

Bestimmung der Plasmaproteinbindung von niedrig affinen Liganden am Beispiel der *Ephedra*-Alkaloide



Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
an der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Miriam Volpp

aus Karlsruhe

Würzburg 2020



EINGEREICHT BEI DER FAKULTÄT FÜR CHEMIE UND PHARMAZIE AM:

GUTACHTER DER DISSERTATION:

1. GUTACHTEN: Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe

2. GUTACHTEN: _____

PRÜFER DES ÖFFENTLICHEN PROMOTIONSKOLLOQUIUMS:

1. PRÜFER: Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe

2. PRÜFER: _____

3. PRÜFER: _____

TAG DES ÖFFENTLICHEN PROMOTIONSKOLLOQUIUMS:

DOKTORURKUNDE AUSGEHÄNDIGT AM:

*Failures, repeated failures, are finger posts on the road
to achievement. One fails forward toward success.*

C. S. Lewis

Für meine Familie

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von November 2013 bis November 2017 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Anleitung von

Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich für die freundliche Aufnahme in ihren Arbeitskreis, für das in mich gesetzte Vertrauen und die fachkundige Unterstützung auf dem Weg zu dieser Arbeit bedanken, die mir die Möglichkeit zum selbstständigen und eigenverantwortlichen Verfassen meiner Dissertation gaben.

Mein Dank gilt auch Dr. Alexander Hörst und Anna Kurcharski, die gerade am Anfang dieser Arbeit die Mysterien der kontinuierlichen Ultrafiltration für mich gelüftet haben. Vielen Dank auch an Dr. Bernd Reyer, Dr. Ludwig Höllein und Raphael Dives für die schnelle und unkomplizierte Hilfe in Sachen Programmierung und die technischen Aspekte der kontinuierlichen Ultrafiltration. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Joachim Wahl für seine Hilfe bei allen Feinheiten und Tücken der Kapillarelektrophorese und den Herausforderungen mit Pia und Paul bedanken.

Ich bedanke mich bei Dr. Nils Terveer und Alexander Becht für die Durchführung der NMR-Experimente und bei Dr. Cecilia Amstalden und Dr. Gabriel Jones für die iTC-Messungen.

Außerdem möchte ich dem gesamten AK Holzgrabe für die schöne Zeit und bleibenden Erinnerungen danken. Insbesondere danke ich allen Bürokollegen aus Büro 1.012, Lu, Johannes, David, Olli, Jogi, Christine, Christiane, Klaus und Patrick, für die Hilfe beim Troubleshooting, die freundschaftliche Zusammenarbeit und die vielen spannenden Experimente. Vielen Dank auch an die Assistenten des 8. Semesters, Nils, Christine, Patrick, Martin und Raphi, für die abwechslungsreiche Zeit im Praktikum und eure Unterstützung beim Anschauen der zahlreichen Stas-Otto-Trennungsgänge und DC-Platten.

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG	1
PLASMAPROTEINBINDUNG	3
1.1 EINFLUSS AUF PHARMAKOKINETIK UND -DYNAMIK	3
PLASMAPROTEINE	9
2.1 ALBUMIN	13
2.1.1 Struktur	14
2.1.2 Funktionen	16
2.1.3 Indikationen	19
2.2 SAURES A ₁ -GLYKOPROTEIN	20
KLINISCHE RELEVANZ – ÄNDERUNG DER PPB	20
3.1 VERDRÄNGUNG AUS DER PLASMAPROTEINBINDUNG	21
3.2 VERÄNDERUNGEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM ALTER	22
3.3 PATHOPHYSIOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN IM KÖRPER	23
EPHEDRIN	25
STEREOSELEKTIVITÄT	26
METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER PLASMAPROTEINBINDUNG	27
ZIEL DER ARBEIT	30
B. ULTRAFILTRATION	33
METHODEN	35
KONTINUIERLICHE ULTRAFILTRATION	35
1.1. AUFBAU UND OPTIMIERUNG DER ANLAGE	36
1.2. ALLGEMEINER VERSUCHSABLAUF	40
1.3. BERECHNUNG DER PLASMAPROTEINBINDUNG	42
DISKONTINUIERLICHE ULTRAFILTRATION	44
2.1. ULTRAFILTRATION	44
2.2. QUANTIFIZIERUNG DER ULTRAFILTRATIONSPROBEN	45
2.3. BERECHNUNG DER PLASMAPROTEINBINDUNG	46
VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	51
VERWENDETE SUBSTANZEN UND GERÄTE	51
3.1. ARZNEISTOFFE	51
3.2. PROTEINE UND SERA	52
3.3. CHEMIKALIEN	52
3.4. MATERIALIEN	53
3.5. WASSER	54
3.6. GERÄTE	54
3.6.1. Kontinuierliche Ultrafiltration	54
3.6.2. Diskontinuierliche Ultrafiltration	55
KONTINUIERLICHE ULTRAFILTRATION	56
4.1. VERMESSENE LIGANDEN	56
4.2. PUFFERLÖSUNG	59
4.3. PROTEINLÖSUNG	61
4.3.1. Humanes Plasma	61
4.3.2. Humanes Serum	61
4.4. ARZNEISTOFFLÖSUNG	64

