

**Quantitative Analyse von Arzneistoff-Membran-Wechselwirkungen
am Beispiel von Neuroleptika und Calcium-Kanal-Blockern**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademische Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

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

von Herrn Ulrich Jörg Franke
geb. am 30. Juli 1967 in Bad Salzungen

Gutachter:

1. Prof. Dr. M. Wiese
2. Prof. Dr. J. K. Seydel
3. Dr. habil. H.-H. Rüttinger

Halle (Saale), am 24. Mai 2000

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Die Bedeutung von Verteilungskoeffizienten an biologischen Membranen	1
1.2	Die Bestimmung von Verteilungskoeffizienten	2
1.3	Die Lokalisation der Arzneistoffmoleküle in Membranen und Diffusionsprozesse an Membranen	3
1.4	Pharmakologische Eigenschaften der untersuchten Arzneistoffe	4
1.5	Ansatz und Zielstellung	5
2	Charakterisierung der verwendeten Arzneistoffe und Chemikalien	
2.1	Die Arzneistoffe	6
2.2	Eingesetzte Chemikalien und Referenzsubstanzen	9
3	Potentiometrische Bestimmung von Verteilungskoeffizienten	
3.1	Theoretische Grundlagen	
3.1.1	Die Dissoziationskonstanten	11
3.1.2	Die Verteilungskoeffizienten in homogenen organischen Phasen	12
3.1.3	Die Verteilungskoeffizienten an Membranen	14
3.2	Experimentelle Durchführung	
3.2.1	Allgemeine Vorbereitungen zur potentiometrischen Titration	15
3.2.2	Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten	15
3.2.3	Liposomenherstellung	15
3.2.4	Die Bestimmung von Verteilungskoeffizienten	16
3.3	Systemvalidierungen	
3.3.1	Kosolventeinflüsse auf die pKa-Wert-Bestimmung	16
3.3.2	Reinheitsprüfung von Propylenglycoldipelargonat	17
3.3.3	Stabilitätstest und Überprüfung der Liposomen als Verteilungssystem	17
3.4	Ergebnisse und Diskussion	
3.4.1	Übersicht zu statistischen Parametern	19
3.4.2	Die Dissoziationskonstanten der Arzneistoffe	19
3.4.3	Die Verteilungskoeffizienten der Arzneistoffe in homogenen organischen Phasen	22
3.4.4	Das liposomale Verteilungssystem	37
3.5	Vergleich aller Verteilungssysteme	
3.5.1	Die Hauptkomponenten-Analyse	41
3.5.2	Das Verteilungsverhalten der Neutralformen	42
3.5.3	Das Verteilungsverhalten der geladenen Molekülformen	45
3.5.4	Vergleich der pH-abhängigen Verteilungskoeffizienten	48

4	Chromatografische Bestimmung des Verteilungsverhaltens	
4.1	Charakterisierung von chromatografischen Säulen als künstliche immobilisierte Membran	50
4.2	Experimentelle Bedingungen	51
4.3	Ergebnisse und Diskussion	
4.3.1	Die Kapazitätsfaktoren der Arzneistoffe	52
4.3.2	Die Effekte von Acetonitril und von Phosphationen	54
4.4	Korrelationen mit anderen Verteilungskoeffizienten	
4.4.1	Die Koeffizienten der protonierbaren Verbindungen	56
4.4.2	Die Koeffizienten der neutralen Verbindungen	58
5	Untersuchungen zu intermolekularen Wechselwirkungen in Membranen	
5.1	Grundlagen von ausgewählte Verfahren der NMR-Spektroskopie	
5.1.1	Die eindimensionale Differenz-Spektroskopie	62
5.1.2	Die eindimensionale Austausch-Spektroskopie	65
5.2	Materialien und Methoden	
5.2.1	Anwendung der NOE-Differenz-Spektroskopie	68
5.2.2	Untersuchungen von Permeationsprozessen an Erythrocyten	69
5.3	Ergebnisse und Diskussion	
5.3.1	Analyse von intermolekularen Wechselwirkungsstellen	70
5.3.2	Das EXSY-Verfahren zur Analyse von Permeationsprozessen	77
6	Modellierung der Verteilungsvorgänge	
6.1	Beschreibung der Modellierungen	
6.1.1	Die Strukturoptimierung	84
6.1.2	GRID - Berechnung von Wechselwirkungspotentialen	84
6.1.3	VOLSURF - Erstellung von Molekül-Deskriptoren	85
6.1.4	GOLPE - Deskriptor-Analyse und Datenelimination	87
6.2	Die Anwendung der Modellierungsverfahren	
6.2.1	Allgemeine Vorbereitungen	91
6.2.2	Rechnerische Vorhersage von Verteilungskoeffizienten	91
6.2.3	Vorgehensweise zum <i>Molecular Modeling</i>	92
6.2.4	Programmoptionen und Parameterauswahl	93
6.3	Rechnerische Bestimmung von <i>n</i> -Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten	
6.3.1	Ergebnisse der berechneten log <i>P</i> -Werte	96
6.3.2	Vergleich der log <i>P</i> -Werte der gesamten Verbindungen	99
6.4	Auswertung von lokalen Wechselwirkungspunkten	
6.4.1	Ergebnisse der GRID-Berechnungen	101
6.4.2	Vergleich der einzelnen organischen Phasen	101

6.5	Deskriptorenanalyse zur Beschreibung von Verteilungskoeffizienten	
6.5.1	Allgemeine Schritte zur Deskriptorenanalyse	105
6.5.2	Analyse des Verteilungsverhaltens der Neutralformen	107
6.5.3	Analyse des Verteilungsverhaltens von geladenen Verbindungen	117
6.5.4	Zusammenfassung der PLS-Analysen	123
7	Methodenübergreifende Bewertung der Ergebnisse	
7.1	Die Verteilung in <i>n</i> -Octanol, Propylenglycoldipelargonat und Liposomen	124
7.2	Das Verteilungsverhalten an IAM-Oberflächen	125
7.3	NMR-spektroskopische Untersuchungen zu Membran-Interaktionen	126
7.4	Vorhersage von Verteilungskoeffizienten in <i>n</i> -Octanol/Wasser	127
7.5	GRID-Wechselwirkungen mit Einzelmolekülen der organischen Phasen	127
7.6	Beschreibung des Verteilungsverhaltens durch Molekül-Deskriptoren	127
8	Zusammenfassung	129
9	Anhang	
9.1	Literaturverzeichnis	130
9.2	Verwendete Programme	140
9.3	Ergänzende Übersichten	
9.3.1	Übersicht zu den Arzneistoffen und wichtigen Chemikalien	141
9.3.2	Parameter der NMR-Pulsprogramme	144
9.3.3	Abgeleitete VOLSURF-Deskriptoren von GRID-Sonden	145
9.4	Rechen- und Messdaten	146
9.5	¹ H-NMR-Spektren von ausgewählten Arzneistoffen	158

Verwendete Abkürzungen

AcCN	Acetonitril
BUW	<i>block unscaled weight</i>
ComFA	<i>comparativ molecular field analysis</i>
CV	<i>cross validation</i>
CW	<i>continuous wave</i>
1D	eindimensional
3D	dreidimensional
D1	<i>delay time 1</i>
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DOPC	Dioleoylphosphatidylcholin
E_{limit}	Potentialgrenzwert zur Auswertung in GRID
EW	Eigenwert
EXSY	<i>exchange spectroscopy</i>
F	Signifikanzwert nach <i>Fischer</i>
FFD	<i>fractional factorial design</i>
FID	<i>free induction decay</i>
GOF	<i>goodnes of fit</i>
Hk	Hämatokrit
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IAM	<i>immobilized artificial membrane</i>
ISA	<i>ion strength adjusted</i>
k_1	Geschwindigkeitskonstante für den Eintritt in die Zelle
k_{-1}	Geschwindigkeitskonstante für den Austritt aus der Zelle
$\log D$	scheinbarer Verteilungskoeffizient
$\log D_m$	scheinbarer Membran-Verteilungskoeffizient
$\log k'$	Kapazitätsfaktor aus einem rein wässrigen Laufmittel
$\log k'_{XY}$	Kapazitätsfaktor aus einem Acetonitril/Phosphatpuffer-Gemisch
$\log K_{\text{ex}}$	Extraktionskonstante eines Gegenions
$\log K_{\text{SIP}}$	Oberflächen-Ionenpaar-Verteilungskoeffizient an Membranen
$\log P$	Verteilungskoeffizient eines ungeladenen Moleküls
$\log P_{\text{dion}}$	Verteilungskoeffizient eines doppelt geladenen Moleküls
$\log P_{\text{ion}}$	Verteilungskoeffizient eines einfach geladenen Moleküls
$\log P_m$	Membran-Verteilungskoeffizient eines ungeladenen Moleküls
$\log P_m^{\text{IP}}$	Membran-Verteilungskoeffizient eines einfach geladenen Moleküls
LOO	<i>leave one out</i>
LUV	<i>large unilamellar vesicles</i>
LV	latente Variable
MCV	mittleres zelluläres Volumen

MLR	multiple lineare Regression
n	Anzahl der Einzelwerte
$\bar{n}H$	Zahl der durchschnittlich gebundenen Wasserstoffatome pro Molekül
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOE	<i>nuclear Overhauser effect</i>
NWP	negativster Wechselwirkungspunkt nach GRID
onc	<i>optimal number of components</i>
OWP	optimaler Wechselwirkungspunkt nach GRID
P_1	Permeationskoeffizient für den Eintritt in die Zelle
P_{-1}	Permeationskoeffizient für den Austritt aus der Zelle
PC	<i>principal component</i>
PCA	<i>principal component analysis</i>
PGDP	Propylenglycoldipelargonat
pKa	Dissoziationskonstante
p_oKa	Dissoziationskonstante in Gegenwart von n-Octanol
p_sKa	Dissoziationskonstante in Gegenwart eines Kosolvents
PLS	<i>partial least squares</i>
PN	Sondenname nach GRID (<i>probe</i>)
q^2	crossvalidiertes Bestimmtheitsmaß
QSAR	<i>quantitative structure activity relationship</i>
RBC	<i>red blood cells</i>
RP	<i>reversed phase</i>
RS	Referenzsubstanz
s	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDEP	<i>standard deviation of error of prediction</i>
SDEV	<i>standard deviation of the SDEP value</i>
SIP	<i>surface ion pair</i>
S/N	<i>signal to noise</i>
r^2	Varianz
r_V	Volumenverhältnis organische zu wässriger Phase
τ_c	Korrelationszeit
t_m	Mischzeit
T_1	longitudinale Relaxationszeit
TFAm	Trifluoracetamid
VR	Varimax-Rotation
wt-%	Gewichtsprozent
WP	Wechselwirkungspunkt nach GRID
WWP	Wechselwirkungspotential nach GRID
ZM	Zielmolekül nach GRID

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung von Verteilungskoeffizienten an biologischen Membranen

Die biologische Membran trennt lebende von nicht lebender Materie. Sie reguliert den Stoff- und Informationsaustausch mit der Umgebung. Da biologische Membranen als Transportbarriere für Arzneistoffe fungieren, ist die Untersuchung der Arzneistoff-Membran-Wechselwirkungen von großer Bedeutung.

Die passive Diffusion stellt den häufigsten Transportweg für Arzneistoffe durch biologische Membranen dar. Sie ist von der Lipophilie der Moleküle abhängig, aber stoffunspezifisch (*Pidgeon* und *Venkataram* 1989). Nach dem *Fick*'schen Diffusionsgesetz ist der Stofftransport bei einem zeitlich konstanten Konzentrationsunterschied direkt proportional zum Konzentrationsgradienten, der Membranfläche sowie dem Verteilungskoeffizienten der betreffenden Substanz und umgekehrt proportional zur Membrandicke. Demnach ist die Permeationsgeschwindigkeit durch eine Membran bei einem durch passive Diffusion resorbierten Arzneistoff direkt proportional zu dem Membran-Verteilungskoeffizienten. Der Hydrophobieeffekt gilt als die Antriebskraft für die passive Diffusion von Arzneistoffen durch biologische Membranen (*Kaliskan* et al. 1994). Die Fähigkeit einer Verbindung, Membranen zu durchdringen, steigt mit zunehmender Lipophilie. Allerdings gilt dieses nur unter *steady state*-Bedingungen, während man sonst ein Ansteigen bis zu einem Grenzwert beobachtet. Oberhalb dieses Grenzwertes nimmt das Permeationsvermögen wieder ab, da bei sehr hoher Lipophilie die Verbindungen nur eine geringe Rückverteilung in das wässrige Kompartiment jenseits der Membran aufweisen.

Die biologische Wirkung einer Substanz ist unter anderem abhängig von diversen chemischen und physikalischen Eigenschaften wie der Löslichkeit, den Dissoziationskonstanten und dem Verteilungskoeffizienten. Der Zusammenhang zwischen biologischer Aktivität und physikochemischen Parametern spielt eine nicht unerhebliche Rolle bei der Analyse von Beziehungen zwischen Struktur und Wirkung (*Seydel* et al. 1994). *Hansch* und Mitarbeiter brachten erstmals in einem extra-thermodynamischen Modell die biologische Aktivität eines Wirkstoffs mit dessen chemischer Struktur bzw. den zugehörigen physikochemischen Eigenschaften wie dem Verteilungskoeffizienten in Beziehung (*Hansch* und *Dunn* 1972).

Der Membran-Verteilungskoeffizient ist zur Erklärung biologischer Prozesse von großer Wichtigkeit, aber *in vivo* schlecht zu bestimmen. Deshalb wurden *in vitro*-Messsysteme entwickelt, um die Verteilungsvorgänge zu modellieren. Dabei sind Prozesse von gegenseitigen Effekten zwischen den Bausteinen der Membranen und den Arzneistoffmolekülen bei der Interpretation von pharmakologischen Wirkungen zu berücksichtigen (*Seydel* et al. 1994).

Der Verteilungskoeffizient P ist definiert als das Konzentrationsverhältnis eines Stoffes zwischen zwei nicht mischbaren Phasen, die sich im Gleichgewicht befinden. Dies kommt im *Nernst*'schen Verteilungssatz zum Ausdruck (*Nernst* 1891). Er gilt bei konstantem Druck, konstanter Temperatur und strenggenommen nur für verdünnte Lösungen. Um Verteilungskoeffizienten zu bestimmen, verwendet man üblicherweise ein organisches Lösungsmittel und Wasser bzw. eine wässrige Pufferlösung. Weiterhin existiert eine Vielzahl an Verteilungskoeffizienten mit unterschiedlichen Definitionen.

Grundsätzlich muss aber in beiden Phasen die gleiche Ladungsform der Substanz vorliegen. Die klassische Definition bezieht sich auf die Verteilung einer elektrisch neutralen Substanz zwischen einer homogenen organischen Phase und Wasser (*Nernst* 1891). Der Verteilungskoeffizient wird herangezogen, um Aussagen zu treffen, wie hydrophil oder lipophil ein Wirkstoff ist. Bei ionisierbaren Arzneistoffen ist der Verteilungskoeffizient der Neutralform oft von geringer Bedeutung, da die Arzneistoffmoleküle unter physiologischen Bedingungen mehr oder weniger stark ionisiert vorliegen. In diesen Fällen wird als hydrophile Phase ein Puffer bestimmten pH-Wertes verwendet, um den Einfluss der Ionisation auf das Verteilungsverhalten zu berücksichtigen.

Die Logarithmen der Verteilungskoeffizienten von ungeladenen Verbindungen sind nach *Collander* in unterschiedlichen Verteilungssystemen linear miteinander verknüpft, allerdings gilt dies nur für ähnliche Verbindungen und ähnliche lipophile Phasen (*Collander* 1951). Verteilungskoeffizienten erlauben relative Aussagen über die Resorption einer Verbindung, deren Bindung an Plasmaproteine, Transportwege (*Glasser* und *Kriegelstein* 1970; *Rojratanakiat* und *Hansch* 1990) sowie die Verteilung im Organismus (*van de Waterbeemd* und *Kansy* 1992).

1.2 Die Bestimmung von Verteilungskoeffizienten

Die Bestimmung von Verteilungskoeffizienten ist ein wesentlicher Beitrag zur Entwicklung neuer Arzneistoffmoleküle. Heute werden vier Modell-Verteilungssysteme vom Typ homogene organische Phase und Wasser als „kritisches Quartett“ angesehen, um sowohl das spezifische Verteilungsverhalten einer Verbindung als auch dessen Ursachen zu analysieren. Die Systeme mit Angabe des charakteristischen Merkmals des organischen Lösungsmittels sind (*Leahy* et al. 1989):

1. *n*-Octanol/Wasser (amphiphil, amphiprotisch);
2. Propylenglycoldipelargonat/Wasser (Wasserstoffbrücken-Akzeptor);
3. Chloroform/Wasser (Wasserstoffbrücken-Donor);
4. Cyclohexan/Wasser (rein hydrophob).

Die homogenen organischen Phasen haben verschiedene Dielektrizitätskonstanten und unterschiedliches Löslichkeitsvermögen von Wasser (*Leahy* et al. 1989). Das mit Wasser gesättigte *n*-Octanol besitzt eine spektroskopisch nachweisbare Clusterstruktur, bei der vier zentrale Wassermoleküle von 16 Octanol-Molekülen mit nach innen gerichteten Hydroxylgruppen umgeben sind (*Smith* et al. 1975; *Franks* et al. 1993).

Das *n*-Octanol/Wasser System gilt als Methode der Wahl zur Analyse des Verteilungsverhaltens einer Verbindung und hat sich seit den Arbeiten von *Hansch* als allgemeines Referenzsystem in der Medizinischen Chemie und der Molekularpharmakologie durchgesetzt (*Hansch* und *Dunn* 1972; *Hansch* und *Leo* 1979). In einigen Fällen wurden Beziehungen zwischen biologischer Aktivität und den Differenzwerten der Logarithmen von Koeffizienten in zwei Verteilungssystemen gefunden, die allerdings nicht allgemeingültig sind, beispielsweise als ein Modell zur Blut-Hirn-Schranke (*Leahy* et al. 1991; *van de Waterbeemd* und *Kansy* 1992).

Liposomen wurden als neueres Verteilungsmodell vorgeschlagen, da deren Aufbau einer biologischen Membran am nächsten kommt. Sie eignen sich gut zur Bestimmung von biologisch relevanten Verteilungskoeffizienten (*Alcorn* et al. 1993; *Pauletti* und *Wunderli-Allenspach* 1994) und zur Unter-

suchung von Arzneistoff-Membran-Wechselwirkungen (Fruttero et al. 1998). Die räumliche Trennung von van-der-Waals- und elektrostatischen Wechselwirkungsbereichen des Phosphatidylcholins sind für das Verteilungsverhalten von Molekülen entscheidend (Katz und Diamond 1974 a-c; Diamond und Katz 1974). Der Vorteil von Liposomen besteht insbesondere in der gleichzeitigen Berücksichtigung von polaren und unpolaren Wechselwirkungen.

Als Methode zur Bestimmung von Verteilungskoeffizienten wird häufig das *shake flask*-Verfahren eingesetzt. Da die *shake flask*-Methode einen hohen Zeitaufwand erfordert und die Reproduzierbarkeit der Verteilungskoeffizienten nicht optimal ist, suchte man nach weiteren einfachen und leicht zu handhabenden Bestimmungsmethoden für die Verteilungskoeffizienten.

Diese wurden in der Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) gefunden (Kaliszan et al. 1994). Allerdings sind die Ergebnisse nur für homologe Reihen mit den Verteilungskoeffizienten in *n*-Octanol/Wasser vergleichbar. Ein Ausweg stellt die Beschichtung der RP-Säule mit *n*-Octanol dar, wobei aber nur Verbindungen mit einem Verteilungskoeffizienten zwischen 0.1 und 1000 sicher vermessen werden können.

An Stelle von Untersuchungen an Liposomen ist die Verwendung von künstlichen immobilisierten Membranen als stationäre Phase in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (IAM-HPLC) eine einfache und genaue Alternative zur Bestimmung von Membran-Verteilungskoeffizienten sowohl für ionisierbare als auch für nichtionisierbare Verbindungen (Ong et al. 1996). Weiterhin wurden IAM-Säulen (*immobilized artificial membrane* = IAM) erfolgreich angewendet zur Trennung, Analyse und Reinigung von Biomolekülen (Pidgeon et al. 1991), zur Vorhersage des Arzneistofftransportes durch die Haut (Ong et al. 1996) und zur Vorhersage von *n*-Octanol/Wasser- oder Membran-Verteilungskoeffizienten (Ong et al. 1996; Barbato et al. 1996; Barbato et al. 1997).

Eine neue Methode stellt die potentiometrische Titration dar, die es mit geringerem Aufwand ermöglicht, Membran-Verteilungskoeffizienten für ionisierbare Verbindungen zu bestimmen (Avdeef et al. 1998).

1.3 Die Lokalisation der Arzneistoffmoleküle in Membranen und Diffusionsprozesse an Membranen

Für das Auffinden von intramolekularen Wechselwirkungsstellen in Molekülen und intermolekularen Wechselwirkungsstellen von Molekülen mit ihrer Umgebung ist die Kern-Magnet-Resonanz-Spektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance* = NMR) die am weitesten entwickelte und universellste Methode. Intra- und intermolekulare Abstände zwischen NMR-aktiven Kernen können unter Ausnutzung von homo- und heteronuklearen Kern-Overhauser-Effekt-Messungen (*nuclear Overhauser effect* = NOE) bestimmt werden. Durch spezielle $^{19}\text{F}^1\text{H}$ -NOE-NMR-Experimenten sind die Beträge von internuklearen Abständen und die Regionen von intermolekularen Wechselwirkungen bei fluoridierten Verbindungen in Lösung zugänglich (Gerig et al. 1979; Jones et al. 1995; Huber et al. 1997).

Für einige Phenothiazine (Frenzel et al. 1978, Kitamura et al. 1979; Kuroda und Kitamura 1984, Pajeva et al. 1996) und Calcium-Kanal-Blocker (Gaggelli et al. 1990; Bäuerle und Seelig 1991) wurden bereits Interaktionen mit Phosphatidylcholin-Molekülen der biologischen Membranen über NMR-Experimente gefunden. Auch konnte die Existenz einer starken Bindung zwischen den polaren Phospholipid-Molekülen und den catamphiphilen Substanzen bewiesen werden, die mit einer höheren Lipophilie einer Substanz zunimmt (Seydel et al. 1989; Seydel et al. 1992; Fruttero et al. 1998). Allerdings gibt es keine konkreten Aussagen über die intermolekularen Wechselwirkungsstellen in der Membran auf atomarer Ebene. Die zum Teil geringe Löslichkeit der ausgewählten Arzneistoffe erschwert dabei die Untersuchungen in wässrigen Lösungen.

Weiterhin wird heute die NMR-Spektroskopie zur Analyse von Transport- oder Diffusionsphänomenen von Molekülen durch Membranen angewendet (King und Kuchel 1990). Durch eine Signalaufspaltung im ^{19}F -Spektrum von Substanzen können Zweiseiten-Austauschprozesse an der Membran von roten Blutkörperchen (*red blood cells* = RBC) untersucht werden, da bei dieser Art von Zellen eine komplizierte Trennung aus ihrer natürlichen Umgebung und weitere Aufbereitungen des biologischen Materials entfallen (Potts et al. 1990; Xu et al. 1991; Potts und Kuchel 1992; Xu und Kuchel 1993; Xu et al. 1998). Die Ein- und Austrittsgeschwindigkeiten von Molekülen können durch Phospholipid-Arzneistoff-Wechselwirkungen auf molekularer Ebene beeinflusst werden.

1.4 Pharmakologische Eigenschaften der untersuchten Arzneistoffe

Neuroleptika von Phenothiazin- und Thioxanthen-Typ werden bei psychomotorischer Erregtheit, psychotischen Syndromen und Schizophrenie angewendet und bewirken ein Anstoßen von anti-psychotischen Effekten über eine reversible Blockade von dopaminergen D_2 -Rezeptoren. Elektronenziehende Substituenten am Trizyklus wie Chlor und CF_3 verstärken die Wirkung, elektronenschiebende Substituenten wie OCH_3 und SCH_3 führen zum Gegenteil. Die Unterschiede in den Wirkstärken werden über die schnellere Biotransformation nicht halogenhaltiger Verbindungen erklärt. Die neuroleptische Potenz der Verbindungen nimmt weiterhin mit der Verlängerung der Seitenkette vom N,N-Dimethylpropylamin zum 2-(4-Propylpiperazin)-ethanol zu. Bei einigen Derivaten (Promethazin, Levomepromazin, Thioridazin) ist eine ausgeprägte antidepressive Aktivität therapeutisch nutzbar. Die Phenothiazine unterliegen einer Radikalbildung bei dauerhafter Licht- und Lufteinwirkung.

Calcium-Kanal-Blocker der Klassen der 1,4-Dihydropyridine und der Phenylalkylamine wirken über eine Hemmung des membranständigen und spannungsabhängigen Calcium-Kanals von L-Typ. Die Verbindungen vom Nifedipin-Typ beeinflussen das Membranpotential und vermindern die Öffnungswahrscheinlichkeit des Ionenkanals, so dass der Calcium-Einstrom in die Zelle verzögert wird. Da die verringerte Kontraktionsfähigkeit besonders bei Myokard- und Muskelzellen der Blutgefäße ausgeprägt ist, sind die klassischen Einsatzgebiete der Calcium-Kanal-Blocker die Therapie von koronarer Herzkrankheit und Hypertonie. Unter Lichteinfluss aromatisiert der 1,4-Dihydropyridinring. Die Phenylalkylamine (Verapamil) wirken über eine allosterische Blockade an der 1,4-Dihydropyridin-Bindungsstelle. Die S-(-)-Form von Verapamil ist therapeutisch stärker wirksam als das andere Enantiomer.

Ein völlig neues Anwendungsgebiet von R-(+)-Verapamil ergibt sich aus dessen Fähigkeit, die Zytostatikaresistenz von Krebszellen aufzuheben (Zamora et al. 1988). Die Expression eines Transportproteins ist verantwortlich für das Auftreten der Resistenzen. Es wurde für beide Enantiomere des Verapamils ein Angriff am membranständigen P-Glykoprotein und dessen Blockade nachgewiesen (Toffoli et al. 1995; Döppenschmidt et al. 1999). Mit Triflupromazin, Trifluoperazin und beiden Flupenthixol-Isomeren fand man ebenso Zytostatikaresistenz aufhebende Effekte an Krebszellen (Ford et al. 1989; Ford et al. 1990). Neben der Bindung an das P-Glykoprotein wurde ein weiterer Wirkmechanismus der neuroleptisch aktiven Substanzen postuliert, indem sie die Membranstruktur unspezifisch verändern können und damit eine verbesserte Membrangängigkeit der eigentlichen Zytostatika nach sich ziehen (Pajeva et al. 1996; Dey et al. 1997).

1.5 Ansatz und Zielstellung

Bevor die ausgewählten Arzneistoffe die molekulare Ordnung einer biologischen Membran beeinflussen, müssen sie sich an oder in die Membran einlagern. Bislang fehlen systematische Bestimmungen von Verteilungskoeffizienten der Verbindungen an biologischen Membranen oder in verwandten *in vitro*-Modellen unter Berücksichtigung von physiologischen Bedingungen.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation besteht in der

- quantitativen Analyse des Verteilungsverhaltens;
- Lokalisation von intermolekularen Wechselwirkungsstellen in Membranen und
- Interpretation des Verteilungsverhaltens durch statistisch ausgewählte Molekül-Deskriptoren.

Dazu werden zuerst die Verteilungskoeffizienten der Neutralformen und der Ionen potentiometrisch in *n*-Octanol/Wasser, in Propylenglycoldipelargonat/Wasser und an Phosphatidylcholin-Liposomen bestimmt sowie die Interaktionen mit künstlichen Membranoberflächen chromatografisch an einer IAM-Säule untersucht. Die Wechselwirkungen auf molekularer Ebene in Membranen werden mit Hilfe der NMR-Spektroskopie analysiert.

Statistische und *Molecular Modeling*-Verfahren ermöglichen einen Vergleich der experimentellen Ergebnisse, um die wesentlichen Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Verteilungsverhalten der Verbindungen und die strukturellen Ursachen herauszustellen. Eine besondere Eignung der verwendeten *in vitro*-Modellsysteme soll zum Schluss abgeleitet werden.

2 Charakterisierung der verwendeten Arzneistoffe und Chemikalien

2.1 Die Arzneistoffe

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden 14 neuroleptisch wirksame Arzneistoffe untersucht. Für diese Arbeit werden die Phenothiazine in einfach protonierbare Verbindungen vom Propylamin-Typ, einschließlich Thioridazin (Abb. 1), und in zweifach protonierbare Verbindungen vom Piperazin-Typ eingeteilt (Abb. 2). Zu den Thioxanthenen gehören Chlorprothixen, das als racemisches Gemisch vorlag, und die Isomeren cis- und trans-Flupenthixol (Abb. 3).

Basierend auf der molekularen Struktur werden die Calcium-Kanal-Blocker in die 1,4-Dihydropyridine (Abb. 4) und die Phenylalkylamine (Abb. 5) unterschieden. Die Verbindungen des Nifedipin-Typs besitzen eine veresterte vinyloge Säureamidstruktur. Die NH-Gruppe im 1,4-Dihydropyridinring besitzt die gleichen Eigenschaften wie in einer Amidstruktur und ist daher nicht basisch. Der 1,4-Dihydropyridinring liegt in einer Wannenkonformation vor. Der verdrehte Arylrest und das NH-Wasserstoffatom befinden sich auf der gleichen Seite der Wanne. Amlodipin und Nifedipin unterscheiden sich in ihren physikochemischen Eigenschaften von den anderen 1,4-Dihydropyridinen, da sie in einer Seitenkette über eine protonierbare Aminstruktur verfügen. Sind die Carbonsäurefunktionen mit unterschiedlichen Alkoholen verestert, entstehen chirale Verbindungen. Eine Razemattrennung erfolgte allerdings vor den Experimenten nicht.

Alle Phenylalkylamine sind protonierbare Verbindungen. Fendilin hat als Diphenylpropylamin eine strukturelle Ähnlichkeit mit H₁-Antihistaminika.

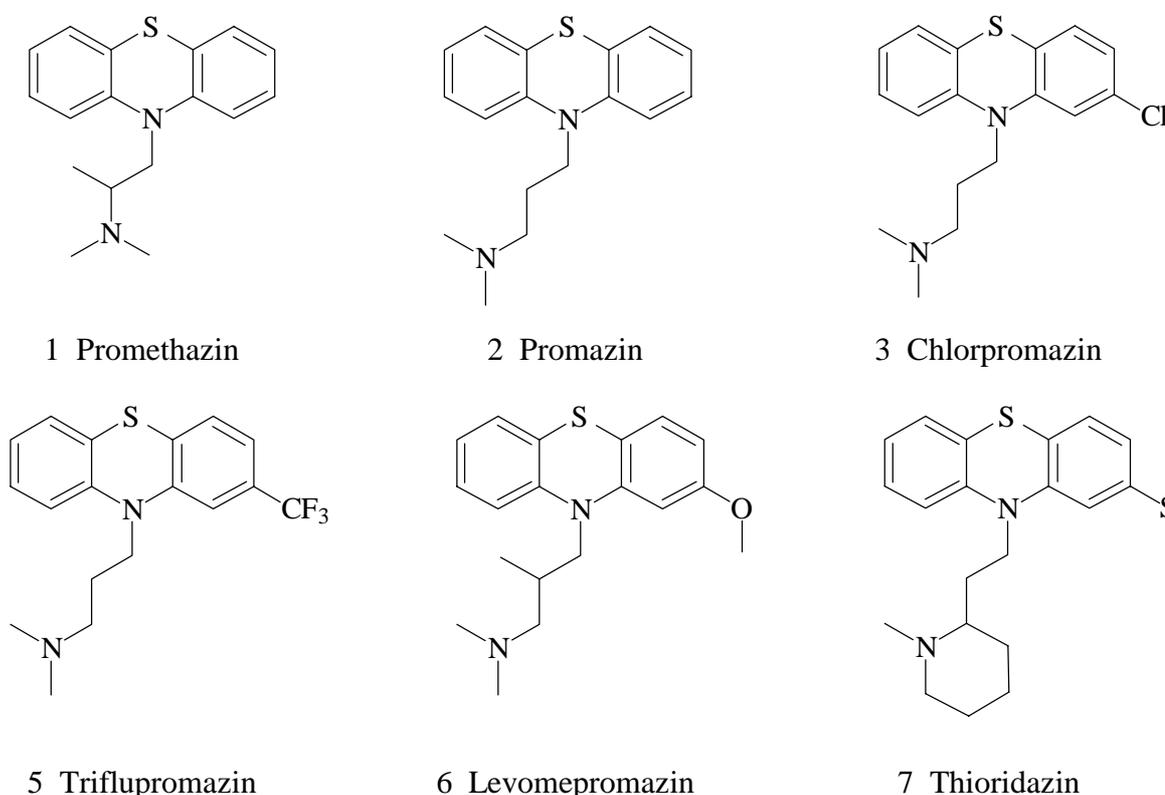
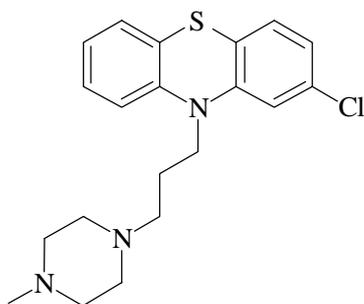
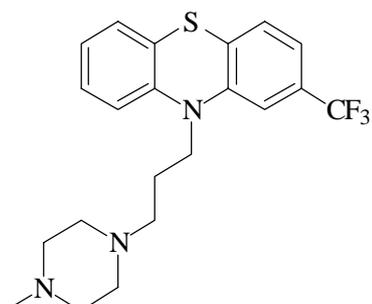


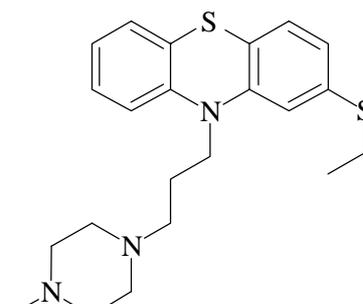
Abbildung 1: Arzneistoffe mit einem Phenothiazinring (einfache Basen)



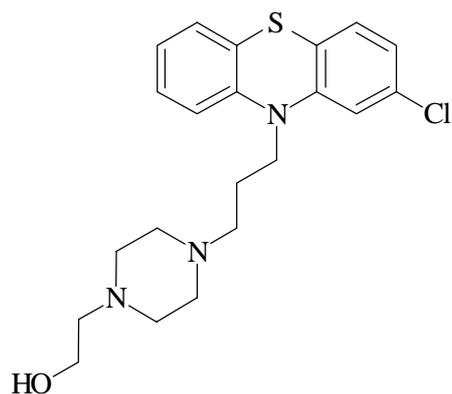
8 Prochlorperazin



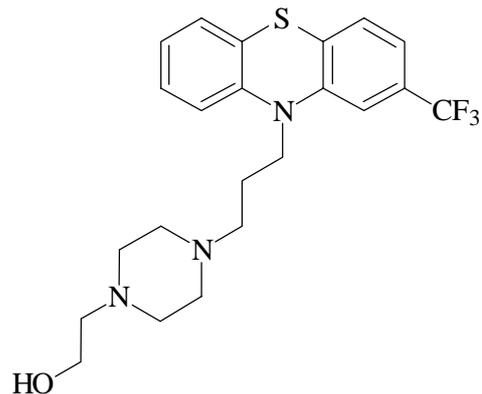
9 Trifluoperazin



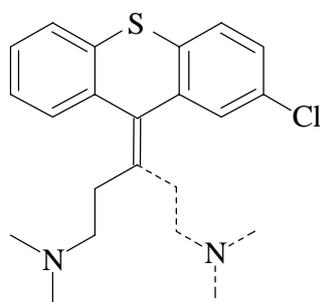
10 Thiethylperazin



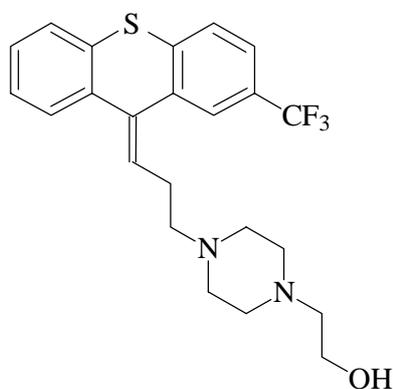
11 Perphenazin



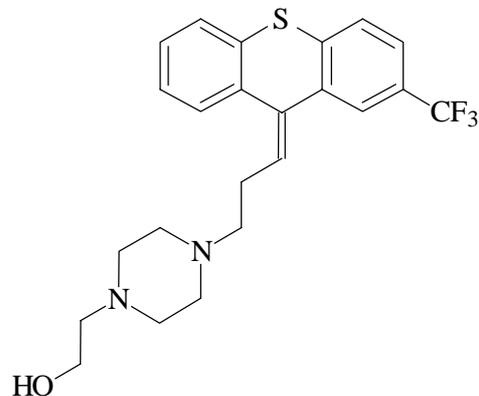
12 Fluphenazin

Abbildung 2: Arzneistoffe mit einem Phenothiazinring (zweifache Basen)

4 Chlorprothixen (Razemat)

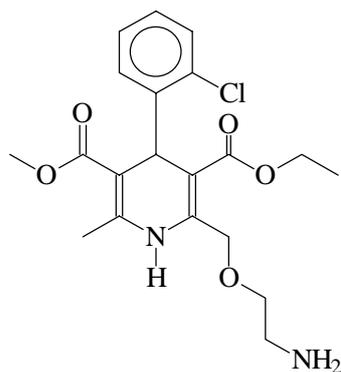


13 cis-Flupenthixol

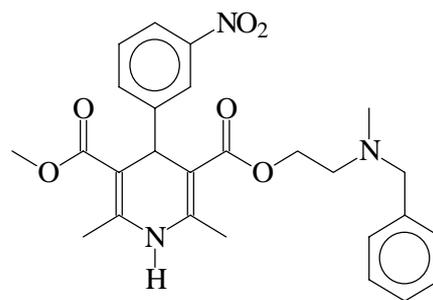


14 trans-Flupenthixol

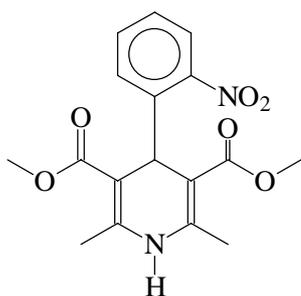
Abbildung 3: Arzneistoffe mit einem Thioxanthenring



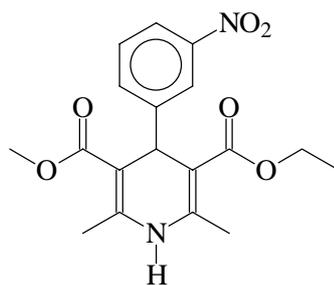
18 Amlodipin



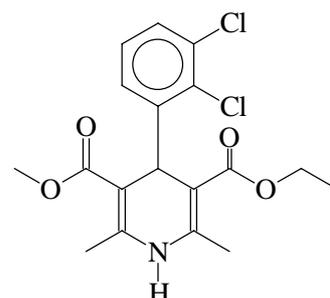
19 Nicardipin



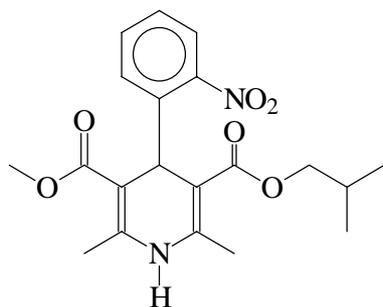
20 Nifedipin



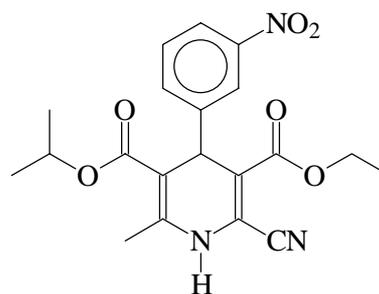
21 Nitrendipin



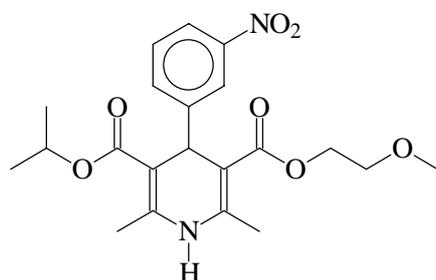
22 Felodipin



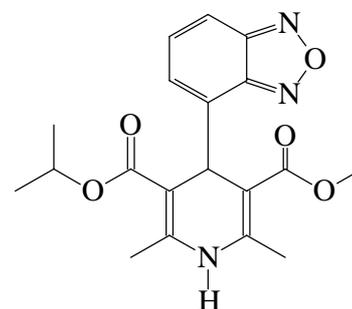
23 Nisoldipin



24 Nilvadipin



25 Nimodipin



26 Isradipin

Abbildung 4: Arzneistoffe mit einer 1,4-Dihydropyridin-Struktur

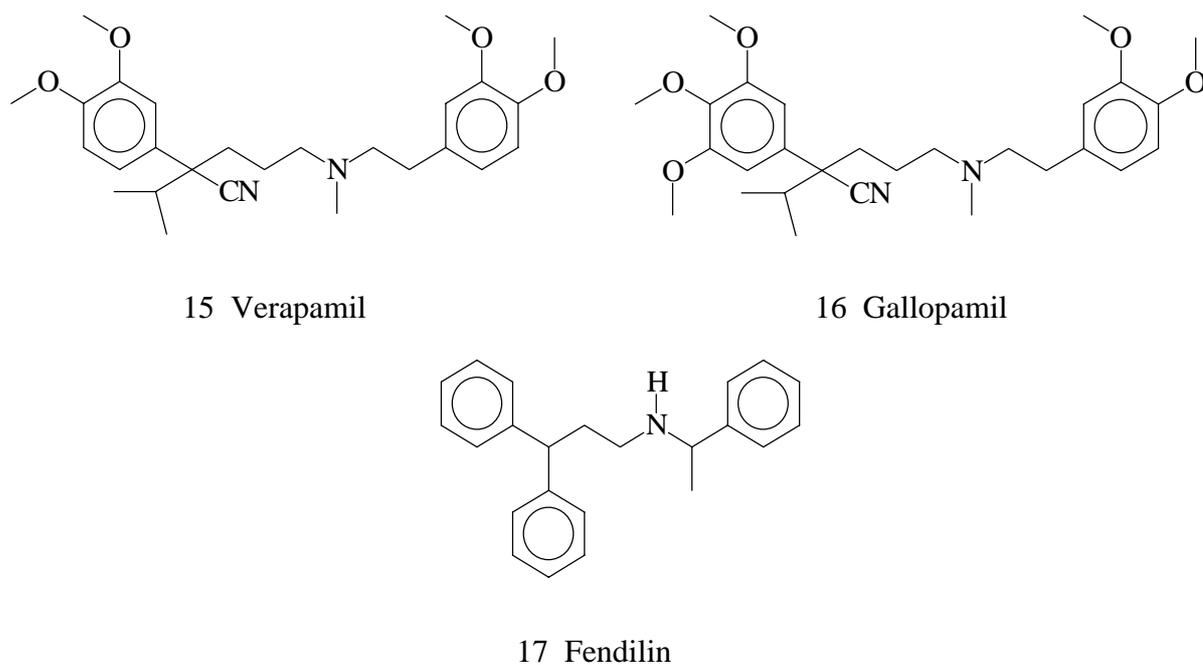


Abbildung 5: Arzneistoffe mit einer Phenylalkylamin-Struktur

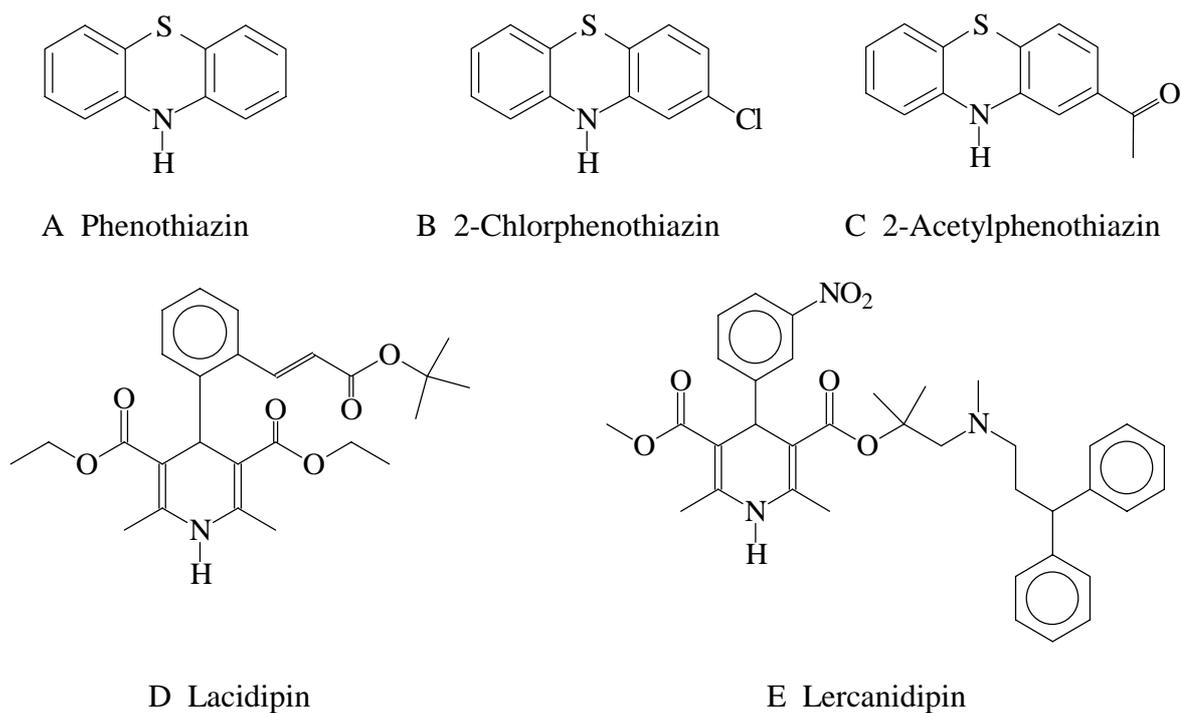


Abbildung 6: Referenzverbindungen: A bis C - Phenothiazine, D und E - 1,4-Dihydropyridine

2.2 Eingesetzte Chemikalien und Referenzsubstanzen

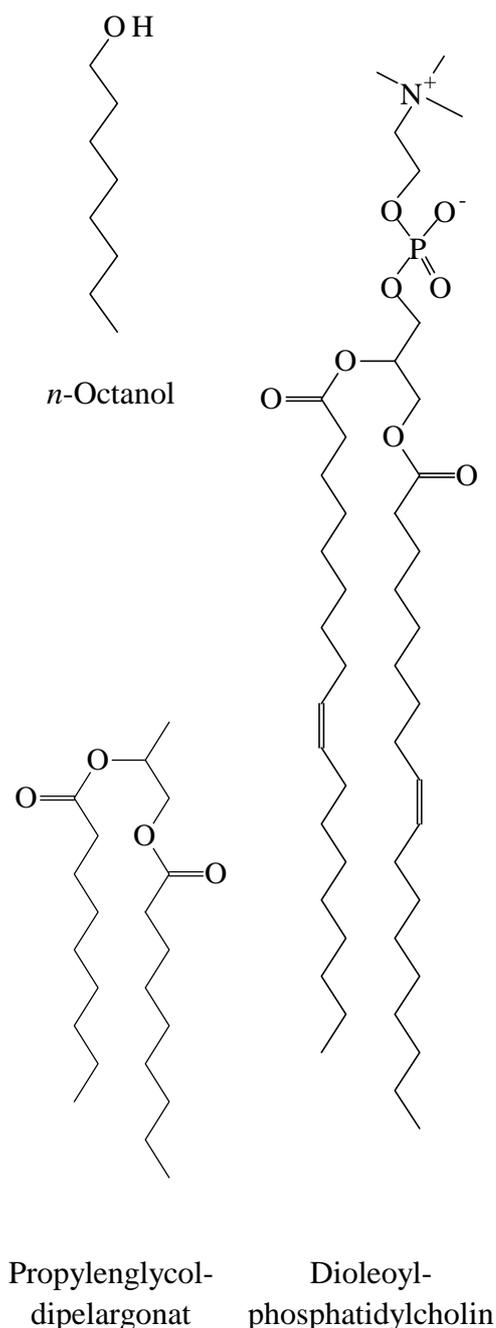
Die Phenothiazine ohne basische Seitenkette, Phenothiazin, 2-Acetylphenothiazin und 2-Chlorphenothiazin, dienen als Bezugssubstanzen in den chromatografischen Untersuchungen (Abb. 6). Weiterhin wurden Literaturwerte von Verteilungskoeffizienten der neueren 1,4-Dihydropyridine Lacidipin (Mason et al. 1989) und Lercanidipin (Herbette et al. 1997) in diese Arbeit aufgenommen.

Ich verwendete in den Verteilungssystemen die homogenen organischen Phasen *n*-Octanol und Propylenglycoldipelargonat sowie Liposomen (Abb. 7), die aus Phosphatidylcholin von getrocknetem Eigelb hergestellt wurden. *N*-Octanol ist eine farblose, eigenartig riechende Flüssigkeit mit einer geringeren Dichte als Wasser. Die endständige Hydroxylgruppe kann als Wasserstoffbrückendonator und -akzeptor fungieren. Wasser ist bis zu einem maximalen molaren Gehalt von 28% in *n*-Octanol löslich (1.72 M in 6.14 M) (Leahy et al. 1989).

Der Ester Propylenglycoldipelargonat (PGDP) besteht aus einem Molekül Propylenglycol und zwei Molekülen Nonansäure. Die farblose, ölige Flüssigkeit ist geruchlos und praktisch unlöslich in Wasser. PGDP hat eine Dichte von 0.914 g/cm³ und eine niedrige Dielektrizitätskonstante von $\epsilon = 3.30$ (Leahy et al. 1989). Der Ester besitzt nur Wasserstoffbrückenakzeptor-Eigenschaften.

Abbildung 7: Strukturen der organischen Phasen

Phosphatidylcholine sind die am häufigsten vorkommenden Phospholipide. Repräsentativ für den molekularen Aufbau ist ein Dioleoylphosphatidylcholin-Molekül (DOPC) in Abb. 7 dargestellt. Über einen großen pH-Bereich liegen die Phosphatidylcholine als Zwitterionen vor, mit einer positiv geladenen Trimethylammoniumgruppe und mit einem negativ geladenen Phosphatbaustein. Bei Anwesenheit von ausreichend Wasser bilden sich geschlossene lamellare Vesikel (Liposomen) aus einer Phosphatidylcholin-Doppelschicht. Dabei lagern sich die unpolaren Fettsäureketten der Phosphatidylcholine so aneinander an, dass nur die polaren Kopfgruppen mit der wässrigen Phase in Berührung kommen. Die Membran der aus Eilecithin hergestellten Liposomen ist bei Raumtemperatur fluide, da die Phasenübergangstemperaturen der überwiegend vorkommenden Phosphatidylcholine mit ein- und mehrfach ungesättigten Fettsäuren überschritten sind (New 1990; Nuhn 1997).



Im Abschnitt 9.3.1 sind die Handels- und IUPAC-Namen aller betrachteten Arzneistoffe und die der wichtigsten Chemikalien sowie die Bezugsquellen aufgeführt. Die übrigen organischen Lösungsmittel hatten eine Reinheit von HPLC-Qualität.

3 Potentiometrische Bestimmung von Verteilungskoeffizienten

3.1 Theoretische Grundlagen

3.1.1 Die Dissoziationskonstanten

Der Mikrotitrator PCA 101 von Sirius Analytical Instruments (SIRIUS) wurde in Rahmen dieser Dissertation zur potentiometrischen Bestimmung von Dissoziationskonstanten (pK_a -Wert) und von Verteilungskoeffizienten verwendet (Avdeef und Burcher 1978; Avdeef 1992; Avdeef et al. 1993; Avdeef 1993; Slater et al. 1993; Takács-Novák et al. 1994; Sirius Analytical Instruments 1994; Avdeef et al. 1995; Avdeef et al. 1996; Avdeef 1996; Takács-Novák und Avdeef 1996; Avdeef et al. 1998). Nach dem Massenwirkungsgesetz ist die Dissoziationskonstante einer Säure (K_a) für wässrige Lösungen definiert als:

$$K_a = \frac{c_{A^-} \cdot c_{H_3O^+}}{c_{H_2O} \cdot c_{HA}} \quad \text{Gl. 1}$$

Sie wird üblicherweise in einer logarithmierten Form angegeben, $pK_a = -\log K_a$. Für unendlich verdünnte Lösungen gilt die *Henderson-Hasselbalch*'sche Gleichung, nach der der pK_a -Wert dem pH-Wert entspricht, wenn zwei korrespondierende Reaktionspartner in gleicher Konzentration in Lösung vorliegen.

$$\text{pH} = pK_a + \log \frac{c_{A^-}}{c_{HA}} \quad \text{Gl. 2}$$

Die Dissoziationskonstante weist den Ionisierungsgrad einer dissoziierbaren Verbindung bei einem bekannten pH-Wert aus. Für eine basische Verbindung sind die Gl. 1 und 2 ebenso gültig, wenn für die Konzentration der dissoziierten Säure c_{A^-} die Konzentration der Neutralform der Base c_B und für die Konzentration der undissoziierten Säure c_{HA} die protonierte Form der Base c_{BH^+} eingesetzt werden. Die Bestimmung von pK_a -Werten mittels potentiometrischer Titration setzt die Löslichkeit des Stoffes in Wasser oder wässrigen Systemen voraus, wobei eine Mindestlöslichkeit von 10^{-4} M vorhanden sein muß (Sirius Analytical Instruments 1994). Da Ionenstärke und Ionenbeweglichkeit erheblich die Titration einer extrem geringen Menge an Substanz beeinflussen, wurde bei einer konstanten Ionenstärke in 0.15 molarer KCl-Lösung gearbeitet, wobei die Salzkonzentration um den Faktor 10 bis 100 größer sein soll als die Substanzkonzentration. Hat eine Substanz eine zu geringe Löslichkeit in diesem wässrigen Medium, bietet das Gerät die Möglichkeit, Lösungsvermittler (Kosolventien) einzusetzen. Beim Zusatz der Kosolventien Methanol oder 1,4-Dioxan (Dioxan) verringert sich die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels. Durch Extrapolation auf ein Kosolvent freies wässriges System wird der wirkliche pK_a -Wert einer Verbindung zugänglich. Die *Yasuda-Shedlovsky*-Gleichung beschreibt die lineare Abhängigkeit der Größe des messbaren pK_a -Wertes bei einem bestimmten Kosolvent/Wasser-Verhältnis ($p_s K_a$ -Wert) von der Wasserkonzentration und der Dielektrizitätskonstante in dem verwendeten Gemisch (Yasuda 1959; Shedlovsky 1962):

$$p_s K_a + \log [H_2O] = a + b/\epsilon \quad \text{Gl. 3}$$

Typisch für Basen ist ein negativer Anstieg der Regressionsgeraden. Die Gültigkeit der *Yasuda-Shedlovsky*-Extrapolation wurde von SIRIUS überprüft (Sirius Analytical Instruments 1994). Im

Standardparametersatz von SIRIUS sind die Werte von $\log [\text{H}_2\text{O}]$ und $1/\varepsilon$ für die eingesetzten Kosolvent/Wasser-Gemische (Gewichtsprozent, wt-%) sowie die Änderung der Elektrodenparameter enthalten. An wasserlöslichen Verbindungen in Methanol/Wasser wurde von SIRIUS eine positive Abweichung (*bias*) zwischen den extrapolierten und den wahren pK_a -Werten schwacher Säuren und ein negativer *bias* bei schwachen Basen festgestellt, wenn entweder die Messwerte von 0 bis 65 wt-% oder die Messwerte von 30 bis 65 wt-% Kosolventgehalt in die Extrapolation einbezogen wurden. Ein empirisch ermittelter *long distance factor* von 0.12 wurde zur Korrektur der extrapolierten pK_a -Werte von schwachen Basen in Fall eines Kosolventanteils (wt-%) aller Einzelmessungen von größer als 30 wt-% addiert (*Sirius Analytical Instruments* 1994).

3.1.2 Die Verteilungskoeffizienten in homogenen organischen Phasen

Der Verteilungskoeffizient für die Neutralform X wird meist logarithmisch als $\log P$ angegeben und ist eine stoffspezifische Konstante (*Hansch und Leo* 1979).

$$\log P_X = \log \left[\frac{c_{X \text{ in org}}}{c_{X \text{ in H}_2\text{O}}} \right] \quad \text{Gl. 4}$$

Unabhängig von der Neutralform können sich auch geladene Moleküle als Ionenpaare verteilen. Die geladene Form bzw. das Ionenpaar besitzt eine andere Lipophilie und ihr Verteilungskoeffizient wird als $\log P_{\text{ion}}$ bezeichnet. Der scheinbare Verteilungskoeffizient $\log D$ bei einem definierten pH-Wert, auch pH-abhängiger Verteilungskoeffizient genannt, berücksichtigt gleichzeitig die Verteilungskoeffizienten der einzelnen Formen und die Dissoziationskonstante(n) der Verbindung.

Aufgrund der Verteilung einer Verbindung zwischen den beiden Phasen verändert sich die Konzentration in der wässrigen Phase, wodurch scheinbar veränderte Dissoziationskonstanten gemessen werden. Der scheinbare pK_a -Wert in Gegenwart einer organischen Phase, p_oK_a , und das Volumenverhältnis r_V ($[V_{\text{org}} / V_{\text{H}_2\text{O}}]$) von organischer zu wässriger Phase wird bei der potentiometrischen Titration zur Berechnung des Verteilungskoeffizienten benutzt:

$$\log P = \log \left[10^{\text{pK}_a - \text{p}_o\text{K}_a} - 1 \right] - \log \left[\frac{V_{\text{org}}}{V_{\text{H}_2\text{O}}} \right] \quad \text{Gl. 5}$$

Gl. 5 beschreibt den Zusammenhang für eine Base, bei der nur die Neutralform in die organische Phase übergeht. Oft nimmt der so berechnete $\log P$ -Wert einer Verbindung mit zunehmenden Volumenverhältnis r_V ab. Dieses Phänomen ist das Ergebnis der Verteilung von Ionenpaaren in die organische Phase und wird besonders bei lipophilen Säuren und Basen beobachtet. Die Entstehung von Ionenpaaren hängt vom Typ des im Wasser vorhandenen Gegenions ab. Für basische Arzneistoffe ist das (physiologische) Vorhandensein des Chlorid-Anions wichtig. Die Ionenpaarverteilung tritt insbesondere bei sehr lipophilen Wirkstoffen auf ($\log P > 3$) und hat erhebliche Auswirkungen für *in vivo*-Verhältnisse.

Liegt also eine Verteilung von Ionen vor, muß der Verteilungskoeffizient $\log P_{\text{ion}}$ bei der Berechnung des $\log P$ -Wertes berücksichtigt werden. Die Verteilungskoeffizienten der Neutralform und des Ionenpaares einer einfach protonierbaren Base können direkt über die Gl. 6 und 7 errechnet werden,

indem man zwei Titrations bei verschiedenen Volumenverhältnissen r_{V1} und r_{V2} durchführt (*Sirius Analytical Instruments* 1994; *Avdeef et al.* 1998).

$$\log P = \log \frac{r_{V1} \cdot 10^{p_{oKa}(2)-pKa} - r_{V2} \cdot 10^{p_{oKa}(1)-pKa} + r_{V2} - r_{V1}}{r_{V1}r_{V2} \cdot (10^{p_{oKa}(1)-pKa} - 10^{p_{oKa}(2)-pKa})} \quad \text{Gl. 6}$$

$$\log P_{\text{ion}} = \log \frac{r_{V2} \cdot 10^{p_{oKa}(2)-pKa} - r_{V1} \cdot 10^{p_{oKa}(1)-pKa} - (r_{V2} - r_{V1}) \cdot 10^{p_{oKa}(1)+p_{oKa}(2)-2pKa}}{r_{V1}r_{V2} \cdot (10^{p_{oKa}(1)-pKa} - 10^{p_{oKa}(2)-pKa})} \quad \text{Gl. 7}$$

Der scheinbare Verteilungskoeffizient, $\log D$, bei einem gewählten pH-Wert des Verteilungssystems ergibt sich dann für eine Base aus den stoffspezifischen Größen pKa , $\log P$ und $\log P_{\text{ion}}$ nach Gl. 8 (*Sirius Analytical Instruments* 1994):

$$\log D = \log \left[P + P_{\text{ion}} \cdot 10^{-\text{pH} + pKa} \right] - \log \left[1 + 10^{-\text{pH} + pKa} \right] \quad \text{Gl. 8}$$

Die Vorgänge bei der Verteilung einer einfachen Base zwischen einer Chlorid-haltigen wässrigen Phase und einer homogenen organische Phase wie *n*-Octanol, PGDP, Chloroform oder *n*-Hexan sind in Abb. 8 dargestellt. Neben dem pH-abhängigen Gleichgewicht in Wasser (pKa) existiert ein korrespondierendes Gleichgewicht in dem organischen Lösungsmittel, der nach *Scherrer* benannte p_oKsch -Wert (*Scherrer* 1984).

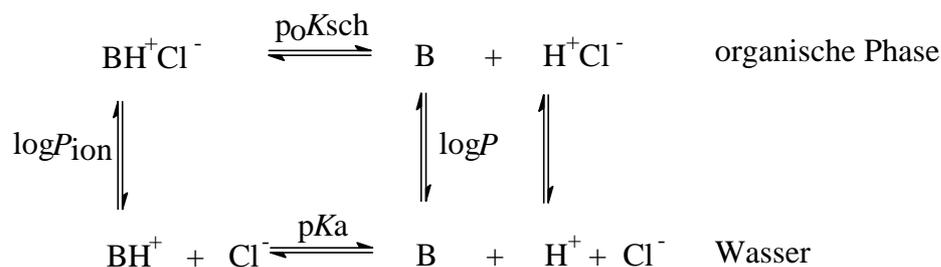


Abbildung 8: Übersicht zum Verteilungssystem homogene organische Phase/Wasser

In den Betrachtungen gehe ich von einem Überschuss an in der organischen Phase gelösten Chlorwasserstoff aus, so dass der Betrag des *Scherrer*- pKa -Wertes lediglich von den stoffspezifischen Koeffizienten $\log P$ und $\log P_{\text{ion}}$ beeinflusst werden kann. Eine weitergehende Diskussion zum p_oKsch -Wert führt über das Thema dieser Arbeit hinaus (*Scherrer und Crooks* 1989).

Der Einfluss des Gegenions muss zum Vergleich von Ionenpaar-Verteilungskoeffizienten einbezogen werden, wenn die $\log P_{\text{ion}}$ -Werte bei verschiedenen Salzkonzentrationen bestimmt wurden. Die Extraktionskonstante $\log K_{\text{ex}}$ beinhaltet den Einfluß des Gegenions als Reaktionspartner (*Box* 1998):

$$\begin{array}{ccc}
 \text{organische} & \text{BH}^+\text{Cl}^- & \rightleftharpoons & \text{BH}^+ + \text{Cl}^- & \text{Wasser} \\
 \text{Phase} & & & & \\
 \log K_{\text{ex}} = \log \left(\frac{[\text{XH}^+\text{Cl}^-]}{[\text{XH}^+] \cdot [\text{Cl}^-]} \right) & = & \log P_{\text{ion}} - \log [\text{Cl}^-] & & \text{Gl. 9}
 \end{array}$$

Der wesentliche Unterschied zwischen den Beträgen der $\log P_{\text{ion}}$ - und $\log K_{\text{ex}}$ -Werte besteht in der Subtraktion des Logarithmus der Konzentration des Gegenions, im vorliegenden Fall von 0.15 M Chlorid ($\log 0.15 = -0.82$). Die Konstante $\log K_{\text{ex}}$ gibt an, wieviel Ionen einer Verbindung in eine

organische Phase bei unterschiedlichen Konzentrationen eines Gegenionen extrahiert werden. Sie ermöglicht weiterhin einen Vergleich des Vermögens verschiedener Gegenionen (bei gleichen Konzentrationen), den Übergang von Ionenpaaren in eine organische Phase zu beeinflussen (Box 1998). Da immer bei einer konstanten Chlorid-Ionen Konzentration gearbeitet wurde, verzichtete ich auf eine Umrechnung der $\log P_{\text{ion}}$ -Werte bei den *n*-Octanol/Wasser- und PGDP/Wasser-Verteilungssystemen.

3.1.3 Die Verteilungskoeffizienten an Membranen

Die Ergebnisse von Untersuchungen zum Verteilungsverhalten an biologischen Membranen sind u.a. abhängig von der Größenverteilung der Liposomen in der wässrigen Lösung, von der Zahl der Membranen pro Vesikel, von der chemischen Stabilität der Phospholipide während der Titration (New 1990). Diese Eigenschaften werden auch vom verwendeten Lipid und vom Verfahren der Liposomenpräparation bestimmt. Der Aufbau und die Zusammensetzung der Membran haben für die Verteilung einer Verbindungen dieselbe Bedeutung wie deren chemische Struktur (Zachowski und Durand 1988; Seydel et al. 1994).

Der Verteilungskoeffizient bei einem sehr geringen Lipidgehalt wurde als Membran-Verteilungskoeffizient der Neutralform, $\log P_m$, angesehen und entspricht dem Verteilungskoeffizienten $\log P$ in homogenen organischen Phasen (Avdeef et al. 1998). Neben dem klassischen Verteilungskoeffizienten $\log P_m$ existiert ein scheinbarer Verteilungskoeffizient $\log P_m^{\text{IP}}$ der Ionen. Er ist ein charakteristischer Verteilungskoeffizient für die geladene Form im pH-Bereich, in dem eine Verbindung nahezu vollständig geladen vorliegt. Beide Koeffizienten von einfachen Basen werden durch die Gl. 6 und 7 aus $\log P$ -Titrations mit unterschiedlichen Lipidkonzentration berechnet.

Ein Ionenpaar, bestehend aus einem geladenen Molekül und dem Gegenion aus der wässrigen Phase, sollte sich überwiegend an der Membranoberfläche im Kopfgruppenbereich anlagern (Avdeef et al. 1998). Eine Verteilung der Ionenpaare in die Region der Fettsäureketten ist erst ab einer bestimmten Größe an lipophilen Molekülbestandteilen zu erwarten (Fruttero et al. 1998). Der Extraktionskoeffizient $\log K_{\text{ex}}$ wird am liposomalen Verteilungssystem als Ionenpaar-Oberflächen-Verteilungskoeffizient der geladenen Form $\log K_{\text{SIP}}$ bezeichnet (*surface ion pair* = SIP) und berücksichtigt die Konzentration des Gegenions zur Bildung von Ionenpaaren. Der p_0K_{sch} -Wert wird am Membransystem zum $p_mK_{\text{a}}^{\text{LIM}}$ -Wert und kennzeichnet den Dissoziationsgrenzwert einer Verbindung in der Membran. Die Abb. 9 gibt vereinfacht die Verteilungsvorgänge an Membranen wieder.

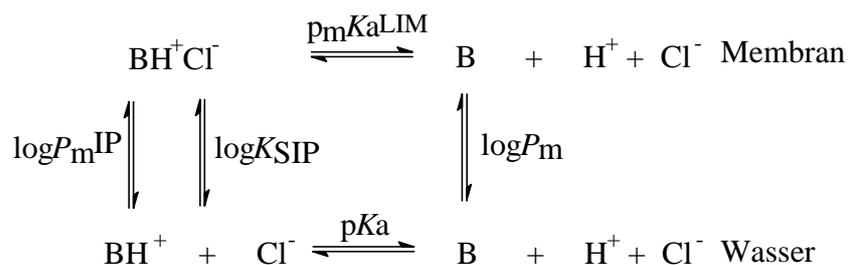


Abbildung 9: Übersicht zum Verteilungsverhalten an einer Phosphatidylcholin-Membran

3.2 Experimentelle Durchführung

3.2.1 Allgemeine Vorbereitungen zur potentiometrischen Titration

Bei den eingesetzten Elektroden wurden wöchentlich entsprechend der Standardisierungsmethode nach SIRIUS (*Sirius Analytical Instruments* 1994) der Aktivitätskoeffizient, dessen Abhängigkeit vom Elektrodenpotential und von der Protonenkonzentration sowie die Effekte der H^+ - und OH^- -Ionen am Diaphragma kalibriert. Weiterhin wurden die Faktoren der 0.5 M HCl-Lösung und der 0.5 M KOH-Lösung sowie der Gehalt an Kohlendioxid im ISA-Wasser (*ion strength adjusted* = ISA) bestimmt. Die Elektrodenparameter für Kosolvent/Wasser-Gemische entstammen dem Standarddatensatz von SIRIUS.

3.2.2 Die Bestimmung von Dissoziationskonstanten

Die Dissoziationskonstanten einer Verbindung wurden bei einer Temperatur von $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$ und bei einer Substanzkonzentrationen zwischen 0.08 und 0.15 mM bestimmt. Der niedrigere pKa-Wert der Verbindungen mit einem Piperazinring wurde dreimal in reinem ISA-Wasser mit einer KCl-Konzentration von 0.15 M ermittelt. Zur Bestimmung der übrigen Dissoziationskonstanten wurden Dioxan zwischen 15 wt-% und 40 wt-% oder Methanol zwischen 20wt-% und 50wt-% als zwei Kosolventien zur Verbesserung der Löslichkeit eingesetzt. Für die Extrapolation nach *Yasuda* und *Shedlovsky* waren mindestens drei unterschiedliche Konzentrationen an Kosolvent notwendig.

3.2.3 Liposomenherstellung

Für die Verteilungsmessungen in Phospholipiden wurden LUV-Liposomen (*large unilamellar vesicles* = LUV) eingesetzt. Gewogene Mengen von getrockneten Eilecithin ($M_{\text{mittel}} = 760 \text{ g/mol}$) wurden in Rundkolben in einem 1:1-Gemisch aus Methanol und Chloroform vollständig gelöst. Im Vakuum wurde das Lösungsmittel bei 40°C unter Drehen entfernt, so dass ein dünner Phospholipidfilm an der Kolbeninnenseite entstehen konnte. Die Kolben wurden für mindestens 12 h unter Vakuum lichtgeschützt und kühl gelagert. Anschließend stellte ich Stammlösungen mit einem Lipidgehalt von 100 mg/ml (131.6 mM) und 10 mg/ml (13.2 mM) her, indem ich ISA-Wasser zugab und die Kolben bis zum vollständigen Ablösen des Films von Hand bewegte. Es folgte eine Beschallung im Wasserbad bei 20°C für 10 min. Die Menge an Suspension, die ich für eine Einzeltitration benötigte, wurde erneut für 3 min (10 mg/ml Ansatz) oder 10 min (100 mg/ml Ansatz) unter Kühlung (Eiswasser) mit dem Gerät HD70TM und dem Rüssel UW70TM (BANDELIN) beschallt. Innerhalb von 24 h wurde diese Suspension verwendet.

3.2.4 Die Bestimmung von Verteilungskoeffizienten

Die Verteilungskoeffizienten in *n*-Octanol und PGDP bestimmte ich über separate Messungen bei $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$ mit entsprechende Mengen an Arzneistoff zwischen 0.12 bis 0.18 mM bei mindestens drei unterschiedlichen Volumenverhältnissen r_v . Ich verwendete 0.1 bis 1.0 ml organische Phase mit 20 ml ISA-Wasser (r_v zwischen 0.005 und 0.05). Alle Titrations begannen im basischen Milieu und pro Verbindung wurden die Titrationskurven als MultiSet ausgewertet. Für die $\log P$ - Titrations wurde ISA-wassergesättigtes *n*-Octanol und gefiltertes PGDP eingesetzt. Der Einsatz von *n*-Octanol bzw. PGDP gesättigtem ISA-Wasser war apparativ nicht möglich. Ein *solubility factor* der Standardsoftware berücksichtigte die Löslichkeiten der organischen Phasen in Wasser.

Die Arzneistoffproben wurden zur Ermittlung von $\log P_m$ -Werten mit definierten Mengen frisch hergestellter Liposomensuspension versetzt. Dieses Gemisch wurde mindestens 1 min von Hand durchgeschüttelt und automatisch mit ISA-Wasser auf 15 oder 20 ml aufgefüllt. Die Titrations starteten bei pH 10.2 nach einem einminütigem kräftigen Durchrühren des endgültigen Ansatzes. Die Messungen wurden in einem Konzentrationsbereich von Phospholipid zwischen 0.65 mg/ml bis 20 mg/ml (0.88 mM - 26.67 mM), mindestens zweimal bei einer Konzentration, durchgeführt. Das molare Mengenverhältnis Phospholipid : Arzneistoff lag mindestens zwischen 4 und 5 zu 1 (Avdeef et al. 1998). Aus dem Mittelwert des Verteilungskoeffizienten der Ionen $\log P_m^{\text{IP}}$ wurde durch Addition von 0.82 der Oberflächen-Ionenpaar-Koeffizienten $\log K_{\text{SIP}}$ errechnet.

