

**Der Einfluß von nahrungsbedingten Faktoren auf das Resorptionsverhalten von
Chinin am Beispiel von Pektinderivaten und Gallensalzmizellen**

Dissertation



zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

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

von Herrn

Diplom-Pharmazeut Bertram Fritzsch

geb. am 25. 09. 1966 in Annaberg-Buchholz

Gutachter:

1. Prof. Dr. habil. Reinhard Neubert, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. habil. Andreas Langner, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
3. Prof. Dr. habil. Wolfgang Süß, Universität Leipzig

Halle/Saale, den 21. September 2000

Bibliographische Beschreibung

Fritsch, Bertram:

Der Einfluß von nahrungsbedingten Faktoren auf das Resorptionsverhalten von Chinin am Beispiel von Pektinderivaten und Gallensalzmizellen

94 S., 29Abb., 13 Tab., 343 Lit.

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Pharmazie, Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Dissertation, 2000

Kurzreferat

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien dienen der besseren Charakterisierung von pharmakokinetischen Interaktionen zwischen nahrungsbedingten Komponenten und Arzneistoffen. Zu diesem Zweck wurde das veränderte Resorptionsverhalten des lipophilen Modellarzneistoffs Chinin in Gegenwart von Pektinderivaten in verschiedenen Varianten, von Glycocholsäure- und Glycodesoxycholsäuremizellen und von binären und ternären mischmizellaren Systemen der Glycodesoxycholsäure mit Palmitinsäure und/oder Eilecithin untersucht. Dabei wurden verschiedene *in vitro*-Transportmodelle (Permeationsmodell nach FÜRST und NEUBERT, *everted sac*-Technik, Diffusionskammersystem SnapwellTM) eingesetzt. Abschließend erfolgten pharmakokinetische Untersuchungen an einem Kaninchenmodell (intraduodenale Einmalapplikation). Die dabei beobachteten Effekte auf das veränderte Transportverhalten des ausgewählten Wirkstoffes werden im Zusammenhang mit Auswirkungen auf die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen durch nahrungsabhängige Faktoren diskutiert.

Deskriptoren

Chinin - *everted sac*-Technik - Glycodesoxycholsäure - *in vitro* / *in vivo* - mizellare Systeme - Pektin - Permeationsmodell nach FÜRST / NEUBERT - Pharmakokinetik - Resorption - Zellkultur

Die vorliegende Arbeit wurde für das Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg angefertigt.

Zuallererst möchte ich meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. habil. Reinhard Neubert, für die Überlassung des interessanten Themas, sein ständiges Interesse am Zustandekommen der Arbeit und die jederzeit gewährte Unterstützung sowie für die von Vertrauen geprägte Zusammenarbeit danken.

Mein besonderer Dank für die zahlreichen wertvollen Hinweise und Diskussionen bei der Anfertigung dieser Arbeit gilt Herrn Dr. Gerhard Dongowski vom Deutschen Institut für Ernährungsforschung in Potsdam-Rehbrücke, mein Dank gilt auch Herrn Dr. Lutz Heinevetter für seine Unterstützung bei der Durchführung der Zellkulturversuche am Rehbrücker Institut.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Jochen Giessler vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereiches Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für seine Hilfestellung bei den Versuchen mit der *everted sac*-Technik danken.

Für die Untersuchungen zur Pharmakokinetik gilt mein Dank Herrn Dr. Albert Härtl und Frau Ursula Stöckel vom Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung in Jena sowie Herrn Prof. Dr. Michael Weiss und Herrn Dr. Olaf Kuhlmann vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität.

Stellvertretend für die Mitarbeiter des Instituts für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich Frau Adelheid Anders und Frau Sigrid Todte für die sehr gute Zusammenarbeit bei der HPLC-Analytik.

Weiterhin möchte ich allen Dank sagen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	
1. Einleitung und Aufgabenstellung	1
2. Theoretischer Teil	3
2.1. Physiologische Grundlagen	3
2.2. Pektin	5
2.2.1. Der Einfluß von Pektinderivaten als löslicher Ballaststoff	5
2.2.2. Charakterisierung der ausgewählten Pektinderivate	6
2.3. Gallensäuren	9
2.3.1. Der Einfluß von Gallensäuren	9
2.3.2. Charakterisierung der ausgewählten Gallensäuren	11
2.3.3. Charakterisierung der ausgewählten Mischmizellen	14
2.3.3.1. Allgemeines	14
2.3.3.2. Fettsäuren	15
2.3.3.3. Phospholipide	16
2.4. Charakterisierung des verwendeten Arzneistoffes Chinin	18
3. In vitro- Versuche	21
3.1. Permeationsversuche mit künstlicher Membran	21
3.1.1. Grundlagen	21
3.1.2. Versuchsdurchführung mit dem Permeationsmodell nach FÜRST und NEUBERT	22
3.1.3. Permeationsversuche Chinin-HCl 2.2 mM mit Pektinderivaten	28
3.1.4. Permeationsversuche Chinin-HCl 2.2 mM mit Gallensäuren und Mischmizellen	29
3.1.5. Permeationsversuche Chinin-HCl 1.1 mM mit	34

	Pektinderivaten	
3. 1. 6.	Permeationsversuche Chinin-HCl 1.1 mM mit Gallensäuren und Mischmizellen	36
3. 2.	Permeationsversuche mit der <i>everted sac</i> -Technik	40
3. 2. 1.	Grundlagen und Versuchsdurchführung	40
3. 2. 2.	Ergebnisse und Diskussion	45
3. 3.	Permeationsversuche mit dem Diffusionskammersystem Snapwell TM unter Verwendung des Zellkultursystems Caco-2	48
3. 3. 1.	Grundlagen und Versuchsdurchführung	48
3. 3. 2.	Ergebnisse und Diskussion	51
4.	Pharmakokinetik - Versuche	53
4. 1.	Grundlagen	53
4. 2.	Versuchsdurchführung	55
4. 3.	Ergebnisse und Diskussion	56
5.	Zusammenfassung und Schlußbetrachtungen	64
6.	Anhang	72
6. 1.	Methoden	72
6. 2.	Chemikalienliste	80
6. 3.	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	81
7.	Literaturverzeichnis	84

Abkürzungsverzeichnis

AG	- Anhydrogalakturonsäure
A-0 - A-100	- Apfelpektin (s. S. 8)
Ac-1 - Ac-4	- Acetylpektinderivate (s. S. 7)
AK	- Akzeptorkompartiment
Am-1 - Am-3	- Amidpektinderivate (s. S. 7)
AUC _{0-360min}	- Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve vom Zeitpunkt 0 bis 360 Minuten
B1-1 - B1-4	- Pektin mit blockweiser Anordnung freier Carboxylgruppen (s. S. 7)
c _{AK}	- Konzentration des Arzneistoffes im Akzeptor
c _{kor}	- korrigierte Arzneistoffkonzentration
Cl _{tot}	- Gesamtkörperclearance
c _{max}	- Plasmaspiegelmaximum
CMC	- kritische Mizellbildungskonzentration
DK	- Donatorkompartiment
DPPC	- Dipalmitoylphosphatidylcholin
F _{Chi}	- Flux von Chinin in das Akzeptorkompartiment
FS	- Fettsäure
GCA	- Glycocholsäure
GDCA	- Glycodesoxycholsäure
GS	- Gallensäure (Glycodesoxycholsäure)
KG	- Körpergewicht
LE	- Lecithin
Lin	- Linolsäure
MRT	- mittlere Verweilzeit
p	- Irrtumswahrscheinlichkeit („probability“)
Pam	- Palmitinsäure
Ste	- Stearinsäure
t _{1/2}	- terminale Eliminationshalbwertzeit
TEER	- transepithelialer Durchgangswiderstand
t _{g1/2}	- theoretische Gleichgewichtstransportzeit
t _{max}	- Zeitpunkt des Plasmaspiegelmaximums
VG	- Veresterungsgrad

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Die orale Applikation ist die mit Abstand am häufigsten verwendete Methode der Verabreichung von Arzneistoffen. Die Bioverfügbarkeit der Arzneistoffe wird dabei von den Verhältnissen im Gastrointestinaltrakt entscheidend mitbestimmt, für die wiederum die Nahrungsaufnahme einen wesentlichen Faktor darstellt. Dabei spielen vor allem pharmakokinetische Wechselwirkungen mit den Nahrungsbestandteilen eine große Rolle [1].

Oft sind die Kenntnisse über den Einfluß der Nahrungsmittel-Arzneimittel-Wechselwirkungen auf die Pharmakokinetik von Arzneistoffen gering ausgeprägt oder beruhen auf empirischen Erkenntnissen. Bei vielen Wirkstoffen ist die Auswirkung gleichzeitiger Nahrungszufuhr auf die Resorption noch nicht geklärt oder wird nur anhand allgemeingültiger Faktoren beurteilt [2-6].

Außerdem variiert ein Effekt häufig sehr stark von Patient zu Patient, so daß sich konkrete Einnahmeempfehlungen oft recht schwierig gestalten. Dennoch wurden in den letzten Jahrzehnten die Untersuchungen auf diesem Gebiet intensiviert, und es erscheinen neben Veröffentlichungen zu einzelnen, speziellen Interaktionen regelmäßig relativ umfangreiche aktualisierte Übersichten [1, 3, 4, 7-25].

Interessant sind hierbei in erster Linie Wirkstoffe mit einer geringen therapeutischen Breite, bei denen eine Änderung der Bioverfügbarkeit eine grundlegende Gefahr bei der Pharmakotherapie darstellt. Oft handelt es sich um Problemarzneistoffe, die durch eine extreme Hydrophilie oder Lipophilie gekennzeichnet sind.

Die Schwierigkeit besteht vor allem darin, daß die aufgenommene Nahrung ständigen Veränderungen hinsichtlich Zusammensetzung, Volumen und Tageszeitpunkt unterworfen ist. Daher ist es auch nicht einfach, Hinweise wie "Zu den Mahlzeiten" oder "Nach dem Essen" zu präzisieren, denn wie setzt sich "Die Mahlzeit" zusammen? Es gibt zwar in der Fachliteratur die Angabe sogenannter Standardmahlzeiten, die allerdings in den verschiedenen Kulturen sehr unterschiedlich ausfallen und sicher auch nicht den individuellen Nahrungszubereitungen in ihrer Vielfalt genügend entsprechen.

Daher wird in zunehmendem Maße der Einfluß bestimmter Nahrungskomponenten auf die Arzneimittelwirkungen in den Vordergrund gestellt. Gleichzeitig sucht man neben den Mechanismen der Wechselwirkungen nach vergleichbaren Testverfahren sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Dabei finden verschiedene Modellsysteme und Methoden ihre Anwendung [3, 4, 9, 26-42].

Für eine hinreichende Charakterisierung einer Arzneistoff-Nahrungsmittel-Interaktion ist es nach einer Reihe von *in vitro*-Untersuchungen erforderlich, das Ergebnis *in vivo* zu bestätigen. Dies ist notwendig, da die komplexen Verhältnisse während der Passage des Gastrointestinaltraktes durch *in vitro*-Modellsysteme immer nur in Teilaspekten beurteilt werden können. Es ist daher wünschenswert, eine möglichst vergleichbare und reproduzierbare Reihenfolge von Modellen und Methoden zu finden, die es ermöglicht, den Einfluß von Nahrungsbestandteilen auf die Resorption und somit auf die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen zu berücksichtigen.

Die Zielstellung der vorliegenden Arbeit setzte sich darauf aufbauend folgendermaßen zusammen:

- die Veränderung des *in vitro*-Transportverhaltens eines ausgewählten Arzneistoffes unter dem Einfluß eines bestimmten Nahrungsbestandteils bzw. verschiedener Gallensäuremizellen bzw. Mischmizellen zu untersuchen;
- ausgewählte Ergebnisse der *in vitro*-Transportuntersuchungen hinsichtlich der Bioverfügbarkeit *in vivo* zu bestätigen;
- eine geeignete Reihenfolge von Modellsystemen festzulegen, die es ermöglicht, pharmakokinetische Interaktionen von Arzneistoffen in Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme besser voraussagen zu können.

Als Modellarzneistoff wurde der basische Arzneistoff Chinin eingesetzt. Er besitzt eine gute Bioverfügbarkeit (sogar bei Durchfall bis zu 80 % nach oraler Gabe [6]) und ein ausgewogenes Verhältnis an Lipophilie für die Membranpermeation und Hydrophilie für die Löslichkeit in den wässrigen Kompartimenten.

Dazu wurden als Nahrungsbestandteil bestimmte Varianten des löslichen Ballaststoffes Pektin beziehungsweise im Vergleich hierzu Gallensäure-Mizellen sowie binäre und ternäre Systeme von Gallensäure-Mischmizellen verwendet. Der erste Schritt war die Durchführung von Transportuntersuchungen an einem Permeationsmodell mit künstlicher Membran. Weiterhin erfolgten Versuche mit einem isoliertem Dünndarmsegment und im abschließenden Teil der Arbeit war es das Anliegen, die *in vitro* gefundenen Ergebnisse im Tierversuch *in vivo* zu bestätigen.

2. Theoretischer Teil

2. 1. Physiologische Grundlagen

Ein oral applizierter Arzneistoff durchläuft während der biopharmazeutischen Phase (Auflösung und Freisetzung, Absorption) in der Regel mehrere Abschnitte des Verdauungstraktes unter Veränderung des umgebenden pH-Wertes, wobei Passagegeschwindigkeit und pH-Wert auch nahrungsbedingt variieren [43-53].

Der Wirkstoff gelangt dabei über Mund und Rachenraum in den Ösophagus und dann in den Magen, von dort kann er weiter über den Pylorus in den Dünndarm gelangen. Im Magen werden vor allem schwache Säuren und Neutralstoffe resorbiert, während sich Basen im sauren Magensaft anreichern. Die Absorptionsfläche ist mit ca. 0,1 bis 0,2 m² relativ klein; die meisten Arzneistoffe sind noch wenig gelöst. Die Geschwindigkeit der Magenentleerung wird von der Art und Zusammensetzung des Mageninhaltes bestimmt. Bei Flüssigkeiten erfolgt sie in Abwesenheit von Proteinen und Fetten nach einer Kinetik 1. Ordnung, ansonsten verläuft die Magenentleerung bevorzugt nach einer Kinetik 0. Ordnung [15]. Interessant ist vor allem die Geschwindigkeit, mit der nach der Magenpassage der Arzneistoff in den Dünndarm gelangt, denn dieser stellt den Hauptresorptionsort für die überwiegende Anzahl der Wirkstoffe dar. Daher werden zur Verkürzung der Verweildauer im Magen viele Arzneimittel zur nüchternen Einnahme empfohlen.

Die vorliegende Arbeit widmet sich in diesem Zusammenhang dem Aspekt einer möglichen Bindung des Arzneistoffes an Nahrungsbestandteile und damit einer längeren Verweildauer im Nahrungsbrei.

Der Dünndarm ist mit seiner großen Oberfläche (ca. 200 m²), der hier relativ langen Passagezeit sowie der Anwesenheit von Pankreassaft, Duodenalsekret und Galleflüssigkeit der wichtigste Resorptionsort für die meisten oral verabreichten Arzneistoffe. Die Gallensäuren, die einem entero-hepatischen Kreislauf unterliegen, spielen mit ihren Tenseigenschaften eine entscheidende Rolle bei der Verdauung und Absorption von Lipiden. Ihre Auswirkung soll ebenfalls einen Teil der folgenden Arbeit zu Untersuchungen von Einflüssen der Nahrungsaufnahme auf die Bioverfügbarkeit des Arzneistoffes Chinin bilden.

Der Dickdarm bildet mit seinen drei Abschnitten Blinddarm, Grimmdarm und Mast- bzw. Enddarm den letzten Teil des Gastrointestinaltraktes und ist mit seiner starken phy-

siologischen Besiedlung durch Mikroorganismen (10^9 bis 10^{11} Keime / g Darminhalt), der Darmflora, auch an der Biotransformation von Arzneistoffen beteiligt [9, 15, 54].

Die physiologischen Verhältnisse für applizierte Arzneistoffe im Magen-Darm-Trakt unterliegen ständigen Veränderungen. Nachfolgend sind einige der bedeutendsten variablen Parameter genannt:

- Adsorption/Komplexbildung mit Nahrungsbestandteilen,
- Alter/Geschlecht/Gesundheitszustand/Genotyp,
- Durchblutung/physische Aktivität/Körpergröße/Körperlage,
- Biotransformation/First-pass-Effekt/pH-Wert/Verweilzeit,
- Geschwindigkeit der Magenentleerung/Peristaltik,
- Gallensäuresekretion/Harn-pH/Exkretion,
- Löslichkeit/Lösungsgeschwindigkeit in Sekreten des Gastrointestinaltraktes,
- Volumen/Temperatur/Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme und Zusammensetzung bzw. Zubereitung der Nahrungskomponenten.

Es ist daher notwendig, einzelne Nahrungsbestandteile bzw. Interaktionen hinsichtlich ihrer Auswirkung auf den Gesamtprozeß der Pharmakokinetik eines Wirkstoffes zu beurteilen, da oft gegensätzliche Einflüsse zur gleichen Zeit miteinander konkurrieren.

Die weit überwiegende Zahl der Nahrungsmittel-Arzneimittel-Interaktionen sind pharmakokinetischen Ursprungs, d. h., sie verändern die Blutspiegelkurve des Arzneistoffes und damit dessen Bioverfügbarkeit. Pharmakodynamische Wechselwirkungen stellen dagegen eher die Ausnahme dar. Die Änderung der Pharmakokinetik eines Arzneistoffes durch Nahrungskomponenten wird in erster Linie durch resorptionsbeeinflussende Faktoren bestimmt. Zur Voraussage von Wechselwirkungen sind daher Wirkstofftransportuntersuchungen besonders geeignet.

2. 2. Pektin

2. 2. 1. Der Einfluß von Pektinderivaten als löslicher Ballaststoff

Als Ballaststoffe bezeichnet man in ihrer Gesamtheit jene Bestandteile der Nahrung (z. B. Pflanzenzellwände), die nicht durch körpereigene Enzyme gespalten und die während der Passage des Magens und des Dünndarms nicht resorbiert werden können. Zu den am häufigsten in der Nahrung vorkommenden Ballaststoffen zählen die Pektine.

Sie entfalten eine Reihe physiologischer Wirkungen. So fördern sie beispielsweise in Verbindung mit Wasser durch ihre Quelleigenschaften die Peristaltik und damit den intestinalen Transit. Diese Eigenschaft nutzt man als milde Laxantien zur Behandlung von Obstipationen oder bei Übergewichtigkeit zur Erreichung eines Sättigungsgefühls. Weiterhin sind sie in der Lage, Nahrungsfette und Gallensalze zu binden. Letzteres ist vor allem bei der Senkung erhöhter Serumcholesterol- und Triglyceridspiegel bedeutsam [55-75].

Durch ihre Fähigkeit zu Adsorption oder Ionenaustausch sind sie für eine verzögerte oder verminderte Aufnahme von Vitaminen, Mineralien und natürlich von Arzneistoffen aus dem Darmlumen verantwortlich [1, 4, 6-9,15-18, 23-42, 76-89].

Dieser Bindungseffekt führte auch zu Untersuchungen über mögliche Freisetzungseigenschaften, beispielsweise von Hydrogelen mit amidierten Pektinen als Matrix für dickdarmlösliche Arzneiformen [90, 91].

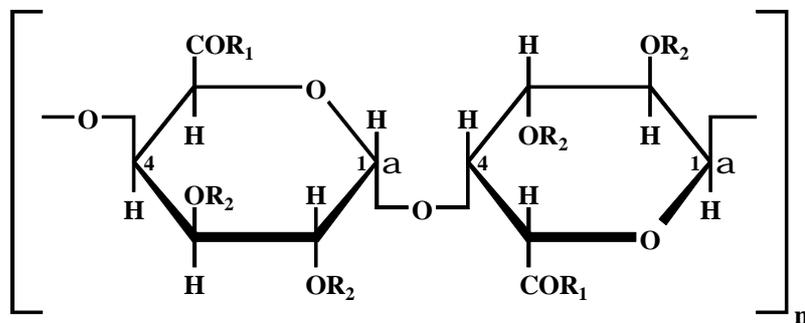
Besonders bei Arzneistoffen mit geringer therapeutischer Breite stellt eine derartige mögliche Interaktion ein Therapierisiko dar. Dazu sei auch hingewiesen auf *in vitro*- bzw. *in vivo*- Untersuchungen zu Ballaststoffeinflüssen auf Problemarzneistoffe wie zum Beispiel Digoxin [77]. Auch ist das veränderte Verhalten von Arzneizubereitungen mit kontrollierter Wirkstoff-Freigabe in Zusammenhang mit ballaststoffreicher Nahrung (erhöhte Viskosität, Bindungsaffinitäten) beachtenswert [42].

Pektine und ihre Derivate zählen neben Cellulose, Hemicellulosen, Ligninen, Wachsen, unverdaulichen Schleimen etc. zu den weitestverbreiteten Ballaststoffen in Obst, Gemüse und Getreideprodukten. Ihr häufiges Vorkommen als lösliche bzw. unlösliche Bestandteile der pflanzlichen Nahrung und ihr vielfältiger Einsatz in der modernen Lebensmittelindustrie wie auch als Arzneimittelhilfsstoff machen sie für Untersuchungen hinsichtlich Interaktionen mit Arzneistoffen interessant [92-107].

In der vorliegenden Arbeit wurden dazu verschiedene Pektine und Pektinderivate mit variierten strukturellen Parametern eingesetzt.

2. 2. 2. Charakterisierung der ausgewählten Pektinderivate

Als Pektin, Pektinsubstanzen bzw. Pektinstoffe bezeichnet man Polysaccharide, deren wesentlicher Baustein D-Galaktopyranuronsäureeinheiten sind, die linear $\alpha(1 \rightarrow 4)$ zu langen Ketten verknüpft sind. Diese Homogalakturonane werden aus den Preßrückständen nach der Apfel- und Zitrusaftgewinnung im industriellen Maßstab extrahiert und sind handelsüblich.



$R_1 = \text{OH}$ oder OCH_3 Pektin

$R_2 = \text{H}$ oder COCH_3 Acetylpektin

$R_1 = \text{OH}$ oder NH_2 Amidpektin

Abb. 1 Strukturformel von Pektin

Die mittleren Molekülmassen bewegen sich zwischen 50000 und 150000. In den Molekülketten sind vereinzelt neutrale Zucker wie $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glykosidisch gebundene L-Rhamnose, dazu können in Seitenketten an die Rhamnoseeinheiten Galaktane, Arabinane, Galaktoxyane oder Xylofucane gebunden sein. Bei den Pektinsäuren sind die Galaktopyranuronsäureeinheiten unverestert, mit Ca- und Mg-Ionen kann daraus ein unlöslicher hochmolekularer Komplex, das sogenannte Protopektin, gebildet werden.

Im pflanzlichen Gewebe ist das Pektin weitgehend in seiner unlöslichen Form vorhanden. Durch Kochen unter Druck im schwach sauren Milieu oder enzymatischen Abbau (beispielsweise bei der Fruchtreifung) kann daraus wasserlösliches Pektin erhalten werden. Die teilweise Veresterung der Carboxylgruppen mit Methanol hemmt die Ausbildung von Wasserstoffbrücken und damit die Parallellagerung der Polymerketten. Das ist dann der

Grund der guten Wasserlöslichkeit von Pektin. Bei schwach saurem pH-Wert können in Gegenwart hoher Zuckerkonzentrationen (Konzentration > 50 %) stabile Gele entstehen [108-110].

Nach der Herkunft unterscheidet man beispielsweise Citrus- oder Apfelpektin.

Bei Veresterung der Hydroxylgruppen an den C-Atomen 2 und 3 der Galakturonsäureeinheiten mit Essigsäure entstehen Acetylpektine. Werden Estermethoxygruppen durch Säureamidgruppen ersetzt, spricht man von Amidpektinen. Bei Einwirkung von pflanzlichen Pektinesterasen auf Pektin werden Derivate mit großen, sogenannten "blockweisen" Anordnungen freier Carboxylgruppen erhalten (Serie BI).

Einen Überblick über die Kenndaten der einzelnen Pektinpräparate gibt Tabelle 1.

Tabelle 1 Zusammensetzung der Pektinpräparate

<u>Präparat</u>	<u>Anhydroga-</u> <u>lakturonsäure</u> (AG) [%]	<u>Veresterungs-</u> <u>grad</u> (VG) [%]	<u>Viskositäts-</u> <u>zahl</u> (η) [ml/g AG]	<u>Acetylie-</u> <u>rungsgrad</u> [%]	<u>Amidie-</u> <u>rungsgrad</u> [%]
BI-1	72,8	92,6	343		
BI-2	72,7	71,6	284		
BI-3	71,5	54,2	279		
BI-4	73,9	34,5	249		
Ac-1	75,5	49,2	436	13,5	
Ac-2	69,4	48,2	418	34,0	
Ac-3	66,5	47,9	435	42,0	
Ac-4	64,5	48,6	290	55,0	
Am-1	72,0	39,3	353		10,3
Am-2	71,8	19,4	336		33,5
Am-3	72,2	13,4	326		38,1
A-0	62,9	54,2	499		
A-10	62,3	53,5	148		
A-100	61,7	53,3	32,4		

Die Viskositätszahl $[\eta]$ steht empirisch in Beziehung mit dem Molekulargewicht (zur Bestimmung und Erläuterung s. Kap. 6 1. Methoden). Pharmazeutische Verwendung finden Pektinpräparate als Hämostyptica oder bei Diarrhoe, weiterhin als Hilfsstoff bei Arzneizubereitungen, so beispielsweise als Tabletzensprengmittel aufgrund des starken Quellvermögens oder Schleimstoff zur Viskositäts­erhöhung bei der Stabilisierung von Suspensionen. Eine außerordentlich breite Anwendung, vor allem aufgrund ihrer Ge­liereigenschaften, finden Pektinderivate in vielen Bereichen der Lebensmittelindustrie.

Die bei den folgenden Versuchsreihen verwendeten Pektinlösungen wurden auf einen AG-Gehalt von jeweils 0,5 % (Masse-Vol.-%) eingestellt (M_{RAG} 176,1 g / mol). Für die Arbeit wurden am Deutschen Institut für Ernährungsforschung in Potsdam-Rehbrücke aus einem handelsüblichen, gereinigten Citruspektin eine Pektinserie mit blockweiser Anordnung der freien Carboxylgruppen (Bl), eine Amidpektinserie (Am) sowie eine Acetylpektinserie (Ac) hergestellt.

Weiterhin wurde ein mittelverestertes Apfelpektinpräparat eingesetzt, welches durch stu­fenweise Mechanolyse (Schwingmühle, Mahldauer 10 und 100 Stunden) des hochmole­kularen Ausgangsderivates im trockenen Zustand in seinem Molekulargewicht differen­ziert vermindert wurde (A-0, A-10, A-100, Kenndaten s. Tab. 1, zur Herstellung der ein­zelnen Serien der Pektinpräparate s. Kap. 6. 1. Methoden).

2. 3. Gallensäuren

2. 3. 1. Der Einfluß von Gallensäuren

Eine wichtige Gruppe von Steroiden im Organismus sind die aus dem Cholesterol gebildeten Gallensäuren. Sie kommen als essentielle Bestandteile der Gallenflüssigkeit, abgeleitet vom 5 β -Cholestan, im Säugetierorganismus als Derivate der Cholansäure vor. Ihre Salze werden als Cholate bezeichnet. Die Gallensäuren treten in der Gallenflüssigkeit fast ausschließlich als wasserlösliche Natriumsalze ihrer amidartig an der Carboxylgruppe mit Glycin (Glycholsäuren) oder Taurin (Taurocholsäuren) verknüpften Konjugate auf [5, 6, 15, 108-111].

Die beim Menschen vorkommenden wichtigsten Gallensäuren sind die Cholsäure und die Chenodesoxycholsäure (in den Leberzellen aus Cholesterol synthetisiert; auch als primäre Gallensäuren bezeichnet), sowie die Desoxycholsäure und die Lithocholsäure (nach Abspaltung der Hydroxylgruppe am C-Atom 7 der primären Gallensäuren durch bakterielle 7 α -Dehydroxylasen; auch als sekundäre Gallensäuren bezeichnet).

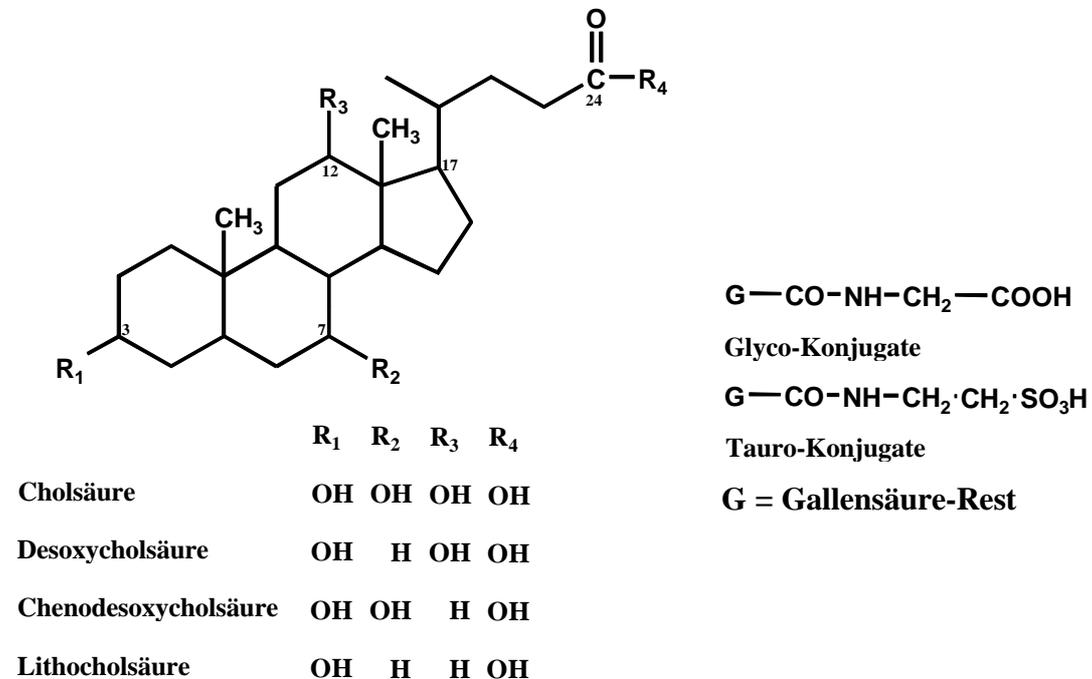


Abb. 2 Strukturformeln der wichtigsten beim Menschen vorkommenden Gallensäuren

Die physiologische Bedeutung der Gallensäuren, begründet in ihren Tensideigenschaften, läßt sich folgendermaßen zusammenfassen:

Erleichterung der Dispersion und Resorption von Lipiden und fettlöslichen Vitaminen aus dem Darmlumen, pH-Verschiebung im Dünndarm, Induktion des Gallenflusses, Rückkopplungshemmung der Gallensäuresynthese und damit verbunden auch Modulation der Cholesterolproduktion in der Leber, Transport von Produkten aus dem Leberstoffwechsel in den Intestinaltrakt sowie über die Gallensäureausscheidung auch Elimination von Cholesterol [55-75].

Die Gallensäuren werden zu ca. 90 % aus dem Darm wieder resorbiert und gelangen in die Leberzellen. Sie unterliegen somit einem enterohepatischen Kreislauf [5, 6, 15, 112].

Durch ihre amphiphile Struktur sind die Gallensäuren-Konjugate stark grenzflächenaktiv. Sie spielen eine herausragende Rolle bei der Fettverdauung aufgrund der Emulgierung der Lipide, womit deren Abbau durch Lipasen erleichtert wird.

In Lösung besitzen sie die Eigenschaft, Mizellen zu bilden, worauf im Kapitel 2. 3. 2. noch ausführlicher eingegangen wird. Die Desoxycholsäure ist in der Lage, mit Fettsäuren und anderen hydrophoben Verbindungen in einem bestimmten Molverhältnis wasserlösliche Einschlußverbindungen, die man als Choleinsäuren bezeichnet, zu bilden. Durch Röntgenstrukturanalyse ist bekannt, daß dabei zwei Desoxycholsäure-Moleküle einen 0,28 nm langen Kanal bilden. Auf diese Weise kann beispielsweise ein Molekül Stearinsäure (mit einer Länge von ca. 2,4 nm) mit acht Molekülen Desoxycholsäure eine derartige Einschlußverbindung bilden [108, 109, 111].

Die pharmazeutische Bedeutung von Gallensäuren ist vielfältig. Entweder erfolgt die Gabe in Form eines Gallensäurepräparates, oder in der Arzneiform sind Gallensäuren als Emulgator zugegeben. Exogen zugeführte Gallensäuren spielen vor allem bei der Gallensteintherapie (Ursofalk®), bei Erkrankungen mit cholestatischer Komponente (Lebererkrankungen etc.), bei der Behandlung der zystischen Fibrose oder bei der Eliminierung toxischer Metabolite eine Rolle [6, 133].

Bei Aufnahme fettreicher Nahrung wird die Sekretion von Gallensäuren gesteigert. Die GS verbessern als physiologische Detergenzien auch die Benetzbarkeit von Arzneistoffen erheblich. Durch diese Lösungsvermittlung werden zum einen auch schlecht wasserlösliche Verbindungen in Lösung gebracht, zum anderen erhöht sich durch die Lösung im Nahrungsfett wesentlich die Auflösungs geschwindigkeit und damit die Resorption lipophiler beziehungsweise schwerlöslicher Wirkstoffe.

Diese Effekte wurden für zahlreiche Arzneistoffe wie zum Beispiel Griseofulvin [113, 114], Itraconazol [115-119], Chloroquin [120], Mefloquin [121], Streptomycin, Gentamicin und Cefazolin [122, 123], Hydrochlorothiazid [13, 19, 124] oder bei bestimmter Galenik Ciclosporin [125-130] beschrieben. Bei fehlender oder gestörter Gallensäuresekretion kann deshalb auch eine zusätzliche Gabe von Gallensäurepräparaten erforderlich sein [1, 15, 131, 132].

Allerdings handelt es sich bei den erwähnten Studien meist um *in vivo*-Untersuchungen, und der Einfluß der Gallensäuren ist nur ein Bestandteil von wesentlich komplexeren Vorgängen. Bei Tierversuchen muß außerdem immer der Unterschied zum menschlichen Organismus beachtet werden. So besitzen beispielsweise Ratten keine Gallenblase und weisen ein deutlich unterschiedliches Spektrum an Gallensäuren auf [15].

Im Zusammenhang mit den Resorptionsprozessen wird auch ein Ionenpaartransport über Gallensäure-Anionen diskutiert [134, 135]. Bei der biliären Exkretion spielen Gallensäuren als einer der drei Hauptbestandteile (neben Cholesterol und Lecithin) der Gallenflüssigkeit, kurz Galle genannt, ebenfalls eine wichtige Rolle [5, 15].

