

***Stereospezifität des aktiven Arzneistofftransports:  
Modelluntersuchungen an Caco-2/TC-7-Zellen  
und quantitative Enantiomerenbestimmung  
mittels Kapillarelektrophorese***

***Dissertation***

*der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften*

**2003**

*vorgelegt von*

***Bilal Awadallah***

Tag der mündlichen Prüfung

23. Oktober 2002

Dekan

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter

Prof. Dr. M. A. Wahl

2. Berichterstatter

Prof. Dr. K.-A. Kovar

Die vorliegende Arbeit entstand unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. M. A. Wahl und Herrn Prof. Dr. P. C. Schmidt

am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Zuallererst möchte ich meinem verehrten Lehrer und Betreuer, Herrn Prof. Dr. M. A. Wahl, 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, die Schaffung optimaler Arbeitsbedingungen, aber auch vor allem für seinen persönlichen und menschlichen Einsatz gilt meinem verehrten Lehrer Herrn Prof. Dr. P. C. Schmidt. Für die Möglichkeit zur Teilnahme an Weiterbildungsseminaren zum Fachapotheker für Pharmazeutische Technologie, den Besuch von Kongressen und Seminaren und die Teilnahme an Exkursionen zu verschiedenen Firmen möchte ich mich bei Ihm bedanken.

Die Caco-2/TC-7-Zellkultur wurde mir freundlicherweise von Prof. Dr. K.W. Bock, Pharmakologisches Institut, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, zur Verfügung gestellt. Dafür bedanke ich mich ganz herzlich.

Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg, danke ich für die fachliche Unterstützung und die Zusammenarbeit bei der Methodenentwicklung zur stereoselektiven Trennung der  $\beta$ -Blocker mittels Kapillarelektrophorese.

Meinen Arbeitskollegen danke ich ganz herzlich für das kreative und angenehme Arbeitsklima, das bei mir eine ständige Motivation zur Bewältigung aller Probleme erzeugt hat, und für die gute Zusammenarbeit. Der Umgang in diesem Arbeitskreis war vorbildlich und diese zusammen verbrachten Zeiten werden mir in Erinnerung bleiben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Harald Römpf, Frau Claudia Kaiser und Herrn Hans-Jürgen Martin für das sorgfältige Korrekturlesen des Manuskripts.

Bei Frau Renate Beer, Frau Martina Brenn, Herrn Roland Walker und Herrn Klaus Weyhing bedanke ich mich für ihre Unterstützung während meiner Zeit am Lehrstuhl.

Den Firmen Aventis Pharma Deutschland GmbH, Arzneimittelwerk Dresden GmbH, Bayer AG, Baxter Deutschland GmbH, Heuman Pharma GmbH, Knoll AG, Novartis Pharma AG, Pharmacia GmbH, Roche Diagnostics GmbH und Wacker Chemie GmbH danke ich für die Überlassung von Untersuchungssubstanzen und sonstige Materialien.

Ganz besonders danken möchte ich meiner lieben Frau Nadja, die mir in allen Zeiten Unterstützung und Beistand geleistet hat.

أَقْرَبُ  
مَشْرَبُ

أَقْرَبُ بِهَذَا الْعَيْلِ الْمَيُّوتِ لِقَوْلِ الرَّبِّ  
مَاءٌ شَرِبَ مَشْرَبُ مَاءٌ شَرِبَ مَاءٌ شَرِبَ

وَاللَّوَالِدِ الرَّبِّ الْأَجْمَلِ وَالزَّوَالِجِ الْغَالِيَةِ  
مَاءٌ شَرِبَ مَاءٌ شَرِبَ مَاءٌ شَرِبَ مَاءٌ شَرِبَ

*Meinen Eltern und Nadja*

*in Liebe und Dankbarkeit*

*gewidmet*



# Inhaltsverzeichnis

<b>Kapitel 1: Einleitung und Zielsetzung</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Arzneistoff-Resorption</i> .....	1
1.1.1 <i>Der Gastrointestinaltrakt als Absorptionsbarriere</i> .....	1
1.1.2 <i>Bauliche und funktionelle Grundlagen</i> .....	2
1.1.3 <i>Resorptionsmöglichkeiten</i> .....	7
1.1.3.1 <i>Transzellulärer Transport</i> .....	8
1.1.3.2 <i>Parazellulärer Transport</i> .....	11
1.1.4 <i>Bioverfügbarkeitsbeeinflussende Faktoren</i> .....	12
1.1.4.1 <i>Intestinaler Metabolismus und intestinale Transportmechanismen als bioverfügbarkeitslimitierende Faktoren</i> .....	14
1.1.4.1.1 <i>Intestinaler Metabolismus</i> .....	14
1.1.4.1.2 <i>P-Glykoprotein</i> .....	16
1.1.5 <i>Resorptionsmodelle</i> .....	18
1.1.5.1 <i>In vivo-Methoden</i> .....	18
1.1.5.2 <i>In situ-Methoden</i> .....	19
1.1.5.3 <i>In vitro-Methoden</i> .....	19
1.1.6 <i>Caco-2/Subklon TC-7</i> .....	24
1.2 <i>Chiralität</i> .....	28
1.2.1 <i>Chiralität und biologische Wirkung</i> .....	29
1.3 <i>Kapillarelektrophorese</i> .....	31
1.3.1 <i>Theoretische Grundlagen</i> .....	34
1.3.2 <i>Allgemeines</i> .....	34
1.3.3 <i>Physikalische Grundlagen</i> .....	36
<i>Elektrophorese und Elektroosmose</i> .....	36
1.3.4 <i>Analytische Parameter zur Beschreibung eines elektrophoretischen Prozesses</i> .....	39
1.3.5 <i>Zielsetzung</i> .....	41
<b>Kapitel 2: Materialien</b> .....	<b>43</b>
2.1 <i>Zellkultur</i> .....	43

2.2	Materialien .....	43
2.3	Datenverarbeitung.....	49
	<b>Kapitel 3: Methoden .....</b>	<b>50</b>
3.1	Zellbiologische Methoden .....	50
3.1.1	Caco-2/TC-7-Zellkultur.....	50
3.1.2	Puffersysteme.....	51
3.1.3	Kultivierung von Zellen in Transwell <sup>®</sup> -Platten.....	52
3.1.4	Untersuchung der Integrität des Zellmonolayers.....	52
3.1.4.1	Transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER).....	52
3.1.4.2	Transport der hydrophilen Markersubstanzen Fluorescein-Natrium..	53
3.1.5	Permeationsstudien .....	53
3.1.5.1	Durchführung der Permeationsstudien .....	53
3.1.6	Permeationsuntersuchungen von Propranolol mittels Caco-2/TC-7-Zellmodell .....	54
3.1.7	Permeationsuntersuchungen von Ibuprofen mittels Caco-2/TC-7-Zellmodell .....	55
3.1.8	Permeationsuntersuchungen von Ofloxacin-Enantiomeren am Caco-2/TC-7-Zellmodell .....	55
3.1.9	Permeationsuntersuchungen von Talinolol mittels Caco-2/TC-7-Zellmodell .....	56
3.2	Analytische Verfahren .....	57
3.2.1	Apparative Ausstattung .....	57
3.2.1.1	Kapillarsäulen .....	57
3.2.1.2	Puffer .....	57
3.2.2	Vorgehensweise zur Bestimmung der Konzentration, Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze .....	58
3.2.3	Methodenbeschreibung für die einzelnen Substanzen.....	59
3.2.3.1	CE-Methode zur Bestimmung von Propranolol.....	59
3.2.3.2	CE-Methode zur Bestimmung der Ibuprofen-Enantiomeren .....	60
3.2.3.3	Kapillarelektrophoretische Bestimmung der Ofloxacin-Enantiomeren	61
3.2.3.4	Kapillarelektrophoretische Bestimmung der Talinolol-Enantiomeren	64



3.2.4	<i>Kapillarelektrophoretische Trennung verschiedener <math>\beta</math>-Blocker</i> .....	66
-------	---	----

**Kapitel 4: Ergebnisse** ..... 67

4.1	<i>Ergebnisse des Methodischen Teils</i> .....	67
4.1.1	<i>Analytische Verfahren</i> .....	67
4.1.1.1	<i>Analytik von Fluorescein-Na</i> .....	67
4.1.1.2	<i>Analytik von Propranolol</i> .....	68
4.1.1.3	<i>Analytik von Ibuprofen-Enantiomeren</i> .....	70
4.1.1.4	<i>Analytik der Ofloxacin-Enantiomeren</i> .....	75
4.1.1.5	<i>Analytik von Talinolol</i> .....	83
4.1.1.6	<i>Enantiomerentrennung verschiedener <math>\beta</math>-Blocker mittels HDAS-<math>\beta</math>-CD</i>	87
4.1.2	<i>Zellkultur und Resorptionsversuche</i> .....	89
4.1.2.1	<i>Morphologie</i> .....	89
4.1.2.2	<i>Transepithelial elektrischer Widerstand (TEER) als Integritätsmarker</i> ... .....	90
4.1.2.3	<i>Integritätsbestimmung mittels Fluorescein-Na</i> .....	91
4.1.2.4	<i>Ermittlung des Permeationskoeffizienten für Propranolol</i> .....	92
4.1.3	<i>Ergebnisse der Resorptionsversuche</i> .....	92
4.1.3.1	<i>Ibuprofen</i> .....	92
4.1.3.2	<i>Ofloxacin</i> .....	93
4.1.3.3	<i>Talinolol</i> .....	96

**Kapitel 5: Diskussion** ..... 99

5.1	<i>Vorversuche zur Etablierung der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco-2/TC-7</i> .....	99
5.1.1	<i>Bestimmung des günstigsten Zeitraumes der Permeationsversuche</i> ....	99
5.1.2	<i>Permeabilität von Markersubstanzen</i> .....	100
5.2	<i>Stereoselektivität der Resorption</i> .....	101
5.2.1	<i>Resorption von Ibuprofen</i> .....	101
5.2.2	<i>Resorption von Ofloxacin</i> .....	103
5.2.2.1	<i>Pharmakokinetische Eigenschaften:</i> .....	104
5.2.2.1.1	<i>Physikalisch-chemische Eigenschaften</i> .....	104

5.2.2.1.2	<i>Pharmakokinetische Daten</i> .....	105
5.2.2.1.3	<i>Sekretion von Ofloxacin</i> .....	107
5.2.2.2	<i>Sekretion von Ofloxacin und deren Stereoselektivität</i> .....	109
5.2.3	<i>Resorption von Talinolol</i> .....	112
5.2.3.1	<i>Pharmakokinetische Daten</i> .....	112
5.2.3.2	<i>Sekretion von Talinolol und deren Stereoselektivität</i> .....	113
 <b><i>Kapitel 6: Zusammenfassung</i></b> .....		<b>119</b>
 <b><i>Kapitel 7: Literaturverzeichnis</i></b> .....		<b>122</b>
 <b><i>Kapitel 8: Anhang</i></b> .....		<b>139</b>
 <b><i>Kapitel 9: Firmenverzeichnis</i></b> .....		<b>153</b>

*Besondere Hinweise:*

Die Ermittlung der Permeationskoeffizienten basiert in dieser Arbeit auf **Gl. 8-1**  
(Anhang, S. 153)

# **Abkürzungen**

<i>ATP</i>	<i>Adenosintriphosphat</i>
<i>AU</i>	<i>Absorption unit</i>
<i>CE</i>	<i>Kapillarelektrophorese</i>
<i>CEC</i>	<i>Kapillarelektrochromatographie</i>
<i>CMC</i>	<i>kritische Mizellbildungskonzentration</i>
<i>CYP</i>	<i>Cytochrom-Proteine</i>
<i>CZE</i>	<i>Kapillarzonenelektrophorese</i>
<i>DCM</i>	<i>Dichlormethan</i>
<i>DM-<math>\beta</math>-CD</i>	<i>statistisch methyliertes <math>\beta</math>-Cyclodextrin; Methylierungsgrad 1,6 - 1,9 pro Glucoseeinheit</i>
<i>EOF</i>	<i>elektroosmotischer Fluss</i>
<i>FDA</i>	<i>Food and Drug Administration</i>
<i>HDAS-<math>\beta</math>-CD</i>	<i>Heptakis-(2,3-diacetyl-6-sulfato)-<math>\beta</math>-cyclodextrin</i>
<i>HDMS-<math>\beta</math>-CD</i>	<i>Heptakis-(2,3-dimethyl-6-sulfato)-<math>\beta</math>-cyclodextrin</i>
<i>HS-<math>\beta</math>-CD</i>	<i>Heptakis-6-sulfato-<math>\beta</math>-cyclodextrin</i>
<i>I. D.</i>	<i>Innendurchmesser</i>
<i>MDR</i>	<i>Multi Drug Resistance</i>
<i>P-gp</i>	<i>P-Glykoprotein</i>
<i>Ph. Eur.</i>	<i>Pharmakopoea Europaea</i>
<i>PI</i>	<i>Isoelektrischer Punkt</i>
<i>r</i>	<i>Korrelationskoeffizient</i>
<i>r<sup>2</sup></i>	<i>Bestimmtheitsmaß</i>
<i>Relstdv</i>	<i>Relative Standardabweichung</i>
<i>SD</i>	<i>Standardabweichung</i>
<i>S<sub>y</sub></i>	<i>Reststandardabweichung</i>
<i>S-<math>\beta</math>-CD</i>	<i>Statistisch sulfatiertes <math>\beta</math>-cyclodextrin</i>
<i>w<sub>h</sub></i>	<i>Peakbreite auf halber Höhe</i>

***Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht beziehungsweise vorgestellt:***

- ❖ B. Awadallah, P. C. Schmidt und M. A. Wahl – „Quantitative Bestimmung von Ofloxacin-Enantiomeren mittels Kapillarelektrophorese im ppb-Bereich“ – Poster, DPhG Jahrestagung Halle/Saale 2001, Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 334, Suppl. 2, S. 65 (2001)
- ❖ B. Awadallah, P. C. Schmidt und M. A. Wahl – „Quantification of the enantiomers of Ofloxacin by capillary electrophoresis in the parts per billion-concentration range for in-vitro drug absorption studies“ – Journal of chromatography A, zur Publikation eingereicht
- ❖ B. Awadallah, P. C. Schmidt und M. A. Wahl – „Quantification of the enantiomers of Ofloxacin in physiological fluids in the ppb range by capillary electrophoresis“ – Poster, APV Jahrestagung Florenz, Italien 2002, Proc. 4<sup>th</sup> World Meeting ADRITELF/APGI/APV, S. 399 – 400 (2002)
- ❖ B. Awadallah, P. C. Schmidt, U. Holzgrabe und M. A. Wahl – „Determination of Talinolol enantiomers in physiological solution by capillary electrophoresis in the ppb-range“ – Poster, DPhG Jahrestagung Berlin, Oktober 2002
- ❖ M. A. Wahl und B. Awadallah – „Transport of Ofloxacin-Enantiomers in the Caco-2/TC-7 cell line“ – Vortrag, DPhG Jahrestagung Berlin, Oktober 2002

# KAPITEL 1

## *EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG*

### ***1.1 Arzneistoff-Resorption***

Die Begriffe Resorption oder Absorption bezeichnen die Aufnahme von Wirkstoffe von außerhalb des Körpers in die Blut- oder Lymphbahn. Auf seinem Weg vom Absorptionsort zum Wirkort muss ein Wirkstoff Membranen passieren wie beispielsweise das Gastrointestinal-Epithel, die Epidermis der Haut, die Membran der Erythrozyten oder die Blut-Hirn-Schranke. Die Membranen können unterschiedliche Dicke und unterschiedliche Eigenschaften aufweisen, so dass die Transportprozesse hinsichtlich des Weges und der Geschwindigkeit sehr starken Variationen unterliegen.

Der peroralen Applikation eines Arzneimittels wird von Seiten der Bevölkerung die höchste Akzeptanz und Compliance entgegengebracht. Dies führt dazu, dass perorale Darreichungsformen prinzipiell die erste Wahl für die Arzneistoffapplikation darstellen (*Pfeifer 1995*). Hierbei kommt dem Dünndarm eine besondere Bedeutung als bevorzugter Absorptionsort für die überwiegende Zahl an Arzneistoffen aber auch für Nahrungsmittel zu.

#### **1.1.1 Der Gastrointestinaltrakt als Absorptionsbarriere**

Der Gastrointestinaltrakt als komplexes System mit vielfältigen Aufgaben bietet für verschiedenste Arzneistoffe oder ihre Formulierungen optimale Bedingungen für einen guten und schnellen Wirkstofftransport. Bereits beim Kauvorgang in der Mundhöhle wird Speichel produziert, mit dessen Hilfe die Nahrung aufgeschlossen wird. Über die Speiseröhre (Ösophagus) gelangen Nahrung oder Arzneistoffe in den Magen. Damit findet bei pH-Werten zwischen 1 und 3 im Magen die Durchmischung der aufgenommenen Nahrung, deren Zerkleinerung, Aufschluss und Verdauung statt. Der Magen ist per se kein absorbierendes Organ und verglichen mit dem Dünndarm spielt die Absorption von Arzneistoffen aus dem Magen eine untergeordnete Rolle. Die Magenschleimhaut besitzt ein einreihiges Zylinder-

epithel, in welches die spezifischen Magendrüsen einmünden. Die Drüsen im Bereich der Kardial- und des Pylorus produzieren nur Schleim, die Korpus- und Fundusdrüsen dagegen Schleim, Salzsäure und proteolytische Enzyme. Die Magendrüsen bilden pro Tag etwa 2 – 3 Liter Magensaft. Der Mageninhalt wird über dem Pylorus in das etwa 25 – 30 cm lange Duodenum (Zwölffingerdarm), dem ersten Abschnitt des Dünndarms, entleert. Der Dünndarm ist 5 – 7 m lang, seine weiteren Abschnitte sind das Jejunum (Leerdarm) und Ileum (Krummdarm). Im Dünndarm findet der wesentliche Teil der Verdauung und der Abtransport der Abbauprodukte in die Blutbahn statt. Im Duodenum werden 70 % der Fette, 60 % der Kohlenhydrate und 30 % der Proteine absorbiert. An den Dünndarm schließt sich der Dickdarm an, dessen Aufgabe in der Eindickung des Speisebreies und der Steuerung der Darmentleerung besteht. Aus dem Dickdarm werden keine Nährstoffe mehr absorbiert. Die Eindickung erfolgt durch Absorption von Wasser und Salze, insbesondere in der proximalen Hälfte des Kolons.

### 1.1.2 Bauliche und funktionelle Grundlagen

Der Dünndarm stellt für Pharmaka wegen der großen Oberfläche, der starken Vaskularisierung und der langen Passagezeiten des Speisebreies den Hauptresorptionsort (*Fichtl 1996*). Aus diesem Grund bleiben Mundhöhle, Magen, Dickdarm und Rektum bei den folgenden Betrachtungen unberücksichtigt. Charakteristisch für die Dünndarmschleimhaut ist die starke Oberflächenvergrößerung (*Abb. 1.1*), die durch Schleimhautfalten, Zotten (Villi intestinales) und Bürstensaum (Mikrovilli) hervorgerufen wird. Dabei nimmt die Oberfläche des Dünndarms von proximal nach distal deutlich ab (*Thews et al. 1999*). Der proximale Abschnitt des Dünndarms hat die höchste Absorptionskapazität nicht nur für Nahrungsbestandteile, sondern auch für Wirkstoffe. Die Resorption der Nahrungsbestandteile findet vorwiegend in den Zottenspitzen statt, während die sekretorischen Aktivitäten in den Krypten lokalisiert sind.

Die anatomischen Barrieren (*Abb. 1.2*) bei der Arzneistoffresorption sind die Schleimschicht, die Luminal- und Serosalmembran der Enterozyten, tight junctions, die Basalmembran und die Kapillarwände der Blut- und Lymphgefäße (*Fleisher 2000*).

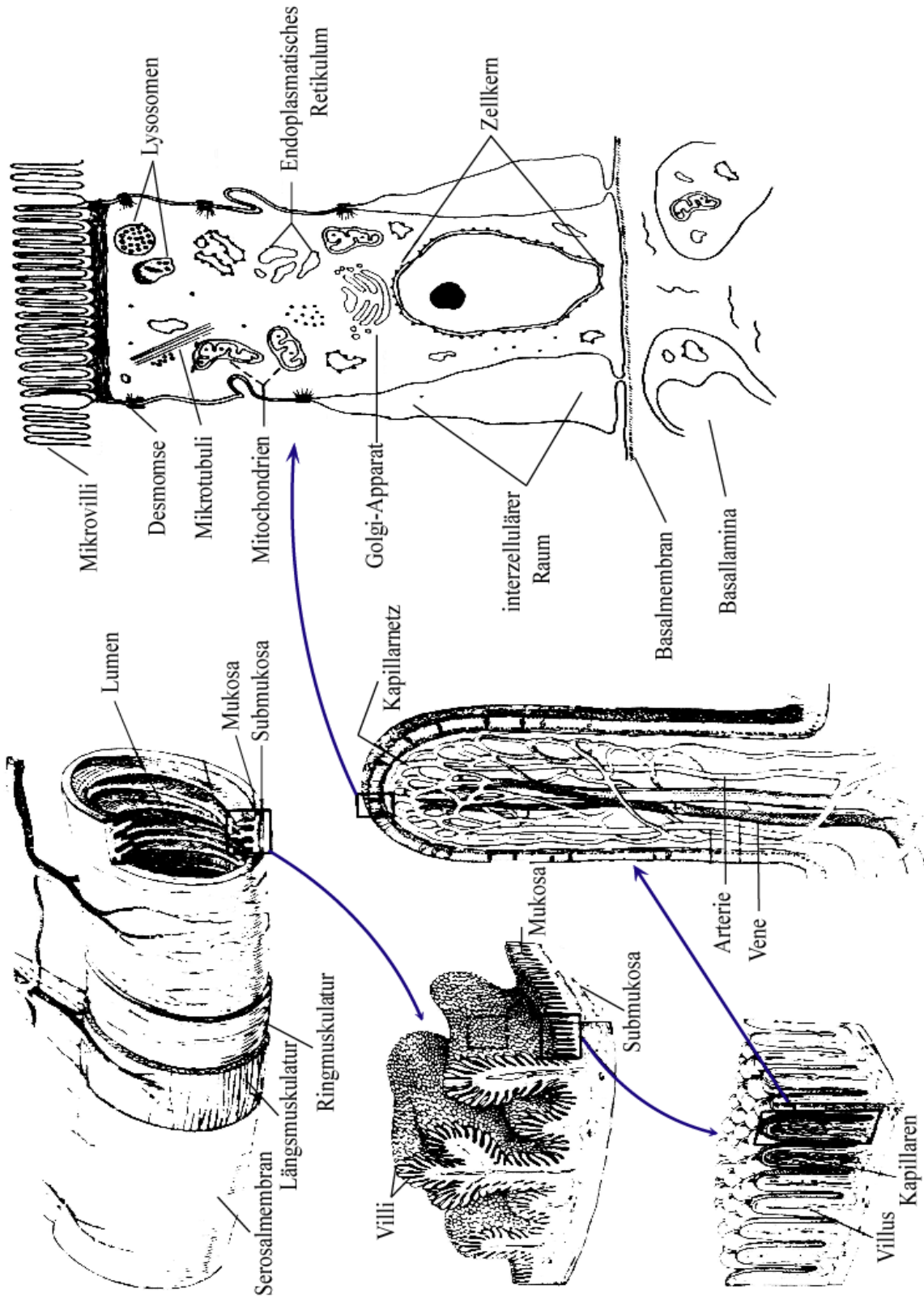
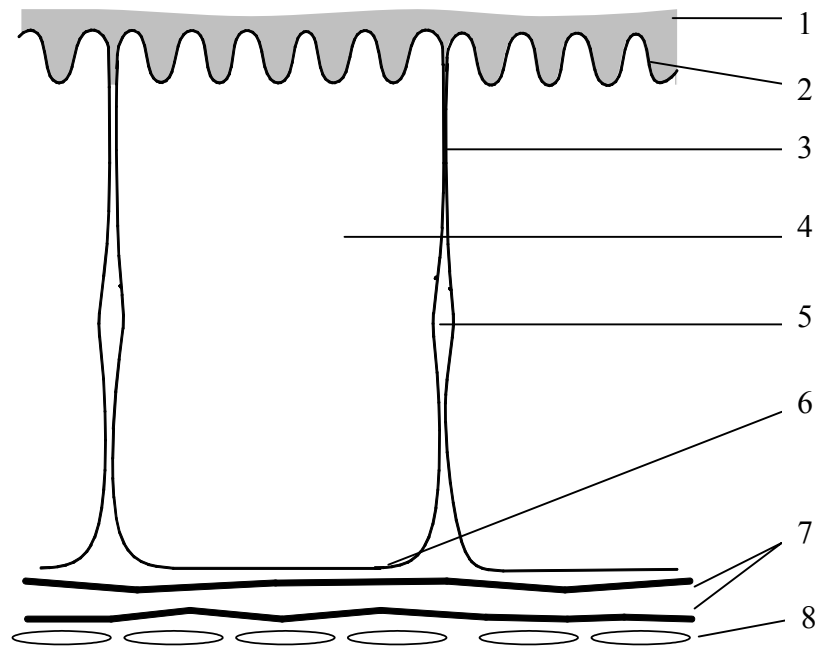


Abb. 1.1 Oberflächenvergrößerung innerhalb des Dünndarms (nach Anderson 1990)



**Abb. 1.2** Schematische Darstellung der intestinalen Resorptionsbarrieren.

1: Schleimschicht; 2: Luminalmembran; 3: tight junction;  
 4: Enterozyt; 5: interzellulärer Raum; 6: Serosalmembran;  
 7: Basalmembran; 8: fenestriertes Kapillarendothel  
 (nach Van Hoogdalem et al. 1989).

Schleimschicht und Glykokalyx stellen das entscheidende Hindernis für lipophile Stoffe dar. Im Schleim herrscht ein saures Mikroklima ( $\text{pH} = 6,0$ ) (Fleisher 2000). Aufgrund ihrer Sialin- und Schwefelsäurereste sind die Mucine negativ geladen. Mobile Kationen wie z. B. Protonen oder ionisierte Basen können sich an diese Ladungen anlagern (Vaupel 2000). Dadurch wird der Kontakt mit der Resorptionsfläche erleichtert sowie durch Anreicherung ein größeres Konzentrationsgefälle aufgebaut, was unter anderem die Resorption von beispielsweise quartären Ammoniumverbindungen erleichtert. Im Gegensatz dazu besteht aber auch die Möglichkeit, dass Arzneistoffe so stark an den Schleim gebunden werden, dass ihre Resorption behindert wird (Van Hoogdalem 1989).



**Tab. 1.1** Dimensionen der Transportwege in humanen intestinalen Epithelien  
(nach Fleisher 2000)

Luminaler Radius	1 cm
Flüssigkeits-Grenzschicht	
<i>in vivo</i>	$\leq 40 \mu\text{m}$
<i>in situ- und in vitro-Systeme</i>	100 - 900 $\mu\text{m}$
Mukusschicht (gemessen <i>in vitro</i> )	100 - 500 $\mu\text{m}$
Jejunal pH-Mikroklima-Schicht	500 - 900 $\mu\text{m}$
Zottenhöhe	500 - 800 $\mu\text{m}$
Interzotten-Räume ( <i>intervilus</i> )	50 $\mu\text{m}$
Mikrovilli-Höhe	1,4 $\mu\text{m}$
Glykocalyx	0,1 - 0,2 $\mu\text{m}$
Höhe der Epithelzellen	30 $\mu\text{m}$
Breite der Epithelzellen	8 $\mu\text{m}$
Dicke der Mukosalmembran	10 - 11 nm
Dicke der Serosalmembran	7 nm
Polare Schicht der Membran (Hydrophiler Teil)	1 - 2 nm
Hydrophober Kern der Membran	30 nm
Dicke der Basalmembran	30 nm
Tiefe der tight junction (in Zotten)	400 nm
Tiefe der tight junction (in Krypten)	250 nm
Lateraler Interzellulärraum	15 - 30 nm
Abstand der Basalmembran zu den Kapillaren	0,5 $\mu\text{m}$

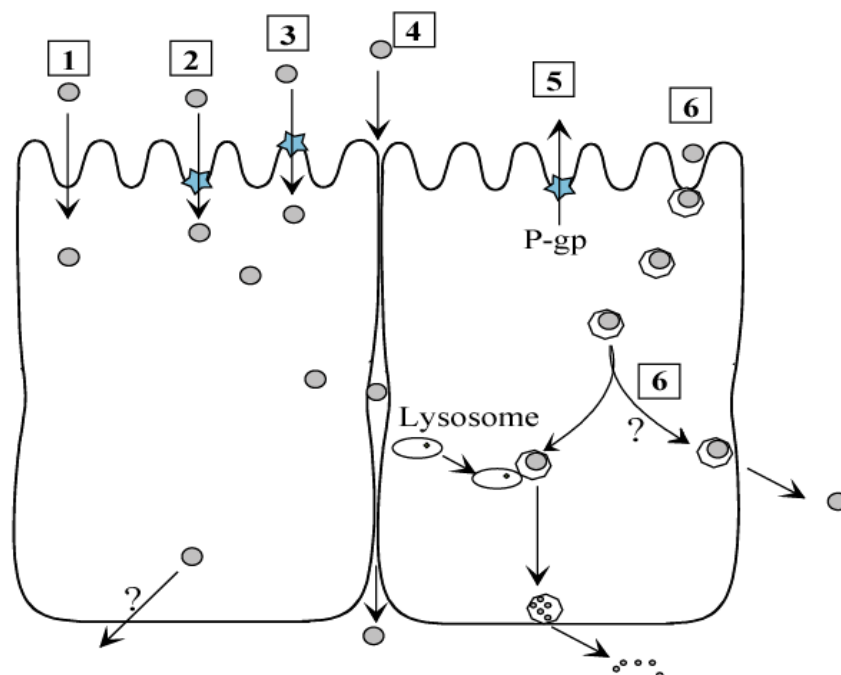
Die Zellmembranen auf der Luminal- und der Serosalseite bestehen wie alle Membranen aus Lipiden und Proteinen und bilden die entscheidenden Diffusionsbarrieren für hydrophile Substanzen. Die Lipide (Phospholipide, Glykolipide und Cholesterol) bilden dabei die Matrix der Membranstruktur in Form von Doppelschichten. Die Proteine sind mit den Membranen locker assoziiert, tauchen in die Membranen ein oder durchdringen diese. Sie sind für Transportvorgänge und die Verankerung des Cytoskeletts verantwortlich, oder sie haben als Enzyme katalytische Aufgaben (*Karlson 1994*). Die Serosalmembran stellt, verglichen mit der Luminalmembran, eine geringere Barriere dar. Dies ist auf den geringeren Gehalt an Glykosphingolipiden und damit die höhere Fluidität zurückzuführen (*Fleisher 2000*).

Die Epithelzellen sind auf der luminalen Seite untereinander seitlich mit „tight junctions“ (Zell-Zell-Verbindungen) verknüpft. Der Porendurchmesser der tight junctions (Zonulae occludentes) nimmt im Intestinaltrakt von proximal nach distal hin ab. Das Jejunum des Menschen ist über tight junctions für Teilchen mit einem Durchmesser von maximal 0,8 nm permeabel, die Werte für das Ileum betragen ca. 0,4 nm und für das Kolon 0,22 – 0,25 nm (*Vaupel 2000*). Moleküle mit einem Durchmesser von 0,8 nm entsprechen sphärisch geformten Molekülen bis zu einem Molekulargewicht von 150 g/mol und kettenförmigen Moleküle bis 400 g/mol. Für makromolekulare Stoffe sind tight junctions jedoch weniger durchlässig bis undurchlässig (*Fleisher 2000*). Die Basalmembranen der Dünndarmepithelzellen bzw. der Kapillarendothelien bestehen aus Glykoproteinen und Proteoglykanen (*Fichtl 1996*), deren Einfluss auf die Resorption bislang nicht genauer charakterisiert wurde. Die Blut- und Lymphkapillaren sind fenestriert (*Fichtl 1996*), so dass die Kapillarwände nur für makromolekulare Stoffe ein nennenswertes Hindernis darstellen. Es wird beschrieben, dass sehr hydrophile Substanzen die Kapillarwände langsamer passieren als lipophile (*Van Hoogdalem 1989*). Mit dem Speichel, aus den Magenwandzellen, aus dem Pankreas bzw. mit der Galle sezernierte oder im Bürstensaum der Enterozyten lokalisierte Verdauungsenzyme begünstigen normalerweise die Resorption durch Umwandlung makromolekularer Nährstoffe in niedermolekulare, gut resorbierbare Verbindungen.

Gallensäuren können durch Ionenpaarbildung mit ionisiert vorliegenden Substanzen oder durch micellaren Einschluss lipophiler Stoffe die passive Diffusion dieser Nahrungsbestandteile verbessern. Werden jedoch Arzneistoffe durch Enzyme abgebaut oder durch Aggregation mit Gallensäuren an der Resorption gehindert, stellen die physiologischen Resorptionsverbesserer eine biochemische „Resorptionsbarriere“ dar (Florence 1981). In den Darm sezernierte Immunglobuline (vor allem Immunglobulin A) können die Resorption von Arzneistoffen mit Antigencharakter ebenfalls verhindern (immunologische „Resorptionsbarriere“) (Florence 1981).

### 1.1.3 Resorptionsmöglichkeiten

Der Transfer eines Moleküls durch eine biologische Membran kann auf verschiedene Weise erfolgen. Man unterscheidet hauptsächlich zwischen transzellulärem Transport und parazellulärem Transport. Der transzelluläre Transport wird wiederum in aktiven und passiven Transport unterteilt.



**Abb. 1.3** Intestinale Transportmechanismen

1: passive Diffusion ; 2 und 3: Carrier-vermittelter Transport (aktiver und passiver); 4: parazellulärer Transport; 5: P-Glykoprotein-Transporter; 6: vesikulärer Transport.

### 1.1.3.1 Transzellulärer Transport

#### a) Passive Diffusion

Die passive Diffusion ist der am meisten verbreitete Transferprozeß für die Verteilung von Wirkstoffen zwischen Kompartimenten mit unterschiedlicher Konzentration. Bei der passiven Diffusion erfolgt der Stofftransport entlang eines Konzentrationsgefälles ohne Energieaufwand.

Nach dem 1. Fickschen Diffusionsgesetz (Gl. 1-1), hängt die Diffusionsgeschwindigkeit ( $dM/dt$ ) vom Verteilungskoeffizienten zwischen dem Membranmaterial und der umgebenden Flüssigkeit ab.

$$\frac{dM}{dt} = D * P * \frac{A}{d} * (C_2 - C_1) \quad (Gl. 1-1)$$

$\frac{dM}{dt}$  pro Zeiteinheit diffundierte Menge (Flux)

$D$  Diffusionskoeffizient

$P$  Verteilungskoeffizient zwischen Membran und Kompartiment

$A$  Diffusionsfläche

$d$  Dicke der Membran

$(C_2 - C_1)$  Konzentrationsgradient zwischen den Kompartimenten

Häufig wird das Produkt aus Diffusionskonstante und Verteilungskoeffizient zum Permeationskoeffizienten zusammengefasst.

Aus dem 1. Fickschen Diffusionsgesetz (Gl. 1-1) folgt, dass die lipophilen Anteile der Membran für hydrophile Substanzen nahezu undurchlässig sind. Auf der anderen Seite ist die Molekülgröße der permeierenden Teilchen der limitierende Faktor für die Diffusion über die durch Membranproteine gebildeten Poren und Kanäle (Fichtl 1996). Passive Diffusion ist abhängig vom herrschenden Konzentrationsgradienten in beide Richtungen möglich und somit reversibel. Voraussetzung dafür, dass ein Stoff passiv transportiert werden kann, ist, dass er in echter Lösung, also molekulardispers vorliegt. Dies erfordert zumindest eine minimale Löslichkeit in Wasser (Hydrophilie). Darüber hinaus muss der zu

transportierende Stoff über eine gewisse Löslichkeit in den Membranlipiden verfügen (Lipophilie). Ionen werden im Allgemeinen nicht durch passive Diffusion transportiert (Koch und Ritschel 1986). Die meisten gebräuchlichen Arzneistoffe sind Salze. Diese haben den Charakter von schwachen Säuren oder Basen, die im wässrigen Milieu zum größten Teil in neutraler (undissozierter) Form vorliegen. Der nicht-ionisierte Anteil, der einerseits vom  $pK_s$  des Stoffes, andererseits vom pH des wässrigen Mediums abhängt, ist allerdings für die passive Diffusion sehr wohl geeignet und wird nach diesem Mechanismus resorbiert.

### **b) Erleichterte Diffusion**

Die erleichterte Diffusion vereinigt die Merkmale der passiven Diffusion mit jenen des aktiven Transportes. Treibende Kraft ist wieder der Konzentrationsgradient. Im Gegensatz zur passiven Diffusion ist hier ein Transportenzym oder Carrier an der Überwindung der Lipidbarriere beteiligt. Die Passage verläuft entsprechend ohne Energieverbrauch entlang des Konzentrationsgefälles, sie ist jedoch hemm- und sättigbar (Meier et al 1981; Fromm und Hierholzer 2000). Als Beispiel für diesen Mechanismus wird die Absorption des Komplexes aus Cyanocobalamin und „Intrinsic Factor“ angesehen. Einen Sonderfall der erleichterten Diffusion stellt der Ionenpaartransport dar.

### **c) Aktiver Transport**

Bei aktivem Transport werden Stoffe gegen ein Konzentrationsgefälle oder Ionen gegen ein elektrisches Potential unter Verbrauch von Stoffwechselenergie durch die Membran geschleust. Dazu bedarf es eines spezifischen Trägers (Carrier). Träger sind membrangebundene ATP-abhängige Enzyme (ATP-asen). Die zu transportierende Substanz wird in einem 1. Schritt an das Transportenzym gebunden. Aus diesem Grund ist der Prozess in hohem Grade substanzspezifisch. Da die Konzentration des Trägers konstant ist, lässt sich der aktive Mechanismus sättigen und hemmen. Bei Säugetieren sind die aktiven Transportprozesse überwiegend an einen vorhandenen  $Na^+$ -Gradienten gekoppelt (Rettig 1981; Fei et al. 1994; Sasabe et al 1997; Christie et al. 2001). Der Transport der Ionen in Richtung des

Konzentrationsgefälles ist mit einem weiteren Transfer gegen das Konzentrationsgefälle verknüpft. Man unterscheidet bei diesem Cotransport Sym- und Antiport, je nachdem ob Substrat und Ionen gleichgerichtet oder entgegengesetzt transportiert werden (*Schmidt et al. 2000; Karlson 1994*). Ist ein weiterer Cotransport zur Translokation notwendig, wird dies als tertiär aktiver Transport bezeichnet.

Ein aktiver Transportprozeß kann folgendermaßen charakterisiert werden:

- der Transport der Substanz wird bei Zugabe eines metabolischen Inhibitors, welcher die Bildung von ATP unterbindet, verlangsamt oder kommt zum Erliegen
- molekularer Sauerstoff wird benötigt
- die Temperaturabhängigkeit aktiver Prozesse ist stärker ausgeprägt als bei passiver Diffusion
- es besteht eine Konkurrenz zwischen strukturellen Analoga um die Bindungsstelle des Carriers

Beispiele für aktive Transportsysteme im Intestinum sind:

- Aminosäuren, diese werden durch unterschiedliche  $\text{Na}^+$ -gekoppelte Co-Transportsysteme resorbiert. Die Carrier sind hochspezifisch und jeder transportiert nur eine bestimmte Gruppe von Aminosäuren (*Christie et al. 2001; Vincent 2000; Malo 1991, Liang-Shang und Dhiren 1997; Thwaites 1994; Hidalgo und Borchardt 1990*).
- Di- und Tripeptide können über einen carriervermittelten Prozeß absorbiert werden, der in verschiedenen Spezies eine breite Substratspezifität aufweist (*Fei et al., 1994; Hyo-kyung et al. 1999; Adibi 1997; Aeissi und Hidalgo 1999; Thwaites et al 2002; Artursson 1993; Bai et al. 1991; Hidalgo et al 1995*). Da Aminosäuren weder die Absorption von Di-/Tripeptiden hemmen können, noch selbst vom Peptidtransporter als Substrat erkannt werden, muss der Peptidtransporter verschieden sein von dem schon länger bekannten Aminosäure-Carrier. Der Aufnahmeprozeß in die Zellen ist stereoselektiv, denn Dipeptide mit L-L-Konfiguration zeigen die höchste Aufnahme rate, gefolgt von gemischten Isomeren (L-D und D-L) und von D-D-Isomeren.

- Gallensalze, diese diffundieren im gesamten Intestinum passiv. Für Gallensalzanionen befinden sich jedoch hochspezifische  $\text{Na}^+$ -abhängige aktive Transportsysteme im unteren Bereich des Ileums. Konjugation mit Taurin oder Glycin erhöht die Affinität zum Transporter (*Barnard und Ghishan 1987; Hidalgo und Borchardt 1990*).
- $\text{Na}^+$ -abhängige aktive Systeme, wie z. B. SGLT-1 Transporter, transportieren Glukose und Galaktose (*Johnson 2001*).

#### **d) Vesikulärer Transport**

Beim vesikulären Transport binden Substrate an Rezeptoren (rezeptorvermittelte Endozytose) oder unspezifisch an die Zytoplasmamembran. Unter Anwendung von Stoffwechselenergie ist die Einstülpung der Epithelschicht in Kontakt mit Partikeln (Phagozytose) oder Flüssigkeitströpfchen (Pinozytose) und anschließende Abschnürung und Einschleusung in die Zelle möglich. Für die Resorption von Arzneistoffen hat dieser Absorptionsmechanismus nur geringe Bedeutung. Lediglich die fettlöslichen Vitamine A, D, E und K werden zusammen mit Öltröpfchen (Chylomikronen) auf diese Weise aus dem Gastrointestinaltrakt aufgenommen (*Meier et al. 1983*).

#### **1.1.3.2 Parazellulärer Transport**

Das intestinale Epithel besteht aus einer einlagigen Zellschicht, in der benachbarte Zellen unter anderem durch „tight junctions“ miteinander verbunden sind. Tight junctions befinden sich direkt unterhalb der apikalen Zellmembran und stellen eine Reihe punktueller Verbindungen zwischen den äußeren Zellmembranen der benachbarten Zellen dar. Sie dienen als Hindernis gegen das Hin- und Herdiffundieren von Substanzen zwischen der apikalen und basolateralen Plasmamembran und kontrollieren somit den Substanzfluss zwischen den Zellen hindurch. Dieses Hindernis ist für Makromoleküle in der Regel undurchlässig, kann aber von kleinen hydrophilen Substanzen durchdrungen werden. Substanzen, die im Durchmesser kleiner sind als die Poren wie Wasser, Methanol, Ethanol, Glycerin, Harnstoff und ähnliche (Durchmesser 7 – 10 Å) können die Poren ungehindert passieren. Treibende Kraft für den konvektiven Transport ist der hydrostatische Druck oder

Osmolaritätsdifferenzen von Lösungen. Insgesamt muss bedacht werden, dass der parazelluläre Weg lediglich 0,1 % der gesamten Epitheloberfläche ausmacht (Nellans 1991).

#### 1.1.4 Bioverfügbarkeitsbeeinflussende Faktoren

Unter Bioverfügbarkeit ist das Ausmaß und die Geschwindigkeit zu verstehen, mit der eine wirksame Substanz aus einer Arzneiform aufgenommen und am Wirkort verfügbar wird. Die Bioverfügbarkeit kann durch interne (physiologische) oder externe (physikalische oder physikochemische) Faktoren beeinflusst werden. Damit ein Arzneistoff resorbiert wird, muss die Tablette bzw. Kapsel in kleinere Partikel zerfallen und sich in der gastrointestinalen Flüssigkeit auflösen. Die Formulierung eines Arzneistoffes spielt dabei eine entscheidende Rolle, so wird die Bioverfügbarkeit z. B. durch die Zerfallzeit einer Tablette, die Auflösungsgeschwindigkeit eines Arzneistoffes, dessen chemische Eigenschaften, die Partikelgröße und nicht zuletzt durch polymorphe Eigenschaften dieser Partikeln maßgeblich beeinflusst. Neben den genannten Faktoren kommt zusätzlich auch den Eigenschaften der verwendeten Hilfsstoffe eine Schlüsselrolle hinsichtlich der Bioverfügbarkeit zu. Insbesondere die Auflösungsgeschwindigkeit ist ein wichtiger Faktor mit großem Einfluss auf die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes. Sie ist abhängig von verschiedenen physikochemischen Eigenschaften des Arzneistoffes wie z. B. pK-Wert, Ionisationsgrad und Partikelgröße. Weiterhin ist die Resorption von der Zusammensetzung des Speisebreies und dem Füllungsgrad des Magens abhängig. Physio-chemische Interaktionen, vor allem die Wechselwirkung des Arzneistoffes mit der Mukusschicht, können die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes einschränken. Neben den Faktoren, die in der Natur der Substanz und ihrer galenischen Zubereitung liegen, kann durch Enzyme in der Darmschleimhaut bzw. durch Darmbakterienenzyme die Bioverfügbarkeit durch Abbau der Substanzen verringert werden. Die Verweildauer eines Arzneistoffes im Gastrointestinaltrakt ist für die Resorption und damit die Bioverfügbarkeit von großer Bedeutung. Substanzen, welche die Darmmotilität erhöhen wie Anticholinergika, Amphetamine oder Morphine, reduzieren die Verweilzeit und vermindern damit die Bioverfügbarkeit. Dagegen haben Stoffe, welche die Darmmotilität erniedrigen, einen



positiven Effekt auf die Bioverfügbarkeit. Die Darmmotilität unterliegt darüber hinaus auch anderen Einflussfaktoren wie Emotionen, starker körperlicher Belastung und Schmerzen. Neben all diesen Faktoren wird die Bioverfügbarkeit durch den gastrointestinalen Metabolismus beeinflusst. Hierbei unterscheidet man zwischen dem pre-absorptiven und dem intrazellulären Metabolismus. Der proximale Teil des Dünndarms ist arm an Bakterien, während der distale Teil  $10^6$  bis  $10^7$  Bakterien pro Gramm aufweist. So können beispielsweise Prodrugs nach Hydrolyse durch die Darmbakterien in die therapeutisch aktive Form überführt werden (*Barthe et al. 1999*). Die zweite Form des pre-absorptiven Metabolismus ist in der Brush Border Membran lokalisiert. Die Oberfläche dieser Membran beträgt ca.  $200 \text{ m}^2$  und enthält Enzyme wie alkalische Phosphatase, Sucrase und verschiedene Peptidasen. Die Peptidasen in der Brush Border Membran sind verantwortlich für die schlechte Bioverfügbarkeit vieler therapeutischer Peptide (*Barthe et al. 1999*).

Die Variabilität der oralen Bioverfügbarkeit zahlreicher Arzneistoffe ist teilweise auf den intrazellulären Metabolismus zurückzuführen. Die Cytochrom P450 Enzyme der Phase-I des Metabolismus sind überwiegend in der Leber, aber auch in extrahepatischen Organen wie dem Darm anzutreffen (*Barthe et al. 1999*). Beim Menschen exprimieren die Darmenterozyten beispielsweise das Isoenzym CYP3A4, welches strukturell und funktionell mit dem in der Leber identisch ist. Dieses Enzym ist beteiligt am Metabolismus vieler Arzneistoffe. Die Phase-II-Enzyme sind ebenfalls in den Enterozyten lokalisiert. Die Darmzellen weisen hohe Konzentrationen an Glutathion-S-transferase  $\pi$  (Säuren) und  $\alpha$  (Basen) auf. Die Konzentration beider Enzyme im Darm ist höher als in der Leber (*Barthe et al. 1999*). Auch die Sulfotransferase besitzt in den Darmenterozyten die höchste Aktivität, während die der Acetyltransferase nur halb so groß wie die in der Leber ist (*Barthe et al. 1999*).

Neben den Enzymen kann die Bioverfügbarkeit durch Transporter beeinflusst werden. So wird die schlechte Bioverfügbarkeit vieler Arzneistoffe dem P-Glycoprotein-Transporter (P-gp) zugeschrieben, dessen Substrate den gleichen Charakter wie die des CYP 3A4-Enzyms zeigen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird die Stereoselektivität der Resorption von Ibuprofen, Ofloxacin und Talinolol untersucht. Um einen Überblick über die Mechanismen zu geben, die parallel während der Resorption ablaufen und damit einen Einfluss auf die Stereoselektivität haben können, wird im Folgenden auf den Metabolismus und die Sekretion im Dünndarm eingegangen.

#### **1.1.4.1 Intestinaler Metabolismus und intestinale Transportmechanismen als bioverfügbarkeitslimitierende Faktoren**

Neben der Leber, dem wesentlichen Organ für eine präsystemische Elimination bei Arzneimitteln mit unvollständiger Bioverfügbarkeit darstellt trägt die Darmwand in erheblichem Umfang zum First-Pass Metabolismus und damit zur unvollständigen und variablen Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln bei. Außer den Metabolisierungssystemen sind auch Transporter, welche in der Darmwand lokalisiert sind, an diesem Effekt beteiligt. Zum Verständnis der dabei ablaufenden Vorgänge und deren Einflusses auf die Bioverfügbarkeit wird im Folgenden auf die wichtigsten Faktoren eingegangen.

##### **1.1.4.1.1 Intestinaler Metabolismus**

Im Dünndarm befindet sich eine Vielzahl von Phase-I- und Phase-II-Enzymen (*Hartiala 1973; Toivonen et al. 1973*). Im Vergleich zur Leber exprimiert der Dünndarm jedoch geringere Mengen an arzneistoffmetabolisierenden Enzymen, insbesondere der Cytochrom P450-Gruppe. So enthält die Leber ca. 90 - 95% des gesamten Cytochrom P450-Gehaltes des Körpers, gegenüber 1 – 2 % die in der Darmwand lokalisiert sind (*Mc Kinnon et al. 1995*). Aus diesem Grund wird dem Metabolismus durch die Darmwand eine geringere Bedeutung beigemessen.

##### **Cytochrom P450 Enzyme**

Die Enzyme der Cytochrom P450 Familie (CYPs) spielen für den Phase-I-Metabolismus die wichtigste Rolle. Bei diesen Enzymen handelt es sich um membranständige Hämproteine, die auf der cytosolischen Seite des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind. Funktionell gehören sie zur Gruppe der mischfunktionellen Monooxygenasen. Sie führen funktionelle Gruppen in unpolare Moleküle ein oder legen entsprechende funktionelle Gruppen frei. Ziel des Meta-

bolismus ist eine Hydrophilisierung der Arzneistoffe, um ihre renale Ausscheidung zu erleichtern.