Die scheinbaren Verteilungskoeffizienten der untersuchten Arzneistoffe bei pH 7.4 und 5.4 wurden unter Verwendung der korrespondierenden $\log P/\log P_{\text{ion}}$ -Paare der *n*-Octanol/Wasser- und PGDP/Wasser-Systeme berechnet. Im liposomalen Verteilungssystem wurden die entsprechenden $\log P_m/\log K_{\text{SIP}}$ -Paare herangezogen.

Prochlorperazin und Thiethylperazin lagen als Dimaleate vor. Für das Maleat-Ion wurden im pH-Bereich zwischen 2.5 und 10.5 ein pK_a -Wert von 5.78 ± 0.01 , ein $\log P$ in *n*-Octanol von -0.38 ± 0.10 und in PGDP von -0.21 ± 0.14 potentiometrisch gemessen, die den veröffentlichten Werten von $pK_a = 5.80$ und $\log P = -0.40$ (*n*-Octanol) entsprachen (Sirius Analytical Instruments 1994).

3.3 Systemvalidierungen

3.3.1 Kosolventeinflüsse auf die pK_a -Wert-Bestimmung

Eigene Untersuchungen zur negativen Verschiebung (*bias*) bei schwachen Basen in Methanol/Wasser- und Dioxan/Wasser-Gemischen wurden anhand des basischen pK_a -Wertes von Procain vorgenommen. In rein wässrigem Lösungsmittel fand ich einen pK_a -Wert von 9.00 ± 0.01 ($n = 3$), der mit dem Literaturwert identisch war (Pharmazeutische Stoffliste 1995). Die einzelnen Extrapolationen sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Wässriger pKa-Wert von Procain nach *Yasuda-Shedlovsky*-Extrapolationen

Kosolvent	wt-%-Bereich	pKa-Wert	r^2	n
Methanol	0 - 50	9.01 ± 0.03	0.99	10
Methanol	0 - 24	9.00 ± 0.04	0.95	5
Methanol	18 - 46	9.01 ± 0.04	0.99	6
Dioxan	0 - 45	8.95 ± 0.05	0.96	10
Dioxan	0 - 22	9.00 ± 0.03	0.95	6
Dioxan	14 - 37	8.94 ± 0.05	0.96	6

Alle pKa-Werte, die in Methanol/Wasser-Gemischen gemessen und auf ein Kosolvent freies Lösungsmittel extrapoliert wurden, waren identisch und somit von der Menge an Kosolvent im untersuchten Bereich unabhängig. Der lineare Zusammenhang der p_sKa-Werte nach *Yasuda-Shedlovsky* geht erst bei Methanol-Mengen über 50 wt-% verloren. In Dioxan/Wasser-Gemischen befand sich ein Knick in der Linearität zwischen 15 und 25 wt-%, da die Korrelationen mit p_sKa-Werten, die überwiegend ober- und unterhalb dieses Bereiches lagen, zu unterschiedlichen Ergebnissen führten. Die größte Abweichung existierte zwischen den extrapolierten pKa-Werten bei 0 bis 22 wt-% und 14 bis 37 wt-%. Obwohl aus statistischer Sicht keine Unterschiede bestanden, berücksichtigte ich bei der pKa-Wert-Extrapolation aus Dioxan/Wasser-Gemischen mit 15 bis 40 wt-% Dioxan einen *long distance factor* von + 0.06 in einem pH-Bereich von 7.5 bis 10, um den konkreten experimentellen Bedingungen Rechnung zu tragen.

3.3.2 Reinheitsprüfung von Propylenglycoldipelargonat

Da Propylenglycoldipelargonat mit einer UV-absorbierenden Substanz verunreinigt sein kann, wurde die eingesetzte Menge nach Vorschrift gereinigt (*Leahy et al.* 1989; *STAN* 1994) und die wässrigen Extrakte vor und nach der Reinigung auf pKa-Werte vermessen. Ein gefundener pKa-Wert von 6.10 ± 0.03 vor der Reinigung war mit dem pKa-Wert nach der Reinigung von 6.03 ± 0.02 nahezu identisch. Beide Werte waren dem pKa-Wert von Hydrogencarbonat (6.11) ähnlich. Eine Verunreinigung, die sich störend auf die pH-metrische Bestimmungen auswirkt, konnte nicht gefunden werden. Im pH-Bereich zwischen 3.2 und 10 blieb der Ester hydrolytisch stabil.

3.3.3 Stabilitätstest und Überprüfung der Liposomen als Verteilungssystem

Um Aussagen zur Herstellungsqualität, Zusammensetzung und Haltbarkeit der Liposomen zu treffen, wurde kurz nach der letzten Beschallung und nach 72 h Lagerung bei Raumtemperatur die Größenverteilung durch dynamische Lichtstreuung im ZetaMaster™ Meßgerät (MALVERN Instruments, UK) festgestellt. In beiden Fällen hatten 90% der Vesikel einen charakteristischen Durchmesser für unilamellare Liposomen (*large unilamellar vesicles* = LUV) von 60 bis 95 nm. Eine Teilchenverschmelzung konnte somit für die Dauer der Messungen ausgeschlossen werden.

Die Liposomen wurden weiterhin auf ihre chemische Stabilität und auf titrierbare Verunreinigungen getestet. Dazu wurden 15 ml LUV-Suspension benutzt, die 20 mg/ml Phosphatidylcholin enthielt. Eine Substanz mit einem pK_a -Wert von 8.94 ± 0.02 wurde im pH-Bereich zwischen 10.3 und 3.6 gefunden, die als Ethanolamin-Lipid interpretiert werden kann. Folgte man der Annahme eines Molekulargewichts von 750 g/mol für die Verunreinigung, so enthielt das eingesetzte Eilecithin 0.85% dieser Substanz. Bei einer Titration mit 20 mg/ml Lipidgehalt war also im 15 ml Ansatz 2.55 mg an nachweisbarer Verunreinigung vorhanden, die bei der endgültigen Auswertung berücksichtigt werden muss. Reduzierte man die Phosphatidylcholin-Menge auf 0.65 mg/ml und hielt man die angenommene Zahl (Durchschnitt) an gebundenen Protonen (Bjerrum Plot (*Avdeef* 1992)) konstant, konnte keine Verunreinigung mehr detektiert werden. Andere Reaktionen wie Esterhydrolyse oder Titration der Phosphatgruppe des Lipids wurden im untersuchten pH- Bereich nicht festgestellt (*Pauletti und Wunderli-Allenspach* 1994; *STAN* 1995 b). Der publizierte pK_a -Wert der Phosphatgruppe beträgt 2.12 und beeinflusst eine Titrationskurve erst unterhalb von pH 4.0 (*Pauletti und Wunderli-Allenspach* 1994).

Das Verteilungsverhalten von basischen Substanzen an oder in Liposomenmembranen kann am besten untersucht werden, wenn die Titrations bei einem hohem pH-Wert beginnen, damit sich die neutralen Moleküle in oder an der Membran anreichern. Wird anschließend zu einem niedrigen pH titriert, können ca. 80% der eingesetzten Substanzmenge erfaßt werden (*Sirius Analytical Instruments* 1996). Ursache dafür ist das schnelle Penetrationsvermögen der zugegebenen Protonen in und durch die Membran zu den eingelagerten Substanzmolekülen. Der pH-Gradient zwischen Außen- und Innenseite einer Membran gleicht sich innerhalb von 5 min aus (*Pauletti und Wunderli-Allenspach* 1994). Bei den verwendeten Liposomen handelt es sich überwiegend um unilamellare Vesikel, bei denen eine verzögerte Einstellung des pH-Wertes im Innenraum nicht auftreten sollte.

Ich überprüfte den eigenen Herstellungsweg der Liposomen anhand von Membran-Verteilungskoeffizienten der Arzneistoffe Diclofenac und Propranolol, da SIRIUS ein FAT-LUVET-Verfahren (*freeze and thaw - large unilamellar vesicles extrusion technique* = FAT-LUVET) empfohlen hatte (*STAN* 1995 d). Im Falle der Liposomen aus Eilecithin erhielt ich für Diclofenac einen $\log P_m$ -Wert von 4.16 ± 0.10 und einen $\log P_m^{IP}$ -Wert von 2.51 ± 0.15 . Die Diclofenac-Referenzwerte mit Liposomen aus Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC) betragen $\log P_m = 4.45 \pm 0.02$ sowie $\log P_m^{IP} = 2.64 \pm 0.04$ (*Avdeef et al.* 1998). Für Propranolol ergab sich an den eigenen Eilecithin-Liposomen ein $\log P_m$ -Wert von 3.68 ± 0.10 und ein $\log P_m^{IP}$ -Wert von 2.42 ± 0.32 . Es existieren zwei Paare von Propranolol-Referenzen in Abhängigkeit vom verwendeten Phosphatidylcholin und von den Messbedingungen (*Avdeef et al.* 1998):

$$\begin{array}{ll} \text{mit DOPC} & \log P_m = 3.45 \pm 0.01 \quad \log P_m^{IP} = 2.61 \pm 0.02; \\ \text{mit Eilecithin} & \log P_m = 3.51 \quad \log P_m^{IP} = 2.56. \end{array}$$

Die Verteilungskoeffizienten an den eigenen Eilecithin-Liposomen stimmten mit den Referenzen unter Berücksichtigung einer Standardabweichung von ± 0.1 überein, wobei die variierende Zusammensetzung der Membranlipide zu berücksichtigen war. Insgesamt war eine reproduzierbare Bestimmung von $\log P_m$ - und $\log P_m^{IP}$ -Werten unabhängig von der Methode der Liposomenpräparation gegeben.

3.4 Ergebnisse und Diskussion

3.4.1 Übersicht zu statistischen Parametern

Das Verfahren der nichtlinearen Regression wurde zur Auswertung der potentiometrischen Messungen benutzt. Die Richtung der Werteanpassung bestimmt eine gewichtete Fehlerabschätzung (*goodness of fit* = GOF), deren Betrag ein Maß der Abweichung zwischen der theoretischen und der experimentellen Titrationskurve darstellt. Im Fall von 1.00 liegt die durchschnittliche Abweichung genau im Limit der geschätzten Ungenauigkeiten des Messverfahrens.

Zusammenhänge, die durch einfache lineare Regressionen sowie durch andere statistische Verfahren analysiert werden, lassen sich anhand verschiedener statistischer Größen charakterisieren.

Dabei ist:

- n Zahl der eingehenden Verbindungen;
- s Standardabweichung der Schätzwerte;
- r^2 Bestimmtheitsmaß, die erklärte Varianz;
- F Maß für die Signifikanz einer Gleichung nach *Fischer* (Verhältnis erklärter zu nicht erklärter Varianz).

3.4.2 Die Dissoziationskonstanten der Arzneistoffe

In Tab. 2 sind die potentiometrisch bestimmten pK_a -Werte den bisher veröffentlichten pK_a -Werten gegenübergestellt. Im wesentlichen stimmen die eigenen und die bisher ermittelten Werte überein, wenn man einen Fehlerbereich von 0.1 bei den eigenen Werten und von 0.1 pH-Einheiten bei den Literaturwerten zulässt. Da die Referenzwerte in verschiedenen Arbeiten veröffentlicht wurden, können die einzelnen experimentellen Bedingungen wie Ionenstärke und Temperatur untereinander und zu meiner Studie abweichen, was die Schwankungen in den pK_a -Werten erklären.

Die pK_a -Bestimmungen in reinem ISA-Wasser sind praktisch frei von Abweichungen (± 0.01). Ein *long distance factor* von + 0.06 wurde bei den aus Dioxan/Wasser extrapolierten pK_a -Werten addiert (Abschnitt 3.3.1). Wenn man diese Dioxan/Wasser-Dissoziationskonstanten mit denen aus Methanol/Wasser vergleicht, so überlappen sich die Fehlerbereiche in fast allen Fällen, wobei der durchschnittliche Unterschied bei 0.09 pH-Einheiten liegt ($n = 20$). Die Dissoziationskonstanten, die unter den zwei verschiedenen experimentellen Bedingungen ermittelt wurden, sind aus statistischer Sicht identisch. Davon ausgenommen sind Promethazin, Promazin und Gallopamil sowie die höheren pK_a -Werte von Prochlorperazin, Trifluoperazin, cis- und trans-Flupenthixol. Bei einem Vergleich der Wertepaare durch lineare Regression weichen Anstieg und Abstandparameter der Regressionsgeraden nicht signifikant von ihren Idealwerten ab:

$$pK_a (\text{Methanol}) = 0.16 (\pm 0.12) + 0.98 (\pm 0.02) pK_a (\text{Dioxan}).$$

$$n = 20 \quad s = 0.166 \quad r^2 = 0.995 \quad F = 3615$$

Die gemessenen pK_a -Werte von cis-Flupenthixol aus Methanol/Wasser hatten einen deutlich höheren Betrag als zu erwarten wäre und wurden als Ausreißer nicht in die Regression einbezogen.

Die von SIRIUS standardisierten Elektrodenparameter für Titrationsen in beiden Kosolvent/Wasser-Systemen führten zu vergleichbaren und zuverlässigen Ergebnissen im untersuchten pH-Bereich.

Tabelle 2: Dissoziationskonstanten der Arzneistoffe

Nr.	Verbindung	pKa-Werte		pKa-Werte Literatur
		mit Dioxan ^a	mit Methanol ^b	
1	Promethazin	8.92 ± 0.01 (6)	9.07 ± 0.08 (10)	9.10 ¹ , 9.11 ²
2	Promazin	9.08 ± 0.03 (5)	8.92 ± 0.09 (5)	9.28 ² , 9.40 ³
3	Chlorpromazin	9.17 ± 0.11 (7)	9.22 ± 0.13 (11)	9.30 ² , 9.30 ³
4	Chlorprothixen	8.84 ± 0.02 (5)	8.80 ± 0.03 (5)	8.80 ⁴
5	Triflupromazin	9.01 ± 0.06 (7)	9.07 ± 0.19 (7)	9.20 ¹ , 9.20 ³
6	Levomepromazin	9.16 ± 0.06 (7)	9.07 ± 0.16 (6)	9.19 ²
7	Thioridazin	9.25 ± 0.06 (4)	9.25 ± 0.07 (10)	9.50 ¹
8	Prochlorperazin	3.84 ± 0.15 (11)	3.73 ± 0.04 (5)	3.73 ⁵ , 3.78 ¹
		8.19 ± 0.13 (11)	7.96 ± 0.09 (5)	8.10 ⁵
9	Trifluoperazin	3.70 ± 0.11 (6)	3.95 ± 0.35 (6)	3.60 ⁶ , 3.90 ⁷
		8.17 ± 0.06 (6)	8.38 ± 0.13 (5)	8.10 ⁶ , 8.10 ⁷
10	Thiethylperazin	3.65 ± 0.02 (4)	3.81 ± 0.27 (4)	-
		8.06 ± 0.09 (4)	8.06 ± 0.06 (4)	8.12 ²
11	Perphenazin	3.97 ± 0.09 (5)	3.98 ± 0.05 (4)	3.70 ⁵
		7.96 ± 0.09 (6)	7.82 ± 0.06 (4)	7.80 ⁵
12	Fluphenazin	3.72 ± 0.11 (10)	3.70 ± 0.31 (6)	3.90 ⁵
		7.88 ± 0.15 (9)	7.90 ± 0.12 (8)	7.90 ⁸ , 8.10 ¹
13	cis-Flupenthixol	-	4.64 ± 0.09 (3)	-
		7.81 ± 0.04 (5)	8.16 ± 0.13 (5)	7.80 ¹ , 7.80 ⁸
14	trans-Flupenthixol	3.40 ± 0.08 (4)	3.44 ± 0.19 (3)	-
		7.74 ± 0.09 (7)	7.89 ± 0.09 (4)	7.80 ¹ , 7.80 ⁸
15	Verapamil	8.74 ± 0.09 (8)	-	8.60 ⁹ , 8.66 ¹⁰ 8.92 ¹
16	Gallopamil	8.63 ± 0.06 (10)	8.42 ± 0.01 (3)	-
17	Fendilin	9.10 ± 0.03 (8)	-	-
18	Amlodipin	9.37 ± 0.10 (9)	-	9.02 ¹¹
19	Nicardipin	7.34 ± 0.10 (7)	-	7.20 ¹² , 7.33 ¹³

^a mit Kosolvent Dioxan und *Yasuda-Shedlovsky*-Extrapolation, einschließlich *long distance*- Korrekturfaktor (+0.06). ^b mit Kosolvent Methanol und *Yasuda-Shedlovsky*-Extrapolation. ^c in rein wässriger ISA-Lösung. Zahl der Einzelmessungen in Klammern angegeben. pKa-Werte zur log*P*-Bestimmung sind unterlegt. Quellen der Literaturwerte im Literaturverzeichnis, Abschnitt 9.1.

Die Treffsicherheit der *Yasuda-Shedlovsky*-Extrapolationen hängt von der Anzahl der eingehenden Einzelerperimente, der Art und der Menge an Kosolvent und von der Qualität der Elektrodenparametrisierung bei dem eingesetzten Kosolvent/Wasser Gemisch ab. Grundsätzlich sollte so wenig Kosolvent wie nötig eingesetzt werden. Zwar wäre eine eigene Elektrodenkalibrierung mit verschiedenen Kosolvent/Wasser-Gemischen ratsam, der Aufwand steht jedoch in keinem Verhältnis zu der zum Teil sehr kurzen Nutzungszeit einer Elektrode

Zur anschließenden Berechnung der Verteilungskoeffizienten wurden die in reinem ISA-Wasser oder die aus Dioxan/Wasser-Gemischen bestimmten Dissoziationskonstanten herangezogen. Diesen extrapolierten Werten gebe ich aus folgenden Gründen den Vorzug:

- Der Gehalt wt-% an Dioxan konnte im Gemisch niedriger als Methanol gehalten werden, um die geforderte Mindestlöslichkeit zu erreichen.
- Im Vergleich zu Methanol fällt die Steigung der Extrapolationsgeraden geringer aus. Mathematisch verringert sich dadurch der Summe der Fehler bei der Extrapolation (Abb. 10).

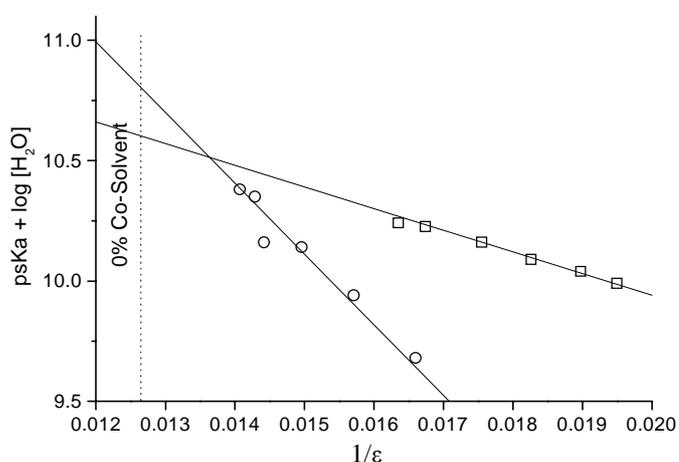


Abbildung 10: *Yasuda-Shedlovsky*-Extrapolationen am Beispiel vom Promethazin
 aus Dioxan/Wasser (□): $p_s K_a + \log[H_2O] = 11.745 + 89.6/\epsilon$; $pK_a = 8.86 \pm 0.01$
 aus Methanol/Wasser (○): $p_s K_a + \log[H_2O] = 14.528 + 291.9/\epsilon$; $pK_a = 9.07 \pm 0.08$

Trotz weiterer Extrapolation fallen die Standardabweichungen der pK_a -Werte aus Dioxan/Wasser-Gemischen (± 0.08) durchschnittlich geringer als aus Methanol/ Wasser-Gemischen (± 0.12) aus.

3.4.3 Die Verteilungskoeffizienten der Arzneistoffe in homogenen organischen Phasen

3.4.3.1 Betrachtungen zu den verschiedenen Auswertemethoden

Zwölf untersuchte Arzneistoffe besitzen ein basisches Zentrum. Sie können entweder in der Neutralform oder als einfach positiv geladenes Kation in den Verteilungssystemen vorliegen. Bei den sieben Verbindungen, die einen Piperazinring in ihrer Struktur enthalten, existieren eine Neutralform sowie jeweils eine einfach und zweifach protonierte Spezies. Somit können ein $\log P$ -Wert und ein oder zwei Ionen-Verteilungskoeffizienten, $\log P_{\text{ion}}$ und $\log P_{\text{dion}}$, ermittelt werden, wenn sich die entsprechenden Molekülformen in die organische Phase verteilen.

Zur Auswertung einer potentiometrischen Titration gibt es verschiedene rechnerische Wege, um zu den endgültigen $\log P$ -, $\log P_{\text{ion}}$ - und $\log P_{\text{dion}}$ -Werten zu gelangen (*Sirius Analytical Instruments* 1994; *Krämer et al.* 1998). Ein Problem stellt die direkte Bestimmung der Verteilungskoeffizienten der jeweils maximal protonierten Ionenform dar. SIRIUS hat in seinem Auswerteprogramm folgenden Weg bei einer Ionen-Verteilung empfohlen (*Sirius Analytical Instruments* 1994):

- Einfügen von $\log P_{\text{ion}} / \log P_{\text{dion}}$ in das Verteilungsgleichungssystem mit einem Fixwert (üblicherweise $\log P_{\text{ion}} = \log P - 3$);
- Neuberechnung des $\log P$ -Wertes;
- im MultiSet gleichzeitige Berechnung von $\log P$ und $\log P_{\text{ion}} / \log P_{\text{dion}}$.

Dieses Verfahren konnte ich nicht eindeutig nachvollziehen. In Abhängigkeit vom $\log P_{\text{ion}} / \log P_{\text{dion}}$ -Korrekturwert erhielt ich verschiedene Endergebnisse für alle Verteilungskoeffizienten. Eine externe Bestimmung der Verteilungskoeffizienten der Formen der einfach protonierbaren Verbindungen über die Gl. 6 und 7 scheint mir eine bessere Methode, weil

- ein fiktiver Korrekturwert nicht eingefügt werden muss;
- die $\log P_{\text{ion}}$ -Werte direkt aus den messbaren pKa - und p_0Ka -Werten zweier Titrationen mit unterschiedlichen Volumenverhältnissen r_{V1} und r_{V2} zugänglich sind;
- mögliche Ausreißer bei den Einzelbestimmungen sofort sichtbar werden, indem sich die betreffenden Gleichungen nicht lösen lassen (Logarithmus von negativen Beträgen);
- sich aus der Standardabweichung von mindestens drei Einzelkoeffizienten ein realistischerer Fehlerbereich ergibt.

Nachdem für jede Kombinationsmöglichkeit $\log P$ und $\log P_{\text{ion}}$ berechnet wurden, können fehlerbehaftete Messungen ausgeschlossen werden (keine Ergebnisse für $\log P$ und/oder $\log P_{\text{ion}}$). Die Mittelwerte aus den übrigen Experimenten bilden die endgültigen Werte für die beiden Verteilungskoeffizienten ($\log P$ Origin; $\log P_{\text{ion}}$ Origin) der einfach protonierbaren Basen mit Angabe ihrer Standardabweichungen.

Die SIRIUS-Auswertemethode berücksichtigt bei der Anpassung der experimentellen an die theoretische Titrationskurve einer Messung besonders die Punkte im Bereich von großen Änderungen des $\bar{n}H$ -Wertes (Zahl der durchschnittlich gebundenen Wasserstoffatome pro Molekül) gegenüber dem pH-Wert der Lösung. Werden Titrationen in verschiedenen *n*-Octanol/ Wasser-Gemischen im MultiSet zusammengefasst, um zu den ionenpaarkorrigierten $\log P$ - und den $\log P_{\text{ion}}$ -Werten zu gelangen, besitzen alle Messpunkte Einfluss auf das Endergebnis. Obwohl somit der Einfluss von Abweichungen einzelner Kurvenpunkte minimiert wird, bleibt der Unsicherheitsfaktor der anfänglich

fiktiven $\log P_{\text{ion}}$ -Werte, da ein funktioneller Zusammenhang zwischen dem $\log P$ - und dem $\log P_{\text{ion}}$ -Wert bei der Auswertung einer Einzeltitration existiert.

Für die $\log P/\log P_{\text{ion}}$ -Auswertung nach den Gl. 6 und 7 werden nur die p_0K_a -Werte verwendet, die aus der nicht ionenkorrigierten $\text{pH}/\bar{n}H$ -Kurve bei einem $\bar{n}H$ -Wert = 0.5 entnommen werden (Abb. 11). Ein p_0K_a -Wert stellt den Wendepunkt der Kurve dar. Er besitzt die wenigsten Ungenauigkeiten bezogen auf die übrigen Messpunkte. Wenn aber ein Experiment insgesamt fehlerhaft ist, bedeutet die Übertragung eines Einzelpunktes in die Gl. 6 und 7 eine Fehlerfortpflanzung. Deshalb wurden mindestens fünf Titrationsen mit verschiedenen r_v -Werten pro einfach protonierbarer Verbindung durchgeführt.

Aus den beiden Berechnungsmöglichkeiten ergeben sich Verteilungskoeffizienten der einfach protonierbaren Verbindungen entweder nach SIRIUS ($\log P$ SIRIUS und $\log P_{\text{ion}}$ SIRIUS) oder direkt über die Gl. 6 und 7 mit Hilfe des Programmes ORIGIN berechnet ($\log P$ Origin und $\log P_{\text{ion}}$ Origin). Die Verteilungskoeffizienten der zweifachen Basen wurden mit dem SIRIUS-Programm einmal ohne und einmal unter Berücksichtigung der Verteilung der doppelt protonierten Form bestimmt. Der zweite pK_a -Wert ermöglicht für diese Verbindungen eine direkte Auswertung des Verteilungskoeffizienten der einfach protonierten Form. Zusätzlich berechnete ich die Verteilungskoeffizienten der Neutralform und der einfach geladenen Form nach Gl. 6, wobei die entsprechenden pK_a -Werte eingesetzt wurden.

3.4.3.2 Das n -Octanol/Wasser-Verteilungssystem

3.4.3.2.1 Die Verteilungskoeffizienten der Neutralformen

Im Anschluss an die Untersuchungen zu den Dissoziationskonstanten begann ich, die Verteilungskoeffizienten in n -Octanol zu bestimmen. Aufgrund der hohen Verteilung der Arzneistoffe in die organische Phase wurden nur 0.1 bis 1.0 ml n -Octanol zugesetzt. Eine ausreichende Löslichkeit der Substanzen, sowohl in der organischen Phase als auch im ISA-Wasser, wird erreicht, indem von hohen zu niedrigen pH -Werten titriert wurde. Die Tab. 3 zeigt eine Übersicht der berechneten $\log P$ -Werte mit den jeweiligen Streubereichen, dem Qualitätsparameter GOF und Literaturdaten.

Alle $\log P$ -Ergebnisse liegen in der Größenordnung der bisher veröffentlichten Verteilungskoeffizienten, die meistens über einen halben $\log P$ -Bereich streuen. Die SIRIUS-Standardmethode geht bei Berechnung der Verteilungskoeffizienten von einer fehlerfreien pK_a -Messung aus, was unrealistisch ist. Deshalb wurden alle $\log P$ -Werte zusätzlich unter Annahme einer Standardabweichung des pK_a -Wertes der Tab. 2 berechnet (limit min/max), um eine vertrauenswürdige Abschätzung des Fehlers zu erzielen. Es zeigte sich, dass sich der pK_a -Streubereich direkt auf die Größe der $\log P$ -Fehlergrenzen auswirkt. Die Genauigkeit der Verteilungskoeffizienten kann also nie besser als der Streubereich des dazugehörigen pK_a -Wertes sein. Die $\log P$ -Minimal- und Maximalwerte haben nicht immer eine gleiche Differenz zum $\log P$ -Wert (SIRIUS). Mögliche Ursachen können die Anzahl und die Beträge der pK_a -Werte, der Einfluss der Ionenpaarverteilung oder Linear-Logarithmus-Transformationen sein.

Tabelle 3: Verteilungskoeffizienten $\log P$ in *n*-Octanol/Wasser

Nr.	Verbindung	$\log P$ SIRIUS ^a	limit ^b min	limit ^b max	GOF	$\log P$ Origin ^c	$\log P$ -Werte Literatur
1	Promethazin	4.70 (3)	4.66	4.74	0.77	4.67 ± 0.03 (3)	4.30 ¹⁴ , 4.75 ² , 4.81 ¹
2	Promazin	4.70 (4)	4.67	4.73	1.72	4.44 ± 0.20 (5)	4.40 ¹⁴ , 4.55 ¹ , 4.64 ²
3	Chlorpromazin	5.27 (5)	5.17	5.38	0.92	5.22 ± 0.14 (4)	5.00 ¹⁵ , 5.16 ¹⁴ , 5.35 ¹
4	Chlorprothixen	5.49 (4)	5.47	5.52	0.72	5.60 ± 0.11 (5)	5.18 ¹
5	Triflupromazin	5.18 (4)	5.12	5.24	0.89	5.22 ± 0.05 (5)	4.95 ¹⁶ , 5.03 ¹ , 5.19 ² 5.30 ¹⁴ , 5.93 ¹⁷
6	Levomepromazin	4.90 (6)	4.81	5.02	0.85	4.81 ± 0.05 (6)	4.40 ¹⁴ , 4.86 ²
7	Thioridazin	5.42 (7)	5.38	5.48	1.04	5.38 ± 0.20 (8)	5.80 ¹⁴ , 5.90 ¹¹ , 5.90 ⁸
8	Prochlorperazin	4.78 (3)	4.66	4.90	0.69	4.59 ± 0.15 (3)	3.00 ¹⁸ , 4.60 ¹ , 4.89 ⁸
9	Trifluoperazin	5.23 (4)	5.16	5.30	1.02	4.99 ± 0.09 (5)	4.90 ¹⁴ , 5.03 ¹ , 5.07 ²
10	Thiethylperazin	4.87 (3)	4.78	4.96	0.63	4.98 ± 0.03 (3)	4.60 ¹⁴ , 5.18 ⁷ , 5.41 ¹
11	Perphenazin	4.27 (3)	4.16	4.37	1.29	4.06 ± 0.13 (4)	3.70 ¹⁸ , 4.19 ¹⁶ , 4.20 ¹
12	Fluphenazin	4.62 (4)	4.48	4.77	1.45	4.36 ± 0.05 (6)	4.36 ¹ , 4.50 ¹⁴ , 4.85 ⁸
13	cis-Flupenthixol	5.00 (3)	4.96	5.05	0.89	4.83 ± 0.20 (3)	4.51 ¹ , 4.92 ⁸
14	trans-Flupenthixol	5.20 (3)	5.11	5.28	0.51	4.83 ± 0.01 (3)	4.51 ¹ , 4.81 ⁸
15	Verapamil	3.84 (6)	3.77	3.93	0.99	3.78 ± 0.12 (7)	3.79 ¹ , 3.96 ¹⁰ , 4.80 ¹⁹
16	Gallopamil	3.76 (5)	3.70	3.82	0.67	3.92 ± 0.12 (8)	-
17	Fendilin	4.98 (4)	4.93	5.01	0.94	4.87 ± 0.12 (15)	-
18	Amlodipin	3.31 (7)	3.24	3.41	1.06	3.35 ± 0.08 (10)	3.15 ²⁰ , 3.30 ¹
19	Nicardipin	4.75 (6)	4.63	4.84	0.58	4.67 ± 0.16 (5)	4.96 ¹

^a mit SIRIUS pKaLOGP-Programm berechnet (incl. Ionenpaarkorrektur), Zahl der Einzelmessungen ist in Klammern angegeben. ^b Bereich des Verteilungskoeffizienten unter Berücksichtigung der dazugehörigen pKa-Standardabweichung. ^c mit Origin als Mittelwert der Einzelergebnisse (Zahl in den Klammern angegeben) nach Gleichung 6 berechnet. Quellen der Literaturwerte im Literaturverzeichnis, Abschnitt 9.1.

Abweichungen zwischen den Literaturdaten und meinen Ergebnissen bestehen bei einzelnen Daten von Triflupromazin, Prochlorperazin, Thiethylperazin, Verapamil und Nicardipin, die auf andere Messbedingungen zurückzuführen sind, sowie bei Thioridazin. Die Ursache des Unterschieds zwischen dem gemessenen $\log P$ -Wert von 5.42 und den ähnlichen $\log P$ -Werten um 5.9 ist nicht vollständig klar. Einerseits kann es mit der niedrigeren Dissoziationskonstante dieser Studie zusammenhängen, andererseits ist die Bestimmung von solch hohen Verteilungskoeffizienten mit der *shake flask*-Methode schwierig, was durch die Streubereiche von bisher veröffentlichten Verteilungs-

koeffizienten deutlich wird. Eine weitere Erklärung liefert die höhere Löslichkeit bzw. Einarbeitung von *n*-Octanol in Wasser bei sehr schnellem Rühren, die über einen verbesserten Übergang von sehr lipophilen Substanzen ($\log P > 5$) in die wässrige Phase zu scheinbar niedrigeren Verteilungskoeffizienten führt (Leo 1999). Da Thioridazin offensichtlich eine der lipophilsten Substanzen der Messreihe ist, können sich bei dieser Verbindung die Rühreffekte am stärksten auswirken.

Mindestens ein $\log P$ -Referenzwert lag immer im Streubereich der eigenen Messungen. Folglich war eine gesicherte Bestimmung der Verteilungskoeffizienten mit Hilfe der potentiometrischen Zweischritt-Titration auch von schlecht wasserlöslichen Substanzen möglich.

Die jeweiligen $\log P$ -Ergebnisse nach Gl. 6 (Origin) wurden auf experimentelle Ausreißer getestet und anschließend gemittelt. Die resultierenden Standardabweichungen der $\log P$ -Koeffizienten (Origin) der einfachen Basen sind überwiegend größer als aus dem MultiSet-Verfahren und schließen die pK_a -Fehler nicht mit ein. Die Verteilungskoeffizienten der einfach protonierbaren Verbindungen aus beiden Auswerteverfahren sind fast identisch mit einer durchschnittlichen Abweichung von 0.01 ± 0.09 ($n = 11$), wenn Promazin unberücksichtigt bleibt. Die $\log P$ -Werte von Promazin unterscheiden sich um 0.36. Obwohl man durch die Überlappung der Standardabweichungen statistisch gesehen von einem identischen Wert sprechen kann, ist die Ursache dieser Differenz offen. Bei den $\log P$ -Werten der doppelt protonierbaren Arzneistoffe sind die $\log P$ Origin-Ergebnisse durchschnittlich um 0.24 ± 0.07 ($n = 6$) kleiner als die der SIRIUS-Methode. Einzige Ausnahme ist Thiethylperazin (+ 0.11). Möglicherweise unterliegt der abgelesene größere p_0K_a -Wert dem Einfluss des zweiten pK_a -Wertes, obwohl ein Unterschied von ca. 4 pH-Einheiten besteht. Gl. 6 beinhaltet zum Beispiel nicht mehrere pK_a -Werte.

Die Ergebnisse können folgendermaßen zusammengefasst werden:

Zur Errechnung des Verteilungskoeffizienten $\log P$ einfach protonierbarer Verbindungen nach Gl. 6 sind die p_0K_a -Werte besser geeignet, bei denen die Einzelmessungen im r_V -Wert um 0.01 differieren. Beide Berechnungswege sind für die $\log P$ -Ergebnisse von einfachen Basen gleichwertig; aber der SIRIUS-Methode ist bei den zweifach protonierbaren Verbindungen der Vorzug zu geben. Der durchschnittliche Fehlerbereich bei der potentiometrischen Bestimmung von *n*-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten liegt für die sehr lipophilen Verbindungen bei $\log P \pm 0.1$ und ist damit deutlich geringer als der allgemein akzeptierte Fehler von ± 0.3 bei $\log P$ -Messungen mit dem *shake flask*-Verfahren.

3.4.3.2.2 Die Verteilungskoeffizienten der geladenen Molekülformen

Ein bisher oft vernachlässigter Punkt bei der Diskussion von Lipophilie und Verteilungsverhalten von Substanzen sind die Verteilungskoeffizienten von Ionen und Ionenpaaren und der Einfluß des pH-Wertes. In Abhängigkeit vom Charakter und der Größe der lipophilen Regionen eines Moleküls können auch geladene Verbindungen in homogene organische Phasen übergehen. Dieses Verhalten wird unterstützt, wenn die Ladung durch entsprechende Gegenionen kompensiert werden kann (Murthy und Zogafi 1970).

Tabelle 4: Verteilungskoeffizienten $\log P_{\text{ion}}$ und $\log D$ in *n*-Octanol/Wasser

Nr.	Verbindung	$\log P_{\text{ion}}$ SIRIUS ^a	$\log P_{\text{ion}}$ Origin ^b	$\log P_{\text{ion}}$ Origin ^c	$\log D_{7.4}$ ^d SIRIUS Origin	$\log D_{7.4}$ Literatur
1	Promethazin	1.54 ± 0.07 (3)	1.47 ± 0.05 (3)		3.09 3.05	2.79 ¹⁴ , 2.88 ²¹
2	Promazin	2.18 ± 0.06 (4)	1.69 ± 0.40 (5)		2.99 2.70	2.50 ¹⁴ , 2.55 ²¹
3	Chlorpromazin	1.79 ± 0.09 (5)	1.68 ± 0.31 (4)		3.41 3.36	3.26 ³ , 3.36 ⁸ 3.39 ¹⁸
4	Chlorprothixen	2.06 ± 0.10 (4)	2.19 ± 0.14 (5)		3.95 4.06	-
5	Triflupromazin	1.68 ± 0.09 (4)	1.80 ± 0.16 (5)		3.47 3.51	3.39 ³ , 3.70 ¹⁴
6	Levomepromazin	1.44 ± 0.18 (6)	1.32 ± 0.16 (6)		3.05 2.96	2.62 ¹⁴
7	Thioridazin	2.17 ± 0.06 (7)	1.97 ± 0.33 (8)		3.49 3.44	3.51 ¹⁴ , 3.90 ⁸
8	Prochlorperazin	1.52 ± 0.07 (3)	1.41 ± 0.00 (1)	1.73 ± 0.66	3.84	4.19 ⁸
9	Trifluoperazin	2.32 ± 0.03 (4) [2.04 ^e]	2.02 ± 0.17 (5)	2.19 ± 0.25	4.31	4.01 ¹⁶ , 4.36 ⁸ 4.36 ¹⁴
10	Thiethylperazin	1.81 ± 0.04 (3)	2.01 ± 0.04 (3)	2.18 ± 0.10	4.05	3.82 ¹⁴
11	Perphenazin	1.45 ± 0.06 (3)	1.73 ± 0.34 (2)	1.70 ± 0.18	3.53	3.65 ¹⁴
12	Fluphenazin	1.83 ± 0.04 (4)	1.46 ± 0.20 (5)	1.47 ± 0.18	3.94	4.05 ¹⁴ , 4.31 ⁸
13	cis-Flupenthixol	2.45 ± 0.05 (3)	2.19 ± 0.34 (3)	2.10 ± 0.34	4.37	4.44 ⁸
14	trans-Flupenthixol	2.76 ± 0.04 (3)	2.34 ± 0.01 (3)	2.53 ± 0.08	4.63	4.33 ⁸
15	Verapamil	1.34 ± 0.06 (6) [0.96 ^f]	1.37 ± 0.16 (7) [0.96 ^f]		2.42 2.37	1.83 ²² , 1.91 ²³ 2.70 ¹⁰
16	Gallopamil	1.25 ± 0.12 (5)	1.38 ± 0.24 (8)		2.44 2.56	-
17	Fendilin	2.18 ± 0.13 (4)	1.92 ± 0.18 (15)		3.22 3.10	-
18	Amlodipin	1.24 ± 0.06 (7)	1.30 ± 0.18 (10)		1.54 1.59	1.11 ²⁰ , 1.46 ¹¹ 1.83 ²⁴
19	Nicardipin	1.37 ± 0.19 (6)	1.52 ± 0.24 (5)		4.42 4.27	3.72 ²⁴ 3.82 ²⁵ (pH 6.8)

^a nach der SIRIUS-Standardmethode, Zahl der Einzelmessungen ist in Klammern angegeben. ^b Eigenberechnung nach Gleichung 7 (Verfahren für einfach protonierte Basen), Zahl der Einzelwerte in Klammern angegeben.

^c Eigenberechnung nach Gleichung 6 (Verfahren für die Neutralform). ^d berechnet mit pKaLOGP-Programm (korrespondierende Wertepaare). ^e Clarke und Cahoon 1987. ^f Winiwarter et al. 1998.

Quellen der Literaturwerte im Literaturverzeichnis, Abschnitt 9.1.

Die Verteilungskoeffizienten der Ionen, die scheinbaren Verteilungskoeffizienten bei physiologischen Bedingungen und bisher veröffentlichte Werte bei pH 7.4 sind in der Tab. 4 zusammengefasst. Die $\log P_{\text{ion}}$ -Werte sind ohne Korrektur durch die pK_a -Streubereiche angegeben.

Die Verteilungskoeffizienten der geladenen Moleküle in *n*-Octanol/Wasser werden ähnlicher. Der Einfluss der Ladung auf das Verteilungsverhalten drängt die Lipophilie der Strukturen mehr in den Hintergrund. Die Ionen der Thioxanthene haben jedoch einen größeren $\log P_{\text{ion}}$ -Wert aufgrund der weniger polaren Grundstruktur als die verwandten Phenothiazine. Die über die Mittelwerte berechneten Ionen-Verteilungskoeffizienten ($\log P_{\text{ion}}$ Origin) haben eine größere Standardabweichung als die SIRIUS-Werte. Die $\log P_{\text{ion}}$ -Werte (Origin) halte ich aber für realistischer, weil die zugänglichen Koeffizienten nach Gl. 7 mit der nachvollziehbaren Berechnungsmethode für die einfach protonierbaren Arzneistoffe direkt bestimmbar sind. Bedingt durch die Streuung bei der $\log P$ -Bestimmung findet man die deutlichste Abweichung zu den SIRIUS-Werten bei Promazin. Weiterhin wurden die $\log P_{\text{ion}}$ -Werte der Piperazin-Ring enthaltenden Verbindungen nach Gl. 7 ausgerechnet (Tab. 4, Index b), oder die $\log P_{\text{ion}}$ -Werte wurden getrennt als $\log P$, bezogen auf den kleineren pK_a -Wert, bestimmt (Tab. 4, Index c). Diese Koeffizienten stimmen aber nur teilweise mit den SIRIUS-Werten überein und zeigen keine systematischen Abweichungen. Entweder wurde ein falscher mathematischer Zusammenhang benutzt oder es überlagern sich die Effekte von beiden Dissoziationskonstanten.

Zur Bestimmung der Ionen-Verteilungskoeffizienten ist eine Berechnung nach Gl. 7 bei einfach protonierbaren Verbindungen von Vorteil. Dazu sollten sich die Volumenverhältnisse r_V der Einzelexperimente bei solch lipophilen Verbindungen um mindestens 0.02 unterscheiden. Die Ionen-Verteilungskoeffizienten von einfachen Basen in *n*-Octanol/Wasser, die durch potentiometrische Titration bestimmt werden, haben eine mittlere Genauigkeit von ± 0.2 . Die SIRIUS-Methode eignet sich bei den zweifach protonierbaren Verbindungen uneingeschränkt zur $\log P_{\text{ion}}$ -Bestimmung der einfach geladenen Form mit einem Fehlerbereich von $\log P_{\text{ion}} \pm 0.1$.

3.4.3.2.3 Das Verteilungsverhalten der zweifachen Basen

Jede Molekülform der zweifachen Basen kann sich theoretisch in *n*-Octanol verteilen. Eine Übersicht zu den 12 Möglichkeiten des Verteilungsverhaltens von Molekülen mit zwei pK_a -Werten erlaubte Rückschlüsse zur Anreicherung der Neutralform oder der beiden geladenen Spezies in den jeweiligen Phasen über die Verschiebung von zwei doppelten S-Kurven (Avdeef 1996). Die pH/ $\log D$ -Diagramme verweisen auf eine charakteristische Verteilung der Neutralform und der einfach geladenen Form in die organische Phase mit $\log P > \log P_{\text{ion}}$. Aussagen zur Verteilung der dritten Molekülform können aus dem Diagramm nicht entnommen werden.

In den bisherigen Auswertungen spielte der Verteilungskoeffizient der vollständig protonierten Form, $\log P_{\text{dion}}$, keine Rolle, weil für ihn ein Betrag von $\log P_{\text{dion}} \sim 0$ angenommen wurde. Außerdem ist der prozentuale Anteil der doppelt geladenen Form, der sich in der organischen Phase befinden kann, bei den Piperazin enthaltenden Verbindungen mit einem durchschnittlichen $\log P = 4.8$ und einem $\log P_{\text{ion}} = 1.8$ im betrachteten pH-Bereich von 2.5 bis 10.5 verschwindend klein. Ein Literaturwert von Trifluoperazin mit $\log P_{\text{dion}} = 0.74$ (Clarke und Cahoon 1987) führte zu einer Gegenüberstellung der

Koeffizienten mit und ohne Verteilung der vollständig protonierten Form. Die $\log P$ - und $\log P_{\text{ion}}$ -Werte aller Perazine, Phenazine und Penthixole wurden unter Berücksichtigung eines anfänglich fiktiven Wertes für die Verteilung der doppelt protonierten Form nachgerechnet (Abschnitt 3.4.3.1). In der Tab. 5 sind die bisherigen und überarbeiteten Koeffizienten aufgeführt.

Tabelle 5: Verteilungskoeffizienten der zweifach protonierbaren Verbindungen; $\log P$, $\log P_{\text{ion}}$, $\log P_{\text{dion}}$ und $\log D_{7,4}$ in *n*-Octanol/Wasser ^a

Nr.	Verbindung	$\log P$	$\log P_{\text{ion}}$	$\log P_{\text{dion}}$	GOF	$\log D_{7,4}$ ^b
8	Prochlorperazin	4.73 ± 0.04	1.46 ± 0.10	0.75 ^c	1.04	3.83
		4.78 ± 0.12	1.52 ± 0.07		0.69	3.84
9	Trifluoperazin	5.12 ± 0.05	2.16 ± 0.06	0.84 ± 0.31	0.85	4.2
		5.23 ± 0.07	2.32 ± 0.03	[0.74 ^d]	1.02	4.31
10	Thiethylperazin	4.78 ± 0.04	1.74 ± 0.09	0.80 ± 0.39	0.60	3.96
		4.87 ± 0.09	1.81 ± 0.04		0.63	4.05
11	Perphenazin	4.16 ± 0.05	1.59 ± 0.11	1.66 ± 0.10	0.83	3.42
		4.27 ± 0.10	1.45 ± 0.06		1.29	3.53
12	Fluphenazin	4.37 ± 0.04	1.56 ± 0.11	1.35 ± 0.16	1.25	3.69
		4.62 ± 0.15	1.83 ± 0.04		1.45	3.94
13	cis-Flupenthixol	4.91 ± 0.10	2.41 ± 0.14	1.66 ± 0.31	0.79	4.29
		5.00 ± 0.05	2.45 ± 0.05		0.89	4.37
14	trans-Flupenthixol	4.85 ± 0.23	2.53 ± 0.28	1.90 ± 0.42	0.86	4.28
		5.20 ± 0.09	2.76 ± 0.04		0.51	4.63

^a nach der SIRIUS-Standardmethode (fiktive Gleichung für die $\log P_{\text{dion}}$ -Form der Verbindungen). ^b berechnet mit pKaLOGP-Programm (korrespondierende Wertepaare). ^c Wert nicht potentiometrisch zugänglich (vermuteter Betrag). Die Verteilungskoeffizienten, die ohne Berücksichtigung der $\log P_{\text{dion}}$ -Werte ermittelt wurden, sind unterlegt.

^d Clarke und Cahoon 1987.

Unter Einbeziehung des pKa-Fehlers der Verbindungen bleiben die neuen $\log P$ - und die $\log P_{\text{ion}}$ -Werte der Perazine und Phenazine unverändert. Die Standardabweichungen der überarbeiteten $\log P_{\text{ion}}$ -Werte sind aber größer geworden. Auch besitzen die $\log P_{\text{dion}}$ -Werte sehr große Fehlerbereiche. Die $\log P_{\text{dion}}$ -Werte sind aus den durchgeführten Messungen nur bedingt zugänglich, da

- nur bis zu einem minimalen pH-Wert von 2.7 titriert wurde;
- zu geringe Substanzmengen zur sicheren Titration unter pH 3 eingesetzt wurden;
- für den erwarteten Betrag ($\log P_{\text{dion}} = 1 \pm 0.5$) zu wenig organische Phase zugegeben wurde.

Trotz dieser Einschränkungen lässt sich eine Verteilung der zweifach protonierten Formen mit einer potentiometrischen Titration in *n*-Octanol/Wasser nachweisen. Die zugänglichen $\log P_{\text{dion}}$ -Werte liegen in einem Bereich zwischen 0.8 und 1.5 und entsprechen der Größenordnung des Literaturwertes. Welche Auswirkungen ein falsches Gleichungssystem auf die Kurvenanpassung hat, beinhaltet

die Abb. 11, die die idealisierten Kurven der Titration einer zweifach basischen Verbindung in *n*-Octanol/Wasser mit einem pK_a -Wert (1) = 8.00, einem pK_a -Wert (2) = 3.80, mit $\log P = 5.00$, $\log P_{\text{ion}} = 2.00$ sowie $\log P_{\text{dion}} = 1.00$ bei verschiedenen Volumenverhältnis r_V von organischer zu wässriger Phase zeigt.

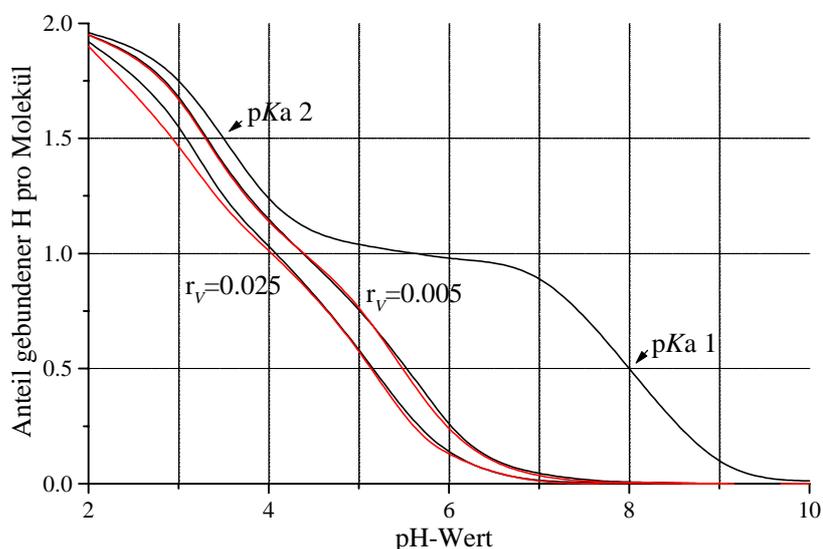


Abbildung 11: Bjerrum-Plot einer potentiometrischen Titration in *n*-Octanol/Wasser; rechte Kurve - Titration in rein wässrigem Milieu (pK_a -Bestimmung); schwarze Kurven - Anpassung ohne $\log P_{\text{dion}}$ -Wert; rote Kurven - Anpassung mit dem $\log P_{\text{dion}}$ -Wert.

Nur bei dem großen r_V -Wert = 0.025 stimmen die angepassten Kurven bei $pH < 4$ nicht überein. Die zuvor angeführten Einschränkungen werden in Abb. 10 bestätigt: ein $\log P_{\text{dion}}$ -Wert von 1.00 wirkt sich erst auf die Kurvenanpassung bei hohen *n*-Octanolmengen und bei niedrigen pH-Werten aus. Bei geringen *n*-Octanolmengen hat eine Verteilung der zweifach protonierten Form keinen Einfluss auf die Größen der $\log P$ - und der $\log P_{\text{ion}}$ -Werte.

Der geringen Löslichkeit der Flupenthixol-Isomere und von Perphenazin sind die Unterschiede in den Verteilungskoeffizienten je nach dem verwendeten Gleichungssystem geschuldet. Die Unsicherheiten in der Kurvenanpassung bei $pH < 4$ führte zu den erheblichen Differenzen. Die $\log P$ - und der $\log P_{\text{ion}}$ -Werte der zweifachen Basen, die ohne eine $\log P_{\text{dion}}$ -Korrektur berechnet wurden, entstammen den sicher zugänglichen Titrationskurven mit kleinen r_V -Werten. Es besteht daher kein Zweifel an deren Richtigkeit.

3.4.3.2.3 Die scheinbaren Verteilungskoeffizienten bei pH 7.4

Die $\log P$ -Werte von Verbindungen sind bei *in vivo*-Studien von geringer Bedeutung, da die Arzneistoffmoleküle unter physiologischen Bedingungen mehr oder weniger stark ionisiert vorliegen. Wesentlich relevanter sind die Verteilungskoeffizienten bei einem physiologischen pH-Wert.

Die $\log D_{7,4}$ -Differenzen zwischen beiden Berechnungswegen liegen für die einfach protonierbaren Arzneistoffe im Rahmen der Fehlergrenzen der potentiometrischen Methode mit Ausnahme von Promazin (Tab. 4). Eine gute Übereinstimmung zwischen den zu bevorzugenden Origin-Werten und den Referenzwerten gibt es bei Promethazin, Chlorpromazin, Triflupromazin, Thioridazin und Amlodipin. Im Fall von Thioridazin spricht das weiterhin für einen richtig ermittelten pK_a -Wert (Tab. 2).

Aufgrund der einwandfreien Zugänglichkeit der $\log P_{\text{ion}}$ -Werte der doppelt protonierbaren Verbindungen mit der SIRIUS-Methode wurden nur die scheinbaren Verteilungskoeffizienten berechnet, die aus diesen Koeffizienten hervorgehen. Alle $\log D_{7,4}$ -Werte stimmen mit den auffindbaren *shake flask*-Referenzen überein (Fehlerbereich ± 0.3).

Unter physiologischen Bedingungen sind die Piperazin-Ring enthaltenden Arzneistoffe lipophiler als die klassischen Verteilungskoeffizienten der Neutralform vermuten lassen. Der Betrag des physiologischen pH-Wertes unterscheidet sich nur wenig von einem pK_a -Wert einer Aminofunktion im Piperazinring. Somit ist der Anteil der Ionenform dieser Arzneistoffmoleküle an der Gesamtmenge geringer als der einfach protonierbarer Basen. Außerdem ist der Anstieg der Kurve der pH-abhängigen Verteilungskoeffizienten zwischen 6 und 8 am größten. Wie in Abb. 11 zu sehen, haben kleine pH-Wertänderungen größere Änderungen am Betrag des scheinbaren Verteilungskoeffizienten zur Folge.

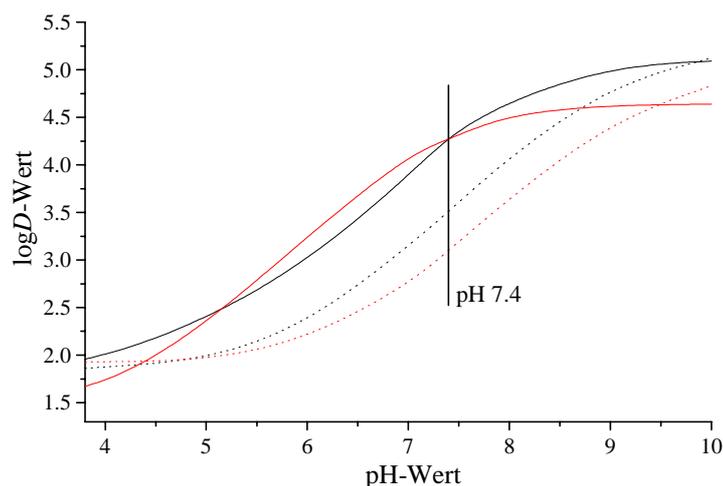


Abbildung 12: pH/ $\log D$ -Diagramm von Triflupromazin (···), Trifluoperazin (—), Fendilin (···) und Nicardipin (—).

Die $\log D_{7,4}$ -Werte der Verbindungen mit zwei basischen Stickstoffatomen sind immer größer als die mit demselben Ringsubstitutionsmuster und einer N,N-Dimethylaminopropyl-Kette. So sind die Kurven von Triflupromazin und Trifluoperazin deutlich bei pH 7.4 verschoben (Differenz 0.8), obwohl sich die $\log P$ - und $\log P_{\text{ion}}$ -Werte kaum unterscheiden. Die Zunahme an Lipophilie nach dem

Anfügen des Piperazinrings kann mit der Zunahme des neuroleptischen Potentials im Einklang stehen (Triflupromazin 20 - 60 mg/Tag, Trifluoperazin 5 - 15 mg/Tag). Ein ähnliches Beispiel bieten die strukturell heterogenen Calcium-Kanal-Blocker Fendilin und Nicardipin. Obwohl beide Verbindungen einen ähnlichen $\log P$ -Wert besitzen, beträgt die $\log D_{7,4}$ -Wert-Differenz 1.2 zum lipophileren 1,4-Dihydropyridin, da die Dissoziationskonstante von Nicardipin um ca. 2 pH-Einheiten kleiner ist.

Diese Unterschiede zwischen den $\log P$ - und $\log D$ -Werten zeigen, dass bei der Diskussion von Verteilungskoeffizienten bzw. dem Verteilungsverhalten der vorliegende pH-Wert und die Dissoziationskonstanten der Verbindungen unbedingt zu berücksichtigen sind. Die Auswahl eines, dem Testsystem entsprechenden Verteilungskoeffizienten hat entscheidende Bedeutung zur Interpretation von physiologischen Effekten und bei QSAR-Studien. Ich empfehle die Verwendung von scheinbaren Verteilungskoeffizienten $\log D$ bei pH 7.4 aus dem *n*-Octanol/Wasser-System.

3.4.3.3 Das Propylenglycoldipelargonat/Wasser-Verteilungssystem

3.4.3.3.1 Die Verteilungskoeffizienten der Neutralformen

Das Verteilungssystem PGDP/Wasser wurde erstmals zu Untersuchungen des Verteilungsverhaltens von catamphiphilen Arzneistoffen herangezogen. Die Verteilungskoeffizienten der neutralen Verbindungen ($\log P_{\text{PGDP}}$) wurden mit den zwei beschriebenen Verfahren ermittelt.

Theoretisch ist keine lineare Übertragung der Ergebnisse vom *n*-Octanol/Wasser-System zu erwarten, da sich die Art und die Stärke von intermolekularen Wechselwirkungen zwischen einzelnen Substituenten an Arzneistoffmolekülen und den Lösungsmittelmolekülen PGDP unterscheiden sollten. Die $\log P$ -Werte der einfachen Basen (Origin) sind durchschnittlich um 0.07 ± 0.07 ($n = 12$) höher als die Werte nach der SIRIUS-Methode (Tab. 6). Bei den zweifach protonierbaren Arzneistoffmolekülen sind die $\log P$ -Werte (Origin) um -0.08 ± 0.10 ($n = 7$) niedriger. Der Vergleich der beiden Auswerteverfahren führt zum gleichen Ergebnis im ersten Verteilungssystem (Abschnitt 3.4.3.2.1).

3.4.3.3.2 Die Verteilungskoeffizienten der geladenen Molekülformen

Die Verteilungskoeffizienten der Ionen bzw. Ionenpaare in PGDP waren experimentell schwieriger zugänglich als in *n*-Octanol. In Tab. 7 fallen insbesondere die relativ kleinen Beträge der $\log P_{\text{ion}}$ -Werte und die großen Standardabweichungen bei Anwendung der SIRIUS-Methode auf, obwohl die pK_a -Fehler nicht einbezogen wurden.

Durch die größeren Differenzen zwischen den Verteilungskoeffizienten der Neutralform und der einfach protonierten Form sind potentiometrische Titrations der einfachen Basen entweder mit einer sehr geringen Menge an PGDP ($\log P$ -Wert) oder mit einer erhöhten PGDP-Zugabe ($\log P_{\text{ion}}$ -Wert) notwendig. Im MultiSet-Verfahren, durch das der Einfluss der Ionenverteilung auf den $\log P$ -Wert berücksichtigt wird, äußert sich die zunehmende Varianz der Volumenverhältnisse r_V in einer allgemeinen Vergrößerung der Standardabweichungen. Die Mittelwerte der direkt zugänglichen Koeffizienten ($\log P_{\text{ion}}$ Origin) sind für die Koeffizienten der einfachen Basen zu bevorzugen, da in den Einzelwerten nach Gl. 7 die experimentellen Unterschiede und Ausreißer besser berücksichtigt werden. Eine einheitliche Beziehung zwischen den SIRIUS- und Origin-Werten für diese Gruppe wurde nicht gefunden.

Tabelle 6: Verteilungskoeffizienten $\log P$ in PGDP/Wasser

Nr.	Verbindung	$\log P$ SIRIUS ^a	GOF	$\log P$ Origin ^b
1	Promethazin	5.25 ± 0.11 (5)	1.23	5.28 ± 0.17 (3)
2	Promazin	4.48 ± 0.05 (4)	1.14	4.50 ± 0.13 (15)
3	Chlorpromazin	5.56 ± 0.09 (4)	1.43	5.66 ± 0.09 (8)
4	Chlorprothixen	5.42 ± 0.03 (4)	0.86	5.55 ± 0.03 (4)
5	Triflupromazin	5.61 ± 0.05 (6)	1.43	5.63 ± 0.06 (7)
6	Levomepromazin	5.35 ± 0.09 (5)	1.05	5.49 ± 0.10 (5)
7	Thioridazin	5.68 ± 0.06 (4)	1.02	5.80 ± 0.16 (6)
8	Prochlorperazin	5.09 ± 0.13 (4)	1.49	4.97 ± 0.18 (10)
9	Trifluoperazin	5.43 ± 0.06 (5)	0.73	5.26 ± 0.06 (8)
10	Thiethylperazin	5.23 ± 0.09 (5)	2.32	5.24 ± 0.13 (4)
11	Perphenazin	3.74 ± 0.09 (4)	1.58	3.84 ± 0.18 (6)
12	Fluphenazin	4.30 ± 0.08 (5)	1.91	4.15 ± 0.24 (2)
13	cis-Flupenthixol	5.11 ± 0.04 (5)	1.48	5.04 ± 0.32 (4)
14	trans-Flupenthixol	5.10 ± 0.09 (4)	1.49	4.94 ± 0.16 (3)
15	Verapamil	4.17 ± 0.10 (5)	0.87	4.10 ± 0.05 (6)
16	Gallopamil	3.99 ± 0.22 (4)	0.60	3.98 ± 0.16 (4)
17	Fendilin	5.41 ± 0.14 (5)	0.66	5.44 ± 0.16 (4)
18	Amlodipin	3.62 ± 0.10 (5)	0.97	3.80 ± 0.10 (6)
19	Nicardipin	4.97 ± 0.10 (5)	0.58	5.06 ± 0.05 (6)

^a mit SIRIUS pKaLOGP-Programm berechnet (incl. Ionenpaarkorrektur) mit Bereich des Verteilungskoeffizienten unter Berücksichtigung der dazugehörigen pKa-Standardabweichung (Zahl der Einzelmessungen in Klammern).

^b mit Origin als Mittelwert der Einzelergebnisse (Zahl in den Klammern angegeben) nach Gleichung 6 berechnet.

Tabelle 7: Verteilungskoeffizienten $\log P_{\text{ion}}$ und $\log D$ in PGDP/Wasser

Nr.	Verbindung	$\log P_{\text{ion}}$	$\log P_{\text{ion}}$	$\log P_{\text{ion}}$	$\log D_{7.4}^{\text{d}}$	
		SIRIUS ^a	Origin ^b	Origin ^c	SIRIUS	Origin
1	Promethazin	2.20 ± 0.13 (5)	2.18 ± 0.28 (3)		3.64	3.67
2	Promazin	1.81 ± 0.03 (4)	1.80 ± 0.26 (15)		2.75	2.77
3	Chlorpromazin	1.45 ± 0.07 (4)	1.59 ± 0.21 (8)		3.69	3.79
4	Chlorprothixen	1.15 ± 0.16 (4)	1.54 ± 0.16 (4)		3.87	4.00
5	Triflupromazin	1.25 ± 0.15 (6)	1.52 ± 0.11 (3)		3.90	3.91
6	Levomepromazin	1.23 ± 0.15 (5)	1.47 ± 0.27 (5)		3.49	3.63
7	Thioridazin	1.54 ± 0.22 (4)	1.64 ± 0.20 (6)		3.73	3.85
8	Prochlorperazin	1.83 ± 0.05 (4)	1.17 ± 0.25 (10)	1.70 ± 0.29	4.15	
9	Trifluoperazin	1.56 ± 0.05 (5)	1.25 ± 0.22 (8)	1.90 ± 0.22	4.51	
10	Thiethylperazin	1.73 ± 0.07 (4)	1.55 ± 0.24 (4)	1.76 ± 0.13	4.40	
11	Perphenazin	1.34 ± 0.05 (4)	1.20 ± 0.28 (4)	1.49 ± 0.51	3.00	
12	Fluphenazin	1.73 ± 0.03 (5)	1.71 ± 0.25 (3)	1.66 ± 0.26	3.62	
13	cis-Flupenthixol	1.90 ± 0.07 (5)	1.87 ± 0.45 (4)	1.78 ± 0.29	4.49	
14	trans-Flupenthixol	2.25 ± 0.07 (4)	1.91 ± 0.25 (2)	2.25 ± 0.14	4.53	
15	Verapamil	1.69 ± 0.16 (5)	1.20 ± 0.09 (6)		2.76	2.66
16	Gallopamil	1.67 ± 0.45 (4)	1.54 ± 0.36 (4)		2.69	2.67
17	Fendilin	1.78 ± 0.28 (5)	1.48 ± 0.32 (4)		3.61	3.64
18	Amlodipin	1.25 ± 0.19 (5)	1.37 ± 0.19 (6)		1.73	1.89
19	Nicardipin	1.01 ± 0.18 (5)	1.19 ± 0.23 (6)		4.57	4.63

^a nach der SIRIUS-Standardmethode, Zahl der Einzelmessungen ist in Klammern angegeben. ^b Eigenberechnung nach Gleichung 7 (Verfahren für einfach protonierte Basen), Zahl der Einzelmessungen in Klammern angegeben. ^c Eigenberechnung nach Gleichung 6 (Verfahren für die Neutralform). ^d berechnet mit pKaLOGP-Programm (korrespondierende Wertepaare).

Die Berechnung der $\log P_{\text{ion}}$ -Werte der einfach geladenen Form der Piperazin-Ring enthaltenden Arzneistoffe wurde auch über die Gl. 6 vorgenommen (Tab. 7). Überraschenderweise erhielt man im Gegensatz zum *n*-Octanol/Wasser-System (Tab. 4) $\log P_{\text{ion}}$ -Werte, die im Fehlerbereich der SIRIUS-Werte liegen mit einer fast unveränderten Reihenfolge der Koeffizienten. Trotzdem bleibt die SIRIUS-Methode das Verfahren der Wahl zur Bestimmung von $\log P_{\text{ion}}$ -Werten für doppelt geladene Verbindungen.

3.4.3.4 Vergleich der beiden Verteilungssysteme

3.4.3.4.1 Das Verteilungsverhalten der Neutralformen

Zum Vergleich der beiden Verteilungssysteme wurden generell die SIRIUS-Werte für Korrelationen der $\log P$ -Werte herangezogen. Auf den ersten Blick besteht kein grundsätzlicher Unterschied in den $\log P$ -Werten zwischen den beiden Systemen. Die Verteilung der ungeladene Moleküle liegt bei PGDP im $\log P$ -Bereich von 3.6 bis 5.7 und ist etwas größer als in *n*-Octanol ($3.3 \leq \log P \leq 5.5$). Auffällig sind nur die relativ kleinen Verteilungskoeffizienten von Promazin, die unabhängig vom Auswerteverfahren den gleichen Betrag haben.

Die $\log P$ -Werte der Phenothiazine (außer Promazin), die keine Hydroxylgruppe im Molekül besitzen, und der protonierbaren Calcium-Kanal-Blocker nehmen durchschnittlich im PGDP/Wasser-Verteilungssystem um 0.34 ± 0.10 ($n = 13$) zu. Die Verteilungskoeffizienten der Arzneistoffe mit Thioxanthen-Grundstruktur ändern sich unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen der potentiometrischen Titration nicht, obwohl die im Vergleich zum Phenothiazin-Ring apolarere Thioxanthen-Struktur bessere intermolekulare van-der-Waals-Wechselwirkungen mit PDGP ausbilden könnte. *Leahy, Taylor* und *Wait* begründeten die generellen Unterschiede zwischen den beiden Verteilungssystemen damit, dass sowohl *n*-Octanol/Wasser-Cluster als auch reines Wasser Protonendonor- und -akzeptoreigenschaften besitzen, die in jeder Phase gleichartige Wasserstoffbrücken ausbilden können (*Leahy et al. 1989; Franks et al. 1993*). Der Ester PGDP gilt nur als Protonenakzeptor und wurde daher aufgrund seines Unterschieds in den Wasserstoffbrückeneigenschaften empfohlen (*Leahy et al. 1989*). Diese Verschiebungen im Vermögen der organischen Phasen, Wasserstoffbrücken auszubilden, führen zu einer Abhängigkeit des Verteilungsverhaltens einer Verbindung in PGDP/Wasser von

- deren amphiphilen Eigenschaften;
- der Polarität der Neutralform;
- deren Fähigkeit zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke bei gleichzeitiger Bereitstellung des reaktiven Wasserstoffatoms.

Zur Quantifizierung von Gemeinsamkeiten und Unterschieden der Verteilungssysteme wurde das Verfahren der linearen Regression herangezogen. Für den gesamten Datensatz ergibt sich eine mäßige Korrelation,

$$\log P_{\text{PGDP}} = 0.13 (\pm 0.57) + 1.01 (\pm 0.12) \log P_{\text{Oct}} \quad n = 19 \quad s = 0.30 \quad r^2 = 0.81 \quad F = 71.0$$

die eine Aufspaltung in die Gruppe der einfach und zweifach protonierbaren Verbindungen nahelegt, wenn man die Anordnung der Verbindungen in Abb. 13 betrachtet. Für den ersten Fall verbessert sich die Qualität des linearen Vergleichs trotz Berücksichtigung von Promazin (Nr. 2; Abb. 13).

$$\log P_{\text{PGDP}} = 0.42 (\pm 0.47) + 0.97 (\pm 0.10) \log P_{\text{Oct}} \quad n = 12 \quad s = 0.23 \quad r^2 = 0.91 \quad F = 96.3$$

Für die anderen Verbindungen bleibt die Korrelation unverändert, wobei sich die Beträge von Ordinatenabschnitt und Anstieg von der ursprünglichen Geradengleichung unterscheiden.

$$\log P_{\text{PGDP}} = -3.00 (\pm 1.68) + 1.62 (\pm 0.35) \log P_{\text{Oct}} \quad n = 7 \quad s = 0.29 \quad r^2 = 0.82 \quad F = 22.0$$

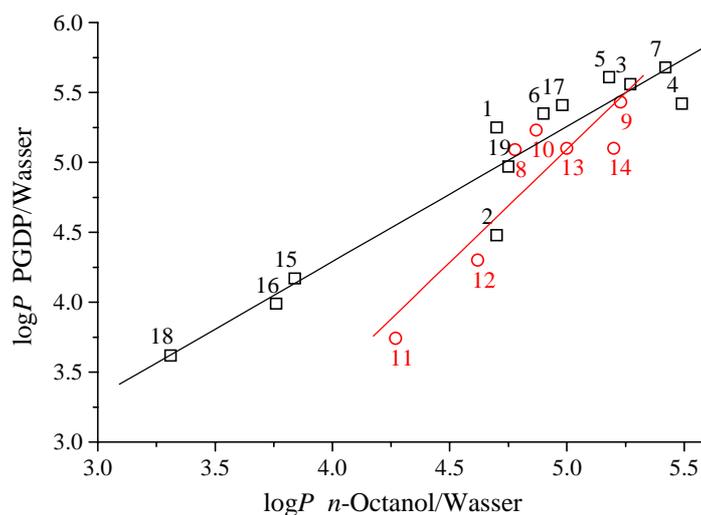


Abbildung 13: Unterschiede im Verteilungsverhalten der Neutralformen in *n*-Octanol/Wasser und PGDP/Wasser (einfache Basen □ ; zweifache Basen ○)

Unterteilt man dagegen die Arzneistoffe nach ihren Protonendonor-Eigenschaften, gehören die beiden Phenazine und die Flupenthixole in eine Gruppe (Nr. 11 bis 14; Abb. 13), da nur sie über die entsprechende Hydroxylgruppe verfügen ($n = 4$). Die ausgewählten Moleküle könnten als begünstigte Wechselwirkungspartner zum Protonenakzeptor PGDP betrachtet werden. Dagegen spricht aber die Abnahme der Verteilungskoeffizienten gegenüber *n*-Octanol. Im Vergleich zur Korrelation aller zweifach protonierbaren Verbindungen bleiben der Anstieg und der Ordinatenabschnitt gleich, die statistischen Parameter sind aber deutlich besser.

$$\log P_{\text{PGDP}} = -2.99 (\pm 1.12) + 1.58 (\pm 0.23) \log P_{\text{Oct}} \quad n = 4 \quad s = 0.17 \quad r^2 = 0.96 \quad F = 45.9$$

Die lineare Korrelation der $\log P$ -Werte aller nicht OH-Gruppe enthaltenden Arzneistoffe zeigt die höchste statistische Absicherung ($n = 15$). Die Werte für Ordinatenabschnitt und Anstieg sind mit denen in der Regressionsgleichung einfacher Basen identisch.

$$\log P_{\text{PGDP}} = 0.44 (\pm 0.41) + 0.96 (\pm 0.09) \log P_{\text{Oct}} \quad n = 15 \quad s = 0.20 \quad r^2 = 0.91 \quad F = 128.0$$

Das Verteilungssystemen ist in beiden Systemen von der Zahl der Dissoziationskonstanten einer Verbindung unabhängig und basiert auf gleichen Ursachen, wenn Strukturen mit Wasserstoffdonoreigenschaften unberücksichtigt bleiben.

