

Fachbereich Biochemie/Biotechnologie

Institut für Biochemie



Trennverfahren für die Wirkstoffanalyse und deren Einsatz in der Pharmakokinetik

Dissertation

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

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dipl.-Biol. Olaf Kuhlmann
geb. 15.12.1965 in Langenhagen (Niedersachsen)

Gutachter:

1. Prof. Dr. habil. G.-J. Krauß
2. Prof. Dr. habil. M. Weiss
3. Prof. Dr. habil. F. Sörgel

"Ich bitte alle, sie wollten nicht zu frühe Doctoren sein und alles zu wissen sich dünken lassen, sondern sich täglich üben, dazu mit aller Sorge und Fleiß sich vorsehen vor dem giftigen Geschmeiß solcher Sicherheit und Dünkelmeister, sondern stetig anhalten mit Lesen, Lehren, Lernen, Denken und Dichten."

Martin Luther, 1529

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Material und Methoden	12
<u>2.1 Material</u>	12
2.1.1 Chemikalien.....	12
2.1.1.1 Synthese der <i>p</i> -ACETYLAMINOHIPPURSAURE (nach Stolk <i>et al.</i> , 1985)	14
2.1.2 Laborgeräte	15
2.1.2.1 Konstruktion des Photochemischen Reaktors	15
2.1.2.2 Chromatographische Systeme	16
2.1.2.3 Weitere Laborgeräte	17
<u>2.2 Methoden</u>	18
2.2.1 Gewinnung der Augenkammerwasser-Proben	18
2.2.2 Einfluß von Gallensäuren auf die Resorption von DICLOFENAC	18
2.2.3 In-situ perfundierte Rattenleber.....	19
2.2.3.1 Perfusat-Herstellung für die in-situ perfundierte Rattenleber.....	19
2.2.3.2 Versuchsaufbau für die in-situ perfundierte Rattenleber.....	20
2.2.3.3 Operationstechnik für die in-situ perfundierte Rattenleber	21
2.2.3.4 Injektion von Proben in die in-situ perfundierte Rattenleber.....	23
2.2.3.5 Katheter-Versuche.....	23
2.2.3.6 Szintillationsmessungen und Verwendung des Mikroplattenlesers	23
<u>2.3 Chromatographie</u>	24
2.3.1 Passivierung (Voroxidation) der HPLC-Anlage bei Verwendung des elektrochemischen Detektors	24
2.3.2 Herstellung mobiler Phasen für die HPLC	25
2.3.2.1 Acetonitril:Natrium-acetat (30 mM).....	25
2.3.2.2 H ₂ O:Acetonitril:30 %ige Essigsäure (pH 4,0)	25
2.3.3 HPLC-Bestimmung von PREDNISOLON-21-ACETAT mit UV-Detektion	26

2.3.4	HPLC-Bestimmung von DICLOFENAC mit UV-Detektion.....	26
2.3.5	HPLC-Bestimmung von DICLOFENAC und OXYBUPROCAIN mit elektrochemischer Detektion (ELCD)	26
2.3.6	HPLC-Bestimmung von DICLOFENAC mit Fluoreszenz-Detektion nach photochemischer Online-Nachsäulenderivatisierung	27
2.3.7	HPLC-Bestimmung von FENOTEROL mit UV- und Fluoreszenz-Detektion.....	28
2.3.8	HPLC-Bestimmung von <i>p</i> -AMINOHIPPURSÄURE (PAH) und <i>p</i> -ACETYLAMINOHIPPURSÄURE (PAAHA) mit UV- und Fluoreszenz-Detektion.....	28
2.3.9	HPLC-Bestimmung von OXYBUPROCAIN mit UV- und Fluoreszenz-Detektion.....	29
2.3.10	Probenvorbereitungen für die HPLC-Analyse.....	29
3.	Ergebnisse	30
3.1	<u>Augenkammerwasser-Proben, Blut-Proben und Perfusat-Lösungen</u>	30
3.2	<u>Synthese der <i>p</i>-ACETYLAMINOHIPPURSÄURE (PAAHA)</u>	30
3.3	<u>HPLC-Bestimmung von PREDNISOLON-21-ACETAT</u>	31
3.4	<u>HPLC-Bestimmung von DICLOFENAC</u>	32
3.5	<u>HPLC-Bestimmung von DICLOFENAC und OXYBUPROCAIN</u>	33
3.5.1	Anwendung der HPLC/ELCD-Methode auf Augenkammerwasser- Proben des Menschen.....	36
3.6	<u>HPLC-Bestimmung von DICLOFENAC nach photochemischer Online-Nachsäulenderivatisierung</u>	38
3.6.1	Emissions- und Excitationsspektrum der CARBAZOL-1- ESSIGSÄURE	38
3.6.2	Einflüsse der Bestrahlungszeit auf die Bildung der Reaktionsprodukte: Offline-Photoderivatisierung	39
3.6.3	Einfluß der Flußgeschwindigkeit auf die Bildung der Reaktionsprodukte: Online-Photoderivatisierung	41
3.6.4	Daten der photochemischen Online-Nachsäulenderivatisierung.....	41
3.6.5	Anwendung der photochemischen Online-Nachsäulenderivatisierung auf Augenkammerwasser-Proben des Menschen	42

3.6.6	Anwendung der photochemischen Online-Nachsäulenderivatisierung auf Perfusat-Proben der Ratte und Blut-Proben des Menschen.....	45
3.7	<u>HPLC-Bestimmung von FENOTEROL</u>	46
3.7.1	Anwendung der FENOTEROL-Methode auf Perfusat-Proben der Ratte .	47
3.8	<u>HPLC-Bestimmung der <i>p</i>-AMINOHIPPURSAURE (PAH) und der <i>p</i>-ACETYLAMINOHIPPURSAURE (PAAHA)</u>	48
3.8.1	Anwendung der PAH- und der PAAHA-Methode auf Serum-Proben des Menschen und auf Perfusat-Proben der Ratte.....	51
3.9	<u>HPLC-Bestimmung von OXYBUPROCAIN</u>	53
3.9.1	Anwendung der OXYBUPROCAIN-Methode auf Augenkammerwasser-Proben des Menschen.....	55
3.10	<u>Darstellung der Ausflußkurven für DICLOFENAC, FENOTEROL, <i>p</i>-AMINOHIPPURSAURE (PAH), <i>p</i>-ACETYLAMINOHIPPURSAURE (PAAHA), ¹⁴C-SACCHAROSE und ³H₂O</u>	55
3.11	<u>Berechnung der Parameter für die Versuche mit der in-situ perfundierten Rattenleber</u>	56
3.12	<u>Einfluß des Katheters auf die Ausflußkurve aus der in-situ perfundierten Rattenleber</u>	61
3.13	<u>Berechnung der Parameter für den extrazellulären Marker ¹⁴C-SACCHAROSE</u> ..	63
3.14	<u>Modellierung der Ausflußkurve mit dem Dispersionsmodell</u>	65
3.15	<u>Modellierung der Ausflußkurve mit dem Bindungsmodell</u>	66
4.	<u>Diskussion</u>	71
4.1	<u>Auswahl der Trennsäule für die Bestimmung von Augenkammerwasser-Proben</u>	71
4.2	<u>Nachstellen des pH-Wertes nach erfolgter Mischung der mobilen Phase</u>	72
4.3	<u>HPLC-Bestimmung von PREDNISOLON-21-ACETAT und DICLOFENAC in Augenkammerwasser-Proben des Menschen</u>	73
4.4	<u>HPLC-Bestimmung von DICLOFENAC und OXYBUPROCAIN</u>	75
4.5	<u>Photochemische Online-Nachsäulenderivatisierung von DICLOFENAC</u>	77
4.5.1	Strahlungsquelle	78
4.5.2	Wahl der Reaktionsschleife	80
4.5.3	HPLC-Bestimmung von DICLOFENAC nach einer photochemischen Online-Nachsäulenderivatisierung	81

4.5.4	Klinische Studie zum Augenkammerwasserspiegel von DICLOFENAC bei Kataraktoperationen.....	83
4.5.5	Versuche zum Einfluß einer Gallensäure auf die DICLOFENAC- Konzentration im Blut des Menschen.....	84
4.6	<u>Die in-situ perfundierte Rattenleber</u>	86
4.6.1	Bestimmung der Viability für die in-situ perfundierte Rattenleber	86
4.6.2	Einflüsse des Katheters und verschiedener Marker auf die Form der Ausflußkurve aus der in-situ perfundierten Rattenleber	87
4.6.3	DICLOFENAC-Bestimmung aus der in-situ perfundierten Rattenleber....	89
4.6.4	FENOTEROL-Bestimmung aus der in-situ perfundierten Rattenleber	92
4.6.5	PAH- und PAAHA-Bestimmung aus der in-situ perfundierten Rattenleber	94
5.	Zusammenfassung und Ausblick	98
6.	Literatur.....	101
	Anhang	

Abkürzungen, Fachausdrücke und Synonyme der verwendeten Wirkstoffe

Abkürzungen

A	: Skalierungsfaktor
AUC	: Area under the curve (Fläche unter der Kurve)
ä.D.	: Äußerer Durchmesser
CAA	: Carbazol-1-acetic acid (Carbazol-1-essigsäure)
C8	: Octyl-Kieselgel
C18	: Octadecyl-Kieselgel
CL	: Clearance
CV ²	: Relative Dispersion (Quadrat des Variationskoeffizienten)
D _N	: Dispersion Number (dimensionsloser Parameter)
ε	: Dielektrizitätskonstante
ELCD	: Elektrochemischer Detektor
ERPF	: Effective Renal Plasma Flow
ETFE	: Tefzel (Copolymerisat aus Ethylen und Tetrafluorethylen)
FL	: Fluoreszenz
Gbq	: Giga Becquerel
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
i.D.	: Innerer Durchmesser
i.v.	: Intravenös
k'	: Retentionsfaktor (früher als Kapazitätsfaktor bezeichnet)
k	: Permeabilitätskonstante
k ₁₂	: Assoziationskonstante [sek ⁻¹]
k ₂₁	: Dissoziationskonstante [sek ⁻¹]
k _{el}	: Eliminationskonstante [sek ⁻¹]
LD ₅₀	: Lethal Dose 50 (tödliche Dosis bei 50 % der untersuchten Tiere)
Mbq	: Mega Becquerel
microAU	: Micro Absorption Units
MTT	: Mean transit time (Mittlere Transitzeit)
MOPS	: 3-[N-Morpholin]propansulfonsäure
nA	: Nano-Ampere
P	: Wichtungsfaktor

PAAHA	: <i>p</i> -Acetylaminohippursäure
PAH	: <i>p</i> -Aminohippursäure
PTFE	: Teflon (Polytetrafluorethylen)
RP	: Reversed Phase (Umkehrphase)
s.c.	: Subcutan
t_m	: Totzeit [min]
t_R	: Retentionszeit [min]
U	: Units [μ mol/min]
UV/Vis	: Ultravioletter bis sichtbarer Lichtwellenbereich
v	: Volumenverhältnis
V	: Verteilungsvolumen
VTT	: Variance of transit time (Varianz der Transitzeit)
μ Ci	: Micro Curie

Fachausdrücke

Antipyretisch	: Fiebersenkend
Bolusinjektion	: Einmalige stoßförmige Injektion
Distal	: Vom Rumpf entfernt gelegen
Intraperitoneal	: In das Bauchfell
Katarakt	: Erkrankung des Auges, die zur Trübung der Augenlinse führt (Grauer Star)
Kaudal	: Richtung Steiß gelegen (schwanzwärts)
Kranial	: Richtung Kopf gelegen (kopfwärts)
Makulaödem	: Schwellung der Netzhaut im Bereich des gelben Flecks
Mydriasis	: Erweiterungszustand der Pupille
Perfusat	: Flüssigkeit, die ein Organ durchströmt
Proximal	: Zur Körpermitte gelegen

Synonyme der verwendeten Wirkstoffe

<i>p</i> -Aminohippursäure	: N-(4-Aminobenzoyl)glycin
Diclofenac	: 2-[(2,6-Dichlorphenyl)amino]benzen-essigsäure; Voltaren [®]
Dihydroxycholansäure	: 3,7-Dihydroxycholansäure; Chenodesoxycholsäure; Chenofalk [®]
Fenoterol	: 5-[1-Hydroxy-2-[[2-(4-hydroxyphenyl)-1-methylethyl]amino]ethyl]-1,3-benzendiol
Oxybuprocain	: 2-Diethylaminoethyl(4-amino-3-butoxybenzoat) hydrochlorid; Benoxinat-hydrochlorid; Dorsacain-hydrochlorid; Novesine [®]
Prednisolon-21-acetat	: 1,4-Pregnadien-3,20-dion-11 β ,17 α ,21-triol 21-acetat; Ultracortenol [®]
Probenecid	: <i>p</i> -Dipropylsulfamoyl-benzoesäure
Xylazin	: Rompun [®]

1. Einleitung und Problemstellung

Die Flüssig-Chromatographie hat ihre Ursprünge zu Beginn dieses Jahrhunderts, als der russische Botaniker Tswett (1906) begann Pflanzenfarbstoffe zu trennen. Diese neue Methode entwickelte sich zuerst aber nur langsam weiter. Erst 1931 trennten Kuhn, Winterstein und Lederer durch Adsorptions-Chromatographie Karotine, die Verteilungs-Chromatographie wurde 1941 von Martin und Synge eingeführt und 1952 die Gas-Flüssig-Chromatographie durch James und Martin (Wintermeyer, 1989, Aced und Möckel, 1991). In den Jahren 1963/64 wurde damit begonnen die theoretischen Erkenntnisse zu hochauflösenden Trennungen für die praktische Anwendung in Laboratorien nutzbar zu machen. Etwa 10 Jahre später konnte sich mit geeignetem Packungsmaterial, Trennsäulen und Peripheriegeräten die heute weit verbreitete Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (engl. High Performance Liquid Chromatography; HPLC) durchsetzen (Unger, 1989). Die HPLC ist im Bereich der Spurenanalytik für nichtflüchtige Substanzen bis heute die Methode der Wahl, die mit hoch empfindlichen Detektoren (z.B. Fluoreszenz- und elektrochemische Detektoren, sowie Massenspektrometer) ausgestattet werden kann. Auch die sich in den letzten Jahren rasch entwickelnde High Performance Capillary Electrophoresis (HPCE) stellt nur eine Ergänzung der HPLC dar, wird aber durch ihre systemimmanente Detektionsschwäche (sehr kurze Lichtwege; 20-100 μm) nie so geringe Konzentrationen bestimmen können wie die HPLC. Genau diese niedrigen Nachweisgrenzen sind aber für die quantitativen Bestimmungen in der Biologie, Medizin und Pharmakologie von großem Wert. Die HPLC wird u.a. zur Routineanalytik von Arzneimitteln genutzt, hat ihre aber noch größere Bedeutung in der Analyse biologischer Proben. Pharmakologische Studien an Mensch und Tier bedürfen sensitiver und selektiver Nachweismethoden. Diese bilden die Grundlage einer erfolgreichen Versuchsdurchführung. Im folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten Wirkstoffe näher charakterisiert, grundlegende Begriffe der Pharmakokinetik erläutert und einzelne Modelle zur Modellierung von Konzentrations-Zeit-Verläufen beschrieben:

DICLOFENAC

Das nichtsteroidale Antiphlogistikum Diclofenac (Abb. 1) hemmt im Arachidonsäure-Stoffwechsel den Cyclooxygenase-Weg (selektiv die COX2; Brune und Hinz, 1998) und indirekt auch den Lipoxygenase-Weg (Brogden *et al.*, 1980, Ku *et al.*, 1985, Scholer *et al.*, 1986, Goa und Crisp, 1992, Roberts und Brennan, 1994) und dadurch die Bildung von

Prostaglandinen, Prostacyclinen, Thromboxanen und Leukotrienen, die eine wesentliche Rolle als Mediatoren und Modulatoren bei Entzündungsreaktionen spielen (Abb. 2). Zur medizinischen Anwendung gelangt Diclofenac vor allem auf dem Gebiet der Rheumaerkrankungen und zur Verhinderung von Entzündungsreaktionen, z.B. beim präoperativen Einsatz am Auge (Kataraktextraktion). Neben dieser Entzündungshemmung zeigt Diclofenac auch noch analgetische und antipyretische Aktivität (Lewis und Furst, 1987).

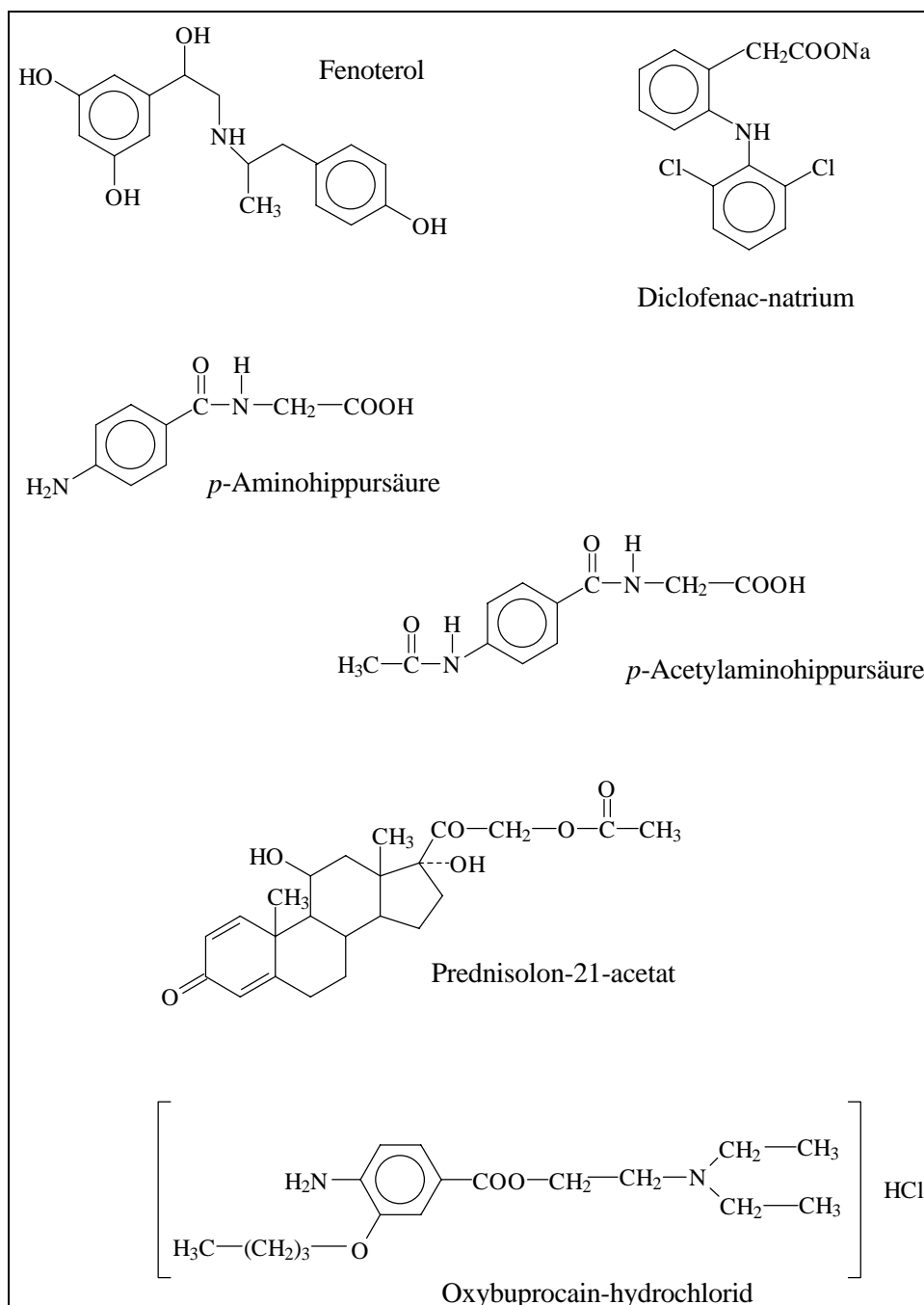


Abb. 1: Chemische Strukturformeln der untersuchten Wirkstoffe.

FENOTEROL

Fenoterol (Abb. 1) ist ein β_2 -Sympathomimetikum und wirkt bevorzugt auf β_2 -Rezeptoren. Die drei phenolischen und die eine alkoholische Hydroxylgruppe bedingen gemeinsam mit dem Substituenten an der sekundären Aminogruppe eine hohe Affinität zu β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren (Forth *et al.*, 1992). Von therapeutischer Relevanz sind β_2 -Adrenozeptor-Agonisten aufgrund ihrer glattmuskulär erschlaffenden Wirkung (hervorgerufen durch die Aktivierung der Adenylatcyclase und der daraus resultierenden Erhöhung des cAMP-Spiegels). Fenoterol wird bei chronischen Atemwegserkrankungen (Asthma bronchiale) zur Erweiterung der Bronchien und zur Erschlaffung der Uterus-Muskulatur bei vorzeitig einsetzenden Wehen (Tokolyse) eingesetzt (Forth *et al.*, 1992). Das chirale Fenoterol kommt therapeutisch als Razemat zum Einsatz (Lüllmann *et al.*, 1994).

p-AMINOHIPPURSÄURE (PAH)

Die Gesamtdurchblutung beider Nieren beim erwachsenen Menschen liegt bei ca. 1,2 L/min (1700 L/Tag), wobei 90 % auf die Nierenrinde und 10 % auf das Nierenmark entfallen. Damit gehört die Niere, neben der Leber, zu den am stärksten durchbluteten Organen. Zur Messung der Nierenfunktion werden der effektive renale Plasmafluß (ERPF) und die tubuläre Sekretionskapazität bereits seit über 50 Jahren mit Hilfe der *p*-Aminohippursäure (PAH) bestimmt (Newman *et al.*, 1949, Freestone *et al.*, 1985, McAulane *et al.*, 1987, Prescott *et al.*, 1993) (Abb. 1). PAH wird bei einer einzigen Nierenpassage nahezu vollständig eliminiert (Mutschler, 1996). Daraus ergibt sich, daß ihr Clearance-Wert (siehe Seite 5) identisch ist mit dem ERPF ($CL_{PAH} = ERPF$). Die maximale sekretorische Kapazität kann daher nach ausreichender intravenöser Applikation (einige Gramm beim Menschen) aus der Menge die pro Minute im Urin ausgeschieden wird und der PAH-Plasmakonzentration errechnet werden (Ammon, 1991). Den wichtigsten Metaboliten stellt die *p*-Acetylaminohippursäure (PAAHA) (Abb. 1) dar.

PREDNISOLON-21-ACETAT

Wie alle Cortikosteroide hemmt auch Prednisolon-21-acetat (Abb. 1) die Phospholipase A2 und damit die Synthese der Arachidonsäure. Sie wirkt direkt sowohl auf den Lipoxxygenase- als auch auf den Cyclooxygenase-Weg (siehe auch Diclofenac) und besitzt dadurch entzündungshemmende Wirkung (Abb. 2). Eine lokale Glukocortikosteroid-Applikation stellt zwar zur Zeit die Standardtherapie zur Entzündungshemmung bei der Kataraktextraktion dar (Strobel *et al.*, 1991, Herbort, 1992), geht aber mit zahlreichen

Nebenwirkungen einher (Augendrucksteigerung, Wundheilungsstörungen, Begünstigung viraler Infektionen) (Schäfer, 1994). Aus diesem Grund kommen vermehrt nichtsteroidale Antiphlogistika zur Anwendung (z.B. Diclofenac). Prednisolon-21-acetat ist ein synthetisches Glucocortikosteroid und weist eine 4fach stärkere Wirkung als das natürliche Nebennierenrindenhormon Cortisol auf.

OXYBUPROCAIN

Das Lokalanästhetikum vom Estertyp Oxybuprocain (Abb. 1) diffundiert infolge seiner Lipophilie in den intraaxialen Raum von Nervenfasern und setzt die Permeabilität der Axonmembran für Natriumionen herab, wodurch die Leitung des Aktionspotentials unterbrochen wird. Es kommt so zu einer Blockade der Erregungsleitung an sensorischen Nervenfasern und zur Hemmung der Erregbarkeit von schmerzvermittelnden Rezeptoren. Oxybuprocain wird prä- und perioperativ zur lokalen Oberflächenanästhesie bei Kataraktextraktionen verwendet. Neben der anästhetischen besitzt Oxybuprocain auch noch eine bakteriostatische Wirkung. Oxybuprocain wird durch im Plasma vorhandene Esterasen abgebaut (Ammon, 1991).

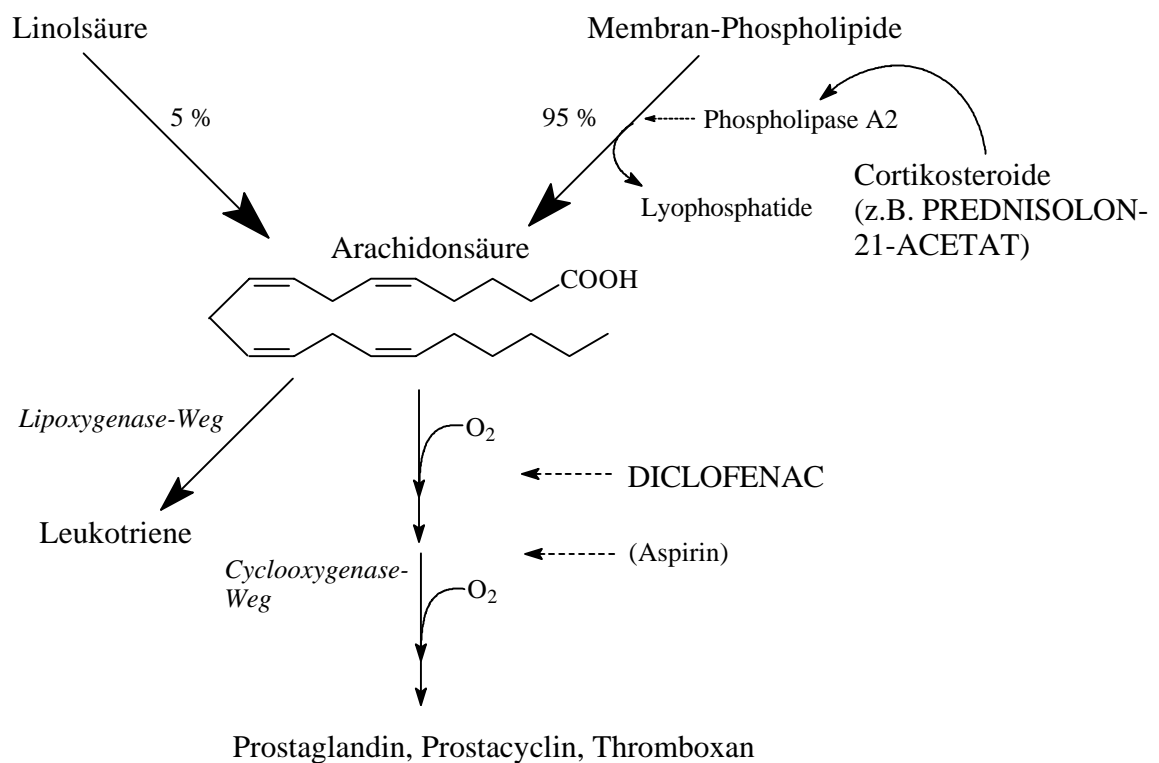


Abb. 2: Schematische Darstellung des Wirkungsmechanismus von Prednisolon-21-acetat und Diclofenac.

Bei der Entwicklung neuer Arzneimittel und bei der Untersuchung ihrer pharmakokinetischer Eigenschaften sind zahlreiche Faktoren zu beachten. Die drei Hauptfaktoren, die die biologische Wirkung eines Arzneimittels beeinflussen, sind die **Absorption** des Wirkstoffes, die sich anschließende **Verteilung** im Körper und schließlich die **Elimination** (Tab. 1). Dabei sind stets die physiologischen Faktoren wie Alter, Geschlecht, Körpergewicht, Streß, Genetik, Schwangerschaft, Umwelt u.s.w. zu beachten (Klotz, 1984).

Tab. 1: Einflußfaktoren auf die biologische Wirkung von Arzneimitteln (nach: Klotz, 1984).

Absorption	Verteilung	Elimination	
		I) Stoffwechsel	II) Exkretion
- Dosisform	- Verteilungsvolumen	- Leberfunktion	- Nierenfunktion
- Applikationsform	- Plasmaproteinbindung	- Proteinbindung	- Proteinbindung
- Physiologische Faktoren	- Gewebefindung	- Leberdurchblutung	- Andere Ausscheidungs-
- Nahrung	- Membranbarrieren	- Metabolische Kapazität	formen
- Andere Medikamente	- Perfusion	- Hemmung/Induktion	- Urin-pH
- First-Pass-Effect	- Zirkulationssysteme	- Diät	- Physiologische
- Bioverfügbarkeit		- Extrahepatischer Abbau	Faktoren
		- Physiologische	
		Faktoren	

Der Begriff Kinetik ist definiert als die spontane Tendenz eines Systems einem Gleichgewichtszustand zuzustreben (Landau und Lifschitz, 1963). Der Ausdruck **Pharmakokinetik** wurde erstmals 1953 verwendet (Dost, 1953) und beschreibt die Reaktion des Organismus auf das Pharmakon, wohingegen die **Pharmakodynamik** dessen Umkehrung beschreibt, die Wirkung des Pharmakons auf den Körper. Das Ziel weitergehender Untersuchungen von Wirkstoffen ist das Verstehen der Beziehung zwischen der dem Körper applizierten Dosis und dem erzielten Effekt. Das Verständnis dieser Dosis-Wirkungsbeziehung bedarf einer kurzen Einführung in einige Parameter der Pharmakokinetik (Klotz, 1984, Derendorf und Garrett, 1987, Weiss, 1990, Forth *et al.*, 1992, Wellhöner, 1997).

Alle körperfremden Substanzen unterliegen der **Biotransformation**, die an erster Stelle in der Leber (ca. 95 %), an zweiter Stelle in der Niere und schließlich in jeder einzelnen Zelle des Körpers abläuft. Die hierbei zugrunde liegenden Prozesse beinhalten die Konversion dieser Substanzen zu polareren Verbindungen, welche dann leichter über die Niere in den

Urin abgegeben werden können (Williams, 1959, Meyer, 1996). Diese Biotransformation dient der Entgiftung des Körpers und wird durch zwei chemische Phasen gekennzeichnet (Tab. 2). Die **Phase I-Reaktionen** entfernen nichtpolare Gruppen oder führen polarere Gruppen meist durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse in das Molekül ein. Die **Phase II-Reaktionen** konjugieren polare Gruppen und bilden dadurch polarere Verbindungen.

Tab. 2: Phase I- und Phase II-Reaktionen (nach: Gillette, 1971).

Phase I-Reaktionen	Phase II-Reaktionen
- Oxidationen	- <u>Konjugation mit:</u>
- Reduktionen	a) Glucuronsäure
- Hydrolysen	b) Schwefelsäure
- Dehalogenierungen	c) Aminosäuren
- Desulfurierung	d) Glutathion
- Azoreduktionen	e) Essigsäure
- Dealkylierungen	f) Methylgruppen

Die eingesetzten Konzentrationen der meisten Medikamente liegen unterhalb des Sättigungsbereiches der Elimination (Exkretion und/oder Metabolisierung), weshalb man von einer linearen Kinetik ausgehen kann. Die Eliminationsgeschwindigkeit des Wirkstoffes ist nach dem Clearance-Konzept zu jedem Zeitpunkt proportional der gemessenen Konzentration (Weiss, 1990):

$$\frac{dAe}{dt} = CL \cdot C(t) \quad [1]$$

CL = Clearance
 C(t) = Konzentration
 Ae(t) = Bereits eliminierte Menge

Unter dem Begriff **Clearance (CL)** ist das konstante Verhältnis zwischen der Eliminationsrate und der Konzentration am Eliminationsort zu verstehen. Im Zeitpunkt unendlich (∞) ist die Elimination:

$$Ae(\infty) = CL \int_0^{\infty} C(t) \cdot dt \quad [2]$$

Die Fläche unter der **Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC)** gilt als Maß der systemischen Exposition. AUC ist das Integral der Konzentration über die Zeit. Es gilt:

$$Ae(\infty) = CL \cdot AUC \quad [3]$$

Nach dem Massenerhaltungsgesetz ist die **ausgeschiedene Menge (Ae)** zum Zeitpunkt unendlich (∞) der gegebenen **Dosis (D)** gleichzusetzen. Daraus folgert:

$$AUC = \frac{D}{CL} \quad \text{und} \quad AUC = \int_0^{\infty} C(t) \cdot dt \quad [4, 5]$$

Der Dosisanteil, der in den Körperkreislauf gelangt, ist biologisch verfügbar. Das Verhältnis von verfügbarer zur tatsächlich applizierten Menge wird **Bioverfügbarkeit (F)** genannt. Bei Berücksichtigung einer Metabolisierung muß die Bioverfügbarkeit in die Formel mit einfließen:

$$AUC = \frac{F \cdot D}{CL} \quad [6]$$

Durch Berechnung des **Verteilungsvolumens (V)** eines isolierten Organes lassen sich indirekte Hinweise über das Ausmaß der Gewebefindung finden. Es ist eine hypothetische Größe, um physiologische Verteilungsvorgänge von Pharmaka einer mathematischen Beschreibung und Berechnung zugänglich zu machen (Klotz, 1984). So wird bei einem Wirkstoff, der stark an Blutbestandteile bindet, V klein, während ein großes V meist dann vorliegt, wenn diese Bindung gering ist. V ergibt sich aus dem Produkt der **Flußrate (Q)** des Blutes (oder der Perfusat-Lösung) und der **mittleren Transitzeit (MTT)**:

$$V = MTT \cdot Q \quad [7]$$

Die mittlere Transitzeit (MTT) und die **Varianz (VTT)** stellen die wichtigsten Maßzahlen der Verweilzeitverteilung dar (Weiss, 1990). Das Quadrat des Variationskoeffizienten (CV^2) wird als **relative Dispersion** bezeichnet und ist als Streuungsmaß von Bedeutung (Weiss, 1990 und 1997):

$$CV^2 = \frac{VTT}{MTT^2} \quad [8]$$

Verschiedene **pharmakokinetische Modelle** versuchen die vielfältigen und komplexen Funktionen des Organismus in einer vereinfachten Form darzustellen und so einer kinetischen Betrachtungsweise zugänglich zu machen. Der Körper wird dabei im Sinne unterschiedlicher hypothetischer Verteilungsräume (Verteilungsvolumen, V) mit verschiedenen Körperflüssigkeiten und Geweberäumen dargestellt. Nach erfolgter Absorption gelangt das Arzneimittel in diese Kompartimente und wird allmählich wieder

ausgeschieden (**Elimination, k_{el}**). Der Körper ist also ein offenes System, in dem der Stofftransport durch Geschwindigkeitskonstanten (k_{12} , k_{21}) beschrieben wird. Von einfachen Modellen ausgehend wurden immer komplexere Modelle, die die Abläufe im Körper zunehmend besser beschrieben, entwickelt. Dabei war es wichtig die Modellierung für einzelne Organe zu optimieren (**Organmodell**), wodurch der Körper als Gesamtheit besser verstanden werden konnte. Die experimentelle Grundlage bildeten, neben Arbeiten mit Zellkulturen, oft perfundierte Organe, die entweder ganz vom Körper isoliert (isoliert-perfundierte Organe) oder aber, im Körper verbleibend, nur von zu- und ableitenden Gefäßen getrennt wurden (in-situ perfundierte Organe). Die Strömungsgeschwindigkeiten (**Q**) des Perfusats durch die Organe, die zu verabreichende Dosis und der resultierende Konzentrations-Zeit-Verlauf (**$C_{(t)}$**) ließen sich so einfach kontrollieren (Abb. 3).

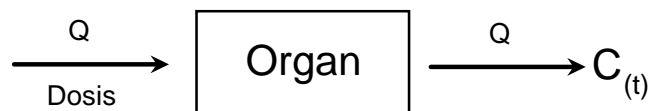


Abb. 3: Schematische Darstellung der theoretischen Grundlagen für perfundierte Organe.

Die verschiedenen Organmodelle versuchen zu modellieren was zwischen dem Verabreichen einer definierten Dosis (Bolusinjektion; Input) und dem zu messenden Output ($C_{(t)}$) passiert (Abb. 4). Dabei unterscheiden sich die Modelle in der Vorstellung des zu untersuchenden Systems und der daraus resultierenden mathematischen Umsetzung.

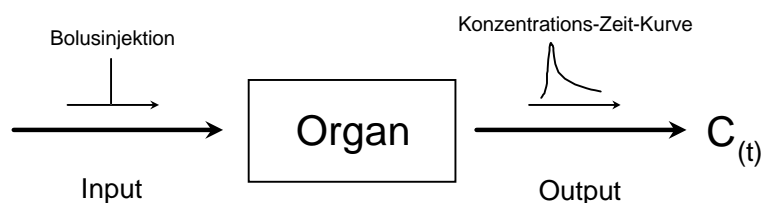


Abb. 4: Grundlagen der Organmodelle.

Da die Leber das wichtigste Organ für Metabolisierungs- und Eliminationsprozesse von endogenen Substanzen darstellt, steht sie auch im Mittelpunkt zahlreicher Modellierungsversuche (Keiding und Andreasen, 1979). Die physikochemischen Eigenschaften von Arzneimitteln beeinflussen dabei die hepatische Verteilung und der Einfluß der Leber auf ein Arzneimittel wirkt sich auf die Pharmakokinetik des gesamten Körpers aus. Neben dem Einfluß der Verteilung eines Wirkstoffes innerhalb der Sinusoide und der Hepatozyten (Abb. 5) muß auch die Elimination in die Modellierungen einfließen.

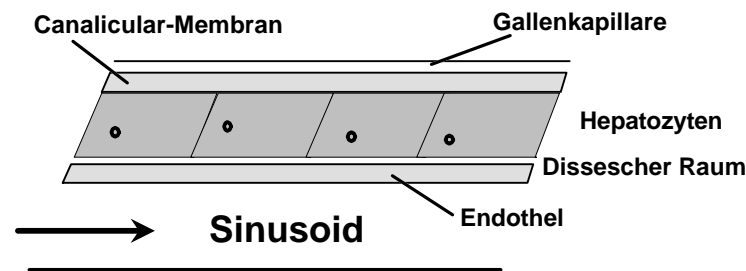


Abb. 5: Schematische Darstellung eines Leberquerschnitts.

Das zur Leber fließende Blut erreicht diese zu ca. 2/3 über die Lebervene und zu ca. 1/3 über die Leberarterie. Mit diesen Blutströmen gelangen auch die Arzneistoffe in die Leber. Der Transport kann frei im Blutstrom oder aber an Trägersubstanzen gebunden erfolgen (z.B. am Albumin). Nach der Dissoziation vom Träger erfolgt eine Translokation vom vaskulären Raum (Sinusoid) zur Hepatozyten-Membran, gefolgt von dem Transport oder der Permeation durch die Membran (Abb. 5). Den nächsten Schritt stellt der intrazelluläre Transport und die Bindung an Enzyme (Phase I- oder Phase II-Enzyme) dar. Nach einer möglichen Metabolisierung kann der Transport durch die Canalicular-Membran zwecks Exkretion oder aber zurück in die Sinusoide und damit zur systemischen Zirkulation erfolgen. Pharmakologische Modelle vereinfachen diese Prozesse, von denen sich jeder einzelne limitierend auf das Gesamtsystem auswirken kann.

Das einfachste **Lebermodell** für die Analyse pharmakokinetischer Daten ist das sogenannte „well-stirred“ oder Gleichverteilungsmodell (mit vollständiger Durchmischung) (Rowland *et al.*, 1973). Hierbei wird die Leber als ein einziges gut gerührtes Gesamtkompartiment angesehen, in dem überall die gleiche Konzentration eines Stoffes vorliegt (Abb. 6-A). Eine Alternative hierzu stellt das „parallel tube“ oder Röhrenmodell (Winkler *et al.*, 1973) dar, in dem die Leber als ein Netzwerk paralleler Röhren angesehen wird (ohne jegliche Durchmischung) (Abb. 6-B; siehe auch Pang und Rowland, 1977a, 1977b, 1977c). Neben der begrenzten praktischen Anwendbarkeit ist der Hauptkritikpunkt beider Modelle, daß sie die physiologischen Verhältnisse in der Leber nicht einmal annähernd richtig beschreiben. Das aus dem Konvektions-Diffusionsmodell von Perl und Chinard (1968) hervorgegangene axiale Dispersionsmodell (Roberts und Rowland 1986a, 1986b, 1986c, 1986d, Yano *et al.*, 1990, Evans *et al.*, 1993, Hussein *et al.*, 1993) (Abb. 6-C) ist weitaus interessanter, berücksichtigt es doch die Anatomie des Leberaufbaus. Weitere komplexe Modelle sind das

Goresky-Modell (Goresky, 1963), das Distributionmodell (Forker und Luxon, 1978, Luxon und Forker, 1982) und das Kettenmodell (Weisiger *et al.*, 1986, Gray und Tam 1987).

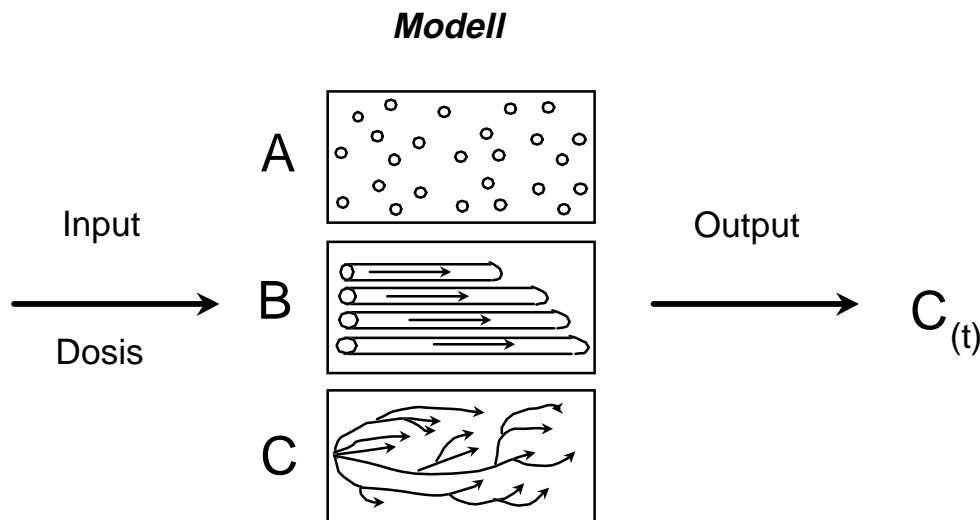


Abb. 6: Darstellung verschiedener Lebermodellvorstellungen: A) Gleichverteilungsmodell, B) Röhrenmodell und C) Dispersionsmodell.

Das physiologisch orientierte **Organmodell** von Weiss und Roberts (1996) beschreibt die Verteilungsdynamik von Pharmaka an isoliert-perfundierten Organen. Der Einsatz als Lebermodell sollte mit dieser Arbeit vorangetrieben werden. Die experimentelle Grundlage der Datenermittlung bildete dazu die in-situ perfundierte Rattenleber (Kap. 2.2.3).

Ziel aller beschriebenen Modellierungsversuchen ist es, die ermittelten Daten zusammenfassen zu können, ablaufende Prozesse besser zu verstehen, verlässliche Voraussagen zu ermöglichen und auch eine bessere Versuchsplanung zukünftiger Experimente zu erlauben. Der Vergleich verschiedener Arzneimittel und das Verständnis für quantitative Beziehungen zwischen pharmakokinetischen Daten und biologischen Wirkungen (Effektkinetik) wird so erst möglich.

Die **Problemstellung** dieser Arbeit umfaßte zum einen die Entwicklung sensitiver und selektiver HPLC-Methoden zum Spurennachweis von Pharmaka in biologischen Matrices (Blut, Augenkammerwasser und Perfusat). Dabei sollten spezielle Kopplungstechniken (UV-, Fluoreszenz- und elektrochemische Detektion, sowie photochemische Nachsäulen-derivatisierung) zum Einsatz kommen. Auf diese Analytik aufbauend sollten zum anderen dann im zweiten Teil der Arbeit verschiedene Versuche durchgeführt und ausgewertet werden. Hierbei standen vor allem pharmakokinetische Modellierungen im Vordergrund.