In der Ratte sind mehr als 40 Isoenzyme der CYP-Familie bekannt, während deren Zahl für den Menschen zwischen 25 und 30 angegeben wird (*Nelson et al. 1996*). Die 6 Haupt-Isoenzyme sind CYP1A2, CYP2C8/9/10, CYP2C18/19, CYP2D6, CYP2E1 und CYP3A4. Innerhalb der CYP3A Subfamilie ist CYP3A4 die dominante Isoform im Darm (*Lown et al. 1994; Kolars et al. 1994*). CYP3A4 ist an der Biotransformation von über der Hälfte der bis heute untersuchten Arzneimittel beteiligt. Cyclosporin, Midazolam und Verapamil werden hauptsächlich durch Enzyme der CYP3A Subfamilie metabolisiert (*Mangold et al. 1994; Thummel et al. 1994; Kroemer et al. 1993*). Die Gesamtmenge CYP3A4 ist im Darm um den Faktor 20 – 30 geringer als in der Leber (*Washington et al. 2001*). CYP3A4 metabolisiert viele Substanzen verschiedener chemischer Strukturen und Eigenschaften wie z. B. Alfentanol, Cimetidin, Cyclosporin, Enoxacin, Erythromycin oder Lidocain. So katalysiert dieses Enzym die N-Dealkylierung und C-Hydroxylierung von Terfenadin im Mensch (*Lin und Lu 1997*). Untersuchungen zeigen, dass beispielsweise 50 % einer oral applizierten Cyclosporin-Dosis durch intestinalen Metabolismus eliminiert werden (*Hebert et al. 1997*). Der intestinale Metabolisierungsgrad beträgt für Midazolam 43 % und für Verapamil 47 % (*Kotegawa et al. 2002; Paine et al. 1996; Kim et al. 1999*). CYP3A macht 30 % aller in der Leber exprimierten CYPs aus (*Shimada et al. 1994*) und ist im Dünndarm zu einem noch höheren Prozentsatz exprimiert (*Washington et al. 2001*). Wie auch in der Leber unterliegt die CYP3A Expression im Dünndarm großen interindividuellen Schwankungen (*Lown et al. 1994; Paine et al. 1997*). Im Gegensatz zur Leber, in der 80 % aller Hepatozyten CYP3A exprimieren (*Ratanasavanh et al. 1991; Watkins et al. 1990*), ist im Darm die Expression dieser Subfamilie auf die Enterozyten, welche die einschichtige Epithelschicht dieses Organs bilden, beschränkt.

Der Dünndarm hat eine mit der Körpergröße korrelierte Gesamtlänge von 250 – 350 cm. Innerhalb des Dünndarms nimmt die CYP3A Proteinexpression vom

Duodenum und proximalen Jejunum über das distale Jejunum zum Ileum hin ab (*Paine et al. 1997*).

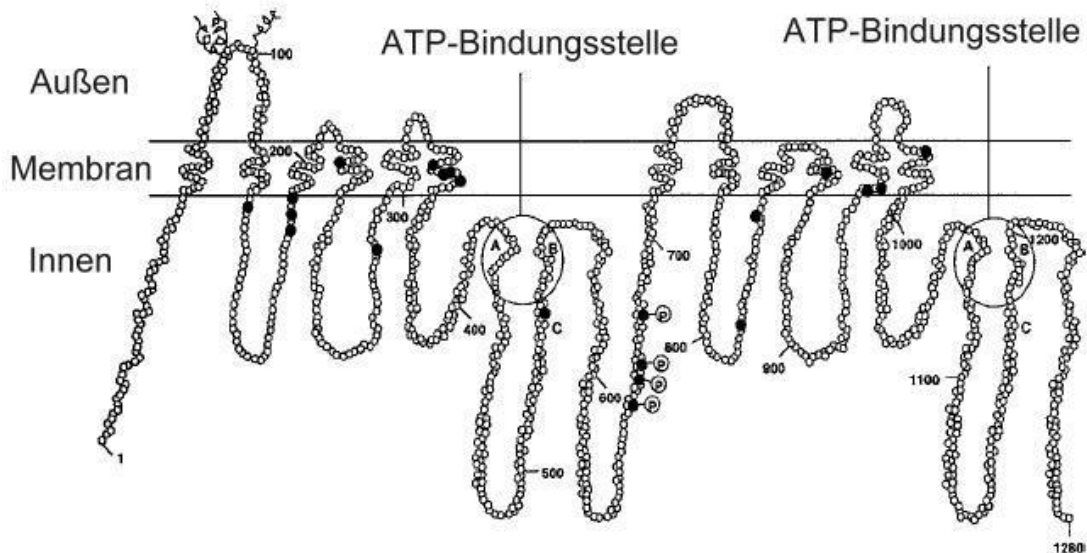
Die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der CYP-Familie sind stark speziesabhängig. Ausgehend von den qualitativen und quantitativen Aspekten ist eine Übertragung des Arzneistoffmetabolismus vom Tier auf den Menschen nicht ohne weiteres möglich. So wird beispielweise der Angiotensin II-Rezeptor Antagonist Losartan in der Ratte, im Hund, im Esel und im Menschen qualitativ unterschiedlich metabolisiert (*Lin und Lu 1997*). Darüber hinaus induziert Omeprazol das CYP1A2-Enzym im Menschen, während es im Kaninchen keinen Effekt zeigt. Das CYP3A4-Isoenzym lässt sich in der Ratte im Gegenteil zum Menschen durch Pregnenolon-16 $\alpha$ -carbonitril induzieren. Dagegen fungiert Rifampicin als CYP 3A4-Induktor im Mensch, jedoch nicht in der Ratte (*Lin und Lu 1997*).

#### 1.1.4.1.2 P-Glykoprotein

Neben dem First-Pass-Metabolismus im Darm und in der Leber stellt die unvollständige Resorption von Arzneistoffen eine weitere Ursache für eine niedrige und variable Bioverfügbarkeit dar. Die Resorption von Arzneistoffen nach oraler Gabe durch passive Diffusion ist in der Regel abhängig von ihren physikochemischen Eigenschaften. Untersuchungen der letzten Jahre haben jedoch gezeigt, dass in der Darmmukosa lokalisierte ABC-Transporter (ATP-Binding Cassette) die Resorption von Arzneistoffen beeinflussen können. Von besonderem Interesse ist dabei das P-Glykoprotein (P-gp), das Genprodukt von MDR1, welches vor allem in den Epithelien des Gastrointestinaltrakts (Jejunum, Ileum und Kolon), in der Niere und in der Leber lokalisiert ist. *Abb. 1.4* zeigt ein hypothetisches, zwei-dimensionales Modell für das P-Glykoprotein.

Das Interesse an P-Glykoprotein wurde durch die Untersuchungen von *Lown et al. (1997)* geweckt. Diese zeigen, dass die Bioverfügbarkeit von Cyclosporin, das sowohl durch CYP3A4 im Darm metabolisiert wird als auch einem aktiven Transport durch P-Glykoprotein unterliegt, mit der Summe der hepatischen CYP3A4- und intestinalen P-Glykoprotein-Expression korreliert. *Kim et al. (1999)* weisen eine Substratüberlappung mit P-Glykoprotein für weitere durch CYP3A4

metabolisierten Arzneistoffe nach. Seitdem wird über ein Zusammenwirken von im Darm exprimierten CYP3A4 und P-Glykoprotein spekuliert (Kato et al. 2001; Raeissi et al. 1999; Raeissi et al. 1997; Lown et al. 1997).



**Abb. 1.4** Hypothetisches zwei-dimensionales Modell für das P-Glykoprotein (Nach Ambudkar et al. 1999).

Die Substrate des P-gp-Transporters variieren sehr stark und erstrecken sich von hydrophilen über amphiphile bis hin zu neutralen Substanzen. P-Glykoprotein ist in der apikalen Enterozytenmembran lokalisiert. Die Aufgabe dieses Transporters besteht darin, in die Enterozyten aufgenommene Substanzen in das Darmlumen zurückzutransportieren und somit eine aktive Barrierefunktion auszuüben. Dadurch wird die intrazelluläre Arzneistoffkonzentration niedrig gehalten und eine Sättigung der arzneistoffmetabolisierenden Enzyme verhindert, was eine effektivere Metabolisierung von Arzneistoffen zur Folge hat (Benet et al. 1999). Zu den Substraten dieses Transporters zählen beispielsweise Cyclosporin A, Taxol, Diltiazem, Dexamethason, Lidocain, Erythromycin, Digoxin, Cimetidin und weitere. Die sehr unterschiedlichen chemischen und strukturellen Eigenschaften dieser Substanzen deuten auf die geringe Spezifität dieses Transporters hin. Die geringe Bioverfügbarkeit der HIV1 Proteaseinhibitoren Indinavir, Nelfinavir und Saquinavir ist neben einem ausgeprägten intestinalen First-Pass-Effekt auf die Sekretion dieser Arzneistoffe ins Darmlumen durch in den Enterozyten exprimiertes P-Glykoprotein zurückzuführen (Kim et al. 1998). Die geringe Bioverfügbarkeit

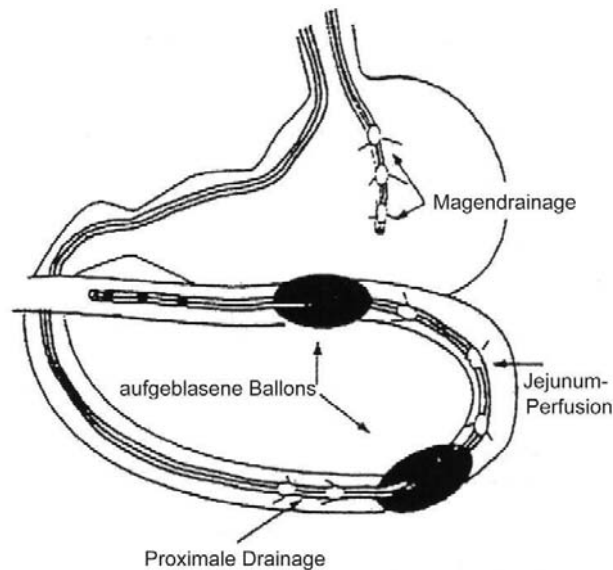
von Cyclosporin wird teilweise ebenfalls durch das P-Glykoprotein verursacht (*Benet et al 1999*): eine Hemmung des intestinalen P-Glykoproteins durch verschiedene P-gp-Blocker führt zu einer Zunahme der Resorption. Die interindividuellen Schwankungen der intestinalen P-gp-Expression sind vergleichbar mit den für CYP3A4 gefundenen Werten (*Lown et al.1997*). Es sind zahlreiche Modulatoren für P-gp bekannt, jedoch inhibiert keiner dieser Modulatoren P-gp durch Bindung an die ATP-Bindungsstelle (*Ambudkar et al. 1999*). Während Modulatoren wie Verapamil die Transportfunktion von P-gp kompetitiv, ohne die Funktionalität dieses Transporters zu stören, hemmen, agiert Cyclosporin als Substrat bei gleichzeitigem Unterbinden der ATP-Hydrolyse, die für die Funktion des P-gp notwendig ist (*Ambudkar et al. 1999*).

### 1.1.5 Resorptionsmodelle

Die verschiedenen Methoden zur Untersuchung der Absorptionsmechanismen lassen sich in die drei Klassen *in vivo*, *in situ* und *in vitro* unterteilen.

#### 1.1.5.1 In vivo-Methoden

Orale Absorptionsstudien werden *in vivo* am lebenden Tier durchgeführt. Über einen Katheter wird die Arzneistofflösung in den Dünndarm appliziert. Dabei wird ein kleiner Schnitt am gewünschten Applikationsabschnitt des Intestinums vorgenommen und anschließend der Katheter sorgfältig ins intestinale Lumen eingeführt und fixiert (*Lennernäs und Regarh 1993*). Diese Perfusionstechnik wurde bis zur Anwendbarkeit am Mensch weiterentwickelt. Das Perfusionsinstrument besteht aus einem Mehrkanalschlauch und zwei aufblasbaren Ballons im Abstand von 10 cm, die in aufgeblasenem Zustand das gewählte Darmsegment verschließen. Der Schlauch wird nach lokaler Anästhesie oral eingeführt. Diese Methode erlaubt die Applikation einer Arzneistofflösung in einen definierten Darmabschnitt. *In vivo*-Methoden sind unter anderem bei der Bestimmung der absoluten Bioverfügbarkeit verschiedener Arzneistoffe und deren Formulierungen nach oraler Applikation die Methode der Wahl. Dazu wird die Fläche unter der Plasmaspiegelkurve mit derjenigen nach intravenöser Applikation verglichen.



**Abb. 1.5** Mehrkanalschlauch mit zwei aufblasbaren Ballons für segmentale Perfusion am Mensch

### 1.1.5.2 In situ-Methoden

In situ-Experimente zur Untersuchung der intestinalen Arzneistoffresorption sind erstmals im Jahre 1960 durchgeführt worden. Die Entwicklung von stabilen vaskulär perfundierten Präparationen des Dünndarmes führte zu einer aussagekräftigen Methode für die Untersuchung intestinaler Transport- und Metabolismuskvorgänge. Das Segment des Darms eines vorher anästhesierten Tieres, in welches die Arzneistofflösung eingebracht wird, kann entweder geschlossen („closed loop“) oder offen („open loop“) sein (Doluisio et al. 1969).

### 1.1.5.3 In vitro-Methoden

In vitro-Systeme und Methoden liefern wertvolle Informationen über Kinetik und mechanistische Aspekte intestinaler Transport- und Metabolismuskvorgänge, welche in diesem Maße aufgrund der Komplexität des Gesamtorganismus in vivo nicht gewonnen werden können. Mehrere in vitro-Modelle können zur Untersuchung der Resorption eines Arzneistoffes verwendet werden. Davon sind einige in der pharmazeutischen Industrie für Screeningszwecke verbreitet. Tab. 1.2 zeigt eine Übersicht der in vitro-Resorptionsmodelle.

<i>Modell</i>	<i>Anwendung</i>	<i>Literatur</i>
Everted sac	Weit verbreitet zur Untersuchung des Transport durch das Intestinum.	<i>Middleton, 1990</i>
Intestinaler Ring (Intestinal rings)	Einfache und effektive Methode zur Untersuchung der Aufnahmekinetik in der intestinalen Mukosa. Der Hauptnachteil dieser Methode liegt darin, dass keine Aussage über die Polarität der Aufnahme gemacht werden kann.	<i>Porter et al. 1985</i>
Mukosale Blätter (Mucosal sheets)	Das Intestinumsegment wird geöffnet und in Streifen geschnitten. Die Muskulatur wird entfernt und zwischen zwei Kompartimenten in einer Ussing Diffusionskammer befestigt	<i>Edmonds und Mar. 1968; Smith et al.</i>
Isolierte Zellen (Isolated cells)	Isolierte Enterozyten werden durch Behandlung des Darmsegments mit proteolytischen Enzymen oder durch mechanische Methoden gewonnen. Nachteil ist die Kurzlebigkeit dieser Zellen. Sinnvolle Anwendung für die Untersuchung Arzneistoffaufnahme in die Zellen.	<i>Webster und Harri 1969; Iglesias et al.</i>
Membranvesikel (Membrane Vesicles)	Brush Border Membran-Vesikel werden durch Abschabung des intestinalen Segmentes oder durch Homogenisierung isolierter Zellen mit anschließender Ausfällung durch divalente Kationen gewonnen.	<i>Hopfer et al 1973; Ostiecka et al 1985; Sugawara et al 1991</i>
Zellkultur-Modelle	Caco-2 oder HAT-29 und andere. Siehe <i>Tab. 1.3.</i>	

**Tab. 1.2** *Übersicht der in vitro-Resorptionsmodelle (nach Panchagnula und Thomas 2000)*



**a) Ussingkammern**

Ussingkammern in verschiedenen modifizierten Aufbauformen sind in größerem Umfang zur Untersuchung von Transport und Transportmechanismen verwendet worden. So werden Ussingkammern beispielsweise zur Untersuchung von Iontentransportern genutzt (*Ussing und Zehran 1951; Atisook et al. 1990; Leibovitz et al. 1976; Sugiyama et al 1997*). Zur Anwendung der Ussingkammer wird das frisch erhaltene intestinale Gewebe von der Muskelschicht befreit. Die Gewebestücke werden über die Öffnung einer Kammerhälfte gelegt, anschliessend wird die Kammer zusammengesetzt. Beide Kammerhälften werden mit Puffer bzw. mit Transportlösung befüllt, das intestinale Gewebe stellt somit die Barriere zwischen den beiden Lösungen dar. Die Ussingkammer wird mit Sauerstoff versorgt, um die Lebensfähigkeit des Gewebes zu verlängern und eine Durchmischung der Lösung in der jeweiligen Kammerhälfte zu erzielen. Der Nachteil dieses Systems besteht wie bei allen anderen in vitro-Systemen in der Abwesenheit der intakten mesenterischen Blutversorgung. Ein weiterer Nachteil liegt in der Schwierigkeit der Entfernung des unterliegenden Gewebes vom Epithel. Dies kann zur Beschädigung des Epithels führen und setzt einiges an Erfahrung voraus.

**b) Kultivierte Zellen**

Zellkultur-Modelle werden vermehrt zur Untersuchung von biologischen Transportprozessen herangezogen. Sie bieten die Möglichkeit, Mechanismen zur Permeabilität und Metabolismus eines Arzneistoffes aufzuklären, sowie neue Strategien hinsichtlich Penetrationsförderung und Drug Targeting zu testen. Zellkultur-Modelle bieten eine Reihe an Vorteilen gegenüber herkömmlichen Methoden, die von guter Reproduzierbarkeit über leichte Handhabung und hohe Aussagekraft bis zur Einsparung von zeit- und kostenintensiven Tierversuchen reichen.

**Tab. 1.3** Häufig verwendete Zellkultur-Modelle zur Bestimmung des transzellulären Fluxes (Ho et al. 2000)

Zellkultur	AbStammung (Gewebe)/Spezies	Zelltyp
<i>Caco-2</i>	<i>Kolon/Mensch</i>	<i>Epithelial</i>
<i>HAT-29</i>	<i>Kolon/Mensch</i>	<i>Epithelial</i>
<i>T<sub>84</sub></i>	<i>Kolon/Mensch</i>	<i>Epithelial</i>
<i>MDCK</i>	<i>Niere/Kaninchen</i>	<i>Epithelial<sup>a</sup></i>
<i>LLC-PK<sub>1</sub></i>	<i>Niere/Schwein</i>	<i>Epithelial<sup>a</sup></i>
<i>BMEC</i>	<i>Gehirn/Rind</i>	<i>Endothelial<sup>b</sup></i>
<i>BPAEC</i>	<i>Lungenarterie/Rind</i>	<i>Endothelial<sup>b</sup></i>
<i>BAEC</i>	<i>Aorta/Rind</i>	<i>Endothelial<sup>b</sup></i>
<i>HUVEC</i>	<i>Umbilical cord (Nabelschnur)/Mensch</i>	<i>Endothelial<sup>b</sup></i>

<sup>a</sup> *MDCK (Madin-Darby canine kidney) isoliert aus dem distalen Tubulus, während LLC-PK<sub>1</sub> aus dem proximalen Tubulus stammt.*

<sup>b</sup> *BMEC (brain-microvessel endothelial cells) isoliert aus den Kapillaren BPAEC (bovine pulmonary artery endothelial cells), BAEC (bovine aortic endothelial cells) und HUVEC (human umbilical vein endothelial cells)*

Zum Verständnis und zur Untersuchung von Transport und Transportmechanismen eines Arzneistoffes durch die intestinalen Enterozyten müssen polarisierte Zellen herangezogen werden, damit die Transportrichtung unterschieden werden kann. Zellkulturen aus Primärzellen haben bis jetzt nicht zum Erfolg geführt, was auf die fehlende Redifferenzierung der isolierten Zellen unter in vitro-Bedingungen zurückzuführen ist. Die begrenzte Lebensfähigkeit und die schwierige Kultivierung sind die wichtigsten Gründe für die

eingeschränkte Anwendbarkeit dieses Zellkultursystems. Der Einsatz von menschlichen Tumorzelllinien entfällt in den meisten Fällen wegen mangelnder Differenzierung der Zellen unter in vitro-Bedingungen. Drei Zelllinien (HAT-29, Caco-2 und T<sub>84</sub>), isoliert aus menschlichen Adenokarzinomen, haben in der jüngeren Zeit große Aufmerksamkeit geweckt (*Fogh et al. 1977; Artursson 1991*).

Die HT-29-Zelllinie differenziert nicht spontan unter normalen Bedingungen; durch den Austausch von Glucose durch Galaktose ist es allerdings möglich die Differenzierung zu induzieren (*Barthe et al. 1999*). HT-29 ist ein Zellmodell zur Untersuchung des Mucin-Einflusses auf den Resorptionsvorgang. Zur Erhaltung eines HT-29-Subklons, welcher in starkem Maß Mucin produziert, genügt es, die HAT-29-Zellen in einem glucosefreien Medium zu kultivieren oder mit Natrium-pyruvat zu behandeln (*Barthe et al. 1999*).

Die T<sub>82</sub>-Zelllinie differenziert spontan nach Konfluenz, zeigt aber sehr begrenzte biochemische und morphologische Differenzierungsmerkmale, sie exprimiert P-Glykoproteine (*Barthe et al. 1990*).

Caco-2-Zellen werden erstmals durch *Fogh (1974)* isoliert und wachsen unter einfachen Standardbedingungen auf verschiedenen festen Substraten wie Glas, Polystyrol, Polycarbonat, Polyethylenterephthalt oder Polyester. Sie zeigen Eigenschaften hinsichtlich Morphologie, Transport und Permeabilität, die denen differenzierter, intestinaler Zellen sehr ähnlich sind (*Hidalgo et al. 1989; Dix et al. 1990*). Die Caco-2-Zelllinie stellt daher ein gutes Modell für die Untersuchung der intestinalen Resorptionsprozesse dar.

Auf diese Zelllinie und deren Eigenschaften im *Abschnitt 1.1.6* näher eingegangen.

### **c) „everted gut sac technique“, intestinale Darmstücke und isolierte intestinale Zellen**

Die „everted gut sac“ Methode wird erstmals durch Wilson und Wieseman beschrieben (*Barthe et al. 1990*) und zur Untersuchung der Resorption von Zuckern und Aminosäuren genutzt. Bei dieser Methode wird ein ca. 5 cm langes

Segment des Dünndarms isoliert und mit Hilfe eines Glasstabes von innen nach außen gewendet (*Wilson und Wiseman 1954*). Das Innere wird mit Puffer gefüllt und anschließend werden die Enden des Segments verschlossen. Das Darmsegment wird in mit Sauerstoff angereichertem Puffer inkubiert. Somit kann die Absorption eines Arzneistoffes von der mukosalen zur serosalen Seite untersucht werden.

Intestinale Zellen und intestinale Darmstücke des Duodenums oder Jejunums können isoliert, in gashaltigem Puffer inkubiert und somit für die Untersuchung von Aufnahmeprozessen einer Substanz in die Zellen verwendet werden. Hier wird lediglich die Permeation in die Zellen bestimmt und nicht der Transport über eine Zellschicht. Von großem Nachteil ist die begrenzte Lebensfähigkeit solcher Modelle (nur ca. 1 Stunde).

### 1.1.6 Caco-2/Subklon TC-7

Die Etablierung von in vitro-Zellkultursystemen zur Simulation von normalen biologischen Membranen in vivo erfordert eine sorgfältige Auswahl der Zellen. Weiterhin kann das Verhalten einer Zelllinie hinsichtlich Metabolismus und Transport durch eine Vielzahl an äußeren Faktoren und auch durch die Zellen selbst erheblich beeinflusst werden. So spielen z. B. Passagezahl, phänotypische Stabilität und Heterogenität der Zelllinie, sowie ihre Fähigkeit zu differenzieren, eine erhebliche Rolle. Auch Komponenten im System selbst, wie z. B. Untergrundmaterial, Wachstumsdauer, Aussaatdichte, Medienzusätze und Anwesenheit von anderen Zelltypen beeinflussen die Charakteristika der Zelllinie (*Wilson und Davis 1990; Sergent-Engelen et al. 1990*). Unter den verschiedenen Zellkultur-Modellen gilt die Caco-2-Zelllinie als das aussichtsreichste System um das intestinale Epithel zu simulieren. Caco-2-Zellen stammen ursprünglich aus einem menschlichen Kolonkarzinom, differenzieren unter Standardkulturbedingungen jedoch zu einem enterozytenähnlichen Epithel (*Wilson et al. 1990; Hidalgo et al. 1989; Audus et al. 1990*). Sie bieten daher den Vorteil, mit menschlichem anstelle von tierischem Gewebe arbeiten zu können und liefern durch ihre kontinuierliche Teilungsfähigkeit

einen ständig verfügbaren Vorrat an gleichartigen Zellen, um Experimente durchführen zu können.

Die humane Kolonkarzinomzelllinie „Caco-2“ wurde im Jahr 1974 durch Fogh isoliert und hat sich zu einem weit verbreiteten in vitro-Modell im Bereich der intestinalen Zellbiologie entwickelt (Zweibaum 1990; Artursson 1991; Wilson et al. 1990). Sie sind bei der American Type Culture (ATCC) und anderen Zellbanken erhältlich. Der Einsatz zur Untersuchung der intestinalen Arzneistoffresorption geht auf die Anfang der 80er Jahre gemachte Entdeckung zurück, dass Caco-2-Zellen die gleichen Charakteristiken der Differenzierung zeigen, wie sie auch bei normalen intestinalen Enterozyten zu finden sind (Pinto et al. 1983). Die Caco-2-Zellen differenzieren spontan nach dem Aussäen auf verschiedenen festen Unterlagen und formen konfluente, einschichtige, dichte Epithelien (Monolayer). Entsprechend der Morphologie der Dünndarmenterozyten haben die Zellen nach 16 Tagen Kultivierung eine Höhe von 30  $\mu\text{m}$  (Hidalgo et al., 1989). Caco-2-Zellen sezernieren u. a. Apolipoproteine, IGF-I,  $\alpha$ -1-Antitrypsin und exprimieren Transcobalamin, den Vitamin D Rezeptor und verschiedene Cytochrome P450 und Phase-II-Enzyme. Postkonfluente Caco-2-Monolayer zeichnen sich durch polarisierte Zellen aus, die sowohl morphologisch als auch biochemisch (funktionell) Eigenschaften ausgereifter Enterozyten des Dünndarmepithels zeigen. Die apikale Brush Border Region ist mit einer Reihe intestinaler Proteine, unter anderem Villin, Hydrolasen (Sucrase-Isomaltase, Lactase, Dipeptidylpeptidase-IV, Aminopeptidase N, Endopeptidase, alkalische Phosphatase) (Hidalgo et al. 1989; Pinto et al. 1983; Chantret et al. 1994), Hexose-Transportern ( $\text{Na}^+$ -abhängige Glucosetransporter, Glut1 bis Glut5, Fruktosetransporter) (Blais et al. 1987; Mahraoui et al. 1994), dem P-Glykoprotein (Hunter et al. 1993<sup>a</sup>; Hunter et al., 1993<sup>b</sup>), Aminosäuretransportern, Rezeptoren für Vitamin B<sub>12</sub> Faktor (Dix et al. 1990), Lektinrezeptoren (Lehr und Lee 1993) ausgestattet.

Die apikale Membrandomäne ist über die tight junctions von der basolateralen Domäne abgetrennt. Dort liegt eine Reihe von Peptidrezeptoren, der Rezeptor für Hyaluronsäure, der Glukosetransporter Glut-2, die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, und weitere vor.

Die Eignung der Caco-2-Zellen zur Untersuchung der passiven Transportmechanismen in vitro konnte gezeigt werden (*Artursson, 1990*). Der gerichtete Transport von Substanzen kann dank der Polarisierung des Zellmonolayers von Caco-2-Zellen in vielen Literaturstellen z. B. für Gallensäuren und Vitamin B<sub>12</sub> (*Dix et al. 1990*) gezeigt werden. In Betracht gezogen werden sollte, dass es sich bei Caco-2-Zellen einerseits um Tumorzellen und andererseits ursprünglich um Zellen des Dickdarms handelt. Caco-2-Zellen sind daher nicht in der Lage, eine für die Dünndarmmukosa charakteristische Mukusschicht zu bilden. Unter diesen Einschränkungen kann mit Hilfe des Caco-2-Zellkultur-Modells das resorptive Dünndarmepithel nachgebildet werden. Zur in vitro-/in vivo-Korrelation, d. h. zur Übertragbarkeit der Ergebnisse des Caco-2 Zellkultur-Modells auf den menschlichen und tierischen Organismus, wird in der Regel auf den ermittelten Permeationskoeffizienten zurückgegriffen. Eine uneingeschränkte Korrelation scheint allerdings nicht möglich. Bei der Caco-2-Zelllinie handelt es sich um eine polyklonale und somit heterogene Zellpopulation, die ihren Genotyp laufend verändert, was auch zu phänotypischen Variationen führt.

Es ist mehreren Arbeitsgruppen gelungen, aus den Caco-2-Zellen verschiedene Klone zu gewinnen. So konnten aus früheren Passagen beispielsweise die Klone PD-7 und PF-11 isoliert werden.

Der in dieser Arbeit verwendete Subklon (TC-7 Klon) stammt aus Passage 198 der Caco-2-Zelllinie ab (T wie Tardif = Spät) und wurde von A. Zweibaum, INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Villejuif (Frankreich)) isoliert. Somit ist das TC-7-Zellmodell eine monoklonale Zellpopulation.

Die TC-7-Zellen sind den Stammzellen ähnlich und damit in der Lage, gut differenzierte Monolayer zu bilden. Untersuchungen ergeben Unterschiede bei der Resorption verschiedener Marker zwischen den TC-7-Zellen und den Stammzellen (*Caro et al. 1995*), insbesondere bei aktivem Transport und den biochemischen Merkmalen. So kann *Zweibaum (1995)* große Unterschiede im Taurocholsäure-Transport und in der UDP-Glucuronosyltransferase-Aktivität zeigen. Die TC-7-Zellen exprimieren die gleiche Konzentration an Sucrase-Isomaltase im Vergleich zum Dünndarm, wobei die Konzentration dieses Enzyms in den Caco-2-Zellen viel geringer ausfällt (*Gres et al. 1998*). Die Expressierung verschiedener Phase-II-

Enzyme z. B. dem UDP-Glycuronosyltransferase ist in Caco-2-Zellen geringer als in TC-7-Zellen und Dünndarm.

Die Bestimmung der Permeationskoeffizienten von 20 verschiedenen Arzneistoffen liefert ähnliche Ergebnisse für die beiden Zelllinien (*Gres et al. 1998*). Somit eignet sich das TC-7-Zellmodell zur Untersuchung von Transport und Transportmechanismen.

## 1.2 Chiralität

Die Chiralität oder Händigkeit (griech. Cheir = Hand) in der Stereochemie (griech. Stereos = starr) – Teilgebiet der organischen Chemie – beschäftigt sich mit



Strukturen im dreidimensionalen Raum.

Ein Objekt, das mit seinem Spiegelbild nicht zur Deckung gebracht werden kann, ist chiral. Paare spiegelbildlicher

Objekte werden als „Enantiomorphe“ bezeichnet, Paare spiegelbildlicher

Moleküle als „Enantiomere“. Die Stereochemie befasst sich mit Stereo-

isomeren. Das sind Substanzen mit unterschiedlicher räumlicher Anordnung

(Konfiguration) von Atomen um ein stereogenes Zentrum (Chiralitätszentrum, zentrale Chiralität) im Molekül. Die molekulare Asymmetrie hat ihre Ursache in der

tetrahedralen geometrischen Natur von Atomen wie Kohlenstoff, Schwefel, Phosphor und Stickstoff, welche stereogene Zentren ausbilden können. Am

häufigsten tritt Chiralität infolge asymmetrischer Kohlenstoffatome auf.



**Abb. 1.6**

*Chiralität bei der Windungsrichtung des Gehäuses der Weinbergschnecke*

In der Natur existieren nicht nur Paare von Enantiomorphen wie unsere Hände oder Füße, sondern auch enantiomorphe Einzelgänger. So windet sich der Hopfen in Wachstumsrichtung links herum, die Gartenbohne rechts herum. In der Fauna ist beispielsweise das Gehäuse der Meeresschnecke *Neptunea despecta* linksgewunden, das Gehäuse der Weinbergschnecke meist rechtsgewunden. Natürliche Proteine sind fast ausschließlich aus L-Aminosäuren aufgebaut. Einige Bakterien produzieren Peptide, die neben L- auch D-Aminosäuren enthalten. Diese Bakterien schützen



sich somit gegen enzymatischen Abbau im Wirt. Giftige Peptide, z. B. aus Giftspinnen, können D-Aminosäuren enthalten, die die Wirksamkeit und enzymatische Stabilität des Gifts erhöhen.

### 1.2.1 Chiralität und biologische Wirkung

Der Einfluss der Chiralität auf lebende Systeme wird in besonderem Maße bei der Enantiomerendiskriminierung in der Natur deutlich.

Etwa 60 % aller in Deutschland zugelassenen Arzneistoffe sind chiral, davon sind etwa 2/3 Naturstoffe oder deren Derivate und werden meist in enantiomerenreiner Form verabreicht; 1/3 hingegen ist vollsynthetisch und wird zum großen Teil als Racemat (äquimolares Enantiomengemisch) angeboten (*Roth et al. 1998*). Aus pharmakologischer Sicht unterteilt man die Enantiomere eines Arzneistoffes, die unterschiedliche Wirkung zeigen, in das Eutomer, welches die beabsichtigte Wirkung hervorruft, und das unwirksame bzw. das für unerwünschte Nebenwirkungen verantwortliche Enantiomer, das Distomer. Im Fall der Applikation eines Racemates, von dem nur ein Enantiomer die erwünschte pharmakologische Wirkung hat, wären also fünfzig Prozent als Verunreinigung (Belastung des biologischen Systems) zu betrachten. Der Einsatz racemischer Gemische ist dementsprechend unerwünscht und kann, wie zum Beispiel Thalidomid, verheerende Wirkungen haben. Dieses als Contergan<sup>®</sup> 1956 auf den Markt gebrachte Medikament diente als Schlaf- und Beruhigungsmittel. Da es sich als besonders wirksam gegen die morgendliche Übelkeit von schwangeren Frauen erwies, wurde es bevorzugt von diesen eingenommen. Es kam in mehreren tausend Fällen zu Wachstumsstörungen an den Gliedmaßen ansonsten gesunder Kinder, was auf die Wirkung des (S)-Enantiomers zurückzuführen war (*Brunner, 1999*). Nur das (R)-Enantiomer hatte die gewünschten therapeutischen Wirkungen. Wie das Beispiel von Opiaten (*Tab. 1.4*) zeigt, ist gerade bei der Entwicklung chiraler Arzneistoffe eine effiziente Analytik von Stereoisomeren zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit, sowie eine gezielte pharmakologische Untersuchung eine unabdingbare Voraussetzung für die Zulassung durch regulative Aufsichtsbehörden.

Wirkstoff	Stereoisomer	Effekt	Wirkstoff	Stereoisomer	Effekt
<b>Pharmakodynamische Effekte</b>					
Thalidomid	(S)-Isomer (R)-Isomer	Fruchtschädigend Schlaffördernd	Prilocain (Lokal- anästhetikum)	S(+)-Isomer R(-)-Isomer	Langsam hydrolysiert durch die Amidase Sehr schnell hydrolysiert
Opiate	(R,S)-Isomer (S,R)-Isomer	Narkotikum (Abhängigkeit!) Hustenmittel	Disopyramid (Antiarrhythmikum)	S(+)-Isomer	Starke Proteinbindung
Penicillin	D-Isomer L-Isomer	Antiarrhythmikum Toxisch	Fluvastatin (Lipidsenker)	(+)-Isomer (3R,5S)	Inhibiert Enzym CYP 2C9, welches Phenytoin und orale Antikoagulantien metabolisiert
Isoprenalin ( $\beta$ -Agonist)	(-)-Isomer (+)-Isomer	800fach potenter als (+)-Isomer	<b>Sonstige Merkmale und Unterschiede</b>		
Ketamine (Anästhetikum)	S(+)-Isomer	Zeigt keine postoperativen Nebenwirkungen	Limonen	(R)-Isomer (S)-Isomer	Orangeruch Limonengeruch
Propoxyphen	(+)-Propoxyphen (-)-Propoxyphen	Analgetisch Antitussiv	Aspartam	(R,R)-Isomer (S,R)-Isomer	Süßer Geschmack Bitterer Geschmack
Picnadol (Opioid- analgetikum)	(+)-Isomer (3S,4R) (-)-Isomer (3R,4S)	$\mu$ -Rezeptor Agonist $\mu$ -Rezeptor Antagonist			

**Tab. 1.4** Beispiele zum Einfluss der Chiralität auf die biologische Wirkung.

### 1.3 Kapillarelektrophorese

#### ***Historische Entwicklung der Elektrophorese und der elektrokinetischen Chromatographie***

Die Kapillarelektrophorese hat sich als sehr effektive analytische Methode etabliert. Das grundsätzliche Prinzip der Kapillarelektrophorese beruht auf der Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld und wird zum ersten Mal von Kohlrausch (1897) genau beschrieben (*Kuhn und Hoffstetter-Kuhn 1993*). Dieses Prinzip wird zur Trennung beziehungsweise Fraktionierung kolloidaler Gemische angewandt. Die Verwendung der Kapillarelektrophorese als Trennmethode scheitert zunächst an der durch die Joulesche Wärme verursachten Konvektion in der Analytlösung, welche die Effizienz der Trennung drastisch verschlechtert. Aus diesem Grund werden zuerst Papier, später Gele aus Polyacrylamid oder Agarose in die Elektrophorese von Tiselius (1930) eingeführt. Seitdem sind diese Techniken unverzichtbar für die Biochemie geworden. Nachteil dieser Methoden, die z. B. in der Medizin und Biochemie auch heute noch verwendet werden, sind die langen Analysenzeiten und die schwierige Quantifizierung. Die langen Analysenzeiten kommen durch die niedrigen Spannungen zustande, die angelegt werden müssen, um ein Überhitzen des Gels zu verhindern. Die Elektrophorese wird heute jedoch weniger zur Trennung, als vielmehr zur Charakterisierung von Partikeln wie beispielsweise Kolloiden oder Proteinen verwendet. Das Potential dieser Methode wurde jedoch bereits von Tiselius (1959) erkannt. Man hatte trotzdem das Bestreben, die Proben, direkt in Puffer gelöst, zu trennen und photometrisch zu erfassen. Hjertén (1958) zeigte die erste Trennung in offenen Glasröhren mit 1 – 3 mm Innendurchmesser. Die Konvektion wird durch Rotation um die Längsachse minimiert und die Analytzone durch einen UV-Detektor vermessen. Hjertén (1967) führte elektrophoretische Trennungen in mit Methylcellulose belegten Quarzkapillaren durch. Durch die Methylcellulosebelegung der Glasoberfläche reduzierte er den elektroosmotischen Fluss (*Kuhn und Hoffstetter-Kuhn 1993*). In sehr dünnen Röhren ist die Konvektion nur minimal, da bei großem Oberflächen/Innendurchmesser-Verhältnis eine gute Wärmeabfuhr gegeben ist.

Virtan (1976) kann die Vorteile der Verwendung sehr dünner Kapillaren (200 – 500  $\mu\text{m}$ ) zeigen. Sie liegen in der Steigerung der Trenneffizienz dieser Methode. 1976 verwendete Everaerts dünne Teflonschläuche zur Durchführung der Isotachophorese. Der Vorteil dieser Schläuche liegt in der Unterdrückung der Elektroosmose. Nachteilig ist allerdings die schwierige Detektion, die nur über Leitfähigkeitsdetektoren möglich war. Diese Entwicklung zeigt, dass das Prinzip der Elektrophorese lange Zeit bekannt ist. Mit der Einführung eines sensitiven Leitfähigkeits- und UV-Detektors in die Kapillarelektrophorese (1979) durch Mikkers kann erstmals eine Trennung hoher Auflösung erreicht werden.

**Tab. 1.5** *Historische Meilensteine in der Entwicklung der Kapillarelektrophorese*

<b>Jahr</b>	<b>Persönlichkeit</b>	<b>Wissenschaftlicher Beitrag</b>
1791	Faraday	Elektrolyse-Gesetze
1877	Helmholtz	Elektrische Doppelschicht
1856	Hittorf	Definition der Überführungszahlen von Ionen
1896	Nernst	Diffusion von Ionen in Lösung
1897	Kohlrausch	Kohlrausch-Beziehung
1923	Kendall und Crittenden	Trennung von Metallen seltener Erden: erste Isotachophorese
1930	Tiselius	Moving Boundary-Methode zur Untersuchung von Proteinen
1948	Tiselius	Nobelpreis für die Entwicklung der Moving Boundary- Methode
1950	Haglung und Tiselius	Elektrophorese in mit Glaspartikeln oder mit Pulver gefüllten Röhren
1955	Smithies	Gelelektrophorese
1958	Hjertén	Elektrophorese in freier Lösung

---

1967	Martin und Everaerts	Verdrängungselektrophorese in Glasröhren mit Hydroxyethylcellulose
1967	Hjertén	Eliminierung der Elektroosmose durch Belegung der Röhrenwand (rotierende Glasröhrchen mit 3 mm I. D.)
1969	Giddings	Ein von der Diffusion unabhängiges Modell der Konzentrationsverteilung in der Zonenelektrophorese
1969	Virtanen	Verwendung von Glaskapillaren mit 200 – 500 $\mu\text{m}$ I.D.
1970	Everaerts und Hoving-Keulemans	Kapillarelektrophorese, Instrumentierung
1970	Arlinger und Routs	UV-Detektor-Entwicklung
1979	Mikkers et al.	Hohe Feldstärken in engen Teflonkapillaren
1981	Jorgenson	Kapillaren mit 75 $\mu\text{m}$ I.D.: Hochleistungs- kapillarelektrophorese
1984	Terabe et al.	Kombination von elektrophoretischen und chromatographischen Modi: Mizellare elektrokinetische Chromatographie

---

Die Kapillarelektrophorese wie wir sie heute kennen, wird 1981 erstmals von Jorgenson und Lukacs beschrieben. Obwohl die Zonenelektrophorese auf Arbeiten von F. M. Everaets und Mitarbeitern 1979 in den Niederlanden zurückgeht, ist Jim Jorenson von der University of Carolina der Wissenschaftler, der 1981 durch Verwendung von Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 75  $\mu\text{m}$  viele Probleme lösen kann (*Jorgenson und Lukas 1981<sup>a</sup>, 1981<sup>b</sup> und 1983*). Die Methode hat sich in dieser relativ kurzen Zeit erstaunlich schnell weiter entwickelt. Zwei Hauptprobleme – die geringe Sensitivität der Detektionssysteme für Kapillaren und die Elektroosmose – verhinderten jedoch eine breite Anwendung. Jorgenson stellte eine Lösung für diese Probleme vor. Er benutzte einen On-Column Fluoreszenzdetektor zur Steigerung der Empfindlichkeit, und versucht nicht länger die Elektroosmose zu unterdrücken, sondern nutzt stattdessen das pfropfenförmige Strömungsprofil, das in Fused-Silica Kapillaren entsteht, um die Analyten ohne Dispersions-

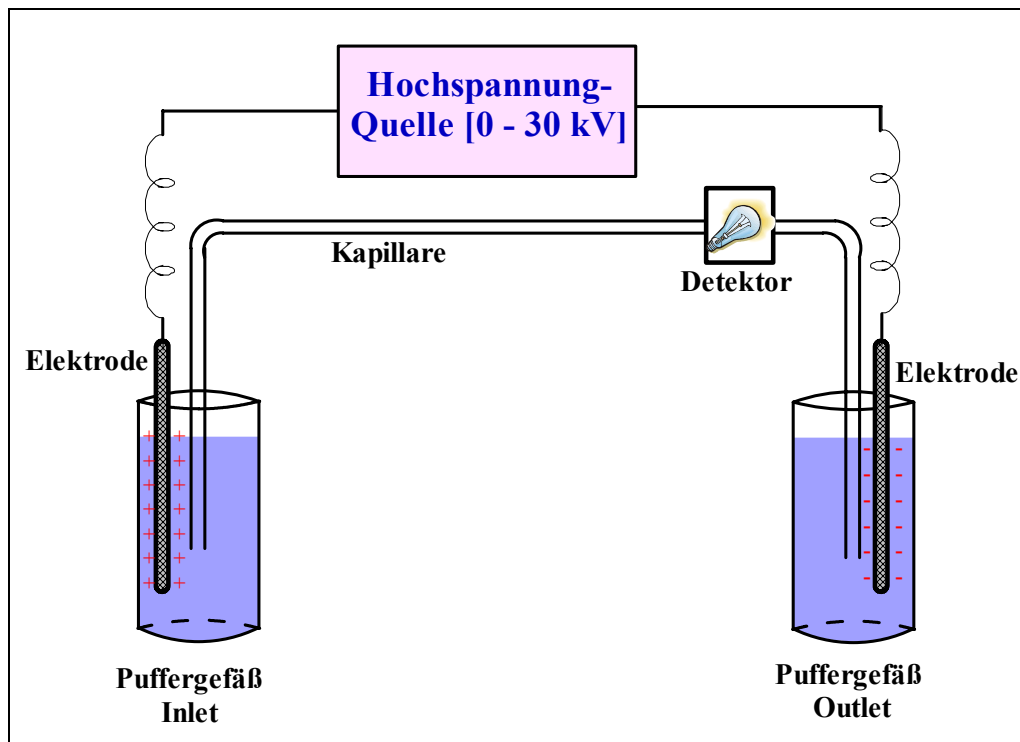
effekte durch die Kapillare zu bewegen (*Jorgenson und Lukas 1981<sup>a</sup>*). Seine Arbeiten sind zur damaligen Zeit aus vielerlei Hinsicht bedeutsam. Zum einen überraschen die schmalen Peaks, die im Vergleich zur HPLC viel größere Bodenzahlen auf gleicher Trennstrecke erlauben, und zum anderen war die Methode, im Vergleich zur klassischen Elektrophorese, viel schneller. Diese Erkenntnisse machten die Elektrophorese für viele Arbeitsgruppen zum attraktiven Forschungsgebiet, und so entstanden schnell neue Kapillarelektromigrationsmethoden. Die zahlreichen Elektromigrationsmethoden, die heute zur Verfügung stehen, können in kapillarelektrophoretische und elektrochromatographische Methoden differenziert werden. Die Kapillarelektrophorese als eine akzeptierte analytische Methode wurde erstmals in dem Ph. Eur. –Nachtrag 2001 aufgenommen.

### 1.3.1 Theoretische Grundlagen

#### 1.3.2 Allgemeines

Die Kapillarelektrophorese ist eine physikalische Analysenmethode und beruht auf der Wanderung einer geladenen Substanz, welche in einer Elektrolytlösung gelöst ist, innerhalb einer Kapillare unter dem Einfluss eines elektrischen Gleichstromfeldes. Für einen elektrophoretischen Trennprozess werden Gleichspannung und ein Puffersystem für die elektrolytische Leitfähigkeit benötigt. In der Kapillare sind Konvektion und freier Fluss auf ein Minimum beschränkt. Bei einer durchschnittlichen molaren Masse von 200 g/mol und einem Injektionsvolumen von 1 nl mit einer Probenkonzentration von 0,1 mg/ml werden nur  $5 \cdot 10^{-13}$  mol (0,5 pmol) Probe injiziert!

Die Kapillarelektrophorese ist eine einfache Technik, wenn man die erforderlichen Bauelemente betrachtet. Die Messanordnung der Elektrophorese besteht aus einer Trennkapillare (meist Fused-Silica) deren beide Enden zusammen mit der Elektrode in den Elektrolytbehälter tauchen, einem Injektor (meist an der Anode) und einem Detektor, der nach der Signalaufbereitung die Daten an einen Computer sendet. Die Elektroden sind mit einer regelbaren Hochspannungsgleichstromversorgungsquelle zur Erzeugung eines Potentials zwischen den beiden Säulenenden verbunden.



**Abb. 1.7** Die Messanordnung der Kapillarelektrophorese

In der Kapillarelektrophorese kommen verschiedene Trennmechanismen zum Einsatz. Ein Überblick über die verschiedenen Trennprinzipien liefert *Tab. 1.6*.

**Tab. 1.6** Trennmethoden in der Kapillarelektrophorese

<b>Trenntechnik</b>	<b>Trennmechanismus</b>
<i>Kapillarzonen-Elektrophorese (CZE)</i>	<i>Mobilität der Freien Lösung (Größe und Ladung)</i>
<i>Mizellare elektrokinetische (Kapillar-) Chromatographie (MEKC; MECC)</i>	<i>Hydrophobe-ionische Wechselwirkung mit Mizellen (Polarität)</i>
<i>Kapillar-Gelelektrophorese (CGE)</i>	<i>Größe und Ladung (v. a. Größe)</i>
<i>Isoelektrische Fokussierung (CIFF)</i>	<i>Isoelektrischer Punkt</i>
<i>Isotachophorese (ITP)</i>	<i>Größe und Ladung (Moving Boundaries)</i>

In den folgenden Abschnitten werden die Grundlagen einer elektrophoretischen Trennung am Beispiel der Kapillarelektrophorese vorgestellt.

### 1.3.3 Physikalische Grundlagen

#### Elektrophorese und Elektroosmose

Man unterscheidet in der Elektrophorese zwischen zwei Transportphänomenen, der Elektrophorese und der Elektroosmose.

#### Elektrophorese:

Das elektrophoretische Trennprinzip beruht auf der unterschiedlichen Migration von Ionen verschiedener Ladung und Größe in einem elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Ions in einem elektrischen Feld der Stärke ( $E$ ) wird durch seine elektrophoretische Mobilität ( $\mu_{ep}$ ) und die elektroosmotische Mobilität ( $\mu_{eo}$ ) des Puffers innerhalb der Kapillare bestimmt. Die Geschwindigkeit  $v_{ep}$  eines Ions lässt sich nach dem Stokesschen Gesetz berechnen:

$$v_{ep} = \frac{z \cdot e}{6\pi \cdot \eta \cdot r_I} \cdot E = \mu_{ep} \cdot E \quad (\text{Gl. 1-2})$$

Für die elektrophoretische Mobilität  $\mu_{ep}$  erhält man somit:

$$\mu_{ep} = \frac{z \cdot e}{6\pi \cdot \eta \cdot r_I} = \frac{q}{6\pi \cdot \eta \cdot r_I} \quad (\text{Gl. 1-3})$$

Dabei ist  $z$  die Ladung eines Ions,  $e$  ist die Elementarladung ( $1,6022 \times 10^{-19}$  C),  $\eta$  die Viskosität,  $r_I$  der Ionenradius,  $\mu_{ep}$  die elektrophoretische Mobilität,  $q$  die wirksame Ladung des gelösten Bestandteils und  $E$  die elektrische Feldstärke.

Die elektrische Feldstärke  $E$  berechnet sich aus:

$$E = \frac{U}{L} \quad (\text{Gl. 1-4})$$

Hier ist  $U$  die angelegte Spannung und  $L$  die Gesamtlänge der Kapillare.

