiedmann, T. S., Herrington, H., Deye, C., und Kallick, D., Distribution and diffusion of sodium taurocholate and egg phosphatidylcholine aggregates in rat intestinal mucin, *Pharm. Res.* 18 (2001) 1489-1496.
78. Lee, S. P. und Nicholls, J. F., Diffusion of charged ions in mucus gel: effect of net charge, *Biorheology* 24 (1987) 565-569.
79. Karlsson, J., Wikman, A., und Artursson, P., The mucus layer as a barrier to drug absorption in monolayers of human intestinal epithelial HT29-H goblet cells, *Int. J. Pharm.* 99 (1993) 209-218.
80. Jastrow, H., Glykokalix, *Elektronenmikroskopischer Atlas im Internet*, (2004), <http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMGlykokalix.html>.
81. Nuhn, P., Transport proteins as drug targets. Biochemical principles of membrane transport, *Pharm. Ztg.* 144 (1999) 541-544.
82. Tsuji, A. und Tamai, I., Carrier-mediated intestinal transport of drugs, *Pharm. Res.* 13 (1996) 963-977.
83. Wachter, V. J., Wu, C. Y., und Benet, L. Z., Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy, *Mol. Carcinog.* 13 (1995) 129-134.

84. Wachter, V. J., Salphati, L., und Benet, L. Z., Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46 (2001) 89-102.
85. Benet, L. Z., Izumi, T., Zhang, Y., Silverman, J. A., und Wachter, V. J., Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery, *J. Contr. Release* 62 (1999) 25-31.
86. Suzuki, H. und Sugiyama, Y., Role of metabolic enzymes and efflux transporters in the absorption of drugs from the small intestine, *Eur. J. Pharm. Sci.* 12 (2000) 3-12.
87. Bretschneider, B., Brandsch, M., und Neubert, R., Intestinal transport of beta-lactam antibiotics: analysis of the affinity at the H<sup>+</sup>/peptide symporter (PEPT1), the uptake into Caco-2 cell monolayers and the transepithelial flux, *Pharm. Res.* 16 (1999) 55-61.
88. Peters, W. H., Allebes, W. A., Jansen, P. L., Poels, L. G., und Capel, P. J., Characterization and tissue specificity of a monoclonal antibody against human uridine 5'-diphosphate-glucuronosyl-transferase, *Gastroenterology* 93 (1987) 162-169.
89. Wynalda, M. A., Hutzler, J. M., Koets, M. D., Podoll, T., und Wienkers, L. C., In vitro metabolism of clindamycin in human liver and intestinal microsomes, *Drug Metab. Dispos.* 31 (2003) 878-887.
90. Obach, R. S., Zhang, Q. Y., Dunbar, D., und Kaminsky, L. S., Metabolic characterization of the major human small intestinal cytochrome p450s, *Drug Metab. Dispos.* 29 (2001) 347-352.
91. Emoto, C., Yamazaki, H., Iketaki, H., Yamasaki, S., Satoh, T., Shimizu, R., Suzuki, S., Shimada, N., Nakajima, M., und Yokoi, T., Cooperativity of alpha-naphthoflavone in cytochrome P450 3A-dependent drug oxidation activities in hepatic and intestinal microsomes from mouse and human, *Xenobiotica* 31 (2001) 265-275.
92. Yamamoto, T., Hagima, N., Nakamura, M., Kohno, Y., Nagata, K., und Yamazoe, Y., Differences in cytochrome P450 forms involved in the metabolism of N,N-dipropyl-2-[4-methoxy-3-(2-phenylethoxy)phenyl]ethylamine monohydrochloride (NE-100), a novel sigma ligand, in human liver and intestine, *Drug Metab. Dispos.* 31 (2003) 60-66.
93. Chiba, M., Hensleigh, M., und Lin, J. H., Hepatic and intestinal metabolism of indinavir, an HIV protease inhibitor, in rat and human microsomes. Major role of CYP3A, *Biochem. Pharmacol.* 53 (1997) 1187-1195.
94. Johnson, T. N., Tanner, M. S., Taylor, C. J., und Tucker, G. T., Enterocytic CYP3A4 in a paediatric population: developmental changes and the effect of coeliac disease and cystic fibrosis, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 51 (2001) 451-460.
95. Ungell, A.-L., Ex vivo models for studying intestinal transport. A lecture in the 4<sup>th</sup> International Intensive Course and Workshop on Cell Culture and in-vitro Models for Drug Absorption and Delivery (20 Feb.-1 Mar./2002), Universität Saarland, Saarbrücken, DE, (unveröffentlichte Arbeit).
96. Takemoto, K., Yamazaki, H., Tanaka, Y., Nakajima, M., und Yokoi, T., Catalytic activities of cytochrome P450 enzymes and UDP-glucuronosyltransferases involved in drug metabolism in rat everted sacs and intestinal microsomes, *Xenobiotica* 33 (2003) 43-55.
97. Wortelboer, H. M., van der Linden, E. C., De Kruif, C. A., Noordhoek, J., Blaauboer, B. J., van Bladeren, P. J., und Falke, H. E., Effects of indole-3-carbinol on biotransformation enzymes in the rat: in vivo changes in liver and small intestinal mucosa in comparison with primary hepatocyte cultures, *Food Chem. Toxicol.* 30 (1992) 589-599.
98. Milewich, L., MacDonald, P. C., und Carr, B. R., Activity of 17 beta-hydroxysteroid oxidoreductase in tissues of the human fetus, *J. Endocrinol.* 123 (1989) 509-518.
99. Farthing, M. J., Vinson, G. P., Edwards, C. R., und Dawson, A. M., 17 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase activity in the mucosa of rat and human small intestine, *J. Steroid Biochem.* 14 (1981) 1107-1113.
100. Sano, T., Hirasawa, G., Takeyama, J., Darnel, A. D., Suzuki, T., Moriya, T., Kato, K., Sekine, H., Ohara, S., Shimosegawa, T., Nakamura, J., Yoshihama, M., Harada, N., und Sasano, H., 17 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression and enzyme activity in the human gastrointestinal tract, *Clin. Sci. (Lond)* 101 (2001) 485-491.