Das Verteilungsverhalten der Hydroxylgruppen enthaltenden Arzneistoffe im PGDP/Wasser-System unterliegt einem besonderen Wechselwirkungsmechanismus. Die Verteilungskoeffizienten der Neutralform der Phenazin-Verbindungen sind in PGDP kleiner als im *n*-Octanol/Wasser-System, was im Gegensatz zum Verhalten aller übrigen Arzneistoffe steht. Zur Erklärung kann man eine bevorzugte Wasserstoffbrückenbildung zwischen den aliphatischen Hydroxylgruppen der Arzneistoffmoleküle und Wasser anstatt mit PGDP postulieren, die zu einer geringeren Lipophilie in PGDP führt.

3.4.3.4.2 Das Verteilungsverhalten der geladenen Molekülformen

Es fällt auf, dass sich die geladenen Formen der Moleküle besser in *n*-Octanol verteilen als in PGDP. Ganz allgemein sind gegenläufige Tendenzen zu erkennen: je höher der $\log P_{\text{ion}}$ -Wert einer Verbindung in *n*-Octanol ist, desto geringer wird der korrespondierende $\log P_{\text{ion}}$ -Wert in PGDP und umgekehrt (Abb. 14). Die größten Differenzen in den Ionen-Verteilungskoeffizienten existieren bei den drei Thioxanthenen Chlorprothixen, cis- und trans-Flupenthixol. Die Diskussion bezieht sich auf die jeweiligen Origin-Werte der einfach protonierbaren Verbindungen und die jeweiligen SIRIUS-Werte der zweifach protonierbaren Verbindungen. Eine Gegenüberstellung der Koeffizienten, ohne den Ausreißer Promethazin, bestätigt die Aussage von *Collander*, dass nur die $\log P$ - und nicht die $\log P_{\text{ion}}$ -Werte linear miteinander verknüpft sind (*Collander* 1951).

$$\log P_{\text{ion PGDP}} = 0.83 (\pm 0.21) + 0.43 (\pm 0.11) \log P_{\text{ion Oct}} \quad n = 18 \quad s = 0.19 \quad r^2 = 0.48 \quad F = 14.6$$

Die Kompensation der ausgeprägten amphiphilen Eigenschaften der Ionen ist von PGDP-Molekülen weniger gut ausgeprägt.

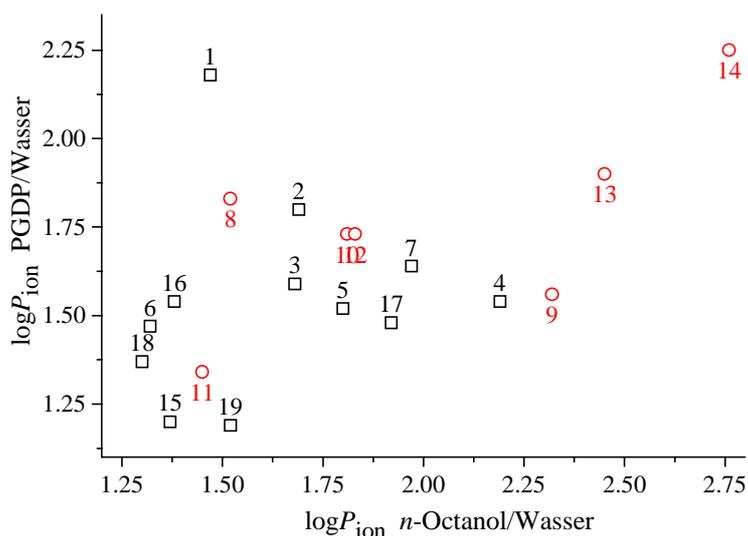


Abbildung 14: Unterschiede im Verteilungsverhalten der einfach geladenen Ionen in *n*-Octanol/Wasser und PGDP/Wasser (einfache Basen □ ; zweifache Basen ○)

PGDP ist ein lipophileres Lösungsmittel als *n*-Octanol. Ladungen in Molekülen erschweren den Übergang von der wässrigen Phase in PGDP. Im Gegensatz zum Verteilungsverhalten der Neutralformen wurden keine spezifischen Effekte an den untersuchten geladenen Arzneimolekülen gefunden.

3.4.4 Das liposomale Verteilungssystem

3.4.4.1 Unterschiede in den Verteilungssystemen

Wenn das Verteilungsverhalten an Membranen untersucht werden soll, muss den spezifischen Dipoleigenschaften der Phosphatidylcholin-Kopfgruppen Rechnung getragen werden. Bei der Bestimmung von Verteilungskoeffizienten an biologischen Membranen sind weitere Unterschiede zu den homogenen organischen Phasen zu berücksichtigen (*Schubert 1994*):

- extrem große Membranoberflächen an den Innen- und Außenseiten, so dass jedes Arzneistoffmolekül an die Membran gelangen kann;
- die Phospholipid-Moleküle tragen Ladungen, über einen großen pH-Bereich haben sie Zwitterionencharakter;
- die Membranen lebender Zellen besitzen asymmetrische elektrische Eigenschaften (Innenseite negativ, Außenseite isoelektrisch);
- die Bindung geladener Moleküle an und in Membranen ist erleichtert.

Zur exakten Messung von Bindungs- oder Verteilungsparametern an Phospholipid-Membranen mittels potentiometrischer Titration sind unilamellare Vesikel als Modell notwendig (*Sirius Analytical Instruments 1996*). Eine asymmetrische Adsorption und eine verlangsamte Permeation führen bei multilamellaren Systemen zu einem Konzentrationsgefälle zwischen Außenraum und dem tiefstem Kompartiment, das zeitabhängige Messwerte in der äußeren Phase verfälscht.

Die Abb. 15 macht die Unterschiede in der Ionenpaar-Verteilung zwischen *n*-Octanol/Wasser und Liposomen deutlich. Die Abnahme des pK_a -Wertes in Gegenwart einer nicht mit Wasser mischbaren organischen Phase (p_oK_a -Wert) ist für basische Arzneistoffe charakteristisch. Wenn der p_oK_a -Wert bei zunehmenden Volumenverhältnissen r_v einem konstanten Wert entgegenstrebt (p_oK_{sch} -Wert), deutet dieses Phänomen auf eine Ionenpaar-Verteilung hin (*STAN 1995 a*). Anhand von Chlorpromazin und Verapamil wurde der Einfluß von r_v im *n*-Octanol/Wasser- (p_oK_a) und liposomalen Verteilungssystem (p_mK_a) untersucht.

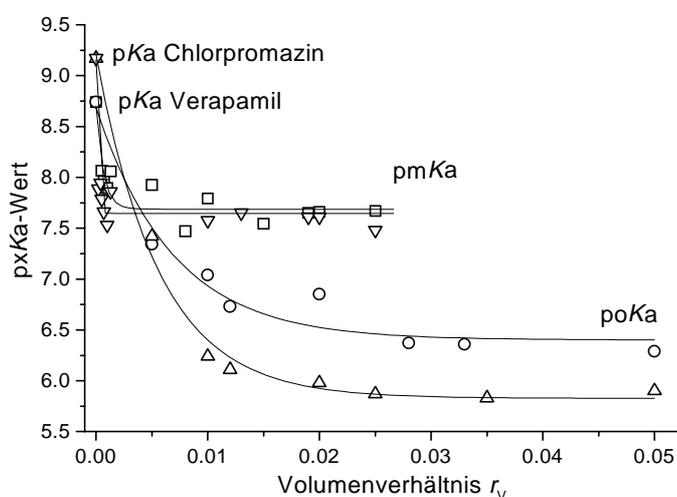


Abbildung 15: p_oK_a - und p_mK_a -Werte von Chlorpromazin (Δ / ∇) sowie p_oK_a - und p_mK_a -Werte von Verapamil (\circ / \square) in Abhängigkeit von der Menge an nicht wässriger Phase

Bei *n*-Octanol wird bei den untersuchten Verbindungen erst ab einem Volumenverhältnis r_V von 0.01 der Einfluss der Ionenpaar-Verteilung sichtbar. Dagegen ist beim selben Volumenverhältnis im liposomalen System bereits der Bereich des p_mK_a -Endwertes erreicht. Selbst kleine Mengen an Phospholipid reichten aus, damit sich alle geladenen Moleküle verteilen können, was auf die große Membranoberfläche zurückzuführen ist. Die geladenen Molekülformen müssen sich folglich als Ionenpaare an bzw. in Membranen in einem weit größeren Anteil verteilen, wie aus dem extremen Kurvenverlauf der p_mK_a -Werte zu erkennen ist. Die unerwartet hohe Verteilung von geladenen Molekülen über den gesamten r_V -Bereich schließt Sättigungsprozesse aus, die auf Ladungen beruhen. Vielmehr könnten in die Membran eingedrungene Arzneistoffmoleküle die Membranstruktur aufweichen, so dass weitere Einlagerungen bei einem veränderten Membranaufbau möglich werden (Seydel et al. 1994).

3.4.4.2 Die Verteilungskoeffizienten an Liposomen

3.4.4.2.1 Die Verteilungskoeffizienten der Neutralformen

Zur Auswertung der Verteilungskoeffizienten der einfachen Basen eigneten sich die Gl. 6 und 7 (Avdeef et al. 1998). Die Verteilungskoeffizienten der einfach protonierbaren Verbindungen wurden aus Einzelmessungen bestimmt, ohne dass ein Ionenpaarkoeffizient in der Auswertung einer Einzelmessung berücksichtigt wurde. In Fall der zweifach protonierbaren Verbindungen wurde das SIRIUS-Auswerteprogramm zur simultanen Berechnung der $\log P_m$ - und der $\log P_m^{IP}$ -Werte benutzt. Mindestens dreimal wurden Messungen mit den zweifach basischen Arzneistoffen mit 0.5 bis 1.0 mg/ml Lipid durchgeführt und die Einzelergebnisse im Multiset gemittelt. Die methodischen Nachweisgrenzen bei der Bestimmung von $\log P_m$ sind bei einer Konzentration von 0.12 mM Arzneistoff und beim molaren Verhältnis von Phospholipid zu Arzneistoff von 5:1 erreicht, welches empirisch gefunden wurde (Sirius Analytical Instruments 1996; Avdeef et al. 1998). Alle Membran-Verteilungskoeffizienten sind in der Tab. 8 zusammengefasst.

Die $\log P_m$ -Werte der Arzneistoffe sind im allgemeinen kleiner als im klassischen *n*-Octanol/Wasser-Verteilungssystem. Levomepromazin, Verapamil, Fendilin und Amlodipin besitzen aber einen größeren $\log P_m$ -Wert als in *n*-Octanol. Der $\log P_m$ -Wert von Nicardipin stimmt mit dem $\log P$ Origin in *n*-Octanol/Wasser überein. Ein Membran-Verteilungskoeffizient von Amlodipin von $\log P_m = 3.75$, der durch Ultrafiltration bestimmt wurde, ist mit dem potentiometrisch zugänglichen Wert unter Einbeziehung der Standardabweichung identisch (Austin et al. 1995).

Deutlich weniger verteilen sich die Neutralformen der zweifachen Basen. Die Vertreter der Gruppe besitzen jeweils sehr ähnliche Verteilungskoeffizienten. Die Mittelwerte der Multisets haben ohne Einbeziehung der pK_a -Fehler sehr geringe Standardabweichungen. Im Vergleich zu den anderen Systemen sind die Membran-Verteilungskoeffizienten für diese Klasse von Verbindungen unabhängig von der Art der Substituenten sowohl an den Phenothiazin- bzw. Thioxanthen-Ringstrukturen als auch am Piperazinring.

Tabelle 8: Übersicht zu den Membran-Verteilungskoeffizienten

Nr.	Verbindung	Verteilungskoeffizienten					
		$\log P_m$	GOF	$\log P_m^{\text{IP}}$	$\log K_{\text{SIP}}$	$\log D_m 7.4^a$	$\log D_m 5.4^a$
1	Promethazin	4.37 ± 0.12 (27)	-	3.06 ± 0.17	3.88	3.90	3.88
2	Promazin	4.26 ± 0.18 (3)	-	2.86 ± 0.19	3.68	3.70	3.68
3	Chlorpromazin	4.96 ± 0.13 (23)	-	3.39 ± 0.15	4.21	4.24	4.21
						[3.93 ^b]	
4	Chlorprothixen	5.34 ± 0.05 (2)	-	4.02 ± 0.09	4.84	4.87	4.84
5	Triflupromazin	5.07 ± 0.16 (6)	-	3.63 ± 0.15	4.45	4.48	4.45
6	Levomepromazin	5.07 ± 0.16 (6)	-	3.59 ± 0.20	4.41	4.43	4.41
7	Thioridazin	4.83 ± 0.13 (9)	-	3.22 ± 0.15	4.02	4.05	4.02
8	Prochlorperazin	3.95 ± 0.03 (5)	1.06	2.65 ± 0.08	3.47	3.56	3.45
9	Trifluoperazin	4.09 ± 0.03 (7)	1.22	2.55 ± 0.08	3.37	3.55	3.34
10	Thiethylperazin	3.94 ± 0.04 (7)	1.46	3.03 ± 0.06	3.85	3.87	3.82
11	Perphenazin	3.99 ± 0.04 (6)	0.80	2.16 ± 0.16	2.98	3.41	2.98
12	Fluphenazin	4.06 ± 0.03 (6)	1.67	2.17 ± 0.25	2.97	3.50	2.97
13	cis-Flupenthixol	3.97 ± 0.04 (7)	1.17	2.41 ± 0.16	3.23	3.55	3.23
14	trans-Flupenthixol	4.18 ± 0.04 (6)	1.70	2.55 ± 0.12	3.37	3.76	3.37
15	Verapamil	3.99 ± 0.12 (31)	-	2.83 ± 0.18	3.65	3.67	3.65
16	Gallopamil	3.64 ± 0.11 (4)	-	2.52 ± 0.19	3.34	3.36	3.34
17	Fendilin	5.24 ± 0.09 (4)	-	3.75 ± 0.11	4.57	4.60	4.57
18	Amlodipin	3.89 ± 0.16 (8)	-	2.47 ± 0.27	3.29	3.30	3.29
		[3.75 ^c]				[3.75 ^c]	[3.75 ^c]
19	Nicardipin	4.66 ± 0.14 (11)	-	3.58 ± 0.18	4.40	4.54	4.40

Werte der einfach protonierbare Verbindungen (1-7 und 15-19): über die Gleichungen 6 und 7; Werte der doppelt protonierbare Verbindungen (8-14): nach der SIRIUS-Standardmethode (Anzahl der Einzelwerte und Einzelmessungen in Klammern angegeben). ^a $\log D_m$ als $\log P_m - \log K_{\text{SIP}} - \text{pH}$ -Korrelation für pH 7.4 und pH 5.4.

^b Zachowski und Durand 1988. ^c Austin et al. 1995.

Dieses Phänomen lässt sich nicht über die Hydrophobie von struktur-homogenen Arzneistoffmolekülen erklären: Bei der Einlagerung eines Moleküls in die wässrige Phase entsteht eine hydrophobe Tasche, die unabhängig von der Art der drei organischen Phase eine konstante van-der-Waals-Oberfläche besitzen sollte. Solange die Grundstruktur der wässrigen Phase nicht zerstört wird, kann man von einheitlichen Solvationsprozessen ausgehen (*Blokzijl und Engberts* 1993).

Demnach muss der Einfluss der Elektrostatik auf das Verteilungsverhalten zu einer Vereinheitlichung der $\log P_m$ -Werte bei strukturgleichen Verbindungen mit variierenden Substituenten führen, wenn die

van-der-Waals-Interaktionen in den aliphatischen Strukturbereichen der nicht wässrigen Phasen davon unberührt bleiben. Vermutlich wird bei den Verbindungen, die nur eine tertiäre Aminstruktur enthalten, das elektrostatische Potential durch das komplementäre Gegenstück in der Kopfgruppe der Membranlipide kompensiert. Bei mehreren basischen Zentren kann dieser gegenseitige Ausgleich durch die strukturelle Trennung im einzulagernden Molekül nicht vollständig erfolgen. Das Ergebnis der verschiedenen Effekte besteht in nicht von der Einzelstruktur abhängigen $\log P_m$ -Werten der zweifach basischen Arzneistoffe, wie es in den Verteilungssystemen homogene organische Phase/Wasser üblich ist.

3.4.4.2.2 Die Verteilungskoeffizienten der geladenen Molekülformen

Wie im Abschnitt 3.4.4.1 dargestellt, ist an Membranen mit einem großen Verteilungskoeffizienten der geladenen Formen, $\log P_m^{\text{IP}}$, zu rechnen. Folglich fallen die Differenzen zwischen den $\log P_m$ -Werten und den entsprechenden $\log P_m^{\text{IP}}$ -Werten mit Liposomen wesentlich geringer aus (Tab. 8). Sie betragen durchschnittlich 1.42 ± 0.24 mit einzelnen Ausnahmen: Thiethylperazin 0.91, Perphenazin 1.83 und Fluphenazin 1.89.

Nach Umrechnung der Ionen-Verteilungskoeffizienten in die Ionenpaar-Oberflächen-Verteilungskoeffizienten (Gl. 9) sind dieselben Ausnahmen in den Differenzen zu den korrespondierenden $\log P_m$ -Werten zu erkennen. Die größten Differenzen zwischen $\log P$ und $\log K_{\text{SIP}}$ existieren bei Perphenazin (1.01) und Fluphenazin (1.07). Die Ionenpaare beider Phenazine verteilen sich schwieriger in die Membran. Eine ähnliche Erscheinung wird auch für deren Neutralform in PGDP beobachtet. Mögliche Wasserstoffbrücken, die sich an der endständigen Alkoholgruppe bevorzugt im wässrigen Medium ausprägen, erweitern die Interaktionsmöglichkeiten mit der wässrigen Phase.

Der Ionenpaar-Oberflächen-Verteilungskoeffizient von Thiethylperazin stimmt mit dem $\log P_m$ -Koeffizienten der Neutralform fast überein (Tab. 8). Trotz der beiden Ladungszentren unterstützt die Ethylthio-Seitenkette die Einlagerung von Ionen in die Lipophil-Hydrophil-Grenzfläche. Es können sich lipophile, polare und ionische intermolekulare Wechselwirkungen in den einzelnen Membranregionen ausbilden, die in ihrer Summe für diese Anreicherung verantwortlich sind. Für Amlodipin wurde in der Literatur ein Verteilungskoeffizient des Ions von 3.75 angegeben, der unabhängig von der Salzkonzentration und vom pH Wert sein soll (Austin et al. 1995). Meine Ergebnisse stützten diese Aussagen nicht.

3.4.4.2.3 Das pH-abhängige Verteilungsverhalten an Membranen

Die ausgeprägten intermolekularen elektrostatischen und ionischen Wechselwirkungen, insbesondere bei der Ionen-Verteilung, sind für die geringe Streuung der $\log D_{m\ 7.4}$ -Werte verantwortlich (Tab. 8). Die Koeffizienten $\log D_{m\ 7.4}$ und $\log D_{m\ 5.4}$ der einfach protonierbaren Verbindungen unterscheiden sich nicht, mit Ausnahme von Nicardipin aufgrund des kleinen pKa-Wertes von 7.34. Ein Referenzwert von Chlorpromazin mit Phosphatidylcholin-Membranen von 3.93 ± 0.04 wurde durch Ultrafiltration bei pH 7.4 gefunden (Zachowski und Durand 1988), der in der Größenordnung mit dem eigenen Wert übereinstimmt. Somit ist es naheliegend, den $\log K_{\text{SIP}}$ -Wert als den für ein Ion charakteristischen Verteilungskoeffizienten mit Membranen anzusehen, da dieser Koeffizient die

Effekte des Gegenions auf die Ion-/Ionenpaar-/Dipol-Wechselwirkungen beinhaltet. Bei den zweifach protonierbaren Arzneistoffen sind die $\log K_{\text{SIP}}$ - und die $\log D_{\text{m } 5,4}$ -Werte identisch.

Die $\log D_{\text{m } 7,4}$ -Koeffizienten werden anscheinend mehr durch die Größe von $\log K_{\text{SIP}}$ bestimmt. Im Membran-Verteilungssystem sind bei einem physiologischem pH-Wert die scheinbaren Verteilungskoeffizienten der einfachen Phenothiazine größer als die der strukturverwandten zweifach basischen Phenothiazine. In beiden anderen Verteilungssystemen beobachtete ich eine umgekehrte Reihenfolge der Koeffizienten. Somit kann das Verteilungsverhalten der neuroleptisch aktiven Substanzen nicht alleine zur Analyse der unterschiedlichen pharmakologischen Aktivitäten herangezogen werden.

3.5 Vergleich der Verteilungssysteme

3.5.1 Die Hauptkomponenten-Analyse

Die Korrelationsstruktur der potentiometrisch bestimmten Verteilungskoeffizienten in den drei Testsystemen wurde auch mittels Hauptkomponenten-Analyse (*principal component analysis* = PCA) untersucht, um erstens Aussagen über globale Gemeinsamkeiten im Verteilungsverhalten der Arzneistoffe zu finden und zweitens, Gruppierungen in Bezug auf den Protonierungscharakter vornehmen zu können. Dazu werden aus den ursprünglichen Verteilungskoeffizienten miteinander unkorrelierte latente Variablen, die Hauptkomponenten (*principal components* = PC), gebildet. Sie werden als in der mehrdimensionalen Punktwolke orthogonal ausgerichtete Raumgeraden so gewählt, dass sie ein Maximum der Varianz der ursprünglichen Koeffizienten aus den drei Verteilungssystemen beschreiben. Jede Hauptkomponente kennzeichnet die maximale Varianz, die durch die bisherigen Hauptkomponenten nicht erfasst wurde (Abschnitt 6.1.4.1).

Als ein empirisches Verfahren zur Ermittlung der Zahl signifikanter PC hat sich das Eigenwert-Eins-Kriterium bewährt (Fleischer 1999). Die Eigenwerte der Hauptkomponenten beinhalten, wieviel Varianz der gemessenen Verteilungskoeffizienten aus den jeweiligen Untersuchungssystemen in einer PC enthalten ist. Wenn eine Hauptkomponente mindestens so viel Information wie ein ursprünglicher standardisierte Variable enthält, ist das Eigenwert-Eins-Kriterium erfüllt. Die Kennfaktoren einer PCA der drei Gruppen von Verteilungskoeffizienten sind:

- die Zahl an extrahierten Hauptkomponenten und
- die Ladungswerte aus den gesamten Koeffizienten der einzelnen Verteilungssysteme.

Besitzen mehrere Variablen einen gleich hohen Ladungswert an einer Hauptkomponente, sind sie statisch gesehen identisch; sie enthalten dieselbe Information. Ein kleiner Ladungswert (*loading*) der ursprünglichen Gruppe von Verteilungskoeffizienten zeigt an, dass die Information nicht von der Hauptkomponente extrahiert wurde. Die Varimax-Rotation (VR) der Hauptkomponenten, das am häufigsten angewendete Rotationsverfahren, kann die Varianz der quadrierten Ladungen pro PC maximieren. Eine Rotation hat das Ziel, dass jede Variable (alle Verteilungskoeffizienten aus einem Testsystem) eine Hauptkomponente möglichst hoch und die weiteren jedoch niedrig lädt.

Die *score*-Werte jeder Hauptkomponente stellen die Projektion einer Verbindung auf einer Hauptkomponente dar. Aus linearen Korrelationen der *score*-Werte mit den jeweiligen Verteilungskoeffizienten pro Verteilungssystem geht hervor, inwieweit Gemeinsamkeiten oder Unterschiede im Beitrag der einzelnen Verbindungen an der Hauptkomponente bestehen.

3.5.2 Das Verteilungsverhalten der Neutralformen

Wenn ich die $\log P$ -Koeffizienten aller ungeladenen Verbindungen ($n = 19$) miteinander korrelierte, wurden die SIRIUS-Werte herangezogen, genau so wie in den Analysen mit den Verteilungskoeffizienten der zweifachen Basen ($n = 7$). Bei Zusammenhängen mit Koeffizienten der Gruppe der einfach protonierbaren Verbindungen ($n = 12$) verwendete ich die Durchschnittswerte nach den Gl. 6 und 7 (Origin). Die Quellen der Koeffizienten sind mit den Regressionsgleichungen angegeben.

Der Eigenwert (EW) und der %-Varianzwert einer Hauptkomponente (PC) charakterisieren die Ähnlichkeit der betrachteten Testsysteme. Wenn die *loading*-Werte mehrerer Koeffizienten an einer PC größer als 0.7 sind, besitzen die Variablen einen gemeinsamen und signifikanten Beitrag an der Hauptkomponente.

Tabelle 9: Hauptkomponenten-Analyse mit den gemessenen Koeffizienten der basischen Verbindungen ($n = 19$); minimaler EW 0.4; standardisierte Varimax-Rotation (VR); Hauptkomponenten-Ladungen > 0.7 sind hervorgehoben.

Analyse	Varianz				<i>loading</i> -Werte		
	PC	EW	%	Σ %	$\log P_{\text{Oct}}$	$\log P_{\text{PGDP}}$	$\log P_{\text{m}}$
A1	1	2.48	82.5	82.5	0.94	0.95	0.83
A2	1 VR	1.50	50.1	50.1	-0.90	-0.83	0.06
	2 VR	1.05	35.1	85.2	-0.10	0.28	-0.98

Die Analyse 1 (Tab. 9) macht deutlich, dass das Verteilungsverhalten der Neutralformen zu 82.5% auf einer gemeinsamen Ursache beruht und unabhängig vom Verteilungssystem ist. Der Beitrag des Liposomen-Systems an der gemeinsamen Eigenschaft fällt etwas kleiner aus als die $\log P_{\text{Oct}}$ - und $\log P_{\text{PGDP}}$ -Koeffizienten und weist auf vorhandene Unterschiede hin.

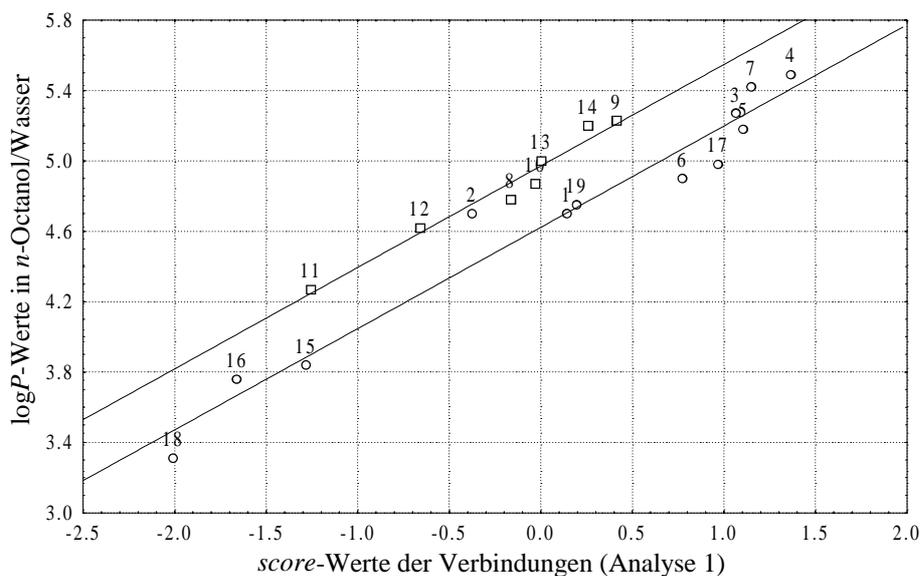


Abbildung 16: Einfluss des Protonierungscharakters auf die Verteilung in *n*-Octanol/Wasser; einfache Basen \circ ($n = 12$); zweifache Basen \square ($n = 7$).

Die lineare Korrelation der *score*-Werte der Arzneistoffe an der Hauptkomponente mit den $\log P$ -Werten der drei Verteilungssysteme ist dazu geeignet, um zu untersuchen, welche Verbindungen globale Gemeinsamkeiten im Verteilungsverhalten besitzen. Der einheitliche Anstieg der beiden Regressionsgeraden bestätigt, dass die Verteilung in *n*-Octanol/ Wasser auf gleichen Prinzipien basiert (Abb. 16).

$$\log P_{\text{Oct}} = 4.62 (\pm 0.04) + 0.58 (\pm 0.04) \text{ scores A1} \quad n = 12 \quad s = 0.15 \quad r^2 = 0.96 \quad F = 231.9$$

$$\log P_{\text{Oct}} = 4.97 (\pm 0.03) + 0.58 (\pm 0.05) \text{ scores A1} \quad n = 7 \quad s = 0.07 \quad r^2 = 0.96 \quad F = 130.6$$

Aus der Anordnung der Verbindungen nach ihrem strukturellen und Seitenkettenaufbau erkennt man den Einfluss der Anzahl an basischen Zentren, also den elektrostatischen Eigenschaften, auf die Größe der $\log P$ -Werte (SIRIUS). Der Eintrag von Promazin (Abb. 16; Nr. 2) besitzt die größten Abweichungen, was auf die ungeklärte Differenz der SIRIUS- und der ORIGIN-Werte zurückzuführen ist.

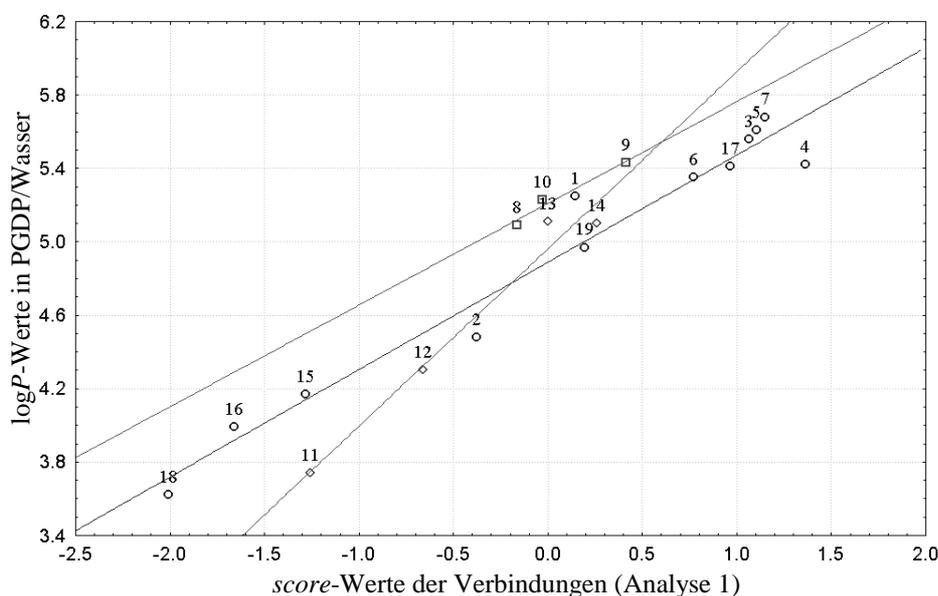


Abbildung 17: Einfluss des Protonierungscharakters und die Struktur auf die Verteilung in PGDP/ Wasser; einfache Basen \circ ($n = 12$); zweifache Basen ohne OH-Gruppe \square ($n = 3$); zweifache Basen mit OH-Gruppe \diamond ($n = 4$).

Betrachtet man nun die Korrelation mit den Verteilungskoeffizienten in PGDP/Wasser, sind drei Regressionen notwendig, um neben den elektrostatischen auch den strukturellen Einflüssen gerecht zu werden (Abb. 17). Die Einträge der Verbindungen, die eine Hydroxylgruppe besitzen ($n = 4$), können nicht auf der Geraden ($n = 3$) abgebildet werden, die den Zusammenhang der übrigen zweifachen Basen repräsentiert. Es ist daher wahrscheinlich, dass Wasserstoffbrücken am Verteilungsverhalten der Perazine und Flupenthixole im PGDP/Wasser-System beteiligt sind. Die Gerade der einfachen Basen ist wie in Abb. 16 zur Geraden der zweifachen Basen ohne OH-Gruppe parallel verschoben.

$$\log P_{\text{PGDP}} = 4.89 (\pm 0.04) + 0.59 (\pm 0.04) \text{ scores A1} \quad n = 12 \quad s = 0.15 \quad r^2 = 0.96 \quad F = 236.8$$

$$\log P_{\text{PGDP}} = 5.21 (\pm 0.03) + 0.55 (\pm 0.11) \text{ scores A1} \quad n = 3 \quad s = 0.05 \quad r^2 = 0.96 \quad F = 24.5$$

$$\log P_{\text{PGDP}} = 4.96 (\pm 0.08) + 0.97 (\pm 0.11) \text{ scores A1} \quad n = 4 \quad s = 0.13 \quad r^2 = 0.97 \quad F = 75.5$$

Wenn die Verteilungskoeffizienten $\log P$ an Liposomen als abhängige Größe in die Regression einfließen, entsteht ein vollkommen anderes Bild (Abb. 18). Eine Gemeinsamkeit zwischen den einfachen und zweifachen Basen ist nicht mehr zu erkennen. Die Ursachen, die zu diesen Unterschieden führen, können nur durch elektrostatische Effekte hervorgerufen sein, da jede Verbindungsklasse an sich gute Korrelationen zwischen den *scores* und den $\log P_m$ -Werten zeigen.

$$\log P_m = 4.55 (\pm 0.05) + 0.45 (\pm 0.05) \text{ scores A1} \quad n = 12 \quad s = 0.19 \quad r^2 = 0.90 \quad F = 92.3$$

$$\log P_m = 4.04 (\pm 0.04) + 0.05 (\pm 0.06) \text{ scores A1} \quad n = 7 \quad s = 0.09 \quad r^2 = 0.12 \quad F = 0.7$$

Bedingt durch geringe Varianz der $\log P_m$ -Werte der zweifachen Basen sind r^2 und F aus dieser Regression nicht allein aussagefähig; denn die Einträge der zweifachen Basen befinden sich nahe an der Regressionsgerade. Die Streuung der einfachen Basen um die Regressionsgerade zeigt, dass im liposomalen Verteilungssystem die charakteristischen Koeffizienten fehlerbehafteter sind als in den anderen Testsystemen (Abb. 18).

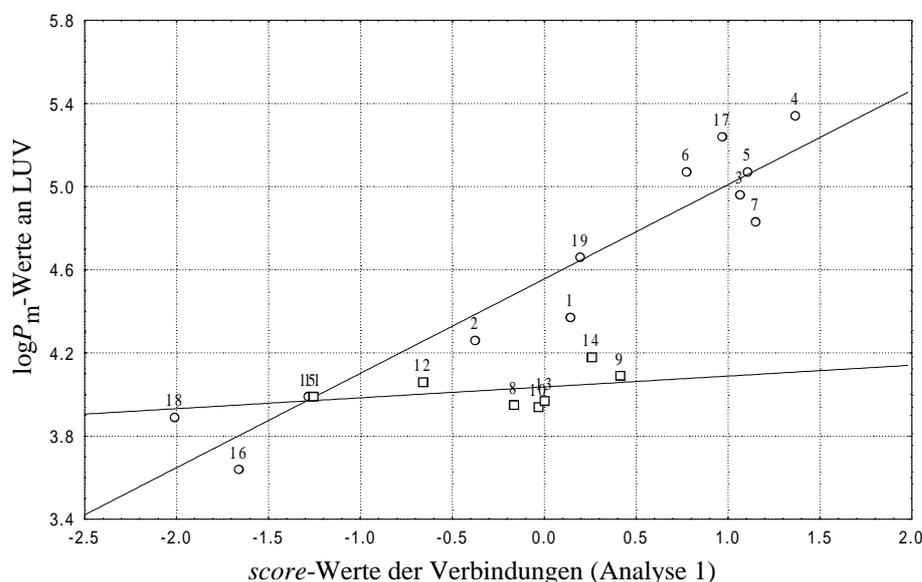


Abbildung 18: Einfluss des Protonierungscharakters auf die Verteilung an Liposomen; einfache Basen \circ ($n = 12$); zweifache Basen \square ($n = 7$)

Abschließend sollen noch die Koeffizienten der drei verwendeten Verteilungssysteme direkt durch lineare Regression verglichen werden. Die Korrelation der Koeffizienten der Neutralformen, $\log P_{\text{Oct}}$ gegen $\log P_m$, lieferte nur Parameter geringer Qualität ($n = 19$, $r^2 = 0.40$, $F = 11.2$). Deshalb wurde der Datensatz unterteilt. Für die einfachen Basen ($n = 12$) ergaben sich Zusammenhänge mit guter Qualität (Origin). Das Verteilungsverhalten dieser Verbindungen ist sowohl im *n*-Octanol/Wasser- als auch im Membran/Wasser-System ähnlich.

$$\log P_m = 1.21 (\pm 0.58) + 0.73 (\pm 0.12) \log P_{\text{Oct}} \quad n = 12 \quad s = 0.28 \quad r^2 = 0.78 \quad F = 34.9$$

Der Zusammenhang für die zweifachen Basen zeigt genau das Gegenteil ($n = 7$, $r^2 = 0.23$, $F = 1.5$). Eine direkte Übertragung des Verteilungsverhaltens der neutralen zweifachen Basen in *n*-Octanol/Wasser auf Membranen ist nicht möglich.

Eine Korrelation der aller $\log P$ -Werte in PGDP gegen $\log P_m$ führte erwartungsgemäß nicht zu einem relevanten Ergebnis ($n = 19$, $r^2 = 0.46$, $F = 14.2$). Die Verteilung der Gruppe der einfachen Basen in die nicht wässrigen Kompartimente wird von den lipophilen Eigenschaften der organischen Phasen bzw. der Membranlipide dominiert, was ähnliche Zusammenhänge in n -Octanol/Wasser nahelegen.

$$\log P_m = 1.05 (\pm 0.53) + 0.71 (\pm 0.10) \log P_{\text{PGDP}} \quad n = 12 \quad s = 0.25 \quad r^2 = 0.82 \quad F = 46.2$$

Die intermolekularen Wechselwirkungen des neutralen Piperazinrings mit der 1,2-Diesterstruktur, die sowohl in PGDP als auch in den Phosphatidylcholin-Molekülen vorhanden ist, sind nicht für die Differenzen im Verteilungsverhalten verantwortlich ($n = 7$, $r^2 = 0.01$, $F = 0.1$).

Das Verteilungsverhalten in n -Octanol und PGDP wird eindeutig von der lipophilen Eigenschaften einer chemischen Struktur bestimmt. Ein allgemeiner Zusammenhang im Verhalten von neutralen, basisch reagierenden Arzneistoffen konnte im Membran-Verteilungssystemen nicht gefunden werden. Entweder beruht die Verteilung auf der Gesamtlipophilie (in n -Octanol und PGDP) oder polare Wechselwirkungen überdecken den Lipophilieeinfluss (an LUV). Der Vergleich von Membran- und PGDP/Wasser-System zeigt, dass sich zweifache Basen in Membranen anders verhalten als die strukturverwandten einfach basischen Verbindungen.

3.5.3 Das Verteilungsverhalten der geladenen Molekülformen

3.5.3.1 Bisher veröffentlichte Zusammenhänge

Alle geladenen Molekülformen sind an Verteilungsprozessen zwischen wässriger Phase und Liposomen beteiligt (*Ottiger und Wunderli-Allenspach 1997*). Der SIP-Verteilungskoeffizient (*surface ion pair = SIP*) wird als Maß für die Verteilung geladener Arzneistoffmoleküle in Form von Ionenpaaren an und in Membranen betrachtet. Der jeweilige Molekülaufbau von Arzneistoffionen bestimmt die verschiedenen intermolekularen Kräfte zwischen den Arzneistoffionen in den einzelnen Phasen eines Verteilungssystems, wie Elektrostatik, die Wasserstoffakzeptor- oder -donoreigenschaften, van-der-Waals-Wechselwirkungen, Hydrophobie der Moleküle in wässriger Umgebung (*Ottiger und Wunderli-Allenspach 1997*). Daher sind geringen Korrelation zwischen den $\log P_{\text{ion}}$ -Werten in n -Octanol und den $\log K_{\text{SIP}}$ -Werten zu erwarten, da sich die nicht wässrigen Phasen ebenso in ihrer Struktur unterscheiden.

Allgemein haben positiv geladene Moleküle eine hohe Affinität zu Membranen (*Herbette et al. 1988*). Eine geladene Aminogruppe fungiert infolge der ionischen Wechselwirkungen mit der Phosphatgruppe des Membranlipides wie ein erster Anker des Arzneistoffmoleküls in der Membran. Ausgeprägte Alkylbestandteile können zusätzliche lipophile Interaktionspotentiale hinzufügen (*Seydel et al. 1989*). Da ionische Wechselwirkungen den größten Beitrag zum Gesamtenergieterm liefern, ist die Vereinheitlichung der Verteilungskoeffizienten von geladenen Verbindungen eine logische Erscheinung.

3.5.3.2 Übersicht zu gefundenen Zusammenhängen

Die $\log P_{\text{ion}}$ -Werte der einfachen Basen entstammen generell aus den Auswertungen mit Gl. 7 (Origin-Methode), die $\log P_{\text{ion}}$ -Koeffizienten der zweifachen Basen vom SIRIUS-Verfahren.

Der postulierte, schlechte Zusammenhang zwischen den $\log P_{\text{ion}}$ - und den $\log K_{\text{SIP}}$ -Werten wird für alle untersuchten Arzneistoffe ($n = 19$) bestätigt. Es besteht keine Gemeinsamkeit im Verteilungsverhalten der Ionen an Membranen weder mit *n*-Octanol/Wasser ($r^2 = 0.01$, $F = 0.1$) noch mit PGDP/Wasser ($r^2 = 0.18$, $F = 3.7$).

Die Unterteilung der Verbindungen nach dem Protonierungscharakter führt zu einer mäßigen Korrelation bei den einfachen Basen. Die $\log P_{\text{ion}}$ -Werte von Levomepromazin passen nicht in den Zusammenhang ($n = 11$). Bei den Ionen der einfachen Basen existieren wahrscheinlich gleichartige Mechanismen, die eine Verteilung sowohl in *n*-Octanol als auch in die Liposomen bewirken.

$$\log K_{\text{SIP}} = 1.64 (\pm 0.60) + 1.43 (\pm 0.36) \log P_{\text{ion Oct}} \quad n = 11 \quad s = 0.32 \quad r^2 = 0.64 \quad F = 16.0$$

Das Verteilungsverhalten der Ionen der einfachen Basen ist in den Systemen PGDP/Wasser und Liposom vollkommen verschieden und ohne systematischen Zusammenhang ($r^2 = 0.01$, $F = 0.1$).

Die elektrischen Eigenschaften des Piperazinringes, die sich aus polaren und ionischen Potentialen zusammensetzen, scheinen für das vereinheitlichte Verteilungsverhalten in LUV-Membranen verantwortlich zu sein, was mit den Ergebnissen sowohl in *n*-Octanol/Wasser ($n = 6$, $r^2 = 0.15$, $F = 0.7$) als auch in PGDP/Wasser ($n = 6$, $r^2 = 0.26$, $F = 1.4$) nicht in Einklang steht. Das einfach geladene Thiethylperazin-Kation hat einen außergewöhnlich hohen $\log K_{\text{SIP}}$ -Wert und stellt, statistisch gesehen, einen Ausreißer dar.

Eine hervorragende Korrelation der Ionen-Verteilungskoeffizienten ist aber mit den *n*-Octanol-Werten der Phenothiazine und Thioxanthene zu finden, die eine endständige Hydroxylgruppe besitzen ($n = 4$).

$$\log K_{\text{SIP}} = 2.46 (\pm 0.15) + 0.32 (\pm 0.07) \log P_{\text{ion Oct}} \quad n = 4 \quad s = 0.07 \quad r^2 = 0.98 \quad F = 100.6$$

Erst bei einheitlichen intermolekularen Wechselwirkungen der Hydroxylgruppe und des Piperazinrings machen sich die Unterschiede in der Lipophilie der verschiedenen trizyklischen Ringstrukturen und der Cl/CF₃-Substituenten bemerkbar. Ein ähnlicher Zusammenhang ist bei den vier Perazinen und Flupenthixolen auch mit den PGDP-Werten vorhanden ($r^2 = 0.79$, $F = 7.6$).

Gemeinsamkeiten bestehen nur im Verteilungsverhalten der einfach protonierten Basen im *n*-Octanol/Wasser- und im liposomalen System. Bei den Verbindungen mit einem Piperazinring überlagern die ionischen Wechselwirkungen mit den Phosphatidylcholin-Molekülen die Abhängigkeit der $\log P$ -Größe von der Lipophilie der Molekülstrukturen. Die schlechten Lösungsmitelegenschaften von PGDP gegenüber geladenen Verbindungen wirken sich auch auf die Qualität des Vergleichs mit dem Membransystem aus. Die gemeinsamen Effekte von Polarität und Ladung am Piperazinring verstärken auch hier die Divergenz.

Trotz unterschiedlichen Aufbaus der organischen Phasen und der strukturellen Varianz der einbezogenen Arzneistoffmoleküle beruht die Verteilung aller einfach geladenen Ionen im *n*-Octanol/Wasser-System auf einer gemeinsamen Eigenschaft (Abb. 19). In der durchgeführten Hauptkomponenten-Analysen A2 (Tab. 9) erklärt der erste Eigenwert 50.1% der gemessenen Verteilungs-

koeffizienten. Die erste, Varimax-Standard rotierte Hauptkomponente wird signifikant nur durch die Werte aus den Verteilungssystemen mit einer homogenen organischen Phase geladen.

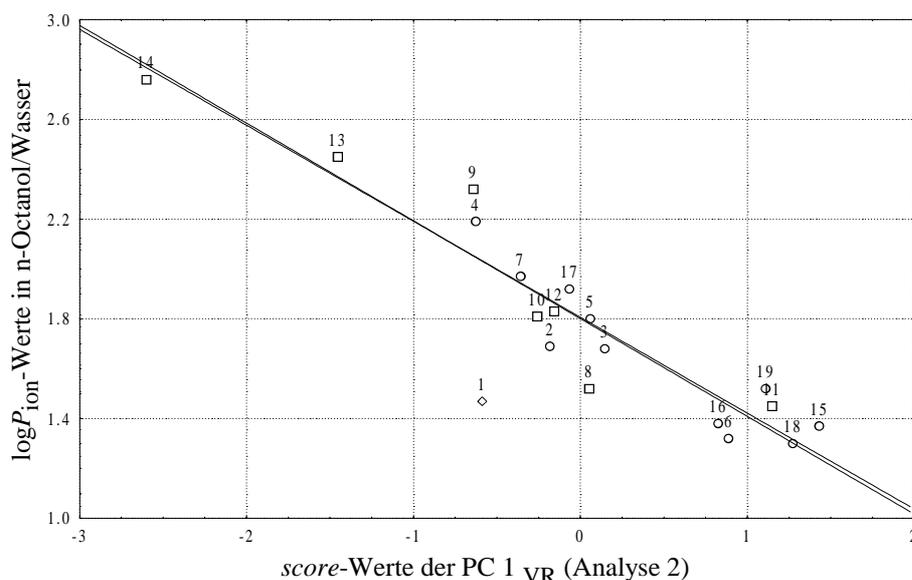


Abbildung 19: Korrelationen der *scores* der varimax-rotierten 1. Hauptkomponente (Analyse 2) mit den $\log P_{\text{ion}}$ -Werten in *n*-Octanol/Wasser; einfache Basen ○ ; zweifache Basen □ .

Ohne Berücksichtigung von Promethazin (Abb. 19, Nr. 1) können die Einträge der Verbindungen zu einer Regressionsgeraden zusammengefasst werden, wenn die $\log P_{\text{ion}}$ -Werte in *n*-Octanol/Wasser als abhängige Größe verwendet werden.

$$\log P_{\text{ion Oct}} = 1.81 (\pm 0.03) - 0.39 (\pm 0.03) \text{ scores A2}_{\text{PC1}} \quad n = 18 \quad s = 0.14 \quad r^2 = 0.90 \quad F = 140.0$$

Eine sehr heterogene Anordnung entsteht, wenn die $\log P_{\text{ion}}$ -Werten in PGDP/Wasser betrachtet werden (Abb. 20), obwohl dieses Verteilungssystem ebenso einen hohen Beitrag an der 1. PC besitzt. Zudem erschwert die Konzentration der Einträge im Zentrum die Beurteilung der Ergebnisse der linearen Regression. Promethazin (Abb. 20, Nr. 1) zeigt wiederum ein abweichende Verteilungsverhalten und kann in die Auswertungen nicht einfließen.

Die parallel verschobenen Regressionsgeraden der einfachen und zweifachen Basen wie in Abb. 17 fallen zusammen, egal ob nur die $\log P_{\text{ion}}$ -Werte der einfachen Basen ($n = 11$) oder gemeinsam mit den Koeffizienten der zweifachen Basen ohne OH-Gruppe betrachtet werden ($n = 14$).

$$\log P_{\text{ion PGDP}} = 1.56 (\pm 0.04) - 0.19 (\pm 0.05) \text{ scores A2}_{\text{PC1}} \quad n = 11 \quad s = 0.12 \quad r^2 = 0.58 \quad F = 12.5$$

$$\log P_{\text{ion PGDP}} = 1.58 (\pm 0.04) - 0.19 (\pm 0.06) \text{ scores A2}_{\text{PC1}} \quad n = 14 \quad s = 0.14 \quad r^2 = 0.50 \quad F = 12.2$$

Dass PGDP zur Bestimmung der Ionenverteilung weniger geeignet ist als *n*-Octanol, zeigt auch die Abnahme der Signifikanz der Korrelation, wenn alle Arzneistoffe ($n = 19$) einbezogen werden.

$$\log P_{\text{ion PGDP}} = 1.60 (\pm 0.03) - 0.22 (\pm 0.03) \text{ scores A2}_{\text{PC1}} \quad n = 18 \quad s = 0.13 \quad r^2 = 0.77 \quad F = 54.5$$

Die zweifachen Basen mit einer Hydroxylgruppe ($n = 4$) bilden keine eigene Gruppe, da Anstieg und Ordinatenabschnitt mit dem Ergebnis der Regression aller Verbindungen ($n = 18$) identisch sind.

$$\log P_{\text{ion PGDP}} = 1.63 (\pm 0.04) - 0.23 (\pm 0.02) \text{ scores A2}_{\text{PC1}} \quad n = 4 \quad s = 0.07 \quad r^2 = 0.98 \quad F = 89.3$$

Membranen bestimmen die lipophilen Eigenschaften der Ionen der einfach protonierbaren Verbindungen ($n = 12$). Die Werte von Amlodipin (Abb. 21, Nr. 18) und Nicardipin (Abb. 21, Nr. 19) entziehen sich etwas dem linearen Zusammenhang. Der besonders hohe bzw. niedrige pK_a -Wert können das abweichende Verteilungsverhalten erklären.

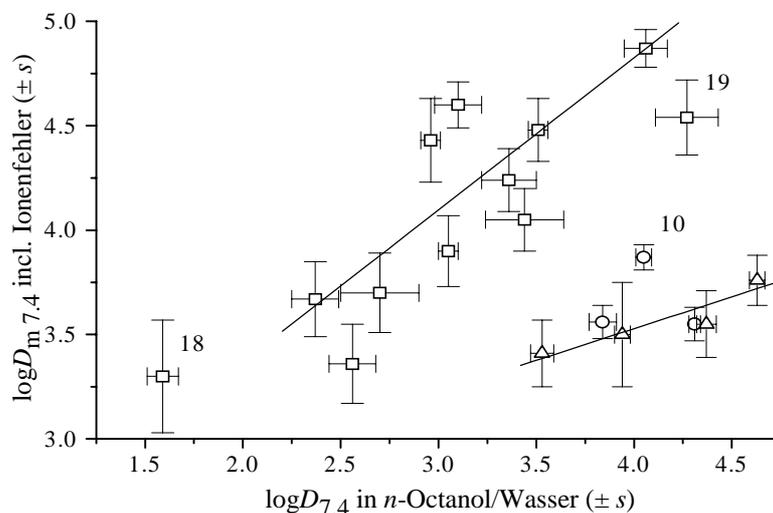


Abbildung 21: Übersicht zum Verteilungsverhalten beim physiologischem pH-Wert 7.4; $\log D_{7.4}$ n -Octanol/Wasser zu $\log D_{m 7.4}$ Liposom; einfache Basen (\square); zweifache Basen ohne (\circ) und mit (\triangle) Hydroxylgruppe.

Der andere Einfluss der Elektrostatik auf das Verteilungsverhalten bei den zweifachen Basen ($n = 6$) in Membranen kommt durch den unterschiedlichen Anstieg der betreffenden Regressionsgeraden zum Ausdruck.

$$\log D_{m 7.4} = 2.29 (\pm 0.38) + 0.59 (\pm 0.12) \log D_{7.4 \text{ Oct}} \quad n = 12 \quad s = 0.29 \quad r^2 = 0.71 \quad F = 24.4$$

$$\log D_{m 7.4} = 2.57 (\pm 0.31) + 0.24 (\pm 0.08) \log D_{7.4 \text{ Oct}} \quad n = 6 \quad s = 0.07 \quad r^2 = 0.71 \quad F = 10.0$$

Variationen im strukturellen Aufbau dieser Moleküle haben eine stärkere Zu- oder Abnahme des $\log D_{7.4}$ -Wertes in n -Octanol/Wasser als im liposomalen Verteilungssystem zur Folge. Die Werte von Thiethylperazin (Abb. 21, Nr. 10) passen wiederum nicht in die Gleichung, da sich die Ionen stärker als alle anderen zweifachen Basen in die Membran verteilen.

4 Chromatografische Bestimmung des Verteilungsverhaltens

4.1 Charakterisierung von chromatografischen Säulen als künstliche immobilisierte Membran

Eine andere Methode zur Analyse des Einflusses von Ladungen und von intermolekularen van-der-Waals-Wechselwirkungen auf das Verteilungsverhalten von Arzneistoffen sowie zur Bestimmung von Lipophiliekonstanten stellen hochdruck-flüssigchromatografische Untersuchungen dar, die mit *n*-Octanol beschichteten RP18-HPLC-Säulen und mit *n*-Octanol gesättigtem Puffer durchgeführt werden (Miyake und Terada 1978). Seit ca. 10 Jahren werden auch mit Phosphatidylcholin bedeckte Oberflächen als stationäre Phasen verwendet (Ong et al. 1995). Die an die Säulenoberfläche kovalent über eine ω -Carboxylgruppe gebundenen Phospholipidbausteine werden als immobilisierte künstliche Membran (*immobilized artificial membrane* = IAM) bezeichnet, da deren Aufbau einer Zellmembran sehr ähnlich ist. Direkt auf der Silica-Oberfläche befindet sich eine ca. 15 Å starke lipophile Schicht von parallel angeordneten Kohlenwasserstoffketten der Fettsäuren (Abb. 22). Auf dem Rückgrat eines Glycerolmoleküls bilden die Cholinkopfgruppen eine polare Oberfläche mit einer Tiefe von 7 Å. Die Ladungszentren jedes elektrisch neutralen Phosphatidylcholin-Moleküls haben einen Abstand von ca. 4,5 Å.

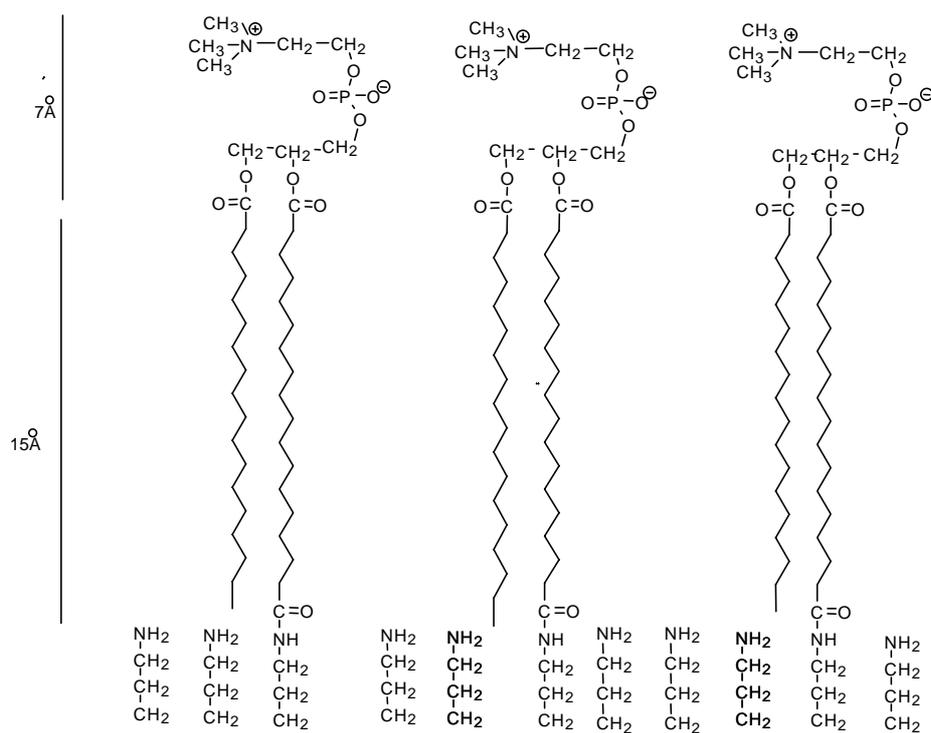


Abbildung 22: Struktureller Aufbau einer immobilisierten künstlichen Membran

³¹P-NMR-Messungen zeigten, dass die IAM-Oberfläche ähnliche Bewegungseigenschaften wie die Oberfläche fluider Liposomen besitzt (Markovich et al. 1989; Stevens et al. 1989; Qiu und Pidgeon 1993). Unerwünschte Wechselwirkungen freier Endgruppen des Amino-RP-Materials mit zu eluierenden Molekülen können durch *endcapping* verhindert werden, indem sie mit Methylglycolat in

Amide überführt werden (*Stevens et al. 1989*). Hauptsächliche Unterschiede zu einer natürlichen Membran ergeben sich dadurch, dass die Oberfläche einer IAM-Säule nur aus einem Monolayer besteht, bei dem durch die kovalente Bindung die innere Beweglichkeit der Membranbestandteile und die laterale Diffusion behindert ist. Phänomene wie flip-flop und axiale Verdrängung können nicht stattfinden.

Das Verteilungsverhalten der Arzneistoffe, insbesondere der undissoziierbaren Arzneistoffe, wurde an einer *endcapped* IAM-Säule untersucht, wobei dazu zwei Retentionsmechanismen diskutiert werden (*Qiu und Pidgeon 1993*):

- Verteilung von neutralen Molekülen in die lipophile Region der Fettsäureketten;
- Adsorption von polaren oder geladenen Molekülen an die polaren Kopfgruppen der Phosphatidylcholin-Moleküle.

Im allgemeinen werden Mischformen der Mechanismen erwartet, da viele Substanzen sowohl hydrophile, polare als auch lipophile Strukturbereiche besitzen. Entsprechend den physikochemischen Eigenschaften des Säulenmaterials und des Laufmittels werden entweder rein van-der-Waals-Wechselwirkungseffekte bei neutralen Verbindungen oder polare bzw. auf Ladungen zurückzuführende Effekte erkannt (*Barbato et al 1996; Barbato et al. 1997*).

Die Retentionszeit von Verbindungen hängt linear vom Acetonitrilgehalt und logarithmisch von der Phosphationenkonzentration des Laufmittels ab (*Caldwell et al. 1998*), wobei durch Extrapolation das jeweilige Maß des Einflusses festgestellt werden kann. In meinen Untersuchungen wurde eine stoffspezifische Konstante $\log k'_{XY}$ für ein Acetonitril- und fast Phosphationen freies System durch multiple lineare Regression berechnet nach:

$$\log k'_{XY} = \log k' + A \cdot ([AcCN]\%) + B \cdot \log ([Phosphat]mM) \quad \text{Gl. 10}$$

Den logarithmierten Kapazitätsfaktor, $\log k'$, einer Verbindung kann man außerdem als deren Lipophiliekonstante bezeichnen. Unterschiede im lipophilen Charakter der Verbindungen äußern sich in verschiedenen Retentionszeiten. In Gl. 10 repräsentiert $\log k'_{XY}$ den experimentell zugänglichen logarithmierten Kapazitätsfaktor bei einem Laufmittel mit definierter Acetonitril- und Phosphatkonzentration, der Koeffizient A der Einfluss des Acetonitrilgehalts des Laufmittels ([AcCN]%) und der Koeffizient B der Einfluss der Phosphationenkonzentration des Laufmittels ([Phosphat]mM).

4.2 Experimentelle Bedingungen

Das Hochdruckflüssigchromatographiesystem (JASCO) bestand aus der Pumpe PU-980, dem Detektor UV-975UV-VIS, dem Integrator MS-1457-LE und der RHEODYNE-Einspritzeinrichtung 7145 mit einer 50 µl Schleife. Die IAM-Säule von REGIS (IAM.PC.MG) enthielt kovalent gebundenes Phosphatidylcholin und war zudem mit Methylglycolat behandelt worden. Die Totzeit des Systems betrug 0.25 Minuten (Thioharnstoff) bei einem Fluss von 1ml/min.

Die als Salz vorliegenden Arzneistoffe konnten in reinem Phosphatpuffer (20 mM) gelöst werden. Die Neutralstoffe wurden unter weiterer Zugabe von Acetonitril in Lösung gebracht. Die Konzentration der Injektionsproben lag zwischen 0.3 und 0.9 mg/ml. Als Laufmittel wurden Gemische von Phosphatpuffer pH 5.4 nach Sørensen und Acetonitril verwendet. Die Konzentration der Phosphationen variierte zwischen 30 mM und 100 mM, der Gehalt an Acetonitril von 15 Vol.-% bis

30 Vol.-%. Die Messungen erfolgten bei Umgebungstemperatur mit jeweils 2 bis 10 μl Probenlösung mit einer Flussrate von 1 ml/min und bei einer Detektionswellenlänge von 260 nm für alle Verbindungen. Die Messungen der Retentionszeit wurden mindestens viermal wiederholt; die Mittelwerte dienten der Berechnung der Kapazitätsfaktoren (Abschnitt 9.4, Tab. A5).

4.3 Ergebnisse und Diskussion

4.3.1 Die Kapazitätsfaktoren der Arzneistoffe

In Vorversuchen bei pH-Werten des Laufmittels zwischen 6 und 7 zeigte sich (Elnaw 1997; Cloos 1998), dass die Verbindungen unter starkem Tailing eluieren. Freie OH-Gruppen der Silica-Schicht können dafür verantwortlich sein. Eine gute Reproduzierbarkeit der Messungen am IAM-Säulen ist bei pH-Werten < 6 gegeben. Bei einem schwach sauren pH von 5.4 bestand eine akzeptable Signalsymmetrie und die basischen Verbindungen lagen einheitlich protoniert vor. Eine Vergleichbarkeit der Verteilungskonstanten mit den potentiometrisch zugänglichen $\log D$ -Werten ist somit möglich. Die Ergebnisse mit den zur Verfügung stehenden Arzneistoffen als auch mit drei Referenzsubstanzen sind in der Tab. 10 dargestellt.

In die multiple lineare Regression wurden jeweils nur die $\log k'_{XY}$ -Werte einbezogen, die sich entweder in der Phosphationen- oder der Acetonitrilkonzentration oder in beidem unterschieden, um eine Übergewichtung einzelner Retentionszeiten zu vermeiden. Einzelne Messwerte (Retentionszeiten) wurden ausgeschlossen, wenn sie sich mehr als zwei Standardabweichungen vom berechneten $\log k'_{XY}$ -Wert unterschieden. Das Auslassen einzelner Punkte war die Folge von Misch- und Volumenfehlern, die bei der Herstellung des Puffers und des Laufmittels entstanden. Die Zahl der einzelnen Retentionszeiten, die in die Regression eingegangen sind (Tab. 10), wurden in Diplomarbeiten (Elnaw 1997; Cloos 1998) dokumentiert oder durch eigene Messungen vervollständigt.

Alle Varianzwerte liegen bei den untersuchten Verbindungen oberhalb von 0.95. Die größeren Standardabweichungen, relativ zu den übrigen Regressionen, fallen bei den $\log k'$ -Werten der Arzneistoffe auf, die aus vier bis sieben Einzelwerten (n) extrapoliert wurden. Da die Messbedingungen bekannt waren, wählte ich einen wesentlich breiteren Bereich im Acetonitrilgehalt der Laufmittel. Dadurch wirkten sich Schwankungen von $\pm \frac{1}{2}$ Vol.-% AcCN durch den linearen Einfluss (Gl. 10) stärker auf die statistische Qualität der $\log k'$ -Extrapolation aus.

Die negativen Koeffizienten A und B belegen (Tab. 10), dass mit zunehmender Acetonitril- und Phosphationenkonzentration des Laufmittels die Retentionszeiten abnehmen. Erstens besitzt Acetonitril eine höhere Elutionskraft als Wasser für lipophile Moleküle; zweitens steigt die Ladungsdichte im Laufmittel bei einer höheren Ionenkonzentration, die zu zunehmender Besetzung von elektrostatischen Wechselwirkungsstellen an der IAM-Oberfläche durch Phosphationen führt. Mit zunehmender Ionenstärke des Laufmittels müsste es auch zu einem „Aussalzeffekt“ an den gelösten Arzneistoffmolekülen an der Säule kommen. Dieser polare Effekt konnte nicht beobachtet werden. Bei den neutralen Molekülen stellte sich der Phosphatkoeffizient B als nicht signifikant heraus.

Tabelle 10: Extrapolierte $\log k'$ -Werte mit den Koeffizienten und statistischen Angaben

Nr.	Verbindung	$\log k' \pm s$	A	B	r^2	F	n
			[AcCN] %	log [Phosphat] mM			
1	Promethazin	2.760 ± 0.099	-0.045 ± 0.0030	-0.575 ± 0.026	0.982	306	14 ^b
2	Promazin	2.657 ± 0.280	-0.052 ± 0.0051	-0.513 ± 0.148	0.976	62	6 ^d
3	Chlorpromazin	3.209 ± 0.258	-0.058 ± 0.0040	-0.605 ± 0.109	0.986	107	6 ^d
4	Chlorprothixen	3.112 ± 0.218	-0.061 ± 0.0041	-0.494 ± 0.091	0.956	110	13 ^e
5	Triflupromazin	3.627 ± 0.092	-0.062 ± 0.0026	-0.577 ± 0.028	0.987	425	14 ^b
6	Levomepromazin	3.098 ± 0.074	-0.053 ± 0.0021	-0.592 ± 0.022	0.99	574	14 ^b
7	Thioridazin	3.988 ± 0.076	-0.070 ± 0.0022	-0.564 ± 0.020	0.992	715	14 ^b
8	Prochlorperazin	3.889 ± 0.108	-0.064 ± 0.0031	-0.559 ± 0.033	0.983	315	14 ^b
9	Trifluoperazin	4.140 ± 0.095	-0.070 ± 0.0027	-0.578 ± 0.028	0.998	471	14 ^b
10	Thiethylperazin	4.245 ± 0.116	-0.072 ± 0.0033	-0.556 ± 0.035	0.983	320	14 ^b
11	Perphenazin	3.353 ± 0.287	-0.066 ± 0.0053	-0.527 ± 0.153	0.989	87	5 ^d
12	Fluphenazin	3.632 ± 0.175	-0.066 ± 0.0031	-0.675 ± 0.079	0.991	222	7 ^d
13	cis-Flupenthixol	3.745 ± 0.233	-0.067 ± 0.0043	-0.687 ± 0.125	0.993	145	5 ^d
14	trans-Flupenthixol	3.812 ± 0.220	-0.072 ± 0.0040	-0.600 ± 0.118	0.997	182	4 ^d
15	Verapamil	2.120 ± 0.070	-0.052 ± 0.0018	-0.384 ± 0.026	0.993	430	9 ^c
16	Gallopamil	2.687 ± 0.267	-0.058 ± 0.0048	-0.633 ± 0.141	0.983	87	6 ^d
17	Fendilin	2.617 ± 0.185	-0.064 ± 0.0048	-0.320 ± 0.068	0.967	88	9 ^c
18	Amlodipin	2.442 ± 0.076	-0.058 ± 0.0020	-0.408 ± 0.028	0.993	454	9 ^c
19	Nicardipin	2.500 ± 0.072	-0.059 ± 0.0019	-0.372 ± 0.026	0.994	524	9 ^c
20	Nifedipin	1.409 ± 0.087	-0.055 ± 0.0021	-0.069 ± 0.037 ^a	0.993	344	8 ^c
21	Nitrendipin	2.033 ± 0.052	-0.070 ± 0.0012	-0.057 ± 0.022 ^a	0.998	1607	8 ^c
22	Felodipin	2.399 ± 0.038	-0.083 ± 0.0034	-0.079 ± 0.098 ^a	0.997	303	5 ^d
23	Nisoldipin	2.221 ± 0.085	-0.074 ± 0.0020	-0.005 ± 0.036 ^a	0.996	684	8 ^c
24	Nilvadipin	2.120 ± 0.084	-0.070 ± 0.0020	-0.047 ± 0.036 ^a	0.996	617	8 ^c
25	Nimodipin	1.940 ± 0.042	-0.065 ± 0.0010	-0.037 ± 0.018 ^a	0.999	2114	8 ^c
26	Isradipin	1.841 ± 0.374	-0.071 ± 0.0068	-0.143 ± 0.207 ^a	0.975	57	6 ^d
A	Phenothiazin	2.157 ± 0.168	-0.062 ± 0.0050	0.088 ± 0.047 ^a	0.947	83	14 ^b
B	2-Chlor-phenothiazin	3.002 ± 0.125	-0.071 ± 0.0035	0.012 ± 0.037 ^a	0.974	209	14 ^b
C	2-Acetyl-phenothiazin	2.363 ± 0.138	-0.065 ± 0.0068	-0.004 ± 0.001 ^a	0.946	96	14 ^b

^a nicht signifikanter Parameter. ^b Elnaw 1997. ^c Cloos 1998. ^d eigene Messungen.
^e eigenen Messungen und Cloos 1998.

Aus der relativen Größe der Konstante $\log k'$ können mehrere Aussagen abgeleitet werden:

Liegen die Arzneistoffmoleküle bei pH 5.4 als Ionen vor, ist $\log k'$ ein Maß für den scheinbaren Verteilungskoeffizienten der Verbindung, der bei den protonierbaren Basen den Verteilungskoeffizienten der fast ausschließlich vorliegenden Monokationen entspricht. Nach diesem Kriterium sind die Ionen von Thioridazin und Thiethylperazin die lipophilsten Strukturen in den Gruppen der einfachen bzw. zweifachen Basen. Das einfach geladene Thiethylperazin-Kation besitzt auch den größten $\log P_m^{\text{IP}}$ -Wert im Liposomen-Verteilungssystem (Abschnitt 3.4.4.2.2).

Für die neutralen Phenothiazine und 1,4-Dihydropyridine ergibt sich eine Reihenfolge im lipophilen Charakter der Moleküle. Diese $\log k'$ -Reihenfolge ist vom chromatografischen Verteilungssystem, an RP, an *n*-Octanol beschichteter RP und an IAM, unabhängig (Cloos 1998).