Zur direkten therapeutischen Verwendung kommen vor allem aus Ochsen-galle gewonnene Gallensäuren, die einen hohen Anteil an Cholsäure und Desoxycholsäure aufweisen, als Choleretika bei gestörtem Gallenfluß (Cholecysmon[®]) oder als Cholelitholytika zur Auflösung kleiner, nicht verkalkter Gallensteine. Weiterhin verwendet man Gallensäuren als Ausgangsprodukte für die Partialsynthese von Steroidhormonen, als Gallensäure-Arzneistoff-Konjugat oder als Detergentien für eine verbesserte Solubilisation und erleichterte Membrangängigkeit schwer resorbierbarer Wirkstoffe [5, 6, 110, 136-142].

2. 3. 2. Charakterisierung der ausgewählten Gallensäuren

Gallensäuren können als amphiphile Moleküle instabile molekulardisperse Lösungen bilden. Ihre Anreicherung an Grenzflächen bzw. in der Oberfläche von Flüssigkeiten, die zur Erniedrigung der Grenzflächen- bzw. Oberflächenspannung führt, resultiert ebenso in einem Energiegewinn wie ihre Assoziierung im Inneren der Lösung. Letztere erfolgt ab einer bestimmten vorliegenden Konzentration, der kritischen Mizellbildungskonzentration CMC, die bei den Gallensäuren zu kugelähnlichen Mizellen führt [143-146]. Diese kugelförmigen primären Gallensäuremizellen, die oberhalb der CMC gebildet werden,

erreichen beispielsweise bei mittleren Aggregationszahlen von $m = 10-12$ eine maximale Größe von $10-16 \text{ \AA}$, sie sind also relativ klein [147].

Eine Besonderheit der Gallensäuren gegenüber anderen Tensiden bei der Mizellbildung ist die deutlich geringere Aggregationszahl bei einer hohen CMC.

Weiterhin bestehen die Moleküle der Gallensäuren im Unterschied zu klassischen Emulgatoren nicht aus einer hydrophilen, polaren Kopfgruppe und einem hydrophilen polaren Alkylrest, sondern aus einer konvexen, hydrophoben Oberseite, einer polaren Seitenkette und einer konkaven, hydrophilen Unterseite. Der hydrophile Teil der Gallensäuren wird von einer ionischen Gruppe (der Carboxylgruppe, die in wässriger Lösung dissoziieren kann) und ein bis drei Hydroxylgruppen (zwei: GDCA, drei: GCA) gebildet.

Gallensäuremizellen tragen daher eine negative Oberflächenladung; zwischen ihnen wirken abstoßende Coulomb-Kräfte. Das Steroidgrundgerüst bildet dabei den hydrophoben Teil [148, 149].

Die Aggregationszahlen der Mizellen, die von den Lösungsbedingungen abhängen, sind bei Trihydroxygallensäuren kleiner (2 - 8) als bei Dihydroxygallensäuren (4 - 60). Bei sinkendem pH oder abnehmender Temperatur bzw. steigender Ionenstärke der Lösung erhöht sich die Aggregationszahl [148].

Dies bedeutet, daß in wässriger Lösung die CMC, die bei Gallensäuren zwischen 0,6 mM und 10,0 mM variieren kann, von diesen Faktoren beeinflusst ist. Durch Mizellbildung mittels der negativ geladenen Gallensäureanionen wird außerdem zusätzlich Gallensäure gelöst [144, 145].

Durch eine Erniedrigung des pH-Wertes bzw. der Temperatur oder durch eine Erhöhung der Ionenstärke bzw. der Konzentration verändern sich Form und Größe der Mizellen; es können sich die sogenannten sekundären Mizellen bilden. Diese flexiblen Gebilde sind meist stäbchenförmig oder helixartig. Ein weiteres Anwachsen der Mizellradien, welches vor allem oberhalb eines bestimmten Schwellenwertes der Ionenstärke der Lösung in Abhängigkeit von der Gallensäurekonzentration auftritt, bezeichnet man auch als Polymerisierung zwischen der hydrophilen Oberfläche primärer Mizellen durch Bildung sekundärer Mizellen.

In jüngster Zeit wurden Untersuchungen über die Mizellstruktur der Gallensäuren mittels Neutronenkleinwinkelstreuung und Lichtstreuung bzw. mizellarer elektrokinetischer Affinitätschromatographie durchgeführt [144, 148].

Die dabei nachgewiesene Aufnahme von Arzneistoffmolekülen in Gallensäuremizellen bildete den Ansatz für die Verwendung der Gallensäuren in der vorliegenden Arbeit. Zur Mizellbildung wurden zwei Glyco-Konjugate von Gallensäuren herangezogen: Glycocholsäure, GCA, und Glycodesoxycholsäure, GDCA (Abb. 3).

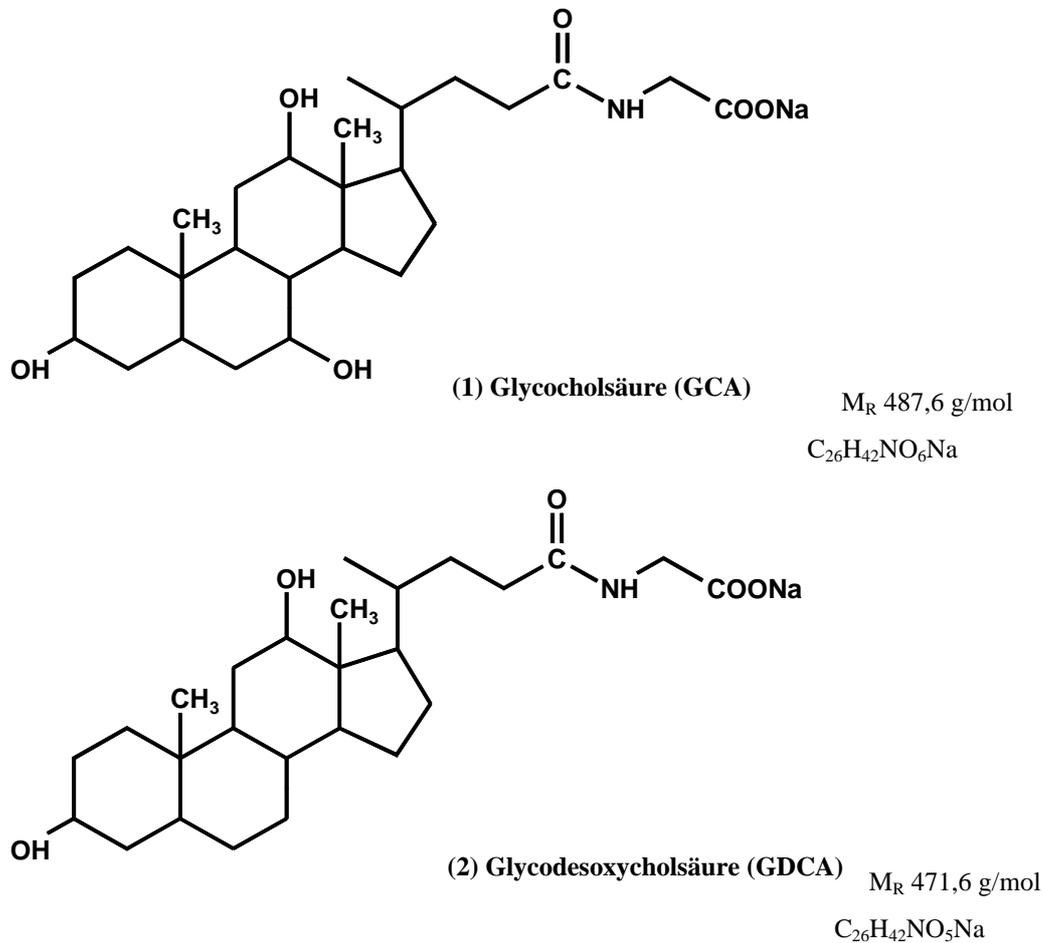


Abb. 3 Strukturformeln von Glycocholsäure (1) und Glycodesoxycholsäure (2) als Na-Salz

Vom Emulgatortyp her sind die Gallensäuren, die in den folgenden Versuchen als Na-Salz eingesetzt wurden, als O/W-Emulgator anzusehen. Die Mizellen der Cholsäure-Derivate sind in einem höheren Maß hydratisiert als die der Desoxycholsäure-Derivate [144, 147-159].

Allgemeine Kenngrößen von GCA- und GDCA-Mizellen sind in Tabelle 2 [nach 151] zusammengestellt.

Tabelle 2 Kenngrößen von Na-Cholat- und Na-Deoxycholol-Mizellen [147, 151, 160-162]

<u>Kenngröße</u>	<u>Na-Cholat</u>	<u>Na-Desoxycholol</u>
CMC [mM]	3 - 15	1 - 5
Aggregationszahl	3,8	8,9
Mizellgewicht [g · mol]	1400	3000

Für die CMC der GCA ergibt sich unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen aus der Literatur ein Wert von 4,2 mM (pK_S 3,8), für GDCA von 1,3 mM (pK_S 4,77).

2. 3. 3. Charakterisierung der ausgewählten Mischmizellen

2. 3. 3. 1. Allgemeines

Gallensäuremizellen sind durch die Aufnahme fremder Tensidmoleküle wie Fettsäuren oder Phospholipide in der Lage, Mischmizellen zu bilden. Diese gemischten mizellaren Systeme können stark wasserunlösliche lipophile Arzneistoffe sehr gut aufnehmen, die dadurch kolloidal löslich werden. Dieser Lösungsvorgang, Solubilisation genannt, hat in der Galenik Anwendung gefunden. Bei der Aufnahme von Fremdmolekülen verläuft der Einbau von wasserunlöslichen, lipophilen Stoffen besonders gut. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, daß die Involvierung von lipophilen Fremdstoffen, besonders von neutralen Molekülen bei ionogenen Tensiden, häufig den mizellaren Assoziationszustand signifikant stabilisiert [143, 144, 151, 163].

Mischmizellen der Gallensäuren spielen bei zahlreichen Prozessen im menschlichen Verdauungstrakt, vor allem bei der Fettverdauung (hier bspw. Mischmizellen Gallensäure-Lecithin), eine entscheidende Rolle [154, 164]. Zu ihrer Charakterisierung sind in der Literatur einschließlich in Übersichten zahlreiche Techniken beschrieben [144, 147, 151, 154, 160, 164-174].

Für die vorliegende Arbeit war es in dieser Hinsicht von Interesse, daß Mischmizellen aus Gallensäuren und Phospholipiden ein besseres Solubilisierungsvermögen für hydrophobe Lipide besitzen als reine Gallensäuremizellen [169]. Vor allem binäre Systeme aus Gallensäuren und Phospholipiden wurden bisher auf ihre Eignung als Arzneistoffträger untersucht [166]. Weiterhin waren die Mitteilungen von SCHWARZ et al. [144, 152,

171] über Wechselwirkungen von Arzneistoffen mit Gallensäure-Mizellen und Mischmizellen mittels mizellarer elektrokinetischer Affinitätschromatografie von Bedeutung. Dort wurden Affinitäten zwischen mischmizellaren Systemen von Gallensäuren und lipophilen Arzneistoffen mit bestimmten strukturellen Voraussetzungen beschrieben

Bei den Versuchen in der vorliegenden Arbeit wurden Mischmizellen als binäres System (GS + Fettsäure, FS, bzw. GS + Phospholipid) und als ternäres System (GS + FS + Phospholipid) eingesetzt.

2. 3. 3. 2. Fettsäuren

Als Fettsäurezusatz für die Bildung von Mischmizellen wurden Palmitinsäure (Pam) und Stearinsäure (Ste) als gesättigte und Linolsäure (Lin) als ungesättigte Fettsäure (FS) verwendet. Fettsäuren sind ein wichtiger Bestandteil natürlicher und synthetischer Fette. Palmitin- und Stearinsäure sind in allen tierischen Fetten sowie in Phospholipiden enthalten, Linolsäure kommt als essentielle, polyungesättigte Fettsäure beispielsweise in Lein- und Sojaöl und in Eilecithin vor. Alle drei Fettsäuren sind praktisch unlöslich in Wasser. Die Alkalisalze besitzen emulgierende Eigenschaften, daher rührt auch ihre Eignung als Seifen für Waschmittel. Handelsüblich ist ein als "Stearin" bezeichnetes Gemisch aus Palmitinsäure und Stearinsäure. Pharmazeutische Verwendung findet vor allem das Magnesiumsalz der Stearinsäure als Formentrenn- und Schmiermittel bei der Kapselherstellung und der Tablettierung; weiterhin nutzt man die Stearinsäure zur Einhüllung bitterer Arzneistoffe, in Salben, in Pflastern zur Verfestigung und in sogenannten "Vanishing creams" (Mattcremes, Stearatrems), welche ein sehr hohes Wasseraufnahmevermögen besitzen [108-111, 159].

Bei Verdauungs- und Resorptionsprozessen im menschlichen Organismus spielen Gallensäure-Fettsäure-Verbindungen (Mizellen, Vesikel) eine wichtige Rolle. Über den Charakter der Mischmizellen, das Nebeneinander von gemischten sowie reinen GS- bzw. FS-Mizellen jeweils nach der Art und Konzentration eines der Partner und die Wechselwirkungen von Gallensäuren und Fettsäuren gibt es sehr unterschiedliche Vorstellungen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit bei den Fettsäuren in einem Konzentrationsbereich gearbeitet, in dem GS-FS-Mischmizellen vorhanden sind [152, 157, 172-182].

Vom Emulgatortyp sind sie O/W zuzuordnen (Abb. 4).

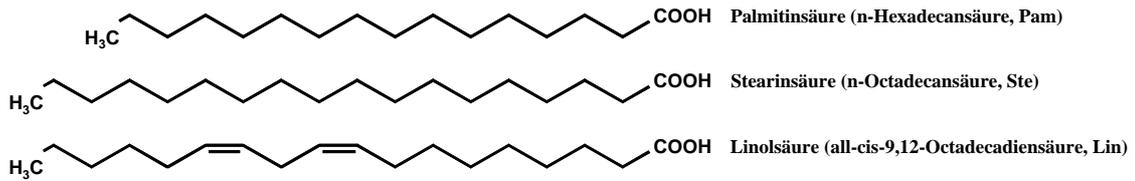


Abb. 4 Strukturformeln von Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure

Für die Verwendung in den nachfolgenden Versuchen standen die Na-Salze der Palmitinsäure (M_R 278,4 g / mol; $C_{16}H_{31}O_2Na$), der Stearinsäure (M_R 306,5 g / mol; $C_{18}H_{35}O_2Na$) und der Linolsäure (M_R 302,4 g / mol; $C_{18}H_{31}O_2Na$) zur Verfügung.

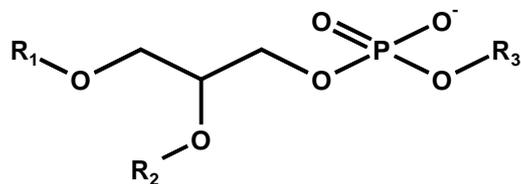
2. 3. 3. 3. Phospholipide

Phospholipide, auch als Phosphatide bezeichnet, bestehen aus Phosphorsäure, Fettsäuren, einem Alkohol und einer stickstoffhaltigen Komponente. Ist diese Komponente Cholin, dann spricht man von Lecithinen. Sie sind als Grundbausteine der Lipidfraktion von Biomembranen außerordentlich weit verbreitet. Besonders phospholipidreich sind Gehirn, Herzmuskel und Lunge, aber auch Eidotter und Sojabohnen. Die beiden letztgenannten dienen auch häufig als Ausgangspunkt für die Isolierung. Durch den amphoteren Charakter (Vorliegen in einem breiten pH-Bereich als Zwitterionen) werden, auch in Abhängigkeit von Cotensiden, sowohl O/W- als auch W/O-Emulsionen ermöglicht. So erhält man beispielsweise bei einem hohen Anteil der Wasserphase eine O/W-Emulsion, und durch eine Änderung der Phasenverhältnisse ist eine Emulsionsumkehr möglich.

Phospholipide besitzen ein breites Anwendungsspektrum als Emulgator in der Pharmazie, der Kosmetik und der Lebensmittelindustrie. Es existieren auch Zubereitungen von Phospholipiden zusammen mit Gallensäuren, wie beispielsweise bei der Verabreichung von Retinoiden oder von Gemfibrozil. Der Vorteil von Lecithinen als Emulgator ist die universelle Einsetzbarkeit auch für innerlich anzuwendende Emulsionen bis hin zu Injektionszubereitungen. Nachteilig ist aber die begrenzte Stabilität, da Lecithin in wässrigem Medium hydrolysiert wird. Der Einsatz von Phosphatidylcholin bei der Therapie der Alzheimerschen Krankheit, nach einem Schlaganfall oder Indikationen wie "altersbedingte Gedächtnis- oder Konzentrationsschwäche" erwies sich bisher als nicht erfolgreich. Trotzdem befinden sich zahlreiche Präparate mit hohem Lecithingehalt, auch als Nahrungsergänzungsmittel deklariert, im Handel [159, 183-185].

Dipalmitoylphosphatidylcholin, DPPC, stellt den überwiegenden Anteil der oberflächenaktiven Lipide des Flüssigkeitsfilms (Surfactant) der Lungenalveolen dar. Ein Mangel an pulmonalem Surfactant kann bei unreifen Neugeborenen zum Atemnotsyndrom führen. Er wird durch intratracheale Instillation von Surfactant, aus Rinderlungen isoliert oder mit synthetischem DPPC (Exosurf[®] Neonatal, 67,5 mg / kg KG) hergestellt, behandelt [5, 6, 108, 109].

Für die Mischmizellversuche standen zwei Phospholipide zur Verfügung: Eilecithin, Lec, (enthält ca. 75 % Phosphatidylcholin und ca. 15 % Phosphatidylethanolamin) und Dipalmitoylphosphatidylcholin (M_R 734 g / mol; $C_{40}H_{80}NO_8P$), DPPC (Abb. 5).



**Lecithin (1) : R_1, R_2 Fettsäurereste; R_3 Cholin
(1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3- phosphocholin)**

**DPPC (2) : R_1, R_2 Palmitinsäure; R_3 Cholin
(1,2-Dihexadecanoyl-*rac*-glycero-3-phosphocholin)**

Abb. 5 Strukturformeln von Lecithin (1), (Phosphatidylcholin: R_3 =Cholin, Phosphatidylethanolamin: R_3 =Ethanolamin) und Dipalmitoylphosphatidylcholin (2)

2. 4. Charakterisierung des verwendeten Arzneistoffes Chinin

Seit vor ca. 400 Jahren Augustiner- und Jesuitenmönche Chinarinde zur Behandlung von Fieber aus Peru nach Europa brachten, ist in der Medizin Chinin als Antimalariamittel in Gebrauch. Chinin ist wie sein Stereoisomeres Chinidin ein Alkaloid aus Cortex Chinae (Stammpflanze *Cinchona pubescens*). Eine synthetische Herstellung ist zwar möglich, aber für industrielle Zwecke zu kostenintensiv. Chinin ist eine schwache lipophile Base (pK_S 4,2 und 8,8; Verteilungskoeffizient n-Oktanol / Phosphatpuffer pH 7,4: 102), leicht löslich in Chloroform, Ethanol und saurem Milieu, löslich in Wasser und organoleptisch gekennzeichnet als ein weißes, fein kristallines Pulver mit stark bitterem Geschmack (Chinin ist die Standardsubstanz zur Bestimmung des Bitterwertes) [5, 6, 109, 111, 186-188, 199-201] (Abb. 6).

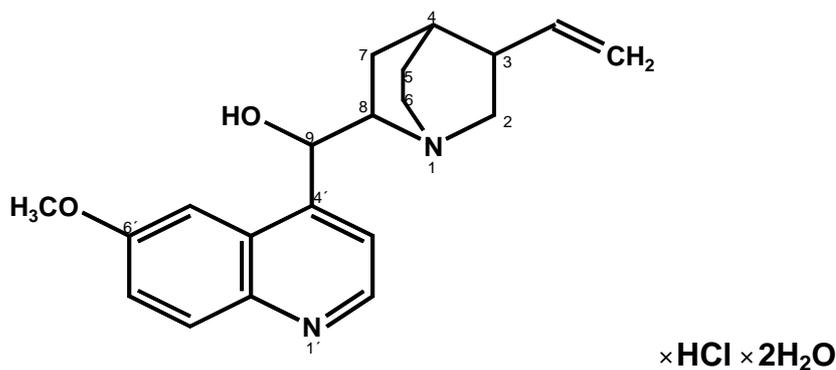


Abb. 6 Strukturformel von Chinin (in der Arbeit eingesetzt als Chininhydrochlorid)

Die Wirkung von Chinin ist primär blutschizontoid bei allen Formen der Malaria-Erreger, bei *Plasmodium vivax* und *Plasmodium malariae* kommt auch eine gametozide dazu. Als Wirkmechanismus ist in der Literatur eine Anreicherung in den sauren Nahrungsvakuolen der Parasiten, dadurch eine Erhöhung des pH-Wertes mit histologischen Veränderungen wie u. a. eine Hemmung der Nukleinsäuresynthese durch Komplexbildung mit DNS sowie eine Protoplasmagiftwirkung beschrieben. Weiterhin besitzt es analgetische, antipyretische, antiarrhythmische, lokalanästhetische und muskelrelaxierende Eigenschaften. Aufgrund letzterer wird es auch zur Behandlung von Muskelkrämpfen, vor allem bei nächtlichen Beinkrämpfen (200-300 mg vor dem Schlafengehen), mit herangezogen [189]. Eine hohe Dosis kann bei Schwangeren eine Abort verursachen [5, 6].

Hauptindikation für den Einsatz von Chinin (Limptar N[®], Chininum hydrochloricum Compretten[®]Merck Dura, Chinosalmid[®], Grippilan C[®]) ist die Behandlung schwerer Malariaformen, hervorgerufen durch chloroquin- oder multiresistente Stämme, besonders von Plasmodium falciparum. Die Anwendung erfolgt in Form seiner Salze, besonders als Hydrochlorid.

Die Dosierung ist nach Alter, Schwere der Krankheit, Empfindlichkeit des Erregerstammes und genetischem Typ der Patienten (große Unterschiede zwischen den Kontinenten) sehr variabel zu handhaben. Für die Tropenmediziner gibt es je nach Land und Region hierzu zahlreiche Dosierungsschemen, die beim Erwachsenen häufig bei ca. 1-2 g / Tag über mehrere Wochen liegen [190-201]. Chinin verursacht zahlreiche Nebenwirkungen (gastrointestinale Beschwerden, Blutdruckabfall, neurotoxische Reaktionen wie Seh- und Hörstörungen) und kann insbesondere Allergien (Typ-II-Reaktion) hervorrufen. Dies ist bemerkenswert, da Chinin weitverbreitet in Tonic und anderen Getränken eingesetzt wird und dabei eine seltene Chininreaktion, die sogenannte Cocktail purpurea (intravasale Hämolyse), verursachen kann [6]. Obwohl Chinin schwach wirksam ist im Vergleich zu seiner Toxizität, ist es als Reservemittel bei Resistenzen aber nach wie vor unersetzlich [202, 203].

Chinin wird nach oraler Gabe rasch und in einem hohen Ausmaß vor allem im oberen Dünndarm durch passive Diffusion resorbiert (selbst bei Durchfall zu mehr als 80 %), erreicht nach ca. drei Stunden die maximalen Plasmaspiegel, die mit einer Halbwertszeit von etwa elf Stunden nach Beendigung der Therapie wieder absinken (dieser Faktor kann allerdings je nach Schwere der Malaria-Infektion stark verändert sein), besitzt eine hohe Eiweißbindung (über 70 %) und wird renal ausgeschieden.

Die Auswahl des Arzneistoffes erfolgte in Anlehnung an die Ergebnisse der mizellaren elektrokinetischen Affinitätschromatographie von SCHWARZ [144], die eine Aufnahme von Arzneistoffmolekülen in Gallensäuremizellen bzw. Mischmizellen besonders bei den lipophilen basischen Arzneistoffen Propranolol-HCl und Chinin-HCl aufzeigten.

Ein Ausdruck dieser Wirkstoffaufnahme in der Mizelle war dabei beispielsweise der Kapazitätsfaktor k_v , der sich in ähnlich wie in der Chromatographie als das Verhältnis der Aufenthaltszeit der untersuchten Moleküle in der mobilen zur stationären Phase definiert, nur daß sich in diesem Falle auch die „stationäre“ Phase in Bewegung befindet [144].

In Tabelle 3 sind die Kapazitätsfaktoren für einige basische und saure Arzneistoffe in GDCA- und GCA-Mizellen (Konzentration GS=30 mM) bei pH 7,4 und pH 5,0 wieder-

gegeben. Die angegebenen Kapazitätsfaktoren k_v , die in Korrelation mit einer Arzneistoffmolekülaufnahme in der Mizelle stehen, wurden dabei aus den Ionenbeweglichkeitsdifferenzen berechnet [144].

Tabelle 3 Kapazitätsfaktoren k_v von Propranolol-HCl, Chinin-HCl, Atenolol, Diclofenac-Na, Salicylsäure und Ibuprofen-Na [nach 144]

<u>Arzneistoff</u>	<u>pH</u>	<u>k_v (GDCA 30 mM)</u>	<u>k_v (GCA 30 mM)</u>	<u>pK_s-Wert</u>
Propranolol-HCl	7,4	10,38	2,59	9,42
	5	91,2	2,8	
Chinin-HCl	7,4	7,46	1,12	4,2 u. 8,8
	5	37	1,28	
Atenolol	7,4	0,58	0,19	9,6
	5	0,83	0,19	
Diclofenac-Na	7,4	0,54	0,5	4,4
	5	1,15	0,37	
Salicylsäure	7,4	0	0	2,97 u. 13,4
	5	0	0	
Ibuprofen-Na	7,4	0,02	0	4,4
	5	0,05	0	

In der Tabelle wird gut ersichtlich, daß sowohl Propranolol-HCl als auch Chinin-HCl für die Transportuntersuchungen mit Gallensäuremizellen als besonders interessant erschienen. Die Entscheidung für den verwendeten Wirkstoff fiel zugunsten von Chinin. Der Grund dafür war der bei Propranolol auftretende hohe first-pass-Effekt, der bei den *in vivo*-Versuchen eine zu große Schwankung der Bioverfügbarkeit hervorrufen könnte, die nicht direkt auf den Einfluß der nahrungsbedingten Faktoren zurückzuführen und somit das Ergebnis nicht eindeutig interpretierbar machen würde.

Eingesetzt wurde Chinin in der vorliegenden Arbeit als Chininhydrochlorid-2 H₂O:

C₂₀H₂₅ClN₂O₂ · 2 H₂O; M_R 396,89 g / mol; CAS-Nr. 6119-47-7.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels HPLC (Konzentrationsbestimmung in den Kompartimenten und im Blut siehe Kap. 6. 1. Methoden).

3. In Vitro-Versuche

3. 1. Permeationsversuche mit künstlicher Membran

3. 1. 1. Grundlagen

Der Arzneistofftransport durch Membranen ist einer der wichtigsten, die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes beeinflussenden Prozesse. Zum besseren Verständnis des Permeationsverhaltens wurde daher eine Reihe von *in vitro*-Modellen entwickelt, die Eingang in die gängige Forschung fanden. Bei den bisher untersuchten Nahrungsmittel-Arzneimittel-Interaktionen wurden zahlreiche dieser Modelle verwendet, wie auch aus der Literatur ersichtlich ist [22, 27-34, 37-39, 42, 204-207].

Allerdings ist durch die Vielfalt unterschiedlichster Modelle und Methoden die Vergleichbarkeit der einzelnen Resultate oft sehr schwierig. Eines der Ziele dieser Arbeit ist es u. a., eine geeignete Reihenfolge von Modellsystemen zu finden, die eine schnelle und zuverlässige Aussage zu bestimmten pharmakokinetisch relevanten Wirkstofftransportveränderungen zuläßt, die durch Nahrungsbestandteile bedingt sind. Geeignet, d. h., mit relativ wenigen Schritten standardisierbare und aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen.

Unabhängig von den physiologischen Faktoren, die selbstverständlich immer mitentscheidend (sowohl geschwindigkeitsbestimmend als auch das Ausmaß entsprechend beeinflussend) für die Resorption eines Arzneistoffes sind und auch durch die Nahrungsaufnahme verändert werden können, sind substanzspezifische Interaktionen ein wesentlicher Faktor für einen veränderten Arzneistofftransport.

Um mögliche signifikante Wechselwirkungen eines Arzneistoffes mit Nahrungskomponenten bzw. durch mit diesen verbundene physiologische Parameter (Gallesekretion) zu prognostizieren, ist eine Vorauswahl dieser in Frage kommenden Wechselwirkungspartner unerlässlich.

Dafür wurde für diese Arbeit das durch zahlreiche Anwendungen [36, 40, 84, 87, 208-215] gut zu klassifizierende Permeationsmodell nach FÜRST und NEUBERT verwendet [37, 213, 214].

3. 1. 2. Versuchsdurchführung mit dem Permeationsmodell nach FÜRST und NEUBERT

Das Permeationsmodell besteht aus vier zu einem Block nebeneinander angeordneten Permeationszellen (Abb. 7) . Diese sind mit einer Halterung an einem Vibrator befestigt und befinden sich in einem Wasserbad, welches in den Versuchen auf 37°C temperiert wurde. Die Aufhängung an einer Rüttelapparatur (Vibrationseinrichtung, vertikale Bewegung mit einer Frequenz von 50 s⁻¹) dient sowohl zur Durchmischung der Kompartimente als auch zur reproduzierbaren Bildung der Diffusionsschichten. Jede Permeationszelle besteht aus zwei Kompartimenten (Donatorkompartiment DK, Akzeptorkompartiment AK) mit einem Fassungsvermögen von jeweils 24 ml. Zwischen den beiden Kompartimenten befindet sich eine künstliche Membran.

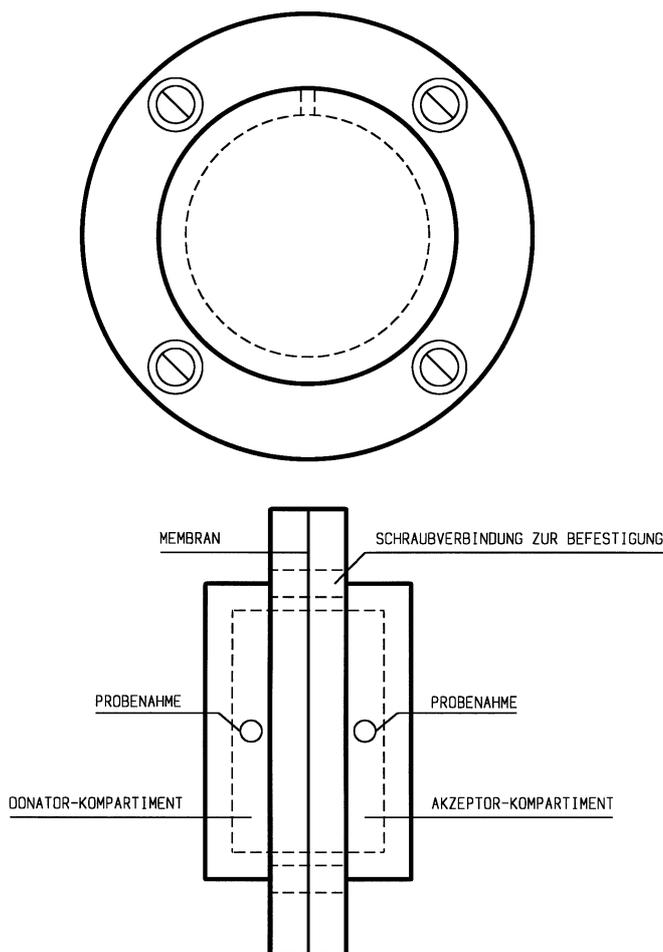


Abb. 7 Aufbau einer Permeationszelle des Modells nach FÜRST und NEUBERT

Die Permeationsfläche bei den Versuchen beträgt 15,9 cm² bei 20 ml Lösung. Während der Versuchsdurchführung permeiert der Arzneistoff in verschiedenem Ausmaß, das sowohl vom Arzneistoff (Konzentration, Lipophilie, Ionisationsgrad, Löslichkeit), den Kompartimentbedingungen (pH-Wert, Temperatur, Vibration) als auch von eben Wechselwirkungen mit anderen Substanzen abhängt, an, in bzw. durch die Membran.

Durch standardisierte Versuchsbedingungen (Temperatur 37 °C, Vibration, pH-Wert durch gepufferte Lösungen) kann der Einfluß dieser Prozesse weitgehend konstant gehalten werden.

Ein carriervermittelter Wirkstofftransport scheidet an der künstlichen Membran aus. Treibende Kraft für die Diffusionsschritte über die Membranbarriere (Donator>Membran, Membran>Akzeptor) ist daher das Konzentrationsgefälle zwischen Donator- und Akzeptorphase.

Die Grundlage hierfür ist im 1. FICKschen Diffusionsgesetz ausgedrückt (Gleichung 1):

$$\frac{dQ}{dt} = (c_2 - c_1)_t \cdot \frac{D}{d} \quad (1)$$

d...Membrandicke dQ/dt...Molekülstrom (c₂-c₁)...Konzentrationsdifferenz D...Diffusionskoeffizient

Durch eine Erhöhung der Viskosität (η) des Lösungsmediums nimmt der Diffusionskoeffizient eines Wirkstoffes ab (Gleichung 2):

$$D = \frac{R \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot N} \quad (2)$$

R...Gaskonstante T...absolute Temperatur η...Viskositätskonstante des Lösungsmittels

r...Radius des gelösten Teilchens (Kugelgestalt) N...Loschmidt-Konstante

Um die gesuchten Effekte für eine Änderung des Transportverhaltens von Chinin durch Pektinderivate, Gallensäuremizellen bzw. Mischmizellen nicht durch einen zu hohen Wert des Parameters Viskosität zu überdecken, wurden daher bei den Versuchen sehr niedrigviskose bzw. annähernd isoviskose Donatorlösungen (Viskositätsbestimmung und Viskositäten s. Kap. 6. 1. Methoden) eingesetzt.

Eine Veränderung durch Diffusion von Lösungsmedium aus dem AK in das DK war nicht nachweisbar. Alle Lösungen waren Newton'sche Lösungen.

Da die Permeation aber nicht nur als freie Diffusion zwischen zwei Phasen stattfindet, sondern durch eine Barriere zwischen zwei Phasen, sind weitere Bedingungen zu berücksichtigen [212].

Das Ausmaß der Permeabilität eines Wirkstoffes durch eine künstliche Lipidbarriere ist in der Regel, abhängig vom Ionisationsgrad, mit zunehmendem Anteil nichtionisierten Wirkstoffes umso höher ausfallend. Um einen ausreichend hohen Anteil nichtdissoziierter und damit gut permeationsfähigen Arzneistoffes zu erhalten, wurde in den Versuchen für den schwach basischen Stoff Chinin als erstes ein pH-Wert von 7,2 in beiden Kompartimenten gewählt. Eingesetzt wurde eine Pufferlösung, um pH-Verschiebungen wie durch den Einsatz von Chinin als Hydrochlorid zu vermeiden.

