

## **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 m<sup>2</sup> 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 m<sup>2</sup>), 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].

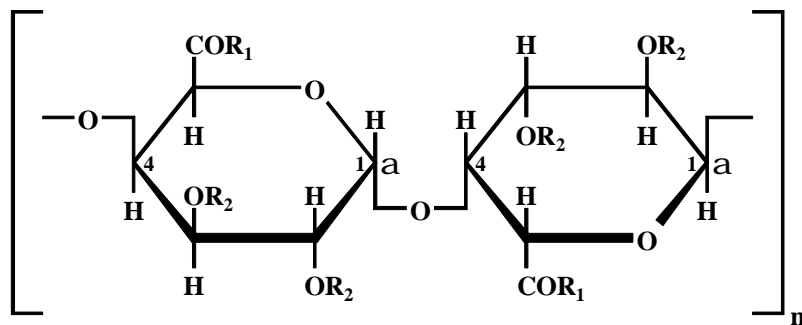
Besonders bei Arzneistoffen mit geringer therapeutischer Breite stellt eine derartige mögliche Interaktion ein Therapierisiko dar. Dazu sei auch hingewiesen auf *in vitro*- bzw. *in vivo*- Untersuchungen zu Ballaststoffeinflüssen auf Problemarzneistoffe wie zum Beispiel Digoxin [77]. Auch ist das veränderte 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  $\text{OCH}_3$  Pektin

$R_2 = \text{H}$  oder  $\text{COCH}_3$  Acetylpektin

$R_1 = \text{OH}$  oder  $\text{NH}_2$  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, Galaktoxyrane 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> ( $\eta$ ) [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 Tablettensprengmittel 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 $\beta$ -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 $\alpha$ -Dehydroxylasen; auch als sekundäre Gallensäuren bezeichnet).

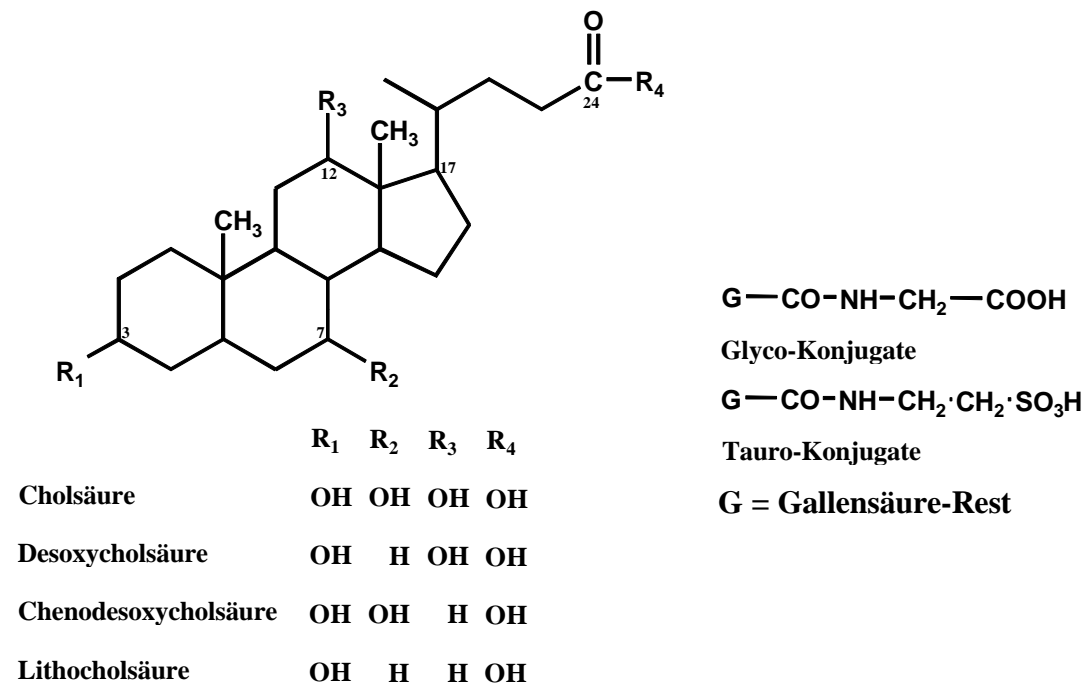


Abb. 2 Strukturformeln der wichtigsten beim Menschen vorkommenden Gallensäuren

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<sup>®</sup>) 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).