4.3.2 Die Effekte von Acetonitril und von Phosphationen

Der Einfluss von Acetonitrils auf das Retentionsverhalten wird mit zunehmender Lipophilie der Moleküle größer. Als unabhängige Bezugsgröße muss der auf ein rein wässriges Laufmittel extrapolierte $\log k'$ -Wert eingebracht werden, da der absolute Einfluss des Acetonitrils die von der Molekülstruktur bestimmten hydrophilen/hydrophoben Solvatationseigenschaften kennzeichnet. Die verschiedenen Beträge von 0.045 bis 0.087 können zu nichtlinearen Verschiebungen in den gegenseitigen Beziehungen der $\log k'_{\text{XY}}$ -Werte bei einem beliebigen acetonitrilhaltigen Laufmittel führen. Unterteilt man die Arzneistoffe entsprechend ihrer Grundstruktur, resultieren lineare Zusammenhänge hoher Korrelation von $\log k'$ und dem Koeffizienten des Acetonitrilfaktors, wie aus Abb. 23 zu ersehen ist.

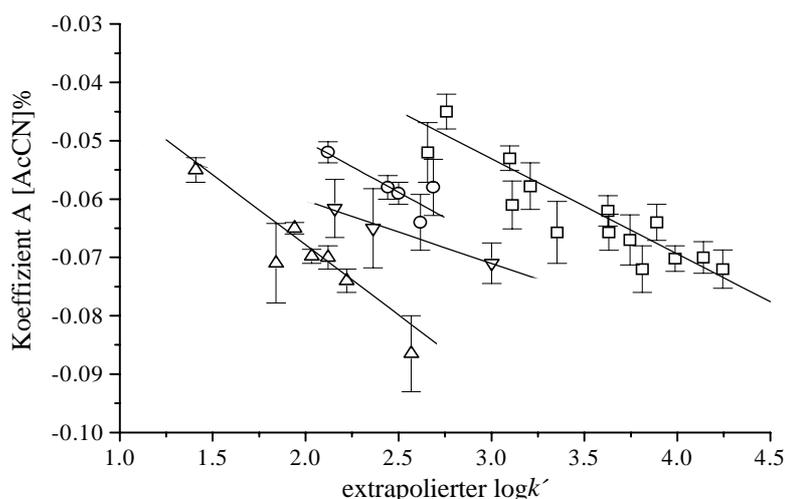


Abbildung 23: Gruppierung der Verbindungen nach dem Koeffizienten A ([AcCN]%):

basische Phenothiazine und Thioxanthenen □ ; neutrale Phenothiazine ∇ ;
 basische Calcium-Kanal-Blocker ○ ; neutrale 1,4 Dihydropyridine Δ .

Die Retention der nicht de/protonierbaren Verbindungen wird stärker vom Acetonitrilgehalt des Laufmittels beeinflusst als bei den strukturverwandten, positiv geladenen Verbindungen. Dabei besitzen die neutralen 1,4-Dihydropyridine die größten Abhängigkeit zwischen der Zunahme des logarithmierten Kapazitätsfaktors und der Zunahme des Acetonitrileinflusses. Allgemein weisen kleinere Werte des Acetonitrilkoeffizienten B darauf hin (basische Verbindungen; Abb. 23), dass die Wechselwirkungen zwischen den geladenen Arzneistoffmolekülen und den Phosphatidylcholinen weniger durch die hydrophilen Eigenschaften der flüssigen Phase bestimmt werden.

Der für die Effekte der Phosphationen charakteristische Koeffizient B ist nur bei Korrelation mit den logarithmierten Kapazitätsfaktoren von ionischen Arzneistoffmolekülen signifikant (Tab. 10). Der extrapolierte $\log k'$ -Wert aller neutralen 1,4-Dihydropyridine und der Phenothiazine ohne basische Seitenkette wird statistisch gesehen nicht durch die Phosphationenkonzentration beeinflusst. Die Retentionszeiten der protonierten Arzneistoffe werden bei zunehmender Ionenstärke bzw. der Hydrophilie der Laufmittel exponentiell kleiner (Abb. 24).

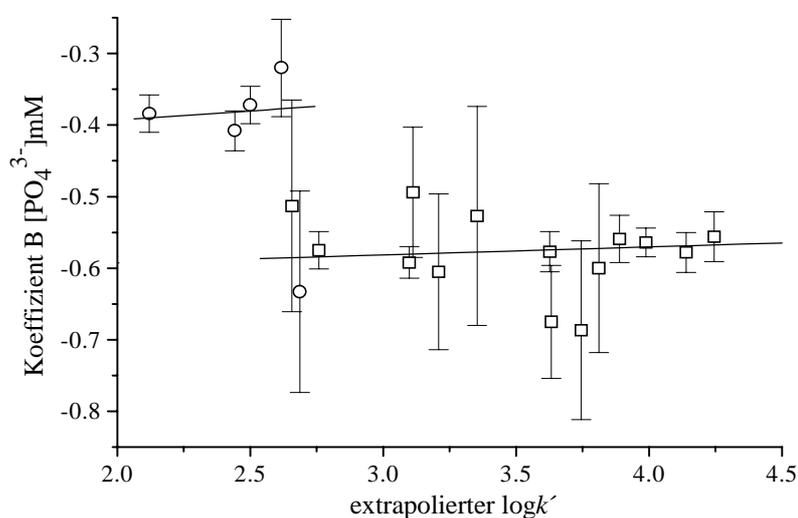


Abbildung 24: Gruppierung der Verbindungen nach dem Koeffizienten B ($\log[\text{Phosphat}]$ mM):
basische Phenothiazine und Thioxanthene □ ; basische Calcium-Kanal-Blocker ○ .

Das negative Vorzeichen und die großen Beträge vom Koeffizient B, der den Einfluss der Phosphationenkonzentration auf die Kapazitätsfaktoren $\log k'$ beinhaltet, zeigen, dass elektrostatische Wechselwirkungen an den Interaktionen der geladenen Verbindungen mit den immobilisierten Phospholipiden entscheidend beteiligt sind. Für die geladenen Phenothiazine und Thioxanthene scheint es jedoch ein einheitliches Plateau des Phosphationen-Effektes zu geben (Abb. 24).

Die unterschiedlichen Auswirkungen des Kosolvents AcCN und der Phosphationen auf die Retention der geladenen Moleküle soll im folgenden deutlich gemacht werden. Es wurden die logarithmierten Kapazitätsfaktoren für die drei Laufmittel, 20% AcCN (1 mM), 50 mM Phosphatpuffer (acetonitrilfrei) oder 20% AcCN mit 50 mM Phosphatpuffer für jede Verbindung berechnet (Gl. 10) und den extrapolierten $\log k'$ -Werten gegenübergestellt. Die Korrelation mit den Kapazitätsfaktoren bei 20% AcCN, $\log k'_{20/00}$, zeigt eine Parallelverschiebung zu den acetonitrilfreien $\log k'$ -Werten.

$$\log k'_{20/00} = -1.17 (\pm 0.12) + 0.96 (\pm 0.04) \log k' \quad n = 29 \quad s = 0.17 \quad r^2 = 0.95 \quad F = 548.6$$

Für die geladenen Arzneistoffe ($n = 19$) ergeben sich statistisch gut abgesicherte Zusammenhänge der Phosphationenkonzentration auf das Retentionsverhalten. Allerdings ist der Anstieg der Regressionsgeraden kleiner als Eins.

$$\log k'_{00/50} = -0.37 (\pm 0.17) + 0.83 (\pm 0.05) \log k' \quad n = 19 \quad s = 0.14 \quad r^2 = 0.94 \quad F = 263.6$$

Folglich kann man die Effekte von AcCN und der Phosphationen ($\log k'_{20/50}$) auf das Retentionsverhalten gemeinsam in einer Gleichung für die protonierten Verbindungen zum Ausdruck bringen.

$$\log k'_{20/50} = -1.01 (\pm 0.15) + 0.65 (\pm 0.04) \log k' \quad n = 19 \quad s = 0.12 \quad r^2 = 0.93 \quad F = 213.9$$

Unter Beibehalten der hohen Korrelation ist eine weitere Abnahme des Anstiegs der Regressionsgeraden festzustellen, wodurch gleichzeitig lipophile und elektrostatische Wechselwirkungen von geladenen Molekülen an der IAM-Oberfläche nachweisbar werden. Bei den neutralen Substanzen treten nur lipophile Interaktionen in Erscheinung.

4.4 Korrelationen mit anderen Verteilungskoeffizienten

4.4.1 Die Koeffizienten der protonierbaren Verbindungen

Bei der Anwendung einer mit *n*-Octanol gesättigten RP18-Säule konnten lineare Zusammenhänge zwischen den $\log k'$ -Werten mit den korrespondierenden $\log P$ -Koeffizienten bei undissoziierbaren Verbindungen und den $\log D_{5,4}$ -Koeffizienten bei protonierbaren Molekülen gefunden werden (Cloos 1998). In zahlreichen Publikationen wurden logarithmierte Kapazitätsfaktoren von Arzneistoffen, an IAM-Säulen bestimmt, den unterschiedlichsten Verteilungskoeffizienten in *n*-Octanol/Wasser oder an Liposomen bzw. Membranen gegenübergestellt (Kaliszan et al. 1993; Kaliszan et al. 1994; Barbato et al. 1996; Ong et al. 1996; Barbato et al. 1997). Sowohl gute als auch schlechte Korrelationen lassen an einer allgemeinen Übertragbarkeit der chromatografischen Ergebnisse auf das Verteilungsverhalten zweifeln.

Von großem Einfluss auf das Ergebnis der Korrelationen zwischen den unterschiedlichen Koeffizienten ist der einheitliche Dissoziationsgrad der Verbindungen. Dementsprechend wurden die jeweiligen Verteilungskoeffizienten der Neutralform, der einfach protonierten Form und die scheinbaren Verteilungskoeffizienten bei pH 7.4 in die Korrelationen einbezogen, um mögliche Ladungs- oder van-der-Waals-Effekte bei den Wechselwirkungen mit IAM-Oberflächen zu erkennen. Die $\log P_{10n}$ - und die $\log D_{5,4}$ -Werte der basischen Verbindungen differierten kaum in den Verteilungssystemen organische Phase/Wasser (Tab. 8), weshalb keine Korrelationen mit den scheinbaren Verteilungskoeffizienten bei pH 5.4 durchgeführt wurden. Eine Ausnahme stellt Nicardipin aufgrund des niedrigen pK_a -Wertes von 7.34 dar.

Die Korrelationen der $\log k'$ -Werte der basischen Arzneistoffe zeigen keine Zusammenhänge mit den Koeffizienten $\log P / \log P_{10n}$ in *n*-Octanol/Wasser. Ohne Nicardipin ($n = 18$) gibt es eine hinreichende, wenn auch nicht befriedigende Korrelation mit den $\log D_{7,4}$ -Werten.

$\log k' = 0.05 (\pm 1.00) + 0.68 (\pm 0.21) \log P_{\text{ion Oct}}$	$n = 19$	$s = 0.52$	$r^2 = 0.38$	$F = 10.4$
$\log k' = 1.60 (\pm 0.55) + 0.93 (\pm 0.30) \log P_{\text{ion Oct}}$	$n = 19$	$s = 0.53$	$r^2 = 0.36$	$F = 9.5$
$\log k' = 0.99 (\pm 0.38) + 0.68 (\pm 0.11) \log D_{7.4 \text{ Oct}}$	$n = 18$	$s = 0.35$	$r^2 = 0.71$	$F = 40.0$

Sowohl lipophile als auch ionische Effekte tragen gemeinsam zur Interpretation der intermolekularen Wechselwirkungen an IAM-Säulen bei. Reine van-der-Waals-Wechselwirkungen besitzen nur einen Anteil am Retentionsverhalten.

Nur für die Phenothiazine ($n = 10$) lassen sich aber die $\log k'$ -Werte an künstlichen Membranen durch die $\log D_{7.4}$ -Werte beschreiben. Thioridazin weicht zu weit ab ($> 2 s$).

$$\log k' = -0.03 (\pm 0.44) + 0.99 (\pm 0.12) \log D_{7.4 \text{ Oct}} \quad n = 10 \quad s = 0.19 \quad r^2 = 0.89 \quad F = 64.0$$

Eine generelle Übertragung von Verteilungskoeffizienten aus dem *n*-Octanol/Wasser-System auf chromatografische Systeme unter Verwendung einer IAM-Säule ist nicht möglich. Es können Gemeinsamkeiten in den Beziehungen der für Verteilungen charakteristischen Koeffizienten $\log P$ bzw. $\log D_{7.4}$ aus *n*-Octanol und $\log k'$ an IAM-Säulen festgestellt werden, wenn man nur Verbindungen einer definierten Grundstruktur mit ähnlichem Dissoziationsgrad bei den Korrelationen berücksichtigt.

Werden die *n*-Octanol/Wasser-Koeffizienten durch die entsprechenden PGDP/Wasser-Werte ersetzt, nimmt die Qualität der einzelnen Zusammenhänge mit $\log k'$, wie erwartet, weiter ab ($\log P_{\text{PGDP}} r^2 = 0.23$; $\log P_{\text{ion PGDP}} r^2 = 0.19$; $\log D_{7.4 \text{ PGDP}} r^2 = 0.67$). Selbst die Korrelation der $\log D_{7.4}$ -Werte des strukturhomogenen Datensatzes der Phenothiazine bringt keine Verbesserung der statistischen Parameter ($r^2 = 0.73$, $F = 21.2$). Insgesamt macht sich der überwiegend lipophile Charakter von PGDP bemerkbar, der zur Beschreibung von Interaktionen der Arzneistoffmoleküle an künstlichen Phospholipidmembranen allein nicht ausreicht.

Da die nicht wässrigen Phasen der Phospholipid-Liposomen und der IAM-Säulen aus identischen Strukturelementen bestehen, sollten sich allgemeine Beziehungen zwischen Koeffizienten aus den beiden Verteilungssystemen ergeben. Es werden keine statistischen Gemeinsamkeiten zwischen $\log k'$ und den drei Verteilungskoeffizienten an Liposomen bei der Betrachtung aller basischen Verbindungen nachgewiesen (alle $r^2 = 0.04 \pm 0.03$, $F = 0.3 \pm 0.2$). Die Ursache der nicht vorhandenen Korrelationen zwischen den $\log P_{\text{m}}$ - und den $\log k'$ -Werten können in den verschiedenen Mechanismen liegen, die eine Verteilung in Membranen fördern oder behindern. Die flexiblen Lipide der Liposomenmembran ermöglichen eine räumliche Anpassung an die Arzneistoffstrukturen, während die Lipide an der IAM-Oberfläche den einzulagernden Molekülen nicht frei ausweichen können. Eine Ladungskompensation ist an den frei beweglichen Phosphatidylcholinen besser möglich. Es existieren keine allgemeingültigen Zusammenhänge unter den beiden Membran-Verteilungssystemen für alle protonierbaren Verbindungen. Selbst für die Gruppe der Phenothiazine finden sich keine besseren Korrelationen.

Die Ausbildung von lipophilen und elektrostatischen Interaktionen ist von den einzelnen Strukturelementen und dem De-/Protonierungscharakter der Verbindungen abhängig. Zusammenhänge zwischen den extrapolierten logarithmierten Kapazitätsfaktoren und den definierten Verteilungskoeffizienten existieren nur für ausgewählte Datensätze, wenn lipophile Effekte vorhanden sind.

Tabelle 11: Hauptkomponenten-Analyse der basischen Verbindungen (n = 19); minimaler EW 0.4; standardisierte Varimax-Rotation (VR); Hauptkomponenten-Ladungen > 0.7 unterlegt.

Analyse	Varianz				loading-Werte			
	PC	EW	%	Σ %	$\log P_{\text{ion Oct}}$	$\log P_{\text{ion PGDP}}$	$\log K_{\text{SIP}}$	$\log k'$
A3	1 VR	1.48	37.00	37.00	0.75	0.25	-0.06	0.92
	2 VR	1.04	26.00	63.00	0.14	-0.16	0.98	-0.19
	3 VR	1.12	27.90	90.90	0.46	0.93	-0.10	0.12

Die Aussagen der Regressionen werden durch die Ergebnisse der PCA (Tab. 11) bestätigt. Drei Hauptkomponenten, die von einzelnen Ionen-Koeffizienten sehr hoch geladen werden, beschreiben 90.9 % der Verteilungsprozesse in den vier Verteilungssystemen. Der Eigenwert der dritten PC (VR) ist untypisch größer als der Eigenwert der zweiten PC (VR).

Die $\log P_{\text{ion}}$ -Werte in *n*-Octanol/Wasser und die $\log k'$ -Werte gehen zur ersten PC (VR) parallel, was auf Gemeinsamkeiten in den Verteilungsvorgängen hinweist. Die verminderte Attraktivität von PGDP für geladene Moleküle gegenüber den anderen Systemen charakterisiert die dritte PC (VR) im Gegensatz zur Analyse A2 (Tab. 9). Das Verteilungsverhalten der Arzneistoffionen unterscheidet sich zwischen Liposomen-Membran und der IAM-Säule.

4.4.2 Die Koeffizienten der neutralen Verbindungen

Die potentiometrische Bestimmung von Verteilungskoeffizienten ist nur mit de-/protonierbaren Molekülen möglich, weshalb bei den neutralen Phenothiazinen und den 1,4-Dihydropyridinen auf veröffentlichte $\log P$ -Werte in *n*-Octanol sowie $\log P_{\text{m}}$ - und $\log D_{\text{m}}$ -Werte aus Membransystemen zurückgegriffen werden muß, die mit anderen Methoden ermittelt wurden. Tab. 12 beinhaltet diese Verteilungskoeffizienten und die Werte der gemessenen logarithmierten Kapazitätsfaktoren.

Die Verteilungskoeffizienten der Neutralform aller Arzneistoffe vom 1,4-Dihydropyridin-Typ, die aus dem *n*-Octanol/Wasser oder einem Membran-System entstammen, lassen sich mit einer ausreichenden statistischen Sicherheit ineinander überführen, unabhängig vom Vorliegen eines pK_a -Wertes. Dazu wurden die Mittelwerte aus den $\log P$ -Literatur-Werten von Nifedipin, Nitrendipin und Nimodipin (Tab. 12) berechnet, auch um den $\log P$ -Toleranzbereich der verschiedenen Bestimmungsmethoden zu berücksichtigen.

$$\log P_{\text{m}} = 0.89 (\pm 0.70) + 0.77 (\pm 0.16) \log P_{\text{Oct}} \quad n = 8 \quad s = 0.33 \quad r^2 = 0.79 \quad F = 22.2$$

Jedoch können die Verteilungskoeffizienten $\log P$ in *n*-Octanol/Wasser nur durch die $\log k'$ -Werte der nicht de/protonierbaren 1,4-Dihydropyridine mit hoher Signifikanz wiedergegeben werden.

$$\log k' = -0.51 (\pm 0.32) + 0.60 (\pm 0.08) \log P_{\text{Oct}} \quad n = 6 \quad s = 0.10 \quad r^2 = 0.94 \quad F = 59.5$$

Wenn Amlodipin und Nicardipin in die Korrelation eingebunden werden, geht der Zusammenhang verloren ($n = 8$, $r^2 = 0.31$, $F = 2.7$).

Tabelle 12: Übersicht zu den Verteilungskoeffizienten und $\log k'$ -Werten von 1,4-Dihydropyridinen und den neutralen Phenothiazinen

No.	Verbindung	<i>n</i> -Octanol		Membran / Liposom			$\log k'$ ^b
		$\log P_{\text{Oct}}$	$\log D_{7.4}$	$\log P_m$	$\log D_m$	pH	
18	Amlodipin	3.35 ± 0.08^a	1.59 ± 0.18^a	3.89 ± 0.16^a	4.11 ± 0.07^a	5.4	2.442 ± 0.076
						7.0	
						7.3	
19	Nicardipin	4.67 ± 0.16^a	4.27 ± 0.20^a	4.66 ± 0.14^a	3.73 ± 0.11^a	5.4	2.500 ± 0.072
20	Nifedipin	$2.86^{27}, 3.14^{25}$ 3.22^{24}		3.48^{26}			1.409 ± 0.087
21	Nitrendipin	$3.98^{25}, 4.15^{27}$		4.01 ± 0.03^{26}			2.033 ± 0.052
22	Felodipin	4.80^{27}		-			2.568 ± 0.359
23	Nisoldipin	4.53^{27}		4.11^{28}			2.221 ± 0.085
24	Nilvadipin	-		-			2.120 ± 0.084
25	Nimodipin	$4.03^{25}, 4.18^{27}$		3.70 ± 0.07^{11} 3.72 ± 0.04^{26} 3.80^{28}			1.940 ± 0.042
26	Isradipin	4.18^{27}		3.76 ± 0.03^{26}			1.841 ± 0.374
A	Phenothiazin	4.15^{27}		-			2.157 ± 0.168
B	2-Chlor-phenothiazin	5.21^{27}		-			3.002 ± 0.125
C	2-Acetyl-phenothiazin	4.23^{27}		-			2.363 ± 0.138
D	Lacidipin	5.56^{11}		5.53 ± 0.04^{26}			-
E	Lercanidipin	-	-	6.14 ± 0.08^{26}	5.50 ± 0.02^{26}	7.0	-

^a nach der ORIGIN-Methode; mit zugeordneten Fehlerbereich. ^b mit zugeordneter Fehlerbereich ($\pm s$)

Quellen der Literaturwerte im Literaturverzeichnis, Abschnitt 9.1.

Eine ebenfalls sehr gute Beziehung von Literaturwerten für die Membranverteilung besteht mit den extrapolierten $\log k'$ -Werten der neutralen 1,4-Dihydropyridine (Tab. 12, Nr. 20-26), wobei für Nimodipin ein $\log P_m$ - Mittelwert von 3.74 eingesetzt wurde.

$$\log k' = -2.55 (\pm 0.83) + 1.16 (\pm 0.22) \log P_m \quad n = 5 \quad s = 0.11 \quad r^2 = 0.91 \quad F = 29.0$$

Werden die verfügbaren Werte aller 1,4-Dihydropyridine berücksichtigt, nimmt die Qualität der Regression ab ($n = 7, r^2 = 0.66, F = 9.7$). Insbesondere Amlodipin kann nicht in dem korrelierten Zusammenhang eingefügt werden. Die Wechselwirkungen der neutralen Verbindungen dieser Klasse mit der IAM-Oberfläche basieren hauptsächlich auf deren Lipophilie, während an den Interaktionen

der basischen Arzneistoffe verschiedene Mechanismen beteiligt sind.

Eine abschließende Hauptkomponenten-Analyse wurde vorgenommen, um Unterschiede im Verteilungsverhalten der 1,4-Dihydropyridine sichtbar zu machen, die auf der Anwesenheit von basischen Zentren basieren (Tab. 13). Jedoch lagen alle drei Koeffizienten, $\log P_{\text{Oct}}$, $\log P_{\text{m}}$ und $\log k'$, bei nur sieben Verbindungen vor. Aufgrund des kleinen Datensatzes beließ ich den minimalen Eigenwert der PC bei Eins.

Tabelle 13: Hauptkomponenten-Analyse der 1,4-Dihydropyridine (n = 7);
minimaler EW 1; Hauptkomponenten-Ladungen > 0.7 sind hervorgehoben.

Analyse	Varianz				loading-Werte		
	PC	EW	%	Σ %	$\log P_{\text{Oct}}$	$\log P_{\text{m}}$	$\log k'$
A4	1	2.37	79.00	79.00	0.83	0.87	0.95

Eine globale Eigenschaft kennzeichnet alle drei Verteilungssysteme, die am deutlichsten im chromatografischen Untersuchungssystem enthalten ist (Tab. 13). Da $\log P_{\text{Oct}}$, $\log P_{\text{m}}$ und $\log k'$ verschiedene loading-Werte an der Hauptkomponente besitzen, zeigt wiederum, dass eine 1:1-Übertragung von Verteilungskoeffizienten selbst bei sehr strukturverwandten Molekülen uneingeschränkt nicht möglich ist. Daher versuchte ich herauszufinden, welche 1,4-Dihydropyridine Besonderheiten im Verteilungsverhalten aufweisen.

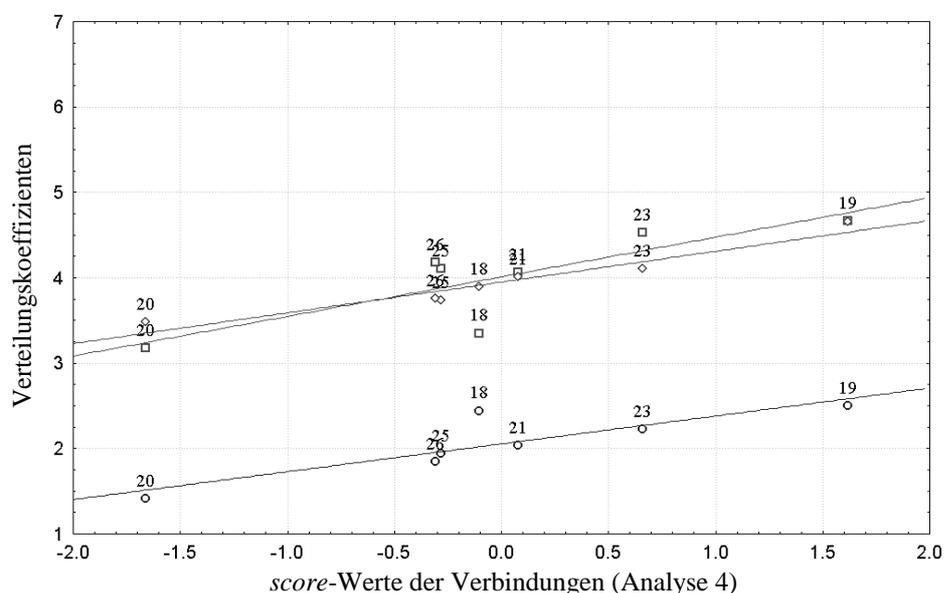


Abbildung 25: Korrelationen der *scores* an der Hauptkomponente (Analyse 4) mit den Verteilungskoeffizienten $\log P_{\text{Oct}}$ \square , $\log P_{\text{m}}$ \diamond und $\log k'$ \circ .

In den Korrelationen der *scores* mit den drei Verteilungskoeffizienten fällt die Verbindung 18, Amlodipin, auf, deren Werte in *n*-Octanol/Wasser und an der IAM-Säule nicht in die Zusammenhänge in Abb. 25 passen. Beide Einträge liegen mehr als zwei Standardabweichungen von der Regressionsgeraden (n = 6) entfernt. Die Beträge der Anstiege der Regressionsgeraden mit $\log P_{\text{m}}$ und $\log k'$ sind identisch, was auf ähnliche Wechselwirkungen der 1,4-Dihydropyridine, einschließlich geladener Moleküle, hinweist. Die Wechselwirkungen von Nicardipin (Abb. 25, Nr. 19) scheinen im Vergleich

zu Amlodipin an der IAM-Säule weniger von der Ladung und in *n*-Octanol/Wasser weniger von der Elektrostatik abzuhängen, weil das basische Zentrum in der Struktur durch den benachbarten aromatischen Substituenten räumlich besser abgeschirmt werden kann als die primäre Aminogruppe in Amlodipin. Folglich haben geladenen Amlodipin-Moleküle eine höheren Affinität der zu den Phosphatidylcholin-Bausteinen der IAM-Oberfläche (Eintrag oberhalb der blauen Regressionsgerade, Abb. 25). Die Neutralform von Amlodipin besitzt einen $\log P_{\text{Oct}}$ -Wert, der dementsprechend kleiner ausfallen sollte (Eintrag unterhalb der roten Regressionsgerade, Abb. 25). Liposomen-Membranen können die lipophilen und elektrostatischen Eigenschaften von beiden Verbindungen gleichzeitig kompensieren.

$$\log P_{\text{Oct}} = 4.11 (\pm 0.08) + 0.45 (\pm 0.08) \text{ scores A4} \quad n = 6 \quad s = 0.19 \quad r^2 = 0.90 \quad F = 34.5$$

$$\log P_{\text{m}} = 3.95 (\pm 0.04) + 0.36 (\pm 0.04) \text{ scores A4} \quad n = 7 \quad s = 0.11 \quad r^2 = 0.93 \quad F = 67.1$$

$$\log k' = 1.98 (\pm 0.02) + 0.33 (\pm 0.02) \text{ scores A4} \quad n = 6 \quad s = 0.04 \quad r^2 = 0.99 \quad F = 454.9$$

Die PC-Analyse A3 (Tab. 9) mit den protonierten Verbindungen zeigte keine Gemeinsamkeiten der $\log P_{\text{Oct}}$ -, $\log P_{\text{m}}$ - und $\log k'$ -Werte.

5 Untersuchungen zu intermolekularen Wechselwirkungen in Membranen

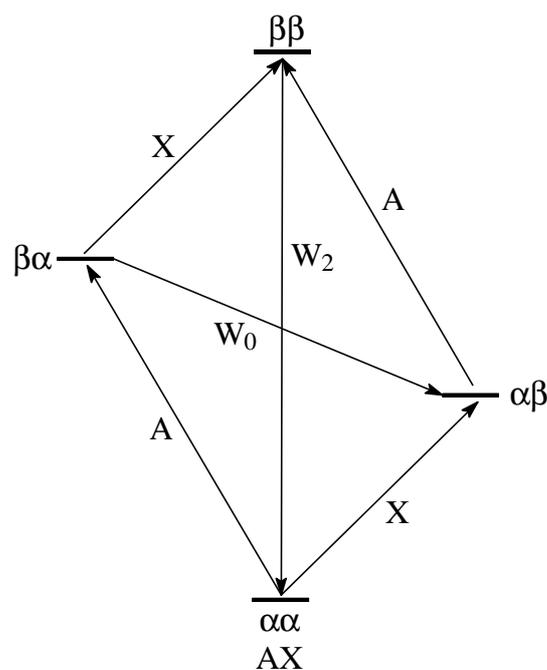
5.1 Grundlagen von ausgewählte Verfahren der NMR-Spektroskopie

5.1.1 Die eindimensionale Differenz-Spektroskopie

Der Kern-Overhauser-Effekt (*nuclear Overhauser effect* = NOE) macht sich bei Doppelresonanz-Experimenten bemerkbar (Noggle und Schirmer 1971). Die Intensität eines beobachteten Signals bei einer Resonanzfrequenz ν_X kann durch eine zusätzliche Einstrahlung ν_A vergrößert oder verkleinert werden. Dazu muß der räumliche Abstand r der Kerne A und X gering sein, da die verantwortliche Dipol-Dipol-Wechselwirkung über die longitudinale Relaxation T_1 mit $1/r^6$ abnimmt. Der NOE ist als Änderung der Signalintensität eines Spins bei Sättigung der Resonanz eines anderen Spins definiert (Fribolin 1988).

Um den Effekt und seinen Zusammenhang mit den strukturellen Eigenschaften des Moleküls zu verstehen, muß die dipolare Kopplung der beiden, nicht skalar gekoppelten Spins A und X betrachtet werden. In einem isolierten homonuklearen Zweispinsystem mit $I = 1/2$ existieren vier energetische Zustände, von denen die $\alpha\beta$ - und die $\beta\alpha$ -Zustände unter Gleichgewichtsbedingungen identisch besetzt sind (Abb. 26).

Abbildung 26: Übergangsschema in einem Zweispin-System AX mit $J_{AX} = 0$



Für die anderen Zustände $\alpha\alpha$ und $\beta\beta$ existiert nach der Boltzmann-Verteilung ein Besetzungsunterschied. Die Übergänge $\alpha\alpha \rightarrow (\alpha\beta \text{ oder } \beta\alpha) \rightarrow \beta\beta$ der Spins A und X sind für Anregung und Relaxation erlaubt und entsprechen den

Resonanzen im eindimensionalen Spektrum, bei denen sich die Magnetquantenzahl um eins ändert (Einquantenübergang). Zur Erklärung des Signalunterschiedes von X bei Sättigung des $\alpha\alpha \rightarrow \beta\alpha$ und des $\alpha\beta \rightarrow \beta\beta$ Überganges (Spin von A) müssen ein Null- ($\alpha\beta \rightleftharpoons \beta\alpha$) und ein Zweiquantenübergang ($\alpha\alpha \rightleftharpoons \beta\beta$) angenommen werden, die theoretisch nur bei der Relaxation vorkommen dürfen. Die Wahrscheinlichkeiten W_0 ($\alpha\beta \rightleftharpoons \beta\alpha$) und W_2 ($\alpha\alpha \rightleftharpoons \beta\beta$) kennzeichnen die Dipol-Dipol-Relaxation. Im NOE-Experiment, bei dem die Übergänge vom Kern A kontinuierlich gesättigt werden, schafft man einheitliche Besetzungsverhältnisse zwischen den Zuständen $\alpha\alpha \rightleftharpoons \beta\alpha$ und $\alpha\beta \rightleftharpoons \beta\beta$, die im bisherigen Gleichgewicht nicht vorliegen. Das Besetzungsverhältnis $\alpha\alpha : \beta\beta$ im Sättigungsfall ist kleiner als das Gleichgewichtsverhältnis $\alpha\alpha : \beta\beta$ im Ursprungszustand. Relaxiert das System nun über den Zweiquantenübergang, wird mit der Wahrscheinlichkeit W_2 der Spinzustand $\alpha\alpha$ angestrebt. Die Relaxation

mit der Wahrscheinlichkeit W_0 verschiebt das Verhältnis zugunsten des $\alpha\beta$ -Zustandes. Ein $\alpha\alpha\rightleftharpoons\beta\beta$ bevorzugter Übergang führt zur Vergrößerung der Besetzungsunterschiede sowohl zwischen $\alpha\alpha\rightleftharpoons\alpha\beta$ als auch zwischen $\beta\alpha\rightleftharpoons\beta\beta$. Es ist ein Intensitätszuwachs des Signals vom Kern X zu beobachten (positiver NOE). Ein negativer NOE ist die Folge eines bevorzugten $\alpha\beta\rightleftharpoons\beta\alpha$ Übergangs. Je nachdem, wie groß die Beiträge von W_0 und W_2 sind, kommt es zu einer Intensitätszu- oder -abnahme. Die Wahrscheinlichkeit der Übergänge wird von der Umorientierung des Moleküls im Magnetfeld beeinflusst.

Für die genaue Beschreibung eines NOE muss man von der Korrelationsfunktion der molekularen Bewegung und von der spektralen Dichtefunktion Gebrauch machen. Als Maßzahl für die Molekülbeweglichkeit wird die Korrelationszeit τ_c verwendet, die als Durchschnittszeit zwischen zwei Reorientierungen angegeben ist. Eine Abhängigkeit des Verstärkungsfaktors η von der Molekülbeweglichkeit und der Messfrequenz ω des NMR-Spektrometers ist in Abb. 27 gezeigt.

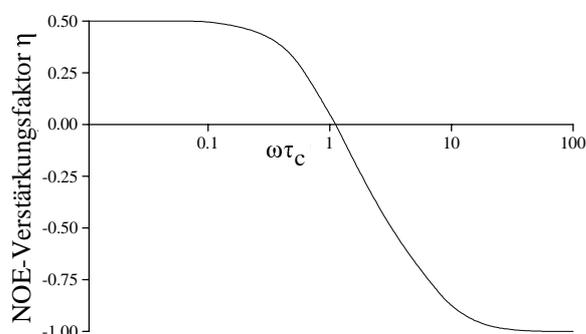


Abbildung 27: Abhängigkeit des Verstärkungsfaktors beim *steady state*-NOE von $\omega\tau_c$ bei einer ^1H ^1H -Kopplung (Neuhaus und Williamson 1989)

Für kleinere Moleküle mit kleinem τ_c ($\alpha\alpha\rightleftharpoons\beta\beta$ Übergang überwiegt) ergibt sich ein positiver NOE mit einem maximalen Verstärkungsfaktor bei einer homonuklearen Kopplung von 0.5, für Moleküle mit großem τ_c ($\alpha\beta\rightleftharpoons\beta\alpha$ Übergang überwiegt) ein negativer NOE. Der besondere Bereich mit einem relativ kleinen Verstärkungsfaktor wird maßgeblich von der spektrometer-abhängigen Frequenz ω des beobachteten Kerns bestimmt. Generell ist ein NOE nur dann festzustellen, wenn der Abstand r zwischen den Dipol-Dipol gekoppelten Kernen weniger als 5 Å beträgt.

Die bisherigen Betrachtungen gelten für ein isoliertes Zweispinsystem in isotroper molekularer Bewegung und idealer dipolarer Relaxation. Unter diesen Annahmen wird ein theoretischer Verstärkungsfaktor η aus dem Quotient der gyromagnetischen Verhältnisse berechnet. Allgemein gilt:

$$\eta = \frac{\gamma_A}{2 \gamma_X} \quad \begin{array}{l} \leftarrow A \text{ gesättigt} \\ \leftarrow X \text{ beobachtet} \end{array} \quad \text{Gl. 11}$$

Die ermittelten η -Werte in einem von mir ausgewählten ^{19}F ^1H -(AX)-System sind für +NOE 0.47 und für -NOE -1.00 und stellen die Maximalwerte dar, die praktisch nie erreicht werden. In realen Molekülen müssen zusätzliche Parameter wie unterschiedliche Korrelationszeiten für Molekülteile und Multispineffekte berücksichtigt werden.

Wie bereits angedeutet, beeinflussen die Molekülbeweglichkeit und die Messfrequenz die Größe des NOE, besonders im Skalenbereich um $\omega\tau_c = 1.12$ (Abb. 27). Eine schnelle Molekülbewegung (kleine Korrelationszeit τ_c) ermöglicht eine rasche dipolare Relaxation, die wiederum zur Ausbildung eines positiven NOE notwendig ist. Weiterhin können sich kleine bis mittelgroße Moleküle schneller als Makromoleküle in Hinblick auf die wirkungsvolle Dipol-Dipol-Relaxation in einer niedrig viskosen Lösung bewegen. Eine Beziehung zwischen Molekülgröße und Korrelationszeit τ_c liefert die *Stoke-Einstein-Gleichung* (Gl. 12):

$$\tau_c = \frac{4 \pi \eta a^3}{3 kT} \quad \text{Gl. 12}$$

Zu beachten ist, dass in dieser Gleichung η die Viskosität des Lösungsmittels darstellt und a einen Molekülradius. Da ein Molekül selten kugelsymmetrisch ist und oft über drei unterschiedliche prinzipielle Rotationsachsen verfügt, ist es schwer zu entscheiden, welchen Radius man zur Berechnung nutzt. Empirische Erfahrungen am verwendeten Spektrometer (^1H 400 MHz) zeigen, dass

- kleine Moleküle ($M < 1000$ g/mol) in nicht viskosen Lösungsmitteln sich im positiven NOE-Einflussbereich befinden;
- Signale von Molekülen zwischen 1200 und 1600 g/mol relativ NOE unempfindlich sind;
- bei Makromolekülen Signalabschwächungen zu erwarten sind.

Diese erste Abschätzung zum erwarteten Bereich auf der $\omega\tau_c$ -Skala über die molare Masse kann über eine Bestimmung der T_1 -Relaxationszeit experimentell präzisiert werden. Vorstellungen zur Größe von τ_c sind zu Beginn von NOE-Untersuchungen nützlich.

Bei der von mir angewendeten eindimensionalen NOE-Differenz-Spektroskopie wird selektiv eine ^{19}F -Resonanz eine bestimmte Zeit CW (*continuous wave* = CW) angeregt und nach einem $\pi/2$ -Impuls ein ^1H -Spektrum aufgenommen. Von diesem Spektrum muß ein ^1H -Referenzspektrum subtrahiert werden, bei dem zuvor kein ^{19}F -Kern angeregt wurde. Im Differenzspektrum erscheinen nur die Signale mit einem positivem oder negativem NOE-Verstärkungsfaktor. Es wird ein *steady state*-NOE gemessen, aus dem über die Änderung der integrierten Signalintensitäten die direkten Verstärkungsfaktoren η berechnet werden können. Für die praktische Umsetzung sollten möglichst niedrig konzentrierte Lösungen, die keinen Sauerstoff oder andere paramagnetische Zusätze enthalten, eingesetzt werden. Die NOE-Differenzen können teilweise nur wenige Prozent ausmachen, so dass auf ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis (*signal to noise* = S/N) geachtet werden muss. Konstante experimentelle Bedingungen erreicht man durch die wechselweise Aufnahme von Spektren mit oder ohne vorheriger Signalsättigung (*Fribolin* 1988; *Neuhaus* und *Williamson* 1989; *Braun* et al. 1996).

Eine quantitative Auswertung von NOE-Experimenten ist sehr schwierig, da das Relaxationsverhalten benachbarter Kerne und indirekte Spineffekte die Dipol-Dipol-Wechselwirkungen der ausgewählten Kerne abschwächen. Daher begnügt man sich überwiegend mit dem qualitativen Nachweis durch die Differenz-Spektroskopie.

Das natürliche Fluor-Isotop ^{19}F hat eine Kernspin-Quantenzahl von $1/2$. Die relative Empfindlichkeit ist etwas geringer als beim Wasserstoffkern; der Resonanzbereich fällt aber wesentlich breiter aus. Als Referenzverbindung zur Festlegung von 0 ppm wird überwiegend Trichlorfluormethan, CFCl_3 , eingesetzt. Die meisten Fluorsignale liegen jedoch im Hochfeld bei negativen δ Werten bis -150 ppm.

5.1.2 Die eindimensionale Austausch-Spektroskopie

5.1.2.1 Der Effekt von Signalaufspaltungen an Membranen

In einer Erythrocyten-Suspension (*red blood cells* = RBC) zeigen Difluorophosphat oder 3-Fluor-3-desoxymonosaccharide im ^{19}F -NMR-Spektrum aufgespaltene Signale, die jeweils für die intra- und extrazellulär befindlichen Moleküle charakteristisch sind (Potts et al. 1990; Xu et al. 1991; Potts und Kuchel 1992). Wenn Trifluoractamid (TFAm), ein neutrales Analogon vom Acetat-Ion, einer RBC-Suspension zugesetzt wird, ergeben sich zwei gut aufgelöste ^{19}F -NMR-Resonanzsignale der transmembranen Formen, wobei das Signal der intrazellulären Moleküle im Vergleich zu dem extrazellulären Signal zu einer höheren Frequenz hin verschoben ist (Xu und Kuchel 1993). Durch diese Signalauftrennung ist eine sichere Bestimmung der transmembranen Verteilung mit Hilfe mathematischer Aufbereitung der spektralen Ergebnisse möglich.

Die Membranen lebender Zellen besitzen asymmetrische elektrische Eigenschaften, da die Innenseite negativ geladen, die Außenseite aber isoelektrisch ist (Op den Kamp 1979). Im Fall der RBC befinden sich gleichartige negative Ladungen an beiden Seiten der Membran. Die positiv geladenen Proteine, die an der Außenseite der Membran eingelagert sind, führen zur einer Ladungskompensation (Sommer 1983). Eine physikalische Ursache der Signaltrennung im ^{19}F -NMR-Spektrum kann nicht in den Unterschieden der Proteinladungen oder der transmembranen Empfindlichkeiten bestehen, da beispielsweise der diamagnetische Effekt des Carboxy-Hämoglobins die Signale intrazellulärer Moleküle zu niedriger Frequenz verschieben würde.

Als Ursache der Signalaufspaltung wird die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Wasser und den Fluoratomen diskutiert (Xu et al. 1991; Xu et al. 1993). Eine Wasserstoffbrücke zwischen einem Donormolekül Wasser und dem Fluoratom des gelösten Moleküls führt zu einer weiteren Abschirmung des beteiligten Heterokerns, hier also von Fluor. Daraus resultiert eine Signalverschiebung zu niedrigeren Frequenzen. Das an der Innenseite der RBC lokalisierte Hämoglobin vermindert den durchschnittlichen Grad an Wasserstoffbrücken zwischen dem Heteroatom und Wasser, und es resultiert ein abnehmender Verschiebungseffekt (Xu et al. 1991).

Allgemein führt eine behinderte Ausbildung von direkten Wasserstoffbrücken zwischen Fluor und Wasser, verursacht durch eine starke Proteinhydratisierung, zur Abnahme der elektromagnetischen Abschirmung des Kerns vom Heteroatom. Bei einer Verteilung einer fluorierten Verbindung in zwei Kompartimente mit einem transmembranären Konzentrationsgradienten an Proteinen werden die Signale der innerhalb und der außerhalb vorliegenden Kerne unterschiedlich chemisch verschoben (Xu et al. 1993). Dieses Phänomen der Signalaufspaltung kann zur direkten Messung von transmembranären Transport- und Diffusionsprozessen von fluorierten Substanzen verwendet werden (Potts et al. 1990; Xu et al. 1991; Potts und Kuchel 1992; Xu und Kuchel 1993; Xu et al. 1998).

5.1.2.2 Das Verfahren des ^{19}F -NMR-Magnetisierungstransfers

In meiner Arbeit nutzte ich den ^{19}F -NMR-Magnetisierungstransfer der Referenzsubstanz TFAM zur Analyse von unspezifischen Einflüssen verschiedener Arzneistoffe auf die RBC-Membran. Eine notwendige NMR-spektroskopische Voraussetzung besteht in der einheitlichen Umwandlung von Oxy- und Desoxy- in Carboxy-Hämoglobin. Das vollständig in der Carboxy-Form vorliegende Hämoglobin befindet sich in einem stabilen, diamagnetischen Zustand und minimiert dadurch Feldgradienteneffekte im NMR-Experiment (Fabry und San George 1983). Vor jedem Pulssequenzdurchgang sollten die angeregten Kerne vollständig relaxiert vorliegen. Die vier verschiedenen Entwicklungszeiten wurden im Experiment so ausgewählt, dass

- sich für die Signale der intra- und extrazellulären Moleküle ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis abzeichnet und
- kaum Relaxationsprozesse während der gesamten Pulsfolge ablaufen können.

Die Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung für den Ein- und Austritt von TFAM an den RBC kann mit dem *overdetermined* ^{19}F -NMR-1D-EXSY-Verfahren (*exchange spectroscopy* = EXSY) bestimmt werden (Bulliman et al. 1989). Da TFAM kaum metabolisiert wird, ist die Auswertung des idealen Austauschprozesses zwischen zwei Kompartimenten möglich, der lediglich von den Membraneigenschaften beeinflusst wird. Das Gleichgewicht zwischen der äußeren und inneren Menge an TFAM hat sich 15 min nach Zugabe eingestellt (Xu und Kuchel 1993).

Die *Bloch-McConnell*-Beziehung (Gl. 13), die die Änderung der Magnetisierung in einem spin- $\frac{1}{2}$ -Kern für ein n-Kompartiment-System beschreibt, wird zur mathematischen Interpretation der Magnetisierung M in Richtung des z-Vektors angewendet. Die Größe E steht für eine Matrix aus den Konstanten für die Austauschrate und der longitudinalen Relaxation. Der Vektor der z-Magnetisierung M setzt sich zusammen aus dem Betrag M_z für eine beliebige Zeit nach der magnetischen Anregung und dem Betrag M_z° im Gleichgewichtszustand.

$$\frac{dM}{dt} = -EM \quad \text{Gl. 13}$$

$$M = (M_z - M_z^\circ) \quad \text{Gl. 14}$$

Das *overdetermined* 1D-EXSY-Verfahren (Bulliman et al. 1989) basiert auf einem zweidimensionalen EXSY-Experiment (Macura und Ernst 1980) mit unselektiven Pulsen und einem geeigneten Phasenzyklus (Bellon et al. 1987),

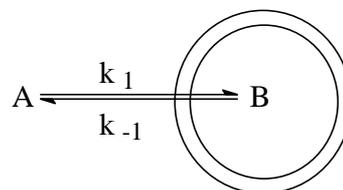
$$\pi/2_x - t_1 - \pi/2_x - t_m - \pi/2_{x'y'} - x' - y' - t_2,$$

wobei t_1 die Entwicklungszeit (*evolution time*), t_m die Mischzeit (*mixing time*) und t_2 die Aufnahmezeit (*acquisition time*) bedeuten. Eine Messreihe, die aus acht Einzelspektren mit variierenden Entwicklungszeiten und einer Mischzeit von entweder 0 s oder 0.5 s besteht, wird mit zwei Standard- ^{19}F -Spektren ergänzt, die vor und nach der Messreihe aufgenommen werden. Die Integrale der Resonanzsignale werden kalibriert und zur Generierung einer Serie aus linearen Gleichungen eingesetzt. Deren Lösung führt zur Auflösung X der *Bloch-McConnell*-Beziehung (Gl. 15).

$$X = e^{-E t_m} \quad \text{Gl. 15}$$

Aus der Rücktransformierung der Auflösung X erhält man die resultierende Matrix E (Gl. 16) für einen Zwei-Seiten-Austausch (Abb. 28). Die Matrix E setzt sich aus vier Beträgen zusammen, die die Austauschkonstanten k_1 und k_{-1} und in die T_1 -Zeiten der in Abb. 28 aufgeführten Spezies umfassen..

$$E = \begin{bmatrix} -\left(\frac{1}{T_1^A} + k_{-1}\right) & k_1 \\ k_{-1} & -\left(\frac{1}{T_1^B} + k_1\right) \end{bmatrix}$$



Gl. 16

Abbildung 28: Zwei-Seiten-Austausch zwischen dem externen und internen RBC-Kompartiment

Allgemein beruht das Experiment auf dem einheitlichen Durchtrittsmechanismus von TFAM-Molekülen durch die RBC-Membran, unabhängig vom Grad der magnetischen Induktion. Nach einer spezifischen Anregung der TFAM-Moleküle in einem Kompartiment relaxieren die Kerne aber zeitlich unterschiedlich je nach Kompartiment, in dem sie sich aktuell befinden. Bei verschiedenen Entwicklungszeiten t_1 treten jeweils Anteile von Molekülen mit angeregten Kernen oder Kernen im Grundzustand durch die Membran. Aus dem Verlauf der Signaländerungen lassen sich, wie beschrieben, die Geschwindigkeitskonstanten für die Membranüberwindung errechnen. Der Rechenweg und dessen Limitierungen wurden von *Bulliman* und Mitarbeitern ausführlich dokumentiert (*Bulliman et al. 1989*). Im Abschnitt 9.4 ist ein vollständiger Rechenweg für die Geschwindigkeitskonstanten von TFAM mit RBC ohne Arzneistoffzusatz in 200 mM NaCl-Lösung zu finden.

Da die Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung für den Austausch von TFAM vom Hämatokritwert der Zellsuspension abhängen, werden sie in die korrespondierenden Membran-Permeationskoeffizienten P_1 bzw. P_{-1} für den Ein- und Austritt umgerechnet, die den Betrag des Hämatokrits berücksichtigen.

$$P_1 = k_1 \cdot \frac{V_{\text{out}}}{A_{\text{tot}}} \quad \text{Gl. 17a}$$

$$P_{-1} = k_{-1} \cdot \frac{V_{\text{int}}}{A_{\text{tot}}} \quad \text{Gl. 17b}$$

Dazu werden die Werte von V_{out} als extrazelluläres Volumen (*Potts and Kuchel 1992*) und von V_{int} als für TFAM zugängliches intrazelluläres Volumen pro ml Suspension (*Savitz et al. 1964*) benötigt, die mit Hilfe des Hämatokritwertes (Hk) der NMR-spektroskopisch untersuchten RBC-Suspension berechnet werden.

$$V_{\text{out}} = 1 - \text{Hk} \quad \text{Gl. 18a}$$

$$V_{\text{int}} = \text{Hk} \cdot 0.717 \quad \text{Gl. 18b}$$

A_{tot} ist die totale RBC Oberfläche pro ml Suspension und kann errechnet werden aus der mittleren Membranfläche eines Erythrozyten von $1.43 \pm 0.08 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2$ (*Sha'afi et al. 1967*) und der Zahl der RBC pro ml. Beim Mann liegt der normale Hämatokritwert bei 0.47, und die durchschnittliche Zahl an RBC beträgt ca. $5.1 \cdot 10^6$ pro μl Blut. Das mittlere Volumen (MCV) eines RBC wird mit $9.2 \cdot 10^{-8} \mu\text{l}$ angegeben (*Thews et al. 1999*). Eigene MCV-Bestimmungen in hypertonen Lösungen von

200 mM NaCl ergaben $9.3 \pm 0.4 \cdot 10^{-8} \mu\text{l}$ ($n = 6$), der nur unwesentlich vom isoosmotischen MCV-Wert abweicht. Die Gl. 19a und 19b schließen alle experimentellen Größen zur Berechnung der Permeationskoeffizienten ein.

$$P_1 = k_1 \cdot \frac{\text{MCV} \cdot (1 - \text{Hk})}{A_{\text{RBC}} \cdot \text{Hk}} \quad \text{Gl. 19a} \qquad P_{-1} = k_{-1} \cdot \frac{\text{MCV} \cdot 0.717}{A_{\text{RBC}}} \quad \text{Gl. 19b}$$

Der Permeationskoeffizient für den TFAM-Austritt ist nach Gl. 19b vom Hämatokrit der Suspension unabhängig, im Gegensatz zu TFAM-Eintritt. Somit sind nur die Prozesse, die den Eintritt einer Substanz in die Zelle beeinflussen, verantwortlich für die Geschwindigkeit zur Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes.

5.2 Materialien und Methoden

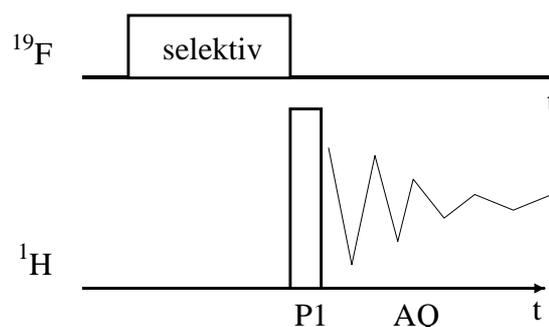
5.2.1 Anwendung der NOE-Differenz-Spektroskopie

Für die eindimensionalen (1D) ^1H - und ^{19}F -Spektren wurden die zu analysierenden Arzneistoffe in einer Konzentration von 7 mM in D_2O mit einem Deuterierungsgrad von 99.9% gelöst, das 0.15 M KCl enthielt. Bei schlecht löslichen Verbindungen setzte ich Dimethylsulfoxid- D_6 99.8% (DMSO) bis zu einem endgültigen Gehalt von 20% DMSO- D_6 in ISA- D_2O zu. Anschließend wurde jede Lösung bei Raumtemperatur im Wasserbad für 1 min beschallt und bis zur Klarheit zentrifugiert. Von der überstehenden Lösung wurden 0.5 ml im 5 mm NMR-Probenröhrchen vermessen. Das interne Referenzsignal einer Spur von DMSO- D_6 99.8% bei 2.49 ppm diente zur Auswertung der chemischen Verschiebung in den ^1H -Spektren. Die chemische Verschiebung der Fluorsignale basierte auf einem Signal von zugesetztem Trifluoracetamid (TFAM) bei -78.5 ppm.

Eilecithin wurde zu 10, 20 und 40 millimolaren Lösungen im ISA- D_2O dispergiert und 15 min unter Eiskühlung mit einem Ultraschallrüssel UW70™ (BANDELIN) beschallt. Für die Arzneistoff/Liposomen-Gemische wurde einer definierten Menge an festem Arzneistoff soviel Liposomen-suspension zugesetzt, bis ein molares Konzentrationsverhältnis von Phospholipid zu Arzneistoff von 4:1 vorlag. Die zuvor beschallte Liposomen-suspension enthielt 5 mM Phospholipid in 80% D_2O /20% H_2O mit 0.12 M KCl und 0.01 mM Phosphatpuffer pH 7.4 nach Sörensen. Die Suspensionen wurden durch ein Polycarbonat-Membranfilter einer Maschengröße von 0.1 μm (COSTAR) gepreßt. Jeweils 0.5 ml kamen im 5 mm Probenröhrchen zur spektroskopischen Vermessung, nachdem das fertige Gemisch 5 min zur Entgasung unter Vakuum behandelt wurde.

Die NMR-Messungen wurden an einem BRUKER AMX400 Spektrometer bei 400.14 MHz für die ^1H -Spektren und bei 376.47 MHz für die ^{19}F -Spektren bei 20°C vorgenommen. Die übrigen Parameter der NMR-Experimente sind in der Tab. A2, Abschnitt 9.3.2, zusammengestellt. Zur heteronuklearen, eindimensionalen ^{19}F ^1H -NOE-Messung wurden die fünf Verbindungen herangezogen, die eine CF_3 -Gruppe besitzen (Triflupromazin, Trifluoperazin, Fluphenazin, cis- und trans-Flupenthixol). Schematisch ist in Abb. 29 der zeitliche Ablauf eines ^{19}F ^1H -NOE-Experiments wiedergegeben.

Abbildung 29: Pulsprogramm des ^{19}F ^1H -NOE-Differenz-Experiments



Bei allen Aufnahmen von ^1H -Spektren wurde durch eine spezifische kontinuierliche CW-Sättigung das HOD Resonanzsignal unterdrückt.

5.2.2 Untersuchungen von Permeationsprozessen an Erythrocyten

Die Erythrocyten (RBC), die aus 30 bis 100 ml eigenem venösen Blut stammten, wurden dreimal im Verhältnis 1:1 in einer 154 mM oder 200 mM NaCl-Lösung bei 4°C gewaschen, um das Blutplasma und die weißen Blutkörperchen zu entfernen. Jede NaCl-Lösung enthielt 10 mM Glucose. Nach gutem Durchmischen wurde jeweils bei 4°C über 7 min mit 2500 g zentrifugiert. Die gereinigten RBC (das Sediment) wurden in einer NaCl-Lösung resuspendiert und maximal 24 h bei 4°C gelagert. Unmittelbar vor einer NMR-Messung wurde die gekühlte Zellsuspension mit Kohlenmonoxid 5 min begast. Erneut wurde zentrifugiert, vom Sediment ca. 1.5 ml abgenommen und mit NaCl-Lösung, 0.2 ml 2 mM oder 10 mM TFAM-Lösung und 0.2 ml von jeweils 2 mM gepufferten Arzneistofflösungen (pH 7.4) versetzt. Der Ansatz wurde gut gemischt, 5 min unter Vakuum belassen und davon 0.5 ml in ein 5 mm NMR-Probenröhrchen gegeben. Parallel wurde der Hämatokrit (Hk) des Ansatzes mit einem Clements-Apparat (CLEMETS, Australien) ermittelt. Die fertiggestellte Suspension wurde frühestens 20 min nach der Herstellung vermessen.

Die ^{19}F -NMR-Spektren wurden an einem BRUKER AMX400 Spektrometer mit einem 5 mm ^{19}F -Probenkopf bei 376.47 MHz aufgenommen. Durch die mit D_2O gefüllte koaxiale Kapillare wurde das *frequency locking* erreicht. Alle Messungen wurden bei 25°C , einer Pausenzeit von $4 \cdot T_1$ für die longitudinale Relaxation, bei 90° Pulslängen ($\pi/2$), mit ^1H -Waltz-Entkopplung durchgeführt. Das Probenröhrchen wurde nicht in Rotation versetzt. Die Bestimmung der T_1 -Zeit erfolgte durch die Standard-*inversion-recovery*-Pulssequenz. Die weiteren Aufnahmeparameter sind in der Tab. A2, Abschnitt 9.3.2, dargestellt. Als Referenz diente das Signal von extrazellulärem TFAM, für das eine chemische Verschiebung von -78.5 ppm festgelegt wurde. Die Mischzeit t_m wurde entweder auf 0 s oder 0.5 s eingestellt und mit jeweils vier unterschiedlichen Entwicklungszeiten t_1 kombiniert. Die konkreten t_1 -Werte betragen $3 \mu\text{s}$, $5/(16 \cdot \Delta\nu)$, $6/(16 \cdot \Delta\nu)$ and $7/(16 \cdot \Delta\nu)$, wobei $\Delta\nu$ die Differenz zwischen dem intra- und extrazellulären Resonanzsignalen eines vollrelaxierten ^{19}F -NMR-Spektrums in Hz darstellt (Potts et al. 1990). Pro Spektrum wurden 16 freie Induktionsabfälle (*free induction decay* = FID) aufgenommen. Das Austausch-Spektroskopie-Experiment wurde sowohl mit Anregung der intern als auch der extern befindlichen Kerne durchgeführt. Vor und nach jeder kompletten EXSY-Messung wurde ein normales ^{19}F -NMR-Spektren aufgezeichnet.

5.3 Ergebnisse und Diskussion

5.3.1 Analyse von intermolekularen Wechselwirkungsstellen

5.3.1.1 Signalzuordnung im eindimensionalen Spektrum

Für den ersten Teil meiner NMR-Untersuchungen verwendete ich heteronukleare eindimensionale ^{19}F - ^1H -Kern-Overhauser-Effekt-Messungen. Durch diese Art von NMR-Experimenten können die internuklearen Abstände und somit Regionen von intermolekularen Wechselwirkungen in Membranen zugänglich gemacht werden.

Den ersten Schritt stellte grundsätzlich die vollständige Zuordnung der spektralen Wasserstoff-Kernresonanzen dar. Für die Arzneistoffstrukturen war dies aus 1D ^1H -Spektren, mit Unterstützung des Programms ACD/HNMR (*Advanced Chemistry Development*), leicht möglich, da es sich nicht um komplexe Moleküle handelt. Im wesentlichen konnte man drei Signalgruppen erkennen:

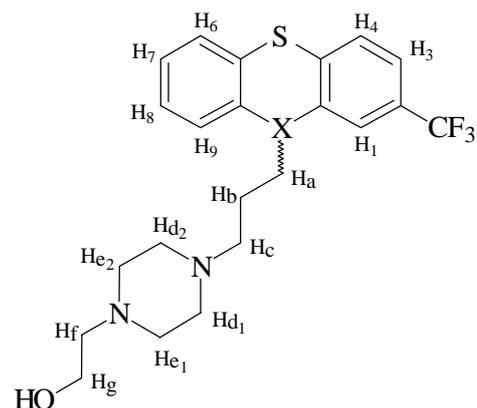
- Signale aromatischer Wasserstoffkerne (Tiefeld, 6 bis 9 ppm);
- Signale aliphatischer Wasserstoffkerne (Hochfeld 0 bis 2 ppm);
- Signale von aliphatischen Wasserstoffkernen, die sich in räumlicher Nähe von elektronenziehenden Atomen (N, O) oder Doppelbindungen befinden (2.5 bis 4.6 ppm).

Eine Zuordnung aller Signale aus den ^1H -Spektren der betrachteten fünf Arzneistoffmoleküle ist in der Tab. 14 zusammengefasst (Spektren, Abschnitt 9.5). Eine allgemeine Benennung der Wasserstoffe für eine Struktur, die alle spektroskopisch untersuchten Verbindungen berücksichtigt, zeigt die Abb. 30.

Tabelle 14: ^1H -NMR-Signale der Fluor enthaltenden Phenothiazine und Thioxanthene

Signal	Chemische Verschiebung in ppm				
	Triflupromazin	Trifluoperazin	Fluphenazin	cis-Flupenthixol	trans-Flupenthixol
H _a	3.87	3.91	3.92	5.75	5.71
H _b	1.96	2.00	2.00	2.70	2.76
H _c	2.99	3.10	3.13	3.16	3.16
H _{d1-2}	2.56	3.28 / 3.34	3.31 / 3.38	3.28 / 3.39	3.27 / 3.37
H _{e1-2}	-	3.28 / 3.34	3.31 / 3.38	3.28 / 3.39	3.27 / 3.37
H _f	-	2.76	3.16	3.19	3.19
H _g	-	-	3.71	3.71	3.71
H ₁	7.10	7.15	7.15	7.51	7.64
H ₃	7.08	7.13	7.10	7.48	7.40
H ₄	7.04	7.10	7.10	7.46	7.38
H ₆	7.09	7.09	7.13	7.41	7.30
H ₇	6.89	6.93	6.91	7.19	7.25
H ₈	7.13	7.17	7.15	7.24	7.23
H ₉	6.85	6.86	6.91	7.31	7.27

Abbildung 30: Nomenklatur der Wasserstoffkerne in einer allgemeinen Grundstruktur in einer allgemeinen Grundstruktur



Zur Analyse der charakteristischen Signale der Trizyklen wurden Literaturangaben herangezogen (Attwood et al. 1994). Eine spezielle Signalzuordnung der äquatorial bzw. axial ständigen Wasserstoffatome im Piperazinring, H_{d1-2} und H_{e1-2} , war für den experimentellen Ansatz nicht notwendig. Da es bei Änderungen der Messbedingungen und der Lösungsmittelzusammensetzung zu Verschiebungen der Resonanzfrequenzen kommt, wurde bevorzugt in überwiegend wässrigen Puffersystemen unterhalb der Selbstassoziationskonzentration gearbeitet (Attwood et al. 1994).

Relativ gut aufgelöste eindimensionale ^1H -Spektrum von Eilecithin wurden nach der Filtration und Entgasung einer Liposomensuspension in D_2O mit einem Lipidgehalt von 10 mM erhalten. Durch einen Vergleich der chemischen Verschiebungen und der Formen der Signale der Referenzspektren (Kuroda und Kitamura 1984; Ellena et al. 1985; Holte und Gawrisch 1997) mit denen im eigenen Spektrum ordnete ich die Signale den Strukturelementen eines Phosphatidylcholin-Moleküls zu (Abb. 31; Tab. 15).

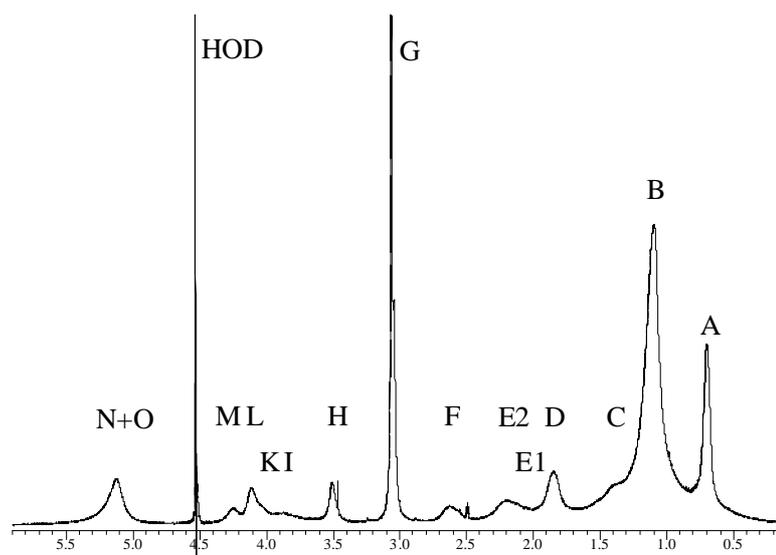


Abbildung 31: ^1H -NMR-Spektrum von Phosphatidylcholin (Liposomen) in D_2O

Tabelle 15: ^1H -NMR-Signale von Phosphatidylcholin in D_2O

Signal	Gruppe	eigene δ in ppm	Referenzen δ in ppm			Nomenklatur der Wasserstoffkerne
			a	b	c	
A	$-\text{CH}_3$	0.69 ± 0.004	0.70	0.76	0.88	
B	$-(\text{CH}_2)_n^-$	1.09 ± 0.006	1.09	1.17	1.30	
C	$-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CO}$	1.38 ± 0.003	-	1.47	1.59	
D	$-\text{CH}_2-\text{C}=\text{}$	1.84 ± 0.004	1.84	1.86 / 1.93	2.02	
E1	$-\text{CH}_2-\text{CO}$ (sn1)	2.04 ± 0.001	1.97	2.23	2.29	
E2	$-\text{CH}_2-\text{CO}$ (sn2)	2.20 ± 0.002	-	2.23	2.29 / 2.40	
F	$=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{}$	2.62 ± 0.008	2.58	2.61 / 2.71	-	
G	$\text{N}-(\text{CH}_3)_3$	3.06 ± 0.001	3.04	3.15	3.22	
H	$-\text{CH}_2-\text{N}$	3.50 ± 0.005	3.49	3.60	3.68	
I	$-\text{CH}_2-\text{OPO}$	3.88 ± 0.009	-	4.22	3.99	
K	$\text{OCO}-\text{CH}_2-$	4.04 ± 0.001	-	-	4.20	
L	$-\text{CH}_2-\text{C}-\text{N}$	4.11 ± 0.007	4.10	4.21	4.26	
M	$\text{OCO}-\text{CH}_2-$	4.24 ± 0.004	-	4.36	4.43	
N	$\text{OCO}-\text{CH}$	5.12 ± 0.009	5.12	5.09	5.28	
O	$-\text{HC}=\text{CH}-$	5.12 ± 0.009	5.12	5.18	5.30	

^a Kuroda und Kitamura 1984; ^b Ellena et al. 1985; ^c Holte und Gawrisch 1997

Referenzsignal: DMSO 2.49 ppm; bei ^a und ^b korrigiert nach HOD 4.60 ppm

Wie Abb. 31 deutlich macht, konnten trotz der breiten Signale als Folge der Hydratisierung, die einzelnen Kerne für wesentliche Strukturelemente gut voneinander unterschieden werden. Für die aliphatischen CH_2 -Ketten der Fettsäuren sind A, B, D und F charakteristische Signale. Der Cholin-kopfgruppe sind die Signale G, H und L zuzuordnen. Glycerin kann am besten durch das Signal M gekennzeichnet werden. Das Signal bei 5.12 ppm setzt sich aus zwei Signalen verschiedener Strukturelemente zusammen, wobei der Anteil der $-\text{HC}=\text{CH}-$ Kerne deutlich größer sein sollte. Die Abweichungen in den chemischen Verschiebungen zu den Referenzen lassen sich dadurch erklären, dass es sich bei dem eingesetzten Eilecithin um ein nicht quantifiziertes Gemisch verschiedener Phosphatidylcholone handelt. Eine Integration der Signale wurde daher nicht durchgeführt.

Das ^{19}F -NMR-Signal der CF_3 -Gruppe enthaltenden Arzneistoffstrukturen bestand aus einem Singulett in einem δ -Bereich zwischen -65.0 bis -66.0 ppm (Abb. 37A).

In den Gemischen von Phosphatidylcholin-Liposomen mit Arzneistoffmolekülen wurde die ^1H -Signalzuordnung aufgrund der Verteilung an die und in der Membran durch Signalüberlagerungen oder verbreiterte Signale erschwert. Die ^1H -Signale der aliphatischen Strukturen der Arzneistoffmoleküle waren teilweise schlecht von den Resonanzsignalen der Fettsäureketten, Glycerin- und Cholingruppe

zu trennen. Folglich musste bei der Lösung der Problemstellung über ^1H -NOE-Differenz-Spektren die schlechte Auflösung in den Spektren von Arzneistoff/Liposomen-Gemischen berücksichtigt werden. Die Lipide lagen in den Suspensionen in einer vierfach höheren molaren Konzentration als die Arzneistoffe vor, was den experimentellen Bedingungen der potentiometrischen Titration entsprach.

5.3.1.2 Auswertung der Differenzspektren

Ausgehend von der Überlegung, dass sich bei selektiver Anregung der Fluoratome der Trifluormethyl-Gruppe eine Änderung im Dipol-Dipol-Relaxationsverhalten benachbarter Wasserstoffkerne ergibt, kennzeichnen Signale im eindimensionalen ^1H -NMR-Differenz-Spektrum die räumliche Nachbarschaft zu den Strukturelementen einer Phosphatidylcholin-Membran, falls ein enger Kontakt besteht.

Als Folge einer starken heteronuklearen ^{19}F ^1H -Kopplung bei räumlicher Nähe der Kerne wurden Unterschiede in den Signalintensitäten in den ^1H -Spektren mit und ohne ^{19}F -Anregung zu erwartet. Die qualitative NOE-Auswertung basierte im Fall eines Differenz-Spektrums auf der Zuordnung der chemischen Verschiebungen und der Auswertung der von Null abweichenden Intensitäten. Man kann außerdem die prozentualen Signaländerungen zwischen den Spektren mit und ohne ^{19}F -Anregung berechnen.

Die durch den NOE verursachten und integrierten Differenzen konnten zu einer halbquantitativen Aussage herangezogen werden, indem pro Signal eine Flächendifferenz ΔI aus dem Integral mit Anregung I_{NOE} minus Integral ohne Anregung I_{norm} berechnet wurde (Gl. 20).

$$\Delta I (\text{Flächendifferenz}) = I_{\text{NOE}} - I_{\text{norm}} \quad \text{Gl. 20}$$

Für jedes Flächenintegral im Differenz-Spektrum wurde ein Wert über den Weg der Dekonvolution mit einer externen Standardskalierung der Flächen (fixed scale-file, übrige Skalierungsparameter 10^{-8}) erhalten. Eine andere Quantifizierung über ein Signalverhältnis $I_{\text{NOE}} : I_{\text{norm}}$ der ursprünglichen Spektren berücksichtigte die absolute Größe der Integralwerte. Die experimentellen Einflüsse auf die Ergebnisse kamen im Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) zum Ausdruck, das so groß wie möglich sein sollte. Zuerst wurde das Verfahren anhand von drei Arzneistoffen ohne Liposomen getestet (Tab. 16).