Die in der Augenheilkunde bereits eingesetzten Wirkstoffe Diclofenac, Prednisolon-21-acetat und Oxybuprocain sollten durch klinische Studien weiteren Untersuchungen unterzogen werden. Zielsetzung hierbei war der Erhalt neuer Erkenntnisse zum topischen Wirkstofftransport, woraus sich eine Verbesserung der Wirkstoffapplikation ergeben sollte. Das betraf die Applikationsmenge, die Applikationsform und den Zeitpunkt der Applikation. Die Messung der Wirkstoff-Konzentrationsverläufe sollte in Augenkammerwasser-Proben von Menschen (Abb. 7), die sich Kataraktoperationen (Implantation einer künstlichen Hinterkammerlinse) unterziehen mußten, erfolgen.

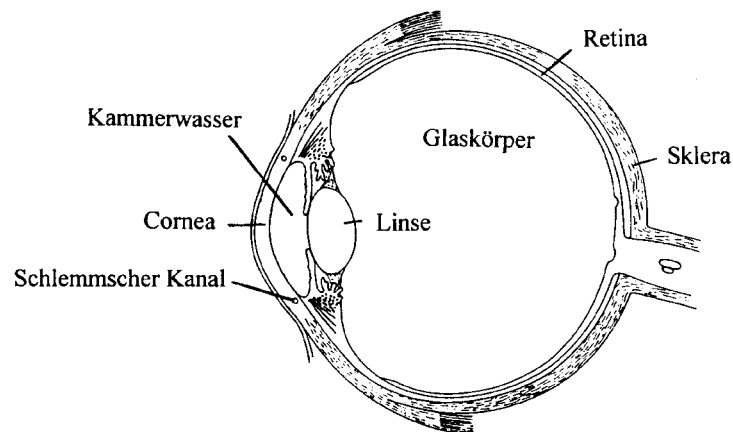


Abb. 7: Schnitt durch ein Auge eines erwachsenen Menschen (nach: Remane *et al.*, 1989).

Die Entwicklung pharmakokinetischer Modelle benötigt für deren Validierung umfangreiche und präzise Datensätze. Die Analytik der Wirkstoffe in biologischen Proben (Blut, Perfusat) und deren Quantifizierung umfaßte hierbei die Substanzen Fenoterol, Diclofenac, *p*-Aminohippursäure und deren wichtigster Metabolit die *p*-Acetylaminohippursäure. Die Auswertung der Daten sollte mit neuen pharmakokinetischen Modellen erfolgen. Die Entwicklung solcher Modelle und deren Validierung stellt eine große Herausforderung dar. In Anbetracht der immensen Entwicklungskosten von ca. 700 Millionen Deutsche Mark für nur ein einziges neues Arzneimittel könnten solche Modellierungen helfen, tiefgehende Informationen zur Kinetik von Pharmaka zu gewinnen und so letztendlich auch Geld und Entwicklungszeit einzusparen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Aldrich-Chemie GmbH + Co. KG, Steinheim

Prednisolon, 98 %

Oxybuprocain-hydrochlorid, 97 %

Amersham, Life-Science, Australien

$^3\text{H}_2\text{O}$ (0,1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$; 925 GBq/mmol)

Bayer Australia Ltd., Pymble, Australien

Rompun[®] (20 mg/mL Xylazin)

BDH Chemicals, Kilsyth, Australien

Eisessig, >99,8 %

Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe

Rinderserumalbumin, 98 %

CIBA Vision Ophthalmics GmbH, Germering

Novesine[®]-Augentropfen 0,4 % (Oxybuprocain-hydrochlorid)

Voltaren[®]-Augentropfen 0,1 % (Diclofenac-natrium)

Ultracortenol[®]-Augentropfen 0,5 % (Prednisolon-21-acetat)

David Bull Laboratories, Australien

Heparin-natrium

DuPont, NEN Products, Boston, U.S.A.

^{14}C -Saccharose (16,4 GBq/mmol)

E. Kocher, Australien

^{14}C -Diclofenac (1,58 MBq/mg)

Dr. Falk GmbH + Co., Germering

Dihydroxycholansäure (Chenofalk[®]-Kapseln)

Fluka Chemie AG, Neu-Ulm

Natriumacetat-anhydrat, >99,5 %

Hewlett-Packard Australia Ltd., Australien

Ultima Gold (Szintillationsflüssigkeit)

Laborchemie, Apolda

Isopropanol, Reinst

Perchlorsäure, HClO_4 , 70 %

Phosphorsäure, H_3PO_4 , 85 %

Salpetersäure, HNO_3 , 85 %

Merck KGaA, Darmstadt

Acetonitril-Gradient Grade

Aluminiumoxid, Al_2O_3

Chromschwefelsäure

Methanol-Gradient Grade

Parnell Laboratories Pty. Ltd., Alexandria, Australien

Ketamin-hydrochlorid

Riedel-de Haen AG, Seelze

Evans Blue

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

p-Aminohippursäure-natriumsalz

Calciumchlorid, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

Diclofenac-natriumsalz, >99 %

Essigsäureanhydrid
Fenoterol-hydrobromid
Glucose
Kaliumchlorid, KCl
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4
Magnesiumsulfat, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
MOPS, >99,5 %
Natriumchlorid, NaCl
Natriumhydroxid, NaOH
Prednisolon-21-acetat, >97 %
Probenecid
Rinderserumalbumin, 98 %

Univor-Reagents, Ajax Chemicals, Pty , Auburn, Australien
Perchlorsäure, HClO_4

Whatman Int. Ltd., Maidstone, England
Whatman 541-Filterpapier

WTW, Weilheim
Elektrolytlösung 3 mol/L KCl

2.1.1.1 Synthese der *p*-ACETYLAMINOHIPPURSÄURE (nach Stolk *et al.*, 1985)

97 mg *p*-Aminohippursäure (PAH) wurden in 1000 μL einer 0,5 M NaOH gelöst. Nach Zugabe von 102 mg Essigsäureanhydrid wurde diese Mischung für 40 min gerührt. Der sich bildende gelblich-weiße Niederschlag wurde unter Anlegen eines Vakuums vom Überstand befreit, dreimal mit 5 mL eiskaltem Ethanol gewaschen und anschließend bei 50 °C getrocknet. Die entstandene *p*-Acetylaminohippursäure (PAAHA) wurde in lichtundurchlässigen Glasgefäßen bei Raumtemperatur gelagert.

2.1.2 Laborgeräte

2.1.2.1 Konstruktion des Photochemischen Reaktors

Für die photochemische Nachsäulenderivatisierung von Diclofenac und der anschließenden Messung des entstehenden Produktes mit einem Fluoreszenz-Detektor, wurde ein photochemischer Reaktor konstruiert. Dazu wurde ein Quecksilberniederdruckstrahler der Firma OSRAM verwendet (HNS 15 OFR), der mit handelsüblichen Fassungen und einem elektrischen Vorschaltgerät (Drossel) auf eine nicht brennbare Unterlage montiert wurde. Dabei war sicherzustellen, daß zwischen dem Lampenrohr (Abb. 8) und der Unterlage ausreichend Platz zur Verfügung stand (mind. 1 cm), um noch eine Tefzel-Kapillare (Plasticell Vertriebs GmbH, Radolfzell) um den Lampenkörper wickeln zu können. Die 20 m lange Tefzel-Kapillare (ä.D.: 1,59 mm; i.D.: 0,25 mm) wurde vor dem Umwickeln der UV-Lampe noch zu einem ca. 4,30 m langem Band verhäkelt (Kuhlmann und Krauss, 1997). Um die Bildung von Sollbruchstellen beim Häkeln zu verhindern, wurde die Tefzel-Kapillare zuerst mit Wasser gefüllt und an beiden Enden unter Erhitzung verschlossen. Anschließend wurde die Tefzel-Kapillare mit sogenannten „Luftmaschen“ verhäkelt (Abb. I, Anhang). Die so verarbeitete Tefzel-Kapillare wurde dann mit handelsüblichen PEEK Doppelferrulen zwischen die Trennsäule und dem Detektorsystem eingebunden. Die gesamte Einheit wurde mit Aluminiumfolie umwickelt, um eine Exposition von Personen mit schädlicher UVC-Strahlung zu vermeiden.

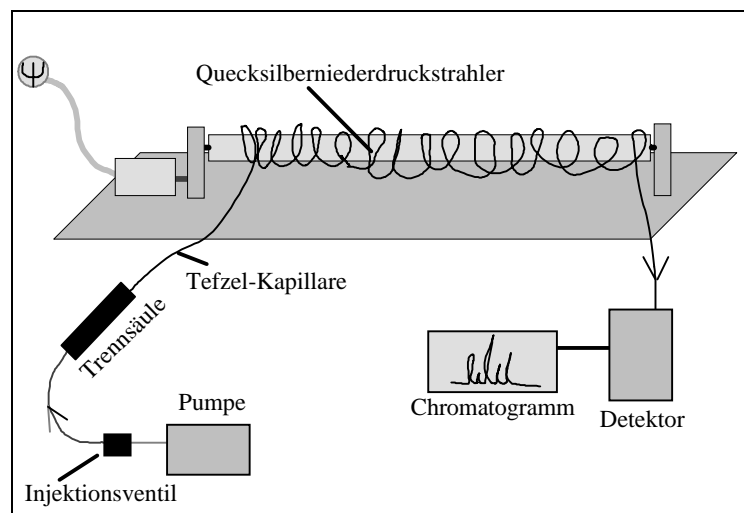


Abb. 8: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage mit einem photochemischen Reaktor.

Die Daten des Quecksilberniederdruckstrahlers HNS 15 OFR sind laut Hersteller (OSRAM, 1996):

Lampenleistung:	15 Watt
UV-Strahlungsleistung:	3,5 Watt
Wellenlänge:	253,7 nm
Bestrahlungsstärke:	40 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$
Rohrdurchmesser:	26 mm
Rohrlänge:	378 mm
Lebensdauer:	ca. 5000 h

2.1.2.2 Chromatographische Systeme

HPLC-Anlage der Firma Spectra-Physics, Darmstadt-Kranichstein

Pumpe:	P2000
Injektion:	Autosampler AS1000 (20 μL -Probenschleife) oder Hand-Injektor (20 μL), Rheodyne, Cotati, U.S.A.
Detektor 1:	UV3000/FOCUS/SM5000
Detektor 2:	Fluoreszenz-Detektor FL2000
Schnittstelle:	SN4000
Auswertesystem:	Mikroprozessor 486 DX 120
Software:	PC1000 Version 3.0, Thermo Separation Products, Darmstadt-Kranichstein

HPLC-Anlage mit Elektrochemischen Detektor

Pumpe:	Isokratische Pumpe, Merck, Darmstadt
Detektor:	Elektrochemischer (amperometrischer) Detektor L-3500 A, Merck/Recipe, Darmstadt
Arbeitselektrode:	Kohlenstoffelektrode in Borosilikatglas
Hilfselektrode:	V4A-Edelstahl
Referenzelektrode:	gefüllt mit 3 M NaCl
Auswertesystem:	Integrator D-2500, Merck/Hitachi, Darmstadt
Injektion:	Hand-Injektor (20 μL -Probenschleife), Rheodyne, Cotati, U.S.A.

Die Kohlenstoffelektrode wurde mit Schleifpaste (Al_2O_3) oder konzentrierter Chromschwefelsäure gereinigt.

HPLC-Anlage der Firma Shimadzu, Australien

Pumpe:	LC-10AS
Injektion:	Autosampler SIL-6B, 20 μL Probenschleife
Detektor 1:	UV-Detektor SPD-6A
Detektor 2:	Fluoreszenz-Detektor RF-551
Schnittstelle:	SCL-6B
Auswertesystem:	Mikroprozessor 486, 25 MHz
Software:	DELTA, Chromatography Data System 5.0, Digital Solutions Pty. Ltd., Margate, Australien

HPLC-Säulen

Reversed-Phase-Säule: SPS-5PM-S5-100-C8 , Regis Chemical Company,
Morton Grove, U.S.A.

Reversed-Phase-Säule: Superspher 100 RP-18 (4 μm), 25 cm, Merck,
Darmstadt

Reversed-Phase-Säule: Octyl-Si 100 (5 μm), 25 cm, Serva, Heidelberg

HPLC-Vorsäule

LiChroCART 4-4; LiChrospher 100 RP-18 (5 μm), Merck, Darmstadt

2.1.2.3 Weitere Laborgeräte

- Spektrometer: Fluoreszenzspektrometer, F-3010, Hitachi Ltd., Düsseldorf
- Szintillationszähler: MINAXIB TRICARB[®], 4000 Serie, United Technologies
Packard, Packard Instruments Co., U.S.A.
- Mikroplattenleser: BIO-RAD, Modell 3550, BIO-RAD, Australien
- Reinstwasseranlage: SERALPUR Pro 90 CN, Seral, Gelman Sciences Inc.,
Ann Arbor, U.S.A.

- Blut-Gasbestimmung: BGM 1312, Blood Gas Manager, Instrumentation
Laboratory, Italien

Alle weiteren Geräte (Pipetten, Waagen, Magnetrührer, Tischzentrifugen, pH-Meter etc.) gehören zur normalen Laborausstattung und werden nicht weiter bezeichnet.

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung der Augenkammerwasser-Proben

Die Augenkammerwasser-Proben wurden durch den Operateur der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Medizinischen Fakultät in Halle bei Kataraktextraktionen unmittelbar bei Operationsbeginn mittels Vorderkammerpunktion gewonnen und anschließend bei -20 °C gelagert. Die Volumina dieser Proben beliefen sich auf ca. 40-150 µL. Die vor der Operation als Augentropfen eingesetzten Wirkstoffe Diclofenac, Prednisolon-21-acetat und Oxybuprocain sollten in den Proben quantitativ bestimmt werden. Dabei wurde die Applikationszeit für Diclofenac und Prednisolon-21-acetat variiert. Für Prednisolon-21-acetat gelangten auch verschiedene Applikationsformen (Tropfen- und Gel-Form) zum Einsatz.

Die mit dem Einverständnis ausgewählter Patienten in der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde in Halle durchgeführten Studien waren von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt worden.

2.2.2 Einfluß von Gallensäuren auf die Resorption von DICOFENAC

In diesem Pilotversuch wurden einer weiblichen Probandin vier Kapseln mit je 250 mg der Gallensäure Dihydroxycholansäure (Chenofalk[®]-Kapseln) zusammen mit einem frischem Eigelb und Diclofenac (Retard-Tabletten mit 50 mg Diclofenac) gegeben. Als Vergleichswert war 4 Tage vorher der gleiche Versuch jedoch ohne Gabe des Gallensalzes durchgeführt worden. Die Blutabnahme in 9 mL heparinisierten Sarstedt-Lithium-Monovetten am linken Arm erfolgte in einem Abstand von 30 min. Die Proben wurden nach der Entnahme sofort bei 5500 rpm (Janetzki-Zentrifuge K 26) für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das getrennte Plasma wurde in zwei Plastikcups zu etwa gleichen Teilen gefüllt und bei -20 °C gelagert.

2.2.3 In-situ perfundierte Rattenleber

Alle Versuche an der in-situ perfundierten Rattenleber wurden im Institut für Medizin der Universität von Queensland/Brisbane (Australien) durchgeführt und durch die zuständige Versuchs- und Ethikkommission der Universität genehmigt. Für die Versuche wurden WISTAR-Ratten aus der Versuchstierfarm der Universität von Queensland verwendet (Tab. III, Anhang). Die Ratten wurden im Tierhaus des Princess-Alexandra-Krankenhauses in Brisbane bei freiem Futterzugang gehalten ($20,0\text{ °C} \pm 0,5$; relative Luftfeuchtigkeit 55-75 %; 12 Stunden Licht). Das Gewicht der verwendeten Ratten lag zwischen 230 und 480 Gramm.

2.2.3.1 Perfusat-Herstellung für die in-situ perfundierte Rattenleber

Lösung A)

138,98 g NaCl

7,10 g KCl

3,24 g KH_2PO_4

In 2000 mL Reinstwasser lösen und bei 4 °C lagern.

Lösung B)

11,6 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{ H}_2\text{O}$

In 1000 mL Reinstwasser lösen und bei 4 °C lagern

Lösung C)

18,74 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{ H}_2\text{O}$

In 50 mL Reinstwasser lösen und bei 4 °C lagern.

Perfusat-Lösung

Zu 200 mL Lösung A) wurden 50 mL Lösung B) und 1 mL Lösung C) gegeben und mit Reinstwasser auf 1000 mL aufgefüllt. Danach wurden 10,46 g MOPS und 4 g Glucose zugegeben und durch Schütteln gelöst. Anschließend wurden noch einmal 6 mL Lösung A) und 3 mL Lösung B) zugegeben. Dieser Ansatz wurde mit Reinstwasser auf 2000 mL aufgefüllt und mit 5 M NaOH wurde der pH-Wert auf ca. 7,4 eingestellt. Unter ständigem Rühren wurden 40 g Rinderserumalbumin (2 % Albumin im Perfusat, w/v) zugegeben.

Nachdem sich das Albumin vollständig gelöst hatte, wurde der pH-Wert mit NaOH auf pH 7,40 nachgestellt und das Perfusat gefiltert (Whatman 541, Papierfilter). Das Perfusat wurde für die Versuche stets frisch hergestellt und sollte bei weiterem Gebrauch nicht länger als 2-3 Tage bei 4 °C gelagert werden.

2.2.3.2 Versuchsaufbau für die in-situ perfundierte Rattenleber

Abbildung 9 zeigt schematisch den Versuchsaufbau für die in-situ perfundierte Rattenleber. Das System bestand aus einem Wasserbad mit einem regelbaren Thermostaten (Thermomix 144, B. Braun, Melsungen), einer peristaltischen Pumpe (Cole-Palmer, Illinois, U.S.A.), einer Belüftungseinheit (künstliche Lunge) und einem Fraktionssammler (Eigenbau), desweiteren diversen Zuleitungen und Verbindungsstücken (siehe auch: Wolkoff *et al.*, 1987 und Mellick, 1995).

Das Perfusat wurde mit Hilfe der Pumpe aus dem im Wasserbad stehenden Behälter gepumpt und in die Belüftungseinheit (künstliche Lunge) weitergeleitet. In die Lunge strömte aus einem Gasbehälter ein Gemisch aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid (Commonwealth Industrial Gases, Brisbane). Nur die durch die Lunge führende Perfusats-Leitung war für Gase durchlässig, so daß das Perfusat auf diesem Weg mit Sauerstoff angereichert wurde. Nach dem Verlassen der Lunge wirkte eine an einem T-Stück (aus Glas) vertikal angebrachte Leitung als Manometer, wobei die Höhe der Flüssigkeitssäule gemessen wurde. Desweiteren funktionierte sie als Falle für vorhandene Luftblasen, da diese durch die Leitung entweichen konnten. Hinter dem Manometer befand sich ein weiteres T-Stück (aus Kunststoff). Durch einen Silikonverschluß konnte hier mit Hilfe einer Nadel die zu untersuchende Substanz injiziert werden. Direkt an dieses T-Stück wurde ein ca. 7 cm langer Kunststoffkatheter (einleitender Katheter) befestigt, der mit seinem Ende in die Leber führte. Am anderen Ende der Leber war ein zweiter Kunststoffkatheter befestigt (ausleitender Katheter, ca. 8 cm Länge), der schließlich das ausfließende Perfusat in den Fraktionssammler weiterleitete. Der Fraktionssammler war regelbar und konnte alle 0,25, 0,5, 1,0, 2,5 oder alle 4,0 sek eine Probe aufnehmen.

Die Plattform (mit Kunststoffabdeckung), auf der die Ratte befestigt wurde, war wärmeregulierbar und schützte durch Aufrechterhaltung einer humiden Umgebung die Leber vor der Austrocknung. Der Wärmeverlust wurde durch das Verwenden möglichst kurzer Zuleitungen minimiert, dennoch mußte das Wasserbad auf 42 °C temperiert werden, um eine Temperatur von 37 °C an der Leber aufrechtzuerhalten.

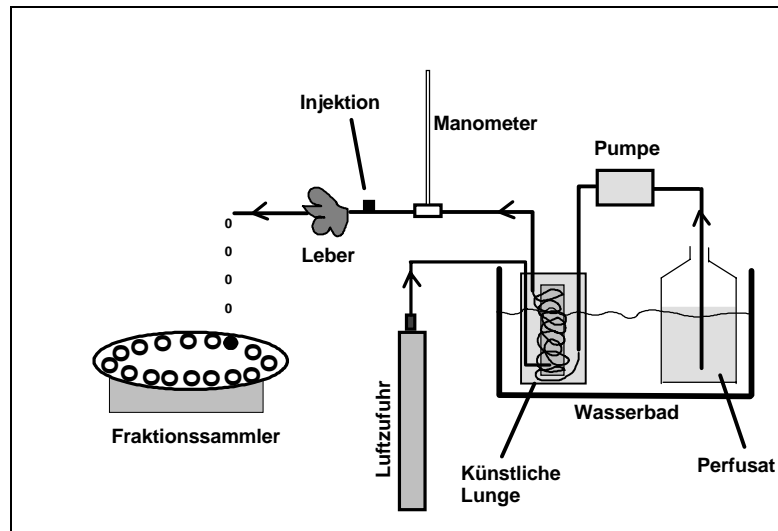


Abb. 9: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die in-situ perfundierte Rattenleber.

2.2.3.3 Operationstechnik für die in-situ perfundierte Rattenleber

Die Ratten wurden in Abhängigkeit von ihrem Körpergewicht mit einem Gemisch aus Xylazin (Rompun[®]) und Ketamin-hydrochlorid (Tab. IV, Anhang) betäubt. Das Gemisch wurde intraperitoneal (linker abdominaler Quadrant) gegeben. Nach eingetretener Anästhesie (keine Reflexantwort bei erfolgtem Druck auf die Füße) wurde die Ratte auf der Versuchsplattform durch das Befestigen von Klebestreifen an den Beinen fixiert. Die Präparation begann damit, daß die Haut der Bauchseite durch einen medianen Schnitt nach vorn bis zum Sternum und nach hinten bis kurz vor die Genitalöffnung aufgeschnitten wurde (siehe auch: Greene, 1955). Die Haut wurde vorsichtig von der Bauchdecke abgelöst und durch weitere Schnitte entlang der Rippenbögen und im Bereich des Abdomen, zur Seite hin zurückgeklappt. Die Bauchdecke wurde nun rektal mit einer Pinzette angehoben und mit einer Schere angeschnitten. Danach wurde ein medianer Schnitt kranial bis zum Sternum geführt. Die entstandene Öffnung wurde durch weitere Schnitte entlang der Rippenbögen und im abdominalen Bereich erweitert. Die Bauchdecke konnte danach seitlich umgeklappt werden. Die nun freiliegenden Darmschlingen wurden vorsichtig nach rechts aus der Bauchhöhle herausgestrichen, ohne sie dabei zu verletzen. Kaudal vom Zwerchfell, teilweise verdeckt durch die Rippenbögen, lag die braunrote Leber.

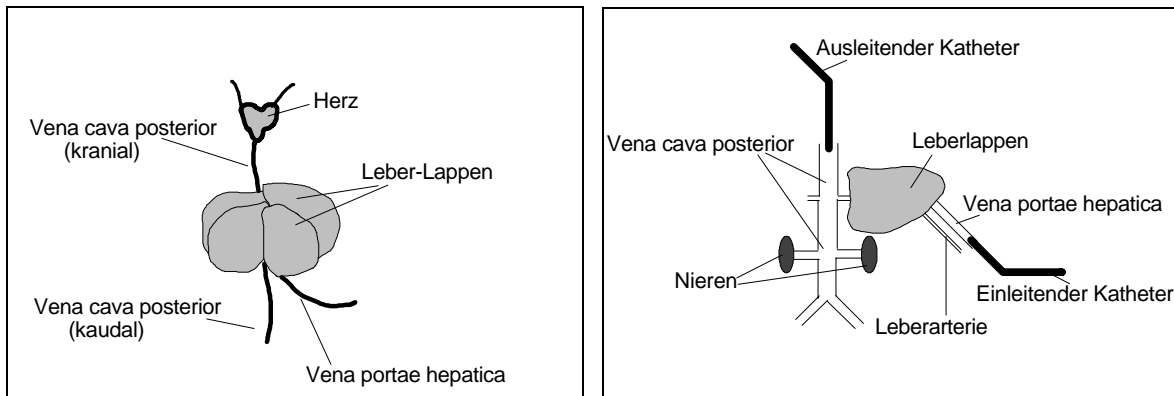


Abb. 10: Schematische Darstellung der Leber einer Ratte und der eingesetzten Katheter.

Die Vena portae hepatica (Abb. 10) wurde mit einem Wattestäbchen vom umgebenden Fettgewebe befreit und mit drei losen Knoten aus festem Operationsgarn umgeben. In die kaudale Vena cava posterior wurden nun 0,1 mL Heparin injiziert (500 U/mL). Danach wurde ein weiterer loser Knoten unterhalb der Leber, aber oberhalb der Nieren an der V. cava posterior plaziert. Der distale Knoten an der V. portae hepatica wurde nun festgezogen. Mit einer Kanüle (16G, i.D. = 1,30 x 32 mm, Terumo Medical Corporation, Elkton, U.S.A.) wurde proximal eine Öffnung gesetzt, durch die der einleitende Katheter (Polyethylen, i.D. = 1,67, ä.D. = 2,42 mm, Länge ca. 7 cm, Clay Adams, New Jersey, U.S.A.) eingeführt und mit den anderen zwei vorhandenen Knoten fixiert wurde. Durch diesen Katheter floß dann mit einer niedrigen Flußrate (2-5 mL/min) das Perfusat durch die Leber, die sich mit zunehmender Zeit und damit verbundenem Austausch des Blutes gegen das Perfusat farblich aufhellte (graubraun). Ein kleiner Schnitt in die V. cava posterior, unterhalb des losen Knotens, erlaubte den Abfluß des Perfusats und verhinderte so, daß sich Druck in der Leber aufbaute. Anschließend wurde der Thorax entfernt und zwei weitere Knoten, diesmal um die kraniale V. cava posterior, gebunden. Nun wurde der ausleitende Katheter (ca. 8 cm) durch die rechte Herzkammer hindurch plaziert und schließlich mit Hilfe der beiden Knoten fixiert. Erst diese letzten Arbeitsschritte verursachten den Tod der Ratte. Der lose Knoten um die kaudale V. cava posterior wurde nun festgezogen, was zur Folge hatte, daß das Perfusat nun durch den Ausflußkatheter geleitet wurde. Die so isolierte Leber war nach einer 10minütigen Ausspülzeit bereit für die ersten Injektionen. Die Dauer dieser beschriebenen Operation belief sich auf ca. 20 min.

Bei Bedarf konnte auch das Sammeln von Gallenflüssigkeit ermöglicht werden. Dafür wurden zwei weitere lose Knoten um den Gallengang gelegt, wovon der distale festgezogen wurde. Der Gallengang weitete sich dann durch den Rückstau der Gallenflüssigkeit langsam auf und wurde nach einem erfolgten kleinen Schnitt mit einem Ausflußkatheter

(Polyethylen, i.D. = 0,28, ä.D. = 0,61 mm, Länge ca. 8 cm, Clay Adams, New Jersey, U.S.A.) versehen. Durch das Festziehen des proximalen Knotens wurde der Katheter dann fixiert. Die Gallenflüssigkeit konnte dann in einem Plastikcup für weitere Untersuchungen aufgefangen werden.

2.2.3.4 Injektion von Proben in die in-situ perfundierte Rattenleber

Nach Beendigung der Operation wurde die Flußrate des Perfusats auf 30 mL/min eingestellt, die bis zum Ende des Versuches beibehalten wurde. Die so präparierte Leber wurde vor dem Start der ersten Bolusinjektion für die Dauer von 10 min mit Perfusat equilibriert. Danach erfolgte die erste Bolusinjektion (jeweils 50 µL der zu untersuchenden Wirkstoffe). Für die Dauer von 150 Sekunden wurden mit Hilfe eines Fraktionssammlers die Proben aufgefangen (1.-30. sek: eine Fraktion pro sek, danach [31.-150. sek] eine Fraktion alle 2,5 sek). Insgesamt wurden bis zu acht Bolusinjektionen pro Rattenleber vorgenommen. Zwischen den einzelnen Injektionen wurde eine 5minütige Auswaschzeit eingehalten.

2.2.3.5 Katheter-Versuche

Der Einfluß der Zu- und Ableitungen zur bzw. von der Leber auf die Form der Ausflußkurve wurde in sogenannten Katheterexperimenten untersucht. Dabei wurde der zu- und ableitende Katheter direkt miteinander verbunden. Die Injektion der zu untersuchenden Wirkstoffe erfolgte direkt nach dem Start des Fraktionssammlers.

2.2.3.6 Szintillationsmessungen und Verwendung des Mikroplattenlesers

Zur Bestimmung des radioaktiven extrazellulären Markers (^{14}C -Saccharose) und des radioaktiven Gesamtmarkers ($^3\text{H}_2\text{O}$) wurde die Szintillationsmessung verwendet und zur Bestimmung des intravaskulären Markers (Albumin) ein Mikroplattenleser. Der Standard für diese Marker wurde wie folgt hergestellt: Zu 100 µL Evans Blue (je nach Versuch: 1-5 mg/mL) wurden 50 µL $^3\text{H}_2\text{O}$ (925 Gbq/mmol), 200 µL ^{14}C - Saccharose (16,4 Gbq/mmol) und 150 µL Perfusat (incl. 2 % Albumin, w/v, pH 7,4) zugegeben. Von diesem Gemisch wurden 50 µL als Bolusinjektion in die in-situ perfundierte Rattenleber injiziert. Die Fraktionen wurden wie bei allen anderen Proben auch im Fraktionssammler aufgefangen (0.-

30. sek: eine Fraktion pro Sekunde; 31.-150. sek: eine Fraktion alle 2,5 sek) und weiter untersucht. Dazu wurden 100 µL der aufgefangenen Fraktion und 5 mL Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold, Hewlett-Packard Australia Ltd.) in ein Szintillationsgefäß aus Kunststoff mit Schraubverschluß gegeben, gut durchgeschüttelt und dann am Szintillationszähler (MINAXIB TRICARB[®], 4000 Serie, Packard Instruments Co., U.S.A.) vermessen. Als Eichwerte wurden mindestens Dreifachbestimmungen der verwendeten Bolusinjektions-Proben direkt (100 µL Probe plus 5 mL Szintillationsflüssigkeit) im Szintillationszähler mitbestimmt.

Für die Bestimmungen im Mikroplattenleser (BIO-RAD, Modell 3550, BIO-RAD, Australien) wurden 100 µL der zu untersuchenden Proben (des intravaskulären Markers Albumin und der Eich-Proben) in die Vertiefungen der Mikroplatte pipettiert und bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Als Eichwerte wurden Verdünnungen der verwendeten Bolusinjektions-Proben verwendet. Reines Perfusat (ohne jeglichen Standard; mit 2 % Albumin) wurde für die Szintillationsbestimmungen und bei dem Mikroplattenleser als Leerwerte mitgeführt.

2.3 Chromatographie

Für die Quantifizierung der Wirkstoffpeaks bei HPLC-Chromatogrammen wurden die Peakhöhen und die Peakflächen herangezogen.

2.3.1 Passivierung (Voroxydation) der HPLC-Anlage bei Verwendung des elektrochemischen Detektors

Vor der Inbetriebnahme des elektrochemischen Detektors, und danach einmal im Monat, wurde eine Passivierung der gesamten Anlage (Pumpe, alle Zuleitungen, Injektionsventil und Probenschleife), mit Ausnahme der Säule und der Detektorzelle, wie folgt vorgenommen:

1. Die Pumpe, das Injektionsventil mit Probenschleife und alle Kapillaren wurden miteinander verbunden.
2. Mit destilliertem Reinstwasser und einem Fluß von 1-2 mL/min wurde dieses System 15 min lang gespült.
3. Danach erfolgte zuerst eine 10minütige Spülung mit Isopropanol (1 mL/min) und

4. dann wieder für 15 min mit destilliertem Reinstwasser (1-2 mL/min).
5. Nun folgte für 30 min 30 %ige Salpetersäure (1 mL/min). Dabei wurde auch mehrmals Salpetersäure in das Injektionsventil injiziert.
6. Anschließend wurde mit destilliertem Reinstwasser (1-2 mL/min) solange gespült, bis die austretende Lösung einen neutralen pH-Wert aufwies. Bei diesem Vorgang durfte nicht vergessen werden auch das Injektionsventil mehrmals mit Wasser zu reinigen.
7. Als letzter Schritt folgte das Umspülen des Systems auf die vorgesehene mobile Phase (15 min; 1 mL/min). Erst danach wurde die Säule und die Detektorzelle angeschlossen.

2.3.2 Herstellung mobiler Phasen für die HPLC

2.3.2.1 Acetonitril:Natrium-acetat (30 mM)

Für die Herstellung der 30 mM Natrium-acetat-Lösung wurden 2,4612 g Natrium-acetat in 1000 mL destillierten Reinstwasser gelöst und mit konzentrierter Phosphorsäure (ca. 2 mL) auf einen pH-Wert von 3,0 (Kap. 2.3.3 bis 2.3.6 und 2.3.9), bzw. mit 0,2 N NaOH auf einen pH-Wert von 6,9 (Kap. 2.3.7) eingestellt. Die so hergestellten Lösungen wurden durch Anlegen eines Vakuums zuerst durch eine Filternutsche (Porosität 4) gefiltert und anschließend entgast. Das verwendete Acetonitril wurde ebenfalls wie oben beschrieben gefiltert und entgast.

Anschließend wurde die Natrium-acetat-Lösung und das Acetonitril im jeweils benötigten Verhältnis (siehe Kap. 2.3.3 bis 2.3.7 und 2.3.9) miteinander gemischt. Der pH-Wert mußte danach noch einmal geprüft und auf pH 3,0 bzw. 6,9 nachgestellt werden. Vor jedem Einsatz wurden die mobilen Phasen 15 min mit Helium entgast.

2.3.2.2 H₂O:Acetonitril: 30 %ige Essigsäure (pH 4,0)

Für die Herstellung dieser mobilen Phase wurden zu 1000 mL entgastem (unter Vakuum oder mit Helium, 15 min) Reinstwasser, 80 mL Acetonitril und 10 mL 30 %ige Essigsäure zugegeben. Nachdem der pH-Wert mit 0,3 M NaOH auf pH 4,0 eingestellt war, wurde der Eluent durch Anlegen eines Vakuums gefiltert (Filternutsche, Porosität 4) und erneut entgast.

2.3.3 Bestimmung von PREDNISOLON-21-ACETAT durch HPLC mit UV-Detektion

Für die Bestimmung von Prednisolon-21-acetat in wäßrigen Proben wurden folgende Bedingungen gewählt:

Mobile Phase: Acetonitril:Natrium-acetat (30 mM, pH 3,0), 30:70,
(siehe Kap. 2.3.2.1)

Flußrate: 1,4 mL/min (Säulendruck: 132 Bar)

Säule: Regis SPS-5PM-S5-100-C8

Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18 (5 µm)

UV-Detektion: 240 nm

2.3.4 Bestimmung von DICLOFENAC durch HPLC mit UV-Detektion

Für die Bestimmung von Diclofenac in wäßrigen Proben wurden folgende Bedingungen gewählt:

Mobile Phase: Acetonitril:Natrium-acetat (30 mM, pH 3,0), 60:40,
(siehe Kap. 2.3.2.1)

Flußrate: 1,0 mL/min (Säulendruck: 110 Bar)

Säule: Regis SPS-5PM-S5-100-C8

Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18 (5 µm)

UV-Detektion: 272 nm

2.3.5 Bestimmung von DICLOFENAC und OXYBUPROCAIN durch HPLC mit elektrochemischer Detektion (ELCD)

Für die simultane Bestimmung von Diclofenac und Oxybuprocain in wäßrigen Proben durch HPLC und einem elektrochemischen Detektor wurden folgende Bedingungen gewählt:

Mobile Phase: Acetonitril:Natrium-acetat (30 mM, pH 3,0), 40:60 (**A**) oder 50:50 (**B**),
(siehe Kap. 2.3.2.1)

Flußrate: 1,3 mL/min (Säulendruck: 95 Bar)

Säule: Regis-SPS-5PM-S5-100-C8
Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18 (5 µm)

Weitere Einstellungen: Volt: + 0,95 V
dB/Oct: 60
Range out: 5,0
Filter: 2

Während der Messungen wurde die Trennsäule und der Behälter mit der mobilen Phase in einem temperierten Wasserbad bei einer konstanten Temperatur gehalten (23-25 °C).

2.3.6 Bestimmung von DICLOFENAC durch HPLC mit Fluoreszenz-Detektion nach photochemischer Online-Nachsäulenderivatisierung

Für die Bestimmung von Diclofenac in wäßrigen Proben wurden folgende Bedingungen gewählt:

Mobile Phase: Acetonitril:Natrium-acetat (30 mM, pH 3,0), 60:40,
(siehe Kap. 2.3.2.1)

Flußrate: 1,0 mL/min (Säulendruck: 67 Bar)

Säule: Regis SPS-5PM-S5-100-C8

Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18 (5 µm)

UV-Detektion: 272 nm

FL-Detektion: Excitation: 286 nm / Emission: 360 nm

Bandweite des Excitationsmonochromators: 30 nm

Bandweite des Emissionsmonochromators: 30 nm

Bandweite des Photonenvervielfachers: 30 nm

Der photochemische Reaktor (siehe Kap. 2.1.2.1) wurde zwischen der Trennsäule und den sich anschließenden Detektoren (zuerst folgte der UV/VIS-Detektor, danach der Fluoreszenz-Detektor) eingefügt.

2.3.7 Bestimmung von FENOTEROL durch HPLC mit UV- und Fluoreszenz-Detektion

Für die Bestimmung von Fenoterol in wäßrigen Proben wurden folgende Bedingungen gewählt:

Mobile Phase: Acetonitril:Natrium-acetat (30 mM, pH 6,9), 25:75,
(siehe Kap. 2.3.2.1)

Flußrate: 0,9 mL/min (Säulendruck: 139 Bar)

Säule: Octyl-Si 100 (5 µm), 25 cm, Serva, Heidelberg

Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18 (5 µm)

UV-Detektion: 274 nm

FL-Detektion: Excitation: 218 nm / Emission: 304 nm
Bandweite des Excitationsmonochromators: 30 nm
Bandweite des Emissionsmonochromators: 30 nm
Bandweite des Photonenvervielfachers: 30 nm

2.3.8 Bestimmung von *p*-AMINOHIPPURSÄURE (PAH) und *p*-ACETYLAMINO-HIPPURSÄURE (PAAHA) durch HPLC mit UV- und Fluoreszenz-Detektion

Für die gleichzeitige Bestimmung von PAH und PAAHA in wäßrigen Proben wurden folgende Bedingungen gewählt:

Mobile Phase: H₂O:Acetonitril:30 %ige Essigsäure (pH 4,0), 100:8:1,
(siehe Kap. 2.3.2.2)

Flußrate: 0,8 mL/min (Säulendruck: 209 Bar)

Säule: Superspher 100 RP-18, (4 µm), 25 cm, Merck, Darmstadt

Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18 (5 µm)

UV-Detektion: 274 nm für PAH/ 263 nm für PAAHA

FL-Detektion: Excitation: 274 nm / Emission: 346 nm (für PAH)
Bandweite des Excitationsmonochromators: 30 nm
Bandweite des Emissionsmonochromators: 30 nm
Bandweite des Photonenvervielfachers: 30 nm

2.3.9 Bestimmung von OXYBUPROCAIN durch HPLC mit UV- und Fluoreszenz-Detektion

Für die Bestimmung von Oxybuprocain in wäßrigen Proben wurden folgende Bedingungen gewählt:

Mobile Phase: Acetonitril:Natrium-acetat (30 mM, pH 3,0), 40:60,
(siehe Kap. 2.3.2.1)

Flußrate: 1,0 mL/min (Säulendruck: 97 Bar)

Säule: Regis SPS-5PM-S5-100-C8

Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18 (5 µm)

UV-Detektion: 308 nm

FL-Detektion: Excitation: 308 nm / Emission: 352 nm

Bandweite des Excitationsmonochromators: 30 nm

Bandweite des Emissionsmonochromators: 30 nm

Bandweite des Photonenvervielfachers: 30 nm

2.3.10 Probenvorbereitungen für die HPLC-Analyse

Bei Blut- und Perfusat-Proben wurde vor der Injektion der Proben in die HPLC-Anlage eine Proteinfällung vorgenommen. Die dabei verwendete Prozedur war für die einzelnen Wirkstoffe unterschiedlich: Bei Prednisolon-21-acetat, Fenoterol, PAH und PAAHA wurden die Peptide und Proteine mit 2 N HClO₄ ausgefällt (4 Teile Probe plus 1 Teil 2 N HClO₄) und bei Diclofenac mit Acetonitril (1 Teil Probe plus 1 Teil Acetonitril). Augenkammerwasser-Proben konnten bei Verwendung der SPS-Säule der Firma Regis ohne weitere Probenvorbereitungsschritte untersucht werden. Als Leerwerte für die HPLC-Bestimmung wurde Augenkammerwasser des Menschen verwendet (Proben der Augenklinik Halle), bzw. humanes Blutplasma (Antikoagulanzen Citrat-Phosphat-Dextrose) vom Transfusionsdienst der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Für die Bestimmung der Eichgeraden wurden diese Proben mit bekannten Wirkstoffmengen versehen und den oben beschriebenen Probenvorbereitungsschritten unterworfen.

3. Ergebnisse

3.1 Augenkammerwasser-Proben, Blut-Proben und Perfusat-Lösungen

Die Augenkammerwasser-Proben hatten ein Volumen zwischen 40 und 150 μL und wiesen pH-Werte zwischen 8,5 und 9,8 auf. Der Mittelwert aus 42 bestimmten Proben lag bei einem pH-Wert von 9,1. Für jeden im Augenkammerwasser untersuchten Wirkstoff (Prednisolon-21-acetat, Oxybuprocain und Diclofenac) wurden Vergleiche der Wiederfindungsraten durchgeführt. Dabei wurden Pharmaka gleicher Konzentration in jeweiligen Eluenten gelöst und mit den ermittelten Daten im Augenkammerwasser verglichen. Die Bestimmungen der Eichgeraden und der Nachweisgrenzen für die quantitativen Probenanalysen erfolgten in, mit dem jeweiligen Wirkstoff versetzten, Eluenten.

Das Volumen der Plasma-Proben lag bei 0,5-1,0 mL (durchschnittlicher pH-Wert: 8,2). Alle Bestimmungen von Eichgeraden und Nachweisgrenzen für im Plasma oder im Perfusat zu bestimmenden Proben (Diclofenac, Fenoterol, PAH, PAAHA) erfolgten im Plasma bzw. im Perfusat. Weil für diese Probenmatrizes Proteinfällungen durchgeführt werden mußten, wurden die Wiederfindungsraten für die unterschiedlichen Wirkstoffe bestimmt. Bei den Versuchen mit der in-situ perfundierten Rattenleber wurde eine Flußrate von 30 mL/min gewählt. Der angeschlossene Fraktionssammler sammelte beginnend vom Start des Experiments (0.-30. sek) jede Sekunde eine Probe, was ein Volumen von 500 μL ergab und ab der 31. Sekunde alle 2,5 sek eine Probe (Volumen 1250 μL , pH-Wert: 7,4).

3.2 Synthese der p-ACETYLAMINOHIPPURSÄURE (PAAHA)

Die PAAHA wurde selbst synthetisiert (nach Stolk *et al.*, 1985). Die Synthese (Kap. 2.1.1.1) wurde dreimal durchgeführt und erbrachte Ausbeuten von 50, 75 und 81 % (Stolk *et al.* erzielten Werte um 70 %). Das entstandene Produkt wurde im Eluenten gelöst und per HPLC auf Reinheit geprüft. Die Chromatogramme zeigten keinerlei Verunreinigungen. Die massenspektrometrische Untersuchung (Abb. 11) ergab eine Masse von 236,9 (Theoretischer Wert für PAAHA: 236,2). Der Natrium-Peak wies eine Masse von 259,1 auf (Theorie: 258,2). Die Abweichungen lagen im Rahmen des Meßfehlers.

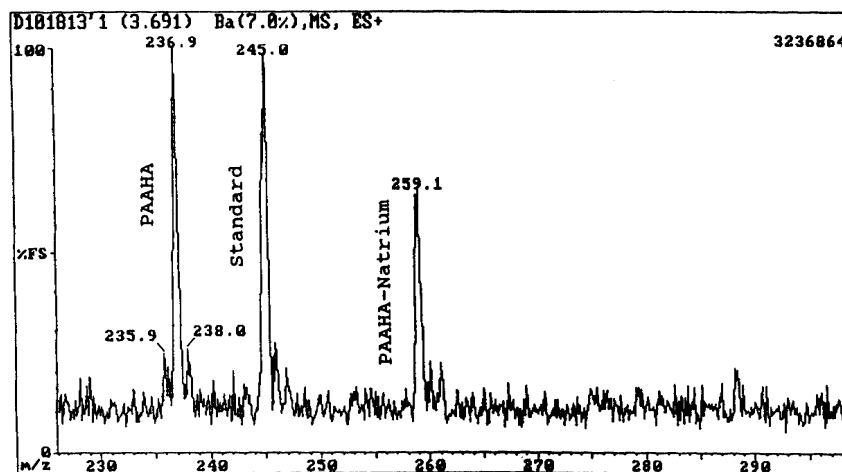


Abb. 11: Massenspektrum der synthetisierten *p*-Acetylaminohippursäure.