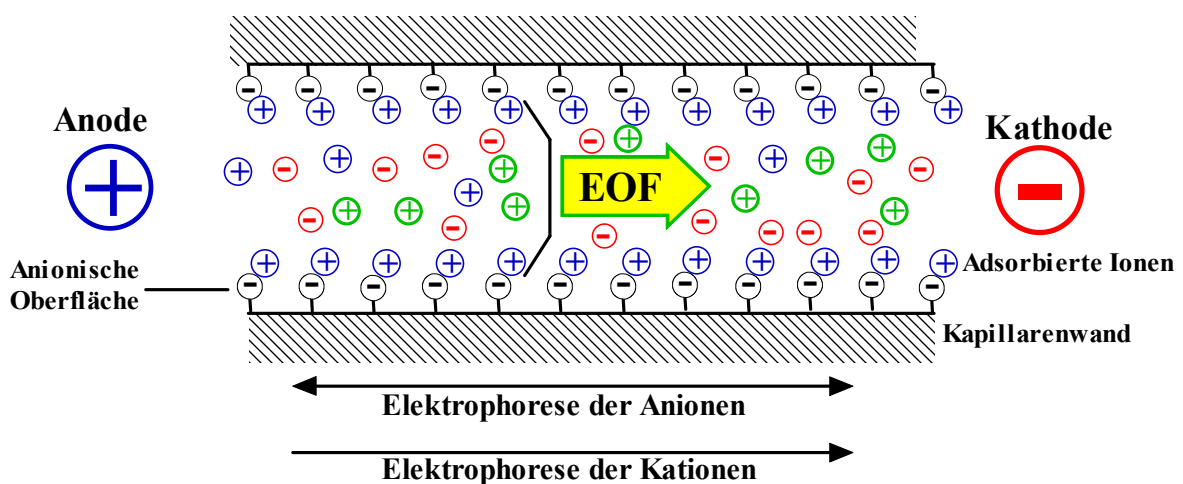
Ein Ion der Ladung  $z \cdot e$  erfährt im elektrischen Feld  $E$  eine in Richtung der Elektroden gerichtete Kraft, der sich die Reibungskraft der umgebenden Lösung entgegenstellt. Ionen unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilitäten  $\mu_{ep}$  wandern



bei konstantem elektrischen Feld  $E$  und konstanter Viskosität des Puffers somit mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Kleine, hochgeladene Teilchen besitzen dabei eine hohe Mobilität; große, wenig geladene Teilchen dagegen eine geringe Mobilität.

### Elektroosmotischer Fluss:

Wird ein elektrisches Feld längs einer mit Pufferlösung gefüllten Kapillare angelegt, resultiert ein Lösungsmittelfluss, der sogenannte *elektroosmotische Fluss (EOF)*. Seine Entstehung ist in *Abb. 1.9* schematisch aufgezeigt. Der elektroosmotische Fluss (auch elektroendoosmotischer Fluss genannt) wird durch die Ladungen der Kapillarwand verursacht. In wässriger Lösung besitzen Quarzkapillaren einen Überschuss an negativer Ladung, die durch Ionisation der Oberfläche durch ein Säure-Base-Gleichgewicht und/oder Adsorption ionischer Teilchen an der Oberfläche resultiert. Im Falle von Fused-Silica-Kapillaren oder Kieselgelen lädt sich deren Oberfläche bei einem pH-Wert größer 2,2 durch Deprotonierung der Silanolgruppen negativ auf. Gegenionen, die sich in der Nähe der Kapillarwand aufhalten, um ein Ladungsgleichgewicht auszubilden, bilden eine Doppelschicht aus und verursachen so eine Potentialdifferenz (*Zeta-Potential*  $\zeta$ ) in der Nähe der Kapillarwand. Wird nun eine Spannung angelegt, so wandern die Kationen der diffusen Doppelschicht in Richtung Kathode. Durch ihre Solvathülle verursachen Sie einen Fluss der gesamten Elektrolyt-Lösung in diese Richtung.



*Abb. 1.8* Entwicklung des elektroosmotischen Flusses

Im Gegensatz zu einer druckgetriebenen Strömung in einer Kapillare gilt hier das Hagen-Poiseuillsche Gesetz nicht. Es gibt kein Druckgefälle innerhalb der Kapillare, da die treibende Kraft gleichmäßig über den Querschnitt der Kapillare verteilt ist. Daher entsteht ein extrem flaches Strömungsprofil, das die Dispersion vermindert und schließlich zu einer sehr geringen Bandenverbreiterung führt.

Die Geschwindigkeit des EOF  $v_{eo}$  hängt von der osmotischen Mobilität ( $\mu_{eo}$ ) ab, die ihrerseits von der Ladungsdichte an der inneren Kapillarwand und den Eigenschaften der Pufferlösung beeinflusst wird. Die elektroosmotische Geschwindigkeit ( $v_{eo}$ ) ist durch folgende Gleichung gegeben:

$$v_{eo} = \mu_{eo} E = \left( \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \right) \cdot \left( \frac{V}{L} \right) \quad (\text{Gl. 1-5})$$

Für die elektroosmotische Mobilität  $\mu_{eo}$  gilt:

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} , \quad (\text{Gl. 1-6})$$

wobei  $\varepsilon$  die Dielektrizitätskonstante der Pufferlösung,  $\zeta$  das Zeta-Potential,  $\eta$  die Viskosität,  $V$  die angelegte Spannung und  $E$  die elektrische Feldstärke darstellen. Das Zeta-Potential wird hauptsächlich über die Oberflächenladung auf der Kapillarinnenwand bestimmt. Da diese Ladung sehr stark vom pH-Wert abhängig ist, ändert sich auch die Stärke des EOF mit dem pH-Wert. Bei hohen pH-Werten, bei denen beinahe alle Silanolgruppen deprotoniert sind, ist der EOF bedeutend stärker als bei einem sehr niedrigen pH-Wert. Das Zeta-Potential ist auch von der Ionenstärke der verwendeten Elektrolytlösung abhängig, da eine höhere Ionenstärke zu einer Kompression der elektrischen Doppelschicht führt. Das Zeta-Potential, und damit auch der EOF, werden durch die weniger stark ausgeprägte Doppelschicht erniedrigt. Ein starker EOF hat zur Folge, dass außer Kationen auch neutrale Moleküle und sogar Anionen an der Kathode detektiert werden können. Dabei wandern Kationen schneller als der EOF und werden voneinander getrennt, Neutralteilchen wandern mit der Geschwindigkeit des EOF, werden aber nicht getrennt. Anionen wandern langsamer als der EOF, da sie einerseits von der Anode angezogen, andererseits mit dem EOF Richtung Kathode transportiert werden; sie können nur dann an der Kathodenseite detektiert werden, wenn ihre elektro-

phoretische Wanderungsgeschwindigkeit langsamer ist als die des EOF. In diesem Fall können auch sie getrennt werden.

Die resultierende Gesamtgeschwindigkeit eines Teilchens ergibt sich aus der Summe von elektrophoretischer Beweglichkeit und elektroosmotischem Fluss. Die Geschwindigkeit ( $v$ ) des gelösten Bestandteils ist durch folgende Gleichung gegeben:

$$v = v_{ep} \pm v_{eo} \quad (\text{Gl. 1-7})$$

Durch Beschichtung der Kapillareninnenwand mit einem geeigneten Polymer lässt sich die Elektroosmose unterdrücken oder durch Beschichtung mit einem positiv geladenen Polymer sogar umkehren (*Melanson et al. 2000; Righetti et al. 2001; Chiari et al. 2000<sup>a</sup>; Chiari et al. 2000<sup>b</sup>; Horvath und Dolnik 2001*).

Die Nettoladung eines Moleküls wird durch den isoelektrischen Punkt (pI) sowie den pH-Wert der verwendeten Elektrolytlösung bestimmt. Bei pH-Werten unterhalb des isoelektrischen Punktes besitzt ein Analyt eine positive Ladung und wandert schneller als der EOF in Richtung Kathode, oberhalb des isoelektrischen Punktes verhält es sich umgekehrt.

#### 1.3.4 Analytische Parameter zur Beschreibung eines elektrophoretischen Prozesses

Die Kapillarelektrophorese zeichnet sich dadurch aus, dass sie eine Methode mit sehr vielen Einflussfaktoren ist.

*Tab. 1.7* schafft einen Überblick über die wichtigsten Einflussfaktoren und deren Wirkung.

**Tab. 1.7** Optimierbare Parameter in der CE (nach Altria 1996)

Parameter	Bereich	Effekt der Steigerung des Parameterniveaus
Angelegte Spannung	5 – 30 kV	Reduktion der Migrationszeit, jedoch geringe Verschlechterung der Auflösung
Stromstärke	5 – 250 $\mu$ A	Reduktion der Migrationszeit, jedoch geringe Verschlechterung der Auflösung
Länge der Kapillare	20 – 100 cm	Erhöhung der Migrationszeit; Verbesserung

		<i>der Auflösung</i>	
<i>Innendurchmesser der Kapillare</i>	<i>25 – 100 µm</i>	<i>Erhöhung der Stromstärke; Verbesserung der Sensitivität; möglicherweise Reduktion der Effizienz</i>	
<i>Kapillarenbelegung</i>	<i>Verschiedene Überzüge</i>	<i>Änderung des EOF und der Selektivität</i>	
<i>pH</i>	<i>1,5 – 11,5</i>	<i>Zunahme des EOF; Erhöhung der Ionisation saurer Analyten; Herabsetzung der Ionisation basischer Analyten</i>	
<i>Elektrische Feldstärke</i>	<i>100 – 500 V/cm</i>	<i>Reduktion der Migrationszeit</i>	
<i>Tenside in MECC</i>	<i>10 – 200 mM</i>	<i>Erhöhung der Retentionszeit; Erniedrigung des EOF; Änderung der Selektivität</i>	
<i>Organische Modifier</i>	<i>1 – 30% V/V</i>	<i>Erhöhung der Solubilisierung; Erniedrigung des EOF; Selektivitätsänderung</i>	
<i>Harnstoff</i>	<i>1 – 7 M</i>	<i>Erhöhung der Solubilisierung hydrophober Analyten; Erhöhung der Migrationszeit</i>	
<i>Aminische Modifier</i>	<i>1 – 50 mM</i>	<i>Reduktion der Oberflächenladung und Reduktion des Peaktailing</i>	
<i>Cyclodextrine</i>	<i>1 – 100 mM</i>	<i>Viskositätserhöhung; EOF-Reduktion</i>	
<i>Viskosität</i>	<i>verschieden</i>	<i>EOF-Reduktion und Erhöhung der Migrationszeit</i>	
<i>Elektrolyt- Konzentration</i>	<i>5 – 200 mM</i>	<i>Erhöhung der Stromstärke, des EOF und der Ionisation; Reduktion des Peaktailing</i>	
<i>Kationische Detergentien</i>	<i>1 – 20 mM</i>	<i>Umkehrung der EOF-Richtung</i>	
<i>Injektionszeit</i>	<i>1 – 20 s (hydrodynamisch)</i>	<i>Signalverbesserung; Verschlechterung der Auflösung und Peaksymmetrie</i>	
<b>Sonstige Typische Parameter</b>			
<i>Wärmeentwicklung</i>	<i>0,1 - 10 W</i>	<i>Proben-Pfropfen Länge</i>	<i>0,06 - 3,5 mm</i>
<i>Probenvolumen</i>	<i>0,03 - 15 nL</i>	<i>Probenkonzentration</i>	<i>~ 0,1 - 1,0 mg/ml</i>

### 1.3.5 Zielsetzung

Ofloxacin, ein Fluorochinolon, ist eine antibakteriell wirksame Substanz und gehört der Gruppe der Gyrase-Hemmer an. Ofloxacin befindet sich sowohl als Racemat (z. B. Tarivid<sup>®</sup>, Oflox<sup>®</sup>, u. a.) als auch als reines Enantiomer (S(-) Enantiomer: Levofloxacin; Tavanic<sup>®</sup>) auf dem Markt. Dem S(-)-Enantiomer wird eine um 8- bis 128-fach höhere antibakterielle Wirkung zugeschrieben (*Fujimoto et al. 1990; Hayakawa et al. 1986; Morrissey et al. 1996*). Untersuchungen an der Ratte zeigen Unterschiede in der Resorption der Enantiomeren. Das R(+)-Enantiomer zeigt bei diesen Studien eine stärkere Sekretion und somit eine schlechtere Bioverfügbarkeit als das S(-)-Enantiomer (*Rabbaa et al. 1996; Rabbaa et al. 1997*).

Ein ähnliches Phänomen ist auch für Talinolol in der Literatur beschrieben. Talinolol, ein  $\beta$ -Blocker, befindet sich als Racemat auf dem Markt (Cordanum<sup>®</sup>). *Wetterich et al (1996)* berichten von unterschiedlichem Resorptionsverhalten der beiden Talinolol-Enantiomeren bei der Resorption. Demzufolge unterliegen die Enantiomeren einer intestinalen Sekretion von unterschiedlichem Ausmaß. Dies konnten sie durch in vivo-Untersuchung am Caco-2-Zellmodell bestätigen (*Wetterich et al. 1996*).

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Stereoselektivität der Resorption von Ofloxacin und Talinolol am Caco-2/TC-7-Zellmodell. Dazu muss die humane Kolonkarzinomzelllinie Caco-2/TC-7 als Modell für die intestinale Resorptionsbarriere in unserem Labor eingeführt und etabliert werden. Eignung und Funktionsfähigkeit dieser Zelllinie müssen durch Untersuchungen mit verschiedenen Markersubstanzen überprüft werden. So wird Fluorescein-Na als hydrophile Substanz für die Überprüfung der Zellmonolayer-Integrität eingesetzt, mit Propranolol, als lipophiler Substanz, wird der passive transzelluläre Transport bestimmt.

Um die Durchführung dieser Experimente zur Untersuchung der Stereoselektivität der Resorption zu ermöglichen, ist es notwendig, eine geeignete Methode zur Trennung und Detektion der Enantiomeren zu finden. Eine zur Trennung von Enantiomeren geeignete Methode ist die Kapillarelektrophorese. Bei der Kapillarelektrophorese werden die optisch aktiven Substanzen unter Zusatz chiraler

Selektoren und der Wirkung eines elektrischen Feldes in ihre Enantiomeren getrennt. Die Kapillarelektrophorese bietet verglichen mit der HPLC-Methode mehrere Vorteile, die vor allem in der höheren Effizienz, der besseren Auflösung, der schmalen Peaks und den kürzeren Analysenzeiten liegen. Daher soll in dieser Arbeit die Kapillarelektrophorese als Bestimmungsmethode für Propranolol, Ibuprofen-, Ofloxacin- und Talinolol-Enantiomere verwendet werden. Aufgrund des kleinen Kapillareninnendurchmessers (Lichtweg) weist die Kapillarelektrophorese allerdings eine geringere Empfindlichkeit auf, was die Durchführung unserer Versuche behindert. Deshalb muss diese Methode speziell für Ofloxacin verfeinert und die Versuchsparameter so optimiert werden, dass eine quantitative Bestimmung der Ofloxacin-Enantiomeren im ppb-Bereich möglich ist. Eine Möglichkeit zur Optimierung besteht in der Durchführung eines statistischen Versuchsplanes (central composite Design) zur Untersuchung der Parametereinflüsse auf die Zielgrößen.

Enantiomeren-Trennung von Talinolol mittels der Kapillarelektrophorese ist jedoch bisher in der Literatur nicht beschrieben. Durch Screeningsversuche mit verschiedenen chiralen Selektoren soll eine hierfür geeignete Methode gefunden werden, die anschließend optimiert und validiert wird.

Um einen tieferen Einblick in eine mögliche Stereoselektivität der Resorption von Ofloxacin und Talinolol zu erhalten, sollen die Unterschiede in der Resorption zwischen den optisch aktiven Formen durch Permeationsbestimmung der einzelnen Enantiomeren am Caco-2/TC-7-Zellmodell herausgefunden werden. Ferner sollen die in der Literatur gemachten Aussagen über die Sekretion von Ofloxacin und Talinolol überprüft werden. Daher muss geklärt werden, ob sich die Resorption in der apikal-basolateralen von der basolateral-apikalen Richtung unterscheidet. Eine weitere zu klärende Frage ist die Beteiligung von P-Glykoprotein am Transport. Das soll unter Verwendung von spezifischen Blockern überprüft werden. Die geplanten Versuche sollen aber auch neue Erkenntnisse über den aktiven Transport von Arzneistoffen bringen. Da sich die hier verwendeten Zellen durch das weitgehende Fehlen von Cytochrom 3A4 von den in anderen Arbeiten verwendeten deutlich unterscheiden, ist über die Beantwortung der gestellten Fragen hinaus ein verbessertes Verständnis des aktiven Transportmechanismus zu erwarten.

# KAPITEL 2

## *MATERIAL*

### **2.1 Zellkultur**

#### **Caco-2/ TC-7-Zellen**

Die Caco-2-Zelllinie stammt aus dem ausdifferenzierten Adenokarzinom des Kolons eines 72 Jahre alten Patienten ab. Der Subklon TC-7 stammt von Passage 198 der Caco-2- Zelllinie ab (T wie Tardif = Spät) und wurde erstmals von A. Zweibaum, INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Villejuif, Frankreich) isoliert.

Caco-2/TC-7-Zellen wurden freundlicher Weise von Prof. Dr. Bock, Pharmakologisches Institut, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, zur Verfügung gestellt.

### **2.2 Materialien**

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien sind in folgenden Tabellen aufgeführt.

**Tab. 2.1** *Reagenzien und Wachstumsmedium für die Zellkultur*

<i>Substanz</i>	<i>Hersteller/Lieferant</i>
<i>Dulbecco`s modified Eagle Medium mit Glutamax-I (MEM)</i>	<i>Fa. Gibco</i>
<i>Dulbecco`s phosphatgepufferte Kochsalzlösung (D-PBS)</i>	<i>Fa. Gibco</i>
<i>Einfriermedium</i>	<i>Fa. Gibco</i>
<i>Fötales Kälberserum, Stamm: Süd Amerika</i>	<i>Fa. Gibco</i>
<i>Gentamicin</i>	<i>Fa. Gibco</i>

---

<i>HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure)</i>	<i>Fa. Fluka</i>
<i>Nicht-Essentielle Aminosäuren</i>	<i>Fa. Gibco</i>
<i>Trypsin-EDTA (0,25 %)</i>	<i>Fa. Gibco</i>

---

**Tab. 2.2**      *Lösungen und Chemikalien*

---

<i>Substanz</i>	<i>Hersteller/Lieferant</i>
<i>β-Cyclodextrinsulfat-Na</i>	<i>Fa. Aldrich</i>
<i>Bupivacainhydrochlorid</i>	<i>Fa. Sigma</i>
<i>Calciumchlorid</i>	<i>Fa. Merck</i>
<i>Cavasol W7 M Pharma</i>	<i>Fa. Wacker Chemie</i>
<i>D(+)-Glucose</i>	<i>Fa. Merck</i>
<i>Dextrin 10</i>	<i>Fa. Fluka</i>
<i>Dextrin 15</i>	<i>Fa. Fluka</i>
<i>Dextrin 20</i>	<i>Fa. Fluka</i>
<i>Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat</i>	<i>Fa. Merck</i>
<i>Heptakis-(2,3-diacetyl-6-sulfato)-β-cyclodextrin (HDAS-β-CD)</i>	<i>Fa. ict Handels</i>
<i>Heptakis-(2,3-dimethyl-6-sulfato)-β-cyclodextrin (HDMS-β-CD)</i>	<i>Fa. ict Handels</i>
<i>Heptakis-6-sulfato-β-cyclodextrin (HS-β-CD)</i>	<i>Fa. ict Handels</i>
<i>Kaliumchlorid</i>	<i>Fa. Merck</i>
<i>Kaliumdihydrogenphosphat</i>	<i>Fa. Merck</i>
<i>Magnesiumchlorid-Hexahydrat</i>	<i>Fa. Merck</i>



<i>Magnesiumsulfat-Heptahydrat</i>	<i>Fa. Merck</i>
<i>Natriumchlorid krist.</i>	<i>Fa. Merck</i>
<i>Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat</i>	<i>Fa. Merck</i>
<i>Natriumhydroxid (9959 Titrisol®) 0,1 M</i>	<i>Fa. Merck</i>
<i>Natriumhydroxid (9956 Titrisol®) 1M</i>	<i>Fa. Merck</i>
<i>Polyvinylalkohol (M<sub>r</sub> = 30000 – 70000 g/mol)</i>	<i>Fa. Sigma</i>
<i>Salzsäure 37 %</i>	<i>Fa. Merck</i>
<i>TAPS</i> <i>(N-tris[Hydroxymethyl]methyl-3-aminopropan-</i> <i>sulfonsäure)</i>	<i>Fa. Sigma</i>

**Tab. 2.3**      *Wirkstoffe*

<i>Wirkstoff</i>	<i>Chargenbezeichnung</i>	<i>Hersteller/Lieferant</i>
<i>Acebutolol Hydrochlorid</i>	<i>Ch.-B. 9711501</i>	<i>Fa. Heumann</i>
<i>Alprenolol Hydrochlorid</i>	<i>Art.-Nr. A8676</i>	<i>Fa. Sigma</i>
<i>Atenolol</i>	<i>Ch.-B. 0100887</i>	<i>Fa. Heumann</i>
<i>Bisoprolol Hemifumerate</i>	<i>Ch.-B. 00-08098</i>	<i>Fa. Heumann</i>
<i>Celiprolol</i>	<i>Ch.-B. S23116</i>	<i>Fa. Pharmacia</i>
<i>Cephalexin Monohydrate</i>	<i>Ch.-B. ID0808</i>	<i>Fa. Lilly</i>
<i>Ciprofloxacin HCl</i>	<i>Ch.-B. 302611H</i>	<i>Fa. Bayer AG</i>
<i>Enrofloxacin</i>	<i>Ch.-B. 317715K</i>	<i>Fa. Bayer AG</i>
<i>Esmolol Hydrochlorid</i> <i>(Breviblo®)</i>	<i>Ch.-B. 004236C</i>	<i>Fa. Baxter Deutschland</i>

---

<i>Fluorescin-Na</i>	<i>Art.-Nr.: 2082530</i>	<i>Fa. Fluka</i>
<i>Ibuprofen (Racemat)</i>	<i>Ch.-B. 460490</i>	<i>Fa. Knoll Pharmaceuticals</i>
<i>Levofloxacin Hemihydrat</i>	<i>Ch.-B. C106</i>	<i>Fa. Aventis Pharma</i>
<i>Lidocain Hydrochlorid</i>	<i>L 5647</i>	<i>Fa. Sigma</i>
<i>Metipranolol</i>	<i>Ch.-B. 01666997S</i>	<i>Fa. Roche Diagnostics</i>
<i>Metoprolol Tartrat</i>	<i>Ch.-B. 0101283</i>	<i>Fa. Heumann</i>
<i>Ofloxacin</i>	<i>Ch.-B. D006</i>	<i>Fa. Aventis Pharma</i>
<i>Oxprenolol</i>	<i>Art.-Nr. O 0253</i>	<i>Fa. Sigma</i>
<i>Penbutololsulfat</i>	<i>Ch.-B. B 041</i>	<i>Fa. Aventis Pharma</i>
<i>Pindolol</i>	<i>Ch.-B. 3062205</i>	<i>Fa. Novartis</i>
<i>Procain Hydrochlorid</i>	<i>Ch.-B. 8550859</i>	<i>Fa. MERCK</i>
<i>Propranolol Hydrochlorid</i>	<i>Art.-Nr. 82067</i>	<i>Fa. Fluka</i>
<i>R(-)-Ibuprofen</i>	<i>Ch.-B. 407026</i>	<i>Fa. Knoll Pharmaceuticals</i>
<i>Rhodamin B</i>	<i>Art.-Nr.: 2013839</i>	<i>Fa. Fluka</i>
<i>S(+)-Ibuprofen</i>	<i>Ch.-B. 27184</i>	<i>Fa. Knoll Pharmaceuticals</i>
<i>S-Naproxen</i>	<i>Ch.-B. 68H0724</i>	<i>Fa. Sigma</i>
<i>Sotalolol Hydrochlorid</i>	<i>Ch.-B. 99-11857</i>	<i>Fa. Heumann</i>
<i>Talinolol</i>	<i>Ch.-B. 98010011/1</i>	<i>Fa. Arzneimittel Werk Dresden</i>
<i>R-Timolol Hemihydrat</i>	<i>Ch.-B. 00-00169</i>	<i>Fa. Heumann</i>
<i>S-Timolol Maleat</i>	<i>Ch.-B. 00-01717</i>	<i>Fa. Heumann</i>
<i>Verapamil Hydrochlorid</i>	<i>Ch.-B. 38H46994</i>	<i>Fa. Sigma</i>

---

**Tab. 2.4** Sonstige Materialien

<i>Substanz</i>	<i>Hersteller/Lieferant</i>
<i>Celluloseacetat- Membranfilter, 0,22 µm Porengröße, Ø 25 mm</i>	<i>Fa. Sartorius</i>
<i>Celluloseacetat- Membranfilter, 0,45 µm Porengröße, Ø 25 mm</i>	<i>Fa. Sartorius</i>
<i>Cryo-Rörchen 1,8 ml</i>	<i>Fa. Nunc</i>
<i>ELISA-Platte, F 96 (96-Well Platten)</i>	<i>Fa. Greiner</i>
<i>Glasfaservorfilter</i>	<i>Fa. Sartorius</i>
<i>PP-Reaktionsgefäße 1,5 ml</i>	<i>Fa. Greiner</i>
<i>Rundfilter(Sorte 595)</i>	<i>Fa. Schleicher &amp; Schuell</i>
<i>Sterile Pipetten 10 ml</i>	<i>Fa. Greiner</i>
<i>Sterile Pipetten 25 ml</i>	<i>Fa. Greiner</i>
<i>Sterile PP-Rörchen 15 ml</i>	<i>Fa. Greiner</i>
<i>Sterile PP-Rörchen 50 ml</i>	<i>Fa. Greiner</i>
<i>Transwell-Platten</i>	<i>Fa. Costar</i>
<i>Zählkammer (Kammertiefe 0,1 mm)</i>	<i>Fa. Merck</i>
<i>Zellkulturflaschen 83 cm<sup>2</sup></i>	<i>Fa. Nunc</i>

**Tab. 2.5** Liste der allgemein verwendeten Geräte

---

<i>Beckmann PACE 5500</i>	<i>Fa. Beckmann Coulter</i>
<i>CO<sub>2</sub>-Brutschrank</i>	<i>Fa. WTB Binder Labor Technik GmbH</i>
<i>Dioden-Array-Detektor für Beckmann PACE 5500</i>	<i>Fa. Beckmann Coulter</i>
<i>Eppendorf Easypet 4420 (Peptierhilfe-Gerät)</i>	<i>Fa. Eppendorf</i>
<i>EVOM (Epithelial Voltohmmeter)</i>	<i>Fa. World Precision Instruments</i>
<i>Heizbarer Magnetrührer, IKA Combimag RCT</i>	<i>Fa. Jahnke &amp; Kunkel, IKA-Labortechnik</i>
<i>Inverses Mikroskop Axiovert 25</i>	<i>Fa. Zeiss</i>
<i>Laborwaage Mettler AE 200</i>	<i>Fa. Mettler</i>
<i>Laborwaage Mettler P 1210</i>	<i>Fa. Mettler</i>
<i>Laborwaage Mettler PM 6100</i>	<i>Fa. Mettler</i>
<i>Mikroprozessor-pH-Meter 761</i>	<i>Fa. Knick</i>
<i>Schüttelwasserbad</i>	<i>Fa. GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH</i>
<i>Sicherheitswerkbank HERAsafe, Klasse 2, Typ H</i>	<i>Fa. Kendo Laboratory Products GmbH</i>
<i>TECAN-SpectraFluor</i>	<i>Fa. Tecan</i>
<i>UV-Detektor für Beckmann PACE 5500</i>	<i>Fa. Beckmann Coulter</i>
<i>UV-VIS Spektrometer Lambda 16</i>	<i>Fa. Perkin Elmer</i>

---

<i>Zentrifuge Megafuge 1.0 R</i>	<i>Fa. Kendo Laboratory Products GmbH</i>
<i>Vortex-Gerät</i>	<i>Fa. Jahnke &amp; Kunkel, IKA-Labortechnik</i>
<i>Halbmicrosmometer</i>	<i>Fa. Knauer</i>
<i>Muldestor</i>	<i>Fa. Wagner &amp; Munz</i>

---

### **2.3 Datenverarbeitung**

Die vorliegende Arbeit wurde mit Hilfe der in der unteren Tabelle aufgeführten Software angefertigt.

**Tab. 2.6** *Liste der allgemein verwendeten Software*

---

<i>Software</i>	<i>Hersteller/Lieferant</i>
<i>Microsoft Word 2000</i>	<i>Fa. Microsoft</i>
<i>Microsoft Excel 2000</i>	<i>Fa. Microsoft</i>
<i>Microsoft Power Point 2000</i>	<i>Fa. Microsoft</i>
<i>Statgraphics<sup>®</sup> plus Version 5 (Testversion)</i>	<i>Fa. Manugistics</i>
<i>Unscrambler<sup>®</sup> v 7.01</i>	<i>Fa. CAMO</i>
<i>VCH Biblio für Windows, 32 bit-Version</i>	<i>VCH Verlagsgesellschaft</i>
<i>UVDM 1.16</i>	<i>Fa. Perkin Elmer</i>

---

# KAPITEL 3

## *METHODEN*

### ***3.1 Zellbiologische Methoden***

#### **3.1.1 Caco-2/TC-7-Zellkultur**

Die verwendete Caco-2/TC-7-Zellkultur stammt von Prof. A. Zweibaum und wurde uns mit seiner Zustimmung von Prof. Dr. Bock (Pharmakologisches Institut, Eberhard-Karls-Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt. Die Zellen werden routinemäßig bei 37 °C in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glucose unter Zusatz von 20 % fötalem Kälberserum (FKS), 1 % nichtessentiellen Aminosäuren und Gentamicin (50 µg/ml) in einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> bei 90 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Kultivierung der Caco-2/TC-7-Zellen erfolgt in 83 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen. Sämtliche Arbeiten mit der Caco-2/TC-7-Zelllinie finden unter aseptischen Bedingungen in einer Laminarflowbox statt. Da nach Erreichen der Konfluenz die Differenzierung der Zellen einsetzt, werden die Zellen bei etwa 90 %-iger Konfluenz (nach 5 – 7 Tagen) vereinzelt. Dazu wird für 5 – 10 min das Medium durch 5 ml Dulbecco's phosphatgepufferter Kochsalzlösung (DPBS- Calciumfrei) ersetzt, um den Zellen Calcium zu entziehen. Danach wird auf die Zellen 3 ml 0,063%-ige Trypsinlösung gegeben. Unter dem Umkehrmikroskop wird der Zeitpunkt bestimmt, bei dem die Zellen beginnen, sich voneinander und vom Untergrund zu lösen (nach etwa 3 – 4 min). Nach Entfernen der Trypsinlösung, werden die Zellen durch Klopfen von der Flaschenwand gelöst und in 10 ml frischem Medium suspendiert. Die Zellen werden mit einer Dichte von 10<sup>5</sup> (Zellen/cm<sup>3</sup>) weiter kultiviert oder in die entsprechenden Versuchsgefäße (Transwells<sup>®</sup>) mit einer Aussaatdichte von 12 × 10<sup>4</sup> (Zellen/cm<sup>3</sup>) ausgesät. Im weiteren Verlauf wird das Medium alle 2 Tage gewechselt. Die Zelldichte wird mit Hilfe einer Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt. Für die mit Caco-2/TC-7 durchgeführten Studien werden Zellen der Passagezahlen 30 – 46 eingesetzt. Das

Zellkultur-Medium wird in der Zusammensetzung wie in *Tab. 3.1* unter aseptischen Bedingungen in der LF-Box hergestellt.

**Tab. 3.1** *Zusammensetzung des Zellkultur-Mediums*

<i>Substanz/Medium</i>	<i>Mengen (ml)</i>
<i>Dulbecco`s modified Eagle Medium mit Glutamax-I (MEM)</i>	<i>400</i>
<i>Nicht-Essentielle Aminosäuren</i>	<i>5</i>
<i>Gentamicin</i>	<i>0,5</i>
<i>Fötales Kälberserum</i>	<i>100</i>

### 3.1.2 Puffersysteme

Für alle Permeationsversuche wird der Hank'sche Puffer in der in *Tab. 3.2* aufgeführten Zusammensetzung verwendet. Die Substanzen werden in destilliertem Wasser gelöst. Nach der Herstellung wird die Lösung auf den benötigten pH-Wert eingestellt und die Osmolarität bestimmt. Die Osmolarität beträgt ca. 300 mosmol/kg.

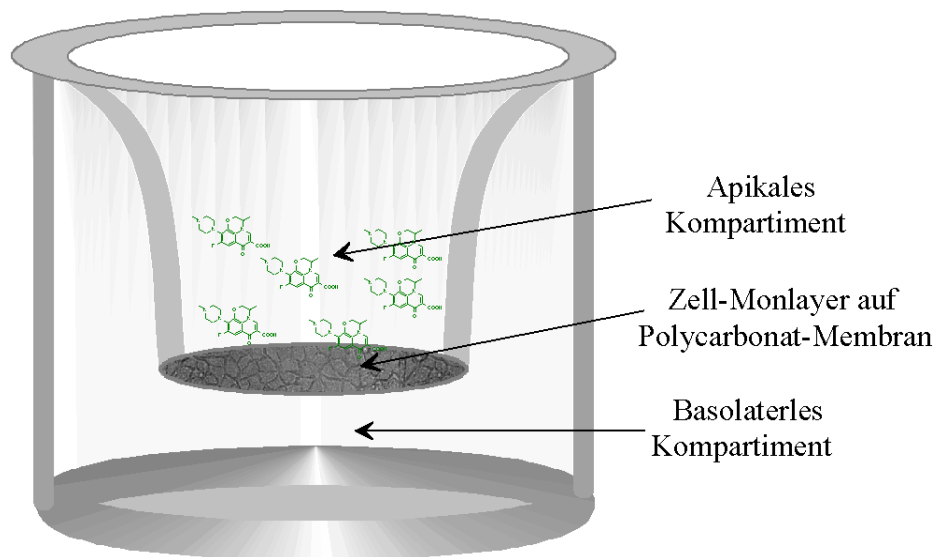
**Tab. 3.2** *Zusammensetzung des Hank'schen Puffers*

<i>Substanz</i>	<i>Mengen (g/l)</i>
<i>Calciumchlorid</i>	<i>0,14</i>
<i>Kaliumchlorid</i>	<i>0,4</i>
<i>Kaliumdihydrogenphosphat</i>	<i>0,06</i>
<i>Magnesiumchlorid-Hexahydrat</i>	<i>0,1</i>
<i>Magnesiumsulfat-Heptahydrat</i>	<i>0,1</i>
<i>Natriumchlorid</i>	<i>8</i>
<i>Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat</i>	<i>0,09</i>

<i>D-Glucose</i>	1
<i>HEPES</i>	5,066 (=20mM)

### 3.1.3 Kultivierung von Zellen in Transwell®-Platten

Für die Resorptionsmessungen kommen 12 mm Transwells® mit einem Porendurchmesser der Polycarbonatmembran von 0,4 µm zur Anwendung. Das Gehäuse enthält 6 Vertiefungen für die Akzeptoren, in die Filtereinsätze eingehängt werden, so dass Donator und Akzeptor durch die Polycarbonatmembran getrennt werden, auf der der dichte Zellrasen wächst.



**Abb. 3.1** Transwells®-System. Die Zellen sind auf einer Polycarbonat-Membran ( $\varnothing = 0,4 \mu\text{m}$ ) kultiviert.

Das Volumen auf der apikalen Seite beträgt 0,5 ml und auf basolateralen Seite 1,5 ml. Für die Aussaat werden die Zellen aus den Kulturflaschen suspendiert, auf eine Konzentration von 60000 Zellen/0,5 ml eingestellt und anschließend in die apikale Seite gegeben. In das Akzeptorkompartiment werden 1,5 ml Medium gegeben. Der Mediumwechsel findet alle 2 Tage mit den angegebenen Volumina statt. Die Versuche werden am 21. – 28. Tag nach der Aussaat durchgeführt.

### 3.1.4 Untersuchung der Integrität des Zellmonolayers

Zur Feststellung der Integrität eines konfluenten Zellmonolayers kommen die folgenden 2 Methoden zur Anwendung.



### 3.1.4.1 Transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER)

Die Differenzierung und Polarisierung von Caco-2/TC-7-Zellen geht einher mit der Ausbildung von tight junctions. Zur Kontrolle der Dichtigkeit des konfluenten Zell-Monolayers mit dichten tight junctions wird während des Zellwachstums die Messung des TEER herangezogen. Diese wird direkt nach Mediumwechsel in DMEM-Medium durchgeführt.

### 3.1.4.2 Transport der hydrophilen Markersubstanzen Fluorescein-Natrium

Als Marker, der bei einem pH-Wert von 7,4 den Zell-Monolayer parazellulär passiert und damit die Dichtigkeit des Zell-Monolayers widerspiegelt, wird Fluorescein-Na in einer Konzentration von 100 µg/ml in Hank'schen Puffer gelöst und im apikalen Kompartiment als Donor eingesetzt. Die Proben werden aus dem basolateralen Kompartiment entnommen. Analog zu den Transportexperimenten über den Zellmonolayer wird die Diffusion des Fluorescein-Na über die Polycarbonatmembran ohne Zellen gemessen. Die physiologische Dichtigkeit des Epithels wird zusätzlich nach jeder Resorption-Studie mittels Fluorescein-Na sichergestellt. Dazu wird der Zellmonolayer dreimal mit DPBS-Lösung gewaschen und anschließend in Hank'schem Puffer für 30 min äquilibriert. Die apikale Phase wird durch die Fluorescein-Na-Lösung ersetzt. Die Versuche werden analog zu den Permeationsstudien in Abschnitt 3.1.5.1 durchgeführt.

Die Proben werden in 96-Well-Platten mittels TECAN-SpectraFluor bei folgenden Bedingungen analysiert.

Exzitationsfilter:	495 nm	Messmodus:	von Oben
Emissionsfilter:	535 nm	Integrationsstart:	0 µs
Schüttelzeit:	10 sec.	Integrationszeit:	40 µs
Schüttelmodus:	Orbital	Gain:	60
Schüttelintensität:	Low	Anzahl der Blitze	3

### 3.1.5 Permeationsstudien

#### 3.1.5.1 Durchführung der Permeationsstudien

**Versuchsablauf:** Nach Entfernung des Mediums wurden die Kompartimente mit 0,5/1,5 ml 37 °C warmer DPBS-Lösung 3-mal gespült. Danach werden in das basolaterale Kompartiment 1,5 ml und in das apikale Kompartiment 0,5 ml vortemperierte Hank'sche Lösung eingefüllt. Die Transwells<sup>®</sup> werden bei 37 °C für 20 min äquilibriert. Anschließend werden die Lösungen auf beiden Seiten der Membran entfernt. Für die Versuche zur Bestimmung des Fluxes von der apikalen zur basolateralen Seite werden die vortemperierten Versuchslösungen in das apikale Kompartiment (Donor) gegeben, auf die basolaterale Seite (Akzeptor) wird jeweils Hank'sche Lösung gegeben. Bei dieser Versuchsanordnung werden Proben (200 µl) aus der basolateralen Seite (Akzeptor) zeitabhängig entnommen. Zur Untersuchung des Fluxes von basolateraler in Richtung apikaler Seite werden 1,5 ml der vortemperierten Versuchslösungen in das basolaterale Kompartiment (Donor) gegeben. Die Entnahme erfolgt in diesem Fall aus dem apikalen Kompartiment (Akzeptor). Die entnommene Menge wird direkt durch 200 µl vortemperierte Hank'sche Lösung ersetzt. Während der gesamten Versuchszeit werden die Transwells<sup>®</sup> in einem auf 37 °C temperierten Schüttelwasserbad mit einer Geschwindigkeit von 85 min<sup>-1</sup> bewegt. Aus den Donor-Phasen werden nach Versuchsende zusätzliche Proben zu Analytik entnommen.

#### 3.1.6 Permeationsuntersuchungen von Propranolol mittels

##### Caco-2/TC-7-Zellmodell

Zur Untersuchung der Permeation von Propranolol wird eine Lösung der Konzentration 325 µg/ml hergestellt. Die Lösung wird in das apikale Kompartiment eingebracht. Nach 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 und 120 min werden jeweils 200 µl Proben aus dem apikalen Kompartiment entnommen und mit demselben Volumen Hank'scher Lösung ersetzt. Die Proben werden direkt analysiert oder bei -20 °C bis zur Analyse eingefroren. Anschließend wird die Integrität der einzelnen Zellmonolayers mittels Fluorescein-Na untersucht.

### 3.1.7 Permeationsuntersuchungen von Ibuprofen mittels

#### Caco-2/TC-7-Zellmodell

Neben Fluorescein-Na und Propranolol soll Ibuprofen als Versuchssubstanz die Funktionstüchtigkeit des Modells für passive Permeation widerspiegeln und somit mehr Anhaltspunkte zum Vergleich der erhaltenen Permeationskoeffizienten mit Literaturwerten liefern. In diesem Zusammenhang wird auch die Permeation der einzelnen Enantiomeren untersucht und einander gegenüber gestellt. Die Enantiomeren-Trennung erfolgt mittels Kapillarelektrophorese (siehe *Abschnitt 3.2.3.2*). Eine Versuchslösung aus racemischem Ibuprofen (400 µg/ml) in Hank'scher Lösung wird hergestellt und auf pH 6,8 eingestellt. 0,5 ml der vortemperierten Lösung wird in das apikale Kompartiment gegeben. In das basolaterale Kompartiment werden 1,5 ml Hank'sche Lösung (pH 7,4) gegeben. Nach 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 110 und 120 min werden Proben (200 µl) aus dem Akzeptor entnommen und mit dem selben Volumen Hank'scher Lösung ersetzt. Die Proben werden direkt analysiert oder bei -20°C bis zur Analyse eingefroren. Nach Beendigung jedes Versuchs wird die Integrität der einzelnen Zellmonolayer mittels Fluorescein-Na untersucht.

### 3.1.8 Permeationsuntersuchungen von Ofloxacin-Enantiomeren am

#### Caco-2/TC-7-Zellmodell

Bei diesem Versuch werden die folgenden Lösungen hergestellt.

- L1: Versuchslösung, Racemisches Ofloxacin (20 µM) gelöst in Hank'scher Lösung (pH 7,4)
- L2: Verapamil-Lösung; Verpamil gelöst in Hank'scher Lösung (200 µM)
- L3: Hank'sche Lösung (pH 7,4)

Je nach Transportrichtung und Verpamil-Zusatz lassen sich die Versuche in 4 Typen unterteilen:

### **1. Apikal zu Basolateral**

Die Lösung L1 wird in das Apikale Kompartiment gegeben. In das basolaterale Kompartiment wird L3 gegeben. Die Probenentnahme erfolgt basolateral und wird durch L3 ersetzt.

### **2. Basolateral zu Apikal**

Die Lösung L1 wird in das basolaterale Kompartiment gegeben. Im apikalen Kompartiment befindet sich L3. Die Probenentnahme erfolgt apikal und wird durch L3 ersetzt.

### **3. Apikal zu Basolateral in Anwesenheit von Verapamil**

Die Lösung L1 wird in das Apikale Kompartiment gegeben. In das basolaterale Kompartiment wird L2 gegeben. Die Probenentnahme erfolgt basolateral und wird durch L2 ersetzt.

### **4. Basolateral zu Apikal in Anwesenheit von Verapamil**

Die Lösung L1 wird in das basolaterale Kompartiment gegeben. In dem apikalen Kompartiment befindet sich L3. Die Probenentnahme erfolgt apikal und wird durch L3 ersetzt.

Die Proben wurden direkt analysiert oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Analyse eingefroren. Anschließend wird die Integrität der einzelnen Zell-Monolayers mittels Fluorescein-Na untersucht.

#### **3.1.9 Permeationsuntersuchungen von Talinolol mittels**

##### **Caco-2/TC-7-Zellmodell**

Die Versuche erfolgen analog zu den Versuchen mit Ofloxacin, wobei

L1: Versuchslösung, racemisches Talinolol ( $46\ \mu\text{g/ml}$ ) gelöst in Hank'scher Lösung (pH 7,4)

L2: Verapamil-Lösung; Verapamil gelöst in Hank'scher Lösung ( $500\ \mu\text{M}$ )

L3: Hank'sche Lösung (pH 7,4)

Die Proben werden zeitabhängig entnommen und anschließend kapillarelektrophoretisch analysiert.

## 3.2 Analytische Verfahren

### 3.2.1 Apparative Ausstattung

**Kapillarelektrophoresegerät:** Es wurde ein Gerät der Firma Coulter Beckmann Typ PACE<sup>TM</sup> 5500 verwendet. Das Gerät verfügt über einen 34-Positionen Autosampler und Flüssigkeitskühler. Das Gerät erlaubt das Anlegen beliebiger Spannungen im Bereich von 0 bis +/-30 kV beziehungsweise die Vorgabe des Stromes im Bereich von 0 bis +/- 250  $\mu$ A oder der elektrischen Leistung von 0 bis +/- 7,5 W. Außerdem kann ein Druck von 5 oder 20 psi auf die Injektionsseite der Kapillare gegeben werden.

**Detektion:** Es wurde ein On-Column UV Detektor oder DAD Detektor der Firma Coulter Beckmann verwendet. Der UV Detektor verfügt über Filter mit 200, 214, 230, 254, 280 und 300 nm mit einer jeweiligen Bandbreite von 10 nm. Der Detektionsbereich des Dioden Array Detektors liegt zwischen 190 nm und 600 nm.

Die effektive Länge der Kapillaren beträgt:  $L_{\text{Effektiv}} = L - 7\text{cm}$

( $L$ : Gesamtlänge der Kapillare)

**Datenakquisition:** Die Signaldaten werden mittels PACE-Station aufgenommen und ausgewertet.

#### 3.2.1.1 Kapillarsäulen

Es werden Fused-Silica-Kapillarsäulen der Firma MicroQuartz (München) mit einem Innendurchmesser von 50  $\mu$ m verwendet. Vor dem Einbau der Säulen in das Gerät wurden 8 cm vor dem Säulenende etwa 2 – 3 mm der Polyimidschicht mit einem rotglühenden Widerstandsdraht entfernt. Diese Zone dient als optisches Fenster für die On-Column UV-Detektion. Die Konditionierung der Kapillaren erfolgt durch Spülen mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung (60 min, 20 psi) und Wasser (60 min, 20 psi). Anschließend wird mit dem jeweiligen Messpuffer für 30 min bei 20 psi gespült.

#### 3.2.1.2 Puffer

Alle Puffer werden aus destilliertem Wasser, gewonnen durch Umkeher-Osmose und anschließender Desillation, hergestellt und vor dem Einsatz in der CE durch

einen Filter (0,45 µm Porengröße) gegeben. Alle Pufferlösungen werden im Kühlschrank für maximal eine Woche aufbewahrt, Phosphatpuffer um den Neutralpunkt werden alle zwei Tage frisch hergestellt. Der pH-Wert der jeweiligen Pufferlösung wird vor Zugabe des chiralen Selektors eingestellt und anschließend nicht mehr verändert.

### 3.2.2 Vorgehensweise zur Bestimmung der Konzentration, Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze

#### Berechnung der Probenkonzentration

Die Konzentrationen der zu bestimmenden Substanzen werden nach der Kalibrierung mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

$$C_{Probe} = \frac{AUC_{Probe}}{AUC_{Inter.Standard}} * Kalibrierwert \quad (Gl. 3-1)$$

$C_{Probe}$ : Konzentration der zu bestimmenden Probe in µg/ml

$AUC_{Probe}$ : Peakfläche der Probe

$AUC_{Inter.Standard}$ : Peakfläche des internen Standards

Der Kalibrierwert wird berechnet aus der Kalibriergeraden wie folgt berechnet:

$$Kalibrierwert = \frac{\Delta(C_{Probe} \text{ µg/ml})}{\Delta(AUC_{Probe} / AUC_{Inter.Standard})} = \frac{1}{\text{Steigung der Kalibriergeraden}} \quad (Gl. 3-2)$$

#### Nachweisgrenze

Es wird das Rauschen des Messverfahrens durch Aufnahme der Basislinie bestimmt. Dazu wird die Konzentration des Analyten ausgehend von einer Leerprobe stetig erhöht bis ein Signal eindeutig erkennbar wird. Die mittlere Höhe dieses Signals wird mit 3 multipliziert und über die Kalibriergerade in einen Konzentrationswert umgerechnet.

#### Bestimmungsgrenze

Es wird das Rauschen des Messverfahrens durch Aufnahme der Basislinie bestimmt.

Dazu wird die Konzentration des Analyten ausgehend von einer Leerprobe stetig erhöht bis ein Signal eindeutig erkennbar wird. Die mittlere Höhe dieses Signals wird mit 10 multipliziert und über die Kalibriergerade in einen Konzentrationswert umgerechnet.

### 3.2.3 Methodenbeschreibung für die einzelnen Substanzen

#### 3.2.3.1 CE-Methode zur Bestimmung von Propranolol

Die Berechnung der Proben-Konzentrationen erfolgt analog zu *Abschnitt 3.2.2.*

##### *Methodenbeschreibung für Propranolol*

---

Detektor:	DAD Detektor, Wellenlänge 214 nm
Kapillare:	Fused-Silica , I. D. 50 µm, L <sub>Total</sub> 37 cm
Elektrolyt-Puffer:	Phosphat-Puffer 100 mM, pH 3,0
Spülschritte:	0,1 N NaOH 1 min bidest. Wasser 2 min Puffer 2 min
Injektion:	10 s hydrodynamisch bei 5 psi
Spannung:	13 kV, normale Polarität
Temperatur:	20 °C

---

##### **Linearität:**

Folgende Lösungen Propranolol werden zur Kalibrierung in Hank'scher Lösung (pH 7,4) hergestellt: 36,81; 29,46; 22,09; 14,73; 9,20; 5,26 und 2,3 mg/100 ml. Weitere zwei Lösungen werden durch Verdünnung der konzentriertesten Lösung im Verhältnis 1:31 und 1:61 hergestellt, um die Konzentrationen 1,19 und 0,60 mg/100 ml zu erhalten. 200 µl dieser Lösungen werden entnommen und mit 50 µl Procain-HCl-Lösung (220 µg/ml) versetzt. Nach Zusatz von 50 µl Procain-HCl Lösung als internem Standard resultieren folgende Konzentration an Propranolol: 294,5; 235,6;

176,7; 117,8; 73,6; 42,1; 18,4; 9,5 und 4,8  $\mu\text{g/ml}$ . Je Verdünnung werden drei Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt. Die Messdaten sind in *Tab. 8.1* aufgeführt.

**Systempräzision:**

9,2 mg Propranolol werden in 100 ml Hank'scher Lösung gelöst und wie oben beschrieben vorbereitet. Die Lösung wird 12-mal hydrodynamisch bei den oben angegebenen Bedingungen injiziert. Mittelwert und Standardabweichung werden berechnet. Die Daten sind in *Tab. 8.2* zusammengefasst.