Das Verteilungsgleichgewicht zwischen einem Wirkstoff in der lipidhaltigen Membran und in wässrigem Kompartiment bzw. in den Grenzschichten zur und in der Membran hängt vom Grad der Lipophilie einer Verbindung ab und drückt sich nach dem NERNSTschen Verteilungssatz im Verteilungskoeffizienten aus (Gleichung 3):

$$\frac{c_1}{c_2} = k \quad (3)$$

k...Verteilungskoeffizient c_1 ...Stoffkonzentration in der lipophilen Phase (Membran)

c_2 ...Stoffkonzentration in der hydrophilen Phase (DK bzw. AK)

Die Lipophilie und damit die Aufnahme in lipidhaltige Membranen nimmt mit zunehmendem Anteil der nichtdissoziierten Form zu.

Für den Verteilungskoeffizienten wird in der Praxis meist der scheinbare Verteilungskoeffizient herangezogen, der unabhängig von der Form des Wirkstoffes in beiden Phasen das reale Verteilungsverhältnis an den Grenzschichten der Lipidbarriere am ehesten widerspiegelt.

Dieser Verteilungskoeffizient ist in Kenntnis der pH-Verhältnisse und des Arzneistoff- pK_A nach HENDERSON-HASSELBALCH über den Ionisationsgrad berechenbar. Unter physiologischen Bedingungen, wie sie bei pH 7,2 wiedergegeben werden, ergibt sich für Chinin (pK_S 4,2 und 8,8) zum einen ein ausreichend hoher nichtdissoziierter Anteil für

eine gute Permeation der Modells substanz als auch zum anderen genügend dissoziierte Anteile für mögliche Wechselwirkungen [3, 159, 212].

Da die Permeationsversuche unter standardisierten Bedingungen wässrige/lipoide Phase (Lösungsmedium Puffer / Dodecanol-Collodium-Membran), Temperatur bzw. pH-Wert (Puffer) stattfanden, konnte dieser Einfluß ebenso wie eine Wechselwirkung (An- und Einlagerung) des Wirkstoffes mit der Membran als konstant bis auf die Änderung durch den Donatorzusatz (Pektin, Gallensäuremizelle/-mischmizelle) angesehen werden.

Der Einsatz einer Vibrationseinrichtung diene neben der mechanischen Durchmischung der einzelnen Kompartimente und der Erhöhung der Teilchenbewegung auch für einen gleichmäßigeren und verringerten Aufbau der wässrigen Diffusionsgrenzschichten an der Membran.

Eine derartige Grenzschicht (auch als NERNSTsche Schicht bezeichnet, abhängig u. a. von der Temperatur und der Teilchenbewegung, die Flüssigkeit unterliegt einer leichten, laminaren Strömung parallel zur Membran), die noch vor der Membran eine zusätzliche Barriere darstellt, wird durch Diffusion überwunden. Der Permeationswiderstand erhöht sich somit neben dem eigentlichen Membranpermeationswiderstand noch um den Grenzschichtendiffusionswiderstand [212, 213, 218].

Daher kann durch den jeweils gewählten Donatorzusatz auch eine Änderung dieses Teilwiderstandes hervorgerufen werden und allein dadurch schon eine Permeationserhöhung oder -erniedrigung erzielt werden. Dies gilt vor allem für eine diffusionsschichtenkontrollierte Permeation, wie sie vor allem bei lipophilen Arzneistoffen anzutreffen ist [212, 213, 218].

Der gleiche pH-Wert auf beiden Seiten wurde zunächst gewählt, um „Ionenfallenbedingungen“, wie sie physiologisch für Chinin beispielsweise im sauren Magenmilieu existieren, mit ihren Auswirkungen auf die Permeation und damit eine erschwerte Erkennung der möglichen Wechselwirkungen zu vermeiden.

Für den Vergleich der Transportbeeinflussung des Arzneistoffes durch Pektin, Gallensäuremizellen oder Mischmizellen wurde neben der prozentual vom Donator in den Akzeptor gelangten Chininkonzentration c_{AK} [%] (bezogen auf die Gesamtkonzentration an Chinin im System) als kinetische Standardgröße der Flux F_{Chi} [$\mu\text{g} / \text{cm}^2 \cdot \text{min}$] herangezogen.

Der F_{Chi} wurde mit Hilfe der Gleichung für den Efflux (Efflux ist der Flux aus der Membran in das Akzeptorkompartiment, vorangegangen der Influx aus dem Donatorkompar-

timient in die Membran, die Differenz ergibt die Membrananreicherung) berechnet [208, 212, 216].

Der Efflux (Gleichung 1) wurde als Basis genommen, da die mögliche veränderte Akzeptorkonzentration des Arzneistoffes durch nahrungsbedingte Parameter für die späteren Untersuchungen als Grundlage für weitergehende Versuche diene (Gleichung 4).

$$F_{\text{Chi}} = \frac{(c_{\text{Akz kor}}(t_n) - c_{\text{Akz kor}}(t_{n-1})) \cdot V_{\text{Akz}}}{A \cdot \Delta t} \quad (4)$$

F_{Chi} ...Flux [$\mu\text{g} / \text{cm}^2 \cdot \text{min}$] c_{Akz} ...Chininkonzentration im AK [$\mu\text{g} / \text{ml}$] (entnommene Probevolumina rechnerisch berücksichtigt, s. c_{kor} S.27) V_{Akz} ...Akzeptorvolumen [20 ml]
 A ...Membranfläche (15,9 cm^2) Δt ...Permeationszeit [min]

Als Membran wurde in den Versuchen eine Dodecanol-Collodium-Membran mit Colloidium als Matrix und Dodecanol als Lipid verwendet (zur Membranherstellung s. Kap. 6. 1. Methoden). Bei den Testreihen wurden in beide Kompartimente jeweils 20 ml Donator- bzw. Akzeptormedium eingefüllt.

Auf der Donatorseite befand sich der Arzneistoff in Lösung, je nach Versuchsbedingung allein bzw. zusammen mit Ballaststoffen, Gallensalzen oder Mischmizellen; auf der Akzeptorseite wirkstofffreies Medium. Die Chininkonzentration wurde im Donator so gewählt, daß im AK „sink-Bedingungen“ vorlagen [3, 15, 15, 201, 217].

Als Lösungsmedium sowohl für den Donator als auch den Akzeptor wurde zuerst Phosphat-Puffer nach SÖRENSEN pH 7,2 ausgewählt. Die verwendeten Lösungen wurden vor Versuchsbeginn frisch zubereitet.

Um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden Stabilitätsuntersuchungen der eingesetzten Substanzen über 24 Stunden im Lösungsmedium durchgeführt, die keine chemischen, physikalischen (Viskosität) oder mikrobiellen Instabilitäten ergaben.

In Vorversuchen ohne Chinin zeigte sich keine Permeation von Pektinpräparaten, bei den Gallensäure- bzw. Mischmizellpräparaten wurden nach 2 Stunden maximal ca. 1 - 1,5 % Gallensäure im Akzeptor gefunden, es fand also kein nennenswerter Transport durch die Lipidmembran statt.

Bei den Pektinderivaten wurde eine Konzentration von 0,5 % (Masse-Vol.-%, entspricht 2,85 mmol / l AG) bezogen auf den AG-Gehalt ausgewählt. Parameter wie das Volumen,

die Temperatur (37 °C) und die Größe, Stärke und Zusammensetzung der Membran waren bei den einzelnen Versuchen stets gleich.

Ausgehend von diesen Vorbetrachtungen wurde postuliert, daß eine auftretende signifikante Veränderung des Flux von Chinin in den Akzeptor durch eine Wechselwirkung mit dem Donatorzusatz (Pektinderivat, Gallensäuremizelle bzw. Mischmizelle) ausgelöst wird. Diese Wechselwirkung soll dann in weiteren *in vitro*- bzw. *in vivo*- Versuchs-schritten auf ihre Auswirkung im Gesamtprozess Bioverfügbarkeit von Chinin untersucht werden.

Die Permeationsversuche wurden über 180 Minuten mit einer Probenentnahme von 2 ml aller 30 Minuten durchgeführt. Das entnommene Volumen wurde durch frisches Akzeptormedium ersetzt. Durch die Probenahme im Akzeptor erfolgte eine Verringerung der dort vorliegenden Wirkstoffkonzentration. Dies wurde für die jeweilige Probenzeit durch die Berechnung einer korrigierten Chininkonzentration c_{korr} ausgeglichen (Gleichung 5):

$$c_{\text{korr}} = c_{(tn)} + \frac{c_{\text{korr}(tn-1)} \cdot V_{\text{Probe}}}{V_{\text{Akzeptor}}} \quad (5)$$

c_{korr} ...korrigierte Chininkonzentration [$\mu\text{g} / \text{ml}$] $c_{(tn)}$...Chininkonzentration zum Zeitpunkt n [$\mu\text{g} / \text{ml}$]

$c_{\text{korr}(tn-1)}$...Chininkonzentration zum Zeitpunkt n-1 [$\mu\text{g} / \text{ml}$] V_{Akzeptor} ...Volumen Akzeptor [ml]

V_{Probe} ...Volumen Probe [ml]

Zum leichteren Erfassen und um den Umfang der Auswertungen in dieser Arbeit so rationell wie möglich zu gestalten, wird bei allen folgenden Darstellungen der Ergebnisse des FÜRST-NEUBERT-Permeationsmodells nur der Wert der Messung nach 120 Minuten angegeben.

„Chinin pur“ steht in den jeweiligen Graphiken für Versuche mit Chinin-HCl ohne Zusatz von Pektin oder Gallensäuren bzw. Mischmizellen im Donatorkompartiment. Die im Akzeptorkompartiment angegebene Chininkonzentration [%] steht für den prozentualen Chininanteil im Gesamtsystem (Ausgangskonzentration 100 % im DK und 0 % im AK, die statistische Auswertung wird in Kap. 6. 1. Methoden erläutert.)

3. 1. 3. Permeationsversuche Chinin-HCl 2.2mM mit Pektinderivaten

Am Anfang der Untersuchungen wurden, aufbauend auf frühere eigene Ergebnisse [40, 87, 88, 209], Testreihen bei einer Ausgangskonzentration von Chinin-HCl 2,2 mmol / l im Donator mit Pektin mit blockweiser Anordnung freier Carboxylgruppen (BI) und dem im Molekulargewicht differenzierten Apfelpektin (A) durchgeführt.

Es ergab sich eine signifikante Verringerung der Akzeptorkonzentration bzw. des Flux durch die zugesetzten Pektinderivate. Zwischen den einzelnen höher veresterten Pektinderivaten BI-1 - BI-3 und dem gemahlene Apfelpektin bis auf das Präparat A-100 (100 h Mechanolyse) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (A-100 allerdings die geringste Transportbeeinflussung). Dafür hatte das Pektin BI-4 mit einem Veresterungsgrad von 34,5 % die deutlichste Reduktion des Flux aller bis dahin eingesetzten Pektinderivate zur Folge (Abb. 8).

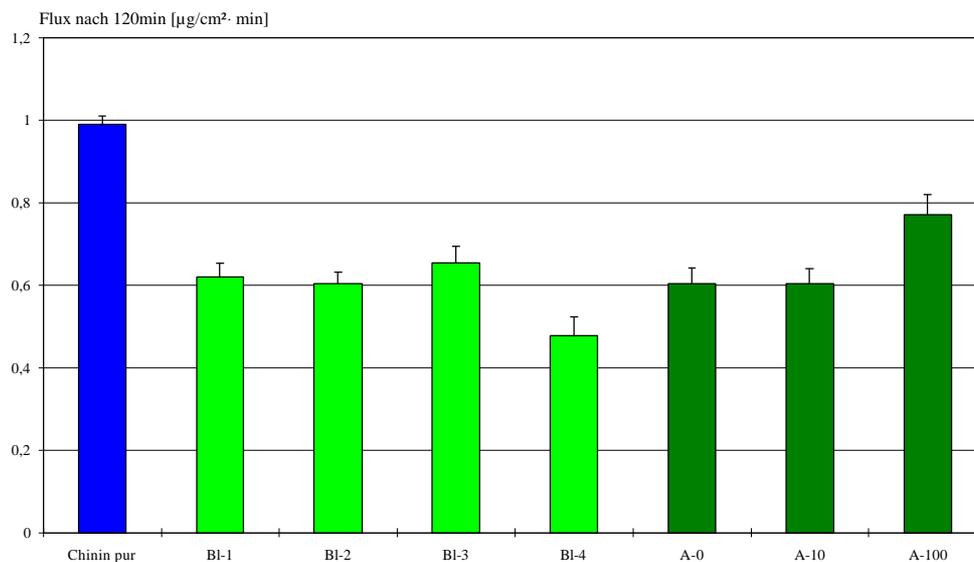


Abb. 8 F_{Chi} [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$] bei 120 min Pektinserien BI und A

Besonders beim Flux, der ein Maß für die Permeationsrate genau zum Zeitpunkt der Probennahme darstellt, wird deutlich, daß der Transport erkennbar verringert wird. Es erscheint daher sinnvoll, weitere Versuche mit Pektinpräparaten am Präparat BI-4 zu orientieren, d. h., nach signifikant größeren Transporterniedrigungen zu suchen.

Als nächste Untersuchungsreihe wurden acetylierte und amidierte Pektinderivate mit dem Pektin BI-4 verglichen. Hier zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zur vorangegangenen Serie, das Präparat mit der stärksten Wechselwirkung der Acetyl- und Amidpektine, Ac-4, hatte keine signifikante Konzentrationsverringering im AK bzw. Fluxerniedrigung hinsichtlich BI-4 zur Folge (Abb. 9).

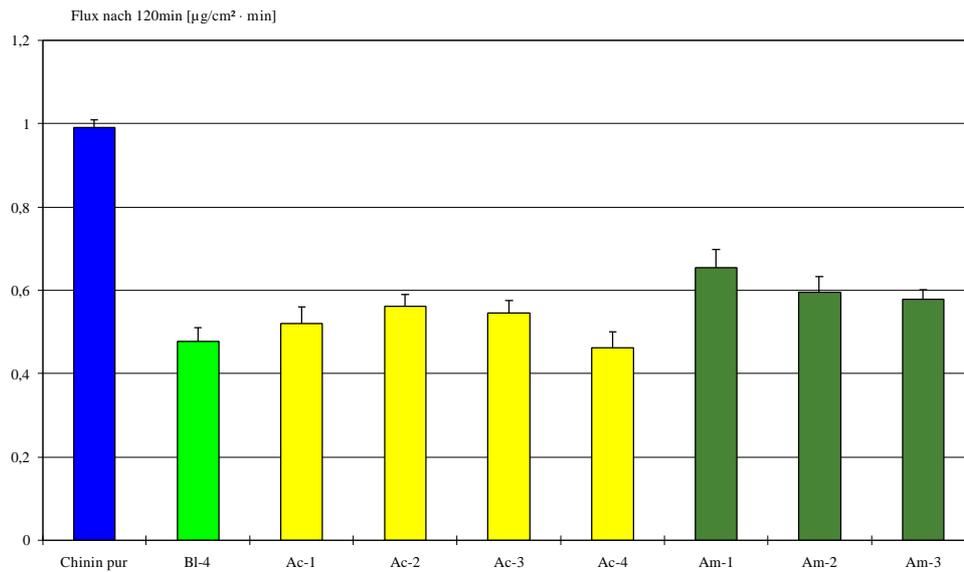


Abb. 9 F_{Chi} [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$] bei 120 min Acetylpektin, Amidpektin und Pektin BI-4

3. 1. 4. Permeationsversuche Chinin-HCl 2.2 mM mit Gallensäuren und Mischmizellen

An die Pektinderivate, die im Falle ihrer stärksten Permeationsverringeringen (BI-4 bzw. Ac-4) die Transportrate auf etwa den halben Wert im Vergleich zur Permeation der Modells substanz ohne Donatorzusatz verringerten, schlossen sich die Gallensäureversuche an.

Dabei wurde mit dem Dihydroxypräparat GDCA begonnen. Unterhalb der CMC (bei GDCA unter den vorgegebenen Bedingungen 1,3 mM [144, 148]) ergab sich keine signifikante Permeationsverringering, ab 5 mM GDCA erfolgte dafür ein ausgeprägter Effekt (Abb. 10).

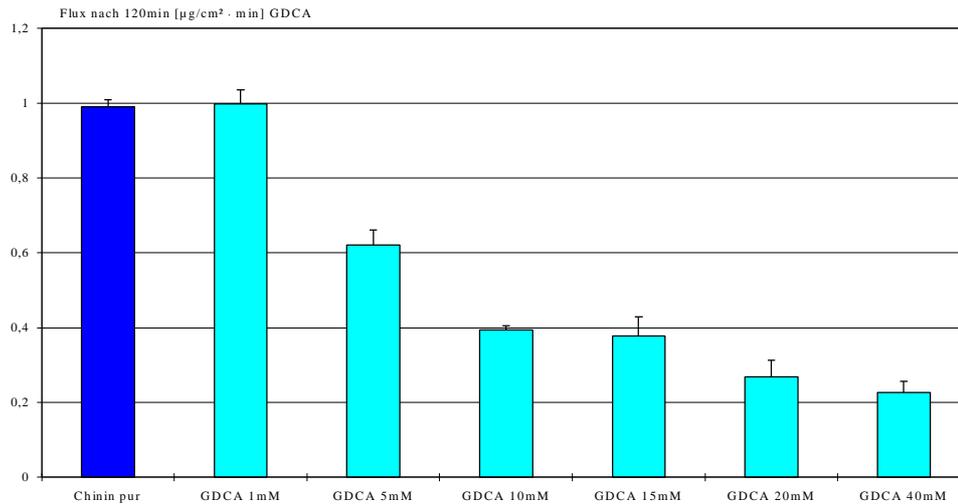


Abb. 10 F_{Chi} [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$] bei 120 min GDCA in verschiedenen Konzentrationen

Das Ausmaß des Chinintransportes in den Akzeptor wurde gegenüber den Pektinpräparaten sehr viel stärker verringert. Besonders ab 10 mM GDCA war eine deutliche Verringerung des Flux um mehr als den Faktor 2 zu verzeichnen.

Als Vergleich zu den verschiedenen GDCA-Konzentrationen wurde das Trihydroxypräparat GCA (mit einer höheren CMC (4,2 mM [144])) eingesetzt. Hier wurde zwar schon ab 1 mM ein ausgeprägter Effekt beobachtet, der allerdings nicht wie bei GDCA mit zunehmender GS-Konzentration steigerungsfähig war und der den Effekt von GDCA nicht überwog (Abb. 11).

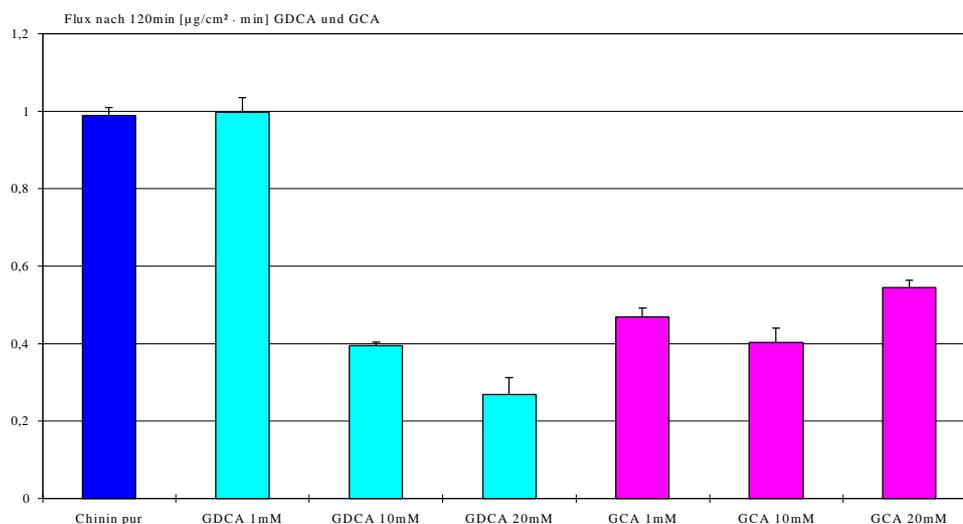


Abb. 11 F_{Chi} [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$] bei 120 min GDCA und GCA im Vergleich

Im Ergebnis der bisherigen Versuche mit Gallensäuren zeigte sich unterhalb bzw. in der Nähe der CMC kein signifikanter Einfluß auf die Permeation von Chinin in das Akzeptorkompartiment, dafür war oberhalb der CMC ein signifikanter, sehr deutlich ausgeprägter Effekt in Form einer starken Reduktion des Chinintransportes zu registrieren.

Dies ist insofern bemerkenswert, da bei einigen Fertigarzneimitteln ein Zusatz von Gallensäuren zur Arzneiform empfohlen wird. Allerdings ist die Dodecanol-Collodium-Membran eine künstliche, porenfreie Lipidmembran, die weder Carrier noch Zellverbände oder weitere Transportmöglichkeiten enthält und der Zusatz an Gallensäuren bewegt sich nicht immer in Bereichen, die in jedem Fall eine Mizellbildung wie in den eingesetzten Donatorlösungen bewirken. Ausgenommen davon ist die gleichzeitige Applikation von Gallensäurepräparaten.

Daher sind Rückschlüsse auf späteres *in vivo*-Verhalten an dieser Stelle verfrüht, allerdings ist die starke Reduktion der Chininpermeation in den Akzeptor von Interesse für weitere Versuchsschritte, da sich aufgrund seiner Deutlichkeit der gefundene Effekt *in vivo* bestätigen könnte.

Im Vergleich der beiden Gallensäuren konnte bei beiden eine eindeutige Reduzierung des Flux in den Akzeptor oberhalb der CMC gefunden werden. Bei der GCA konnte schon bei 1 mM eine signifikant verringerte Akzeptorkonzentration bzw. Abnahme des Flux festgestellt werden, bei der GDCA wurde bei 5 mM diese Auswirkung gut feststellbar.

Der Effekt war bei allen Versuchen schon bei 30 Minuten erkennbar. Da die Transportveränderungen der einzelnen Präparate bzw. Konzentrationen zueinander bei allen Zeiten im gleichen Verhältnis standen, wurde, wie bereits erwähnt, darauf verzichtet, die Profile für jede einzelne Meßzeit anzugeben und nur der 120-Minuten-Wert gewählt, um die Veranschaulichung der Resultate übersichtlich gestalten zu können.

Im Falle der GCA konnte eine weitere Steigerung der Gallensäurekonzentration keine signifikante Veränderung bewirken, während bei der GDCA stufenweise, wie beispielsweise in Abbildung 10 gut sichtbar, die Erniedrigung des Flux erfolgte.

Zwischen der GCA bei 1 - 20 mM und der GDCA im Bereich 10 - 15 mM bestand kein wesentlicher Unterschied (s. Abb. 11). In den nächsten Versuchen wurde zur Mischmizellbildung als Gallensäure zuerst eine Konzentration von 15 mM GDCA eingesetzt. Da spätere Mischmizellversuche mit 10 mM GCA sich in ihren Resultaten von den GDCA-Mischmizellversuchen nicht erwähnenswert unterschieden bzw. geringeren Einfluß zeigten, soll im folgenden nur auf die Versuche mit den GDCA-Mischmizellen eingegangen

werden. Als erstes dazu eine graphische Übersicht des Flux von Chinin aus dem Donator in den Akzeptor bei der Anwesenheit von Mischmizellen im DK (Abb. 12):

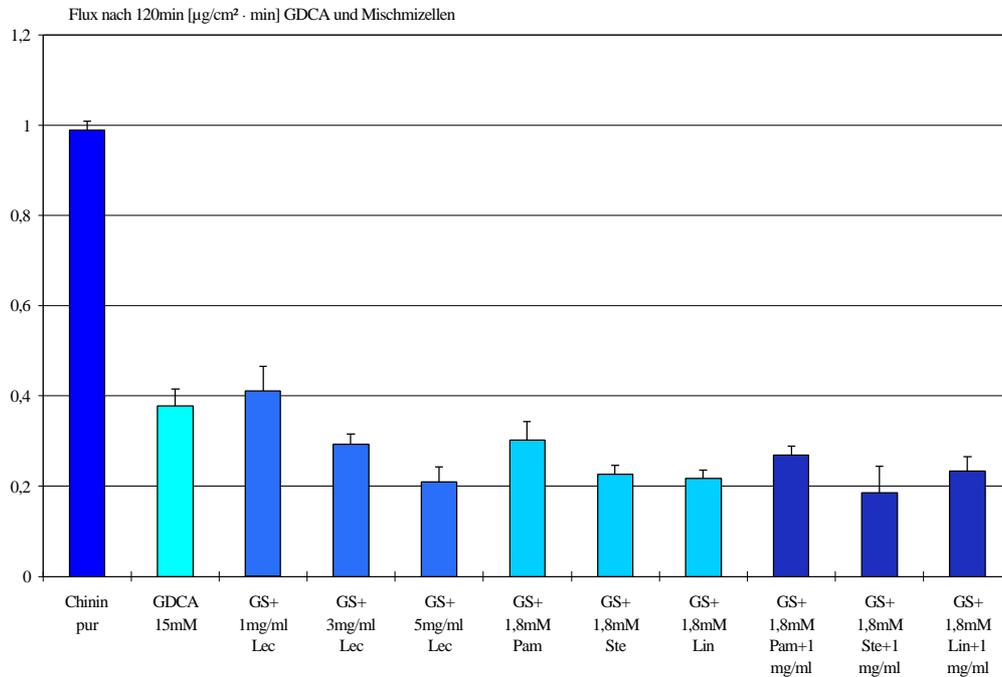


Abb. 12 F_{Chi} [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$] bei 120 min GDCA und Mischmizellen*

* 1mg/ml bei den drei rechten Säulen (ternäres System) = 1mg/ml Lec, GS = GDCA

Als Ergebnis war beim Vorhandensein von Mischmizellen neben Chinin im Donator-kompartiment eine deutliche Flux-Abnahme wie auch bei den reinen Gallensäuremizellen zuvor zu verzeichnen. Verglichen mit GDCA 15 mM ohne Zusatz bewirkten sowohl die binären als auch die ternären Systeme (mit Ausnahme 15 mM GDCA + 1mg / ml Eilecithin) eine noch ausgeprägtere Transportreduktion, die sich allerdings nicht in jedem Fall signifikant von der reinen GDCA-Mizellanwesenheit bzw. im Verhältnis binär-ternär unterschied. Dennoch ist die sehr deutliche Reduktion des Flux auf ca. ein Fünftel des „Chinin pur“-Wertes, also ein Unterschied um fast den Faktor 5, äußerst bemerkenswert. An dieser Stelle erscheint es geeignet, nochmals auf die Affinität von lipophilen Arzneimittel-molekülen zu mizellaren GS-Strukturen nach SCHWARZ einzugehen [144]. Nicht nur, daß dort mittels der mizellaren elektrokinetischen Affinitätschromatographie die Aufnahme von Chininmolekülen in Gallensäuremizellen aufgezeigt wurde (s. Kap. 2.

4., Tab. 3, S. 20), es wurde auch eine höhere Affinität eines lipophilen basischen Arzneistoffes wie z. B. Propranolol zu mischmizellaren Systemen gefunden (Tab. 4).

Tabelle 4 Abhängigkeit des Kapazitätsfaktors k von Propranolol-HCl von der Mizellzusammensetzung bei der mizellaren elektrokinetischen Affinitätschromatographie [nach 144]

<u>System</u>	<u>k</u>
GDCA 20 mM	7,4
GDCA 20 mM+10 mM DPPC	76,8
GDCA 20 mM+15 mM DPPC	∞
GDCA 20 mM+2 mM Laurinsäure	8
GDCA 20 mM+10 mM Laurinsäure	26
GDCA 20 mM+2 mM Ölsäure	8
GDCA 20 mM+10 mM Ölsäure	101
GDCA 20 mM+5 mM DPPC+ 20 mM Ölsäure	∞

Die bei den *in vitro*-Versuchen mit dem FÜRST/NEUBERT-Modell bisher gefundene Reduzierung des Flux von Chinin durch eine künstliche Lipidmembran bei Anwesenheit von Gallensäuremizellen im Donator und der noch stärkere Effekt bei den mischmizellaren Ausgangslösungen könnte ein Hinweis sein, daß die Anreicherung des Arzneistoffes in den Mischmizellen höher bzw. stabiler ausfällt. Oder anders ausgedrückt, daß die Affinität zu den Mizellen durch Zusätze wie Fettsäuren oder Phospholipide noch gesteigert werden kann und dies sich dann wiederum in einem verminderten Transport in das andere Kompartiment niederschlägt.

Als Zusammenfassung für die bisherigen Versuche läßt sich feststellen, daß eine Reihe der getesteten Substanzen eine Abnahme des Flux während der Versuchsdauer im Permeationsmodell bewirkten.

Eine mögliche Interpretation ist bei den Pektinpräparaten eine Wechselwirkung von Chinin mit den Bereichen an unveresterten Carboxylgruppen, bei den mizellaren Systemen eine Anreicherung (die durch Zusätze noch steigerungsfähig ist) des lipophilen Chinins in den Mizellen. Die Testreihen mit Gallensäuremizellen bzw. Mischmizellen ergaben hierbei eine stärkere Wirkstofftransportbeeinflussung als die Pektinderivate. Zur Übersicht zeigt die nächste Abbildung noch einmal die Abnahme des Flux durch das Vorhanden-

sein ausgewählter Pektinderivate bzw. Gallensäuremizellen/Mischmizellen im Donator (Abb. 13).

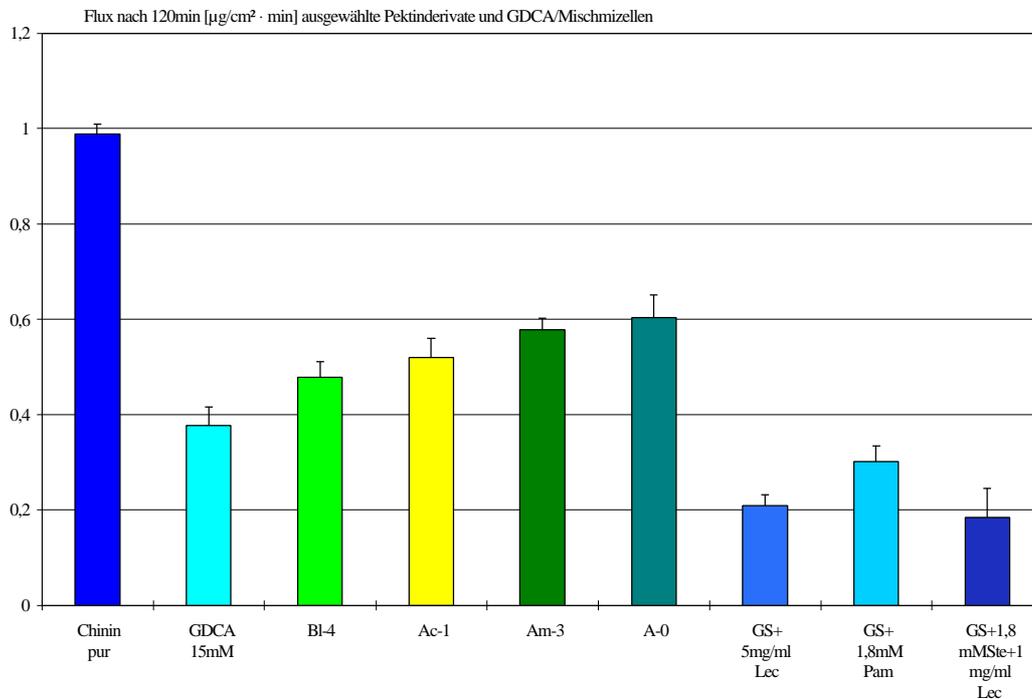


Abb. 13 Vergleich F_{Chi} [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$] ausgewählte Pektinderivate und GDCA-Mizellen/Mischmizellen

3. 1. 5. Permeationsversuche Chinin-HCl 1.1 mM mit Pektinderivaten

Nachdem die erste Serie der Versuche mit dem Modell nach FÜRST und NEUBERT beendet war, wurden nun analoge Testreihen mit einer Chinin-Ausgangskonzentration im Donator von jetzt 1,1 mmol/l durchgeführt, um Viskositätseffekte auszuschließen. Dabei konnten die bisher gefundenen Ergebnisse im wesentlichen bestätigt werden.

Zuerst wurde wieder eine Serie Pektin mit blockweiser Anordnung freier Carboxylgruppen (BI-1 - BI-4) und eine Serie Apfelpektin verschiedener Mahldauer (A-0 - A-100) eingesetzt. Auch hier zeigte sich, wie bei der zweifachen Ausgangskonzentration von Chinin im Donator vorher (s. S. 28) die geringste Akzeptoranreicherung nach 120 Minuten bzw. die größte Flux-Abnahme bei dem Pektinderivat BI-4 (Abb. 14).

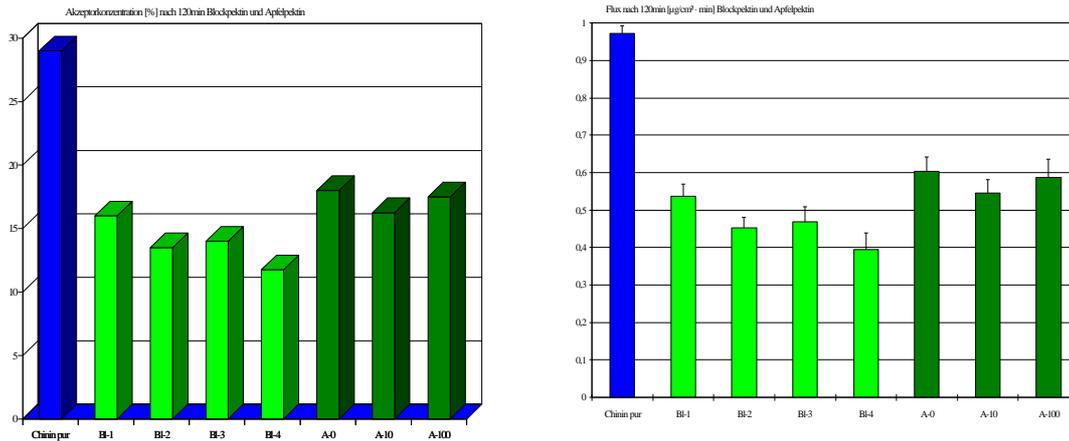


Abb. 14 Prozentuale Chininkonzentration im AK (linke Graphik) und F_{Chi} [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$] (rechte Graphik) bei 120 min Pektinserien B1 und A

Nachfolgend wurden acetylierte und amidierte Pektinpräparate auf eine Änderung der Permeation des Modellarzneistoffs in Bezug zu B1-4 untersucht. Auch hier erwies sich Acetylpektin als leicht stärkerer Wechselwirkungspartner verglichen mit Amidpektin, konnten Ac-1 und Ac-4 den größten Einfluß auf den Chinintransport erzielen, allerdings unterschieden sie sich ebenfalls wie im vorangegangenen Versuchsteil (mit 2.2 mM Chinin-HCl) nicht signifikant von B1-4 in Bezug auf eine Reduzierung des Arzneistoff-Flux in das Akzeptorkompartiment (Abb. 15).