3.3 HPLC-Bestimmung von PREDNISOLON-21-ACETAT

Für die Optimierung des Nachweises von Prednisolon-21-acetat wurde dessen Absorptionsspektrum mit der HPLC-Anlage der Firma Spectra-Physics (Kap. 2.1.2.2) aufgenommen. Das Absorptionsmaximum lag bei 240 nm (Abb. 12).

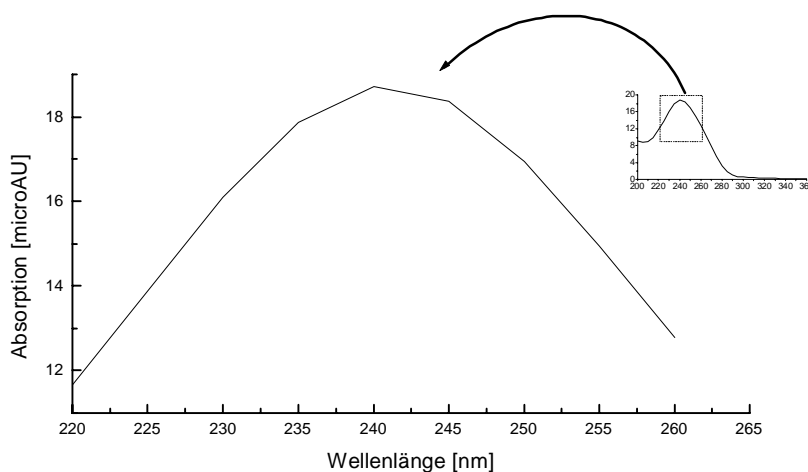


Abb. 12: Darstellung des Absorptionsspektrums von Prednisolon-21-acetat.

Beim Einsatz von frisch angesetztem Eluenten (Kap. 2.3.2.1), und entsprechend den in Kapitel 2.3.3 angegebenen Vorgaben, wurde Prednisolon nach ca. 3,0 min (t_R) und Prednisolon-21-acetat nach ca. 6,8 min (t_R) detektiert. Der Rauschwert (microAU) lag auch nach über 50 Realproben und gleich vielen Eichproben zwischen 2 und 4. Die Nachweisgrenze lag jeweils bei 15 ng/mL bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3. Die

Methode wies einen linearen Meßbereich von 25 ng/mL bis 98000 ng/mL auf (Korrelationskoeffizient = 0,999996). Die berechnete Tagesstandardabweichung lag bei Berechnung über die Peakfläche bei 3,6 % und 2,1 % bei Berechnung über die Peakhöhe (510 ng Prednisolon-21-acetat/mL; n = 8), bzw. 3,0 % und 2,0 % (980 ng Prednisolon/mL; n = 4). Der Retentionsfaktor (k' , früher auch Kapazitätsfaktor genannt) lag für Prednisolon-21-acetat bei 6,2 und für Prednisolon bei 2,2. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$k' = \frac{(t_R - t_m)}{t_m} \quad [9]$$

t_R = Retentionszeit
 t_m = Durchflußzeit

3.4 HPLC-Bestimmung von DICLOFENAC

Für die Optimierung des Nachweises von Diclofenac wurde dessen Absorptionsspektrum mit der HPLC-Anlage der Firma Spectra-Physics (Detektor 1; Kap. 2.1.2.2) aufgenommen. Das Absorptionsmaximum lag bei 272 nm (Abb. 13).

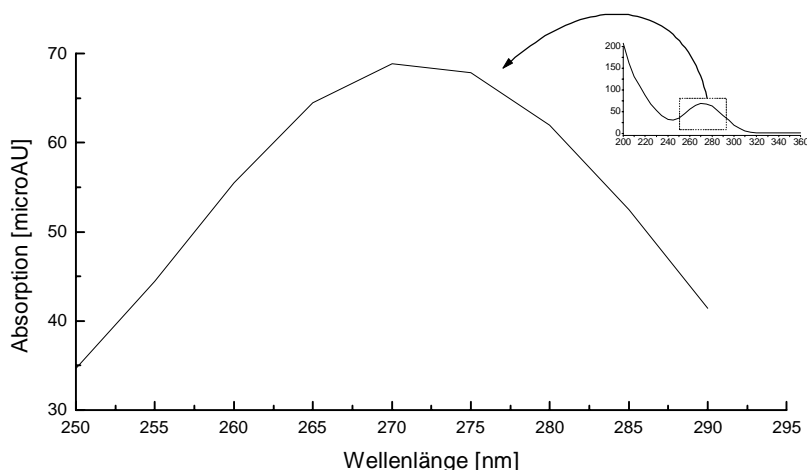


Abb. 13: Darstellung des Absorptionsspektrums von Diclofenac.

Beim Einsatz von frisch zubereitetem Eluenten (siehe Kap. 2.3.2.1), und entsprechend den in Kapitel 2.3.4 angegebenen Vorgaben, erschien der Diclofenac-Peak nach ca. 5,8 min (t_R) ($k' = 6,3$). Der Rauschwert (microAU) lag auch nach über 50 Realproben und gleich vielen Eichproben zwischen 1 und 4. Die Nachweisgrenze lag bei 10 ng/mL bei einem Signal-

Rausch-Verhältnis von 3. Der lineare Meßbereich begann bei 20 ng/mL und reichte bis 55000 ng/mL (Korrelationskoeffizient = 0,99998). Die berechnete Tagesstandardabweichung lag für das Einspritzen der Proben per Hand durch das Rheodyne-Ventil bei Berechnung über die Peakfläche unter 5,12 % und unter 3,35 % bei Berechnung über die Peakhöhe (54,7 ng/mL Diclofenac-natrium; n = 13). Diclofenac zeigte keinerlei natürliche Fluoreszenz.

3.5 HPLC-Bestimmung von DICLOFENAC und OXYBUPROCAIN

Der simultane Nachweis von Diclofenac und Oxybuprocain gelang durch HPLC mit elektrochemischem Detektor (Kap. 2.1.2.2). Beim Einsatz von frisch zubereiteten Eluenten (siehe Kap. 2.3.2.1) und entsprechend den in Kapitel 2.3.5 angegebenen Vorgaben erschien der Oxybuprocain-Peak (Abb. 16) nach ca. 5,5 min (t_R) ($k' = 4,5$) und der Diclofenac-Peak (Abb. 14) nach ca. 19,5 min (t_R) ($k' = 18,5$). Der Rauschwert lag bei 2. Die Nachweisgrenze lag bei 30 ng/mL für Oxybuprocain, bzw. 500 pg/mL für Diclofenac bei einem jeweiligen Signal-Rausch-Verhältnis von 3. Der lineare Meßbereich begann für Oxybuprocain bei 50 ng/mL und reichte bis 200000 ng/mL (Korrelationskoeffizient = 0,99994) (Tab. 4 und Abb. 17). Für Diclofenac lagen die Werte bei 1 ng/mL bzw. 1000 ng/mL (Korrelationskoeffizient = 0,99998) (Tab. 3 und Abb. 15). Die berechnete Tagesstandardabweichung für die Peakflächen lag zwischen 2,3 % und 3,0 % für Oxybuprocain (40 µg/mL Oxybuprocain; n = 15) bzw. bei 6,3 % für Diclofenac (50 ng/mL Diclofenac; n = 14).

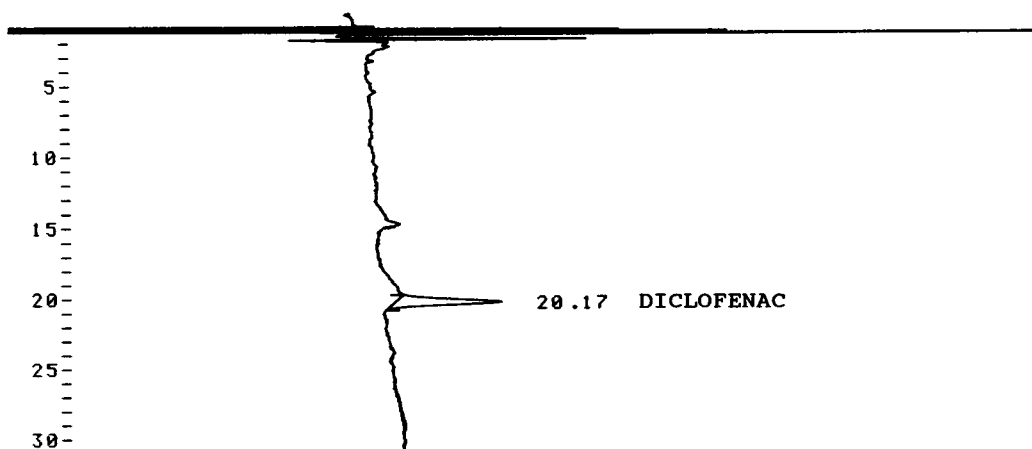


Abb. 14: ELCD-Chromatogramm mit 100 ng Diclofenac/mL gelöst im Eluenten.

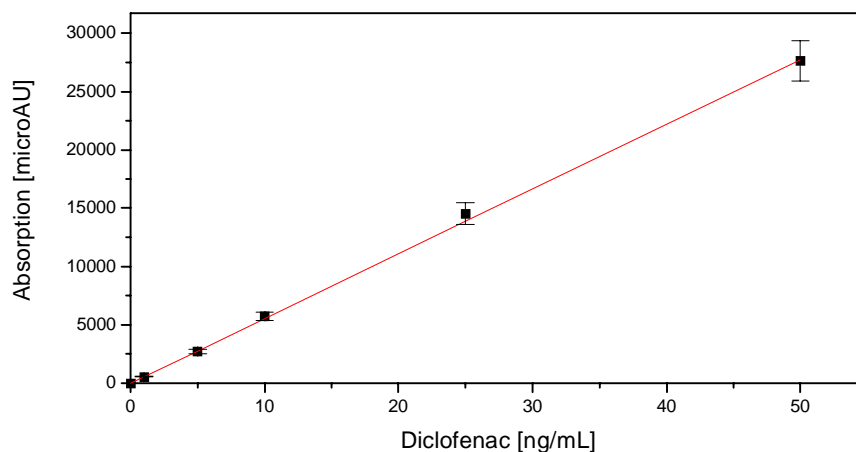


Abb. 15: Lineare Regression für Diclofenac im Bereich 1-50 ng/mL (gelöst im Eluenten) und einer Standardabweichung von 6,3 % (Korrelationskoeffizient = 0,99963).

Tab. 3: Eichwerte für im Eluenten gelöstes Diclofenac (Korrelationskoeffizient = 0,9998).

Diclofenac [ng/mL]	Gemessene Peakfläche [microAU]	Daten für die lineare Regression
1	556	561,904
5	2739	2809,523
10	5715	5619,047
25	14547	14047,617
50	27606	28095,234
100	57245	56190,469
500	270083	280952,344
1000	566217	561904,688

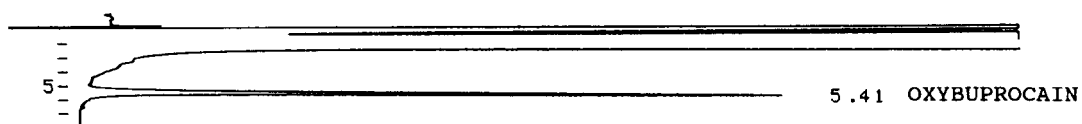


Abb. 16: ELCD-Chromatogramm für 20 µg Oxybuprocain/mL gelöst im Eluenten.

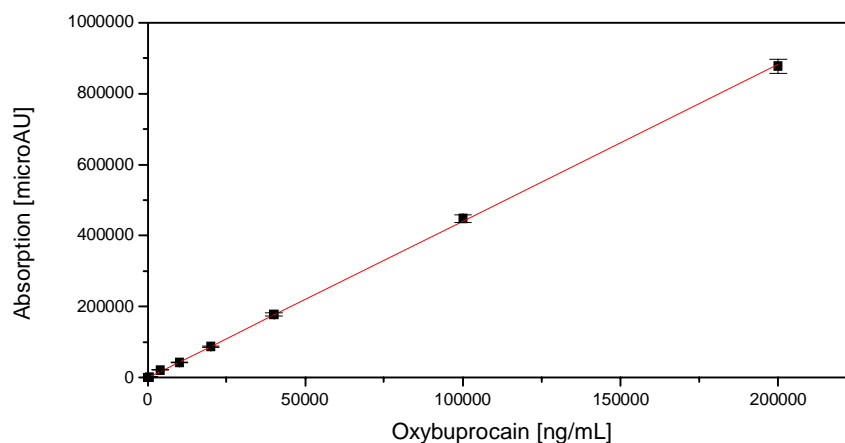


Abb. 17: Lineare Regression für im Eluenten gelöstes Oxybuprocain im Bereich 0,4-200 $\mu\text{g/mL}$ und einer Standardabweichung von 2,3 % (Korrelationskoeffizient = 0,99994).

Tab. 4: Eichwerte für im Eluenten gelöstes Oxybuprocain (Korrelationskoeffizient = 0,9994).

Oxybuprocain [$\mu\text{g/mL}$]	Gemessene Peakfläche [microAU]	Daten für die lineare Regression
0,4	1802	1758,265
4	17795	17582,650
10	42405	43956,626
20	86842	87913,252
40	197559	175826,503
100	447922	439566,258
200	876708	879132,517

Bei der Untersuchung von Proben, die nur Diclofenac enthielten, konnte das Verhältnis Acetonitril:Natrium-acetat von 40:60 (**A**) auf 50:50 (**B**) verändert werden. Dies resultierte in einer Verschiebung der Retentionszeit des Diclofenac-Peaks von t_R 19,5 min auf t_R 9 min ($k' = 8$) und einem leichten Rückgang des Säulendrucks (statt 95 Bar nur noch 90 Bar; Fluß: 1,3 mL/min). Bei den unter 2.3.5 genannten Einstellungen am ELCD beliefen sich die Gesamt-nA-Werte bei frisch zubereiteter mobiler Phase, passivierten Zuleitungen und equilibrierter Trennsäule auf Werte zwischen 8-10 nA.

3.5.1 Anwendung der HPLC/ELCD-Methode auf Augenkammerwasser-Proben des Menschen

Oxybuprocain wurde stets zum gleichen präoperativen Zeitpunkt und mit der gleichen Dosis appliziert. Dazu wurde 15 min vor der Operation viermal einen Novesine[®]-Augentropfen (0,4 % Oxybuprocain) in kurzen Abständen in das zu operierende Auge getropft. Der Mittelwert aus 23 untersuchten Kammerwasser-Proben des Menschen (Tab. 5) lag bei 88810 ng/mL (Median: 72232 ng/mL). Die höchste gemessene Konzentration mit 262375 ng/mL lag dabei 147fach über dem kleinsten Wert (1784 ng/mL).

Tab. 5: Oxybuprocain-Konzentrationen in 23 Augenkammerwasser-Proben des Menschen (Tropfschema: viermal einen Tropfen, 15 min vor der Operation, einer 0,4 %igen Oxybuprocain-Lösung, Novesine[®]).

Proben-Nummer	Oxybuprocain [ng/mL]
1	16308,5
2	50606,7
3	79383,0
4	90039,5
5	31851,5
6	154773,0
7	138859,0
8	262375,0
9	77069,0
10	126450,0
11	254140,0
12	42294,0
13	159599,0
14	52764,0
15	52607,0
16	11659,0
17	72232,0
18	155167,0
19	1784,0
20	141226,0
21	9078,0
22	12680,0
23	49684,0
Mittelwert:	88809,965
Standardabweichung:	73959,446
Median:	72232,0
Maximum:	262375,0
Minimum:	1784,0

Abbildung 18 zeigt ein typisches Chromatogramm einer Augenkammerwasser-Probe des Menschen bei simultaner Bestimmung von Oxybuprocain und Diclofenac mit einem

elektrochemischen Detektor. Die für diese Probe berechneten Konzentrationen lagen bei 77069 ng Oxybuprocain und 20 ng Diclofenac je Milliliter Kammerwasser.

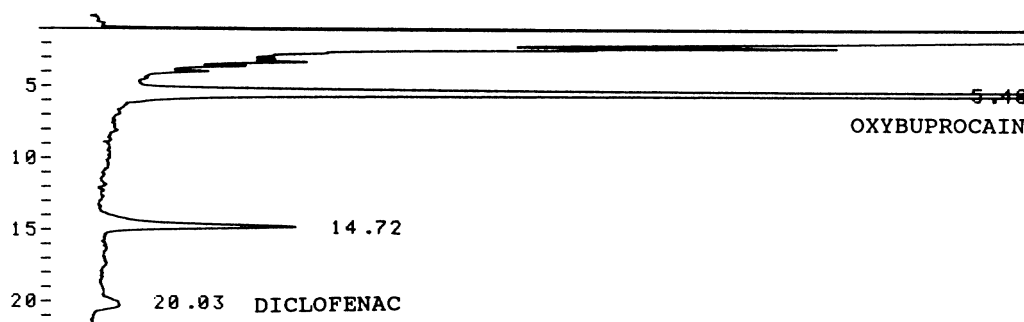


Abb. 18: ELCD-Chromatogramm einer Augenkammerwasser-Probe des Menschen. Berechnete Konzentration für Oxybuprocain (77069 ng/mL) und für Diclofenac (20 ng/mL).

Die ersten Ergebnisse der Studie über den topischen Transport von Diclofenac durch die Hornhaut des Auges (Cornea) in der Klinik und Poliklinik für Augenkrankheiten sind in Abbildung 19 dargestellt. Bei sieben Patienten wurden die Diclofenac-Konzentrationen gemessen und in Beziehung zur Applikationszeit gesetzt. In unterschiedlichen zeitlichen Abständen zur Operation wurden 2 Tropfen Voltaren® (0,1 % Diclofenac) gegeben. Es zeigte sich, daß nach 120 min der höchste Wert gemessen werden konnte und danach ein allmählicher Abfall der im Kammerwasser vorkommenden Diclofenac-Konzentration zu beobachten war.

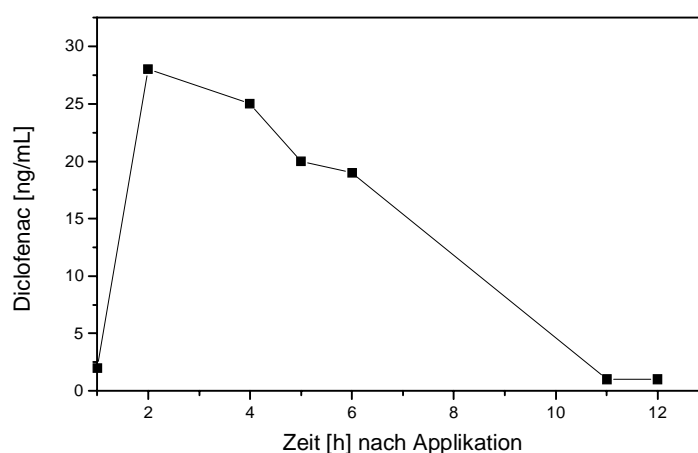


Abb. 19: Vorversuch mit 7 Patienten (mindestens Doppelbestimmung je Probe). Zeitabhängiger Konzentrationsverlauf für Diclofenac in Augenkammerwasser-Proben des Menschen nach erfolgreicher Applikation von 2 Tropfen Voltaren® (0,1 % Diclofenac).

3.6 HPLC-Bestimmung von DICLOFENAC nach photochemischer Online-Nachsäulenderivatisierung

Mit dieser Methode gelang die quantitative Bestimmung von Diclofenac. Nachgewiesen wurde die durch die Online-Photoderivatisierung entstehende Carbazol-1-essigsäure (CAA). Für diese Nachsäulen-Photoderivatisierung wurden eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt.

3.6.1 Emissions- und Excitationsspektrum der CARBAZOL-1-ESSIGSÄURE

Eine Quarzküvette (Hellma, 100-QS, K 82, 1 mm Schichtdicke) wurde mit 400 μL einer Diclofenac-Lösung (4050 ng/mL) befüllt und in einer Entfernung von ca. 3 mm von dem Quecksilberniederdruckstrahler (UV-Lampe) justiert. Nach einer UV-Bestrahlungszeit von einer Minute wurden 20 μL dieser Lösung in die HPLC-Anlage injiziert. Das Excitationsspektrum wurde mit der HPLC-Anlage der Firma Spectra-Physics (Detektor 1; Kap. 2.1.2.2) aufgenommen (Abb. 20). Das Excitations-Maximum lag bei 285 nm. Das Emissionsspektrum wurde mit dem Fluoreszenzspektrometer der Firma Hitachi (F-3010) aufgenommen. Das ermittelte Emissionsmaximum lag bei 361 nm (Abb. 21).

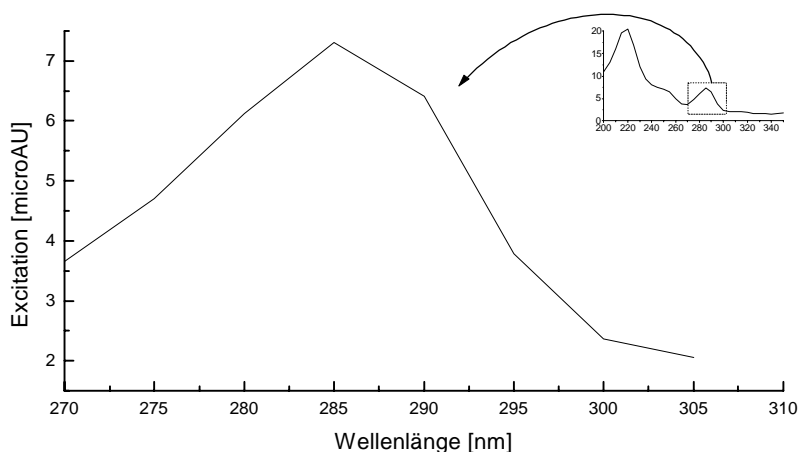


Abb. 20: Excitationspektrum der Carbazol-1-essigsäure (CAA).

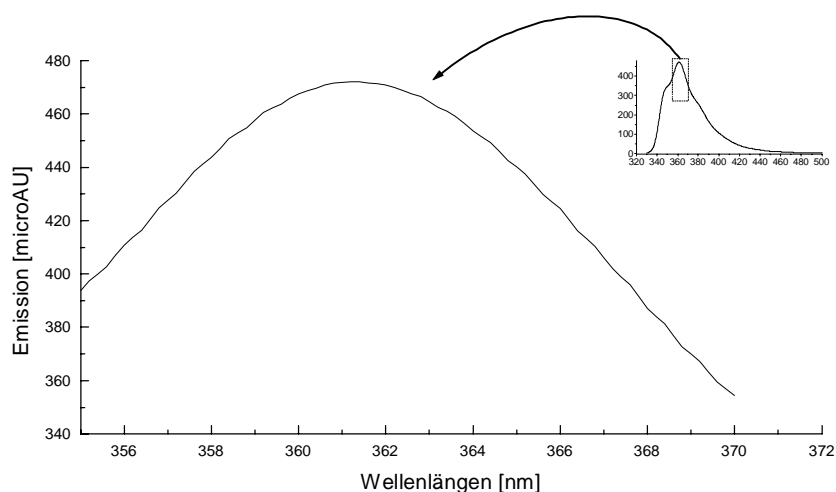


Abb. 21: Emissionsspektrum der Carbazol-1-essigsäure (CAA).

3.6.2 Einflüsse der Bestrahlungszeit auf die Bildung der Reaktionsprodukte: Offline-Photoderivatisierung

Bei diesen Versuchen wurde die Quarzküvette (Hellma, 100-QS, K 82, 1 mm Schichtdicke) mehrmals mit 400 μ L einer Diclofenac-Lösung (4050 ng/mL) befüllt und in einer Entfernung von ca. 3 mm von dem Quecksilberniederdruckstrahler (UV-Lampe) justiert. Der Einfluß unterschiedlicher UV-Bestrahlungszeiten (0-20 min) auf Diclofenac und auf das Entstehen des Derivatisierungsproduktes Carbazol-1-essigsäure sollte verfolgt werden.

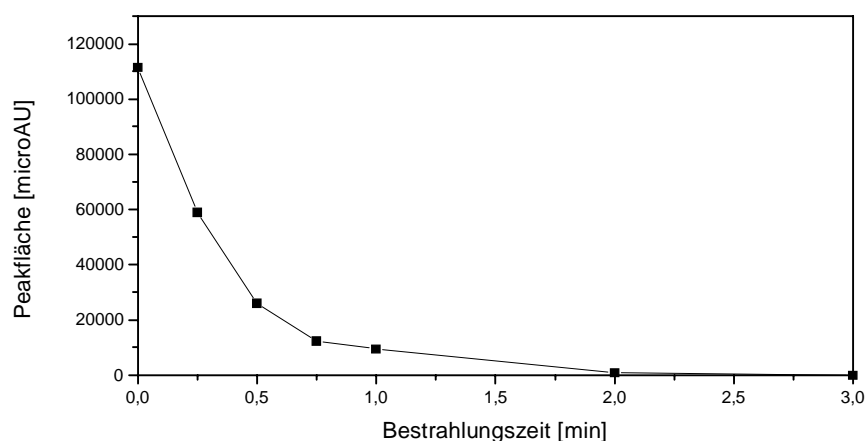


Abb. 22: Fläche des Diclofenac-Peaks in Abhängigkeit von der UV_{254 nm}-Bestrahlungszeit. 4050 ng Diclofenac/mL in einer Quarzküvette (Hellma, 100-QS, K 82, 1 mm Schichtdicke). UV-Detektion (272 nm).

Nach erfolgter Bestrahlung wurden die Proben durch HPLC mit UV- und Fluoreszenz-Detektor untersucht. Die Abbildung 22 zeigt die Abnahme des Diclofenac-Peaks. Nach einer Bestrahlzeit von einer Minute sind nur noch ca. 8,6 % der Peakfläche (UV-Detektion, 272 nm) für Diclofenac vorhanden, bzw. nach 2 min noch 0,9 %.

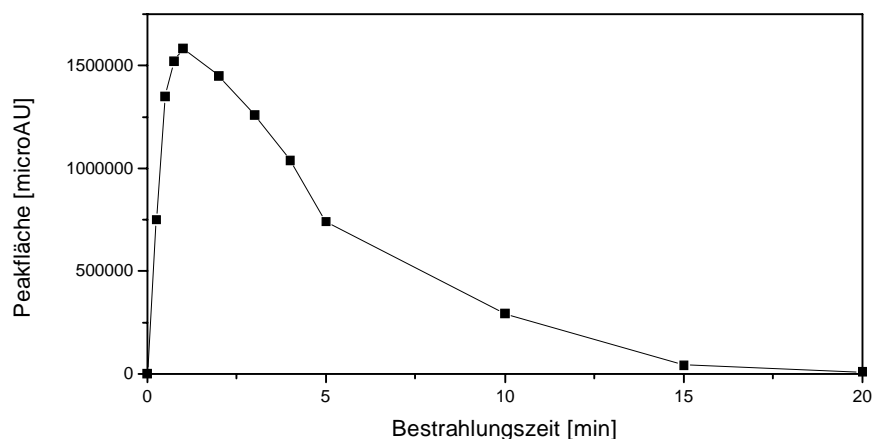


Abb. 23: Peakfläche der entstehenden Carbazol-1-essigsäure in Abhängigkeit von der $UV_{254 \text{ nm}}$ -Bestrahlungszeit. Fluoreszenz-Detektion (286/360 nm).

Demgegenüber stand das gleichzeitige Entstehen und Ansteigen eines zusätzlichen Peaks (der Carbazol-1-essigsäure) (Abb. 23). Das Entstehen dieses Produktes wurde bei 286/360 nm mit einem Fluoreszenz-Detektor überwacht. Nach einer einminütigen Bestrahlzeit wurde der größte Wert für die Fläche der CAA erreicht. Länger andauernde Bestrahlung resultierte in der Abnahme der gemessenen Peakflächen (Abb. 23 und 24).

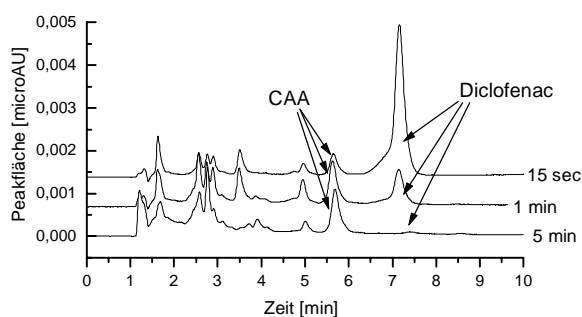


Abb. 24: Peakflächen in Abhängigkeit von drei ausgewählten Offline- $UV_{254 \text{ nm}}$ -Bestrahlungszeiten (15 sek, 1 min und 5 min). UV-Detektion bei 272 nm. (Weitere Daten siehe Text).

3.6.3 Einfluß der Flußgeschwindigkeit auf die Bildung der Reaktionsprodukte: Online-Photoderivatisierung

In einem weiteren Vorversuch wurde die Abhängigkeit der Bildung der Carbazol-1-essigsäure in Abhängigkeit von der Flußgeschwindigkeit untersucht. Verwendet wurde eine 20 m lange Tefzel-Kapillare mit einem Innendurchmesser von 0,25 mm. Daraus errechnete sich ein Gesamtkapillarvolumen von 1 mL. Beginnend mit einer Flußrate von 0,5 mL/min stieg die Peakfläche für die entstehende Carbazol-1-essigsäure stetig an. Die größten Peakflächen wurden schließlich bei einer Flußrate von 1 mL/min ermittelt. Bei noch höheren Fließgeschwindigkeiten nahmen die Peakflächen wieder kontinuierlich ab (Abb. 25).

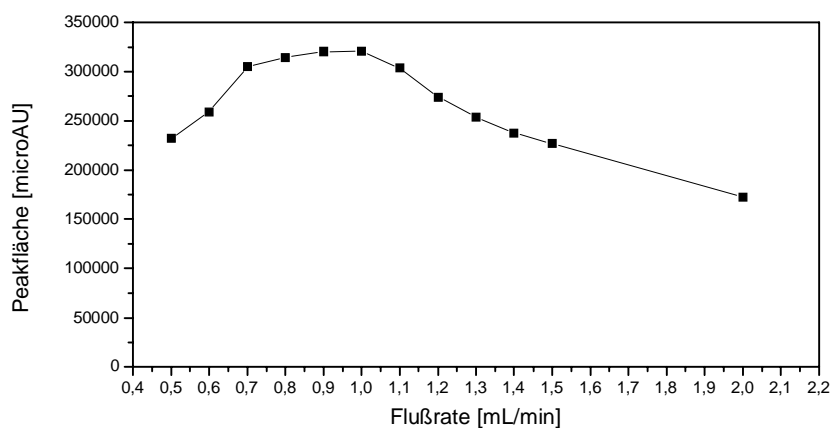


Abb. 25: Peakflächen-Verlauf der entstehenden Carbazol-1-essigsäure in Abhängigkeit von der Flußrate. Online-Photoderivatisierung durch UV_{254 nm}-Bestrahlung in einer 20 m langen Tefzel-Kapillare (Innendurchmesser 0,25 mm).

3.6.4 Daten der photochemischen Online-Nachsäulenderivatisierung

Beim Einsatz von frisch zubereiteten Eluenten (Kap. 2.3.2.1) und entsprechend den in Kapitel 2.3.6 angegebenen Vorgaben erschien der Diclofenac-Peak bzw. der Carbazol-1-essigsäure-Peak nach ca. 7,1 min (t_R). Bei einer Retentionszeit von 7,09 min und einer Totzeit von 2,91 min ergibt sich daraus ein Retentionsfaktor von 1,44. Die Nachweisgrenze, bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3, lag bei 1 ng/mL. Für den untersuchten Linearitäts-Bereich von 2,175 bis 1740 ng Diclofenac/mL wurde ein Korrelationskoeffizient von 0,9999995 ermittelt. Die berechnete Tagesstandardabweichung lag für die Injektion der Proben per Hand (20 µL) bei Berechnung über die Peakfläche bei 5,5 % und bei Berechnung über die Peakhöhe bei 7,4 % (73 ng Diclofenac/mL, $n = 9$). Die Peakbreite vergrößerte sich von 0,227 min (ohne die TEFZEL-Kapillare) auf 0,277 min (mit Kapillare),

was einen Anstieg von 22 % bedeutete. Gleichzeitig nahm die Retentionszeit von 5,5 min auf 6,9 min zu (entspricht einem Zuwachs von 25 %).

3.6.5 Anwendung der photochemischen Online-Nachsäulenderivatisierung auf Augenkammerwasser-Proben des Menschen

Bei Anwendung der in Kap. 2.3.6 beschriebenen HPLC-Methode für Augenkammerwasser-Proben trat der Diclofenac-Peak bei $t_R = 7,1$ min auf. Die Abbildungen 26 und 27 zeigen UV- und Fluoreszenz-Chromatogramme für Augenkammerwasser-Proben des Menschen, jeweils mit und ohne UV-Bestrahlung der Probe während der Passage durch den photochemischen Reaktor. In keinem Analysenlauf traten störende Peaks oder Überlagerungen auf.

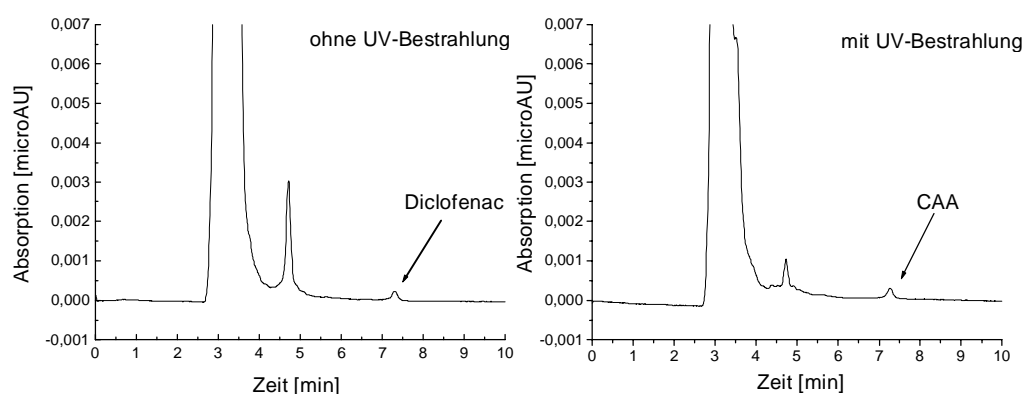


Abb. 26: HPLC-Chromatogramme von Augenkammerwasser-Proben des Menschen (UV-Detektion bei 272 nm). Mit und ohne UV_{254 nm}-Bestrahlung. 74 ng Diclofenac/mL.

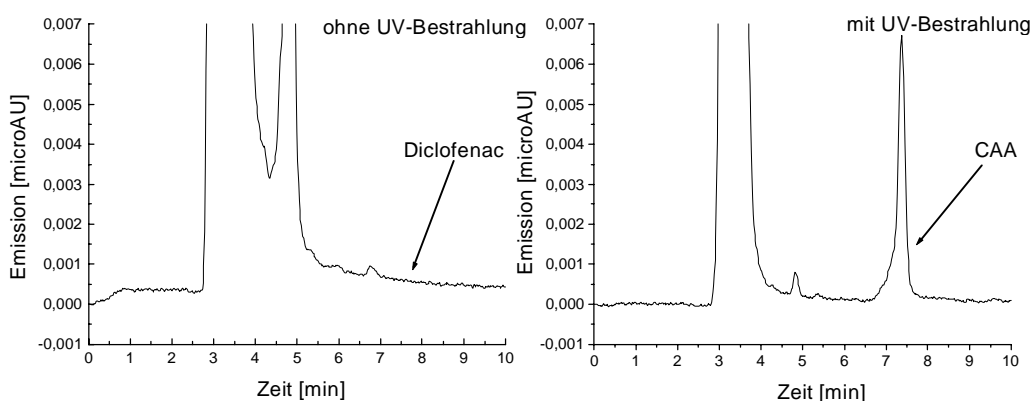


Abb. 27: HPLC-Chromatogramme von Augenkammerwasser-Proben des Menschen (Fluoreszenz-Detektion: 286/360 nm). Mit und ohne UV_{254 nm}-Bestrahlung. 74 ng Diclofenac/mL.

Diclofenac und das Photoderivat Carbazol-1-essigsäure konnten bei 272 nm detektiert werden (Abb. 26), auch wenn das Absorptionsmaximum für CAA mit 286 nm (Abb. 20) leicht über dem von Diclofenac (Abb. 13) lag. Mit der Fluoreszenz-Detektion konnte nur die CAA bestimmt werden (Abb. 27). Diclofenac zeigte keinerlei Fluoreszenz.

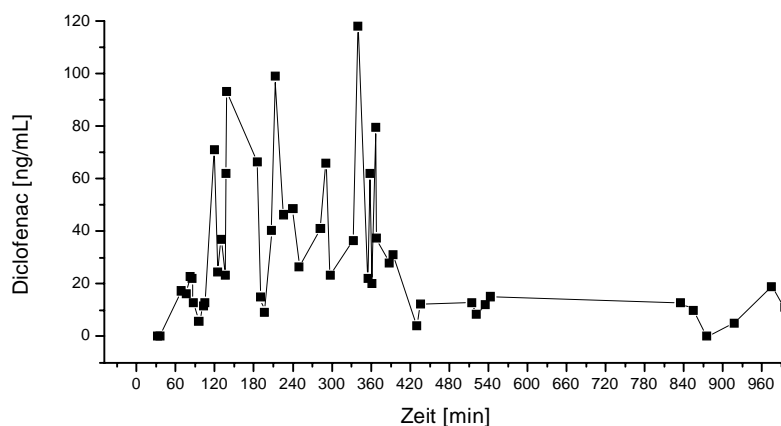


Abb. 28: Diclofenac-Kammerwasserspiegel von 50 Patienten (23 männlich, 27 weiblich) in Abhängigkeit von der Einwirkzeit von Diclofenac-Augentropfen (0,1 % Voltaren[®], einmalig 2 Tropfen).

Tab. 6: Gruppeneinteilung für 50 Patienten (23 männlich, 27 weiblich) nach der Dauer der Einwirkzeit von Diclofenac-Augentropfen (0,1 %, Voltaren[®], einmalig 2 Tropfen). Die Diclofenac-Konzentrationen für die einzelnen Patienten sind in Tabelle II des Anhangs dargestellt.

Probenentnahme [min]	Mittelwert [min]	Diclofenac [ng/mL]	Standardabweichung [ng/mL]	Patientenzahl
0-36	18	0	0	2
68-95	82,2	16,2	6,3	6
103-124	112,8	30,0	27,9	4
130-196	156,3	49,9	36,9	8
207-226	221,3	58,5	32,3	3
240-290	273,6	44,5	14,2	4
297-361	340,5	46,9	38,2	6
367-430	389,2	36,0	24,0	5
435-515	461,7	12,5	6,3	3
521-855	657,8	11,7	2,6	5
875-995	940,8	8,8	8,2	4

Die Diclofenac-Kammerwasserspiegel von 50 Patienten sind in Abbildung 28 dargestellt. 23 Männer und 27 Frauen im Alter zwischen 43 und 90 Jahren (Durchschnitt: 74,2 Jahre) wurden für eine klinische Studie im Zeitraum April 1995 bis Januar 1998 untersucht (alle Daten in Tab. II, Anhang). Im Rahmen einer Kataraktextraktion wurden den Patienten 40-150 μ L Augenkammerwasser mittels Vorderkammerpunktion entnommen und bis zur

HPLC-Analyse bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Plastikcups gelagert. Vor der Operation waren den Patienten über eine randomisierte Zuteilung im Zeitraum von 32 bis 995 min vor dem Eingriff jeweils einmal Diclofenac-Augentropfen (0,1 %, Voltaren[®], 2 Tropfen) in den Bindehautsack des zu operierenden Auges appliziert worden. Tabelle 6 zeigt die Daten in 11 Zeitbereiche unterteilt. Abbildung 29 stellt die Werte graphisch aufbereitet dar. Die 50 Einzelwerte (Tab. II, Anhang) konnte man noch einmal in drei Zeitbereiche zusammenfassen: 1) Im **Zeitraum von 0 bis 95 min** lagen die Werte zwischen 0 und 22,9 ng/mL (Durchschnitt: 12,1 ng/mL; $n = 8$). Bis zu einer Einwirkzeit von 36 min war kein Diclofenac meßbar. Nach 68 min konnte 17,3 ng Diclofenac/mL nachgewiesen werden. 2) In den **Zeitraum von 103 bis 393 min** fielen 29 Patienten, bei denen die durchschnittliche Diclofenac-Konzentration im Augenkammerwasser bei 46,3 ng/mL lag. Der niedrigste Wert lag bei 9,2, der höchste bei 136,0 ng Diclofenac pro mL Kammerwasser. 3) Im **Zeitraum von 430 bis 995 min** lagen die Werte zwischen 0 und 19,0 ng/mL (Durchschnitt: 10,4 ng/mL; $n = 13$). In dieser Abklingphase konnte selbst nach 995 min noch Diclofenac im Kammerwasser nachgewiesen werden (11,0 ng/mL).

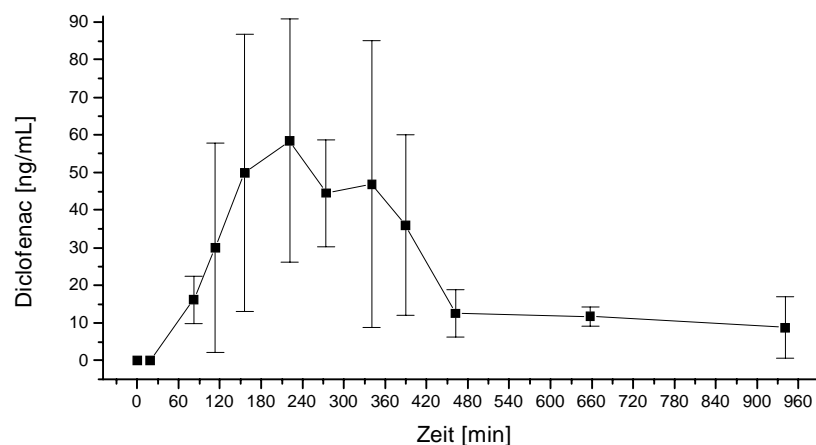


Abb. 29: Mittlere Diclofenac-Kammerwasserspiegel für 11 Zeitbereiche (Tab. 6) mit Darstellung der berechneten Standardabweichungen.

Abbildung 30 stellt die Diclofenac-Konzentrationen für die 50 Patienten unter Anwendung eines einfachen inversen Gauß-Modells auf Grundlage der 50 Datenpunkte dar. Die daraus berechnete mittlere Verweildauer für Diclofenac im Augenkammerwasser lag bei 6,6 Stunden und die relative Dispersion (CV^2) bei ca. 0,6.

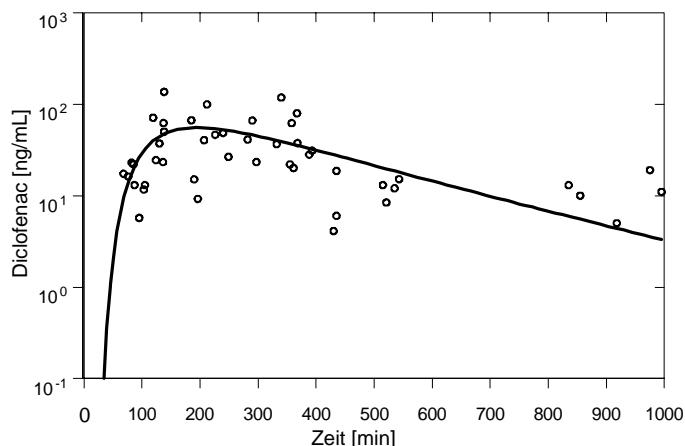


Abb. 30: Darstellung der Diclofenac-Kammerwasserkonzentration für 50 untersuchte Patienten (23 männlich, 27 weiblich) als Punktwolke (\circ) in Abhängigkeit von der Einwirkzeit von Diclofenac-Augentropfen (0,1 % Voltaren[®], einmalig 2 Tropfen). Die durchgezogene Linie (---) stellt einen mit einem einfachen inversen Gauß-Modell modellierten Kurvenverlauf dar.