4.4.1. <i>Ephedra</i> -Alkaloide	64
4.4.2. Sympathomimetika	65
4.4.3. Mip-Inhibitoren	66
4.4.4. Fluorchinolone	67
4.4.5. Zimtsäure-Derivate	67
4.5. ULTRAFILTRATIONSMEMBRAN	68
4.6. VERSUCHSVORBEREITUNGEN	69
4.7. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	69
4.8. ABBAU UND LAGERUNG DER ANLAGE	71
DISKONTINUIERLICHE ULTRAFILTRATION	72
5.1. VERMESSENE LIGANDEN	72
5.2. PUFFERLÖSUNG	72
5.3. PROTEINLÖSUNG	72
5.4. ARZNEISTOFFLÖSUNG	73
5.4.1. <i>Ephedra</i> -Alkaloide	73
5.4.2. Fluorchinolone	73
5.5. INTERNER STANDARD	74
5.5.1. <i>Ephedra</i> -Alkaloide	74
5.5.2. Fluorchinolone	74
5.6. KALIBRIERLÖSUNGEN	74
5.6.1. <i>Ephedra</i> -Alkaloide	74
5.6.2. Fluorchinolone	75
5.7. FILTERVORBEHANDLUNG	76
5.8. ARZNEISTOFF-PROTEIN-PROBELÖSUNGEN	77
5.9. <i>EPHEDRA</i> -ALKALOIDE	77
5.9.1. Trennpuffer	77
5.9.2. Konditionierung der Kapillare	78
5.10. FLUORCHINOLONE	78
5.10.1. Mobile Phase (HPLC)	78
ERGEBNISSE	79
NEU SYNTHETISIERTE ARZNEISTOFFE	79
6.1. PROTEINBINDUNG DER MIP-INHIBITOREN	79
6.2. PROTEINBINDUNG DER FLUORCHINOLONE	84
6.2.1. GHQ-Substanzen	85
6.2.2. MB-Substanzen	93
6.3. PROTEINBINDUNG DER ZIMTSÄUREDERIVATE	95
KONTINUIERLICHE ULTRAFILTRATION	98
7.1. <i>EPHEDRA</i> -ALKALOIDE	98
7.1.1. Vorversuche	100
7.1.2. Weiterführende Untersuchungen	103
7.1.3. Plasmaproteine	108
7.1.4. Diskussion	110
7.2. SYMPATHOMIMETIKA	112
7.2.1. Adrenalin und Noradrenalin	113
7.2.2. Weitere Sympathomimetika	114
7.2.3. Diskussion	116
DISKONTINUIERLICHE ULTRAFILTRATION	118
8.1. <i>EPHEDRA</i> -ALKALOIDE	118
8.1.1. Ultrafiltration	118
8.1.2. Interner Standard	119

8.1.3. Kapillarelektrophorese	120
8.1.4. Messergebnisse	124
8.1.5. Diskussion	129

C. AFFINITÄTS-KAPILLARELEKTROPHORESE **133**

METHODE **135**

1.1 MESSPRINZIP	135
1.2 BESTIMMUNG VON BINDUNGS-AFFINITÄTEN	139
1.3 ALLGEMEINER VERSUCHSABLAUF	140
1.4 BERECHNUNG DER PLASMAPROTEINBINDUNG	141

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG **145**

2.1 ZUSÄTZLICH VERWENDETE SUBSTANZEN UND GERÄTE	145
2.1.1 Chemikalien	145
2.1.2 Geräte	145
2.2 VERMESSENE LIGANDEN	145
2.3 TRENNPUFFER	145
2.4 ARZNEISTOFFLÖSUNG	147
2.5 KONDITIONIERUNG DER KAPILLARE	147
2.6 VERSUCHSABLAUF	148