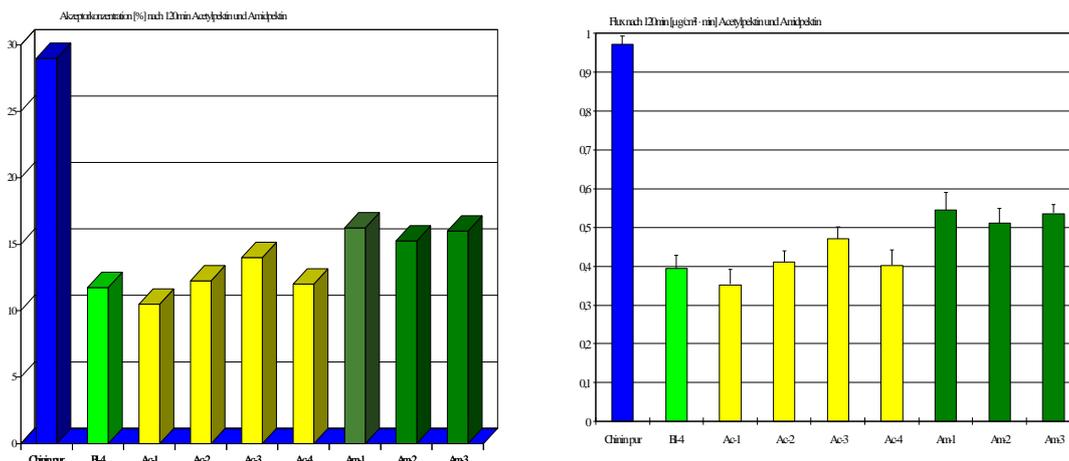


Abb. 15 Prozentuale Chininkonzentration im AK (linke Graphik) und F_{Chi} [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$] (rechte Graphik) bei 120 min Pektin B1-4, Acetylpektin und Amidpektin

3. 1. 6. Permeationsversuche Chinin-HCl 1.1 mM mit Gallensäuren und Mischmizellen

Nach den Pektinderivaten wurden wiederum Transportuntersuchungen mit Gallensäuren bzw. Mischmizellen im Donatorkompartiment durchgeführt.

Auch hier zeigte sich bei der GDCA die stufenweise Abnahme der Akzeptoranreicherung bzw. des Flux bei 5 mM mit zunehmender GDCA-Konzentration oberhalb der CMC. Bei der GCA konnte im Gegensatz zu den Versuchen mit der vorangegangenen doppelten Chininkonzentration (s. Kap. 3. 1. 4) nicht der gleiche Effekt wie bei der GDCA erzielt werden.

Da auch bei weiteren Versuchsreihen mit anderen Lösungsmedien in AK bzw. DK der Einfluß von GCA auf den Chinintransport geringer war als der von GDCA, wurde in allen weiteren Untersuchungen mit Gallensäuren bzw. Mischmizellen ausschließlich das Dihydroxypräparat GDCA als GS-Komponente verwendet. Bemerkenswert ist bei den Ergebnissen vor allem der Wert ab 15 mM GDCA, da hier die Akzeptoranreicherung bzw. der Flux deutlich unter 50 % des Wertes von „Chinin pur“, also ohne GS-Zusatz im Donator, liegt (Abb. 16).

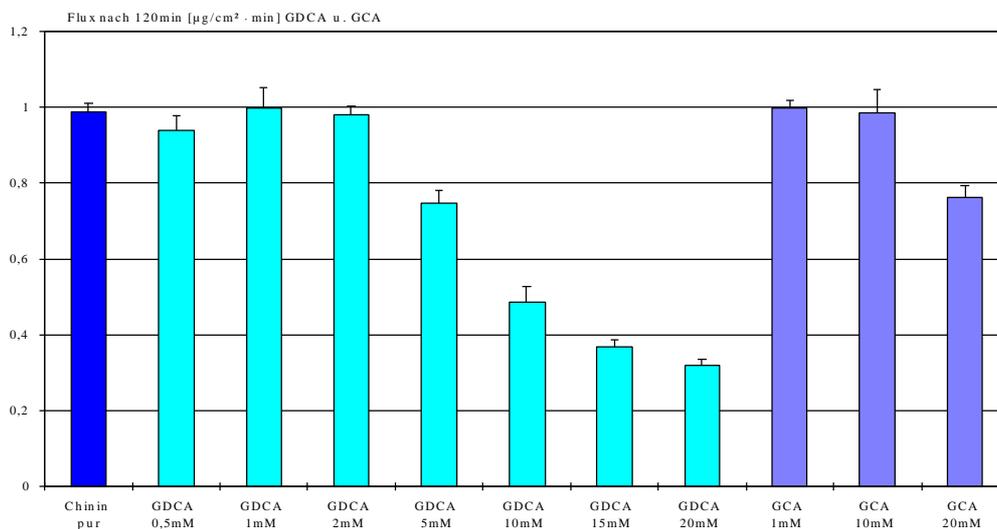


Abb. 16 F_{Chi} [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$] bei 120 min GDCA und GCA

Bei den anschließenden Testreihen mit 1,1 mmol / l Chinin-HCl in Gegenwart von Mischmizellen im Donatorkompartiment war die reduzierte Chinin-Akzeptorkonzentration bzw. Erniedrigung des Flux, die schon bei 2.2 mmol Chinin-HCl-

Ausgangskonzentration als starker Effekt zu finden war, noch deutlicher ausgeprägt. Der Zusatz sowohl binärer als auch ternärer Mischmizellensysteme in das Donormedium resultierte in einem sehr großen Abfall der Transportrate in den Akzeptor, die Reduktion des Flux erfolgte dabei sogar annähernd um den Faktor 10 (Abb. 17).

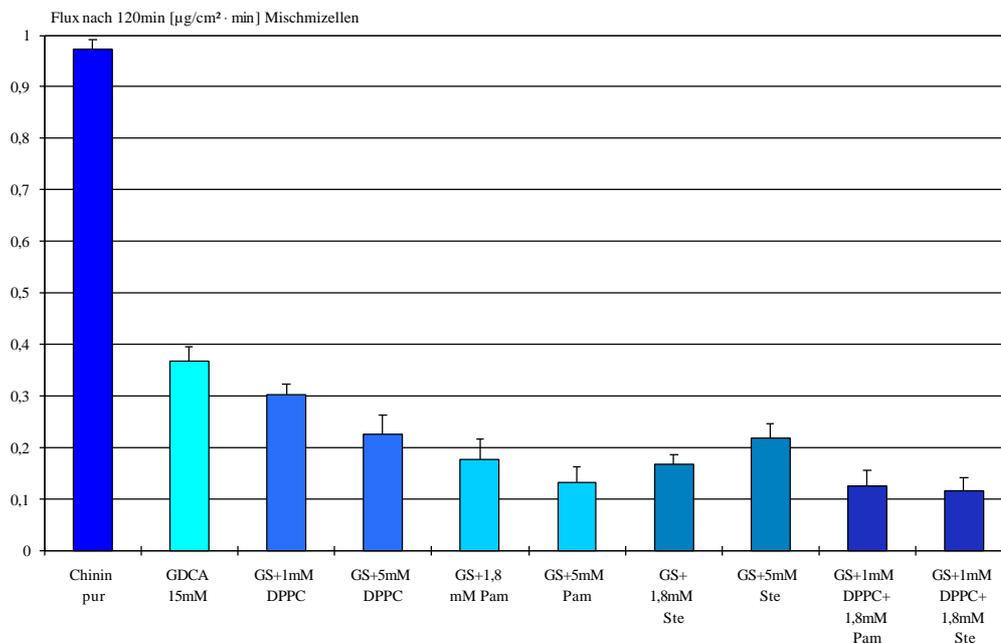


Abb. 17 F_{Chi} [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$] bei 120 min GDCA und GDCA-Mischmizellen*

* GS = GDCA 15mM

In Zusammenfassung der bisherigen Versuche mit einer Konzentration von Chinin-HCl 1,1 mmol/l läßt sich feststellen, daß erneut ein starker Effekt auf den Chinintransport durch die Gegenwart von GS-Mizellen bzw. -Mischmizellen nachgewiesen wurde. Dieser Einfluß war wie bei den vorherigen Untersuchungen mit 2,2 mmol/l Chinin-HCl deutlich stärker ausgeprägt als der von den Pektinderivaten.

Weiterhin wurden die Testreihen mit beiden Chininkonzentrationen mit verändertem Lösungsmedium im Akzeptor (KREBS-HENSELEIT-Puffer pH 7,4; modifiziert nach Poole, Zusammensetzung s. Kap. 6. 1. Methoden) bzw. in Donator und Akzeptor (dabei Phosphatpuffer nach SÖRENSEN pH 6,0 und 8,0 in jeweils beiden Kompartimenten) durchgeführt.

Die Ergebnisse waren im Falle der KREBS-HENSELEIT-Lösung mit den vorangegangenen Versuchen nahezu übereinstimmend bzw. zeigten bei pH 6,0 und 8,0 keine wesentlichen Unterschiede im Permeationsverhalten der einzelnen Präparate zueinander vergli-

chen mit pH 7,2. Auch bei einem Donator-pH 6,0 und 0,1 N HCl im Akzeptor ergab sich keine erwähnenswerte Änderung des Verhältnisses der Transportänderung durch die jeweiligen Donatorzusätze, auch wenn die Fluxrate durch den pH-Gradienten entsprechend verändert werden konnte. Daher soll hier auch nicht weiter auf diese Versuche eingegangen werden.

Ein graphischer Vergleich der Fluxe sowohl nach Pektinzusatz BI-4 als auch bei Anwesenheit von mizellaren Systemen im Donator soll die stärkere Permeationsänderung durch die Affinität des Arzneistoffes zu den Mizellen noch einmal verdeutlichen (Abb. 18).

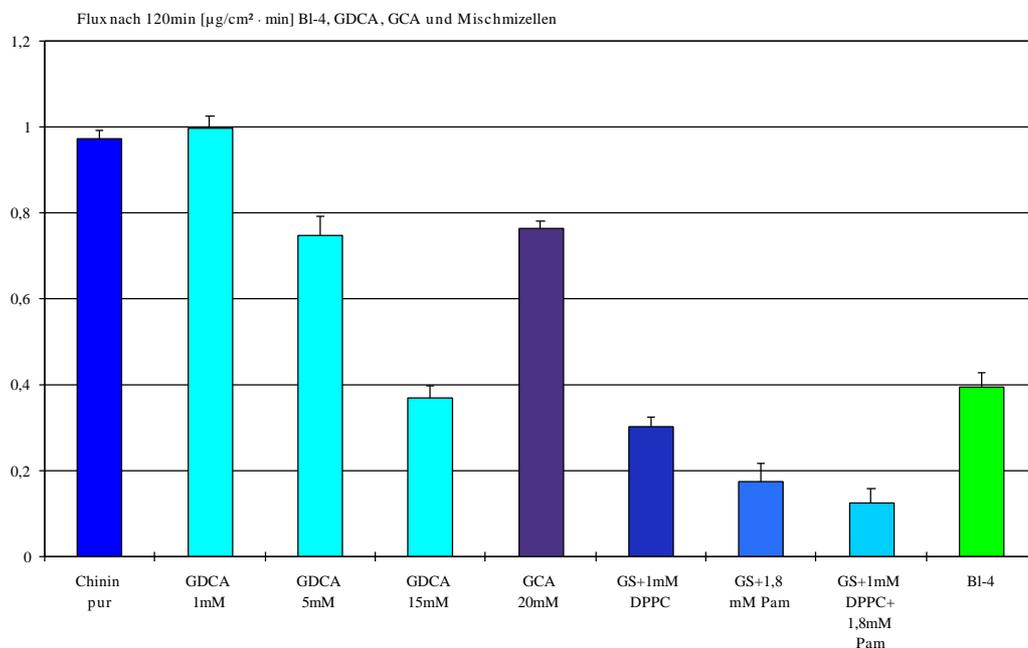


Abb. 18 Vergleich F_{Chi} [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$] bei 120 min BI-4 und GDCA-Mizellen/-Mischmizellen*

* GS = GDCA

In den bisherigen Darstellungen der Ergebnisse des FÜRST-NEUBERT-Modells wurden zur übersichtlicheren Veranschaulichung nur die Ergebnisse der Messungen des Zeitpunktes 120 Minuten wiedergegeben. Als Ergänzung dazu sind in Abbildung 19 die Fluxwerte aller Messzeiten der in Abbildung 18 ausgewählten Präparationen wiedergegeben, um zu verdeutlichen, daß die Transportbeeinflussung die gleichen Unterschiede durch die jeweiligen Donatorzusätze prinzipiell bei allen Messzeiten zeigte (Abb. 19):

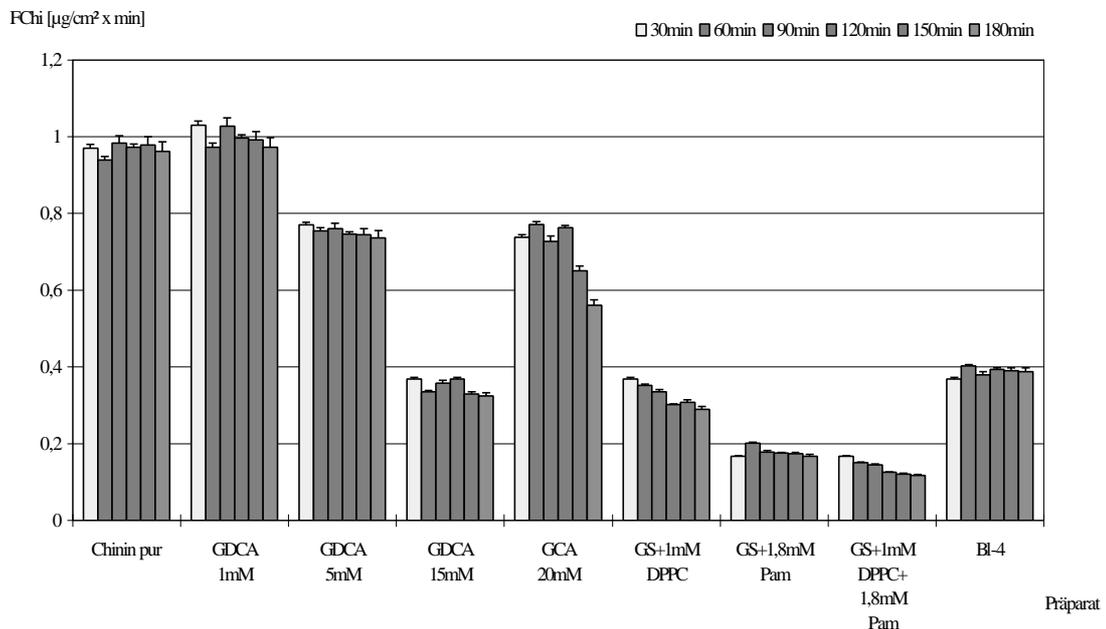


Abb. 19 Vergleich der Fluxe F_{Chi} [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$] für BI-4 und GDCA- Mizellen/-Mischmizellen* für alle Meßzeitpunkte bei den Permeationsversuchen mit dem Modell nach FÜRST und NEUBERT mit Chinin-HCl 1,1 mmol/l

* GS = GDCA

Der starke Abfall des Flux, besonders bei der Anwesenheit von Mischmizellen stand im Verhältnis zur vorangegangenen Chininkonzentration im Donator (2,2 mmol / l bzw. 1,1 mmol / l) und könnte dadurch erklärt sein, daß sich die Chininmoleküle in einer bestimmten statistischen Verteilung in der Mizelle anreichern und diese dadurch thermodynamisch stabilisieren, zusätzliche Chininmoleküle bei höheren Donatorkonzentrationen eher für die Permeation in bzw. nach entsprechender Membrananreicherung durch die Membran zur Verfügung stehen.

Ob sich die im Permeationsmodell nach FÜRST und NEUBERT gefundene Anreicherung der Chininmoleküle in den Gallensäuremizellen bzw. Mischmizellen als relevant für ein vermindertes Transportverhalten *in vivo* erweist, soll in einem nächsten Schritt in einem weiteren *in vitro*-Modellsystem, welches den physiologischen Bedingungen im lebenden Organismus nähersteht, weiter untersucht werden.

3. 2. Permeationsversuche mit der *everted sac*-Technik

3. 2. 1. Grundlagen und Versuchsdurchführung

Nachdem der erste Abschnitt der *in vitro*-Versuche unter Verwendung künstlicher Membranen mit dem Permeationsmodell nach FÜRST und NEUBERT abgeschlossen war, wurde als nächster Schritt der Einsatz einer biologischen Membran mit Hilfe der *everted sac*-Methode durchgeführt.

Das *in vitro*-Modell des gewendeten Darms, auch als *everted sac*-Technik oder Technik des umgestülpten Darms bezeichnet, hat seit seiner Einführung durch WILSON und WISEMAN immer wieder Anwendung für die Charakterisierung der Resorption von Arzneistoffen und möglichen Wechselwirkungen bei diesem Prozess gefunden [24, 219-233].

Beispiele dafür sind u. a. Untersuchungen zur intestinalen Aufnahme von Sulfonamiden und Benzodiazepinen [221], der Effekt der gleichzeitigen Gabe von Kationen und Sulfonamiden [228] oder Studien zum Einfluß verschiedener einwertiger Kationen wie Na^+ oder K^+ auf die Absorptionsrate von Lithium [230].

Bei der Methode des gewendeten Darms werden isolierte Abschnitte des Dünndarms narkotisierter Versuchstiere (Ratte, Meerschwein, Hamster, Maus) zur Möglichkeit der Simulation von Transportprozessen durch eine natürliche Membran benutzt.

Die Vorteile dieses Modells bestehen darin, ohne den Aufwand von Versuchen mit lebenden Tieren durch die Verwendung eines entnommenen bestimmten Darmabschnittes eine nahezu intakte Darmmukosa (mit lebenden Enterozyten) zur Verfügung zu haben, die unter den entsprechenden Voraussetzungen für eine gewisse Zeit auch noch aktive Resorptionsmechanismen besitzt. Daher liegt das Ergebnis näher an den unter physiologischen Bedingungen im Organismus ablaufenden Vorgängen der Nahrungsmittel-Arzneimittel-Wechselwirkungen.

Die Nachteile bestehen neben den interindividuellen Schwankungen zwischen den isolierten Organen der Versuchstiere in einer möglichen Bindung des Arzneistoffes an das Muskelgewebe und die Schleimhaut und einer damit einhergehenden Diffusionsbeeinflussung sowie in der beschränkten zeitlichen Verwendbarkeit. Dabei spielt nach der Entnahme aus dem Versuchstier neben dem Alterungsprozess natürlich auch die Versor-

gung der Darmzellen und damit deren Intaktheit und Überlebensfähigkeit ebenso wie die Geschlossenheit der Zellverbände eine entscheidende Rolle.

Auch ist es zur besseren Vergleichbarkeit unbedingt notwendig, bei der Organentnahme aus den einzelnen Tieren der Versuchsreihe, die natürlich auch möglichst in einem annähernd gleichen physiologischen Zustand (Alter, Gewicht, Füllungszustand etc.) sein sollten, stets die gleichen Darmabschnitte (entweder gemessen vom Magenausgang oder vom Blinddarmbeginn) zu verwenden sowie beim Wenden und Präparieren des Darmabschnittes möglichst gleiche Bedingungen zu haben [220].

Aus bisherigen Veröffentlichungen ist bekannt, daß ca. fünf Minuten nach Versuchsbeginn erste morphologische Veränderungen sichtbar werden können. Dies zeigt sich in einer beginnenden Ablösung des Dünndarmepithels mit gleichzeitiger Hydratation (Wasseraufnahme in die Lamina propria der Mucosa) wie auch in einer Zunahme der Permeation von Versuchssubstanzen [224, 225].

Deshalb ist ein zügiges Arbeiten nach der Organentnahme erforderlich, um den isolierten Abschnitt möglichst innerhalb weniger Minuten in der Versuchsanordnung zu haben. Es ist allgemein üblich, die Versuche nicht viel länger als über 90 Minuten hinweg nach Beginn der Entnahme des Darmstückes durchzuführen [219-231].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuche mit der *everted sac*-Technik in Anlehnung an die Apparaturvarianten von WILSON / WISEMAN bzw. SCHILLING / MITRA mit einer modifizierten Versuchsanordnung durchgeführt [219, 227].

Für die Organentnahme wurden als Versuchstiere Ratten (männlich, Wistar) ausgewählt (Tierdaten, Lösungsmedium etc. s. Kap. 6. 1. Methoden). Zur Kinetik von Chinin bei Ratten gibt es bereits verschiedene Veröffentlichungen, daher konnten sowohl die beim vorliegenden *everted sac*-Modell verwendete Dosis als auch die Konzentrationen auf der Serosaseite gut vergleichbar gemessen werden [234-240].

Die Versuchstiere wurden mit cervikaler Dislokation für die Organentnahme vorbereitet. Als isoliertes Organ wurde ein ca. 10 cm langes Darmstück entfernt, das ca. 3 cm oberhalb des Blinddarms beginnend in Richtung Magenausgang entnommen wurde und unverzüglich in oxygenierte KREBS-HENSELEIT-Lösung gegeben wurde.

Nach einer kurzen Reinigung in KREBS-HENSELEIT-Lösung zur Entfernung des Darminhalts wurde das Darmstück dann auf einen Kunstfaserstab aufgezogen, am Stabende fixiert und durch entgegengesetztes Abrollen gewendet. Dieser gewendete Darmabschnitt wurde dann mit beiden Enden an den Darmhalterungen mittels Catgut befestigt (Ausspa-

zung zur besseren Fixierung s. a. Abb. 20), 5 ml auf 37 ° C temperierter KREBS-HENSELEIT-Lösung als Akzeptormedium eingefüllt und der Darmabschnitt in das ebenfalls auf 37 ° C erwärmte arzneistoffhaltige Donatorkompartiment (25 ml) eingetaucht (Abb. 20).

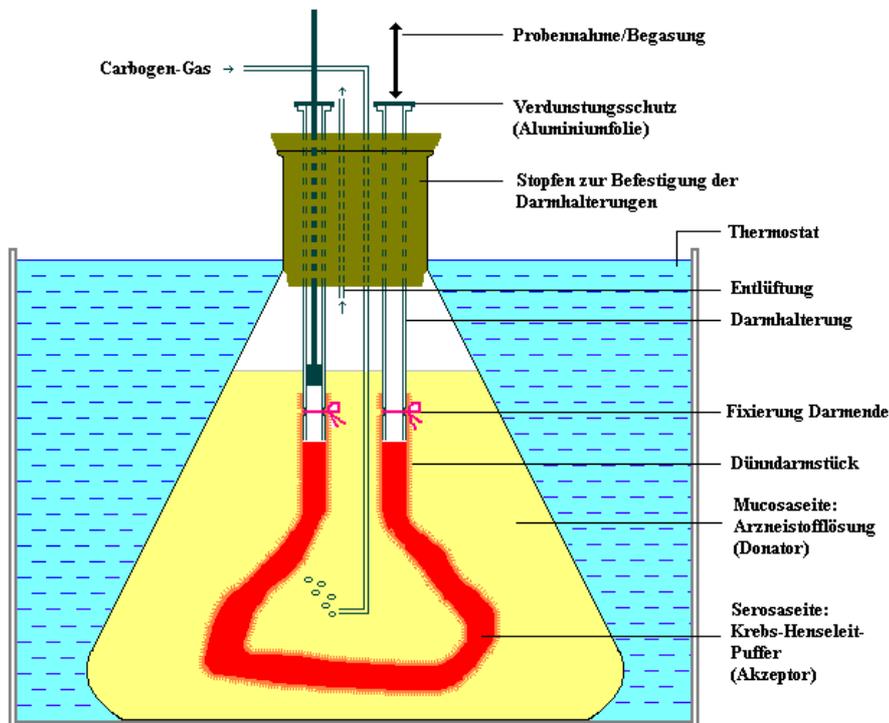


Abb. 20 Schematischer Aufbau der Versuchsanordnung zur Durchführung der Untersuchungen mit der *everted sac*-Technik

Der KREBS-HENSELEIT-Puffer (pH 7,4), der auch als Lösungsmedium für den Donator diente, wurde stets frisch bereitet und in der Versuchsanordnung bereits 30 Minuten vor Versuchsbeginn oxygeniert. Zur Sauerstoffversorgung wurde Carbogengas (95 % O₂, 5 % CO₂) verwendet, welches auch gleichzeitig zur Durchmischung des Donatorkompartiments diente. Es wurden nach jeweils 30, 60 und 90 Minuten Probenvolumina von 0,2 ml aus dem Akzeptorkompartiment entnommen und durch neues Akzeptormedium ersetzt. An dieser Stelle erfolgte eine Durchmischung des Akzeptorkompartiments durch eine fünfminütige Carbogenbegasung auf der Serosaseite.

Eine Probennahme nach 15 Minuten erwies sich in Vorversuchen nicht als sinnvoll, da der Arzneistoff erst nach einer gewissen Verzögerungszeit („lag time“) zur Durchdringung der Barriere auf der Serosaseite gelangt.

Aufgrund der Resultate mit dem Permeationsmodell nach FÜRST und NEUBERT wurden für die *everted sac*-Versuche folgende Donatorlösungen ausgewählt (Tabelle 5):

Tabelle 5 Varianten für die Versuche mit der *everted sac*-Technik

<u>Donatorlösung</u>	<u>Kurzbezeichnung</u>
Chinin 1.1 mmol	Chin. pur
Chinin 1.1 mmol+ 0,5 % BI-4	BI-4
Chinin 1.1 mmol+ 0.5 mM GDCA	GS*
Chinin 1.1 mmol+ 15 mM GDCA	GS
Chinin 1.1 mmol+ 15 mM GDCA+	GS+LE
1 mg/ml Lecithin	
Chinin 1.1 mmol+ 15 mM GDCA+	GS+PA
1.8 mM Palmitinsäure	
Chinin 1.1 mmol+ 15 mM GDCA+	GS+LE+PA
1mg/ml Lecithin+ 1.8 mM Palmitin- säure	

Die Versuche wurden für jedes Donatorpräparat mit mindestens drei Versuchstieren durchgeführt. Die Integrität bzw. Funktionalität des Darmgewebes sollte vor Beginn von Testreihen nach der Isolation aus einem Versuchstier im verwendeten Modellaufbau nachgewiesen werden.

Möglichkeiten dazu sind neben der Messung elektrischer Zellpotentiale und histologischen Studien der Nachweis carriergestützter Transporte von Substanzen wie D-Glucose oder L-Histidin oder die Untersuchung des Adsorptionsverhaltens nicht bzw. schwer transportierbarer Stoffe [212, 241-248]. Letzteres wurde mit Phenolrot durchgeführt und zeigte über 90 Minuten keinen Verlust der Barriereigenschaften des Darmgewebes.

Zur Auswertung wurden die auf der Serosaseite gemessenen bzw. prozentualen (im Vergleich zur Ausgangskonzentration im Donator) Chininanteile nach 90 Minuten herangezogen.

Als weiterer Vergleichsparameter wurde eine theoretische Gleichgewichtstransportzeit $t_{g1/2}$, die sich mathematisch von der Halbtransportzeit $t_{1/2}$ (Gleichung 6 und 7) ableitet, ermittelt [3, 36, 208].

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_t} = t_{g1/2} \quad (6)$$

$$k_t = t^{-1} \cdot \ln c_{CE} / (c_{CE} - c_{AK}) \quad (7)$$

c_{CE} ...Gleichgewichtskonzentration c_{AK} ...Konzentration im Akzeptor t ...Zeit k_t ...Transportkonstante

Die Halbtransportzeit $t_{1/2}$ steht für den Zeitraum, in dem 50 % der im Donator eingesetzten Arzneistoffkonzentration in den Akzeptor übergeht und leitet sich von einer Vereinfachung des 1. FICKschen Diffusionsgesetz (Gl. 1) ab [36].

Da für den Chinintransport im *everted sac*-Modell von einem passiven Transportprozess ausgegangen werden kann und aufgrund der unterschiedlich großen Kompartimente (Donator 25 ml u. Akzeptor 5 ml) der Diffusionsprozess zu einem Konzentrationsgleichgewicht hinstrebt, ist die Verwendung des Begriffes „theoretische Gleichgewichtstransportzeit“ geeigneter.

Allerdings ist diese Gleichgewichtstransportzeit als modellabhängige Größe im vorliegenden *everted sac*-Modell nur ein theoretischer Vergleichsparameter, da die praktisch mögliche Versuchszeit beschränkt ist. Die Berechnung erfolgte mit den Werten der Messung zum Zeitpunkt 90 Minuten. Da in der vorliegenden Arbeit das Verhältnis der Volumina von Donator (Mucosaseite) zu Akzeptor (Serosaseite) 5:1 war, bezieht sich in diesem Fall die transportierte Donatorkonzentration (bei $t_0=1.1$ mmol / l Chinin) auf eine Gleichgewichtskonzentration c_{CE} in 30 ml (also einen Wert von 0,92 mmol / l), wobei der Anteil im Darmgewebe dabei unberücksichtigt bleibt.

Hinsichtlich der Veränderungen im Transportverhalten des Arzneistoffes durch die einzelnen Donatorzusätze besitzt diese theoretische Gleichgewichtstransportzeit eine gute Aussagekraft, vergleichbar mit dem Flux im Permeationsmodell mit der künstlichen Membran, da die veränderte Transportgeschwindigkeit gut verdeutlicht werden kann.

3. 2. 2. Ergebnisse und Diskussion

Die Resultate mit der *everted sac*-Technik bestätigten die Ergebnisse der Untersuchungen mit dem Permeationsmodell nach FÜRST und NEUBERT. Auch hier zeigte sich durch den Zusatz von Gallensäuren oberhalb der CMC eine deutliche Reduktion der Akzeptoranreicherung von Chinin. Das ist insofern bemerkenswert, da durch den Gallensäurezusatz eher eine Transportverbesserung durch die biologische Membran vermutet wurde.

Nur ein Zusatz von 0,5 mM GDCA ergab eine geringfügige Konzentrationserhöhung auf der Serosaseite. Die stärkste Reduktion der Chininpermeation war bei Anwesenheit des binären Systems Glycodeoxycholsäure + Palmitinsäure bzw. des ternären Mischmizellsystems zu registrieren.

Das Ausmaß der Transportreduktion zeigte bei 30 Minuten keine erwähnenswerten Unterschiede, bei 60 und 90 Minuten trat dann allerdings der Effekt deutlich zutage (Abb. 21).

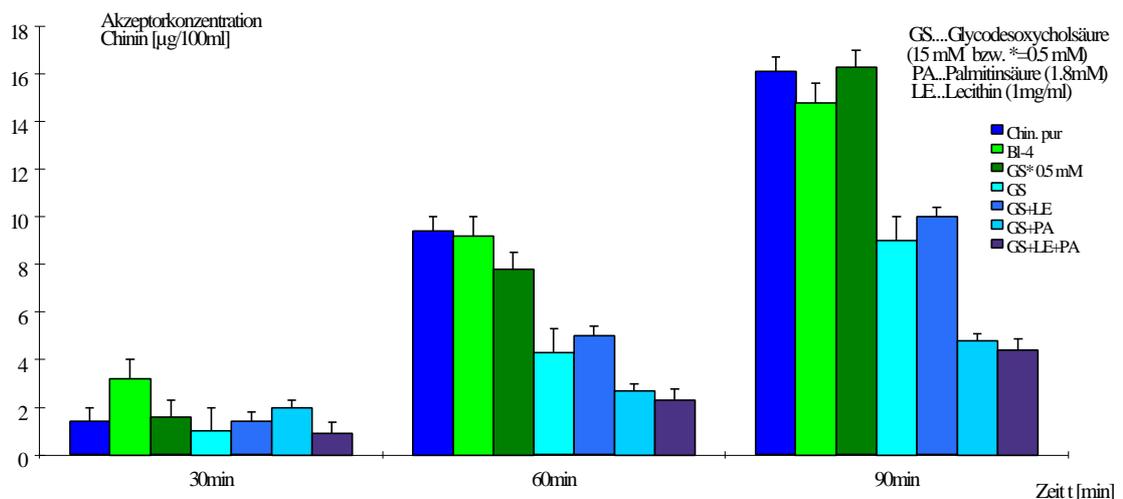


Abb. 21 Chininkonzentration auf der Akzeptorseite *everted sac*-Versuche

Ab einem Zeitpunkt von 60 Minuten wird ausgesprochen deutlich die starke Reduzierung der Transportrate um bis zu ca. 75 %, also um etwa den Faktor 4, erkennbar.

Den Zusammenhang zwischen vermindertem Chinintransport und dem Zusatz von Gallensäuremizellen bzw. Mischmizellen im *everted sac*-Modell verdeutlicht relativ gut auch die theoretische Gleichgewichtstransportzeit $t_{g1/2}$, also der Zeitraum, bis zu dem

beidseits der Barriere eine annähernd gleiche Chininkonzentration erreicht würde (Tabelle 6):

Tabelle 6 Theoretische Gleichgewichtstransportzeit $t_{g1/2}$ *everted sac*-Versuche

<u>Präparat</u>	<u>$t_{g1/2}$ [min]</u>
Chinin pur	94,5 \pm 2,6
B1-4	105,9 \pm 3,4
GS*	92,6 \pm 1,4
GS	198,1 \pm 9,5
GS+LE	174,9 \pm 4,7
GS+PA	398,2 \pm 13,7
GS+LE+PA	440,3 \pm 9,3

n=3

p<0,05 (t-Test nach STUDENT)

Die mit der Methode des isolierten, gewendeten Darms erhaltenen Ergebnisse der Transportuntersuchungen führten somit nicht zu einer erhöhten Aufnahme von Chinin durch dessen Anreicherung in den Gallensäuremizellen bzw. Mischmizellen. Dafür kam es auch bei diesem Modell zu einem erneuten Auftreten des Effektes einer starken Transportverminderung [251, 252].

Während im vorangegangenen Kapitel der verringerte Flux im Permeationsmodell nach FÜRST und NEUBERT bei Anwesenheit von Mizellen durchaus auch die Möglichkeit eines stärkeren Chinintransportes mit Hilfe mizellarer Systeme durch die biologische Membran des Darmgewebes erwarten ließ, könnte die bei Vorhandensein von Gallensäuremizellen auf der Mucosaseite beobachtete Wirkstofftransportverringering neben einer verstärkten Anreicherung im Gewebe auch für eine stärkere Wirkstoffinvolvierung, besonders in den Mischmizellen, als bisher angenommen stehen.

In bestimmten Abschnitten des Darmtraktes findet eine Resorption mizellarer Systeme ebenso statt wie an anderer Stelle durch die Bindung von Gallensäuren bzw. Mizellen an nahrungsbedingte Komponenten (bspw. ballaststoffreicher Fäzes) eine verstärkte Ausscheidung. Da die vorhandene Gallensäurekonzentration und die Zusammensetzung der Mischmizellen wesentlich den Anteil des in den Mizellen angereicherten Arzneistoffs beeinflussen kann, könnte der bisher beobachtete Effekt erklären helfen, warum in der

Literatur zu einigen Arzneistoffen wie Propranolol oder Amphotericin B unterschiedliche Angaben zu Verbesserung bzw. Verschlechterung der Bioverfügbarkeit durch den Zusatz von Gallensäuremizellen zu finden sind [84, 210, 249, 250].