3.6.6 Anwendung der photochemischen Online-Nachsäulenderivatisierung auf Perfusat-Proben der Ratte und Blut-Proben des Menschen

Die Wiederfindungsraten für Diclofenac nach der Fällungsreaktion mit Acetonitril aus Perfusat lagen nach Berechnung über die Peakfläche zwischen 95,7 und 104,6 % und nach Berechnung über die Peakhöhe zwischen 94,6 und 104,4 %. Die entsprechenden Wiederfindungsraten nach der Fällung aus Plasma reichten für die Peakfläche von 95,7 bis 106,1 % und für die Peakhöhen-Berechnung von 95,5 bis 104,7 %. Die Abbildung 31 zeigt typische Chromatogramme für Blut-Proben des Menschen (**A**) und Perfusat-Proben der Ratte (**B**).

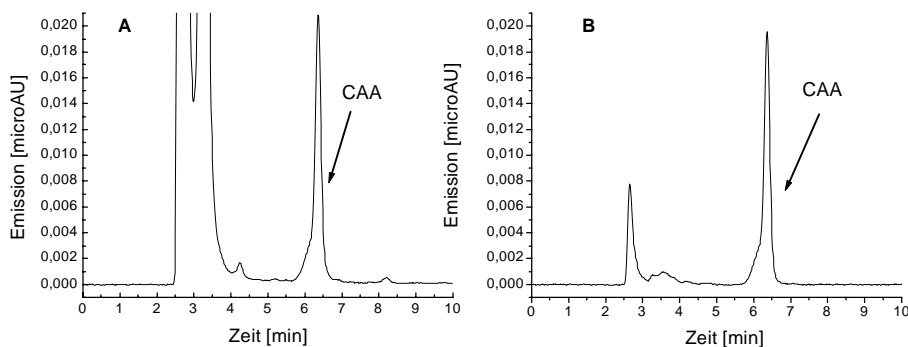


Abb. 31: HPLC-Chromatogramme (Fluoreszenz-Detektion: 286/360 nm) von Blut-Proben des Menschen (**A**) und Perfusat-Proben der Ratte (**B**). Die Proben wurden mit jeweils 327,5 ng Diclofenac pro mL Blut/Perfusat versehen.

In Abbildung 32 sind zwei Vorversuche dargestellt, die den Einfluß von Gallensäuren auf die Resorption von Diclofenac untersuchen (Versuchsordnung beschrieben in Kap. 2.2.2). Die Konzentration von Diclofenac im Blut erreichte nach 150 min seinen höchsten Wert (1270,6 ng/mL). Die letzte noch meßbare Probe lag bei 390 min (19,2 ng/mL). Der gleiche Versuch, jedoch unter Zugabe von 1000 mg der Gallensäure Dihydroxycholansäure, zeigte bereits nach 105 min den maximalen Wert von 1234,2 ng/mL. Auch hier befand sich die letzte noch quantifizierter Probe mit 14,9 ng/mL bei 390 min.

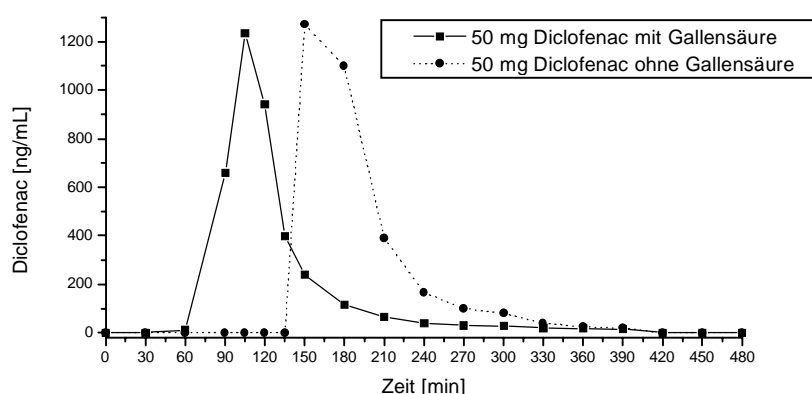


Abb. 32: Konzentrations-Zeit-Kurve nach oraler Gabe von Diclofenac (mit und ohne Zugabe von Gallensäuren) in menschlichem Blut. Experiment wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben. Jeder Datenpunkt resultiert aus der doppelten Bestimmung einer vorliegenden Probe einer weiblichen Probandin.

3.7 HPLC-Bestimmung von FENOTEROL

Das Excitationsspektrum von Fenoterol (HPLC-Anlage der Firma Spectra-Physics Detektor 1; Kap. 2.1.2.2) zeigte einen charakteristischen Absorptions-Peak bei 274-276 nm (Abb. 33). Im kurzwelligeren Bereich konnte bei ca. 218 nm ein weiteres Absorptionsmaximum nachgewiesen werden. Das mit dem Fluoreszenzspektrometer (Hitachi, F-3010) aufgenommene Emissionsmaximum lag zwischen 304 und 306 nm (Abb. 34). Die Retentionszeit lag bei 4,9 min ($k' = 1,7$). Die Nachweisgrenze lag bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3 für die UV-Detektion (274 nm) bei ca. 80 ng/mL und für die Fluoreszenz-Detektion bei ca. 80 ng/mL (Excitation: 274 nm, Emission: 304 nm), bzw. bei ca. 40 ng/mL (Excitation: 218 nm, Emission: 304 nm). Der lineare Meßbereich für die UV-Detektion reichte von 164 bis 164000 ng/mL (Korrelationskoeffizient = 0,999998) und bei der Fluoreszenz-Detektion (218/304 nm) von 82 bis 16400 ng/mL (Korrelationskoeffizient= 0,999994). Die Standardabweichungen für die UV-Detektion (274 nm) lag bei Berechnung

über die Peakfläche bei 4,1 % (164 ng Fenoterol/mL; n = 8), bzw. bei Berechnung über die Peakhöhe bei 3,7 % und für die Fluoreszenz-Detektion (218/304 nm) bei 6,16 % bzw. bei 4,57 % (143,2 ng/mL, n = 8).

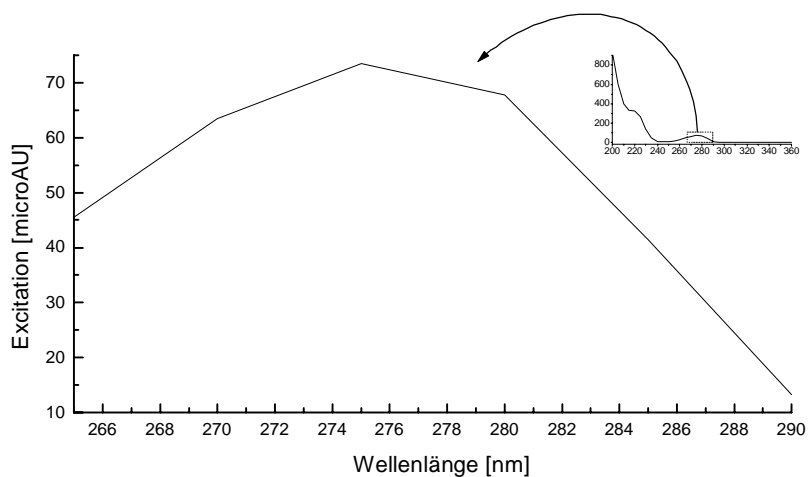


Abb. 33: Excitationsspektrum von Fenoterol.

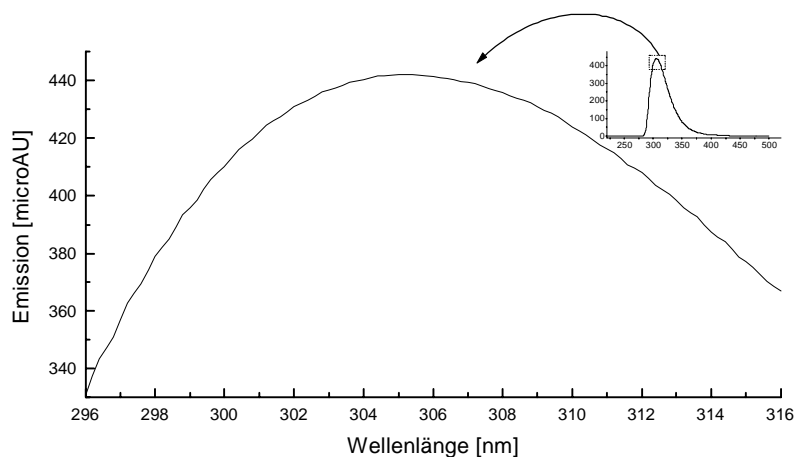


Abb. 34: Emissionsspektrum von Fenoterol.

3.7.1 Anwendung der FENOTEROL-Methode auf Perfusat-Proben der Ratte

Die Abbildung 35 zeigt zwei Chromatogramme einer Perfusat-Probe die Fenoterol enthielt, eines mit UV-Detektion (**A**) und eines mit Fluoreszenz-Detektion (**B**). Die Wiederfindungsraten nach der Fällungsreaktion mit 2 M HClO₄ aus Perfusat lagen bei Berechnung über die

Peakfläche zwischen 101,5 und 105,9 % und bei Berechnung über die Peakhöhe zwischen 97,2 und 108,6 %. Die Ergebnisse der Versuche mit den in-situ perfundierten Rattenlebern und die Auswertung der pharmakokinetischen Parameter sind ab Kapitel 3.11 dargestellt.

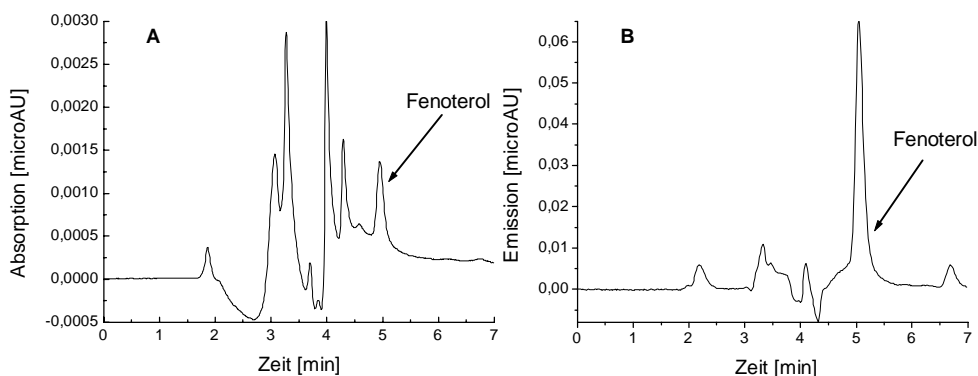


Abb. 35: Vergleichende Darstellung von Chromatogrammen mit jeweils 1313 ng Fenoterol/mL nach Fällung mit 2 M HClO₄ aus Perfusat. **A:** UV-Detektion (274 nm). **B:** Fluoreszenz-Detektion (Excitation: 218 nm, Emission: 304 nm).

3.8 HPLC-Bestimmung der *p*-AMINOHIPPURSÄURE (PAH) und der *p*-ACETYL-AMINOHIPPURSÄURE (PAAHA)

Die Excitationsspektren der PAH (Abb. 36) und der PAAHA (Abb. 38) wurden mit der HPLC-Anlage der Firma Spectra-Physics aufgenommen (Detektor 1; Kap. 2.1.2.2) und die Emissionsspektren (Abb. 37 und 39) mit dem Fluoreszenzspektrometer (Hitachi, F-3010). Die Maxima der Excitation und Emission für die PAH lagen bei 276 bzw. 346 nm und für die PAAHA bei 263 und 330 nm.

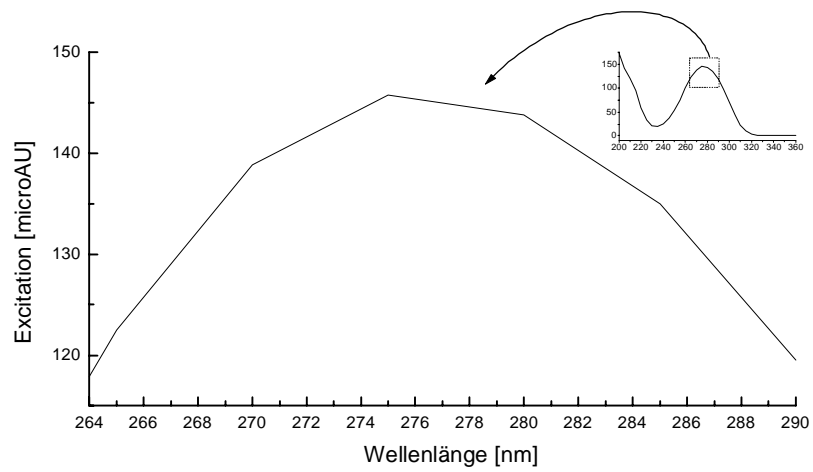


Abb. 36: Excitationsspektrum der *p*-Aminohippursäure (PAH).

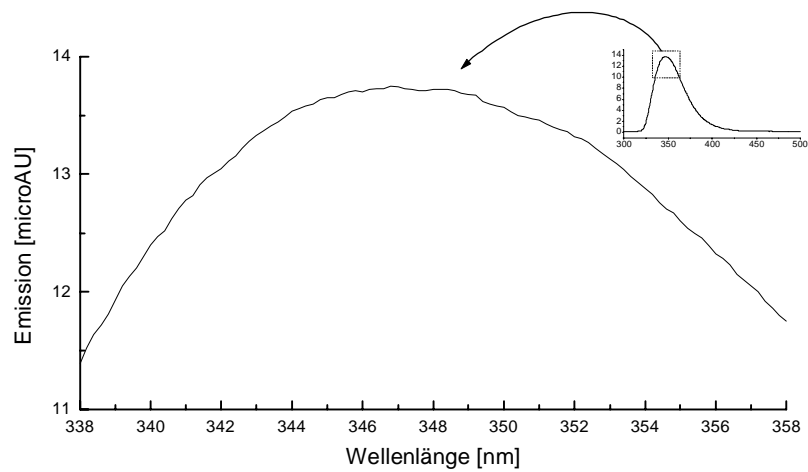


Abb. 37: Emissionsspektrum der *p*-Aminohippursäure (PAH).

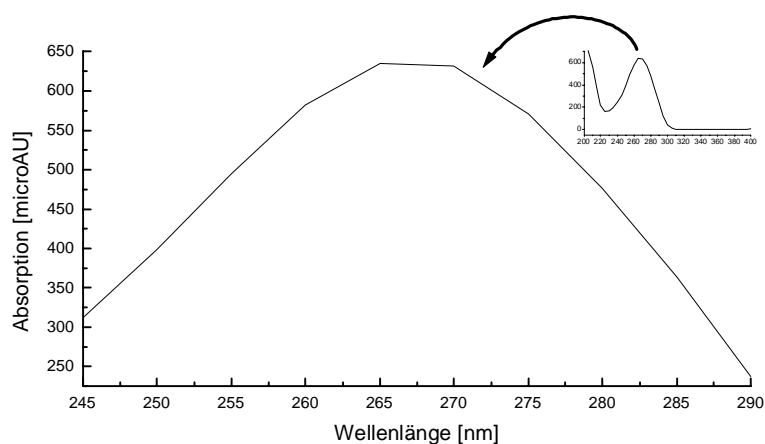


Abb. 38: Excitationsspektrum der synthetisierten *p*-Acetylaminohippursäure (PAAHA).

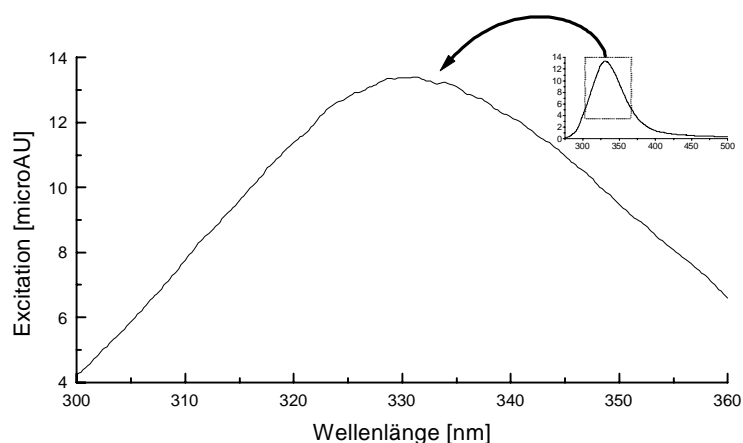


Abb. 39: Emissionsspektrum der synthetisierten *p*-Acetylaminohippursäure (PAAHA).

Bei einer Flußrate von 0,8 mL/min erschien der PAH-Peak bei 4,6 min (t_R) ($k' = 1,5$) und der PAAHA-Peak bei 9,0 min (t_R) ($k' = 3,9$). Die Rauschwerte lagen zwischen 2 und 4. Die Nachweisgrenze für die PAH lag bei UV- und Fluoreszenz-Detektion jeweils bei 4 ng/mL (Signal-Rauschwert = 3) und für die PAAHA bei 15 ng/mL (UV-Detektion). Der lineare Meßbereich reichte für die PAH von 8 bis 151000 ng/mL (UV-Detektion) bzw. 8-15100 ng/mL (Fluoreszenz-Detektion). Die zugehörigen Korrelationskoeffizienten waren 0,9991 und 0,998. Für die PAAHA war der Meßbereich von 25 bis 131000 ng/mL (UV-Detektion) linear (Korrelationskoeffizient = 0,999996). Die tägliche Standardabweichung betrug für die PAH unter Verwendung der UV-Detektion und bei Berechnung der Peakfläche 4,4 % (75,5

ng/mL; n = 6) und bei Berechnung der Peakhöhe 4,6 %, bzw. bei Anwendung der Fluoreszenz-Detektion 3,7 % und 3,7 % (75,5 ng/mL; n = 6). Die Standardabweichung für die PAAHA lag bei 2,6 % für die Peakfläche und 2,8 % für die Peakhöhe (UV-Detektion; 65,5 ng/mL; n = 10).

3.8.1 Anwendung der PAH- und der PAAHA-Methode auf Serum-Proben des Menschen und auf Perfusat-Proben der Ratte

Die Wiederfindungsraten von PAH nach der Fällungsreaktion mit 2 M HClO₄ aus Perfusat lagen zwischen 97,8 und 101,2 % (Berechnung über die Peakfläche des UV-Chromatogramms), bzw. 98,2 und 100,8 % (Peakhöhe des UV-Chromatogramms). Die entsprechenden Werte für die Auswertung der Fluoreszenz-Chromatogramme reichten von 93,7 bis 102,3 % (Peakfläche), bzw. von 97,8 bis 102,4 % (Peakhöhe). Für die Fällungsreaktionen von PAH aus Plasma berechneten sich folgende Werte: 97,0 bis 101,2 % (Peakfläche, UV-Chromatogramm), 98,2 bis 100,7 % (Peakhöhe, UV-Chromatogramm), 93,7 bis 102,3 % (Peakfläche, FL-Chromatogramm) und 97,8 bis 102,4 % (Peakhöhe, FL-Chromatogramm). Die Wiederfindungsraten von PAAHA nach der Fällung mit 2 M HClO₄ aus Perfusat reichten von 92,8 bis 113,0 % (Berechnung über die Peakfläche), bzw. 103,1 bis 115,8 % (Peakhöhe). Für die Fällung aus Plasma lagen die Werte zwischen 89,7 und 102,1 % (Peakfläche), bzw. zwischen 99,5 und 103,7 %.

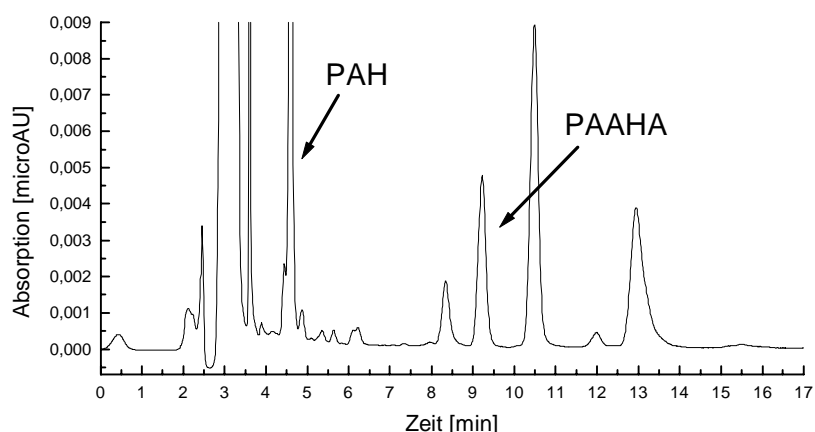


Abb. 40: HPLC-Chromatogramm einer Plasma-Probe des Menschen. PAH (1148 ng/mL) wurde bei 276 nm detektiert und PAAHA (1911 ng/mL) bei 263 nm.

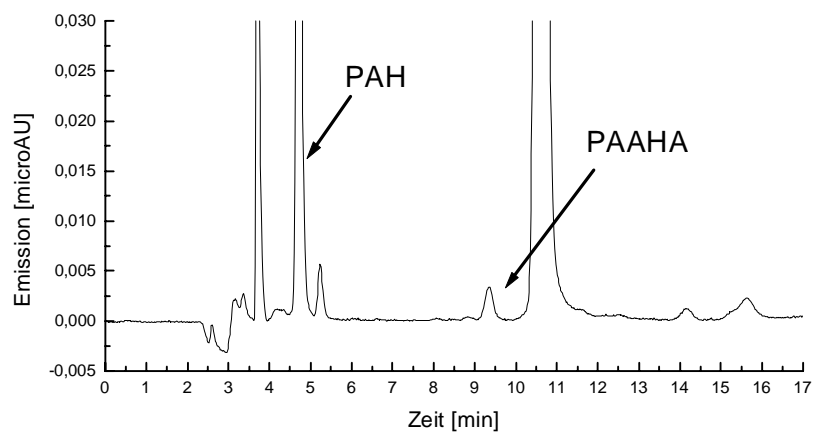


Abb. 41: HPLC-Chromatogramm einer Plasma-Probe des Menschen. Excitation: 276 nm, Emission: 346 nm. Das Plasma enthält 1148 ng/mL PAH und 1911 ng/mL PAAHA.

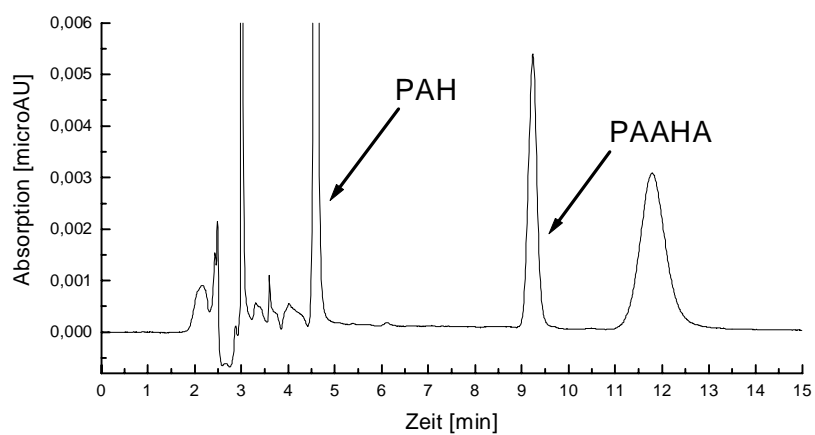


Abb. 42: HPLC-Chromatogramm einer Perfusat-Probe. PAH (1148 ng/mL) wurde bei 276 nm detektiert und PAAHA (1911 ng/mL) bei 263 nm.

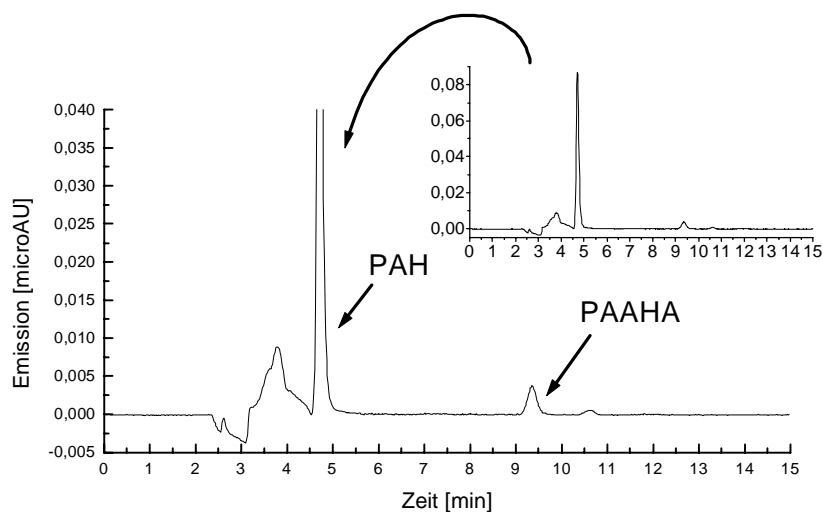


Abb. 43: HPLC-Chromatogramm einer Perfusat-Probe. Excitation: 276 nm, Emission: 346 nm. Das Perfusat enthielt 1148 ng/mL PAH und 1911 ng/mL PAAHA.

Die Abbildungen 40 und 41 zeigen zwei Chromatogramme von mit PAH und PAAHA versetzten Plasma-Proben des Menschen nach der Fällungsreaktion. Die Abbildungen 42 und 43 geben die entsprechenden Chromatogramme für Perfusat-Proben wieder.

3.9 HPLC-Bestimmung von OXYBUPROCAIN

Neben der im Kapitel 3.5 beschriebenen elektrochemischen Detektion ist Oxybuprocain auch über UV- und Fluoreszenz-Detektion zugänglich. Das Absorptionsspektrum (HPLC-Anlage der Firma Spectra-Physics; Detektor 1; Kap. 2.1.2.2) zeigte ein erstes Maximum bei ca. 228 nm und ein zweites bei ca. 308 nm (Abb. 44). Das Emissionsspektrum wurde bei einer Anregungswellenlänge von 308 nm mit dem Fluoreszenzspektrometer Hitachi, F-3010 aufgenommen. Das Emissionsmaximum lag bei ca. 352 nm (Abb. 45). Entsprechend der in Kapitel 2.3.9 angegebenen Vorgaben wurde die HPLC-Analyse durchgeführt. Bei einer Flußrate von 1,0 mL/min erschien der Oxybuprocain-Peak nach 2,5 min (t_R) ($k' = 1,5$). Die Rauschwerte lagen zwischen 2 und 4. Bei Verwendung des UV-Detektors (308 nm) lag die Nachweisgrenze bei 20 ng/mL (Signal-Rausch-Verhältnis = 3). Der lineare Meßbereich lag zwischen 40 und 142000 ng/mL (Korrelationskoeffizient = 0,99990). Bei Anwendung der Fluoreszenz-Detektion lagen die Nachweisgrenzen bei 142 ng/mL (Excitation: 228 nm/Emission: 352 nm), bzw. bei 35 ng/mL (308/352 nm); beide bei einem Signal-Rausch-

Verhältnis von 3. Der lineare Meßbereich begann bei 300 (228/352 nm), bzw. bei 71 ng/mL (308/352 nm) und reichte jeweils bis 71000 ng/mL. Der Korrelationskoeffizient lag bei 0,9998 (308/352 nm). Die Tagesstandardabweichung für die UV-Detektion (308 nm) war bei Berechnung über die Peakfläche 2,1 % und 1,8 %, bei Berechnung über die Peakhöhe (71 ng/mL; n = 10) und für die Fluoreszenz-Detektion (308/352 nm) 5,1 %, bzw. 5,7 % (71 ng/mL; n = 10).

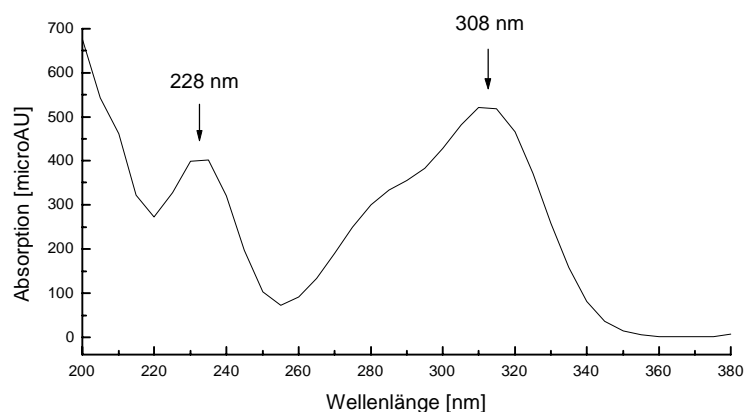


Abb. 44: Absorptionsspektrum von Oxybuprocain.

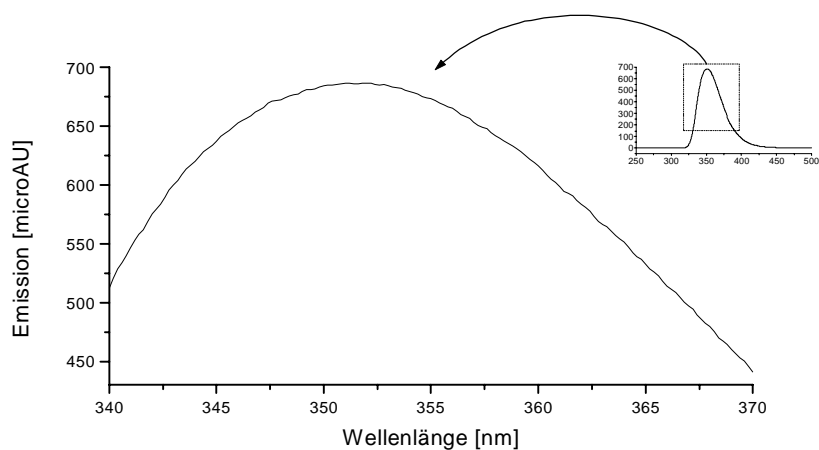


Abb. 45: Emissionsspektrum von Oxybuprocain.

3.9.1 Anwendung der OXYBUPROCAIN-Methode auf Augenkammerwasser-Proben des Menschen

In Abbildung 46 sind ein UV-Chromatogramm (A) und ein Fluoreszenz-Chromatogramm (B) einer Augenkammerwasser-Probe des Menschen zu sehen, die mit 142 ng Oxybuprocain pro Milliliter Kammerwasser versetzt wurde. Alle Augenkammerwasser-Proben, die auf Oxybuprocain im Rahmen der in Kapitel 3.5.1 und 3.6.5 genannten Studie untersucht wurden, waren mit der in Kapitel 3.5 beschriebenen Methode (elektrochemische Detektion) quantifiziert worden (siehe auch Kap. 4.4).

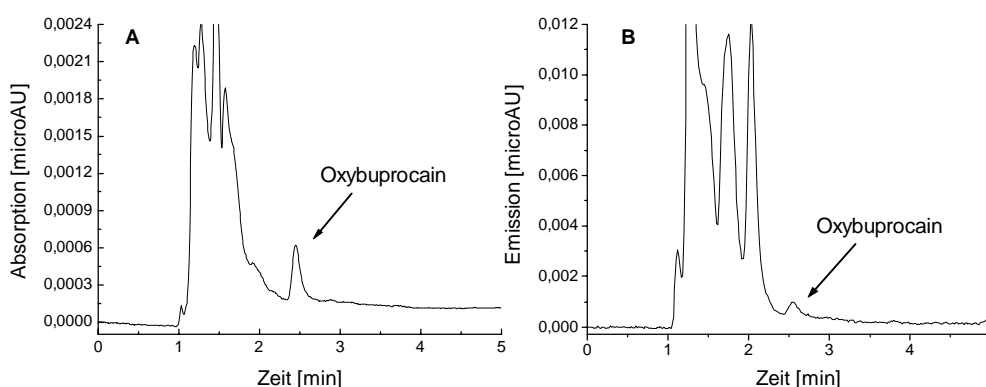


Abb. 46: Vergleichende Darstellung von Chromatogrammen mit jeweils 142 ng/mL Oxybuprocain in Augenkammerwasser-Proben des Menschen. **A:** UV-Chromatogramm (308 nm). **B:** Fluoreszenz-Chromatogramm (Excitation: 308 nm, Emission: 352 nm).

3.10 Darstellung der Ausflußkurven für DICLOFENAC, FENOTEROL, p-AMINOHIPPURSÄURE (PAH), p-ACETYLAMINOHIPPURSÄURE (PAAHA), ¹⁴C-SACCHAROSE und ³H₂O

Für die Darstellung der Ausflußkurven wurden die bereits Dosis normierten Daten für die jeweiligen Wirkstoffe herangezogen. Abbildung 47 zeigt die normierten Ausflußkurven in halblogarithmischer Form für je einen Versuch mit Wasser (**A:** Ratte Nr. 5, Injektion 1; 5-1), Saccharose (**B:** 9-1), Diclofenac (**C:** 9-6), Fenoterol (**D:** 11-4), PAH (**E:** 5-3) und PAAHA (**F:** 7-6).

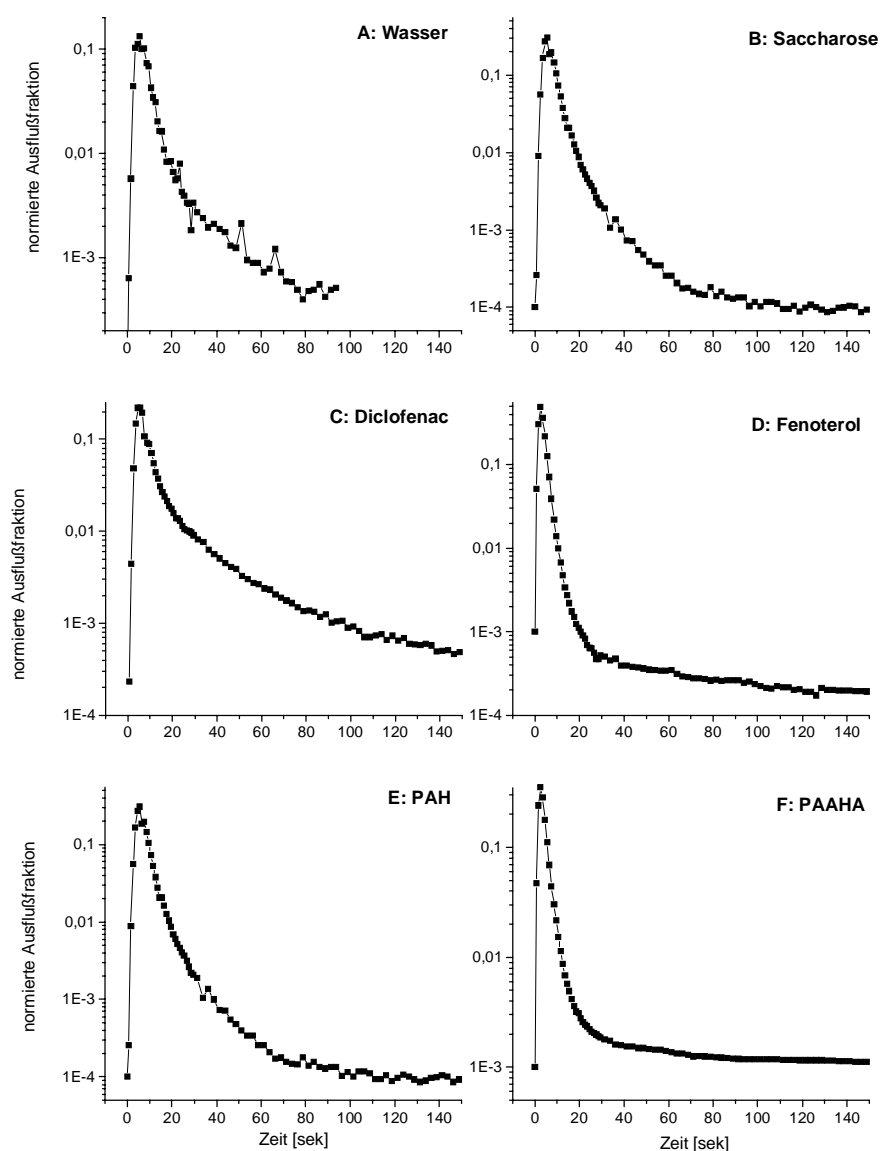


Abb. 47: Dosis normierte Ausflußkurven für je einen Versuch mit Wasser (**A:** Ratte Nr. 5, Injektion 1; 5-1), Saccharose (**B:** 9-1), Diclofenac (**C:** 9-6), Fenoterol (**D:** 11-4), PAH (**E:** 5-3) und PAAHA (**F:** 7-6). Halblogarithmische Darstellung.

3.11 Berechnung der Parameter für die Versuche mit der in-situ perfundierten Rattenleber

Für die Berechnung der Momente AUC , AUC_n , MTT und CV^2 wurde ein in FORTRAN implementierter Algorithmus von Purves (1992a, 1992b, 1992c) verwendet. Die Katheter-Kenngrößen MT_{cath} und CV^2_{cath} (wie im Kap. 3.12 beschrieben) wurden dabei für die Berechnung in den Algorithmus einbezogen. Die ermittelten Daten sind in den Tabellen 7-14 nach Wirkstoffen getrennt für jeden Versuch aufgelistet. Für die Momente AUC_n , MTT

und CV^2 wurden von den 78 Meßpunkten eines jeden Versuches die letzten 25 Datenpunkte (Ausnahme Tab. 14: die letzten 5 Datenpunkte) dem Tailpart zugerechnet und für die Berechnungen herangezogen. AUC_n beschreibt dabei die berechnete Fläche der Ausflußkurve bis zum letzten vorhandenen Meßpunkt und stellt damit einen experimentell ermittelten Wert dar. Die AUC hingegen ergab sich aus der Extrapolation der Daten bis zum theoretischen Ende der Kurve. Für jede Injektion wurde außerdem aus der AUC_n und den zugehörigen Eichwerten die Wiederfindungsrate (Recovery) berechnet.

Tab. 7: Berechnete Parameter für die Versuche mit der Injektion von 3H_2O in die in-situ perfundierte Rattenleber.

Versuch	Eingesetzte Aktivität [μCi]	Recovery [%]	AUC_n	AUC	MTT [sek]	CV^2
1-1	3	55,1	1,089	1,100	24,824	0,841
2-1	3	70,2	1,356	1,366	17,229	1,296
3-1	3	70,3	1,357	1,362	15,446	1,083
5-1	3	86,9	1,657	1,680	9,471	2,853
6-1	3	53,9	1,043	1,064	13,803	2,783
7-1	3	96,0	1,821	1,834	7,913	1,540
8-1	3	96,3	1,857	1,862	6,595	0,808
9-1	3	95,3	1,839	1,845	8,297	0,729
10-1	3	108,7	2,106	2,121	8,687	1,753
11-1	3	112,2	2,169	2,238	11,481	1,170
12-1	3	87,0	1,658	1,679	8,406	1,223
Mittelwert:		84,7	1,632	1,650	12,014	1,462
Standardabweichung:		19,9	0,379	0,387	5,451	0,737
Median:		87,0	1,658	1,680	9,471	1,223
Maximum:		112,2	2,169	2,238	24,824	2,853
Minimum:		53,9	1,043	1,064	6,595	0,729

Tab. 8: Berechnete Parameter für die Versuche mit der Injektion von ^{14}C -Saccharose in die in-situ perfundierte Rattenleber.

Versuch	Eingesetzte Aktivität [μCi]	Recovery [%]	AUC_n	AUC	MTT [sek]	CV^2
1-1	2	52,2	1,042	1,046	17,530	1,070
2-1	2	69,0	1,326	1,330	11,256	1,837
3-1	2	81,6	1,609	1,612	10,503	1,641
5-1	2	80,7	1,558	1,566	9,283	5,818
6-1	2	45,1	0,888	0,893	12,092	2,921
7-1	2	80,7	1,556	1,567	9,140	9,057
8-1	2	90,5	1,762	1,772	8,195	10,287
9-1	2	89,9	1,765	1,777	10,419	6,824
10-1	2	95,8	1,874	1,888	10,242	5,815
11-1	2	91,5	1,784	1,788	6,236	5,862
12-1	2	81,8	1,616	1,631	10,398	5,239
Mittelwert:		78,1	1,526	1,534	10,481	5,125
Standardabweichung:		16,3	0,316	0,318	2,818	3,013
Median:		81,6	1,609	1,612	10,398	5,815
Maximum:		95,8	1,874	1,888	17,530	10,287
Minimum:		45,1	0,888	0,893	6,236	1,070

Tab. 9: Berechnete Parameter für die Versuche mit der Injektion von Diclofenac in die in-situ perfundierte Rattenleber (+ F bedeutet, daß bei dieser Injektion Diclofenac zusammen mit Fenoterol injiziert wurde).

Versuch	Eingesetzte Konzentration [mg/mL]	Recovery [%]	AUC _n	AUC	MTT [sek]	CV ²
1-4	4,3	87,3	1,865	1,884	8,069	6,492
2-4	4,3	82,1	1,713	1,749	12,417	6,190
3-4	4,3	90,3	1,875	1,893	10,095	4,687
9-6	10,5 + F	91,1	1,794	1,826	19,415	3,309
9-7	10,5 + F	96,3	1,905	1,944	20,773	3,318
9-8	10,5	88,7	1,754	1,788	21,841	2,708
10-6	10,5 + F	91,3	1,815	1,856	15,226	7,442
10-7	10,5 + F	94,1	1,856	1,895	14,845	7,059
10-8	10,5	96,9	1,903	1,954	18,994	5,500
11-5	10,5 + F	94,6	1,883	1,920	13,507	8,195
11-6	10,5 + F	93,0	1,880	1,924	14,959	7,874
11-7	10,5	95,9	1,948	2,009	17,309	9,003
Mittelwert:		91,8	1,849	1,887	15,621	5,981
Standardabweichung:		4,3	0,068	0,073	4,236	2,090
Median:		92,2	1,870	1,894	15,093	6,341
Maximum:		96,9	1,948	2,009	21,841	9,003
Minimum:		82,1	1,713	1,749	8,069	2,708

Tab. 10: Berechnete Parameter für die Versuche mit der Injektion von ¹⁴C-Diclofenac in die in-situ perfundierte Rattenleber.

Versuch	Eingesetzte Aktivität [µCi]	Recovery [%]	AUC _n	AUC	MTT [sek]	CV ²
1-5	1	52,8	1,061	1,084	17,147	3,239
2-5	1	62,4	1,242	1,257	9,502	6,448
3-5	1	57,3	1,179	1,197	11,556	2,378
12-7	1	63,0	1,237	1,243	15,039	2,467
12-8	1	56,5	1,119	1,130	18,581	2,295
Mittelwert:		58,4	1,168	1,182	14,365	3,365
Standardabweichung:		4,3	0,078	0,074	3,792	1,794
Median:		57,3	1,179	1,197	15,039	2,467
Maximum:		63,0	1,242	1,257	18,581	6,448
Minimum:		52,8	1,061	1,084	9,502	2,295

Tab. 11: Berechnete Parameter für die Versuche mit der Injektion von Fenoterol in die in-situ perfundierte Rattenleber (+ D bedeutet, daß bei dieser Injektion Fenoterol zusammen mit Diclofenac injiziert wurde).

Versuch	Eingesetzte Konzentration [mg/mL]	Recovery [%]	AUC _n	AUC	MTT [sek]	CV ²
1-3	3,9	85,4	1,746	1,757	5,209	2,387
2-3	3,9	81,2	1,695	1,731	5,652	10,920
3-3	3,9	74,8	1,540	1,565	5,676	5,531
9-4	8,06	81,5	1,606	1,620	11,475	5,587
9-5	16,12	69,2	1,374	1,412	17,124	11,714
9-6	8,06 + D	75,2	1,480	1,508	15,645	6,932
9-7	8,06 + D	83,6	1,651	1,703	19,356	6,983
10-4	8,02	69,1	1,335	1,337	4,433	0,790
10-5	16,08	79,7	1,550	1,552	4,668	1,703
10-6	8,04 + D	62,6	1,208	1,211	4,590	1,641

10-7	8,04 + D	59,4	1,159	1,163	4,399	2,148
11-2	5,0	69,2	1,296	1,311	5,134	7,372
11-3	10,0	81,4	1,590	1,624	9,414	15,571
11-4	15,0	87,9	1,724	1,763	12,905	22,916
11-5	7,5 + D	59,6	1,174	1,176	3,647	0,961
11-6	7,5 + D	66,1	1,277	1,280	3,858	1,064
12-2	11,05	62,4	1,220	1,356	62,360	10,191
12-3	22,1	70,7	1,390	1,430	18,766	10,816
Mittelwert:		73,3	1,445	1,472	11,906	6,957
Standardabweichung:		9,2	0,199	0,203	13,755	5,967
Median:		72,8	1,435	1,469	5,664	6,260
Maximum:		87,9	1,746	1,763	62,360	22,916
Minimum:		59,4	1,159	1,163	3,647	0,790

Tab. 12: Berechnete Parameter für die Versuche mit der Injektion von *p*-Aminohippursäure (PAH) in die in-situ perfundierte Rattenleber (+ P bedeutet, daß bei dieser Injektion PAH zusammen mit Probenecid injiziert wurde) (n.b. = konnte nicht bestimmt werden).