101. Andersson, S., Molecular genetics of androgenic 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 55 (1995) 533-534.
102. Akinola, L. A., Poutanen, M., und Vihko, R., Cloning of rat 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and characterization of tissue distribution and catalytic activity of rat type 1 and type 2 enzymes, *Endocrinology* 137 (1996) 1572-1579.
103. Eik-Nes, K. B., Stenstad, P., und Lofthus, R., Metabolism in vitro of testosterone (T) to 17 beta-hydroxy-5 alpha-androstane-3-one (DHT) and 5 alpha-androstane-3 alpha,17 beta-diol (3 alpha) by the 800 g supernatant fraction of ileum from rats, *J. Steroid Biochem.* 19 (1983) 683-686.
104. Stenstad, P. und Eik-Nes, K. B., In vitro metabolism of testosterone to 17 beta-hydroxy-5 alpha-androstane-3-one and 5 alpha-androstane-3 alpha, 17 beta-diol by the rat intestine, *J. Steroid Biochem.* 17 (1982) 401-406.
105. Buur, A. und Mork, N., Metabolism of testosterone during in vitro transport across CACO-2 cell monolayers: evidence for beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in differentiated CACO-2 cells, *Pharm. Res.* 9 (1992) 1290-1294.
106. Oppermann, U. C. und Maser, E., Characterization of a 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/ carbonyl reductase from the gram-negative bacterium *Comamonas testosteroni*, *Eur. J. Biochem.* 241 (1996) 744-749.
107. Laube, B., Winkler, S., Ladstetter, B., Scheller, T., und Schwarz, L. R., Establishment of a novel in vitro system for studying the interaction of xenobiotic metabolism of liver and intestinal microflora, *Arch. Toxicol.* 74 (2000) 379-387.
108. Shinohara, Y., Baba, S., und Kasuya, Y., Absorption, metabolism, and excretion of oral testosterone in humans by mass fragmentography, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51 (1980) 1459-1462.
109. Pacifici, G. M., D'alessandro, C., Gucci, A., und Giuliani, L., Sulphation of the heterocyclic amine 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline in the human liver and intestinal mucosa: interindividual variability, *Arch. Toxicol.* 71 (1997) 477-481.
110. Pacifici, G. M., Temellini, A., Castiglioni, M., D'alessandro, C., Ducci, A., und Giuliani, L., Interindividual variability of the human hepatic sulphotransferases, *Chem. Biol. Interact.* 92 (1994) 219-231.
111. Matsumoto, A. M., The testis and male function, In: Wyngaarden, J. B., Smith, L. H., und Bennet, J. C. [Hrsg.], *Cecil Textbook of medicine*, WB Saunders, Philadelphia, USA, (1992), S. 1333.
112. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K. und Schäfer-Korting, M., *Mutschler Arzneimittelwirkungen*, (8. Auflage), Wiss. Verl.-Ges. mbH (WVG), Stuttgart, DE, (2001), S. 450.
113. van Asperen, J., van Tellingen, O., und Beijnen, J. H., The pharmacological role of P-glycoprotein in the intestinal epithelium, *Pharmacol. Res.* 37 (1998) 429-435.
114. Borst, P., Zelcer, N., und van Helvoort, A., ABC transporters in lipid transport, *Biochim. Biophys. Acta* 1486 (2000) 128-144.
115. Borst, P., Evers, R., Kool, M., und Wijnholds, J., The multidrug resistance protein family, *Biochim. Biophys. Acta* 1461 (1999) 347-357.
116. Germann, U. A., Pastan, I., und Gottesman, M. M., P-glycoproteins: mediators of multidrug resistance, *Semin. Cell Biol.* 4 (1993) 63-76.
117. Katoh, M., Nakajima, M., Yamazaki, H., und Yokoi, T., Inhibitory effects of CYP3A4 substrates and their metabolites on P-glycoprotein-mediated transport, *Eur. J. Pharm. Sci.* 12 (2001) 505-513.
118. Oka, A., Oda, M., Saitoh, H., Nakayama, A., Takada, M., und Aungst, B. J., Secretory transport of methylprednisolone possibly mediated by P-glycoprotein in Caco-2 cells, *Biol. Pharm. Bull.* 25 (2002) 393-396.
119. Taeuber, U., Absolute bioavailability of testosterone after oral administration of testosterone-undecanoate and testosterone. Reply to comments, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 12 (1987) 226.

120. Testosterone: Elecsys® Systems 1010/2010/MODULAR ANALYTICS E170 - product brochure, Roche diagnostics GmbH, Mannheim, DE, (2001).
121. Taeuber, U., Schroeder, K., Dusterberg, B., und Matthes, H., Absolute bioavailability of testosterone after oral administration of testosterone-undecanoate and testosterone, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 11 (1986) 145-149.
122. Farthing, M. J., Vinson, G. P., Edwards, C. R., und Dawson, A. M., Testosterone metabolism by the rat gastrointestinal tract, in vitro and in vivo, *Gut* 23 (1982) 226-234.
123. Martin, R. P., Loriaux, D. L., und Farnham, G. S., Enterohepatic cycling of metabolized testosterone in the male dog, *Steroids Suppl.* II (1965) 149-163.
124. Daggett, P. R., Wheeler, M. J., und Nabarro, J. D., Oral testosterone, a reappraisal, *Horm. Res.* 9 (1978) 121-129.
125. Foss, G. L., Clinical administration of androgens, *Lancet* 236 (1939) 502-504.
126. Nieschlag, E., Mauss, J., Coert, A., und Kicovic, P., Plasma androgen levels in men after oral administration of testosterone or testosterone undecanoate, *Acta Endocrinol.* 79 (1975) 366-374.
127. Frey, H., Aakvaag, A., Saanum, D., und Falch, J., Bioavailability of oral testosterone in males, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 16 (1979) 345-349.
128. Aakvaag, A. und Vogt, J. H., Plasma testosterone values in different forms of testosterone treatment, *Acta Endocrinol.* 60 (1969) 537-542.
129. Hamburger, C., Testosterone treatment and 17-ketosteroid excretion. V. Administration of testosterone per rectum, *Acta Endocrinol.* 28 (1958) 529-536.
130. Hirschhauser, C., Hopkinson, C. R., Sturm, G., und Coert, A., Testosterone undecanoate: a new orally active androgen, *Acta Endocrinol.* 80 (1975) 179-187.
131. Mazer, N. A., New clinical applications of transdermal testosterone delivery in men and women, *J. Contr. Release* 65 (2000) 303-315.
132. Altenburger, R. und Kissel, T., The human keratinocyte cell line HaCaT: an in vitro cell culture model for keratinocyte testosterone metabolism, *Pharm. Res.* 16 (1999) 766-771.
133. Noguchi, T., Charman, W. N. A., und Stella, V. J., The effect of drug lipophilicity and lipid vehicles on the lymphatic absorption of various testosterone esters, *Int. J. Pharm.* 24 (1985) 173-184.
134. Voorspoels, J., Remon, J. P., Eechaute, W., und De Sy, W., Buccal absorption of testosterone and its esters using a bioadhesive tablet in dogs, *Pharm. Res.* 13 (1996) 1228-1232.
135. Partsch, C. J., Weinbauer, G. F., Fang, R., und Nieschlag, E., Injectable testosterone undecanoate has more favourable pharmacokinetics and pharmacodynamics than testosterone enanthate, *Eur. J. Endocrinol.* 132 (1995) 514-519.
136. Davidson, D. W., O'Carroll, R., und Bancroft, J., Increasing circulating androgens with oral testosterone undecanoate in eugonadal men, *J. Steroid Biochem.* 26 (1987) 713-715.
137. Papadimas, J., Bili, E., Papadopoulou, F., Spanos, E., Tarlatzis, B., Kokkas, B., Pangalos, G., Bontis, J., und Mantalenakis, S., Testosterone undecanoate versus mesterolone in hypogonadal male patients, *Epitheor. Klin. Farmakol. Farmakokinet.* 10 (1996) 3-8.
138. Shackelford, D. M., Faassen, W. A., Houwing, N., Lass, H., Edwards, G. A., Porter, C. J., und Charman, W. N., Contribution of lymphatically transported testosterone undecanoate to the systemic exposure of testosterone after oral administration of two andriol formulations in conscious lymph duct-cannulated dogs, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306 (2003) 925-933.
139. Coert, A., Geelen, J., und De Visser, J., The pharmacology and metabolism of testosterone undecanoate (TU), a new orally active androgen, *Acta Endocrinol.* 79 (1975) 789-800.
140. Horst, H. J., Holtje, W. J., Dennis, M., Coert, A., Geelen, J., und Voigt, K. D., Lymphatic absorption and metabolism of orally administered testosterone undecanoate in man, *Klin. Wochenschr.* 54 (1976) 875-879.