ERGEBNISSE **149**

3.1 VERÄNDERUNGEN DES EOFs	149
3.2 VERSUCHSBEDINGUNGEN	150
3.3 MESSERGEBNISSE	151
3.4 DISKUSSION	155

D. NMR-SPEKTROSKOPIE **157**

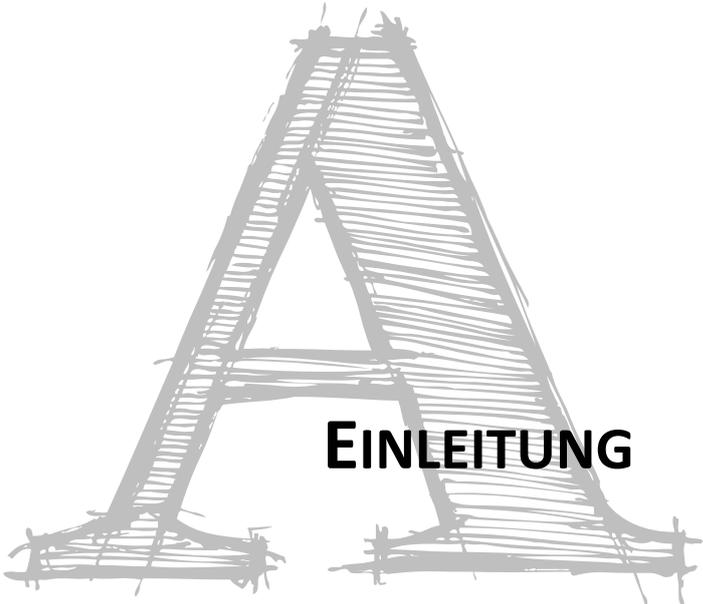
METHODE **159**

1.1 MESSPRINZIP	159
1.2 UNTERSUCHUNG DER BINDUNGEN ZWISCHEN MOLEKÜLEN	159
1.2.1 Änderungen im Spektrum	160
1.2.2 Veränderte Stoffeigenschaften	160
1.3 BERECHNUNG DER PLASMAPROTEINBINDUNG	161
1.3.1 Änderungen der chemischen Verschiebung	161
1.3.2 Bestimmung des Diffusionskoeffizienten D	163

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG **164**

2.1 ZUSÄTZLICH VERWENDETE SUBSTANZEN UND GERÄTE	164
2.1.1 Chemikalien	164
2.1.2 Geräte	164
2.2 VERMESSENE LIGANDEN	164
2.3 PUFFERLÖSUNG	165
2.4 CHEMISCHE VERSCHIEBUNG	165
2.4.1 Pufferlösung	165
2.4.2 Probelösung	165
2.4.3 Versuchsdurchführung	167

2.5	DIFFUSIONSKOEFFIZIENT	169
2.5.1	Pufferlösung	169
2.5.2	Probelösung	169
2.5.3	Versuchsdurchführung	170
ERGEBNISSE		176
3.1	MESSERGEBNISSE	176
3.1.1	Chemische Verschiebung	176
3.1.2	Diffusionskoeffizient	181
3.2	DISKUSSION	184
3.2.1	Chemische Verschiebung	184
3.2.2	Diffusionskoeffizient	186
E. ISOTHERMALE TITRATIONSKALORIMETRIE		189
METHODE		191
1.1	MESSPRINZIP	191
1.2	BERECHNUNG DER PLASMAPROTEINBINDUNG	193
VERSUCHSDURCHFÜHRUNG		195
2.1	ZUSÄTZLICH VERWENDETE GERÄTE	195
2.1.1	Geräte	195
2.2	VERMESSENE LIGANDEN	195
2.3	PUFFERLÖSUNG	195
2.4	PROTEINLÖSUNG	195
2.5	ARZNEISTOFFLÖSUNG	196
2.6	VERSUCHSABLAUF	197
ERGEBNISSE		197
3.1	MESSERGEBNISSE	197
3.2	DISKUSSION	198
F. ZUSAMMENFASSUNG		201
G. SUMMARY		207
ANHANG		213
PUBLIKATIONSVERZEICHNIS		215
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS		215
TABELLENVERZEICHNIS		217
ABBILDUNGSVERZEICHNIS		218
LITERATURVERZEICHNIS		221



PLASMAPROTEINBINDUNG

Die Arzneimitteltherapie hat sich im letzten Jahrhundert stark verändert. Während die verwendeten Wirkstoffe ihren Ursprung anfangs in der Volksmedizin hatten oder Zufallsentdeckungen waren, so entstammen viele der heute eingesetzten, neueren Wirkstoffe dem strategischen Design der Medizinischen Chemie. Ziel dieses Wirkstoffdesigns ist es, eine potentiell wirksame Substanz – die Leitstruktur – so zu optimieren, dass sie ideale pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften besitzt ^[1,2].