Versuch	Eingesetzte Konzentration [mg/mL]	Recovery [%]	AUC _n	AUC	MTT [sek]	CV ²
1-2	4,0	72,3	1,493	1,501	9,711	3,556
2-2	4,0	83,8	1,728	1,735	5,469	6,689
3-2	4,0	87,7	1,811	1,818	5,115	8,212
5-2	8,03	63,4	1,251	1,253	10,454	1,922
5-3	8,03	67,7	1,339	1,358	15,476	4,560
5-4	8,03	57,4	1,138	1,154	15,303	4,911
5-5	8,03	46,2	0,916	0,939	19,936	8,283
5-6	8,03	65,9	1,301	1,307	11,618	2,426
5-7	8,03	50,2	0,989	1,000	13,258	4,948
7-2	4,0	66,2	1,267	1,271	6,679	1,082
7-3	8,0	64,7	1,239	1,246	7,858	4,102
8-2	4,0	82,3	1,587	1,595	6,638	4,293
8-3	8,0	80,4	1,548	1,556	7,376	4,516
8-4	12,0	n.b.	n.b.	n.b.	4,741	4,980
8-7	8,0 + P	72,7	1,402	1,408	5,163	4,174
9-3	12,05	n.b.	n.b.	n.b.	12,494	2,329
10-2	8,09	n.b.	n.b.	n.b.	6,461	2,570
10-3	16,06	n.b.	n.b.	n.b.	8,812	4,592
Mittelwert:		68,6	1,358	1,367	9,587	4,341
Standardabweichung:		12,3	0,258	0,256	4,316	1,960
Median:		67,0	1,335	1,340	7,028	4,234
Maximum:		87,7	1,811	1,818	19,936	8,283
Minimum:		46,2	0,916	0,939	4,741	1,082

Tab. 13: Berechnete Parameter für die Versuche mit der Injektion von *p*-Acetylaminohippursäure (PAAHA) in die in-situ perfundierte Rattenleber.

Versuch	Eingesetzte Konzentration [mg/mL]	Recovery [%]	AUC _n	AUC	MTT [sek]	CV ²
5-8	4,1	83,4	1,651	1,719	24,967	4,399
7-5	2,0	75,8	1,498	1,798	169,167	3,292
7-6	6,0	70,4	1,392	1,670	123,619	3,700
8-5	1,99	99,1	1,958	2,451	100,964	4,156
8-6	5,98	80,5	1,594	2,518	364,749	3,492

12-5	4,75	89,1	1,763	2,562	159,523	2,904
12-6	9,5	91,7	1,799	2,348	310,132	2,343
Mittelwert:		84,3	1,665	2,152	179,017	3,469
Standardabweichung:		9,8	0,192	0,403	119,064	0,708
Median:		83,4	1,651	2,348	159,523	3,492
Maximum:		99,1	1,958	2,562	364,749	4,399
Minimum:		70,4	1,392	1,670	24,967	2,343

Bei den Versuchen mit Bolusinjektionen von PAH wurde parallel auch noch der in der Leber entstehende Metabolit PAAHA bestimmt. Bei der Injektion von 8,0 mg/mL PAH trat PAAHA 9 sek (bei 4,0 mg/mL ca. 20 sek) nach dem ersten quantifizierbaren PAH-Peak auf. Die PAAHA-Konzentrationen stiegen dann bis auf Werte von 101 ng/mL (bei 4,0 mg/mL: Mittelwert = 50,2 ng/mL) an, um danach langsam wieder abzufallen. Dabei wurden die jeweils höchsten Werte, unabhängig von der eingesetzten Konzentration, nach ca. 63 sek erreicht. Am Ende der Versuche nach 150 sek lagen noch Konzentrationen zwischen 46 und 57 ng/mL vor (siehe auch Abb. 48). Bei den Injektionen mit 4,0 mg/mL lagen die letzten Werte bereits unterhalb der Nachweisgrenze für PAAHA. Die MTT für die Versuche mit 4,0 mg/mL (140,48 sek \pm 7,09) PAH unterschieden sich dabei nicht signifikant von denen mit 8,0 mg/mL (153,58 sek \pm 9,90). Dies galt auch für die Werte der relativen Dispersion (CV^2), die bei 0,499 (bei 4,0 mg/mL), bzw. bei 0,448 (bei 8,0 mg/mL) lagen und für die Wiederfindungsraten 0,255 % \pm 0,05 (bei 4,0 mg/mL) und 0,307 % \pm 0,05 (bei 8,0 mg/mL).

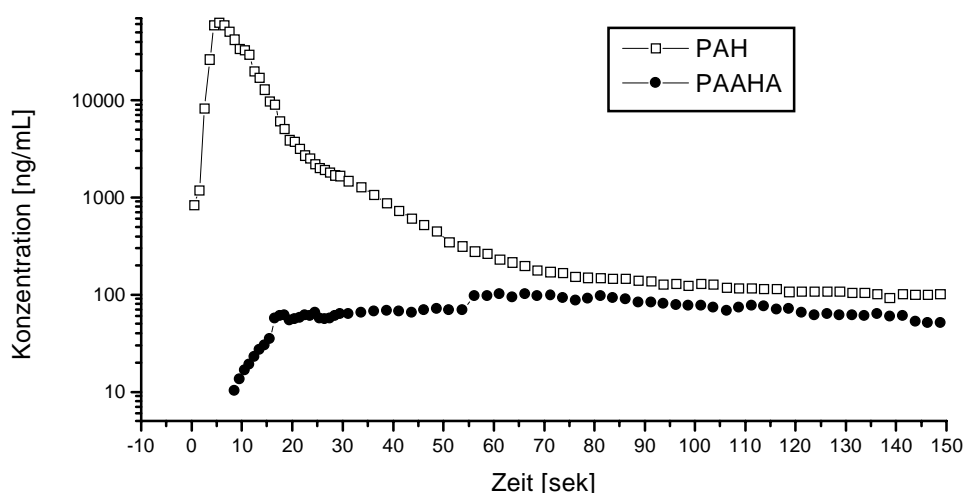


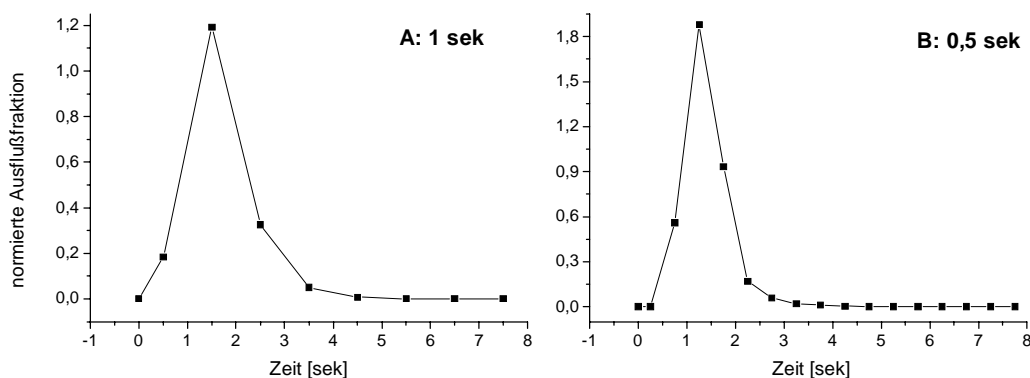
Abb. 48: Darstellung der Ausflußkurve für PAH (Versuch 5-3; Bolusinjektion: 8,0 mg/mL PAH) und des Kurvenverlaufes für den Metaboliten PAAHA.

Tab. 14: Berechnete Parameter für den bei PAH-Injektionen entstehenden Metaboliten (PAAHA).

Versuch	Eingesetzte Konzentration [mg/mL]	Recovery [%] [± Stabw]	Mittelwerte AUC _n [± Stabw]	Mittelwerte AUC [± Stabw]	Mittelwerte MTT [sek] [± Stabw]	Mittelwerte CV ² [± Stabw]
1-2 2-2 3-2 7-2 8-2	4,0	0,255 [±0,053]	3836,96 [±354,86]	7775,91 [±775,35]	140,48 [±7,09]	0,499 [±0,032]
5-2 5-3 5-4 5-5 5-6 5-7 7-3	8,0	0,307 [±0,054]	5501,10 [±145,74]	9393,86 [±1225,76]	153,58 [±9,90]	0,448 [±0,041]

3.12 Einfluß des Katheters auf die Ausflußkurve bei der in-situ perfundierten Rattenleber

Der Einfluß des Katheters auf die Form der Ausflußkurve mußte in die Modellierung für den zu untersuchenden Wirkstoff mit einbezogen werden. Abbildung 49 zeigt Ausflußkurven für Fenoterol in Abhängigkeit von der Anzahl der Proben. Je mehr Proben pro Zeitabschnitt gesammelt und untersucht wurden, desto besser wurde der Konzentrationsverlauf beschrieben und desto schmäler wurde die Form der Ausflußkurve (**A**, **B** und **C**). Im Bild **D** wurde der Kurvenverlauf eines Katheterexperimentes (4 Fraktionen pro Sekunde) dem Verlauf einer Injektion in die perfundierte Rattenleber gegenübergestellt.



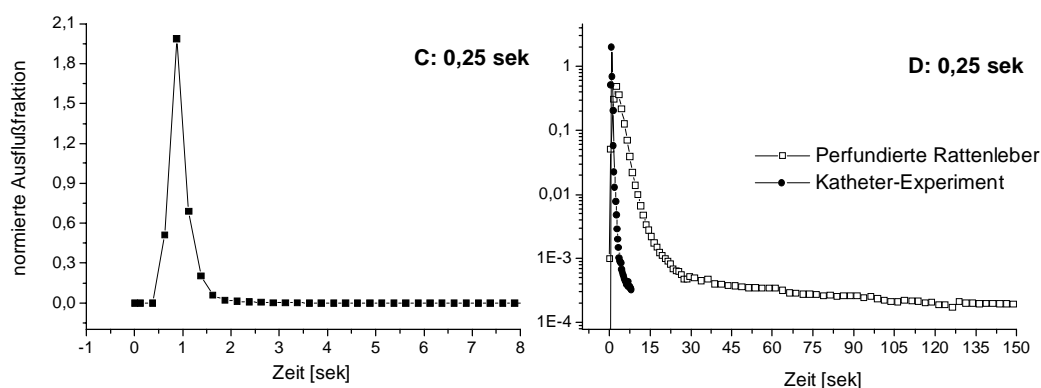


Abb. 49: Ausflußkurven für drei Katheterexperimente für den Wirkstoff Fenoterol. **A:** Je Sekunde wurde eine Fraktion aufgefangen und bestimmt. **B:** Eine Fraktion je 0,5 sek. **C:** Eine Fraktion je 0,25 sek. **D:** Gegenüberstellung eines Katheterexperimentes (eine Fraktion je 0,25 sek) und einer Ausflußkurve der perfundierten Rattenleber (Versuch 11-4).

Die Daten der Katheterexperimente, mit einer Sammelrate von vier Proben je Sekunde, wurden dann für die Berechnung des Einflusses der Katheter auf die Ausflußkurve der perfundierten Rattenleber mit dem Zeitbereich-Modell (Weiss, 1990) angepaßt. Da bei diesen Versuchen nur der Einfluß des Katheters auf die Form der Ausflußkurve wichtig war, konnte die Abschätzung des Effektes durch dieses rein empirische Modell geschehen. Die Zeit (t) ging als unabhängige Variable und die eingesetzte Konzentration (C) als abhängige Variable in die Berechnung ein. Der Wichtungsfaktor (P) beeinflusste die Stärke der Wichtung der ersten und der zweiten im Modell einbezogenen Gaußfunktionen. Je näher dieser Wert gegen 1 tendierte, desto größer wurde der Einfluß der ersten Gaußfunktion und desto geringer fielen die Werte der zweiten ins Gewicht. Die weiteren Parameter waren der Skalierungsfaktor (A) und für die erste und zweite Gaußfunktion die jeweiligen mittleren Transitzeiten (MT_1 und MT_2) und relativen Dispersionen (CV_1^2 und CV_2^2). Für die erste und zweite Gaußfunktion galt:

$$G_1 = \sqrt{\frac{MT_1}{2 \cdot \pi \cdot CV_1^2 \cdot t^3}} \cdot \exp\left[-\frac{(t - MT_1)}{2 \cdot CV_1^2 \cdot MT_1 \cdot t}\right] \quad [10]$$

$$G_2 = \sqrt{\frac{MT_2}{2 \cdot \pi \cdot CV_2^2 \cdot t^3}} \cdot \exp\left[-\frac{(t - MT_2)}{2 \cdot CV_2^2 \cdot MT_2 \cdot t}\right] \quad [11]$$

Die Flußrate (Q) des Perfusats lag bei 30 mL/min. Wurde für Q die Einheit „Sekunde“ zugrunde gelegt ergab sich daraus:

$$Q = 0,5$$

Für die Konzentration (C) galt:

$$C = \frac{A}{Q} \cdot [p \cdot G_1 + (1 - p) \cdot G_2] \quad [12]$$

Für den Katheter errechneten sich, auf Grundlage der Datenpunkte der Ausflußkurve eines Katheterexperimentes mit Diclofenac (eine Probe je 0,25 sek), folgende Werte:

$$\begin{aligned} p_{cath} &= 0,99 \\ MT_{1cath} &= 1,76 \\ MT_{2cath} &= 5,69 \\ CV_1^2{}_{cath} &= 0,0596 \\ CV_2^2{}_{cath} &= 2,0592. \end{aligned} \quad [13]$$

3.13 Berechnung der Parameter für den extrazellulären Marker ¹⁴C-SACCHAROSE

Neben dem beschriebenen Einfluß der Katheter mußte auch das Verhalten eines extrazellulären Markers berücksichtigt und in die weiteren Berechnungen einbezogen werden. Dabei diente ¹⁴C-Saccharose als Modells substanz. Die für ¹⁴C-Saccharose ermittelten Daten wurden dann für das Anpassen der Wirkstoffdaten mit dem Bindungsmodell (Weiss *et al.*, 1998) verwendet. Durch Transformation einer Funktion der Zeit $f_{(t)}$ in den Laplace-Raum erhielt man die Laplace-Transformierte:

$$\hat{f}_{(s)} = L(f_{(t)}) \quad [14]$$

Die Rücktransformation geschah numerisch durch das verwendete Softwareprogramm SCIENTIST (siehe Anhang: Software). Die weiteren Parameter wurden bereits im Kapitel 3.12 beschrieben. Für die erste und zweite Gaußfunktion galt nun:

$$G_1 = \exp \left[\frac{1}{CV_1^2} - \sqrt{\frac{2MT_1}{CV_1^2}} \left(s + \frac{1}{2MT_1 \cdot CV_1^2} \right) \right] \quad [15]$$

$$G_2 = \exp \left[\frac{1}{CV_2^2} - \sqrt{\frac{2MT_2}{CV_2^2}} \left(s + \frac{1}{2MT_2 \cdot CV_2^2} \right) \right] \quad [16]$$

Die im Kapitel 3.12 berechneten Werte für den Katheter-Fit [13] wurden für die Parameterschätzung des extrazellulären Markers mit einbezogen. Für die erste und zweite Gaußfunktion galt:

$$G_{1cath} = \exp\left[\frac{1}{CV_1^2 cath} - \sqrt{\frac{2MT_1cath}{CV_1^2 cath}}\left(s + \frac{1}{2MT_1cath \cdot CV_1^2 cath}\right)\right] \quad [17]$$

$$G_{2cath} = \exp\left[\frac{1}{CV_2^2 cath} - \sqrt{\frac{2MT_2cath}{CV_2^2 cath}}\left(s + \frac{1}{2MT_2cath \cdot CV_2^2 cath}\right)\right] \quad [18]$$

$$f_{cath} = p_{cath} \cdot G_{1cath} + (1 - p_{cath}) \cdot G_{2cath} \quad [19]$$

$$f_s = f_{cath} \cdot \frac{A}{Q} \cdot [p \cdot G_1 + (1 - p) \cdot G_2] \quad [20]$$

$$C(t) = f(t) = L^{-1}\left[\hat{f}_s(s)\right] \quad [21]$$

Die nach dem Modell geschätzten Parameter für den extrazellulären Marker wurden in Tabelle 15 für sieben Versuche zusammengefaßt. Die Parameter MTT_s und CV^2 berechneten sich nach den folgenden Formeln (Weiss und Roberts, 1996):

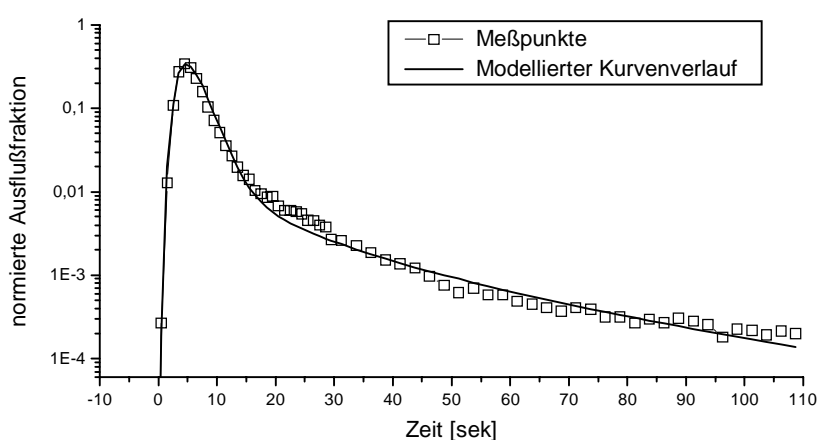
$$MTT_s = p \cdot MT_1 + (1 - p) \cdot MT_2 \quad [22]$$

$$CV_s^2 = \frac{p \cdot (CV_1^2 + 1) \cdot MT_1^2 + (1 - p) \cdot (CV_2^2 + 1) \cdot MT_2^2}{MTT_s^2} - 1 \quad [23]$$

Die Vorversuche 1 bis 3 wurden hierbei nicht berücksichtigt. Bei den Versuchen 4 und 6 traten Komplikationen bei der Operation an der Rattenleber auf. Diese Daten mußten daher aus der Bewertung herausgenommen werden. Für den Versuch mit der Ratte Nr. 10, Injektion Nr. 1 wurde in Abbildung 50, neben den gemessenen Daten, auch der modellierte Kurvenverlauf graphisch dargestellt.

Tab. 15: Geschätzte Parameter für den extrazellulären Marker ^{14}C -Saccharose.

Versuch/ Parameter	5-1	7-1	8-1	9-1	10-1	11-1	12-1	Mittelwert
P	0,07309	0,09124	0,12572	0,12695	0,33821	0,16584	0,14850	0,15279
MT₁ [sek]	15,4143	17,3461	9,79009	14,7332	10,5025	21,7477	15,0537	14,94109
MT₂ [sek]	5,03106	4,32198	4,08675	5,74733	4,55754	3,11396	4,45984	4,47407
CV₁	2,35121	3,42297	12,1294	8,20644	4,47430	7,21381	6,24658	6,29210
CV₂	0,26269	0,29744	0,73086	0,48052	0,32921	0,31657	0,39452	0,39883
MTT_s [sek]	5,79	5,51	4,80	5,86	6,57	6,20	6,03	5,82
CV_s²	1,62	3,72	6,95	1,14	4,16	16,01	6,35	5,71

**Abb. 50:** Darstellung einer Konzentrations-Zeit-Kurve (Ausflußkurve) für den Versuch mit der Ratte Nr. 10, Injektion Nr. 1 (^{14}C -Saccharose) und dem dazugehörigen modellierten Kurvenverlauf.

3.14 Modellierung der Ausflußkurve mit dem Dispersionsmodell

Das axiale Dispersionsmodell ist ein physiologisch orientiertes pharmakokinetisches Modell, das die Verteilung und Elimination eines Wirkstoffes in der Leber beschreibt. Es ist ein Modell der 2-Kompartiment-Form. Die dabei zugrunde liegende Annahme ist, daß der radiale Transfer des Pharmakons zwischen vaskulärem und zellulärem Raum eine Permeabilitätsbarriere überwinden muß. Der dabei auftretende dimensionslose Parameter D_N beschreibt die intravaskuläre Verteilung einer Substanz während der Passage durch die Leber. Neben D_N wurden die Konstanten 1. Ordnung für den Transfer des Pharmakons zwischen vaskulärem und zellulärem Kompartiment (k_{in} und k_{out}) und die Eliminationsrate (k_{el}) aus dem zellulären Kompartiment beschrieben. Die weiteren Parameter waren das Verteilungsvolumen (V_1), die Zeit-Variable (t), bzw. die durch Transformation gebildete

Laplace-Variable (s) und die Konzentrationsvariable (C). Das Dispersionsmodell wies folgende Form auf:

$$f_s = f_{cath} \cdot \frac{A}{Q} \cdot disp \quad [24]$$

Die in Kapitel 3.12 berechneten Werte für den Katheter-Fit [13] wurden auch hier für die Parameterschätzung mit einbezogen, gefolgt von den beschriebenen Berechnungen nach den Formeln [17] bis [19]. Für die Funktion $disp$ und b galt:

$$disp = \exp \left[\frac{1}{(2 \cdot D_N)} \cdot \left(1 - \sqrt{1 + 4 \cdot D_N \cdot \frac{V_1 \cdot b}{Q}} \right) \right] \quad [25]$$

$$b = s + k_{in} - k_{in} \cdot \frac{k_{out}}{(s + k_{out} + k_{el})} \quad [26]$$

Die Konzentration $C(t)$ wurde dann wieder nach der Formel [21] berechnet:

$$C(t) = f(t) = L^{-1} \left[\hat{f}_s(s) \right] \quad [21]$$

Für drei Diclofenac-Injektionen der Ratte Nr. 9 wurden die Parameter nach dem Dispersionsmodell berechnet und denen aus der Arbeit von Evans *et al.* (1993) gegenübergestellt (Tab. 16).

Tab. 16: Darstellung der nach dem Dispersionsmodell geschätzten Parameter für die Diclofenac-Versuche mit der Ratte Nr. 9 und Vergleich der Mittelwerte mit der Arbeit von Evans *et al.*, 1993. Das Volumenverhältnis (v) berechnet sich nach der Formel 27.

Versuch	D_N	$k_{in} [\text{sek}^{-1}]$	$k_{out} [\text{sek}^{-1}]$	v	$k_{el} [\text{sek}^{-1}]$	V_1
9-6	1,32	0,025	0,009	2,723	0,0110	9,06
9-7	0,98	0,020	0,009	2,270	0,0080	7,91
9-8	1,66	0,019	0,007	2,697	0,0113	14,30
Mittelwerte:	1,32	0,021	0,008	2,563	0,0101	10,42
Evans <i>et al.</i>, 1993	0,39	0,091	0,034	2,677	0,0042	10,35

3.15 Modellierung der Ausflußkurve mit dem Bindungsmodell (Weiss *et al.*, 1998)

Das Bindungsmodell von Weiss *et al.* (1998) beruht auf dem 2-Phasen-Organmodell von Weiss und Roberts (1996). Die Modifikation liegt in der Annahme, daß die Diffusion im Zytosol schneller erfolgt als der Bindungsprozess an die Bindungsstellen (immobilisierte Membranbestandteile). In das Modell gingen dabei die Geschwindigkeitskonstanten k_{12} (Assoziation) und k_{21} (Dissoziation) ein. Das Volumenverhältnis (v) ergab sich aus dem Quotienten des Verteilungsvolumens im Gewebe (V_T) zum Verteilungsvolumen im Blut/Sinusoide (V_S):

$$v = \frac{V_T}{V_S} \quad [27]$$

V_T = Verteilungsvolumen im Gewebe

V_S = Verteilungsvolumen im Blut/Sinusoide

und die Permeabilitätskonstante (k) aus dem Quotienten des Permeabilitätsflächenproduktes (PS) durch das Verteilungsvolumen (V_S) im Blut/Sinusoide:

$$k = \frac{PS}{V_S} \quad [28]$$

PS = Permeabilitätsflächenprodukt

V_S = Verteilungsvolumen im Blut/Sinusoide

Die Parameter p , MT_1 , MT_2 , CV_1 , CV_2 und k_{el} sind bereits näher beschrieben worden (Kap. 3.12 bis 3.14). Das verwendete Modell (Weiss *et al.*, 1998) hatte folgende Form:

$$k_{ou} = \frac{k}{vc} \quad [29]$$

$$k_{21} = \frac{k_{12}}{vdvc - 1} \quad [30]$$

$$k_h = k_{12} + k_{21} + k_{ou} \quad [31]$$

$$l_1 = 0,5 \cdot \left(k_h + \sqrt{k_h^2 - 4 \cdot k_{21} \cdot k_{ou}} \right) \quad [32]$$

$$l_2 = 0,5 \cdot \left(k_h + \sqrt{k_h^2 - 4 \cdot k_{21} \cdot k_{ou}} \right) \quad [33]$$

$$a_1 = k_{ou} \cdot \frac{l_1 - k_{21}}{l_1 - l_2} \quad [34]$$

$$a_2 = k_{ou} \cdot \frac{k_{21} - l_2}{l_1 - l_2} \quad [35]$$

$$fys = \frac{a_1}{(l_1 + s + k_{el})} + \frac{a_2}{(l_2 + s + k_{el})} \quad [36]$$

$$r = k(1 - fys) \quad [37]$$

$$G_1 = \exp \left[\frac{1}{CV_1^2} - \sqrt{\frac{2MT_1}{CV_1^2}} \left(s + r + \frac{1}{2MT_1 \cdot CV_1^2} \right) \right] \quad [38]$$

$$G_2 = \exp \left[\frac{1}{CV_2^2} - \sqrt{\frac{2MT_2}{CV_2^2}} \left(s + r + \frac{1}{2MT_2 \cdot CV_2^2} \right) \right] \quad [39]$$

Die im Kapitel 3.12 berechneten Werte für den Katheter-Fit [13] wurden wieder in die Parameterschätzung einbezogen. Die weiteren Berechnungen folgten den Formeln [17] bis [20] und die Konzentration $C(t)$ der Formel [21]:

$$C(t) = f(t) = L^{-1}[\hat{f}_s(s)] \quad [21]$$

Geschätzt wurden dabei die Parameter:

$$vdvc = \frac{v}{vc} = \frac{V_T}{V_H} \quad \text{und} \quad [40]$$

$$vc = \frac{V_H}{V_S} \quad [41]$$

sowie k_{12} , k und k_{el} . Eine mit diesem Modell modellierte Konzentrations-Zeit-Kurve für einen Versuch mit Diclofenac ist in der Abbildung 51 dargestellt. Eine Übersicht über die

geschätzten Parameter der ausgewerteten Diclofenac-Versuche zeigt die Tabelle 17. Die Daten der Vorversuche mit den Ratten 1 bis 3 fanden darin keine Berücksichtigung und der Versuch 11-8 (Tab. III, Anhang) konnte wegen eines Pipettierfehlers (Zugabe von 2 M HClO_4 statt Acetonitril als Fällungsreagenz) nicht ausgewertet werden. Für das scheinbare Steady-State Verteilungsvolumen (V_T) galt:

$$V_T = V_H \left(1 + \frac{k_{12}}{k_{21}}\right) \quad [42]$$

Wobei V_H das zytosolische Verteilungsvolumen der freien Moleküle in den Hepatozyten darstellt. Das Volumenverhältnis (v) ließ sich auch nach folgender Formel berechnen:

$$v = \frac{V_H \left(1 + \frac{k_{12}}{k_{21}}\right)}{V_S} \quad [43]$$

Durch Anwendung der Formeln 42 und 43 und in Anbetracht, daß der Parameter (v) durch das Bindungsmodell geschätzt wurde, konnten die in Tabelle 17 aufgeführten Parameter V_H und V_T berechnet werden. Die für Diclofenac geschätzte durchschnittliche Eliminationsrate $0,039 \text{ sek}^{-1} \pm 0,016$ war niedriger als die Wirkstofftransferrate durch die Plasmamembran ($k = 0,089 \text{ sek}^{-1} \pm 0,032$). Die intrazelluläre Verteilungskinetik wurde durch die Assoziations- ($k_{12} = 0,015 \text{ sek}^{-1} \pm 0,006$) und Dissoziationskonstanten ($k_{21} = 0,019 \text{ sek}^{-1} \pm 0,006$) charakterisiert.

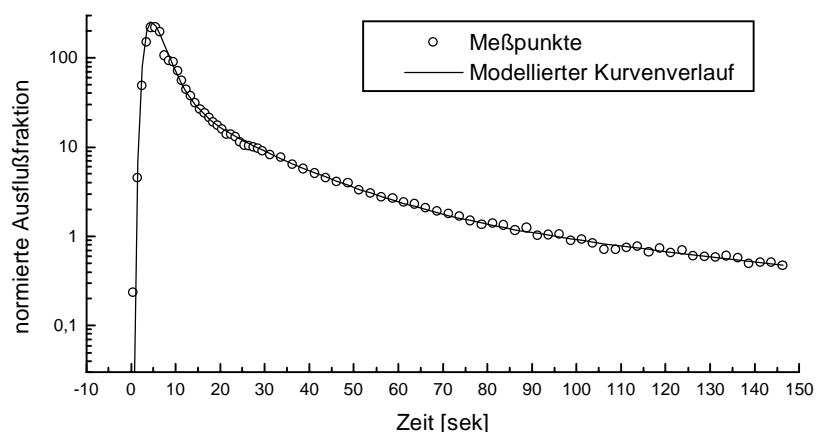


Abb. 51: Darstellung einer Konzentrations-Zeit-Kurve (Ausflußkurve; Skalierungsfaktor 1000) für den Versuch mit der Ratte Nr. 9, Injektion Nr. 6 (Diclofenac) und der mit dem Bindungsmodell modellierte Kurvenverlauf.

Tab. 17: Gesamtdarstellung der nach dem Bindungsmodell geschätzten Parameter für die Versuche mit Diclofenac (\pm : Standardabweichung).

Versuch / Parameter	9-6	9-7	9-8	10-6	10-7	10-8	11-5	11-6	11-7	12-7	12-8	Mittelwert	\pm
P	0,126	0,126	0,126	0,034	0,034	0,034	0,166	0,166	0,166	0,149	0,149	0,199	0,059
MT₁ [sek]	14,73	14,73	14,73	10,50	10,50	10,50	21,75	21,75	21,75	15,05	15,05	15,55	4,65
MT₂ [sek]	5,747	5,747	5,747	4,558	4,558	4,558	3,114	3,114	3,114	4,460	4,460	4,470	1,077
CV₁	8,206	8,206	8,206	4,474	4,474	4,474	7,214	7,214	7,214	6,247	6,247	6,562	1,590
CV₂	0,481	0,481	0,481	0,329	0,329	0,329	0,317	0,317	0,317	0,395	0,395	0,379	0,075
k₁₂ [sek⁻¹]	0,012	0,016	0,013	0,012	0,023	0,017	0,017	0,024	0,017	0,006	0,005	0,015	0,006
k₂₁ [sek⁻¹]	0,017	0,019	0,019	0,014	0,010	0,018	0,022	0,028	0,015	0,033	0,014	0,019	0,007
v	4,462	3,599	8,401	6,131	8,749	4,793	7,687	7,043	6,146	5,254	5,848	6,192	1,645
k [sek⁻¹]	0,069	0,098	0,107	0,067	0,059	0,094	0,106	0,126	0,146	0,041	0,065	0,089	0,032
k_{el} [sek⁻¹]	0,039	0,041	0,067	0,036	0,026	0,042	0,036	0,031	0,006	0,049	0,049	0,039	0,015
V_S [mL]	3,44	3,44	3,44	3,28	3,28	3,28	3,10	3,10	3,10	3,02	3,02	3,34	0,19
V_H [mL]	9,01	6,73	17,18	10,84	8,71	8,10	13,45	11,76	8,94	13,41	13,00	11,66	3,08
V_T [mL]	15,37	12,40	28,93	20,13	28,73	15,74	23,85	21,85	19,07	15,85	17,64	20,68	5,44
MTT_S [sek]	6,888	6,888	6,888	6,568	6,568	6,568	6,204	6,204	6,204	6,033	6,033	6,677	0,382

4. Diskussion

4.1 Auswahl der Trennsäule für die Bestimmung von Augenkammerwasser-Proben

Augenkammerwasser ist ein komplexes Gemisch aus anorganischen (Natrium, Kalium, Hydrogencarbonat, Chlorid und Phosphat) und organischen Bestandteilen (Proteine, Peptide, Aminosäuren, Ascorbinsäure und Glucose) (Reddy, 1985). Proteine und andere Makromoleküle sind in biologischen Proben häufig anzutreffen und müssen vor der HPLC-Analyse aus den Proben entfernt werden, weil sie durch höhere Anteile von organischen Lösungsmitteln in der mobilen Phase ausgefällt oder durch die Restsilanolgruppen an der Oberfläche des Trägermaterials unspezifisch, irreversibel gebunden oder denaturiert werden. Die Makromoleküle blockieren den Zugang zu den Poren, da sie aufgrund ihrer Größe vorwiegend auf der Oberfläche der stationären Phase adsorbieren bzw. präzipitieren. Dadurch kommt es zu einer Verringerung der adsorptiven Oberfläche. Dieses sogenannte Fouling resultiert schließlich in einem meist irreversiblen Druckanstieg innerhalb der Trennsäule, einem Kapazitäts- und einem Selektivitätsverlust.

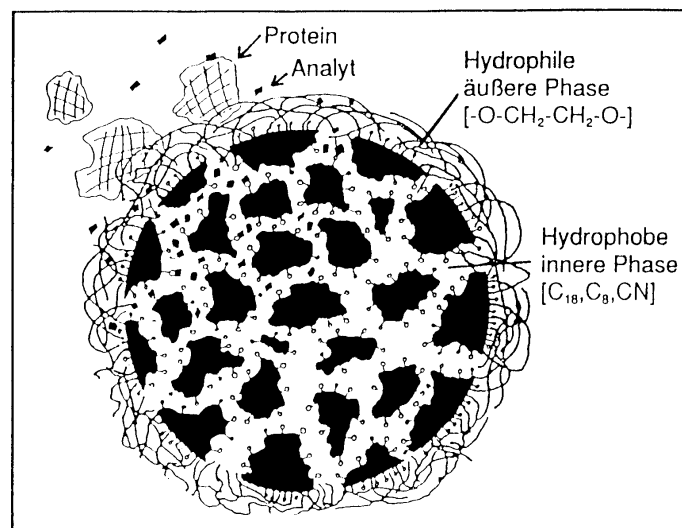


Abb. 52: Vereinfachte Darstellung eines polymerbeschichteten Trennmaterials (Restricted Access Media) (Regis/ICT, 1991).

Die verwendete Trennsäule gehörte zu den in der Literatur bereits beschriebenen (Hanson und Unger, 1992) Restricted Access Materialien (RAM). Die Säulenpackung wies zwei unterschiedliche Oberflächen auf. Auf die innere Phase (Reversed Phase; C8) des Silicagels war außen ein hydrophiles Polyoxyethylenpolymer gebunden, welches als semipermeable

Schicht (Semi Permeable Surface = SPS) den Zutritt von Makromolekülen zur inneren Phase physikalisch verhinderte (Abb. 52 und 53). Proteine durchliefen die Trennsäule unretiniert, während kleine Moleküle die Polymerschicht durchdringen und mit der inneren stationären Phase in Wechselwirkung treten konnten. Eine direkte Injektion proteinbelasteter Proben auf diese Säule war so möglich und ersparte damit zeitaufwendige und fehlerbelastete Probenaufbereitungsschritte.

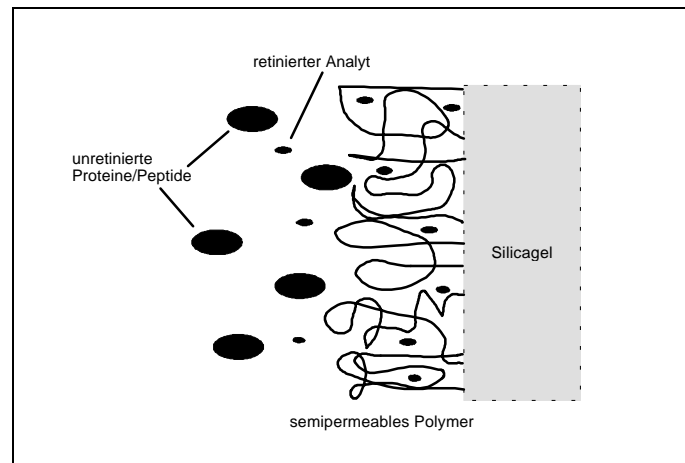


Abb. 53: Vereinfachte Darstellung der Wirkungsweise einer Polymerbeschichtung.

4.2 Nachstellen des pH-Wertes nach erfolgter Mischung der mobilen Phase

Bei der Kontrolle des pH-Wertes einer frischen Mischung aus Acetonitril und Natrium-Acetat (eingestellt auf pH 3,0) zeigte sich stets ein Anstieg des pH-Wertes auf ca. 4,2. Dies erforderte ein Nachstellen des pH-Wertes mit Phosphorsäure.

Der Grund für diese stets auftretende Änderung liegt in den Eigenschaften des Acetonitrils begründet. Acetonitril ist ein polares aprotisches Lösungsmittel mit einer Dielektrizitätskonstante (ϵ) von 37. Acetonitril kann, da es keine ausreichend aciden Wasserstoffatome besitzt, Anionen nicht durch Wasserstoffbrückenbindungen, sondern nur durch die wesentlich schwächeren Dispersionskräfte solvatisieren. Lösungsmittel mit $\epsilon > 30$ (z.B. Nitromethan $\epsilon = 37$, Dimethylsulfoxid $\epsilon = 47$) wirken deshalb auf Ionenpaare und Salze dissoziierend (Becker, 1993).

4.3 HPLC-Bestimmung von PREDNISOLON-21-ACETAT und DICLOFENAC in Augenkammerwasser-Proben des Menschen

Die Therapie mit nichtsteroidalen Antiphlogistika (z.B. Diclofenac) in der Augenheilkunde hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen (Strobel, 1991). Der Grund dafür waren unterschiedliche Komplikationen (Augendrucksteigerung, Wundheilungsstörungen, Begünstigung viraler Infektionen) bei der Therapie mit Cortikosteroiden (z.B. Prednisolon-21-acetat) (Schäfer, 1994). Verschiedene Studien (Strobel *et al.*, 1991, Roberts und Brennan, 1994, Struck *et al.*, 1994) beschäftigten sich daher mit den Vor- und Nachteilen nichtsteroidaler und steroidaler Antiphlogistika. Dabei waren zumindest Diclofenac und Prednisolon-21-acetat in ihrer entzündungshemmenden Wirkung gleichzusetzen (Roberts und Brennan, 1994).

Für die Bestimmung von **Prednisolon** sind bereits HPLC-Methoden in der Literatur beschrieben (Rose und Jusko, 1979, Rocci und Jusko, 1981, Öst *et al.*, 1982). Auch die Bestimmung durch GC-MS (Matin und Amos, 1978) und Radioimmunassay (Al-Habet *et al.*, 1981) ist möglich. Da die Acetat-Form des Prednisolons ein wesentlich besseres Hornhautpenetrationsvermögen aufweist, rückte Prednisolon-21-acetat immer mehr in den Mittelpunkt neuer Studien. 1986 veröffentlichten Prasad *et al.* dann eine Arbeit, die sich mit der Bestimmung von Prednisolon-21-acetat aus Schweineplasma nach erfolgter Extraktion beschäftigte. Musson *et al.* (1991a) bestimmten Prednisolon und Prednisolon-21-acetat in Kammerwasser von Kaninchen. Sie injizierten erstmalig die Kammerwasser-Proben ohne Probenvorbereitung, weil sie davon ausgingen, daß nur sehr wenige Peptide und Proteine darin enthalten waren und somit das Fouling der Trennsäule vernachlässigbar war. Dem widersprechen zumindest für Kammerwasser des Menschen die grundlegende Arbeit von Reddy (1985), der bis zu 200 µg Peptide und Proteine pro Milliliter Kammerwasser fand und die Ergebnisse von Wolf (1997), bei dem ohne Ausfällung der Proteine sofort die Zuleitungen zum massenspektrometischen Detektor verstopften.

Durch die Verwendung einer polymerbeschichteten Trennsäule (Kap. 4.1) konnte die Säule selbst nach Direktinjektion von über 2000 Proben noch verwendet werden. Die in den Kapiteln 2.3.3 und 3.3 beschriebene HPLC-Methode mit UV-Detektion wurde dann auf die Bestimmung von Prednisolon-21-acetat in Augenkammerwasser-Proben des Menschen abgestimmt und optimiert. Untersucht werden sollte für eine randomisierte Einfachblindstudie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Medizinischen Fakultät ein neues Prednisolon-21-acetat-0,5 %-Gel (30 Patienten) gegen Prednisolon-21-acetat-

1 %-Augentropfen (33 Patienten). Die Annahme war, daß das Gel längeren Kontakt mit der Hornhaut hat als die bisherigen Augentropfen und so eine bessere Bioverfügbarkeit des darin enthaltenen Wirkstoffes bewirkt. Diese Annahme wurde im Tierexperiment am Kaninchen bereits überprüft und erbrachte eine signifikante Erhöhung der Bioverfügbarkeit (Johansen *et al.*, 1996).

Nach der Analyse der Augenkammerwasser-Proben stand fest, daß die Nachweisgrenze der erarbeiteten HPLC-Methode nicht ausreichte, um Prednisolon-21-acetat zu quantifizieren. Bei keiner der untersuchten Proben konnte Prednisolon-21-acetat nachgewiesen werden. Auf der Grundlage der beschriebenen HPLC-Methode mit UV-Detektion wurde daraufhin in Zusammenarbeit mit dem Fachbereich für Pharmazie eine verbesserte HPLC-Methode mit massenspektrometrischer Detektion entwickelt (die Methode wurde von Herrn R. Wolf entwickelt und bisher nicht publiziert). Doch sowohl diese neue Methode, als auch eine unabhängige Analyse (mit elektrochemischer Detektion) durch die Firma Iris Pharma (La Gaude, Frankreich) konnte kein Prednisolon-21-acetat im Kammerwasser nachweisen (Struck und Stoldt, 1998).

Die beschriebenen Ergebnisse decken sich mit neueren Erkenntnissen. Man geht mittlerweile davon aus, daß das lipophile Prednisolon-21-acetat langsam durch die Hornhaut penetriert und dabei gleichzeitig zu Prednisolon metabolisiert wird. 1989 beschrieben erstmalig McGhee und seine Mitautoren die vollständige Metabolisierung von Prednisolon-natriumphosphat zu Prednisolon. Musson *et al.* (1991a und 1991b) beschrieben zwei Jahre später dann auch die Metabolisierung von Prednisolon-21-acetat zu Prednisolon. Demgegenüber stand bis dahin die Arbeit von Leibowitz *et al.* (1977), die in einer Studie mit 58 Patienten Prednisolon-21-acetat-Konzentrationen von z.T. über 1 µg/mL fanden. Unter Berücksichtigung der Metabolisierung war diese Diskrepanz aber leicht zu erklären. Leibowitz und Mitarbeiter verwendeten radioaktiv (³H) markiertes Prednisolon-21-acetat. Die gemessenen radioaktiven Proben waren also nicht auf das Prednisolon-21-acetat zurückzuführen, sondern auf das durch Metabolisierung entstandene Prednisolon. Auch die Arbeit von Sousa (1991) deutete an, daß Prednisolon-21-acetat und Prednisolon-natriumphosphat praktisch gleiche Effekte beim Patienten lieferten, aber die dafür zugrundeliegenden Vorgänge wurden nicht erkannt.

Die weiteren Untersuchungen der Proben (im Rahmen der Studie der Klinik und Poliklinik für Augenkrankheiten) auf Prednisolon (Struck und Stoldt, 1998) fanden dann zum einen durch die Firma Iris Pharma (La Gaude, Frankreich), zum anderen durch das Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg statt.