Durch den Einsatz des isolierten Darmabschnittes konnte eine gute Annäherung an die Verhältnisse unter physiologischen Bedingungen gefunden werden. Es soll nun im folgenden Kapitel mittels Durchführung von Zellkulturversuchen untersucht werden, ob die bisher beobachteten Einflüsse durch die GDCA-Mizellen bzw. Mischmizellen auch in einem weiteren, den physiologischen Verhältnissen nahekommenden *in vitro*-Modell der intestinalen Resorption nachgewiesen werden können bzw. das Modell für die Detektion von Einflüssen auf den Arzneistofftransport der lipophilen basischen Modellsubstanz Chinin-HCl durch die Gegenwart von Pektin bzw. mizellaren Gallensäuresystemen geeignet ist.

3. 3. Permeationsversuche mit dem Diffusionskammersystem Snapwell™ unter Verwendung des Zellkultursystems Caco-2

3. 3. 1. Grundlagen und Versuchsdurchführung

Neben den Untersuchungsreihen mit isolierten Darmabschnitten am *everted sac*-Modell wurden auch Untersuchungen zur Transportbeeinflussung von Chinin durch Pektinderivate oder Gallensäuremizellen bzw. Mischmizellen mit einem Zellkultursystem einer Caco-2 Zelllinie (humane Dickdarmkarzinom-Zelllinie) durchgeführt.

Die Verwendung von Zellkulturen mit menschlichen Zellen aus Dickdarmkarzinomen (Adenokarzinomen) zu Studien über das Aufnahme- und Transportverhalten von Arzneistoffen im Intestinaltrakt zählt zu den gängigen Methoden, anstelle oder im Vorfeld von *in vivo*-Versuchen Resorptionsprozesse unter physiologischen Bedingungen nahekommenden Verhältnissen zu untersuchen. Die verwendeten Caco-2 Zellen nähern sich dabei im Laufe ihres Entwicklungsprozesses in ihrer Physiologie sehr den „normalen“ Enterozyten an [243, 253-267].

Der Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit der Verwendung lebender Zellen zur Simulation bestimmter Mechanismen, die beispielsweise carrierabhängig sind, ohne den Einsatz von Versuchstieren oder menschlichen Probanden.

Der Nachteil liegt zum einen in der Empfindlichkeit (Infektionen etc.) und im relativ hohen Handlingsaufwand (Kultivierung) des Systems, zum anderen darin, daß nicht alle Enzyme und Transportsysteme in den Caco-2 Zellen denen in „normalen“ Enterozyten entsprechen, was auch mit ihrer Herkunft aus dem Dickdarm und als Tumorzelle zusammenhängt [243, 253-267].

Im folgenden Abschnitt soll kurz die Präparation des Modellsystems beschrieben werden: Die Caco-2-Zelllinie wurde von der DSMZ (Dt. Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig/D) bezogen. Eine Vermehrungs- bzw. Erhaltungskultur der Caco-2-Zellen erfolgte in T 75-Kulturflaschen bei 37 °C in Gegenwart einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und 95 % normaler Atemluft (höherer CO₂-Gehalt zur Unterstützung der anaeroben Prozesse) sowie 100 % Luftfeuchtigkeit. Zur Versorgung der Zellen im Inkubator (Standardkulturbedingungen) diente das Nährmedium Dulbeccos Mem seromed® mit einem Zusatz von 10 % inaktiviertem fetalen Kälberserum.

Bei ca. 80 %iger Konfluenz des „Zellrasens“ (6 Tage) wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche abtrypsiniert und eine Einzell-Suspension hergestellt. Anschließend erfolgte die Aussaat von jeweils ca. $6,3 \cdot 10^4$ Zellen / cm² in 0,5 ml Kulturmedium auf die Snapwell-Membranen (SnapwellTM, Polyester, 12 mm Durchmesser, Porengröße 0,4 µm), die vorher mit Collagen Typ I beschichtet worden waren.

Auf die Snapwells wurden 2 ml weiteres Medium gegeben und jeweils 6 Snapwells in Sechs-Well-Kulturplatten im Brutschrank bei 37 °C unter sterilen Verhältnissen 19 Tage inkubiert (Standardkulturbedingungen).

Bis zum Erreichen eines konstanten transepithelialen Durchgangswiderstandes (engl. TEER, nach durchschnittlich 15 Tagen erreicht) wurde dieser alle zwei Tage bestimmt. Die homogen mit Zellen bewachsenen Snapwell-Membranen wurden nach der Überprüfung des TEER am Tag 19 für das Permeationsexperiment verwendet. Unmittelbar vor dem Einsetzen in die Diffusionskammer wurde die Konfluenz der Zellschicht mittels Messung des Durchgangswiderstandes nochmals kontrolliert.

Die Diffusionskammern wurden vor dem Einbringen der Snapwells temperiert (während der Versuche erfolgte die Temperierung über ein Thermostat im Halteblock der Kammern) und während der Versuchsdauer über ein Begasungssystem ähnlich dem *everted sac*-Modell begast (Carbogen 95 % O₂, 5 % CO₂), was auch zur Durchmischung der Kompartimente diente.

Die Transportrichtung der Modellsubstanz Chinin (Ausgangskonzentration 2,2 mmol/l) erfolgte von der der Snapwell-Membran abgewandten („Mukosaseite“) zur zugewandten („Serosaseite“) Seite der Zellschicht.

Das Volumen sowohl auf der Donator- als auch der Akzeptorseite betrug bei den Versuchen jeweils 5 ml. Die Versuche wurden für jede Variante mit mindestens drei Snapwells durchgeführt.

Es wurde alle 15 Minuten der elektrische Widerstand [Ω] der Zellschicht durch in das Kammersystem integrierte Elektroden eines Ohmmeters gemessen.

Die Versuchszeit betrug 120 Minuten, nach jeweils 30 Minuten wurde auf beiden Seiten ein Probevolumen von 0,2 ml entnommen.

Das Prinzip des Zellkultursystems und der Aufbau der Diffusionskammer bzw. des Membransystems SnapwellTM ist in Abbildung 21 dargestellt:

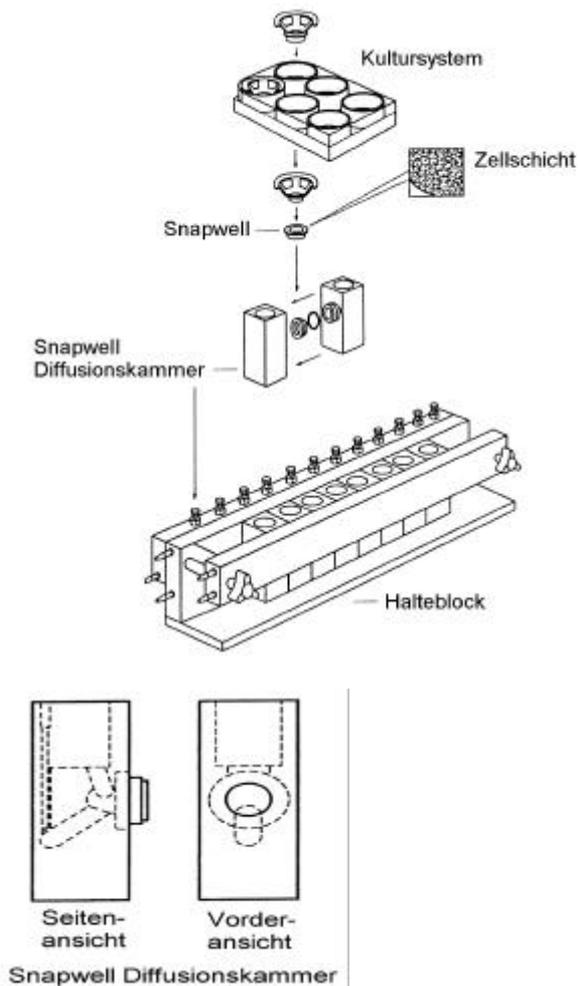


Abb. 22 Prinzip des Zellkultursystems sowie Aufbau der vertikalen Diffusionskammer

Eine Übersicht der eingesetzten Donatorlösungen gibt Tabelle 7:

Tabelle 7 Varianten für die Versuche mit Snapwell™

Donatorlösung

Chinin 1,1 mmol / l
 Chinin 1,1 mmol / l + 0,1% BI-4
 Chinin 1,1 mmol / l + 1 mM GDCA
 Chinin 1,1 mmol / l + 15 mM GDCA
 Chinin 1,1 mmol / l + 15 mM GDCA + 1 mg / ml Lecithin
 Chinin 1,1 mmol / l + 15 mM GDCA + 1,8 mM Palmitinsäure
 Chinin 1,1 mmol / l + 15 mM GDCA + 1,8 mM Palmitinsäure +
 1 mg / ml Lecithin

Kurzbezeichnung

Chin. pur
 BI-4
 GS*
 GS
 GS+LE
 GS+PA
 GS+LE+PA

3. 3. 2. Ergebnisse und Diskussion

Leider erwies sich das System mit einer Caco-2-Zellmonoschicht als nicht sehr geeignet für Versuche mit Gallensäuremizellen.

Durch den Gallensäurezusatz fand schon nach kurzer Zeit eine Zerstörung der Geschlossenheit der Zellschicht („monolayer“) statt. Dieser Umstand wurde durch einen raschen Abfall des gemessenen Widerstandes zwischen den beiden Kompartimenten (trat bei Pektinzusatz nicht auf) sichtbar (Tabelle 8).

Tabelle 8 Gemessene Widerstände [Ω] ausgewählter Zellkulturversuche (n=3)

<u>Zeit [min]</u>	<u>Präparat</u>						
	<i>Chinin pur</i>	<i>Bl-4</i>	<i>GS*</i>	<i>GS</i>	<i>GS+LE</i>	<i>GS+PA</i>	<i>GS+LE+PA</i>
15	250 \pm 8	244 \pm 8	249 \pm 10	75 \pm 4	297 \pm 11	79 \pm 4	252 \pm 6
30	206 \pm 6	236 \pm 6	252 \pm 7	69 \pm 3	102 \pm 5	79 \pm 3	162 \pm 9
45	277 \pm 13	222 \pm 9	223 \pm 10	68 \pm 6	78 \pm 3	74 \pm 4	115 \pm 5
60	195 \pm 4	215 \pm 9	168 \pm 8	66 \pm 8	72 \pm 3	77 \pm 6	101 \pm 4
75	158 \pm 8	213 \pm 10	123 \pm 5	67 \pm 5	70 \pm 4	76 \pm 3	94 \pm 8
90	141 \pm 7	211 \pm 3	103 \pm 6	66 \pm 4	69 \pm 3	76 \pm 1	89 \pm 3
105	117 \pm 5	212 \pm 7	89 \pm 5	66 \pm 5	68 \pm 3	78 \pm 4	85 \pm 5
120	121 \pm 4	209 \pm 9	82 \pm 4	65 \pm 3	66 \pm 3	78 \pm 4	81 \pm 2

Auch wenn aus der Literatur [268-280] bekannt ist, daß die Lebensfähigkeit der Zellen unter den Bedingungen einer Exposition von Gallensäuren weiter gegeben ist, so ist doch durch die Auflösung der Geschlossenheit des Zellverbandes (sicher auch ermöglicht durch die im Gegensatz zum isolierten Darmabschnitt fehlende schützende Schleimhautschicht gegenüber den Gallensäuren) das Ergebnis der Versuche nur von orientierendem Charakter [88, 293].

Trotzdem ist das Ergebnis der Versuche recht interessant. Denn obwohl die Geschlossenheit der Zellverbände („monolayer“) bei Anwesenheit der Gallensäuremizellen bzw. Mischmizellen schon nach sehr kurzer Zeit nicht mehr vorhanden war, verhielt sich der Effekt analog den Permeationsversuchen mit dem Modell nach FÜRST / NEUBERT (s. Kap. 3. 1.). In Abbildung 23 sind dazu die gemessenen Konzentrationen der eingesetzten

Modellsubstanz Chinin auf der Akzeptorseite der Diffusionskammer nach 120 Minuten wiedergegeben:

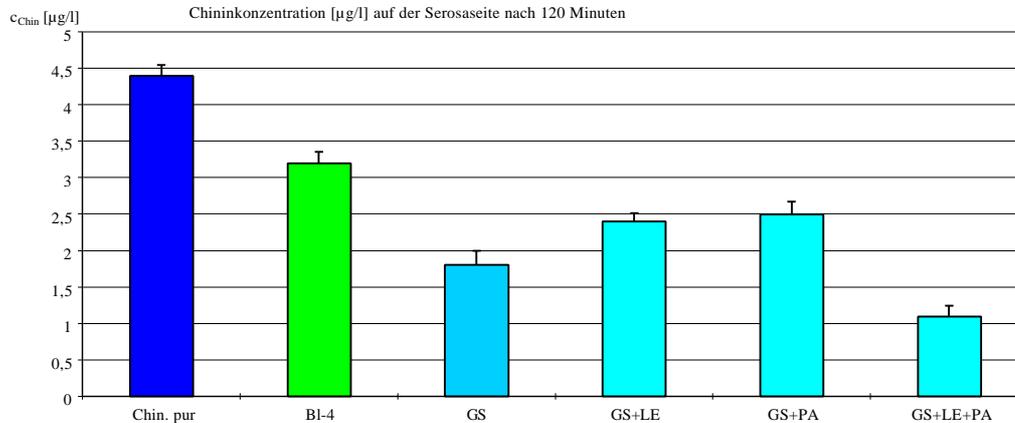


Abb. 23 Chininkonzentrationen [$\mu\text{g/ml}$] auf der Akzeptorseite des Diffusionskammersystems Snapwell™

In Zusammenfassung der Untersuchungsreihen mit dem Zellkultursystem erwies sich dieses als nicht günstig für Studien in Anwesenheit höherer Konzentrationen von mizellaren Gallensäuresystemen, im vorliegenden Falle mit GDCA. Auch der Zusatz von Fettsäure oder Phospholipid zur Bildung stabilerer mizellarer Systeme konnte die rasche Zerstörung der Geschlossenheit der Zellschicht nicht verhindern.

Daher besitzen die Ergebnisse nur orientierenden Charakter und in Anbetracht des hohen Handlungsaufwandes gegenüber beispielsweise dem Permeationsmodell nach FÜRST und NEUBERT oder dem *everted sac*-Modell ist der Einsatz von Zellkulturen zur Detektion von Einflüssen mizellarer Gallensäuresysteme auf den Arzneistofftransport nicht zu empfehlen.

4. Pharmakokinetik-Versuche

4. 1. Grundlagen

Nach der Durchführung der Untersuchungen mit den *in vitro*-Modellen war es im abschließenden experimentellen Teil dieser Arbeit das Ziel, die bisher erhaltenen Ergebnisse auf ihre Übertragbarkeit unter physiologischen Bedingungen zu betrachten. Zu diesem Zweck wurde am Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung Jena eine Serie von Tierversuchen mit einem Kaninchenmodell durchgeführt.

Dabei wurde der Arzneistoff Chinin in gelöster Form in einer wässrigen Donatorflüssigkeit, deren jeweilige Zusammensetzung sich von den vorangegangenen Versuche ableitete, intraduodenal appliziert und anschließend der Chiningehalt im Blut ermittelt.

Die intraduodenale Applikation wurde gewählt, um in einem bestimmten Abschnitt des Gastrointestinaltraktes (Duodenum) die Situation nachzubilden (Wirkstoff Chinin + Gallensäuremizelle bzw. Gallensäure / Phospholipid / Fettsäure-Mischmizelle), die unter dem Einfluß bestimmter Nahrungskomponenten im lebenden Organismus entstehen kann.

Neben den *in vitro*-Methoden, wie beispielsweise Zellkulturen oder der Einsatz isolierter Organe, ist für eine zuverlässige Voraussage von Arzneistoffwirkungen bzw. Wechselwirkungen, außer der Testung der Pharmakokinetik am Menschen selbst, die Untersuchung am intakten Tier die den humanen physiologischen Verhältnissen am nächsten kommende Verfahrensweise. Sicherlich ist eine absolute Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus nicht möglich, aber bestimmte Effekte können im geeigneten Tiermodell sehr gut detektiert werden.

Bei der Auswahl und der Durchführung von Tierversuchen ist natürlich eine Reihe von Voraussetzungen zu beachten. So ist neben den entsprechenden Genehmigungs-Richtlinien und der Beachtung der Bestimmungen des Tierschutzes die Zahl der verwendeten Versuchstiere so gering wie möglich zu halten.

Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Arbeit nur Versuche mit Donatorzusätzen basierend auf mizellaren Systemen von GDCA bzw. GDCA+Palmitinsäure und/oder Lecithin durchgeführt, um die Zahl der Tiere so gering wie möglich zu halten und auf den Einsatz einer pektinhaltigen Chininlösung verzichtet, da die vorangegangenen Ergebnisse

keine so große Wirkstofftransportänderung ergeben hatten wie die Anwendung der Gallensäuremizellen bzw. Mischmizellen.

Der entscheidende Vorteil der Untersuchung von Transportprozessen mittels Tierversuchen im lebenden Organismus ist die Beobachtungsmöglichkeit einer eventuellen Änderung der pharmakokinetischen Parameter des Arzneistoffes durch bestimmte Einflußfaktoren.

Im Vorfeld pharmakokinetischer Untersuchungen steht eine exakte Versuchsplanung unter der Berücksichtigung der Zielstellung, in diesem Fall der Auswirkung der Gegenwart mizellarer bzw. mischmizellarer Systeme von GDCA auf die Kinetik von Chinin. Bei der Auswahl der Tiere ist darauf zu achten, daß der physiologische Zustand (Alter, Geschlecht, Gewicht, Gesundheitszustand etc.) ebenso wie die Haltung (Fütterung, Aufbewahrung etc.), die Nahrungszufuhr während des Versuches und die Versuchsdurchführung (einschließlich der weiteren Verwendung der Tiere) den durch die Aufgabenstellung vorgegebenen Standardbedingungen entspricht.

Im vorliegenden Fall wurden weibliche Kaninchen (Rasse: Weiße Neuseeländer) mit einem Körpergewicht von ca. 3,5 kg verwendet. Die Tiere wurden bis Versuchsbeginn in einem klimatisierten Raum untergebracht und erhielten Standardfutter sowie Trinkwasser *ad libitum*.

Für jeden Versuch der Versuchsreihe wurden vier Tiere eingesetzt. Die Applikation des Wirkstoffes erfolgte über einen Katheder mit einer einmaligen intraduodenalen Dosis von 5 mg / kg KG (Körpergewicht).

Durch diese Verfahrensweise wurde zum einen erreicht, daß die definierte Donatorlösung in den gewünschten Darmabschnitt Duodenum gelangen konnte, und andererseits nicht der Charakter der applizierten Donatorlösung während einer Passage höhergelegener Abschnitte des Gastrointestinaltraktes verändert wurde.

Als Versuchsdauer wurde ein Zeitraum von 360 Minuten festgelegt. Während dieser Zeit wurden alle 30 Minuten 2 ml Blut entnommen, dem Versuchstier 2 ml isotonische NaCl-Lösung i. v. verabreicht und der Blutspiegel von Chinin für die Ermittlung der Invasionskinetik bestimmt. Die verabreichte Dosis von 5 mg / kg KG lehnte sich an bisher erschienene Studien zur Kinetik von Chinin in Ratten und Kaninchen an [281-288].

Ermittelt wurden neben den Blutspiegelkurven (als arithmetische Mittelwerte) die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve von $t = 0$ bis Versuchsende $t = 360$ Minuten („area under the curve“, $AUC_{0-360\text{min}}$), die terminale Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2}$), die Ge-

samtkörperclearance (totale Clearance, Cl_{tot}), das Plasmaspiegelmaximum (c_{max}), der Zeitpunkt des Plasmaspiegelmaximums (t_{max}) sowie die mittlere Verweilzeit („mean residence time, MRT) mit Hilfe der kompartmentunabhängigen Methode [3, 289].

Zur Auswertung der erhaltenen pharmakokinetischen Daten wurde das PC-Programm TOPFIT 2.0 benutzt [290].

4. 2. Versuchsdurchführung

Die Methodik der angewendeten Versuchsdurchführung zur Bestimmung der Pharmakokinetik in Kaninchen nach intraduodener Applikation ist in der Literatur ausführlich beschrieben [291, 292].

Dabei wurden die Versuchstiere (ab 8 h vor Versuchsbeginn keine Verabreichung von Futter) auf einem beheizten Operationstisch fixiert (um die Körpertemperatur aufrechterhalten zu können) und zu Beginn mit einer i. v. Applikation von Pentobarbital (50 mg / kg KG) in isotonischer Kochsalzlösung narkotisiert.

Die weitere Narkose während der Versuchsdauer wurde mit einer Lösung von 0,5 mg / kg / h Xylazin (Rompun[®], Bayer, Leverkusen) und 0,2 mg / kg / h Ketamin (Velonarcon[®], Berlin-Chemie, Berlin), gelöst in isotonischer Kochsalzlösung, aufrechterhalten.

Um die Blutzirkulation immer zu ermöglichen und möglichen Blutgerinnseln vorzubeugen, wurde dem Tier während des Versuches durch eine Infusionspumpe über die Oberschenkelvene heparinisierte (500 I. E. Heparin pro 100 ml) isotonische NaCl-Lösung (36 ml / h) zugeführt. Zur Kontrolle des Kreislaufs des Versuchstieres wurde der arterielle Blutdruck während des laufenden Experiments ständig mit Hilfe einer in der Halsschlagader angebrachten Kanüle überwacht. Die wässrige Donatorlösung mit Chinin bzw. Chinin in Anwesenheit mizellarer Systeme wurde über einen im Duodenum implantierten Katheder entsprechend intraduodenal appliziert.

Die Aufbereitung der halbstündlich entnommenen Blutproben (2 ml) nach sofortiger Versetzung mit 3,13 %iger Citratlösung im Verhältnis 1:1 geschah durch Zentrifugieren (10 min bei 3000 Umdrehungen), anschließender Entnahme des klaren Zentrifugatüberstandes und darauffolgendes Einfrieren bei -20 °C bis zur Analytik mittels HPLC.

Die Zusätze zu den Donatorlösungen von Chinin-HCl (1 mg / ml) in Phosphatpuffer pH 7,2 nach SÖRENSEN sind in Tabelle 9 beschrieben:

Tabelle 9 Versuchslösungen zur intraduodenalen Applikation per Sonde für die *in vivo*-Versuche

<u>Lösung-Nr.</u>	<u>Mizellzusatz</u>	<u>Bezeichnung</u>
I	keiner	Chin. pur
II	15 mM GDCA	GS
III	15 mM GDCA + 1 mg / ml Eilecithin	GS+LE
IV	15 mM GDCA + 1,8 mM Palmitinsäure	GS+PA
V	15 mM GDCA + 1 mg / ml Eilec. + 1,8 mM Palmitinsäure	GS+LE+PA

4. 3. Ergebnisse und Diskussion

Als erster Schritt wurde die Blutspiegelkinetik einer Gabe von Chinin-HCl in Pufferlösung ohne den Zusatz von Gallensäuren untersucht. Dabei zeigte sich ein aus anderen Studien bekannter Verlauf des Wirkstoffprofils (Abb. 24).

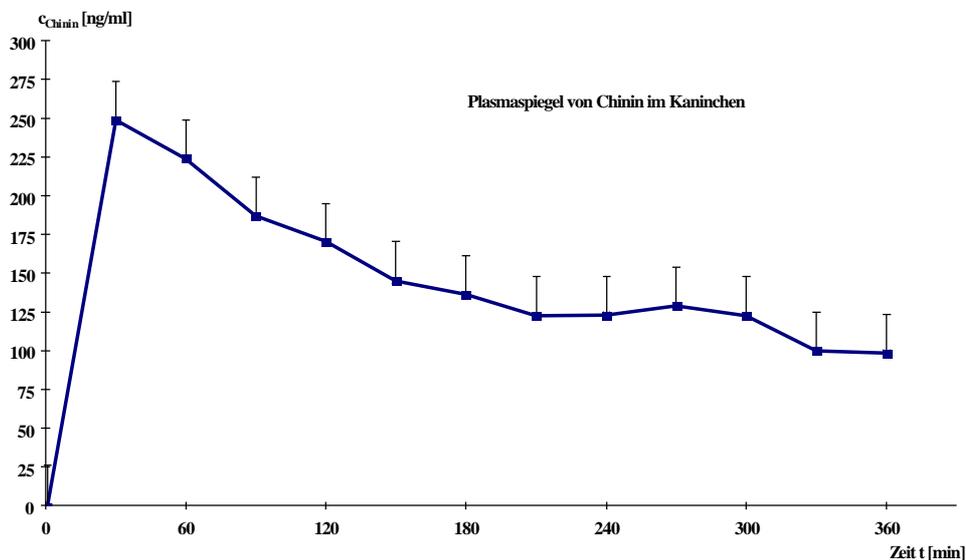


Abb. 24 Verlauf des Plasmaspiegels von Chinin im Kaninchen nach intraduodener Applikation (Dosis 5 mg / kg KG)

Im ersten Abschnitt des Zeitverlaufes ist dabei die überwiegende Invasion genauso gut sichtbar wie die im weiteren Verlauf dominierende Elimination.

In der Zeitspanne zwischen 240 und 300 Minuten wird auch der in der Literatur beschriebene entero-hepatische Kreislauf durch den leichten Wiederanstieg der Chininkonzentration im Blut deutlich erkennbar.

Das Plasmaspiegelmaximum wird wie in der vorliegenden Graphik beim Kaninchen gewöhnlich innerhalb der ersten Stunde erreicht, beim Menschen liegt vergleichsweise dazu dieser Bereich zwischen 1 bis 3 Stunden [201, 281-283].

Als nächster Teilschritt wurde eine mögliche Veränderung der Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes bei der Gabe in einer wässrigen Pufferlösung durch die Anwesenheit von Gallensäuremizellen untersucht. Dafür wurde die Lösung wie in den vorangegangenen *in vitro*-Versuchen mit einer GDCA-Konzentration von 15 mM versehen.

In Abbildung 25 sind beide Plasmaspiegelverläufe (Chinin und Chinin + Gallensäure) dargestellt.

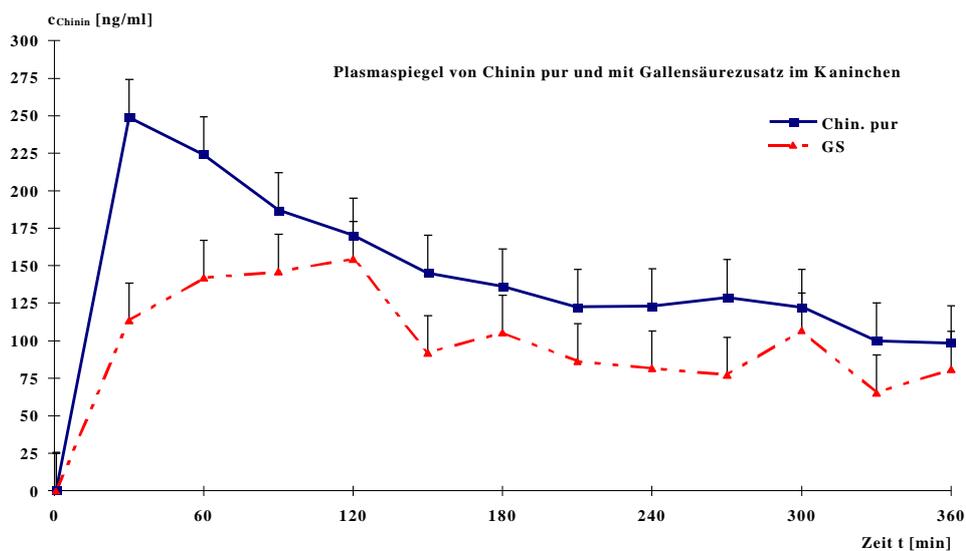


Abb. 25 Vergleich der Plasmaspiegel mit und ohne Zusatz von GDCA

Wie in der Darstellung ersichtlich wird, ergibt sich auch hier wie in den vorangegangenen *in vitro*-Modellversuchen mit der Gallensäure GDCA oberhalb der CMC ein deutlich verminderter Transport von Chinin in das Zielkompartiment, in diesem Falle ein geringerer Plasmaspiegel.

Eswird deutlich, daß das Plasmaspiegelmaximum c_{\max} des Arzneistoffes bei GDCA-

Zusatz oberhalb der CMC in der Applikationslösung auf der Zeitachse sehr weit nach hinten verschoben auftritt.

Im Vergleich der c_{\max} -Meßzeitpunkte 30 Minuten (Chinin pur) und 120 Minuten (Chinin + GS) ist dies ein erheblicher Unterschied. Auffällig ist auch das im weiteren Verlauf des Plasmaspiegelprofils zum einen zeitversetzte (wie beim Konzentrationsmaximum) und zum anderen hier auch stärker hervortretende Erscheinungsbild des enterohepatischen Kreislaufes von Chinin.

Das zeitversetzte Plasmaspiegelmaximum könnte ein Indiz dafür sein, daß auch hier bei den Versuchen in einem lebenden Organismus, wie schon in vorangegangenen Kapiteln der *in vitro*-Transportuntersuchungen erwähnt, eine längerdauernde bzw. ausgeprägtere Assoziation der Chininmoleküle in den GDCA-Mizellen stattfindet als bisher angenommen.

Außerdem ist es auch ein mögliches Anzeichen dafür, daß die im Rahmen des enterohepatischen Kreislaufs in das Darmlumen sezernierte Gallensäure dort vorhandene Chininmoleküle bindet, in diesem Falle aber der intestinalen Resorption eher förderlich ist (daher dann der spätere Anstieg), da durch das bis dahin erfolgte Ausscheiden eines Teils der gegebenen GDCA die Konzentration von 15 mM eventuell deutlich unterschritten wird und hier anstelle der Bindung in der Mizelle eher die resorptionsfördernde Tensideigenschaft im Intestinaltrakt überwiegt.

Weiterhin sind zwei kleinere Plasmaspiegelmaxima bei 180 und 300 Minuten zu erkennen, die zum einen für einen zeitversetzten enterohepatischen Kreislauf, zum anderen für im Rahmen dieses Kreislaufes mittransportierte Chininmoleküle stehen können, also eine Rückresorption von Chinin stattgefunden hat.

In weiteren Teilschritten wurde anschließend dann der Einfluß der Gegenwart von Gallensäure/Phospholipid/Fettsäure-Mischmizellen (als binäre und ternäre Systeme, s. Tab. 9) auf den Blutspiegelverlauf von Chinin betrachtet.

Dabei wurde die GDCA-Konzentration von 15 mM mit entweder 1 mg / ml Eilecithin oder 1,8 mM Palmitinsäure zur Bildung binärer bzw. mit beiden zur Bildung ternärer Mischmizellensysteme ergänzt und analog den vorangegangenen Versuchen intraduodenal appliziert.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen sind in Abbildung 26 wiedergegeben.

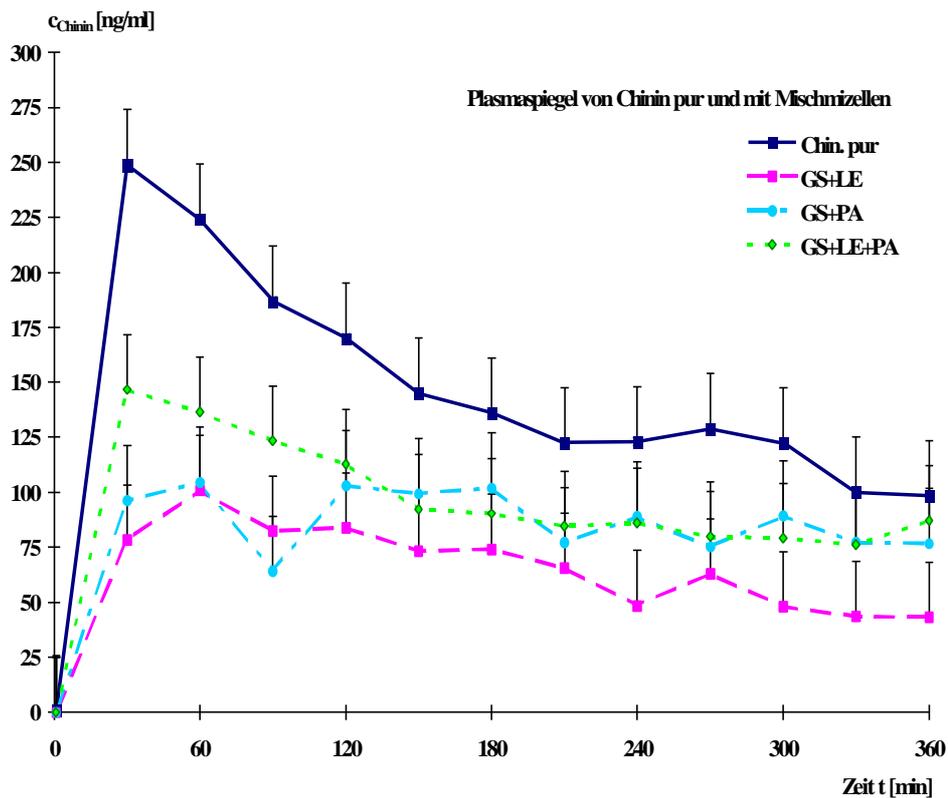


Abb. 26 Vergleich der Plasmaspiegel mit und ohne Zusatz von mischmizellaren Systemen

Bei der Untersuchung der Auswirkung im Duodenum vorhandener mischmizellarer Systeme auf die Plasmaspiegelkinetik des Chinins nach einer einmaligen intraduodenalen Gabe zeigte sich ebenfalls ein niedrigeres Konzentrations-Zeit-Profil im Vergleich zu Chinin ohne weitere Zusätze in der wässrigen Applikationslösung.

Während die Anwesenheit von reinen GDCA-Mizellen das in Abbildung 25 wiedergegebene Verhalten bewirkte, kam es bei den Mischmizellen vor allem im ersten Drittel der Zeitachse zu unterschiedlichen Plasmaspiegelverläufen.

Bei den binären Mischmizellen war die stärkste Reduktion der Blutspiegelkonzentration zu beobachten und das Konzentrationsmaximum war ebenfalls um den Faktor 2-3 versetzt. Dagegen zeigte das ternäre System (GS+LE+PA) eine der zusatzfreien Chiningabe ähnliche Invasions- bzw. Eliminationskinetik, allerdings bei signifikant niedrigerer Plasmakonzentration, die sich dann später dem Profil von Chinin ohne Mizellzusatz annäherte.

Mit fortschreitender Versuchsdauer wurden die Unterschiede im Kurvenverlauf bei allen drei Mischmizelllösungsvarianten immer geringer. Dies ist sicher auch durch die dann

überwiegende Elimination bzw. Ausscheidung sowohl des Arzneistoffes als auch der zugesetzten Mischmizellbildner bzw. durch die im lebenden Organismus ablaufenden Metabolisierungsprozesse der eingesetzten Substanzen bedingt.