141. Brzezowska, E., Dmochowska-Gladysz, J., Kolek, T., und Nobilec, E., Biotransformation--XXXIV. Metabolism of testosterone esters in fungi cultures, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 46 (1993) 259-263.
142. Hobbelen, P. M., Coert, A., und Geelen, J. A., Interactions of steroids with serum lipoproteins, *Biochem. Pharmacol.* 24 (1975) 165-172.
143. Heller, R. F., Wheeler, M. J., Micallef, J., Miller, N. E., und Lewis, B., Relationship of high density lipoprotein cholesterol with total and free testosterone and sex hormone binding globulin, *Acta Endocrinol.* 104 (1983) 253-256.
144. Pardridge, W. M., Serum bioavailability of sex steroid hormones., *Clin. Endocrinol. Metab.* 15 (1986) 259-278.
145. Petra, P. H., Stanczyk, F. Z., Namkung, P. C., Fritz, M. A., und Novy, M. J., Direct effect of sex steroid-binding protein (SBP) of plasma on the metabolic clearance rate of testosterone in the rhesus macaque, *J. Steroid Biochem.* 22 (1985) 739-746.
146. Westphal, U., Characteristics of steroid-protein interactions, including results on a progesterone-binding globulin., In: James, V. H. T. und Martini, L. [Hrsg.], *Horm.Steroids: Proc. Int. Congr.*, International congress series, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, Neth., (1971), S. 410-419.
147. Westphal, U., Protein binding of steroid hormones, *Klin. Wochenschr.* 55 (1977) 877-880.
148. Tax, L., Absolute bioavailability of testosterone after oral administration of testosterone-undecanoate and testosterone. Letters to the Editor, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 12 (1987) 226.
149. Grisafe, J. A. und Hayton, W. L., Intestinal absorption of griseofulvin from a triolein digestion mixture in rats, *J. Pharm. Sci.* 67 (1978) 895-899.
150. Hoffman, N. E., The relationship between uptake in-vitro of oleic acid and micellar solubilization, *Biochim. Biophys. Acta* 196 (1970) 193-203.
151. Poelma, F. G. J., Breas, R., Tukker, J. J., und Crommelin, D. J. A., Intestinal absorption of drugs. The influence of mixed micelles on the disappearance kinetics of drugs from the small intestine of the rat, *J. Pharm. Pharmacol.* 43 (1991) 317-324.
152. Wiedmann, T. S., Deye, C., und Kallick, D., Interaction of bile salt and phospholipids with bovine submaxillary mucin, *Pharm. Res.* 18 (2001) 45-53.
153. Wilson, F. A. und Dietschy, J. M., Characterization of bile acid absorption across the unstirred water layer and brush border of the rat jejunum, *J. Clin. Invest.* 51 (1972) 3015-3025.
154. Westergaard, H. und Dietschy, J. M., The mechanism whereby bile acid micelles increase the rate of fatty acid and cholesterol uptake into the intestinal mucosal cell, *J. Clin. Invest.* 58 (1976) 97-108.
155. Lindström, M., *Intestinal Lipid Absorption with Emphasis on Non-polar Lipids and on the Importance of Non-micellar Aggregates of Bile Salts and lipolytic Products*, Diss., Department of Medical and Physiological Chemistry, University of Lund, Sweden, (1988).
156. Li, C. Y., Zimmerman, C. L., und Wiedmann, T. S., Diffusivity of bile salt/phospholipid aggregates in mucin, *Pharm. Res.* 13 (1996) 535-541.
157. Martin, G. P., Marriott, C., und Kellaway, I. W., Direct effect of bile salts and phospholipids on the physical properties of mucus, *Gut* 19 (1978) 103-107.
158. Poelma, F. G. J., Breas, R., und Tukker, J. J., Intestinal absorption of drugs. IV. The influence of taurocholate and L-cysteine on the barrier function of mucus, *Int. J. Pharm.* 64 (1990) 161-169.
159. Meaney, C. M. und O'Driscoll, C. M., A comparison of the permeation enhancement potential of simple bile salt and mixed bile salt:fatty acid micellar systems using the CaCo-2 cell culture model, *Int. J. Pharm.* 207 (2000) 21-30.
160. Schreier, S., Malheiros, S. V. P., und De Paula, E., Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects, *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes* 1508 (2000) 210-234.

161. Segura-Bono, M. J., Garrigues, T. M., Merino, V., und Bermejo, M. V., Compared effects of synthetic and natural bile acid surfactants on xenobiotic absorption. III. studies with mixed micelles, *Int. J. Pharm.* 107 (1994) 159-166.
162. Rege, B., Kao, J., und Polli, J., Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers, *Eur. J. Pharm. Sci.* 16 (2002) 237.
163. Jelinek, A., *In-vitro-Toxizität grenzflächenaktiver Substanzen: Wirkung auf Zellmembran, mitochondriale Funktion und Apoptose*, Diss., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, DE, (2001).
164. Taylor, C. B., The effect of cetyltrimethylammonium bromide and some related compounds on transport and metabolism in the intestine of the rat in vitro, *J. Physiol.* 165 (1963) 199-218.
165. Alhaique, F., Marchetti, M., Riccieri, F. M., und Santucci, E., A negative cooperative binding process between chloramphenicol and sodium dodecyl sulfate to bovine serum albumin: a possible effect on drug absorption, *Experientia* 31 (1975) 215-218.
166. Warisnoicharoen, W., Lansley, A. B., und Lawrence, M. J., Toxicological evaluation of mixtures of nonionic surfactants, alone and in combination with oil, *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 859-868.
167. Charman, W. N. und Stella, V. J., Transport of lipophilic molecules by the intestinal lymphatic system, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 7 (1991) 1-14.
168. Charman, W. N., Lipid vehicle and formulation effects on intestinal lymphatic drug transport, In: Charman, W. N. und Stella, V. J. [Hrsg.], *Lymphatic Transport of Drugs*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, (1992), S. 113-179.
169. Anderberg, E. K., Lindmark, T., und Artursson, P., Sodium Caprate elicits Dilatations in Human Intestinal Tight Junctions and Enhances Drug Absorption by the Paracellular Route, *Pharm. Res.* 10 (1993) 857-864.
170. Ward, P. D., Tippin, T. K., und Thakker, D. R., Enhancing paracellular permeability by modulating epithelial tight junctions, *Pharm. Sci. Technol. Today* 3 (2000) 346-358.
171. Oberle, R. L., Moore, T. J., und Krummel, D. A., Evaluation of mucosal damage of surfactants in rat jejunum and colon, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 33 (1995) 75-81.
172. Lapré, J. A., Termont, D. S. M. L., Groen, A. K., und van der Meer, R., Lytic effects of mixed micelles of fatty acids and bile acids, *Am. J. Physiol.* 263 (1992) G333-G337.
173. Martin, G. P., El-Hariri, L., und Marriott, C., Bile Salt- and Lysophosphatidylcholine-induced Membrane Damage in Human Erythrocytes, *J. Pharm. Pharmacol.* 44 (1992) 646-650.
174. Kraus, C., Mehnert, W., und Froemming, K., Hemolytic activity of mixed micellar solutions of Solutol HS 15 and sodium deoxycholate, *Acta Pharm. Technol.* 36 (1990) 221-225.
175. Grant, R. L., Yao, C., Gabaldon, D., und Acosta, D., Evaluation of surfactant cytotoxicity potential by primary cultures of ocular tissues: I. Characterization of rabbit corneal epithelial cells and initial injury and delayed toxicity studies, *Toxicology* 76 (1992) 153-176.
176. Effendy, I. und Maibach, H. I., Surfactants and experimental irritant contact dermatitis, *Contact Dermatitis* 33 (1995) 217-225.
177. Feldman, S., Reinhard, M., und Willson, C., Effect of sodium taurodeoxycholate on biological membranes: release of phosphorus, phospholipid, and protein from everted rat small intestine, *J. Pharm. Sci.* 62 (1973) 1961-1964.
178. Whitmore, D. A., Brookes, L. G., und Wheeler, K. P., Relative effects of different surfactants on intestinal absorption and the release of proteins and phospholipids from the tissue, *J. Pharm. Pharmacol.* 31 (1979) 277-283.
179. Gullikson, G. W., Cline, W. S., Lorenzsonn, V., Benz, L., Olsen, W. A., und Bass, P., Effects of anionic surfactants on hamster small intestinal membrane structure and function: relationship to surface activity, *Gastroenterology* 73 (1977) 501-511.
180. Coleman, R., Lowe, P. J., und Billington, D., Membrane lipid composition and susceptibility to bile salt damage, *Biochim. Biophys. Acta* 599 (1980) 294-300.