Aufgrund der Bedeutung von **Diclofenac** in der heutigen Medizin liegen zahlreiche Publikationen vor, die sich mit der Quantifizierung in unterschiedlichen Matrices beschäftigen. Meistens handelt es sich dabei um HPLC-Methoden für die Bestimmung in Plasma (Owen *et al.*, 1987, Raz *et al.*, 1988, Sioufi *et al.*, 1991, Santos *et al.*, 1992, Mohamed *et al.*, 1994, Li *et al.*, 1995, Mason und Hobbs, 1995), in Urin (Battista *et al.*, 1985, Godbillon *et al.*, 1985, Lansdorp *et al.*, 1990, Hirai *et al.*, 1997) oder in Cerebrospinal-Flüssigkeit (Zecca *et al.*, 1991). Eine gute Übersicht stellen besonders die Artikel von Degen (1988) und Davies und Anderson (1997) dar. Die Gaschromatographie (Schneider und Degen, 1981 und 1986, Borenstein *et al.*, 1996, Gonzales *et al.*, 1996) wurde in den letzten Jahren immer mehr durch HPLC-Methoden ersetzt. Die Zielsetzung der meisten dieser Arbeiten, und auch der hier vorliegenden, war es die Nachweisgrenzen der verwendeten Methoden zu senken.

Für die Ermittlung der Eichgeraden wurde Augenkammerwasser (ohne Wirkstoff) des Menschen mit dem zu bestimmenden Wirkstoffen (Prednisolon-21-acetat oder Diclofenac) in bekannter Konzentration versetzt und durch HPLC bestimmt. Die Peakflächen, Peakhöhen und die Retentionszeiten unterschieden sich statistisch nicht signifikant von im Eluenten gelösten Prednisolon-21-acetat- oder Diclofenac-Standards. Weil Augenkammerwasser des Menschen ohne Wirkstoff nur in sehr geringen Mengen (ca. 250 µL) zur Verfügung stand, wurden für spätere Quantifizierungen dieser Pharmaka in Kammerwasser Eichstandards, die in der mobilen Phase gelöst waren, verwendet.

Die in den Kapiteln 2.3.4 und 3.4 beschriebene HPLC-Methode für Diclofenac mit UV-Detektion reichte mit ihrer Nachweisgrenze von 10 ng/mL oft nicht aus, um Augenkammerwasser-Proben des Menschen zu bestimmen (Tab. II, Anhang). Daher wurden verbesserte Verfahren mit elektrochemischer Detektion (Kap. 2.3.5 und 3.5), bzw. mit photochemischer Nachsäulenderivatisierung (Kap. 2.3.6 und 3.6) erarbeitet.

4.4 HPLC-Bestimmung von DICLOFENAC und OXYBUPROCAIN

Zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit für Diclofenac in Augenkammerwasser wurde die elektrochemische Detektion verwendet (Zecca *et al.*, 1991, Torres-Lopez *et al.*, 1997b). Die Nachweisgrenze von Diclofenac in Augenkammerwasser-Proben konnte auf 500 pg Diclofenac pro mL Probe gesenkt werden. Das entspricht bei 20 µL Injektionsvolumen 31 fmol. Das Erreichen dieser hohen Empfindlichkeit bedurfte folgender Voraussetzungen:

- 1.) Eine gründliche Passivierung (siehe Kap. 2.3.1) der gesamten Anlage (alle Zuleitungen, Injektionsventil, Pumpe), mit Ausnahme der Säulen und der Detektorzelle, war vor der Inbetriebnahme des elektrochemischen Detektors durchzuführen. Durch die Passivierung wurden Metallionen (meist Fe^{2+}), die oxidiert werden können und damit zu erheblichen Störungen der Detektion führen würden (hoher Grundstrom, unruhige Basislinie, Geisterpeaks etc.) aus dem System entfernt.
 - 2.) An die Reinheit und Sauberkeit der verwendeten Chemikalien waren höchste Ansprüche zu stellen. Denn auch hier galt, daß Verunreinigungen hohe Grundströme und unruhige Basislinien bewirken und sich dies wiederum in einer Verschlechterung der Detektion äußert. Das verwendete Reinstwasser wurde noch einmal destilliert und der fertiggestellte Eluent noch einmal gefiltert und entgast.
 - 3.) Die isokratische Pumpe wies zwar bereits eine niedrige Pulsation auf, dennoch wurde zur Steigerung der Detektionsempfindlichkeit der noch vorhandene Puls, durch Einfügen einer ca. 60 cm langen PEEK-Kapillare (Pharmacia, LKB GmbH, Freiburg; ä. D.: 1,58 mm, i. D.: 0,5 mm) zwischen die Trennsäule und dem elektrochemischen Detektor, geglättet.
 - 4.) Schwankungen der Temperatur resultierten in einer verschlechterten Detektion und damit der Reproduzierbarkeit. Durch den Einsatz eines temperierten Wasserbades (23-25 °C), in dem sich sowohl die Säule, als auch der Behälter mit dem Eluenten befand, konnten solche Abweichungen verhindert werden. Unter Beachtung dieser Hinweise lag der gemessene Gesamt-nA-Wert eines frisch zubereiteten Eluenten zwischen 8-10 nA.
- Zusätzlich zu der Steigerung der Empfindlichkeit für Diclofenac war es außerdem mit dieser Methode möglich simultan das Anästhetikum Oxybuprocain in der Augenkammerwasser-Probe zu bestimmen (Kuhlmann *et al.*, 1998). Klinische Studien über Oxybuprocain (Morton *et al.*, 1997) sind nur wenige bekannt, was auch daran liegt, daß nur wenige Nachweismethoden bisher veröffentlicht worden sind. Jühlcke 1981 beschrieb die Hochleistungsdünnschichtchromatographie für die Routineüberprüfung von Oxybuprocain-Augentropfen und Delbeke *et al.* (1981) die Detektion in Pferdeurin und -plasma mittels Gaschromatographie (Nachweisgrenze 25 ng/mL). Eine HPLC-Methode für Oxybuprocain mit elektrochemischer Detektion war bisher nicht bekannt und auch die in Kapitel 3.9 beschriebenen HPLC-Methoden mit UV- und Fluoreszenz-Detektion wurden neu entwickelt. Alle drei Verfahren waren einfach in der Handhabung und wiesen Nachweisgrenzen zwischen 20 bis 35 ng/mL auf. Die ermittelte Nachweisgrenze von 30 ng/mL für die elektrochemische Detektion entsprach, bei einer Injektion von 20 µL, 1,7 pmol. Die Augenkammerwasser-Proben, die auf Oxybuprocain untersucht wurden, waren

alle mit der elektrochemischen Detektion bestimmt worden. Dabei fiel auf, daß es trotz gleicher Applikation (viermal einen Tropfen in einem Zeitraum von 15 min vor dem erwarteten Operationstermin) zu großen interindividuellen Konzentrationsunterschieden kam. Der niedrigste Wert mit 1784 ng/mL lag deutlich unter dem höchsten (262375 ng/mL; Tab. 5), wobei der Mittelwert (88810 ng/mL) und auch der Median (72232 ng/mL) gleiche Größenordnungen annahmen. Die Konzentrationsschwankungen beruhten sicherlich zum einen auf die nicht genau genug standardisierte Applikation (Tropfengröße und eventuelle Wartezeiten bis zum Beginn der Operation), zum anderen sind jedoch interindividuelle Unterschiede bei klinischen Studien bekannt (siehe auch Kap. 4.5.4).

Die Linearität der Bestimmungsmethode für Diclofenac für einen Bereich von 1-1000 ng/mL reichte für alle untersuchten Realproben aus und auch der lineare Meßbereich von 0,05 bis 200 µg/mL für Oxybuprocain genügte meistens, um auch die auftretenden großen Konzentrationsschwankungen abzudecken. Nur zwei von 23 Patienten wiesen Oxybuprocain-Konzentrationen von über 200 µg/mL auf (Quantifizierung nach erfolgter Verdünnung; Tab. 5). Die Selektivität und Sensitivität der beschriebenen HPLC-Methode genügte allen an sie gestellten Anforderungen.

Als Nachteil der Methode ist anzumerken, daß auf die Reinigung der Arbeitselektrode mit konzentrierter Chromschwefelsäure oder Schleifpaste (Al_2O_3) oder der Passivierung der HPLC-Anlage stets sehr lange Einlaufzeiten folgten. Eine ruhige Basislinie und ein ausreichender Gesamt-nA-Wert stellten sich erst nach Stunden ein.

4.5 Photochemische Online-Nachsäulenderivatisierung von DICLOFENAC

Wie bereits in den Kapiteln 4.3 und 4.4 beschrieben wurde, sollte Diclofenac in Augenkammerwasser-Proben des Menschen quantitativ nachgewiesen werden. Hierfür bedurfte es einer selektiven und sensitiven Methode der Diclofenac-Bestimmung. Die Nachweisgrenze bei der HPLC-Bestimmung durch UV-Detektion (10 ng/mL) reichte häufig nicht aus, um alle Proben bestimmen zu können. Der Nachweis durch die Verwendung eines elektrochemischen Detektors (Kap. 4.4) erfüllte zwar die Anforderung an eine möglichst niedrige Nachweisgrenze (0,5 ng/mL), hatte aber den Nachteil der nicht ganz einfachen Handhabung und vor allem der Notwendigkeit einer häufigen und zeitaufwendigen Säuberung der Arbeitselektrode (Kap. 4.4). Als eine weitere empfindliche Detektionsmöglichkeit stand der Fluoreszenz-Detektor zur Verfügung. Da aber Diclofenac

über keine natürliche Fluoreszenz verfügte (Kap. 3.4), wurden Derivatisierungen in Betracht gezogen. Hierbei wurde die Möglichkeit einer photochemischen Derivatisierung untersucht. Photochemische Reaktionen sind seit langer Zeit bekannt, wurden aber erst mit der Einführung photochemischer Reaktoren 1976 durch Iwaoka und Tannenbaum als Detektionsvariante in der HPLC eingesetzt, wo sie sich hervorragend zur Nachsäulenderivatisierung eigneten. Licht als Nachsäulenderivatisierung einzusetzen bietet viele Vorteile gegenüber anderen Derivatisierungstechniken: 1) Keine Derivatisierungssubstanz muß wieder entfernt werden und kein Derivatisierungsüberschuß kann die chromatographische Auswertung stören. 2) Billige Strahlungsquellen unterschiedlichster Intensitäten und Wellenlängen sind im Handel erhältlich und können an die gewünschte Wellenlänge angepaßt werden (siehe Kap. 4.5.1) 3) Die Strukturveränderungen des Analyten, die durch die photochemische Reaktion entstehen, resultierten oft in einer veränderten Detektionseigenschaft. Dies wiederum kann zu einer genaueren Identifizierung einer Substanz führen. Die wichtigste Veränderung lag wahrscheinlich in der Verstärkung des detektierbaren Signals, was bei UV/VIS-, Elektrochemischen-, Chemilumineszenz- oder Fluoreszenz-Detektoren der Fall sein kann (siehe Kap. 4.5.3). 4) Die photochemische Reaktion läuft durch die Bildung sehr reaktionsfreudiger Zwischenstufen schnell ab (Abb. 22 und 23). 5) Die Systembedingungen sind sehr gut reproduzierbar und leicht automatisierbar. Trotz aller dieser Vorteile fanden jedoch Anwendungen der photochemischen Reaktion nur selten statt. Ein Punkt dürfte hierbei die schlechte Vorhersagbarkeit der Reaktionsverläufe und der entstehenden Produkte sein. Ein weiterer Grund lag wahrscheinlich auch darin, daß bis vor wenigen Jahren noch kein kommerziell vertriebenes Reaktorsystem auf dem Markt war, was aber mittlerweile der Fall ist.

4.5.1 Strahlungsquelle

Einen wichtigen Teil des photochemischen Reaktors stellt die Strahlungsquelle dar. Die Emissionsspektren verschiedener Quecksilberdampflampen sind in Abbildung 54 zu sehen. Dabei ist zu erkennen, daß Hochdrucklampen einen erhöhten Anteil an Strahlung im längerwelligen Bereich abgeben und daß mit zunehmendem Druck im Entladungsrohr auch die Emissionslinien stark verbreitert sind und sich schließlich überlagern (Meister, 1991). Die Quecksilberniederdruckstrahler haben außerdem noch den Vorteil geringerer Wärmeentwicklung (max. 50-60 °C), das zur Verfügung stehen der Energieausstrahlung

direkt nach dem Einschalten der Lampe und einer stabileren Energieausstrahlung über die gesamte Lebensdauer von über 5000 Betriebsstunden, was wiederum in einer verbesserten Reproduzierbarkeit resultiert (Meister, 1991).

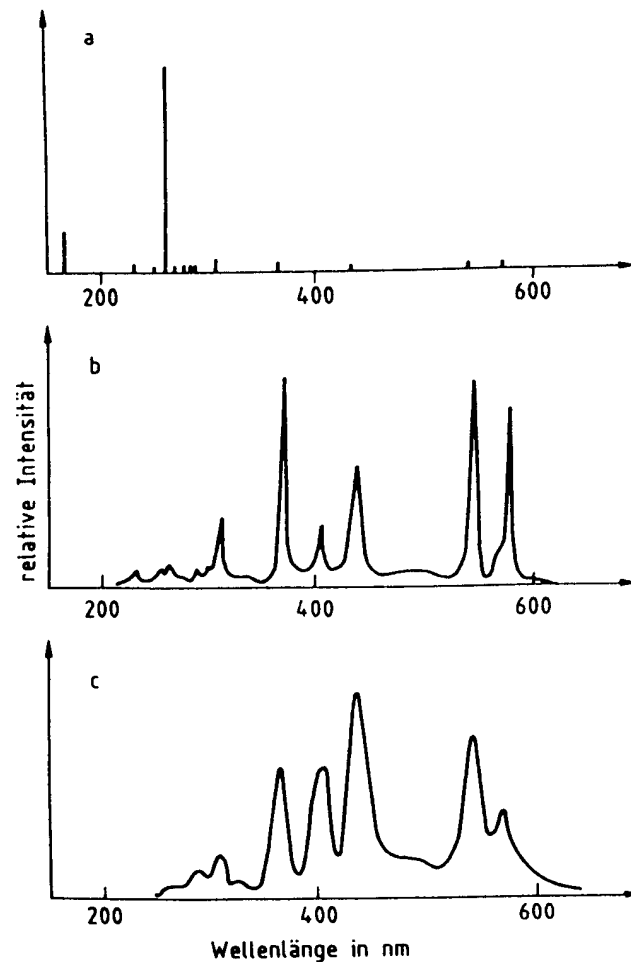


Abb. 54: Emissionsspektrum einer a) Quecksilberdampf-Niederdruck-, b) -Hochdruck-, c) -Höchstdrucklampe (aus von Büнау und Wolff, 1987).

UV-Lampen werden in drei Strahlungsbereiche unterteilt: UVA-Strahler (320-400 nm), UVB-Strahler (280-320 nm) und UVC-Strahler (185-280 nm). Weil das Absorptionsspektrum für Diclofenac bei 272 nm ein Maximum besaß (Kap. 3.4, Abb. 13), fiel die Wahl auf eine Quecksilberniederdrucklampe, die UVC-Strahlung einer Wellenlänge von 253,7 nm aussendete. Um das Entstehen von umwelt- und gesundheitsgefährdenden Ozon zu vermeiden, wurde eine speziell dotierte Lampe (absorbiert Wellenlängen unter 240 nm) der Firma OSRAM gewählt, die kein Ozon entstehen ließ (OSRAM, HNS 15 OFR). Die emittierte Wellenlänge von 253,7 nm ist für eine Vielzahl photochemischer Reaktionen eine nützliche und oft verwendete Wellenlänge (Scholten *et al.*, 1981; Meister, 1991).

Die UV-Lampe wurde mit Aluminiumfolie umwickelt, um eine Exposition von Personen mit schädlicher UVC-Strahlung zu vermeiden und gleichzeitig eine höhere Durchstrahlung der Kapillare durch Reflexionen zu erreichen.

4.5.2 Wahl der Reaktionsschleife

Für die photochemische Reaktion war es notwendig, eine UV-durchlässige Kapillare zu verwenden, die außerdem noch mechanisch stabil und flexibel war. Das Häkeln der Kapillare zu "Luftmaschen" (Abb. I, Anhang; Kuhlmann und Krauss, 1997) stellte hohe Anforderungen an das verwendete Material. Bei den meisten Veröffentlichungen wurden deshalb Teflon-Kapillaren (Polytetrafluorethylen; PTFE) verwendet (Scholten *et al.*, 1980 und 1981, Brinkmann *et al.*, 1981, Engelhardt und Neue, 1982, Lefevere *et al.*, 1982), die unempfindlich gegenüber aggressiven Chemikalien sind, bis 250 °C eingesetzt werden können und eine ausreichende Druckstabilität für den Einsatz in der HPLC nach der Trennsäule aufwiesen. Durch die ständige Bestrahlung mit Wellenlängen von 254 nm wurde jedoch beobachtet, daß sich Fluoridionen aus der Kapillare lösen (Batley, 1984). Das Material wurde zunehmend spröde und brüchig. Meister (1991) stellte Brüche in den Teflon-Kapillaren nach ca. 200 Betriebsstunden fest und auch Wiese und Hermansson berichteten 1991 über Reaktorstabilitäten bis ca. 200 Stunden. Deshalb wählte Meister (1991) für die Analyse verschiedener Sprengstoffe die mechanisch wesentlich stabileren Tefzel-Kapillaren (ein modifiziertes Copolymerisat aus Ethylen und Tetrafluorethylen; ETFE). Es ist ein gegenüber chemischen Einflüssen äußerst inertes Material und kann bis 155 °C eingesetzt werden. Tefzel weist eine höhere mechanische Festigkeit und Druckstabilität als Teflon auf, ist aber noch flexibel genug, um gehäkelt zu werden. Neben diesen Vorteilen zeigte Tefzel auch eine bessere UV-Durchlässigkeit (Meister, 1991). Aus den genannten Gründen kam daher eine Tefzel-Kapillare (Außendurchmesser 1,59 mm; Innendurchmesser 0,25 mm) zum Einsatz.

Die Versuche zur Offline-Photoderivatisierung (Kap. 3.6.2) deuteten auf eine optimale Bestrahlungszeit von einer Minute hin (Abb. 23 und 25), um ein möglichst starkes Fluoreszenz-Signal (286/360 nm) zu erhalten. Daraus wiederum ergab sich die Länge der zu verwendeten Tefzel-Kapillare. Bei einem Innendurchmesser von 0,25 mm, einem gewünschtem Volumen von einem Milliliter und einem Pumpenfluß von 1 mL pro min, mußte die Kapillare 20 m lang sein. Die sich anschließenden Versuche zur Online-

Photoderivatisierung (Kap. 3.6.3) zeigten, daß eine Flußrate von 1,0 mL/min die höchsten Metabolisierungsraten erzielte (Abb. 25).

Würde die verwendete 20 m lange Tefzel-Kapillare direkt um die Strahlungsquelle gewickelt käme es zu einer nicht zu tolerierenden Peakverbreiterung. Durch kleinere Durchmesser der Kapillare wurde dies zwar gemindert, jedoch aufgrund der Länge von 20 m käme es doch noch zu einer Verbreiterung des Peaks und damit zu einer verschlechterten Detektion. Eine geometrische Verformung der Kapillare durch spezielle Häkel-, Strick- oder Knotentechnik erzeugte solche Art von Sekundärströmungen in der Kapillare, daß schließlich die Dispersion des chromatographischen Peaks so stark reduziert wurde, daß auch längere Kapillaren (25 m) problemlos Verwendung finden konnten (Engelhardt und Neue, 1982; Engelhardt und Klinkner, 1984; Engelhardt und Lillig, 1985; Poulsen *et al.*, 1986).

4.5.3 HPLC-Bestimmung von DICLOFENAC nach einer photochemischen Online-Nachsäulenderivatisierung

Die ersten photochemischen Untersuchungen an Diclofenac fanden 1990 durch Moore *et al.* statt. Sie zeigten, daß Diclofenac, das in Methanol oder Puffern gelöst war, unter UVA-Bestrahlung beide substituierten Chloratome verliert und es zu einem Ringschluß kommt (Abb. 55).

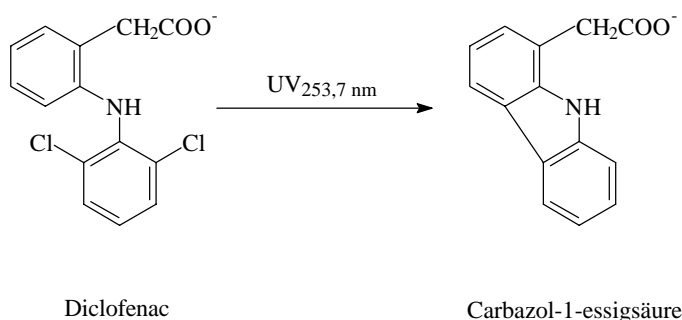


Abb. 55: Photoreaktion von Diclofenac zu Carbazol-1-essigsäure bei Verwendung eines UVC-Strahlers (253,7 nm).

Wiese und Hermansson beschrieben dann 1991, daß die entstehende Carbazol-1-essigsäure bei Verwendung eines UVC-Strahlers (254 nm) Fluoreszenz zeigte. Moore *et al.* hatten ein Jahr vorher das Entstehen von Fluoreszenz noch verneint, was aber im nachhinein betrachtet nicht weiter überrascht, denn Moore *et al.* (1990) arbeiteten mit, für das Entstehen von Fluoreszenz bei der Carbazol-1-essigsäure, ungeeigneter UVA-Strahlung (365 nm). Neben

diesen beiden Arbeiten liegen keine weiteren Publikationen zu diesem Thema vor. Benutzten Wiese und Hermansson noch UV-labile Teflon-Kapillaren (PTFE; 1 mm Innendurchmesser und 1,3 m Länge), so ist durch die Verwendung einer gegen UV-Licht stabileren Tefzel-Kapillare (ETFE; 0,25 mm Innendurchmesser und 20 m Länge) ein wichtiger Schritt gelungen (Kap. 4.5.2). Die von Batley (1984) und später auch von Wiese und Hermansson (1991) beschriebenen Brüche der Kapillaren nach 200 Stunden traten bisher nicht auf (Einsatz über 370 Stunden). Durch den geringeren Innendurchmesser und der verlängerten Kapillare wurde zur Vermeidung einer nicht tolerierbaren Peakverbreiterung die Kapillare zusätzlich geometrisch verformt (häkeln sogenannter Luftmaschen; Kuhlmann und Krauss, 1997). Durch das Einfügen der 20 m langen Kapillare verlängerte sich die Retentionszeit von 5,5 min auf 6,9 min (bzw. 7,1 min, wenn zwischen der Kapillare und dem Fluoreszenz-Detektor noch ein UV-Detektor eingefügt wurde), was einem Zuwachs von 25 % entsprach. Dabei fiel auf, daß die vorher (bei der Offline-Derivatisierung; Kap. 3.6.2) durch das Berechnen des Kapillarvolumens (1 mL) kalkulierte Verlängerung der Retentionszeit von 1 min (bei einer Flußrate von 1 mL/min) mit 1,4 min höher ausfiel. Diese Differenz zwischen erwarteter und tatsächlich erhaltener Retentionszeit kann wahrscheinlich auf den Häkelprozess zurückgeführt werden, bei dem die Kapillare starken Zugkräften ausgesetzt wurde. Solche Abweichungen beschrieben auch Poulsen *et al.* (1986). Eine weitere Möglichkeit liegt in den Herstellungstoleranzen für die TEFZEL-Kapillare (0,25 mm i.D.) die mit $\pm 0,05$ mm vom Lieferanten (Plastizell Vertriebs GmbH) angegeben wurden. Die Verbreiterung des Peaks von 0,227 min auf 0,277 min entsprach 22 % und erfüllte damit die, durch das Verwenden der Häkeltechnik, erwartete Minimierung der Bandenverbreiterung. Statt der schwachen UV-Lampe (0,09 Watt) von Wiese und Hermansson (1991), wurde eine stärkere UV-Röhre (3,5 Watt) verwendet. Dies resultierte in einer schnelleren Derivatisierungsreaktion und in einer besseren Nachweisgrenze (1 ng/mL bei Verwendung einer 20- μ L-Probenschleife gegenüber 6 ng/mL und einer 50- μ L-Probenschleife bei Wiese und Hermansson, 1991). Wobei die niedrigere Nachweisgrenze auch durch die geeignetere Wahl der Excitations-Wellenlängen (286 nm statt 272 nm) zustande kam (Abb. 20). Durch die Verwendung einer polymerbeschichteten Trennsäule (Kap. 4.1) war keine Probenvorbereitung mehr notwendig und die erstmalige Analyse von Augenkammerwasser-Proben des Menschen nach einer photochemischen Nachsäulenderivatisierung konnte erfolgreich durchgeführt werden. Der gegenüber der UV-Detektion empfindlichere Nachweis zeigt noch einmal die Abbildung 56. Die beschriebene HPLC-Methode weist eine sehr gute Sensitivität und eine hohe Selektivität auf. Ihre breiten

Anwendungsmöglichkeiten machen sie zu einer geeigneten Methode zum Nachweis von Diclofenac in den verschiedensten biologischen Matrices (Kap. 4.5.4, Kap. 4.5.5 und Kap. 4.6.3).

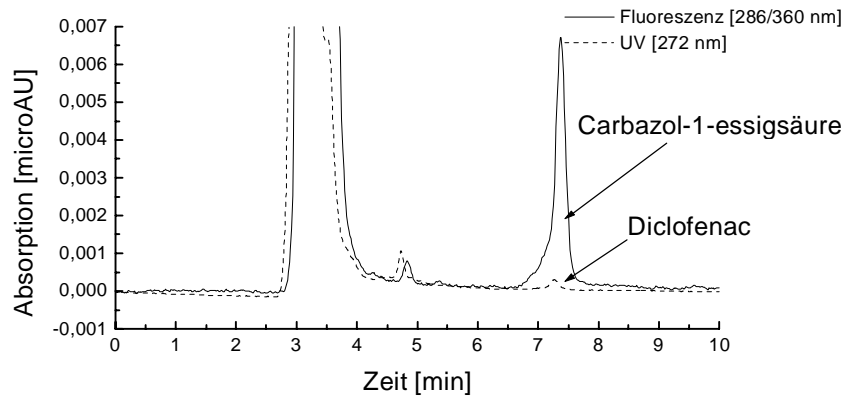


Abb. 56: Gegenüberstellung des UV-Signals (272 nm) für Diclofenac und des Fluoreszenz-Signals (286/360 nm) der Carbazol-1-essigsäure nach erfolgter Photoderivatisierung (eingesetzte Diclofenac-Konzentration: 74 ng/mL).

4.5.4 Klinische Studie zum Augenkammerwasserspiegel von DICLOFENAC bei Kataraktoperationen

Diclofenac wird wegen seiner antiphlogistischen und analgetischen Wirkung in der Augenheilkunde bei der perioperativen Therapie von Kataraktextraktion eingesetzt. Es bewirkt ferner die Aufrechterhaltung der intraoperativen Mydriasis und eine Prophylaxe eines zystoiden Makulaödems (Struck *et al.*, 1998). Bei der beschriebenen Studie mit 50 Patienten, die sich einer Operation zur Entfernung der Hinterkammerlinse unterziehen mußten (Kataraktextraktion), sollte der effektivste präoperative Applikationszeitpunkt bestimmt werden. Dazu wurde der Kammerwasserspiegel von Diclofenac in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Medikamentengabe (einmalig zwei Tropfen einer 0,1 %igen Diclofenac-Augentropfen-Lösung, Voltaren®) untersucht. Die in Kapitel 3.6.5 vorgestellten Ergebnisse zeigten, daß in einem Zeitfenster von ca. 120 bis 400 min (Abb. 29) nach Applikation der Diclofenac-Augentropfen eine Wirkstoff-Konzentration von über 30 ng/mL aufrechterhalten werden konnte (103.-393. min, Durchschnitt: 46,3 ng Diclofenac/mL; n = 29), was die Ergebnisse des Vorversuchs (Kap. 3.5.1) auch bereits angedeutet hatten (Abb. 18). Dies war deshalb von so großem Interesse, weil bereits Steele *et al.* (1981) und später auch Quentin (1991) eine Kammerwasserkonzentration von Diclofenac unter 30 ng/mL als klinisch nicht mehr wirksam einschätzten. Die durchschnittlichen Konzentrationen vor (12,1

ng/mL; n = 8) und nach (10,4 ng/mL; n = 13) diesem Zeitfenster waren demnach zu niedrig, um noch eine genügende Wirkung zu erlauben. Bei der Auswertung der beschriebenen Daten fielen große interindividuelle Schwankungen der Diclofenac-Konzentrationen auf. Der niedrigste Wert im Zeitfenster 119.-393. min lag bei 9,2 ng Diclofenac pro Milliliter Kammerwasser und 8 weitere Patienten wiesen ebenfalls Werte unter 30 ng/mL auf. Demgegenüber lagen 18 Werte z.T. deutlich über diesem Schwellenwert (Maximum: 136,0 ng/mL). Ähnliche interindividuelle Unterschiede wurden bereits in der Literatur beschrieben (Witzemann und Jacobi, 1985, Quentin, 1991, Hessemer *et al.*, 1996). Eine weitere Erklärung für die großen Schwankungen wird auch in der nicht standardisierten Gabe des Diclofenacs liegen. Ein durchschnittlicher Tropfen der Diclofenac-Lösung wies im Laborversuch ein Volumen von ca. 30 µL auf. Die Abweichungen betrug dabei 10-15 %. Diese dürften aber im klinischen Alltag noch weitaus größer sein. Die Abbildungen 28 und vor allem 29 zeigen, daß 2,5 bis 3,5 Stunden nach erfolgter Applikation der höchste Wirkspiegel im Kammerwasser erreicht wird. Dieses Ergebnis deckte sich mit der Studie von Ellis *et al.* (1994), die 2,4 Stunden als optimal ansahen. Die Autoren fanden für weitere 4 Stunden Konzentrationen von über 20 ng/mL (bei Applikation nur eines 0,1 % Diclofenac-Tropfens) und sogar nach 24 Stunden konnte noch Diclofenac im Kammerwasser nachgewiesen werden (bis zu 16 ng/mL). Die vorliegenden Ergebnisse zeigten auch, daß Diclofenac nur langsam durch die Cornea penetriert. Erst nach 68 min war die erste Konzentration mit 17,3 ng/mL nachweisbar. Ähnliche Daten erbrachte die Studie von Quentin (1991), der nach dreimaliger Gabe von 2 Tropfen nach 65 min noch kein Diclofenac im Kammerwasser quantifizieren konnte. Die Abschätzung der mittleren Verweildauer für Diclofenac im Augenkammerwasser (Abb. 30) lag bei ca. 6,6 Stunden. Tierexperimentelle Untersuchungen von Anderson und Chen (1988) deuteten auf Halbwertszeiten für nichtsteroidale Antiphlogistika von 4-6 Stunden hin.

Berücksichtigt man alle Ergebnisse und bezieht die zitierte Literatur mit ein, so lassen sich daraus folgende Empfehlungen ableiten (siehe auch Struck *et al.*, 1998): **1.)** Spätestens 120 min vor Operationsbeginn sollte mit der lokalen Applikation von Diclofenac (0,1 %, Voltaren[®]) begonnen werden. **2.)** Zwei Tropfen sind ausreichend für das Erzielen der wirksamen Kammerwasserkonzentration von >30 ng/mL. **3.)** Dieser wirksame Kammerwasserspiegel bleibt für mindestens vier weitere Stunden aufrecht und fällt danach allmählich ab.

4.5.5 Versuche zum Einfluß einer Gallensäure auf die DICLOFENAC-Konzentration im Blut des Menschen

Die Einflüsse von Gallensäuren auf die Bioverfügbarkeit schwer resorbierbarer, lipophiler Arzneimittel sollte untersucht werden. Die Bioverfügbarkeit hängt dabei vom pH-Wert der Darmflüssigkeiten, der Gegenwart von Nahrungsbestandteilen (Neubert *et al.*, 1993) und von Gallensalzen ab (Gasco *et al.*, 1984, Poelma *et al.*, 1990). Eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit bei oraler Applikation wird durch den erleichterten Transfer des Wirkstoffes durch die Darmwand erreicht. Dabei kann die Aufnahmerate lipophiler Substanzen durch eine Verringerung der Oberflächenspannung der gastrointestinalen Flüssigkeiten oder aber durch die Aufnahme in Micellen erreicht werden. Die Micellenbildung und die chemischen Wechselwirkungen wurden dabei mittels Kapillarezonenelektrophorese charakterisiert (Schwarz *et al.*, 1996a, 1996b, 1997). Die Ergebnisse deuteten darauf hin, daß eine gleichzeitige Applikation von Gallensalzen und Wirkstoffen eine erhöhte Darmresorption bewirken müßte.

Der beschriebene Pilotversuch sollte die Grundlagen für den Versuchsaufbau (Dosisfindung, Probenvolumen, Entnahmezeiten) für eine beabsichtigte klinische Studie liefern und damit zur Klärung beitragen, inwieweit die Ergebnisse der kapillarelektrophoretischen Untersuchungen therapeutisch relevant waren. Bei dem Versuch mit einer weiblichen Probandin (29 Jahre; Kap. 2.2.2) wurde eine Diclofenac Retard-Tablette (50 mg) zusammen mit der Gallensäure Dihydroxycholansäure (Chenofalk[®]-Kapseln, 1000 mg), die therapeutisch zur in-vivo Auflösung von Gallensteinen verwendet wird (Auterhoff *et al.*, 1994), verabreicht. Der Diclofenac-Konzentrationsverlauf im Blut wurde durch Nachsäulenphotoderivatisierung (Kap. 2.3.6) verfolgt. Dieses Ergebnis wurde mit dem gleichen Versuchsaufbau (dieselbe Probandin), jedoch ohne Zugabe der Gallensäure, verglichen. Es zeigte sich eine deutlich schnellere Resorption bei gleichzeitiger Gabe von Diclofenac und Dihydroxycholansäure (Maximum mit 1234,2 ng/mL nach 105 min) als ohne die Gallensäure (Maximum: 1270,6 ng/mL nach 150 min) (Kap. 3.6.6). Ohne Verabreichung der Gallensäure wurde t_{\max} erst 45 min oder 43 % später erreicht. Neben der schnelleren Resorption war aber auch eine Erhöhung der Wirkstoffkonzentration (C_{\max}) erwartet worden. Der Vergleich von C_{\max} und der berechneten AUC zeigte diesbezüglich keinerlei Einflüsse.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in diesem einen Fall durch die gleichzeitige Verabreichung von Diclofenac und Dihydroxycholansäure eine deutlich beschleunigte

Resorption zu verzeichnen war, was jedoch nicht zu einer erhöhten Wirkstoffkonzentration im Blut führte. In Anbetracht dessen, daß hier nur die Daten einer einzelnen Probandin herangezogen wurden, muß aber damit gerechnet werden, daß dies durchaus ein Sonderfall darstellen könnte. Erst weitere Untersuchungen ließen abgesicherte Aussagen zu diesem Sachverhalt zu. Die bei diesem Pilotversuch verwendete Dosis von 50 mg Diclofenac reichte aus, um die Plasmakonzentration von Diclofenac bis zu einem Zeitraum von 10 Stunden zu verfolgen. Im Bereich des Wirkstoffpeaks (zwischen 60 und 240 min) wäre eine Probennahme alle 15 min für eine gute Beschreibung des Wirkstoffpeaks vorteilhaft. Davor und danach würden Abstände von 30 min ausreichen.

4.6 Die in-situ perfundierte Rattenleber

Die bei den Experimenten mit der in-situ perfundierten Rattenleber angewandte Operationstechnik wurde bereits in der Literatur beschrieben (Ritchie und Hardcastle, 1973, Ballet und Thurman, 1991, Waynforth und Flecknell, 1992, Mellick, 1995). Bei den durchgeführten Versuchen war zur Überwachung stets ein erfahrener Operateur anwesend, der die in Kapitel 4.6.1 beschriebenen Merkmale einer einwandfreien Leber einzuschätzen wußte. Entgegen der verbreiteten Verwendung des Bikarbonat-Puffers nach Krebs und Henseleit (Ahmad *et al.*, 1983, Evans *et al.*, 1993, Hussein *et al.*, 1993) wurde ein MOPS-Puffer für die Perfusat-Herstellung eingesetzt. Der im Perfusat gelöste Sauerstoff wird bei der Leberpassage verbraucht und gegen Kohlendioxid ausgetauscht. Die entstehende Kohlensäure wird aber durch den Bikarbonat-Puffer schlechter gepuffert als durch den MOPS-Puffer (Mellick, 1997) und bereits geringe pH-Wert-Abweichungen hätten großen Einfluß auf die Funktion und Haltbarkeit der Leber.

Um den Bedarf an Tieren zu minimieren wurden in der Regel 8 Injektionen pro Rattenleber vorgenommen. Diese 8 Einzelversuche (Dauer je 150 sek) wurden durch genügend lange Auswaschintervalle (5 min) unterbrochen. Zur Prüfung des Versuchsaufbaus und des Probenentnahmeschemas wurden Vorversuche mit drei Ratten durchgeführt. Weitere Zielsetzungen dieser Vorversuche waren die Dosisfindung und die Anpassung der vorher getesteten HPLC-Methoden.

4.6.1 Bestimmung der Viability für die in-situ perfundierte Rattenleber

Die Kontrolle der perfundierten Rattenleber auf deren Viability erfolgte während des Versuchs aufgrund des makroskopischen Erscheinungsbildes. Bei Beginn der Spülung der Rattenleber mit dem Perfusat wechselte die Farbe der Leber von braunrot (blutreich) zu graubraun (blutarm, nur noch von Perfusat durchspült). Dabei durfte es nicht zum Anschwellen der Leber kommen. Dies würde auf einen Druckanstieg in der Leber, verursacht durch den Anstau von Perfusat, schließen und das Experiment müßte abgebrochen werden. Die einmal erreichte Farbstufe (graubraun) der Leber durfte sich dann während des Versuches nicht mehr verändern.

Eine weitere Kontrolle stellte die Messung des Druckes am Manometer dar. Der Druck wurde in cm der Perfusat-Säulenhöhe gemessen. Dabei wurde der durch die Katheterexperimente ermittelte Wert als Ausgangswert genommen. Der so korrigierte Druck resultierte bei einer Flußrate von 30 mL/min in eine Säulenhöhe von ca. 40 mm. Wären die Katheter nicht richtig gelegt oder würde es zu Stauungen innerhalb der Leber kommen (Blutpfropfen), würde dies in einem erhöhten Druck resultieren. Der Versuch müßte abgebrochen werden.

Ein weiterer sehr wichtiger Wert stellt der Sauerstoffverbrauch der Leber dar. Sie wurde ermittelt aus der Differenz des im Perfusat gelösten Sauerstoffs vor und nach der Leberpassage. Der Sauerstoffwert (pO_2) vor der Leberpassage lag bei ca. 530 mmHg, während er danach bei ca. 60 mmHg lag (gemessen mit: BGM 1312, Blood Gas Manager, Instrumentation Laboratory, Italien). Die Verringerung des Sauerstoffgehaltes um 90 % zeigte, daß die Leber noch voll funktionsfähig war. Eine deutlich erniedrigter Verbrauch würde auf Störungen innerhalb der Leber (Enzymsystem) hinweisen.

4.6.2 Einflüsse des Katheters und verschiedener Marker auf die Form der Ausflußkurve aus der in-situ perfundierten Rattenleber

Die Einflüsse der Katheter auf die Konzentrations-Zeit-Kurven von Wirkstoffen wurden in Kapitel 3.12 am Beispiel des Fenoterols graphisch dargestellt (Abb. 49). Dabei zeigte es sich, daß die Fraktionssammelrate einen großen Einfluß auf die Peakform des Katheters ausübt. Aus praktischen Gründen war es jedoch nicht möglich mehr als vier Proben pro Sekunde als Einzelfraktion zu untersuchen. Schon bei dieser Geschwindigkeit des Fraktionssammlers werden, bei einer Flußrate des Perfusats von 30 mL/min, nur noch 125

μL aufgefangen. Dies ist aber ein rein theoretischer Wert. Das tatsächliche Volumen lag unter $100 \mu\text{L}$. Der Grund hierfür lag in dem ruckartigen Rotieren des Fraktionssammlers, wodurch stets einige Tropfen neben die Auffanggefäße (Plastikcups) fielen. Je mehr Meßpunkte aber pro Zeitabschnitt untersucht wurden, desto schmaler wurde der resultierende Peak (Abb. 49; Bild **A**, **B** und **C**). Dieser Effekt läßt die Vermutung zu, daß bei noch schnellerer Fraktionierung die Peakform sich weiter verengt und sich damit die in Kapitel 3.13 geschätzten Katheterparameter ebenfalls verändern würden.

^{14}C -Saccharose verteilt sich in der Leber, wie in der Struktur des Organmodells dargestellt (Abb. 57), innerhalb der Sinusoide bis einschließlich des Disseschen Raumes und kann nicht bis in die Hepatozyten vordringen. Zur Berechnung des Verteilungsvolumens (V_s) diente daher Saccharose als extrazellulärer Marker. Eine Modellierung der Konzentrations-Zeit-Kurven für Wirkstoffe setzte die Kenntnisse der Einflüsse der Katheter und der Sinusoide voraus. Daher wurde zu jedem Versuch an der in-situ perfundierten Rattenleber eine Injektion mit dem extrazellulären Marker ^{14}C -Saccharose vorgenommen. Die daraus berechneten Parameter der mittleren Transitzeiten (MT_1 und MT_2) und der relativen Dispersion (CV_1^2 und CV_2^2) für die erste und zweite Gaußfunktion dienten als Grundlage für die Schätzung der Parameter für die Konzentrations-Zeit-Kurven der zu untersuchenden Wirkstoffe. Aus MT_1 und MT_2 ließ sich MTT_s berechnen (Tab. 15). Der Mittelwert lag bei 5,82 sek und damit etwas unter dem entsprechenden Wert (10,48 sek; Tab. 8), der mit dem Algorithmus von Purves (1992a, 1992b, 1992c) berechnet wurde. Die Ergebnisse für die relative Dispersion von Saccharose lagen eng beieinander (5,71, bzw. 5,13 nach dem Algorithmus von Purves).

Ein weiterer Marker stellte Albumin dar, das den intravaskulären Raum beschreiben sollte. Es verteilt sich innerhalb der Sinusoide, aber im Gegensatz zur Saccharose nur teilweise im Disseschen Raum. Albumin wurde mit Evans Blue als Indikator versehen und zusammen mit ^{14}C -Saccharose injiziert und photometrisch am Mikroplattenleser bestimmt. Die anfänglich eingesetzte Konzentration von 1 mg/mL Evans Blue reichte aber nicht aus, um genügend viele Meßpunkte zu erhalten, die den Kurvenverlauf im Bereich des Albumin-Peaks genau genug wiedergaben. Auch höhere Konzentrationen (ab Versuch Nr. 9: 5 mg/mL) brachten nur wenig Verbesserung. Die Ausflußkurve im Bereich des Konzentrations-Peaks wurde zwar dadurch besser beschrieben, die Anfangskonzentrationen von Evans Blue lagen aber bereits über dem linearen Meßbereich des Photometers, während der Tailbereich der Kurve immer noch nicht empfindlich genug dargestellt werden konnte. Insgesamt muß die

Verwendung dieses Markers als wenig praktikabel für die Routinearbeit angesehen werden und sollte auf spezielle Anwendungen beschränkt bleiben.

Neben ^{14}C -Saccharose als extrazellulären und Albumin/Evans Blue als intravaskulären Marker, wurde mit der jeweiligen ersten Injektion eines jeden Leberexperimentes auch noch der Marker $^3\text{H}_2\text{O}$ injiziert, der bis in die Hepatozyten vordringen konnte und deshalb als Gesamtmarker fungierte.

Von den während eines Versuches aufgefangenen Fraktionen wurden 100 μL mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und gleichzeitig auf die radioaktiven Substanzen ^{14}C -Saccharose und $^3\text{H}_2\text{O}$ am Szintillationszähler untersucht (Kap. 2.2.3.6). Als Standard diente eine mindestens dreifache Bestimmung der unverdünnten Bolusinjektion (enthielt stets 3 μCi $^3\text{H}_2\text{O}$, 2 μCi ^{14}C -Saccharose und das Albumin/Evans Blue-Gemisch). Die dabei gemessenen Counts lagen für ^3H bei bis zu 486000 und bei ^{14}C bei bis zu 5870000. Demgegenüber standen bei den Ausflußkurven der in-situ perfundierten Rattenleber Höchstwerte von bis zu 19300 Counts für $^3\text{H}_2\text{O}$, bzw. bis zu 158000 Counts für ^{14}C -Saccharose. Dieses Verfahren zur Bestimmung und Auswertung von ^{14}C - und ^3H -Proben wurde routinemäßig im Institut für Medizin der University of Queensland/Brisbane angewendet und ohne Veränderung übernommen. Nach der Rückkehr aus Australien wurden alle Daten analysiert und den beschriebenen pharmakokinetischen Berechnungen unterworfen. Die Ergebnisse wurden in den Kapiteln 3.10 bis 3.15 beschrieben.