**Methodenpräzision:**

Aus einer Lösung (147,3  $\mu\text{g/ml}$  Propranolol) wird sechsmal unabhängig voneinander unter identischer Vorgehensweise eine Probe hergestellt, filtriert und in je drei Einzelbestimmungen analysiert. Aus den Messwerten werden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die Methodenpräzisionsdaten sind in *Tab. 8.3* wiedergegeben.

**3.2.3.2 CE-Methode zur Bestimmung der Ibuprofen-Enantiomeren**

Die Trennung der Enantiomeren von Ibuprofen mittels Maltodextrin als chiralem Selektor ist von Khaledi et al. im Jahr 1994 beschrieben worden. In Anlehnung daran wird die Bestimmungsmethode der Ibuprofen-Enantiomeren durchgeführt.

**Methodenbeschreibung**

---

<i>Detektor:</i>	<i>DAD Detektor, Wellenlänge 214 nm</i>
<i>Kapillare:</i>	<i>Fused-Silica, I. D. 50 <math>\mu\text{m}</math>, <math>L_{\text{Total}}</math> 37 cm</i>
<i>Elektrolyt-Puffer:</i>	<i>Phosphat-Puffer 100 mM, pH 7,0</i>
<i>Spülschritte:</i>	<i>0,1 N NaOH 1 min</i> <i>bidest. Wasser 2 min</i> <i>Puffer 2 min</i>
<i>Injektion:</i>	<i>10 s hydrodynamisch bei 5 psi</i>

---



---

<i>Spannung:</i>	<i>15 kV, normale Polarität</i>
<i>Chiraler Selektor:</i>	<i>Dextrin 10 (10 % m/V)</i>
<i>Temperatur:</i>	<i>20 °C</i>

---

### ***Berechnung der Konzentration der Ibuprofen-Enantiomeren***

Die Berechnung der Proben-Konzentrationen erfolgt analog zu *Abschnitt 3.2.2.*

### ***Kalibrierung und Validierung***

#### **Linearität:**

Folgende Ibuprofen-Lösungen werden zur Kalibrierung in Hank'scher Lösung (pH 6,8) hergestellt: 31,47; 26,23; 19,67; 13,11; 6,56; 1,87 mg/100 ml. 200 µl dieser Lösungen werden entnommen und mit 50 µl S-Naproxen (428,4 µg/ml) versetzt. Nach Zusatz von 50 µl Naproxen als internem Standard resultieren folgende Konzentrationen an racemischem Ibuprofen: 251,78; 209,81; 157,36; 104,91; 52,45 und 14,99 µg/ml. Je Verdünnung werden drei Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt. Die Daten der Kalibriergeraden sind in *Tab. 8.4* zusammengefasst.

#### **Systempräzision:**

9,84 mg racemisches Ibuprofen werden in 100 ml Hank'scher Lösung gelöst und wie beschrieben vorbereitet. Die Lösung wird 12-mal hydrodynamisch bei den oben angegebenen Bedingungen injiziert. Mittelwert und Standardabweichung werden berechnet. Die Messdaten sind in *Tab. 8.5* wiedergegeben.

#### **Methodenpräzision:**

Aus einer Lösung (157,36 µg/ml racemisches Ibuprofen) werden 6-mal unabhängig voneinander unter identischer Vorgehensweise eine Probe hergestellt, filtriert und in je drei Einzelbestimmungen analysiert. Aus den Messwerten werden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die Daten der Methodenpräzision für R- und S-Ibuprofen sind in *Tab. 8.6* und *Tab. 8.7* wiedergegeben.

### 3.2.3.3 Kapillarelektrophoretische Bestimmung der Ofloxacin-Enantiomeren

#### *Probenaufbereitung*

Jeweils 200  $\mu\text{l}$  der Ofloxacin-Proben, gelöst in Hank'scher Lösung, werden entnommen und zusammen mit 50  $\mu\text{l}$  Enrofloxacin (1,51  $\mu\text{g/ml}$ ) unter Lichtschutz in ein EppendorfReaktionsgefäß (1,5 ml) gegeben. Die Proben werden mit 1 ml Dichlormethan versetzt, für 2 min mit Hilfe eines Vortex-Gerätes geschüttelt und anschließend für 5 min bei 2500 U/min zentrifugiert. 900  $\mu\text{l}$  der Dichlormethan-Phase werden in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das Dichlormethan wird unter Stickstoffatmosphäre eingedampft. Der Rückstand wird in 200  $\mu\text{l}$  einer Mischung von Wasser:Methanol (9:1) aufgenommen. Die Konzentration an Enrofloxacin in den Proben beträgt somit 378 ng/ml.

*Abb. 3.2* zeigt schematisch die Aufbereitungsschritte und beschreibt die Methode.

#### *Methodenbeschreibung für Ofloxacin*

---

Detektor:	UV Detektor, Wellenlänge 280 nm
Kapillare:	Fused-Silica , I. D. 50 $\mu\text{m}$ , $L_{\text{Total}}$ 37 cm
Elektrolyt-Puffer:	Phosphat-Puffer 50 mM, pH 2,8
Spülschritte:	0,1 N NaOH für 1 min; bidest. Wasser für 2 min Puffer für 2 min
Injektion:	20 s elektrokinetisch bei 10 kV
Spannung:	20 kV, normale Polarität
Chiraler Selektor:	M- $\beta$ -CD 4% (m/V)
Temperatur	25°C

---

#### *Berechnung der Konzentration der Ofloxacin-Enantiomeren*

Die Berechnung der Proben-Konzentrationen erfolgt analog zu *Abschnitt 3.2.2*.

### Methodenoptimierung:

Die angegebenen Bedingungen sind mittels eines Faktoren-Designs ermittelt worden. Dafür wurde ein „Full Factorial Central Composite Design“ verwendet, um die Einflüsse der einzelnen Faktoren zu ermitteln und somit die Methode optimieren zu können. Die Vorgehensweise und Ergebnisse dieser Untersuchung sind Kapitel 4 „Ergebnisse“ dargestellt.

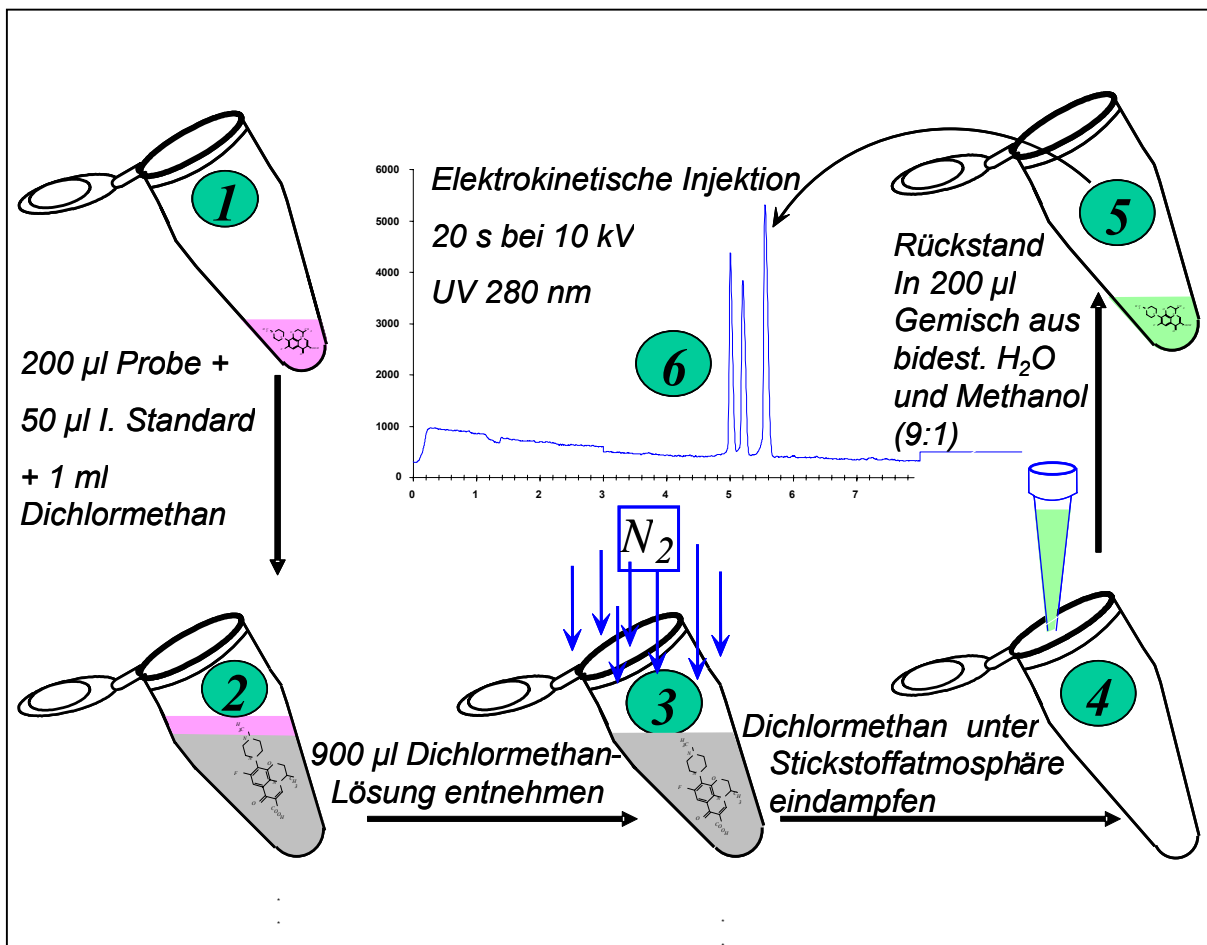


Abb. 3.2 Proben-Aufbereitungsschritte und Methodenbeschreibung

### Kalibrierung und Validierung

#### Linearität:

Folgende Lösungen von racemischem Ofloxacin wurden zur Kalibrierung in Hank'scher Lösung (pH 7,4) hergestellt: 2,032; 5,064; 8,128; 16,255; 3,69;

3,57; 4,56; 5,296 und 6,314 mg/50 ml. Die ersten 4 Lösungen werden 1:1000, die restlichen 1: 100 verdünnt. Nach dem Verdünnungsschritt und Zusatz von 50 µl Enrofloxacin als internem Standard resultieren folgende Konzentrationen an racemischem Ofloxacin: 40,64; 81,27; 162,55; 325,1; 538,3; 713,8; 912,1; 1059,2 und 1262,9 ng/ml. Je Verdünnung werden drei Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt. Die Daten der Kalibriergeraden sind in *Tab. 8.8* zusammengefasst.

#### **Systempräzision:**

6,08 mg racemisches Ofloxacin werden in 100 ml Hank`scher Lösung gelöst und anschließend 1:100 verdünnt. 200 µl dieser Lösung werden mit 50 µl Enrofloxacin versetzt. Die Probe wird wie oben beschrieben weiter vorbereitet. Die Lösung wird 12-mal elektrokinetisch bei den oben angegebenen Bedingungen injiziert. Mittelwert und Standardabweichung werden berechnet. Die Messdaten sind in *Tab. 8.9* zusammengefasst.

#### **Methodenpräzision:**

Aus einer Lösung (521 ng/ml racemisches Ofloxacin) wird 6-mal unabhängig voneinander unter identischer Vorgehensweise eine Probe hergestellt, filtriert und in je drei Einzelbestimmungen analysiert. Aus den Messwerten werden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die für die Methodenpräzision sind in *Tab. 8.10* für L-Ofloxacin und in *Tab. 8.11* für D-Ofloxacin wiedergegeben.

### **3.2.3.4 Kapillarelektrophoretische Bestimmung der Talinolol-Enantiomeren**

#### ***Probenaufbereitung***

200 µl der Talinolol-Proben, gelöst in Hank`scher Lösung, werden entnommen und mit 50 µl Celiprolol (5,05 µg/ml) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml) gegeben. Die Proben werden mit 20 µl 1 N NaOH und 1 ml Diethylether versetzt und für 2 min mit Hilfe eines Vortex-Gerätes geschüttelt. 900 µl der Diethylether-Phase werden in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der Diethylether wird unter Stickstoffatmosphäre

eingedampft, und der Rückstand in 200  $\mu\text{l}$  bidest. Wasser aufgenommen. Die Konzentration an Celiprolol in den Proben beträgt somit 1,262  $\mu\text{g/ml}$ .

### **Methodenbeschreibung für Talinolol**

---

Detektor:	UV Detektor, Wellenlänge 200 nm
Kapillare:	PVA-überzogene Kapillare, I. D. 50 $\mu\text{m}$ , $L_{\text{Total}}$ 27 cm
Elektrolyt-Puffer:	Phosphat-Puffer 100 mM, pH 3,5
Spülschritte:	bidest. Wasser für 2 min Puffer für 2 min
Injektion:	40 s elektrokinetisch bei 10 kV
Spannung:	15 kV, normale Polarität
Chiraler Selektor:	HDAS 3mM
Temperatur	20°C

---

### **Berechnung der Konzentration der Ofloxacin-Enantiomeren**

Die Berechnung der Proben-Konzentrationen erfolgt analog zu *Abschnitt 3.2.2.*

### **Kalibrierung und Validierung**

#### **Linearität:**

Folgende Lösungen von racemischem Talinolol werden zur Kalibrierung in Hank'scher Lösung (pH 7,4) durch Verdünnung aus den Stammlösungen hergestellt: 2374,4; 1780,7; 1187,2; 593,6; 296,8; 148,4 ng/ml. Je Verdünnung werden drei Einzelbestimmungen in willkürlicher Reihenfolge durchgeführt. Die Daten der Kalibriergeraden sind in *Tab. 8.13* aufgeführt.

#### **Systempräzision:**

12,18 mg racemisches Talinolol werden in 100 ml Hank'scher Lösung gelöst und anschließend 1:100 verdünnt. 200  $\mu\text{l}$  dieser Lösung werden mit 50  $\mu\text{l}$

Celiprolol versetzt. Die Probe wird wie oben beschrieben weiter vorbereitet. Die Lösung wird 12-mal elektrokinetisch unter den oben angegebenen Bedingungen injiziert. Mittelwert und Standardabweichung werden berechnet. Die Messdaten sind in *Tab. 8.12* aufgeführt.

**Methodenpräzision:**

Aus einer Lösung (1,44 µg/ml racemisches Talinolol) wird 6-mal unabhängig voneinander unter identischer Vorgehensweise eine Probe hergestellt, filtriert und in je drei Einzelbestimmungen analysiert. Aus den Messwerten werden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die Messdaten sind in *Tab. 8.14* und *Tab. 8.15* wiedergegeben.

**3.2.4 Kapillarelektrophoretische Trennung verschiedener  $\beta$ -Blocker**

Mittels HDAS- $\beta$ -CD als chiralem Selektor wurde eine Methode entwickelt, welche in der Lage ist, eine große Anzahl an  $\beta$ -Blockern in die jeweils optisch aktiven Enantiomeren zu trennen.

Folgende Substanzen wurden eingesetzt:

Accebutolol, Alprenolol, Atenolol, Bisoprolol, Bupranolol, Celiprolol, Esmolol, Metipranolol, Metiprolol, Oxprenolol, Penbutolol, Sotalol, Talinolol und Timolol.

Die Parameter entsprechen denen des Talinolols bei einer Kapillarenlänge von 37 cm und einer Spannung von 20 kV.

# KAPITEL 4

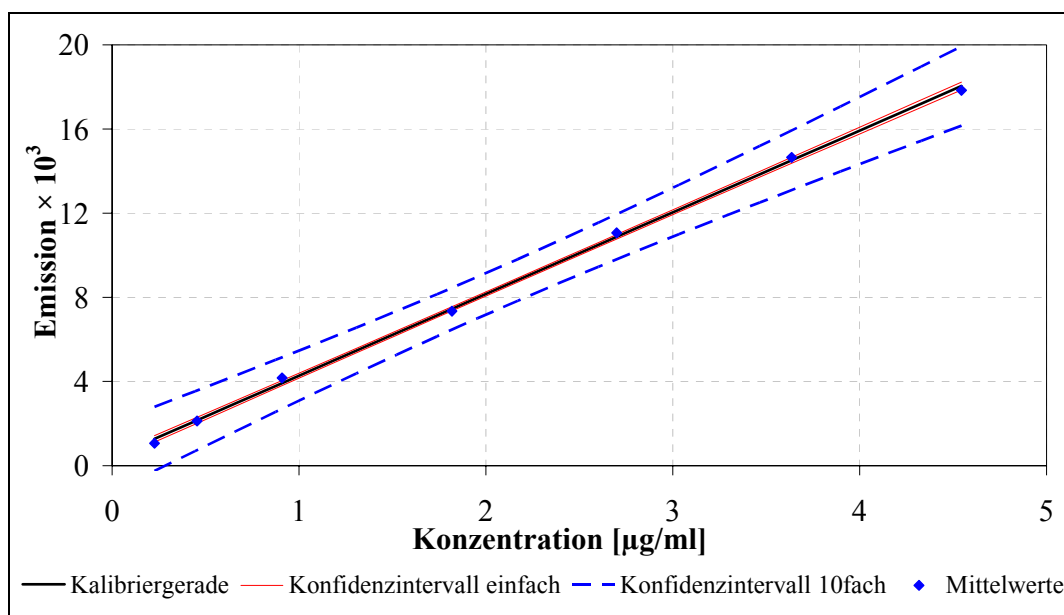
## ERGEBNISSE

### 4.1 Ergebnisse des Methodischen Teils

#### 4.1.1 Analytische Verfahren

##### 4.1.1.1 Analytik von Fluorescein-Na

Unter den im Kapitel 3 „Methoden“ aufgeführten Bedingungen werden die Proben in 96-Well-Platten photometrisch mittels TECAN-SpectraFluor analysiert. Die Methode wird im Konzentrationsbereich von 227 ng/ml bis 4,55 µg/ml kalibriert. Der Zusammenhang zwischen der Konzentration und Emission ist linear (*Abb. 4.1*).



*Abb. 4.1* Kalibriergerade für Fluorescein-Na

Die Parameter der Kalibrierung sind in *Tab. 4.1* zusammengestellt. Die Bestimmung der Fluorescein-Na-Permeation wird zur Überprüfung der Integrität des Zellmonolayers nach jedem Resorptionsversuch durchgeführt.

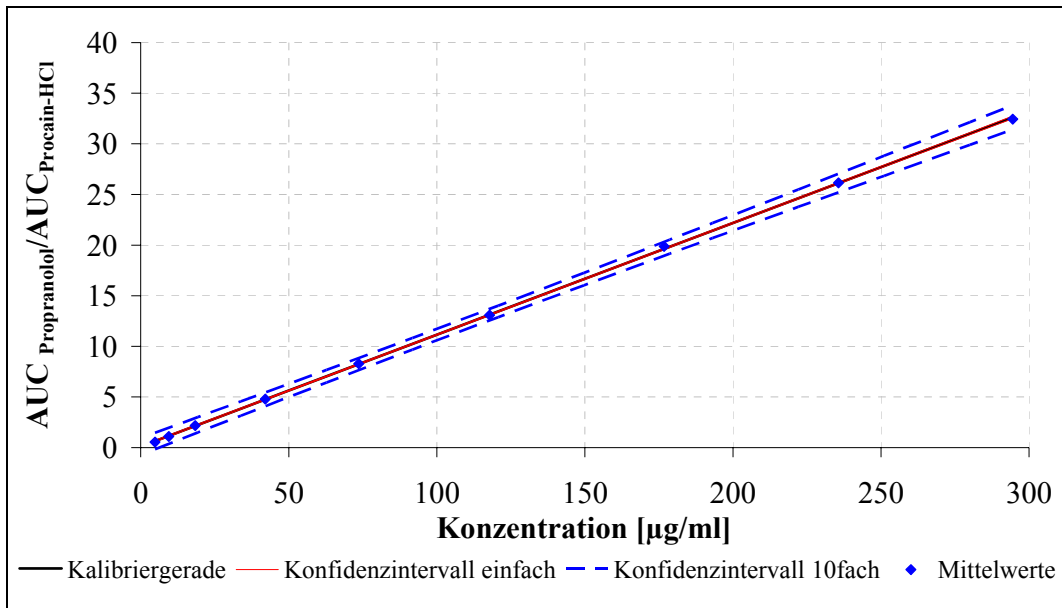
**Tab. 4.1** Kalibrierparameter von Fluorescein-Na

Modell	$y(x) = b1 (x - E[xc]) + E[yc]$
Messbereich [mg/ml]	0,23 - 4,55 [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Anzahl Kalibrierproben	21
Anzahl Freiheitsgrade	19
Kalibrierfunktion	$y(x) = 3883,424[x - 2,041] + 8319,762$
Korrelationskoeffizient	0,9996
Steigung/Empfindlichkeit	3883,4237
Nachweisgrenze	35,8 [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Bestimmungsgrenze	119,3 [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Datenschwerpunkte	$E[xc] = 2,04 [\mu\text{g/ml}]$ $E[yc] = 8319,762 [AUC]$
Vertrauensbereich der Kalibrierfunktion	$y(x) \pm 0,45(0,476 + [x - 0,002]^2/0,049)^{0,5}$

#### 4.1.1.2 Analytik von Propranolol

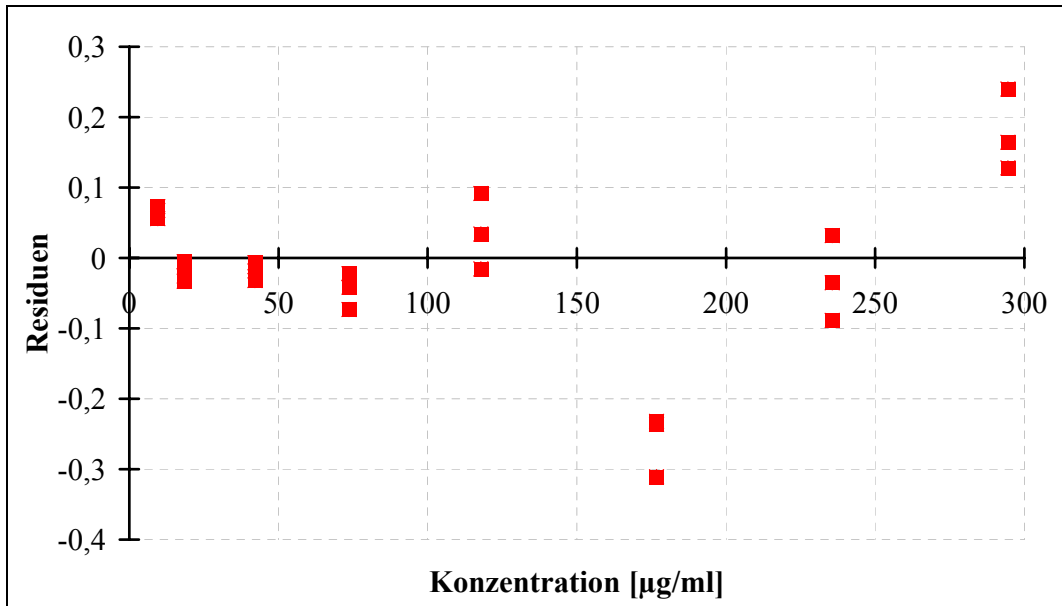
Zur Bestimmung des Permeationskoeffizienten von Propranolol wird die Kapillarelektrophorese als Detektionsmethode verwendet. In saurem Milieu liegt die Aminogruppe in Propranolol protoniert vor und wandert somit das Molekül unter der Wirkung des elektrischen Feldes in Richtung der Kathode. In einem Phosphat-Puffer pH 3,0 und unter der Wirkung einer Spannung von 13 kV kann ein scharfes Signal für Propranolol erzielt werden. Die hohe Spannung und kurze Kapillarenlänge führen zusammen zu einer geringen Analysenzeit von unter 8 min. Da Propranolol den Zellmonolayer schnell und gut passiert, sind Aufbereitungs- und Aufkonzentrierungsschritte zur Erhöhung der Empfindlichkeit der Methode unnötig. Die Methode hat die Bestimmung von racemischem Propranolol ohne eine Trennung der Propranolol-Enantiomere zum Ziel.





**Abb. 4.2** Kalibriergerade für Propranolol ( $n = 3$ )

Die Kalibrierung wird im Konzentrationsbereich von 4,8 µg/ml bis 295 µg/ml durchgeführt. Zwischen Konzentration und Absorption besteht eine lineare Beziehung (Abb. 4.2).



**Abb. 4.3** Residuen-Diagramm für Propranolol ( $n = 3$ )

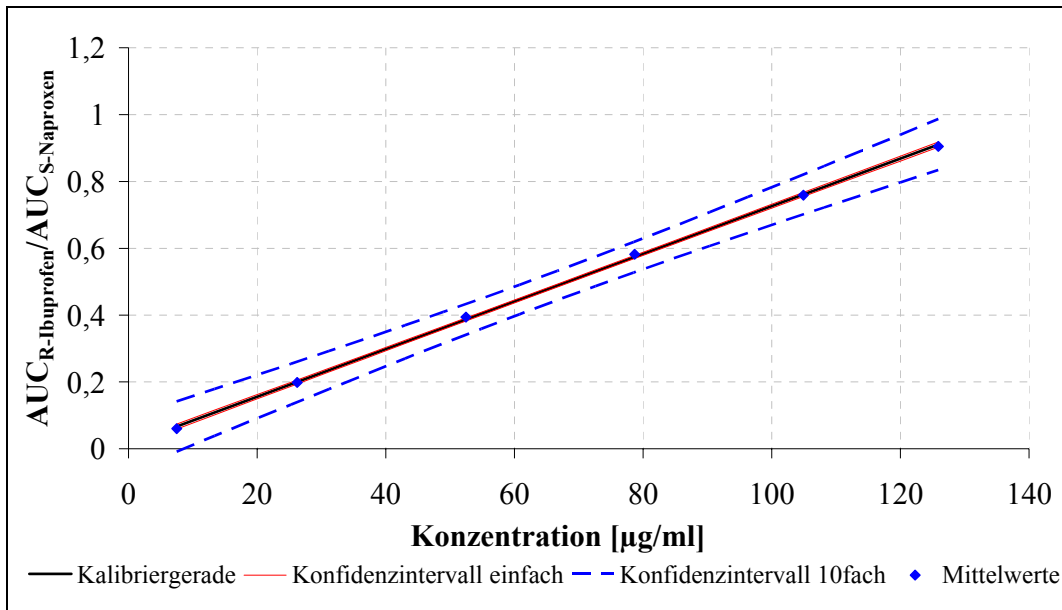
Ein Trend ist innerhalb der Residuen von Propranolol nicht zu erkennen (Abb. 4.8). Die Parameter der Kalibrierung sind in Tab. 4.2 zusammengefasst. Die Methodenpräzision ist in Tab. 8.3 (Anhang) aufgeführt.

**Tab. 4.2** Kalibrierparameter für Propranolol

	<i>Propranolol</i>
Modell	$y(x) = b1 (x - E[xc]) + E[yc]$
Messbereich [mg/ml]	4,83 - 294,5 [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Anzahl Kalibrierproben	27
Anzahl Freiheitsgrade	25
Kalibrierfunktion	$y(x) = 0,110 [x - 108,126] + 12,049$
Korrelationskoeffizient	0,999
Steigung/Empfindlichkeit	0,1103
Nachweisgrenze	0,75 [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Bestimmungsgrenze	2,50 [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Datenschwerpunkte	$E[xc] = 108,13 [\mu\text{g/ml}]$ $E[yc] = 12,049 [AUC]$
Vertrauensbereich der Kalibrierfunktion	$y(x) \pm 2,936 \cdot 10^{-4} (3,7 \cdot 10^{-5} + [x - 0,108]^2 / 2,7 \cdot 10^2)^{0,5}$

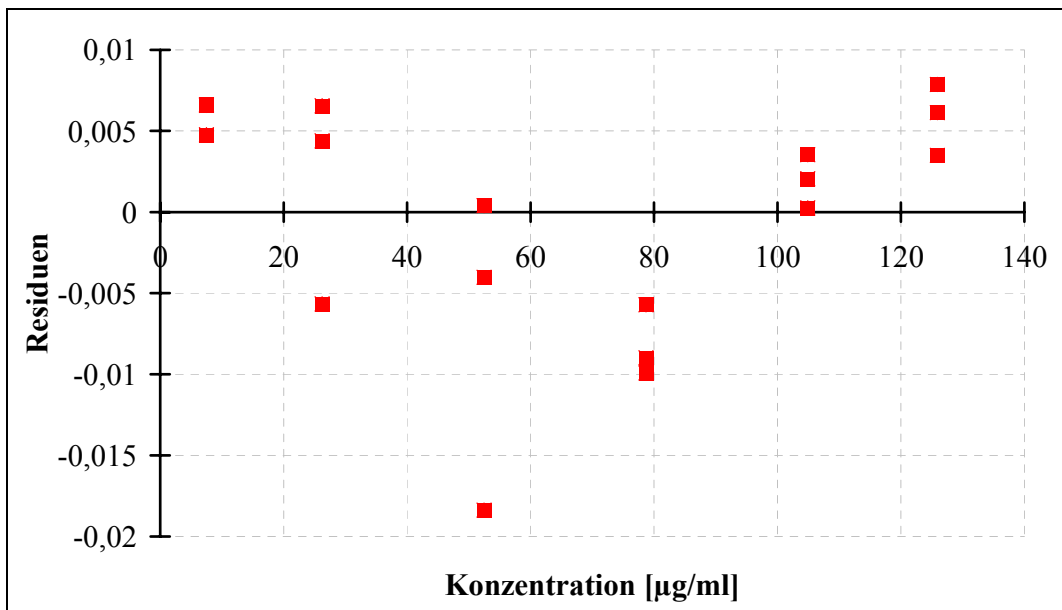
#### 4.1.1.3 Analytik von Ibuprofen-Enantiomeren

Unter dem Einsatz von chiralen Selektoren können racemische Substanzen in ihre Enantiomeren getrennt werden. Die Trennung beruht auf einer kinetischen Interaktion zwischen dem chiralen Selektor, der sich in der mobilen Phase befindet, und dem zu trennenden chiralen Analyt. Unter dem Einsatz von Maltodextrin als chiralem Selektor konnten in der Literatur mehrere optisch aktive Substanzen stereoselektiv getrennt werden. Die in der vorliegenden Arbeit erzielte Trennung von Ibuprofen mittels Dextrin 10<sup>®</sup> beruht auf der Arbeit von *Quang und Khaledi (1994)*. Die Methode zeichnet sich aus durch den hohen Anteil an Dextrin 10<sup>®</sup>, der 10 % (m/V) des Puffers beträgt. Die hohe Konzentration ist jedoch für eine gute Trennung erforderlich. Unter den in Kapitel 3 aufgeführten Bedingungen kann eine Trennung der Ibuprofen-Enantiomeren bei einer Migrationszeit von unter 8 min erzielt werden.



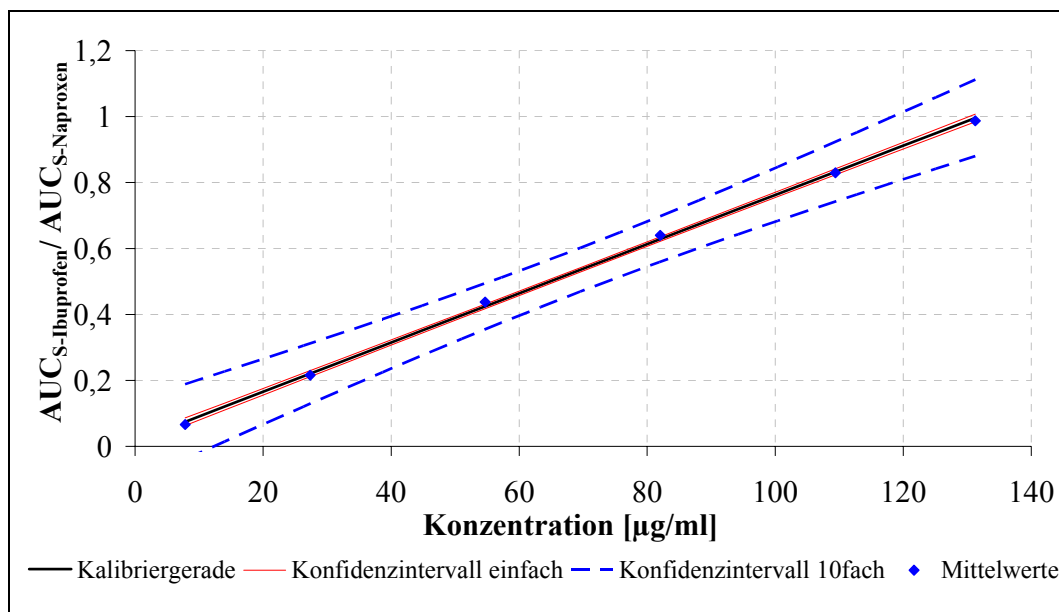
**Abb. 4.4** Kalibriergerade für R-Ibuprofen ( $n = 3$ )

Eine lineare Beziehung besteht zwischen der R-Ibuprofen-Konzentration und der Absorption (Abb. 4.2). Derselbe Zusammenhang ist zwischen der Konzentration und der Absorption für S-Ibuprofen zu erkennen (Abb. 4.4).

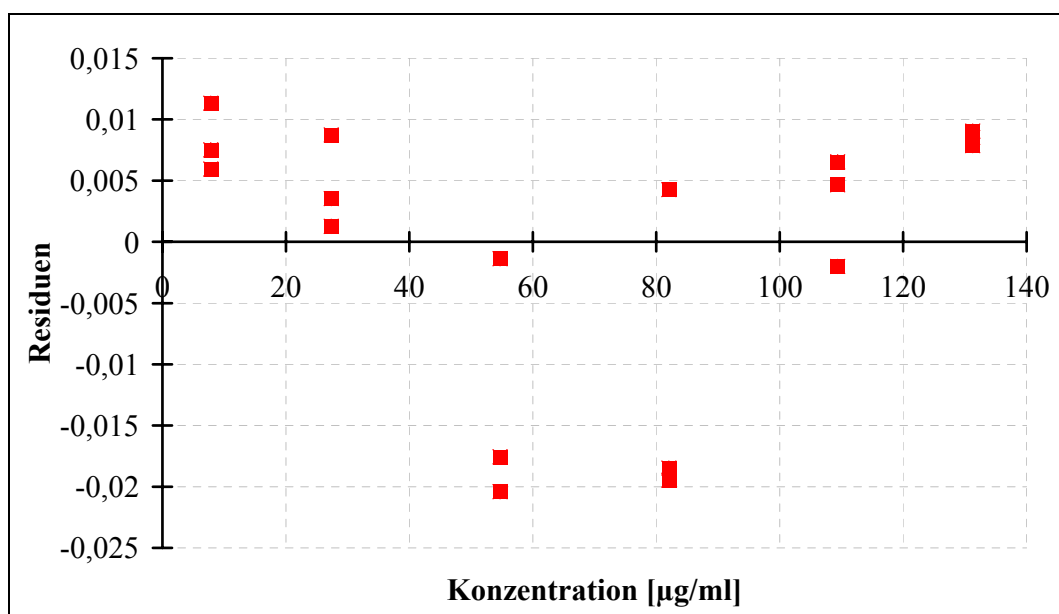


**Abb. 4.5** Residuen-Diagramm für R-Ibuprofen ( $n = 3$ )

Ein Trend innerhalb der Residuen ist weder für R- noch für S-Ibuprofen zu erkennen (Abb. 4.3 und Abb. 4.5). Die Kalibrierungsparameter für beide Enantiomeren sind in Tab. 4.3 zusammengestellt. Abb. 4.6 zeigt ein typisches Elektropherogramm und zusätzlich das jeweilige Absorptionsspektrum der einzelnen Peaks.



**Abb. 4.6** Kalibriergerade für S-Ibuprofen ( $n = 3$ )



**Abb. 4.7** Residuen-Diagramm für S-Ibuprofen ( $n = 3$ )

Die Validierungsparameter (Systempräzision und Methodenpräzision) sind Tab. 8.5, Tab. 8.6 und Tab. 8.7 (Anhang) wiedergeben. Die Methodenpräzision für R-Ibuprofen liegt bei einem Wert von 2,5 % und für S-Ibuprofen bei 2,6 %.

**Tab. 4.3** Kalibrierparameter von R- und S-Ibuprofen

	<i>R-Ibuprofen</i>	<i>S-Ibuprofen</i>
<i>Modell</i>	$y(x) = b1 (x - E[xc]) + E[yc]$	$y(x) = b1 (x - E[xc]) + E[yc]$
<i>Messbereich [mg/ml]</i>	7,49 - 125,89 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	7,81 - 131,26 [ $\mu\text{g/ml}$ ]
<i>Anzahl Kalibrierproben</i>	18	18
<i>Anzahl Freiheitsgrade</i>	16	16
<i>Kalibrierfunktion</i>	$y(x) = 0,007 [x - 65,941] + 0,483$	$y(x) = 0,007 [x - 68,757] + 0,529$
<i>Korrelationskoeffizient</i>	0,9997	0,9995
<i>Steigung/Empfindlichkeit</i>	0,0071	0,0075
<i>Nachweisgrenze</i>	1,15 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	1,66 [ $\mu\text{g/ml}$ ]
<i>Bestimmungsgrenze</i>	3,82 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	5,53 [ $\mu\text{g/ml}$ ]
<i>Datenschwerpunkte</i>	$E[xc] = 65,94 [\mu\text{g/ml}]$ $E[yc] = 0,483 [AUC]$	$E[xc] = 68,76 [\mu\text{g/ml}]$ $E[yc] = 0,529 [AUC]$
<i>Vertrauensbereich der Kalibrierfunktion</i>	$y(x) \pm 1,85 \cdot 10^{-5} (5,56 \cdot 10^{-5} + [x - 0,066]^2/30)^{0,5}$	$y(x) \pm 2,81 \cdot 10^{-5} (5,56 \cdot 10^{-5} + [x - 0,069]^2/30)^{0,5}$

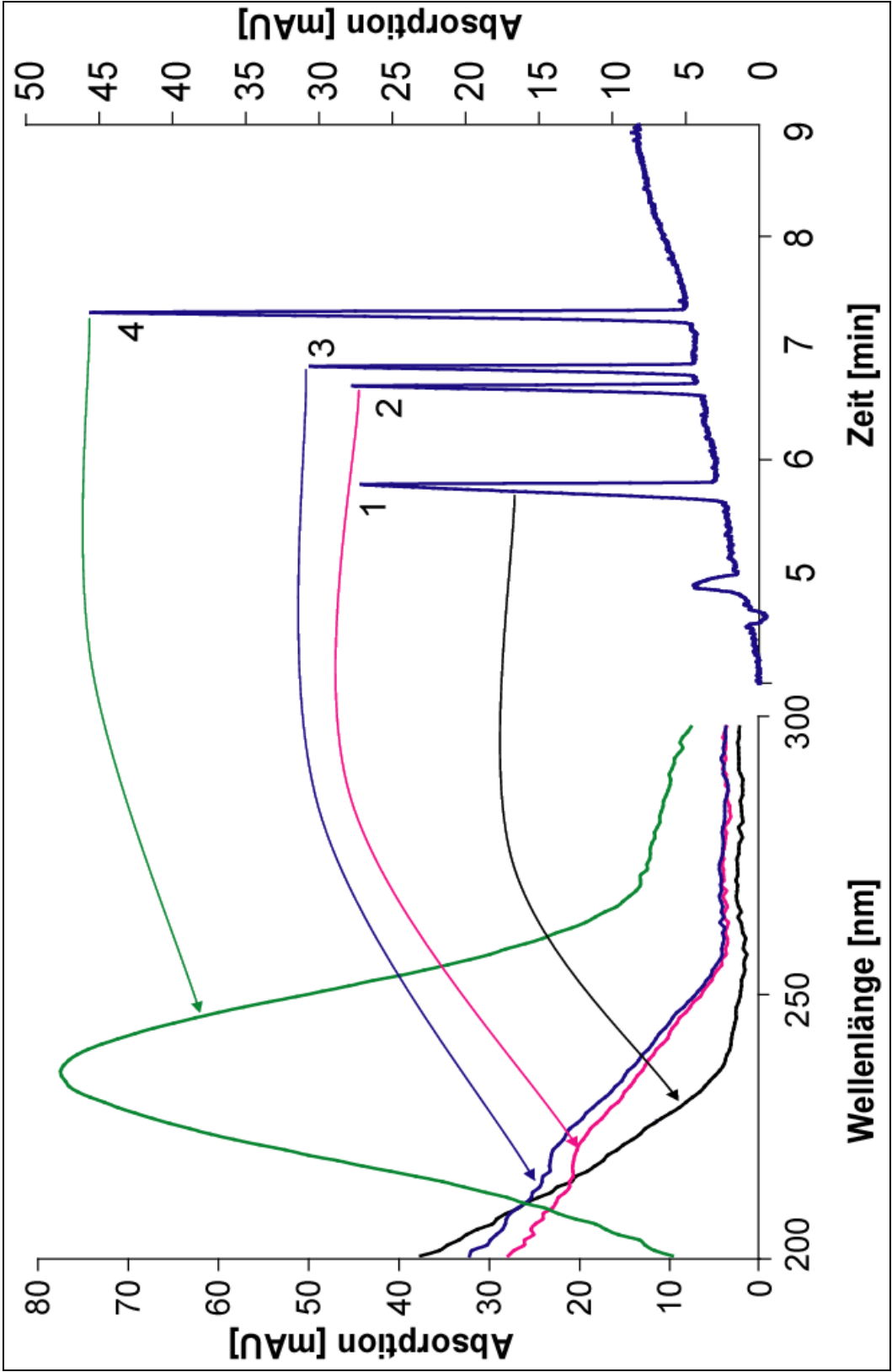


Abb. 4.8 Kapillarelektrophoretische Trennung von Ibuprofen-Enantiomeren (rechts) und Absorptionsspektren der einzelnen Substanzen (links). 1: HEPES; 2: R-Ibuprofen; 3: S-Ibuprofen; 4: S-Naproxen

#### 4.1.1.4 Analytik der Ofloxacin-Enantiomeren

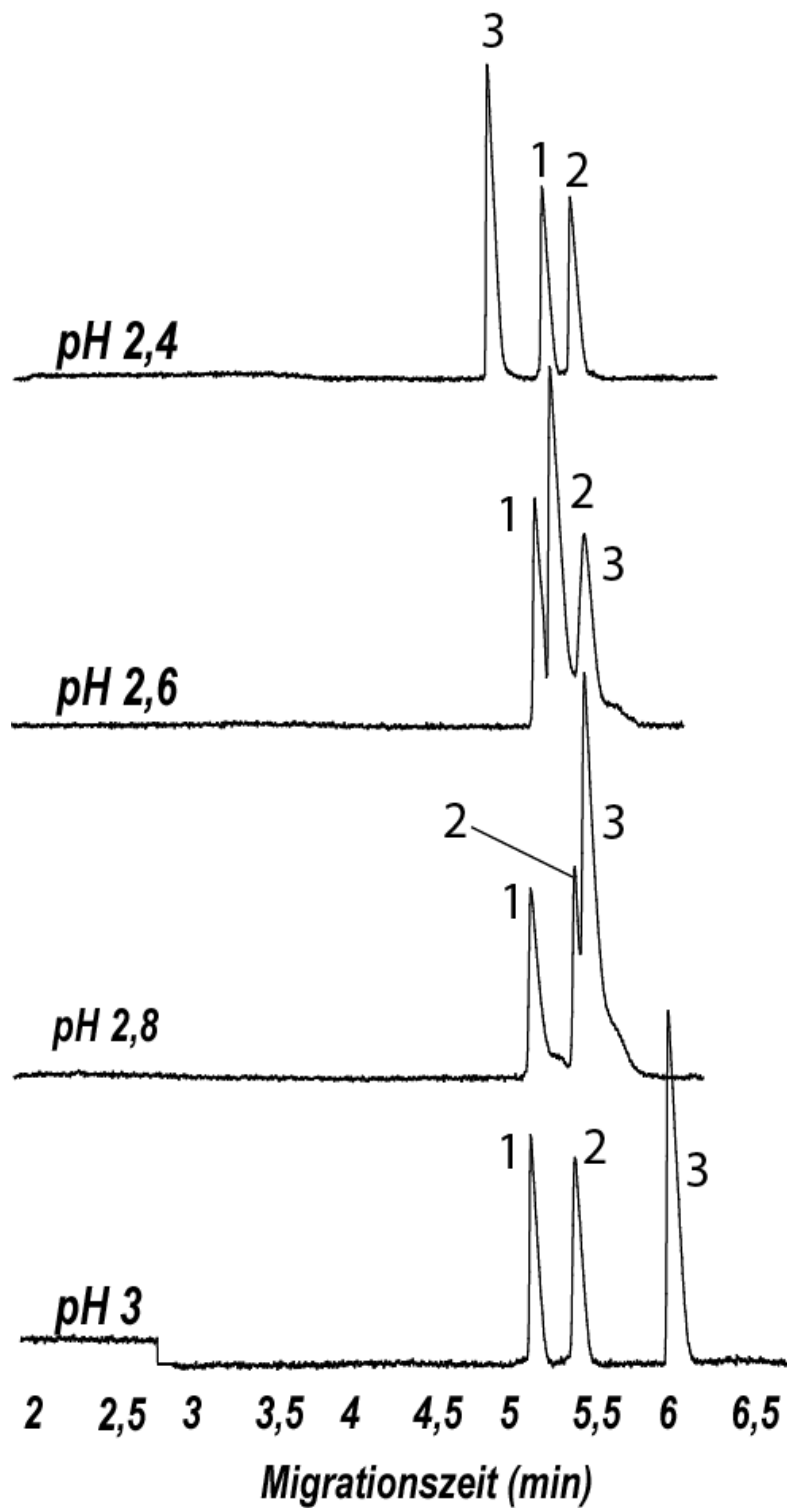
##### Methode 1

Es wurden 2 Methoden zur Bestimmung der Ofloxacin-Enantiomeren entwickelt. Die erste Methode bedient sich der hydrodynamischen Injektion. Die Proben für diese Methode werden direkt ohne Probenaufbereitung injiziert. Mit dieser Methode konnte eine Nachweisgrenze von lediglich 2,5 µg/ml erreicht werden. Um Ofloxacin-Enantiomere in extrem verdünnten Lösungen zu bestimmen, konnte diese Methode somit nicht genutzt werden. Da sich die Methode für unsere Zwecke als unbrauchbar erwiesen hat, wird folglich darauf nicht mehr eingegangen.

##### Methode 2

Um Empfindlichkeitsprobleme der Kapillarelektrophorese zu umgehen, werden die Proben, wie in Kapitel 3 „Methoden“ auf beschrieben ist, aufbereitet und anschließend elektrokinetisch injiziert. Anfänglich wird Procain-HCl als interner Standard eingesetzt. Die Methode zeigt in Abhängigkeit von sehr geringfügigen Veränderungen des pH-Wertes eine Verschiebung des Procain-Peaks gegenüber den Ofloxacin-Peaks. Dieses Phänomen ist auf die unterschiedliche Ionisation von Ofloxacin und Procain-HCl zurückzuführen. Zusätzlich verändert sich bei geringfügiger Veränderung des pH-Wertes und gleichbleibender Konzentration das Verhältnis der injizierten Procainmenge zu der von Ofloxacin. Somit ist Procain-HCl als interner Standard bei elektrokinetischer Injektion ungeeignet.

Ersatz von Procain-HCl gegen Enrofloxacin führt hingegen zu einer validen Methode. Durch ein Central Composite Design ( $2^4$  full factorial central composite design) kann die Methode weiter optimiert werden. Die Elektrolytkonzentration (Puffer), der pH-Wert, die M-β-CD Konzentration und die Temperatur gehen als Faktoren ein. Gemessen werden die Zielgrößen Peakfläche, Auflösung, Migrationszeit und Stromstärke. Ziel ist eine möglichst hohe Peakfläche, hohe Auflösung, geringe Migrationszeiten und geringe Stromstärke.



**Abb. 4.9** *pH-Wert-Abhängigkeit der Migrationszeit von Procaïn-HCl. Verschiebungen des Procaïn-HCl Peaks gegenüber dem von Ofloxacin.*

*1: L-Ofloxacin; 2: D-Ofloxacin; 3: Enrofloxacin*



**Tab. 4.4** Eingesetzte Faktoren und deren Niveaus

	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$
Niveau	Puffer-Konzentration (mM)	M-CD Konzentration (m/V %)	Puffer-pH	Temperatur (°C)
-1	30	3	2	15
0	50	4	2,5	20
+1	70	5	3	25

Die Versuchsreihe besteht aus 16 Versuchen an Würfelpunkten (Eckpunkte des Würfels), 8 an Sternpunkten und 3 im Zentrum. Jeder Versuch wird 5-mal wiederholt. Alle 135 Versuche werden vollständig randomisiert durchgeführt. Tab. 4.5 zeigt die Versuchsreihe des Designs.

Mit Hilfe einer „Multiple Response Optimization“ wird eine Optimierung durchgeführt, welche zu einem Kompromiss für alle vier beteiligten Zielgrößen führt.

Folgende Bedingungen errechnen sich als optimal:

Puffer-Konzentration	50 $\mu$ M
M- $\beta$ CD-Konzentration	4 % (m/V)
pH-Wert	2,8
Temperatur	25°C

**Tab. 4.5** Faktoren und die ermittelten Werte der Zielgrößen. ( $R_s$  = Auflösung)

Versuch	Experimentelle Faktoren				Gemessene Zielgrößen			
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	Fläche	$R_s$	Zeit (min)	Stromstärke ( $\mu A$ )
1	-1	-1	-1	-1	7535	0,81	5,45	34
2	-1	-1	-1	1	7550	0,63	4,32	40
3	-1	-1	1	-1	3541	1,93	5,60	16
4	-1	-1	1	1	5818	1,33	4,38	20
5	-1	0	0	0	5396	1,48	5,27	19
6	-1	1	-1	-1	9496	0,98	5,89	33
7	-1	1	-1	1	6276	1,09	4,65	39
8	-1	1	1	-1	3235	2,24	6,37	16
9	-1	1	1	1	2970	1,98	4,99	19
10	0	-1	0	0	6044	1,85	5,51	31
11	0	0	-1	0	8123	1,50	5,46	42
12	0	0	0	-1	8503	2,00	6,93	27
13	0	0	0	1	8686	1,59	5,33	33
14	0	0	1	0	3671	2,46	6,04	28
15	0	1	0	0	8086	1,95	6,26	29
16	1	-1	-1	-1	8655	1,93	6,62	46
17	1	-1	-1	1	6405	1,68	5,31	54
18	1	-1	1	-1	7038	2,10	6,68	35
19	1	-1	1	1	8204	1,69	5,18	43
20	1	0	0	0	5598	2,37	6,43	39
21	1	1	-1	-1	7967	2,14	7,11	44
22	1	1	-1	1	5395	1,94	5,54	52
23	1	1	1	-1	5798	2,65	7,70	33
24	1	1	1	1	5946	2,23	5,84	41
25	0	0	0	0	5086	2,13	6,08	31
26	0	0	0	0	5908	2,05	6,07	31
27	0	0	0	0	6802	1,88	6,09	30

Aus den Daten werden die Effekte und die Interaktionen ermittelt und statistisch auf Signifikanz überprüft. Tab. 4.6 zeigt statistische Auswertung der Effekte und der Interaktionen.