Während der Charakterisierung eines neu synthetisierten Arzneistoffes in der präklinischen Phase der Entwicklung wird unter anderem die Affinität der neuen Substanz zu den Plasmaproteinen bestimmt. Die Plasmaproteinbindung liegt nicht im Fokus der Arzneistoffoptimierung, dennoch beeinflusst sie die Pharmakokinetik und -dynamik des Wirkstoffes und sollte deshalb nicht vernachlässigt werden ^[3].

1.1 Einfluss auf Pharmakokinetik und -dynamik

Systemisch wirksame Arzneistoffe durchlaufen in unserem Körper von der Einnahme bis zur Wirkung drei Phasen (siehe auch Abb. 1). Es beginnt mit der pharmazeutischen Phase, bei der die Applikation des Wirkstoffes im Mittelpunkt steht. Hier sind die galenischen Eigenschaften der Arzneiform entscheidend, sie bilden die Grundlage für die Aufnahme des Wirkstoffes in den Körper. Durch Optimierung der Galenik kann daher Einfluss auf den Wirkeintritt und die Wirkdauer genommen werden ^[4]. Anschließend folgt die pharmakokinetische Phase. Die Pharmakokinetik beschreibt den zeitlichen Verlauf der Wirkstoffkonzentration im Körper. Die meisten Arzneistoffe zeigen eine lineare Kinetik, auch Kinetik 1. Ordnung genannt. Eine nichtlineare Kinetik ist selten und tritt vor allem bei Sättigung der beteiligten Enzyme oder Transporter auf ^[5]. Die pharmakokinetische Phase gliedert sich in die verschiedenen Teilprozesse Absorption (Aufnahme bzw. Resorption), Distribution (Verteilung), Metabolisierung (Biotransformation) und Elimination (Ausscheidung), kurz ADME (*engl.*: absorption, distribution, metabolism, excretion) ^[1,4]. Die letzte Phase ist die pharmakodynamische Phase. Die Pharmakodynamik beschreibt die biologische Wirkung von Pharmaka am jeweiligen Wirkort. Durch die Wechselwirkung des

Wirkstoffes mit der Zielstruktur, wie einem Rezeptor oder Enzym, entfaltet sich letztendlich der pharmakologische Effekt. Dieser Effekt kann dabei sowohl die gewünschte klinische Wirksamkeit oder die toxische Nebenwirkung eines Arzneistoffes darstellen [4].