Bei den binären Mischmizellensystemen (GS + LE bzw. GS + PA) fällt auf, daß sich die Konzentrations-Zeit-Profile in vielen Punkten zwar nicht signifikant unterscheiden, der Lecithinzusatz insgesamt gesehen aber mit einem geringeren Plasmaspiegel als der Palmitinsäurezusatz verbunden war. Als Erklärung hierfür könnte möglicherweise die vereinzelte Bildung von Ionenpaaren Chinin+Palmitinsäure stehen, die neben der Resorptionsverzögerung durch Arzneistoffbindung in der Mizelle diesen Effekt dann etwas verringern.

Interessant ist in dieser Hinsicht der im ersten Abschnitt mit dominierender Invasionskinetik deutliche Unterschied zwischen ternär (GS + LE + PA) und binär (GS + LE bzw. GS + PA).

Eine Ursache für den höheren Chinin-Plasmaspiegel nach intraduodener Einmalgabe zusammen mit einem mizellbildenden Gemisch aus Gallensäure / Lecithin / Palmitinsäure könnte in diesem Falle ein stärker ausgeprägtes Lösungsvermögen bzw. eine höhere thermodynamische Begünstigung für eine Assoziation des Arzneistoffes in der ternären Mischmizelle darstellen, vorausgesetzt, daß im gleichen Umfang Mizellen wie bei den binären mischmizellaren Systemen aus dem Darmlumen aufgenommen werden.

Des Weiteren könnten auch die schon erwähnten gleichzeitig gebildeten Ionenpaare in Frage kommen, auch könnte eine erleichterte Aufnahme ternärer Mischmizellen mit inkorporiertem Arzneistoff neben einer größeren Chininkonzentration in der Mizelle bei annähernd gleichem Mizellresorptionsumfang in Frage kommen.

Der durch den enterohepatischen Kreislauf verursachte Plasmaspiegelanstieg, der bei alleiniger Chiningabe bzw. reinen Gallensäuremizellen gut erkennbar war, konnte bei der Kombination GDCA + Lecithin ebenfalls deutlich nachgewiesen werden, bei GDCA + LE + PA war er nur als leichtes Plateau sichtbar und bei GDCA + PA wurde während der Versuchsdauer ein unregelmäßiger Verlauf des Konzentrations-Zeit-Profils registriert.

Insgesamt gesehen verursachten auch die mischmizellaren Zusätze zur applizierten wässrigen Chininlösung eine signifikante Abnahme der Bioverfügbarkeit von Chinin bei intraduodener Einmalgabe.

Eine zusammenfassende Übersicht zum Vergleich wichtiger pharmakokinetischer Parameter aller durchgeführten *in vivo*-Versuche gibt Tabelle 10.

Tabelle 10 Pharmakokinetische Parameter von Chinin ohne und mit mizellaren Zusätzen nach intraduodenaler Einmalgabe

<u>Parameter</u>	<u>Chin. pur</u>	<u>GS</u>	<u>GS+LE</u>	<u>GS+PA</u>	<u>GS+LE+PA</u>
n	5	3	3	3	3
AUC _{0-360min} [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}$]	56,92 \pm 1,7	36,33 \pm 1,1	14,44 \pm 0,8	23,15 \pm 0,9	30,87 \pm 0,8
MRT [min]	161 \pm 10,1	168 \pm 8,4	165 \pm 8,7	183 \pm 12,8	167 \pm 4,6
t _{1/2} [h]	4,5 \pm 0,5	5,8 \pm 0,7	4,8 \pm 0,1	10,3 \pm 0,7	6,2 \pm 0,6
c _{max} [ng/ml]	248,4 \pm 62	154,4 \pm 40	100,9 \pm 25	104,7 \pm 28	146,7 \pm 36
t _{max} [min]	30	120	60	60	30
Cl _{tot} [ml/min]	55,1 \pm 4,4	64,5 \pm 3,6	120 \pm 5,2	51,0 \pm 6,8	61,7 \pm 2,9

n = Anzahl der Tiere pro Versuchspräparat

p < 0,05 (t-Test nach STUDENT)

Durch den veränderten Verlauf der Plasmaspiegelkurve ergibt sich auch dementsprechend eine geänderte Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve AUC_{0-360min} des untersuchten Zeitraums von 360 Minuten (auf die Kurvenextrapolation und die Berechnung der AUC₀₋₈ soll hier nicht weiter eingegangen werden, da sich im Verhältnis untereinander der AUC der einzelnen Versuchsvarianten keine weiteren Erkenntnisse ergaben).

Hier wird die starke Resorptionshemmung des Wirkstoffes durch die Gegenwart von mizellaren bzw. mischmizellaren Systemen der GDCA im Duodenum besonders deutlich, man kann gut erkennen, daß auf diesen pharmakokinetischer Parameter ein sehr großer Einfluß ausgeübt wurde. Zur besseren Übersicht dazu soll Tabelle 11 dienen, in welcher das Verhältnis der Erniedrigung der AUC_{0-360min} wiedergegeben wird:

Tabelle 11 Quotient der AUC_{0-360min}-Erniedrigung durch Zusatz mizellarer Systeme bei intraduodenaler Einmalapplikation im Kaninchenmodell

<u>Präparat:</u>	<u>Chin. pur</u>	<u>GS</u>	<u>GS+LE</u>	<u>GS+PA</u>	<u>GS+LE+PA</u>
<u>Quotient:</u>	1	2,3	3,9	2,4	1,8

Während sich bei der mittleren Verweilzeit MRT zwischen den einzelnen Präparationen (s. Tab. 10) kaum ein Unterschied zeigte, ist die starke Änderung der AUC (und damit verbunden der geänderte verfügbare Plasmaspiegel des Arzneistoffes, also letztendlich

der Bioverfügbarkeit im Organismus) doch bemerkenswert. Bei der Halbwertszeit, $t_{1/2}$, ergibt sich für die Versuchsvarianten binäres System GDCA + Palmitinsäure und ternäres System GDCA + Lecithin + Palmitinsäure ein merklich höherer Wert im Vergleich zur Donatorpräparation GDCA + Lecithin, bei der dafür wiederum die höchste Gesamtkörperclearance, Cl_{tot} , zu finden ist.

Als eine Erklärung für die längere Verweilzeit des Chinins in den beiden Systemen mit Palmitinsäurezusatz könnte die neben der Assoziation des Wirkstoffes in den Mizellen auftretende zusätzliche Bindung des Chinins durch die Palmitinsäure (die ohne Gallensäuremizellzusatz im Zuge der Ionenpaarbildung sogar die Resorption erhöhen kann [281, 282]) stehen. Denn für den Effekt einer Einlagerung der Chininmoleküle in den Mizellen und ein vergleichsweise größeres Verbleiben dieser im Darmtrakt steht der in allen Fällen des Plasmaspiegelmimums, c_{max} , auftretende deutlich erkennbar geringere Wert im Vergleich mit der Applikation der Chininlösung ohne Zusatz (Chin. pur).

Einen Gesamtüberblick über alle durchgeführten *in vivo*-Versuche gibt Abbildung 27:

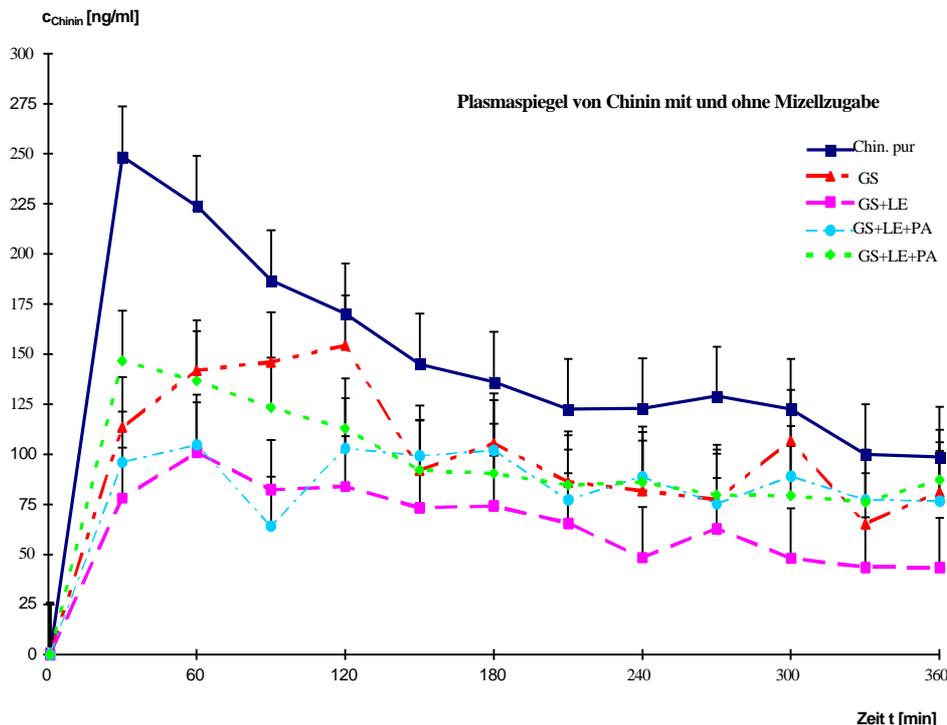


Abb. 27 Einfluß von Zusätzen zur Bildung stabiler GDCA-Mizellen und Lecithin/Palmitinsäure/GDCA-Mischmizellen auf die Pharmakokinetik von Chinin im Kaninchen nach intraduodener Einmalgabe

Als Ergebnis der Versuchsreihen mit intraduodener Einmalapplikation einer wässrigen Chininlösung ohne und mit Zusätzen zur Bildung stabiler GDCA-Mizellen bzw. GDCA-Mischmizellen ergibt sich insgesamt gesehen eine signifikante Beeinflussung, vor allem eine starke Verringerung des Plasmaspiegels bzw. der AUC des Arzneistoffes.

Der in den vorangegangenen *in vitro*-Untersuchungen aufgetretene Effekt eines verminderten Wirkstofftransportes von Chinin in Gegenwart von Gallensäuren wie Glycodesoxycholsäure oberhalb der CMC, verstärkt durch Phospholipid wie Lecithin und Fettsäure wie Palmitinsäure, wurde auch im Tierversuch wiedergefunden.

Die Affinität von Chinin zu Gallensäuremizellen bzw. Mischmizellen, welche in der verwendeten Form auch unter den physiologischen Bedingungen im Organismus in Zusammenhang mit der Fettverdauung auftreten können, konnte nach den vorangegangenen *in vitro*-Modellversuchen auch *in vivo* als transportbeeinflussender Faktor nachgewiesen werden. Im Falle der vorliegenden Ergebnisse führte diese Affinität allerdings zu einer Verringerung des Plasmaspiegels des Arzneistoffes und damit zu einer Reduzierung der Bioverfügbarkeit.

5. Zusammenfassung und Schlußbetrachtungen

Für die abschließende Bewertung der Ergebnisse dieser Arbeit ergibt sich folgende Fragekonstellation (auch in Bezug zur Aufgabenstellung s. Kap. 1, S. 2):

Ist es zum einen gelungen, einen relevanten Effekt für ein *in vitro* verändertes Transportverhalten eines ausgewählten Arzneistoffes zu finden und diesen Effekt dann *in vivo* zu bestätigen, also eine veränderte Bioverfügbarkeit nachzuweisen; und ist es zum anderen möglich, durch eine bestimmte Verfahrensweise bzw. Reihenfolge einzelner Modellsysteme unter validierten Bedingungen für die Detektion von pharmakokinetischen Wechselwirkungen zwischen Arzneistoffen und mit der Nahrungsaufnahme zusammenhängenden Komponenten schnelle und präzise Aussagen zu ermöglichen, d. h., ist das System „praxistauglich“ ?

Für den zweiten Teil ist es natürlich auch von Interesse, für welche Arzneistoffeigenschaften (hydrophil-lipophil, sauer-basisch etc.) diese Verfahrensweise besonders geeignet ist. Zum ersten Fragepunkt, der Suche nach einem veränderten *in vitro*-Transportverhalten bzw. einem Effekt zur Beeinflussung der Pharmakokinetik eines ausgewählten Wirkstoffes konnte ein eindeutiges Ergebnis erzielt werden. Eingesetzt wurde bekanntlich der Modellarzneistoff Chinin, ein basische Substanz mit einer sehr guten Bioverfügbarkeit und ausgewogener Hydrophilie / Lipophilie.

Als nahrungsbedingter Interaktionspartner diente zuerst ein löslicher Ballaststoff, Pektin, mit verschiedenen strukturellen Parametern. Dabei ergab sich, abgesehen von einer immer möglichen Verringerung der Transportrate durch eine Viskositätserhöhung der Donatorlösung bzw. des Darminhaltes durch zugesetztes Pektin (was nicht der Gegenstand dieser Arbeit war), kein für weitergehende Untersuchungen ausreichend bedeutsamer Anhaltspunkt für eine stark veränderte Chininpermeation. Daher wurde dieser Weg auch nicht weiter verfolgt. Ein anderes Bild ergab sich bei dem Einsatz von Gallensäuren, in der vorliegenden Arbeit speziell vor allem von Glycodesoxycholsäure oberhalb der CMC. Hier zeigte sich nicht, wie anfangs auch postuliert werden konnte, eine Steigerung des Transportes durch die (beispielsweise auch membranverändernden) Tensideigenschaften der Gallensäuren im Verdauungsprozess, sondern es kam zu einem, besonders im Falle der binären und ternären mischmizellaren Systeme, Überwiegen des ausgeprägten Effektes einer deutlichen Arzneistofftransportverringerung durch die Anwesenheit der Gallensäuremizellen bzw. Gallensäuremischmizellen der GDCA. Dieser Umstand fand letzt-

endlich seinen Ausdruck in einem gut erkennbar veränderten, signifikant niedrigeren, Plasmaspiegel des Modellwirkstoffes im lebenden Organismus nach intraduodener Einmalgabe. Somit kann der erste Teil der Aufgabenstellung, die Frage nach einem für die Pharmakokinetik bzw. Bioverfügbarkeit relevanten Effekt durch einen nahrungsbedingten Parameter folgendermaßen beantwortet werden:

Der Plasmaspiegel von Chinin kann durch die gleichzeitige Anwesenheit von Glycodesoxycholsäure im Intestinaltrakt oberhalb der CMC (15 mM) signifikant verringert werden. Diese Gallensäurekonzentration ist physiologisch durchaus nicht ungewöhnlich, so konnte beispielsweise in einer Studie nach einer Testmahlzeit im menschlichen Duodenum eine durchschnittliche GS-Höchstkonzentration von 14,5 mM nachgewiesen werden, wobei die GDCA-Konzentration hierbei allerdings großen individuellen Schwankungen unterlag (2,3 - 17 mM) [294]. In diesem Zusammenhang ist natürlich auch die mögliche Veränderung der Gallensäuren in ihrer im Verdauungstrakt vorkommenden Konzentration bzw. ihrem Konzentrationsverhältnis untereinander bei verschiedenen Krankheitsbildern zu erwähnen [295-298]. Eine Verstärkung der Transportreduktion des Arzneistoffes aus dem Darminhalt durch GDCA-Mizellen ist in Gegenwart von Palmitinsäure und / oder Lecithin, die aus der Fettverdauung resultieren, zur Bildung stabiler mischmizellärer Systeme möglich.

Die Affinität von Chinin zu mizellaren Systemen der Gallensäuren, in der vorliegenden Arbeit von Glycodesoxycholsäure, die mittels der mizellaren elektrokinetischen Affinitätschromatographie nachweisbar ist [144], zeigte sich als ein Einflußfaktor, der nach dem Nachweis in verschiedenen *in vitro*-Transportmodellen auch unter physiologischen Bedingungen in einem lebenden Organismus die Bioverfügbarkeit von Chinin entscheidend verändern kann. Der transportverringende Effekt der duodenalen Anwesenheit der GDCA-Mizellen bzw. Mischmizellen bei Chinin ist an dieser Stelle natürlich in die aus der Literatur bisher bekannten resorptionsbeeinflussenden Effekte der Gallensäuren einzuordnen. Denn für eine Anzahl von Arzneistoffen ist durch den Zusatz von Gallensäuren eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit nachgewiesen worden.

Erwähnt werden sollen an dieser Stelle Propranolol [249], Amphotericin-B [250], Ciclosporin [299, 305], Streptomycin [123], Gentamicin [122], Fluorouracil [300] und Bleomycin [301]. Für die erhöhte Aufnahme von Arzneistoffen durch die gleichzeitige Anwesenheit von Gallensäuremizellen bzw. mischmizellaren Systemen, die den Wirk-

stoff dann auch in den Mizellen involvieren, werden dabei mehrere Mechanismen zur Erklärung herangezogen:

Die durch passive Diffusion in allen Darmsegmenten bzw. Na^+ -abhängigen Cotransport (Carriermechanismus: Aufnahme eines Na^+ /GS-Anion-Konjugates von der apikalen Seite des Enterozyten, Ausschleussung des GS-Anions von der basolateralen zur apikalen Seite im Tausch gegen ein anderes Anion wie bspw. HCO_3^- , Wiederherstellung des Na^+ -Gradienten durch die basolaterale Na^+ / K^+ -ATPase) wiederaufgenommenen Gallensäuren transportieren den Arzneistoff als Gallensäure-Arzneistoff-Konjugat [302, 303]; eine gesteigerte Resorption des Wirkstoffes ins lymphatische System (für α -Interferon bisher nachgewiesen, allerdings war der absolute Wert der Aufnahme sehr gering) [305]; eine Erhöhung des Arzneistofftransportes besonders im flüssigkeitsärmeren rektalen Bereich des Intestinaltraktes (allgemein gilt hierbei ein Zunahme des Transportes in distaler Richtung bei Mizellzusatz) durch bessere Verteilung im Zusammenhang mit der erhöhten Löslichkeit des Arzneistoffes; eine Abnahme der Barrierefunktion der Schleimhaut; transzelluläre Mechanismen wie auch eine Steigerung der Membranfluidität und ein erhöhter parazellulärer Transport können bei hohen Gallensäurekonzentrationen und dem Entstehen von mizellaren Strukturen im Intestinum auftreten [24, 122, 300, 306-314]. (Allerdings wird im Zusammenhang mit dem Zusatz hoher Konzentrationen von Gallensäuren zur Bildung mischmizellarer Systeme auch von Störungen der Zellstruktur der Epithelzellen, Freisetzung von Mukosaproteinen und möglichen entzündlichen Reaktionen im Rektalbereich berichtet.). Demgegenüber steht für andere Arzneistoffe wie Bropirimin, Cefadroxil oder Ciprofloxacin eine Verminderung der Resorption durch Gallensäuremizellen bzw. Mischmizellen [299, 315, 316]. Als Ursache für die erniedrigte Bioverfügbarkeit wird u. a. eine verringerte thermodynamische Aktivität des Arzneistoffes nach Aufnahme in den Mizellkomplex, der den Effekt einer erhöhten Lösungsgeschwindigkeit des schwer wasserlöslichen Wirkstoffes überwiegt (Bropirimin) oder eine stärkere Verminderung des aktiven Transportmechanismus im Vergleich zur Erhöhung des passiven Transportes (Cefadroxil) diskutiert [315, 316]. In der Mehrzahl der veröffentlichten Studien wurde für die Verringerung der Arzneistoffresorption durch Mizellen / Mischmizellen die erniedrigte thermodynamische Aktivität des Wirkstoffes durch Aufnahme in die Mizellen, abhängig vom Verteilungskoeffizienten wässrige Phase / mizellare Phase und vom jeweiligen Diffusionskoeffizienten durch die wässrige Schicht auf der Membran („unstirred water layer“), als Ursache diskutiert [131, 317-321].

Weiterhin werden eine verminderte Viskosität der Schleimhaut [322], eine Interaktion der Gallensäuren mit den „tight junctions“ über eine Bindung an Ca^{2+} und eine Änderung der membranständigen Na^+ / K^+ -ATPase zur Begründung aufgeführt [323-326].

Wie ist an dieser Stelle der transportverringere Effekt (der sich einordnet bei Anreicherung in den Mizellen und dadurch verringerte thermodynamische Aktivität in der wässrigen Phase) bei Chinin, welches mittels passiver Diffusion durch die lipidhaltige Membran („membrane lipid bilayer“) permeiert, durch den nahrungsverbundenen Faktor der Gallensäurekonzentration im Intestinaltrakt zu sehen?

Bisher ist zu nahrungsbedingten Einflüssen auf die Pharmakokinetik von Chinin wenig veröffentlicht worden. Eine Studie zur Auswirkung von Grapefruitsaft (hemmt das Enzym CYP3A4 in der Leber, welches wiederum für die Metabolisierung von Chinin hauptsächlich verantwortlich gemacht wird) zeigte keine signifikante Veränderung des Chinin-Plasmaspiegels, sicher auch dem Umstand verbunden, daß Chinin eine sehr hohe orale Bioverfügbarkeit bei geringer Clearance besitzt und somit eine verzögerte Metabolisierung sich kaum rasch auf den Blutspiegel auswirkt [327].

Neben den schon erwähnten Untersuchungen mittels mizellarer elektrokinetischer Affinitätschromatographie [144], die eine sehr hohe Affinität der Chininmoleküle zu mizellaren Systemen von Gallensäuren aufzeigten, finden sich in der Literatur Angaben zu Wechselwirkungen von Chinin mit Phospholipiden (Gleichgewichts-Fluoreszenzspektroskopie: Interaktionen sowohl mit zwitterionischen als auch negativ geladenen Strukturen), während ein Einfluß von Sulfhydrylgruppen der Membranproteine auf den Chinintransport nicht nachgewiesen werden konnte, weiterhin wird über eine Erhöhung des Chinintransportes mit α -Methylpalmitinsäure bzw. durch gleichzeitige Gabe von Hexylsalicylsäure über eine verlängerte mittlere Verweildauer bei i.v. oder Resorptionsbeschleunigung bei rektaler Applikation durch Ionenpaarbildung berichtet [281, 282, 328, 329].

Obwohl die Wasserlöslichkeit von Chininhydrochlorid (löslich in 25 Teilen Wasser) relativ gut ist, wird sie durch die Zugabe der Gallensäure als Solubilisationsvermittler erheblich gesteigert. Daher läßt sich das Ergebnis dieser Arbeit erfolgreich in die bisherigen Veröffentlichungen zur Reduzierung der Bioverfügbarkeit durch Mizellen auf Gallensäurebasis einordnen: die hohe Affinität des lipophilen Arzneistoffes Chinin zu den mizellaren Systemen wiegt schwerer als ein verbesserter Solubilisationsprozess in der wässrigen Pufferlösung.

Allgemein gesehen ergibt sich aus den Resultaten der durchgeführten Versuche und ihrer Interpretation sowie der derzeitigen Literaturlage folgendes Schema zur Prognostizierung von Wechselwirkungen vor allem von Arzneistoffen, die über passive Diffusion resorbiert werden, in wässriger Lösung mit Gallensäuremizellen bzw. Mischmizellen bei einem konstanten pH-Wert:

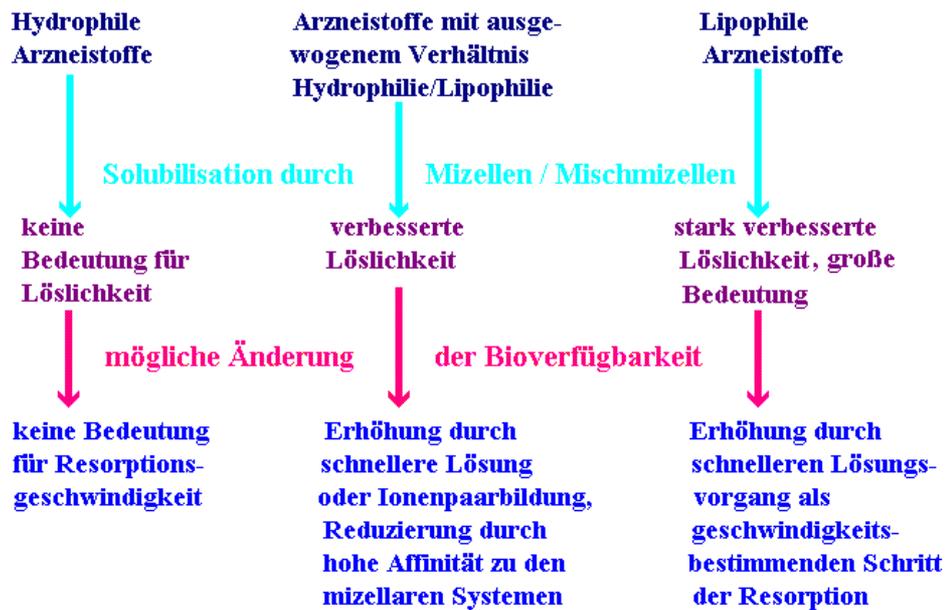


Abbildung 28: Relation zwischen Hydrophilie/Lipophilie eines Arzneistoffes und Bioverfügbarkeitsänderungen durch mizellare Systeme

Die Solubilisation eines Arzneistoffes in wässriger Lösung besitzt mit zunehmender Lipophilie steigende Bedeutung, da bei diesen Stoffen dann der Lösungsvorgang der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Resorptionsprozesses ist. Daher ist in solchen Fällen die Involvierung des Wirkstoffes in mizellaren Systemen resorptionsfördernd. Und natürlich besteht neben der Reduzierung der Bioverfügbarkeit durch Anreicherung in Mizellen auch die Möglichkeit einer Erhöhung durch einen stärkeren Effekt anderer Wechselwirkungen des Arzneistoffes mit den Mizellbildnern. Als ein Beispiel hierfür soll die erhöhte Propranololabsorption durch Ionenpaarbildung mit Taurodeoxycholsäure (der first-pass-Effekt zeigte sich dabei aber unverändert) stehen [249].

Es ist deshalb notwendig, für die Abwägung der Relevanz einer Interaktion des eingesetzten Wirkstoffes mit nahrungsbedingten Komponenten, besonders für Problemärzneistoffe mit geringer therapeutischer Breite durch wenige, aber aussagefähige experimentelle Schritte mögliche Veränderungen in der Pharmakokinetik durch Nahrungseinflüsse berücksichtigen zu können.

Daher ist es von Interesse und stellte auch den letzten Teil der Zielstellung dar: Die Herangehensweise bzw. der Ablauf einer geeigneten Reihenfolge eines Einsatzes verschiedener Transportmodelle, um Interaktionen von Arzneistoffen mit Partnern, die durch nahrungsbedingte Faktoren hervorgerufen werden und die Pharmakokinetik des Arzneistoffes verändern, besser voraussagen zu können.

Als Eckpunkte für eine geeignete Schrittfolge sollen dabei zwei Prämissen gelten: erstens geringstmöglicher Aufwand und zweitens gute Korrelation der *in vitro* erhaltenen Daten mit abschließenden Untersuchungen *in vivo*.

Der erste Schritt wird dabei immer mit von der Überlegung geprägt: welcher gastrointestinaler Resorptionsmechanismus (Diffusion, Konvektion, carriergestützter bzw. aktiver Transport, Pinozytose [330]) ist für den Wirkstofftransport aus dem Gastrointestinaltrakt geschwindigkeitsbestimmend?

Im Falle der passiven Diffusion kommen zahlreiche Transportmodelle, die sich in zwei Gruppen einteilen lassen in Frage (s. Tab. 12). Für die Detektion von Veränderungen von aktiven Prozessen wie der carriervermittelten Resorption oder membranspezifischer Vorgänge wie der Konvektion kommen Membranmodelle zur Anwendung, wobei die aktiven Transportvorgänge mit Hilfe von Membranen natürlichen Ursprunges nachvollzogen werden. Eine Übersicht über gängige *in vitro*-Transportmodelle [15, 205] gibt Tabelle 12:

Tabelle 12 Häufig verwendete *in vitro*-Resorptionsmodelle

Verteilungsmodelle

SCHULMAN-Zelle

Drehkolben nach KOCH

Verteilungsmodell nach DIBBERN

Membranmodelle

Resomat II-Modell nach DIBBERN

Sartorius-Modell nach STRICKER

Membranmodell nach GOLDBERG und HIGUCHI

Durchflußdiffusionskammer nach LAPIDUS und LORDI

Membranmodelle nach FÜRST bzw. FÜRST / NEUBERT

MOLL-BENDER SCHE-Drehscheibenzelle

everted sac-Methode

Für den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modellarzneistoff gilt ein passiver Diffusionsvorgang als Resorptionsmechanismus, daher war als erster Schritt ein einfaches Membranmodell unter Verwendung einer künstlichen Membran günstig.

Eingesetzt wurde das Permeationsmodell nach FÜRST und NEUBERT, und wie sich später herausstellte, erwies sich die dort gefundene Veränderung des passiven Diffusionsprozesses als später *in vivo* nachweisbar.

Als nächster Schritt schloß sich der Einsatz einer Membran natürlicher Herkunft an. Dies ist insofern sinnvoll, als daß neben dem Einfluß der nahrungsbedingten Faktoren, die eine Verschiebung des im nüchternen Zustand geschwindigkeitsbestimmenden Schritts des passiven Transportvorgangs bewirken können (an dieser Stelle sei nur an die erhöhte Löslichkeit von Griseofulvin bei Anwesenheit von lipidreicher Nahrung erinnert [1, 331]), auch eine Änderung bis dahin nicht berücksichtigter aktiver Transportmechanismen stattfinden kann. Auch hier erwies sich das gewählte Modell, die *everted sac*-Methode unter Nutzung eines isolierten Organs als brauchbar hinsichtlich des Resultates in Bezug auf den Vergleich der Ergebnisse *in vitro* / *in vivo*. Der darauffolgende Schritt der Verwendung einer Zellkulturlinie von Caco-2-Zellen erwies sich durch die hohe Empfindlichkeit gegenüber Gallensäure in physiologischer Konzentration als nicht geeignet zur Untersuchung von nahrungsbedingten Interaktionen. Im letzten Schritt wurden im lebenden Organismus die durch die vorangegangenen *in vitro*-Versuche ausgewählten relevanten Interaktionen überprüft.

Zusammenfassend empfiehlt sich folgende Herangehensweise für die Untersuchung nahrungsbedingter Veränderungen in der Pharmakokinetik eines Arzneistoffes mit passiver Resorption:

1. Membranmodell mit künstlicher Membran
(pH angenähert an Verhältnisse im Gastrointestinaltrakt)
2. Methode unter Verwendung isolierter Darmabschnitte
3. Überprüfung ausgewählter *in vitro*-Ergebnisse *in vivo*

Abschließend läßt sich feststellen: das Transportverhalten des ausgewählten Arzneistoffes Chinin wird *in vitro* durch die Anwesenheit von mizellaren bzw. mischmizellaren Systemen der Glycodeoxycholsäure deutlich verändert, diese Ergebnisse konnten *in vivo* bestätigt werden, eine geeignete Schrittfolge von Transportmodellen zur Detektion phar-

makinetischer Interaktionen von Arzneistoffen mit nahrungsbedingten Komponenten wurde gefunden.

Wie das Ergebnis der Arbeit deutlich macht, kann durch Nahrungseinflüsse die Bioverfügbarkeit und damit letztendlich auch die Wirksamkeit eines Arzneimittels entscheidend verändert werden. Im Zuge einer optimalen Versorgung des Patienten und damit auch im Rahmen des „pharmaceutical care“ ergibt sich daraus die Notwendigkeit, weitere Arbeiten auf diesem Gebiet voranzubringen, um dann entsprechende Einnahmeempfehlungen geben zu können.

6. Anhang

6. 1. Methoden

Herstellung der Pektinderivate

Herstellung von sehr hoch verestertem Pektin

Als Ausgangspektin wurde ein handelsübliches Apfelpektin (s. Chemikalienliste) verwendet. Dieses wurde 24 Stunden bei 20 °C im Vakuum getrocknet und 2 Wochen lang bei 4 °C mit einem Gemisch aus 800 ml absolutem Methanol und 80 ml konzentrierter Schwefelsäure behandelt. Nach Tag 3 und Tag 7 wurde die flüssige Phase erneuert. Am Ende der Veresterungszeit wurde das saure Medium über eine Fritte abgesaugt.

Danach wurde zunächst mit Methanol, dann bis zum negativen Nachweis von Sulfationen mit 80 %igem Ethanol und schließlich mit 96 %igem Ethanol und zum Schluß mit Aceton gewaschen. Das Produkt wurde anschließend an der Luft und dann im Vakuum getrocknet.

Herstellung von Pektinen mit blockweiser Anordnung freier Carboxylgruppen

Zur Bildung von Pektinpräparaten mit einer blockweisen Anordnung freier Carboxylgruppen wurde eine Entesterung mit Orangen-Pektinesterase durchgeführt. Für die Durchführung wurden 25 g des sehr hoch veresterten Pektins (25 g bezogen auf den Anhydrogalakturonsäuregehalt) in 1,75 l H₂O, welches 0,15 M NaCl und 0,0025 M Na-Oxalat zur Enzymaktivierung enthielt, gelöst und auf 30 °C temperiert.

Der pH-Wert, der bei ca. 3,3 lag, wurde mit 0,5 M NaOH auf pH 7,5 eingestellt. Dann erfolgte eine Zugabe von 20 mg Orangen-Pektinesterase und eine pH-stat-Titration bis zum Verbrauch der berechneten Laugenmenge. (Zur Entesterung von 25 g AG (= 0,1452 mol / l AG) ist ein Verbrauch von 29,03 ml 0,5 M NaOH erforderlich.). Der zeitliche Verlauf der Entesterungsreaktion wurde verfolgt. Durch Zugabe von 12 ml halbkonzentrierter HCl unter Rühren wurde die enzymatische Reaktion abgebrochen (Einstellung des pH-Wertes auf ca. 2,0), und die Pektinlösung wurde 15 Minuten bei 90-95 °C zur Enzyminaktivierung erhitzt. Anschließend wurde die Pektinlösung abgekühlt und in 50 %igem Ethanol gefällt, die Abtrennung des Pektinkoagulates geschah durch Zentrifugieren bei 6000 U / min und 4 °C. Der Rückstand wurde fünfmal unter Rühren und Zentrifugieren

mit 50 %igem Ethanol gewaschen, mit 80 %igem, 90 %igem Ethanol und Aceton behandelt und getrocknet.

Herstellung der Amidpektine

Zur Herstellung der Amidpektine wurden je 40 g des hochveresterten Ausgangspräparates (bezogen auf AG-Gehalt) mit 240 ml gekühltem Ethanol verrührt und dann mit 160 ml 25 %iger Ammoniaklösung versetzt. Diese Mischung wurde je nach gewünschtem Amidierungsgrad stundenweise in einer verschlossenen Schliffstopfenflasche bei 4 °C unter häufigem Umschütteln zur Reaktion gebracht. Zum Beenden der Amidierung wurde die flüssige Phase über eine Nutsche mit dickem Filtrationstuch abgesaugt und dann zweimal mit 500 ml 60 %igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurden die Präparate in 500 ml 60 %igem Ethanol mit 5 % konz. HCl 10 Minuten gerührt, und dann nach Absaugen der flüssigen Phase mit Ethanol bis zum negativen Nachweis von NH_4Cl gewaschen und vor dem Trocknungsprozess mit 96 %igem Ethanol und Aceton behandelt.