**Tab. 4.6** Haupteffekte und deren Interaktionen

Variable	Peakfläche	Auflösung	Zeit (min)	Stromstärke ( $\mu\text{A}$ )
Puffer ( $X_1$ )	+++	+++	+++	+++
M- $\beta$ CD ( $X_2$ )	---	+++	+++	---
pH-Wert ( $X_3$ )	---	+++	+++	---
Temperatur ( $X_4$ )	--	---	---	+++
$X_{11}$	---	ns	--	---
$X_1X_2$	ns	ns	ns	-
$X_1X_3$	+++	---	ns	+++
$X_1X_4$	ns	ns	---	+++
$X_{22}$	ns	ns	ns	ns
$X_2X_3$	--	++	+++	ns
$X_2X_4$	---	+	---	ns
$X_{33}$	ns	ns	---	+++
$X_3X_4$	+++	---	--	---
$X_{44}$	+++	---	+++	ns

(+): positiver Effekt; (-) : negativer Effekt; (ns): nicht signifikant

Signifikanz-Niveaus:

P-Werte	negativer Effekt	positiver Effekt
$\geq 0,05$	ns	ns
$[0,01 - 0,05]$	-	+
$[0,001 - 0,01]$	--	++
$< 0,001$	---	+++

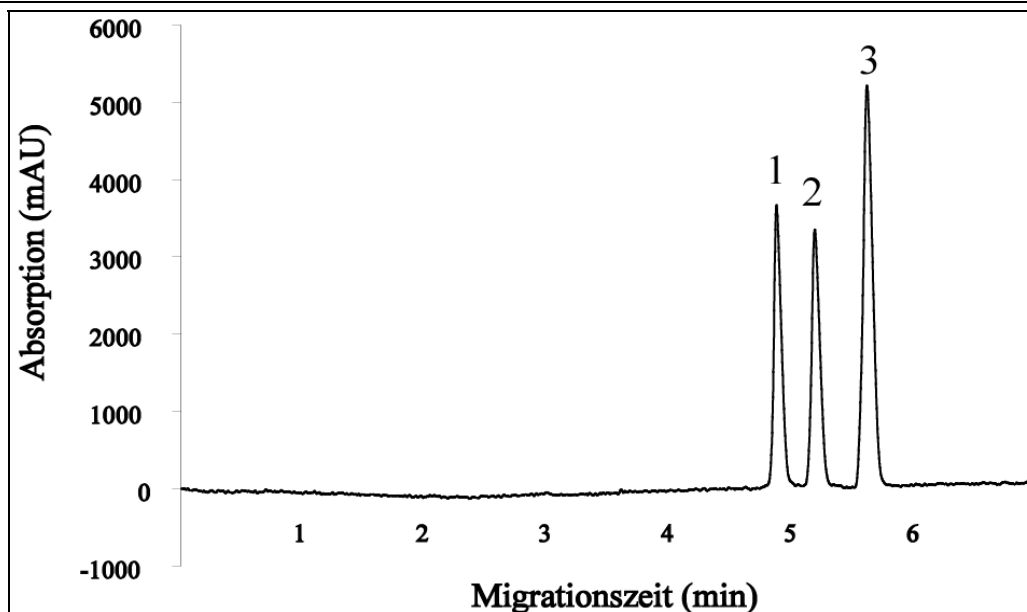
Die Zielgrößen lassen sich mittels folgender Gleichung berechnen:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{34} X_3 X_4 + \beta_{44} X_4^2$$

Ein typisches Elektropherogramm für die Trennung der beiden Enantiomeren von Ofloxacin unter den gewählten Versuchsbedingungen (Optimum) zeigt *Abb. 4. 10*.

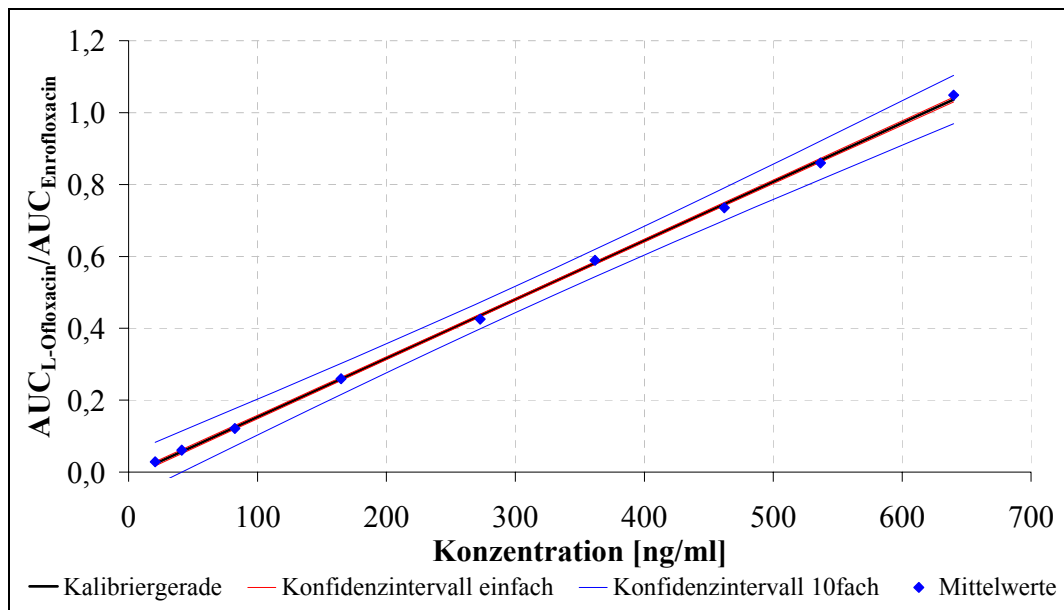
**Tab. 4.7** *Ermittelte Regressionskoeffizienten für die ausgewählten Zielgrößen.*

Koeffizient	Peakfläche	Auflösung	Migrationszeit (min)	Stromstärke ( $\mu\text{A}$ )
$\beta_0$	6503,47	1,988	6,009	30,113
$\beta_1$	511,54	0,348	0,527	8,500
$\beta_2$	-312,26	0,182	0,296	-0,726
$\beta_3$	-1177,66	0,328	0,134	-7,395
$\beta_4$	-250,95	-0,146	-0,712	3,243
$\beta_{11}$	-1291,99	-0,046	-0,128	-0,886
$\beta_{12}$	-170,37	-0,001	0,015	-0,203
$\beta_{13}$	866,01	-0,187	-0,013	1,992
$\beta_{14}$	-144,78	-0,020	-0,080	0,798
$\beta_{22}$	275,96	-0,070	-0,088	0,200
$\beta_{23}$	-352,57	0,060	0,099	-0,041
$\beta_{24}$	-44,734	0,042	-0,055	-0,144
$\beta_{33}$	-892,28	0,009	-0,228	5,330
$\beta_{34}$	709,55	-0,074	-0,044	-0,323
$\beta_{44}$	1804,97	-0,175	0,158	0,447



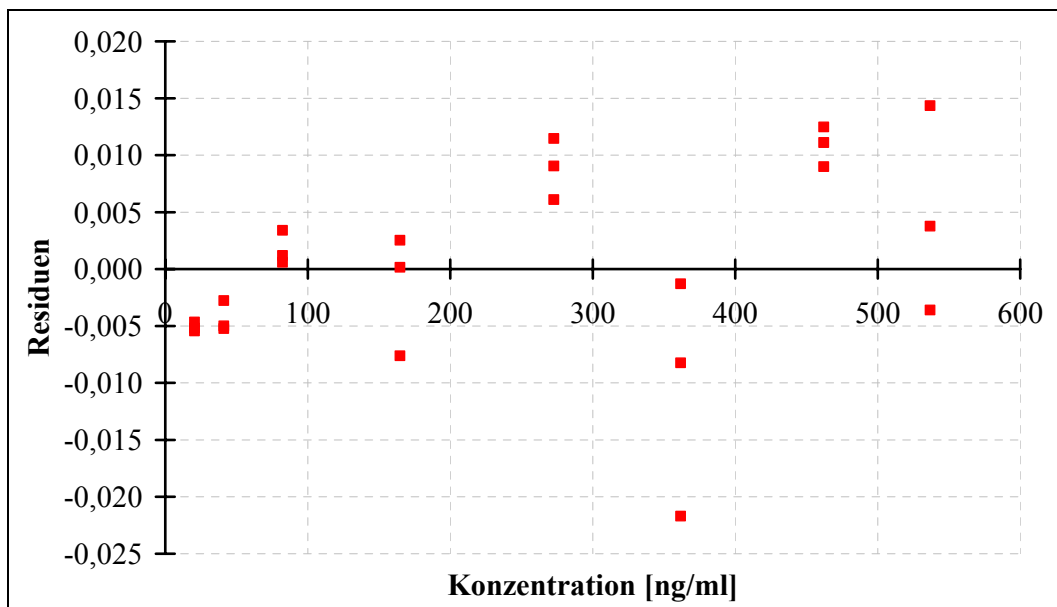
**Abb. 4.10** *Elektropherogramm der Ofloxacin-Enantiomere*  
 1: L-Ofloxacin; 2: D-Ofloxacin; 3: Enrofloxacin

Nach Ermittlung der optimalen Bedingungen, wird die Methode kalibriert und validiert. Die Daten der Kalibriergerade für L- und D-Ofloxacin sind in *Tab. 4.8* zusammengestellt.



**Abb. 4.11** Kalibriergerade für L-Ofloxacin ( $n = 3$ )

Unter den gewählten Versuchsbedingungen erwies sich die Beziehung zwischen Konzentration und Absorption für beide Enantiomeren als linear (*Abb. 4.11* und *Abb. 4.13*).



**Abb. 4.12** Residuen-Diagramm für L-Ofloxacin ( $n = 3$ )

Ein Trend innerhalb der Residuen ist weder bei L-Ofloxacin (Abb. 4.12) noch bei D-Ofloxacin (Abb. 4.14) zu erkennen. Die Daten der Methodenpräzision für L-Ofloxacin sind in Tab. 8.10 und für D-Ofloxacin in Tab. 8.11 (Anhang) zusammengefasst. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wird bei 6 verschiedenen Konzentrationen das Verhältnis der Peakfläche der extrahierten Proben zur Peakfläche der jeweiligen Stammlösung ermittelt. Die Wiederfindungsrate liegt bei 92 %.

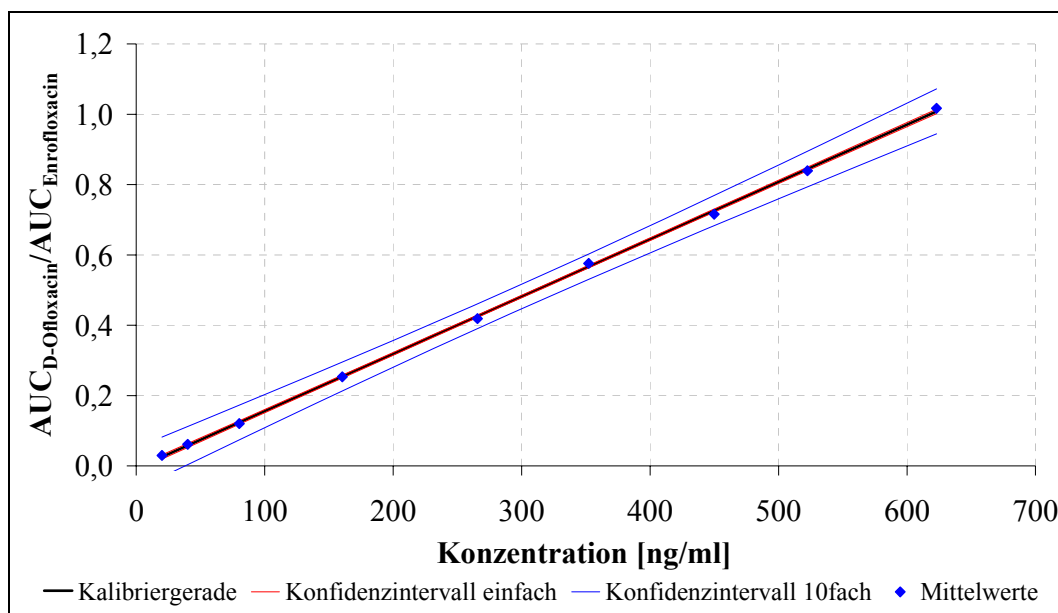


Abb. 4.13 Kalibriergerade für D-Ofloxacin ( $n = 3$ )

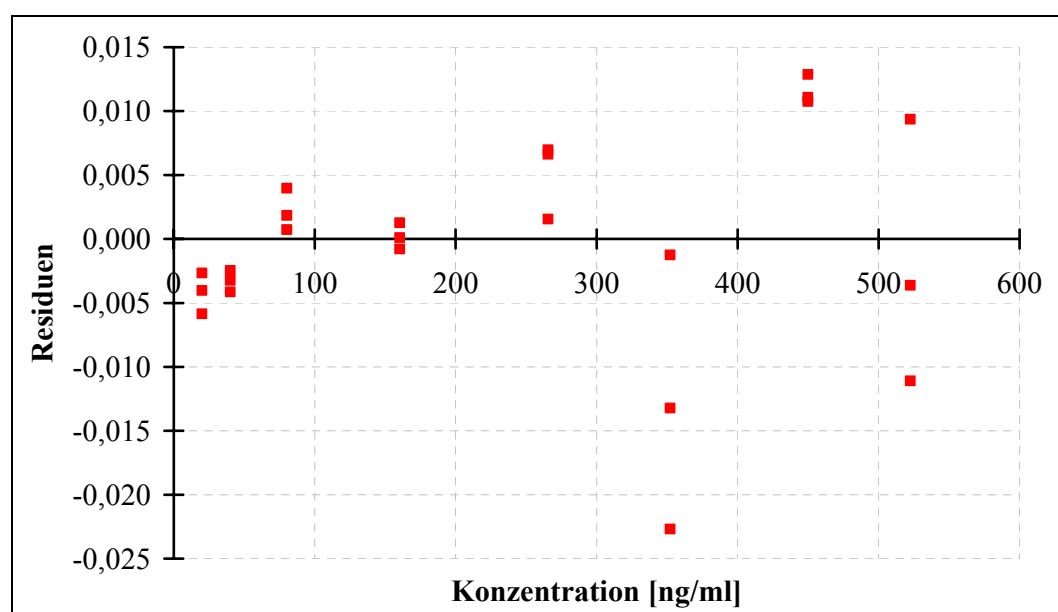


Abb. 4.14 Residuen-Diagramm für D-Ofloxacin ( $n = 3$ )

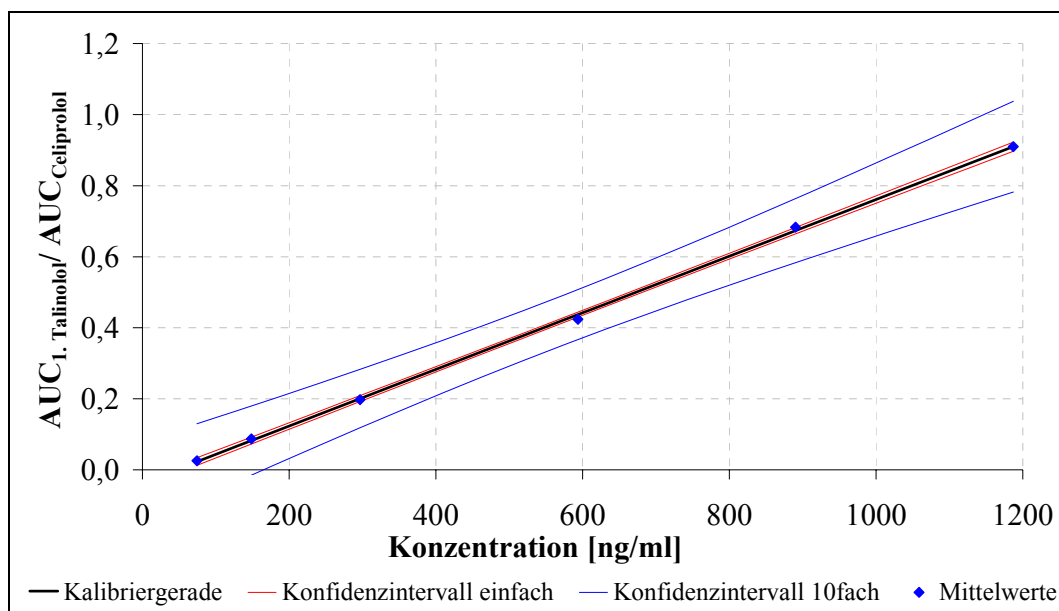
**Tab. 4.8** Kalibrierparameter von L- und D-Ofloxacin

	L-Ofloxacin	D-Ofloxacin
Modell	$y(x) = b1 (x - E[xc]) + E[yc]$	$y(x) = b1 (x - E[xc]) + E[yc]$
Messbereich [mg/ml]	20,59 - 639,9 [ng/ml]	20,05 - 623,0 [ng/ml]
Anzahl Kalibrierproben	27	27
Anzahl Freiheitsgrade	25	25
Kalibrierfunktion	$y(x) = 0,002 [x - 302,7] + 0,485$	$y(x) = 0,002 [x - 294,7] + 0,473$
Korrelationskoeffizient	0,9997	0,9997
Steigung/Empfindlichkeit	0,0016	0,0016
Nachweisgrenze	3,82 [ng/ml]	3,64 [ng/ml]
Bestimmungsgrenze	12,72 [ng/ml]	12,14 [ng/ml]
Datenschwerpunkte	$E[xc] = 302,75$ [ng/ml] $E[yc] = 0,485$ [AUC]	$E[xc] = 294,74$ [ng/ml] $E[yc] = 0,473$ [AUC]
Vertrauensbereich der Kalibrierfunktion	$y(x) \pm 2,26 \cdot 10^{-5} (2,63 \cdot 10^{-5} + [x - 0,303]^2 / 1,82 \cdot 10^3)^{0,5}$	$y(x) \pm 2,15 \cdot 10^{-5} (2,63 \cdot 10^{-5} + [x - 0,295]^2 / 1,73 \cdot 10^3)^{0,5}$

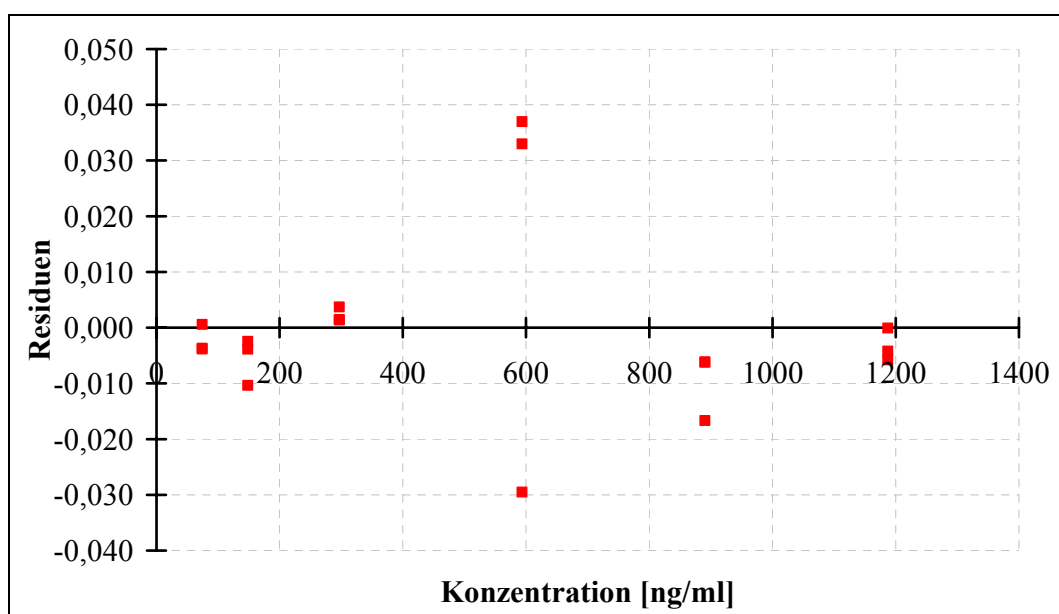
#### 4.1.1.5 Analytik von Talinolol

Eine stereoselektive Trennung von Talinolol-Enantiomeren mittels der Kapillarelektrophorese ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. Zur Entwicklung einer analytischen Methode wird eine Versuchsreihe mit verschiedenen chiralen Selektoren bei verschiedenen pH-Werten und verschiedenen Elektrolyt-Konzentrationen durchgeführt. Folgende chirale Selektoren werden in die Versuche einbezogen:  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, DM- $\beta$ -CD, S- $\beta$ -CD, HDMAS- $\beta$ -CD, HS- $\beta$ -CD und HDAS- $\beta$ -CD. Eine Trennung kann mit S- $\beta$ -CD, HS- $\beta$ -CD, HDMAS  $\beta$ -CD und HDAS- $\beta$ -CD erzielt werden. Bei der Trennung unter Einsatz von S  $\beta$ -CD oder HS  $\beta$ -CD ist die Migrationszeit von der Konzentration an chiralem Selektor stark abhängig. Eine sehr starke Asymmetrie der Peaks (Tailing) ist zu beobachten. Eine sehr gute Trennung kann unter Einsatz von 3 mM HDAS- $\beta$ -CD in 100 mM Phosphatpuffer (pH 3,5) erzielt werden. Aufgrund der nicht zufriedenstellenden Ergebnisse für alle chiralen Selektoren, ausgenommen HDAS- $\beta$ -CD, wurde in den folgenden Versuchen nur HDAS- $\beta$ -CD verwendet. Die ausgewählten Bedingungen

sind im Abschnitt 3.2.3.4 aufgeführt. Da keines der reinen Enantiomeren zur Verfügung steht, können die Peaks der Talinolol-Enantiomeren nicht den R- und S-Formen zugeordnet werden. Somit werden hier nur die Begriffe „1. und 2. Peak des Talinolols“ verwendet.



**Abb. 4.15** Kalibriergerade für das 1. Talinolol-Enantiomer ( $n = 3$ )

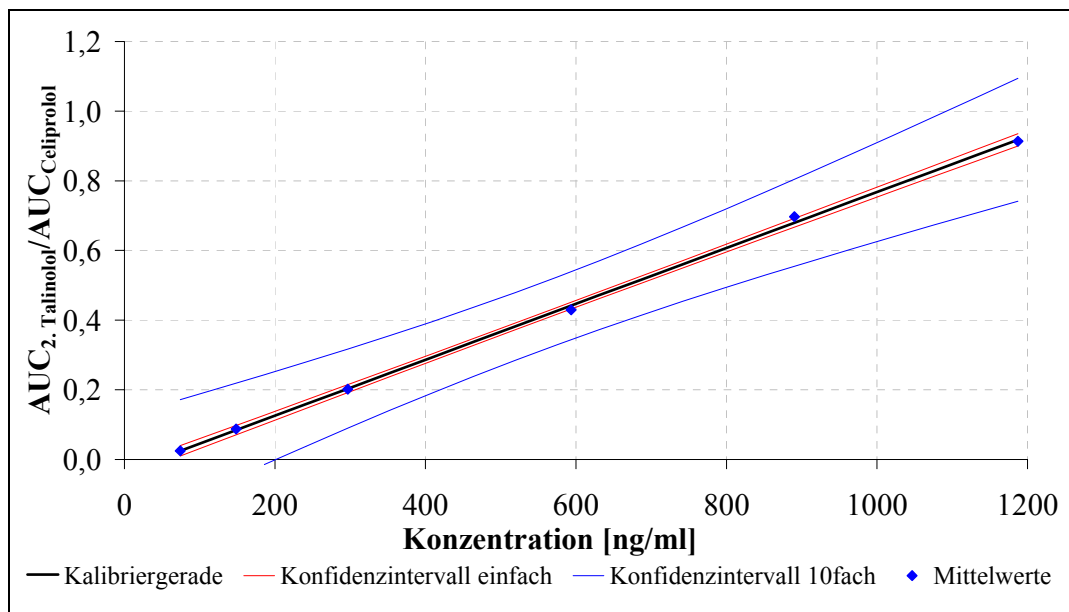


**Abb. 4.16** Residuen-Diagramm für das 1. Talinolol-Enantiomer ( $n = 3$ )

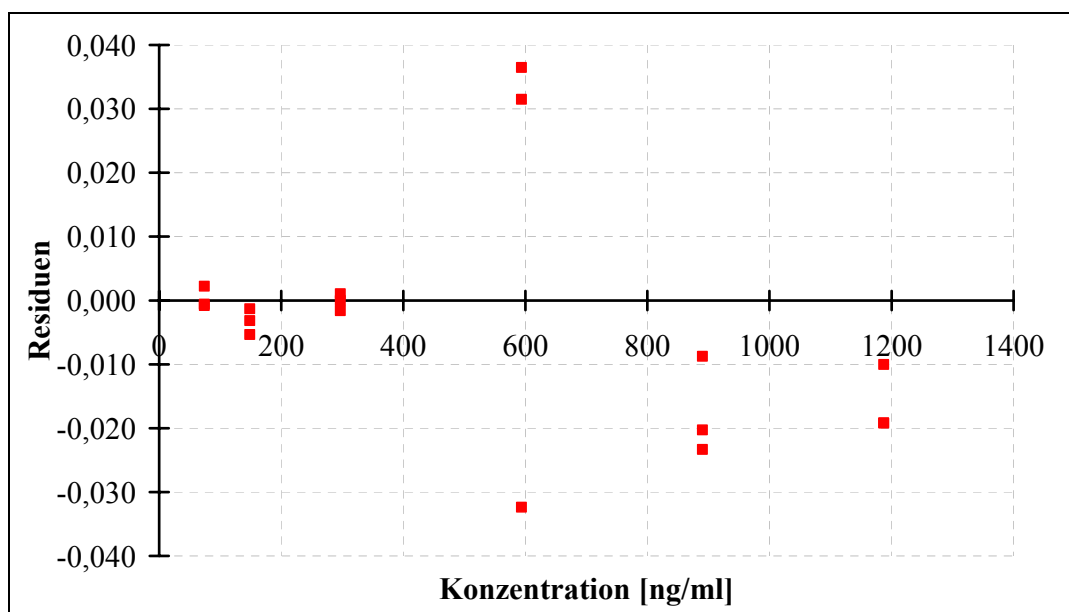
Im Kalibrierungsbereich erwies sich die Beziehung zwischen Konzentration und Absorption sowohl für 1. Talinolol (Abb. 4.15) als auch für 2. Talinolol (Abb. 4.17) als linear.



Die Parameter der Kalibrierung sind in *Tab. 4.9* zusammengefasst. Die Daten der Methodenpräzision sind in *Tab. 8.14* für das 1. Talinolol-Enantiomer und in *Tab. 8.15* für das 2. Talinolol-Enantiomer angegeben. Ein typisches Elektropherogramm zeigt *Abb. 4.19*.



**Abb. 4.17** Kalibriergerade für das 2. Talinolol-Enantiomer ( $n = 3$ )

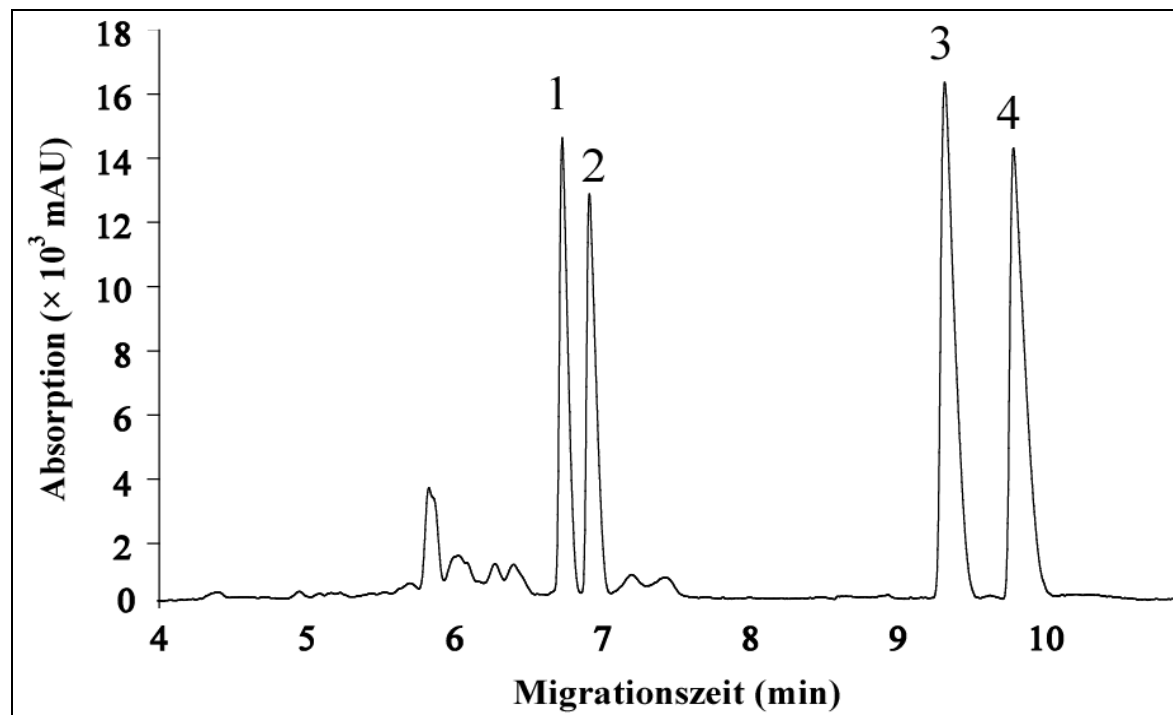


**Abb. 4.18** Residuen-Diagramm für das 2. Talinolol-Enantiomer ( $n = 3$ )

Ein Trend innerhalb der Residuen ist weder für 1. Talinolol noch für 2. Talinolol zu erkennen (*Abb. 4.16* und *Abb. 4.18*).

**Tab. 4.9** Kalibrierungsparameter für Talinololenantiomeren

	1. Enantiomer	2. Enantiomer
Modell	$y(x) = b1 (x - E[xc]) + E[yc]$	$y(x) = b1 (x - E[xc]) + E[yc]$
Messbereich [mg/ml]	74,2 - 1187,18 [ng/ml]	74,2 - 1187,18 [ng/ml]
Anzahl Kalibrierproben	23	23
Anzahl Freiheitsgrade	21	21
Kalibrierfunktion	$y(x) = 0,001 [x - 551,646] + 0,404$	$y(x) = 0,001 [x - 551,646] + 0,408$
Korrelationskoeffizient	0,9992	0,9985
Steigung/Empfindlichkeit	0,0008	0,0008
Nachweisgrenze	14,57 [ng/ml]	17 [ng/ml]
Bestimmungsgrenze	48,58 [ng/ml]	56,68 [ng/ml]
Datenschwerpunkte	$E[xc] = 551,65$ [ng/ml] $E[yc] = 0,404$ [AUC]	$E[xc] = 551,65$ [ng/ml] $E[yc] = 0,408$ [AUC]
Vertrauensbereich der Kalibrierfunktion	$y(x) \pm 3,36 \cdot 10^{-5} (4,35 \cdot 10^{-5} + [x - 5,52]^2 / 4,03 \cdot 10^3)^{0,5}$	$y(x) \pm 4,65 \cdot 10^{-5} (4,35 \cdot 10^{-5} + [x - 5,52]^2 / 4,03 \cdot 10^3)^{0,5}$

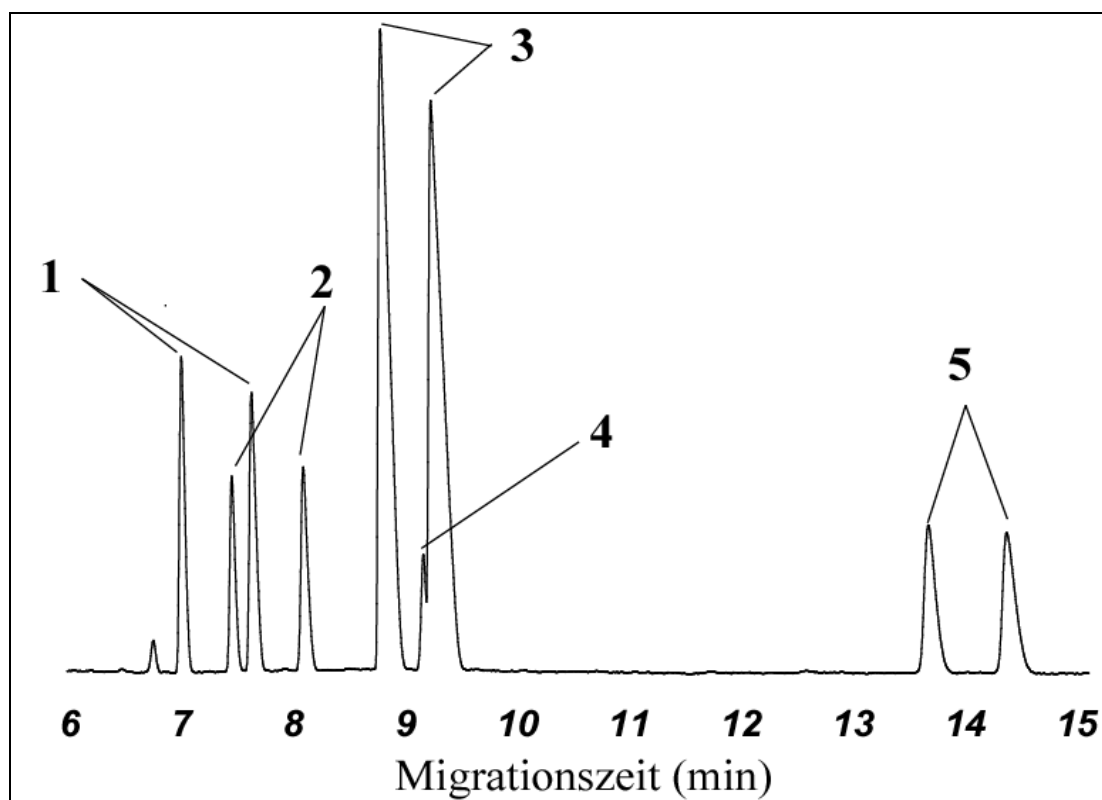
**Abb. 4.19** Typischer Elektropherogramm einer Probe.

1, 2: Celiprolol; 3, 4: Talinolol

#### 4.1.1.6 Enantiomerentrennung verschiedener $\beta$ -Blocker mittels HDAS- $\beta$ -CD

Neben der stereoselektiven Trennung von Talinolol kann mit dieser Methode auch die Enantiomeren-Trennung anderer  $\beta$ -Blocker erzielt werden. Dabei wird eine Kapillare mit einer Länge von 37 cm verwendet, die Spannung liegt bei 20 kV. Eine Basislinien-Enantiomerentrennung kann für folgende Substanzen erzielt werden: Atenolol, Alprenolol, Bisoprolol, Celiprolol, Metipranolol, Oxprenolol und Sotalol. Unter diesen Bedingungen können folgende Substanzen jedoch nicht getrennt werden: Bupranolol, Esmolol, Penbutolol, Pindolol und Timolol. *Abb. 4.20*

zeigt ein typisches Elektropherogramm eines  $\beta$ -Blocker-Gemischs unter den oben angegebenen Bedingungen. *Abb. 4.21* zeigt die einzelnen Elektropherogramme der verschiedenen  $\beta$ -Blocker. Das Metipranolol-Elektropherogramm (\*) ist bei 15 kV und mit einer 27 cm langen Kapillare aufgenommen.



*Abb. 4.20* Elektropherogramm eines Gemischs von  $\beta$ -Blockern.

1: Oxprenolol; 2: Sotalol; 3: Bisoprolol; 4: Celiprolol; 5: Talinolol.

Versuchs-Bedingungen: 37 cm PVA-Kapillare; 20 kV; 3 mM HDAS- $\beta$ -CD in 100 mM Phosphatpuffer pH 3,5.

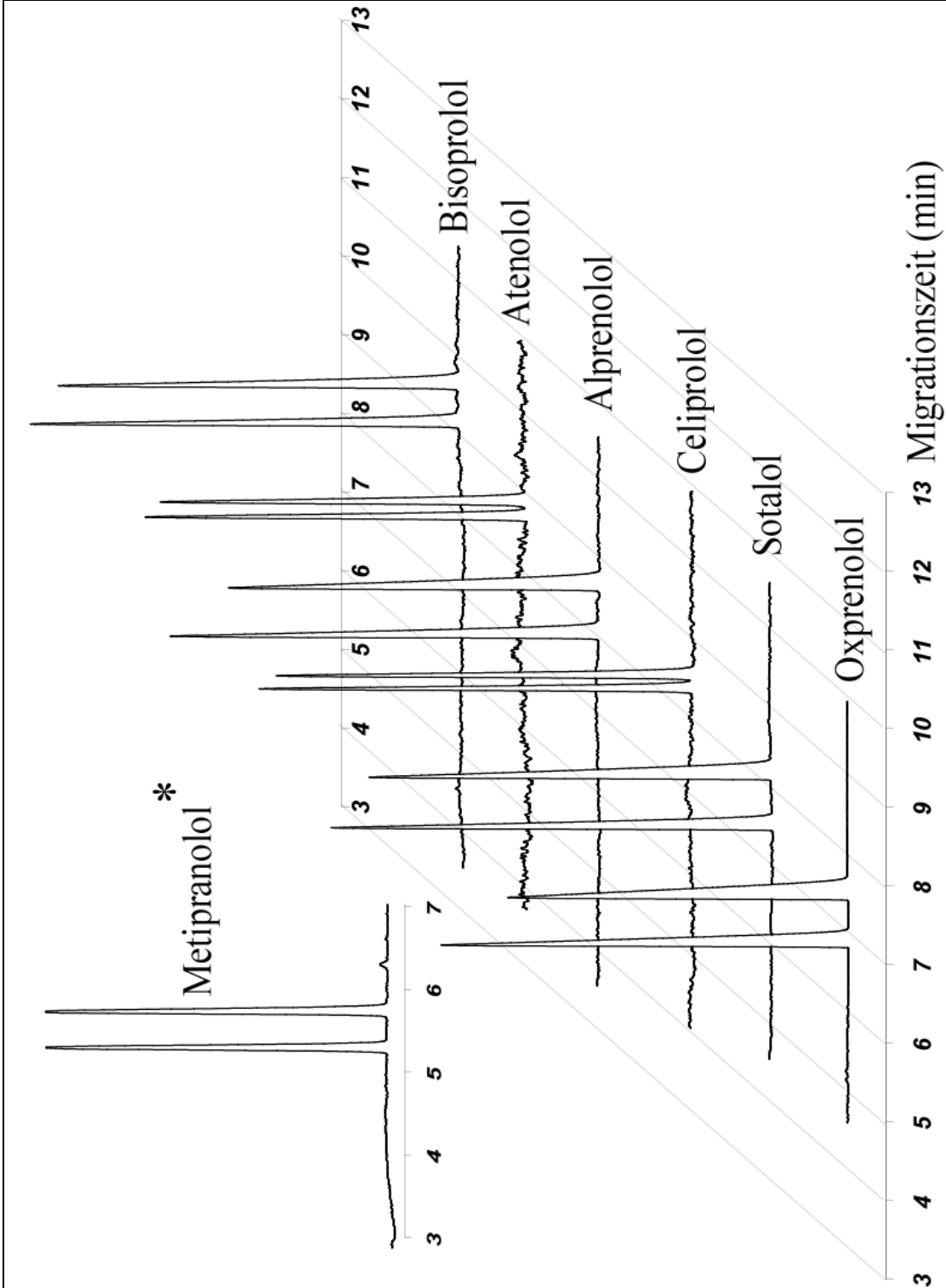


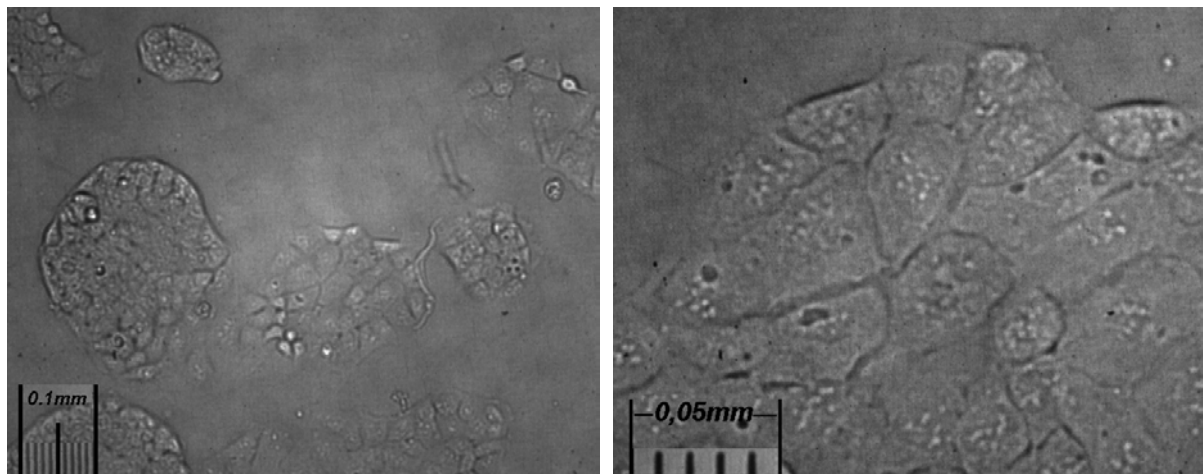
Abb. 4.21 Enantiomerenentrennung verschiedener  $\beta$ -Blocker mittels HDAS- $\beta$ -CD

## 4.1.2 Zellkultur und Resorptionsversuche

Um die Caco-2/TC-7-Zellen als intestinales Transportmodell verwenden zu können, müssen die Zellkultur morphologisch charakterisiert und die Permeationen bestimmter Markersubstanzen untersucht werden.

### 4.1.2.1 Morphologie

Zum Zweck der morphologischen Charakterisierung wird überprüft, wie sich die Zellen sowohl in der Kulturflasche als auch in Transwells<sup>®</sup> für die Resorptionsversuche entwickeln. Wenige Tage nach der Zellaussaat ist die Bildung einzelner Zellinseln in Kulturflaschen und Transwells<sup>®</sup> zu beobachten (*Abb. 4.22*).



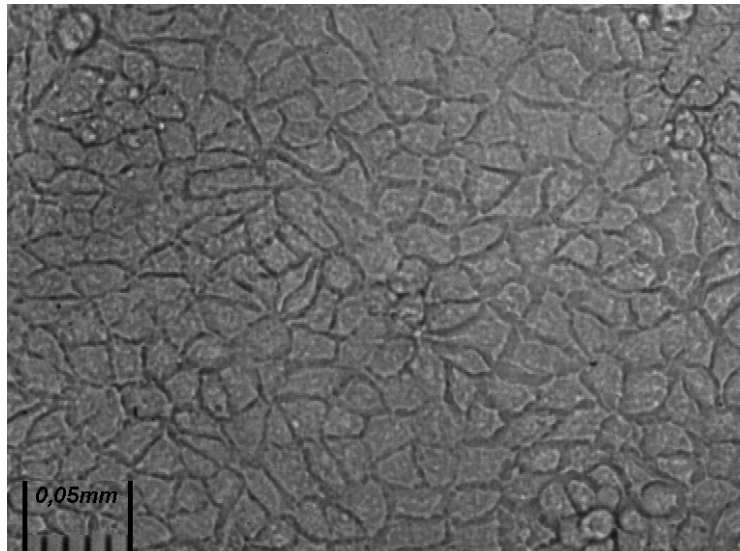
A

B

*Abb. 4.22* Mikroskopische Aufnahme von Caco-2 Zellen, 4 Tage nach der Aussaat (Vergrößerung A:  $16 \times 10$ ; B:  $16 \times 40$ )

Nach ca. einer Woche Kultivierungsdauer bilden die Zellen einen konfluenten Zellmonolayer. Zu diesem Zeitpunkt ist die gesamte Kulturflasche mit einer Zellschicht bedeckt und die Proliferationsphase somit beendet (*Abb. 4.23*).

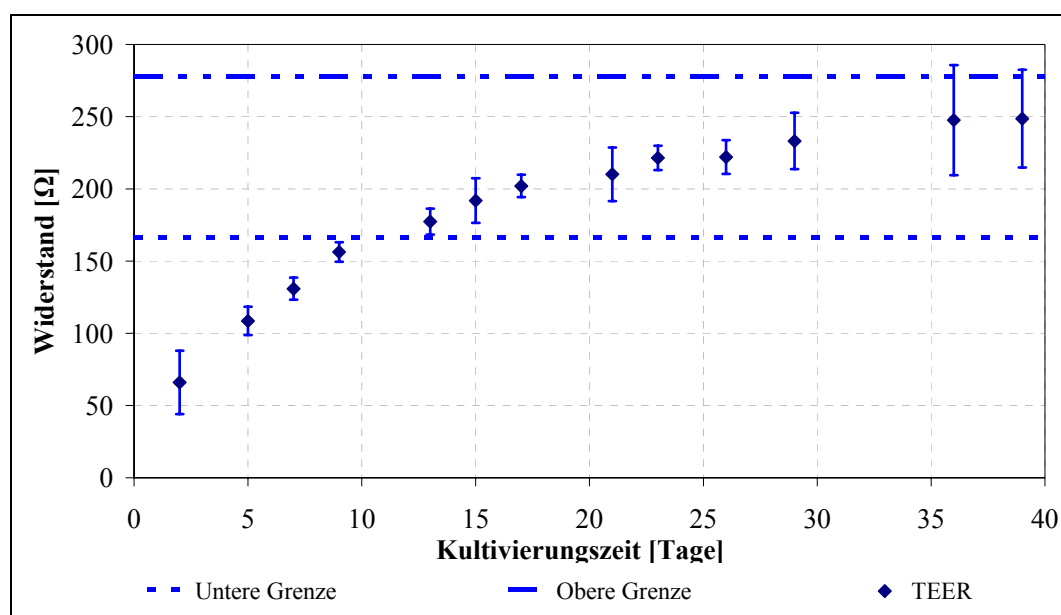
Neben der morphologischen Charakterisierung wird die TEER-Messung und die Bestimmung der Permeation von Fluorescein-Na zur Untersuchung der Integrität der verwendeten Zell-Monolayer herangezogen. Darüber hinaus wird die Funktionsfähigkeit und Eignung des Modells durch Bestimmung der Permeationen von Propranolol und Ibuprofen überprüft.



**Abb. 4.23** Mikroskopische Aufnahme eines konfluenten Caco-2-Zell-Monolayers, 8 Tage nach der Aussaat. (Vergrößerung  $10 \times 40$ ).

#### 4.1.2.2 Transepithelial elektrischer Widerstand (TEER) als Integritätsmarker

Innerhalb der ersten zwei Wochen steigt der TEER steil an und flacht anschließend ab (Abb. 4.24).



**Abb. 4.24** Typischer Verlauf des effektiven TEER während eine Kultivierungszeit von 40 Tage ( $n = 6$ , aufeinander folgende Passagen)

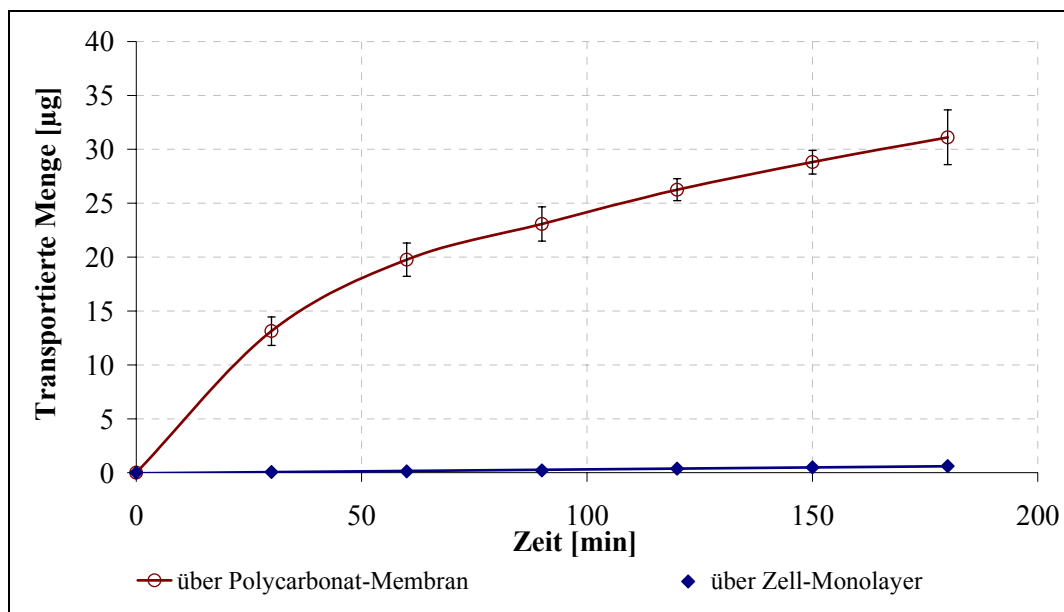
Der TEER wurde als Auswahlkriterium für die Zellmonolayer eingesetzt. So wurden nur solche Transwell<sup>®</sup> für Permeationsversuche herangezogen, welche

einen TEER-Wert zwischen der oberen und unteren Grenze zeigten. Der Toleranzbereich wurde wie folgt bestimmt:

Arithemischer Mittelwert für die Zeit 20. bis 36. Tag  $\pm 25\%$  dieses Wertes.

#### 4.1.2.3 Integritätsbestimmung mittels Fluorescein-Na

Parallel zu den Permeationsversuchen werden Versuche zur Überprüfung der Dichtigkeit des Zell-Monolayers durchgeführt. Nach Durchführung der einzelnen Versuche wird die jeweilige Probe gegen eine Fluorescein-Na-Lösung (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ausgetauscht und damit die Dichtigkeit des verwendeten Zell-Monolayers untersucht. Fluorescein-Na passiert in neutralem Milieu den Zell-Monolayer ausschließlich passiv auf parazellulärem Weg. Fluorescein-Na hat sich daher als Marker für die Überprüfung der Dichtigkeit der Zwischenzellräume etabliert (Wilson et al. 1990).