Für die Auswertung der Radioaktivitätsbestimmungen sind jedoch einige Punkte kritisch zu betrachten: Die Quantifizierung mit Hilfe einer Eichgeraden ist der Eichung mit der unverdünnten Bolusinjektion vorzuziehen. Dies gilt insbesondere, da die natürlich vorkommende Radioaktivität stets als Hintergrundstrahlung in Erscheinung trat und so ein Grundrauschen von ca. 10-20 Counts lieferte. Weil für die exakte Bestimmung des für die pharmakokinetischen Berechnungen so wichtigen Tailparts aber gerade die kleinen Meßwerte von großer Bedeutung sind, müssen diese auch exakt quantifizierbar sein. Dafür ist die Kenntnis des linearen Meßbereiches und der unteren und oberen Nachweisgrenze, einschließlich der zugehörigen Standardabweichungen, wichtig. Bei pharmakokinetischen Berechnungen von C. Stedtler (1998) wurde zur genaueren Eichung der Daten dieses Grundrauschen von den gemessenen Datenpunkten abgezogen. In Abhängigkeit ob ein Grundrauschen von 10 oder 20 Counts vorausgesetzt wurde, ergaben sich Abweichungen je nach Parameterschätzung von 10-30 %.

Bei zukünftigen Experimenten ist daher die Bestimmung einer Eichgeraden, einschließlich der Nachweisgrenzen und der Standardabweichungen zu empfehlen, da nur dadurch eine exakte Datenauswertung ermöglicht wird.

Eine weitere Schwierigkeit, die sich bei der pharmakokinetischen Modellierung der Wirkstoffe ergab, war auf den Versuchsaufbau zurückzuführen. Die Ausflußkurven der Wirkstoffe mußte mit dem Kurvenverlauf des zur jeweiligen Leber gehörenden extrazellulären Markers ^{14}C -Saccharose in Einklang gebracht werden. Der Start des Fraktionssammlers mußte aber, ebenso wie die Bolusinjektion selbst, per Hand vorgenommen werden. Dabei konnte es passieren, daß es zu zeitlichen Verschiebungen von 1 bis 3 Sekunden innerhalb der Abfolge der Injektionen kam, was eine Anpassung an die Modelle erschwerte. Es ist deshalb notwendig, daß eine genaue Synchronisierung beider Kurvenverläufe (die des Markers ^{14}C -Saccharose und des Wirkstoffes) erreicht wird. Das Starten des Fraktionssammlers sollte daher immer im gleichen zeitlichen Abstand vor der Bolusinjektion erfolgen.

4.6.3 DICLOFENAC-Bestimmung aus der in-situ perfundierten Rattenleber

Die pharmakokinetischen Eigenschaften von Diclofenac werden bis heute intensiv untersucht (Tabata *et al.*, 1996a und 1996b, Zmeili *et al.*, 1996, Gonzales *et al.*, 1997) und auch die Bestimmung der relevanten Parameter stehen im Mittelpunkt vieler neuer Publikationen (Mahmood, 1996, Auler-Junior *et al.*, 1997, Petrescu und Tarba, 1997, Torres-Lopez *et al.*, 1997a). Die Diclofenac-Bestimmungen in der perfundierten Rattenleber fanden mit der in Kapitel 2.3.6 beschriebenen HPLC-Methode mit photochemischer Nachsäulenderivatisierung und bei Verwendung von ^{14}C -Diclofenac durch einen Szintillationszähler statt. Der Vorteil der HPLC-Methode lag vor allem in dem selektiven Nachweis von Diclofenac, während die Bestimmung der Radioaktivität nicht zwischen ^{14}C -Diclofenac und potentiellen Metaboliten unterscheiden konnte. Die Tabellen 9 und 10 im Kapitel 3.11 stellen die Ergebnisse der Berechnungen für die Parameter getrennt nach Diclofenac und ^{14}C -Diclofenac dar. Während die Werte für MTT und CV^2 sich nicht statistisch signifikant unterschieden, war der Unterschied der berechneten AUC_n und AUC jedoch deutlich. Aber auch hier müssen bei der Auswertung die in Kapitel 4.6.2 bereits beschriebenen Probleme mit der Eichung der radioaktiven Proben berücksichtigt werden. Die mittlere Wiederfindungsraten bei den Versuchen mit ^{14}C -Diclofenac lagen bei 58,4 % und bei der HPLC-Bestimmung von Diclofenac bei 91,8 %.

Die Auswertung der Daten für die Versuche mit dem Wirkstoff Diclofenac erfolgte sowohl mit dem Dispersionsmodell (Kap. 3.14) als auch mit dem neuen Bindungsmodell (Weiss *et al.*, 1998) (Kap. 3.15).

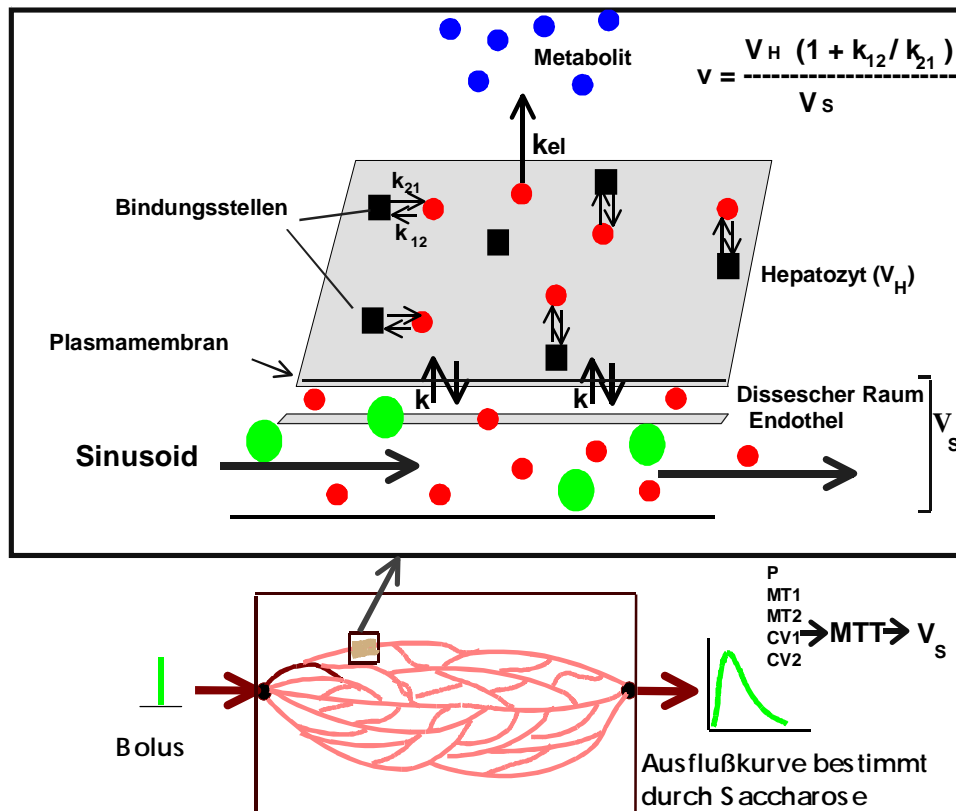


Abb. 57: Struktur des mathematischen Modells der Leber (ROT: Diclofenac; GRÜN: Saccharose; BLAU: Metabolit). Der untere Teil der Abbildung zeigt den sich verzweigenden Blutstrom in der Leber (Sinusoide). Der obere Teil stellt einen Ausschnitt aus dem unteren dar.

Die Tabelle 16 zeigt die nach dem Dispersionsmodell berechneten Parameter für die Diclofenac-Versuche mit der Ratte Nr. 9 (9-6, 9-7 und 9-8) und vergleicht sie mit den Ergebnissen aus der Arbeit von Evans *et al.* (1993). Das Volumenverhältnis ($v = 2,56$) und das Verteilungsvolumen ($V_1 = 10,42$) stimmte sehr gut mit den Werten aus der Arbeit von Evans *et al.* überein ($v = 2,68$ und $V_1 = 10,35$). Die übrigen Parameter zeigten aber deutliche Unterschiede. So lagen D_N (1,32) und k_{el} ($0,0101 \text{ sek}^{-1}$) deutlich über den Vergleichswerten der Arbeitsgruppe um Evans ($D_N = 0,39$ und $k_{el} = 0,0042 \text{ sek}^{-1}$). Während die Parameter k_{in} ($0,021 \text{ sek}^{-1}$) und k_{out} ($0,008 \text{ sek}^{-1}$) geringer als bei Evans und Mitarbeiter ausfielen ($k_{in} = 0,091 \text{ sek}^{-1}$ und $k_{out} = 0,034 \text{ sek}^{-1}$). Die Autoren verwendeten für ihre Versuche mit der perfundierten Rattenleber einen Krebs-Bikarbonat-Puffer, der 2,5 % Albumin enthielt. Außerdem arbeiteten sie mit ^{14}C -Diclofenac, deren Konzentrations-Zeit-Kurve sie nur über einen Zeitraum von 100 sek verfolgten. Dagegen wurden die eigenen Versuche mit dem geeigneteren MOPS-Puffer (siehe Kap. 4.6) und 2 % Albumin

durchgeführt. Die selektive HPLC-Methode erlaubte außerdem die Beobachtung des Kurvenverlaufs bis zu 150 sek. Neben des Einflusses der Albumin-Konzentration (Jones *et al.*, 1984, Rowland *et al.*, 1984, Evans *et al.*, 1993) war wahrscheinlich der viel längere Beobachtungszeitraum (Tailpart der Kurve) für die unterschiedliche Parameterschätzung verantwortlich.

Für das Bindungsmodell galt, daß die Verteilung innerhalb der Hepatozyten durch die Assoziations- ($\tau_{12} = 68,2$ sek; $\tau_{12} = 1/k_{12}$) und Dissoziationszeitkonstanten ($\tau_{21} = 52,7$ sek; $\tau_{21} = 1/k_{21}$) charakterisiert wird, wobei die bisherigen Organmodelle von der Annahme ausgingen, daß diese Zeitkonstanten vernachlässigbar wären. Die Verteilung in die Hepatozyten durch die Plasmamembran war permeabilitätslimitiert ($k = 0,0889$ sek⁻¹; $\tau = 11,3$ sek, $\tau = 1/k$) und für das Permeabilitätsflächenprodukt (PS) der Plasmamembran galt, wobei V_S das extrazelluläre Verteilungsvolumen darstellte, die Gleichung 28.

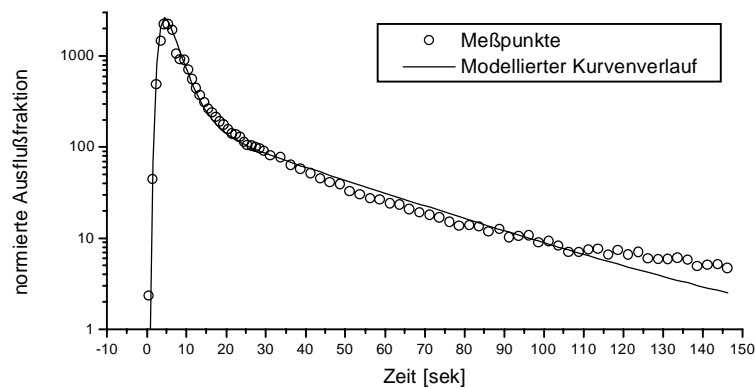


Abb. 58: Konzentrations-Zeit-Kurve (Ausflußkurve; Skalierungsfaktor 10000) für Diclofenac (Versuch 9-6). Modellierter Kurvenverlauf ohne Berücksichtigung der Bindungsdynamik.

Die zweifache inverse Gaußfunktion stand als empirische Funktion der vaskulären Phase im Organmodell von Weiss und Roberts (1996) und im Bindungsmodell von Weiss *et al.* (1998). Das Dispersionsmodell implizierte theoretisch eine einfache inverse Gaußfunktion als Transitzeitdichte des vaskulären Markers. Beim Bindungsmodell von Weiss *et al.* (1998) hingegen, das auf dem Organmodell von Weiss und Roberts (1996) aufbaute, konnte f_s verschiedene Funktionen annehmen und war so in der Lage vaskuläre Marker besser zu beschreiben. Das Bindungsmodell berücksichtigte neben der Heterogenität der Blutflußverteilung in der Leber aber auch noch die hepatozelluläre Verteilungsdynamik von Diclofenac. Das 2-Phasen-Organmodell von Weiss und Roberts (1996) wurde für das

Bindungsmodell so verändert, daß die Diffusion im Zytosol als sehr schnell im Verhältnis zu den Wechselwirkungen mit den zytosolischen Bindungsstellen angesehen wurde. Die grundlegende Struktur des mathematischen Modells der Leber ist in Abbildung 57 dargestellt worden. Die im Kapitel 3.15 (Abb. 51) gezeigte Ausflußkurve und die gute Modellierung des Kurvenverlaufes mit dem Bindungsmodell zeigte, daß die hepatozelluläre Verteilungsdynamik nicht vernachlässigbar war und sich besonders im Tailpart der Ausflußkurve die Schwäche der konventionellen Organmodelle (z.B. das Dispersionsmodell) offenbarte, bei denen diese Dynamik unberücksichtigt blieb (Abb. 58).

4.6.4 FENOTEROL-Bestimmung aus der in-situ perfundierten Rattenleber

Zur Bestimmung von Fenoterol in biologischen Proben dient in der Medizin (Warnke *et al.*, 1992, Hildebrandt *et al.*, 1993 und 1994) häufig der radioimmunologische Nachweis der auf den Arbeiten von Rominger und Albert (1985) und Rominger *et al.* (1990) zurückgeht. Diese Methode ist bisher die einzige, die mit einer Nachweisgrenze von 20 pg/mL auch im mittleren therapeutischen Bereich, der bei ca. 300 pg/mL liegen soll (Leferink *et al.*, 1982), quantifizieren kann. Als weitere empfindliche Nachweismethoden wären die GC-MS-Methode (Leferink *et al.*, 1982, Couper und Drummer, 1996; Nachweisgrenze: 1 ng/mL) und die HPLC-Methode mit elektrochemischer Detektion von Koster *et al.* (1985; Nachweisgrenze 2 ng/mL) zu nennen. Ein Vergleich der Bestimmungsmethoden Isotachophorese, Kapillarzonenelektrophorese (CZE) und der HPLC mit UV-Detektion erbrachte hingegen nur Nachweisgrenzen von 6,0 µg/mL (CZE), 7,2 µg/mL (HPLC), bzw. 58,4 µg/mL (Ackermans *et al.*, 1992). Auch die neuere Arbeit von Jacobson und Peterson (1994) gibt für eine HPLC-Methode mit UV-Detektion nur einen linearen Meßbereich von 27,8 bis 500 µg/mL an.

Die Untersuchungen von Fenoterol in Perfusat-Lösungen erfolgten durch die neu entwickelte und in Kapitel 2.3.7 beschriebene HPLC-Methode mit Fluoreszenz-Detektion und einer Nachweisgrenze von 40 ng/mL. Exemplarisch für die Untersuchungen mit dem Wirkstoff Fenoterol zeigt die Abbildungen 47 die Ausflußkurve für den Versuch 11-4. Der berechnete Mittelwert für die AUC_n lag bei 1,445 und der extrapolierte Wert für die AUC bei 1,472, wobei beide eine verhältnismäßig geringe Standardabweichung von ca. 0,2 aufwiesen. Der Mittelwert für die mittlere Transitzeit (MTT) lag bei 11,9 sek. Die Standardabweichung betrug allerdings 13,8 sek, was vor allem auf das Ergebnis des Versuches 12-2 zurückzuführen war, bei dem eine MTT von 62,4 sek ermittelt wurde.

Nimmt man diesen einen Wert aus der Bewertung heraus, lag der Mittelwert nur noch bei 8,9 sek (Standardabweichung 5,7 sek). Die Werte schwankten dabei zwischen 3,65 und 19,4 sek. Auch das Ergebnis für die relative Dispersion (CV^2) wies mit der Standardabweichung von 5,97 gegenüber dem Mittelwert (6,96) eine große Abweichung auf. Die Ergebnisse lagen zwischen 0,79 und 22,92 bei einem Median von 6,26. Die mittlere Wiederfindungsrate lag bei 73,3 % (Median 72,8 %). Fenoterol unterliegt wie PAH einem aktiven Transportmechanismus. Da das Bindungsmodell aber nicht auf aktive Transporte abgestimmt wurde, konnten keine Ausflußkurven modelliert werden. Die HPLC-Methode für Fenoterol hat sich in den Versuchen bewährt. Die Nachweisgrenze von 40 ng/mL sollte jedoch noch weiter abgesenkt werden. Hierfür kämen vor allem Derivatisierungen mit fluoreszierenden Substanzen in Betracht. Dafür würden sich besonders die vier vorhandenen Hydroxylgruppen des Fenoterols eignen (Wintersteiger, 1982 und 1988, Karlsson *et al.*, 1985, Yamaguchi *et al.*, 1989, Motte *et al.*, 1996). Eine verbesserte Nachweisgrenze könnte helfen, den bisher nur schlecht beschriebenen Tailpart der Ausflußkurve besser zu beschreiben.

4.6.5 PAH- und PAAHA-Bestimmung aus der in-situ perfundierten Rattenleber

Zur Messung der renalen Durchblutung und der tubulären Sekretionskapazität wird die PAH intravenös verabreicht und z.T. im Organismus zur PAAHA acetyliert. Während diese Reaktion bei Menschen und bei Meerschweinchen, Mäusen, Kühen, Schafen und Schweinen und in geringerem Umfang auch bei der Ratte abläuft, tritt sie bei Katzen, Hunden und Kaninchen nicht auf (Carpenter und Mudge, 1980). Bei der oralen Applikation traten durch Hydrolyse neben der PAAHA zahlreiche weitere Metabolite auf (Hülsmann und van Eps, 1967). HPLC-Methoden mit UV-Detektion für den Nachweis der PAH und deren Metaboliten PAAHA in Plasma oder Urin sind seit langem bekannt (Brown *et al.*, 1974, Brown und Michalski, 1976, Chan *et al.*, 1988). Eine HPLC-Analytik mit Fluoreszenz-Detektion für Kaninchen-Plasma beschrieben 1996 Song und Hsu. Auf dieser Arbeit aufbauend wurde die in Kapitel 2.3.8 beschriebene Methode für den simultanen Nachweis von PAH und PAAHA im Perfusat von Rattenlebern entwickelt. Die schwache Fluoreszenz der PAAHA resultierte in einer Nachweisgrenze von nur 200 ng/mL (Song und Hsu, 1996). Durch das Aufnehmen der Excitations- und Emissionsspektren für die PAH und die PAAHA (Kap. 3.8) konnte die optimale Wellenlänge für das Entstehen der Fluoreszenz bei der PAH verwendet werden. Die für den Nachweis der PAAHA empfindlichere UV-

Detektion wurde durch das Einfügen eines UV-Detektors, vor den für die PAH-Messung verwendeten Fluoreszenz-Detektor, möglich. Weil die von Song und Hsu verwendete Trennsäule (RP-18, 5 μm Teilchen) im Perfusat eine ungenügende Basislinientrennung der Peaks zeigte, kam eine Superspher-Säule zum Einsatz (RP-18, 4 μm Teilchen). Dies resultierte zwar in einem höheren Säulendruck, der jedoch mit einer kleineren Flußrate und einem höheren Anteil an Acetonitril kompensiert werden konnte. Als Ergebnis erhielt man basisliniengetrennte Peaks, die durch die zusätzlich optimierte Wahl der Wellenlängen (Fluoreszenz-Detektion für PAH, UV-Detektion für PAAHA) auch empfindlicher nachgewiesen werden konnten (PAAHA: 15 ng/mL und PAH: 4 ng/mL). Die Bestimmung der PAH und der PAAHA bei den Versuchen mit der in-situ perfundierten Rattenleber erfolgte dann durch die bereits vorgestellte Methode (Kap. 2.3.8).

Die Ergebnisse der Parameterberechnung für AUC, AUC_n , MTT und CV^2 bei der getrennten Injektion von PAH und PAAHA sind in den Tabellen 12 und 13 (Kap. 3.11) aufgelistet. Die Standardabweichungen der Mittelwerte der Parameter für die **PAH-Injektion** zeigten keine auffälligen Schwankungen. Für die Bewertung der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, daß die bei der HPLC-Analyse verwendete Trennsäule ab der Ratte Nr. 7 die PAH- und PAAHA-Peaks nicht mehr immer basisliniengetrennt auflösen konnte. Auch gründliche Spülungen der Trennsäule mit Wasser, Methanol, Acetonitril und Isopropanol brachten nur noch kurzzeitige Besserungen. Die Säule hatte offensichtlich nach über 3800 Probeninjektionen einen nicht mehr reversiblen Verlust ihre Trennfähigkeit erlitten. Da eine Ersatzsäule nicht vorhanden war, konnten die verbliebenen Perfusat-Proben nur unter großem zeitlichen Aufwand analysiert werden (häufiges gründliches Spülen). Die Daten der Ratte Nr. 6 wurden wegen Anschwellung der Leber während der Versuchsdurchführung aus der Auswertung herausgenommen. Desweiteren konnten vereinzelte Parameter nicht berechnet werden (in Tab. 12 mit „n.b.“ markiert).

Bei den Daten für die **PAAHA-Injektion** fiel auf, daß die Ergebnisse der Schätzung des Parameters MTT (Tab. 13) z.T. sehr hohe Werte annimmt und großen Schwankungen unterliegt (von 24,9 bis 364,8 sek). Der berechnete Mittelwert von 179,0 sek lag ebenfalls sehr hoch. Die mittlere Wiederfindungsrate lag bei 84,3 %. Die AUC-Werte der Versuche 8-5, 8-6, 12-5 und 12-6 lagen über dem Wert 2, was für die daraus resultierende extrapolierte Wiederfindungsrate Werte von über 100 % bedeutete. Der Mittelwert für die relative Dispersion (CV^2) lag bei 3,5. Die durchgeführten, aber in den Tabellen 12 und 13 nicht aufgelisteten, PAH- und PAAHA-Versuche konnten, wegen den beschriebenen Schwierigkeiten mit der Trennsäule, nicht ausgewertet werden.

Bei den Versuchen mit PAH-Injektionen wurden auch stets die **Konzentrationen des entstehenden Metaboliten PAAHA** gemessen. Die Ergebnisse zeigten, daß bereits 9 sek nach erfolgter PAH-Injektion die ersten PAAHA-Peaks quantifiziert werden konnten (Abb. 48). Der anfänglich relativ schnelle Anstieg der PAAHA-Konzentration flachte nach 15 bis 20 sek allmählich ab und erreichte im Mittel nach ca. 63 sek seinen höchsten Wert (77-101 ng/mL; Versuche mit 8,0 mg/mL). Bis zum Ende des Versuches fiel die PAAHA-Konzentration dann langsam auf ca. 50 ng/mL. Auch die Versuche mit 4,0 mg PAH/mL, zeigten nach ca. 63 sek den höchsten PAAHA Wert (Mittelwert 50,2 ng/mL). Die ersten PAAHA-Peaks konnten aber erst 20 sek nach der PAH-Injektion quantifiziert werden und die Konzentrationen am Ende des Versuches lagen dann bereits unterhalb der Bestimmungsgrenze. Die Wiederfindungsraten der beiden getesteten Konzentrationen unterschieden sich nicht signifikant voneinander (0,255 % \pm 0,05 bei 4,0 mg/mL, bzw. 0,307 % \pm 0,05 bei 8,0 mg/mL). Die nicht dosisnormierten AUC_n- und AUC-Werte bei den Versuchen mit 8,0 mg PAH/mL lagen zwar signifikant höher als bei den Injektionen mit 4,0 mg/mL, erreichten aber nicht den erwarteten doppelt so hohen Wert. Der Grund liegt vermutlich darin, daß sich die PAAHA-Werte nur wenig oberhalb der Bestimmungsgrenze bewegten. Die Abweichung in der Genauigkeit der Quantifizierung ist aber in diesem Bereich besonders hoch. Die berechneten Mittelwerte für die MTT (140, bzw. 153 sek) und die CV² (0,499, bzw. 0,448) unterschieden sich, wie erwartet, nicht signifikant bei den verschiedenen Konzentrationen. Die Mittelwerte der MTT stimmten dabei gut mit den Werten für die Bolusinjektion der PAAHA überein (179,0 sek). Die Daten der relativen Dispersion zeigten jedoch Abweichungen ($CV^2_{\text{Bolusinjektion}} = 3,5 \pm 0,7$ und $CV^2_{\text{Metabolit}} \approx 0,5$).

Bei einem Vorversuch sollte der Einfluß von Probenecid auf die Pharmakokinetik der *p*-Aminohippursäure untersucht werden (Tab. III, Anhang). PAH unterliegt in der Niere aktiven Transportmechanismen, die in ähnlicher Form auch in der Leber vorhanden sein könnten. Der Wirkstoff Probenecid vermindert dabei die Elimination und vergrößert das Verteilungsvolumen (V) in der Niere. Die tubuläre Sekretion im ersten System des proximalen Tubulus (es sezerniert organische Säuren) wird gehemmt, wohingegen das zweite System, es sezerniert Basen, nicht durch Probenecid hemmbar ist. Wenn Probenecid auch auf den aktiven Transport in der Leber einen Einfluß hätte, könnte man annehmen, daß für PAH gleiche Transportwege in beiden Organen vorliegen würden.

Probenecid ist sehr schlecht wasserlöslich. Weder starkes und langes Schütteln der Proben, noch deren vorsichtige Erwärmung konnte erreichen, daß eine konzentriertere Lösung als

20 mM erhalten wurde. Der Versuch 8-7 (8,0 mg/mL PAH in 20 mM Probenecid) zeigte keine auffälligen Abweichungen der Parameterschätzung im Vergleich zu den übrigen Versuchen. Dieser eine Vorversuch hat jedoch wenig Aussagekraft und sollte bei Bedarf wiederholt werden.

Für die Aufnahme der PAH in die Zelle werden aktive Transportmechanismen genutzt (Carpenter und Mudge, 1980). Da ein aktiver Transport aber nicht im Bindungsmodell berücksichtigt wurde, konnten die Ausflußkurven der PAH und der PAAHA nicht modelliert werden. Die entwickelte HPLC-Methode war geeignet, um die PAH und die PAAHA simultan in Perfusat-Proben der Ratte zu bestimmen. Die Peaks waren, bis zum Verlust der Trennfähigkeit der Säule, stets basisliniengetrennt und empfindlich detektierbar. Für weitere Untersuchungen mit der PAAHA sollten auch noch höhere PAH-Konzentrationen zum Einsatz kommen, um die Metabolitkinetik besser verfolgen zu können.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Für die klinische Routinebestimmung von Pharmaka wurden analytische Methoden entwickelt, die sich durch hohe Reproduzierbarkeit, Selektivität und Sensitivität auszeichneten. Zur Anwendung kam, unter Verwendung von Umkehrphasen und verschiedener Kopplungstechniken (UV-, Fluoreszenz- und elektrochemische Detektion), die High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Trennmethode für die Wirkstoffe Oxybuprocain, Diclofenac, Prednisolon-21-acetat, Fenoterol und die *p*-Aminohippursäure wurden erarbeitet und die wichtigsten Charakterisierungsparameter (Retentionszeiten, Nachweisgrenzen, Linearitätsbereiche, Korrelationskoeffizienten, Wiederfindungsraten, Retentionsfaktoren und Standardabweichungen) bestimmt. Für alle Substanzen wurden die UV- und Fluoreszenzspektren aufgenommen und dargestellt.

Der wichtigste Metabolit der *p*-Aminohippursäure (PAH), die *p*-Acetylaminohippursäure (PAAHA) wurde synthetisiert und sowohl durch HPLC, als auch durch Massenspektrometrie auf Reinheit geprüft. Die PAAHA konnte zusammen mit der PAH in einem Analysenlauf bestimmt werden.

Für Diclofenac wurde neben UV- und elektrochemischer Detektion außerdem eine neue photochemische Online-Nachsäulenderivatisierung etabliert. Dabei kam ein Eigenbau eines Photoreaktors mit einer sekundär verformten und 20 m langen Tefzel-Kapillare zum Einsatz. Bei dieser Methode wurde Diclofenac unter UV-Bestrahlung in die Carbazol-1-essigsäure (CAA) umgewandelt. Versuche mit Offline- und Online-Derivatisierungen und verschiedenen Flußraten optimierten die Methode. Die CAA war nach der Photoreaktion fluorimetrisch detektierbar.

Die genannten Wirkstoffe wurden in unterschiedlichen biologischen Proben (Blut und Augenkammerwasser des Menschen, Perfusat-Proben der Ratte) nachgewiesen und konnten damit ihre breite Anwendbarkeit unter Beweis stellen. Die Probenvorbereitungen für Blut- und Perfusat-Proben waren einfach in ihrer Anwendung. Sie beschränkten sich auf die Ausfällung der Proteine und Peptide durch Perchlorsäure oder Acetonitril. Die ermittelten Wiederfindungsraten im Überstand der Proben beliefen sich auf ca. 100 %. Für Augenkammerwasser entfiel durch die Verwendung einer polymerbeschichteten Umkehrphase eine Probenvorbereitung sogar gänzlich.

Für das Organsystem Auge nimmt, neben der systemischen Applikation von Pharmaka, vor allem die topische Verabreichungsform eine führende Rolle ein. In klinischen Studien und in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt wurde Augenkammerwasser von Menschen, die

sich Kataraktoperationen unterziehen mußten, auf die Wirkstoffe Diclofenac, Prednisolon-21-acetat und Oxybuprocain untersucht. Die Konzentrationen von Diclofenac und Oxybuprocain konnten durch eine neue HPLC-Methode mit elektrochemischer Detektion simultan im Kammerwasser bestimmt werden. Für Diclofenac konnten daraus Empfehlungen für die optimale Dosis und Applikationszeit abgeleitet werden. Prednisolon-21-acetat ließ sich durch die angewandte UV-Detektion im Kammerwasser-Proben nicht nachweisen. Dieses Ergebnis deckte sich mit neueren Publikationen. Es wird davon ausgegangen, daß Prednisolon-21-acetat während der Passage durch die Hornhaut des Auges zu Prednisolon metabolisiert wird. Prednisolon wurde durch HPLC-MS im Fachbereich Pharmazie der Martin-Luther-Universität in diesen Proben nachgewiesen.

In einem Pilotversuch wurde der Einfluß der Gallensäure Dihydroxycholansäure auf die Resorption und Bioverfügbarkeit des oral applizierten Diclofenac im Blut des Menschen untersucht. Eine klinische Studie soll auf den Ergebnissen dieses Versuches aufbauen.

Für die Modellierung pharmakokinetischer Prozesse wurden umfangreiche und präzise Datensätze für die Wirkstoffe Diclofenac, Fenoterol, PAH und PAAHA benötigt. Im Tierversuch mit in-situ perfundierten Rattenlebern wurden Bolusinjektionen dieser Wirkstoffe in unterschiedlichen Konzentrationen appliziert. Die Konzentrations-Zeit-Kurven für die einzelnen Wirkstoffe wurden über einen Zeitraum von 150 Sekunden verfolgt und ausgewertet. Die Parameter AUC_n , AUC, MTT, CV^2 und die Wiederfindungsraten wurden berechnet und tabellarisch aufgelistet.

Die Ausflußkurven für den Wirkstoff Diclofenac wurden unter Verwendung des Dispersionsmodells (Roberts und Rowland, 1986a) und des neuen Bindungsmodells (Weiss *et al.*, 1998) einer pharmakokinetischen Betrachtung zugänglich gemacht. Dabei wurde der extravaskuläre Marker (^{14}C -Saccharose), ebenso wie der Einfluß des verwendeten Katheters, bei den Modellierungen berücksichtigt. Die Konzentrations-Zeit-Kurven konnten mit dem Bindungsmodell, das erstmalig neben der Heterogenität der Blutflußverteilung in der Leber auch die hepatozelluläre Verteilungsdynamik berücksichtigt, gut angepaßt werden. Dieses neue Organmodell zeigte, daß die Verteilungsdynamik bei dem Wirkstoff Diclofenac nicht vernachlässigbar war und im Anpassen des Tailparts der Ausflußkurven den herkömmlichen Modellen überlegen war.

Die Metabolisierung von PAH zur PAAHA in der in-situ perfundierten Rattenleber konnte erstmalig nachgewiesen werden. Dies wurde durch die hohe Empfindlichkeit der erarbeiteten HPLC-Methoden ermöglicht. Bei weiteren Untersuchungen sollte jedoch

versucht werden noch höhere PAH-Konzentrationen einzusetzen, um den entstehenden Metaboliten PAAHA besser nachweisen zu können.

Die Nachweisgrenze für die Bestimmung des Fenoterols war nicht immer ausreichend. Zur Steigerung der Sensitivität sollten Derivatisierungsreaktionen eingesetzt werden. Da Fenoterol als Razemat zum therapeutischen Einsatz gelangt, wäre auch eine Trennung der Enantiomeren und deren getrennte Untersuchung ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften sinnvoll.

Kuhlmann, Olaf

Trennverfahren für die Wirkstoffanalyse und deren Einsatz in der Pharmakokinetik.

Halle, Univ., FB Biochem./Biotechnol., Diss., 119 Seiten, 1998.

6. Literatur

Aced, G., und H. J. Möckel. 1991. Liquidchromatographie. Apparative, theoretische und methodische Grundlagen der HPLC. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.

Ackermans, M. T., J. L. Beckers, F. M. Everaerts und I. G. J. A. Seelen. 1992. Comparison of isotachopheresis, capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography for the determination of salbutamol, terbutaline sulphate and fenoterol hydrobromide in pharmaceutical dosage forms. *J. Chromatogr.*, **590**:341-353.

Agarwal, R. 1998. Chromatographic estimation of iothalamate and *p*-aminohippuric acid to measure glomerular filtration rate and effective renal plasma flow in humans. *J. Chromatogr.*, **705**:3-9.

Ahmad, A. B., P. N. Bennett und M. Rowland. 1983. Models of hepatic drug clearance: Discrimination between the "well-stirred" and the "parallel-tube" models. *J. Pharm. Pharmacol.*, **35**:219-224.

Al-Habet, S. M. H., W. A. C. McAllister, J. V. Collins und H. J. Rogers. 1981. Comparison of radioimmunoassay and thin layer chromatographic assay methods for estimation of plasma prednisolone concentrations. *J. Pharmacol. Methods*, **6**:137-142.

Ammon, H. P. T. 1991. Arzneimittelneben- und -wechselwirkungen. Ein Handbuch und Tabellenwerk für Ärzte und Apotheker. 3. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

Anderson, J. A., und C. C. Chen. 1988. Multiple dosing increases the ocular bioavailability of topically administered flurbiprofen. *Arch. Ophthalmol.*, **106**:1107-1109.

Auler-Junior, J. O., E. B. Espada, E. Crivelli, T. B. Quintavalle, A. Kurata, N. A. Stolf, A. M. Issy, O. E. Paschoa, M. Danhof, D. D. Breimer, D. A. Chamone und S. R. Santos. 1997. Diclofenac plasma protein binding: PK-PD modelling in cardiac patients submitted to cardiopulmonary bypass. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **30**:369-374.

- Auterhoff, H., J. Knabe und H.-D. Höltje.** 1994. Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie. 13. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Ballet, F., und R. G. Thurman.** 1991. Why the perfused liver ? In: F. Ballet und R. G. Thurman (Hrsg.): Research in perfused liver. INSERM/John Libby, London, Seite 1-20.
- Batley, G. E.** 1984. Use of teflon components in photochemical reactors. Anal. Chem., **56**:2261-2262.
- Battista, H. J., G. Wehinger und R. Henn.** 1985. Separation and identification of non-steroidal antirheumatic drugs containing a free carboxyl function using high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr., **345**:77-89.
- Becker, H. G. O.** 1993. Organikum. Organisch-chemisches Praktikum. 19. Auflage. Leipzig, Berlin, Heidelberg. J. A. Barth Verlag, Edition Deutscher Verlag der Wissenschaften., Seite 143-144.
- Borenstein, M. R., Y. Xue, S. Cooper und T. B. Tzeng.** 1996. Sensitive capillary gas chromatographic-mass spectrometric-selected-ion monitoring method for the determination of diclofenac concentrations in human plasma. J. Chromatogr., **685**:59-66.
- Brinkmann, U. A. Th., P. L. M. Welling, G. De Vries, A. H. M. T. Scholten und R. W. Frei.** 1981. Liquid chromatography of demoxepam and phenothiazines using a post-column photochemical reactor and fluorescence detection. J. Chromatogr., **217**:463-471.
- Brogden, R. N., R. C. Heel, G. E. Pakes, T. M. Speight und G. S. Avery.** 1980. Diclofenac sodium: A review of its pharmacological properties and therapeutic use in rheumatic diseases and pain of varying origin. Drugs, **20**:24-48.
- Brown, N. D., R. T. Lofberg und T. P. Gibson.** 1974. High-performance liquid chromatographic method for the determination of *p*-aminobenzoic acid and some of its metabolites. J. Chromatogr., **99**:635-641.
- Brown, N. D., und E. J. Michalski.** 1976. An improved high-performance liquid chromatographic method for quantifying *p*-aminobenzoic acid and some of its metabolites. J. Chromatogr., **121**:76-78.

Brune, K., und B. Hinz. 1998. Zum aktuellen Stand der Zyklooxygenase-Forschung. Dt. Ärztebl., **95**:295-297.

Budavari, S., M. J. O'Neil, A. Smith und P. E. Heckelman. 1989. The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Eleventh Edition. Merck+Co., Inc., Rahway, New Jersey, U.S.A.

von Büнау, G., und T. Wolff. 1987. Photochemie. Grundlagen, Methoden, Anwendungen. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Carpenter, H. M., und G. H. Mudge. 1980. Uptake and acetylation of *p*-aminohippurate by slices of mouse kidney cortex. J. Pharmacol. Exp. Ther., **213**:350-354.

Chan, K., J. O. Miners und D. J. Birkett. 1988. Direct and simultaneous high-performance liquid chromatographic assay for the determination of *p*-aminobenzoic acid and its conjugates in human urine. J. Chromatogr., **426**:103-109.

Couper, F. J., und O. H. Drummer. 1996. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of β_2 -agonists in postmortem blood: Application in forensic medicine. J. Chromatogr., **685**:265-272.

Davies, N. M., und K. E. Anderson. 1997. Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Clin. Pharmacokinet., **33**:184-213.

Decosterd, L. A., A. Karagiannis, J.-M. Roulet, N. Belaz, M. Appenzeller, T. Buclin, P. Vogel und J. Biollaz. 1997. High-performance liquid chromatography of the renal blood flow marker *p*-aminohippuric acid (PAH) and its metabolite N-acetyl PAH improves PAH clearance measurements. J. Chromatogr., **703**:25-36.

Degen, P. H. 1988. The assay of diclofenac and metabolites: A review. In: E. Reid, J. D. Robinson und I. Wilson (Hrsg.): Bioanalysis of drugs and metabolites. Plenum Publishing Corporation. Seite 107-114.

Delbeke, F. T., M. Debackere und N. Desmet. 1981. Detection of some local anesthetics in horse urine and plasma by gas-liquid chromatography. J. Chromatogr., **206**:594-599.

- Derendorf, H., und E. R. Garrett.** 1987. Pharmakokinetik. Einführung in die Theorie und Relevanz für die Arzneimitteltherapie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Dost, F. H.** 1953. Der Blutspiegel - Kinetik der Konzentrationsabläufe in der Kreislaufflüssigkeit. G. Thieme-Verlag, Stuttgart.
- Ellis, P. P., D. S. Pfoff, D. C. Bloedow und M. Riegel.** 1994. Intraocular diclofenac and flurbiprofen concentrations in human aqueous humor following topical application. *J. Ocul. Pharmacol.*, **10**:677-682.
- Engelhardt, H., und R. Klinkner.** 1984. Durchflußanalytische Phosphatbestimmung unter Verwendung geometrisch verformter offener Röhren. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **319**:277-281.
- Engelhardt, H., und B. Lillig.** 1985. Practical applications of open tubes in liquid chromatography. *J. High Resol. Chromatogr.*, **8**:531-534.
- Engelhardt, H., und U. D. Neue.** 1982. Reaction detector with three dimensional coiled open tubes in HPLC. *Chromatographia*, **15**:403-408.
- Evans, A. M., Z. Hussein und M. Rowland.** 1993. Influence of albumin on the distribution and elimination kinetics of diclofenac in the isolated perfused rat liver: Analysis by the impulse-response technique and the dispersion model. *J. Pharm. Sci.*, **82**:421-428.
- Forker, E. L., und B. Luxon.** 1978. Hepatic transport kinetics and plasma disappearance curves: Distributed modelling versus conventional approach. *Am. J. Physiol.*, **235**:648-660.
- Forth, W., D. Henschler, W. Rummel und K. Starke.** 1992. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 6. Auflage. BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich.
- Freestone, S., J. A. N. McAuslane, I. G. Mackay, J. Cowie, M. L. Watson und L. F. Prescott.** 1985. Comparison of total body clearance of inulin and *p*-aminohippuric acid during constant infusion. *Proceedings of the Br. J. Clin. Pharmacol.*, **21**:96-97.
- Gasco, M. R., M. Trotta und M. Eandi.** 1984. The influence of bile salts on the adsorption in vitro and in vivo of propranolol. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2**:425-439.

- Gillette, J. R.** 1971. Factors affecting drug metabolism. *Ann. N. Acad. Sci.*, **179**:43-66.
- Goa, K. L., und P. Chrisp.** 1992. Ocular diclofenac. A review of its pharmacology and clinical use in cataract surgery, and potential in other inflammatory ocular conditions. *Drugs-Aging*, **2**:473-486.
- Godbillon, J., S. Gauron und J. P. Metayer.** 1985. High-performance liquid chromatographic determination of diclofenac and its monohydroxylated metabolites in biological fluids. *J. Chromatogr.*, **338**:151-159.
- Gonzales, G., A. R. Dominguez und A. Guevara.** 1997. Pharmacokinetics and hepatotoxicity of diclofenac using an isolated perfused rat liver. *Biomed. Pharmacother.*, **51**:170-175.
- Gonzales, G., R. Ventura, A. K. Smith, R. de la Torre und J. Segura.** 1996. Detection of non-steroidal anti-inflammatory drugs in equine plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, **719**:251-264.
- Goresky, C. A.** 1963. A linear method for determining liver sinusoidal and extravascular volumes. *Am. J. Physiol.*, **204**:626-640.
- Gray, M. R., und Y. K. Tam.** 1987. The series-compartment model for hepatic elimination. *Drug Metab. Dispos.*, **15**:27-29.
- Greene, E. C.** 1955. *Anatomy of the rat.* Hafner Publishing Co., New York.
- Hanson, M., und K. K. Unger.** 1992. Polymer coatings as stationary phases in high-performance liquid chromatography. *Trends Anal. Chem.*, **11**:368-372.
- Herbort, C. P.** 1992. Messung der Entzündung nach Kataraktoperationen und Laserinterventionen mit dem Laser-Flare-Cell-Meter und deren Therapie mit dem nichtsteroidalen Entzündungshemmer Diclofenac-Natrium (Voltaren ophtha). *Augenärztl. Fortbild.*, **15**:203-213.
- Hessemer, V., K. Schmitt und A. Jacobi.** 1996. Entzündungshemmende Effekte und Kammerwasserkonzentrationen verschiedener nichtsteroidaler Antiphlogistika bei extrakapsulärer Kataraktchirurgie. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.*, **208**:161-166.