181. Feldman, S. und Gibaldi, M., Physiologic surface-active agents and drug absorption. I. Effect of sodium taurodeoxycholate on salicylate transfer across the everted rat intestine, *J. Pharm. Sci.* 58 (1969) 425-431.
182. Alhaique, F., Giacchetti, D., Marchetti, M., und Riccieri, F. M., Effect of a second solubilize on the partition coefficient of drugs in micellar solution and their permeation rate across an artificial membrane, *J. Pharm. Pharmacol.* 29 (1977) 401-406.
183. De Castro, B., Gameiro, P., Guimaraes, C., Lima, J. L. F. C., und Reis, S., Partition coefficients of beta-blockers in bile salt/lecithin micelles as a tool to assess the role of mixed micelles in gastrointestinal absorption, *Biophysical Chemistry* 90 (2001) 31-43.
184. De Castro, B., Gameiro, P., Guimaraes, C., Lima, J. L. F. C., und Reis, S., Study of partition of nitrazepam in bile salt micelles and the role of lecithin, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001) 595-602.
185. Poelma, F. G. J., Breaes, R., und Tukker, J. J., Intestinal absorption of drugs . III. The influence of taurocholate on the disappearance kinetics of hydrophilic and lipophilic drugs from the small intestine of the rat, *Pharm. Res.* 7 (1990) 392-397.
186. Lichtenberger, L. M., The hydrophobic barrier properties of gastrointestinal mucus, *Annu. Rev. Physiol.* 57 (1995) 565-583.
187. Larhed, A. W., Artursson, P., Grasjo, J., und Bjork, E., Diffusion of drugs in native and purified gastrointestinal mucus, *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 660-665.
188. Muranishi, S., Muranushi, N., und Sezaki, H., Improvement of absolute bioavailability of normally poorly absorbed drugs: inducement of the intestinal absorption of streptomycin and gentamycin by lipid-bile salt mixed micelles in rat and rabbit, *Int. J. Pharm.* 2 (1979) 101-111.
189. Grisafe, J. A. und Hayton, W. L., Effects of short and medium chain fatty acids on absorption of lipophilic drugs from perfused rat intestine, *J. Pharm. Sci.* 67 (1978) 1211-1215.
190. Meaney, C. und O'Driscoll, C., Mucus as a barrier to the permeability of hydrophilic and lipophilic compounds in the absence and presence of sodium taurocholate micellar systems using cell culture models, *Eur. J. Pharm. Sci.* 8 (1999) 167-175.
191. Muranushi, N., Kunugawa, M., Nakajima, Y., Muranishi, S., und Sezaki, H., Mechanism for the inducement of the intestinal absorption of poorly absorbed drugs by mixed micelles I. Effects of various lipid-bile salt mixed micelles on the intestinal absorption of streptomycin in rat, *Int. J. Pharm.* 4 (1980) 271-279.
192. Fagerholm, U., Sjostrom, B., Sroka-Markovic, J., Wijk, A., Svensson, M., und Lennernäs, H., The effect of a drug-delivery system consisting of soybean phosphatidyl choline and medium-chain monoacylglycerol on the intestinal permeability of hexarelin in the rat, *J. Pharm. Pharmacol.* 50 (1998) 467-473.
193. Ganem-Quintanar, A., Quintanar-Guerrero, D., und Buri, P., Monoolein: A review of the pharmaceutical applications, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 26 (2000) 809-820.
194. Muranushi, N., Nakajima, M., Kinugawa, M., Muranishi, S., und Sezaki, H., Mechanism for the inducement of the intestinal absorption of poorly absorbed drugs by mixed micelles II. Effect of the incorporation of various lipids on the permeability of liposomal membranes, *Int. J. Pharm.* 4 (1980) 281-290.
195. Perry, E. A., Chandler, S. G., und Ferdinando, J. J. C., Oral pharmaceutical compositions containing sex hormones, Patent: WO 9740823, (1996).
196. Tengamnuay, P. und Mitra, A. K., Bile salt-fatty acid mixed micelles as nasal absorption promoters of peptides. I. Effects of ionic strength, adjuvant composition, and lipid structure on the nasal absorption of [D-Arg2]kyotorphin, *Pharm. Res.* 7 (1990) 127-133.
197. Yeh, P. Y., Effect of Medium-Chain Glycerides on Physiological Properties of Rabbit Intestinal Epithelium *in Vitro*, *Pharm. Res.* 11 (1994) 1148-1154.
198. Yu, L. X. und Amidon, G. L., Analytical Solutions to Mass Transfer, In: Amidon, G. L., Lee, P. I., und Topp, E. M. [Hrsg.], *Transport Processes in Pharmaceutical Systems*, Marcel Dekker, Inc., NY, USA, (2000), S. 23-53.

199. Riegelman, S., Allawala, N. A., Hrenoff, M. K., und Strait, L. A., The ultraviolet absorption spectrum as a criterion of the type of solubilization, *J. Colloid Sci.* 13 (1958) 208-217.
200. Guttman, D. E., Hamlin, W. E., Shell, J. W., und Wagner, J. G., Solubilization of anti-inflammatory steroids by aqueous solutions of Triton WR-1339, *J. Pharm. Sci.* 50 (1961) 305-307.
201. Kosower, E. M., The Effect of Solvent on Spectra. I. A new Empirical Measure of Solvent Polarity: Z-Values, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 3253-3260.
202. Kosower, E. M., The Effect of Solvent on Spectra. II. Correlation of Spectral Absorption Data with Z-Values, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 3261-3267.
203. Kosower, E. M., The Effect of Solvent on Spectra. III. The Use of Z-Values in Connection with Kinetic Data, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 3267-3270.
204. Kosower, E. M. und Wu, G.-S., The Effect of Solvent on Spectra. V. The Low Intensity ( $n$  to  $\pi^*$ ) Electronic Transition of Cyclic Ketones, *J. Am. Chem. Soc.* 83 (1961) 3142-3147.
205. Kosower, E. M., Wu, G.-S., und Sorensen, T. S., Effect of Solvent on Spectra. VI Detection of Solvent Effect on Molecular Conformation or Shape through Z-Values, *J. Am. Chem. Soc.* 83 (1961) 3147.
206. IUPAC, Z-value (def.), *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, 2<sup>nd</sup> Edn., (1997), <http://www.iupac.org/goldbook/Z06737.pdf>.
207. IUPAC, Cybotactic Region (def.), *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, 2<sup>nd</sup> Edn., (1997), <http://www.iupac.org/goldbook/C01490.pdf>.
208. Bjaastad, S. G. und Hall, N. A., Preliminary investigation of the Z-value measure of relative solvent polarity in micellar solubilization, *J. Pharm. Sci.* 56 (1967) 504-507.
209. Thakkar, A. L. und Hall, N. A., Micellar solubilization of testosterone. I. In aqueous solutions of polysorbates, *J. Pharm. Sci.* 56 (1967) 1121-1125.
210. Thakkar, A. L. und Hall, N. A., Micellar solubilization of testosterone. II. In aqueous solutions of some ionic surfactants, *J. Pharm. Sci.* 57 (1968) 1394-1398.
211. Janich, M., *Licht- und Neutronenstreuexperimente an Gallensalzmizellen*, Diss., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, DE, (1998).
212. Provencher, S. W., A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations, *Comput. Phys. Commun.* 27 (1982) 213-227.
213. Johnsen, R. und Brown, W., An overview of current methods of analyzing QLS data, In: Harding, S. E., Sattelle, D. B., und Bloomfield, V. A. [Hrsg.], *LASER Light Scattering in Biochemistry*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, (1992), S. 77-91.
214. Johnsen, R. und Brown, W., An investigation of rigid rod-like particles in dilute solution, In: Harding, S. E., Sattelle, D. B., und Bloomfield, V. A. [Hrsg.], *LASER Light Scattering in Biochemistry*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, (1992), S. 161-183.
215. Pecora, R., *Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy*, Plenum Press, NY, USA, (1985).
216. Berne, B. J. und Pecora, R., *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*, (Reprint. Originally published: Wiley, NY, 1976), R.E. Krieger Pub. Co, Malabar, FL, USA, (1990).
217. Maier, D., *Ein neues kombiniertes Meß- und Auswerteverfahren für die dynamische Lichtstreuung*, Diss., Fakultät der Physik der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, DE, (1996).
218. Shukla, A., *Characterization of Microemulsions using Small Angle Scattering Techniques*, Diss., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, DE, (2003).
219. Substance Description: Phospholipon® 90 H (E-PP90H.DOC/pe), Natterman Phospholipid GmbH, (Aug. 1998).
220. Substance Description: Phospholipon® 90/90G (E-PL90.DOC/br), Natterman Phospholipid GmbH, (Mar. 1996).