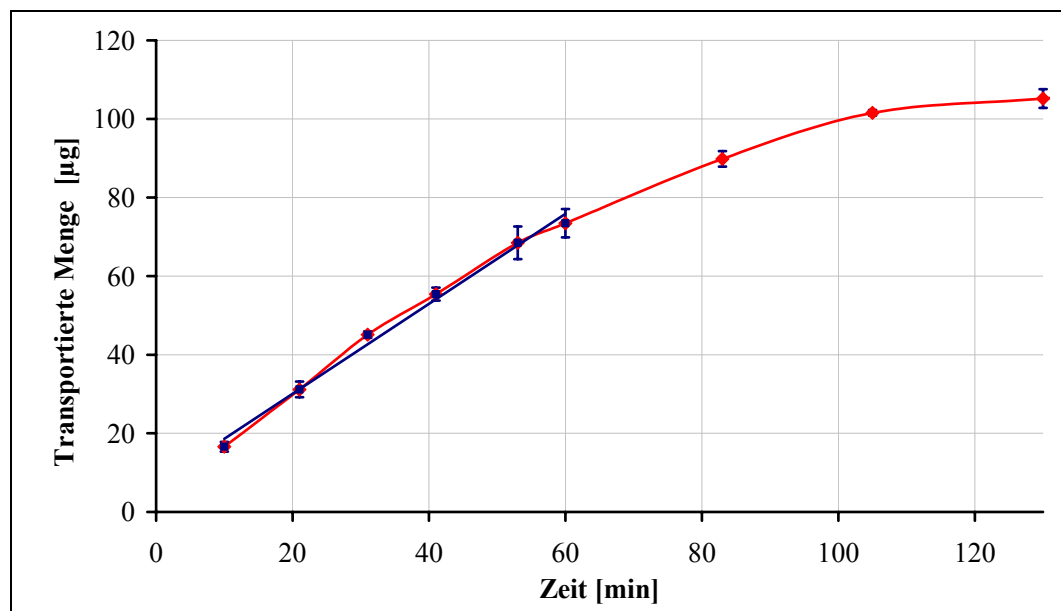
**Abb. 4.25** Integritätsprüfung mittels Fluorescein-Na. Polycarbonat-Membran  $n = 3$ ; Zell-Monolayer  $n = 6$

Der scheinbare Permeationskoeffizient für die Zell-Monolayer wird aus 6 Versuchen zu  $8,89 \pm 0,73 \times 10^{-7} \text{ 1}/\text{cm}^2$  bestimmt. Die Permeation durch eine Polycarbonat-Membran (Leeres Transwell) beträgt  $6,34 \pm 0,46 \cdot 10^{-5} \text{ cm}/\text{s}$  ( $n = 3$ ). Der Permeationskurvenverlauf von Fluorescein-Na über die Polycarbonat-Membran

beginnt steil und flacht sehr schnell ab. Nach 60 min sind jedoch keine Sink-Bedingungen mehr gegeben. Deswegen werden zur Ermittlung des Permeationskoeffizienten an der Polycarbonat-Membran nur die ersten 3 Punkte für die Berechnung der Regressionsgeraden verwendet.

#### 4.1.2.4 Ermittlung des Permeationskoeffizienten für Propranolol

Propranolol, eine passiv transzellulär permeierende Substanz, zeigt bei diesen Versuchen einen hohen Permeationskoeffizienten. Aus dem linearen Bereich (10 – 60 min) kann eine Regression berechnet und daraus ein Permeationskoeffizient von  $52,0,1 \pm 1,43 \cdot 10^{-6}$  cm/s ermittelt werden. *Abb. 4.26* zeigt die durch den Zell-Monolayer kumulativ transportierte Menge an Propranolol.



*Abb. 4.26* Kumulative Menge an Propranolol, die durch den Caco-2/TC-7-Zell-Monolayer transportiert wird, (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 3$ )

### 4.1.3 Ergebnisse der Resorptionsversuche

#### 4.1.3.1 Ibuprofen

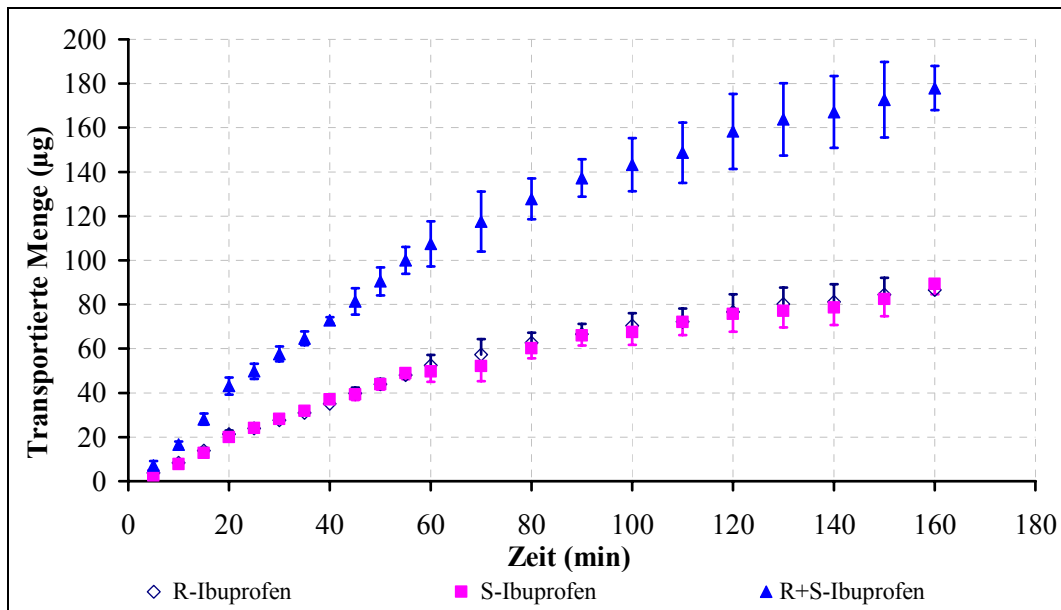
Es werden die Enantiomeren von Ibuprofen zur Untersuchung der Stereoselektivität der Resorption am Caco-2/TC-7-Zellmodell herangezogen. Die Versuche zeigen keine stereoselektive Diskriminierung der Resorption. Dies ist auf den rein passiv verlaufenden Transport zurückzuführen. Die Berechnung der Permeationskoeffizienten erfolgt aus dem Kurvenabschnitt in der Zeit 5 – 60 min.



R- und S- Ibuprofen werden gleich gut absorbiert (Tab. 4.10).

**Tab. 4.10** Mittlere Permeationskoeffizienten von Ibuprofen ( $\times 10^{-6}$  cm/s)

R-Ibuprofen	S-Ibuprofen	Racemat
$57,3 \pm 2,9$	$57,2 \pm 2,8$	$57,3 \pm 2,9$



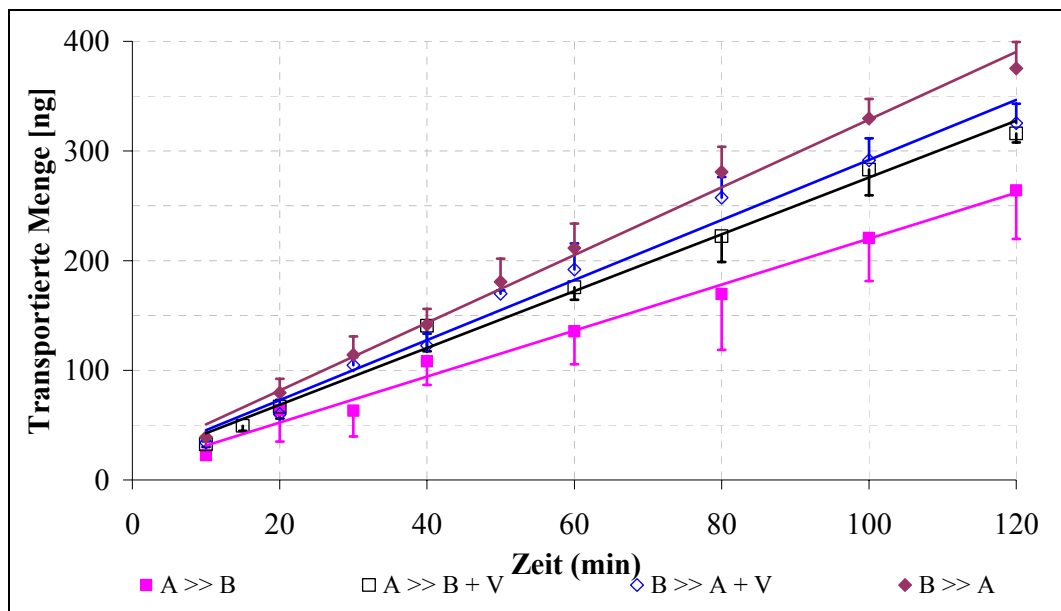
**Abb. 4.27** Kumulative Menge an racemischem Ibuprofen im basolateralen Kompartiment, (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 3$ )

#### 4.1.3.2 Ofloxacin

Zur Untersuchung der Sekretion und des Einflusses der Transportrichtung auf die Permeation werden die Versuche in 4 Gruppen eingeteilt. Die Permeation von Ofloxacin ist in der apikal-basolateralen Richtung am geringsten, lässt sich aber durch Zusatz von Verapamil steigern (Abb. 4.28). Die höchste Permeation ist in der basolateral-apikalen Richtung zu finden, die sich bei Zugabe von Verapamil verringert.

**Tab. 4.11** Permeationskoeffizienten von Ofloxacin-Enantiomeren ( $\times 10^{-6}$  cm/s)

Versuchsgruppe apikal zu basolateral (A >> B)		Versuchsgruppe basolateral zu apikal (B >> A)	
	Mittelwert $\pm$ SD		Mittelwert $\pm$ SD
L-Ofloxacin	4,501 $\pm$ 0,757	L-Ofloxacin	7,030 $\pm$ 0,354
D-Ofloxacin	4,319 $\pm$ 0,658	D-Ofloxacin	6,989 $\pm$ 0,325
L-Ofloxacin + Verapamil	5,517 $\pm$ 0,327	L-Ofloxacin + Verapamil	6,447 $\pm$ 0,308
D-Ofloxacin + Verapamil	5,274 $\pm$ 0,242	D-Ofloxacin + Verapamil	6,343 $\pm$ 0,173



**Abb. 4.28** Transportierte Menge an racemischem Ofloxacin. A >> B: Apikal zu Basolateral; B >> A: Basolateral zu Apikal; V: unter Zusatz von Verapamil, (Mittelwert  $\pm$  SD, n = 5)

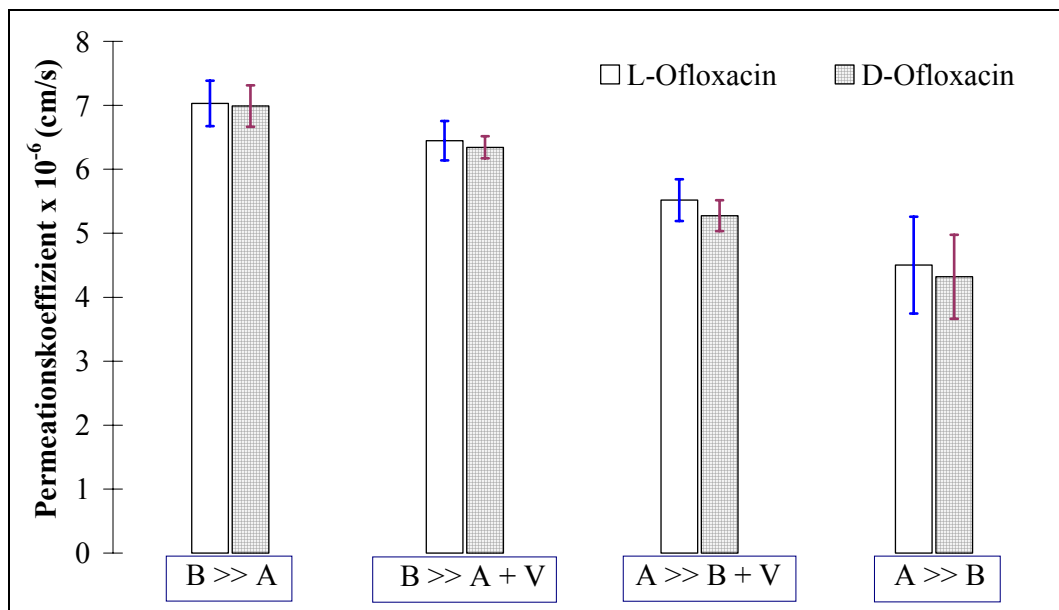
Abb. 4.29 zeigt die Permeationskoeffizienten der einzelnen Enantiomeren einander gegenüber gestellt. Eine stereoselektive Diskriminierung ist daher nicht zu erkennen.

**Tab. 4.12** Vergleich der Permeationskoeffizienten der Ofloxacin-Enantiomeren

Versuchsgruppe Apikal zu Basolateral (A >> B)			Versuchsgruppe Basolateral zu Apikal (B >> A)		
	D-Ofloxacin	L-Ofloxacin + Verapamil		D-Ofloxacin	L-Ofloxacin + Verapamil
L-Ofloxacin	ns	$p < 0,01$	L-Ofloxacin	ns	ns
D-Ofloxacin + Verapamil	$p < 0,05$	ns	D-Ofloxacin + Verapamil	ns	ns

ANOVA, t-Test mit Bonferroni-Korrektur; ns: nicht signifikant

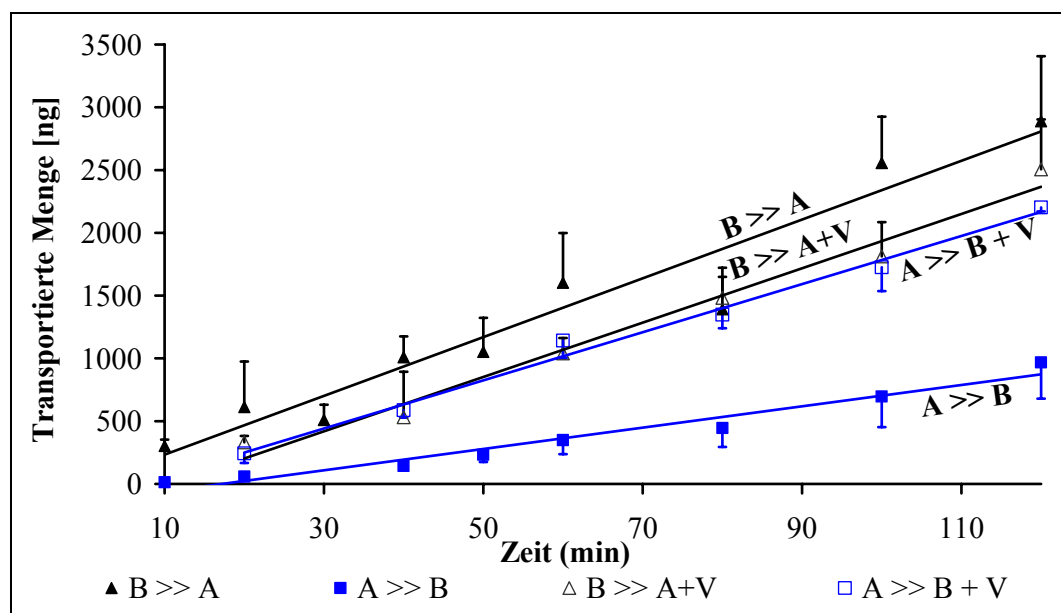
Die Tabelle zeigt, dass in allen Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied zwischen den Permeationskoeffizienten von L- und D-Ofloxacin zu beobachten ist.



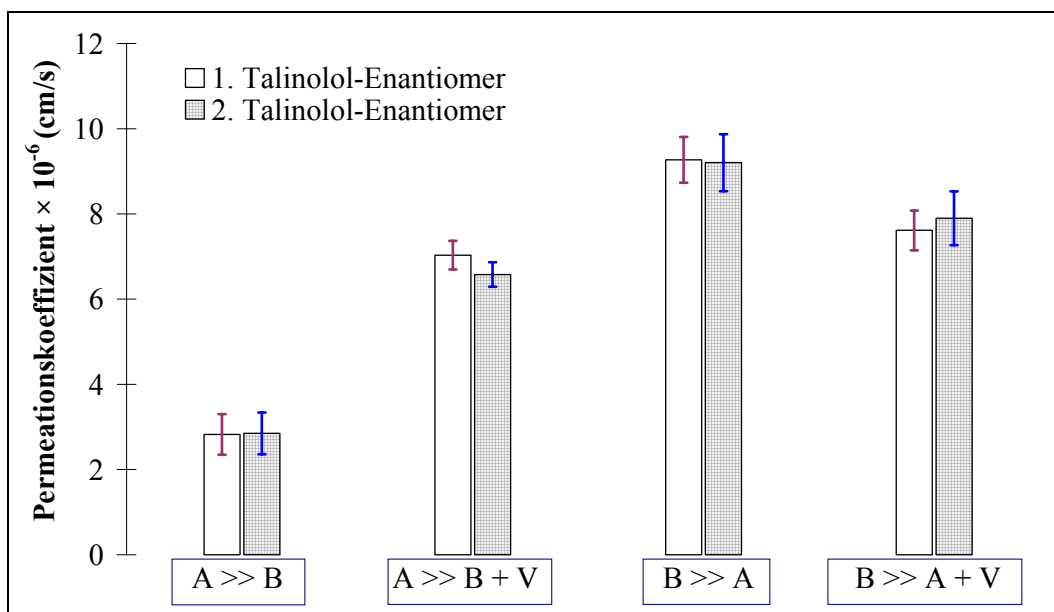
**Abb. 4.29** Permeationskoeffizienten der Ofloxacin-Enantiomeren und der Einfluss von Verapamil auf die Permeation, (Mittelwert ± SD, n = 5)

### 4.1.3.3 Talinolol

Die kumulativ transportierten Mengen an racemischem Talinolol in der apikal-basolateralen Richtung bzw. in der basolateral-apikalen Richtung sind in *Abb. 4.30* dargestellt. Die Permeation in der apikal-basolateralen Richtung ist am geringsten, während die Permeation in der basolateral-apikalen Richtung am höchsten ist. Verapamil hat einen positiven Effekt auf die Resorption. Die Sekretion bzw. die Permeation in der basolateral-apikalen Richtung verringert sich bei Zugabe von Verapamil (*Abb. 4.30*). Die Abbildung zeigt den Einfluss des Verapamils auf die Permeation von Talinolol in beiden Richtungen. *Abb. 4.31* zeigt die mittleren Permeationskoeffizienten der einzelnen Talinolol-Enantiomeren einander gegenübergestellt. Die Permeationskoeffizienten und deren Standardabweichungen sind in *Tab. 4.13* zusammengefasst.



**Abb. 4.30** Transportierte Menge an racemischem Talinolol. A >> B: Apikal zu Basolateral; B >> A: Basolateral zu Apikal; V: unter Zusatz von Verapamil, (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 3$ )



**Abb. 4.31** Permeationskoeffizienten der Ofloxacin-Enantiomeren und der Einfluss von Verapamil auf die Permeation, (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 5$ )

**Tab. 4.13** Permeationskoeffizienten von Talinolol-Enantiomeren ( $\times 10^{-6}$  cm/s)

Versuchsgruppe apikal zu basolateral (A >> B)		Versuchsgruppe basolateral zu apikal (B >> A)	
	Mittelwert $\pm$ SD		Mittelwert $\pm$ SD
1. Talinolol	2,824 $\pm$ 0,476	1. Talinolol	9,27 $\pm$ 0,537
2. Talinolol	2,849 $\pm$ 0,489	2. Talinolol	9,204 $\pm$ 0,668
1. Talinolol + Verapamil	7,033 $\pm$ 0,336	1. Talinolol + Verapamil	7,616 $\pm$ 0,465
2. Talinolol + Verapamil	6,578 $\pm$ 0,287	2. Talinolol + Verapamil	7,901 $\pm$ 0,63

**Tab. 4.14** Vergleich der Permeations-koeffizienten von Talinolol-Enantiomeren.

Versuchsgruppe Apikal zu Basolateral (A >> B)			Versuchsgruppe Basolateral zu Apikal (B >> A)		
	2. Talinolol	1. Talinolol + Verapamil		2. Talinolol	1. Talinolol + Verapamil
1. Talinolol	ns	P < 0,01	1. Talinolol	ns	P < 0,01
2. Talinolol + Verapamil	P < 0,01	ns	2. Talinolol + Verapamil	P < 0,01	ns

ANOVA, t-Test mit Bonferroni-Korrektur; ns: nicht signifikant

# KAPITEL 5

## *DISKUSSION*

### ***5.1 Vorversuche zur Etablierung der humanen***

#### ***Kolonkarzinomzelllinie Caco-2/TC-7***

Um die humane Kolonkarzinomzelllinie Caco-2/TC-7 als intestinales Transportmodell in unserem Labor zu etablieren, mussten Vorversuche zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit und die Eignung dieses Modells durchgeführt werden. Neben der morphologischen Charakterisierung werden die Dichtigkeit des Zell-Monolayers und die Permeation bestimmter Markersubstanzen für den parazellulären und transzellulären Transport untersucht.

##### **5.1.1 Bestimmung des günstigsten Zeitraumes der Permeationsversuche**

Eine Hauptvoraussetzung für die Verwendung von Caco-2/TC-7-Zellmonolayern für Permeationsversuche ist eine sichergestellte Dichtigkeit des Zellrasens. Die Dichtigkeit wird durch Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) mittels einer Volt-Ohm-Meßanordnung (EVOM<sup>®</sup>-Apparatur) überprüft. Der TEER ist nicht nur ein Maß für die Integrität des Zell-Monolayers, sondern spiegelt auch das Wachstum und die Differenzierung der Caco-2/TC-7-Zellen wider. Im Gegensatz zu früheren Arbeiten wurde die TEER-Messung in dieser Arbeit zur Vereinfachung der Durchführung, und um das Kontaminationsrisiko gering zu halten, nach frisch erfolgtem Mediumswechsel direkt im DMEM-Medium vorgenommen.

Als günstigster Zeitraum für die Durchführung der Permeationsversuche wurde daher der Zeitraum vom 21. bis 28. Tag nach der Aussaat ermittelt. In diesem Zeitraum zeigen die kultivierten Zell-Monolayer einen nahezu konstanten transepithelial-elektrischen Widerstand (TEER), der sich im Optimum befindet. Die Zellen bilden nach ca. 1 Woche ein konfluentes Monolayer. Die Tatsache, dass der TEER auch über diesen Zeitraum hinaus ansteigt, weist auf einen

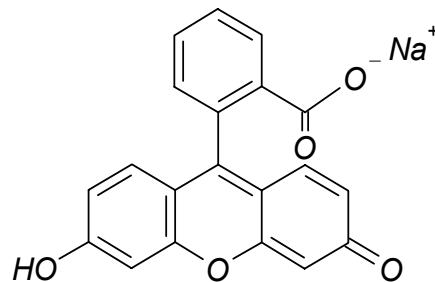
Veränderungsprozess der Zellen hin. In dieser Phase bilden die Zell-Monolayer dichte Zell-Zellverbindungen, sogenannte „tight junctions“ aus.

### 5.1.2 Permeabilität von Markersubstanzen

#### Fluorescein-Natrium

Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung der Permeabilität bzw. der Dichtigkeit eines Zell-Monolayers besteht in Durchführung von Transportversuchen mit Markersubstanzen. In der Literatur sind für diesen Zweck radioaktiv markiertes Mannitol und PEG 4000 beschrieben (*Knipp et al. 1997; Rubas et al. 1995; Cogburn et al. 199, Sulzbacher et al. 1997*). Weitere Möglichkeiten bestehen in der Verwendung von Fluorescein-Na bzw. Rhodamin (*Sulzbacher et al. 1997; Bock et al. 1998*).

Fluorescein-Na (*2-(6-Hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoesäure-Natrium*) als Markersubstanz spiegelt den parazellulären Transport wider.



**Abb. 5.1** Strukturformel von Fluorescein-Na.

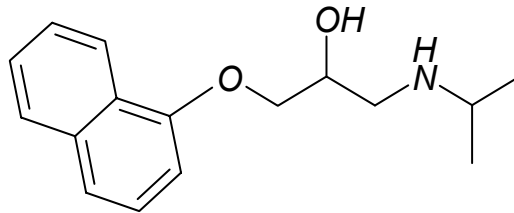
Die Permeationsversuche werden bei einem pH-Wert von 7,4 durchgeführt, da bei niedrigen pH-Werten eine Protonierung der Carboxylgruppe erfolgt, was eine Steigerung der Lipophilie und damit eine Erhöhung der transzellulären Diffusion zur Folge hat.

Der in der vorliegenden Arbeit gefundene Permeationskoeffizient für Fluorescein-Na am Caco-2/TC-7-Zellmodell stimmt mit Angaben in der Literatur weitgehend überein (*Wilson et al. 1990; Lennernas et al. 1996*). Durch die Permeabilitätsbestimmung von Fluorescein-Na und die TEER-Messung ist sichergestellt, dass die Zellmonolayer die erforderliche Dichtigkeit aufweisen, und damit die Bildung der tight junctions belegen.



## Propranolol

Propranolol (1-Isopropylamino-3-(1-naphthoxy)-2-propanol) als stark lipophile Markersubstanz spiegelt den passiven transzellulären Transport wider. Der in unser Labor ermittelte Permeationskoeffizient für Propranolol stimmt mit den Angaben in der Literatur überein (*Sakai et al. 1997; Gres et al. 1998; Artursson 1990; Yee 1997; Yazdanian et al. 1998*).



**Abb. 5.2** Strukturformel von Propranolol

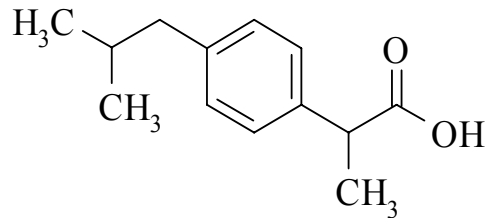
Die Ergebnisse der Transportexperimente von Propranolol bestätigen die Eignung des Caco-2/TC-7-Zellmodells zur Untersuchung des passiv transzellulären Transports.

### 5.2 Stereoselektivität der Resorption

Wie in Kapitel 1 „Einleitung und Zielsetzung“ an verschiedenen Beispielen erläutert, können Enantiomere sowohl pharmakodynamische als auch pharmakokinetische Unterschiede zeigen. Substanzen, welche ausschließlich passiv über die Enterozyten diffundieren, zeigen keine stereoselektive Resorption. Eine stereoselektive Diskriminierung kann erst dann auftreten, wenn an der Resorption ein aktiver Transportmechanismus beteiligt ist. So können *Williams und Lee (1985)* zeigen, dass L-Dopa deutlich schneller aufgenommen wird als D-Dopa. Ähnliches gilt für Methotrexat, bei dem die Bioverfügbarkeit des D-Enantiomers lediglich 2,5 % der des L-Enantiomers beträgt (*Hendel und Brodthagen 1984*). Neben der Resorption spielt der stereoselektive Metabolismus eine wichtige Rolle. Die Enantiomere einer Vielzahl an Arzneistoffe werden qualitativ und/oder quantitativ unterschiedlich metabolisiert, was auf die Asymmetrie innerhalb der Enzyme zurückzuführen ist.

### 5.2.1 Resorption von Ibuprofen

Das Propionsäurederivat Ibuprofen ((*RS*)-2-(4-Isobutylphenyl)-propionsäure), zählt zu den nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR).



**Abb. 5.3** Strukturformel von Ibuprofen

Die Absorption des Racemats erfolgt rasch und praktisch vollständig (Yee 1997; Foransini et al. 1997; Jamali et al. 1988). Ibuprofen unterliegt einer enterohepatischen Zirkulation (Dietzel et al 1990). Es wird nach hepatischer Metabolisierung (Hydroxylierung, Carboxylierung) rasch, hauptsächlich renal (90 %), aber auch biliär eliminiert. Die beiden Hauptmetaboliten (+)-2,4-(2-Hydroxy-2-methyl-propyl)-phenyl-propionsäure und (+)-2,4-(Carboxy-propyl)-phenyl-propionsäure sind pharmakodynamisch inaktiv. Es ist unstrittig, dass S(+)-Ibuprofen primär für die Wirksamkeit verantwortlich ist (Dietzel 1990; Cheng et al. 1994). Den Angaben der FDA-Richtlinie zum biopharmazeutischen Klassifizierungskonzept (BCS) folgend, wird Ibuprofen hinsichtlich seiner Absorption im Gastrointestinaltrakt (FDA Guidline August 2000) der Klasse II des BCSs zugeordnet. Unter Berücksichtigung des BCS Konzepts kann die Löslichkeit von Ibuprofen im Bereich 1 bis 7,4 als schlecht klassifiziert werden. Ibuprofen ist jedoch pH-abhängig löslich, eine Einzeldosis von 800 mg löst sich erst ab pH 6,5 vollständig auf. Die Permeabilität von Ibuprofen ist, wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt, sehr hoch. Der ermittelte Permeationskoeffizient von  $572,7 \pm 28,6 (\times 10^{-7} \text{ cm/s})$  für racem. Ibuprofen stimmt sehr gut mit in der Literatur gefundenen Werte überein (Yee 1997). Ibuprofen wird passiv transzellulär absorbiert (Yee 1997). Eine Untersuchung der Pharmakokinetik der Ibuprofen-Enantiomeren zeigt eine erhöhte Bioverfügbarkeit von S-Ibuprofen gegenüber von R-Ibuprofen (Geisslinger et al. 1990). Eine Bioinversion von R-Ibuprofen zugunsten des S-Enantiomers ist in der Literatur beschrieben, wird jedoch nicht auf eine

präsystemische, sondern auf eine systemische Inversion zurückgeführt (*Cheng et al 1994; Geisslinger et al. 1990*). Die Bioinversion in vivo liegt zwischen 20 und 33 % des R-Enantiomers.

Die Versuche in der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, dass Ibuprofen weder stereoselektiv resorbiert noch stereoselektiv in den Enterozyten metabolisiert wird. Somit ist, wie für einen passiv transzellulären Transport auch nicht anders zu erwarten, eine Enantiomerendiskriminierung hinsichtlich der Absorption ausgeschlossen. Darüber hinaus ist die Bioinversion des R-Enantiomers zum S-Enantiomer am Caco-2/TC-7-Zellmodell, im Gegensatz zum Verhalten in der Leber, nicht zu erkennen.

### **Schlussfolgerung zu den Vorversuchen:**

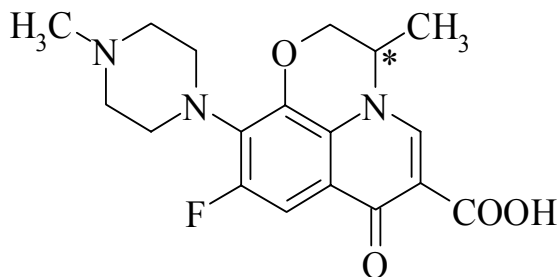
Um eine reproduzierbare Absorptionsbarriere für Transportexperimente von Arzneistoffen zu erreichen, ist es äußerst wichtig, die benutzte Zellkultur ausreichend hinsichtlich der Permeabilität zu untersuchen und regelmäßig zu kontrollieren. Durch die Permeabilität von Fluorescein-Na und die TEER-Messung kann unter geeigneten Bedingungen eine Aussage über die Integrität, also die „Dichtigkeit“ der Zell-Monolayer getroffen werden. Beide Verfahren laufen Hand in Hand, wobei aufgrund der Permeabilitätsdaten jedoch die quantitativ genauere Aussage getroffen werden kann. Die TEER-Messung und die Permeabilitätsbestimmung von Fluorescein-Na zeigen deutlich eine ausreichende Dichtigkeit unseres Modells an.

Die Daten von Propranolol bestätigen in Übereinstimmung mit Literaturangaben die Eignung des Caco-2/TC-7-Zellmodells zur Untersuchung des passiv transzellulären Transports.

Das Caco-2/TC-7-Zellmodell zeigt eine hohe Permeation für Ibuprofen, was auch mit Literaturdaten übereinstimmt. Darüber hinaus ist aufgrund des passiv transzellulären Transports eine stereoselektive Diskriminierung hinsichtlich der Resorption erwartungsgemäß nicht zu beobachten.

### 5.2.2 Resorption von Ofloxacin

Ofloxacin ((±)-9-Fluor-2,3-dihydro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-7H-pyridol[1,2,3-de][1,4]benzoxacin-6-carbonsäure) gehört der Gruppe der Chinoloncarbonsäuren oder kurz „Chinolone“ an. Die Chinolone sind die zurzeit bekanntesten, totalsynthetischen, antibakteriellen Arzneistoffe, die heute sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin eine wichtige Rolle spielen. Alle antibakteriell wirksamen Chinolone besitzen als gemeinsames Merkmal eine Oxogruppe in 7-Stellung und eine Säurefunktion in 6-Stellung. Ofloxacin besitzt ein Fluoratom in 9-Stellung und wird somit den Fluorochinolonen zugeordnet.



**Abb. 5.4** Strukturformel von Ofloxacin; \* chirales Zentrum

Ofloxacin besitzt ein breites Wirkungsspektrum, das neben gramnegativen Bakterien auch grampositive und *Pseudomonas aeruginosa* umfasst. Unter klinischen Gesichtspunkten gehört Ofloxacin der Chinolongruppe IIa an, welche sowohl oral als auch parenteral und bei systemischen Infektionen einsetzbar ist. Die pharmakodynamische Wirkungsweise der Chinolone liegt in einer Hemmung der DNA-Gyrase. Die Chinolone fixieren den Gyrase-DNA-Komplex in einem Reaktionszwischenstadium, in dem das Enzym kovalent mit der DNA verbunden ist. Dadurch kommen Polymerisationsreaktionen entlang der DNA, wie die DNA-Replikation und Transkription zum Erliegen, was die Zellteilung weitgehend und schließlich zum Zelltod führt.

#### 5.2.2.1 Pharmakokinetische Eigenschaften:

Die Absorptionskinetik eines Wirkstoffes hängt entscheidend mit von physikalisch-chemischen Eigenschaften des Moleküls ab, besonders von Löslichkeit und Ionisationsgrad, aber auch vom Transportverhalten im Absorptionsbereich.

### 5.2.2.1.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Die Carbonsäure in Ofloxacin weist einen pKs-Wert von 6,05 auf, während die methylierte tertiäre Amingruppe des Piperazinrings einen pKs-Wert von 8,22 hat. Somit hat Ofloxacin einen amphiphilen Charakter und besitzt einen isoelektrischen Punkt (pI) von 7,14. Während die Carboxylgruppe zur Löslichkeit im neutralen bis basischen pH-Bereich beiträgt, bildet sich im sauren Milieu am N-Atom des Heterocyclus nach dessen Protonierung ein Hydratationszentrum aus. Der Einfluss der Carboxylgruppe auf die Löslichkeit des Ofloxacins im wässrigen Medium ist dabei geringer als der der N-Basizität des Heterocyclus, woraus eine bessere Löslichkeit des Ofloxacins im stark sauren Bereich resultiert. Diese Eigenschaften erklären auch die erhöhte Resorption von Ofloxacin *in vitro* bei einem pH 7,4 verglichen mit pH 5 und pH 8 (Rabba *et al* 1997).

### 5.2.2.1.2 Pharmakokinetische Daten

Nach peroraler Gabe wird Ofloxacin rasch und nahezu vollständig resorbiert. Die Bioverfügbarkeit wird mit 90 % angegeben (Rabba *et al.* 1997). Maximale Serumspiegel werden innerhalb von 1 – 2 Stunden erreicht. Die Plasmaproteinbindung liegt bei ca. 25 %. Das scheinbare Verteilungsvolumen beträgt 120 Liter. Ofloxacin wird bis zu etwa 6 % biotransformiert.

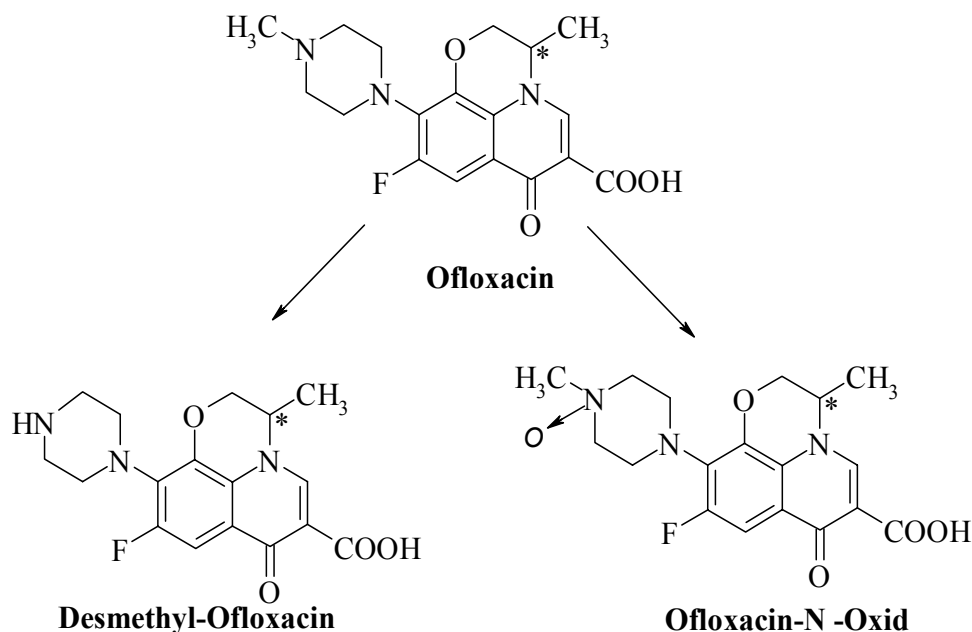


Abb. 5.5 Phase-I-Metaboliten von Ofloxacin.

Die Ausscheidung erfolgt in erster Linie über die Niere. Im Urin werden die Hauptmetaboliten N-Desmethyl-Ofloxacin und Ofloxacin-N-Oxid gefunden (*Wong und Flor 1990*). Das Glucuronsäurekonjugat von Ofloxacin geht in die Galle über (*Kommentar zur PH. Eur. NT 2000*).

Eine stereoselektive Metabolisierung von Ofloxacin gilt als sicher. Untersuchungen an der Ratte zeigen, dass nach 8 Stunden 31,3 % einer oral applizierten Dosis als Ester-Glucuronid des S-Ofloxacins in der Galle zu finden sind, während lediglich 7,3 % des R-Enantiomers als Glucuronid auf dem gleichen Weg ausgeschieden werden (*Okazaki et al. 1989*). Die gleiche Untersuchung zeigt darüber hinaus, dass das Glucuronid des S-Enantiomers auch im Urin und Blut dominiert. Eine Induktion der Phase-II-Enzyme mittels Phenobarbital führt zu einer Erhöhung des Metabolisierungsgrades und gleichzeitig zu einer höheren stereoselektiven Diskriminierung (*Yao et al. 2000*). *Fuhr et al. (1990)* zeigen, dass durch Zugabe von Ofloxacin die N-Demethylierung von Coffein unterbunden wird, was auf eine kompetitive Hemmung des entsprechenden CYPs hindeutet. Somit erscheint es möglich, dass Ofloxacin intestinal durch die CYPs im Dünndarm, die mit den in der Leber identisch sind, metabolisiert werden kann.

Wie vorher erwähnt, liegt der isoelektrische Punkt von Ofloxacin bei einem Wert von 7,4. Die pH-Abhängigkeit der Resorption konnte in der Rate gezeigt werden (*Rabbaa et al. 1997*). Hierbei wurde die Resorption von Ofloxacin bei pH 5, pH 7,4 und pH 8 untersucht. Die höchste Resorption wird bei einem pH-Wert von 7,4 gefunden. Die Autoren kommen dabei zum Schluss, dass Ofloxacin vor allem durch passive Diffusion aufgenommen wird. Dies erscheint nahe liegend, wenn man berücksichtigt, dass die Lipophilie von Ofloxacin bei pH 7,4 ein Maximum durchschreitet. Gemäß den im Gastrointestinaltrakt vorliegenden pH-Werten findet die Resorption von Chinolonen vornehmlich im Duodenum und Jejunum statt, da hier ein hinreichend großer Teil der Chinolone ungeladen vorliegt und so passiv entsprechend des lipophilen Anteils resorbiert werden (*Sörgel und Kinzig 1993*). Dagegen konnten *Prieto et al. (1988)* allerdings einen aktiven Transportmechanismus nachweisen. Sie untersuchten die Abhängigkeit der Resorptionsrate von der applizierten Ofloxacindosis an der Ratte und zeigten dabei eine Sättigung des Transportmechanismus bei steigender Konzentration von 0,125 mg/ml bis 5

mg/ml mittels der Perfusionstechnik. Demnach besteht keine lineare Beziehung zwischen der Dosis und der Absorptionsrate. Einen linearen Zusammenhang zwischen den Kehrwerten der applizierten Dosis und den Kehrwerten der Absorptionsrate von Ofloxacin konnten die Autoren feststellen. Dies deutet auf eine sättigbare Michaelis-Menten Kinetik und somit die Beteiligung eines aktiven Transporters hin.

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefundene Permeationskoeffizient ist, trotz der lipophilen Eigenschaften des Ofloxacin, sehr gering, was auf eine eingeschränkte passive Diffusion oder einen aktiven Transportmechanismus hindeutet. Am Caco-2-Zellmodell gefundene geringe Permeationskoeffizienten für Substanzen mit guter Resorption in vivo sind häufig auf eine Beteiligung eines Carriers an dem Transport zurückzuführen (*Artursson et al 1996*). Dieses Phänomen ist bei L-Dopa (*Hu und Borchardt 1990*), Aminosäuren und D-Glucose beschrieben (*Hidalgo und Borchardt 1990*). Aufgrund der o. a. Daten und dem geringen Permeationskoeffizienten ist eine Beteiligung eines aktiven Transportmechanismus an der Resorption von Ofloxacin anzunehmen.

### 5.2.2.1.3 Sekretion von Ofloxacin

Ofloxacin befindet sich als Racemat auf dem Markt (z. B. Tarivid<sup>®</sup>); ebenfalls auf dem Markt befindet sich sein linksdrehendes Enantiomer (S(-)-Ofloxacin oder Levofloxacin) (z. B. Tavanic<sup>®</sup>). Die Chiralität eines Moleküls kann, wie in Kapitel 1 „Einleitung und Zielsetzung“ erläutert, einen großen Einfluss auf die biologische Wirkung besitzen. So ist S(-)-Ofloxacin etwa 8- bis 128-fach wirksamer als R(+)-Ofloxacin (*Petersen 2001; Morrissey et al. 1996; Hayakawa et al. 1986*). Unter pharmakokinetischen Gesichtspunkten berichten *Vehro et al. (1996)* von sehr kleinen, nicht erwähnenswerten Unterschieden beim Vergleich einer Applikation von Levofloxacin mit der eines racem. Ofloxacins. Diese in vivo-Untersuchungen ergeben eine  $AUC_{0-28}$  von  $17 \text{ mg} \times \text{h/l}$  für S-Ofloxacin und  $AUC_{0-28}$  von  $14,6 \text{ mg} \times \text{h/l}$  für R-Ofloxacin. Vergleicht man allerdings die Daten zur Pharmakokinetik von Levofloxacin mit denen von Ofloxacin, so zeigt sich ein Trend zu geringerer renaler Clearance und – vielleicht als Folge davon – zu einem geringfügigen Unterschied der AUCs zugunsten von Levofloxacin. *Sörgel et al. (2001)* berichten über das

pharmakokinetische Verhalten von Ofloxacin und Levofloxacin. Demzufolge beträgt die Bioverfügbarkeit für Ofloxacin 95 – 100 % und für Levofloxacin > 90 %. Sie bestimmen eine renale Clearance von 160 – 200 ml/min für Ofloxacin und 125 ml/min für Levofloxacin. Die Daten zeigen deutlich einen Unterschied in der renalen Clearance zwischen Ofloxacin und Levofloxacin und damit eine Stereoselektivität der renalen Elimination. Die geringe renale Clearance erklärt auch die erhöhte Halbwertszeit für Levofloxacin von 6 – 8 h gegenüber der des racemischen Ofloxacins von 4 – 6 h, die von den gleichen Autoren angegeben wird. Auch eine frühere Untersuchung zur Pharmakokinetik der Ofloxacin-Enantiomeren nach Gabe des Racemats zeigt eine geringere renale Clearance des S(-)-Ofloxacins (*Verho et al. 1996*).

Die Sekretion von Ofloxacin nach der Aufnahme in die Enterozyten in das Darmlumen gilt als unstrittig. Dabei wird ein Teil der schon resorbierten Menge in das Darmlumen aktiv zurückgefördert. Dieses Phänomen der Sekretion ist für viele Chinolone beschrieben worden (*Dautrey et al 1999; Griffiths et al 1994; Murata et al. 1998; Sasabe et al. 1998 und Sasabe et al. 1999*). Bei der intestinalen Elimination (Sekretion) unterliegen die Substanzen einer Zirkulation, die bei gewissen Chinolonen die vollständige Ausscheidung hinauszögert. *Sörgel et al. (2001)* berichten von in vivo-Untersuchungen zur Bestimmung des Anteils einer applizierten Dosis an Chinolonen, der durch die Sekretion in das Darmlumen eliminiert wird. Dabei werden einer Gruppe Probanden die verschiedenen Chinolone intravenös appliziert. Einer zweiten Gruppe Probanden werden die Chinolone intravenös appliziert bei gleichzeitiger peroraler Gabe von Aktivkohle. Die Aktivkohle adsorbiert die eliminierten Substanzen und verhindert damit eine Reabsorption der Substanzen nach einmaliger Sekretion. Eine AUC-Verminderung um 25,7 % wird für Ofloxacin ermittelt. Demzufolge unterliegt Ofloxacin einer intestinalen Sekretion. Die Sekretion von Ofloxacin wird im Rahmen dieser Arbeit am Caco-2/TC-7-Zellmodell bestätigt. Der Transport in der apikal-basolateralen Richtung ist etwa halb so groß wie in der basolateral-apikalen Richtung. Das ist auf einen aktiven Transportmechanismus zurückzuführen. Bisher durchgeführte Experimente mit Chinolonen legen die Beteiligung verschiedener Transporter nahe. Während eine Beteiligung von P-gp an dem Transport von Ciprofloxacin



ausgeschlossen wird (*Griffiths et al. 1994; Dautrey et al. 1999*), gilt eine Beteiligung des P-gp-Transporters bei der Sekretion von Sparfloxacin, Grepafloxacin und Levofloxacin jedoch als sicher (*Yamaguchi et al. 2000; Cormet-Boyaka et al. 1998*). Auch für Ofloxacin konnte eine Beteiligung von P-gp an der Sekretion von Ofloxacin gezeigt werden (*Rabbaa et al. 1997; Yamaguchi et al. 2000; Dautrey et al. 1999; Rabbaa et al. 1996*). Darüber hinaus wird die Sekretion nicht nur dem P-gp zugeschrieben, sondern auch einem verpamilsensitiven, bisher nicht identifizierten Transporter (*Yamaguchi et al. 2000; Matsuo et al. 1998*). Probenecid (cMOAT/MRP2-Inhibitor), Cimetidin und p-Aminohippurat (Inhibitoren für den organischen Anionen- und Kationen-Transporter) beeinflussen die Sekretion von Ofloxacin nicht. Somit wird eine Beteiligung dieser Transporter an der Sekretion von Ofloxacin ausgeschlossen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (*Abschnitt 4.1.3.2*) deuten darauf hin, dass die Beteiligung anderer Transporter neben P-gp an der Sekretion von Ofloxacin höchst wahrscheinlich ist. So ist der gefundene Unterschied zwischen dem Permeationskoeffizienten von Ofloxacin in Abwesenheit von Verapamil und dem in Anwesenheit von Verapamil in der basolateral-apikalen Richtung nicht signifikant verschieden. Dabei erhöht sich der Transport von Ofloxacin bei Zugabe von Verapamil um lediglich 10 % verglichen zum Transport in der Abwesenheit von Verapamil. Die Permeation in der apikal-basolateralen Richtung hat sich durch Verapamilzugabe ebenfalls nur um etwa 20 % erhöht. Das bedeutet, dass Verapamil den aktiven Transport nicht vollständig hemmt und die Permeation, insbesondere in der basolateral-apikalen Richtung, nur unwesentlich beeinflusst. Diese Ergebnisse lassen auf die Beteiligung eines weiteren Transportmechanismus neben P-gp schließen.

#### **5.2.2.2 Sekretion von Ofloxacin und deren Stereoselektivität**

##### **Analytik:**

Um die Permeation der Enantiomeren zu bestimmen, war es notwendig, eine analytische Methode zu etablieren. Die Enantiomeren-Trennung konnte mittels DM- $\beta$ -CD kapillarelektrophoretisch erzielt werden. Das

Hauptproblem lag in der geringen Empfindlichkeit der Kapillarelektrophorese als Detektionsmethode. Dies ist auf den kleinen Kapillareninnendurchmesser (50  $\mu\text{m}$ ) und das geringe Injektionsvolumen (wenige nl) zurückzuführen. Bei Verwendung der hydrodynamischen Injektion (Methode 1) konnte in dieser Arbeit eine Bestimmungsgrenze von lediglich 2,5  $\mu\text{g/ml}$  erreicht werden. Daher konnte eine Bestimmung der Permeation der einzelnen Enantiomeren von Ofloxacin nicht durchgeführt werden, da die Menge an Ofloxacin, die den Zellmonolayer passiert, in Konzentrationsbereichen unterhalb der Bestimmungsgrenze gelegen hat. Eine Umstellung der Injektionsart von der hydrodynamischen zur elektrokinetischen verbesserte die Empfindlichkeit stark. Die elektrokinetische Injektion setzt allerdings eine Verarmung der Probe an Elektrolyten voraus, was bei einer physiologischen Hank'schen Lösung nicht der Fall ist. Somit war eine Probenvorbereitung unvermeidbar. Als Extraktionsmittel diente Dichlormethan. Ein zweites Problem, das die elektrokinetische Injektion mit sich brachte, war die Tatsache, dass bei dieser Injektionsart eine Diskriminierung der Teilchen durch ihre elektropheretischen Mobilitäten erfolgt. Das bedeutet, dass die mobileren Ionen vermehrt in die Kapillare gelangen verglichen mit den weniger mobilen. Um starke Variationen der injizierten Mengen an Ofloxacin und des internen Standards zu vermeiden, war es notwendig, eine Substanz mit sehr ähnlichen physikalischen Eigenschaften wie das Ofloxacin als internen Standard zu verwenden. Diese Voraussetzung erfüllte Enrofloxacin. Zur Optimierung der Methode wurde ein Versuchsplan gemäß dem „Central Composite Design“ erstellt und durchgeführt. Ziel dieses statistischen Versuchsplanes ist die Peakauflösung und die Methodenempfindlichkeit zu verbessern, sowie eine niedrige Stromstärke und kurze Migrationszeiten zu erzielen. Eine geringe Stromstärke ist wünschenswert, um eine Überhitzung der Kapillare zu vermeiden und um die Joule'sche Wärmeentwicklung so gering wie möglich zu halten. Dafür wird der Einfluss der Faktoren Puffer-Konzentration, DM- $\beta$ -CD-Konzentration, Puffer-pH und Temperatur sowie deren Interaktionen auf die Zielgrößen untersucht. Die steigende Puffer-Konzentration hat einen

positiven Effekt auf alle Zielgrößen. Die steigenden Konzentrationen des chiralen Selektors beeinflussen die Auflösung und die Migrationszeit positiv, während sie auf die übrigen zwei Zielgrößen einen negativen Effekt haben. Dasselbe gilt auch für steigende pH-Werte. Eine Erhöhung der Temperatur hat eine Erhöhung der Stromstärke zur Folge, jedoch einen negativen Effekt auf die restlichen 3 Zielgrößen. Zur Findung des Optimums wird ein Kompromiss zwischen den 4 Zielgrößen gesucht. Die Berechnung des Optimums erfolgt letztendlich durch eine „multiple response optimization“. Nach Entwicklung, Optimierung und Etablierung der analytischen Methode war es möglich, die Permeationen der einzelnen Enantiomeren von Ofloxacin zu bestimmen.