Tabelle 16: ^{19}F ^1H -NOE-Signaldifferenzen von drei Arzneistoffen

Verbindung	Signal	H_f	H_a	H_9	H_7	H_3	H_1	S/N
Trifluoperazin	ppm	-	-	-	6.92	7.11	7.16	960
	ΔI				+ 0.050	+ 0.057	+ 0.108	
	absolut				+ 1.4%	+ 2.0%	+ 1.7%	
cis-Flupenthixol	ppm	3.2	-	-	-	7.52	7.58	208
	ΔI	+ 0.050				+ 0.122	+ 0.089	
	absolut	+ 3.4%				+ 4.3%	+ 11.0%	
trans-Flupenthixol	ppm	-	5.76	7.35	7.28	7.44	7.69	201
	ΔI		+ 0.037	+ 0.056	+ 0.168	+ 0.194	+ 0.082	
	absolut		+ 2.5%	+ 6.0%	+ 9.3%	+ 6.6%	+ 8.0%	

Die Benennung der Wasserstoffkerne entspricht der Abb. 30. Alle ^1H -Spektren mit und ohne ^{19}F -Anregung besaßen ein gutes S/N-Verhältnis. Die NOE fielen insgesamt positiv und deutlich aus. In Abb. 32 ist das ^1H -Differenz-Spektrum von trans-Flupenthixol dargestellt; die NOE-Signale sind gekennzeichnet.

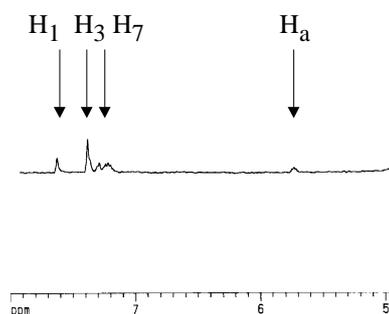


Abbildung 32:

^1H -Differenz-Spektrum von trans-Flupenthixol

Die intramolekulare ^{19}F ^1H -Kopplung zu den benachbarten Wasserstoffen H_1 und H_3 wurden in jedem Molekül erwartet und gefunden. Durch die Aggregation der Moleküle im Bereich der Trizyklen (Attwood et al. 1994) waren ebenso intramolekulare NOE für die Wasserstoffkerne H_7 und H_9 am unsubstituierten Ring nachweisbar. Die trans-Konformation der Seitenkette im Flupenthixol-Molekül wurde durch die NOE-Verstärkung des zur CF_3 -Gruppe räumlich nahestehenden Wasserstoffs H_a an der Doppelbindung bestätigt (Abb. 32). Auf eine Faltung der Seitenkette oder eine intermolekulare Anlagerung (Komplexbildung) deutet bei cis-Flupenthixol das Differenz-Signal des Wasserstoffs H_f der Hydroxyethylkette hin. Obwohl nur relativ wenige Anwendungen zur heteronuklearen ^{19}F ^1H -Kopplung veröffentlicht wurden, zeigten bereits die Vorversuche die Möglichkeiten zur Aufklärung von heteronuklearen Nachbarschaften.

Im Gemisch von Phospholipid-Liposomen und der Arzneistoffe war eine eindeutige Zuordnung der Differenz-Signale trotz einer leichten Peakformänderung mit positiven oder negativen NOE möglich. Eine Verstärkung des intermolekularen NOE könnte durch eine gezielte Änderung der ^{19}F ^1H -Dipol-Dipol-Relaxationsrichtung über den Austausch benachbarter intramolekularer Wasserstoffatome durch Deuterium im Arzneistoffmolekül und durch Verwenden von vollständig deuterierten Lösungsmittel erreicht werden (Hammond 1984). Da die optimierten experimentellen Bedingungen von mir nicht genutzt werden konnten, wurden die FID von 1000 Einzelpulsen aufsummiert, um einen auswertbaren Effekt zu erhalten. Die Ergebnisse der Differenz-Spektren gibt Tab. 17 wieder.

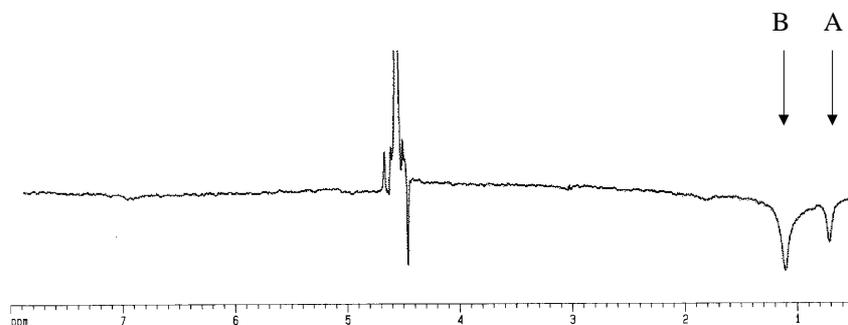


Abbildung 33: ^1H -Differenz-Spektrum von trans-Flupenthixol mit Liposomen aus Phosphatidylcholin

In allen fünf Fällen erlauben die hohen S/N-Zahlen Aussagen zu den Differenz-Signalen, die in drei Erscheinungen zu unterteilen sind (Abb. 33):

- negativer NOE am Signal der CH₃-Gruppe der Fettsäureketten, Signal A;
- negativer NOE am Signal der aliphatischen CH₂-Gruppen der Fettsäureketten ohne elektronenziehende Nachbarn, Signal B;
- NOE am Signal der Trimethylammonium-Gruppe der Cholin-Struktur (Abb. 31, Signal G).

Tabelle 17: ¹⁹F¹H-NOE-Signaldifferenzen von fünf Arzneistoffen mit Liposomen

Verbindung	Signal Gruppe	A	B	G	G	S/N
		-CH ₃ _{fs}	-CH ₂ ⁻ _{fs}	-CH ₃ _{ch}	-CH ₃ _{ch}	
Triflupromazin	ppm	0.75	1.15	3.08	3.11	40
	ΔI	-0.02	-0.046	-0.186	+ 0.166	
	absolut	- 0.3%	- 0.3%	- 3.5%	+ 3.1%	
Trifluoperazin	ppm	0.68	1.05	3.05	3.12	200
	ΔI	-0.137	-0.149	+ 0.049	-0.033	
	absolut	- 1.2%	- 0.4%	+ 0.5%	- 0.4%	
Fluphenazin	ppm	0.75	1.18	3.07	3.12	84
	ΔI	-0.051	-0.163	-0.283	+ 0.455	
	absolut	- 0.4%	- 0.5%	- 3.7%	+ 6.1%	
cis-Flupenthixol	ppm	0.72	1.11	3.05	3.10	134
	ΔI	-0.21	-1.5	-0.565	+ 0.425	
	absolut	- 1.1%	- 2.3%	- 3.2%	+ 2.4%	
trans-Flupenthixol	ppm	0.73	1.13	3.05	3.07	138
	ΔI	-0.636	-3.206	-0.044	+ 0.056	
	absolut	- 2.1%	- 2.8%	- 0.3 %	+ 0.3%	

Gruppe der Fettsäureketten (fs) oder der Trimethylammoniumgruppe (ch).

Da ein negativer NOE für Moleküle ab einer molaren Masse über 1600g/mol unter den spektroskopischen Bedingungen typisch ist, kann man sicher davon ausgehen, dass sich die CF₃-Gruppe eines Arzneistoffmoleküls zwischen mindestens drei Phospholipid-Molekülen (M ≈ 760 g/mol) im Bereich der aliphatischen Ketten befindet (Abb. 33). Die hohe Packungsdichte im Bereich der Fettsäuren lässt die Membran als ein Makromolekül erscheinen.

Die gegensätzlichen Vorzeichen der NOE-Signale zwischen 3.05 und 3.12 ppm können auf verschiedenen Ursachen beruhen (Tab. 17). Zuerst sind intermolekulare Wechselwirkungen an der Trimethylammonium-Gruppe an der Liposomenaußenseite zu nennen. Aus der Flexibilität des Cholinbausteins resultiert einen positiver NOE. Durch die cis-Stellung der Seitenkette zur CF₃-Gruppe in cis-Flupenthixol besteht für die Fluoratome die Möglichkeit, in Nachbarschaft zur Trimethylammonium-Gruppe zu gelangen. Im Differenz-Spektrum mit trans-Flupenthixol ist aufgrund der anderen Seitenkettenausrichtung nur ein schwaches NOE-Signal zu erkennen (Tab. 17).

Dass die pseudo-cis Stellung der Seitenkette zur Ausbildung eines NOE an der Trimethylammonium-

Gruppe essentiell ist, zeigen die Werte der Flächendifferenzen der NOE-Differenz-Signale und der prozentualen Signalunterschiede um 3.10 ppm. Ein erwarteter kleiner Betrag findet sich für die sterisch fixierte *trans*-Konformation von Flupenthixol, für die eine Einlagerung wie in Abb. 34, Form B, nicht möglich ist. Die gewonnenen Aussagen sind in Abb. 34 verdeutlicht.

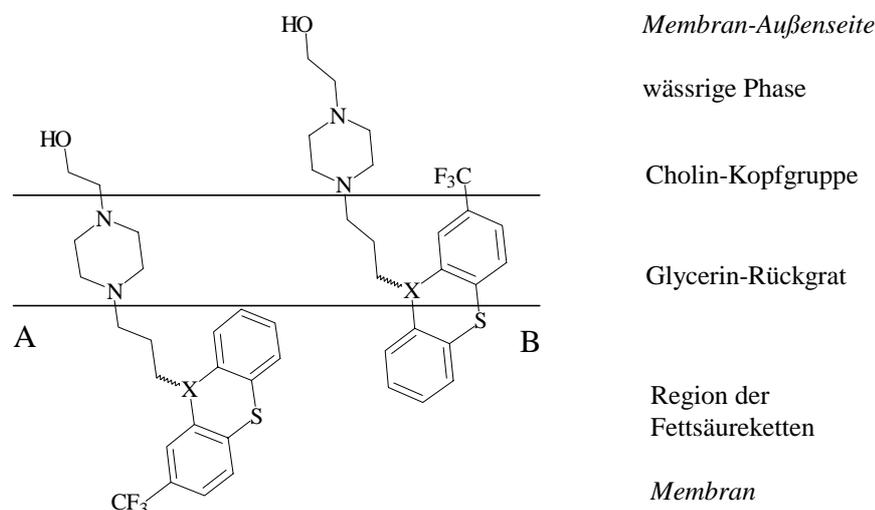


Abbildung 34: Postulierte Wechselwirkungsmöglichkeiten der CF_3 -Gruppen enthaltenden Verbindungen (Form A und B) in der äußeren Membranoberfläche.

Der NOE des aus einem Arzneistoff- und aus mindestens zwei Lipidmolekülen zusammengesetzten Komplexes an der Innenseite sollte eher negativ ausfallen. Die Interaktionen an der Membrannenseite im Bereich der Trimethylammonium-Gruppe können eine Signalabnahme verursachen, da mit einer stärkeren Krümmung der Membran eine vermehrte Ausbildung intra- und intermolekularer Lipidbausteinkontakte verbunden ist.

Mit Verlängerung der Seitenkette der Arzneistoffmoleküle, von N,N-Dimethylaminopropan über 4-Methylpiperazin-1-ylpropan zu 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ylpropan, nehmen die ΔI -Werte der NOE-Differenz-Signale und die prozentualen Unterschiede zwischen den ursprünglichen Signalen der CH_2 - und CH_3 -Gruppen zu. Unter Voraussetzung von konstanten ionischen und elektrostatischen intermolekularen Wechselwirkungen der Ladungszentren des Piperazinringes der Arzneistoffmoleküle in der Cholin-/Glycerin-Region der Membran (Abb. 34, Form A) vermag der lipophile Heterozyklusbereich, der an eine längere Seitenkette gebunden ist, tiefer in den Bereich der lipophilen Fettsäureketten einzutauchen. Es sind daher quantitativ mehr zwischenmolekulare Kontakte der CF_3 -Gruppen mit den tieferen Strukturelementen der Fettsäuren innerhalb der Membran möglich. Diese Vermutung wird durch die folgende Korrelation der liposomalen Verteilungskoeffizienten bei pH 7.4 mit den prozentualen Signaldifferenzen bestätigt.

$$\log D_{m\ 7.4} = 3.40 (\pm 0.05) - 0.16 (\pm 0.04) \text{ Signal A (\%)} \quad n = 4 \quad s = 0.05 \quad r^2 = 0.89 \quad F = 16.8$$

Werden die vier Prozent-Werte der CH_2 -Gruppen (Signal B) in die Korrelation einbezogen, bleibt das Ergebnis der Regression unverändert. Somit kann die Lage A in Abb. 34 von Phenothiazinen und Thioxanthenen, die eine Piperazin-1-ylpropan-Seitenkette besitzen, in biologischen Membranen angenommen werden, die durch weitere NMR-Experimente bestätigt werden muss.

5.3.2 Das EXSY-Verfahren zur Analyse von Permeationsprozessen

5.3.2.1 Auswahl von optimierten Versuchsbedingungen

Die NMR-Spektroskopie kann zur Analyse des Membranaustauschs von Molekülen und damit verbundenen Transportphänomenen umfassend angewendet werden. Dazu müssen bei einer Verwendung von Erythrocyten (RBC) die klinischen Parameter wie Hk, MCV und die mittlere RBC-Membranfläche unter Versuchsbedingungen bekannt sein, die oft um einen Mittelwert innerhalb festgelegter Grenzen schwanken (*Sha'afi et al. 1967; Thews et al. 1999*). Nach Erhöhung der Osmolarität der äußeren Phase um 46 mM NaCl blieb das MCV konstant (Abschnitt 5.1.2.2). Eine Änderung der Größe eines Erythrozyten wurde nicht nachgewiesen, so dass man ebenso von der Beibehaltung der Membranfläche ausgehen kann.

Die Validierung des Testsystems erfolgte über Modifizierungen der Zusammensetzung der RBC-Suspensionen und der Parameter der NMR-Experimente. Die einzelnen Ergebnisse sind in der Tab. 18 aufgelistet. Bei einer TFAM-Konzentration von 1.25 mM lag in jedem Einzelspektrum ein deutliches Signalpaar mit einem guten S/N-Verhältnis vor. Bei geringeren TFAM-Konzentrationen führte die unklare Trennung von Signal- zu Nichtsignalbereichen nach der Signalintegration zu Lösungen der Gl. 16 aus dem Bereich der komplexen Zahlen. Die experimentell bestimmte T_1 -Zeit von TFAM ohne RBC im ^{19}F -NMR-Spektrum betrug 4.13 s. Deren Vierfaches entspricht der Pausenzeit D1 zwischen jeder Pulsfolge von 15 s, die einen Kompromiss zwischen einer angestrebten vollständigen Spinrelaxation und einer schnellen Versuchsdurchführung darstellt. Die Beträge für die charakteristischen Konstanten der Geschwindigkeit des Eintritts k_1 und des Austritts k_{-1} von TFAM sind aus der Ergebnismatrix (Gl. 16) direkt entnehmbar. Das Verhältnis F_k aus den Geschwindigkeitskonstanten, $k_1 : k_{-1}$, gilt als Richtungsvektor für die TFAM-Verteilung bzw. -Anreicherung. Aus den anderen Ausgabewerten (A) und (B) (Abschnitt 9.4) können fiktive Relaxationszeiten für die dazugehörigen Spezies berechnet werden: aus (A) die T_1 -Zeit der extrazellulären und aus (B) die T_1 -Zeit der intrazellulären Fluor-Kerne.

$$(A) = - \left(\frac{1}{T_1^{\text{ex}}} + k_{-1} \right) \quad \text{Gl. 21a}$$

$$(B) = - \left(\frac{1}{T_1^{\text{in}}} + k_1 \right) \quad \text{Gl. 21b}$$

Diese theoretischen longitudinalen Relaxationszeiten dienen als Qualitätsparameter zur Einschätzung der berechneten Geschwindigkeitskonstanten. Die nach Gl. 21a berechnete T_1^{ex} -Zeit sollte der experimentellen T_1 -Zeit von TFAM ohne RBC von 4.13 s ähnlich sein.

Im gewählten RBC-System wurden gleiche T_1 -Zeiten (*inversion recovery*-Methode) der extra- und intrazellulär vorliegenden Kerne gemessen; sie betragen 2.05 s. Jedoch muss die Relaxationszeit der extrazellulären TFAM-Moleküle unverändert bleiben, da sie sich ausschließlich in einer wässrigen Umgebung befinden. Die identischen T_1 -Werte sprechen für einen schnellen transmembranären Austausch der TFAM-Moleküle und stellen den Mittelwert aus T_1^{ex} - und T_1^{in} -Zeit dar. Es ist zu erwarten, dass die Fluor-Kerne der innerhalb der RBC vorliegenden Moleküle durch die stärkere Einbindung in Wasserstoffbrücken schneller relaxieren, die T_1^{in} -Zeit ist in jedem Fall geringer als die T_1^{ex} -Zeit einzuschätzen.

Tabelle 18: Validierung des RBC/TFAm-Systems: Testergebnisse mit unterschiedlich zusammengesetzten Suspensionen aus 1D EXSY-Experimenten (P in cm/s)

Exp.- Name	[TFAm] mM	[NaCl]	D1 s	Hk	k_1 s^{-1}	k_{-1} s^{-1}	F_k	T_1^{ex} s	T_1^{in} s	P_1 $\cdot 10^4$	P_{-1} $\cdot 10^4$	F_p
(4/5)	0.25	154	1.0	0.71	5.72 ± 0.16	4.50 ± 0.12	1.27	0.31	0.61	1.50	2.08	-
(14/15a)	0.25	154	12.5	0.71	nicht lösbar, komplexe Zahlen							
(14/15b)	0.25	154	12.5	0.71	nicht lösbar, komplexe Zahlen							
(24/25a)	0.25	154	12.5	0.72	nicht lösbar, komplexe Zahlen							
(24/25b)	0.25	154	12.5	0.72	0.45 ± 0.02	1.56 ± 0.07	0.29	-	1.26	0.11	0.72	-
(2/3a)	1.25	154	15.0	0.72	4.10 ± 0.03	2.37 ± 0.01	1.73	1.77	1.76	1.03	1.09	0.94
(2/3b)	1.25	154	15.0	0.72	3.85 ± 0.02	2.31 ± 0.01	1.67	1.92	1.77	0.96	1.06	0.91
(12/13a)	1.25	154	15.0	0.71	4.70 ± 0.01	2.46 ± 0.01	1.91	2.98	1.58	1.24	1.14	1.09
(12/13b)	1.25	154	15.0	0.71	5.15 ± 0.01	2.57 ± 0.01	2.01	3.44	1.58	1.35	1.18	1.14
(A2/3a)	1.25	154	15.0	0.69	6.41 ± 0.01	3.43 ± 0.01	1.87	2.71	1.56	1.85	1.58	1.17
(A2/3b)	1.25	154	15.0	0.69	5.09 ± 0.01	2.96 ± 0.01	1.72	2.69	1.6	1.47	1.37	1.07
(reVb)	1.25	200	15.0	0.56	4.79 ± 0.02	4.63 ± 0.02	1.04	2.67	1.85	2.42	2.14	1.13
(reXa)	1.25	200	15.0	0.52	4.90 ± 0.01	5.29 ± 0.01	0.93	4.72	1.35	2.91	2.44	1.19
(reXb)	1.25	200	15.0	0.52	4.94 ± 0.01	5.36 ± 0.01	0.92	4.69	1.32	2.93	2.47	1.18
(reZa)	1.25	200	15.0	0.55	6.91 ± 0.01	6.10 ± 0.01	1.13	4.48	0.81	3.64	2.82	1.29
(reZb)	1.25	200	15.0	0.55	6.53 ± 0.01	5.59 ± 0.01	1.17	5.1	0.87	3.44	2.58	1.33

Die Permeationskoeffizienten, berechnet nach den Gl. 19a/b, stellen weitere interne Vergleichsgrößen zur Beurteilung der Membrangängigkeit von TFAM dar, aus denen ein Verhältnis $F_p, P_1 : P_{-1}$, gebildet wird. Ich verringerte nachfolgend den Hämatokrit der RBC-Suspensionen, um das Volumenverhältnis $V_{out} : V_{in}$ auszugleichen. Bei einem Hk von 0.71 existiert nach den Gl 18a/b ein Verhältnis 29% : 50%, welches sich in 45% : 39% bei einem Hk von 0.55 ändert. Im ursprünglichen Messansatz mit 154 mM NaCl und einem Hk von 0.71 traten sowohl starke Schwankungen in den k_1/k_{-1} -Werten und im Verhältnis F_k sowie große Abweichungen in den T_1 -Zeiten auf.

Die endgültige Versuchsbedingungen wurden wie folgt festgelegt:

- eine Pausenzeit zwischen den einzelnen Pulsen von 15 s;
- eine TFAM-Konzentration in der zu analysierenden Lösung von 1.25 mM;
- eine hypertone NaCl-Konzentration von 200 mM zur Stabilisierung der Membran;
- ein Hk-Wert um 0.55, da die verfügbaren Volumen der äußeren und inneren wässrigen Phase ausgeglichener sind.

5.3.2.2. Spektrenauswahl zum Zweiseiten-Austausch

In die Experimente zur Analyse von strukturspezifischen Einflüssen, die die Membrandurchgängigkeit kleiner Moleküle verändern, bezog ich die vier strukturell unterschiedlichen Verbindungen Triflupromazin, trans-Flupenthixol, Verapamil und Nicardipin ein. Die Messungen wurden bei einer einheitlichen Arzneistoffkonzentration durchgeführt, so dass relative Unterschiede in den Membraneffekten erkennbar werden können (Tab. 19). Eine Zusammenstellung aller zur Auswertung benötigten Einzelspektren beinhaltet die Abb. 35 und 36.

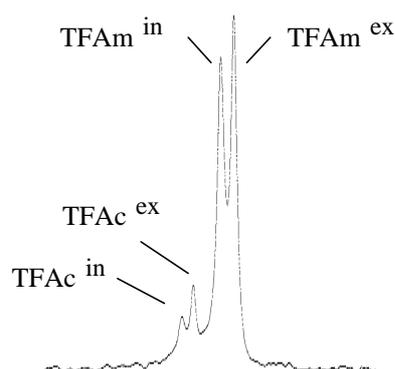


Abbildung 35: vollrelaxiertes ^{19}F -NMR-TFAM-Spektrum (1.25 mM) mit RBC (Hk 0.55)

Das Spektrum (Abb. 35) zeigt die aufgespaltenen ^{19}F -Signale der beiden Spezies TFAM^{ex} (extrazellulär) und TFAM^{in} (intrazellulär) mit einem Signalabstand von 73.2 Hz. Das Verhältnis der beiden, etwas tieffeldverschobenen Signale des Metaboliten Trifluoracetat (TFAc) ist gleich dem der Originalsubstanz.

Tabelle 19: 1D EXSY-Ergebnisse aus Einzelmessungen in vier RBC/TFAm/Arzneistoff- Systemen

Verbindung	Nr.	Hk	k_1 s ⁻¹	k_{-1} s ⁻¹	F_k	T_1^{ex} s	T_1^{in} s	P_1 · 10 ⁴	P_{-1} · 10 ⁴	F_p
Triflupromazin	C1	0.55	5.18 ± 0.02	4.97 ± 0.02	1.04	3.89	1.62	2.73	2.29	1.19
	C2	0.55	5.16 ± 0.02	4.80 ± 0.02	1.07	3.61	1.56	2.71	2.21	1.23
	D1	0.55	8.01 ± 0.03	8.00 ± 0.03	1.00	1.35	0.46	4.22	3.69	1.14
	E1	0.57	6.80 ± 0.03	6.41 ± 0.03	1.06	2.24	1.94	3.3	2.96	1.11
	E2	0.57	7.89 ± 0.05	7.21 ± 0.04	1.10	2.31	1.96	3.83	3.32	1.15
trans- Flupenthixol	D1	0.57	5.30 ± 0.01	4.78 ± 0.01	1.11	2.95	1.79	2.57	2.2	1.17
	D2	0.57	5.22 ± 0.01	4.79 ± 0.01	1.09	2.82	1.76	2.53	2.21	1.14
	E1	0.56	5.19 ± 0.01	5.32 ± 0.01	0.98	4.88	1.40	2.62	2.45	1.07
	E2	0.56	5.37 ± 0.01	5.24 ± 0.01	1.02	5.05	1.40	2.71	2.42	1.12
Verapamil	31	0.56	5.84 ± 0.01	5.83 ± 0.01	1.00	2.14	2.11	2.95	2.69	1.10
	32	0.56	6.04 ± 0.01	5.99 ± 0.01	1.01	2.05	2.09	3.05	2.76	1.11
	4a	0.56	9.19 ± 0.02	8.88 ± 0.02	1.03	1.52	3.03	4.64	4.1	1.13
	4b	0.56	8.88 ± 0.02	8.62 ± 0.02	1.03	1.52	2.96	4.49	3.97	1.13
Nicardipin	11	0.52	7.16 ± 0.02	7.72 ± 0.02	0.93	27.78	1.06	4.25	3.56	1.19
	12	0.52	7.46 ± 0.02	7.85 ± 0.02	0.95	142.8	0.98	4.43	3.62	1.22
	31	0.52	7.34 ± 0.05	8.01 ± 0.06	0.92	4.12	1.48	4.36	3.7	1.18
	32	0.52	6.45 ± 0.04	6.89 ± 0.05	0.94	3.77	1.61	3.83	3.18	1.20

Jedes Spektrenpaar der Signalfolgen in In und Ex (Abb. 36), beispielsweise 1 und 1', entstand bei gleicher Entwicklungszeit t_1 und setzt sich aus zwei Einzelaufnahmen 1 und 1' mit den beiden Mischzeiten t_m , 1 mit $t_m = 0$ s und 1' mit $t_m = 0.5$ s, zusammen.

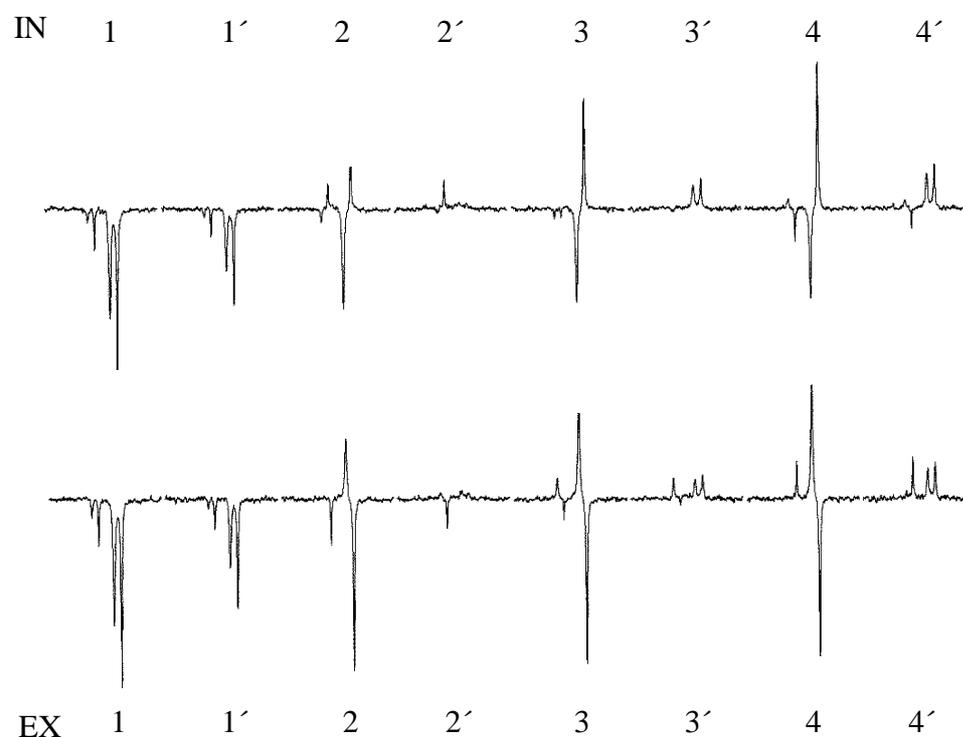


Abbildung 36: ^{19}F -NMR-TFAM-Spektren zum *overdetermined* 1D EXSY-Verfahren:
 IN - vier Paare von TFAM-Spektren mit Anregung des TFAMⁱⁿ-Signals;
 EX - vier Paare von TFAM-Spektren mit Anregung des TFAM^{ex}-Signals;
 ohne Mischzeit - kein Index; mit Mischzeit 0.5 s - Index am Signalpaar.

Aus der Abb. 36 werden die Intensitätsvektoren des TFAM-Gleichgewichts entnommen (Me). Für die Auswertung des Zweiseiten-Austausch-Vorgangs werden die Flächenintegrale aus den 16 Einzelspektren als reihenweise Vektoren erfasst. In eine Matrix (Mo) trägt man die TFAM-Intensitäten der acht Spektren ohne Mischzeit ein. Die Intensitäten der acht Spektren mit Mischzeit enthält eine andere Matrix (Mt). Die Reihen der Matrizen stehen mit den jeweiligen Entwicklungszeiten in Beziehung und die Spalten mit einer TFAM-Spezies. Der genaue Weg der Datentransformation ist im Abschnitt 9.4 dargestellt.

5.3.2.3 Der Einfluss von Arzneistoffen auf den Membrandurchtritt

Die EXSY-Experimente basieren auf der Annahme, dass die unspezifischen Effekte der Arzneistoffe auf die Membraneigenschaften (Seydel et al. 1994) eine messbare Änderung der Durchtrittsgeschwindigkeiten von TFAM nach sich ziehen. Die Streuung durch die Ergebnisse der Einzelbestimmungen lässt sich auf die Verwendung von lebenden RBC als biologisches Testsystem zurückführen. Die Mittelwerte pro Testreihe der Tab. 20 sind daher besser geeignet, um zu vergleichenden Aussagen zu gelangen, obwohl sich die Standardfehlerbereiche oft überschneiden.

Tabelle 20: Durchschnittswerte aller Einzelergebnisse der RBC/TFAm- und der RBC/TFAm/Arzneistoff-Systeme

Verbindung	Hk	[NaCl] mM	k_1 s^{-1}	k_{-1} s^{-1}	F_k	T_1^{ex} s	T_1^{in} s	P_1^a $\cdot 10^4$	P_{-1}^a $\cdot 10^4$	F_p
TFAm rein	0.71	154	4.89 ± 0.91	2.68 ± 0.43	1.82 ± 0.13	2.59 ± 0.64	1.64 ± 0.10	1.32 ± 0.32	1.24 ± 0.20	1.05 ± 0.11
TFAm rein	0.55	200	5.49 ± 0.97	5.25 ± 0.59	1.04 ± 0.10	4.08 ± 1.06	1.35 ± 0.47	2.96 ± 0.50	2.42 ± 0.27	1.21 ± 0.08
TFAm mit Triflupromazin	0.56	200	6.61 ± 1.34	6.28 ± 1.39	1.05 ± 0.04	2.68 ± 1.05	1.51 ± 0.61	3.36 ± 0.67	2.89 ± 0.64	1.16 ± 0.05
TFAm mit trans-Flupenthixol	0.56	200	5.27 ± 0.08	5.03 ± 0.29	1.05 ± 0.06	3.93 ± 1.20	1.59 ± 0.22	2.61 ± 0.08	2.32 ± 0.13	1.13 ± 0.04
TFAm mit Verapamil	0.56	200	7.49 ± 1.79	7.33 ± 1.65	1.02 ± 0.02	1.81 ± 0.33	2.55 ± 0.52	3.78 ± 0.90	3.38 ± 0.76	1.12 ± 0.02
TFAm mit Nicardipin	0.52	200	7.10 ± 0.46	7.62 ± 0.50	0.93 ± 0.02	3.95 ^b ± 0.18	1.28 ± 0.31	4.21 ± 0.27	3.52 ± 0.23	1.20 ± 0.02

^a in cm/s. ^b nur aus 2 Werten.

Eine Verringerung des Hk-Wertes in den reinen TFAm/RBC-Systemen bedeutet eine Zunahme an extrazellulärem Volumen in der Suspension, was sich in einer Verdopplung der Ausfluss-Geschwindigkeitskonstanten und deren Angleich an den k_1 -Wert äußert. Weiterhin führt diese Hk-Abnahme zu einer Verdopplung der Permeationszahlen. Die durchschnittlichen TFAm-Relaxationszeiten beim Hk 0.55 von $T_1^{ex} = 4.08$ s und $T_1^{in} = 1.35$ s gelten als Kriterium für das normale TFAm-Durchtrittsverhalten. Änderungen sind ein Indikator für Veränderungen in der Membran.

Bei Anwesenheit von ca. 200 μ M Triflupromazin, Verapamil oder Nicardipin im TFAm/RBC-System nimmt die durchschnittliche TFAm-Einfluss-Geschwindigkeitskonstante zu, im Fall von trans-Flupenthixol gleicher Konzentration bleibt sie unverändert. Wie aus dem konstanten Vergleichsmaß F_k hervorgeht, trifft gleiches für die Austritt-Geschwindigkeitskonstante zu. Nur bei Nicardipin besteht ein scheinbares Übergewicht an TFAm-Ausfluss, das möglicherweise auf den zu den anderen Suspensionen etwas kleineren Hk-Wert zurückgeführt werden kann. Auf einen schnellen Austausch der Referenzmoleküle in Gegenwart von Triflupromazin oder Verapamil weisen die Abnahme von T_1^{ex} und die Zunahme von T_1^{in} hin. Bei Verapamil ist sogar T_1^{ex} kleiner als T_1^{in} .

Die Permeationszahlen geben die selben Effekte der Verbindungen auf den TFAm-Durchtritt wie die Geschwindigkeitskonstanten wieder. Auffallend sind die Permeationszahlen mit trans-Flupenthixol, die an sich kleiner als die des Referenzsystems ausfallen. In allen übrigen TFAm/RBC-Systemen vergrößern sich die Permeationszahlen in einer Reihenfolge der zugegebenen Arzneistoffe Triflupromazin, Verapamil und Nicardipin. Da die Permeationskoeffizienten eine Hk-korrigierte Größe darstellen, kann Nicardipin als der Arzneistoff mit der höchsten Wirkung auf die Zunahme des

TFAm-Durchtritts durch die RBC-Membran bezeichnet werden.

Diese qualitative Aussage muss ich relativieren, da die Geschwindigkeitskonstanten nur bei einer Arzneistoffkonzentration bestimmt wurden. Erst aus den Konzentration/Wirkungs-Kurven pro Arzneistoff im TFAm/RBC-System wird die Bestimmung der EC_{50} -Werte als quantitatives Maß für die unspezifische Membranwirkung möglich. Außerdem müsste der pK_a -Einfluß bzw. der Anteil an geladenen oder ungeladenen Molekülen in Bezug zum Effekt berücksichtigt werden.

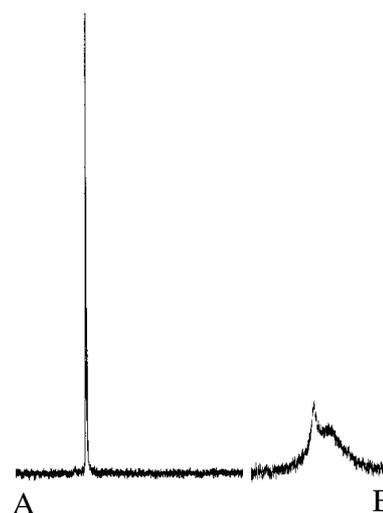
5.3.2.4 Grenzen des EXSY-Verfahrens

Mit einem, die spektroskopische Vermessung abschließenden 1D ^{19}F -Spektrum (wie Abb. 35) untersuchte ich die RBC-Suspension auf Veränderungen in ihrer Zusammensetzung, da die verwendeten Arzneistoffe oberflächenaktive Eigenschaften besitzen können. Eine hämolysierende Wirkung von Molekülen beruht auf der Herabsetzung der Oberflächenspannung zwischen der wässrigen und der Lipidphase der Membran. In Vorversuchen trat eine RBC-Lysis bei einer Arzneistoffkonzentration von ca. 700 μM bei Zugabe von cis-/trans-Flupenthixol am schnellsten auf, was den Erkenntnissen, die im Vergleich zu den anderen Arzneistoffen erhalten wurden, widerspricht.

Man kann die Erscheinungen folgendermaßen interpretieren: die trans-Flupenthixol-Moleküle lagern sich tief in die Membran ein (Abschnitt 5.3.1.2). Eine niedrige Konzentration bewirkt eine Verfestigung der Membran über eine Zunahme an intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Fettsäureketten und dem Trizyklus. Der unspezifische Durchtritt von kleinen Molekülen wird somit erschwert (Abschnitt 5.3.2.3). Die Membranintegrität wird aber ab einer bestimmten Grenzkonzentration aufgehoben, da der Kontakt der Membranbausteine infolge der fortschreitenden Arzneistoffeinlagerung aufgehoben wird.

Man kann die 1D EXSY-Experimente an RBC auch direkt an den ^{19}F -Signalen der Arzneistoffe durchführen.

Abbildung 37: ^{19}F -Spektrum von Fluphenazin in D_2O (A) und mit RBC (B)



Die Fluor enthaltenden Arzneistoffe verteilen sich in allen Protonierungsformen in die Membranen eines Phosphatidylcholin-Liposoms, wie das Spektrum B (Abb. 37) durch ein sehr breites Signal zeigt, das von den ^{19}F -Kernen an den Molekülen stammt, die sich entweder in der wässrigen Außen- und Innenphase, oder an der und in der Membran befinden, oder an membranständige Proteine gebundenen sind. Eine eindeutige Linienzuordnung und Integration der einzelner Signalbereiche ist daher nicht möglich.

6 Modellierung der Verteilungsvorgänge

6.1 Beschreibung der Modellierungsprogramme

6.1.1 Die Strukturoptimierung

Der dreidimensionale (3D) Aufbau eines Moleküls, also dessen Konformation, die Partialladungen der Atome sowie die relative Lage von Strukturen zueinander beeinflussen die Qualität von Zusammenhängen mit experimentellen Größen oder Parametern, die durch *Molecular Modeling* und darauf aufbauenden statistischen Verfahren erhalten werden (*Kubinyi* 1993).

Ein guter Ausgangspunkt für *Molecular Modeling*-Studien sind Röntgenkristallstrukturen, die energetisch günstige Molekülkonformationen liefern. Alle folgenden Rechenprozesse können auf diesen Molekülgeometrien aufbauen. Die übliche und notwendige Optimierung einer Startkonformation führt zum nächsten, meist lokalen Minimum. In dieser Arbeit wurde eine semi-empirische Rechenmethode zum Auffinden einer geometrie-optimierten Konformation benutzt. Eine semi-empirische Rechnung fußt formal auf einer *ab initio*-Technik, aber mit folgenden Vereinfachungen (*Kunz* 1997):

- Beschränkung der Rechnung auf die Valenzelektronen;
- Ersatz ausgewählter Integrale durch Näherungen oder Parametrisierungen aus Quantentheorie-fremden Größen oder experimentellen Daten.

Der Vorteil einer semi-empirischen Strukturoptimierung besteht im Mittelweg von Rechenzeit und naturnaher Modellierung.

6.1.2 GRID - Berechnung von Wechselwirkungspotentialen

Der räumliche und strukturelle Aufbau eines Moleküls bestimmt die Möglichkeiten, die Formen und die Stellen von Interaktionen mit dessen Umgebung. Das Programmpaket GRID (*Molecular Discovery*) wurde zur Vorhersage von nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen Molekülen und chemischen Teilchen entwickelt (*Goodford* 1985; *Wade et al.* 1993; *Wade und Goodford* 1993). Es kann zur Berechnung von molekularen Wechselwirkungsfeldern für bekannte dreidimensionale Strukturen verwendet werden. Als zu testendes Molekül (das Zielmolekül) sind ein einzelnes Molekül, ein Teil eines Makromoleküls oder eine räumlich geordnete Datenbank von Molekülen möglich, die entweder elektrochemisch neutral sind oder Ladungen enthalten. Ein Teilchen (die Sonde) kann ein neutrales Atom, ein Ion, eine funktionelle Gruppe oder ein kleines Molekül beschreiben, indem dessen Eigenschaften - van-der-Waals Radius (vdW);

- Anzahl der freien Elektronen in der äußeren Hülle (EZ);
- Polarisierbarkeit (α);
- elektrostatische Ladung (Q);
- optimaler Energiewert einer Wasserstoffbrücken-Bindung (E_{\min});
- Wasserstoffbrücken-Radius (r_{\min});
- Wasserstoffbrücken-Typ der Sonde sowie maximale Anzahl von Wasserstoffbrückendonor- und -akzeptormöglichkeiten (D/A)

definiert werden.

Zuerst werden alle Angaben zu den Atomtypen des Zielmoleküls überprüft, bevor es vollständig in einen virtuellen Käfig gelegt wird, der wiederum in Würfel mit wählbarer Kantenlänge unterteilt ist. Für jeden Eckpunkt wird das Wechselwirkungspotential (WWP) zwischen einer ausgewählten Sonde und den Atomen des Zielmoleküls berechnet, das auf der Summe der jeweiligen Energieterme, *Lennard-Jones*-, elektrostatischer, Wasserstoffbrückenbindungs- und entropischer Term (DRY-Sonde), basiert. Alle Informationen sind in einer binären Datei enthalten, die eine drei-dimensionale Energiewertematrix (*grid map*) darstellt und sowohl zur graphischen Visualisierung der Ergebnisse als auch zur Erzeugung von quantitativ auswertbaren Feldern oder abgeleiteten Deskriptoren Verwendung findet.

Ein Unterprogramm filtert die Energieminima aus der *grid map* heraus und listet die Energiewerte für die favorisierten Positionen der Sonde mit der jeweiligen Koordinatenposition auf. Besitzt ein Raumpunkt ein negativeres WWP relativ zu allen anderen Nachbarpunkten, sind die Anziehungskräfte zwischen Zielmolekül und Sonde an dieser Stelle besonders ausgeprägt und man spricht von einem bevorzugtem Wechselwirkungspunkt oder von einem lokalen Minimum. Die Angabe eines Energiegrenzwertes erweist sich zur besseren Selektion der gefundenen Minima aus dem gesamten Gitter als notwendig. Eine Interpolation der Punktkoordinaten ist dann sinnvoll, wenn sich das Energieprofil von Position zu Position nur wenig ändert. Werden die charakteristischen funktionellen Merkmale von zwei verschiedenen Molekülen, die räumlich benachbart sind, jeweils als Sonde oder Zielmolekül benutzt, werden die günstigsten Stellen für die intermolekularen Wechselwirkungen sichtbar (*Franke 1996; Fleischer 1999*). Der Vorteil des GRID-Kraftfeldes besteht gegenüber dem CoMFA-Verfahren (*Cramer et al. 1993*) in der Möglichkeit, unterschiedlichste Sonden auszuwählen (z.B. Wasser, Phosphat-Anionen).

6.1.3 VOLSURF - Erstellung von Molekül-Deskriptoren

6.1.3.1 Die Erstellung von molekularen Deskriptoren

VOLSURF (*Multivariate Infometric Analysis; Cruciani et al. a; Cruciani et al. b*) ist ein Rechenprogramm, das aus 3D-*grid maps* für Wechselwirkungsenergien wenige vektorielle Deskriptoren ableitet und diese zu einer weiteren statistischen Analyse zur Verfügung stellt. Dazu werden aus Raumpunkten oder von Regionen mit definierten Energiewerten (WWP), die sich unmittelbar auf der van-der-Waals-Oberfläche der dreidimensionalen Struktur befinden, einzelne Deskriptoren erstellt. Der Vorteil dieser neuen Parameter besteht darin, dass die Art der räumlichen Überlagerung (*alignment*) der betrachteten Moleküle keinen Einfluss auf die Größe der Deskriptoren hat. Trotz des Vorteils gegenüber dem CoMFA-Verfahren (*Cramer et al. 1993*), bei dem die statistische Relevanz sehr stark vom *alignment* der Moleküle abhängig ist, spielt die jeweilige Konformation des Moleküls bei der Ableitung der Deskriptoren eine Rolle. Liegen verschiedene Molekülkonformationen vor, empfiehlt sich eine vergleichende Betrachtung mit den anderen Molekülstrukturen der Datenbank im zu erstellenden Modell.

Die physikochemischen Eigenschaften, wie Molekülgröße, Molekülform, Fähigkeiten zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken sowie die Hydrophobie lassen sich mit Hilfe der Deskriptoren leicht verständlich aufbereiten (*Guba und Cruciani 1998; Mannhold et al 1999*).

6.1.3.2 Die Eigenschaften der Deskriptoren

Von der Wasser-Sonde allein werden neun Deskriptoren abgeleitet. Die Energiewerte beziehen sich auf die Potentiale der Gitterpunkte des GRID-Käfigs. Das molekulare Volumen V repräsentiert das durch ein Molekül verdrängte Wasservolumen in \AA^3 und ist definiert als das Volumen, das sich innerhalb der Oberfläche mit einem WWP von 0.20 kcal/mol befindet. Entsprechend wird die molekulare Oberfläche S in \AA^2 berechnet, indem die Wasser-Sonde bei einem WWP von 0.20 kcal/mol über das Zielmolekül rollt. Der Quotient aus V und S wird als Faltungskoeffizient R bezeichnet und ist ein Maß der molekularen Ausdehnung. Der Deskriptor G kennzeichnet die Kugelförmigkeit des Moleküls und steht für dessen Flexibilität.

Die hydrophilen Regionen eines Moleküls werden über das Volumen um eine Struktur definiert, bei dem eine Wasser-Sonde ein negatives WWP liefert. Zur weiteren Differenzierung dienen acht WWP-Grenzwerte der Wasser-Sonde (-0.2; -0.5; -1.0; -2.0; -3.0; -4.0; -5.0; -6.0 kcal/mol). Die resultierenden Regionen $W1$ - $W8$ unterteilt man erfahrungsgemäß in $W1$ - $W4$, die Polarisierbarkeit und Dispersionskräfte beschreiben. Die Werte $W5$ - $W8$ charakterisieren polare Regionen und Regionen mit Wasserstoffbindung-Donor-Akzeptor-Eigenschaften. Das *Integy*-Moment (*interaction energy = integy*) $Iw1$ - $Iw8$, berechnet für die acht WWP-Werte der $W1$ - $W8$ Regionen, beschreibt als Vektor das Ungleichgewicht zwischen dem Massezentrum eines Moleküls und den Zentren der darum befindlichen hydrophilen Regionen $W1$ - $W8$. Wenn sich große Beträge ergeben, sind die hydrophilen Regionen an einer Stelle auf der Moleküloberfläche konzentriert. Befinden sich die polaren Bereiche in der Nähe des Massenzentrums oder liegen sie an gegenüberliegenden Seiten der Molekülstruktur bezüglich der Molekülmitte, bleibt das *Integy*-Moment relativ klein. Die Kapazitätsfaktoren $Cw1$ - $Cw8$ repräsentieren einen Quotient aus den acht hydrophilen Regionen $W1$ - $W8$ und der molekularen Oberfläche S . Sie stellen ein Maß für den Anteil an Hydrophilie pro Oberflächeneinheit dar. Die drei lokalen Wechselwirkungsstellen mit den negativsten WWP des Zielmoleküls mit der Wasser-Sonde werden in den Deskriptoren für die lokalen Energieminima $Emin1$ - $Emin3$ erfasst. Die Abstände zwischen den lokalen Energieminima führen zu den Vektoren $D12$, $D13$, $D23$ in \AA .

Entsprechend den hydrophilen Regionen bei acht Wechselwirkungspotentialen werden die hydrophoben Regionen $D1$ - $D8$ definiert. Dazu wird die DRY-Sonde eingesetzt, wobei der Bereich der Energien angepasst wird (-0.2, -0.4, -0.6, -0.8, -1.0, -1.2, -1.4 und -1.6 kcal/mol). Weitere Deskriptoren, die ausschließlich von der DRY-Sonde abgeleitet werden, sind die hydrophoben *Integy*-Momente $ID1$ - $ID8$, die vektoriell die räumliche Trennung von Massezentrum und den Zentren der acht hydrophoben Regionen $D1$ - $D8$ messen.

Aus der Kombination der Wasser- mit der DRY-Sonde sind Aussagen zu dominierenden Effekten möglich. Der Quotient aus den hydrophilen und den hydrophoben Regionen bei -3.0 zu -0.6 kcal/mol und bei -4.0 zu -0.8 kcal/mol heißt Hydrophilie-Lipophilie-Balance $HL1$ - $HL2$. Das amphiphile Moment A kann man sich als gerichtete Verbindung zwischen den Zentren der hydrophoben zur hydrophilen Domäne vorstellen. Die Länge des Vektors ist proportional der Stärke des amphiphilen Moments und gilt als Maß für die Fähigkeit einer Verbindung, eine Membran zu durchdringen. Der kritische Dichteparameter CP bezeichnet die molekulare Packungsdichte bei Molekülformationen

ähnlich einer Mizelle und charakterisiert das Verhältnis von hydrophoben zu lipophilen Bestandteilen einer Struktur.

Acht weitere Deskriptoren für hydrophile Regionen W_{x1} - W_{x8} können durch VOLSURF extrahiert werden, wenn entweder eine amphiphile, eine polare oder eine Sonde mit Ladungen in die GRID-Kalkulation einbezogen wird. Die jeweiligen Grenzwerte der WWP richten sich nach den Sonden-Eigenschaften. Aus der Kombination der Wasser- mit einer polaren Sonde werden die Wasserstoffbrücken-Kapazitäten $HB1$ - $HB8$ abgeleitet. Sie repräsentieren die Fähigkeiten des Zielmoleküls zur Bildung von Wasserstoffbrücken, da der Deskriptor die Unterschiede in den Volumen der hydrophilen Regionen zwischen der Wasser-Sonde und der polaren Sonde für jede Potentialstufe berücksichtigt. In Abhängigkeit von den Eigenschaften der verwendeten polaren Sonde werden verschiedene HB -Werte erhalten (nach VOLSURF-Handbuch, *Multivariate Infometric Analysis*).

Die extrahierten Deskriptoren können zu QSAR-Analysen herangezogen werden. Mit Hilfe einer multivariaten Datenanalyse lassen sich pharmakokinetische und physikochemische Eigenschaften sowie die Unterschiede in der Stärke von biologischen Effekten der Moleküle erklären (*Mannhold et al. 1999*).

6.1.4 GOLPE - Deskriptor-Analyse und Datenelimination

6.1.4.1 Die PLS-Analyse

Das *partial least squares*-Verfahren (PLS) ist ein Regressionsverfahren der multivariaten Datenanalyse zur Erklärung einer oder mehrerer abhängiger Aktivitätsvariablen durch unabhängige Strukturvariablen und eine verbreitete Rechenmethode, die mit solchen in der 3D QSAR-Analytik gebräuchlichen X-Matrizen (Gesamtmenge aller Deskriptorbeträge pro Verbindung) umgehen kann (*Wold et al. 1993*). Es ist insbesondere geeignet, wenn die Anzahl der Strukturvariablen (Deskriptoren) größer ist als die Zahl der zu untersuchenden Verbindungen und Interkorrelationen zwischen den Strukturvariablen bestehen (*Cruciani et al. 1993*).

Das PLS-Verfahren ist verwandt mit der Hauptkomponenten-Analyse (Abschnitt 3.5.1). Der Unterschied liegt in der Art, wie die Hauptkomponenten (latente Variablen) extrahiert werden. Bei der Hauptkomponenten-Analyse werden ohne Berücksichtigung der Y-Variablen orthogonale Hauptkomponenten so ausgewählt, dass mit möglichst wenigen Hauptkomponenten ein Maximum der Varianz der X-Variablen beschrieben werden kann. Beim PLS-Verfahren gewinnt man ebenfalls durch lineare Kombination aus den X-Variablen zueinander orthogonale, sogenannte latente Variablen (LV), die jedoch zusätzlich mit den Aktivitätsvariablen eine maximale Korrelation aufweisen. Die erste latente Variable erklärt den größten Varianzanteil. Jede neue latente Variable erfasst das Maximum an Varianz, die bisher nicht einbezogen wurde und dient der Zunahme an Variation, die das Model erklärt.

Beide Verfahren zerlegen die ursprüngliche X-Matrix in zwei andere Matrizen. Die *loading*-Matrix enthält Informationen über die Deskriptoren und enthält pro latenter Variablen einen Ladungsvektor jedes Deskriptors. Die *loading*-Werte kennzeichnen die Größe des Einflusses der ursprünglichen Variablen (Deskriptoren) auf die latente Variable und geben an, inwiefern die einzelnen Variablen zur latenten Variable parallel gehen. Die *loading*-Werte entsprechen dem Cosinus des Winkel zwischen

den Vektoren der ursprünglichen Deskriptoren und den extrahierten latenten Variablen. Ein kleiner *loading*-Wert eines Deskriptors zeigt, dass die Information nur unzureichend von der latenten Variablen extrahiert wurde. Eine perfekte Wiedergabe eines Deskriptors innerhalb einer LV führt zu einer Ladung von 1. Als Grenzwert für eine signifikante Ladung einer ursprünglichen Variablen durch eine latente Variable wird allgemein ein Wert von 0.7 gewählt, da dieser ca. 50% der Varianz der ursprünglichen Variablen entspricht.

Die *score*-Matrix beinhaltet Informationen über die Verbindungen. Dabei ist jedes Molekül anstatt durch seine Deskriptoren über seine Beträge zu den *score*-Werten der jeweiligen latenten Variablen charakterisiert. Die *score*-Werte stellen somit die Projektion der ursprünglichen Variablen (Verbindungen) auf die latenten Variablen dar. In diesem Zusammenhang sind die *score*-Werte der ersten LV von besonderer Bedeutung. Sie repräsentiert den generellen Zusammenhang zwischen den Molekülen und den Aktivitätsvariablen, weil die erste LV die meiste Varianz extrahiert.

Bei der PLS-Analyse sollen die latenten Variablen sowohl die X-Matrix als auch die Y-Matrix repräsentieren. Dabei wird der bestmögliche Zusammenhang zwischen den X- und Y-Variablen angestrebt. Die Kovarianz zwischen X- und Y-Variablen wird somit maximiert. Mit zunehmender Anzahl an latenten Variablen kann eine überzogene Anpassung (*overfitting*) auftreten. Die optimale Anzahl der latenten Variablen wird anhand der Vorhersagekraft bei unterschiedlicher Zahl an LV bestimmt. Im Gegensatz zur multiplen linearen Regression (MLR) dient beim PLS-Verfahren die Vorhersagekraft als Auswahlkriterium für das beste Modell.

Als wichtige Kennfaktoren einer PLS-Analyse sind demnach die Anzahl der zu extrahierenden latenten Variablen, die *score*-Werte der Verbindungen und die *loading*-Werte der ursprünglichen Variablen (Deskriptoren) in der ersten latenten Variablen herauszustellen.

6.1.4.2. Testung der Vorhersagekraft

Zur Kontrolle der Signifikanz des Beitrags der einzelnen latenten Variablen eignet sich das *cross validation*-Verfahren (CV). In Verbindung mit der PLS-Analyse nutzt man die CV zur Bestimmung der optimalen Anzahl latenter Variablen (Kubinyi und Abraham 1993). Es gibt verschiedene Vorgehensweisen, die Vorhersagekraft des Modells abzuschätzen:

Leave-one-out-Modelle (LOO) werden erstellt, indem ein Objekt (Verbindung) aus der PLS-Analyse ausgelassen wird (Testsatz). Für diese Verbindung wird der Aktivitätswert nach einer erneuten PLS-Analyse berechnet. Dieser Vorgang wird zyklisch wiederholt, bis jede Verbindung einmal ausgelassen und ihr Y-Wert vorhergesagt worden ist. Die unberücksichtigte Information einer ausgelassenen Verbindung kann sich in Fall von Objektgruppen weiterhin im Modell befinden, so dass sich die LOO-Methode eher als eine oberflächliche Testung erweist.

Die *random group*-Methode, besser als *leave-n-out*-Methode zu bezeichnen, trägt diesem Umstand Rechnung. Die Einteilung der Objekte (Verbindungen) in Gruppen erfolgt zufällig und die Prozedur wird mehrfach wiederholt, wobei üblicherweise 5 Gruppen, entsprechend 20% der Verbindungen, ausgewählt werden. Jede Gruppe (Testsatz) besteht aus einer ausgeglichenen Menge an Objekten. Nun wird jede Gruppe einmal pro Analyse ausgelassen und die Aktivitäten der Objekte des entsprechenden Testsatzes vorhergesagt. Im Gegensatz zur LOO-Methode variiert die Vorhersagekraft

in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Gruppen. Aus kombinatorischen Gründen (exponentielle Zunahme der Kombinationsmöglichkeiten) ist es selbst bei kleineren Datensätzen unmöglich, systematisch alle Gruppierungen durchzurechnen. Daher wird die Prozedur mehrfach wiederholt (20 bis 100) und der Mittelwert der statistischen Größen gebildet. Die *random group*-Methode führt zu einer mehr konservativen Abschätzung der Vorhersagekraft. Je geringer die Zahl der Gruppen, desto höher ist die Zahl der Gruppenmitglieder und folglich auch die Härte der Modellvalidierung. Als Ergebnis erhält man die mittlere Vorhersagekraft q^2 und die Standardabweichung der Vorhersage.

Um ein von der Varianz der Aktivitätswerte unabhängiges Maß für die Vorhersagekraft des Modells zu erhalten, wurde ein *cross*-validiertes Bestimmtheitsmaß, der q^2 -Wert, eingeführt. Die optimale Anzahl an latenten Variablen kann anhand des kleinsten Wertes der Standardabweichung in Verbindung mit dem höchsten q^2 -Wert entnommen werden.

$$q^2 = 1 - \left[\frac{\sum (Y_{\text{obs}} - Y_{\text{pred}})^2}{\sum (Y_{\text{obs}} - \bar{Y})^2} \right] \quad \text{Gl. 22}$$

In Analogie zur Standardabweichung der Schätzwerte s , ein Maß für die Güte der Anpassung der Gleichung, wurde eine Standardabweichung der Vorhersagen SDEP (*standard deviation of error of prediction*) für das PLS-Verfahren definiert. Die SDEP-Berechnung in GOLPE (Gleichung 23a) berücksichtigt nicht die Zahl der latenten Variablen, wie es in der MLR und auch im QSAR-Modul von SYBYL üblich ist (Gleichung 23b).

$$\text{SDEP} = \sqrt{\frac{\sum (Y_{\text{obs}} - Y_{\text{pred}})^2}{n}} \quad \text{Gl. 23a}$$

$$\text{SDEP} = \sqrt{\frac{\sum (Y_{\text{obs}} - Y_{\text{pred}})^2}{n - c - 1}} \quad \text{Gl. 23b}$$

GOLPE berechnet weiterhin eine Standardabweichung von SDEP, der SDEV-Wert (*standard deviation of the SDEP values*). Die Indizes der Aktivitätswerte stehen für:

Y_{obs}	beobachteter Y-Wert;	Y_{pred}	vorhergesagter Y-Wert durch PLS mit CV;
\bar{Y}	Mittelwert aller Y-Werte;	c	Zahl der latenten Variablen des Modells.

Das Modell mit dem höchsten q^2 -Wert und den kleinsten SDEP- und SDEV-Werten wird als das beste Modell betrachtet. Die als optimal gefundene Anzahl latenter Variablen (*optimal number of components* = onc) ist ein Maß für die Komplexität des Modells. Je weniger LV extrahiert werden müssen, um einen bestimmten q^2 -Wert zu erreichen, desto einheitlicher ist der Zusammenhang zwischen den Strukturvariablen und den Aktivitätswerten.

6.1.4.3 Die Variablenselektion

Das Konzept der Variablenselektion in der 3D QSAR-Analyse basiert auf der Überlegung, dass von der großen Zahl an Strukturvariablen in der X-Matrix nur wenige für die Korrelation mit den Y-Werten entscheidend sind, d.h., viele Strukturvariablen (Deskriptoren) stehen in keiner Beziehung zur Aktivität (*Cruciani et al. 1993*). Obwohl diese Deskriptoren keinen Beitrag zur Erklärung der Y-Werte liefern, beeinflussen sie die Struktur der X-Matrix und können so die essentiellen, Information enthaltenden Variablen überdecken. Mit Hilfe des GOLPE-Programms (*Multivariate Infometric Analysis, Cruciani et al. 1998*) ist es möglich, die Variablen ohne Informationen von den mit den wichtigen Informationen zu trennen.

Aufgrund der Vielzahl der X-Variablen ist eine systematischer Ansatz zum Auffinden der Information enthaltenden Variablen nicht möglich. Insbesondere hängt die Varianz der X-Matrix von den ausgewählten Variablen (Deskriptoren) ab. Es wird deshalb ein Verfahren der Versuchsplanung (experimentelles Design) eingesetzt, um mit möglichst wenigen Rechnungen ein Maximum an Information über die relevanten X-Variablen zu erhalten. Hierzu gehören das *D-Optimal Design* und das *Fractional Factorial Design* (*Seydel und Schaper 1979*).

Das *Fractional Factorial Design* (FFD) entwickelt eine Vielzahl an reduzierten Modellen mit einer im Gegensatz zum Ausgangsmodell verminderten Zahl an Strukturvariablen. Die Vorhersagekraft jedes reduzierten Modells wird mit CV überprüft und es wird eine Übersicht (*design matrix*) von Vorhersagekraft eines Modells bei Anwesenheit (Eintrag \oplus) oder Abwesenheit (Eintrag \ominus) jeder X-Variable erstellt. Durch multiple Kombination aller Modelle ist der konkrete Effekt bei An- und Abwesenheit einer Variable auf die Vorhersagekraft q^2 bzw. den SDEP-Wert zugänglich. Der Effekt E_X der Variable X wird berechnet:

$$E_X = (\text{SDEP}_{\oplus X} - \text{SDEP}_{\ominus X}). \quad \text{Gl. 24}$$

Dabei ist $(\text{SDEP}_{\oplus X})$ der durchschnittliche SDEP-Wert der Modelle, die die Variable X einschließen und $(\text{SDEP}_{\ominus X})$ der durchschnittliche SDEP-Wert der Modelle ohne die Variable X. Beim FFD-Verfahren besteht die Gefahr der Selektion von Variablen als relevant, die es aber nicht sind. Deshalb werden zufallsverteilte *ghost*-Variablen in die *X-design matrix* integriert. Der mittlere Effekt der *ghost*-Variablen (V) wird mit dem Effekt der echten Variablen E_X verglichen:

- $E_X < V$ die Variable X ist unbestimmt;
- $E_X > V$ und $E_X < 0$ die Variable X vermindert den SDEP-Wert, (Verbesserung der Vorhersage), sie ist relevant;
- $E_X < V$ und $E_X > 0$ die Variable X erhöht den SDEP-Wert (Abnahme der Vorhersage), sie ist nicht relevant.

Nun können die als nicht relevant erfassten Variablen aus der gesamten X-Matrix entfernt werden. Die unbestimmten Variablen haben entweder einen positiven oder negativen E_X -Wert, der nicht von den Effekten der *ghost*-Variablen unterschieden werden kann. Die Zahl der hinzugefügten *ghost*-Variablen beeinflusst somit das Ergebnis der Variablenselektion. Die Einschätzung der Relevanz von Variablen nimmt mit der Zahl an *ghost*-Variablen zu. Das Selektionsverfahren gilt als abgeschlossen, wenn die Zahl der verbliebenen Variablen unverändert bleibt. Dabei darf die ursprüngliche Struktur der

X-Matrix nicht zerstört worden sein, auch wenn keine befriedigende Übereinstimmung mit den Aktivitätsdaten erreicht wurde.

Die Variablenselektion sollte nur eingesetzt werden, wenn das *cross*-validierte Bestimmtheitsmaß q^2 des ursprünglichen Modells nicht geringer als 0.3 ausfällt. Weiterhin darf das ursprüngliche Modell keine Ausreißer oder besondere Gruppierungen der Verbindungen enthalten. Ansonsten erklärt ein Modell mit selektierten Variablen überwiegend die Ausreißer, führt zu unechten Ergebnissen und zu einem Modell ohne Allgemeingültigkeit (nach GOLPE-Handbuch, *Multivariate Infometric Analysis*).

6.2 Die Anwendung der Modellierungsverfahren

6.2.1 Allgemeine Vorbereitungen

Aus der Cambridge Structural Database (*Cambridge Crystallographic Data Center*), einer Sammlung von Kristallstrukturen, wurden alle eingetragenen Strukturen der betrachteten Arzneistoffmoleküle entnommen. Keine Konformationen waren von Fluphenazin, Gallopamil, Nicardipin, Nilvadipin, Isradipin, Lacidipin und Lercanidipin vorhanden. Sie wurden aus den Röntgenkristallstrukturen verwandter Verbindungen abgeleitet: Fluphenazin von Perphenazin, Gallopamil von Verapamil, Nicardipin und Lercanidipin von Amlodipin, Nilvadipin, Isradipin und Lacidipin von Nifedipin.

Die Modellierung der drei-dimensionalen Strukturen erfolgte mit SYBYL (*TRIPOS*). Zur Berechnung der atomaren Partiaalladungen der Moleküle mit anschließender Strukturoptimierung verwendete ich das Programm MOPAC (*Quantum Chemistry Program Exchange*) mit dem AM1-Rechenmodus und den Optionen 'precise' und 'gnorm-0.2'. Das Verfahren wurde zur Ladungsberechnung und Geometrieoptimierung für die elektrisch neutralen und die einfach geladenen Molekülstrukturen angewendet.

6.2.2 Rechnerische Vorhersage von Verteilungskoeffizienten

Zur rechnerischen Vorhersage von *n*-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten der neutralen Molekülformen verwendete ich die Programme ClogP, ACD und HINT.

ClogP (*BioByte*) basiert auf einer zwei-dimensionalen Methode nach *Leo* und *Hansch*, die auf Molekülfragment-Konstanten aufbaut. Sie wurden als Differenzwerte von substituierten zu den unsubstituierten Verbindungen entwickelt. Zusätzliche Korrekturfaktoren berücksichtigten Nachbarschafts- und Synergieeffekte mehrerer Substituenten. Das Programm bemerkt Berechnungsprobleme bei bestimmten Substitutionsmustern, die zu großen oder zu geringen $\log P$ -Werten führen (*Leo* 1990; *Leo* 1993). Das ACD-Programm (*Advanced Chemistry Development*) benutzt einen ähnlichen Rechenalgorithmus, wobei die $\log P$ -Beiträge von Atomen, funktionellen Gruppen und intramolekularen Effekten aus einem Datensatz von 3600 experimentell bestimmten Verteilungskoeffizienten stammen. Die Ergebnisse werden mit einem Fehlerbereich angegeben. Je größer der Fehlerbereich ist ($\text{Maximum} \pm 0.62$), desto unsicherer wird der Verteilungskoeffizient durch das Programm vorhergesagt. HINT (*eduSoft*) wurde als Rechenmethode für drei-dimensionale Strukturen entwickelt, die Lipophiliekonstanten von Atomen benutzt. Der Beitrag von Wasserstoffatomen zur Lipophilie einer

Verbindung wurde einheitlich festgelegt. Die Lipophilie der anderen Atome eines Fragments wird errechnet, indem der Beitrag der Zentralatome so angepasst wird, dass die Summe aller einzelnen Atomwerte den experimentellen Wert des Fragments ergibt. Nachbarschaftseffekte können entweder über die Bindungen (entsprechen dem Bindungsmuster - HINT_2D) oder über den Raum (konformationsabhängig - HINT_3D) berücksichtigt werden (Kellog et al. 1991). Beide HINT-Verteilungskoeffizienten wurden mit den geometrie-optimierten Strukturen berechnet.

6.2.3 Vorgehensweise beim *Molecular Modeling*

Der gesamte Datensatz wurde in strukturhomologe Verbindungen geordnet und in einzelne Datenbanken aufgespalten:

- Neutralformen der Phenothiazine und Thioxanthene;
- Neutralformen der 1,4-Dihydropyridine;
- Neutralformen aller Verbindungen;
- einfach geladene Ionen der Phenothiazine und Thioxanthene;
- einfach geladene Ionen aller Verbindungen;
- je ein Molekül der organischen Phasen.

Mit Hilfe des Programms SYBYL (*TRIPOS*) wurden die Moleküle räumlich übereinander gelegt (*fitting*). Die Superpositionierung der Verbindungen erfolgte generell atombasiert. In der Gruppe der Phenothiazine wählte ich als Bezugspunkte alle korrespondierenden Atome des Phenothiazin-Rings unter Berücksichtigung einer einheitlichen Lage des Ringsubstituenten und möglichst einer zum Ringsubstituenten transständigen Seitenkette (Pajeva und Wiese 1998). Gleiches galt für die Thioxanthene, wobei die Lage der Seitenkette unberücksichtigt blieb. In die atombasierte Superpositionierung der 1,4-Dihydropyridine wurde die Atome des 1,4-Dihydropyridin-Ringes zuzüglich des aromatischen Atoms in Stellung 1 einbezogen. Die Verbindungen vom Phenylalkylamin-Typ wurden zuerst nach einer ähnlichen Lage der aliphatischen Kette verschoben, gefolgt durch die Ausrichtung der aromatischen Ringe.

Die geometrie-optimierten und geordneten Konformationen dienten als Ausgangsstrukturen der GRID-, VOLSURF- und GOLPE-Berechnungen. Um die GRID-Felder aller Verbindungen später in den VOLSURF- und GOLPE-Analysen verwenden zu können, wurde für jede Datenbank ein einheitlicher GRID-Käfig definiert. Einen schematischen Überblick zum Ablauf des *Molecular Modeling* zeigt die Abb. 38. In der linken Spalte befinden sich die Programme, mit denen die Arbeitsschritte für die jeweiligen Molekülgruppen in der Reihenfolge der Pfeile durchgeführt wurden. Die Ziele der Modellierungen sind unterstrichen dargestellt.

Die drei organischen Phasen (Abschnitt 3), *n*-Octanol, PGDP und Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC), werden durch jeweils ein Molekül repräsentiert. Mit dem Programm GRID (*Molecular Discovery*) wurde die Zahl und die Lage von interpolierten Punkten mit bevorzugten intermolekularen Wechselwirkungspotentialen analysiert.

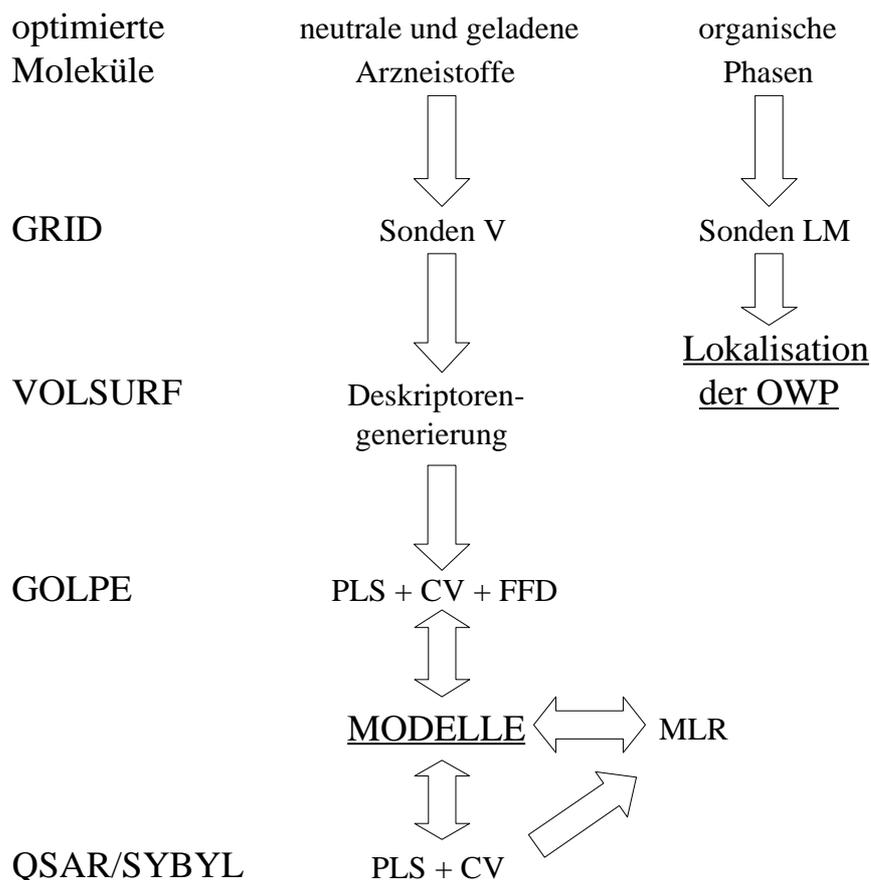


Abbildung 38: Übersicht zum Weg der Modellierungen

Die statistische Auswertung von Zusammenhängen zwischen Strukturvariablen und Koeffizienten, die das Verteilungsverhalten charakterisieren, erfolgte durch *partial least squares*-Analysen (PLS) und mit multiplen linearen Regressionen (MLR) bei den neutralen und geladenen Arzneistoffmolekülen. Die entwickelten Modelle sollten möglichst signifikant strukturelle Ursachen des experimentellen Verteilungsverhaltens erklären.