- Hildebrandt, R., B. Wagner, K. Preiss-Nowzohour und U. Gundert-Remy.** 1994. Fenoterol metabolism in man: Sulphation versus glucuronidation. *Xenobiotica*, **24**:71-77.
- Hildebrandt, R., H. Weitzel, K. Warnke und U. Gundert-Remy.** 1993. Pharmacokinetics of fenoterol in pregnant and nonpregnant women. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **45**:275-277.
- Hirai, T., S. Matsumoto und I. Kishi.** 1997. Simultaneous analysis of several non-steroidal anti-inflammatory drugs in human urine by high-performance liquid chromatography with normal solid-phase extraction. *J. Chromatogr.*, **692**:375-388.
- Hülsmann, W. C., und L. W. S. van Eps.** 1967. The metabolism of *p*-aminohippuric acid and *p*-acetylaminohippuric acid. *Clin. Chim. Acta*, **15**:233-239.
- Hussein, Z., A. M. Evans und M. Rowland.** 1993. Physiologic models of hepatic drug clearance: Influence of altered protein binding on the elimination of diclofenac in the isolated perfused rat liver. *J. Pharm. Sci.*, **82**:880-885.
- Iwaoka, W., und S. R. Tannenbaum.** 1976. Photohydrolytic detection of N-nitroso compounds in high-performance liquid chromatography. IARC Scientific Publication, **14**:51-56.
- Jacobson, G. A., und G. M. Peterson.** 1994. High-performance liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of ipratropium bromide, fenoterol, salbutamol and terbutaline in nebulizer solution. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **12**:825-832.
- James, A. T., und A. J. P. Martin.** 1952. Gas-liquid partition chromatography: The separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochem. J.*, **50**:679-690.
- Johansen, S., E. Rask-Pedersen und J. U. Prause.** 1996. A bioavailability comparison on rabbits after a single topical ocular application of prednisolone acetate formulated as a high-viscosity gel and as an aqueous suspension. *Acta Ophthalmol. Scand.*, **74**:253-258.
- Jones, D. B., D. J. Morgan, G. W. Mihaly, L. K. Webster und R. A. Smallwood.** 1984. Discrimination between the venous equilibrium and sinusoidal models of hepatic drug

elimination in the isolated perfused rat liver by perturbation of propranolol protein binding. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **229**:522-526.

Jühlke, N. 1981. Antizikulare DC-Direktauswertung von Oxybuprocain-HCl, Naphazolin nitrat und Actinoquinol-Natrium in Augentropfen. *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **121**:2881-2883.

Karlsson, K.-E., D. Wiesler, M. Alasandro und M. Novotny. 1985. 7-[(Chloro-carbonyl)methoxy]-4-methylcoumarin: A novel fluorescent reagent for the precolumn derivatization of hydroxy compounds in liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **57**:229-234.

Keiding, S., und P. B. Andreasen. 1979. Hepatic clearance measurements and pharmacokinetics. *Pharmacology*, **19**:105-110.

Klein, T., R. M. Nüsing, J. Pfeilschifter und V. Ullrich. 1994. Selective inhibition of cyclooxygenase 2. *Biochem. Pharmacol.*, **48**:1605-1610.

Klotz, U. 1984. *Klinische Pharmakokinetik*. 2. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

Koster, A. S., G. A. Hofman, A. C. Frankhuijzen-Sierevogel und J. Noordhoek. 1985. Presystemic and systemic intestinal metabolism of fenoterol in the conscious rat. *Drug Metab. Dispos.*, **13**:464-470.

Ku, E. C., W. Lee, H. V. Kothari, E. F. Kimble, L. Liauw und J. Tjan. 1985. The effects of diclofenac sodium on arachidonic acid metabolism. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, **15**:36-41.

Kuhlmann, O., und G.-J. Krauss. 1997. Crocheted ETFE-reactor for on-line post-column photoderivatization of diclofenac in high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **16**:553-559.

Kuhlmann, O., G. Stoldt, H.-G. Struck und G.-J. Krauss. 1998. Simultaneous determination of diclofenac and oxybuprocaine in human aqueous humor with HPLC and electrochemical detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **17**:1351-1356.

Kuhn, R., A. Winterstein und E. Lederer. 1931. Zur Kenntnis der Xanthophylle. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **197**:141-160.

- Landau, L. D., und E. M. Lifschitz.** 1963. Lehrbuch der Theoretischen Physik. Akademie-Verlag, Berlin.
- Lansdorp, D., T. J. Janssen, P. J. M. Guelen und T. B. Vree.** 1990. High-performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac and its hydroxy metabolites in human plasma and urine. *J. Chromatogr.*, **528**:487-494.
- Leferink, J. G., J. Dankers und R. A. A. Maes.** 1982. A time-saving method for the determination of the β_2 sympathomimetics terbutaline, salbutamol and fenoterol. Preliminary results. *J. Chromatogr.*, **229**:217-221.
- Lefevere, M. F., R. W. Frei, A. H. M. T. Scholten und U. A. Th. Brinkmann.** 1982. Photochemical reaction detection of phylloquinone and menaquinones. A comparison with chemical post-columns reduction for fluorescence detection. *Chromatographia*, **15**:459-467.
- Leibowitz, H. M., A. R. Berrospi, A. Kupferman, G. V. Restropo, V. Galvis und J. A. Alvarez.** 1977. Penetration of topically administered prednisolone acetate into the human aqueous humor. *Am. J. Ophthalmol.*, **83**:402-406.
- Lewis, A. J., und D. E. Furst.** 1987. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Mechanisms and clinical use. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel.
- Li, K., F.-L. Zhao, Y.-S. Yuan und L. Tan.** 1995. Determination of diclofenac sodium in human plasma by reversed-phase liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.*, **18**:2205-2216.
- Lüllmann, H., K. Mohr und A. Ziegler.** 1994. Taschenatlas der Pharmakologie. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Luxon, B. A., und E. L. Forker.** 1982. Simulation and analysis of hepatic indicator dilution curves. *Am. J. Physiol.*, **243**:76-89.
- Mahmood, I.** 1996. Pharmacokinetic analysis of the absorption characteristics of diclofenac sodium in man by use of a multi-segment absorption model. *J. Pharm. Pharmacol.*, **48**:1260-1263.

- Marsilio, R., R. Dall'Amico, G. Montini, L. Murer, M. Ros, G. Zacchello und F. Zacchello.** 1997. Rapid determination of *p*-aminohippuric acid in serum and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **704**:359-364.
- Martin, A. J. P., und R. L. M. Synge.** 1941. A new form of chromatogram employing two liquid phases. 1. A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. *Biochem. J.*, **35**:1358-1368.
- Mason, J. L., und G. J. Hobbs.** 1995. A rapid high performance liquid chromatographic assay for the measurement of diclofenac in human plasma. *J. Liq. Chromatogr.*, **18**:2045-2058.
- Matin, S. B., und B. Amos.** 1978. Quantitative determination of prednisone and prednisolone in human plasma using GLC and chemical ionization-mass spectrometry. *J. Pharm. Sci.*, **67**:923-926.
- McAuslane, J. A. N., S. Freestone, W. Barron und L. E. Prescott.** 1987. Disposition and kinetics of PAH following a single intravenous injection: Measurement of renal plasma flow. *Proceedings of the Br. J. clin. Pharmacol.*, **24**:277.
- McGhee, C. N. J., M. J. Noble, D. G. Watson, G. N. Dutton, A. I. Fern. T. M. Healey und J. M. Midgley.** 1989. Penetration of topically applied prednisolone sodium phosphate into human aqueous humour. *Eye*, **3**:463-467.
- Meister, J.** 1991. Bestimmung von Sprengstoffen mittels HPLC und photochemischem Reaktionsdetektor. Diplomarbeit. Universität des Saarlandes. Fachrichtung 12.6 Instrumentelle Analytik / Umweltanalytik.
- Mellick, G. D.** 1995. Studies on the disposition of solutes in the perfused rat liver and the influence of physicochemical properties. Ph.D.-Thesis, Department of Medicine, University of Queensland/Brisbane, Australien.
- Mellick, G. D.** 1997. Mündliche Mitteilung. Department of Medicine, University of Queensland/Brisbane, Australien.
- Meyer, U. A.** 1996. Overview of enzymes of drug metabolism. *J. Pharm. Biopharm.*, **24**:449-459.

- Mohamed, F. A., H. W. Jun, T. H. Elfaham, H. A. Sayed und E. Hafez.** 1994. An improved HPLC procedure for the quantitation of diclofenac in plasma. *J. Liq. Chromatogr.*, **17**:1065-1088.
- Moore, D. E., S. Roberts-Thomson, D. Zhen und C. C. Duke.** 1990. Photochemical studies on the anti-inflammatory drug diclofenac. *Photochem. Photobiol.*, **52**:685-690.
- Morton, N. S., S. W. Benham, R. A. Lawson und L. R. McNicol.** 1997. Diclofenac vs oxybuprocaine eyedrops for analgesia in paediatric strabismus surgery. *Paediatr. Anaesth.*, **7**:221-226.
- Motte, J. C., R. Windey und A. Delafortrie.** 1996. High-sensitivity fluorescence derivatization for the determination of hydroxy compounds in aqueous solution by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **728**:333-341.
- Musson, D. G., A. M. Bidgood und O. Olejnik.** 1991a. Assay methodology for prednisolone, prednisolone acetate and prednisolone sodium phosphate in rabbit aqueous humor and ocular physiological solutions. *J. Chromatogr.*, **565**:89-102.
- Musson, D. G., A. M. Bidgood und O. Olejnik.** 1991b. Comparative corneal penetration of prednisolone sodium phosphate and prednisolone acetate in NZW rabbits. *J. Ocul. Pharmacol.*, **7**:175-182.
- Mutschler, L.** 1996. Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 7. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Neubert, R. H. H., B. Fritsch und G. Dongowski.** 1993. Wechselwirkungen zwischen Nahrungsbestandteilen und Arzneistoffen. *Pharmazie*, **48**:723-728.
- Newman, E., A. Kattus, A. Genecin, J. Genest, E. Calkins und J. Murphy.** 1949. Observations on the clearance method of determining renal plasma flow with diodrast, para-aminohippuric acid (PAH) and para-acetyl-aminohippuric acid (PACA). *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **84**:135-168.
- OSRAM.** 1996. Firmenprospekt der OSRAM GmbH: Entkeimungs- und Ozonstrahler. Leipzig.

Öst, L., O. Falk, O. Lantto und I. Björkhem. 1982. Simultaneous determination of prednisolone and cortisol in serum by HPLC and by isotope dilution-mass spectrometry. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **42**:181-187.

Owen, S. G., M. S. Roberts und W. T. Friesen. 1987. Rapid high-performance liquid chromatographic assay for the simultaneous analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma. *J. Chromatogr.*, **416**:293-302.

Pang, K. S., und M. Rowland. 1977a. Hepatic clearance of drugs. I. Theoretical considerations of a "well-stirred" model and a "parallel tube" model. Influence of hepatic blood flow, plasma and blood cell binding, and the hepatocellular enzymatic activity on hepatic drug clearance. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **5**:625-653.

Pang, K. S., und M. Rowland. 1977b. Hepatic clearance of drugs. II. Experimental evidence for acceptance of the "well-stirred" model over the "parallel tube" model using lidocaine in the perfused rat liver in situ preparation. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **5**:655-680.

Pang, K. S., und M. Rowland. 1977c. Hepatic clearance of drugs. III. Additional experimental evidence supporting the "well-stirred" model, using metabolite (MEGX) generated from lidocaine under varying hepatic blood flow rates and linear conditions in the perfused rat liver in situ preparation. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **5**:681-699.

Perl, W., und F. P. Chinard. 1967. A convection-diffusion model of indicator transport through an organ. *Circul. Res.*, **22**:273-298.

Petrescu, I., und C. Tarba. 1997. Uncoupling effects of diclofenac and aspirin in the perfused liver and isolated hepatic mitochondria of rat. *Biochim. Biophys. Acta*, **1318**:385-394.

Poelma, F., J. Tukker und D. Crommelin. 1990. The role of bile salts in the intestinal absorption of drugs. *Acta Pharm. Technol.*, **36**:43-52.

Poulsen, J. R., K. S. Birks, M. S. Gandelman und J. W. Birks. 1986. Crocheted PTFE reactors for post-column photochemistry in HPLC. *Chromatographia*, **22**:231-234.

- Prasad, V. K., B. Ho und C. Haneke.** 1986. Simultaneous determination of prednisolone acetate, prednisolone, prednisone, cortisone and hydrocortisone in swine plasma using solid-phase and liquid-liquid extraction techniques. *J. Chromatogr.*, **378**:305-316.
- Prescott, L. F., S. Freestone und J. A. N. McAuslane.** 1993. The concentration-dependent disposition of intravenous *p*-aminohippurate in subjects with normal and impaired renal function. *Br. J. clin. Pharmacol.*, **35**:20-29.
- Purves, R. D.** 1992a. Optimum numerical integration methods for estimation of area-under-the-curve (AUC) and area-under-the-moment-curve (AUMC). *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **20**:211-226.
- Purves, R. D.** 1992b. Bias a variance of extrapolated tails for area-under-the-curve (AUC) and area-under-the-moment-curve (AUMC). *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **20**:501-510.
- Purves, R. D.** 1992c. Numerical estimation of the noncompartmental pharmacokinetic parameters variance and coefficient of variation of residence times. *J. Pharmaceutical. Sc.*, **83**:202-205.
- Quentin, C. D.** 1991. Diclofenackammerwasserkonzentrationsbestimmung bei Kataraktoperation. In: K. Schott (Hrsg.): 4. Kongreß der DGII 1990. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. Seite 98-101.
- Raz, I., Z. Hussein, E. Samara und J. Ben-David.** 1988. Comparative pharmacokinetic analysis of a novel sustained-release dosage form of diclofenac sodium in healthy subjects. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, **26**:246-248.
- Reddy, V. N.** 1985. Biochemie des Auges. Kapitel 3: Kammerwasser. In: O. Hockwin (Hrsg.): Bücherei des Augenarztes. Nr. 107. Enke-Verlag, Stuttgart. Seite 47-62.
- Regis/ICT.** 1991. Firmenprospekt der Firma ICT Handelsgesellschaft m.b.H. Frankfurt.
- Remane, A., V. Storch und U. Welsch.** 1989. Kurzes Lehrbuch der Zoologie. 6. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Ritchie, H. D., und J. D. Hardcastle.** 1973. Isolated organ perfusion. Crosby Lockwood Staples, London.

Roberts, C. W., und K. M. Brennan. 1994. A comparison of topical diclofenac sodium to prednisolone acetate for postcataract inflammation. In: L. D. Solomon (Hrsg.): Proceedings of the ophthalmic NSAID roundtable. Medicöpea International Inc., Seite 79-84.

Roberts, M. S., und M. Rowland. 1986a. A dispersion model of hepatic elimination 1. Formulation of the model and bolus considerations. *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, **14**:227-260.

Roberts, M. S., und M. Rowland. 1986b. A dispersion model of hepatic elimination 2. Steady-state considerations-influence of hepatic blood flow, binding within blood, and hepatocellular enzyme activity. *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, **14**:261-288.

Roberts, M. S., und M. Rowland. 1986c. A dispersion model of hepatic elimination 3. Application to metabolite formation and elimination kinetics. *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, **14**:289-308.

Roberts, M. S., und M. Rowland. 1986d. Correlation between in-vitro microsomal enzyme activity and whole organ hepatic elimination kinetics: Analysis with a dispersion model. *J. Pharm. Pharmacol.*, **38**:177-181.

Rocci, Jr., M. L., und W. J. Jusko. 1981. Analysis of prednisone, prednisolone and their 20 β -hydroxylated metabolites by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **224**:221-227.

Rominger, K. L., und H. J. Albert. 1985. Radioimmunological determination of fenoterol. *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)*, **35**:415-420.

Rominger, K. L., A. Mentrup und M. Stiasni. 1990. Radioimmunological determination of fenoterol. *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)*, **40**:887-895.

Rose, J. Q., und W. J. Jusko. 1979. Corticosteroid analysis in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **162**:273-280.

Rowland, M., L. Z. Benet und G. G. Graham. 1973. Clearance concepts in pharmacokinetics. *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, **1**:123-136.

Rowland, M., D. Leitch, G. Fleming und B. Smith. 1984. Protein binding and hepatic clearance: Discrimination between models of hepatic clearance with diazepam, a drug of high intrinsic clearance, in the isolated perfused rat liver preparation. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **12**:129-147.

Santos, S. R. C. J., H. Donzella, M. A. Bertoline, M. D. Pereira, C. E. Omosako und V. Porta. 1992. Simplified micromethod for the HPLC measurement of diclofenac in plasma. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **25**:125-128.

Schäfer, K. 1994. Zum Einfluß von Diclofenac 0,1 %- und Flurbiprofen 0,03 %- Augentropfen auf den Entzündungsverlauf nach der Kataraktextraktion. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Medizinische Fakultät.

Schneider, W., und P. H. Degen. 1981. Simultaneous determination of diclofenac sodium and its hydroxy metabolites by capillary column gas chromatography with electron-capture detection. *J. Chromatogr.*, **217**:263-271.

Schneider, W., und P. H. Degen. 1986. Simultaneous determination of diclofenac sodium and its metabolites in plasma by capillary column gas chromatography with electron-capture detection. *J. Chromatogr.*, **383**:412-418.

Scholer, D. W., E. C. Ku, I. Boettcher und A. Schweizer. 1986. Pharmacology of diclofenac sodium. *Am. J. Med.*, **80**:34-38.

Scholten, A. H. M. T., U. A. Th. Brinkmann und R. W. Frei. 1981. Solvent segmentation in liquid chromatography - Application to photochemical reaction detectors. *J. Chromatogr.*, **205**:229-237.

Scholten, A. H. M. T., P. L. M. Welling, U. A. Th. Brinkmann und R. W. Frei. 1980. Use of PTFE coils in post-column photochemical reactors for liquid chromatography - Application to pharmaceuticals. *J. Chromatogr.*, **199**:239-248.

Schwarz, M. A., R. H. H. Neubert und G. Dongowski. 1996a. Characterization of interactions between bile salts and drugs by micellar electrokinetic capillary chromatography. Part I. *Pharm. Res.*, **13**:1174-1182.

Schwarz, M. A., R. H. H. Neubert und H. H. Rüttinger. 1996b. Application of capillary electrophoresis for characterizing interactions between drugs and bile salts. Part I. J. Chromatogr., **745**:135-143.

Schwarz, M. A., K. Raith, H. H. Rüttinger, G. Dongowski und R. H. H. Neubert. 1997. Investigations of the interactions between drugs and mixed bile salt/lecithin micelles. A characterization by micellar affinity capillary electrophoresis (MACE). Part III. J. Chromatogr., **781**:377-389.

Sicherheitsdatenblätter. 1996. Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Deisenhofen.

Sioufi, A., J. R. P. Mangoni und J. Godbillon. 1991. Determination of diclofenac in plasma using a fully automated analytical system combining liquid-solid extraction with liquid chromatography. J. Chromatogr., **565**:401-407.

Sousa, F. J. 1991. The bioavailability and therapeutic effectiveness of prednisolone acetate vs. prednisolone sodium phosphate: A 20-year review. CLAO J., **17**:282-284.

Stedtler, C. 1998. Mündliche Mitteilung. Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Sektion Pharmakokinetik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Steele, L., I. M. Hunneyball und P. Bressloff. 1981. Comparison of rheumatoid synovial microsomes and bovineseminal vesicle microsomes for determining the relative potencies of prostaglandin synthetase inhibitors. J. Pharmacol. Methods, **5**:341-345.

Stolk, L. M. L., L. S. Chandi-Bakridi, J. C. Filedt Kok, M. G. Koopman, F. M. J. Zuyderhoudt und L. Arisz. 1985. Formulation of a stable *p*-acetylaminohippurate infusion fluid and determination of the serum concentrations. Pharm. Weekbl. [Sci], **7**:146-149.

Strobel, J. 1991. Kammerwasserkonzentrationen nichtsteroidaler Antiphlogistika. Ophthalmologica, **202**:38-42.

Strobel, J., W. Seitz und K. Tietze. 1991. Quantitative Untersuchungen von Protein- und Zellkonzentration in der Vorderkammer bei Kataraktchirurgie unter der Therapie von steroidalen und nichtsteroidalen Antiphlogistika. Ophthalmologica, **202**:86-93.

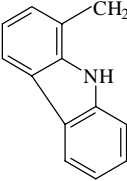
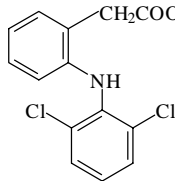
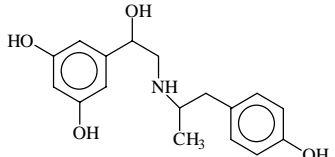
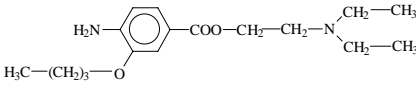
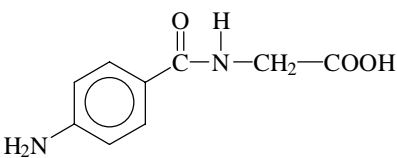
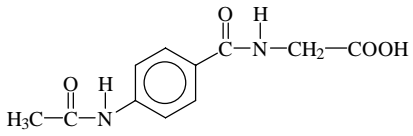
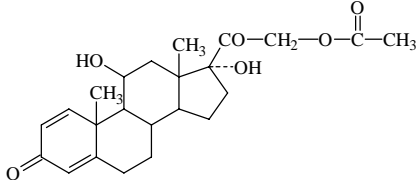
- Struck, H. G., K. Schäfer, C. Foja, C. Giessler und C. Lautenschläger.** 1994. Zum Einfluß von Diclofenac und Flurbiprofen auf den Entzündungsverlauf nach der Kataraktextraktion. *Ophthalmologe*, **91**:482-485.
- Struck, H. G., und G. Stoldt.** 1998. Klinische und pharmakokinetische Untersuchungen zur perioperativen antiphlogistischen Wirksamkeit von Prednisolon-Gel bei der Kataraktextraktion. In: C. Ohrloff (Hrsg.): 11. Kongreß der DGII 1997, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. Seite 401-407.
- Struck, H. G., G. Stoldt, O. Kuhlmann und M. Weiss.** 1998. Zum Verlauf der Diclofenac-Konzentration im Kammerwasser nach präoperativer Gabe bei der Kataraktextraktion. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.*, **212**:5.
- Song, D.-J., und K.-Y. Hsu.** 1996. Determination of *p*-aminobenzoic acid and its metabolites in rabbit plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.*, **677**:69-75.
- Tabata, K., K. Yamaoka, T. Fukuyama und T. Nakagawa.** 1996a. Local absorption kinetics into the portal system using the portal-venous concentration difference after an oral dose of diclofenac in the awakening rat. Accelerative effect of bile on intestinal absorption of diclofenac. *Drug Metab. Dispos.*, **24**:216-220.
- Tabata, K., K. Yamaoka, H. Yasui, T. Fukuyama und T. Nakagawa.** 1996b. Influence of pentobarbitone on in-vivo local disposition of diclofenac in rat liver. *J. Pharm. Pharmacol.*, **48**:866-869.
- Torres-Lopez, J. E., F. J. Lopez-Munoz, G. Castaneda-Hernandez, F. J. Flores-Murietta und V. Granados-Soto.** 1997a. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of the antinociceptive effect of diclofenac in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**:685-690.
- Torres-Lopez, J. E., M. B. Robles, J. Perez-Urizar, F. J. Flores-Murietta und V. Granados-Soto.** 1997b. Determination of diclofenac in micro-whole blood samples by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Application in a pharmacokinetic study. *Arzneimittelforschung*, **47**:1040-1043.
- Tswett, M.** 1906. Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **24**:316-323.

- Unger, K. K. (Hrsg).** 1989. Handbuch der HPLC. Teil 1: Leitfaden für Anfänger und Praktiker. GIT Verlag GmbH, Darmstadt.
- Warnke, K., R. Hildebrandt, K. Günther, U. Langen und U. Gundert-Remy.** 1992. The pharmacokinetics of the β_2 -adrenoceptor agonist fenoterol in healthy women. Eur. J. Clin. Pharmacol., **43**:663-665.
- Waynforth, W. B., und P. A. Flecknell.** 1992. Experimental and surgical technique in the rat. 2. Auflage. Academic Press, London.
- Weisiger, R. A., C. M. Mendel und R. R. Cavalieri.** 1986. The hepatic sinusoid is not well-stirred: Estimation of the degree of axial mixing by analysis of lobular concentration gradients formed during uptake of thyroxine by the perfused rat liver. J. Pharm. Sci., **75**:233-237.
- Weiss, M.** 1990. Theoretische Pharmakokinetik. Modellierung, Datenanalyse, Dosierungsoptimierung. Verlag Gesundheit GmbH, Berlin.
- Weiss, M.** 1997. A note on the interpretation of tracer dispersion in the liver. J. theor. Biol., **184**:1-6.
- Weiss, M., O. Kuhlmann, G.-J. Krauss und M. S. Roberts.** 1998. Hepatocellular distribution and elimination kinetics of diclofenac in the isolated perfused rat liver. Arch. Pharmacol., **357**:R6.
- Weiss, M., und M. S. Roberts.** 1996. Tissue distribution kinetics as determinant of transit time dispersion of drugs in organs: Application of a stochastic model to the rat hindlimb. J. Pharmacokin. Biopharm., **24**:173-196.
- Wellhöner, H.-H.** 1997. Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie. 6. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Wiese, B., und J. Hermansson.** 1991. Bioanalysis of diclofenac as its fluorescent carbazole acetic acid derivative by a post-column photoderivatization high-performance liquid chromatographic method. J. Chromatogr., **567**:175-183.
- Williams, R. T.** 1959. Detoxication mechanisms. 2te Auflage. John Wiley and Sons, New York, Seite 734.

- Winkler, K., S. Keiding und N. Tygstrup.** 1973. Clearance as a quantitative measure of liver function. In: P. Paumgartner und R. Presig (Hrsg.): The liver: Quantitative aspects of structure and function. Basel, Karger. Seite 144-145.
- Wintermeyer, U.** 1989. Die Wurzeln der Chromatographie. Historischer Abriß von den Anfängen bis zur Dünnschicht-Chromatographie. GIT Verlag GmbH, Darmstadt.
- Wintersteiger, R.** 1982. Anthracene isocyanate as a new fluorescent label for compounds with an alcoholic group. *J. Liq. Chromatogr.*, **5**:897-916.
- Wintersteiger, R.** 1988. Fluoreszenz-Derivatisierung in DC und HPLC. *GIT Supplement Chromatographie*, **3/88**:5-10.
- Witzemann, A., und K. W. Jacobi.** 1985. Wirkung und Resorption von topischem Indomethacin am Auge. In: A. Bronner und F. Hollwich (Hrsg.): Prostaglandin-Synthesehemmung am Auge. Zuckschwerdt, München, Bern, Wien. Seite 54-59.
- Wolf, R.** 1997. Mündliche Mitteilung. Fachbereich Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Wolkoff, A. W., K. L. Johansen und T. Goeser.** 1987. The isolated perfused rat liver: Preparation and application. *Anal. Biochem.*, **167**:1-14.
- Yamaguchi, M., T. Yoshitake, J. Ishida und M. Nakamura.** 1989. Determination of 21-Hydroxycorticosteroids in human urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**:3022-3025.
- Yano, Y., K. Yamaoka, T. Minamide, T. Nakagawa und H. Tanaka.** 1990. Evaluation of protein binding effect on local disposition of oxacillin in rat liver by two-compartment dispersion model. *J. Pharm. Pharmacol.*, **42**:632-636.
- Zecca, L., P. Ferrario und P. Costi.** 1991. Determination of diclofenac and its metabolites in plasma and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr.*, **567**:425-432.
- Zmeili, S., M. Hasan, N. Najib, E. Sallam, S. Deleq und M. Shubair.** 1996. Bioavailability and pharmacokinetic properties of 2 sustained-release formulations of

diclofenac sodium, Voltaren vs inflaban: Effect of food on inflaban bioavailability. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **34**:564-570.

Tab. I: Übersicht über die verwendeten Wirkstoffe.

Substanz	Excitation/ Absorption [nm]	Emission [nm]	M _r	LD ₅₀ [mg/Kg]	Strukturformel
Carbazol-1-essigsäure	285	360	239,3	nicht bekannt	
Diclofenac-natrium	272	-	318,1	Maus*: 390 oral	
Fenoterol	274	304	384,3	Maus*: 1100 s.c. 1990 oral	
Oxybuprocain	228 bzw. 308	352	344,9	Maus#: 42,5 s.c. 6,8 i.v.	
<i>p</i> -Amino-hippursäure (PAH)	276	346	194,2	Maus#: 4930 i.v.	
<i>p</i> -Acetylaminohippursäure (PAAHA)	263	330	236,2	nicht bekannt	
Prednisolon-21-acetat	240	-	402,5	Maus#: 3500 s.c.	

* Budavari et al., 1989

Sicherheitsdatenblätter, 1996

Tab. II: Diclofenac-Kammerwasserkonzentrationen und die dazugehörigen Einwirkzeiten für 50 Patienten nach Applikation von Diclofenac-Augentropfen (0,1 % Voltaren[®], einmalig 2 Tropfen).

Zeit nach Applikation [min]	Berechnete Diclofenac- Konzentration [ng/mL]
32	0
36	0
68	17,3
76	16,2
82	22,9
85	22,0
87	13,0
95	5,7
103	11,6
105	13,0
119	71,0
124	24,4
130	37,0
136	23,2
137	62,0
138	136,0
138	50,0
185	66,4
190	15,0
196	9,2
207	40,3
212	99,0
226	46,2
240	48,4
249	26,5
282	41,0
290	66,0
297	23,2
332	36,4
340	117,9
355	22,0
358	61,9
361	20,0
367	79,4
368	37,5
388	28,0
393	31,0
430	4,1
435	18,6
435	6,0
515	13,0
521	8,4
535	12,0
543	15,1
835	13,0
855	10,0
875	0
918	5,0
975	19,0
995	11,0

Tab. III: Übersicht über die Versuche mit der in-situ perfundierten Rattenleber.

Ratten-Nr.	Geschlecht	Gewicht [g]	Injektionsabfolge (jeweils 50 µL)	Eingesetzte Konzentration
1	männlich	285	1. Evans Blue/ ¹⁴ C-Saccharose/ ³ H ₂ O 2. PAH 3. Fenoterol 4. Diclofenac 5. ¹⁴ C-Diclofenac	1. 1,0 mg/mL/ 2 µCi/3 µCi 2. 4,0 mg/mL 3. 3,9 mg/mL 4. 4,3 mg/mL 5. 1 µCi
2	männlich	315	1. Evans Blue/ ¹⁴ C-Saccharose/ ³ H ₂ O 2. PAH 3. Fenoterol 4. Diclofenac 5. ¹⁴ C-Diclofenac	1. 1,0 mg/mL/ 2 µCi/3 µCi 2. 4,0 mg/mL 3. 3,9 mg/mL 4. 4,3 mg/mL 5. 1 µCi
3	weiblich	230	1. Evans Blue/ ¹⁴ C-Saccharose/ ³ H ₂ O 2. PAH 3. Fenoterol 4. Diclofenac 5. ¹⁴ C-Diclofenac	1. 1,0 mg/mL/ 2 µCi/3 µCi 2. 4,0 mg/mL 3. 3,9 mg/mL 4. 4,3 mg/mL 5. 1 µCi
4	männlich	325	1. PAH 2. PAH 3. PAH 4. PAH 5. PAAHA	1. 0,0056 mg/mL 2. 0,0112 mg/mL 3. 0,056 mg/mL 4. 0,112 mg/mL 5. 0,060 mg/mL
5	männlich	330	1. Evans Blue/ ¹⁴ C-Saccharose/ ³ H ₂ O 2. PAH 3. PAH 4. PAH 5. PAH 6. PAH 7. PAH 8. PAAHA	1. 1,0 mg/mL/ 2 µCi/3 µCi 2. 8,03 mg/mL 3. 8,03 mg/mL 4. 8,03 mg/mL 5. 8,03 mg/mL 6. 8,03 mg/ml 7. 8,03 mg/mL 8. 4,1 mg/mL
6	männlich	455	1. Evans Blue/ ¹⁴ C-Saccharose/ ³ H ₂ O 2. PAH 3. PAH 4. PAAHA 5. PAAHA 6. Evans Blue/ ¹⁴ C-Saccharose/ ³ H ₂ O	1. 1,0 mg/mL/ 2 µCi/3 µCi 2. 8,08 mg/mL 3. 8,08 mg/mL 4. 2,0 mg/mL 5. 2,0 mg/mL 6. 2,0 mg/mL/ 2 µCi/3 µCi
7	männlich	405	1. Evans Blue/ ¹⁴ C-Saccharose/ ³ H ₂ O 2. PAH 3. PAH 4. PAH 5. PAAHA 6. PAAHA 7. PAH + Probenecid 8. PAH + Probenecid	1. 1,0 mg/mL/ 2 µCi/3 µCi 2. 4,0 mg/mL 3. 8,0 mg/mL 4. 12,0 mg/mL 5. 2,0 mg/mL 6. 6,0 mg/mL 7. 8,0 mg/mL in 17,4 mM Probenecid 8. 8,0 mg/mL in 17,4 mM Probenecid
8	männlich	380	1. Evans Blue/ ¹⁴ C-Saccharose/ ³ H ₂ O 2. PAH 3. PAH	1. 2,0 mg/mL/ 2 µCi/3 µCi 2. 4,0 mg/mL 3. 8,0 mg/mL

			4. PAH 5. PAAHA 6. PAAHA 7. PAH + Probenecid 8. PAH + Probenecid	4. 12,0 mg/mL 5. 1,99 mg/mL 6. 5,98 mg/mL 7. 8,0 mg/mL in 20 mM Probenecid 8. 8,0 mg/mL in 20 mM Probenecid
9	männlich	350	1. Evans Blue/ ¹⁴ C-Saccharose/ ³ H ₂ O 2. PAH 3. PAH 4. Fenoterol 5. Fenoterol 6. Fenoterol und Diclofenac 7. Fenoterol und Diclofenac 8. Diclofenac	1. 5,0 mg/mL/ 2 μCi/3 μCi 2. 8,06 mg/mL 3. 12,05 mg/mL 4. 16,12 mg/mL 5. 8,06 mg/mL 6. 8,06 mg/mL und 10,5 mg/mL 7. 8,06 mg/mL und 10,5 mg/mL 8. 10,5 mg/mL
10	männlich	385	1. Evans Blue/ ¹⁴ C-Saccharose/ ³ H ₂ O 2. PAH 3. PAH 4. Fenoterol 5. Fenoterol 6. Fenoterol und Diclofenac 7. Fenoterol und Diclofenac 8. Diclofenac	1. 5,0 mg/mL/ 2 μCi/3 μCi 2. 8,09 mg/mL 3. 16,06 mg/mL 4. 8,02 mg/mL 5. 16,08 mg/mL 6. 8,04 mg/mL und 10,5 mg/mL 7. 8,04 mg/mL und 10,5 mg/mL 8. 10,5 mg/mL
11	männlich	400	1. Evans Blue/ ¹⁴ C-Saccharose/ ³ H ₂ O 2. Fenoterol 3. Fenoterol 4. Fenoterol 5. Fenoterol und Diclofenac 6. Fenoterol und Diclofenac 7. Diclofenac 8. Diclofenac	1. 5,0 mg/mL/ 2 μCi/3 μCi 2. 5,0 mg/mL 3. 10,0 mg/mL 4. 15,0 mg/mL 5. 7,5 mg/mL und 10,5 mg/mL 6. 7,5 mg/mL und 10,5 mg/mL 7. 10,5 mg/mL 8. 6,0 mg/mL
12	männlich	480	1. Evans Blue/ ¹⁴ C-Saccharose/ ³ H ₂ O 2. Fenoterol 3. Fenoterol 4. PAH 5. PAAHA 6. PAAHA 7. ¹⁴ C-Diclofenac 8. ¹⁴ C-Diclofenac	1. 5,0 mg/mL/ 2 μCi/3 μCi 2. 11,05 mg/mL 3. 22,1 mg/mL 4. 16,3 mg/mL 5. 4,75 mg/mL 6. 9,5 mg/mL 7. 1 μCi 8. 1 μCi

Tab. IV: Injektionsschema für die Anästhesie von Ratten (Ketamin: 80 mg/kg und Xylazin: 10 mg/kg Körpergewicht).

Gewicht der Ratte [g]	Ketamin [mL]	Xylazin [mL]	Gesamt [mL]
180	0,144	0,090	0,234
190	0,152	0,095	0,247
200	0,160	0,100	0,260
210	0,168	0,105	0,273
220	0,176	0,110	0,286
230	0,184	0,115	0,299
240	0,192	0,120	0,312
250	0,200	0,125	0,325
260	0,208	0,130	0,338
270	0,216	0,135	0,351
280	0,224	0,140	0,364
290	0,232	0,145	0,377
300	0,240	0,150	0,390
310	0,248	0,155	0,403
320	0,256	0,160	0,416
330	0,264	0,165	0,429
340	0,272	0,170	0,442
350	0,280	0,175	0,455
360	0,288	0,180	0,468
370	0,296	0,185	0,481
380	0,304	0,190	0,494
390	0,312	0,195	0,507
400	0,320	0,200	0,520
410	0,328	0,205	0,533
420	0,336	0,210	0,546
430	0,344	0,215	0,559
440	0,352	0,220	0,572
450	0,360	0,225	0,585
460	0,368	0,230	0,598
470	0,376	0,235	0,611
480	0,384	0,240	0,624
490	0,392	0,245	0,637
500	0,400	0,250	0,650
510	0,408	0,255	0,663
520	0,416	0,260	0,676
530	0,424	0,265	0,689
540	0,432	0,270	0,702
550	0,440	0,275	0,715

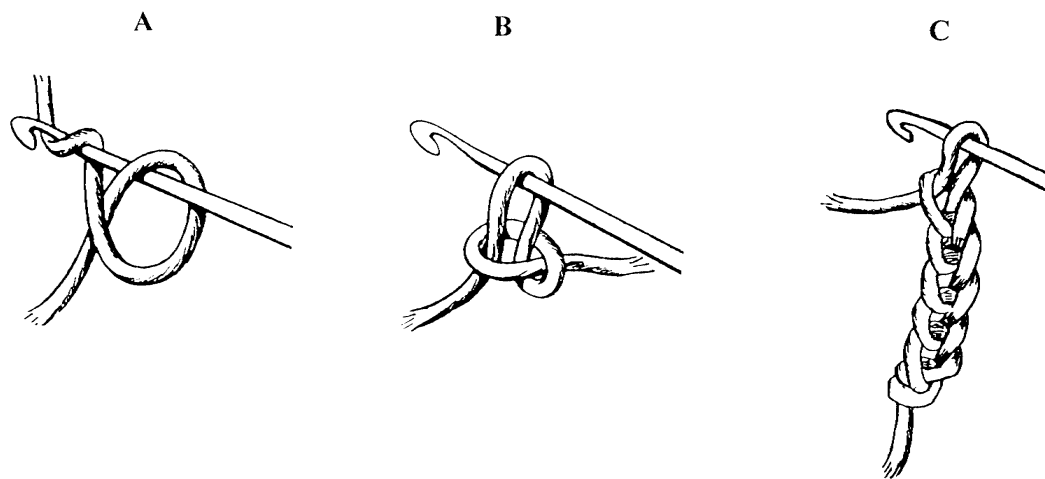


Abb. I: Anleitung zum Häkeln sogenannter „Luftmaschen“ als Reaktionskapillare für den photochemischen Reaktor. Zuerst einen losen Knoten ca. 15 cm vom Ende entfernt bilden (**A**), dann mit der Häkelnadel die Kapillare durch die entstandene Schlaufe ziehen (**B**) und diesen Vorgang solange wiederholen (**C**) bis ca. 15 cm verbleiben.

Verwendete Software

1. Der Text der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Programm **Word 6.0c** (Microsoft Corporation, Houghton, U.S.A.) geschrieben.
2. Die ersten Bearbeitungen (Berechnungen) der Daten erfolgten mit **Excel 5.0c** (Microsoft Corporation, Houghton, U.S.A.).
3. Für die Darstellung der Daten (incl. HPLC-Chromatogramme) wurde **Origin 4.1** (Microcal Software, Inc., Northampton, U.S.A.) verwendet.
4. Die Strukturformeln wurden mit dem Programm **ChemWindow 3.0.2** (Cherwell Scientific Publishing, Oxford, England) gezeichnet.
5. Die Abbildungen 3-6, 8-10, 53 und 57 wurden unter Verwendung des Programmes **Harvard Graphics 2.0** (Software Publishing Corporation, Mountain View, U.S.A.) erstellt.
6. **Powerpoint 4.0c** (Microsoft Corporation, Houghton, U.S.A.) wurde für die Erstellung von Diapositiven genutzt.
7. Die Modellberechnungen und statistischen Auswertungen erfolgten mit **SCIENTIST 2.01** (MicroMath Scientific Software, Salt Lake City, U.S.A.).
8. Die verwendete HPLC-Software für die Arbeit in Deutschland war das Programm **PC1000 Version 3.0** (Thermo Separation Products, Darmstadt-Kranichstein) und für den Aufenthalt an der University of Queensland/Brisbane (Australien) das Programm **Delta Chromatography Data System 5.0** (Digital Solutions Pty. Ltd., Margate, Australien).
9. Die Systemoberfläche war **OS/2 Warp** (IBM, Dortmund), bzw. **Windows 95** (Microsoft Corporation, Houghton, U.S.A.) bei Verwendung des Programmes **SCIENTIST 2.01**.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G.-J. Krauß für die Überlassung des interessanten Themas, für zahlreiche Anregungen und für seine vielfältige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. M. Weiss danke ich für das mir entgegengebrachte Vertrauen, viele wertvolle Ratschläge, kritische Diskussionen und für seine Fürsprache, die mir einen Forschungsaufenthalt an der University of Queensland Brisbane/Australien ermöglichte.

Herrn Prof. Dr. M. Roberts möchte ich danken für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe in Brisbane/Australien und für seine finanzielle Unterstützung. Prof. Dr. M. Roberts, Frau Dr. M. Thompson, die mich sehr gut während meines Aufenthaltes in Brisbane betreute, und allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe ist es zu verdanken, daß mir dieser Aufenthalt in so guter Erinnerung bleiben wird.

Prof. Dr. H. Engelhardt ermöglichte mir einen Forschungsaufenthalt in seiner Arbeitsgruppe an der Universität des Saarlandes, wo mich Dr. S. Adam tatkräftig unterstützte.

Frau Dr. S. Friebe und Frau I. Thielemann halfen mir bei der Einarbeitung in die Gebiete der HPLC und HPCE. Frau Dr. A. Schierhorn nahm die Massenspektren für die *p*-Acetylaminohippursäure (PAAHA) auf. Frau Dipl.-Math. C. Stedtler half mir bei der Einarbeitung in die SCIENTIST-Software und bei der Auswertung der Ergebnisse. Ihnen allen sei an dieser Stelle dafür gedankt.

Bei Ina, Kristin, Maik, Sabine und Torsten bedanke ich mich für die Durchsicht von Teilen dieser Arbeit. Alle Mitarbeiter der Abteilung Ökologische und Pflanzenbiochemie trugen für das stets anregende und angenehme Laborklima bei.

Desweiteren möchte ich mich noch bei meinen Eltern bedanken und ganz besonders bei Frau Dipl.-Biol. Ulrike Kohlweyer, die meine Arbeit unterstützend begleitete.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs „Transport von Wirkstoffen in biologischen Systemen“, das von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) finanziert wurde, angefertigt.

Lebenslauf

- Name: Kuhlmann, Olaf
- Geburtsdatum: 15. Dezember 1965
- Geburtsort: Langenhagen, Niedersachsen, Deutschland
- Anschrift: Schönitzstraße 2, 06110 Halle
- Familienstand: Ledig
- Schulbildung: 1972-1985: Abschluß: Abitur
- Militärdienst: 1985-1989: Fernmeldeoffizier in Oldenburg, München und Hannover.
- Studium: 1989-1995: Studium der Biologie mit Hauptfach Mikrobiologie an der Universität Hannover.
- 1991: Vordiplom
 - 1994: Mündliche Diplomprüfung
 - 1995: Schriftliche Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie. Titel:
„Einfluß von Manganionen auf die Bildung von Lignin- und Manganperoxidase in *Phanerochaete chrysosporium*“
(Betreuer: Prof. Dr. H. Diekmann).
- Promotion: -1995: Beginn der Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg als Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft und im Rahmen des Graduiertenkollegs „Transport von Wirkstoffen in biologischen Systemen“ (Betreuer: Prof. Dr. G.-J. Krauß, Fachbereich Biochemie /Biotechnologie, Abteilung Ökologische und Pflanzenbiochemie und Prof. Dr. M. Weiss, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Sektion Pharmakokinetik).
- 1996: Juli: Forschungsaufenthalt an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken in der Abteilung für Analytische Chemie (Prof. Dr. H. Engelhardt).
 - 1997: März bis Juni: Forschungsaufenthalt an der University of Queensland, Brisbane/Australien, im Fachbereich Medizin (Prof. Dr. M. Roberts).
 - 1998: Juni: Abgabe der Dissertationsschrift.

Halle, im Juni 1998

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt, die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben und die den benutzten Werken entnommene Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Halle, im Juni 1998