Die Ergebnisse in Kapitel 4 zeigen, dass bei dem verwendeten Caco-2/TC-7-Modell keine stereoselektive Diskriminierung bei der Sekretion von Ofloxacin zu erkennen ist. So sind keine signifikanten Unterschiede in der Absorption (apikal zu basolateral) oder in der Elimination (basolateral zu apikal) zwischen den einzelnen Enantiomeren zu beobachten. Dies widerspricht den Angaben von *Rabbaa et al. (1997)*, welche in der Ratte signifikante Unterschiede in der Sekretion zwischen R-Ofloxacin und S-Ofloxacin zeigen. Bei genauerer Betrachtung dieser Arbeit ist jedoch zu erkennen, dass lediglich R- und S-Enantiomere des Ofloxacins analytisch erfasst werden, ohne Rücksichtnahme auf Metaboliten, welche in der Darmwand entstehen können. *Rabbaa et al. (1996)* untersuchten an Ratten mit einem Gewicht von 250 g die Sekretionsunterschiede von Ofloxacin-Enantiomeren. Demnach betragen die sezernierten Mengen an S-Ofloxacin ca. 19 µg und an R-Ofloxacin ca. 30 µg nach 60 min bei einer applizierten Dosis von 25 mg/kg. Dies bedeutet, dass der Unterschied zwischen dem sezernierten R- und S-Ofloxacin nur 0,27 % der applizierten Dosis ausmacht und somit extrem gering ist. Auf der anderen Seite kann die Ursache für solche Unterschiede in dem bereits erwähnten intestinalen Metabolismus liegen, welcher auch in der Ratte bekannt ist, bei *Rabbaa et al. (1996)* jedoch unberücksichtigt geblieben ist.

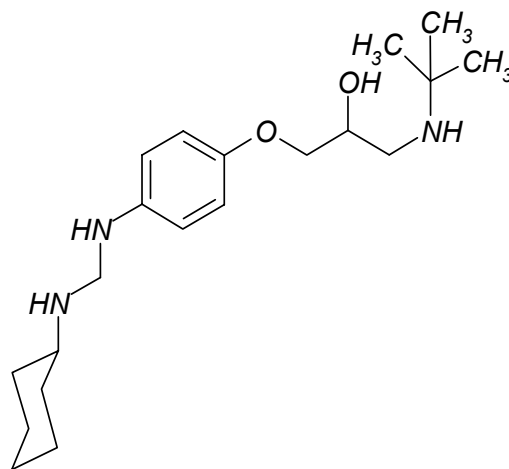
Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass kein Unterschied zwischen dem Resorptionsverhalten der Ofloxacin-Enantiomeren am Caco-2/TC-7-Zell-

modell besteht. Eine stereoselektive Diskriminierung ist für Ofloxacin an diesem Zellmodell nicht zu beobachten. Ebenso ist ein stereoselektiver Metabolismus für Ofloxacin am Caco-2/TC-7-Zellmodell nicht erkennbar. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der oben angeführten Gründe ist eine stereoselektive Sekretion von Ofloxacin am Caco-2/TC-7-Zellmodell auszuschließen.

Die Substrate für P-gp weisen verschiedene chemische Strukturen und verschiedene physiko-chemische Eigenschaften auf, die Substratspezifität des P-gp-Transporters ist sehr gering. Ein stereoselektiver Transport mittels eines unspezifischen Transporters (P-gp) ist eher unwahrscheinlich. Da stereoselektive Metabolisierung von Ofloxacin jedoch bekannt ist (*Abschnitt 5.2.2.1.2*), ist anzunehmen, dass die von *Rabbaa et al. (1996)* beobachtete Stereoselektivität eher auf den Metabolismus als auf die durch das P-gp verursachte Sekretion zurückzuführen ist. Dies hat sich auch im Fall von Talinolol bestätigt, bei dem man früher davon ausging, dass es einer stereoselektiven Sekretion unterliegt.

### 5.2.3 Resorption von Talinolol

Talinolol (*(RS)*-1-*{4-[3-tert.-Butylamino]-2-hydroxypropoxy}phenyl*}-3-cyclohexyl-harnstoff) ist ein kardioselektiver Betablocker ( $\beta$ -Adrenozeptorantagonist) ohne intrinsische sympathomimetische Aktivität.



**Abb. 5.6** Strukturformel von Talinolol

Talinolol zeigt bis auf die  $\beta_1$ -Selektivität die gleichen pharmakologischen Eigenschaften wie Propranolol. Infolge der  $\beta_1$ -Selektivität hemmt Talinolol die  $\beta_2$ -gesteuerte Glykogenolyse in geringerem Ausmaß als Propranolol, während bei der  $\beta_1$ -gesteuerten Lipolyse kein Unterschied besteht.

### 5.2.3.1 Pharmakokinetische Daten

In einer offenen, randomisierten crossover Studie an 12 Probanden konnten *Trausch et al. (1995)* die pharmakokinetischen Parameter von Talinolol bestimmen. Demzufolge wird nach peroraler Gabe von Talinolol eine Bioverfügbarkeit von bis zu  $55 \pm 15 \%$  erreicht. Die totale Clearance beträgt  $4,9 \pm 0,6 \text{ ml} \times \text{min}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$ , wobei  $55 \pm 11 \%$  der bioverfügbaren Menge unverändert und  $0,57 \pm 0,33 \%$  ( $0,26 \pm 0,17 \%$  der verabreichten Dosis) als hydroxyliertes Talinolol über die Niere ausgeschieden werden. *Wetterich et al. (1996)* berichten von einer stereoselektiven Sekretion von Talinolol. Demnach konnte eine Diskriminierung der Talinolol-Enantiomeren sowohl in vivo als auch in vitro feststellen werden.

### 5.2.3.2 Sekretion von Talinolol und deren Stereoselektivität

#### Analytik:

Eine Enantiomeren-Trennung von Talinolol mittels Kapillarelektrophorese ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Von den verschiedenen chiralen Selektoren, die in den Screeningversuchen verwendet wurden, hat sich HDAS- $\beta$ -CD (*Abb. 5.8*) als besonders geeignet erwiesen. Im Gegenteil zu HDAS- $\beta$ -CD, besteht eine Abhängigkeit zwischen der Migrationszeit und der Konzentration von HS- $\beta$ -CD bzw. S- $\beta$ -CD. Darüber hinaus leidet die Auflösung unter einem starken Tailing der Peakformen. Mit einer 3 mM HDAS- $\beta$ -CD Phosphat-Lösung pH 3,5 können schmale Peaks der Talinolol-Enantiomeren unter 10 min Migrationszeit erzielt werden. Durch Verwendung des elektrokinetischen Injektionsmodus und nach Optimierung der Methode war es möglich, Konzentrationen an Talinolol-Enantiomeren bis in den niedrigen ppb-Bereich zu erfassen. Im Gegensatz zur HPLC liefert

die Trennung mittels der Kapillarelektrophorese eine bessere Auflösung, schmalere Peaks und kürzere Analysenzeiten für die Talinolol-Enantiomeren. Darüber hinaus bestehen die Vorteile dieser Methode gegenüber der HPLC in den geringen benötigten Probenvolumina und in großer Ersparnis an Lösungsmittel für die mobile Phase. Die Verwendung einer Polyvinylalkohol-gecoateten Kapillare hat durch Verminderung der Adsorptionseffekte an der Kapillarinnenwand zur Stabilisierung der Migrationszeiten geführt.

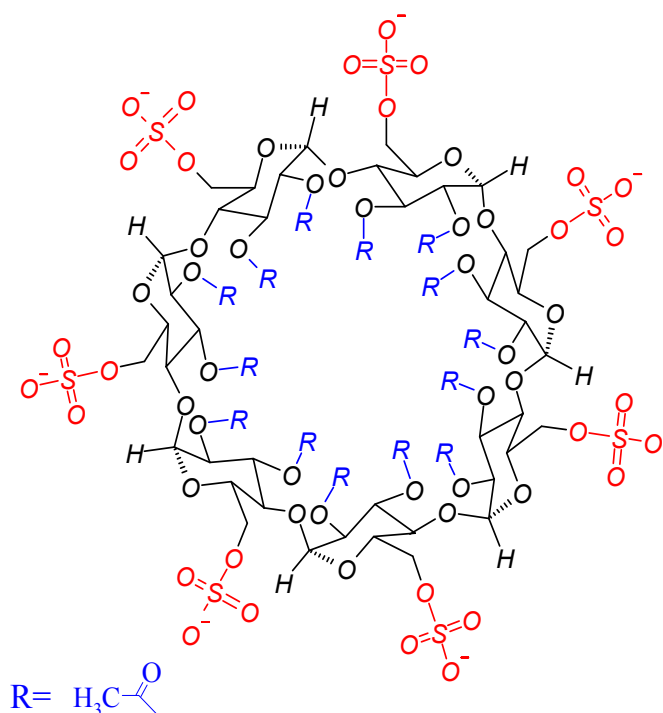


Abb. 5.7 Strukturformel von HDAS- $\beta$ -CD

### Sekretion von Talinolol

Die meisten Autoren führen die verminderte Bioverfügbarkeit von Talinolol auf die intestinale Sekretion zurück. Dies wird auch durch die vorliegende Arbeit bestätigt, wonach am Caco-2/TC-7-Zellmodell die Permeationskoeffizienten von racem. Talinolol in der basolateral-apikalen Richtung 3 – 4-fach höher als in der apikal-basolateralen Richtung sind (Abschnitt 4.1.3.3). Die Richtungsabhängigkeit der Permeationskoeffizienten deutet auf eine Sekretion in der basolateral-apikalen Richtung hin. Durch simultane Zugabe von Erythromycin, welches als P-gp-Blocker bekannt ist, lässt sich die Bioverfügbarkeit von Talinolol steigern (Schwarz

*et al.* 2000). Eine Erhöhung der Permeation *in vitro* durch Zugabe von Verapamil, als P-gp-Substrat, ist ebenfalls in der Literatur beschrieben (*Wetterich et al.* 1996).

Das Phänomen der Sekretion ist für die Gruppe der Beta-Blocker nicht unbekannt und findet sich in der Literatur unter anderem für Pafenolol und Celiprolol (*Kuo et al.* 1994; *Lennernas und Regardh* 1993; *Lennernas et al.* 1993).

Die Ergebnisse in dieser Arbeit bestätigen die bekannte Tatsache, dass P-gp an der Sekretion von Talinolol beteiligt ist und eine Hemmung dieses Transporters zu einer Steigerung der Resorption führt. Dabei ist die Transportrate von Talinolol in der basolateral-apikalen Richtung 3,3-mal so groß wie in der apikal-basolateralen-Richtung. Das alleine deutet auf einen aktiven Transport in der basolateral-apikalen Richtung hin. Die Ergebnisse der Versuchsreihen zeigen eine signifikante Verminderung des Permeationskoeffizienten von racemischem Talinolol in der basolateral-apikalen Richtung durch Zugabe von Verapamil. Darüber hinaus ist eine signifikante Steigerung des Permeationskoeffizienten in der apikal-basolateralen Richtung zu beobachten, wenn Verapamil simultan zugesetzt wird. Zugabe von Verapamil bewirkt eine Steigerung der Permeation von Talinolol in der apikal-basolateralen Richtung um das 2,3-fache. Das zeigt wiederum, dass Talinolol ein Substrat für den gleichen Transporter ist, der von Verapamil gehemmt wird, den P-gp-Transporter.

*Wetterich et al.* (1996) untersuchen eine mögliche stereoselektive Sekretion von Talinolol nach intravenöser und peroraler Gabe von racem. Talinolol am Menschen sowie am Caco-2-Zellmodell. Sie kommen zu dem Ergebnis, dass die totale Clearance *in vivo* von S(-)-Talinolol höher ist als die von R-(+)-Talinolol. Ähnliches gilt für das Caco-2-Zellmodell. Demnach ist der Permeationskoeffizient von R-(+)-Talinolol in der apikal-basolateralen Richtung höher als der von S(-)-Talinolol.

Nach Unstimmigkeiten hinsichtlich der Stereoselektivität von Ofloxacin zwischen den vorliegenden Ergebnissen am Caco-2/TC-7-Zellmodell und den für die Ratte wie in der Literatur beschrieben, ist es notwendig das Caco-2/TC-7-Zellmodell mit einer zweiten Substanz, von der eine stereoselektive Sekretion am normalen Caco-2-Zellmodell bekannt ist, zu überprüfen. Dies führte zu der Untersuchung der Resorption von Talinolol am Caco-2/TC-7-Zellmodell.

Unsere Ergebnisse zeigen unabhängig von der Transportrichtung jedoch keine Unterschiede in der Resorption der Talinolol-Enantiomeren. Die gefundenen Permeationskoeffizienten innerhalb der Versuchsanordnungen sind für die Talinolol-Enantiomeren jeweils gleich. Eine Zugabe von Verapamil hat keinen Effekt hinsichtlich der Enantiomerendiskriminierung, allerdings bewirkt es eine Hemmung des aktiven Transports.

Eine neue Arbeit *in vivo* von *Zschiesche et al. (2002)* bestätigt die Befunde in Bezug auf die stereoselektive Diskriminierung von Talinolol-Enantiomeren bei der Sekretion. Demzufolge wird die Sekretion beider Talinolol-Enantiomeren nach peroraler und intravenöser Applikation untersucht. Dabei finden die Autoren einen signifikanten Unterschied in der Enantiomerensekretion ausschließlich nach einer peroralen Gabe. Damit können die gefundenen Konzentrationsunterschiede nicht auf einen stereoselektiven Transport durch P-gp zurückgeführt werden, denn sonst müsste die stereoselektive Diskriminierung auch bei intravenöser Applikation auftreten, da auch bei dieser Applikationsform ein Teil des Arzneistoffs aus dem Plasma aktiv ins Darmlumen sezerniert wird. Eine simultane Gabe von Rifampicin über 9 Tage führt darüber hinaus für beide Applikationsarten zu einem signifikanten Unterschied in der Sekretion beider Enantiomeren. Rifampicin gilt als starker Induktor für das CYP3A4-Isoenzym. Somit beweisen die Autoren, dass der stereoselektive Unterschied bei der intravenösen Gabe, der erst nach einer simultanen Applikation von Rifampicin zustande kommt, nicht durch die Sekretion, sondern durch den Metabolismus verursacht wird. Es muss hier darauf hingewiesen werden, dass Rifampicin nicht nur einen Induktor für P-gps darstellt (*Westphal et al. 2000; Hebert et al. 1992; Hebert et al. 1999*), sondern auch wegen der großen Ähnlichkeit mit dem P-gp die Expression des CYP3A4-Enzyms positiv beeinflusst (*Hebert et al. 1992; Hebert et al. 1999; Fromm et al. 1996; Holtbecker et al. 1996; Kolars et al. 1992*). Es ist auch bekannt, dass Talinolol ausschließlich durch CYP3A4 metabolisiert wird (*Zschiesche et al. 2002*). Dies lässt sich mittels spezifischer Enzyminhibitoren nachweisen. Die Metabolitenentstehung wird durch Ketoconazol, einem CYP3A4-Inhibitor, unterbunden.  $\alpha$ -Naphthoflavon, ein CYP1A2-Inhibitor, und Chinidin, ein CYP2D6-Inhibitor, haben keinen Einfluss auf die Metabolisierung von Talinolol. *Zschiesche et al. (2002)* zeigen darüber hinaus



die stereoselektive Metabolisierung durch Lebermikrosomen. Die Autoren stellen fest, dass der Metabolisierungsgrad und die Metabolisierungsgeschwindigkeit für das R-Enantiomer höher liegen als für das S-Enantiomer. Diese Metabolisierungsreaktionen finden auch in den Enterozyten statt, in der die Metabolisierungsenzyme vorhanden sind. *Zschiesche et al. (2002)* kommen in ihrer Arbeit zu dem Schluss, dass die in geringem Maß gefundene Diskriminierung zwischen den Talinolol-Enantiomeren auf eine pre-systemische Metabolisierung zurückzuführen ist.

Dieser intestinale Metabolismus ist höchst wahrscheinlich auch für die Befunde von *Wetterich et al. (1996)* verantwortlich, die von einer stereoselektiven Sekretion von Talinolol berichtet haben. Das dabei verwendete Caco-2-Zellmodell ist für die Expression von CYP3A4-Isoenzym bekannt. Somit täuscht der Metabolismus in den Caco-2-Zellen eine stereoselektive Sekretion vor. Im Gegensatz dazu wird in der vorliegenden Arbeit keine stereoselektive Diskriminierung am Caco-2/TC-7-Zellmodell beobachtet, was auf das Fehlen des CYP3A4-Isoenzym bei diesem Klon zurückzuführen ist (*Raeissi et al. 1997; Raeissi et al. 1999; Engmann et al. 2001*).

Die vorliegenden Ergebnisse, bestätigt durch die Arbeit von *Zschiesche et al. (2002)*, zeigen deutlich, dass Talinolol einer aktiven Sekretion unterliegt, welche durch P-gp-Blocker hemmbar ist. Diese Sekretion verläuft im Gegensatz zu den Befunden von *Wetterich et al. (1997)* nicht stereoselektiv. Die Enantiomeren-diskriminierung kommt vorwiegend durch die CYP3A4-Metabolisierung für Talinolol zustande.

### **Schlussfolgerung:**

Aus der vorliegenden Arbeit geht hinsichtlich der Stereoselektivität und des Caco-2/TC-7-Zellmodells hervor:

- Im Gegenteil zum Caco-2-Zellmodell, das für Transport- und Resorptions eine große Verbreitung gefunden hat, und in dem die Transportmechanismen mit denen des Metabolismus vergesellschaftet sind, bietet das Caco-2/TC-7-Zellmodell, eine Möglichkeit zur Untersuchung des Transports losgelöst von den Einflüssen des intrazellulären Metabolismus, insbesondere für Substanzen, die durch CYP3A4 metabolisiert werden. Die Exprimierung des

CYP3A4-Enzyms, das für die Metabolisierung von über 50 % aller Arzneistoffe verantwortlich ist, macht das Caco-2-Zellenmodell nicht uneingeschränkt verwendbar zur Untersuchung der Transportmechanismen und der Stereoselektivität der Resorption.

- Eine stereoselektive Sekretion von Ofloxacin ist ausgeschlossen, zumindest in dem in dieser Arbeit verwendeten Caco-2/TC-7-Zellmodell. Eine stereoselektive Metabolisierung ist jedoch bekannt und steckt höchst wahrscheinlich hinter der in der Literatur beschriebenen Stereoselektivität für Ofloxacin.
- Eine stereoselektive Sekretion von Talinolol konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Nur die Metabolisierung von Talinolol verläuft stereoselektiv. Dieser Erkenntnis lässt sich durch Literaturdaten bestätigen.

# KAPITEL 6

## *ZUSAMMENFASSUNG*

In jüngerer Zeit kommen in vitro-Modelle, v. a. Zellkulturmodelle, immer mehr zum Einsatz zur Untersuchung von Transport und Transportmechanismen. Unter den verschiedenen Zellkultur-Modellen gilt die Caco-2-Zelllinie als das aussichtsreichste System, um das intestinale Epithel zu simulieren. Caco-2-Zellen stammen ursprünglich aus einem menschlichen Kolonkarzinom, differenzieren unter Standardkulturbedingungen jedoch zu einem enterozytenähnlichen Epithel. Sie bieten daher den Vorteil, mit menschlichem anstelle von tierischem Gewebe arbeiten zu können und liefern durch ihre kontinuierliche Teilungsfähigkeit ständig einen verfügbaren Vorrat an gleichartigen Zellen, um Experimente durchführen zu können. Die Caco-2-Zellen differenzieren spontan nach Aussäen auf verschiedenen festen Unterlagen und formen konfluente einschichtige, dichte Epithelien (Monolayer).

Das in dieser Arbeit verwendete Caco-2/TC-7-Zellmodell ist ein Subklon und stammt aus Passage 198 der Caco-2-Zelllinie ab. Somit ist das TC-7-Zellmodell eine monoklonale Zellpopulation. Dieses Zellkultur-Modell wird im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt um die Stereoselektivität der Resorption bzw. der Sekretion von Ofloxacin und Talinolol zu untersuchen. Zur Überprüfung und Etablierung dieses Modells wurden Vorversuche mit Fluorescein-Na und Propranolol durchgeführt und die Ergebnisse mit Literaturdaten verglichen. Der in der vorliegenden Arbeit gefundene Permeationskoeffizient stimmt mit Angaben in der Literatur gut überein. Fluorescein-Na wird nach jedem durchgeführten Versuch eingesetzt, um die Integrität des bereits verwendeten Zellmonolayers zu untersuchen. Fluorescein-Na passiert den Zell-Monolayer im neutralen Milieu parazellulär und spiegelt somit die Dichtigkeit des Monolayers wider.

Propranolol passiert die Zellbarriere passiv transzellulär und wird in der vorliegenden Arbeit kapillarelektrophoretisch erfasst. Der in dieser Arbeit ermittelte Permeationskoeffizient von Propranolol stimmt mit Angaben der Literatur überein.

Dies zeigt die Eignung des Caco-2/TC-7-Zellmodell zur Untersuchung des passiv transzellulären Transports.

Zur Ermittlung der Permeationskoeffizienten von Ibuprofen-Enantiomeren wird eine analytische Methode zur Trennung der Enantiomeren mittels Kapillarelektrophorese aufgebaut. Die am Caco-2/TC-7-Zellmodell erhaltenen Permeationskoeffizienten der Ibuprofen-Enantiomeren unterscheiden sich nicht, daher ist, wie für einen passiv transzellulären Transport auch nicht anders zu erwarten, eine Enantiomerendiskriminierung hinsichtlich der Resorption ausgeschlossen.

*Rabbaa et al. (1997)* zeigten an der Ratte einen signifikanten Unterschied in der Sekretion zwischen R-Ofloxacin und S-Ofloxacin. Um dies auch am Caco-2/TC-7-Zellmodell zu überprüfen, wird eine analytische Methode mittels Kapillarelektrophorese entwickelt, wobei 4 Haupt-Einflussfaktoren mittels eines statistischen Versuchsplans gemäß dem Central Composite Design optimiert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen keinen Unterschied in der Sekretion zwischen L- und D-Ofloxacin am Caco-2/TC-7-Zellmodell. Ofloxacin wird, wie in der Literatur beschrieben, stereoselektiv metabolisiert, somit ist die beobachtete Stereoselektivität eher auf den Metabolismus als auf die Sekretion zurückzuführen. Eine Sekretion kann am Caco-2/TC-7-Zellmodell nachgewiesen werden, diese ist durch Zugabe von Verapamil teilweise hemmbar.

Nach Unstimmigkeiten hinsichtlich der Stereoselektivität von Ofloxacin zwischen den vorliegenden Ergebnissen am Caco-2/TC-7-Zellmodell und den in der Literatur für die Ratte beschriebenen Daten ist es notwendig das Caco-2/TC-7-Zellmodell mit einer zweiten Substanz, von der eine stereoselektive Sekretion am Caco-2-Zellmodell bekannt ist (*Wetterich et al. 1996*), zu überprüfen. Dafür wird die Resorption von Talinolol am Caco-2/TC-7-Zellmodell untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wird eine neue Methode zur Bestimmung von Talinolol-Enantiomeren mittels Kapillarelektrophorese entwickelt. Um eine Trennung der Enantiomeren zu erreichen, wird der chirale Selektor HDAS- $\beta$ -CD (Heptakis-(2,3-diacetyl-6-sulfato)- $\beta$ -Cyclodextrin) verwendet. Die Methodenparameter werden optimiert und die Methode in einem Konzentrationsbereich von 144 ng/ml – 2,37  $\mu$ g/ml kalibriert und validiert. Neben der stereoselektiven Trennung von Talinolol kann auch die Enantiomeren-Trennung verschiedener  $\beta$ -Blocker erzielt werden. Dabei wird eine

Kapillare mit einer Länge von 37 cm verwendet, die Spannung liegt bei 20 kV. Eine Basislinien Enantiomerentrennung kann für folgende Substanzen erzielt werden: Alprenolol, Atenolol, Bisoprolol, Celiprolol, Metipranolol, Oxprenolol und Sotalol. Die Permeationskoeffizienten für Talinolol in der apikal-basolateralen Richtung unterscheiden sich signifikant von denen in der basolateral-apikalen Richtung, was auf die Sekretion unter Beteiligung des P-gp-Transporters zurückzuführen ist. Die Ergebnisse der Resorptionsuntersuchungen von Talinolol am Caco-2/TC-7-Zellmodell ergeben aber keine Sekretionsunterschiede der Talinolol-Enantiomeren. Eine neue Arbeit von *Zschiesche et al. (2002)* bestätigt die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Enantiomerendiskriminierung in der Sekretion. Sie finden keinen Unterschied in den Enantiomerenkonzentrationen im Darmlumen in vivo nach intravenöser Gabe von Talinolol, dafür aber eine höhere Konzentration an S(-)-Talinolol als R-(+)-Talinolol nach peroraler Gabe. Eine Untersuchung des Metabolismus von Talinolol durch *Zschiesche et al. (2002)* zeigt einen Unterschied in der Metabolisierungsrate durch das CYP3A4-Isoenzym zugunsten von R-(+)-Talinolol, was sich in einer höheren Konzentration des S(-)-Talinolols im Darmlumen bemerkbar macht. Damit ist bewiesen, dass Enantiomerendiskriminierung für Talinolol vorwiegend durch die unterschiedliche CYP3A4-Metabolisierung zustande kommt.

In der hier vorliegenden Arbeit wird jedoch keine stereoselektive Diskriminierung am Caco-2/TC-7-Zellmodell beobachtet, was auf das Fehlen des CYP3A4-Isoenzym bei diesem Zellklon zurückzuführen ist (*Raeissi et al. 1997; Raeissi et al. 1999; Engmann et al. 2001*).

Die vorliegende Arbeit zeigt Übereinstimmungen hinsichtlich der Permeationskoeffizienten von Fluorescein-Na, Propranolol und Ibuprofen mit Literaturangaben und damit die Eignung des Caco-2/TC-7-Zellmodells für die Untersuchung der Absorption passiv permeierender Substanzen. Dagegen kann keine stereoselektive Diskriminierung in der Sekretion von Talinolol und Ofloxacin am Caco-2/TC-7-Zellmodell beobachtet werden. Die in der Literatur beschriebene Diskriminierung ist eher auf den Metabolismus als auf die Sekretion durch P-gp-Transporter zurückzuführen.

# ***KAPITEL 7***

## LITERATURVERZEICHNIS

Adibi, S. A.

*"The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function"*  
Gastroenterology **113**(1), S. 332-340 (1997).

Altria, K. D.

*"Capillary electrophoresis guidebook: principles, operation, and application"* in:  
*"Methods in molecular biology"*  
Humana Press Inc.; Totowa, New jersey; 1. Auflage (1996).

Ambudkar, S. V.; Dey, S.; Hrycyna, C. A.; Ramachandra, M.; Pastan, I.  
und Gottesman, M. M.

*"Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter"*  
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **39**, S. 361-398 (1999).

Artursson, P.

*"Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa"*  
Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. **8**(4), S. 305-330 (1991).

Artursson, P.

*"Cell cultures as models for intestinal peptide transport"*  
Pharm. Sci. **3**(1), S. 5-10 (1993).

Atisook, K.; Carlson, S. und Madara, J. L.

*"Effects of phlorizin and sodium on glucose-elicited alterations of cell junctions in intestinal epithelia"*  
Am. J. Physiol. **258**(1 Pt 1), S. C77-C85 (1990).

Audus, K. L.; Bartel, R. L.; Hidalgo, I. J. und Borchardt, R. T.

*"The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies"*  
Pharm. Res. **7**(5), S. 435-451 (1990).

- Bai, P. F.; Subramanian, P.; Mosberg, H. I. und Amidon, G. L.  
*"Structural requirements for the intestinal mucosal-cell peptide transporter: the need for N-terminal alpha-amino group"*  
Pharm. Res. **8**(5), S. 593-599 (1991).
- Barnard, J. A. und Ghishan, F. K.  
*"Taurocholate transport by human ileal brush border membrane vesicles"*  
Gastroenterology **93**(5), S. 925-933 (1987).
- Barthe, L.; Woodley, J. und Houin, G.  
*"Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies"*  
Fundam. Clin. Pharm. **13**(2), S. 154-168 (1999).
- Benet, L. Z.; Izumi, T.; Zhang, Y.; Silverman, J. A. und Wacher, V. J.  
*"Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery"*  
J. Controlled Release **62**(1-2), S. 25-31 (1999).
- Blais, A.; Bissonnette, P. und Berteloot, A.  
*"Common characteristics for Na-dependent sugar transport in Caco-2 cells and human fetal colon"*  
J. Membr. Biol. **99**(2), S. 113-125 (1987).
- Bock, U.; Kolac, C.; Borchard, G.; Koch, K.; Fuchs, R.; Streichhan, P. und Lehr, C.-M.  
*"Transport of proteolytic enzymes across Caco-2 cell monolayers"*  
Pharm. Res. **15**(9), S. 1393-1400 (1998).
- Brunner, H.  
*"Rechts oder Links"*  
Wiley-VCH Verlag; Weinheim, New York, Chinchester, Brisbane, Singapore, Toronto (1999).
- Caro, I.; Boulenc, X.; Rousset, M.; Meunier, V.; Bourrie, M.; Julian, B.; Joyeux, H.; Roques, C. und Berger, Y.  
*"Characterisation of a newly isolated Caco-2 clone (TC-7), as a model of transport processes and biotransformation of drugs"*  
Int. J. Pharm. **116**(2), S. 147-158 (1995).

- Chantret, I.; Rodolosse, A.; Barbat, A.; Dussaulx, E.; Brot-Laroche, E.; Zweibaum, A. und Rousset, M.  
*"Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation"*  
J. Cell Sci. **107**(1), S. 213-225 (1994).
- Cheng, H.; Rogers, J.D.; Demetriades, J. L.; Holland, S. D.; Seibold, J. R. und Depuy, E.  
*"Pharmacokinetics and bioinversion of ibuprofen enantiomers in humans"*  
Pharm. Res. **11**(6), S. 824-830 (1994).
- Chiari, M.; Cretich, M.; Damin, F.; Ceriotti, L. und Consonni, R.  
*"New adsorbed coatings for capillary electrophoresis"*  
Electrophoresis **21**(5), S. 909-916 (2000<sup>a</sup>).
- Chiari, M.; Cretich, M.; Desperati, V.; Marinzi, C.; Galbusera, C. und De Lorenzi, E.  
*"Evaluation of new adsorbed coatings in chiral capillary electrophoresis and the partial filling technique"*  
Electrophoresis **21**(12), S. 2343-2351 (2000<sup>b</sup>).
- Christie, C.; Ford, D.; Howard, A.; Ann Clark, M. und Hirst, B. H.  
*"Glycine supply to human enterocytes mediated by high-affinity basolateral GLYT1"*  
Gastroenterology **120**(2), S. 439-448 (2001).
- Cogburn, J. N.; Donovan, M. G. und Schasteen, C. S.  
*"A model of human small intestinal absorptive cells: 1. transport barrier"*  
Pharm. Res. **8**(2), S. 210-216 (1991).
- Cormet-Boyaka, E.; Huneau, j. F.; Mordelle, A.; Boyaka, P. N.; Carbon, C.; Rubinstein, E. und Tome, D.  
*"Secretion of sparfloxacin from the human intestinal Caco-2 cell line is altered by P-glycoprotein inhibitors"*  
Antimicrob. Agents Chemother. **42**(10), S. 2607 – 2611 (1998).
- Dautrey, S.; Felice, K.; Petiet, A.; Lacour, B.; Carbon, C. und Farinotti, R.  
*"Active intestinal elimination of ciprofloxacin in rats: modulation by different substrates "*  
Brit. J. Pharm. **127**(7), S. 1728-1734 (1999).



- Desta, Z.; Soukhova, N.; Morocho, A. M. und Flockhart, D. A.  
*"Stereoselective metabolism of cisapride and enantiomer-enantiomer interaction in human cytochrome P450 enzymes: major role of CYP3A"*  
J. Pharmacol. Exp. Ther. **298**(2), S. 508-520 (2001).
- Dietzel, K.; Beck, W. S.; Schneider, H. T.; Geisslinger, G. und Brune, K.  
*"The biliary elimination and enterohepatic circulation of ibuprofen in rats"*  
Pharm. Res. **7**(1), S. 87-90 (1990).
- Dix, C. J.; Hassan, I. F.; Obray, H. Y.; Shah, R. und Wilson, G.  
*"The transport of vitamin B12 through polarized monolayers of Caco-2 cells"*  
Gastroenterology **98**(5), S. 1272-1279 (1990).
- Doluisio, J. T.; Billups, N. F.; Dittert, L. W.; Sugita, E. T. und Swintosky, J. V.  
*"Drug absorption. I. An in situ rat gut technique yielding realistic absorption rates"*  
J. Pharm. Sci. **58**(10), S. 1196-1202 (1969).
- Echizen, H.; Tanizaki, M.; Tatsuno, J.; Chiba, K.; Berwick, T.; Tani, M.; Gonzalez, F. J. und Ishizaki, T.  
*"Identification of CYP3A4 as the enzyme involved in the mono-N-dealkylation of disopyramide enantiomers in humans"*  
Drug Metab. Dispos. **28**(8), S. 937-944 (2000).
- Engman, H. A.; Lennernäs, H.; Taipalensuu, J.; Otter, C.; Leidvik, B. und Artursson, P.  
*"CYP3A4, CYP3A5, and MDR1 in human small and large intestinal cell lines suitable for drug transport studies"*  
J. Pharm. Sci. **90**(11), S. 1736-1751 (2001).
- Fei, Y. J.; Kanai, Y.; Nussberger, S.; Ganapathy, V.; Leibach, F. H.; Romero, M. F.; Singh, S. K.; Boron, W. F. und Hediger, M. A.  
*"Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter"*  
Nature **368**(6471), S. 563-566 (1994).

Fichtl, B.

*"Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie"* in: "Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie"

Hrsg.: Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W. und Starke, K.

Spektrum, akad. Verlag; Heidelberg, Berlin, Oxford; 7 Auflage (1996) S. 3-102.

Fleisher, D.

*"Biological transport phenomena in the gastrointestinal tract: cellular mechanisms"* in: "Transport Processes in Pharmaceutical Systems"

Hrsg.: Amidon, G. L.; Lee, P. I. und Topp E. M.

Marcel, Dekker, Inc.; New York, Basel; (2000) S. 147-184.

Florence, A. T.

*"Surfactant interactions with biomembranes and drug absorption"*

Pure Appl. Chem. **53**(11), S. 2057-2068 (1981).

Fogh, J.; Fogh, J M. und Orfeo, T.

*"One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice"*

J. Nat. Cancer Inst. **59**(1), S. 221-226 (1977).

Food and Drug Administration: Center for Drug Evaluation and Research (CDER)

*"FDA guidance for industry: waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms containing certain active moieties/active ingredients based on a biopharmaceutics classification system"*  
(August 2000).

Fromm, M. F.; Busse, D.; Kroemer, H. K. und Eichelbaum, M.

*"Differential induction of prehepatic and hepatic metabolism of verapamil by rifampin"*

Hepatology **24**(4), S. 796-801 (1996).

Fromm, M. und Hierholzer, K.

*"Epithelien"* in: "Physiologie des Menschen"

Hrsg.: Schmidt, R. F.; Thews, G. und Lang, F.

Kap. 34; Springer-Verlag; Berlin; Heidelberg; 28. Auflage (2000) S. 719-736.

- Fuhr, U.; Wolff, T.; Harder, S.; Schymanski, P. und Staib, A. H.  
*"Quinolone inhibition of cytochrome P-450-dependent caffeine metabolism in human liver microsomes"*  
Drug Metab. Dispos. **18**(6), S. 1005-1010 (1990).
- Fujimoto, T. und Mitsuhashi, S.  
*"In vitro antibacterial activity of DR-3355, the S(-)-isomer of ofloxacin"*  
Chemotherapy **36**(4), S. 268-76 (1990).
- Geisslinger, G.; Schuster, O.; Stock, K. P.; Loew, D.; Bach, G. L. und Brune, K.  
*"Pharmacokinetics of S(+)- and R(-)-ibuprofen in volunteers and first clinical experience of S(+)-ibuprofen in rheumatoid arthritis"*  
Eur. J. Pharmacol. **38**(5), S. 493-497 (1990).
- Gres, M. C.; Julian, B.; Bourrie, M.; Meunier, V.; Roques, C.; Berger, M.; Boulenc, X.; Berger, Y. und Fabre, G.  
*"Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line"*  
Pharm. Res. **15**(5), S. 726-733 (1998).
- Griffiths, N. M.; Hirst, B. H. und Simmons, N. L.  
*"Active intestinal secretion of the fluoroquinolone antibacterials ciprofloxacin, norfloxacin and pefloxacin; a common secretory pathway?"*  
J. Pharmacol. Exp. Ther. **296**(2), S. 496-502 (1994).
- Hall, S. D.; Thummel, K. E.; Watkins, P. B.; Lown, K. S.; Benet, L. Z.; Paine, M. F.; Mayo, R. R.; Turgeon, D.K.; Bailey, D. G.; Fontana, R. J. und Wrighton, S. A.  
*"Molecular and physical mechanisms of first-pass extraction"*  
Drug Metab. Dispos. **27**(2), S. 161-166 (1999).
- Hartiala, K.  
*"Metabolism of hormones, drugs and other substances by the gut"*  
Physiol. Rev. **53**(2), S. 496-534 (1973).
- Hayakawa, I.; Atarashi, S.; Yokohama, S.; Imamura, M.; Sakano, K. und Furukawa M.  
*"Synthesis and antibacterial activities of optically active ofloxacin"*  
Antimicrob. Agents Chemother. **29**(1), S. 163-164 (1986).

Hebert, M. F.

*"Contributions of hepatic and intestinal metabolism and P-glycoprotein to cyclosporine and tacrolimus oral drug delivery"*

Adv. Drug Deliv. Rev. **2(3)**, S. 201-214 (1997).

Hebert, M. F.; Fisher, R. M.; Marsh, C. L.; Dressler, D. und Bekersky, I.

*"Effects of rifampin on tacrolimus pharmacokinetics in healthy volunteers"*

J. Clin. Pharmacol. **39(1)**, S. 91-96 (1999).

Hebert, M.F.; Roberts, J. P.; Prueksaritanont, T. und Benet, L. Z

*"Bioavailability of cyclosporine with concomitant rifampin administration is markedly less than predicted by hepatic enzyme induction"*

Clin. Pharmacol. Ther. **52(5)**, S. 453-457 (1992).

Hendel, J. und Brodthagen, H.

*"Enterhepatic Cycling of methotrexate estimated by use of the D-isomer as a refernce marker "*

Eur. J. Clin. Pharmacol. **26(1)**, S. 103-107 (1984).

Hidalgo, I. J. und Borchardt, R. T.

*"Transport of a large neutral amino acid (phenylalanine) in a human intestinal epithelial cell line: Caco-2"*

Biochim. Biophys. Acta **1028(1)**, S. 25-30 (1990).

Hidalgo, I. J. und Borchardt, R. T.

*"Transport of bile acids in a human intestinal epithelial cell line, Caco-2"*

Biochemica et Biophysica ACTA **1035(1)**, S. 97-103 (1990).

Hidalgo, I. J.; Bhatnagar, P.; Lee, C. P.; Miller, J.; Cucullino, G. und Smith, P. L.

*"Structural requirements for interaction with the oligopeptide transporter in Caco-2 cells"*

Pharm. Res. **12(2)**, S. 317-319 (1995).

Hidalgo, I. J.; Raub, T. J. und Borchardt, R. T.

*"Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability"*

Gastroenterology **96(3)**, S. 736-749 (1989).

- Ho, F. H. N.; Raub, T. J.; Burton, P. S., Barsuhn, C. L.; Adson, A.; Audus, K. L. und Borchardt R. T.  
*"Quantitative approaches to delineate passive transport mechanisms in cell culture monolayers"* in: "Pharmaceutical Processes in Pharmaceutical Systems"  
Hrsg.: Amidon, G. L.; Lee, P. I. und Topp, E. M.  
Maecel Dekker, INC. Verlag; New York; Basel; 1. Auflage (2000) S. 219-316.
- Holtbecker, N.; Fromm, M. F.; Kroemer, H. K.; Ohnhaus, E. E. und Heidemann, H.  
*"The nifedipine-rifampin interaction: evidence for induction of gut wall metabolism"*  
Drug Metab. Dispos. **24**(10), S. 1121-1123 (1996).
- Horvath, J. und Dolník, V.  
*"Polymer wall coatings for capillary electrophoresis (review)"*  
Electrophoresis **22**(4), S. 644-655 (2001).
- Hu, M. und Borchardt, R. T.  
*"Mechanism of L-alpha-methyldopa transport through a monolayer of polarized human intestinal epithelial cells (caco-2)"*  
Pharm. Res. **7**(12), S. 1313-1319 (1990).
- Hunter, J.; Hirst, B. H. Simmons, N. L.  
*"Drug absorption limited by P-glycoprotein-mediated secretory drug transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers"*  
Pharm. Res. **10**(5), S. 743-749 (1993<sup>a</sup>).
- Hunter, J.; Jepson, M. A.; Tsuruo, T.; Simmons, N. L. und Hirst, B. H.  
*"Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. Kinetics of vinblastine secretion and interaction with modulators"*  
J. Biol. Chem. **268**(20), S. 14991-14997 (1993<sup>b</sup>).
- Johnson, L. R.  
*"Digestion and Absorption"* in: "Gastrointestinal Physiology"  
Hrsg.: Johnson, L. R.  
Mosby, Inc.; Missouri, USA; 6. Auflage (2001).
- Jorgenson, J. W. und Lukas, K. D.  
*"Capillary zone electrophoresis"*  
Science, **222**(4621), S. 266-272 (1983).

- Jorgenson, J. W. und Lukas, K. D.  
*"Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries"*  
Anal. Chem. **53**(8), S. 1298-1302 (1981<sup>a</sup>).
- Jorgenson, J. W. und Lukas, K. D.  
*"High resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis"*  
J. Chromatogr. **218**, S. 209-216 (1981<sup>b</sup>).
- Kararli, T. T.  
*"Gastrointestinal absorption of drugs"*  
Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. **6**(1), S. 39-86 (1989).
- Karlson, P.; Doenecke, D. und Koolman, J.  
*"Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler"*  
Thieme-Verlag; Stuttgart, New York; 14. Auflage (1994).
- Karlsson, J.; Kuo, S. M.; Ziemniak, J. und Artursson, P.  
*"Transport of celiprolol across human intestinal epithelial (Caco-2) cells: mediation of secretion by multiple transporters including P-glycoprotein"*  
Brit. J. Pharm. **110**(3), S. 1009-1016 (1993).
- Katoh, M.; Nakajima, M.; Yamazaki, H. und Yokoi, T.  
*"Inhibitory effects of CYP3A4 substrates and their metabolites on P-glycoprotein-mediated transport"*  
Eur. J. Pharm. Sci. **12**(4), S. 505-513 (2001).
- Kim, R. B.; Fromm, M. F.; Wandel, C.; Leake, B.; Wood, A. J.; Roden, D. M. und Wilkinson, G. R.  
*"The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors"*  
J. Clin. Invest. **101**(2), S. 289-294 (1998).
- Kim, R. B.; Wandel, C.; Leake, B.; Cvetkovic, M.; Fromm, M. F.; Dempsey, P. J.; Roden, M. M.; Belas, F.; Chaudhary, A. K.; Roden, D. M.; Wood, A. J. und Wilkinson, G. R.  
*"Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein"*  
Pharm. Res. **16**(3), S. 408-414 (1999).

- Knipp, G. T.; Ho, N. F. H.; Barsuhn, C. L. und Borchardt, R. T.  
*"Paracellular diffusion in Caco-2 cell monolayers: effect of perturbation on the transport of hydrophilic compounds that vary in charge and size"*  
J. Pharm. Sci. **86**(10), S. 1105-1110 (1997).
- Koch und Ritschel.  
*"Synopsis der Biopharmazie und Pharmakokinetik"*  
ecomed-Verlag; Landsberg, München; (1986).
- Kolars, J. C.; Schmiedlin-Ren, P.; Schuetz, J. D.; Fang, C. und Wathkins, P. B.  
*"Identification of rifampin- inducible P450III<sub>A4</sub> (CYP3A4) in human small bowel enterocytes"*  
J. Clin. Invest. **90**(5), S. 1871-1878 (1992).
- Kotegawa, T.; Laurijssens, B. E.; von Moltke, L. L.; Cotreau, M. M.; Perloff, M. D.; Venkatakrishnan, K.; Warrington, J. S.; Granda, B. W.; Harmatz, J. S. und Greenblatt, D. J.  
*"In vitro, pharmacokinetic, and pharmacodynamic interactions of ketoconazole and midazolam in the rat"*  
J. Pharmacol. Exp. Ther. **302**(3), S. 1228-1237 (2002).
- Kuhn, R. und Hoffstetter-Kuhn, S.  
*"Capillary electrophoresis: principles and practice"*  
Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg; 1. Auflage (1993).
- Lehr, C. M. und Lee, V. H.  
*"Binding and transport of some bioadhesive plant lectins across Caco-2 cell monolayers"*  
Pharm. Res. **10**(12), S. 1796-1799 (1993).
- Leibovitz, A.; Stinson, J. C.; McCombs, W. B. 3rd; McCoy, C. E.; Mazur, K. C. und Mabry, N. D.  
*"Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines"*  
Cancer Res. **36**(12), S. 4562-4569 (1976).

- Lown, K. S.; Mayo, R. R.; Leichtman, A. B.; Hsiao, H. L.; Turgeon, D. K.; Schmieidlin-Ren, P.; Brown, M. B.; Guo, W.; Rossi, S. J.; Benet, L. Z. und Watkins, P. B.  
*"Role of intestinal P-glycoprotein (MDR1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine"*  
Clic. Pharmacol. Therap. **62**(3), S. 248-260 (1997).
- Mahraoui, L; Rousset, M.; Dussaulx, E.; Darmoul, D.; Zweibaum, A. und Brot-Laroche, E.  
*"Expression and localization of GLUT-5 in Caco-2 cells, human small intestine, and colon"*  
Am. J. Physiol. **263**(3 pt 1), S. G312-318 (1992).
- Matsuo, Y.; Yano, I.; Ito, T.; Hashimoto, Y. und Inui, K.-I.  
*"Transport of quinolone antibacterial drugs in a kidney epithelial cell line, LLC-PK<sub>1</sub>"*  
J. Pharmacol. Exp. Ther. **287**(2), S. 672-678 (1998).
- McKinnon, R. A.; Burgess, W. M.; Hall, P. De. La. M.; Roberts-Thomson, S. J.; Gonzalez, F. J. und McManus, M. E.  
*"Characterization of CYP3A gene subfamily expression in human gastrointestinal tissues"*  
Gut **36**(2), S. 259-267 (1995).
- Mehvar, R. und Jamali, F.  
*"Pharmacokinetics analysis of the enantiomers inversion of chiral nonsteroidal antiinflammatory drugs"*  
Pharm. Res. **5**(2 ), S. 76-79 (1988).
- Meier, J.; Rettig, H. und Hess, H  
*"BIOPHARMAZIE: Theorie und Praxis der Pharmakokinetik"*  
Thieme-Verlag; Stuttgart, New; (1981).
- Melanson, J. E.; Baryla, N. E. und Lucy, C. A.  
*"Double-chained surfactants for semipermanent wall coatings in capillary electrophoresis"*  
Anal. Chem. **72**(17), S. 4110-4114 (2000).



- Mikkers, F. E. P.; Everaerts, F. M. und Verheggen, T. P. E. M.  
*"High performance zone elektrophoresis"*  
J. Chromatogr. **169**, S. 11 (1974).
- Morrissey, I.; Hoshino, K.; Sato, K.; Yoshida, A.; Hayakawa, I.; Bures, M, G.  
und Shen, L. L.  
*"Mechanism of differential activities of ofloxacin enantiomers"*  
Antimicrob. Agents Chemother. **40**(8), S. 1775-1784 (1996).
- Murata, M.; Tamai, I.; Sai, Y.; Nagata, O.; Kato, H.; Sugiyama, Y. und Tsuji, K.  
*"Hepatobiliary transport kinetics of HSR-903, a new quinolone antibacterial agent"*  
Drug Metab. Dispos. **26**(11), S. 1113-1119 (1998).
- Nellans, H. G.  
*"Mechanisms of peptide and protein absorption. (1) Paracellular intestinal transport: modulation of absorption"*  
Adv. Drug Delivery Rev. **7**(3), S. 339-364 (1991).
- Okazaki, O.; Kurata, T. und Tachizawa, H.  
*"Stereoselective metabolic disposition of enantiomers of ofloxacin in rats"*  
Xenobiotica **19**(4), S. 419-429 (1989).
- Paine, M. F.; Schmiedlin-Ren, P. und Watkins, P. B.  
*"Cytochrome P-450 1A1 expression in human small bowel: interindividual variation and inhibition by ketoconazole"*  
Drug Metabol. Dispos. **27**(3), S. 360-364 (1999).
- Petersen, U.  
*"Die Evolution der Chinolone: Von der Nalidixinsäure zu den Chinolonen der dritten Generation"*  
Pharmazie in unserer Zeit **5**, S. 376-381 (2001).
- Pfeifer, S.; Pfliegel, P. und Borchert, H. H.  
*"Biopharmazie: Pharmakokinetik - Bioverfügbarkeit - Biotransformation"*  
Ullstein Mosby GmbH Verlag; Berlin, Wiesbaden; 3 Auflage (1995).