6.2.4 Programmoptionen und Parameterauswahl

Bei den Berechnungen mit dem GRID-Programm verfolgte ich zwei Strategien:

1. Analyse der favorisierten Wechselwirkungspunkte nach Potential und Lage mit den Molekülen der organischen Phasen als Zielstrukturen und
2. Erfassung der strukturellen Informationen der Arzneistoffkonformationen als dreidimensionale Potentialfelder.

Da die Ergebnisse der GRID-Kalkulationen auf unterschiedlichen Wegen analysiert wurden, kamen verschiedene Parameter und Sonden zur Anwendung. Die Sondenauswahl der Untersuchungen nach Punkt 1. basierte auf den Strukturelementen der Arzneistoffmoleküle. Die binären GRID-Ergebnisse wurden in einzelne Dateien zerteilt, die die Resultate für jedes eingesetzte Molekül mit jeder Sonde enthielten. Mit Hilfe weiterer Unterprogramme (MINIM, FILMAP (*Molecular Discovery*)) konnten die sondenspezifischen negativsten Wechselwirkungspunkte extrahiert werden.

Die Tab. 21 führt die GRID-Parameter der ausgewählten Einzel- und Multiatomsonden auf.

Tabelle 21: Übersicht zu den Parametern der verwendeten GRID-Sonden (*Molecular Discovery*)

PN	vdW	EZ	α	Q	E_{\min}	r_{\min}	D	A	Beschreibung der Sonden	ZM
OH2	1.70	7	1.20	0	-4.5	1.4	2	2	Wasser-Sonde	LM+V
DRY	1.70	7	1.20	0	-4.5	1.4	2	2	hydrophobe Sonde	LM+V
O1	1.65	7	1.20	-0.10	-4.5	1.4	1	2	aliphatische Hydroxylgruppe	LM
N:	1.65	6	1.10	0	-6.5	1.5	0	1	sp ³ -hybridisiertes Stickstoffatom mit einem Elektronenpaar	LM
N1+	1.65	7	1.40	0.66	-3.0	1.6	1	0	sp ³ -hybridisiertes Stickstoff-Kation mit einem Wasserstoffatom	LM
C3	1.95	8	2.17	0	0	0	0	0	Methylgruppen-Sonde	LM
C1=	1.90	6	2.07	0	0	0	0	0	sp ² -hybridisiertes, aromatisches Kohlenstoffatom mit einem Wasserstoffatom	LM
BOTH	1.70	7	1.20	0	-4.5	1.4	2	2	amphiphile Sonde	LM
OH	1.65	7	1.50	-0.15	-4.5	1.4	1	1	phenolische Hydroxylgruppe	V
O::	1.60	6	2.10	-0.45	-5.0	1.4	0	2	sp ² -hybridisiertes Carboxysauerstoffatom mit zwei getrennten Elektronenpaaren	V
PO4H	2.30	24	6.20	-1	-3.0	2.3	1	6	Phosphat-Monoanion	V

Übersicht zu den verwendeten Abkürzungen:

- PN Kurzform des Sondennamens nach GRID;
- vdW van-der-Waals-Radius in Å;
- EZ effektive Anzahl an zugänglichen Elektronen;
- α Polarisierbarkeit in Å³;
- Q Nettoatomladung;
- E_{\min} maximale Stärke der durch die Sonde gebildeten Wasserstoffbrückenbindung, optimale Wasserstoffbrückenbindungsenergie in kcal/mol;
- r_{\min} reduzierter van-der-Waals-Radius, Wasserstoffbrückenbindungsradius in Å ;
- D / A Anzahl von bzw. mit der Sonde gebildeten Wasserstoffbrückenbindungen;
- ZM Zielmoleküle: V = untersuchter Arzneistoff; LM = organische Phase.

Acht Sonden dienen der Beschreibung von erwarteten, günstigen intermolekularen Wechselwirkungen der gelösten Arzneistoffe in den organischen Phasen (LM). Die repräsentierten Strukturen und Vorgänge verdeutlicht Tab. 22. Vergleichende Aussagen zu hydrophilen und lipophilen Bereichen um die Strukturen der organischen Phasen waren mit der Wasser- (OH2), hydrophoben (DRY) und amphiphilen (BOTH) Sonde zu erwarten. Die beiden Stickstoff-Sonden beschrieben insbesondere polare und ionische Wechselwirkungen mit den neutralen oder den geladenen Arzneistoffmolekülen.

Tabelle 22: Übersicht der von den ausgewählten Sonden beschriebenen Strukturelemente

Sonde		bei den Arzneistoffmolekülen charakteristisch für
OH2	Wasser	Hydratation des Zielmoleküls
DRY	hydrophobe Sonde	lipophile Bereiche der Arzneistoffmoleküle
O1	aliphatische Hydroxylgruppe	Hydroxylgruppe der Phenazine und Flupenthixole
N:	sp ³ -hybridisiertes Stickstoffatom	neutrale Aminogruppe in aliphatischer Kette / neutraler Piperazinring
N1+	sp ³ -hybridisiertes Stickstoff-Kation	protonierte Aminogruppe in aliphatischer Kette / geladener Piperazinring
C3	Methylgruppe	aliphatische Kette / aliphatischer Ring
C1=	sp ² -hybridisiertes Kohlenstoffatom	aromatischer Ring
BOTH	amphiphile Sonde	Grenzbereich zwischen hydrophilen und lipophilen Strukturen des Zielmoleküls

Fünf verschiedene Sonden wurden entsprechend den Anforderungen von VOLSURF für die Untersuchungen nach Punkt 2. ausgewählt (V), weil die GRID-Sonden die Art der extrahierbaren Deskriptoren bestimmen. Die Sonden phenolische Hydroxylgruppe (OH) und Carboxy-Sauerstoffatom (O::) waren zur Generierung der acht *Hydrogen Bonding*-Deskriptoren essentiell. Die von den WWP des Phosphat-Monoanion (PO₄H) abgeleiteten acht hydrophilen Regionen beinhalten mögliche Ladungseffekte.

Alle GRID-Kalkulationen wurden im Multitarget-Multiproben-Modus durchgeführt. Obwohl die Vorbereitung der Rechnungen einige Zeit beanspruchte, vereinfachte sich das rein tastaturgesteuerte Aufsetzen und Starten. Im Fall der organischen Phasen betrug die Maschenweite des Gitters 1 Å, bei den Arzneistoffen nur 0.5 Å. Weitere, nicht standardgemäße Programmparameter der jeweiligen GRID-Rechnungen waren:

- Zielmolekül organische Phase: *DWAT* 40.0, *KWIK* 4, *LIST* 1;
- Zielmolekül Arzneistoff: *KWIK* 3, *LIST* -2.

Die aus den Berechnungen nach Punkt 2. resultierende Datei wurde ohne Veränderung in VOLSURF verwendet. Aufgrund der Zusammenstellung der GRID-Sonden konnten 94 Deskriptoren pro Konformation eines Arzneistoffmolekül gewonnen werden, die im Abschnitt 9.3.3 dargestellt sind. Das Resultat der Transformationen wurde entweder in einem für das GOLPE-Programm (*Multivariate Infometric Analysis*) oder für das QSAR-Modul (*TRIPOS*) von SYBYL lesbaren Format abgespeichert.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem PLS-Verfahren und durch Multiple Lineare Regression. Als Aktivitätswerte wurden die eigenen, oder wenn nicht selbst bestimmt, veröffentlichte log*P*-Werte, die log*P*_{10n}-Werte oder die log*k'*-Koeffizienten herangezogen. Da PLS empfindlich gegenüber der Varianz der X-Werte ist und die Deskriptoren eine große Variationen in ihren Beträgen besaßen, wichtete ich sie durch die BUW-Option (*block unscaled weight* = BUW). Eine Abnahme an

informationslosen Grundschwankungen im Datenverhalten (*noise*) wurde über das Null-Setzen sehr kleiner X-Werte durch *zeroing* von X1 (Grenze: 10% des größten Deskriptorbetrages der Wasser-Sonde) und durch *minimum standard deviation X value cut-off* von X2 bis X5 (alle übrigen Sonden; Grenze zwischen 8 und 12%) erreicht. Durchschnittlich wurden 9% an Variablen selektiert und nicht weiter berücksichtigt. Die Modelle wurden durch eine schrittweise Eliminierung von Ausreißern (alle Einträge oder eine Konformation einer Verbindung) und nicht signifikanten Parametern mittels *fractional factorial design* (FFD) verbessert. Bei der Auswertung mit dem PLS-Verfahren diente die Vorhersagekraft nach der *cross validation* (CV) mit der *random group*-Methode als Auswahlkriterium für das beste Modell, das möglichst hohe q^2 - und r^2 -Werte sowie gleichzeitig kleine SDEP- und SDEV-Koeffizienten besitzen sollte.

Um eine Regressionsgleichung zwischen den Aktivitätswerten und den signifikanten Deskriptoren zu erhalten, rechnete ich die PLS-CV-Ergebnisse mit dem QSAR-Modul in SYBYL nach. Die Deskriptoren und die PLS-CV-Parameter blieben identisch: *cross-validation* mit 5 Gruppen, *autoscale*, *no filtering* gefolgt von *no validation* mit optimaler Zahl an latenten Variablen (*onc*). Die Signifikanz der ausgewählten Deskriptoren wurde durch einen Interkorrelationstest überprüft, wodurch unerwünschte Beziehungen unter den Deskriptoren in der Korrelationsmatrix offensichtlich werden. Falls Interkorrelationen existierten, wurden alle Kombinationen im QSAR-Modul in SYBYL getestet und das beste PLS-Modell ausgewählt. Die weiterführende Angaben über den Weg der Modellerstellung und -validierung befinden sich in den jeweiligen Auswertekapiteln (Abschnitte 6.5.2 und 6.5.3)

6.3 Rechnerische Bestimmung von *n*-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten

6.3.1 Ergebnisse der berechneten $\log P$ -Werte

Ein berechneter *n*-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient ist nach *Mannhold* und Mitarbeiter vernünftig, wenn er nicht mehr als 0.5 vom gemessenen $\log P$ -Wert abweicht (*Mannhold et al.* 1990). Dieser Streubereich ist allerdings nur für QSAR-Analysen zu akzeptieren, bei denen die $\log P$ -Werte der betrachteten Verbindungen einen großen Bereich abdecken. Für diese Studie kamen strengere Kriterien zur Anwendung. Entweder wurde das experimentell zugängliche Fehlerintervall berücksichtigt (potentiometrisch ± 0.1), oder ein akzeptabler $\log P$ -Streubereich der kalkulierten Verteilungskoeffizienten wurde bei ± 0.3 festgelegt, dem allgemein anerkannten Genauigkeitsbereich bei *shake flask*-Messungen. In der Tab. 23 sind die potentiometrisch bestimmten Verteilungskoeffizienten $\log P$ (SIRIUS-Methode) den berechneten Verteilungskoeffizienten gegenübergestellt.

Tabelle 23: Übersicht von experimentellen und berechneten *n*-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten

Nr.	Verbindung	$\log P_{\text{Oct}}^a$	ClogP	ACD	HINT ^b 2D	HINT ^c 3D
1	Promethazin	4.70 ± 0.04	4.65	4.69 ± 0.26	4.63	3.89
2	Promazin	4.70 ± 0.03	4.27	4.63 ± 0.25	4.39	4.00
3	Chlorpromazin	5.27 ± 0.10	5.20	5.36 ± 0.27	4.98	4.60
4	Chlorprothixen	5.49 ± 0.03	5.36	-	5.73	5.73
5	Triflupromazin	5.18 ± 0.06	5.53	5.70 ± 0.37	4.79	4.40
6	Levomepromazin	4.90 ± 0.12	4.72	5.05 ± 0.27	4.76	4.27
7	Thioridazin	5.42 ± 0.06	6.42	6.13 ± 0.38	5.90	5.78
8	Prochlorperazin	4.78 ± 0.12	6.15	4.76 ± 0.39	5.83	4.21
9	Trifluoperazin	5.23 ± 0.07	6.48	5.11 ± 0.41	5.64	4.04
10	Thiethylperazin	4.87 ± 0.09	6.31	5.05 ± 0.41	6.41	4.76
11	Perphenazin	4.27 ± 0.11	5.57	4.49 ± 0.42	5.14	3.04
12	Fluphenazin	4.62 ± 0.15	5.90	-	4.95	2.67
13	cis-Flupenthixol	5.00 ± 0.05	6.00	5.17 ± 0.50	5.99	3.90
14	trans-Flupenthixol	5.20 ± 0.09	6.00	5.17 ± 0.50	5.99	3.90
15	Verapamil	3.84 ± 0.09	3.71	5.03 ± 0.39	5.29	4.88
16	Gallopamil	3.76 ± 0.06	3.14	4.73 ± 0.40	5.59	4.93
17	Fendilin	4.98 ± 0.05	5.73	6.55 ± 0.34	5.43	5.43
18	Amlodipin	3.31 ± 0.10	3.03	3.72 ± 0.62	1.85	-1.14
19	Nicardipin	4.75 ± 0.12	4.65	5.22 ± 0.62	3.53	0.86

^a SIRIUS-Werte mit zugeordneten Fehlerbereich.

^b HINT Parameter: polar proximity 'via bond'; hydrogen treatment 'all'.

^c HINT Parameter: polar proximity 'through space'; hydrogen treatment 'all'.

Vergleicht man die experimentellen $\log P$ -Werte einschließlich ihrer Fehlergrenzen mit den berechneten Verteilungskoeffizienten der Programme, stimmen bei Verwendung von ClogP nur drei Werte, bei ACD nur vier Werte und kein Wert bei HINT_2D bzw. HINT_3D überein. Bei Berücksichtigung der ausgegebenen ACD-Fehlerbereiche fallen nunmehr die Intervalle in 12 Fällen zusammen. Chlorprothixen und Fluphenazin wurden erst nach Ablauf der ACD-Lizenz in diese Studie aufgenommen. Fügt man den mit ClogP und HINT berechneten Verteilungskoeffizienten den Fehlerbereich von ± 0.3 an, nimmt die Zahl an Übereinstimmungen mit den fehlerfrei angenommenen Messwerten nicht bedeutend zu: sieben bei ClogP, vier bei HINT_2D und zwei bei HINT_3D.

Die Qualität der Vorhersage von Verteilungskoeffizienten für die Phenothiazine vom Promazin-Typ ist mit Ausnahme der HINT_3D-Ergebnisse zufriedenstellend. Das ClogP-Programm und HINT_2D berechneten die $\log P$ -Werte des Piperazinringes generell zu hoch, obwohl das zweite polare Zentrum

die Gesamtlipophilie der Verbindungen eher verringert (Franke et al. 1999).

Da die Verteilungskoeffizienten der meisten 1,4-Dihydropyridine nicht mit einer potentiometrischen Titration zugänglich sind, wurde von den zugänglichen Literaturdaten ein Mittelwert zu Vergleichszwecken mit den korrespondierenden berechneten $\log P$ -Werten gebildet. Allen $\log P$ -Werten wurde der durchschnittliche Fehler von ± 0.3 (shake flask-Methode) zugeordnet. Tab. 24 beinhaltet gemessene Lipophilie-Parameter und berechnete $\log P$ -Werte der 1,4-Dihydropyridine.

Ein weiterer Zusammenhang von experimentellen zu kalkulierten Verteilungskoeffizienten kann mit Hilfe des logarithmierten Kapazitätsfaktors $\log k'$ hergestellt werden, da die Größe eines für die Lipophilie des Moleküls charakteristischen Koeffizienten der undissoziierbaren 1,4-Dihydropyridine nur von der Gesamtlipophilie des Moleküls abhängt (Cloos 1998). Die Reihenfolge dieser Verbindungen bleibt unverändert, wenn sie nach zunehmenden $\log P$ - oder $\log k'$ -Werten geordnet werden.

Eine Übereinstimmung zwischen den gemittelten $\log P$ -Werten mit der zugeordneten Standardabweichung (± 0.3) und den berechneten Verteilungskoeffizienten besteht bei den undissoziierbaren Verbindungen (Tab. 24, Nr. 20-26 und D) bei ClogP und bei ACD in vier Fällen. Bei Berücksichtigung des ACD-Vertrauensbereiches fallen in allen Fällen die Verteilungskoeffizienten zusammen. Das ACD-Programm scheint über die Vertrauensbereiche am besten in der Lage zu sein, *n*-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten vorherzusagen. Die Arzneistoffe Lacidipin und Lercanidipin wurden erst später einbezogen. Die Werte der HINT-Ergebnisse sind insgesamt zu verschieden.

Tabelle 24: Experimentelle und berechnete Verteilungskoeffizienten der 1,4-Dihydropyridine

No.	Verbindung	$\log P_{\text{Oct}}$	$\log k'$	ClogP	ACD	HINT ^b 2D	HINT ^c 3D
18	Amlodipin	3.35 ± 0.08^a	2.442 ± 0.076	3.03	3.72 ± 0.62	1.85	-1.14
19	Nicardipin	4.67 ± 0.16^a	2.500 ± 0.072	4.65	5.22 ± 0.62	3.53	0.86
20	Nifedipin	2.86^{27} , 3.14^{25} 3.22^{24}	1.409 ± 0.087	2.78	3.05 ± 0.59	1.48	-0.24
21	Nitrendipin	3.98^{25} , 4.15^{27}	2.033 ± 0.052	3.39	3.59 ± 0.59	2.02	0.25
22	Felodipin	4.80^{27}	2.399 ± 0.038	4.96	4.92 ± 0.60	3.46	1.68
23	Nisoldipin	4.53^{27}	2.221 ± 0.085	4.24	4.46 ± 0.59	2.88	1.16
24	Nilvadipin	-	2.120 ± 0.084	2.50	3.19 ± 0.61	1.61	-0.97
25	Nimodipin	4.03^{25} , 4.18^{27}	1.940 ± 0.042	3.52	3.94 ± 0.61	2.34	-0.22
26	Isradipin	4.18^{27}	1.841 ± 0.374	3.58	3.67 ± 0.61	2.45	1.15
D	Lacidipin	5.56^{11}	-	5.74	-	3.55	1.79
E	Lercanidipin	-	-	7.40	-	6.21	1.61

^a ORIGIN-Wert mit Fehlerbereich.

^b HINT Parameter: polar proximity 'via bond'; hydrogen treatment 'all'.

^c HINT Parameter: polar proximity 'through space'; hydrogen treatment 'all'.

Zur Abschätzung, welche Methode das messbare Verteilungsverhalten der neutralen 1,4-Dihydropyridine gut vorhersagen kann, wurden auch Korrelationen zwischen den Programm- $\log P$ -Werten und den logarithmierten Kapazitätsfaktoren ($\log k'$) herangezogen. Die $\log k'$ -Werte von Amlodipin und Nicardipin konnten nicht einbezogen werden, da sie pH-abhängig sind und die Verbindungen bei pH 5.4 fast ausschließlich protoniert vorliegen.

Die allgemein geringen Korrelationen (mit ClogP, ACD, HINT_2D) gründen sich hauptsächlich auf die unzureichende Qualität der $\log P$ -Vorhersage ($r^2 = 0.58 \pm 0.08$, $F = 7.1 \pm 2.0$). Mit den experimentellen $\log P_{\text{Oct}}$ -Werten wurde ein fast idealer Zusammenhang gefunden (Abschnitt 4.4.2, $r^2 = 0.94$, $F = 59.5$). Die Verteilungskoeffizienten der 1,4-Dihydropyridine in *n*-Octanol/Wasser können durch kein Programm mit absoluter Genauigkeit (± 0.1) vorhergesagt werden.

6.3.2 Vergleich der $\log P$ -Werte aller Verbindungen

Einen quantitativen Vergleich ermöglicht die lineare Regression von vorhergesagten Koeffizienten zu den experimentellen Daten. Die gemessenen $\log P$ -Werte wurden als die abhängigen Variablen eingesetzt, da wie in der QSAR-Analytik üblich, getestet werden sollte, ob die Programme Verteilungskoeffizienten für unbekannte Verbindungen vorhersagen können, wenn nur eine geringe Zahl an Messdaten zur Verfügung steht. Ein anderer Maßstab zur Güte der $\log P$ -Berechnung im Wertebereich der ausgewählten Verteilungskoeffizienten bietet sich in den Beträgen von Ordinatenabschnitt (Intercept) und vom Geradenanstieg, die bei absoluter Übereinstimmung von berechneten zu gemessenen Wert Null und Eins annehmen.

Von Vorteil ist der erweiterte $\log P$ -Wertebereich der gemessenen und auch der kalkulierten $\log P$ -Werte, wenn alle Verbindungen als ein Datensatz betrachtet werden.

$\log P = 2.37 (\pm 0.29) + 0.46 (\pm 0.06) \log P_{\text{ClogP}}$	$n = 23$	$s = 0.33$	$r^2 = 0.75$	$F = 62.5$
$\log P = 1.61 (\pm 0.50) + 0.62 (\pm 0.10) \log P_{\text{ACD}}$	$n = 23$	$s = 0.40$	$r^2 = 0.63$	$F = 35.3$
$\log P = 3.36 (\pm 0.32) + 0.27 (\pm 0.07) \log P_{\text{HINT.2D}}$	$n = 23$	$s = 0.40$	$r^2 = 0.44$	$F = 16.5$
$\log P = 3.97 (\pm 0.19) + 0.20 (\pm 0.05) \log P_{\text{HINT.3D}}$	$n = 23$	$s = 0.50$	$r^2 = 0.41$	$F = 14.5$

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Regressionen zu gewährleisten, wurden die Verbindungen Chlorprothixen, Fluphenazin und Lacidipin bei ClogP und HINT nicht berücksichtigt.

Eine Verbesserung der Beziehungen zwischen berechneten und experimentellen Verteilungskoeffizienten konnte bei einer breiten $\log P$ -Varianz nicht gefunden werden. Wie erwartet nehmen die Standardabweichungen der Zusammenhänge zu, wenn die stärker streuenden Daten (Abb. 39/40) von strukturell heterogenen Verbindungen stammen. Die Beträge der Ordinatenabschnitte und der Anstiege sind trotz ihrer kleinen Standardabweichungen weit von ihren Idealwerten entfernt, was für eine schlechte absolute Wiedergabequalität der Berechnungsprogramme für große $\log P$ -Bereiche spricht.

Der Test auf Ausreißer in der Regression führte zu unterschiedlichen Ergebnissen, die Auskunft über die problembehaftete Berechnung für bestimmte Strukturmerkmale geben.

$$\begin{array}{ll} \log P = 2.31 (\pm 0.26) + 0.48 (\pm 0.05) \log P_{\text{ClogP}} & n = 22 \quad s = 0.30 \quad r^2 = 0.80 \quad F = 78.9 \\ \log P = 1.63 (\pm 0.40) + 0.63 (\pm 0.08) \log P_{\text{ACD}} & n = 21 \quad s = 0.31 \quad r^2 = 0.76 \quad F = 59.3 \\ \log P = 3.25 (\pm 0.23) + 0.32 (\pm 0.05) \log P_{\text{HINT.2D}} & n = 21 \quad s = 0.35 \quad r^2 = 0.68 \quad F = 40.8 \\ \log P = 3.93 (\pm 0.13) + 0.25 (\pm 0.04) \log P_{\text{HINT.3D}} & n = 21 \quad s = 0.34 \quad r^2 = 0.72 \quad F = 46.8 \end{array}$$

Verapamil und Gallopamil sind sowohl Ausreißer bei ACD als auch bei beiden HINT-Algorithmen ($n = 21$). ACD und HINT waren nicht in der Lage, die Lipophilie eines Di-/Tri-methoxyphenyl-Ringes korrekt zu berechnen. Nach Ausschluß beider Verbindungen verbessern sich die statistische Absicherungen der Zusammenhänge deutlich, ohne dass sich die Koeffizienten für den Anstieg und den Ordinatenabschnitt signifikant ändern.

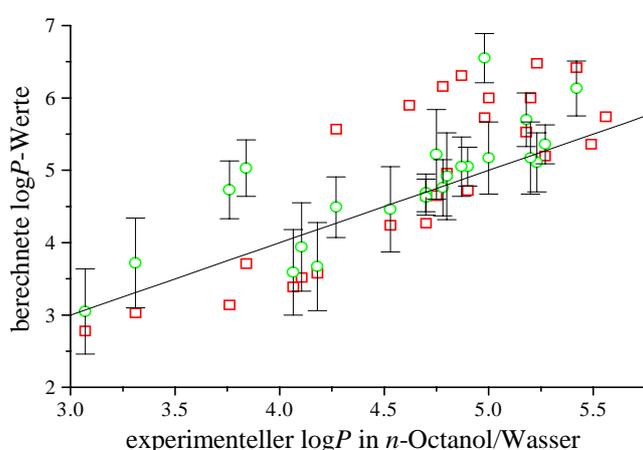


Abbildung 39: Vorhersage der $\log P$ -Werten in n -Octanol/Wasser; Referenzgerade SIRIUS-Werte; ClogP \square ; ACD \circ mit Vertrauensbereich.

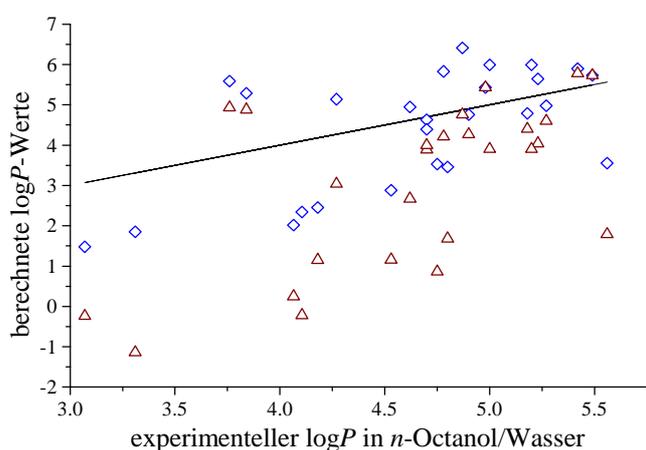


Abbildung 40: Vorhersage von $\log P$ -Werten in n -Octanol/Wasser; Referenzgerade SIRIUS-Werte; HINT_2D \diamond ; HINT_3D \triangle .

Obwohl ACD am häufigsten die Absolutwerte der Verteilungskoeffizienten vorhersagen kann, zeigen aber die ClogP-Werte (ohne Perphenazin) die beste Korrelation mit den experimentellen $\log P$ -Daten über den gesamten Wertebereich. Die Standardabweichungen der Regressionen mit den getesteten Programmen liegen nach der Elimination der Ausreißer im Bereich der *shake flask*-Messungen.

6.4 Auswertung von lokalen Wechselwirkungspunkten

6.4.1 Ergebnisse der GRID-Berechnungen

Zur Ermittlung von Regionen mit günstigen Wechselwirkungsenergien mit dem Programm GRID können sowohl die Gitterpunkte der Energieminima als auch die Konturfelder eingesetzt werden. Die Vor- und Nachteile beider Methoden wurden bereits von Fleischer aufgeführt (Fleischer 1999).

Die Analyse der favorisierten Wechselwirkungspunkte (Tab. 25) erfolgte nach einem Grenzpotential, welches von mir anhand von *n*-Octanol empirisch definiert wurde, bei dem mindestens ein und maximal 10 Wechselwirkungspunkte (WP) unterhalb von Potentialwert E_{limit} zu finden waren. Von den beiden negativsten Potentialwerten (NWP1, NWP2) konnte ich die Lage der Wechselwirkungspunkte um die organischen Strukturen ableiten. Die für ein Phosphatidylcholin eingesetzte Struktur von DMPC entstammte einer Röntgenkristallstruktur, die bereits geometrie-optimiert vorlag (Odia und Wiese 1999).

Die Sonden (PN) wurden in eine hydrophile und eine lipophile Gruppe geordnet. Die Auswertung erfolgte jeweils für ein Zielmolekül (ZM) nach der Zahl von Wechselwirkungspunkten, deren Energie unter einem Potentialgrenzwert (E_{limit} in kcal/mol) lag. Die mit einem Stern gekennzeichneten Grenzwerte weichen vom vorgesehenen Potentialwert der Referenzverbindung *n*-Octanol ab, wenn entweder kein Punkt oder mehr als 10 WP extrapoliert wurden. Die beiden negativsten Energien sind mit dem gemessenen Abstand zu dem unterstrichenen komplementären Atom angegeben. Bevorzugte Interaktionen wurden in Tab. 25 dunkel und weniger günstige hell unterlegt.

6.4.2. Vergleich der einzelnen organischen Phasen

Anhand jeweils eines Moleküls *n*-Octanol, PGDP und DMPC testete ich das Vermögen der einzelnen Strukturen, intermolekulare Wechselwirkungen mit verschiedenen funktionellen Gruppen der Arzneimoleküle einzugehen (Tab. 25). Eine Vergleichbarkeit der GRID-Ergebnisse war durch die optimale Überlagerung von struktur-identischen Bereichen, wie aliphatischen Ketten und Sauerstoff enthaltenden funktionellen Gruppen, der drei repräsentativen Moleküle gegeben. Die Gitterpunkte mit minimaler Energie (NWP) ermöglichen eine Bestimmung des Abstands zum Zielmolekül, vermitteln aber keinen Eindruck, wie genau die Positionierung des Strukturelements für eine günstige Wechselwirkung sein muss (optimale Position). Obwohl in den praktischen Experimenten eine nicht wässrige Phase Verwendung findet, beschreibt ein einzelnes Molekül deren prinzipielle Eigenschaften, da man von einem ungerichteten Erstkontakt zwischen einem Arzneistoff- und einem Lösungsmittelmolekül ausgehen kann.

Folgende Einschränkung ist bei der Auswertung der GRID-Berechnungen zu berücksichtigen (Fleischer 1999): ein Abstand von 1 Å zwischen zwei Wechselwirkungspunkten mit ähnlichem Potential bedeutet praktisch Übereinstimmung der Lage des Minimums bei einer Gitterauflösung von einem Å. Wenn die Genauigkeit der Auflösung durch eine Interpolation erhöht werden soll, dürfen sich die Potentiale benachbarter Gitterpunkte nur wenig unterscheiden, damit die Interpolation vertrauenswürdige Raumpunkte liefert.

Tabelle 25: Ergebnisse der GRID-Rechnung mit einem Molekül jeder organischen Phase

PN	ZM	E _{limit} kcal/mol	Zahl WP	E in kcal/mol		durchschnittlicher Abstand in Å (gerundet) der WP
				NWP 1	NWP 2	
OH2	DMPC	-5.0	6	-9.39	-7.44	<u>CO</u> 3.10 + <u>PO</u> 3.40
	PGDP	-5.0	4	-6.37	-6.13	<u>CO</u> 3.15
	Octanol	-5.0	5	-5.88	-5.52	<u>OH</u> 3.15
O1	DMPC *	-5.0	5	-6.58	-6.00	<u>CO</u> 3.10 + <u>PO</u> 3.40
	PGDP *	-5.0	4	-6.36	-6.06	<u>CO</u> 3.15 ; Ester- <u>O</u> 3.35
	Octanol	-3.0	6	-5.89	-5.51	<u>OH</u> 3.20
N:	DMPC *	-1.5	2	-2.10	-1.84	<u>H</u> an Nachbarn Ester-O 2.10
	PGDP *	-1.0	3	-2.01	-2.01	<u>H</u> an Nachbarn Ester-O 2.30 <u>CO</u> 3.40
	Octanol	-4.5	3	-5.30	-5.05	<u>OH</u> 2.40 ; <u>OH</u> 3.20
N1+	DMPC *	-7.0	3	-8.52	-7.86	<u>PO</u> 3.05 <u>H</u> an Nachbarn Ester-O 2.30
	PGDP	-4.8	6	-6.50	-6.11	<u>CO</u> 3.30 <u>H</u> an Nachbarn Ester-O 2.40
	Octanol	-4.8	2	-5.25	-5.18	<u>OH</u> 3.20 ; HO <u>CH</u> ₂ 3.25
C3	DMPC *	-1.7	3	-2.19	-2.13	<u>CH</u> ₂ in Kette (No 2-3) 3.90
	PGDP	-1.5	3	-1.99	-1.87	<u>CH</u> ₂ in Kette (No 2-3) 3.90
	Octanol *	-0.9	1	-1.30	-	<u>CH</u> ₂ in Kette (No 2-3) 4.00
C1=	DMPC *	-1.5	6	-2.20	-2.05	<u>CH</u> ₂ in Kette (No 2-3) 3.90 N(<u>CH</u> ₃) ₃ 3.80
	PGDP *	-1.2	4	-1.92	-1.80	<u>CH</u> ₂ in Kette (No 2-3) 4.00 Kopf <u>CH</u> ₃ 4.20
	Octanol	-0.8	4	-1.08	-1.04	<u>CH</u> ₂ in Kette (No 2-3) 4.10
DRY	DMPC *	-1.2	2	-1.31	-1.26	<u>CH</u> ₂ in Kette (No 2-3) 3.55
	PGDP *	-1.2	1	-1.31	-	<u>CH</u> ₂ in Kette (No 2-3) 3.60
	Octanol	-0.8	3	-1.02	-0.87	<u>CH</u> ₂ in Kette (No 3-5) 3.45
BOTH	DMPC	-0.3	2	-0.48	-0.44	<u>CO</u> 3.20
	PGDP	-0.3	1	-0.47	-	<u>CO</u> 3.40
	Octanol	-0.3	1	-0.33	-	<u>CH</u> ₂ in Kette (No 2-3) 3.60

* Potentialgrenzwert abweichend von Referenzwert

Durch den Vergleich der jeweiligen Potentiale und der durchschnittlichen Abstände zu funktionellen Gruppen der Moleküle lassen sich bevorzugte intermolekulare Wechselwirkungen lokalisieren:

Die Lage und der Abstand der NWP der Wasser- (OH₂) und der aliphatischen Hydroxyl-Sonde (O1) zu den Sauerstoffatomen der Zielmoleküle sind aufgrund der Ausbildung von Wasserstoffbrücken fast identisch (Tab. 25). Die Phosphatgruppe im DMPC-Molekül ermöglicht eine doppelte Fixierung eines Wassermoleküls durch die gleichzeitige Ausbildung zweier Wasserstoffbrücken mit einem Carbonyl- und einem Phosphat-Sauerstoffatom (Abb. 41). Das niedrige Potential weist auf die Hydratisierungsmöglichkeit im Bereich der Esterfunktionen von Phospholipid-Membranen hin. Die Wechselwirkungspunkte der O1-Sonde, die die aliphatischen Hydroxylgruppe der Phenazine und Flupenthixole beschreibt, besitzen eine gleiche Lage um die Moleküle (Abb. 41) und ähnliche Potentiale (Tab. 25), so dass damit nicht die Unterschiede im beobachteten Verteilungsverhalten der Neutralformen dieser Verbindungen erklärt werden kann.

Ein neutrales sp³-hybridisiertes Stickstoffatom (N:) kennzeichnet ungeladene Aminogruppen oder andere basische Zentren der Arzneistoffstrukturen. Es wirkt als deutlicher Akzeptor der Wasserstoffbrücke mit der endständigen Hydroxylgruppe des *n*-Octanol. Das niedrige Potential favorisiert *n*-Octanol als guten Wechselwirkungspartner mit neutralen basischen Verbindungen. Wenn die Aminogruppe protoniert vorliegt (N1+), kehrt sich das Verhältnis der Attraktivität der einzelnen organischen Phasen um (Tab. 25). Selbst die Carbonyl-Funktion in PGDP wird von der N1+-Sonde etwas stärker bevorzugt als *n*-Octanol.

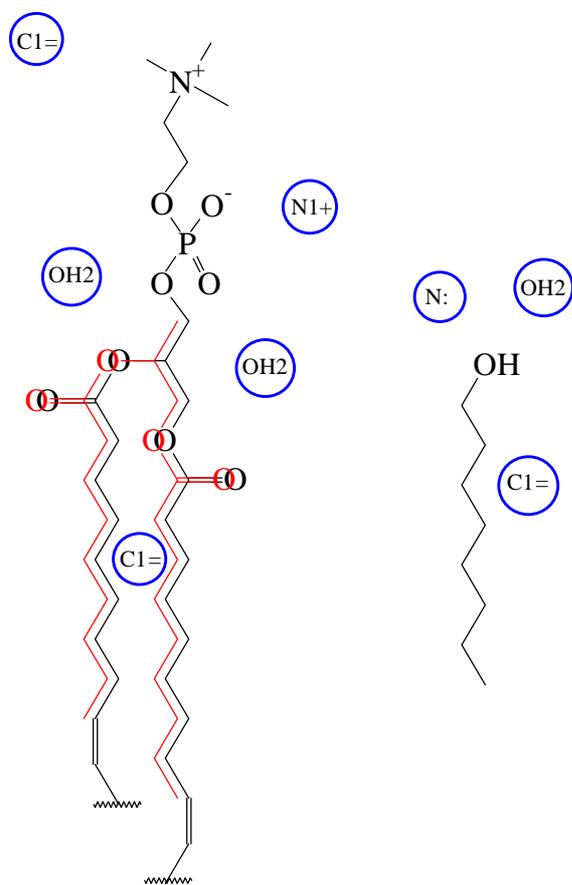


Abbildung 41: Bevorzugte Wechselwirkungspunkte von ausgewählten Sonden mit DMPC/PGDP (links) und *n*-Octanol (rechts)

Die negativ geladene Phosphatgruppe des DMPC-Moleküls wirkt besonders stark anziehend auf die positiv geladene Sonde. Den anzustrebenden Ladungsausgleich macht das sehr niedrige Potential deutlich. Membranen aus Phosphatidylcholin sind daher für die Verteilung von positiv geladenen Arzneistoffen sehr gut geeignet.

Für das Auffinden von van-der-Waals-Wechselwirkungen werden die drei Sonden C3, C1= und DRY herangezogen. Die DRY-Sonde enthält zudem einen Energieterm für entropische Effekte bei der Solvation in Wasser. Allgemein existieren bessere intermolekulare Wechselwirkungen, wenn parallel ausgerichtete aliphatische Ketten im Molekül vorhanden sind (Tab. 25). Es entsteht zwischen ihnen eine Art lipophile Spalte. Alle drei lipophilen Sonden besitzen dementsprechend das niedrigste Potential mit dem langkettigen DMPC-Molekül, mit kleinen Unterschieden zu PGDP. Die Ausbildung der van-der-Waals-Wechselwirkungen hängt von der zugänglichen Fläche an aliphatischen Ketten ab, was anhand der aromatische Sonde C1= bestätigt wird, die ein nur halb so starkes Potential mit dem einkettigen *n*-Octanol als mit DMPC ausbildet. Lipophile aliphatische und aromatische Bereiche der Arzneistoffstrukturen können sich demnach bevorzugt zwischen die parallel ausgerichteten Fettsäureketten einlagern. Überraschenderweise findet GRID auch sind günstige Wechselwirkungen mit der Trimethylammonium-Gruppe in DMPC und der endständigen Methylgruppe der Propylenglycol-Struktur.

Die amphiphile BOTH-Sonde kennzeichnet die Grenze zwischen hydrophilen und lipophilen Strukturbereichen der organischen Phasen in der Nähe der Carbonylfunktionen bei DMPC und PGDP. Im Fall von *n*-Octanol befindet sich der NWP im Bereich der Wechselwirkungsstellen mit den lipophilen Proben (Tab. 25).

Die Untersuchungen durch GRID an den Strukturen der organischen Phasen belegen die Tauglichkeit des Programms, bevorzugte intermolekulare Wechselwirkungen mit Strukturelementen der Arzneistoffe zu lokalisieren und Unterschiede zwischen den Einzelmolekülen der organischen Phasen zu erkennen. Da die Arzneistoffe auf verschiedenen Wegen Wechselwirkungen mit Wasser und mit den jeweiligen organischen Phasen der Verteilungssysteme ausbilden, müssen zur Quantifizierung die Potentiale in einem kompletten Systems erfasst und aufsummiert werden. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit lagen noch keine äquilibrierten *Molecular Modeling*-Modelle der Verteilungssysteme vor.

6.5 Deskriptorenanalyse zur Beschreibung von Verteilungskoeffizienten

6.5.1 Allgemeine Schritte zur Deskriptorenanalyse

Die Potentialberechnungen durch GRID erfolgten für alle Arzneistoffmoleküle gleichzeitig mit den fünf Sonden (Tab. 21, Zielmolekül V). Alle Strukturen einer Datenbank wurden automatisch den gleichen Programmparametern in einem Einheitsgitter unterzogen, was die vergleichende Auswertung durch nachfolgende statistische Methoden erst ermöglichte. Um einen Kompromiss zwischen der Rechenzeit und der Berücksichtigung verschiedener Konformationen zu erhalten, beinhalteten die folgenden Datenbanken eine unterschiedliche Zahl an Maximaleinträgen:

- Neutralformen der Phenothiazine und Thioxanthene ($n = 18$);
3 Einträge pro Verbindung: Chlorpromazin 4 Einträge; cis-/trans-Chlorprothixen ($\sum n = 55$).
- Neutralformen der 1,4-Dihydropyridine ($n = 11$); 3 Einträge pro Verbindung ($\sum n = 33$).
- Neutralform aller Verbindungen ($n = 32$);
2 Einträge pro Verbindung: cis-/trans-Chlorprothixen ($\sum n = 64$).
- einfach geladene Ionen der Phenothiazine und Thioxanthene ($n = 15$);
2 Einträge: einfache Basen, Thiethylperazin, cis-/trans-Chlorprothixen;
3 Einträge: zweifache Basen, Promethazin, Promazin, Chlorpromazin ($\sum n = 39$).
- einfach geladene Ionen aller Verbindungen ($n = 21$);
2 Einträge: einfache Basen, Thiethylperazin, cis-/trans-Chlorprothixen;
3 Einträge: zweifache Basen, Promethazin, Promazin, Chlorpromazin ($\sum n = 51$).

Da die absoluten Konformationen der betrachteten Moleküle in der einzelnen Phasen der untersuchten Verteilungssysteme unbekannt sind, wurden alle, nach der Strukturoptimierung unterschiedlichen Konformationen berücksichtigt. Die konformellen Einflüsse auf das Ergebnis der Deskriptorenanalyse wurden weiterhin ausgeglichen, indem jede Datenbank aus einer einheitlichen Anzahl an Einträgen pro Verbindung bestand. Entweder wurden die beiden unterschiedlichsten Konformationen einbezogen (bei nur zwei Einträgen) oder die freien Plätze durch die vorhandene Konformation aufgefüllt. In den ersten PLS-Analysen zeigte sich, dass sich die Einträge bei Verbindungen mit variierenden Konformationen nicht sehr unterschieden, weswegen die Zahl der Moleküle auf ein vernünftiges Maß reduziert wurde ($2 \leq n \leq 3$) und keine weiteren Konformationsanalysen notwendig waren.

Die ursprüngliche Zahl an Deskriptoren wurde bereits vor der ersten PLS-Berechnung reduziert. Dazu wurden die Beträge der Deskriptoren, die von der Wasserprobe abstammen und unter 10% des Maximalwertes liegen, auf Null gesetzt. Die Grenze der Standardabweichungen der übrigen Deskriptor-Daten wurde so gewählt, dass 10% an Variablen pro Probe in der weiteren Analyse nicht mehr berücksichtigt wurden. Mit einer anschließenden PLS-Analyse wurde die Lage jeder Molekülkonformation im zwei-dimensionalen System der *score*-Werte an der ersten latenten Variablen (LV) mit den skalierten Werten der ausgewählten Verteilungskoeffizienten (T/U-Plot) überprüft.

Somit konnte sowohl die Wiedergabe von spezifischen Moleküleigenschaften durch die erste LV abgeschätzt als auch eine mögliche Gruppenbildung und Ausreißer erkannt werden. Gewöhnlich waren vier bis fünf LV zur Interpretation von 90% der Varianzen der X-Variablen nötig. Um den möglichen Einfluss einzelner Konformationen oder Verbindungen in den ersten beiden LV zu überprüfen, wurden weiterhin die extrahierten *score*-Werte gegeneinander aufgetragen. Aus dieser

Darstellung lassen sich Gemeinsamkeiten in den VOLSURF-Deskriptoren strukturübergreifend finden. Die systematische Eliminierung der Deskriptoren erfolgte nach dem Ausschluss von abweichenden Verbindungen im T/U-Plot. Das *fractional factorial design* (FFD) basierte auf den *onc*-Werten der vorhergegangenen *cross validation* mit einer Unterteilung des Datensatzes in fünf Gruppen und 100-facher Wiederholung.

Die relevanten Deskriptoren mit ihren *partial weights*-Beträgen an der ersten LV, die statistischen Parameter und die absoluten Beiträge wurden pro Datenbank zusammengefasst (Tab. 27 bis 36). Dazu wurden die Deskriptoren in den Tabellen geordnet von maximal positiven zu maximal negativen Gewichten an der ersten latenten Variablen dargestellt. Interkorrelationen zwischen den gefundenen Deskriptoren wurden durch Korrelationsanalysen erkannt. Zur besseren Interpretierbarkeit der Zusammenhänge wurden die wenig interkorrelierten VOLSURF-Deskriptoren einer weiteren PLS-Analyse unterzogen. Dabei zeigte sich, dass überwiegend ein Deskriptor pro beschriebener Eigenschaft und Sonde zur Interpretation der Verteilungskoeffizienten ausreicht. Die absoluten Beiträge der relevanten Deskriptoren sind nach der Rücktransformation der latenten Variablen in die Original-Parameter aus den Regressionsgleichungen nebst den statistischen Größen ersichtlich.

Die PLS- und MLR-Analysen wurden getrennt für die drei Verteilungssysteme, *n*-Octanol/Wasser, Liposomen-Membran, und IAM-Säule, mit den passenden GRID-Sonden durchgeführt. Darauf baut die Benennung der einzelnen Modelle auf:

Tabelle 26: Nomenklatur der PLS-/MLR-Modelle

Verteilungssystem		einbezogene Sonden		untergliedert in	
<i>n</i> -Octanol/Wasser	o	OH2, DRY	12	einfache Basen	e
Liposomen/Membran	m	OH2, DRY, OH	123	zweifache Basen	z
IAM-Säule	k	OH2, DRY, O::	124		
		OH2, DRY, PO4H	125		
		OH2, DRY, OH, PO4H	o3		
		OH2, DRY, O::, PO4H	o4		

Die Namen der Modelle sind aus den aufgeführten Abkürzungen in den Tabellen 27 bis 36 zusammengesetzt, z. B. für die Deskriptoranalyse der zweifachen Basen unter Verwendung der $\log P_m$ -Werte des Liposomen-Systems (Y-Variable) und der Sonden OH2 und DRY: m12z.

Die Ergebnisse der PLS- und CV-Verfahren werden gekennzeichnet durch die Größen:

- *onc* optimale Zahl an latenten Variablen;
- q^2 *cross*-validiertes Bestimmtheitsmaß.

In den ersten PLS-Analysen stellte ich in einem *scores*-Plot (Abb. 42b) fest, dass die Verbindungen zu Gruppenbildungen neigen. Daher begann ich die systematischen Deskriptoren-Selektion mit verwandten Arzneistoffen und damit geringer Strukturvariabilität der Objekte. Teilweise machte sich eine weitere Trennung nach dem Protonierungscharakter (neutrale Moleküle, einfache oder zweifache Basen) notwendig. Die PGDP-Koeffizienten wurden nicht in die Analysen aufgenommen, da die $\log P$ -Werte mit denen aus *n*-Octanol/Wasser hoch korreliert sind und das System für die Verteilung von Ionen nicht gut geeignet war.

6.5.2 Analyse des Verteilungsverhaltens der Neutralformen

6.5.2.1. Phenothiazine und Thioxanthene

Die PLS-Analysen der Konformationen der Neutralformen aller Phenothiazine und Thioxanthene unter Einbeziehung der Deskriptoren der Sonden OH2 und DRY führen mit den $\log P$ -Werten in *n*-Octanol/Wasser ($\sum n = 55$) nach der Variablenselektion nur zu einem *cross*-validiertem q^2 von 0.06 und einer optimalen Zahl an latenten Variablen (*onc*) von 2, mit den $\log P_m$ -Werten an Liposomen (14 Verbindungen \times 3 Einträge + 4 Einträge Chlorpromazin = 46) zu einem q^2 -Wert von 0.08 und *onc* = 1. Bei einer veränderten Sondenauswahl ändern sich die Ergebnisse der Korrelationen nicht. Daher ist für eine Interpretation des Verteilungsverhaltens in den beiden Systemen eine Unterteilung der Objekte in die Gruppe der einfachen und der zweifachen Basen geboten. Die drei Phenothiazine ohne basische Seitenkette passen mit ihren *score*-Beträgen in keine der beiden Gruppen.

Die Variablenselektion liefert für die einfachen Basen gute PLS-Modelle mit einem $q^2 > 0.7$ in *n*-Octanol/Wasser (Tab. 27). Unabhängig von der Probenauswahl tragen sechs bis sieben ausgewählte VOLSURF-Deskriptoren Anteile an den wenigen latenten Variablen (maximal 7), was auf Interkorrelationen hinweist. In den Gleichungen mit den absoluten Beiträgen in der Tab. 28 korreliert die Anzahl der relevanten Deskriptoren mit der Zahl an LV. Allen Modellen gleich ist ein positiver Einfluss eines *W*-Parameters (Wasser- oder polare Sonde) und vom Lipophilie-Term *D2* sowie der negative *ID7*-Deskriptor. Da das lipophile *Integy*-Moment die räumliche Verteilung von nicht hydrophilen Gruppen um den Molekülschwerpunkt kennzeichnet, benachteiligen folglich periphere lipophile Substituenten die Verteilung in *n*-Octanol/Wasser. Das gleiche Vorzeichen der hydrophilen und lipophilen Eigenschaften der Moleküle bestätigt in den Modellen den amphiphilen Charakter des *n*-Octanols. Wasserstoffbrücken werden durch die Carbonylsauerstoff-Sonde besser beschrieben als mit der phenolischen OH-Sonde. Der negative Koeffizient für Wasserstoffbrücken (*HB1*) zeigt aber, dass sie sich hinderlich auf eine Verteilung in die organische Phase auswirken.

Die als Maß für die Güte der PLS-Modelle verwendete Vorhersagekraft (q^2 -Wert) nimmt zu, wenn Perphenazin und Fluphenazin in der Gruppe der zweifachen Basen in *n*-Octanol/Wasser unberücksichtigt bleiben (Tab. 27). Jede LV entspricht einer Moleküleigenschaft in den von Interkorrelationen befreiten Modellen. Somit sind die Modelle leichter auszuwerten als bei den einfachen Basen. Die Verteilung der zweifach protonierbaren Verbindungen in *n*-Octanol/Wasser wird durch andere Parameter beschrieben. Die Zunahme an Molekülgröße (*V/S*), vorhandene polare Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken haben einen großen $\log P$ -Wert zur Folge. Hydrophilie bzw. Polarität (*W*) und Lipophilie (*D*) haben jeweils einen negativen Einfluss auf den Verteilungskoeffizienten (Tab. 28).

Kein Unterschied besteht in den Ergebnissen der PLS-Analysen der einfachen Basen zwischen dem Liposomen- und dem *n*-Octanol/Wasser-Modell (Tab. 27/28). Eine Konformation von Promazin kann aber nicht in den Modellen berücksichtigt werden. Ein positiver Einfluss von Wechselwirkungen mit Ladungen ist zu erkennen. Die *cis/trans*-Isomeren von Flupenthixol liegen in den T/U-Plots der ersten LV (*score*-Werte) im gleichen Abstand entweder ober- oder unterhalb der Ideallinie der PLS-Modelle der zweifachen Basen und der $\log P$ -Werte an Liposomen. Daran wird die Bedeutung der *cis/trans*-Konfiguration in Molekülen auf die Beträge der VOLSURF-Deskriptoren ersichtlich.

Tabelle 27: PLS-Modelle mit allen Phenothiazinen und Thioxanthenen

Name	n	ohne	CV vor FFD			selektierte Deskriptoren mit <i>partial-weights</i> -Beträgen (1. LV)							CV nach FFD			Fit
			Variablen	onc	q^2	1	2	3	4	5	6	7	onc	SDEP	q^2	
o 12e	25	neutrale Phenothiazine	50 von 54	2	0.68	D1 0.63	W1 0.39	D2 0.38	D3 0.31	W2 0.20	ID7 -0.41	-	1	0.203	0.74	0.81
o 12z	15	Perphenazin Fluphenazin	50 von 54	5	0.64	W3 0.44	W4 0.10	V 0.04	S 0.03	W5 0.02	D2 -0.29	D1 -0.84	4	0.059	0.90	0.96
o 123e	25	neutrale Phenothiazine	64 von 70	2	0.69	D1 0.64	D2 0.39	D3 0.31	W1 OH 0.27	W1 0.24	W2 OH 0.17	ID7 -0.42	1	0.206	0.73	0.79
o 123z	15	Perphenazin Fluphenazin	64 von 70	5	0.81	W1 OH 0.46	W3 OH 0.42	S 0.02	HB1 -0.06	D2 -0.25	D1 -0.74	-	5	0.039	0.95	0.99
o 124e	25	neutrale Phenothiazine	64 von 70	2	0.72	W1 O:: 0.51	D3 0.43	W2 O:: 0.32	W1 0.32	W2 0.16	ID7 -0.57	-	3	0.203	0.74	0.83
o 124z	15	Perphenazin Fluphenazin	64 von 70	5	0.79	HB2 0.41	W1 O:: 0.38	W3 0.37	W2 O:: 0.22	S 0.02	D1 -0.71	-	3	0.072	0.84	0.91
m 12e	24	Promazin_1	50 von 54	2	0.78	D3 0.37	W2 0.33	D4 0.30	D5 0.21	ID7 -0.79	-	-	2	0.172	0.76	0.87
m 12z	15	Flupenthixole	50 von 54	3	0.59	D1 -0.40	D2 -0.92	-	-	-	-	-	1	0.031	0.74	0.80
m 124e	24	Promazin_1	64 von 70	2	0.75	D3 0.37	W2 0.33	D4 0.30	D5 0.21	HB2 0.13	ID7 -0.78	-	3	0.161	0.79	0.87
m 124z	15	Flupenthixole	64 von 70	3	0.65	HB2 0.50	D1 -0.87	-	-	-	-	-	1	0.028	0.78	0.84
m 125e	24	Promazin_1	61 von 68	2	0.83	W1 PO4 0.47	D3 0.34	W1 0.29	D4 0.28	ID7 -0.71	-	-	2	0.178	0.75	0.84
m 125z	15	Flupenthixole	61 von 68	4	0.76	W1 PO4 0.44	W2 0.42	W3 0.30	W2 PO4 0.16	D4 -0.07	D2 -0.28	D1 -0.66	3	0.022	0.86	0.93
m o3e	24	Promazin_1	70 von 78	2	0.81	W1 PO4 0.44	D2 0.33	W2 0.29	D4 0.27	W3 PO4 -0.26	ID7 -0.69	-	2	0.178	0.74	0.84
m o3z	15	Flupenthixole	70 von 78	4	0.77	W2 0.52	W2 PO 0.19	D2 -0.33	D1 -0.77	-	-	-	3	0.023	0.85	0.92

Tabelle 28: Verbleibende Koeffizienten der GOLPE-PLS-Optimierung nach Interkorrelationstest: alle Phenothiazine und Thioxanthene

VOLSURF-Deskriptoren: von den GRID-Sonden																
Name	Y	<i>intercept</i>	1	2	2	1	3 / 4	1 / 3 / 4	5	n	onc	SDEP	q^2	s	r^2	F
o 12e	$\log P_{\text{oct}} =$	1.624	+ 0.002 W1	+ 0.004 D1	- 0.004 ID7	/	/	/	/	25	3	0.232	0.71	0.191	0.79	87.3
o 12z	$\log P_{\text{oct}} =$	4.203	- 0.002 W3	- 0.005 D1	/	+ 0.006 S	/	/	/	15	3	0.088	0.82	0.075	0.87	24.4
o 123e	$\log P_{\text{oct}} =$	1.557	/	+ 0.004 D1	- 0.004 ID7	/	+ 0.002 W1 OH	/	/	25	1	0.206	0.75	0.184	0.80	93.2
o 123z	$\log P_{\text{oct}} =$	3.020	/	- 0.003 D2	/	+ 0.002 S	+ 0.0004 W1 OH	/	/	15	3	0.056	0.93	0.042	0.96	64.9
o 124e	$\log P_{\text{oct}} =$	2.199	/	+ 0.014 D3	- 0.001 ID7	/	+ 0.002 W1 O::	- 0.008 HB1	/	25	2	0.225	0.72	0.191	0.80	42.7
o 124z	$\log P_{\text{oct}} =$	4.703	- 0.005 W3	- 0.005 D1	/	/	+ 0.003 W1 O::	+ 0.005 HB1	/	15	4	0.087	0.84	0.055	0.94	36.3
m 12e	$\log P_{\text{m}} =$	3.456	+ 0.002 W2	+ 0.017 D4	- 0.001 ID7	/	/	/	/	24	3	0.195	0.75	0.172	0.80	27.1
m 12z	$\log P_{\text{m}} =$	4.289	/	- 0.001 D1	/	/	/	/	/	15	1	0.033	0.74	0.027	0.82	58.6
m 12e	$\log P_{\text{m}} =$	3.056	+ 0.002 W2	+ 0.015 D4	- 0.001 ID7	/	/	- 0.003 HB2	/	24	4	0.213	0.71	0.171	0.82	20.9
m 124z	$\log P_{\text{m}} =$	4.289	/	- 0.001 D1	/	/	/	/	/	15	1	0.033	0.74	0.027	0.82	58.6
m 125e	$\log P_{\text{m}} =$	2.465	/	+ 0.015 D4	- 0.001 ID7	/	/	/	+ 0.002 W1 PO4	24	3	0.196	0.74	0.167	0.82	29.3
m 125z	$\log P_{\text{m}} =$	4.669	- 0.0004 W3	- 0.002 D1	/	+ 0.004 D4	/	/	/	15	3	0.026	0.86	0.019	0.93	47.1
m o3e	$\log P_{\text{m}} =$	3.045	+ 0.001 W2	+ 0.014 D3	- 0.001 ID7	/	/	/	+ 0.003 W3 PO4	24	1	0.176	0.77	0.162	0.85	23.9
m o3z	$\log P_{\text{m}} =$	4.149	+ 0.001 W2	- 0.004 D2	/	/	/	/	- 0.001 W2 PO4	15	3	0.032	0.78	0.027	0.85	20.7

Wenige Deskriptoren, die mit der Zahl an signifikanten LV bereinstimmen, erklären die Verteilung im Membransystem. In allen Modellen (Tab. 28) hemmen lipophile Eigenschaften der zweifachen Basen die Einlagerung. Wenn die Deskriptoren der Ladungs-sonde in die PLS-Analyse einbezogen werden, sind die erhaltenen Modelle nicht einfach zu interpretieren. Durch einen gegenläufigen Einfluss verwandter Deskriptoren liegt die Vermutung nahe, dass unterschiedliche Teile der Molekülstrukturen auf verschiedenen Wegen und mit variierenden Potentialen Wechselwirkungen ausbilden können. Die im Vergleich zu den *n*-Octanol/Wasser-Modellen kleineren q^2 -Werte deuten auf eine heterogene Struktur der Objekte hin.

6.5.2.2 Die 1,4-Dihydropyridine

Die 1,4-Dihydropyridine stellen eine strukturell homogenere Gruppe als die Phenothiazine und Thioxanthene dar. Jedoch passen die Moleküle mit protonierbaren Aminofunktionen nicht in die Modelle, die die $\log P$ -Werte in *n*-Octanol/Wasser erklären sollen (Tab. 29). Der Verteilungskoeffizient (Referenzwert) von Nifedipin, $\log P_{\text{Oct}} = 2.78$, lag zu niedrig, um in signifikante Übereinstimmung mit dem PLS-Zusammenhang zu gelangen. Für Lacidipin und Lercanidipin waren nur Literaturwerte bekannt, deren Exaktheit nicht überprüft werden konnte.

Für die Modelle mit den verbleibenden Verbindungen (*n*-Octanol 7; Membran und IAM-Säule 8), unabhängig von den Sonden und der Art der Verteilungskoeffizienten, finden sich fast ideale r^2 - und q^2 -Werte der PLS-Berechnungen nach Beseitigung der Interkorrelationen (Tab. 29). Die Zahl an relevanten Deskriptoren stimmt mit den gefundenen optimalen LV fast immer überein und zeigt, dass jede Eigenschaft für die Modelle von entscheidender Bedeutung ist (Tab. 30). Eine Ursache besteht in der Dominanz und dem generell positiven Einfluss der Lipophilie bzw. lipophilen Interaktionen in den einzelnen Verteilungssystemen.

Die amphiphilen Eigenschaften von *n*-Octanol und der IAM-Säule belegen die gleichzeitig positiven Koeffizienten von hydrophilen und lipophilen Deskriptoren (Tab. 30). Je weiter ein lipophiles Zentrum vom Masseschwerpunkt entfernt ist, desto ungünstiger fällt die Verteilung in *n*-Octanol bei vorhandenen polaren Wechselwirkungen aus. Da es sich bei den 1,4-Dihydropyridinen fast ausschließlich um Verbindungen ohne de-/protonierbare funktionelle Gruppe handelt, sind keine Effekte von Ladungen in den Modellen mit den $\log k'$ -Werten erkennbar (Tab. 29). Nicardipin ist die einzige untersuchte Verbindung mit einer Ringstruktur als verestete Seitenkette und kann in den Korrelationen der chromatografischen Werte nicht mit einbezogen werden.

In den Modellen, die die Verteilung an Liposomen darstellen (Tab. 29), kommen weitere Deskriptoren zur Beschreibung hinzu. Wasserstoffbrücken an polaren Bereichen vermindern die Einlagerung in die Membran. Hydrophile Wechselwirkungen werden wahrscheinlich durch den Beitrag des Ladungsdeskriptors im PLS-Modell ersetzt, da vor dem Interkorrelationstest ein *W*-Deskriptor selektiert wurde. Der beliebige Austausch der Deskriptoren *W1*, *O*:: und *D1* in der Korrelationsgleichung m_03 zeigt (Tab. 30), dass nur diese beiden Eigenschaften zur Erklärung des Verteilungsverhaltens der 1,4-Dihydropyridine relevant sind. Die statistischen Parameter dieser Gleichung bleiben stabil.

Tabelle 29: PLS-Modelle aller 1,4-Dihydropyridine

Name	n	ohne	CV vor FFD		selektierte Deskriptoren mit <i>partial-weights</i> -Beiträgen (1. LV)					CV nach FFD			Fit r^2	
			Variablen	onc	q^2	1	2	3	4	5	onc	SDEP		q^2
o 12	21	Amlodipin Nicardipin	50 von 54	2	0.98	D1 0.71	V 0.52	S 0.31	W1 0.27	D2 0.26	2	0.229	0.89	0.92
o 123	21	Amlodipin Nicardipin	64 von 70	3	0.95	D1 0.86	W1 OH 0.34	W1 0.24	D2 0.23	ID8 -0.19	1	0.138	0.96	0.98
o 124	21	Amlodipin Nicardipin	64 von 70	3	0.95	D1 0.93	W1 0.26	D2 0.25	D3 0.08	-	2	0.167	0.94	0.94
m 12	24	Lacidipin	50 von 54	1	0.94	D1 0.87	D2 0.49	-	-	-	1	0.187	0.94	0.95
m 124	24	Lacidipin	64 von 70	1	0.94	W1 O:: 0.69	D1 0.60	D2 0.34	HB1 -0.21	-	1	0.164	0.96	0.96
m 125	24	Lacidipin	56 von 62	2	0.96	D1 0.67	W1 0.63	D2 0.37	W3 PO4 -0.06	W2 PO4 -0.12	2	0.133	0.97	0.97
m o3	24	Lacidipin	70 von 78	2	0.96	W1 O:: 0.70	D1 0.61	D2 0.34	W3 PO4 -0.05	W2 PO4 -0.11	2	0.138	0.97	0.97
k 12	24	Nicardipin	50 von 54	3	0.91	D1 0.91	D2 0.37	W1 0.17	-	-	2	0.115	0.88	0.91
k 124	24	Nicardipin	63 von 70	3	0.90	D1 0.90	D2 0.37	W1 0.17	D3 0.16	D4 0.08	2	0.115	0.88	0.91
k 125	24	Nicardipin	56 von 62	3	0.89	D1 0.90	D2 0.37	W1 0.17	D3 0.16	W2 -0.09	2	0.114	0.89	0.91
k o3	24	Nicardipin	70 von 78	2	0.87	D1 0.88	D2 0.36	W1 O:: 0.21	W1 0.17	D3 0.16	3	0.108	0.90	0.95

Tabelle 30: Verbleibende Koeffizienten der GOLPE-PLS-Optimierung nach Interkorrelationstest: alle 1,4-Dihydropyridine

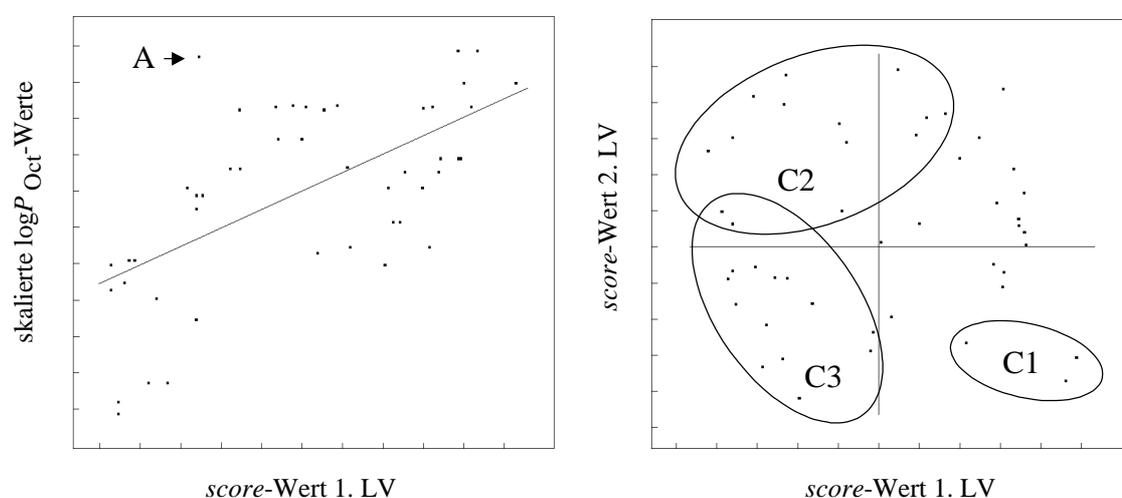
Name	Y	<i>intercep</i> <i>t</i>	VOLSURF-Deskriptoren: von den GRID-Sonden						n	on c	SDEP	q^2	<i>s</i>	r^2	<i>F</i>
			1	2	2	3/4	1/3/4	5							
o 12	$\log P_{\text{oct}} =$	-1.862	+0.003 W1	+0.014 D1	/	/	/	/	21	2	0.186	0.94	0.167	0.95	180.5
o 123	$\log P_{\text{oct}} =$	-1.690	/	+0.012 D1	-0.005 ID8	+0.003 W1 OH	/	/	21	3	0.170	0.95	0.125	0.98	218.9
o 124	$\log P_{\text{oct}} =$	-1.862	+0.003 W1	+0.014 D1	/	/	/	/	21	2	0.186	0.94	0.167	0.95	180.5
m 12	$\log P_{\text{m}} =$	2.410	/	+0.009 D1	/	/	/	/	24	1	0.197	0.94	0.183	0.95	426.9
m 124	$\log P_{\text{m}} =$	1.791	/	+0.004 D1	/	/	-0.011 HB1	/	24	1	0.144	0.97	0.140	0.97	372.4
m 125	$\log P_{\text{m}} =$	1.924	/	+0.008 D1	/	/	/	+0.001 W3 PO4	24	2	0.190	0.95	0.183	0.95	215.5
m o3	$\log P_{\text{m}}^*$	-0.012	/	/	/	+0.003 W1 O::	/	/	24	1	0.240	0.92	0.224	0.93	279.6
k 12	$\log k'$	-0.720	+0.001 W1	+0.009 D1	/	/	/	/	24	2	0.121	0.89	0.110	0.91	103.3
k 124	$\log k'$	-0.720	+0.001 W1	+0.009 D1	/	/	/	/	24	2	0.121	0.89	0.110	0.91	103.3
k 125	$\log k'$	-0.601	+0.001 W2	+0.10 D1	/	/	/	/	24	2	0.110	0.91	0.104	0.92	117.4
k o3	$\log k'^{**}$	-0.740	/	+0.009 D1	/	+0.001 W1 O::	/	/	24	2	0.128	0.88	0.114	0.90	95.1

* oder Zusammenhang wie bei m12; ** oder Zusammenhang wie bei k12.

6.5.2.3 Alle ungeladenen Verbindungen

Für diesen Teil wurden die Maximalzahl an Objekten berücksichtigt (32 Verbindungen \times 2 Einträge = 64), da ich allgemeine und strukturübergreifende Zusammenhänge zwischen den Verteilungskoeffizienten und den selektierten VOLSURF-Deskriptoren finden wollte. Die verschiedenen n -Werte der PLS-Analysen (Tab. 31/32) kommen zustande, da nicht für alle Verbindungen die jeweiligen Koeffizienten (Y-Variablen) gegeben waren (Tab. 3, 8, 10, 12 und 24). Die Elimination der Verteilungskoeffizienten der Referenzsubstanzen Lacidipin und Lercanidipin führte oft zu einer starken Zunahme der Vorhersagekraft.

In den Abb. 42 bis 44 sind die T/U-Plots, erste LV zu skalierten Verteilungskoeffizienten, sowie die *scores*-Plots der Objekte an der ersten und zweiten LV der PLS-Analysen mit der Wasser- und DRY-Sonde vor Eliminierung der Ausreißer und vor der Variablenselektion dargestellt.



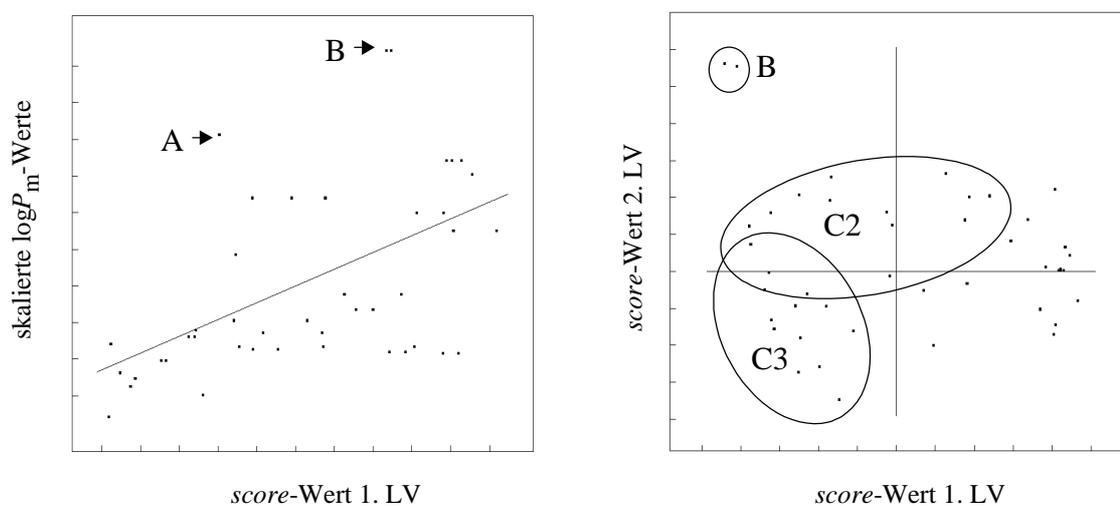
Abbildungen 42a/b: T/U-Plot der ersten latenten Variablen, $\log P_{\text{Oct}}$ -Werte und Sonden 1/2 (a); *score*-Plot der ersten beiden LV (b); Modell o12 in Tab. 31.