221. Rauscher, K., Voigt, J., Wilke, I. und Wilke, K., *Chemische Tabellen und Rechentafeln für die analytische Praxis*, VAB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, DE, (1970).
222. Course folder of the 4<sup>th</sup> International Intensive Course and Workshop on Cell Culture and in-vitro Models for Drug Absorption and Delivery (20 Feb.-1 Mar./2002), Dept. Biopharmaceutics & Pharm. Tech., Universität Saarland, Saarbrücken, DE, (2002).
223. Lindahl, A., Ungell, A.-L., Knutson, L., und Lennernäs, H., Characterization of fluids from the stomach and proximal jejunum in men and women, *Pharm. Res.* 14 (1997) 497-502.
224. Fausa, O., Duodenal bile acids after a test meal, *Scand. J. Gastroenterol.* 9 (1974) 567-570.
225. Tangerman, A., van Schaik, A., und van der Hoek, E. W., Analysis of conjugated and unconjugated bile acids in serum and jejunal fluid of normal subjects, *Clin. Chim. Acta* 159 (1986) 123-132.
226. Peeters, T. L., Vantrappen, G., und Janssens, J., Bile acid output and the interdigestive migrating motor complex in normals and in cholecystectomy patients, *Gastroenterology* 79 (1980) 678-681.
227. Bergh, M., Shao, L. P., Hagelthorn, G., Gafvert, E., Nilsson, J. L., und Karlberg, A. T., Contact allergens from surfactants. Atmospheric oxidation of polyoxyethylene alcohols, formation of ethoxylated aldehydes, and their allergenic activity, *J. Pharm. Sci.* 87 (1998) 276-282.
228. Duerr, M., Hager, J., und Loehr, J. P., Investigations on mixed micelle and liposome preparations for parenteral use based on soya phosphatidylcholine, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 40 (1994) 147-156.
229. Neubert, R. H. H., Hildebrand, A., Janich, M., Mrestani, Y., und Plaetzer, M., Stabile physiologische Mischmizellen, eine zukunftssträchtige Arzneiform, *Pharm. Ztg.* 44 (2000) 3691-3697.
230. Krishna, G., Chen, K., Lin, C., und Nomeir, A. A., Permeability of lipophilic compounds in drug discovery using in-vitro human absorption model, Caco-2, *Int. J. Pharm.* 222 (2001) 77-89.
231. Kromidas, S., *HPLC-Tips: Die schnelle Hilfe für jeden Anwender*, NOVIA GmbH, Hoppenstedt, Darmstadt, DE, (1997), S. 116.
232. Schwarz, M. A., *Charakterisierung von Wechselwirkungen zwischen Wirkstoffen und Gallensalz-mizellen mittels mizellarer elektrokinetischer Affinitätschromatographie (MEAC)*, Diss., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Tectum Verlag, Marburg, DE, (1998).
233. Neubert, R. H. H., *Zur Bewertung des Permeations- und Resorptionsverhalten von Arzneimitteln durch Modellmethoden*, Diss., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, DE, (1978).
234. Fürst, W., Neubert, R., und Reppel, L., Arzneimittelpermeation durch künstliche Lipoidmembranen. 10. Mitteilung: Einfluß von Diffusionsschichten auf den Permeationsprozeß, *Pharmazie* 35 (1980) 106-109.
235. Fritsch, B., *Der Einfluß von nahrungsbedingten Faktoren auf das Resorptionsverhalten von Chinin am Beispiel von Pektinderivaten und Gallensalzmizellen*, Diss., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, DE, (2000).
236. Ussing, H. H. und Zerahn, K., Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin, *Acta Physiol. Scand.* 23 (1951) 110-127.
237. Ewing, L. L., Chubb, C. E., und Robaire, B., Macromolecules, steroid binding and testosterone secretion by rabbit testes, *Nature* 264 (1976) 84-86.
238. Kniewald, J., Kniewald, Z., und Mildner, P., New approach to the study of hormone-protein interaction using the microcalorimetric method, *Steroids* 25 (1975) 477-485.
239. Pearlman, W. H. und Fong, I. F., Steroid binding properties of some peptide fragments of bovine serum albumin obtained on peptic digestion, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 8078-8084.
240. Pearlman, W. H. und Fong, I. F. F., Why some proteins bind steroid hormones. Experimental approach to a fundamental problem., In: Goland, M. [Hrsg.], *Normal and Abnormal Growth of Prostate, Symp. (San Antonio, Tex., USA)*, Springfield, Ill: Thomas, (1975), S. 650-657.
241. Tucker, R. und Lata, G. F., Circular dichroism of bovine serum albumin--testosterone systems, *J. Steroid Biochem.* 6 (1975) 1523-1525.