- Pinto, M.; Robine-Leon, S.; Appay, M.-D.; Kedinger, M.; Triadou, N.; Dussaulx, E.; Lacroix, B.; Simon-Assmann, P.; Haffen, K.; Fogh, J. und Yweibaum, A  
*"Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture"*  
Biol. Cell (47), S. 323-330 (1983).
- Prieto, J. G.; Barrio, J. P.; Alvarez, A. I. und Gomez, G.  
*"Kinetic mechanism for the intestinal absorption of ofloxacin"*  
J. Pharm. Pharmacol. **40**(3), S. 211-212 (1988).
- Quang, C. und Khaledi, M. G.  
*"Chiral separation of acidic compounds by dextrin-mediated capillary zone electrophoresis"*  
J. High Resol. Chromatogr. **17**(8), S. 609-612 (1994).
- Rabbaa, L.; Dautrey, S.; Colas-Linhart, N.; Carbon, C. und Farinotti, R.  
*"Intestinal elimination of ofloxacin enantiomers in the rat: evidence of a carrier-mediated process"*  
Antimicrob. Agents Chemother. **40**(9), S. 2126-2130 (1996).
- Rabbaa, L.; Dautrey, S.; Colas-Linhart, N.; Carbon, C. und Farinotti, R.  
*"Absorption of ofloxacin isomers in the rat small intestine"*  
Antimicrob. Agents Chemother. **41**(10), S. 2274-2277 (1997).
- Raeissi, S. D.; Guo, Z.; Dobson, G. L.; Artursson, P. und Hidalgo, I. J.  
*"Comparison of CYP3A activities in a subclone of Caco-2 cells (TC7) and human intestine"*  
Pharm. Res. **14**(8), S. 1019-1025 (1997).
- Raeissi, S. D.; Hidalgo, I. J.; Segura-Aguilar, J. und Artursson, P.  
*"Interplay between CYP3A-mediated metabolism and polarized efflux of terfenadine and its metabolites in intestinal epithelial Caco-2 (TC7) cell monolayers"*  
Pharm. Res. **16**(5), S. 625-632 (1999).
- Raeissi, S. D.; Li, J. und Hidalgo, I. J.  
*"The role of an alpha-amino group on H<sup>+</sup>-dependent transepithelial transport of cephalosporins in Caco-2 cells"*  
J. Pharm. Pharmacol. **51**(1), S. 35-40 (1999).

Rettig, H.

*"Physiologische Transportvorgänge"* in: "BIOPHARMAZIE: Theorie und Praxis der Pharmakokinetik"

Hrsg.: Meier, J.; Rettig, H. und Hess, H.

Thieme-Verlag; Stuttgart, New York; (1981).

Righetti, P. G.; Gelfi, C.; Verzola, B. und Castelletti, L.

*"The state of the art of dynamic coatings"*

Electrophoresis **22**(4), S. 603-611 (2001).

Roth, H. J.; Müller, C. E. und Folkers, G.

"Stereochemie und Arzneistoffe"

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.; Stuttgart, 5. Auflage (1998).

Rubas, W.; Jezyk, N. und Grass, G. M.

*"Mechanism of dextran transport across rabbit intestinal tissue and a human colon cell-line (Caco-2)"*

J. Drug Targeting **3**(1), S. 15-21 (1995).

Sasabe, H.; Terasaki, T.; Tsuji, A. und Sugiyama, Y.

*"Carrier-mediated hepatic uptake of quinolone antibiotics in the rat"*

J. Pharmacol. Exp. Ther **282**(1), S. 162-171 (1997).

Sasabe, H.; Kato, Y.; Terasaki, T.; Tsuji, A. und Sugiyama, Y.

*"Differences in the hepatobiliary transport of two quinolone antibiotics, grepafloxacin and lomefloxacin, in the rat"*

Biopharm. Drug Dispos. **20**(3), S. 151-158 (1999).

Schwarz, U. I.; Gramatte, T.; Krappweis, J.; Oertel, R. und Kirch, W.

*"P-glycoprotein inhibitor erythromycin increases oral bioavailability of talinolol in humans"*

Inter. J. Clin. Pharmacol. Ther. **38**(4), S. 161-167 (2000).

Sörgel, F. und Kinzig, M.

*"Pharmakokinetik of gyrase inhibitors. Part 1: basic chemistry and gastrointestinal disposition"*

Amer. J. Med. **94**(Suppl. 3A), S. 44-55 (1993).

- Sörgelm F.; Bulitta, M. und Kinzig-Schippers, M.  
*"Wie gut wirken die Gyrasehemmer? Pharmakokinetik der Chinolone"*  
Pharmazie in unserer Zeit **5**, S. 418-427 (2001).
- Sugiyama, T.; Yamamoto, A.; Kawabe, Y.; Uchiyama, T. und Quan, Y.  
*"Effects of various absorption enhancers on the intestinal absorption of water soluble drugs by in vitro Ussing chamber method: correlation with an in situ absorption experiments"*  
Biol. Pharm. Bull. **20**(7), S. 812-814 (1997).
- Sulzbacher, A.; Jarosch, A.; Schüler, R.; Acerbi, D.; Ventura, P.; Puccini, P. und Woodcock, B. G.  
*"Validation of Caco-2 cell monolayer culture for drug transport studies"*  
Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. **35**(4), S. 151-154 (1997).
- Thews, G.; Mutschler, E. und Vaupel, P.  
*"Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen"*  
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; Stuttgart; (1999).
- Thwaites, D. T.; Kennedy, D. J.; Raldua, D.; Anderson, C. M. H.; Mendoza, M. E.; Bladen, C. L. und Simmons, N. L.  
*"H<sup>+</sup>/dipeptide absorption across the human intestinal epithelium is controlled indirectly via a functional Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger"*  
Gastroenterology **122**(5), S. 1322-1333 (2002).
- Toivonen, L.; Hanninen, O. und Hartiala, K.  
*"Drug metabolism in canine duodenum"*  
Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. **51**(1), S. 8-10 (1973).
- Trausch, B.; Oertel, R.; Richter, K. und Gramatte, T.  
*"Disposition and bioavailability of the I-adrenoceptor antagonist talinolol in man"*  
Biopharm. Drug Dispos. **16**(5), S. 403-414 (1995).
- Ussing, H. H. und Zerahn, K.  
*"Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin"*  
Acta Physiol. Scand **23**, S. 110-127 (1951).

- Van Hoogdalem, E. J.; de Boer, A. G. und Breimer, D. D.  
*"Intestinal drug absorption enhancement: an overview"*  
Pharmacol. Ther. **44**(3), S. 407-443 (1989).
- Vaupel, P.  
*"Funktion des Magen-Darm-Trakts"* in: "Physiologie des Menschen"  
Hrsg.: Schmidt, R. F.; Thews, G. und Lang, F.  
Kap. 8; Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg; 28 Auflage (2000) S. 806-848.
- Verho, M.; Malerczyk, V.; Damm, D. und Lehr, K. H.  
*"Pharmacokinetics of levofloxacin in comparison to the racemic mixture of ofloxacin in man"*  
Drug Metabol. Drug Interact. **13**(1), S. 57-67 (1996).
- Washington, N.; Washington, C. und Wilson, C. G.  
*"Drug absorption from the small intestine"* in: "Physiological Pharmaceutics: Barriers to drug absorption"  
Taylor und Francis Verlag; London, New York; 2 Auflage (2001).
- Weinberger, R.  
*"Practical Capillary Electrophoresis"*  
Academic Press; San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo; 2. Auflage (2000)
- Welling, P.  
*"Drug metabolism"* in: "Pharmacokinetics: Processes, Mathematics and Applications"  
American Chemical Society; Washington, DC; 2. Auflage (1997) S. 145-162.
- Wetterich, U.; Spahn-langguth, H.; Mutschler, E.; Terhaag, B.; Rösch, W. und Langguth, P.  
*"Evidence for intestinal secretion as an additional clearance pathway of talinolol enantiomers: concentration- and dose-dependent absorption in vitro and in vivo"*  
Pharm. Res. **13**(4), S. 514-522 (1996)

- Westphal, K.; Weinbrenner, A.; Zschiesche, M.; Franke, G.; Knoke, M.; Oertel, R.; Fritz, P.; von Richter, O.; Warzok, R.; Hachenberg, T.; Kauffmann, H. M.; Schrenk, D.; Terhaag, B.; Kroemer, H. K. und Siegmund, W.  
*"Induction of P-glycoprotein by rifampin increases intestinal secretion of talinolol in human beings: a new type of drug/drug interaction"*  
Clin. Pharmacol. Ther. **68**(4), S. 345-355 (2000).
- Williams, K. und Lee, E.  
*"Importance of drug enantiomers in clinical pharmacology"*  
Drugs(30), S. 333-354 (1985).
- Wilson, G.; Davis, S. S.; Illum, L. und Zweibaum, A.  
*"Pharmaceutical applications of cell and tissue culture to drug transport"*  
Plenum Press; New York (1990).
- Wilson, G.; Hassan, I. F.; Dix, C. J.; Williamson, I.; Shah, R.; Mackay, M. und Artursson, P.  
*"Transport and permeability properties of human Caco-2 cells: an in vitro model of the intestinal epithelial cell barrier"*  
J. Controlled Release **11**(1-3), S. 25-40 (1990).
- Wilson, T. H. und Wiseman, G.  
*"The use of everted small intestine for the study of the transference of substance from mucosal to the serosal surface"*  
J. Physiol. London **123**, S. 116-125 (1954).
- Wong, F. A. und Flor, S. C.  
*"The metabolism of ofloxacin in humans"*  
Drug Metab. Dispos. **18**(6), S. 1103-1104 (1990).
- Yamaguchi, H.; Yano, I.; Hashimoto, K. und Inui, K.-I.  
*"Secretory mechanism of grepafloxacin and levofloxacin in the human intestinal cell line Caco-2"*  
J. Pharmacol. Exp. Ther. **295**(1), S. 360-366 (2000).
- Yao, T.-W.; Zeng, S. und Li, X.  
*"Glucuronidation metabolism of ofloxacin enantiomers in rat microsomes treated with different inducers"*  
Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi **14**(4), S. 268-272 (2000).

- Yazdanian, M.; Glynn, S. L.; Wright, J. L. und Hawi, A.  
*"Correlating partitioning and Caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds"*  
Pharm. Res. **15**(9), S. 1490-1494 (1998).
- Yee, S.  
*"In vitro permeability across Caco- 2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man - fact myth"*  
Pharm. Res. **14**(6), S. 763-766 (1997).
- Yu, H.; Cook, T. J. und Sinko, P. J.  
*"Evidence for diminished functional expression of intestinal transport in Caco-2 cell monolayer at high passages"*  
Pharm. Res. **14**(6), S. 757-762 (1997).
- Zschesche, M.; Lemma, G. L.; Klebingat, K.-J.; Franke, G.; Terhaag, B.; Hoffmann, A.; Gramatte, T.; Kroemer, H. K. und Siegmund, W.  
*"Stereoselective disposition of talinolol in man"*  
J. Pharm. Sci. **91**(2), S. 303-311 (2002).
- Zweibaum, A.  
*"Differentiation of human colon cancer cells"* in: "Pharmaceutical applications of cell and tissue culture to drug transport"  
Hrsg.: Wilson, G.; Dais, S. S.; Illum, L. und Zweibaum, A.  
Plenum Press; New York; (1990).

# KAPITEL 8

## ANHANG

**Tab. 8.1** Messdaten der Kalibrierung von Propranolol

	Propranolol [µg/ml]	$\frac{AUC_{Propranolol}}{AUC_{Procain}}$	Propranolol [µg/ml]	$\frac{AUC_{Propranolol}}{AUC_{Procain}}$
	294,50	32,481	42,08	4,770
	294,50	32,445	42,08	4,781
	294,50	32,370	42,08	4,795
Mittelwert		32,432		4,782
Relsdv [%]		0,176		0,265
	235,64	26,084	18,41	2,157
	235,64	26,205	18,41	2,185
	235,64	26,151	18,41	2,177
Mittelwert		26,147		2,173
Relsdv [%]		0,231		0,663
	176,72	19,853	9,50	1,096
	176,72	19,848	9,50	1,101
	176,72	19,927	9,50	1,113
Mittelwert		19,876		1,103
Relsdv [%]		0,223		0,780
	117,82	13,134	4,83	0,549
	117,82	13,027	4,83	0,558
	117,82	13,084	4,83	0,565
Mittelwert		13,082		0,557
Relsdv [%]		0,410		1,426
	73,63	8,317		
	73,63	8,285		
	73,63	8,266		
Mittelwert		8,289		
Relsdv [%]		0,310		



**Tab. 8.2** Messdaten der Systempräzision für Propranolol

Jeweils 14,5 mg Propranolol /100ml	
AUC <sub>Propranolol</sub> /AUC <sub>Procain-HCl</sub>	
	12,995
	12,980
	12,950
	13,042
	13,303
	13,076
	13,336
	13,233
	13,285
	13,134
	13,027
	13,084
Mittelwert	13,120
Relsdv [%]	0,990

**Tab. 8.3** Messdaten der Methodenpräzision für Propranolol

Jeweils 22 mg Propranolol /100ml			
AUC <sub>Propranolol</sub> /AUC <sub>Procain-HCl</sub>			
	19,491	19,562	19,853
	19,469	19,653	19,848
	19,424	19,612	19,927
Mittelwert	19,461	19,609	19,876
Relsdv [%]	0,176	0,231	0,223
	19,700	19,961	20,032
	19,539	19,885	20,080
	19,626	19,839	20,138
Mittelwert	19,622	19,895	20,083
Relsdv [%]	0,410	0,310	0,265
Methodenpräzision		19,758	
Relsdv der Methodenpräzision [%]		1,170	

**Tab. 8.4** Messdaten der Kalibrierung von Ibuprofen-Enantiomeren

	racem. Ibuprofen [µg/ml]	$\frac{AUC_{R-Ibuprofen}}{AUC_{S-Naproxen}}$	$\frac{AUC_{S-Ibuprofen}}{AUC_{S-Naproxen}}$
	251,78	0,9025	0,9866
	251,78	0,9069	0,9872
	251,78	0,9042	0,9878
Mittelwert		0,9045	0,9872
Relsdv [%]		0,2432	0,0602
	209,81	0,7573	0,8260
	209,81	0,7588	0,8278
	209,81	0,7606	0,8345
Mittelwert		0,7589	0,8294
Relsdv [%]		0,2160	0,5411
	157,36	0,5796	0,6470
	157,36	0,5829	0,6242
	157,36	0,5838	0,6480
Mittelwert		0,5821	0,6397
Relsdv [%]		0,3799	2,0998
	104,91	0,4053	0,4449
	104,91	0,3910	0,4420
	104,91	0,3866	0,4258
Mittelwert		0,3943	0,4376
Relsdv [%]		2,4881	2,3449
	52,45	0,2057	0,2169
	52,45	0,1957	0,2117
	52,45	0,1935	0,2192
Mittelwert		0,1983	0,2159
Relsdv [%]		3,2875	1,7751
	14,99	0,0600	0,0634
	14,99	0,0599	0,0688
	14,99	0,0618	0,0672
Mittelwert		0,0606	0,0665
Relsdv [%]		1,7508	4,1532

**Tab. 8.5** Messdaten der Systempräzision für R- und S-Ibuprofen

racem. Ibuprofen [µg/ml]	$\frac{AUC_{R-Ibuprofen}}{AUC_{S-Naproxen}}$	$\frac{AUC_{S-Ibuprofen}}{AUC_{S-Naproxen}}$
104,9	0,5641	0,6167
104,9	0,5668	0,6170
104,9	0,5652	0,6174
104,9	0,5680	0,6195
104,9	0,5691	0,6209
104,9	0,5705	0,6259
104,9	0,5797	0,6370
104,9	0,5829	0,6242
104,9	0,5839	0,6388
104,9	0,6081	0,6409
104,9	0,5866	0,6353
104,9	0,5799	0,6377
Mittelwert	0,577	0,628
Relsdv [%]	2,188	1,528

**Tab. 8.6** Messdaten der Methodenpräzision für R-Ibuprofen

Jeweils ca. 10,5 mg R-Ibuprofen /100ml			
	$AUC_{R-Ibuprofen}/AUC_{S-Naproxen}$		
	0,7521	0,7728	0,7321
	0,7557	0,7772	0,7357
	0,7535	0,7784	0,7335
Mittelwert	0,7538	0,7762	0,7338
Relsdv [%]	0,2432	0,3799	0,2499
	0,7573	0,8107	0,7673
	0,7588	0,7820	0,7688
	0,7606	0,7732	0,7706
Mittelwert	0,7589	0,7887	0,7689
Relsdv [%]	0,2160	2,4881	0,2132
Methodenpräzision		0,7634	
Relsdv der Methodenpräzision [%]		2,5011	

**Tab. 8.7** Messdaten der Methodenpräzision für S-Ibuprofen

Jeweils ca. 10,5 mg S-Ibuprofen /100ml			
	AUCS-Ibuprofen/AUCS-Naproxen		
	0,8122	0,8626	0,8242
	0,8126	0,8323	0,8426
	0,8132	0,8640	0,8432
Mittelwert	0,8127	0,8530	0,8367
Relsdv [%]	0,0610	2,0998	1,2916
	0,8260	0,8898	0,8260
	0,8278	0,8841	0,8278
	0,8345	0,8517	0,8345
Mittelwert	0,8294	0,8752	0,8294
Relsdv [%]	0,5411	2,3449	0,5411
Methodenpräzision		0,8394	
Relsdv der Methodenpräzision [%]		2,6023	

**Tab. 8.8** Messdaten der Kalibrierung von Ofloxacin-Enantiomeren

	racem. Ofloxacin [ng/ml]	$\frac{AUC_{L-Ofloxacin}}{AUC_{Enrofloxacin}}$	$\frac{AUC_{D-Ofloxacin}}{AUC_{Enrofloxacin}}$
	40,64	0,0279	0,0294
	40,64	0,0287	0,0291
	40,64	0,0284	0,028
Mittelwert	40,64	0,0283	0,0288
Relsdv [%]	40,64	1,4281	2,5594
	81,27	0,0619	0,0613
	81,27	0,0621	0,0605
	81,27	0,0597	0,0622
Mittelwert	81,27	0,0612	0,0613
Relsdv [%]	81,27	2,1759	1,3874
	162,55	0,1209	0,1194
	162,55	0,1231	0,1227
	162,55	0,1237	0,1215
Mittelwert	162,55	0,1226	0,1212
Relsdv [%]	162,55	1,2025	1,3782

	325,09	0,2666	0,2549
	325,09	0,2565	0,254
	325,09	0,2588	0,2528
Mittelwert	325,09	0,2606	0,2539
Relsdv [%]	325,09	2,0314	0,4150
	538,27	0,4242	0,4239
	538,27	0,4296	0,4189
	538,27	0,4267	0,4185
Mittelwert	538,27	0,4268	0,4204
Relsdv [%]	538,27	0,6332	0,7157
	713,79	0,6029	0,5893
	713,79	0,5894	0,5798
	713,79	0,5825	0,5679
Mittelwert	713,79	0,5916	0,579
Relsdv [%]	713,79	1,7540	1,85
	912,06	0,7344	0,7132
	912,06	0,7365	0,7149
	912,06	0,7331	0,7153
Mittelwert	912,06	0,7347	0,7145
Relsdv [%]	912,06	0,2335	0,1561
	1059,17	0,8637	0,8479
	1059,17	0,8711	0,8554
	1059,17	0,8531	0,8349
Mittelwert	1059,17	0,8626	0,8461
Relsdv [%]	1059,17	1,0488	1,2259
	1262,85	1,0546	1,0261
	1262,85	1,0559	1,0235
	1262,85	1,0514	1,0201
Mittelwert	1262,85	1,054	1,0232
Relsdv [%]	1262,85	0,2197	0,2941

**Tab. 8.9** Messdaten der Systempräzision für L- und D-Ofloxacin

racem. Ofloxacin [ng/ml]	$\frac{AUC_{L-Ofloxacin}}{AUC_{Enrofloxacin}}$	$\frac{AUC_{D-Ofloxacin}}{AUC_{Enrofloxacin}}$
600	0,4350	0,438
600	0,4276	0,443
600	0,4350	0,442
600	0,4356	0,443
600	0,4339	0,450
600	0,4396	0,443
600	0,4347	0,445
600	0,4358	0,451
600	0,4303	0,447
600	0,4343	0,442
600	0,4385	0,446
600	0,4362	0,439
Mittelwert	0,435	0,444
Relsdv [%]	0,739	0,894

**Tab. 8.10** Messdaten der Methodenpräzision für L-Ofloxacin

Jeweils 521 ng/ml racem. Ofloxacin			
	$AUC_{L-Ofloxacin}/AUC_{Enrofloxacin}$		
	0,4856	0,4766	0,4801
	0,4871	0,4725	0,4789
	0,4884	0,4793	0,4832
Mittelwert	<b>0,4870</b>	<b>0,4761</b>	<b>0,4807</b>
Relsdv [%]	0,2877	0,7191	0,4616
	0,4768	0,4828	0,4924
	0,4781	0,4869	0,4950
	0,4759	0,4769	0,4929
Mittelwert	<b>0,4769</b>	<b>0,4822</b>	<b>0,4934</b>
Relsdv [%]	0,2319	1,0425	0,2796
Methodenpräzision		0,4827	
Relsdv der Methodenpräzision [%]		1,3567	

**Tab. 8.11** Messdaten der Methodenpräzision für D-Ofloxacin

Jeweils 521 ng/ml racem. Ofloxacin			
	AUC <sub>L-Ofloxacin</sub> /AUC <sub>Enrofloxacin</sub>		
	0,4150	0,4159	0,4210
	0,4170	0,4109	0,4290
	0,4170	0,4106	0,4201
Mittelwert	<b>0,4163</b>	<b>0,4125</b>	<b>0,4234</b>
Relsdv [%]	0,2774	0,7218	1,1572
	0,4129	0,4210	0,4291
	0,4140	0,4265	0,4280
	0,4141	0,4163	0,4266
Mittelwert	<b>0,4137</b>	<b>0,4213</b>	<b>0,4279</b>
Relsdv [%]	0,1610	1,2119	0,2928
Methodenpräzision		0,4192	
Relsdv der Methodenpräzision [%]		1,4373	

**Tab. 8.12** Messdaten der Systempräzision für die Talinolol-Enantiomere

racem. Talinolol [ng/ml]	$\frac{AUC_{1.Talinolol}}{AUC_{Celiprolol}}$	$\frac{AUC_{2.Talinolol}}{AUC_{Celiprolol}}$
1218	0,4697	0,4541
1218	0,4689	0,4607
1218	0,4668	0,4560
1218	0,4669	0,4608
1218	0,4611	0,4543
1218	0,4721	0,4509
1218	0,4648	0,4509
1218	0,4649	0,4598
1218	0,4605	0,4556
1218	0,4708	0,4563
1218	0,4646	0,4507
1218	0,4621	0,4515
Mittelwert	0,4661	0,4551
Relsdv [%]	0,8125	0,8318

**Tab. 8.13** Messdaten der Kalibrierung von Talinolol-Enantiomeren.

	Racem. Talinolol [ng/ml]	$\frac{AUC_{1.Talinolol}}{AUC_{Celiprolol}}$	$\frac{AUC_{2.Talinolol}}{AUC_{Celiprolol}}$
	2374,36	0,9157	0,9371
	2374,36	0,9141	0,9372
	2374,36	0,9100	0,9280
Mittelwert		0,9133	0,9341
Relsdv [%]		0,3219	0,5656
	1780,72	0,6901	0,7031
	1780,72	0,6796	0,6885
	1780,72	0,6797	0,7000
Mittelwert		0,6831	0,6972
Relsdv [%]		0,8833	1,1033
	1187,18	0,4001	0,4051
	1187,18	0,4166	0,4140
	1187,18	0,4041	0,4101
Mittelwert		0,4236	0,4097
Relsdv [%]		2,1153	1,0889
	593,58	0,1992	0,2023
	593,58	0,1994	0,2050
	593,58	0,1970	0,2034
Mittelwert		0,1985	0,2036
Relsdv [%]		0,6709	0,6668
	296,79	0,0879	0,0866
	296,79	0,0850	0,0874
	296,79	0,0864	0,0856
Mittelwert		0,0864	0,0865
Relsdv [%]		1,6786	1,0426
	148,39	0,0278	0,0251
	148,39	0,0271	0,0248
	148,39	0,0272	0,0255
Mittelwert		0,0274	0,0251
Relsdv [%]		1,3817	1,3992

Bemerkung:

1. Talinolol entspricht dem ersten Enantiomer im Elektropherogramm
2. Talinolol entspricht dem zweiten Enantiomer im Elektropherogramm



**Tab. 8.14** Messdaten der Methodenpräzision für 1. Talinolol

Jeweils 1436 ng/ml racem. Talinolol			
	AUC <sub>1. Talinolol</sub> /AUC <sub>Celiprolol</sub>		
	0,524	0,543	0,544
	0,523	0,531	0,544
	0,520	0,538	0,549
Mittelwert	0,5223	0,5375	0,5457
Relsdv [%]	0,3345	1,1362	0,4880
	0,529	0,522	0,549
	0,533	0,525	0,541
	0,537	0,527	0,545
Mittelwert	0,5328	0,5245	0,5448
Relsdv [%]	0,7133	0,5153	0,7108
Methodenpräzision		0,5346	
Relsdv der Methodenpräzision [%]		1,8579	

**Tab. 8.15** Messdaten der Methodenpräzision für 2. Talinolol

Jeweils 1436 ng/ml racem. Talinolol			
	AUC <sub>2. Talinolol</sub> /AUC <sub>Celiprolol</sub>		
	0,5668	0,5670	0,5724
	0,5668	0,5652	0,5733
	0,5613	0,5721	0,5660
Mittelwert	0,5650	0,5681	0,5706
Relsdv [%]	0,5621	0,6300	0,6976
	0,5695	0,5436	0,5754
	0,5659	0,5430	0,5796
	0,5621	0,5441	0,5740
Mittelwert	0,5658	0,5436	0,5763
Relsdv [%]	0,6540	0,1013	0,5057
Methodenpräzision		0,5649	
Relsdv der Methodenpräzision [%]		1,9856	

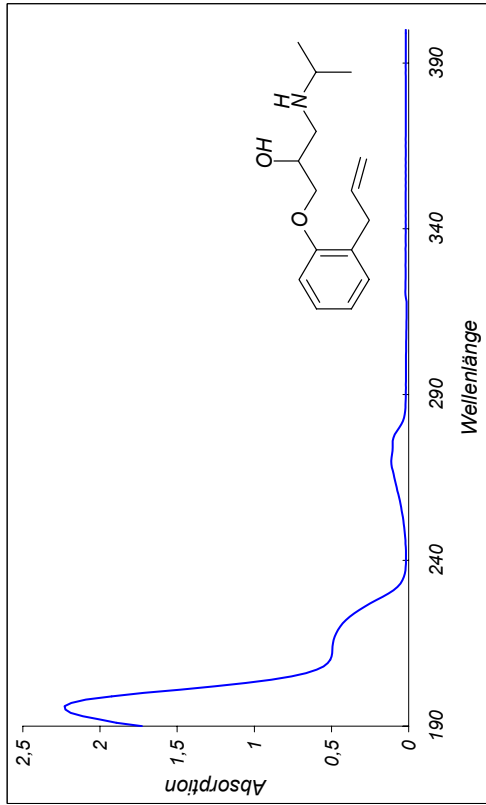


Abb. 8.2 Absorptionsspektrum von Alprenolol

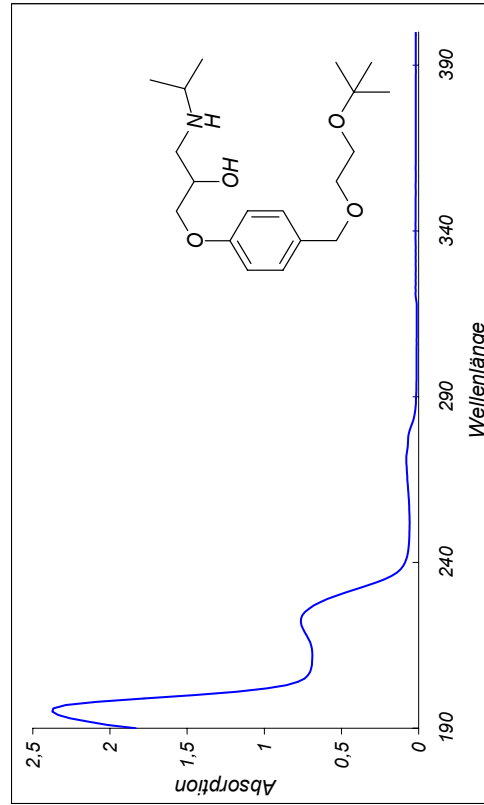


Abb. 8.4 Absorptionsspektrum von Bisoprolol.

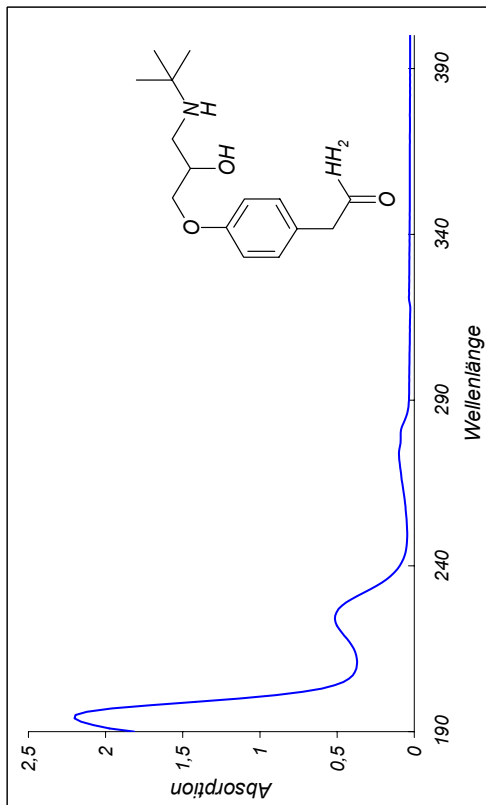


Abb. 8.1 Absorptionsspektrum von Acebutolol

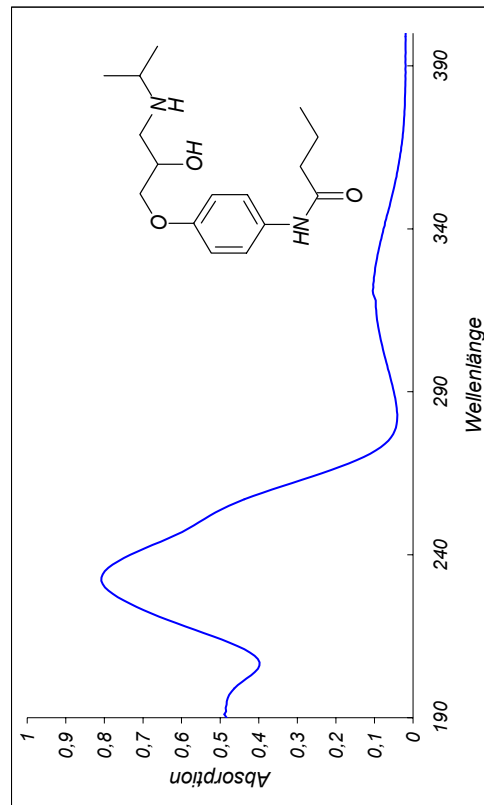


Abb. 8.3 Absorptionsspektrum von Atenolol

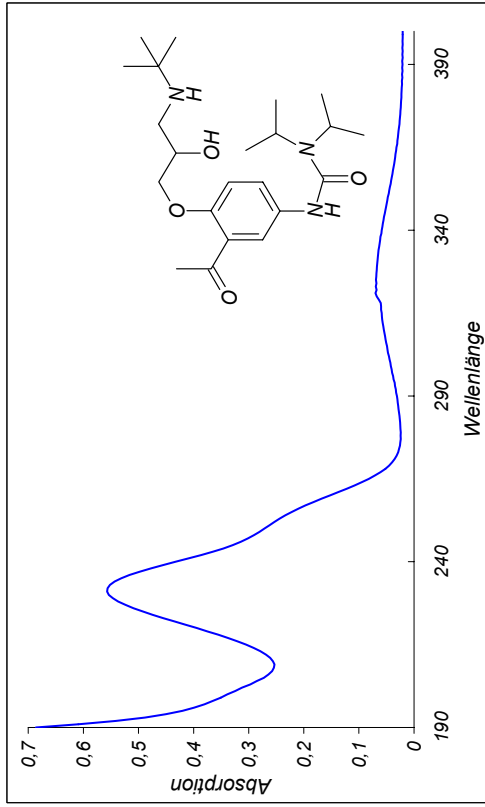


Abb. 8.6 Absorptionsspektrum von Celiprolol.

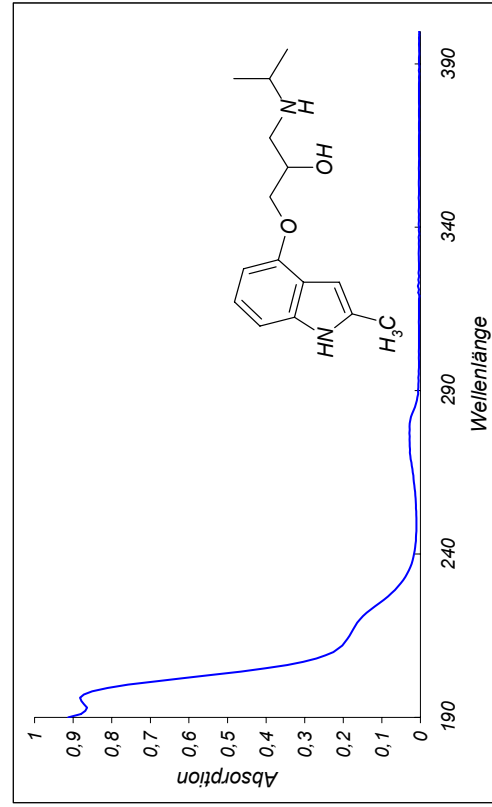


Abb. 8.8 Absorptionsspektrum von Meipranolol.

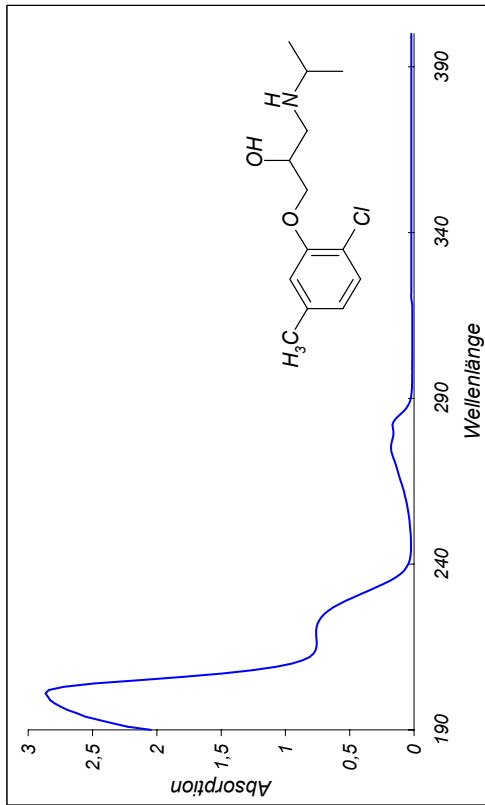


Abb. 8.5 Absorptionsspektrum von Bupranolol.

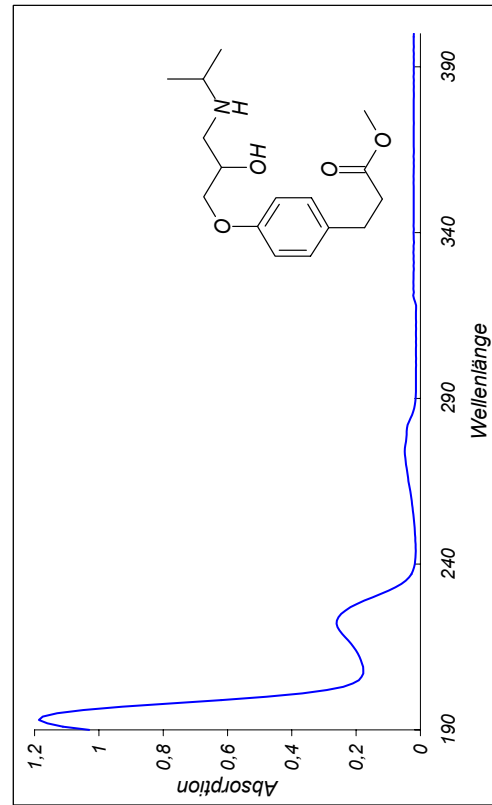


Abb. 8.7 Absorptionsspektrum von Esmolol.

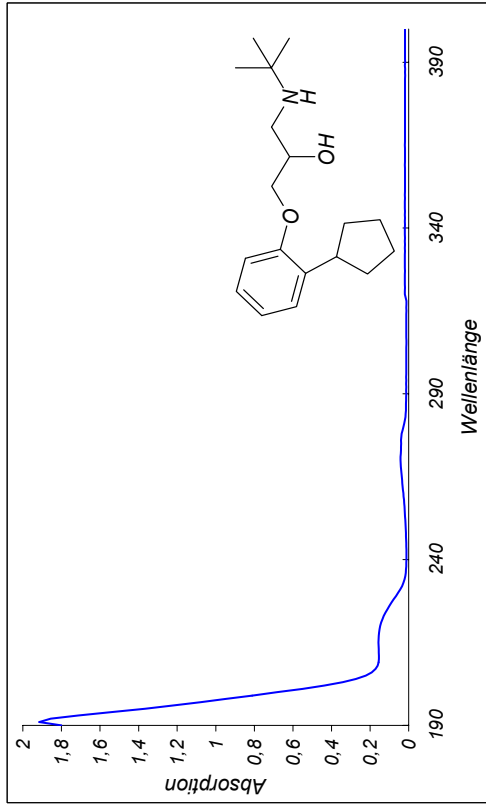


Abb. 8.10 Absorptionsspektrum von Penbutolol.

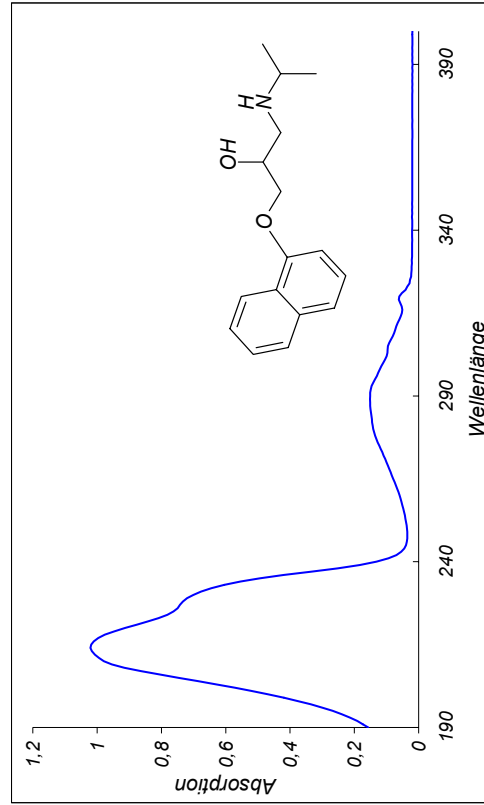


Abb. 8.12 Absorptionsspektrum von Propranolol.

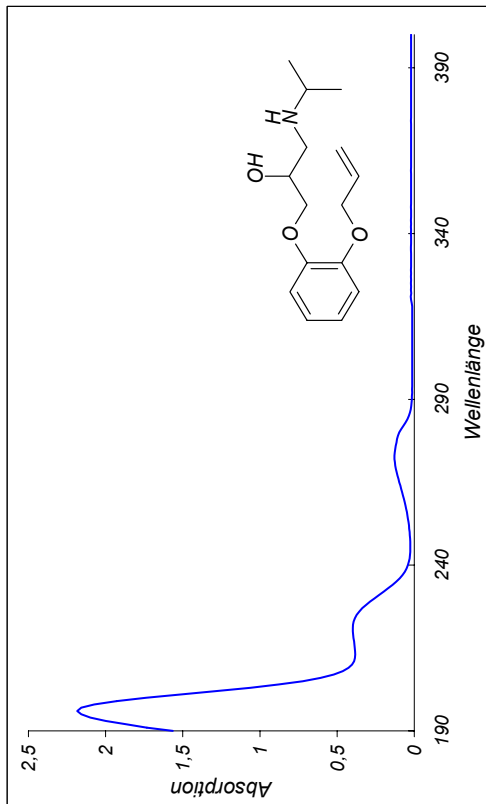


Abb. 8.9 Absorptionsspektrum von Oxprenolol.

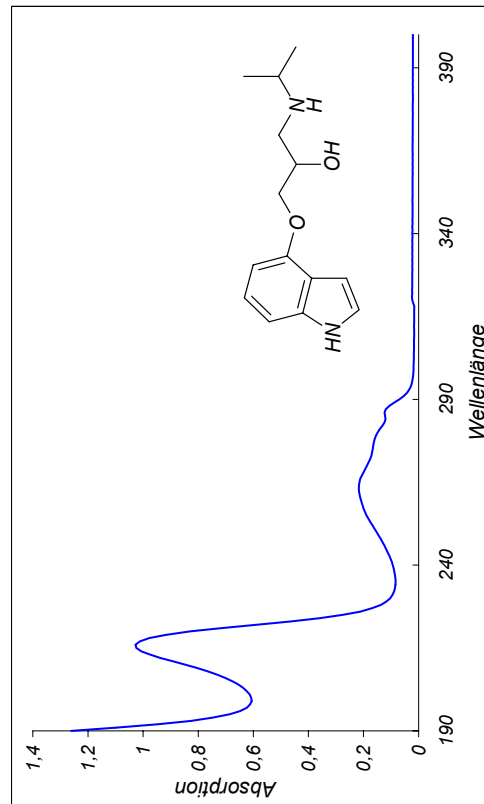


Abb. 8.11 Absorptionsspektrum von Pindolol.

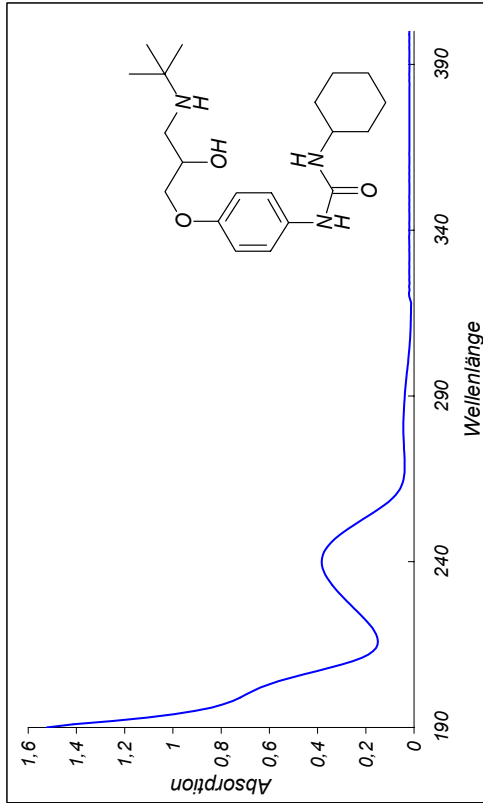


Abb. 8.14 Absorptionsspektrum von Talinolol.

Berechnung des Permeationskoeffizienten:

$$P = \frac{dc \cdot V}{dt \cdot A \cdot C_0} \quad \text{Gl. 8-1}$$

$dc/dt$ : Substanzfluss durch den Monolayer (entspricht der Steigung der Ausgleichsgeraden, die man erhält, wenn die transportierte Menge gegen die Zeit aufgetragen wird)

$V$ : das Volumen der Akzeptorkammer (ml)

$A$ : die Oberfläche der Monolayer (cm<sup>2</sup>)

$C_0$ : die Ausgangskonzentration im Donorkompartiment.

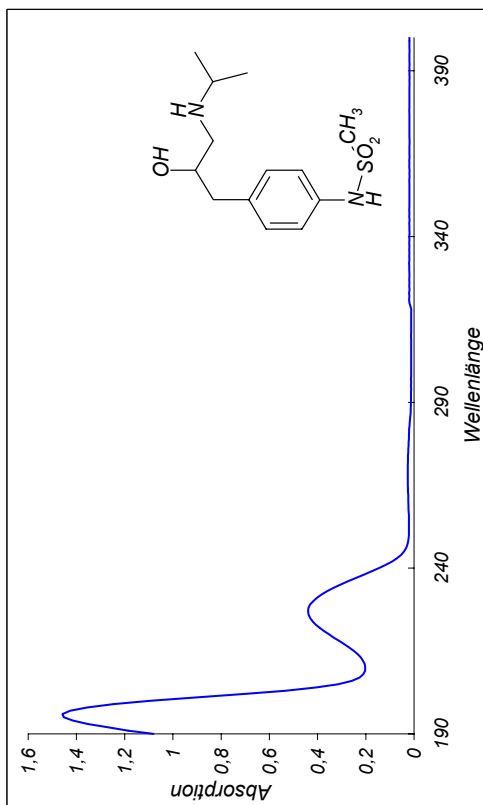


Abb. 8.13 Absorptionsspektrum von Sotalol.

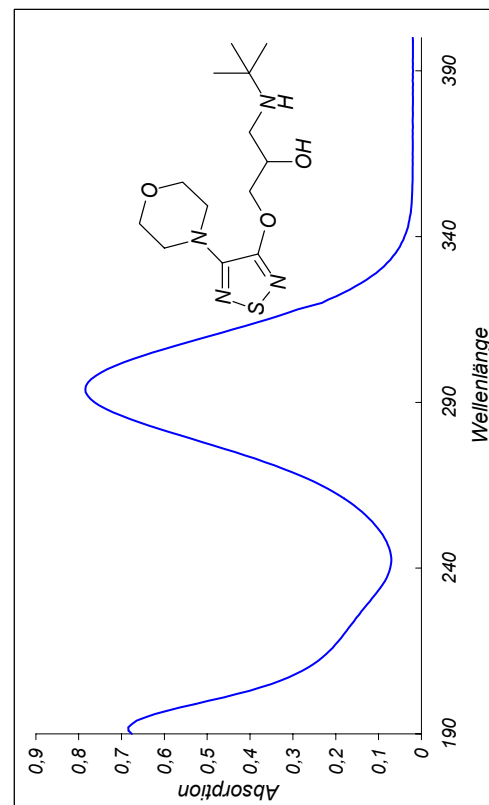


Abb. 8.15 Absorptionsspektrum von Timolol.

# **KAPITEL 9**

## **FIRMENVERZEICHNIS**

*AWD - Arzneimittelwerk Dresden GmbH, Meißner Straße 35, D-01445 Radebeul*

*Aventis Pharma Deutschland GmbH, Industriepark Höchst H840, D-65926 Frankfurt am Main*

*Bayer Vital GmbH, Welser Str. 5-7, D-51149 Köln*

*Baxter Deutschland GmbH, Am Weichselgarten 30, 91058 Erlangen*

*Beckmann Coulter GmbH, Siemensstr. 1, D-85716 Unterschleißheim*

*Bristol-Myers Squibb GmbH, Volksstraße 83, D-80636 München*

*CAMO ASA Development & Support, Olav Tryggvasonsgt. 24, N-7011 Trondheim*

*Carl Zeiss Jena GmbH, Tatzendpromenade, D-07745 Jena*

*CIBA Vision Vertriebs GmbH, Bauhofstr. 16, D-63762 Großostheim*

*Fluka (siehe Sigma-Aldrich Chemie GmbH)*

*GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Schulze-Delitzsch-Straße 4, D-30938 Burgwedel*

*Greiner GmbH, Maybachstraße 2, D-72636 Frickenhausen*

*Heraeus Instruments GmbH, Postfach 1561, D-63450 Hanau*

*Heumann Pharma GmbH, Heideloffstr. 18-28, D-90478 Nürnberg*

*IBM Deutschland GmbH, Pascalstr. 100, D-70569 Stuttgart*

*Ict Chemietechnik GmbH, Frankfurter Landstr. 126, D-61352 Bad Homburg*

*IKA (s. Janke und Kunkel)*

*Janke und Kunkel, IKA Labortechnik, Postfach 1263, D-79217 Staufen*

*Kendo Laboratory Products GmbH, Heraeusstraße 12-14, 63450 Hanau*

*Knauer GmbH, Hegauer Weg 38, 14163 Berlin*

*Knoll Pharmaceuticals, Main Road, Beeston, Nottingham NG9 1AD, England*

*Lilly Deutschland GmbH, Saalburgstraße, D-61350 Bad Homburg*

*Macherey & Nagel, Neumann-Neander-Str. 6-8, D-52355 Düren*

*Manugistics, Inc., East Jefferson Street Rockville, MD 20852-4999, USA*

*Merck KGaA, Frankfurter Str. 250, D-64271 Darmstadt*

*Mettler-Toledo GmbH, Ockerweg 3, D-35396 Gießen*

*Microsoft GmbH, Edisonstr. 1, D-85716 Unterschleißheim*

*Millipore GmbH, Hauptstr. 87, D-65760 Eschborn*

*Novartis Pharma AG, CH-4002 Basel*

*Nunc GmbH, Postfach 120543, 65083 Wiesbaden*

*Perkin-Elmer GmbH, Postfach 10 11 64, D-88662 Überlingen*

*Pharmacia GmbH, Am Wolfmantel 46, D-91058 Erlangen*

*Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer 116, D-68305 Mannheim*

*Schleicher & Schuell GmbH, Hahnestr. 3, D-37586 Dassel*

*Sigma GmbH, Grünwalderweg 30, D-82041 Deisenhofen*

*Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Wunstorferstraße 40, D-30926 Seelze*

*VCH-Verlagsgesellschaft, Boschstr. 12, D-69469 Weinheim*

*Wacker Chemie GmbH, Hanns-Seidel-Platz 4, D-81737 München*

*Wagner & Munz GmbH Deutschland, In der Rosenau 4, 81829 München*

*World Precision Instruments, Inc., Liegnitzer Str. 15, D-10999 Berlin*

*WTB Binder Labor Technik GmbH, Postfach 102, 78502 Tuttlingen*

*Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:*

*Ammon, Bechtold, Beyer, Drews, Gauglitz, Grabmayr, Gündisch, Häfelinger, Hanack, Heide, Kovar, Lindner, Mechler, Müller, Pommer, Reinhard, Roth, Safayhi, Schmidt, Schultz, Steinhilber, Strähle, Wahl, Wankmüller, Zimmermann*



# *Lebenslauf*

- 01.03.1973*                      *geboren in Rafah (Palästina), letztes Kind von Mohammed und Nehma Awadallah (geb. Abu Ghali)*
- 1978 – 1984*                      *Grundschule in Rafah*
- 1984 – 1997*                      *Mittelschule in Rafah*
- 1987 – 1990*                      *Gymnasium in Rafah*
- 1990*                                *Abitur (General Secondary Education Certificate Examination)*
- Februar 1991 –*  
*Dezember 1992*                      *Deutsch-Sprachkurs am Utz-Institut in Erlangen*
- Januar 1992 –*  
*Juni 1993*                              *Studienkolleg an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität in Bonn als Vorbereitung auf das Studium*
- Oktober 1993 –*  
*Oktober 1997*                      *Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen*
- September 1995*                      *1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung*
- Oktober 1997*                        *2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung*
- November 1997 –*  
*Oktober 1998*                      *Praktikum in der Mayer`schen Apotheke in Tübingen*
- November 1998*                      *3. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung*
- Seit Dezember 1998*                      *Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für pharmazeutische Technologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Beginn der Dissertation „Stereospezifität des aktiven Arzneistofftransports: Modelluntersuchungen an Caco-2/TC-7-Zellen und quantitative Enantiomerenbestimmung mittels Kapillarelektrophorese“ unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. A. Wahl und Herrn Prof. Dr. P. C. Schmidt*