Das heterogene Bild der ersten latenten Variablen (LV) mit den n -Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($n = 60$) lässt in Abb. 42a erkennen, dass mehrere latente Variablen, die aus Anteilen von verschiedenen VOLSURF-Deskriptoren bestehen, zur signifikanten Beschreibung des PLS-Zusammenhangs verwendet werden müssen ($q^2 = 0.36$; $\text{onc} = 2$). Lacidipin (A) weicht deutlich ab. Aus dem *score*-Plot (Abb. 41b) kann man vier Gruppen an strukturverwandten Verbindungen finden, die Phenothiazine ohne basische Seitenkette (C1), die zweifachen Basen (C2), die 1,4-Dihydropyridine (C3) und die einfachen Basen (nicht hervorgehoben). In Abb. 42b nehmen mit der ersten LV die Verteilungskoeffizienten zu, mit der zweiten LV die Polarität und die Größe der Verbindungen.

Die Elimination der nicht in das Modell passenden Lacidipin-Moleküle führte zu einer Verdopplung der Vorhersagekraft q^2 der PLS-Analysen mit den $\log P$ -Werten in n -Octanol/Wasser (Tab. 31). Die lipophilen Wechselwirkungen stellen die universelle Eigenschaft aller Verbindungen dar, um das Verteilungsverhalten im Standardsystem zu erklären. Die Einbeziehung der Carbonylsauerstoff-Funktion zur Charakterisierung polarer Interaktionen hat eine heterogene Deskriptorenselektion zur Folge. Die Moleküloberfläche und Wasserstoffbrückenbildungskapazitäten besitzen negative Vorzeichen. Obwohl die nicht signifikanten Interaktionsparameter mit ihren geringen

Beiträgen nicht in den Modellen vorhanden sind, liefern die für dieses Verteilungssystem charakteristischen Sonden bzw. die davon abgeleiteten Deskriptoren nur Gleichungen mit geringer Vorhersagekraft (Tab. 32).

Die Membran-Verteilungskoeffizienten von Lacidipin (A) und Lercanidipin (B) können mit den *score*-Werten der beiden Moleküle an der ersten LV nicht in den Grundzusammenhang gebracht werden ($n = 54$; $q^2 = 0.26$; $onc = 3$) (Abb. 43a). Weiterhin liegen im T/U-Plot die einfach protonierbaren Phenothiazine von Triflupromazin und Levomepromazin oberhalb und die doppelt protonierbaren Phenothiazine von Prochlorperazin und Thiethylperazin unterhalb der Geraden. Die Einträge im *score*-Plot (Abb. 43b) sind deutlich umgruppiert. Es deutete sich eine andere Zusammensetzung der LV aus den einzelnen VOLSURF-Deskriptoren an.



Abbildungen 43a/b: T/U-Plot der ersten latenten Variablen, $\log P_m$ -Werte und Sonden 1/2 (a); *score*-Plot der ersten beiden LV (b); Modell m12 in Tab. 31.

Der Vergleich mit den ersten beiden PLS-Gleichungen der Modelle mit den an Liposomen gemessenen Verteilungskoeffizienten (Tab. 31; m12 und m124) zeigt große Ähnlichkeit der Beiträge der einzelnen Deskriptoren. Werden die Wechselwirkungen mit Ladungen einbezogen, bleibt bei der Variablenselektion kein Beitrag für die Lipophilie übrig. Jedoch erklären die selektierten Deskriptoren der geladenen Sonde die Verteilung in Liposomen nur unzureichend. Die Modelle mit der schlechten Vorhersagekraft weisen auf die Heterogenität der Wechselwirkungen mit den Phosphatidylcholinen hin. So hat der ausgewählte *ID*-Deskriptor gegenteilige Auswirkungen bei der Interpretation des Verteilungsverhaltens wie beim IAM-System. Die Verteilungsmodelle IAM-Säule und Liposomen sind somit nicht direkt vergleichbar.

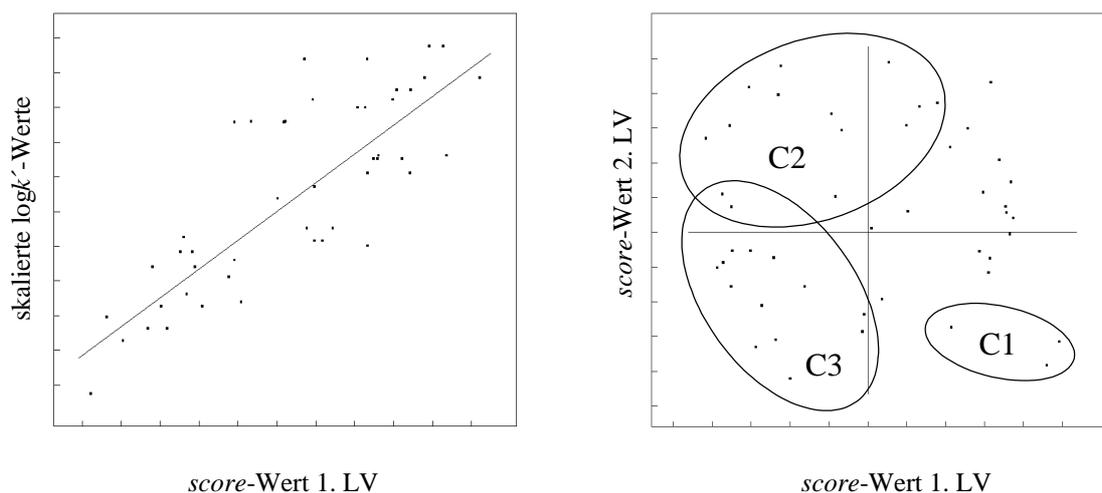
Eine ausgesprochen homogene Verteilung (Abb. 44a) zeigen die *score*-Werte der Objekte ($n = 60$) um die Idealgerade, wenn die logarithmierten Kapazitätsfaktoren als skalierte Y-Werte eingesetzt werden. Bei einem q^2 -Wert von 0.76 und $onc = 3$ kann die Menge an Verbindungen unverändert bleiben. Die Lage der Verbindungen im *score*-Plot und folglich die Gruppenbildungen sind mit der Abb. 42b identisch.

Tabelle 31: PLS-Modelle der Neutralformen aller Verbindungen

Name	n	ohne	CV vor FFD			selektierte Deskriptoren mit <i>partial-weights</i> -Beiträgen (1. LV)						CV nach FFD			Fit
			Variablen	onc	q^2	1	2	3	4	5	6	onc	SDEP	q^2	
o 12	58	Lacidipin	50 von 54	2	0.47	D1 0.87	D2 0.49	-	-	-	-	1	0.441	0.48	0.53
o 123	58	Lacidipin	64 von 70	2	0.48	D1 0.85	D2 0.48	D3 0.20	-	-	-	1	0.438	0.49	0.53
o 124	58	Lacidipin	64 von 70	5	0.62	D1 0.91	W1 O:: 0.03	S -0.08	HB2 -0.42	-	-	3	0.370	0.63	0.70
m 12	50	Lercanidipin Lacidipin	50 von 54	3	0.54	D2 0.99	ID7 -0.12	-	-	-	-	2	0.424	0.42	0.49
m 124	50	Lercanidipin Lacidipin	64 von 70	2	0.44	D2 0.99	ID7 -0.12	-	-	-	-	2	0.425	0.42	0.49
m 125	50	Lercanidipin Lacidipin	56 von 62	3	0.62	ID7 -0.09	W2 PO4 -1.00	-	-	-	-	2	0.355	0.59	0.64
m 03	50	Lercanidipin Lacidipin	70 von 78	5	0.60	ID7 -0.04	V -0.09	W2 PO4 -0.43	W1 PO4 -0.89	-	-	2	0.386	0.52	0.59
k 12	60	-	50 von 54	4	0.76	D1 0.94	ID4 0.27	W1 0.23	-	-	-	3	0.344	0.79	0.82
k 124	60	-	64 von 70	5	0.78	D1 0.84	W1 O:: 0.45	ID4 0.24	ID3 0.17	-	-	3	0.338	0.80	0.83
k 125	60	-	56 von 62	4	0.80	W1 0.27	D3 0.23	W2 -0.16	W1 PO4 -0.92	-	-	2	0.376	0.75	0.78
k o3	60	-	70 von 78	5	0.82	D1 0.72	D3 0.14	ID3 0.14	W4 PO4 0.08	HB2 0.32	W1 PO4 -0.58	3	0.312	0.83	0.86

Tabelle 32: Verbleibende Koeffizienten der GOLPE-PLS-Optimierung nach Interkorrelationstest: Neutralformen aller Verbindungen

Name	Y	<i>intercept</i>	VOLSURF-Deskriptoren: von den GRID-Sonden							n	onc	SDEP	q^2	s	r^2	F
			1	2	2	1	3 / 4	1 / 3 / 4	5							
o 12	$\log P_{\text{oct}} =$	3.154	/	+ 0.005 D1	/	/	/	/	/	58	1	0.462	0.47	0.444	0.51	58.8
o 123	$\log P_{\text{oct}} =$	3.154	/	+ 0.005 D1	/	/	/	/	/	58	1	0.462	0.47	0.444	0.51	58.8
o 124	$\log P_{\text{oct}} =$	3.408	/	+ 0.004 D1	/	- 0.001 S	/	- 0.004 HB2	/	58	2	0.467	0.47	0.516	0.52	19.2
m 12	$\log P_{\text{m}} =$	3.594	/	+ 0.008 D2	- 0.004 ID7	/	/	/	/	50	2	0.426	0.45	0.411	0.49	22.3
m 124	$\log P_{\text{m}} =$	3.594	/	+ 0.008 D2	- 0.004 ID7	/	/	/	/	50	2	0.426	0.45	0.411	0.49	22.3
m 125	$\log P_{\text{m}} =$	5.921	/	/	- 0.002 ID7	/	/	/	- 0.002 W2 PO4	50	2	0.485	0.29	0.464	0.35	12.4
m o3	$\log P_{\text{m}} =$	5.902	/	/	/	- 0.002 V	/	/	- 0.0004 W1 PO4	50	2	0.538	0.12	0.528	0.15	4.3
k 12	$\log k' =$	-0.636	+ 0.001 W1	+ 0.007 D1	+ 0.022 ID4	/	/	/	/	60	2	0.431	0.69	0.408	0.73	49.7
k 124	$\log k' =$	-0.419	/	+ 0.006 D1	+ 0.011 ID4	/	+ 0.001 W1 O::	/	/	60	3	0.343	0.81	0.327	0.83	87.8
k 125	$\log k' =$	-0.173	+ 0.001 W1	+ 0.026 D3	/	/	/	/	/	60	2	0.558	0.48	0.539	0.51	30.1
k o3	$\log k' =$	0.316	/	+ 0.003 D1	+ 0.021 ID3	/	/	- 0.007 HB2	- 0.002 W4 PO4	60	3	0.361	0.80	0.338	0.82	60.9



Abbildungen 44a/b: T/U-Plot der ersten latenten Variablen, $\log k'$ -Werte und Sonden 1/2 (a); $score$ -Plot der ersten beiden LV (b); Modell k12 in Tab. 31.

Einige Modelle mit den an der IAM-Säule bestimmten Verteilungsfaktoren besitzen eine hohe Signifikanz. Dazu zählen die PLS-Analysen unter Einschluss der Carbonylsauerstoff-Sonde und bei Berücksichtigung aller Strukturelemente einer IAM-Säule (Tab. 32, ko3). Die Verteilungsvorgänge werden an künstlichen immobilisierten Membranen nicht nur durch die Lipophilie der Moleküle bestimmt. Lipophile Interaktionen haben auch hier einen positiven Beitrag, der aber vom positiv Einfluss eines Ungleichgewichts zwischen den lipophilen Bereichen und dem Massezentrum überlagert wird. Eine ausreichende räumliche Trennung von lipophilen Bereichen vom Schwerpunkt in Verbindung mit dem positiven Vorzeichen für die Hydrophilie zeigt die verschiedenen Bereiche von bestimmten Wechselwirkungen in diesem Verteilungssystem. Ladungen und Wasserstoffbrücken sind hinderlich bei der Verteilung. Die Anwesenheit dieser Deskriptoren erhöht aber die Signifikanz der Modelle.

6.5.3 Analyse des Verteilungsverhaltens der geladenen Verbindungen

6.5.3.1 Einfach geladene Phenothiazine und Thioxanthene

Zur Erstellung der einzelnen Modelle werden die Verteilungskoeffizienten der einfach geladenen Ionen und die $\log k'$ -Werte verwendet (Tab. 33). Die Molekülen mit endständigen Hydroxylgruppen besaßen andere Beiträge der Deskriptoren. Aufgrund dieser Abweichungen konnten die Phenazine in den Modellen mit den *n*-Octanol/Wasser-Werten sowie die Phenazine und die Flupenthixole in den Modellen mit den IAM-Faktoren nicht berücksichtigt werden. Eine weitere Untergliederung nach dem Protonierungscharakter war nicht notwendig. Es wurden nur Modelle erstellt, die entweder reine hydrophile und lipophile Wechselwirkungen (Sonden OH2 und DRY) oder alle Interaktionsmöglichkeiten des jeweiligen Verteilungssystems einschließen (Tab. 33/34).

In den Ergebnissen der PLS-Analysen mit den $\log P_{\text{ion}}$ -Werten in *n*-Octanol/Wasser ist kein Lipophilie-Deskriptor mehr enthalten (Tab. 34). Die Ionenverteilung wird in ähnlicher statistischer Qualität mit den hydrophilen Wechselwirkungspotentialen sowohl mit Wasser als auch gemeinsam mit einer negativen Ladung und einer polaren Hydroxylgruppe, alle mit positiven Vorzeichen, beschrieben.

Tabelle 33: PLS-Modelle der einfach geladenen Phenothiazine und Thioxanthene

Name	n	ohne	CV vor FFD		selektierte Deskriptoren mit <i>partial-weights</i> -Beiträgen (1. LV)						CV nach FFD			Fit	
			Variablen	onc	q^2	1	2	3	4	5	6	onc	SDEP		q^2
o 12	33	Perphenazin Fluphenazin	50 von 54	4	0.62	W2 0.72	W1 0.69	-	-	-	-	1	0.283	0.55	0.60
o o4	33	Perphenazin Fluphenazin	71 von 78	3	0.65	W1 PO4 0.69	W2 0.49	W2 OH 0.48	W2 PO4 0.26	-	-	2	0.228	0.71	0.77
m 12	33	Triflupromazin Chlorprothixen	50 von 54	1	0.53	W1 -0.70	W2 -0.72	-	-	-	-	1	0.292	0.55	0.60
m o3	33	Triflupromazin Chlorprothixen	71 von 78	1	0.53	ID7 -0.23	W2 PO4 -0.31	W1 -0.45	W2 -0.46	W1 PO4 -0.67	-	1	0.285	0.57	0.62
k 12	27	Phenazine Flupenthixole	50 von 54	2	0.87	W1 0.73	W2 0.56	V 0.39	-	-	-	2	0.187	0.88	0.90
k o3	27	Phenazine Flupenthixole	71 von 78	2	0.84	W1 0.70	W2 0.54	V 0.38	W2 O:: 0.25	D1 0.08	D2 0.03	2	0.194	0.87	0.90

Tabelle 34: Verbleibende Koeffizienten der GOLPE-PLS-Optimierung nach Interkorrelationstest: einfach geladene Phenothiazine und Thioxanthene

VOLSURF-Deskriptoren; von den GRID-Sonden															
Name	Y	<i>intercept</i>	1	2	2	3 / 4	5	n	onc	SDEP	q^2	<i>s</i>	r^2	<i>F</i>	
o 12	$\log P_{\text{ion}} =$ oct	0.995	+ 0.002 W2	/	/	/	/	33	1	0.292	0.55	0.277	0.60	46.2	
o o4	$\log P_{\text{ion}} =$ oct	0.199	/	/	/	+ 0.0001 W1 OH	+ 0.004 W2 PO4	33	2	0.282	0.60	0.270	0.63	25.4	
m 12	$\log K_{\text{SIP}} =$	4.525	- 0.001 W2	/	/	/	/	33	1	0.313	0.52	0.290	0.58	43.4	
m o3	$\log K_{\text{SIP}} =$	5.356	- 0.001 W2	/	- 0.002 ID7	/	- 0.001 W2 PO4	33	1	0.283	0.61	0.276	0.64	26.1	
k 12	$\log k' =$	-0.639	+ 0.004 W1	/	/	/	/	27	1	0.234	0.82	0.219	0.85	136.3	
k o3	$\log k' =$	-1.612	+ 0.004 W1	+ 0.002 D1	/	/	/	27	2	0.210	0.86	0.183	0.90	102.9	

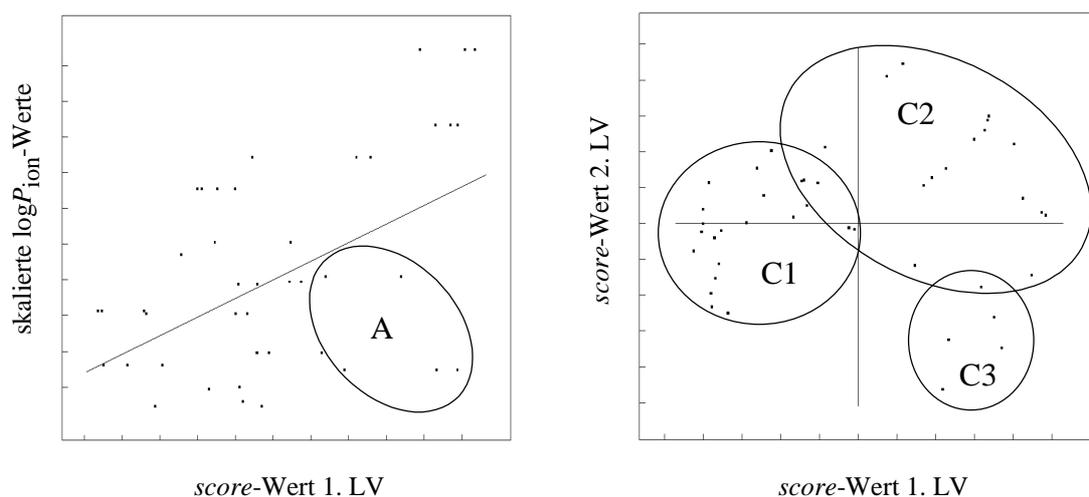
Bisher ist noch nicht geklärt, warum in den Analysen mit den $\log K_{SIP}$ -Werten alle Objekte von Triflupromazin und von Chlorprothixen Ausreißer darstellen. Ein Zusammenhang mit der ausgesprochen hohen Membranverteilung der Ionen ist zu vermuten. Im Gegensatz zu den anderen Verteilungssystemen besitzen alle selektierten Deskriptoren in den Regressionsgleichungen ein negatives Vorzeichen (Tab. 34). Zwar sind auf Ladungen basierende Wechselwirkungen wichtig für die Interpretation von Verteilungsvorgängen an Membranen, aber laut Deskriptoranalyse (Tab. 34, mo3) behindern sie die Einlagerung, wenn gleichzeitig hydrophile Interaktionen auftreten.

Die Wechselwirkungen mit Wasser und die lipophilen Interaktionen in Gegenwart von Ladungen sind in den PLS-Modellen k12 und ko3 (Tab. 34) ausreichend zur Erklärung der $\log k'$ -Werten mit den geladenen Phenothiazinen und Thioxanthenen. Es besteht eine hohe Korrelation zwischen den ausgewählten Deskriptoren und den logarithmierten Kapazitätsfaktoren dieser Verbindungen.

6.5.3.2 Alle einfach geladenen Verbindungen

Die strukturell heterogenere Objektmenge ($n = 51$) konnte durch das GOLPE-PLS-Verfahrens nicht so gut wie im vorhergehenden Abschnitt analysiert werden, wobei nicht immer alle für das Verteilungsverhalten charakteristischen Koeffizienten (Y-Variablen) vorhanden waren. Die Sonden wurden entweder nach rein hydrophilen/lipophilen Potentialen oder nach für jedes Verteilungssystem typischen Interaktionsmöglichkeiten ausgewählt.

Aufgrund der inhomogenen Verteilung der Verbindungen im T/U-Plot wurden die PLS-Berechnungen zur Interpretation der $\log P_{ion}$ -Werte in *n*-Octanol/Wasser getrennt nach einfachen und zweifachen Basen durchgeführt. Der T/U-Plot (Abb. 45a) der ersten PLS-Analyse mit allen Ionen ($n = 54$) veranschaulicht die Abweichungen der Einträge der Phenazine (A) und die Vorhersagekraft des Modells ($n = 49$, $q^2 = 0.38$, $onc = 4$).



Abbildungen 45a/b: T/U-Plots der ersten latenten Variablen, $\log P_{ion}$ -Werte in *n*-Octanol/Wasser und Sonden 1/2 (a); *score*-Plot der ersten beiden LV (b).

Die Lage der Gruppen an strukturverwandten Verbindungen im *score*-Plot (Abb. 45b) ist vollkommen verschieden zu den Abb. 42b bis 44b. Gruppe C1 umfasst die Ionen der einfach protonierbaren Phenothiazine und Thioxanthene, Gruppe C2 Ionen der zweifachen Basen und Gruppe C3 die Ionen von allen protonierbaren Calcium-Kanal-Blocker.

Tabelle 35: PLS-Modelle aller einfach geladenen Verbindungen

Name	n	ohne	CV vor FFD			selektierte Deskriptoren mit <i>partial-weights</i> -Beiträgen (1. LV)						CV nach FFD			Fit r^2
			Variablen	onc	q^2	1	2	3	4	5	6	onc	SDEP	q^2	
o 12e	29	-	50 von 54	2	0.65	D1 0.83	D2 0.50	D3 0.23	-	-	-	2	0.147	0.74	0.79
o 12z	14	Perphenazin Fluphenazin	50 von 54	1	0.77	W2 0.64	W1 0.47	W3 0.37	D1 -0.48	-	-	3	0.140	0.90	0.96
o o4e	29	-	71 von 78	2	0.64	D1 0.83	D2 0.50	D3 0.24	-	-	-	2	0.147	0.74	0.79
o o4z	14	Perphenazin Fluphenazin	71 von 78	1	0.82	W1 PO4 0.62	W2 0.46	W2 OH 0.43	W1 0.34	W1 OH 0.33	-	2	0.123	0.93	0.96
m 12	47	Lercanidipin Nicardipin	50 von 54	5	0.71	W4 -1.00	-	-	-	-	-	1	0.338	0.64	0.68
m 03	47	Lercanidipin Nicardipin	71 von 78	5	0.73	ID5 -0.57	W3 PO4 -0.82	-	-	-	-	2	0.274	0.77	0.80
k 12	49	-	50 von 54	5	0.47	ID6 0.66	ID4 0.62	ID3 0.42	-	-	-	3	0.459	0.40	0.49
k o3	49	-	71 von 78	4	0.70	W1 O:: 0.63	D1 0.45	ID4 0.34	ID3 0.23	W1 PO4 0.04	HB1 -0.48	4	0.317	0.72	0.77

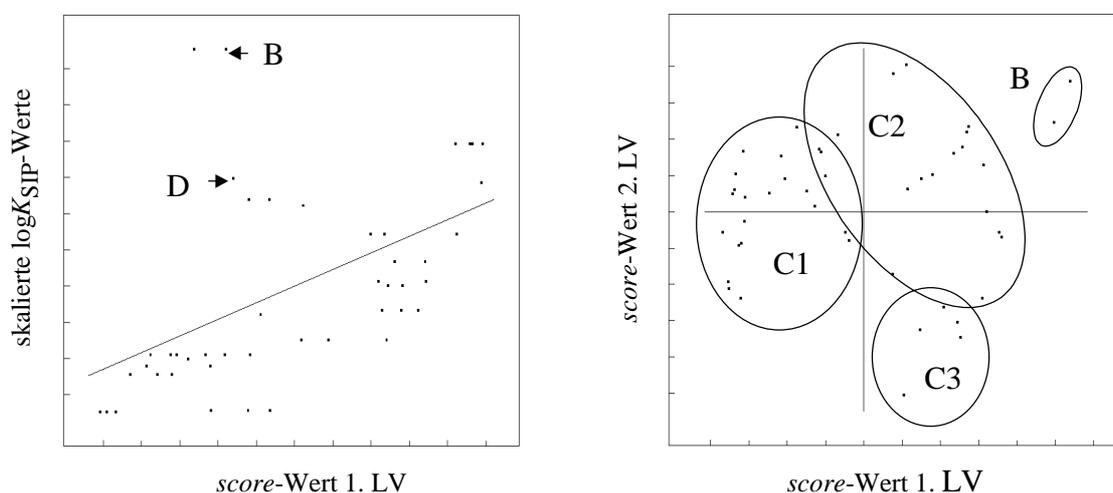
Tabelle 36: Verbleibende Koeffizienten der GOLPE-PLS-Optimierung nach Interkorrelationstest: alle einfach geladenen Verbindungen

Name	Y	<i>intercept</i>	VOLSURF-Deskriptoren: von den GRID-Sonden						n	onc	SDEP	q^2	s	r^2	F
			1	2	2	3 / 4	1 / 3 / 4	5							
o 12e	$\log P_{\text{ion}} =$ oct	0.580	/	+ 0.003 D1	/	/	/	/	29	1	0.175	0.66	0.166	0.70	61.8
o 12z	$\log P_{\text{ion}} =$ oct	-1.672	+ 0.003 W1	-0.001 D1	/	/	/	/	14	2	0.170	0.89	0.136	0.93	71.8
o o4e	$\log P_{\text{ion}} =$ oct	0.580	/	+ 0.003 D1	/	/	/	/	29	1	0.175	0.66	0.166	0.70	61.8
o o4z	$\log P_{\text{ion}} =$ oct	-0.954	/	/	/	+ 0.002 W1 OH	/	+ 0.003 W1 PO4	14	2	0.146	0.92	0.128	0.94	176.3
m 12	$\log K_{\text{SIP}} =$	4.617	-0.003 W4	/	/	/	/	/	47	1	0.375	0.58	0.365	0.60	68.2
m o3	$\log K_{\text{SIP}} =$	5.823	/	/	-0.002 ID5	/	/	-0.003 W3 PO4	47	2	0.430	0.46	0.409	0.51	23.2
k 12	$\log k' =$	2.421	/	+ 0.024 ID4	-0.008 ID6	/	/	/	49	2	0.476	0.40	0.457	0.44	18.3
k o3	$\log k' =$	2.783	/	+ 0.002 D1	+ 0.019 ID3	- 0.001 W1 O::	- 0.011 HB1		49	4	0.363	0.67	0.321	0.74	31.0

Die Aufspaltung der Objekte und die Elimination der Ausreißer (Abb. 45a, A) führt zu einer starken Zunahme der Vorhersagekraft aller PLS-Analysen mit dem $\log P_{\text{ion}}$ in *n*-Octanol/Wasser (Tab. 35). Die Verteilung der Ionen von einfachen Basen ist in den PLS-Modellen nur durch einen positiven Einfluss von lipophilen Wechselwirkungen zu interpretieren und bleibt unabhängig von der Sondenwahl (Tab. 36, o12e und oo4e). Ohne die Konformationen der beiden Phenazine ergibt sich eine hohe Vorhersage der Verteilung der Monokationen der zweifachen Basen (Tab. 36, o12d, oo4d). Hier spielen Wechselwirkungen mit hydrophilen sowie polaren und geladenen Teilchen eine positive Rolle. Die Lipophilie ist zur Modellierung des Verteilungsverhaltens in *n*-Octanol/Wasser in Gegenwart von Ladungen nicht notwendig.

Der $\log K_{\text{SIP}}$ -Wert von Lercanidipin (B) wurde vermutlich falsch gemessen (Herbette et al. 1997) und liegt weit von übrigen Wertebereich der SIP-Konstanten entfernt. Das andere 1,4-Dihydropyridin mit einer aromatischen Ringstruktur, der Arzneistoff Nicardipin (D), weicht auch stark im T/U-Plot (Abb. 46a) von der Ideallinie ab. Die Anordnung der Gruppen im *score*-Plot (Abb. 46b) ist leicht im Uhrzeigersinn verschoben. Die erste PLS-Analyse ($n = 51$) hatte nur eine geringe Vorhersagekraft ($q^2 = 0.34$; $\text{onc} = 3$).

Je größer die hydrophilen Wechselwirkungspotentiale einer Konformation ausgebildet ist, desto weniger werden sich die geladenen Verbindungen in Liposomen-Membranen verteilen, wenn ausschließlich hydrophile und lipophile Effekte einbezogen werden. Kommen Einflüsse von Polarität und Ladungen hinzu, nimmt auch die Verteilung in die Membran mit sich ausbildenden ionischen Interaktionen ab. Der *ID*-Deskriptor besitzt ein negatives Vorzeichen in der Regressionsgleichung (Tab. 36, mo3). Kompakte Konformationen haben nach diesem Modell einen höheren $\log K_{\text{SIP}}$ -Wert.

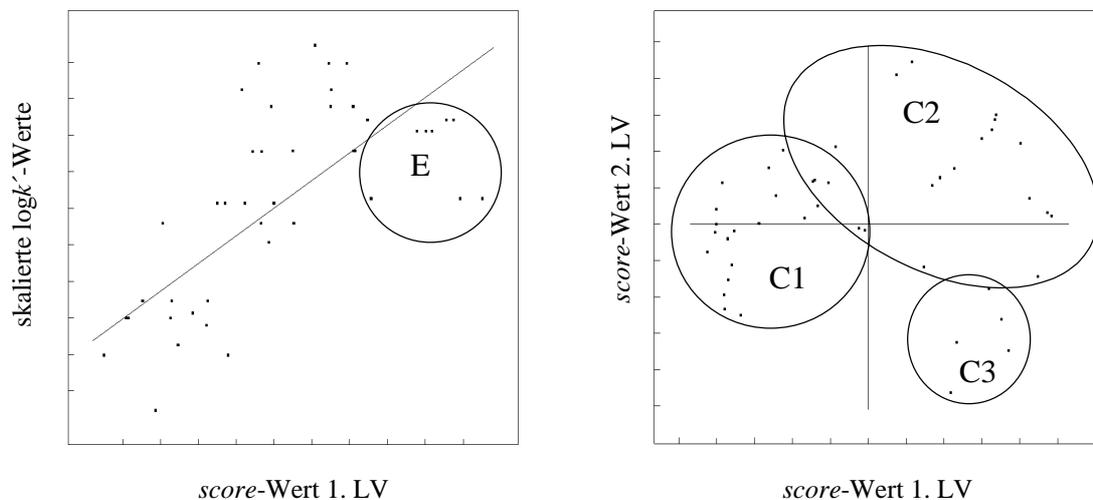


Abbildungen 46a/b: T/U-Plots der ersten latenten Variablen, $\log K_{\text{SIP}}$ -Werte und Sonden 1/2 (a); *score*-Plot der ersten beiden LV (b).

Wenn nur die Deskriptoren der Wasser- und DRY-Proben in ein PLS-Modell mit den $\log k'$ -Werten einbezogen wurden, ist das Verhalten der Phenazine und Flupenthixole (E) nicht mit der Lage der übrigen Verbindungen im T/U-Plot (Abb. 47a) in Einklang zu bringen ($n = 49$; $q^2 = 0.47$; $\text{onc} = 5$). Der *score*-Plot (Abb. 47b) veränderte sich nicht im Vergleich zur Abb. 45b.

Wie auch bei den Modellen, die aus den Neutralformen aller Verbindungen resultieren, bewirkt die räumliche Trennung von lipophilen Bereichen und dem Molekülschwerpunkt eine Zunahme der $\log k'$ -

Werte. Trotz der schlechten statistischen Absicherung verbleiben die offensichtlichen Ausnahmen (Abb. 47a, E) im Modell k12, um eine Vergleichbarkeit mit dem folgenden Modell (Tab. 36, ko3) sicherzustellen.



Abbildungen 47a/b: T/U-Plots der ersten latenten Variablen, $\log K_{SIP}$ -Werte und Sonden 1/2 (a); *score*-Plot der ersten beiden LV (b); Modell k12 in Tab. 35.

Bei Berücksichtigung aller für eine IAM-Oberfläche typischen Sonden kann der gesamte Datensatz gut interpretiert werden. Separierte lipophile Wechselwirkungen haben einen positiven Einfluss auf die Retention, Wasserstoffbrücken (mit Wasser) und polare Interaktionen behindern ein längeres Verbleiben von Ionen auf der IAM-Säule. Hervorzuheben ist, dass das Modell nach dem Interkorrelationstest stabil bleibt.

6.5.4 Zusammenfassung der PLS-Analysen

Bei der Bewertung der PLS-Modelle zur Interpretation des Verteilungsverhaltens muss man beachten, dass die gewählte Ladungsform der Verbindungen in den Modellierungen zur Ladungsform in den experimentellen Größen passt. Das ist insbesondere in den Modellen mit ungeladenen Phenothiazinen und Thioxanthenen zu berücksichtigen, da die $\log k'$ -Werte charakteristisch für die einfachen Ionen der protonierbaren Verbindungen sind. Deshalb kann man die Ergebnisse nur im Vergleich zu den Modellen mit den $\log P$ -Werten in-Octanol/Wasser und Liposomen bewerten.

Es wurden nur wenige Deskriptoren-Typen selektiert, die universell in den Modellen zu finden sind und das Verteilungsverhalten erklären: hydrophile Interaktionen (W_{OH_2} , W_{OH} und $W_{O::}$), lipophile Interaktionen (D), räumliche Trennung zwischen Molekülschwerpunkt und lipophilen Interaktionen (ID), Wasserstoffbrücken (HB) und Molekülgröße (V , S).

Die Vorhersagekraft der Modelle vor und nach dem Interkorrelationstest blieb überwiegend konstant. Von mehreren VOLSURF-Deskriptoren einer Eigenschaft, die unterschiedliche *loading*-Werte an der ersten latenten Variablen hatten, reichte eine zur Beschreibung des Verteilungsverhaltens aus. Der größte Zuwachs an Signifikanz der Modelle wurde durch eine Elimination einzelner Objekte oder durch die Aufteilung der Objektmenge nach dem Protonierungscharakter erreicht. Die Modelle zur Erklärung des Verteilungsverhaltens können daher untereinander nur verglichen werden, wenn die betrachteten Verbindungen in den Modellen kaum variieren.

7 Methodenübergreifende Bewertung der Ergebnisse

7.1 Die Verteilung in *n*-Octanol, Propylenglycoldipelargonat und Liposomen

Die potentiometrische Titration ist eine geeignete Methode zur Bestimmung der Größen von Dissoziationskonstanten. Die pK_a -Werte von schwerlöslichen Substanzen sind durch den Einsatz von Kosolventien und durch die Korrektur nach *Yasuda-Shedlovsky* zugänglich. Die Dissoziationskonstanten und der Säure/Base-Charakter der Substanzen müssen zur Auswertung der $\log P$ -Messungen bekannt sein. Neben der direkten Zugänglichkeit des Verteilungskoeffizienten der Neutralform von einfach de-/protonierbaren Verbindungen ist auch die sichere Bestimmung des Koeffizienten der Ionenverteilung möglich, wenn eine dafür vorgesehene Gleichung verwendet wird. Bei zwei- und mehrfach de-/protonierbaren Molekülen bleibt das vom Hersteller gelieferte Auswerteverfahren die Methode der Wahl. Der scheinbare Verteilungskoeffizient für den physiologischen pH-Wert kann errechnet werden, wenn pK_a , $\log P$ und $\log P_{\text{ion}}$ bekannt sind. Dieser Koeffizient kann besser geeignet als der $\log P$ -Wert für Beziehungen zwischen Struktur und Verteilung *in vivo* sein, weil er den Einfluss von Dissoziation und der Ionenpaarverteilung auf das Verteilungsverhalten einer Verbindung berücksichtigt.

Die drei Verteilungssysteme besitzen folgende Vor- und Nachteile:

1. Das *n*-Octanol/Wasser-System wird standardmäßig zur Charakterisierung des Einflusses von Strukturbestandteilen auf die Gesamtlipophilie von ungeladenen Verbindungen verwendet (Konstante π nach *Hansch*). Die Reihenfolge der Arzneistoffe, jeweils geordnet nach den Verteilungskoeffizienten $\log P$ und $\log P_{\text{ion}}$, blieb im Prinzip gleich, obwohl die Variationen der Beträge der Ionen-Koeffizienten kleiner wurden. Die einfach positiv geladenen Formen von Verbindungen mit apolaren Ringstrukturen (Thioxanthene, Fendilin) verteilten sich besser in *n*-Octanol als anzunehmen war. Die scheinbaren Verteilungskoeffizienten bei pH 7.4 der Verbindungen mit einem Piperazinring waren größer als der der korrespondierenden N,N-Dimethylaminopropan-Strukturen.
2. Aufgrund des lipophileren Charakters der organischen Phase hatten die ungeladenen Arzneistoffe einen höheren Verteilungskoeffizienten in PGDP als in *n*-Octanol. Unerwartete Ausnahmen stellten die Verbindungen mit einer endständigen aliphatischen Hydroxylgruppen dar. Das Verteilungsverhalten von Ionen konnte im PGDP/Wasser-System schlecht untersucht werden. Die $\log P_{\text{ion}}$ -Werte in PGDP besaßen eine gegenläufige Tendenz zu den $\log P_{\text{ion}}$ -Werten in *n*-Octanol. Mit dem PGDP/Wasser-Verteilungssystem konnten intermolekulare Wechselwirkungsmechanismen durch einen Vergleich zu *n*-Octanol/Wasser gefunden werden, die auf Wasserstoffbrücken-Effekte zurückzuführen waren.
3. Im allgemeinen wurden kleinere Verteilungskoeffizienten $\log P_m$ in liposomalen Phosphatidylcholin-Membranen als im klassischen *n*-Octanol/Wasser System für die betrachteten Arzneistoffe festgestellt. Zum Vergleich mit den *n*-Octanol/Wasser-Koeffizienten mussten strukturverwandte Verbindungen nach der Zahl der basischen Zentren (Alkylamin, Piperazin) unterteilt werden, da die Elektrostatik der Moleküle stärker das Verteilungsverhalten als in den anderen Systemen beeinflusste. In Folge zunehmender Ladungswechselwirkungen mit den

Liposomen-Membranen fielen die Verteilungskoeffizienten der Ionen $\log P_m^{\text{IP}}$ durchschnittlich nur um 1.4 geringer als die $\log P$ -Werte aus. Die Ladungen der Ionen konnten von der zwitterionischen Kopfgruppe der Membranbausteine gut kompensiert werden. Den Effekt von Gegenionen auf die Verteilung der geladenen Moleküle in bzw. an Membranen kennzeichnete der $\log K_{\text{SIP}}$ -Wert. Die scheinbaren Verteilungskoeffizienten bei pH 7.4 wurden von den $\log K_{\text{SIP}}$ -Werten dominiert, so dass beim Membransystem die N,N-Dimethylaminopropan-Strukturen einen höheren Koeffizienten besaßen als die Piperazinring enthaltenden Verbindungen. Insgesamt verminderten elektrostatische und Ladungseffekte in bzw. an Membranen den Einfluss der Gesamtlipophilie von Strukturen (π -Werte) auf die Verteilung von Molekülen.

4. Es existieren allgemeingültige Zusammenhänge zwischen den Verteilungssystemen homogene organische Phase/Wasser und Liposom, wenn man das Verteilungsverhalten von ungeladenen Verbindungen durch Hauptkomponenten analysiert.

5. Es können intermolekulare Wechselwirkungsmöglichkeiten aus Vergleichen mit dem *n*-Octanol/Wasser-System abgeleitet werden:

Im PGDP/Wasser-System existieren

- überwiegend van-der-Waals-Interaktionen innerhalb der organischen Phase;
- schwache polare Wechselwirkungen zwischen dem Piperazinring der Arzneistoffe und der Esterstruktur des Lösungsmittels.

Im Liposom/Wasser-System sind einige Besonderheiten zu erkennen:

- starke ionische Wechselwirkungen mit dem einfach geladenen Piperazinring der Arzneistoffe;
- ausgeprägte lipophile Wechselwirkungen bei Verbindungen mit einem basischen Zentrum.

7.2 Das Verteilungsverhalten an IAM-Oberflächen

Zusammenfassend kann man bei den nicht protonierbaren Substanzen von nahezu reinen intermolekularen van-der-Waals-Interaktionen mit den Fettsäureketten der Phospholipide ausgehen. Ein Einfluss der Ionenkonzentration des Laufmittels auf das Retentionsverhalten war nicht nachweisbar. Elektrostatische und ionische Wechselwirkungen mit den Phosphatidylcholin-Kopfgruppen kommen bei den geladenen Arzneistoffmolekülen hinzu, die die lipophilen Effekte überlagerten. An IAM-Säulen wurden mit Hilfe von unterschiedlich zusammengesetzten Laufmitteln Mechanismen zum Verteilungsverhalten von Verbindungen erkennbar.

Bestimmte der lipophile Charakter von nicht de-/protonierbaren Substanzen die Verteilung zwischen zwei nicht mischbaren Phasen, waren die relativen Beziehungen der Verteilungskoeffizienten auf das chromatografische Verteilungssystemen übertragbar. Hingegen konnten bei den basischen Verbindungen nur teilweise lineare Abhängigkeiten beim Vergleich von $\log D$ - und $\log k'$ -Werten aus potentiometrischen und chromatografischen Messungen gefunden werden, die oft auf strukturhomogene Gruppen beschränkt blieben. Beim Vergleich im Verteilungsverhalten von Verbindungen war eine Unterteilung nach Art und Zahl von Ladungszentren sowie nach den Eigenschaften zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken von Nutzen.

Die Ursachen dafür müssen wahrscheinlich in Unterschieden der Membranfluidität von LUV-Membranen und von IAM-Oberflächen und der geometrischen Anordnung der Phospholipide zueinander gesucht werden. Die Arzneistoffmoleküle sollten mit den flexiblen Phosphatidylcholin-Bausteinen der Liposomenmembran besser in Wechselwirkung treten können. Dabei können sich die Membraneigenschaften ändern, was in der Oberfläche aus kovalent gebundenen Phospholipiden nicht möglich ist.

Außerdem existiert kein Gleichgewichtszustand einer Substanz zwischen den Phasen eines chromatografischen System, was aber eine Bedingung zur Bestimmung von Verteilungskoeffizienten ist.

7.3 NMR-spektroskopische Untersuchungen zu Membran-Interaktionen

Mit Hilfe der ^{19}F - ^1H -NOE-Differenz-Spektroskopie kann die Identifizierung und Lokalisation von intra- und intermolekularen Wechselwirkungen auf submolekularer Ebene möglich werden. In Abhängigkeit von der Größe und vom Aufbau der basischen Seitenketten waren halbquantitativ Unterschiede in der Stärke der Wechselwirkungen zwischen den Fluor enthaltenden Arzneistoffen nachweisbar, die auf die Eintauchtiefe der Ringstrukturen in die Fettsäurekettenregion zurückzuführen sind. Eine Verbesserung der Messempfindlichkeit könnte durch eine Deuterierung der CF_3 -Gruppe benachbarten Positionen und durch den Einsatz von reinem D_2O erhalten werden, um die Relaxation über andere Wege wie quadrupole Relaxation und Spin-Rotation-Relaxation zu vermindern. Mit den durchgeführten NOE-Experimenten lassen sich Rückschlüsse auf ein quantitatives Verteilungsverhalten ($\log D_m$ -Werte) von strukturähnlichen Arzneistoffe in eine Phosphatidylcholin-Membran ziehen.

Im Trifluoracetamid/Erythrocyt/Arzneistoff-System wurden die Effekte der Arzneistoffe auf die Durchlässigkeit kleiner Moleküle durch die RBC-Membran untersucht. In der verwendeten Konzentration von ca. 200 μM erhöhten Triflupromazin, Verapamil und Nicardipin die Permeation von Trifluoracetamid. Trans-Flupenthixol zeigte bei gleicher Konzentration keinen Einfluss auf die Durchlässigkeit. Es behinderte sogar den TFAM-Durchtritt.

Es wurde der Nachweis erbracht, dass vier strukturheterogene Substanzen unterschiedliche Effekte auf den Durchtritt von TFAM durch Membranen besitzen. Eine quantitativer Vergleich der Wirkung der Arzneistoffe wäre erst durch EC_{50} -Werte am Testsystem möglich.

7.4 Vorhersage von Verteilungskoeffizienten in *n*-Octanol/Wasser

Allgemein wiesen große Ordinatenabschnitte und geringe Anstiege der Regressionen mit gemessenen $\log P$ -Werten eine Überbewertung der lipophilen Eigenschaften von Strukturelementen durch die Programme aus. ACD berechnete die $\log P$ -Werte der Phenothiazine und Thioxanthene korrekt, aber für die gesamte Arzneistoffauswahl zeigte ClogP den besten Zusammenhang von Mess- zu Rechenwerten. Alle untersuchten Programme müssen weiterentwickelt werden, um die Vorhersagequalität für $\log P$ -Werte in *n*-Octanol/Wasser-Systemen zu erhöhen.

HINT, insbesondere 3D, konnte die absoluten Beträge der Verteilungskoeffizienten am schlechtesten berechnen. Auffällig waren die extrem kleinen Verteilungskoeffizienten für die 1,4-Dihydropyridine. Auch beinhaltete HINT einen zu großen Parameter für einen Chlorsubstituenten an Position 2 des Phenothiazin-Ring im Vergleich zu einer Trifluoromethylgruppe, was nicht dem nachgewiesenen Verhältnis entsprach (Verbindungen 3 zu 5; 8 zu 9). Der Anteil einer 3,4,5-Trimethoxyphenyl-Gruppe an der Gesamtlipophilie wurde ebenso zu hoch im Vergleich zum 3,4-Dimethoxyphenyl-Ring bestimmt, wie aus den berechneten Verteilungskoeffizienten für Gallopamil und Verapamil hervorging.

7.5 GRID-Wechselwirkungen mit Einzelmolekülen der organischen Phasen

Die Untersuchungen zu günstigen und bevorzugten intermolekularen Wechselwirkungen an den Strukturen der organischen Phasen belegten die Tauglichkeit des Programms GRID, Unterschiede zwischen den Einzelmolekülen der organischen Phasen und Strukturelementen der Arzneistoffe zu erkennen.

Die ausgeprägte Fähigkeit von *n*-Octanol zur Aufnahme von neutralen basischen Arzneistoffen unterstützten die Ergebnisse der Sonde N: Die Protonierung des Stickstoffs (Sonde N1+) führte hingegen zu einer Verstärkung der Interaktion mit der Phosphatgruppe der Phospholipide. Diese ionischen Wechselwirkungen lassen die hohe Verteilung von Ionen in Membranen erklärbarer werden. Eine parallele Anordnung von aliphatischen Ketten der Moleküle der organischen Phasen war für die Zunahme an van-der-Waals-Interaktionen wichtig. Somit stellt sich ein Zusammenhang dar zwischen dem strukturellen Aufbau der organischen Phasen, *n*-Octanol/Wasser-Cluster oder Phospholipid-Bilayer, und deren Vermögen, aromatische oder aliphatische Moleküle aufzunehmen. Die Anwendung von GRID auf die gesamten Phasen von modellierten Verteilungssystemen wäre ein zukünftiger Schritt.

7.6 Beschreibung des Verteilungsverhaltens durch Molekül-Deskriptoren

Der Vorteil des GOLPE-PLS-Verfahrens besteht in der Möglichkeit einer Variablenselektion unter Beibehaltung der Vorhersagekraft der Modelle. Da die PLS-Analyse nicht immun gegenüber Rausch-Variablen ist, die dennoch wichtige Informationen enthalten können, ist die Art der Trennung wichtiger von unwichtigen Parametern entscheidend für die Relevanz der Modelle. Das FFD-Verfahren eignete sich zur Eliminierung von unwichtigen VOLSURF-Deskriptoren. Hilfreich war die BUW-Skalierung der Deskriptorenbeiträge pro Sonde in Bezug zu den jeweiligen Verteilungskoeffizienten.

Eine kurze Übersicht veranschaulicht die wesentlichen Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Modelle zur Interpretation des Verteilungsverhaltens.

- Der Einfluss bestimmter Moleküleigenschaften innerhalb von Arzneistoffgruppen auf das Ergebnis der Variablenselektion wird ersichtlich, wenn die Deskriptoren der Modelle der Neutralformen verglichen werden: Bei den Phenothiazinen und Thioxanthenen war eine Unterteilung in einfache und zweifache Basen zur Erklärung des Verteilungsverhaltens in *n*-Octanol/Wasser und mit Liposomen notwendig. Dabei hatten die *W*- und *D*-Deskriptoren bei den einfachen Basen einen positiven Beitrag. Das Vorzeichen des *D*-Deskriptors drehte sich bei den zweifachen Basen um. Ein generell positiver Einfluss der Lipophilie kennzeichnete das Verteilungsverhalten der 1,4-Dihydropyridine, was ebenso in den Modellen mit allen neutralen Verbindungen der Fall war. Gegensätzliche Vorzeichen besaß der *ID*-Deskriptor in den Modellen des IAM-Systems (\oplus) und in den Modellen des liposomalen Systems (\ominus).
- Die wichtigsten Deskriptoren zur Interpretation des Verteilungsverhaltens sind in Abhängigkeit von den gewählten GRID-Sonden, der Verteilungskoeffizienten (*Y*-Variable) und von der Ladungsform, geordnet nach deren Häufigkeit und Koeffizientenbeträgen:

Verteilungssystem	Sonden	Y-Variable	neutrale Moleküle
<i>n</i> -Octanol/Wasser	1/2	$\log P$	$D > ID > W$
<i>n</i> -Octanol/Wasser	1/2/3	$\log P$	$D > ID > W_{OH}$
<i>n</i> -Octanol/Wasser	1/2/4	$\log P_m$	$D > HB > W_{O::}$
Liposomen/Membran	1/2	$\log P_m$	$D > ID > W$
Liposomen/Membran	1/2/4/5	$\log P_m$	$W_{PO4H} > W = W_{O::} > D > ID$
IAM-Säule	1/2	$\log k'$	$D > ID > W$
IAM-Säule	1/2/4/5	$\log k'$	$D > ID > HB > W_{PO4H} > W = W_{O::}$
Verteilungssystem	Sonden	Y-Variable	einfach geladene Ionen
<i>n</i> -Octanol/Wasser	1/2	$\log P_{ion}$	$W > D$
<i>n</i> -Octanol/Wasser	1/2/4	$\log P_{ion}$	$W_{PO4H} > W_{OH} > D$
Liposomen/Membran	1/2	$\log K_{SIP}$	W
Liposomen/Membran	1/2/4/5	$\log K_{SIP}$	$ID > W_{PO4} > W$
IAM-Säule	1/2	$\log k'$	$ID = W$
IAM-Säule	1/2/4/5	$\log k'$	$ID > HB > D > W = W_{O::} > W_{PO4H}$

Die Carbonylsauerstoff-Sonde (O::) war zur Charakterisierung von Wasserstoffbrücken-Kapazitäten besser geeignet als die Sonde der phenolischen Hydroxylgruppe (OH). Sind von Ladungen abgeleitete VOLSURF-Deskriptoren in den Modellen vorhanden, in denen Ladungsinteraktionen zu berücksichtigen waren, wurden sie als relevante Variable des PLS-Modells extrahiert.

Die meisten Verteilungsprozesse in *n*-Octanol/Wasser, in Liposomen-Membranen und an IAM-Oberflächen, sowohl mit geladenen als auch mit neutralen Verbindungen, können aus dem Verhältnis in den Potentialen der hydrophilen (polaren) und lipophilen Wechselwirkungen und dem Abständen von lipophilen Bereichen vom Molekülschwerpunkt erklärt werden.

8 Zusammenfassung

Unter dem Titel 'Quantitative Analyse von Arzneistoff-Membran-Wechselwirkungen am Beispiel von Neuroleptika und Calcium-Kanal-Blockern' wurde das Verteilungsverhalten sowohl der ungeladenen als auch der geladenen Molekülformen in *n*-Octanol/Wasser, in PGDP/Wasser, mit Liposomen aus Eilecithin und an IAM-Säulen untersucht.

Das *n*-Octanol/Wasser-Verteilungssystem erwies sich zur Bestimmung der lipophilen Eigenschaften von ungeladenen Molekülen im Rahmen dieser Arbeit als das geeignete Testsystem. Die auf Ladungen basierenden Interaktionen zwischen den Arzneistoffen und den organischen Phasen waren an Liposomen-Membranen gut nachweisbar. Die Überlegungen zum PGDP/Wasser-Verteilungssystem, welches das Verteilungsverhalten von Molekülen in biologischen Membranen aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten zwischen einem PGDP- und einem Phosphatidylcholin-Molekül modellieren soll, konnten nicht bestätigt werden. Amphiphile Wechselwirkungen bestimmten die Stärke der Retention von Ionen an IAM-Säulen. Im liposomalen Verteilungssystem hatte die Zahl an Ladungszentren, unabhängig vom Grad der Ionisierung, den größten Einfluss auf den Betrag der Verteilungskoeffizienten mit Membranen.

Mit der heteronuklearen ^{19}F -NMR-Spektroskopie wurde die Lage von ausgewählten Phenothiazinen und Thioxanthenen in der Liposomen-Membran auf atomarer Ebenen durch eindimensionale NOE-Differenz-Spektren zugänglich. Triflupromazin, Verapamil und Nocardipin erhöhten die Permeation von Trifluoracetamid-Molekülen durch Erythrocyten-Membranen, wie in ^{19}F -EXSY-Experimenten nachgewiesen wurde. Für trans-Flupenthixol konnte ich einen solchen Effekt nicht finden.

Die untersuchten Programme zur Berechnung des *n*-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten der Neutralformen eigneten sich nur bedingt zur $\log P$ -Vorhersage. Der durchschnittliche Fehler lag im Bereich der Messgenauigkeit des *shake flask*-Verfahrens zur $\log P$ -Bestimmung.

Der Vergleich der Moleküle der drei organischen Phasen in ihren Wechselwirkungspotentialen mit Strukturelementen der betrachteten Arzneistoffmoleküle bestätigte die beste Eignung der Phosphatidylcholin-Moleküle, mit Kationen in Wechselwirkung zu treten. Die Sonde für neutrale Amine zeigte besonders gute Interaktionen mit der Hydroxylgruppe vom *n*-Octanol-Molekül.

Die durch das GRID-Programm generierten Wechselwirkungspotentiale konnten durch PLS-Analysen mit den Verteilungskoeffizienten in Modellen zur Interpretation der zur Verteilung notwendigen Moleküleigenschaften genutzt werden. Die gezielte Auswahl von modellbestimmenden VOLSURF-Variablen erleichterte die Erklärung, da überwiegend eine Eigenschaft der Arzneistoffmoleküle durch eine latente Variable der PLS-Modelle beschrieben wurde. Die meisten Verteilungsvorgänge, sowohl von neutralen als auch geladenen Molekülen, basierten auf einem Verhältnis von hydrophilen zu lipophilen Wechselwirkungen, auf der Trennung von hydrophilen und lipophilen Bereichen in den Arzneistoffstrukturen vom Massepunkt und auf möglichen Ladungsinteraktionen.

9 Anhang

9.1 Literaturverzeichnis

- Alcorn, C.J.; Simpson, R.J.; Leahy, D.E.; Peters, T.J.** Partition and distribution coefficients of solutes and drugs in brush border membrane vesicles. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *45*, 1775-1782
- Attwood, D.; Waigh, R.; Blundell, R.; Bloor, D.; Thévand, A.; Boitard, E.; Dubès, J.-P.; Tachoire, H.** ^1H and ^{13}C NMR studies of the self-association of chlorpromazine hydrochloride in aqueous solution. *Magn. Reson. Chem.* **1994**, *32*, 468-472
- Austin, R.P.; Davis A.M.; Manners, C.N.** Partitioning of ionizing molecules between aqueous buffers and phospholipid vesicles. *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 1180-1183 20
- Avdeef, A.; Bucher, J.J.** Accurate measurement of the concentration of hydrogen ions with a glass electrode: Calibration using the prideaux and other universal buffer solutions and a computer-controlled automatic titrator. *Anal. Chem.* **1978**, *50*, 2137-2142
- Avdeef, A.** pH-Metric logP. 1. Difference plot for determining ion-pair octanol-water partition coefficients of multiprotic substances. *Quant. Struct.-Act. Relat.* **1992**, *11*, 510-517
- Avdeef, A.** pH-Metric logP. 2. Refinement of partition coefficients and ionization constants of multiprotic substances. *J. Pharm. Sci.* **1993**, *82*, 183-190
- Avdeef, A.; Comer, J.E.A.; Thomson, S.J.** pH-Metric logP. 3. Glass electrode calibration in methanol-water, applied to $\text{p}K_a$ determination of water-insoluble substances. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 42-49
- Avdeef, A.; Box, K.J.; Takács-Novák, K.** pH-Metric logP. 6. Effects of sodium, potassium and N- CH_3 -D-glucamine on the octanol-water partitioning of prostaglandins E1 and E2. *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 523-529
- Avdeef, A.; Barrett, D.A.; Shaw, P.N.; Knaggs, R.D.; Davis, S.S.** pH-Metric logP. 7. Octanol-, chloroform- and propylene glycol dipelargonate partitioning of morphine-6-glucuronide and other related opiates. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4377-4381
- Avdeef, A.** pH-Metric logP. 8. Assessment of distribution-pH profiles. In: *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, Pliska, V., Testa, B., Waterbeemd, H.v.d., Eds. In: *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*, Vol. 4; Mannhold, R.; Kubinyi, H.; Timmermann, H., Eds.; VCH Publishers: Weinheim, **1996**, 109-139
- Avdeef, A.; Box, K.J.; Comer, J.E.A.; Hibbert, C.; Tam, K.Y.** pH-Metric logP. 10. Determination of vesicle membrane-water partition coefficients of ionisable drugs. *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 208-214
- Bäuerle, H.D.; Seelig, J.** Interaction of charged and uncharged calcium channel antagonists with phospholipid membranes. Binding equilibrium, binding enthalpy, and membrane location. *Biochemistry* **1991**, *30*, 7203-7211
- Barbato, F.; La Rotonda, M.I.; Quaglia, F.** Chromatographic indices determined on an immobilized artificial membrane (IAM) column as descriptors of lipophilic and polar interactions of 4-phenyldihydropyridine calcium-channel blockers with biomembranes. *Eur. J. Med. Chem.* **1996**, *31*, 311-318 24

- Barbato, F.; La Rotonda, M.I.; Quaglia, F.** Interactions of nonsteroidal antiinflammatory drugs with phospholipids: comparison between octanol/buffer partition coefficients and chromatographic indexes on immobilized artificial membranes.
J. Pharm. Sci. **1997**, *86*, 225-229
- Barton, P.; Davis, A.M.; McCarthy, D.J.; Webborn, P.J.H.** Drug-phospholipid interactions. 2. Predicting the sites of drug distribution using *n*-octanol/water and membrane/water distribution coefficients. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 1034-1039 15
- Bellon, S.F.; Chen, D.; Johnston, E.R.** Quantitative 1D exchange spectroscopy.
J. Magn. Reson. **1987**, *73*, 168-173
- Blokzijl, W.; Engberts, J.B.F.N.** Hydrophobe Effekte - Ansichten und Tatsachen.
Angew. Chemie **1993**, *105*, 1610-1648
- Box, K.J.**, private Korrespondenz, Mai **1998**
- Braun, S.; Kalinowski, H.-O., Berger, S.** In: *100 and more basic NMR experiments*. VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim, **1996**, 87-92
- Bulliman, B.; Kuchel, P.W.; Chapman, B.E.** 'Overdetermined' one-dimensional NMR exchange analysis: a 1D counterpart of the 2D EXSY experiment.
J. Magn. Reson. **1989**, *82*, 131-138
- Caldwell, G.W.; Masucci, J.A.; Eangelisto, M.; White, R.** Evaluation of the immobilized artificial membrane phosphatidylcholine drug discovery column for high-performance liquid chromatographic screening of drug-membrane interactions.
J. Chromatography A, **1998**, *800*, 161-169
- Chlorprothixen**, In: *Pharmazeutische Stoffliste*, Vol. C-Ch; ABDATA Pharma-Daten-Service, Ed.; Werbe- und Vertriebsgesellschaft Deutscher Apotheker mbH: Eschborn/Tns., **1995**, 482 4
- Clarke, F.C.; Cahoon, N.M.** Ionization constants by curve fitting: determination of partition and distribution coefficients of acids and bases and their ions. 16
J. Pharm. Sci. **1987**, *76*, 611-620
- ClogP** for Windows™; Version 2.0.0b; Reference Manual, BioByte Corp., **1995-1997** 27
- Cloos, B.** In: *HPLC Untersuchungen zum Verteilungsverhalten von Arzneistoffen unter Berücksichtigung von Arzneistoff-Membran-Wechselwirkungen*. Diplomarbeit, Universität Halle-Wittenberg, FB Pharmazie, **1998**
- Collander, R.** The partition of organic compounds between higher alcohols and water.
Acta Chem. Scand. **1951**, *3*, 774-780
- Craig, P.N.** Drug Compendium. In: *Comprehensive Medicinal Chemistry*, Vol. 6; Hansch, C.; Sammes, P.G.; Taylor, J.B., Eds.; Pergamon Press: Oxford, **1990**, 237-991 1
- Cramer III, R.D.; DePriest, S.A.; Patterson, D.E.; Hecht, P.** The developing practice of comparative molecular field analysis. In: *3D-QSAR in Drug Design - Theory, Methods and Applications*. Kubinyi, H., Ed.; ESCOM: Leiden, **1993**, 443-485
- Cruciani, G.; Clementi, S. u. Baroni, M.** Variable selection in PLS analysis. In: *3D-QSAR in Drug Design - Theory, Methods and Applications*. Kubinyi, H., Ed.; ESCOM: Leiden, **1993**, 551-564

- Cruciani, G.; Clementi, S.; Pastor, M.** GOLPE - guided region selection. In: *3D-QSAR in Drug Design, Volume 3 - recent advances*; Kubinyi, H.; Folkers, G.; Martin, Y.C., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, **1998**, 71-86
- Cruciani, G.; Crivori, P.; Carrupt, P.-A.; Testa, B.** Molecular fields in quantitative structure-permeation relationship: the VolSurf approach. *Teochem.* accepted, in press (**a**)
- Cruciani, G.; Pastor, M.; Guba, W.** VolSurf, a new image processing method for 3D grid map and QSAR studies. *J. Med. Chem.* work in preparation (**b**)
- Dey, S.; Ramachandra, M.; Pastan, I.; Gottesman, M.M.; Ambudkar, S.** Evidence for two nonidentical drug-interaction sites in the human P-glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 10594-10599
- Diamond, J.M.; Katz, Y.** Interpretation of nonelectrolyte partition coefficients between dimyristoyl lecithin and water. *J. Membrane Biol.* **1974**, *17*, 121-154
- Diez, I.; Colom, H.; Moreno, J.; Obach, R.; Peraire, C.; Domenech, J.** A comparative study of transdermal absorption of a series of calcium channel antagonists. *J. Pharm. Sci.* **1991**, *80*, 931-934 25
- Döppenschmidt, S.; Langguth, P.; Regardh, C.G.; Andersson, T.B.; Hilgendorf, C.; Spahn-Langguth, H.** Characterisation on binding properties to human P-glycoprotein: development of a [3H]-verapamil radioligand-binding assay. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *288*, 348-357
- El Tayer, N.; Kilpatrick, G.J.; van de Waterbeemd, H.; Testa, B.; Jenner, P.; Marsden, C.D.** Interaction of neuroleptic drugs with rat striatal D-1 and D-2 dopamine receptors: a quantitative structure-affinity relationship study. *Eur. J. Med. Chem.* **1988**, *23*, 173-182 8
- Ellena, J.F.; Hutton, W.C.; Cafiso, D.S.** Elucidation of cross-relaxation pathway in phospholipid vesicles utilizing two-dimensional ¹H NMR spectroscopy. *J. Am. Soc.* **1985**, *107*, 1530-1537
- Elnaw, M.H.** In: *IAM-HPLC Untersuchungen zu Arzneistoff-Membran-Wechselwirkungen und deren Beeinflussung durch unterschiedliche Ionen*. Diplomarbeit, Universität Halle-Wittenberg, FB Pharmazie, **1997**
- Fabry, M.E.; San George, R.C.** Effect of magnetic susceptibility on nuclear magnetic resonance signals arising from red cells: a warning. *Biochemistry* **1983**, *22*, 4119-4125
- Fleischer, R.** In: *Computergestützte Analyse von Piritrexim und Analoga. 3D-QSAR, Molecular Modeling und strukturbasiertes Wirkstoffdesign*. Dissertation, Universität Halle-Wittenberg, **1999**
- Ford, J.M.; Prozialeck, W.C.; Hait, W.N.** Structural features determining activity of phenothiazines and related drugs for inhibition of cell growth and reversal of multidrug resistance. *Mol. Pharmacol.* **1989**, *35*, 105-115
- Ford, J.M.; Bruggeman, E.P.; Pastan, I.; Gottesmann, M.; Hait, W.N.** Cellular and biochemical characterisation of thioxanthenes for reversal of multidrug resistance in human and murine cell lines. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 1748-1756
- Franke, U.** In: *Molecular-Modeling-Untersuchungen von β -Cyclodextrin-Methadon-Komplexen zur Erklärung der Razemattrennung*. Diplomarbeit, Universität Halle-Wittenberg, FB Pharmazie, **1996**

- Franke, U.; Munk, A.; Wiese, M.** Ionization constants and distribution coefficients of phenothiazines and calcium channel antagonists determined by a pH-metric method and correlation with calculated partition coefficients. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 89-95
- Franks, N.P.; Abraham, M.H.; Lieb, W.R.** Molecular organisation of liquid n-octanol: an X-ray diffraction analysis. *J. Pharm. Sci.* **1993**, *82*, 466-470
- Frenzel, J.; Arnold, K.; Nuhn, P.** Calorimetric, ¹³C NMR, and ³¹P NMR studies on the interaction of some phenothiazines derivatives with dipalmitoyl phosphatidylcholine model membranes. *Biochem. Biophys. Acta* **1978**, *507*, 185-197
- Fribolin, H.** In: *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*. VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim, **1988**, 229-239
- Frisk-Holmberg, M.; v.d. Kleijn, E.** The Relationship between the lipophilic nature of tricyclic neuroleptics and antidepressants, and histamine release. *Eur. J. Pharmacol.* **1972**, *18*, 139-147
- Fruttero, R.; Caron, G.; Fornatto, E.; Boschi, D.; Ermondi, G.; Gasco, A.; Carrupt, P.-A.; Testa, B.** Mechanisms of liposome/water partitioning of (p-methylbenzyl)-alkylamines. *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 1407-1413
- Gaggelli, E.; Di Perri, T.; Orrico, A.; Capecchi, P.L.; Laghi Pasini, F.; Valensin, G.** Selective ¹H-NMR relaxation investigations of membrane-bound drugs in vitro. 3. Calcium-entry blockers and adenosine. *Biophys. Chem.* **1990**, *36*, 209-213
- Gerig, J.T.; Luk, K.F.S.; Roe, D.C.** Selective fluorine-proton nuclear overhauser effects in 4-trifluoromethylbenzenesulfonyl- α -chymotrypsin. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 7698-7704
- Glasser, H.; Krieglstein, J.** Die Eiweissbindung einiger Psychopharmaka mit tricyclischem Ringsystem in Abhaengigkeit von ihrer chemische Konstitution. *Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol.* **1970**, *265*, 321-334
- Goodford, P.J.** A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 849-857
- Green, A.L.** Ionization constants and water solubilities of some aminoalkylpheno-thiazine tranquilizers and related compounds. *J. Pharm. Pharmacol.* **1967**, *19*, 10-16
- Guba, W.; Cruciani, G.** Molecular field-derived descriptors for the multivariate modeling of pharmacokinetic data. QSAR conference. Copenhagen, **1998**
- Hammond, S.J.** Two-dimensional ¹⁹F(¹H) overhauser effects in proteins. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, 712-713
- Hansch, C.A.; Dunn, W.J.** Linear relationship between lipophilic character and biological activity of drugs. *J. Pharm. Sci.* **1972**, *61*, 1-19
- Hansch, C.; Leo, A.J.** In: *Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology*, J.Wiley & Sons: New York, **1979**
- Herbette, L.G.; Trumbore, M.; Chester, D.W.; Katz, A.M.** Possible molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of three membrane-active drugs: propranolol, nimodipine and amiodarone. *J. Mol. Cell Cardiol.* **1988**, *20*, 373-378
- Herbette, L.G.; Rhodes, D.G.; Mason, R.P.** New approach to drug design and delivery based on drug-membrane interaction. *Drug Design Delivery* **1991**, *7*, 75-118

- Herbette, L.G.; Vecchiarelli, M.; Leonardi, A.** Lercanidipine: short plasma half-life, long duration of action. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1997**, *29*, 19-24 26
- Holte, L.L.; Gawrisch, K.** Determining ethanol distribution in phospholipid multilayers with MAS-NOESY spectra. *Biochemistry* **1997**, *36*, 4669-4674
- Huber, E.W.; Kane, J.M.; Dalton, C.R.** ^1H -(^{19}F) NOE difference spectroscopy as a tool for structural assignment of positional isomers in fluorine-substituted analogues of FPL 64176. *J. Fluorine Chem.* **1997**, *82*, 47-50
- Jones, B.G.; Branch, S.K.; Threadgill, M.D.; Wilman D.E.V.** Unexpected formation of a 5-trifluoromethyloxazole from a 1,2-dibenzamidoalkene. *J. Fluorine Chem.* **1995**, *74*, 221-222
- Kaliszan, R.; Kaliszan, A.; Wainer, I.W.** Deactivated hydrocarbonaceous silica and immobilized artificial membrane stationary phases in high-performance liquid chromatographic determination of hydrophobicities of organic bases: relationship to logP and CLOGP. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1993**, *11*, 505-511
- Kaliszan, R.; Nasal, A.; Bucinski, A.** Chromatographic hydrophobicity parameter determined on an immobilized artificial membrane column; relationships to standard measures of hydrophobicity and bioactivity. *Eur. J. Med. Chem.* **1994**, *29*, 163-170
- Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K.** Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1007-1010
- Katz, Y.; Diamond, J.M.** A method for measuring nonelectrolyte partition coefficients between liposomes and water. *J. Membrane Biol.* **1974 a**, *17*, 69-86
- Katz, Y.; Diamond, J.M.** Nonsolvent water in liposomes. *J. Membrane Biol.* **1974 b**, *17*, 87-100
- Katz, Y.; Diamond, J.M.** Thermodynamic constants for nonelectrolyte partition between dimyristoyl lecithin and water. *J. Membrane Biol.* **1974 c**, *17*, 101-120
- Kellog, G.E.; Semus, S.F.; Abraham, D.J.** HINT: A new method of empirical hydrophobic field calculation for CoMFA. *J. Computer Aided Mol. Design* **1991**, *5*, 545-552
- Kirk, K.L.; Kuchel, P.W.** NMR methods for measuring membrane transport rates (review). *NMR Biomed.* **1990**, *3*, 102-119
- Kitamura, K.; Kishino, T.; Hozumi, K.** Interaction of chlorpromazine with lecithin vesicles detected by the use of carbon-13 nuclear magnetic resonance. *Chem. Pharm. Bull.* **1979**, *27*, 1264-1267
- Kou, J.H.; Roy, S.D.; Du, J.; Fujiki, J.** Effect of receiver fluid pH on in vitro skin flux of weakly ionizable drugs. *Pharm. Research.* **1993**, *10*, 986-990 13
- Krämer, S.D.; Gautier, J.-C.; Saudemon, P.** Considerations on the potentiometric logP determination. *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 1310-1313
- Krieglstein, J.; Meiler, W.; Staab, J.** Hydrophobic and ionic interactions of phenothiazine derivatives with bovine serum albumin. *Biochem. Pharmacol.* **1972**, *21*, 985-997 21
- Kubinyi, H.** In: *3D-QSAR in Drug Design - Theory, Methods and Applications*. ESCOM: Leiden, **1993**