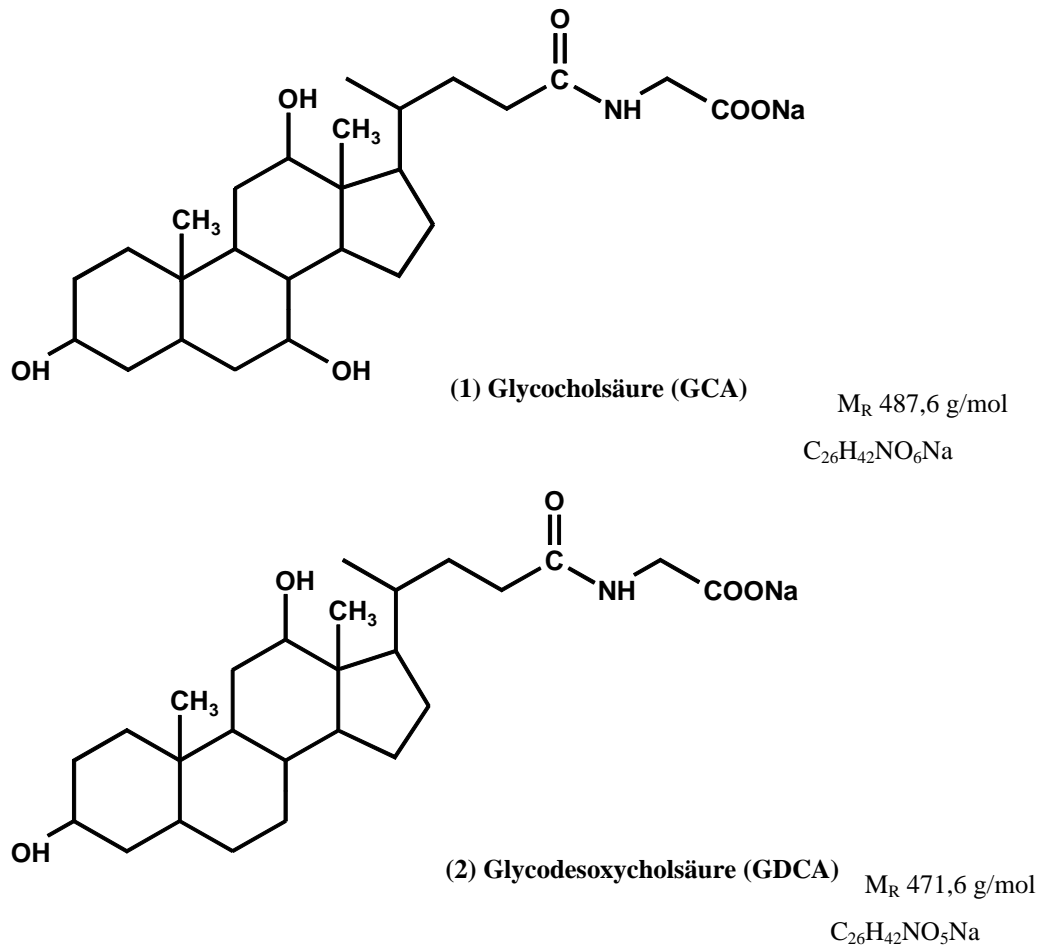


Abb. 3 Strukturformeln von Glycocholsäure (1) und Glycodesoxycholsäure (2) als Na-Salz

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).

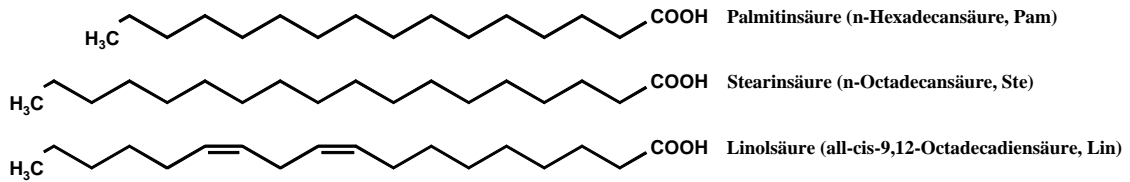


Abb. 4 Strukturformeln von Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure

Für die Verwendung in den nachfolgenden Versuchen standen die Na-Salze der Palmitinsäure ( $M_R$  278,4 g / mol;  $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}_2\text{Na}$ ), der Stearinsäure ( $M_R$  306,5 g / mol;  $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{O}_2\text{Na}$ ) und der Linolsäure ( $M_R$  302,4 g / mol;  $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{O}_2\text{Na}$ ) zur Verfügung.

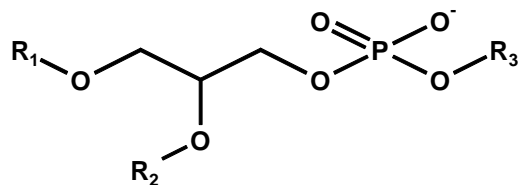
### 2. 3. 3. 3. Phospholipide

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<sup>®</sup> 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<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> Fettsäurereste; R<sub>3</sub> Cholin  
(1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3- phosphocholin)**

**DPPC (2) : R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> Palmitinsäure; R<sub>3</sub> Cholin  
(1,2-Dihexadecanoyl-*rac*-glycero-3-phosphocholin)**

Abb. 5 Strukturformeln von Lecithin (1), (Phosphatidylcholin: R<sub>3</sub>=Cholin, Phosphatidylethanolamin: R<sub>3</sub>=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).

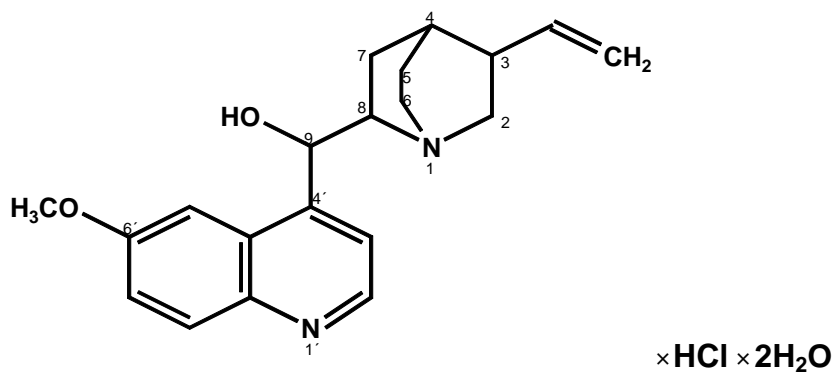


Abb. 6 Strukturformel von Chinin (in der Arbeit eingesetzt als Chininhydrochlorid)

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<sup>®</sup>, Chininum hydrochloricum Compretten<sup>®</sup>Merck Dura, Chinosalmid<sup>®</sup>, Grippilan C<sup>®</sup>) 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><math>k_v</math> (GDCA 30 mM)</u>	<u><math>k_v</math> (GCA 30 mM)</u>	<u><math>pK_s</math>-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 H<sub>2</sub>O:

C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O; M<sub>R</sub> 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).