Herstellung der Acetylpektine

Zur Gewinnung der Acetylpektine wurden 25 g Ausgangspräparat (hochverestertes Pektin) zunächst in 400 ml Formamid gequollen und 1 Stunde bei 50 °C gerührt, dann wurden 200 ml Pyridin zugegeben, und nach einer weiteren Stunde Behandlung bei 50 °C wurde auf 30 °C abgekühlt. Darauffolgend wurde unter Rühren langsam die vorgesehene Menge an Acetanhydrid zugegeben, bei 20 °C 12 Stunden stehengelassen und dann in 3 l Ethanol, der 150 ml konz. HCl enthielt, eingerührt. Nach Absaugen und mehrfachem Waschen mit zuerst 90 %igem Ethanol mit 10 ml konz. HCl/l, später 96 %igem Ethanol, wurde das erhaltene Produkt schließlich getrocknet (zuerst an der Luft, dann im Vakuum).

Herstellung der im Molekulargewicht differenzierten Pektinpräparate

Die Mechanolyse der Präparate A-10 und A-100 (A-0 keine Mechanolyse) erfolgte im trockenen Zustand mit einer Schwingmühle („Vibrator“, Fa. Siebtechnik GmbH, Mühlheim/D) über 10 bzw. 100 Stunden. Bei der Mechanolyse wird der Veresterungsgrad nicht verändert.

Viskositätsbestimmung

Um ausschliessen zu können, daß die Effekte auf den Arzneistofftransport nur auf Änderungen der Viskosität der Ausgangslösung beruhten, wurden die Viskositäten der verwendeten Donatorlösungen bestimmt. Die Viskositätsmessungen erfolgten mit einem Rotationsviskosimeter (Fa. Physica, Stuttgart/D) mit einem Doppelspalt-Meßsystem Z 1

DIN. Als Lösungsmedium für die Donatorpräparate diente Phosphatpuffer pH 7,2 nach SÖRENSEN: Nach einer Temperierphase von 3 min wurde bei 37 °C innerhalb von 5 min das Schergefälle linear bis auf 1200 s⁻¹ erhöht (90 Meßpunkte), die sich hierbei einstellenden Schubspannungen als Hinkurve registriert (mPa), und anschließend durch die Verminderung des Schergefälles die Rückkurve aufgenommen. Die Auswertung der Meßpunkte erfolgte rechnergestützt. Alle Lösungen besaßen Newtonsches Fließverhalten. Zur leichteren Übersicht erfolgt in Tabelle 13 nur die Angabe der am häufigsten verwendeten Donatorlösungen.

Tabelle 13 Viskositäten eingesetzter Donatorlösungen

<u>Donatorlösung</u>	<u>Viskosität h [mPas]</u>	<u>Anpassung r^{2*}</u>
Chinin pur 1,1 mM	0,094	99,96
Bl-1	3,9	99,91
Bl-2	2,79	99,93
Bl-3	3,11	99,93
Bl-4	2,62	99,78
Ac-1	1,72	99,9
Ac-4	3,2	99,87
Am-2	2,25	99,82
Am-3	2,12	99,86
GDCA 5 mM	0,098	99,96
GDCA 15 mM	0,095	99,91
GDCA + PA	0,097	99,71
GDCA + LE	0,097	99,88
GDCA + PA + LE	1	99,91

* r^2 entspricht der prozentualen Anpassung der Meßdaten an ideales Newton'sches Verhalten bei der rechnergestützten Auswertung

Viskositätszahl

Die Viskositätszahl $[\eta]$ steht bei der Charakterisierung von Pektinpräparaten empirisch in Beziehung zum Molekulargewicht durch die MARK-HOUWINK-Beziehung [332]. Bestimmt wird diese Größe bei 25 °C im Ubbelohde-Viskosimeter. Als Lösungsmedium dient dabei für hochveresterte Pektine (VG > 50 %) 0,155 M NaCl-Lösung bzw. für niederesterte Pektine 0,05 M NaCl- / 0,005 M Na-Oxalat -Lösung.

Permeationsmodell nach FÜRST und NEUBERT

Herstellung der Dodecanol-Collodium-Membranen

Zur Produktion der künstlichen Membranen wurde eine Mischung aus 4 g Dodecanol (Dodecylalkohol) in Ether / Ethanol (8,5:1,5 Vol.%) ad 100 g und 4 %iger Collodiumlösung DAC 1986 im Masseverhältnis 1:1 hergestellt. Davon wurden anschließend 70 ml auf die plangeschliffene Glasplatte eines Filmziehgerätes (institutseigene Herstellung) gegeben, mit Hilfe einer Abziehvorrichtung (in definierter Spalthöhe von der Glasplatte entfernt) homogen verteilt und zur Verdunstung der Lösungsmittelanteile ca. 12 Stunden stehengelassen.

Im Anschluß daran wurde die Membranfläche mit dest. Wasser 20 Minuten bedeckt, von der Glasplatte abgezogen, zwischen Filterpapier ca. 12 Stunden getrocknet, für die Permeationszelle geeignete kreisrunde Membranen mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten (Durchmesser ca. 1,5 cm größer als eigentliche Permeationsfläche der Permeationszelle) und bis zur Verwendung zwischen Filterpapier im Exsikkator bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Versuchsdurchführung und Berechnungen

Die Versuchsdurchführung erfolgte wie im Kapitel 3. 1. 2., S. 22ff., beschrieben. Auf die Chininbestimmung mittels HPLC sowie die Statistik wird im Kapitel 6. 1. (Methoden) noch gesondert eingegangen. Die Ermittlung der Parameter F_{Chi} und c_{kor} erfolgte wie im Kapitel 3. 1. 2. auf Seite 26ff. erläutert.

everted sac-Technik

Versuchsaufbau

Die Präparation des Darmstückes und die Beschreibung der Versuchsanordnung findet sich im Kapitel 3. 2. 1., S. 41ff., der Integritätstest des Darmgewebes mit der verwendeten Versuchsanordnung (institutseigene Herstellung) wurde mit Phenolrot durchgeführt. Zur Oxygenierung diente Carbogengas (95 % O₂, 5 % CO₂) der Fa. Messer Griesheim GmbH, Krefeld / D. Die Intensität des aus der Druckflasche kommenden Gases wurde über einen zwischengeschalteten Druckminderer geregelt. Die Zuleitung erfolgte über dünne Silikonschläuche.

Zur Fixierung der Darmenden diente Catgut (Traumafil® Polyester Steril AB-DDR, Fadedicke 00 der Fa. Catgut, Markneukirchen/D). Die Herstellung des KREBS-HENSELEIT-Puffers (modifiziert nach POOLE [205]) erfolgte nach folgender Vorschrift:

KCl 5 mmol, KH₂PO₄ 6 mmol, NaHCO₃ 25 mmol, NaCl 117 mmol gelöst in 1000 l H₂O (pH-Wert bei 37 °C: 7,4).

Tierdaten

Als Versuchstiere wurden männliche Ratten des Auszucht-Stammes Wistar (Fa. Charles River, Sulzfeld/D) mit einem Körpergewicht von ca. 300 g verwendet. Die Tiere wurden bis zur Organentnahme nach cervikaler Dislokation in einem ruhigen, klimatisierten Raum (Temperatur 23 °C \pm 1 °C) mit natürlicher Tag-Nacht-Helligkeit in Polycarbamat-Käfigen Typ III (400 x 250 x 150 mm) mit Edeltstahlgitter in Gruppen zu je 3 Ratten, geschützt vor direkter Sonneneinstrahlung und Zugluft, gehalten. Als Futter diente Altromin[®]-Haltungs-Diät, als Trinkflüssigkeit Leitungswasser aus einer automatischen Nippeltränke.

Versuchsdurchführung und Berechnungen

Die Durchführung der Versuche mit der *everted sac*-Methode erfolgten wie im Kapitel 3. 2. 1., S. 43ff. beschrieben, die Chininkonzentration wurde wie in jedem Versuchsabschnitt dieser Arbeit mit Hilfe der HPLC-Analytik bestimmt. Die Berechnung des Parameters $t_{g1/2}$ ist im gleichen Kapitel auf Seite 44 zu finden.

Permeationsversuche mit Zellkultur

Kultivierung und Versuchsvorbereitung

Die Präparation des Modellsystems wird im Kapitel 3. 3. 1., S. 48ff., vorgestellt. Das Diffusionskammersystem SnapwellTM (incl. Halteblock, Begasungssystem und Diffusionskammerelektroden) wurde von der Fa. Costar, Bodenheim / D bezogen. Das zur Versorgung der Zellen eingesetzte Nährmedium Dulbeccos Mem seromed[®] kam von der Fa. Biochrom KG, Berlin / D und hatte folgende Zusammensetzung: 500 ml enthielten 3,7 g / l NaHCO₃, 4,5 g / l D-Glucose, 10 % inaktiviertes fetals Kälberserum L-627, 1 % L-Glutamin, 1 % Na-Pyruvat. Die Begasung erfolgte mit Carbogengas analog den Versuchen mit der *everted sac*-Technik.

Versuchsdurchführung

Die Versuchsdurchführung wird im Kapitel 3. 3. 1., S. 49ff., beschrieben. Zur Chininkonzentrationsbestimmung wurde das entnommene Probevolumen mittels HPLC untersucht. Zur Messung des TEER wurde das „Epithelial Voltometer EVOM“ (Fa. World Precision Instruments, Berlin / D) benutzt.

Pharmakokinetik-Versuche

Versuchsdurchführung und Berechnungen

Das eingesetzte Kaninchenmodell des Hans-Knöll-Institutes für Naturstoff-Forschung Jena ist in der Literatur [291, 292] erläutert und wird im Kapitel 4. 1., S. 54ff., vorgestellt. Die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter $AUC_{0-360\text{min}}$, $t_{1/2}$, Cl_{tot} , c_{max} , t_{max} und MRT wurde mit Hilfe des PC-Programmes „TOPFIT 2.0 Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis System for the PC“ durchgeführt [290]. Die Probengewinnung erfolgte nach den Empfehlungen der Tierärztlichen Vereinigung für den Tierschutz e. V. (1991) „Hinweise zur Blutentnahme bei kleinen Versuchstieren“. Alle Lösungen wurden wie bei allen anderen Untersuchungen dieser Arbeit vor Versuchsbeginn frisch zubereitet. Die Applikation erfolgte per Sonde intraduodenal mit einer Dosis von 5 ml / kg Körpermasse. Die Tiere erhielten ab 8 Stunden vor Versuchsbeginn nur noch Trinkwasser. Der Beginn der Versuche war stets morgens 6.00 Uhr. Der Blutdruck wurde permanent überwacht und bewegte sich bei allen Versuchen im Normalbereich für Kaninchen von 120 / 110 bis 90 / 100 (syst / diastol.). Zur Aufrechterhaltung der Blutzirkulation und zur Vorbeugung von Blutgerinnseln wurde über eine Infusionspumpe heparinisierte NaCl-Lösung (ca. 36 ml / h), angepasst an den gemessenen arteriellen Druck, intraarteriell appliziert. Die Entnahmesysteme (Kanülen, Schläuche) wurden mit der heparinisierten, isotonischen Kochsalzlösung gespült (500 I. E. Heparin / 100 ml). Nach der Entnahme wurde das Vollblut direkt in Polypropylenröhrchen (Fa. Eppendorf, Hamburg/D) mit vorgelegtem gleichen Volumen an Natriumcitratlösung (16,65 g / 500ml Aqua dest.) gegeben, und nach kräftigem Schütteln (ca. 30 s) sofort für 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen / Minute zentrifugiert. Nach der Gewinnung des klaren Zentrifugatüberstandes (ca. 1,3 ml) wurde die Probe bis zur Untersuchung mittels HPLC bei -20 °C eingefroren (auf die HPLC-Analytik von Chinin im Plasma wird an anderer Stelle eingegangen).

Tierdaten

Zum Einsatz als Versuchstiere kamen weibliche Kaninchen des Auszucht-Stammes „Weiße Neuseeländer“ des Lieferanten Charles River, Sulzfeld/D, mit einem Körpergewicht von ca. 3,5 kg. Bis zu Versuchsbeginn wurden die Tiere in einem belüfteten, vollklimatisierten Raum (Temperatur 20 °C \pm 1 °C) mit einem konstanten Lichtrhythmus von 12:12 (12 Stunden Helligkeit, 12 Stunden Dunkelheit) gehalten. Untergebracht waren die Tiere einzeln in Edelstahlkäfigen (0,5 x 0,5 x 1 m) und erhielten Kaninchen-

Standardfutter Ssniff® der Fa. Spezialdiäten GmbH, Soest / D sowie Trinkwasser aus einer automatischen Nippeltränke.

Statistik

Bei der statistischen Auswertung wurden die erhaltenen Resultate als arithmetische Mittelwerte aus den Einzelwerten ($n \geq 3$) angegeben. Als Maß für die Streuung der Einzelwerte um den jeweiligen Mittelwert diente der Standardfehler (in der Auswertung als \pm -Wert hinter dem Mittelwert aufgeführt).

Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Wertegruppen wurde der zweiseitige t-Test nach STUDENT für ungepaarte Stichproben durchgeführt. Voraussetzung hierfür war der F-Test auf Varianzhomogenität [333, 334]. Bei Varianzinhomogenität wurde der parameterfreie MANN-WHITNEY-Test durchgeführt [335]. Bei den Pharmakokinetik-Versuchen wurde zusätzlich die Prüfung auf Unterschiede in der Bioverfügbarkeit durch ein nichtparametrisches Vertrauensbereichsverfahren nach DILETTI und STEINIANS durchgeführt [336].

HPLC-Analytik

In der Literatur sind für die HPLC-Analytik von Chinin in wässrigen Flüssigkeiten bzw. in Plasma zahlreiche Methoden beschrieben [337-343]. Die Untersuchungsflüssigkeiten außer den Plasmaproben der Pharmakokinetik-Versuche wurden nicht weiter vorbehandelt, bei den Plasmaproben erfolgte als zusätzlicher Schritt noch eine Extrahierung des Chinins aus der Plasmaflüssigkeit mit Acetonitril vor der Injektion. In Abbildung 29 ist das Chromatogramm einer Eichlösung (3 Werte), aufgenommen aus einer Blutplasmaprobe, wiedergegeben.

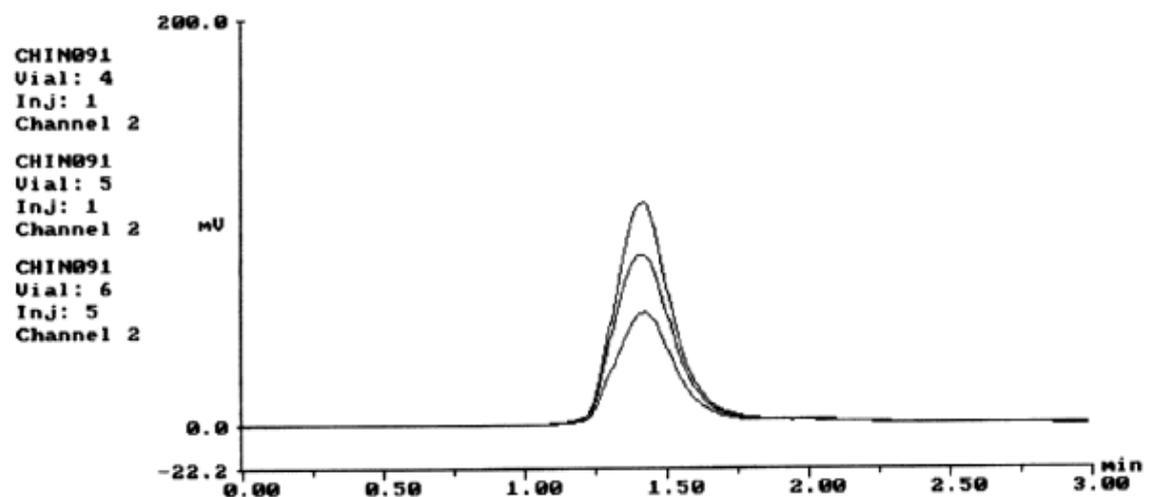


Abb. 29 HPLC-Chromatogramm von Chinin aus einer Blutprobe

Nachfolgend die wichtigsten Parameter der durchgeführten HPLC-Analytik:

HPLC-Analytik mit UV-Detektion (in vitro- Versuche)

Gerät: Autosampler: Kontron Instruments, HPLC 360 (Fa. Kontron, Neufahrn / D)

Software: Kontron PC-Integrator, Version 3.90

Pumpe: HP Series 1050 Detektor: HP Series 1050

Trennbedingungen:

stationäre Phase: Säule Nucleosil[®] 100 C18

mobile Phase: Acetonitril / KH₂PO₄ 0,05 M (1:1 Vol %) incl. 0,2 % konz. H₃PO₄

Injektionsvolumen: 20 µl Flußrate: 1 ml / min Laufzeit: 5,1 min

Temperatur: Raumtemperatur Retentionszeit: 1,3 min

Detektionswellenlänge: $\lambda = 330$ nm

Für jede Untersuchungsflüssigkeit wurde eine Eichkurve mit Chinin kalibriert. Die Nachweisgrenze lag mit 6,5 µg / ml stets deutlich unterhalb der gemessenen Werte der einzelnen Proben.

HPLC-Analytik mit Fluoreszenz-Detektion

Gerät: Autosampler: AS-4000 (Fa. Merck-Hitachi, Darmstadt / D)

Software: D-6000 A Interface

Pumpe: L-6200 A Detektor: F-1080 Fluorescence-Detektor

Trennbedingungen:

stationäre Phase: Säule Lichrospher 100 RP 18 (5µm)

mobile Phase: Acetonitril / KH₂PO₄ 0,05 M (1:1 Vol %) incl. 0,2 % konz. H₃PO₄

Injektionsvolumen: 20 µl Flußrate: 1 ml / min Laufzeit: 3 min

Temperatur: Raumtemperatur Retentionszeit: 1,4 min

Detektionswellenlänge: Excitation: 350 nm Emission: 450 nm

Nachweisgrenze: 5 ng / ml (ebenfalls deutlich unterhalb der gemessenen Werte der einzelnen Proben)

6. 2. Chemikalienliste

Apfelpektin (Grünband-Apfelpektin)	- Obipektin, Bischofszell / CH
Orangen-Pektinesterase	- Sigma Chemical, St. Louis / USA
Glycodeoxycholsäure (Na-Salz)	- Sigma, Deisenhofen / D
Glycocholsäure (Na-Salz)	- Sigma, Deisenhofen / D
Palmitinsäure (Na-Salz)	- Sigma, Deisenhofen / D
Linolsäure (Na-Salz)	- Sigma, Deisenhofen / D
Stearinsäure (Na-Salz)	- Sigma, Deisenhofen / D
DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholin)	- Sigma, Deisenhofen / D
Lecithin (Eilecithin)	- Sigma, Deisenhofen / D
Chininhydrochlorid	- Caesar&Loretz, Hilden / D
Dodecylalkohol	- Merck, Darmstadt / D
Collodiumlösung DAC 1986	- Caesar&Loretz, Hilden / D
Dulbeccos Mem seromed [®]	- Biochrom, Berlin / D
Xylazin (Rompun [®])	- Bayer, Leverkusen / D
Ketamin (Velonarcon [®])	- Berlin-Chemie, Berlin / D
Isotonische Kochsalzlösung	- Braun, Melsungen / D
Heparin (Na-Salz, 170 I. E./mg)	- Audor, Regensburg / D
Citronensäure (Na-Salz)	- Caesar&Loretz, Hilden / D
Ethanol	- Merck, Darmstadt / D
Acetonitril	- Merck, Darmstadt / D

Alle weiteren verwendeten Substanzen entsprachen in ihrem Reinheitsgrad den jeweils geforderten Ansprüchen und Bedingungen.

6. 3. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Verzeichnis der Abbildungen

<i>Abb.-Nr.</i>	<i>Titel</i>	<i>Seite</i>
1	Strukturformel von Pektin	6
2	Strukturformeln der wichtigsten beim Menschen vorkommenden Gallensäuren	9
3	Strukturformeln von Glycocholsäure und Glycodesoxycholsäure als Na-Salz	13
4	Strukturformeln von Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure	16
5	Strukturformeln von Lecithin und Dipalmitoylphosphatidylcholin	17
6	Strukturformel von Chinin	18
7	Aufbau einer Permeationszelle des Modells nach FÜRST und NEUBERT	22
8	F_{Chi} bei 120 min Pektinserien BI und A (Chinin-HCl 2,2 mM)	28
9	F_{Chi} bei 120 min Acetylpektin, Amidpektin und Pektin BI-4 (Chinin-HCl 2,2 mM)	29
10	F_{Chi} bei 120 min GDCA in verschiedenen Konzentrationen (Chinin-HCl 2,2 mM)	30
11	F_{Chi} bei 120 min GDCA u. GCA im Vergleich (Chinin-HCl 2,2mM)	30
12	F_{Chi} bei 120 min GDCA und Mischmizellen (Chinin-HCl 2,2 mM)	32
13	Vergleich F_{Chi} ausgewählte Pektinderivate und GDCA-Mizellen / Mischmizellen	34
14	Prozentuale Chininkonzentration im AK und F_{Chi} bei 120 min Pektinserien BI 35 und A (Chinin-HCl 1,1 mM)	35
15	Prozentuale Chininkonzentration im AK und F_{Chi} bei 120 min Pektin BI-4, Acetylpektin und Amidpektin (Chinin-HCl 1,1 mM)	35
16	F_{Chi} bei 120 min GDCA und GCA (Chinin-HCl 1,1mM)	36
17	F_{Chi} bei 120 min GDCA und GDCA-Mischmizellen (Chinin-HCl 1,1 mM)	37
18	Vergleich F_{Chi} bei 120 min BI-4 und GDCA-Mizellen / -Mischmizellen (Chinin-HCl 1,1 mM)	38
19	Vergleich der Fluxe F_{Chi} für BI-4 und GDCA-Mizellen / Mischmizellen für alle Meßzeitpunkte bei den Permeationsversuchen mit dem Modell nach FÜRST und NEUBERT mit Chinin-HCl 1,1 mmol / l	39

<i>Abb.-Nr.</i>	<i>Titel</i>	<i>Seite</i>
20	Schematischer Aufbau der Versuchsapparatur zur Durchführung der Untersuchungen mit der <i>everted sac</i> -Technik	42
21	Chininkonzentration auf der Akzeptorseite <i>everted sac</i> -Versuche	45
22	Prinzip des Zellkultursystems sowie Aufbau der vertikalen Diffusionskammer	50
23	Chininkonzentrationen auf der Akzeptorseite des Diffusionskammersystems Snapwell TM	52
24	Verlauf des Plasmaspiegels von Chinin im Kaninchen nach intraduodener Applikation (Dosis 5 mg / kg KG)	56
25	Vergleich der Plasmaspiegel mit und ohne Zusatz von GDCA	57
26	Vergleich der Plasmaspiegel mit und ohne Zusatz von mischmizellaren Systemen	59
27	Einfluß von Zusätzen zur Bildung stabiler GDCA-Mizellen und Lecithin / Palmitinsäure / GDCA-Mischmizellen auf die Pharmakokinetik von Chinin im Kaninchen nach intraduodener Einmalgabe	62
28	Relation zwischen Hydrophilie / Lipophilie eines Arzneistoffes und Bioverfügbarkeitsänderungen durch mizellare Systeme	68
29	HPLC-Chromatogramm von Chinin aus einer Blutprobe	78

Verzeichnis der Tabellen

<i>Tab.-Nr.</i>	<i>Titel</i>	<i>Seite</i>
1	Zusammensetzung der Pektinpräparate	7
2	Kenngößen von Na-Cholat- und Na-Desoxycholol-Mizellen	14
3	Kapazitätsfaktoren k_v von Propranolol-HCl, Chinin-HCl, Atenolol, Diclofenac-Na, Salicylsäure und Ibuprofen-Na [nach 144]	20
4	Abhängigkeit des Kapazitätsfaktors k von Propranolol-HCl von der Mizellzusammensetzung bei der mizellaren elektrokinetischen Affinitätschromatographie [nach 144]	33
5	Varianten für die Versuche mit der <i>everted sac</i> -Technik	43
6	Theoretische Gleichgewichtstransportzeit $t_{g1/2}$ <i>everted sac</i> -Versuche	46
7	Varianten für die Versuche mit Snapwell TM	50
8	Gemessene Widerstände ausgewählter Zellkulturversuche	51

<i>Tab.-Nr.</i>	<i>Titel</i>	<i>Seite</i>
9	Versuchslösungen zur intraduodenalen Applikation per Sonde für die <i>in vivo</i> -Versuche	56
10	Pharmakokinetische Parameter von Chinin ohne und mit mizellaren Zusätzen nach intraduodenaler Einmalgabe	61
11	Quotient der $AUC_{0-360\text{min}}$ -Erniedrigung durch Zusatz mizellarer Systeme bei intraduodenaler Einmalapplikation im Kaninchenmodell	61
12	Häufig verwendete <i>in vitro</i> - Resorptionsmodelle	70
13	Viskositäten eingesetzter Donatorlösungen	74

7. Literaturverzeichnis

- [1] Wunderer, H.: Wechselwirkungen mit der Nahrung: welche Wechselwirkungen sind für die Praxis von Bedeutung?, 1. Auflage, Govi-Verlag, Eschborn (1998)
- [2] Zum Thema Wechselwirkungen, Impressum, ABDA, Abt. Information und Öffentlichkeitsarbeit, Eschborn (1996)
- [3] Pfeifer, S.: Pharmazie 48 (1993) 3
- [4] Neubert, R.; Fritsch, B.; Dongowski, G.: Pharmazie 48 (1993) 723
- [5] Mutschler, E.: Arzneimittelwirkungen, 7. Auflage, Wiss. Verlagsges. mbH Stuttgart, (1996)
- [6] Goodman Gilman, A.; Dominiak, P.; Harder, S.; Paul, M.; Unger, T.: Pharmakologische Grundlagen der Arzneimitteltherapie, 9. Auflage, McGraw-Hill Int. (UK) Ltd., Berkshire/England (1998)
- [7] Kuhlmann, J.: Med. Pharm. 5 (1980) 133
- [8] Brieskorn, C.: Einfluß von Nahrung auf die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen, Schriftenreihe der Bayer. Landesapothekerkammer, Heft 21 (1980)
- [9] Merkus, F. W. H. M.: Arzneimittel vor, während oder nach der Mahlzeit? Wiss. Verlagsges. mbH Stuttgart, (1984)
- [10] Fricke, U.: Med. Pharm. 5 (1988) 169
- [11] Welling, P.: Pharmacol. Ther. 43 (1989) 425
- [12] Becker-Brüser, W.: Die Offizin 4 (1991) 225
- [13] Williams, L.: Med. Clin. North Am. 77 (1993) 815
- [14] Pfeifer, S.: Pharm. Ztg. Prisma 2 (1995) 125
- [15] Pfeifer, S.; Pfliegel, P.; Borchert, H.: Biopharmazie Pharmakokinetik Bioverfügbarkeit-Biotransformation, 3. Auflage, Ullstein/Mosby GmbH & Co. KG, Berlin/Wiesbaden (1995)
- [16] D'Arcy, P.F.: Toxicol. Rev. 14 (1995) 233
- [17] Hahn, A.: Ernährungs-Umschau 42, 6 (1995) 198
- [18] Hahn, A.: Ernährungs-Umschau 42 7 (1995) 238
- [19] Williams, L.: Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin. 21 (1996) 201
- [20] Walter-Sack, I.; Klotz, U.: Clin. Pharmacokin. 31 (1996) 47
- [21] Kuhlmann, J.: Arzneimittelther. 14 (1996) 202
- [22] Mehnert, W.; Vetter, G.; Frömming, K. H.: DAZ 121 (1981) 373
- [23] Lamy, P.: J. Am. Geriatr. Soc. 30 (1982) 99
- [24] van Hoogdalem, E.; de Boer, A.; Breimer, D.: Pharmac. Ther. Vol. 44 (1989) 407
- [25] Alexy, U.: Interaktionen zwischen Pharmaka und Vitaminen, Diplomarbeit Justus Liebig-Universität Gießen (1992)
- [26] Vetter, G.; Mehnert, W.; Frömming, K. H.: Acta Pharm. Technol. 27 (1981) 109
- [27] Crawford, L.: Nutr. Rep. Int. 28 (1983) 481
- [28] Wearnly, L.; Karim, A.; Pagone, F.; Streicher, J.; Wickmann, A.: Proc. Int. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mat. 12 (1985) 39

- [29] Maturu, P. K.; Prasad, V. K.; Worsley, W.; Shiu, G.; Skelly, J. P.: *J. Pharm. Sci.* 75 (1986) 1205
- [30] Macheras, P.; Koupparis, M.; Tsaprounis, C.: *Int. J. Pharm.* 33 (1986) 125
- [31] Wearly, L.; Karim, A.; Pagone, F.; Streicher, J.; Wickmann, A.: *Drug Dev. Ind. Pharm.* 14 (1988) 13
- [32] Aiache, J. M.; Pierre, N.; Beyssac, E.; Prasad, V. K.; Skelly, J. P.: *J. Pharm. Sci.* 78 (1989) 261
- [33] Fleisher, D.; Lippert, C.; Sheth, N.; Reppas, C.; Wlodyga, J.: *Contr. Rel.* 11 (1990) 41
- [34] Junginger, H.; Verhoeven, J.; Peschier, L. J. C.: *Pharm. Ztg. Wiss.* 135/3 (1990) 53
- [35] Junginger, H.; Verhoeven, J.; Peschier, L. J. C.: *Acta Pharm. Technol.* 36 (1990) 155
- [36] Fürst, W.; Neubert, R.; Jurkschat, T.; Lücke, L.: *Int. J. Pharm.* 61 (1990) 43
- [37] Neubert, R.: *Pharmazie* 45 (1990) 233
- [38] Neubert, R.; Mäder, C.; Dongowski, G.: *Pharmazie* 47 (1992) 714
- [39] Neubert, R.; Fahr, F.; Mäder, C.; Lücke, L.; Fries, G.; Rostock, G.: *Arzneim.-Forsch.* 42 (1992) 1098
- [40] Neubert, R.; Fritsch, B.; Dongowski, G.: *Pharmazie* 50 (1995) 414
- [41] Krämer, J.: Korrelation biopharmazeutischer in-vivo- und in-vitro-Daten von Theophyllin- und Verapamil- Retardpräparaten, Dissertation A Heidelberg (1995)
- [42] Beerbohm, R.: In vitro- und in vivo-Untersuchungen der Wechselwirkungen retardierter und nicht retardierter Arzneimittel mit Nahrungsmitteln, Dissertation A Johannes Gutenberg-Universität Mainz (1998)
- [43] Fallingborg; Christensen; Ingeman-Nielsen; Jacobsen; Abilgaard; Rasmussen: *Aliment. Pharmacol. Therap.* 3 (1989) 605
- [44] Hunt, J.; Stubbs, D.: *J. Physiol. Lond.* 245 (1975) 209
- [45] Cortot, A.; Phillips, S.; Malagelada, J.: *Gastroenterology* 80 (1981) 922
- [46] Bateman, D.: *J. Physiol. Lond.* 331 (1982) 461
- [47] Collins, P.; Horowitz, M.; Cook, D.; Harding, P.; Shearman, D.: *Gut* 24 (1983) 1117
- [48] Dooley, C.; Reznick, J.; Valenzuela, J.: *Gastroenterology* 87 (1984) 1114
- [49] Smith, J.; Jiang, C.; Hunt, J.: *Am. J. Physiol.* 246 (1984) 959
- [50] Kumar, D.; Wingate, D.; Ruckebusch, Y.: *Gastroenterology* 91 (1986) 926
- [51] Smith, H.; Feldman, M.: *Gastroenterology* 91 (1986) 1452
- [52] Mojaverian, P.; Vlasses, P.; Kellner, P.; Rocci, M.: *Pharm. Res.* 5 (1988) 639
- [53] Pletscher, W.; Perretti, E.: *Pharm. Acta Helv.* 65 (1990) 210
- [54] Beck, T.: *Pharm. Ztg.* 39 (1998) 11
- [55] Kirby, R. et al.: *Am. J. Clin. Nutr.* 34 (1981) 824
- [56] Chen, W.: *Nutr. Rep. Int.* 24 (1981) 1093
- [57] Anderson, K. et al.: *Am. J. Clin. Nutr.* 40 (1984) 1146
- [58] Connor, W.: *N. Engl. J. Med.* 322 (1990) 193
- [59] Davidson et al.: *J. Am. Med. Assoc.* 265 (1991) 1833
- [60] Terpsta, A.; Lapre, J.; de Vries, H.; Beynen, A.: *J. Nutr.* 128 (1998) 1944
- [61] Davidson, M.; Dugan, L.; Stocki, J.; Picklin, M.; Maki, K.; Coletta, F.; Cotler, R.; McLeod, M.; Hoersten, K.: *J. Nutr.* 128 (1998) 1927