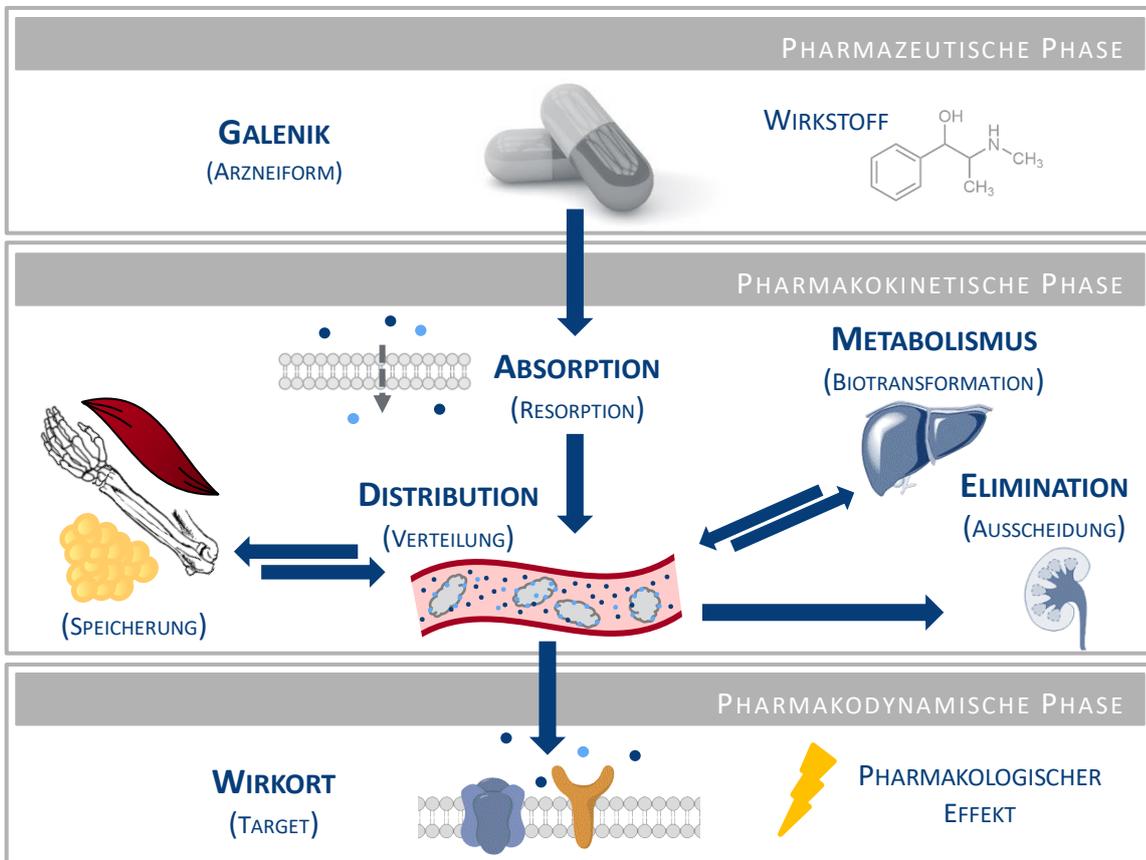


Abb. 1: Phasen der pharmakologischen Wirkung bei peroraler Gabe nach *Mutschler* [4]

Bei vielen Fertigarzneimitteln, die zur Therapie eingesetzt werden, wird der Wirkstoff als Tablette oder Kapsel peroral verabreicht. Nach peroraler Einnahme erreicht nicht zwangsläufig die komplette verabreichte Dosis den Wirkort im Körper, man spricht hierbei von der Bioverfügbarkeit. Die Bioverfügbarkeit beschreibt das Ausmaß und die Geschwindigkeit des im Plasma verfügbaren Arzneistoffanteils nach der Applikation. Sie ist bei der intravenösen Gabe mit 100 % definiert. Wird ein Arzneistoff peroral eingenommen, errechnet sich dessen Bioverfügbarkeit aus der Fläche unter der Plasmaspiegelkurve (AUC, engl. area under the curve) im Vergleich zur intravenösen Gabe [4]. Die Bioverfügbarkeit kann unter anderem durch den Resorptionsvorgang und den First-Pass-Effekt deutlich reduziert sein.

Im Plasma angekommen wird der Wirkstoff über die systemische Zirkulation im Körper verteilt und zum Wirkort transportiert (Distribution). Dabei liegt der Wirkstoff entweder frei vor oder ist an verschiedene Blutbestandteile – vorwiegend Proteine – gebunden. Im Blut ermöglicht die Bindung an die vorhandenen Plasmaproteine den Transport von lipophilen Substanzen, die im Blutplasma nur schwerlöslich sind und ohne den Transport durch die Plasmaproteine nicht zum Wirkort gelangen würden. Neben der Plasmaproteinbindung stellen auch die Bindung an Gewebeproteine (z.B. bei Herzglykosiden, Chloroquin) und die Speicherung des Wirkstoffes im Fettgewebe (Diazepam, Insektizid DDT) oder Knochen (Tetrazykline, Schwermetalle) weitere Verteilungsprozesse dar^[6,7]. Durch Speicherung des Wirkstoffes in den verschiedenen Geweben bzw. durch Bindung an die Plasmaproteine ist der Arzneistoff zwar pharmakologisch inaktiv, gleichzeitig kann er aber auch nicht metabolisiert oder eliminiert werden. Dieser Depoteffekt sorgt zunächst für eine schwächere Wirkung, verlängert jedoch zeitgleich die Wirkdauer des Arzneistoffes^[1].