242. Watanabe, S., Tani, T., Watanabe, S., und Seno, M., Effects of free fatty acids on the binding of steroid hormones to bovine serum albumin, *Lipids* 25 (1990) 633-638.
243. Watanabe, S., Tani, T., Watanabe, S., und Seno, M., Transport of steroid hormones facilitated by serum proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1073 (1991) 275-284.
244. Giraudi, G., Cenderelli, G., Migliardi, M., De Filippis, V., und Spinnato, M. R., Kinetics of the steroid-protein interaction and bioavailability of sex steroid hormones, In: Raynaud, C. [Hrsg.], *Nuclear Medicine and Biology: Proc. 3<sup>rd</sup> World Congress of Nuclear Medicine and Biology (29 Aug.-2 Sept./1982 Paris)*, Pergamon Press, Oxford, UK, (1983), S. 3306-3308.
245. Oyakawa, E. K. und Levedhal, B. H., Testosterone binding to bovine and human serum albumin: the role of tyrosine groups., *Arch. Biochem.* 74 (1958) 17-23.
246. Attallah, N. A. und Lata, G. F., Steroid-protein interactions studies by fluorescence quenching, *Biochim. Biophys. Acta* 168 (1968) 321-333.
247. Ramirez, V. D., Characterization of membrane action of steroids., *Neuro-protocols: A Companion to Methods in Neuroscience* 1 (1992) 35-45.
248. Saha, P. und Kou, J. H., Effect of bovine serum albumin on drug permeability estimation across Caco-2 monolayers, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 54 (2002) 319-324.
249. Yamashita, S., Furubayashi, T., Kataoka, M., Sakane, T., Sezaki, H., und Tokuda, H., Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells, *Eur. J. Pharm. Sci.* 10 (2000) 195-204.
250. Grass, G. M. und Sweetana, S. A., In vitro measurement of gastrointestinal tissue permeability using a new diffusion cell, *Pharm. Res.* 5 (1988) 372-376.
251. Funk, W., Dammann, V., Vonderheid, C. und Qehlmann, G., *Statistische Methoden in der Wasseranalytik. Begriffe, Strategien, Anwendungen*, VCH, Weinheim, DE, (1985).
252. Cohen, D. E. und Carey, M. C., Acyl chain unsaturation modulates distribution of lecithin molecular species between mixed micelles and vesicles in model bile. Implications for particle structure and metastable cholesterol solubilities, *J. Lipid Res.* 32 (1991) 1291-1302.
253. Booker, M. L., LaMorte, W. W., Ahrendt, S. A., Lillemoe, K. D., und Pitt, H. A., Distribution of phosphatidylcholine molecular species between mixed micelles and phospholipid-cholesterol vesicles in human gallbladder bile: dependence on acyl chain length and unsaturation, *J. Lipid Res.* 33 (1992) 1485-1492.
254. Kanicky, J. R. und Shah, D. O., Effect of degree, type, and position of unsaturation on the pKa of long-chain fatty acids, *J. Colloid Interface Sci.* 256 (2002) 201-207.
255. Hifeda, Y. M. und Rayfield, W. G., Phase transitions in fatty acid monolayers containing a single double bond in the fatty acid tail, *J. Colloid Interface Sci.* 104 (1985) 209-215.
256. Tomoaia-Cotisel, M., Zsako, J., Mocanu, A., Lupea, M., und Chifu, E., Insoluble mixed monolayers. III. The ionization characteristics of some fatty acids at the air/water interface., *J. Colloid Interface Sci.* 117 (1987) 464-476.
257. Davies, J. T. und Rideal, E. K., *Interfacial phenomena*, Acad. Press, NY [u.a.], USA, (1961).
258. Inoue, T., Yamahata, T., und Shimosawa, R., Systematic study on the solubilization of phospholipid vesicles by various surfactants, *J. Colloid Interface Sci.* 149 (1992) 345-358.
259. Malcolmson, C., Satra, C., Kantaria, S., Sidhu, A., und Lawrence, M. J., Effect of oil on the Level of Solubilization of Testosterone Propionate into Nonionic Oil-in-Water Microemulsions, *J. Pharm. Sci.* 87 (1998) 109-116.
260. Martis, L., Hall, N. A., und Thakkar, A. L., Micelle formation and testosterone solubilization by sodium glycocholate, *J. Pharm. Sci.* 61 (1972) 1757-1761.
261. Stevens, R. W. und Green, C., Effect of side chain structure on the incorporation of steroids into lipid bilayers (liposomes), *FEBS Lett.* 27 (1972) 145-148.
262. Treiner, C., Nortz, M., und Vaution, C., Micellar solubilization in strongly interacting binary surfactant systems, *Langmuir* 6 (1990) 1211-1216.

263. Holland, P. M., *Mixed Surfactant Systems*, American Chemical Society, Washington, DC, USA, (1992).
264. Scamehorn, J. F., *Phenomena in mixed surfactant systems*, American Chemical Society, Washington, DC, USA, (1986).
265. Becher, P., Nonionic surface-active compounds. IV. Micelle formation by polyoxyethylene alkanols and alkyl phenols in aqueous solution, *J. Colloid Sci.* 16 (1961) 49-56.
266. Robson, R. J. und Dennis, E. A., The size, shape, and hydration of nonionic surfactant micelles. Triton X-100, *J. Phys. Chem.* 81 (1977) 1075-1078.
267. Barry, B. W. und El-Eini, D. I., Solubilization of hydrocortisone, dexamethasone, testosterone and progesterone by long-chain polyoxyethylene surfactants, *J. Pharm. Pharmacol.* 28 (1976) 210-218.
268. Tomida, H., Yotsuyanagi, T., und Ikeda, K., Solubilization of Steroid Hormones by Polyoxyethylene Lauryl Ether, *Chem. Pharm. Bull.* 26 (1978) 2832-2837.
269. Warisnoicharoen, W., Lansley, A. B., und Lawrence, M. J., Light scattering investigations on dilute nonionic oil-in-water microemulsions, *AAPS. Pharm. Sci.* 2 (2000) E12.
270. Malcolmson, C. und Lawrence, M. J., A comparison of the incorporation of model steroids into non-ionic micellar and microemulsion systems, *J. Pharm. Pharmacol.* 45 (1993) 141-143.
271. Ikeda, N., Sanefuji, N., Lu, K. K., Aratono, M., und Motomura, K., Surface adsorption and micelle formation of the mixture of N-methylated dodecylammonium chloride and dodecylammonium chloride, *J. Colloid Interface Sci.* 164 (1994) 439-443.
272. Ikeda, S. und Fujio, K., The salt-induced sphere-rod transition of dodecylpyridinium iodide in aqueous NaI solutions, *J. Colloid Interface Sci.* 270 (1992) 1009.
273. Goetz, K. G. und Heckmann, K., Mizellform und Struktur mizellarer Phasen: Leitfähigkeits-anisotropie strömender Seifenlösungen II, *Z. Phys. Chem. Neue Folge* 20 (1959) 42-52.
274. Porte, G., Appell, J., und Poggi, Y., Experimental investigations on the flexibility of elongated cetylpyridinium bromide micelles, *J. Phys. Chem.* 84 (1980) 3105.
275. Smith, M. B. und Alexander, A. E., In: Schulman, J. H. [Hrsg.], *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Congress of Surface Activity*, Butterworths, London, UK, (1957), S. 349.
276. Eriksson, J.-C. und Gillberg, G., NMR-studies of the solubilisation of aromatic compounds in cetyltrimethylammonium bromide solution, *Surface Chemistry* (1965) 148-156.
277. Candau, S. J., Merikhi, F., Waton, G., und Lemarechal, P., Temperature-jump study of elongated micelles of cetyltrimethylammonium bromide, *J. Phys. (France)* 51 (1990) 977-989.
278. Candau, S. J., Hirsch, E., und Zana, R., Light scattering investigations of the behavior of semidilute aqueous micellar solutions of cetyltrimethylammonium bromide: analogy with semidilute polymer solutions, *J. Colloid Interface Sci.* 105 (1985) 521-528.
279. Cates, M. E. und Candau, S. J., Statics and dynamics of worm-like surfactant micelles, *Journal of physics. Condensed Matter* 2 (1990) 6869-6892.
280. Imae, T. und Ikeda, K., Sphere-Rod Transition of Micelles of Tetradecyltrimethylammonium Halides in Aqueous Sodium Halide Solutions and Flexibility and Entanglement of Long Rodlike Micelles, *J. Phys. Chem.* 90 (1986) 5216-5223.
281. Imae, T., Kamiya, R., und Ikeda, K., Formation of spherical and rod-like micelles of cetyltrimethylammonium bromide in aqueous NaBr solutions, *J. Colloid Interface Sci.* 108 (1985) 215-225.
282. Zahng, W., Li, G., Mu, J., Sehn, Q., Zheng, L., Liang, H., und Wu, C., Effect of KBr on the micellar properties of CTAB, *Chinese Science Bulletin* 45 (2000) 1854-1857.
283. Malliaris, A., Lang, J., und Zana, R., Micellar aggregation numbers at high surfactant concentration, *J. Colloid Interface Sci.* 110 (1986) 237.
284. Reiss-Husson, F. und Luzatti, V., The structure of the micellar solutions of some amphiphilic compounds in pure water as determined by absolute small-angle x-ray scattering techniques, *J. Phys. Chem.* 68 (1964) 3504-3511.