- [62] Jensen, C.; Hashell, W.; Whittam, J.: *Am. J. Cardiol.* 79 (1997) 34
- [63] Wu, J.; Peng, S.: *Biomed. Environ. Sci.* 10 (1997) 27
- [64] Grudeva, P.; Krachanova, M.; Djurdjev, A.; Krachanov, C.: *Folia Med.* 39 (1997) 39
- [65] Brenelli, S.; Campos, S.; Saad, M.: *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30 (1997) 1437
- [66] Issy, A.; Lanchote, V.; de Carvalho, D.; Silva, H.: *Ther. Drug Monit.* 19/5 (1997) 516
- [67] Levinska, D.; Piatkewicz, W.; Rosinski, S.: *Int. J. Artif. Organs.* (1997) 650
- [68] Veldman, F.; Nair, C.; Vorster, H.; Vermaak, W.; Jerling, J.; Oosthuizen, W.; Venter, C.: *Thromb. Res.* 86 (1997) 183
- [69] Trautwein, E.; Kunath, R.; Erbersdorfer, H.: *Br. J. Nutr.* 79 (1998) 463
- [70] Vergara-Jimenez, M.; Conde, K.; Erickson, S.; Fernandez, M.: *J. Lipid Res.* 39 (1998) 1455
- [71] Choi, Y.; Kim, H.; Lee, H.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 44/5 (1998) 591
- [72] Gonzalez, M.; Rivas, C.; Caride, B.; Lamas, M.; Taboada, M.: *J. Physiol. Biochem.* 54 (1998) 99
- [73] Shen, H.; He, L.; Price, R.; Fernandez, M.: *J. Nutr.* 128 (1998) 1434
- [74] Tribat, T.: *Lik Sprava (Russ.)* 6 (1998) 99
- [75] Brown, L.; Rosner, B.; Willett, W.; Sacks, F.: *Am. J. Clin. Nutr.* 69 (1999) 30
- [76] Richter, W. et al.: *Lancet* 338 (1991) 706
- [77] Brown, D.; Juhl, P.; Warner, S.: *Circulation* 58 (1978) 164
- [78] Huuponen, R.; Seppälä, P.; Iisalo, E.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 26 (1984) 279
- [79] Hoppu, K. et al.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 32 (1987) 427
- [80] Lutz, M. et al.: *Clin. Pharmacol. Ther.* 42 (1987) 220
- [81] Stewart, D.: *J. Clin. Psychopharmacol.* 12 (1992) 438
- [82] Walter-Sack, I. et al.: *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 27 (1989) 544
- [83] Liel, Y.; Harman-Boehm, I.; Shany, S.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81 (1996) 857
- [84] Dongowski, G.; Neubert, R.; Haase, H.; Schnorrenberger, B.: *Int. J. Pharm.* 144 (1996) 233
- [85] Dongowski, G.; Schnorrenberger, B.; Plätzer, M.; Schwarz, M.; Neubert, R.: *Int. J. Pharm.* 158 (1997) 99
- [86] Dongowski, G.; Schwarz, M.; Schnorrenberger, B.; Plätzer, M.; Neubert, R.: *FASEB J.* 12 (1998) A 516
- [87] Fritzsche, B.; Dongowski, G.; Neubert, R.: *FASEB J.* 8 (1994) A 188
- [88] Fritzsche, B.; Neubert, R.; Dongowski, G.; Heinevetter, L.: *Proc. 2nd World Meeting APGI/APV, Paris* (1998) 1059
- [89] Manunza, B.; Deiana, S.; Pintore, M.; Gessa, C.: *Glyc. J.* 15/3 (1998) 297
- [90] Wakerly, Z.; Fell, J.; Attwood, D.; Parkins, D.: *J. Pharm. Pharmacol.* 49 (1997) 622
- [91] Munjeri, O.; Hodza, P.; Osim, E.; Musabayane, C.: *J. Pharm. Sci.* 87 (1998) 905
- [92] Thakur, B.; Singh, R.; Handa, A.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37 (1997) 47
- [93] Meshali, M.; Gabr, K.: *Int. J. Pharm.* 89 (1993) 177
- [94] Gouda, M.: *Int. J. Pharm.* 89 (1993) 75
- [95] Al Shora, H.; Moustafa, M.; Niazy, E.; Gaber, M.; Gouda, M.: *Int. J. Pharm.* 47 (1988) 209
- [96] Hladon, T.; Pawlaczyk, J.; Gorecki, M.: *Acta Pol. Pharm.* 44 (1987) 362
- [97] Moustafa, M.; Al Shora, H.; Gaber, M.; Gouda, M.: *Int. J. Pharm.* 34 (1987) 207

- [98] Moustafa, M.; Babhair, S.; Kouta, H.: *Int. J. Pharm.* 36 (1987) 185
- [99] Molokhia, A.; Al Rahman, S.: *Drug Dev. Ind. Pharm.* 13 (1987) 1229
- [100] Takahashi, Y.; Nambu, N.; Nagai, T.: *Chem. Pharm. Bull.* 30 (1982) 2919
- [101] Albert, K.; Elliott, W.; Abbott, R.; Gilbertson, T.; Data, J.: *J. Clin. Pharmacol.* 21 (1981) 449
- [102] Bucci, A.; Myre, S.; Tan, H.; Shenouda, L.: *J. Pharm. Sci.* 70 (1981) 999
- [103] Allen, M.; Greenblatt, D.; Harmatz, J.; Smith, T.: *J. Clin. Pharmacol.* 21 (1981) 26
- [104] Albert, K.; DeSante, K.; Welch, R.; DiSanto, A.: *J. Pharm. Sci.* 67 (1978) 1579
- [105] Bottari, F.; Di Colo, G.; Nanniperi, E.; Saettone, M.; Serafini, M.: *Boll. Chim. Farm.* 115 (1976) 113
- [106] Jaffe, J.; Colaizzi, J.; Barry, H.: *J. Pharm. Sci.* 60 (1971) 1646
- [107] Binnion, P.; McDermott, M.: *Lancet* 2 (1972) 592
- [108] Nuhn, P.: *Naturstoffchemie*, 3. Auflage, S. Hirzel Verlag Stuttgart (1997)
- [109] Burger, A.; Wachter, H.: *Hunnius-Pharmazeutisches Wörterbuch*, 8. Auflage, Walter de Gruyter Verlag Berlin (1998)
- [110] Teuscher, E.: *Pharmakognosie Biogene Arzneimittel*, Teil I, 3. Auflage, Akademie-Verlag Berlin (1987)
- [111] Beyer, H.; Walter, W.; Francke, W.: *Lehrbuch der Organischen Chemie*, 23. Auflage, S. Hirzel Verlag Stuttgart Leipzig (1998)
- [112] Hofmann, A.: *Gastroint. Dis.* 5 (1993) 127
- [113] Crouse, R.: *J. Invest. Dermatol.* 37 (1961) 529
- [114] Ogunbona, F. et al.: *J. Pharm. Pharmacol.* 3 (1985) 283
- [115] Barone, J. et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 37 (1993) 778
- [116] Feola, D.; Rapp, R.: *Clin. Inf. Dis.* 25 (1997) 344
- [117] Van Peer, A. et al.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 36 (1989) 423
- [118] Wishart, J.: *J. Am. Acad. Dermatol.* 17 (1987) 220
- [119] Zimmermann, T. et al.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 46 (1994) 147
- [120] Tulpule, A. et al.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 23 (1982) 271
- [121] Crevoisier, C. et al.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 53 (1997) 135
- [122] Muranishi, S.; Muranishi, N.; Sezaki, H.: *Int. J. Pharm.* 2 (1979) 101
- [123] Muranishi, N. et al.: *Int. J. Pharm.* 4 (1980) 271
- [124] Williams, L.: *Pharm. Res.* 4 (1987) 348
- [125] Gupta, S.: *Pharm. Res.* 7 (1990) 46
- [126] Gupta, S.: *J. Clin. Pharmacol.* 30 (1990) 643
- [127] Ptachcinski, R. et al.: *Transplantation* 40 (1985) 174
- [128] Lindholm, A.; Henricsson, S.; Dahlquist, R.: *Br. J. Clin. Pharmacol.* 29 (1990) 541
- [129] Holt, D. et al.: *Transplant. Proc.* 26 (1994) 2935
- [130] Mueller, E. et al.: *Pharmac. Res.* 11 (1994) 151
- [131] Poelma, F.; Tukker, J.; Crommelin, D.: *Acta Pharm. Technol.* 36 (1990) 43
- [132] Fricker, G.; Fahr, A.; Beglinger, C.; Kissel, T.; Reiter, G.; Drewe, J.: *Br. J. Pharmacol.* 117 (1996) 217

- [133] Vetter, C.: Pharm. Ztg. 47 (1998) 31
- [134] Neubert, R.; Amlacher, R.: Dt. Apoth.-Ztg. 131 (1991) 2225
- [135] Neubert, R.: Beiträge zur biopharmazeutischen Bedeutung der Ionenpaarbildung, Dissertation B, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1987)
- [136] Wess, G. et al.: Tetrahedron Lett. 33 (1992) 195
- [137] Wess, G. et al.: Tetrahedron Lett. 34 (1993) 817
- [138] Kagedahl, M.; Swaan, P.; Redemann, C.; Tang, M.; Oie, S. et al.: Pharm. Res. 14 (1997) 176
- [139] Berg, C.; Gollan, J.: Gastrointest. Pharmacother. (1993) 245
- [140] Paumgartner, G.: Gastrointest. Dis. 5 (1993) 1844
- [141] Tint, G.; Salen, G.; Shefer, S.: Gastroenterol. 91 (1986) 1007
- [142] Nakanishi, K.; Masada, M.; Nadai, T.; Miyajima, K.: Chem. Pharm. Bull. Tokyo 37 (1989) 211
- [143] Bauer, K.; Frömming, K.-H.; Führer, C.: Pharmazeutische Technologie, Govi-Verlag, Frankfurt/Main (1997)
- [144] Schwarz, M.: Charakterisierung von Wechselwirkungen zwischen Wirkstoffen und Gallensalzmizellen mittels mizellarer elektrokinetischer Affinitätschromatographie, Dissertation A Martin Luther-Universität Halle-Wittenberg (1998)
- [145] Carey, M., in: The Bile Acids in Gastroenterology (Barbara, L.; Dowling, R.; Hofmann, A.; Roda, E. MTP Press, Boston, MA (1983) 19
- [146] Carey, M.; Montet, J.-C.; Phillips, M.; Armstrong, M.; Mazer, N.: Biochemistry 20 (1981) 3637
- [147] Mazer, N.; Carey, M.; Kwasnick, R.; Benedek, G.: Biochemistry 18 (1979) 3064
- [148] Janich, M.: Licht- und Neutronenstreuexperimente an Gallensalzmizellen, Dissertation A Martin Luther-Universität Halle-Wittenberg (1998)
- [149] Padmanabhan, P.; Kritchevsky, D.: The Bile Acids - Chemistry, Physiology and Metabolism, Plenum Press, New York (1971)
- [150] Small, D.: Adv. Chem. Ser. 84 (1968) 31
- [151] Hildebrand, A.: Charakterisierung mizellarer Systeme hinsichtlich thermodynamischer Stabilität und Wechselwirkungskapazität, Diplomarbeit Martin Luther-Universität HalleWittenberg (1998)
- [152] Schwarz, M.; Neubert, R.; Dongowski, G.: Pharm. Res., Vol. 13, 8 (1996) 1174
- [153] Lopez, F. et al.: Langmuir 12/26 (1996) 6188
- [154] Mazer, N.; Schurtenberger, P.: Proc. Int. Sch. Phys. 90 (1985) 587
- [155] Fontell, K.: Kolloid Z. v. Z. Polymere 246 (1971) 614
- [156] Cussler, E.; Duncan, G.: J. Soln. Chem. 1 (1972) 269
- [157] Hofmann, A.: Biochem. J. 89 (1963) 57
- [158] Kratochvil, J.; Dellicolli, H.: Can. J. Biochem. 46 (1968) 945
- [159] Voigt, R.: Pharmazeutische Technologie für Studium und Beruf, 9. Auflage, Dt. Apotheker Verlag Stuttgart (2000)
- [160] Lichtenberg, D.: Biomembranes: Physical Aspects, VCH Weinheim (1993) 63
- [161] Jover, A. et al.: Langmuir 13 (1997) 3590
- [162] Süß, W.: Titrationskalorimetrische Untersuchungen an wäßrigen SDS- und SDS/DMPC-Systemen, Diplomarbeit Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie

- [163] Müller, R.; Hildebrand, G.: Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, 2. Auflage, Wiss. Verlagsges. mbH Stuttgart (1998)
- [164] Duane, W.: Bioch. Biophys. Acta 398 (1975) 275
- [165] Mazer, N.; Benedek, G.; Carey, M.: Biochemistry 19 (1980) 601
- [166] Hjelm, R.; Thiyagarajan, P.; Alkan-Onyuksel, H.: J. Phys. Chem. 96 (1992) 8653
- [167] Pedersen, J.; Egelhaaf, S.; Schurtenberger, P.: J. Phys. Chem. 99 (1995) 1299
- [168] Long, M.; Kaler, E.; Lee, S.; Wignall, G.: J. Phys. Chem. 98 (1994) 4402
- [169] Müller, K.: Hepatology 4 (1984) 134S
- [170] Egelhaaf, S.; Müller, M.; Schurtenberger, P.: Progr. Colloid. Polym. Sci. 97 (1994) 267
- [171] Schwarz, M.; Raith, K.; Rüttinger, H.; Dongowski, G.; Neubert, R.: J. Chromatogr. A 781 (1997) 377
- [172] Narayanan, V.; Storch, J.: Biochem. 35 (1996) 7466
- [173] Yang, S.; Bumgarner, J.; Kruk, L.; Khaledi, M.: J. Chromatogr. A 721 (1996) 323
- [174] Li, Y.; Shao, Z.; Mitra, A.: Pharm. Res. 9 (1992) 864
- [175] Carey, M.; Small, D.: Coll. Interface Sci. 31 (1969) 382
- [176] Herndon, W.: J. Chem. Educ. 44 (1967) 137
- [177] Benzonana, G.: Bioch. Biophys. Act. 176 (1969) 836
- [178] Sallee, V.: J. Lipid Res. 15 (1974) 837
- [179] Sallee, V.: J. Lipid Res. 19 (1978) 207
- [180] Vahouny, G.; Tombes, R.; Cassidy, M.; Kritchevsky, D.; Gallo, L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 166 (1981) 12
- [181] Lough, A.; Smith, A.: Br. J. Nutr. 35 (1976) 89
- [182] Scott-Moncrieff, J.; Shao, Z.; Mitra, A.: J. Pharm. Sci. 83 (1994) 1465
- [183] Li, Y.; Zimmerman, C.; Wiedmann, T.: Pharm. Res. 13 (1996) 907
- [184] Luner, P.; Babu, S.; Radebaugh, G.: Pharm. Res. 11 (1994) 1755
- [185] Klein, J.: Dt. Apotheker Zeitung 10 (1999) 51
- [186] Eiden, F.: Pharm. uns. Zeit 6 (1998) 257
- [187] Eiden, F.: Pharm. uns. Zeit 1 (1999) 11
- [188] Eiden, F.: Pharm. uns. Zeit 2 (1999) 74
- [189] Jansen, P. et al.: Lancet 349 (1997) 528
- [190] White, N.: Eur. J. Clin. Pharmacol. 34 (1988) 14
- [191] White, N.: Br. J. Clin. Pharmacol. 34 (1992) 10
- [192] Slater, A.; Cerami, A.: Nature 355 (1992) 167
- [193] Dyson, E. et al.: Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.) 291 (1985) 31
- [194] Silamut, K. et al.: Br. J. Clin. Pharmacol. 32 (1991) 311
- [195] Winstanley, P. et al.: Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 87 (1993) 201
- [196] Edwards, G.; Winstanley, P.; Ward, S.: Clin. Pharmacokinet. 27 (1994) 150
- [197] Miller, K.; Greenberg, A.; Campbell, C.: N. Engl. J. Med. 321 (1989) 65
- [198] Bateman, D.; Dyson, E.: Adverse Drug React. Acute Poisoning Rev. 5 (1986) 215
- [199] Pharmazeutische Stoffliste, 11. Auflage, ABDATA-Service, Eschborn (1996)

- [200] Europäisches Arzneibuch, Amtliche deutsche Ausgabe, Dt. Apo. Verlag Stuttgart Govi-Verlag - Pharmazeut. Verlag GmbH Eschborn, Nachtrag 1999
- [201] Hartke, K.; Hartke, H.; Mutschler, E.; Reicher, G.; Wichtel, M.: DAB 10-Kommentar, Wiss. VerlagsGmbH, Farnkfurt/Eschborn (1996)
- [202] Schadewaldt, H.: Über die Rückkehr der Seuchen, vgs Verlagsgesellschaft Köln (1994)
- [203] Büger, J.; Rieke, B.: Pharm. Ztg. 31 (1999) 49
- [204] Dibbern, H.; Scholz, G.: Arzneim. Forsch. 19 (1969) 1140
- [205] Moll, F.; Bender, H.: Biopharm. Untersuchungsverfahren, Wiss. Verlagsges. mbH Stuttgart (1994)
- [206] Lippold, B.: Pharm. Ind. 38 (1976) 208
- [207] Möller, H.: Pharm. Ind. 45 (1983) 617
- [208] Dabbert, C.: Untersuchungen an *in vitro*-Modellen der Resorption und Permeation mit Arzneiformulierungen des Verapamils und potentiellen Wirkstoffen, Dissertation A Martin Luther-Universität (kurz: MLU) Halle-Wittenberg (1992)
- [209] Fritsch, B.: Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen dem Ballaststoff Pektin und dem β -Sympatholytikum Propranolol, Diplomarbeit MLU Halle- Wittenberg (1993)
- [210] Haase, H.: Untersuchungen von Wechselwirkungen zwischen dem β -Blocker Propranololhydrochlorid und Pektinen und Gallensäuren Diplomarbeit MLU Halle-Wittenberg (1994)
- [211] Wustmann, B.: Transportuntersuchungen an Cephalosporinen Diplomarbeit MLU Halle-Wittenberg (1994)
- [212] Wagner, C.: Das Transportverhalten topisch applizierter Antiseptika in künstlichen und biologischen Membransystemen, Dissertation A MLU Halle-Wittenberg (1995)
- [213] Neubert, R.: Zur Bewertung des Permeations- und Resorptionsverhalten von Arzneimitteln durch Modellmethoden Dissertation A MLU Halle-Wittenberg (1978)
- [214] Neubert, R.; Fürst, W.: Pharmazie in unserer Zeit 18 (1989) 112
- [215] Bräutigam, K.: Untersuchung an Modellen der Arzneistofffreigabe und *in vitro*-Resorption, Möglichkeiten der *in vitro/in vivo*-Korrelation, Dissertation A MLU Halle-Wittenberg (1994)
- [216] Wellner, K.: Charakterisierung von N,N'-Bis-/3-(2-Ethoxyphenoxy)-2-Hydroxypropyl/-Ethylendiamin (Falirymin) unter biopharm. Aspekten, Dissertation A MLU Halle-Wittenberg (1989)
- [217] List, P.: Arzneiformenlehre, 4. Auflage, Wiss. Verlagsges. mbH Stuttgart (1985)
- [218] Kedem, O.; Katchalsky, A.: Trans. Faraday Soc. 59 (1963) 1941
- [219] Wilson, H.; Wiseman, G.: J. Physiol. 123 (1954) 116
- [220] Moll, F.; Bender, H.: Biopharmazeutische Untersuchungsverfahren, Wiss. Verlagsges. mbH Stuttgart (1994)
- [221] Kaplan, S.; Cotler, S.: J. Pharm. Sci. 61/9 (1972) 1361
- [222] Blanchard, J.; Straussner, A.: Acta Pharm. Suecica 14 (1977) 279
- [223] Perrier, D.; Gibaldi, M.: J. Pharm. Sci. 62/9 (1973) 1487
- [224] Kararli, T.: Crit. Rev. Ther. Drug Car. Sys. Vol. 6 (1989) 39
- [225] Levine, R.; McNary, F.; Kornguth, P.; Leblanc, R.: Eur. J. Pharmacol. 9 (1970) 211

- [226] Gibaldi, M.; Grundhofer, B.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 141 (1972) 564
- [227] Schilling, R.; Mitra, A.: *Int. J. Pharm.* 62 (1990) 53
- [228] Nogami, H.; Matsuzawa, T.: *Chem. Pharm. Bull.* 9 (1961) 532
- [229] Turner, R.; Mehta, C.; Benet, L.: *J. Pharm. Sci.* 59 (1970) 591
- [230] Czaky, T.; Thale, M.: *J. Physiol. London* 151 (1960) 59
- [231] Meyersohn, M.; Gibaldi, M.: *J. Pharm. Sci.* 60 (1971) 327
- [232] Nogami, H.; Hanano, M.; Aruga, M.: *Chem. Pharm. Bull.* 14 (1966) 166
- [233] Dangl, S.; Vyas, S.; Dixit, V.: *Drug Dev. Ind. Pharm.* 21 (1995) 2021
- [234] Tomkins, D.; Otton, S.; Joharchi, N.; Berns, T.; Wu, D.; Corrigan, W.; Sellers, E.: *Behav. Pharmacol.* 8 (1997) 223
- [235] Watari, N.; Wakamatsu, A.; Kaneniwa, N.: *J. Pharmacobio.* 12 (1989) 608
- [236] Bochner, F.; Somogyi, A.; Chen, Z.: *Xenobiotica* 24 (1994) 543
- [237] Mansor, S.; Ward, S.; Edwards, G.: *J. Pharm. Pharmacol.* 43 (1991) 705
- [238] Muralidharan, G.; Hawes, E.; McKay, G.; Midha, K.: *Xenobiotica* 21 (1991) 1441
- [239] Somogyi, A.; Rumrich, G.; Fritzschn, G.; Ullrich, K.: *J. Pharm. Exp. Ther.* 278 (1996) 31
- [240] Jakovljevic, V.; Popovic, M.; Sabo, A.; Banic, B.: *Eur. J. Drug Met. Pharmacokin.* 20 (1995) 185
- [241] Eastin, W., Birnbaum, L.: *Exp. Geront.* 22 (1987) 351
- [242] Schilling, R.; Ashim, K.: *Int. J. Pharm.* 62 (1990) 53
- [243] Grass, G.; Sweetana, S.: *Pharm. Res.* 5 (1988) 372
- [244] Porteus, J.; Pritchard, P.: *Proc. Biochem. Soc.* 127 (1972) 61P
- [245] Czaky, T.; Hara, Y.: *Am. J. Physiol.* 209 (1965) 467
- [246] Bamford, D.: *Proc. R. Soc. London B* 166 (1966) 30
- [247] Yamashita, S. et al.: *Chem. Pharm. Bull.* 35 (1987) 3382
- [248] Perry, D.; Walson, P.; Blanchard, J.: *J. Pharm. Sci.* 73 (1984) 320
- [249] Gasco, M.; Trotta, M.; Eandi, M.: *J. Pharm. Biomed. Anal. Vol.2* (1984) 425
- [250] Dangl, J.; Vyas, S.; Dixit, V.: *Drug Dev. Ind. Pharm.* 21/17 (1995) 2021
- [251] Dongowski, G.; Fritzschn, B.; Neubert, R.; Giessler, J.: *FASEB J.* 13 (1999) A 883
- [252] Fritzschn, B.; Neubert, R.; Dongowski, G.; Giessler, J.: *Pharmazie* 54 (1999) 6
- [253] Augustijns, P.: *J. Pharm. Pharmacol.* 48 (1996) 277
- [254] Rubas, W.; Cromwell, M.; Shahrokh, Z.; Villagran, J.; Nguyen, T.-N.; Wellton, M.; Nguyen, T.-H.; Mrsny, R.: *J. Pharm. Sci.* 85 (1996) 165
- [255] Hidalgo, I.; Li, J.: *Adv. Drug Del. Rev.* 22 (1996) 53
- [256] Quaroni, A.; Hochman, J.: *Adv. Drug Del. Rev.* 22 (1996) 3
- [257] Schneider, E.: *BIOforum* 4 (1996) 132
- [258] Artursson, P.: *J. Pharm. Sci.* 79/6 (1990) 476
- [259] Yee, S.: *Pharm. Res.* 14 (1997) 763
- [260] Yu, H.; Cook, T.; Sinko, P.: *Pharm. Res.* 14 (1997) 757
- [261] Rossi, A.; Poverini, R.; Di Lullo, G.; Modesti, A.; Modica, A.; Scarino, M.: *Toxicol. in Vitro* 10 (1996) 27
- [262] Anderberg, E.; Lindmark, T.; Artursson, P.: *Pharm. Res.* 10 (1993) 857

- [263] Grass, G.; Sweetana, S.; Bozarth, C.: *J. Pharm. Pharmacol.* 42 (1990) 40
- [264] Audus, K.; Bartel, R.; Hidalgo, I.; Borchardt, R.: *Pharm. Res.* 7 (1990) 435
- [265] Grass, G.; Rubas, W.; Jezyk, N.: *FASEB J.* 6 (1992) A 1002
- [266] Lennernäs, H.; Palm, K.; Fagerholm, U.; Artursson, P.: *Int. J. Pharm.* 127 (1996) 103
- [267] Milton, S.; Knutson, V.: *J. Cell. Physiol.* 144 (1990) 498
- [268] Fricker, G.; Fahr, A.; Beglinger, C.; Kissel, T.; Reiter, G.; Drewe, J.: *Br. J. Pharmacol.* 117 (1996) 217
- [269] Shekels, L.; Lyftogt, C.; Ho, S.: *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 28 (1996) 193
- [270] Lapre, J.; Termont, D.; Groen, A.; van der Meer, R.: *Am. J. Physiol.* 263 (1992) G333-7
- [271] Velardi, A.; Groen, A.; Elferink, R.; van der Meer, R.; Palasciano, G.; Tytgat, G.: *Gastroenterol.* 101 (1991) 457
- [272] Karpen, S.; Sun, A.; Kudish, B.; Hagenbuch, B.; Meier, P.; Ananthanarayanan, M.; Suchy, F.: *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 15211
- [273] Kanda, T.; Niot, I.; Foucaud, L.; Fujii, H.; Bernard, A.; Ono, T.; Besnard, P.: *FEBS-Lett.* 384 (1996) 131
- [274] Root, C.; Smith, C.; Winegar, D.; Brieady, L.; Lewis, M.: *J. Lipid Res.* 36 (1995) 1106
- [275] Chandler, C.; Zaccaro, L.; Moberly, J.: *Am. J. Physiol.* 264 (1993) G1118-25
- [276] Dulfer, W.; Groten, J.; Govers, H.: *J. Lipid Res.* 37 (1996) 950
- [277] Dias, V.; Shaffer, E.; Wallace, J.; Parsons, H.: *Dig. Dis. Sci.* 39 (1994) 802
- [278] Chen, H.; Born, E.; Mathur, S.; Johlin, F.; Field, F.: *Biochem. J.* 286 (1992) 771
- [279] Field, F.; Albright, E.; Mathur, S.: *Lipids* 26 (1991) 1
- [280] Ranheim, T.; Gedde-Dahl, A.; Rustan, A.; Drevon, C.: *Biochim. Biophys. Acta* 1212 (1994) 295
- [281] Neubert, R.; Fürst, W.; Schneider, S.; Müller, H.; Loh, H.; Jirka, M.: *Pharmazie* 42/1 (1987) 29
- [282] Neubert, R.; Fürst, W.; Schulze, P.; Loh, H.; Jirka, M.; Wenzel, U.: *Pharmazie* 42/2 (1987) 393
- [283] Hasan, M.; Hassan, M.; Rawashdeh, N.: *Pharmacol. Toxicol.* 67 (1990) 73
- [284] Watari, N.; Wakamatsu, A.; Kaninewa, N.: *J. Pharmacobiodyn.* 12/10 (1989) 608
- [285] Jahovljevic, V.; Popovic, M.; Sabo, A.; Banic, B.: *Europ. J. Drug Metabol. Pharmacokinetics* 20 (1995) 185
- [286] Muralidharan, G.; Hawes, E.; McKay, G.; Midha, K.: *Xenobiotica* 21 (1991) 1441
- [287] Onyeji, C.; Dixon, P.; Ugwu, N.: *Pharm. Week Sci. Ed.* 14 (1992) 185
- [288] Mansor, S.; Ward, S.; Edwards, G.: *J. Pharm. Pharmacol.* 43 (1991) 705
- [289] Weiss, M.: *Theoretische Pharmakokinetik*, 1. Auflage, Verlag Gesundheit GmbH, Berlin (1990)
- [290] Heinzl, G.; Woloszczak, R.; Thomann, P.: *TOPFIT 2.0 Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis System for the PC*, Gustav Fischer Verlag Stuttgart Jena New York (1993)
- [291] Dongowski, G.; Fritsch, B.; Neubert, R.; Härtl, A.: *Proc. 3rd World Meeting APGI/APV*, Berlin (2000) 479
- [292] Hobe, G.; Schön, R.; Hajek, M.; Undisz, K.; Härtl, A.: *Steroids* 63 (1998) 393
- [293] Fritsch, B.; Neubert, R.; Dongowski, G.; Heinevetter, L.: *Pharmazie* 55 (2000) 59
- [294] Fausa, O.: *Scand. J. Gastroenterol* 9 (1974) 567
- [295] McLeod, G.; Wiggins, H.: *Lancet* 1 (1968) 873

- [296] Mallory, A.; Kern, F.; Smith, J.; Savage, D.: *Gastroenterology* 64 (1973) 26
- [297] Sjövall, J.: *Clin. chim. Acta* 5 (1960) 33
- [298] Turnberg, L.; Grahame, G.: *Gut* 11 (1970) 126
- [299] Rote Liste 2000, Arzneimittelverzeichnis für Deutschland (einschließlich EU-Zulassungen), Herausgeber: Rote Liste® Service GmbH, Frankfurt/Main, Edition Cantor Verlag Aulendorf
- [300] Muranishi, S.; Yoshikawa, H.; Sezaki, H.: *J. Pharmacobiodyn.* 2 (1979) 286
- [301] Yoshikawa, H.; Takada, K.; Muranishi, S.: *Chem. Pharm. Bull.* 34 (1986) 4382
- [302] Hofmann, A.; in: *Physiology of the Gastrointestinal Tract. Third Edition.*, edited by Johnson, L., Raven Press New York (1994) 1850
- [303] Smith, P.; Wall, D.; Gochoco, C.; Wilson, G.: *Adv. Drug Del. Rev.* 8 (1992) 253
- [304] Yoshikawa, H.; Takada, K.; Satoh, Y.; Naruse, N.; Muranishi, S.: *Pharmaceut. Res.* 2 (1985) 249
- [305] Takada, K.; Skibata, N.; Yoshimura, H.; Masuda, Y.; Yoshikawa, H.; Muranishi, S.; Oka, T.: *J. Pharmacobiodyn.* 8 (1985) 320
- [306] Yoshikawa, H.; Muranishi, S.; Kato, C.; Sezaki, H.: *Int. J. Pharm.* 8 (1981) 291
- [307] Taniguchi, K.; Muranishi, S.; Sezaki, H.: *Int. J. Pharm.* 4 (1980) 219
- [308] Fukui, H.; Murakami, M.; Yoshikawa, H.; Takada, K.; Muranishi, S.: *J. Pharmacobiodyn.* 10 (1987) 236
- [309] Murakami, T.; Sasaki, Y.; Yamajo, R.; Yata, N.: *Chem. Pharm. Bull.* 32 (1984) 1948
- [310] Cullis, P.; deKruiff, B.; Verkleij, A.; Hope, M.: *Biochem. Soc. Trans.* 14 (1986) 242
- [311] Masuda, Y.; Yoshikawa, H.; Takada, K.; Muranishi, S.: *J. Pharmacobiodyn.* 9 (1986) 793
- [312] Tokunaga, Y.; Muranishi, S.; Sezaki, H.: *J. Pharmacobiodyn.* 1 (1978) 28
- [313] Taniguchi, K.; Muranishi, S.; Sezaki, H.: *Int. J. Pharm.* 4 (1980) 219
- [314] Wargovich, M.; Eng, V.; Newmark, H.: *Cancer Lett.* 23 (1984) 253
- [315] Emori, H.; Yokohama, S.; Nishihata, T.: *J. Pharm. Pharmacol.* 47 (1995) 487
- [316] Ibanez, C.; del Val, B.; Rius, A.; Villodre, M.: *Arzneimittelforschung* 49 (1999) 44
- [317] Kagemi, K.; Sezaki, H.; Konishi, R.; Kimura, T.; Murakami, M.: *Chem. Pharm. Bull.* 18 (1970) 275
- [318] Kimura, T.; Sezaki, H.; Kakemi, K.: *Chem. Pharm. Bull.* 20 (1972) 1656
- [319] Yamaguchi, T.; Ikeda, C.; Sekine, Y.: *Chem. Pharm. Bull.* 34 (1986) 3836
- [320] Gaginella, T.; Bass, P.; Perrin, J.; Vallner, J.: *J. Pharm. Sci.* 62 ((1973) 1121
- [321] Slowe, L.; Shaeiwitz, J.: *J. Coll. Int. Sci.* 90 (1982) 495
- [322] Martin, G.; Mariott, C.; Kellaway, I.: *Gut* 19 (1978) 103
- [323] Mitjavila, M.; Mitjavila, S.; Gas, N.; Derache, R.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 34 (1975) 72
- [324] Sladen, G.; Harries, J.: *Biochim. Biophys. Acta* 288 (1972) 443
- [325] Chadwick, V. et al.: *J. Lab. Clin. Med.* 94 (1979) 661
- [326] Russell, R.; Allan, J.; Gerskowitch, V.; Cochran, K.: *Clin. Sci. M. Med.* 45 (1973) 301
- [327] Ho, P.; Chalcraft, S.; Coville, P.; Wanwimolruk, S.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 55/5 (1999) 393
- [328] Pedros, J.; Gomez, C.; Campos, A.; Abad, C.: *Spectrochim. Acta A Mol Biomol. Spectrosc.* 53 A (1997) 2219

- [329] Murakami, M.; Takada, K.; Muranishi, S.: *Biochim. Biophys. Acta* 1117/1 (1992) 83
- [330] Ritschel, W.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 8 (1969) 699
- [331] Crouse, R.: *J. Invest. Dermatol.* 37 (1961) 529
- [332] Kravtchenko, T.; Pilnik, W.: in: Phillips, G.; Williams, P.; Wedlock, D.: *Gums and Stabilisers in the Food Industrie. Bd. 5, IRL PRESS Oxford* (1990) 281
- [333] Stenzhorn, G.: *Pharm. Ztg.* 124 (1979) 795
- [334] Doerffel, K.: *Statistik in der analytischen Chemie, 4. Auflage, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie Leipzig* (1987)
- [335] Weber, E.: *Grundriß der biologischen Statistik, 9. Aufl., VEB Gustav Fischer Verlag Jena* (1986)
- [336] Diletti, E.; Steinijans, V. W.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 24 (1983) 127
- [337] Dua, V.; Sarin, R.; Prakash, A.: *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 125 (1993) 87
- [338] Babalola, C.; Bolaji, O.; Dixon, P.; Ogunbona, F.: *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 127 (1993) 151
- [339] Mihaly, G.; Hyman, K.; Smallwood, R.; Hardy, K.: *J. Chromatogr.* 415 (1987) 177
- [340] Johnston, M. et al.: *J. Chromatogr.* 189 (1980) 241
- [341] Hobson-Frohock, A.; Edwards, W.: *J. Chromatogr.* 249 (1982) 369
- [342] Keene, A.; Anderson, L.; Phillipson, J.: *J. Chromatogr.* 260 (1983) 123
- [343] McCalley, D.: *J. Chromatogr.* 260 (1983) 184

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt habe, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet und die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Diese Arbeit wurde keiner weiteren Universität oder Hochschule vorgelegt.

Bertram Fritsch

Halle/Saale, den 21. September 2000

Lebenslauf

Name: Bertram Fritzsch
Geburtstag: 25.09.66
Geburtsort: Annaberg-Buchholz
Familienstand: ledig

Sept. 1973 - Juli 1983 POS "Adam Ries" Annaberg-Buchholz
Sept. 1983 - Juli 1985 EOS "J. R. Becher" (heute: St. Annen-Gymnasium),
Annaberg-Buchholz

Nov. 1985 - Aug. 1988 Wehrdienst Marinestützpunkt Saßnitz

Sept. 1988 - Sept. 1992 Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg, Fachbereich Pharmazie

Okt. 1992 - März 1993 Diplomarbeit am Institut für Pharmazeutische
Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg

April 1993 - Sept. 1993 Praktikum in der Straussen-Apotheke, Hattingen/Ruhr
Okt. 1993 Approbation als Apotheker
Okt. 1993 - März 1994 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für
Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

seit April 1994 Inhaber der Annen-Apotheke, Annaberg-Buchholz
seit April 1999 Vorstandsmitglied der DPhG, Landesgruppe Sachsen

Halle/Saale, den 21. September 2000