Zur Beschreibung der Verteilung verschiedener Wirkstoffe wird das scheinbare Verteilungsvolumen V_D (apparent volume of distribution) verwendet. Das Verteilungsvolumen ist ein Proportionalitätsfaktor, der die Wirkstoffkonzentration C zur Gesamtwirkstoffmenge X in Beziehung setzt. V_D gibt letztendlich das Volumen an, das bei gegebener Gesamtwirkstoffmenge X nötig ist, um die gemessene Wirkstoffkonzentration C zu erhalten. Bei einer starken Verteilung des Wirkstoffes in den extravasalen Raum ergibt sich dabei ein großes, teilweise unphysiologisches Volumen. Das Benzodiazepin Diazepam beispielsweise reichert sich im Fettgewebe an und hat ein scheinbares Verteilungsvolumen von 120 Litern^[7]. Ein solches Volumen liegt deutlich über dem Volumen des Gesamtkörperwassers eines durchschnittlichen Erwachsenen von 42 Litern^[5].

Neben der Verteilung wird der freie Arzneistoff im Körper auch laufend metabolisiert. Die Leber ist dabei das Hauptorgan für die Biotransformation von Stoffen. Die Stoffe werden durch die Metabolisierung hydrophiler, damit sie anschließend leichter über die Niere und die Galle ausgeschieden werden können. Der Metabolismus gliedert sich in zwei verschiedene Phasen: Phase I und Phase II. Phase I dient der Funktionalisierung, d.h. Einführung neuer funktioneller Gruppen, um die Metabolite in der folgenden Phase II mit hydrophilen, körpereigenen Stoffen konjugieren zu können. In Phase I laufen Oxidations-, Reduktions-, Hydrolyse- und Eliminations-Reaktionen ab, die vielfach durch die Enzymfamilie

der Cytochrom-P450-Enzyme katalysiert werden. Die Konjugation der Metabolite in Phase II erfolgt u.a. mit Glucuronsäure, Schwefelsäure, Essigsäure, Glutathion und Glycin ^[1]. Das Ausmaß der Biotransformation kann von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden. Zu den Einflussfaktoren zählen nicht zuletzt das Alter, Arzneistoffinteraktionen und die genetische Prädisposition ^[1,4].

Der letzte Teilprozess der Pharmakokinetik ist die Elimination oder Ausscheidung des Arzneistoffes. Dieser findet parallel zur Verteilung und zum Metabolismus statt und sorgt dafür, dass die eingenommenen Wirkstoffe den menschlichen Körper wieder verlassen. Genaugenommen kann auch die Biotransformation in gewisser Weise einen Ausscheidungsprozess darstellen, da hier durch die Entgiftung zum unwirksamen Metabolit der Anteil an aktivem Wirkstoff im Körper verringert wird. Die Elimination hängt wie alle pharmakokinetischen Teilprozesse von den physikochemischen Eigenschaften der Stoffe ab. Hier spielen insbesondere Molekulargewicht, Säure-Base-Eigenschaften und Löslichkeit der Stoffe eine Rolle. Die meisten hydrophilen, niedermolekularen Stoffe werden über die Niere ausgeschieden. Weiterhin können Stoffe aber auch über den Darm, die Galle, die Haut und Lunge eliminiert werden ^[1]. Bei der glomerulären Filtration in der Niere werden zunächst sowohl hydrophile als auch lipophile Stoffe filtriert; bei einem Molekulargewicht kleiner 5 kDa geschieht dies ungehindert, mit weniger als 70 kDa eingeschränkt und größere Moleküle werden zurückgehalten. Aus diesem Grund kann nur der ungebundene Wirkstoff in der Niere glomerulär filtriert werden. Albumin (67 kDa) und Albumin-Wirkstoff-Komplexe können aufgrund ihrer Größe nicht passiv durch die Basalmembran im gesunden Glomerulus diffundieren und verbleiben daher im Blutplasma ^[4,8,9].

Zur Beschreibung der Biotransformation bzw. Elimination der Stoffe aus dem Körper, wird in der Pharmakokinetik die Clearance herangezogen. Die Clearance ist ein Maß für die Eliminationsgeschwindigkeit und beschreibt das Volumen, das pro Zeiteinheit vom betrachteten Stoff vollständig geklärt wird ^[5]. Die Gesamtkörperclearance setzt sich dabei aus den verschiedenen Organclearances zusammen, je nachdem über welche Wege der Arzneistoff aus dem Körper eliminiert wird. Wird ein Wirkstoff beispielsweise in der Leber metabolisiert und über die Niere ausgeschieden, setzt sich die Gesamtkörperclearance aus der hepatischen und der renalen Clearance zusammen. Die Organclearance lässt sich mit

Hilfe der Wilkinson-Shand-Gleichung berechnen, hier am Beispiel der hepatischen Clearance Cl_H [5,10,11].