285. Scheuing, D. R. und Weers, J. G., A Fourier transform infrared spectroscopic study of dodecyltrimethylammonium chloride/sodium dodecyl sulfate surfactant mixtures, *Langmuir* 6 (1990) 665-671.
286. Koehler, R. D. und Kaler, E. W., Structure of sheared cetyltrimethylammonium tosylate-sodium dodecylbenzenesulfonate rodlike micellar solutions, *ACS Symp. Ser.* 578 (1994) 120-128.
287. Schulz, P. C., Minardi, R. M., und Vuano, B., Dodecyltrimethylammonium bromide-disodium dodecanephosphonate mixed micelles, *Colloid Polym. Sci.* 277 (1999) 837-845.
288. De Lisi, R., Perron, G., Paquette, J., und Desnoyers, J. E., Thermodynamics of micellar systems: activity and entropy of sodium decanoate and *n*-alkylamine hydrobromides in water, *Can. J. Chem.* 59 (1981) 1865-1871.
289. Mehreteab, A. und Loprest, F., Formation of Pseudo-Nonionic Complexes of Anionic and Cationic Surfactants, *J. Colloid Interface Sci.* 125 (1988) 602-609.
290. El-Kadi, N., Martins, F., Clause, D., und Schulz, P. C., Critical micelle concentrations of aqueous hexadecyltrimethylammonium bromide-sodium oleate mixtures, *Colloid Polym. Sci.* 281 (2003) 353-362.
291. Tomašić, V., Štefanić, I., und Filipović-Vinceković, N., Adsorption, association and precipitation in hexadecyltrimethylammonium bromide/sodium dodecyl sulfate mixtures, *Colloid Polym. Sci.* 277 (1999) 153-163.
292. Israelachvili, J. N., *Intermolecular and surface forces*, (3<sup>rd</sup> Edn.), Academic Press, San Diego, Calif.; London, (2003).
293. Israelachvili, J. N., Mitchell, D. J., und Ninham, B. W., Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 72 (1976) 1525-1568.
294. Hyde, S. T., On the variation of microstructure within surfactant solutions, *Prog. Colloid. Polym. sci.* 82 (1989) 236-242.
295. Hyde, S. T., Curvature and the global structure of interfaces in surfactant-water systems, *J. Phys. (France)* 51 (1990) 209-228.
296. Safran, S. A., *Statistical thermodynamics of surfaces, interfaces, and membranes*, (2<sup>nd</sup> Edn.), Boulder, Co.: Westview Press, USA, (2003).
297. Mukerjee, P., Odd-even alternation in the chain length variation of micellar properties. Evidence of some solid-like character of the micelle core, *Kolloid-Z. Z. Polym.* 236 (1970) 76-79.
298. Schwarz, M. A., Raith, K., Rüttinger, H. H., Dongowski, G., und Neubert, R. H. H., Investigation of the interactions between drugs and mixed bile salt/lecithin micelles. A characterisation by micellar affinity capillary electrophoresis (MACE). Part III, *J. Chromatography A.* 781 (1997) 377-389.
299. Riddick, J. A., Bunger, W. B. und Sakano, T. K., *Organic solvents: physical properties and methods of purification*, (4<sup>th</sup> Edn.), Wiley-Interscience publication, NY [u.a.], USA, (1986).
300. Gomez-Fernandez, J. C. und Villalain, J., The use of FT-IR for quantitative studies of the apparent pKa of lipid carboxyl groups and the dehydration degree of the phosphate group of phospholipids, *Chem. Phys. Lipids* 96 (1998) 41-52.
301. Small, D. M., Cabral, D. J., Cistola, D. P., Parks, J. S., und Hamilton, J. A., The ionization behavior of fatty acids and bile acids in micelles and membranes, *Hepatology* 4 (1984) 77S-79S.
302. Ferreira, J. A., Martin-Neto, L., Nascimento, O. R., Colnago, L. A., und Forato, L. A., Hydrophobic sites in humic acids as detected by ESR of Spin-Label 5-SASL and <sup>13</sup>C NMR of labeled oleic acid, *17<sup>th</sup> World Cong. of Soil Science (14-20 Aug./ 2002 Bangkok, Thailand)*, <http://www.ldd.go.th/Wcss2002/papers/1381.pdf>, (2002).
303. Lieckfeldt, R., Villalain, J., Gomez-Fernandez, J. C., und Lee, G., Apparent pKa of the fatty acids within ordered mixtures of model human stratum corneum lipids, *Pharm. Res.* 12 (1995) 1614-1617.
304. Kuvshinov, B. A., Altunina, L. K., und Genkina, L. F., Surface tension of oil as a function of the pH of the aqueous phase, *J. Appl. Chem. USSR* 63 (1990) 867-869.

305. Karzhavin, V. K., Dissociation of oleic acid, *J. Appl. Chem. USSR* 59 (1986) 583-587.
306. Jukes, T. H. und Schmidt, C. L. A., The combination of certain fatty acids with lysine, arginine and salmine, *J. Biol. Chem.* 110 (1935) 9-16.
307. Johns, W. H. und Bates, T. R., Quantification of the binding tendencies of cholestyramine. II. Mechanism of interaction with bile salt and fatty acid salt anions, *J. Pharm. Sci.* 59 (1970) 329-333.
308. Bunton, C. A. und Minch, M. J., Micellar Effects on the Ionization of Carboxylic Acids and Interactions between Quaternary Ammonium Ions and Aromatic Compounds, *J. Phys. Chem.* 78 (1974) 1490-1498.
309. Müller, J., *Resorptionsverbesserung oral nicht verfügbarer Cephalosporine durch Tenside*, Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, DE, (2000).

## Danksagung

Hinter dem Zustandekommen der vorliegenden Promotionsarbeit steht die Unterstützung von vielen Beteiligten auf verschiedenen Ebenen, ohne deren wichtige und manchmal essentielle Beiträge die Verwirklichung dieses Zieles unmöglich gewesen wäre. Diesen fühle ich mich an dieser Stelle verpflichtet, ein Dankeschön dafür auszusprechen.

An erster Stelle gilt ein ganz herzlicher Dank meinem Doktorvater, Herrn **Prof. Dr. habil. Reinhard Neubert**, für die Überlassung des Themas, die hilfreichen Tipps und die Bereitstellung aller verfügbaren Mittel am Institut zur Anfertigung dieser Arbeit. Außerdem möchte ich mich bei ihm für sein stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit, aber auch für die mir gewährten Freiheiten bei der Bearbeitung des Themas bedanken. Wichtig war für mich seine Hilfe bei der schriftlichen und fachlichen Ausarbeitung der Dissertation sowie sein Versuch, mir durch die verfügbaren Mittel zur Überwindung meiner finanziellen Schwierigkeiten nach dem Ablauf der Förderungszeit zu helfen.

Ein besonderer Dank gebührt dem Katholischen Akademischen Ausländer-Dienst (**KAAD**), ohne dessen großzügige Förderung ich hier in Deutschland nicht hätte promovieren können. Insbesondere möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn **Hans W. Landsberg** und Dr. **Carsten M. Walbiner** vom Referat Naher und Mittlerer Osten bedanken, deren freundliches Verhältnis zu mir weit über die üblichen geschäftlichen Beziehungen hinaus ging und sich zu einer wertvollen Freundschaft entwickelt hat. Eure Unterstützung, Hans und Carsten, ermöglichte mir, an das ganze mögliche Angebot der Förderung mit möglichst kleinem bürokratischem Aufwand heranzukommen. Eure KAAD-Bildungsseminare machten die Förderungszeit zu einem unvergesslichen Erlebnis.

Mein nächster ganz herzlicher Dank gilt meinen Betreuern Herrn **Dr. Roland Rietz** und Herrn **Dr. Yahya Mrestani**. Dir, Roland, danke ich für die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei allen auftretenden fachlichen Problemen während deiner freundlichen Betreuung sowie für die sorgfältige Korrektur und die konstruktiven Anregungen zur Verbesserung der schriftlichen Arbeit. Dir, Yahya, danke ich für die Übernahme meiner Betreuung nach Roland, insbesondere für deine fachliche Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Untersuchungen mittels MAKE, für deine Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie für deine freundschaftliche und ständige Beratung unterschiedlicher Natur.

Für ihre unentbehrliche und tatkräftige Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der DLS-Experimente sei den Herren **Dr. Anuj Shukla** und **Dr. Martin Janich** aus der Arbeitsgruppe Optik des Fachbereichs Physik ganz besonders gedankt.

Für die Durchführung der intraduodenalen Perfusionsuntersuchungen möchte ich hier meinen Dank an Herrn **Dr. Albert Härtl** und seine Mitarbeiterinnen vom Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung in Jena richten.