- Kubinyi, H.; Abraham, U.** Practical problems in PLS analysis. In: *3D-QSAR in Drug Design - Theory, Methods and Applications*. Kubinyi, H., Ed.; ESCOM: Leiden, **1993**, 717-728
- Kunz, R.W.** In: *Molecular Modelling für Anwender*. B.G. Teubner: Stuttgart, **1997**
- Kuroda, Y.; Kitamura, K.** Intra- and intermolecular ^1H - ^1H nuclear overhauser effect studies on the interaction of chlorpromazine with lecithin vesicles. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1-6
- Leahy, D.E.; Tayler, P.J.; Wait, A.R.** Model solvent systems for QSAR part I. Propylene glycol dipelargonate (PGDP). A new standard solvent for use in partition coefficient determination. *Quant. Struct.-Act. Relat.* **1989**, *8*, 17-31
- Leahy, D.E.; Morris, J.J.; Taylor, P.J.; Wait, A.R.** In: *QSAR: Rational Approaches to the Design of Bioactive Compounds*; Silipo, C.; Vittoria, A., Eds. Elsevier: Amsterdam, **1991**, 75-82
- Lehmann, J.** Nicardipin. In: *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, Vol. 8; 12
Bruchhausen, F.v., Ebel, S., Frahm, A.W., Hackenthal, E., Eds.; Springer-Verlag:
Berlin, **1993**, 1141
- Leo, A.L.** Methods of calculating partition coefficients. In: *Comprehensive Medicinal Chemistry*, Vol. 4; Hansch, C., Sammes, P.G., Taylor, J.B., Eds.; Pergamon Press: Oxford, **1990**; 295-319
- Leo, A.L.** Calculating logP oct from structures. *Chemical Reviews*, **1993**, *93*, 1281-1309
- Leo, A.L.**, private Korrespondenz, März **1999**
- Limberg, J.** In: *Wechselwirkungen von Arzneistoffen mit Phosphatidylcholin-Vesikeln*
Dissertation, Universität Münster, **1987**
- Macura, S.; Ernst, R.R.** Elucidation of cross relaxation in liquids by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **1980**, *41*, 95-117
- Mannhold, R.; Dross, K.P.; Rekker, R.F.** Drug lipophilicity in QSAR practice: I. A 2
comparison of experimental with calculative approaches.
Quant. Struct.-Act. Relat. **1990**, *9*, 21-28
- Mannhold, R.; Cruciani, G.; Weber, H.; Lemoine, H.; Derix, A.; Weichel, C.; Clementi, M.** 6-varied bezopyrans as potassium channel activators: synthesis, vasodilator properties and multivariate analysis. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 981-997
- Markovich, R.J.; Stevens, J.M.; Pidgeon, C.** Fourier transform infrared assay of membrane lipids immobilized to silica: leaching and stability of immobilized artificial membrane-bonded phases. *Anal. Biochem.* **1989**, *182*, 237-244
- Mason, R.P.; Campbell, S.F.; Wang, S.-D.; Herbette, L.G.** Comparison of location and 11
binding for the positively charged 1,4-dihydropyridine calcium channel antagonist amlodipine with uncharged drugs of this class in cardiac membranes.
Mol. Pharmacol. **1989**, *86*, 634-640
- Miyake, K.; Terada, H.** Preparation of a column with octanol-like properties for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **1978**, *157*, 386-390
- Miyoshi, T.; Sukimoto, K.; Otagiri, M.** Investigation of the interaction mode of pheno- 17
thiazine neuroleptics with α_1 -acid glycoprotein.
J. Pharm. Pharmacol. **1992**, *44*, 28-33

- Murthy, K.S.; Zogafi, G.** Oil-Water partitioning of chlorpromazine and other phenothiazine derivatives using dodecane and *n*-octanol. *J. Pharm. Sci.* **1970**, *59*, 1281-1285 7
- Nernst, W.** Verteilung eines Stoffes zwischen zwei Lösungsmitteln und zwischen Lösungsmittel und Dampfraum. *Z. Phys. Chem.* **1891**, *8*, 110-139
- Neuhaus, D.; Williamson, M.** In: *The NOE in structural and conformational analysis*. VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim, **1989**
- New, R.R.C.** In: *Liposomes - a practical approach*. IRL Press: Oxford, **1990**
- Noggle, J.H. Schirmer, R.E.** In: *The nuclear overhauser effect, chemical applications*. Academic Press: London, **1971**
- Nuhn, P.** In: *Naturstoffchemie*. S. Hirzel Verlag: Stuttgart, **1997**, 358-361
- Odia, K.; Wiese M.** Moleküldynamik-Simulation von hydratisierten Phospholipidbilayern. Sonderforschungsbereich 197, Arbeitstagung. Jena, **1999**
- Ong, S.; Liu, H; Qiu, X.; Bhat, G.; Pidgeon, C.** Membrane partition coefficients chromatographically measured using immobilized artificial membrane surface. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 755-762
- Ong, S.; Liu, H; Pidgeon, C.** Immobilized-artificial-membrane chromatography: measurements of membrane partition coefficient and predicting drug membrane permeability. *J. Chromatogr. A* **1996**, *728*, 113-128
- Op den Kamp, J.A.F.** Lipid asymmetry in membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **1979**, *48*, 47-71
- Ottiger, C.; Wunderli-Allenspach, H.** Partition behaviour of acids and bases in a phosphatidylcholine liposome-buffer equilibrium dialysis system. *Eur. J. Pharm. Sci.* **1997**, *5*, 223-231
- Pajeva, I.K.; Wiese, M.; Cordes, H.-P.; Seydel, J.K.** Membrane interactions of some catamphiphilic drugs and relation to their multidrug-resistance-reversing ability. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1996**, *40*, 122-127
- Pajeva, I.; Wiese, M.** Molecular modeling of phenothiazines and related drugs as multidrug resistance modifiers: a comparative molecular field analysis study. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1815-1826
- Pauletti, G.M.; Wunderli-Allenspach, H.** Partition coefficients in vitro: artificial membranes as a standardized distribution model. *Eur. J. Pharm. Sci.* **1994**, *1*, 273-282
- Pidgeon, C.; Venkataram, U.V.** Immobilized artificial membrane chromatography: supports composed of membrane lipids. *Anal. Biochem.* **1989**, *176*, 36-47
- Pidgeon, C.; Marcus, C.; Alvarez, F.** Immobilized artificial membrane chromatography: surface chemistry and application. In: *Application of enzyme biotechnology*. Kelly, J.W.; Baldwin, T.O., Eds.; Plenum Press: New York, **1991**, 201-217
- Potts, J.R.; Hounslow, A.M.; Kuchel, P.W.** Exchange of fluorinated glucose across the red-cell membrane measured by ¹⁹F-n.m.r. magnetisation transfer. *Biochem. J.* **1990**, *266*, 925-928
- Potts, J.R.; Kuchel, P.W.** Anomeric preference of fluoroglucose exchange across human red-cell membranes. *Biochem. J.* **1992**, *281*, 753-759

- Procain**, In: *Pharmazeutische Stoffliste*, Vol. Pl-Pz; ABDATA Pharma-Daten-Service, Ed.; Werbe- und Vertriebsgesellschaft Deutscher Apotheker mbH: Eschborn/Tns., **1995**, 179-180
- Qiu, X.; Pidgeon, C.** A ^{31}P NMR study of immobilized artificial membrane surfaces: structure and dynamics of immobilized phospholipids. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 12399-12407
- Rojratanakiat, W.; Hansch, C.** The relative dependence of calcium antagonists and neuroleptics binding to brain and heart receptors on drug lipophilicity. *J. Pharm. Pharmacol.* **1990**, *42*, 599-600
- Roth, H.J.; Eger, K.; Troschütz, R.** In: *Arzneistoffanalyse*; Roth, H.J., Eger, K., Troschütz, R., Eds.; Thieme Verlag: Stuttgart, **1990**, 737
- Savitz, D.; Sidel, V.W.; Solomon, A.K.** Osmotic properties of human red cells. *J. Gen. Physiol.* **1964**, *48*, 79-94
- Scherrer, R.A.** The treatment of ionizable compounds in quantitative structure-activity studies with special consideration to ion partitioning. In: *Pesticide synthesis through rational approaches*, Magee, P.S.; Kohn, G.K.; Menn, J.J. Eds.; ACS Symposium Series 255; American Chemical Society: Washington DC, **1984**, 225-246
- Scherrer, R.A.; Crooks, S.L.** Titration in water-saturated octanol: a guide to partition coefficients of ion pairs and receptor-site interactions. *QSAR in Drug Design.* **1989**, 59-62
- Schleinitz, H.** Verapamilhydrochlorid. In: *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, Vol. 9; Bruchhausen, F.v., Dannhardt, G., Ebel, S., Frahm, A.W., Hackenthal, E., Holzgrabe, U., Eds.; Springer-Verlag: Berlin, **1993**, 1167
- Schubert, R.** Comparison of octanol/buffer and liposome/buffer partition coefficients as model for the in vivo behavior of drugs. *Proceedings of MoBBEL* **1994**, *8*, 11-20
- Seydel, J.K.; Schaper K.J.** In: *Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen*. VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim, **1979**
- Seydel, J.K.; Cordes, H.P.; Wiese, M.; Chi, H.; Croes, N.; Hanpft, R.; Lüllmann, H.; Mohr, K.; Patten, M.; Padberg, Y.; Lüllmann-Rauch, R.; Vellguth, S.; Meindl, W.R.; Schönenberger, H.** QSAR and multivariate data analysis of amphiphilic benzylamines and their interaction with various phospholipids determined by different methods. *Quant. Struct.-Act. Relat.* **1989**, *8*, 266-278
- Seydel, J.K.; Velasco, M.A.; Coats, E.A.; Cordes, H.P.; Kunz, B.; Wiese, M.** The importance of drug-membrane interaction in drug research and development. *Quant. Struct.-Act. Relat.* **1992**, *11*, 205-210
- Seydel, J.K.; Coats, E.A.; Cordes, H.P.; Wiese, M.** Drug membrane interaction and the importance for drug transport, distribution, accumulation, efficacy and resistance. *Arch. Pharm.* **1994**, *327*, 601-610
- Sha'afi, R.I.; Rich, G.T.; Sidel, V.W.; Bossert, W.; Solomon, A.K.** The effect of the unstirred layer on human red cell water permeability. *J. Gen. Physiol.* **1967**, *50*, 1377-1399
- Shedlovsky, T.** The behavior of carboxylic acids in mixed solvents. In: *Electrolytes*, Pesce, B., Ed.; Pergamon Press: New York, **1962**; 146-151

Sirius Analytical Instruments Ltd., In: *Application and Theory Guide to pH-Metric pKa and log P Determination*, Rev. 1.0; Forrest Row, **1994**

Sirius Analytical Instruments Ltd. In: *STAN*, Vol. 1(6); Forrest Row, **1994**; 90-92

Sirius Analytical Instruments Ltd. In: *STAN*, Vol. 2(9); Forrest Row, **1995 a**; 142

Sirius Analytical Instruments Ltd. In: *STAN*, Vol. 2(9); Forrest Row, **1995 b**; 172-174

Sirius Analytical Instruments Ltd. In: *STAN*, Vol. 2(9); Forrest Row, **1995 c**; 175-177

Sirius Analytical Instruments Ltd. In: *STAN*, Vol. 2(9); Forrest Row, **1995 d**; 178-178a

Sirius Analytical Instruments Ltd. In: *Application manual for working with liposomes*, internal communication, Forrest Row, **1996**

Slater, B.; McCormack, A.; Avdeef, A.; Comer, J.E.A. pH-Metric logP. 4. Comparison of partition coefficients determined by shake-flask, HPLC and potentiometric methods. *J. Pharm. Sci.* **1993**, *83*, 1280-1283

Smith, R.N.; Hansch, C.A.; Ames, M.M. Selection of a reference partitioning system for design work. *J. Pharm. Sci.* **1975**, *64*, 599-606

Sommer, K. In: *Der Mensch*. Verlag Volk und Wissen: Berlin, **1983**, 154-159

Stevens, J.M.; Markovich, R.J.; Pidgeon, C. Charakterisation of immobilized artificial membrane HPLC columns using deoxynucleotides as model compounds. *Biochromatography* **1989**, *4*, 192-205

Takács-Novák, K.; Avdeef, A.; Box, K.J.; Podyani, B.; Szasz, G. pH-Metric logP. 5. Determination of protonation macro- and micro-constants and octanol/water partition coefficient of the anti-inflammatory drug niflumic acid. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1994**, *12*, 1369-1377

Takács-Novák, K.; Avdeef, A. pH-Metric logP. 9. Interlaboratory study of logP determination by shake-flask and potentiometric methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1996**, *14*, 1405-1413

Thews, G.; Mutschler, E.; Vaupel, P. In: *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, **1999**, 109-142

Toffoli, G.; Simone, F.; Corona, G.; Raschack, M.; Cappelletto, B.; Gigante, M.; Boiocchi, M. Structure-activity relationship of verapamil analoges and reversal of multidrug resistance. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *50*, 1245-1255

Van de Waterbeemd, H.; Kansy, M. Hydrogen-bonding capacity and brain penetration. *Chimia* **1992**, *46*, 299-303

Wade, R.C.; Clark, K.J.; Goodford, P.J. Further development of hydrogen bond functions for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. 1. Ligand probe groups with the ability to form two hydrogen bonds. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 140-147

Wade, R.C.; Goodford, P.J. Further development of hydrogen bond functions for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. 2. Ligand probe groups with the ability to form more than two hydrogen bonds. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 148-156

- Winiwarter, S.; Bonham, N.M.; Ax, F.; Hallberg, A.; Lennernas, H.; Karlen, A.** 10
Correlation of human jejunal permeability (in vivo) of drugs with experimentally and
theoretically derived parameters. A multivariate data analysis approach.
J. Med. Chem. **1998**, *41*, 4939-4949
- Wold, S.; Johansson, E.; Cocchi, M.** PLS - partial least-squares projections to latent
structures. In: *3D-QSAR in Drug Design - Theory, Methods and Applications*. Kubinyi, H.:
Ed.; ESCOM: Leiden, **1993**, 523-564
- Xu A.S.-L.; Potts, J.R.; Kuchel, P.W.** The phenomenon of separate intra- and extracellular
resonances of difluorophosphate in ^{31}P and ^{19}F NMR spectra of erythrocytes.
Magn. Res. Medicine **1991**, *18*, 193-198
- Xu, A.S.L.; Kuchel, P.W.** Charakterisation of erythrocyte transport exchange of
trifluoroacetate using ^{19}F NMR: evidence for transport via monocarboxylate transporter.
Biochim. Biophys. Acta **1993**, *1150*, 35-44
- Xu A.S.-L.; Waldeck, A.R.; Kuchel, P.W.** Transmembrane ^{19}F NMR chemical shift
difference of fluorinated solutes in liposomes, erythrocytes and erythrocytes ghosts.
NMR Biomedicine **1993**, *6*, 136-143
- Xu, A.S.L.; Chu, C.K.; London, R.E.** ^{19}F NMR study of the uptake of 2-fluoro-5-methyl- β -
L-arabinofuranosyluracil in erythrocytes. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 1611-1619
- Yasuda, M.** Dissociation constants of some carboxylic acids in mixed aqueous solvents. *Bull.*
Chem. Soc. Jpn. **1959**, *32*, 429-432
- Zachowski, A.; Durand, P.** Biphasic nature of the binding of cationic amphipaths with
artificial and biological membranes. *Biochem. Biophys. Acta* **1988**, *937*, 411-416
- Zamora, J.M.; Pearce, H.L.; Beck, W.T.** Physical-chemical properties shared by compounds 19
that modulate multidrug resistance in human leukemic cells.
Mol. Pharmacol. **1988**, *33*, 454-462

Die Zahlen in der rechten Spalte verweisen auf Referenzwerte in den Tabellen 2 bis 4, 12 und 24.

9.2 Verwendete Programme

ACD/logP 1.0 Demo-Version	Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada; 1995
ACD/HNMR 2.51	Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada; 1994-1997
BORWIN 1.21.60	JMBS Developments, Grenoble, France; 1993-1995
Cambridge Crystallographic Database 2.3.7	Cambridge Crystallographic Data Center, Cambridge, UK; 1994-1998
ClogP 2.0.0b	BioByte Corp., Claremont, CA, USA; 1995-1997
GOLPE 4.5.1	Multivariate Infometric Analysis, Perugia, Italia; 1996-1999
GRID 16 - 17	Molecular Discovery Ltd., Oxford, UK; 1997-1999
HINT 2.20S	eduSoft LC, Ashland, VA, USA; 1996-1997
MATHCAD 6.0 - 8.0	MathSoft Inc., Cambridge, MA, USA; 1986-1998
MOPAC 6.0	Quantum Chemistry Program Exchange, Department of Chemistry, Indiana University, Bloomington, Indiana, USA; 1996-1997
ORIGIN 5.0	Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA; 1991-1997
pKaLOGP 4.05c	Sirius Analytical Instruments Ltd., Forrest Row, UK; 1989-1996
STATISTICA 5.0	StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA; 1984-1998
SYBYL 6.3 - 6.5	Tripos Inc., St. Louis, Missouri, USA; 1996-1999
VOLSURF 1.2.3	Multivariate Infometric Analysis, Perugia, Italia; 1998
XWIN-NMR	Bruker Analytik GmbH, Rheinstetten; 1997

9.3 Ergänzende Übersichten

9.3.1 Übersicht zu den Arzneistoffe und wichtige Chemikalien

Tabelle A1: Übersicht zu den Arzneistoffen und wichtigen Chemikalien

INN / IUPAC	Hersteller / Quelle
2-Acetylphenothiazin <i>2-Acetylphenothiazin</i>	Aldrich GmbH
Amlodipin - Besylat <i>3-Ethyl-5-methyl-(RS)-2-[(2-aminoethanoxy)methyl]-4-(2-chlorphenyl)-1,4-dihydro-6-methyl--3,5-pyridindicarboxylat-benzolsulfonat</i>	Pfizer GmbH, Karlsruhe
2-Chlorphenothiazin <i>2-Chlorphenothiazin</i>	Aldrich GmbH
Chlorpromazin - HCl <i>2-Chlor-10-(3-dimethylaminopropyl)-phenothiazin-hydrochlorid</i>	Sigma GmbH
Chlorprothixen <i>2-Chlor-N,N-dimethyl-9-thioxanthenyliden-propylamin</i>	Promonta Lundbeck, Hamburg
Dioleoylphosphatidylcholin <i>(1,2-Dioctadec-9-enoyl-sn-glycerol-3)-2-trimethylammonioethyl-phosphat</i>	Sigma GmbH
Felodipin <i>(RS)-Ethyl-4-(2,3-dichlorphenyl)-1,4-dihydro-5-methoxycarbonyl-2,6-dimethyl-3-pyridincarboxylat</i>	Astra Hässle AB, Schweden
Fendilin - HCl <i>(RS)-N-(3,3-Diphenylpropyl)-N-(1-phenylethyl)-amin-hydrochlorid</i>	Sigma GmbH
cis-Flupenthixol - 2 HCl <i>(Z)-4-[3-(2-Trifluormethyl-9-thioxanthenyliden)propyl]-1-piperazinethanol-dihydrochlorid</i>	Lundbeck AG, Dänemark
trans-Flupenthixol - 2 HCl <i>(E)-4-[3-(2-Trifluormethyl-9-thioxanthenyliden)propyl]-1-piperazinethanol-dihydrochlorid</i>	Lundbeck AG, Dänemark
Fluphenazin - 2 HCl <i>4-[3-(2-Trifluormethylphenothiazin-10-yl)propyl]-1-piperazinethanol-dihydrochlorid*</i> <i>2-Trifluor-10-{3-[4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl]propyl}-phenothiazin-dihydrochlorid</i>	Sigma GmbH
Gallopamil - HCl <i>(RS)-5-[(3,4-Dimethoxyphenethyl)methylamino]-2-isopropyl-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-6-pentannitril-hydrochlorid</i>	Knoll Deutschland GmbH, Ludwigshafen

INN / IUPAC	Hersteller / Quelle
Isradipin <i>(RS)-Isopropylmethyl-4-(2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-1,4-dihydro-2,6-dimethyl-3,5-pyridindicarboxylat</i>	Schwarz Pharma AG, Monheim
Lacidipin <i>Diethyl-4-[(E)-2-(tert-butyloxycarbonyl)vinyl]phenyl-1,4-dihydro-2,6-dimethyl-3,5-pyridindicarboxylat</i>	RS (Mason et al. 1989)
Lercanidipin <i>(RS)-2-[(3,3-Diphenylpropyl)methylamino]-1,1-dimethylethyl-methyl-1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-3,5-pyridindicarboxylat</i>	RS (Herbette et al. 1997)
Levomepromazin - HCl <i>[3-(2-Methoxy-10-phenothiazinyl)-2-methylpropyl]-N,N-dimethylamin-hydrochlorid*</i> <i>2-Methoxy-10-(N,N-dimethylamino-2-methylpropyl)-phenothiazin-hydrochlorid</i>	Bayer AG, Leverkusen
Nicardipin - HCl <i>(RS)-2-(Benzylmethylamino)-ethylmethyl-1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-3,5-pyridindicarboxylat-hydrochlorid</i>	Ciba-Geigy GmbH, Wehr
Nifedipin <i>Dimethyl-1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)-3,5-pyridindicarboxylat</i>	Synopharm GmbH, Barsbüttel
Nimodipin <i>(RS)-2-Methoxyethyl-1,4-dihydro-5-isopropoxycarbonyl-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-3-pyridincarboxylat</i>	Bayer AG, Leverkusen
Nilvadipin <i>(RS)-5-Isopropyl-3-methyl-2-cyan-1,4-dihydro-6-methyl-4-(3-nitrophenyl)-3,5-pyridindicarboxylat</i>	Klinge Pharma GmbH, München
Nisoldipin <i>(RS)-Isobutyl-1,4-dihydro-5-methoxycarbonyl-2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)-3-pyridincarboxylat</i>	Bayer AG, Leverkusen
Nitrendipin <i>(RS)-Ethyl-1,4-dihydro-5-methoxycarbonyl-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-3-pyridincarboxylat</i>	Bayer AG, Leverkusen
<i>n</i> -Octanol <i>n-Octan-1-ol</i>	Sigma GmbH
Perphenazin <i>4-[3-(2-Chlorphenothiazin-10-yl)propyl]-1-piperazinethanol*</i> <i>2-Chlor-10-[3-[4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl]propyl]-phenothiazin</i>	Sigma GmbH

INN / IUPAC	Hersteller / Quelle
Phenothiazin <i>Phenothiazin</i>	Aldrich GmbH
Prochlorperazin - Dimaleat <i>2-Chlor-10-[3-(4-methyl-1-piperazinyl)propyl]-phenothiazin-dihydrogenmaleat</i>	Sigma GmbH
Promazin - HCl <i>10-(3-Dimethylaminopropyl)-phenothiazin-hydrochlorid</i>	Sigma GmbH
Promethazin - HCl <i>(RS)-10-(2-Dimethylaminopropyl)-phenothiazin--hydrochlorid</i>	Sigma GmbH
Propylenglykoldipelargonat <i>1,2-Dinonyl-propan-dicarboxylat</i>	Henkel Organics, UK
Thiethylperazin - Dimaleat <i>2-Ethylthio-10-[3-(4-methyl-1-piperazinyl)propyl]-phenothiazin-dihydrogenmaleat</i>	Sandoz AG, Nürnberg
Thioridazin - HCl <i>(RS)-10-[2-(1-methyl-2-piperidyl)ethyl]-2-methylthiophenothiazin-hydrochlorid</i>	Sandoz AG, Nürnberg
Trifluoperazin - 2 HCl <i>10-[3-(4-Methyl-1-piperazinyl)propyl]-2-trifluormethylphenothiazin-dihydrochlorid</i>	Sigma GmbH
Trifluoroacetamid <i>2,2,2-Trifluoethansäureamid</i>	Aldrich GmbH
Triflupromazin - HCl <i>10-(3-Dimethylaminopropyl)-2-trifluormethylphenothiazin-hydrochlorid</i>	Sigma GmbH
Verapamil - HCl <i>(RS)-2-Isopropyl-2,8-bis-(3,4-dimethoxyphenyl)-6-methyl-6-azaocnitril-hydrochlorid</i>	Sigma GmbH

* IUPAC-gemäß, aber Bezeichnung als Phenothiazinderivat möglich

9.3.2 Parameter der NMR-Pulsprogramme

Tabelle A2: Pulsprogramm-Parameter der NMR-Messungen

Parameter mit Abkürzung		1D ¹ H	1D ¹⁹ F	¹⁹ F ¹ H NOE
90° Pulslänge	$\pi/2$	14.5 - 15.6 μ s	14.5 - 15.0 μ s	entsprechend 1D
Spektralweite	SW	4000 Hz	5000 - 8000 Hz	4000 Hz ^b
Zahl der Scans	NS	16 / 32	16	1000
Pulslänge	P1	4 μ s	3 μ s	4 μ s ^b
Aufzeichnungszeit	AQ	4 s	0.8 - 4 s	4 s ^b
Pause (Delay)	D1	15 s	15 s	16 s
Linienbreite	LB	3 Hz	1 / 3 Hz	1 Hz ^b
Mixzeit	t_m	-	0 / 0.5 s ^a	-
Größe der FID Aufzeichnung	rg	8 - 16k	8 - 16k	256
¹⁹ F Signalsättigung	CW	-	-	4 s

^a nur für 1D ¹⁹F-EXSY; ^b für ¹H-Kern.

9.3.3 Abgeleitete VOLSURF-Deskriptoren von GRID-Sonden

Tabelle A3: Abgeleitete VOLSURF-Deskriptoren von GRID-Sonden

Sonde	Deskriptor	Anzahl
OH2	molekulares Volumen V	1
	molekulare Oberfläche S	1
	Faltungskoeffizient R	1
	Kugelförmigkeit G	1
	hydrophile Regionen $W1 - W8$ (Standardwerte)	8
	<i>Integy</i> -Momente $Iw1 - Iw8$	8
	lokale Energieminima $Emin1 - Emin3$	3
	Abstände zwischen den lokalen Energieminima $D12, D13, D23$	3
DRY	hydrophobe Regionen $D1 - D8$	8
	hydrophobe <i>Integy</i> -Momente $ID1 - ID8$	8
	Hydrophilie-Lipophilie-Balance $HL1 - HL2$	2
	amphiphiles Moment A	1
	kritischer Dichteparameter CP	1
OH	hydrophile Regionen $W1 - W8$ (Standardwerte)	8
	Wasserstoffbrücken-Kapazitäten $HB1 - HB8$	8
O::	hydrophile Regionen $W1 - W8$ (Standardwerte)	8
	Wasserstoffbrücken-Kapazitäten $HB1 - HB8$	8
PO4H	hydrophile Regionen $W1 - W8$	8
	(-2.0; -3.0; -4.0; -5.0; -6.0; -7.0; -8.0; -10.0 kcal/mol)	

Tabelle A5: Retentionszeiten an der IAM-Säule, gemessen mit verschiedenen Laufmitteln

Nr.	Verbindung	n *	Bruttoretentionszeiten in min									
			[AcCN]	15 %	15 %	18 %	20 %	20 %	23 %	25 %	30 %	30 %
			[PO ₄ ³⁻]	67 mM	100 mM	50 mM	30 mM	67mM	67 mM	100 mM	30 mM	50 mM
2	Promazin	3	2.538	-	2.985	1.970	1.354	0.940	0.837	-	0.688	
3	Chlorpromazin	4	-	3.318	4.090	-	2.403	1.685	1.243	1.073	-	
4	Chlorprothixen	3	-	3.990	5.035	-	2.783	1.967	1.413	1.233	-	
11	Perphenazin	4	2.602	-	-	4.625	-	1.850	1.473	-	1.060	
12	Fluphenazin	3	2.583	4.835	6.043	5.005	-	2.003	1.438	1.250	-	
13	cis-Flupenthixol	3	7.988	-	-	6.150	-	2.183	1.583	-	1.208	
14	trans-Flupenthixol	3	10.867	-	-	7.173	-	2.478	1.813	-	1.365	
16	Gallopamil	4	1.473	-	1.468	1.142	0.787	0.583	0.498	-	0.447	
22	Felodipin	4	2.843	-	2.315	1.248	-	0.753	0.645	-	0.407	
26	Isradipin	4	0.980	-	0.918	0.588	-	0.440	0.413	-	0.327	

* Zahl der Einzelmessungen, aus denen die durchschnittlichen Retentionszeiten ($s \pm 0.1$) berechnet wurden.

Auswertung der ^{19}F -EXSY-Experimente: Dokumentation der Matrixberechnung (Gl. 16)

Mathcad-Datei: Analysis of a two site exchange system using the overdetermined 1D-EXSY method. Me is the equilibrium intensity vector, Mo the zero mixing time matrix and Mt the non-zero mixing time matrix. This analysis requires the equilibrium spectrum and eight sets of spectra at eight different evolution times for each set, each set consisting of a zero mixing time and a non zero mixing time spectrum. A total of seventeen spectra are required. Intensities are entered as row vectors for each evolution time. Thus rows are associated with an evolution time and columns with a chemical species.

Comments File mt-reXb 2/3 trifluoroacetamide with RBC

reference d1=15s; Me of expt. 4; Hk 0.55

$$\begin{aligned}
 & \text{Me} := (0.358 \quad 0.39) \\
 & \text{Mo} := \begin{bmatrix} -0.282 & -0.35 \\ -0.26 & 0.173 \\ -0.237 & 0.278 \\ -0.23 & 0.338 \\ -0.3 & -0.341 \\ 0.156 & -0.329 \\ 0.247 & -0.322 \\ 0.279 & -0.308 \end{bmatrix} \quad \text{Mt} := \begin{bmatrix} -0.147 & -0.201 \\ 0.054 & 0.046 \\ 0.099 & 0.1 \\ 0.125 & 0.129 \\ -0.159 & -0.193 \\ 0.019 & -0.004 \\ 0.05 & 0.036 \\ 0.061 & 0.058 \end{bmatrix} \quad \text{Tm} := 0.5 \\
 & \text{A} := \text{Mo} \quad \text{O} := \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 0 \\ 0 & 0 \\ 0 & 0 \\ 0 & 0 \\ 0 & 0 \\ 0 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix} \\
 & \text{B} := \text{Mt} \\
 & \text{A}^{<0>} := \text{Mo}^{<0>} - (\text{Me}^T)_0 \quad \text{B}^{<0>} := \text{Mt}^{<0>} - (\text{Me}^T)_0 \\
 & \text{A}^{<1>} := \text{Mo}^{<1>} - (\text{Me}^T)_1 \quad \text{B}^{<1>} := \text{Mt}^{<1>} - (\text{Me}^T)_1 \\
 & \text{A} = \begin{bmatrix} -0.64 & -0.74 \\ -0.618 & -0.217 \\ -0.595 & -0.112 \\ -0.588 & -0.052 \\ -0.658 & -0.731 \\ -0.202 & -0.719 \\ -0.111 & -0.712 \\ -0.079 & -0.698 \end{bmatrix} \quad \text{B} = \begin{bmatrix} -0.505 & -0.591 \\ -0.304 & -0.344 \\ -0.259 & -0.29 \\ -0.233 & -0.261 \\ -0.517 & -0.583 \\ -0.339 & -0.394 \\ -0.308 & -0.354 \\ -0.297 & -0.332 \end{bmatrix} \\
 & \text{AO} := \text{augment}(\text{A}, \text{O}) \\
 & \text{OA} := \text{augment}(\text{O}, \text{A}) \\
 & \text{bigA} := \text{stack}(\text{AO}, \text{OA}) \\
 & \text{bigB} := \text{stack}(\text{B}^{<0>}, \text{B}^{<1>})
 \end{aligned}$$

	0	1	2	3
0	-0.64	-0.74	0	0
1	-0.62	-0.22	0	0
2	-0.6	-0.11	0	0
3	-0.59	-0.05	0	0
4	-0.66	-0.73	0	0
5	-0.2	-0.72	0	0
6	-0.11	-0.71	0	0
7	-0.08	-0.7	0	0
8	0	0	-0.64	-0.74
9	0	0	-0.62	-0.22
10	0	0	-0.6	-0.11
11	0	0	-0.59	-0.05
12	0	0	-0.66	-0.73
13	0	0	-0.2	-0.72
14	0	0	-0.11	-0.71
15	0	0	-0.08	-0.7

bigA =

	0
0	-0.5
1	-0.3
2	-0.26
3	-0.23
4	-0.52
5	-0.34
6	-0.31
7	-0.3
8	-0.59
9	-0.34
10	-0.29
11	-0.26
12	-0.58
13	-0.39
14	-0.35
15	-0.33

bigB =

QR := qr(bigA)

	0	1	2	3	4
0	0.45	0.21	0	0	0.86
1	0.44	-0.19	0	0	-0.18
2	0.42	-0.26	0	0	-0.16
3	0.42	-0.3	0	0	-0.14
4	0.47	0.2	0	0	-0.29
5	0.14	0.45	0	0	-0.19
6	0.08	0.5	0	0	-0.17
7	0.06	0.51	0	0	-0.16
8	0	0	0.45	0.21	0
9	0	0	0.44	-0.19	0
10	0	0	0.42	-0.26	0
11	0	0	0.42	-0.3	0
12	0	0	0.47	0.2	0
13	0	0	0.14	0.45	0
14	0	0	0.08	0.5	0
15	0	0	0.06	0.51	0

QR =

$Q := \text{submatrix}(QR, 0, 15, 0, 15)$
 $R := \text{submatrix}(QR, 0, 15, 16, 19)$

$$Q =$$

	0	1	2	3	4
0	0.45	0.21	0	0	0.86
1	0.44	-0.19	0	0	-0.18
2	0.42	-0.26	0	0	-0.16
3	0.42	-0.3	0	0	-0.14
4	0.47	0.2	0	0	-0.29
5	0.14	0.45	0	0	-0.19
6	0.08	0.5	0	0	-0.17
7	0.06	0.51	0	0	-0.16
8	0	0	0.45	0.21	0
9	0	0	0.44	-0.19	0
10	0	0	0.42	-0.26	0
11	0	0	0.42	-0.3	0
12	0	0	0.47	0.2	0
13	0	0	0.14	0.45	0
14	0	0	0.08	0.5	0
15	0	0	0.06	0.51	0

 $Rx := Q^T \cdot \text{bigB}$

$$R =$$

	0	1	2	3
0	-1.41	-1.04	0	0
1	0	-1.25	0	0
2	0	0	-1.41	-1.04
3	0	0	0	-1.25
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0

$$Rx =$$

	0
0	-0.9
1	-0.47
2	-1.03
3	-0.54
4	0.01
5	0
6	-0
7	0
8	-0.01
9	-0
10	-0.01
11	0
12	$-8.6 \cdot 10^{-5}$
13	0
14	0
15	0

$$\text{subR} := \text{submatrix}(R, 0, 3, 0, 3)$$

$$\text{subRx} := \text{submatrix}(Rx, 0, 3, 0, 0)$$

$$\text{subRI} := \text{subR}^{-1}$$

$$\text{subRx} = \begin{bmatrix} -0.901 \\ -0.472 \\ -1.026 \\ -0.545 \end{bmatrix}$$

$$\text{subR} = \begin{bmatrix} -1.408 & -1.04 & 0 & 0 \\ 0 & -1.254 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1.408 & -1.04 \\ 0 & 0 & 0 & -1.254 \end{bmatrix}$$

$$X := \text{subRI} \cdot \text{subRx}$$

$$X1 := \text{submatrix}(X, 0, 1, 0, 0)$$

$$X2 := \text{submatrix}(X, 2, 3, 0, 0)$$

$$X = \begin{bmatrix} 0.361 \\ 0.376 \\ 0.408 \\ 0.434 \end{bmatrix}$$

$$\text{RN} := \text{stack}(X1^T, X2^T)$$

$$\text{RN} = \begin{bmatrix} 0.361 & 0.376 \\ 0.408 & 0.434 \end{bmatrix}$$

$$\text{EV} := \text{eigenvec}(\text{RN})$$

$$\text{EA} := \text{eigenval}(\text{RN})$$

$$\text{EV} = \begin{bmatrix} 0.726 & 0.659 \\ -0.688 & 0.752 \end{bmatrix}$$

$$\text{EA} = \begin{bmatrix} 4.504 \cdot 10^{-3} \\ 0.791 \end{bmatrix}$$

$$\text{EVI} := \text{EV}^{-1}$$

$$\text{LnEA} := \overrightarrow{\ln(\text{EA})}$$

$$\text{EVI} = \begin{bmatrix} 0.753 & -0.659 \\ 0.689 & 0.726 \end{bmatrix}$$

$$\text{LnEA} = \begin{bmatrix} -5.403 \\ -0.234 \end{bmatrix}$$

$$\text{LnEAM} := \text{diag}(\text{LnEA})$$

$$\text{LnEAM} = \begin{bmatrix} -5.403 & 0 \\ 0 & -0.234 \end{bmatrix}$$

$$\text{ETm} := \text{EV} \cdot \text{LnEAM} \cdot \text{EVI}$$

$$\text{ETm} = \begin{bmatrix} -3.058 & 2.472 \\ 2.679 & -2.578 \end{bmatrix}$$

$$E := \frac{\text{ETm}}{\text{Tm}}$$

$$E = \begin{bmatrix} -6.116 & 4.944 \\ 5.357 & -5.157 \end{bmatrix}$$

$$\text{covarX} := \frac{(\text{Rx}_4)^2}{12} \cdot \text{subRI} \cdot \text{subRI}^T$$

$$\text{covarX} = \begin{bmatrix} 2.224 \cdot 10^{-6} & -1.227 \cdot 10^{-6} & 0 & 0 \\ -1.227 \cdot 10^{-6} & 1.662 \cdot 10^{-6} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 2.224 \cdot 10^{-6} & -1.227 \cdot 10^{-6} \\ 0 & 0 & -1.227 \cdot 10^{-6} & 1.662 \cdot 10^{-6} \end{bmatrix}$$

$$\text{sdevRN} := \sqrt{\text{covarX}}$$

$$\text{varE} := \text{E}$$

$$\text{varE}_{0,0} := \frac{\text{covarX}_{0,0}}{\text{Tm} \cdot \text{EA}_0}$$

$$\text{varE}_{0,1} := \frac{\text{covarX}_{1,1}}{\text{Tm} \cdot \sqrt{\text{EA}_0} \cdot \sqrt{\text{EA}_1}}$$

$$\text{varE}_{1,0} := \frac{\text{covarX}_{2,2}}{\text{Tm} \cdot \sqrt{\text{EA}_0} \cdot \sqrt{\text{EA}_1}}$$

$$\text{varE}_{1,1} := \frac{\text{covarX}_{3,3}}{\text{Tm} \cdot \text{EA}_1}$$

$$\text{varE} = \begin{bmatrix} 9.876 \cdot 10^{-4} & 5.566 \cdot 10^{-5} \\ 7.451 \cdot 10^{-5} & 4.199 \cdot 10^{-6} \end{bmatrix}$$

$$\text{sdevE} := \sqrt{\text{varE}}$$

$$\text{RN} = \begin{bmatrix} 0.361 & 0.376 \\ 0.408 & 0.434 \end{bmatrix}$$

$$\text{sdevRN} = \begin{bmatrix} 1.491 \cdot 10^{-3} & 1.108i \cdot 10^{-3} & 0 & 0 \\ 1.108i \cdot 10^{-3} & 1.289 \cdot 10^{-3} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1.491 \cdot 10^{-3} & 1.108i \cdot 10^{-3} \\ 0 & 0 & 1.108i \cdot 10^{-3} & 1.289 \cdot 10^{-3} \end{bmatrix}$$

$$\text{E} = \begin{bmatrix} -6.116 & 4.944 \\ 5.357 & -5.157 \end{bmatrix}$$

Ergebnis Gl. 16

$$\text{sdevE} = \begin{bmatrix} 0.031 & 7.46 \cdot 10^{-3} \\ 8.632 \cdot 10^{-3} & 2.049 \cdot 10^{-3} \end{bmatrix}$$

Standardabweichungen zur Matrix E

Tabelle A6: Übersicht zu den Flächengrößen der ^{19}F -EXSY-Experimente ohne Arzneistoffe

Experiment	Me			Mo			Mt	
	in	ex		in	ex		in	ex
(4/5)	0.313	0.237	IN 1	-0.253	-0.260	IN 1'	-0.071	-0.071
			2	-0.289	0.144	2'	0.128	0.045
			3	-0.266	0.181	3'	0.136	0.099
			4	-0.237	0.225	4'	0.197	0.089
			EX 1	-0.275	-0.205	EX 1'	-0.073	-0.098
			2	0.229	-0.189	2'	0.179	0.085
			3	0.278	-0.179	3'	0.194	0.115
			4	0.335	-0.162	4'	0.214	0.134
(14/15a)	0.250	0.139	IN 1	-0.207	-0.107	IN 1'	-0.090	-0.051
(14/15b)	0.240	0.110	2	-0.197	0.058	2'	-0.012	-0.002
			3	-0.161	0.082	3'	0.018	0.004
			4	-0.172	0.114	4'	0.022	0.008
			EX 1	-0.188	-0.114	EX 1'	-0.101	-0.068
			2	0.115	-0.106	2'	0.008	0.027
			3	0.175	-0.088	3'	0.084	0.062
			4	0.194	-0.079	4'	0.100	0.073
			(24/25a)	0.211	0.140	IN 1	-0.171	-0.093
(24/25b)	0.197	0.860	2	-0.168	0.043	2'	-0.007	-0.011
			3	-0.137	0.073	3'	0.011	-0.002
			4	-0.147	0.082	4'	0.033	0.002
			EX 1	-0.167	-0.095	EX 1'	-0.087	-0.050
			2	0.077	-0.075	2'	0.048	0.024
			3	0.137	-0.074	3'	0.071	0.035
			4	0.162	-0.060	4'	0.081	0.036
			(2/3a)	0.429	0.232	IN 1	-0.383	-0.203
(2/3b)	0.439	0.249	2	-0.329	0.090	2'	-0.016	-0.021
			3	-0.328	0.140	3'	0.037	0.006
			4	-0.317	0.186	4'	0.057	0.010
			EX 1	-0.420	-0.190	EX 1'	-0.184	-0.089
			2	0.169	-0.195	2'	0.107	0.034
			3	0.280	-0.182	3'	0.167	0.066
			4	0.350	-0.188	4'	0.216	0.079

Experiment	Me			Mo			Mt	
	in	ex		in	ex		in	ex
(12/13a)	0.459	0.243	IN 1	-0.385	-0.201	IN 1'	-0.189	-0.099
(12/13b)	0.477	0.241	2	-0.352	0.095	2'	-0.022	-0.017
			3	-0.358	0.159	3'	0.025	0.008
			4	-0.328	0.197	4'	0.053	0.017
			EX 1	-0.406	-0.182	EX 1'	-0.199	-0.100
			2	0.177	-0.196	2'	0.105	0.039
			3	0.298	-0.198	3'	0.169	0.073
			4	0.375	-0.192	4'	0.207	0.084
			(A2/3a)	0.460	0.246	IN 1	-0.386	-0.218
(A2/3b)	0.441	0.238	2	-0.346	0.098	2'	-0.008	-0.004
			3	-0.332	0.175	3'	0.042	0.013
			4	-0.319	0.215	4'	0.071	0.026
			EX 1	-0.399	-0.208	EX 1'	-0.192	-0.103
			2	0.170	-0.205	2'	0.092	0.036
			3	0.280	-0.197	3'	0.154	0.068
			4	0.356	-0.204	4'	0.196	0.101
			(reVa)	0.261	0.246	IN 1	-0.212	-0.189
(reVb)	0.245	0.240	2	-0.178	0.101	2'	0.025	0.019
			3	-0.176	0.173	3'	0.053	0.046
			4	-0.165	0.205	4'	0.071	0.067
			EX 1	-0.205	-0.195	EX 1'	-0.115	-0.105
			2	0.098	-0.194	2'	0.019	0.010
			3	0.162	-0.193	3'	0.043	0.031
			4	0.196	-0.186	4'	0.056	0.047
			(reXa)	0.351	0.380	IN 1	-0.282	-0.350
(reXb)	0.358	0.390	2	-0.260	0.173	2'	0.054	0.046
			3	-0.237	0.278	3'	0.099	0.100
			4	-0.230	0.338	4'	0.125	0.129
			EX 1	-0.300	-0.341	EX 1'	-0.159	-0.193
			2	0.156	-0.329	2'	0.019	-0.004
			3	0.247	-0.322	3'	0.050	0.036
			4	0.279	-0.308	4'	0.061	0.058

Experiment	Me			Mo			Mt	
	in	ex		in	ex		in	ex
(reZa)	0.356	0.334	IN 1	-0.293	-0.340	IN 1'	-0.158	-0.185
(reZb)	0.379	0.345	2	-0.281	0.121	2'	0.035	0.019
			3	-0.272	0.222	3'	0.077	0.069
			4	-0.255	0.294	4'	0.109	0.099
			EX 1	-0.307	-0.323	EX 1'	-0.159	-0.183
			2	0.180	-0.304	2'	0.037	0.013
			3	0.260	-0.291	3'	0.060	0.054
			4	0.311	-0.283	4'	0.077	0.069

Tabelle A7: Übersicht zu den Flächengrößen der ^{19}F -EXSY-Experimente mit Arzneistoffen

Experiment	Me			Mo			Mt	
	in	ex		in	ex		in	ex
Triflupromazin			IN 1	-0.317	-0.319	IN 1'	-0.163	-0.179
C1	0.384	0.373	2	-0.269	0.141	2'	0.021	0.021
C2			3	-0.265	0.234	3'	0.069	0.062
			4	-0.242	0.304	4'	0.107	0.101
			EX 1	-0.303	-0.307	EX 1'	-0.169	-0.178
			2	0.164	-0.303	2'	0.003	0.006
			3	0.249	-0.290	3'	0.055	0.048
			4	0.287	-0.271	4'	0.097	0.074
Triflupromazin					IN 1	-0.196	-0.194	IN 1'
D1	0.245	0.238	2	-0.175	0.082	2'	0.016	0.019
			3	-0.160	0.146	3'	0.049	0.047
			4	-0.167	0.182	4'	0.070	0.047
			EX 1	-0.180	-0.190	EX 1'	-0.106	-0.056
			2	0.111	-0.189	2'	0.011	0.015
			3	0.160	-0.179	3'	0.030	0.028
			4	0.187	-0.177	4'	0.058	0.047
			Triflupromazin			IN 1	-0.213	-0.177
E1	0.233	0.215	2	-0.170	0.080	2'	0.011	0.008
E2			3	-0.158	0.143	3'	0.044	0.034
			4	-0.154	0.176	4'	0.058	0.050
			EX 1	-0.205	-0.175	EX 1'	-0.100	-0.100
			2	0.111	-0.183	2'	0.023	0.018
			3	0.163	-0.163	3'	0.043	0.044
			4	0.194	-0.155	4'	0.088	0.048

Experiment	Me			Mo			Mt	
	in	ex		in	ex		in	ex
trans- Flupenthixol			IN 1	-0.223	-0.205	IN 1'	-0.124	-0.118
			2	-0.200	0.087	2'	0.008	0.007
D1	0.270	0.244	3	-0.184	0.151	3'	0.045	0.040
D2	0.259	0.238	4	-0.177	0.197	4'	0.069	0.054
			EX 1	-0.217	-0.200	EX 1'	-0.115	-0.110
			2	0.110	-0.192	2'	0.021	0.012
			3	0.171	-0.187	3'	0.053	0.037
			4	0.201	-0.175	4'	0.067	0.058
trans- Flupenthixol			IN 1	-0.210	-0.214	IN 1'	-0.110	-0.115
			2	-0.185	0.075	2'	0.006	0.009
E1	0.241	0.255	3	-0.184	0.155	3'	0.048	0.049
E2	0.247	0.248	4	-0.165	0.202	4'	0.060	0.060
			EX 1	-0.200	-0.220	EX 1'	-0.115	-0.133
			2	0.119	-0.190	2'	0.019	0.013
			3	0.180	-0.193	3'	0.040	0.040
			4	0.212	-0.187	4'	0.061	0.055
Verapamil			IN 1	-0.217	-0.188	IN 1'	-0.109	-0.110
31	0.236	0.230	2	-0.184	0.067	2'	0.002	-0.002
32	0.227	0.219	3	-0.178	0.125	3'	0.031	0.021
			4	-0.157	0.172	4'	0.061	0.046
			EN 1	-0.209	-0.190	EX 1'	-0.108	-0.104
			2	0.131	-0.183	2'	0.028	0.020
			3	0.179	-0.176	3'	0.051	0.035
			4	0.198	-0.170	4'	0.070	0.062
Verapamil			IN 1	-0.239	-0.201	IN 1'	-0.121	-0.110
4a	0.266	0.248	2	-0.207	0.112	2'	0.020	0.009
4b	0.263	0.246	3	-0.200	0.167	3'	0.061	0.042
			4	-0.175	0.213	4'	0.072	0.060
			EX 1	-0.230	-0.198	EX 1'	-0.127	-0.109
			2	0.104	-0.208	2'	0.019	-0.007
			3	0.160	-0.201	3'	0.045	0.038
			4	0.212	-0.187	4'	0.083	0.062

Experiment	Me			Mo			Mt	
	in	ex		in	ex		in	ex
Nicardipin			IN 1	-0.255	-0.296	IN 1'	-0.129	-0.171
11	0.323	0.359	2	-0.227	0.130	2'	0.035	0.038
12	0.308	0.334	3	-0.203	0.210	3'	0.078	0.079
			4	-0.184	0.284	4'	0.103	0.120
			EX 1	-0.244	-0.301	EX 1'	-0.123	-0.165
			2	0.153	-0.285	2'	0.012	0.009
			3	0.214	-0.270	3'	0.034	0.039
			4	0.232	-0.263	4'	0.056	0.056
Nicardipin			IN 1	-0.261	-0.280	IN 1'	-0.129	-0.150
31	0.298	0.330	2	-0.200	0.122	2'	0.026	0.024
32	0.312	0.337	3	-0.189	0.213	3'	0.072	0.071
			4	-0.165	0.269	4'	0.098	0.105
			EX 1	-0.242	-0.284	EX 1'	-0.136	-0.151
			2	0.151	-0.267	2'	0.008	0.003
			3	0.211	-0.258	3'	0.036	0.035
			4	0.242	-0.255	4'	0.056	0.054

Abkürzungen lt. Abschnitt 5.3.2.2 und Abb. 35 und 36:

Me - Intensitäten im normalen ^{19}F -Spektrum von Trifluoracetamid (TFAm);

Mo - Intensitäten ohne Mischzeit ($t_m = 0$ s);

Mt - Intensitäten mit Mischzeit ($t_m = 0.5$ s);

in/ex - ^{19}F -Signal der TFAm-Moleküle innerhalb/außerhalb der Erythrocyten;

IN/EX - Sättigung des internen/externen ^{19}F -Signals von TFAm.

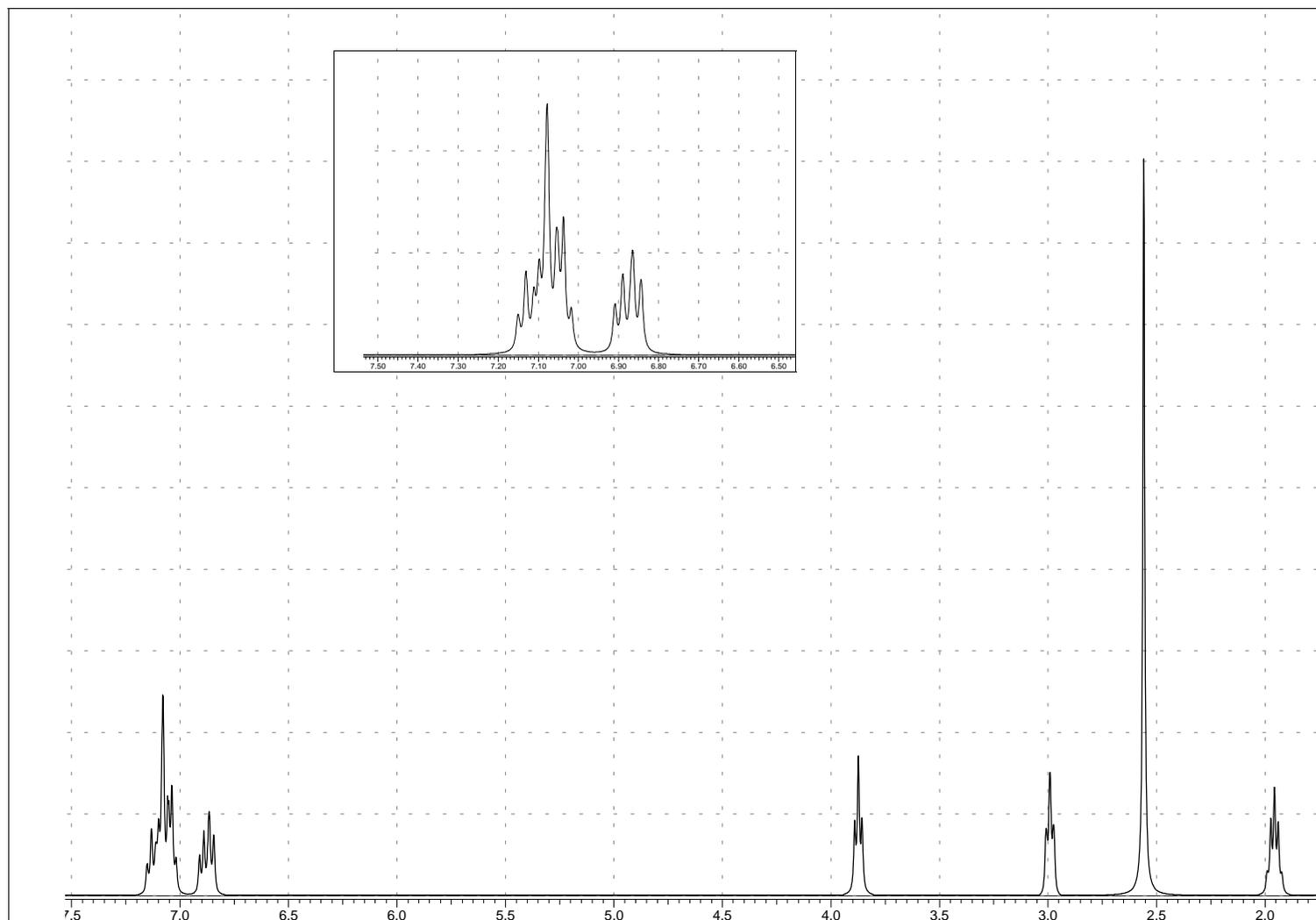
9.5 ^1H -NMR-Spektren von ausgewählten Arzneistoffen**Abbildung A1:** ^1H -Spektrum von Triflupromazin - HCl in D_2O 

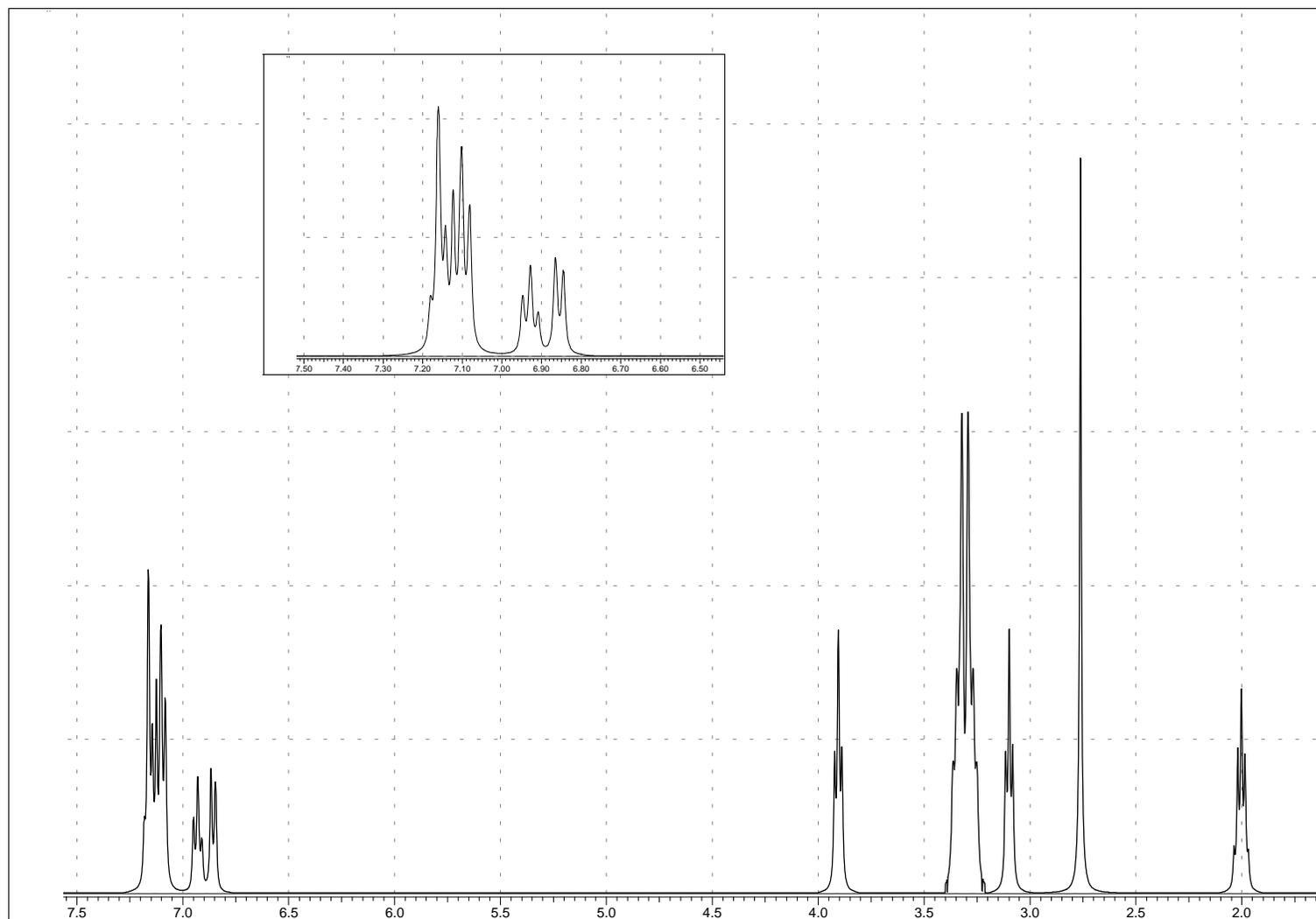
Abbildung A2: ^1H -Spektrum von Trifluoperazin - $2\cdot\text{HCl}$ in D_2O 

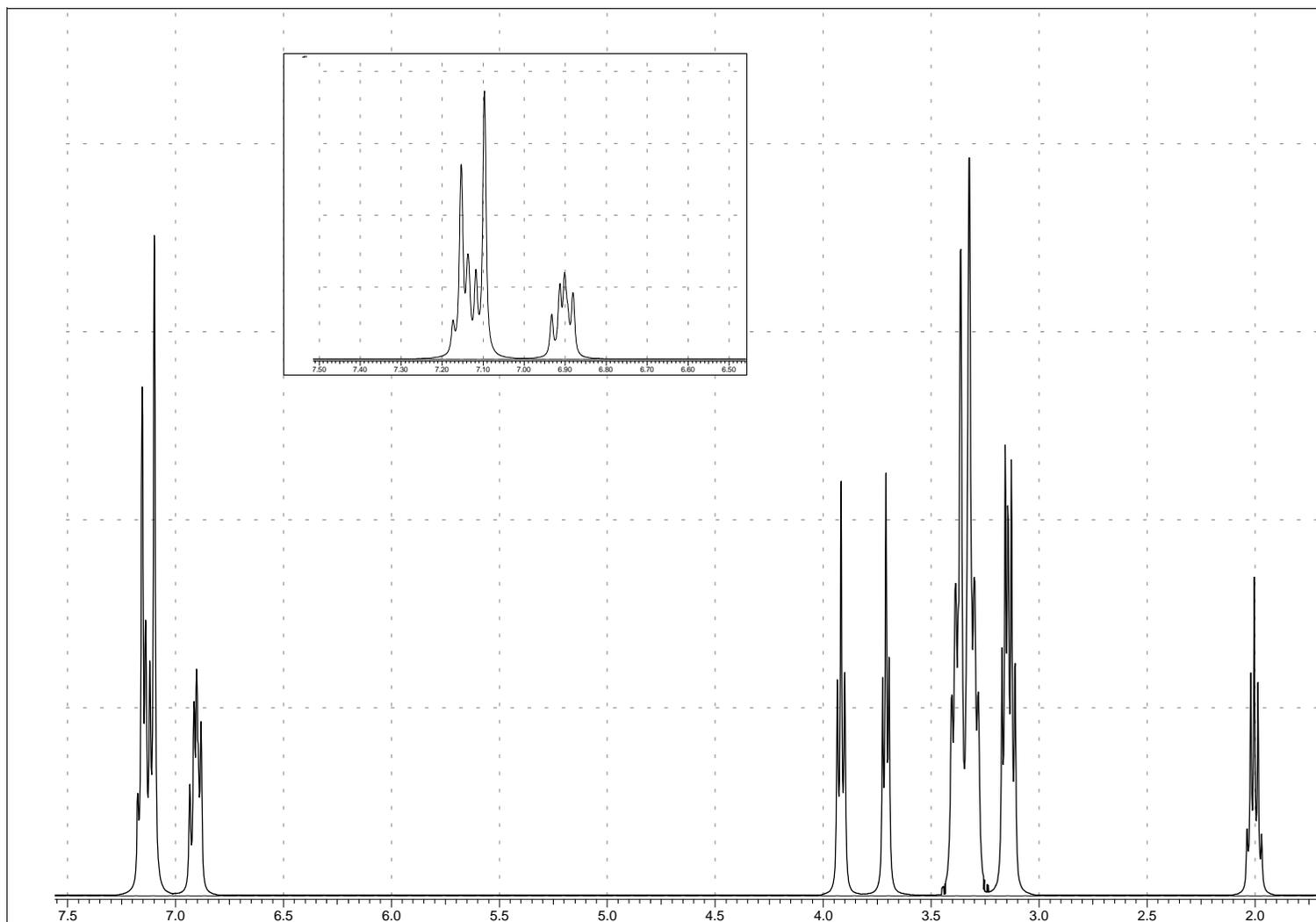
Abbildung A3: ^1H -Spektrum von Fluphenazin - $2\cdot\text{HCl}$ in D_2O 

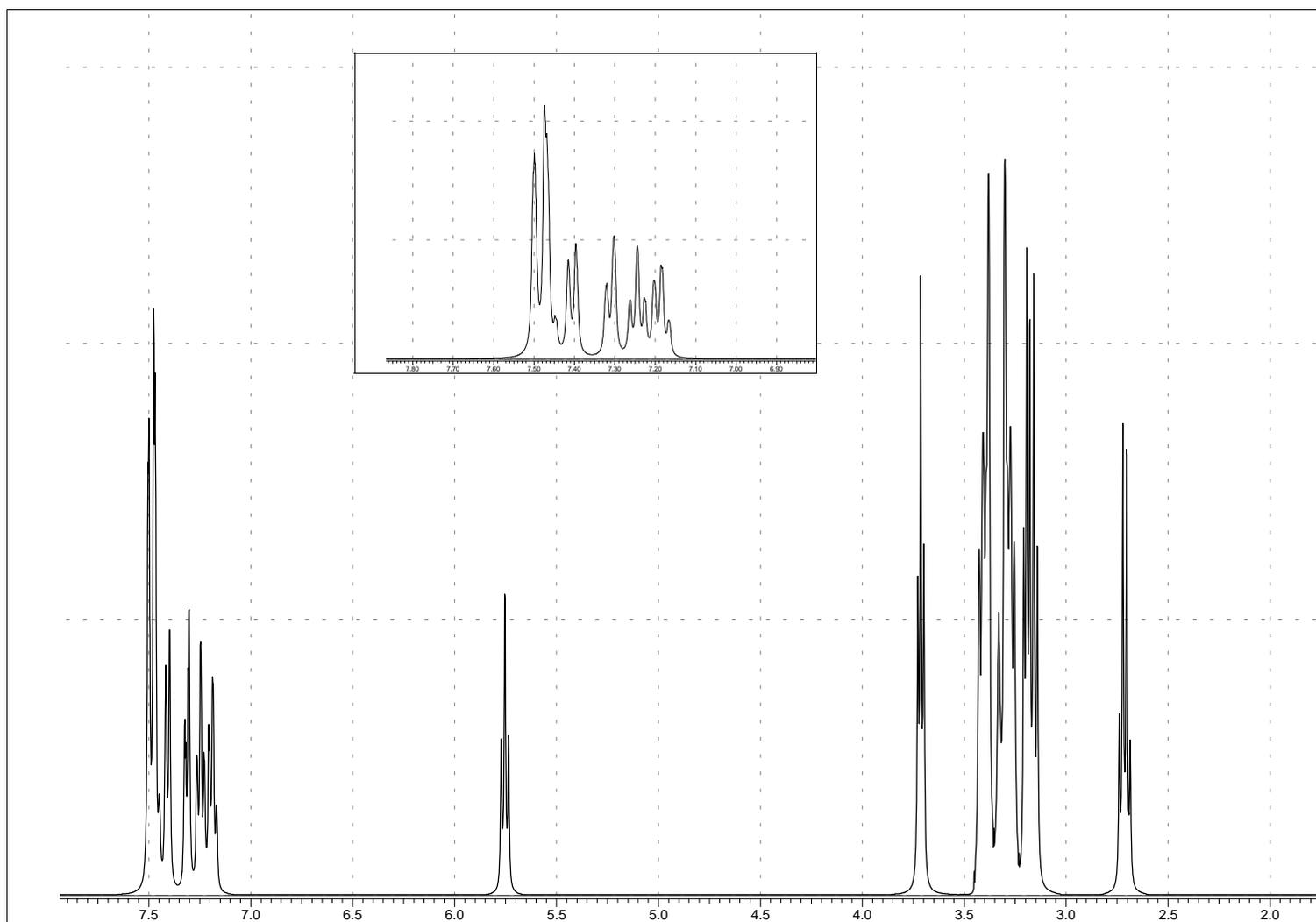
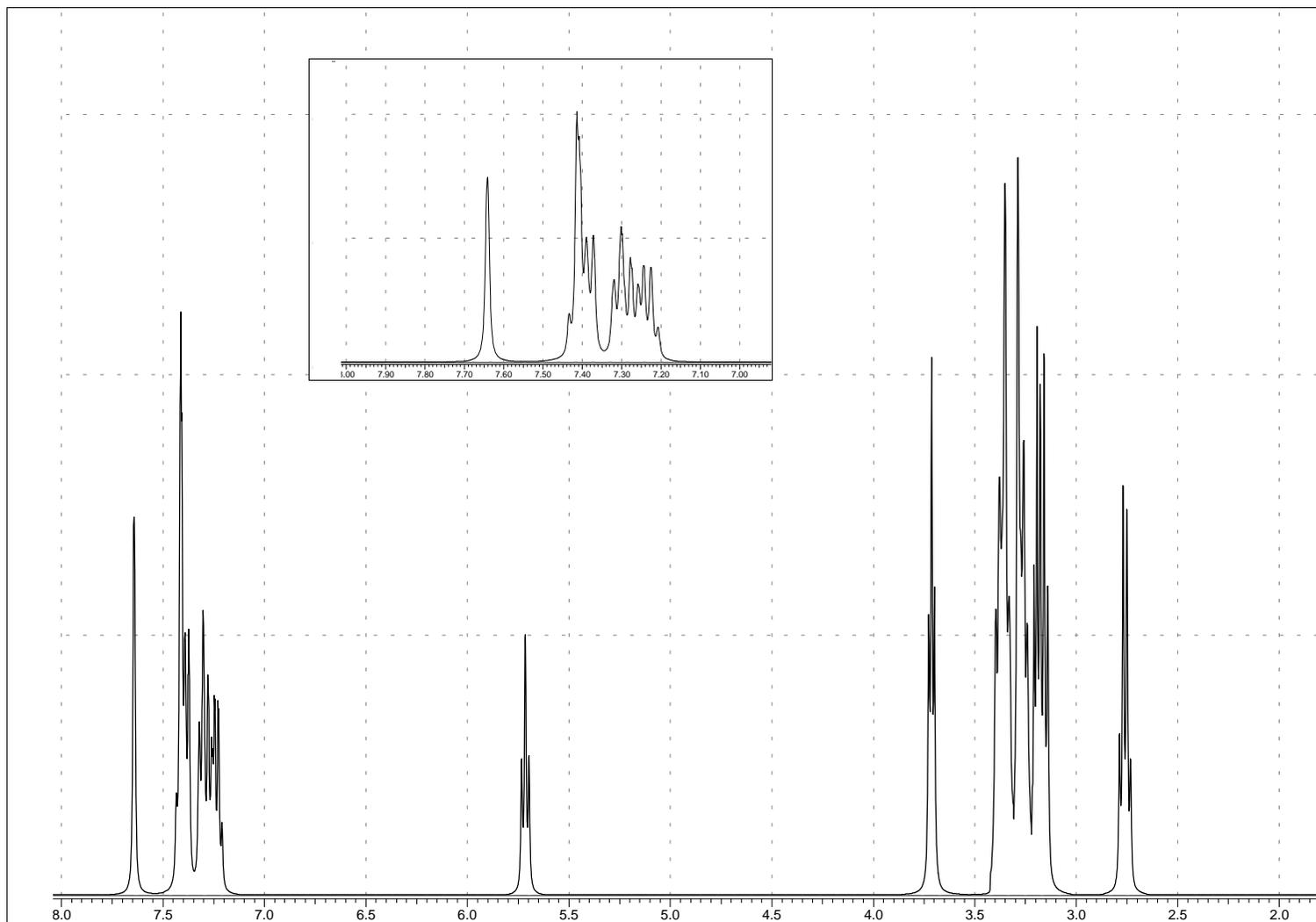
Abbildung A4: ^1H -Spektrum von cis-Flupenthixol - 2·HCl in D_2O 

Abbildung A5: ^1H -Spektrum von trans-Flupenthixol - 2·HCl in D_2O 

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre eidesstattlich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbst angefertigt habe. Dazu verwendete ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel.

Die wörtlichen und inhaltlichen Zitate aus fremden Werken wurden als solche kenntlich gemacht.

Halle, am 16. Februar 2000

Ulrich Franke

Lebenslauf

Personalien:

Name: Franke
Vornamen: Ulrich, Jörg
geboren: am 30. Juli 1967 in Bad Salzungen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Ausbildung:

1974 bis 1984 Polytechnische Oberschule in Barchfeld / Werra
1984 bis 1986 Erweiterte Oberschule in Bad Salzungen; Abitur
1989 bis 1992 Pharmaziestudium an der Universität Halle - Wittenberg;
Ablegen des 1. Abschnitts des Pharmazeutischen Staatsexamens
1992 bis 1994 Pharmaziestudium an der Universität Freiburg / Breisgau;
Ablegen des 2. Abschnitts des Pharmazeutischen Staatsexamens
1994 bis 1995 Pharmaziepraktikant in der Apotheke Allendorf;
Diplomand am Institut für Pharmazeutischen Chemie der Universität
Halle-Wittenberg; Betreuer Prof. Dr. M. Wiese
02/1996 Ablegen des 3. Abschnitts des Pharmazeutischen Staatsexamens und
Erteilung der Approbation als Apotheker
04/1996 Diplomverteidigung zum Thema: Molecular-Modeling-Untersuchungen von
 β -Cyclodextrin-Methadon-Komplexen zur Erklärung der Razemattrennung
(Prädikat gut)
04/1996 bis 02/2000 Promotionsstudent (Stipendiat der Hans-Böckler-Stiftung) und
wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Chemie der
Universität Halle-Wittenberg; Abteilung Medizinische Chemie

Weiteres:

1986 bis 1989 aktiver Wehrdienst
1990 bis 1991 Mitarbeit in der Studierendenvertretung an der Universität Halle - Wittenberg
09/1997 bis 03/1998 Gastaufenthalt am Department of Biochemistry, University of Sydney,
Australien; Abteilung NMR Studies of Membrane Transport;
Betreuung durch Prof. P.W. Kuchel, PhD

Halle, am 16. Februar 2000

Ulrich Franke

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von April 1996 bis Dezember 1999.

Mein besonderer Dank gilt

der Hans-Böckler-Stiftung, Studienförderungswerk des Deutschen Gewerkschaftsbundes, für die langjährige finanzielle Unterstützung meines Dissertationsvorhabens, insbesondere des Forschungsaufenthalts an der University of Sydney, Australien;

meinem wissenschaftlichen Betreuer, Herr Prof. Dr. M. Wiese, für die gemeinsame Entwicklung des Konzepts dieser Arbeit, seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft bei der Umsetzung und die kritische Begutachtung der Ergebnisse;

Herrn Prof. P.W. Kuchel, PhD, und Herrn W. Bubb, PhD, für ihre Bereitschaft, mich bei den NMR-spektroskopischen Untersuchungen mit Rat und Tat zu unterstützen. Mit ihrer Hilfe konnte ich mich in die Theorie und Praxis der NMR-Spektroskopie einarbeiten und eigene Messungen anfertigen;

Frau A. Munk, die mit großer Anteilnahme und unermüdlicher Hilfsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat;

der gesamten Arbeitsgruppe Medizinische Chemie für die mannigfaltige Hilfe, ohne die sich die Anfertigung dieser Dissertation weit schwieriger gestaltet hätte.

Allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, die am Zustandekommen der Arbeit Anteil hatten, danke ich ebenfalls herzlich.