$$(1) \quad Cl_H = Q_H \cdot \varepsilon_H = \frac{Q_H \cdot f_U \cdot Cl_{int}}{Q_H + f_U \cdot Cl_{int}}$$

Q ist die Durchblutungsgeschwindigkeit (mL/min) des jeweiligen Organs. Im Schnitt liegt der Blutfluss in der Leber (Q_H) bei 1500 mL/min und in der Niere (Q_K) bei 1200 mL/min [11,12]. ε_H ist der Extraktionskoeffizient, der zwischen 0 und 1 liegt und den Anteil an eliminierten Wirkstoff in einer Leberpassage beschreibt. Cl_{int} ist die intrinsische Clearance (mL/min), sie beschreibt die maximale Eliminationsleistung bei uneingeschränkter Wirkstoffzufuhr. f_u bildet das Ausmaß der Plasmaproteinbindung des Stoffes ab und stellt den ungebundenen Anteil des Wirkstoffes im Blut dar. Hierbei wird in der Gleichung (1) nur der freie Wirkstoffanteil berücksichtigt, da nur der ungebundene Arzneistoff in die Hepatozyten gelangen und dort metabolisiert werden kann; genauso verhält es sich auch bei der Elimination in der Niere. In manchen Fällen lässt sich die Gleichung (1) jedoch vereinfachen: Bei Stoffen mit einem Extraktionskoeffizienten $\varepsilon_H < 0,2$ wird der Stoff nur zu einem geringen Anteil metabolisiert, er hat also eine niedrige intrinsische Clearance. Für diese Stoffe gilt:

$$(2) \quad Q_H \gg f_U \cdot Cl_{int}$$

Damit vereinfacht sich Formel (1) zu:

$$(3) \quad Cl_H \sim f_U \cdot Cl_{int}$$

In diesem Fall hängt die hepatische Arzneistoff-Clearance von der Enzymaktivität (Cl_{int}) und der Plasmaproteinbindung (f_u) ab. Man spricht hier von einer kapazitätslimitierenden Clearance, da die Enzymaktivität und das Ausmaß der Plasmaproteinbindung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sind. Diese Arzneistoffe – mit einem niedrigen Extraktionskoeffizienten – werden *low extraction drugs* genannt. Zu ihnen zählen Warfarin, Phenytoin, Diazepam und Tolbutamid [4,5]. Auf der anderen Seite gibt es die *high extraction drugs*, zu ihnen zählen alle Stoffe mit einem Extraktionskoeffizienten $\varepsilon_H > 0,8$. Diese Stoffe werden zu einem hohen Anteil metabolisiert, d.h. es liegt eine hohe Enzymaktivität und eine große intrinsische Clearance vor. Für diese Stoffe gilt:

$$(4) \quad Q_H \ll f_U \cdot Cl_{int}$$

Damit vereinfacht sich wiederum Gleichung (1) wie folgt:

$$(5) \quad Cl_H \sim Q_H$$

Die Clearance hängt in diesem Fall ausschließlich von der Durchblutungsgeschwindigkeit des Organs ab. Diese Stoffe werden so schnell metabolisiert, dass nur die Durchblutung der Organe geschwindigkeitsbestimmend ist; daher spricht man auch von einer perfusionslimitierten Clearance. Propranolol, Lidocain, Pethidin und Imipramin sind Beispiele für *high extraction drugs* [4,5,11].

Neben der Clearance dient auch die Plasma-Halbwertszeit zur Beschreibung der pharmakokinetischen Prozesse. Die Halbwertszeit ist als die Zeitspanne definiert, die benötigt wird bis sich die Konzentration in der entsprechenden Körperflüssigkeit halbiert hat. In der Regel bezieht man sich auf die Halbwertszeit im Plasma. Bei einer linearen Kinetik 1. Ordnung ist die Halbwertszeit konstant. Sie ist ein häufig verwendeter und anschaulicher Parameter zur Beschreibung der Elimination. Als sekundärer Parameter ist die Halbwertszeit abhängig von den primären Parametern Verteilungsvolumen V_D und Clearance Cl . Die primären Parameter können sich unabhängig voneinander ändern, eine Änderung der Halbwertszeit hängt jedoch immer auch mit einer Änderung der Clearance oder des Verteilungsvolumens oder beiden zusammen [5].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Plasmaproteinbindung Einfluss auf fast alle Teilprozesse der Pharmakokinetik hat. So ist die Proteinbindung einerseits wichtig bei der Verteilung lipophiler Stoffe im systemischen Blutkreislauf. Andererseits erschwert eine hohe Plasmaproteinbindung die Verteilung des Wirkstoffes ins Zielgewebe und verzögert damit den Wirkeintritt des Arzneistoffes. Genauso ist beim Metabolismus und der Elimination nur der freie Wirkstoffanteil ausschlaggebend, da nur der ungebundene Wirkstoff in die Leber oder Niere gelangen kann, um dort verstoffwechselt oder ausgeschieden zu werden. Dieser durch die Plasmaproteinbindung bedingte Depoteffekt führt zu einer länger anhaltenden Wirkung von hoch-affinen Liganden. Ein hohes Ausmaß an Plasmaproteinbindung bewirkt somit ein höheres Verteilungsvolumen und eine längere Plasmahalbwertszeit.