Vom Biozentrum der Universität Halle danke ich an dieser Stelle Herrn **PD. Dr. Mathias Brandsch** für die gastfreundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe zwecks meiner Durchführung der *Ussing*-Kammer-Untersuchungen sowie Herrn **PD. Dr. Reinhard Paschke** für die Ermöglichung der Durchführung der spektroskopischen Z-Wert-Messungen in seinem Labor und die Gastfreundschaft seiner Mitarbeiter. Ferner gilt ein ganz großes Dankeschön Frau **Mandy Bruch** und Herrn **André Kacholdt** von der AG. Dr. Brandsch für ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Zusammenarbeit bei der Durchführung der *Ussing*-Kammer-Versuche, woraus eine meiner wichtigsten Freundschaften hier in Deutschland geworden ist, sowie für ihre sprachliche Unterstützung bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit. Dir, André, vergesse ich nie deine Geduld bei dem mühsamen Versuch, aus meinen langen, geknickten Sätzen und meinem

## Danksagung

schwer verständlichen deutschen Stil etwas verständliches zu machen, sowie deine Unterstützung bei meinem Umzug und den anderen Schwierigkeiten in letzter Zeit.

Als wesentlichen Beitrag zum Gelingen der Arbeit möchte ich an dieser Stelle die ständige Hilfe meines Freundes Dr. **Firas El-Saleh** hervorheben. Seitdem die Promotion noch ein reiner Wunsch war und bis zum heutigen Zeitpunkt steht mir Firas auf dem Weg zum Erlangen meines Zieles mit Rat und Tat zur Seite. Deine Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit und deine aufmunternden Worte sowie der Gedankenaustausch mit dir, Firas, haben mich aus meinen dunkelsten Momenten der Verzweiflung herausgeholt und mir geholfen, meine Schwierigkeiten zu überwinden. Nicht zu vergessen ist auch deine ständige Hilfe bei den EDV-Fragen, die kleinen Macros, die du mir nach Wunsch zur Vereinfachung der Datenverarbeitung erstellt hast, deine Hilfe bei der Erstellung der Abbildungen 2, 13, 15 und 28 und bei der fachlichen und sprachlichen Überarbeitung der vorliegenden Arbeit sowie die vielen hilfreichen Tipps und Hinweise.

Allen **Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Fachbereiches Pharmazie** und vor allem am Institut für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der MLU Halle sei hiermit für die kollegiale und freundliche Arbeitsatmosphäre herzlich gedankt. Ein besonderer Dank gebührt hier Frau **Adelheid Pöttsch** (Heidi) und **Iris** (mittlerweile Frau Dr. **Hinneburg**) für die freundschaftliche und angenehme Zusammenarbeit im Labor sowie Frau PD Dr. **Katharina Picker-Freyer** für ihre stete freundschaftliche und fachliche Beratung, außerdem für ihre Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit, für meine Aufnahme in ihren Freundeskreis, die mir vor allem beim Einstieg am Institut ermöglichte, mich schnell in die neue Umgebung zu integrieren sowie für die freundliche Überarbeitung der vorletzten Druckversion dieser Schrift. Weiterhin möchte ich mich bei dir, Heidi, für die sprachliche Überarbeitung der Kapitel III und IV ganz herzlich bedanken. Ein ebenso herzlicher Dank geht an **Jarmila** (Frau **Zbytovška**) für ihre freundschaftliche Unterstützung und ihr Engagement bei der Korrektur der Arbeit.

Auf keinen Fall möchte ich vergessen, unserer Bibliothekarin Frau **Anja Friedrich** von der Zweigbibliothek Weinberg der ULB der MLU Halle zu danken, die sich bei unseren Literaturrecherchen bemüht hat, uns jeglichen schwierigen Wunsch zu erfüllen, und sich trotz der manchmal sehr langen Literaturlisten nie beschwert hat, sowie auch für den liebevollen persönlichen Lieferservice der Literatur zum Labor. Vielen Dank Anja.

Nicht zuletzt richte ich einen sehr persönlichen und herzlichen Dank an **meine lieben Eltern**. Ihr habt unermüdlich und voller Liebe keine Mühe gescheut, und alle möglichen Mittel bereitgestellt, damit wir die besten Lebens- und Ausbildungsbedingungen bekommen. Ich weiß, meine Promotion ist für euch wie ein eigener Erfolg, deshalb möchte ich euch diese Arbeit als ein kleines, winziges Dankeschön widmen. Aus Liebe zu dir, **meinem Bruder Johny**, und dem Glauben an deine erfolgreiche Zukunft will ich auch dir diese Arbeit widmen.

**Dina**, dir kann ich nicht genug danken. Mit Liebe, Mitgefühl und Verständnis hast du es geduldet, dass die Promotion so viel Aufmerksamkeit von mir in Anspruch nahm, die ich lieber auf dich verwendet hätte, und dass sie mich von dir immer wieder über lange Zeiten und Strecken entfernt hat. Deine Liebe und deine Unterstützung durch Rat und Tat gaben mir während der anstrengenden Zeiten immer Kraft und Mut. Nur deine Leidenschaft und unsere gemeinsame Zeit geben mir jetzt das Gefühl, dass das Leben während dieser Jahre nicht an mir vorbeiging. Aus Liebe und als kleines Dankeschön widme ich auch dir diese Arbeit.

Allen **Freunden**, die mir während meiner Promotionszeit auf irgendeiner Art und Weise geholfen haben, und deren Namen und Taten ich hier nicht alle nennen kann, sei ebenfalls herzlich gedankt.

## Lebenslauf

Name: Bashar Hunien  
Geburtsdatum: 19.06.1970  
Geburtsort: Jisser-al-Shughur, Syrien  
Eltern: Youssef Hunien (B.Sc. in Philosophie)  
und Dalal Antakli (B.Sc. in Philosophie)  
Familienstand: verheiratet mit Fr. Dina Al-Missber (B.Sc.Ing. Arch.)

## Ausbildung:

1975 – 1987: Schulausbildung: École des sœurs de Besançon (Grundschule ), Al-Waqidi (Gym.) und Omayya (Gym.), Damaskus, Syrien. Abschluss: Baccalaureat (Abitur), naturwissenschaftliche Fachrichtung  
1987 – 1992: Studium der Pharmazie an der Universität Damaskus (Syrien)  
Abschluss des Pharmaziestudiums: Licence (B.Sc. in Pharmazie)  
09/98 - 02/99: Aufbaustudium Pharmazeutische Industrie an der Universität Damaskus: Abbruch wegen des Promotionsangebots in der BRD  
seit 10/1999: Dissertation am Institut für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

## Berufserfahrung:

11/92 - 12/94: Wehrdienst als Leutnant in einer Militärfabrik für Kräuterheilmittel und Honig (Herstellungs- und Laborabteilungen)  
01/95 - 09/98: Voll- bzw. Teilzeitleiter einer Apotheke (davon die gesetzlich vorgeschriebene zweijährige Berufstätigkeit außerhalb des großstädtischen Bereiches zum Erwerb der endgültigen Erlaubnis zur Ausübung des Apothekerberufes in ganz Syrien)  
08/95 - 01/97: Pharmareferent bei Bristol-Myers-Squibb in Damaskus  
02/97 – 02/98: Marketingplaner und Handelsvertreter bei der Firma ARARAT in Damaskus (Import medizinischer Rohstoffe und Hilfsmittel für die pharmazeutische Industrie)  
SS 2002 und SS 2003: Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle: Betreuung der Seminararbeiten und Praktika für das Fach AFL. II

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich versichere weiterhin, dass ich keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Diese Dissertationsschrift habe ich an keiner anderen Hochschule vorgelegt und mich zu keinem früheren Zeitpunkt um den Doktorgrad beworben.

Halle (S.), 2. November 2004