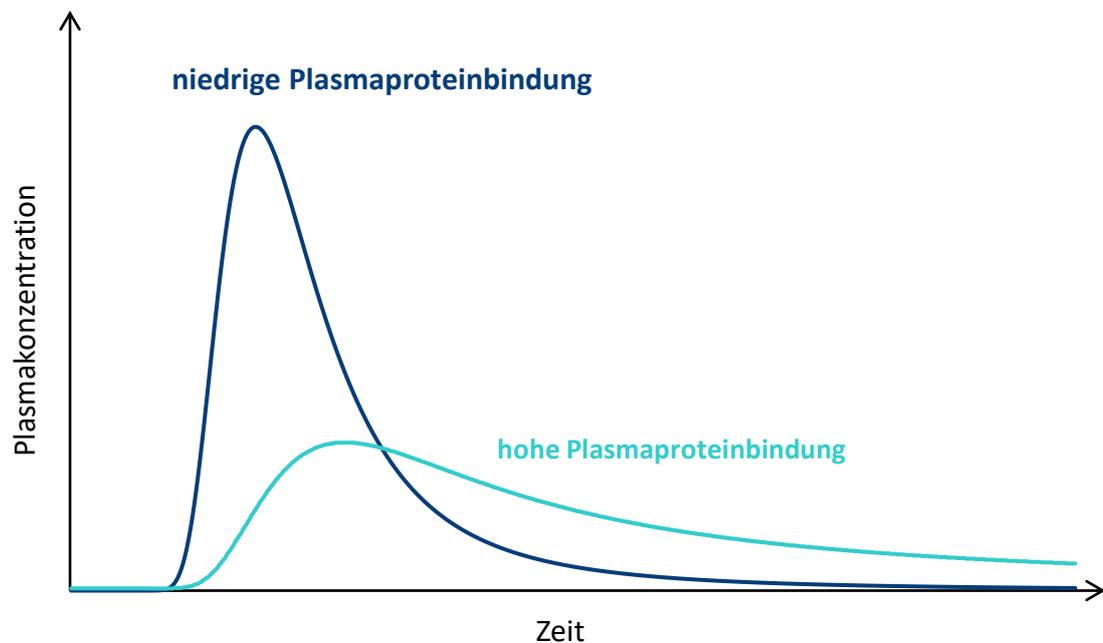


Abb. 2: Schematische Darstellung der Plasmaspiegelkurven von Wirkstoffen mit einer hohen und niedrigen Plasmaproteinbindung^[9]

Letztendlich bedeutet das, dass Arzneistoffe mit einer starken Proteinbindung eine deutlich schwächere und verzögerte Wirkung haben, gleichzeitig jedoch durch den Depoteffekt auch länger wirken.

PLASMAPROTEINE

Das Blut versorgt den Körper und die Organe mit lebenswichtigem Sauerstoff, Nährstoffen und vielem mehr. Ein durchschnittlicher Erwachsener hat zwischen vier und sechs Litern Blut, das aus Blutzellen und Blutplasma besteht. 45 % des Blutes machen im Durchschnitt die Blutzellen aus; bei Männern ist der Anteil etwas höher als bei Frauen. Die Blutzellen werden in die Erythrozyten, die Leukozyten und die Thrombozyten unterteilt, die unterschiedliche Aufgaben im Körper haben, unter anderem Gasaustausch, Gerinnung und Immunabwehr^[8,13]. Das Blutplasma (1,8 – 2,7 Liter) besteht zu 90 % aus Wasser. Den Rest bilden Plasmaproteine, Gerinnungsfaktoren, Nährstoffe wie Glucose, Metabolite (u.a. Harnstoff, Kreatinin), Lipide und Elektrolyte.

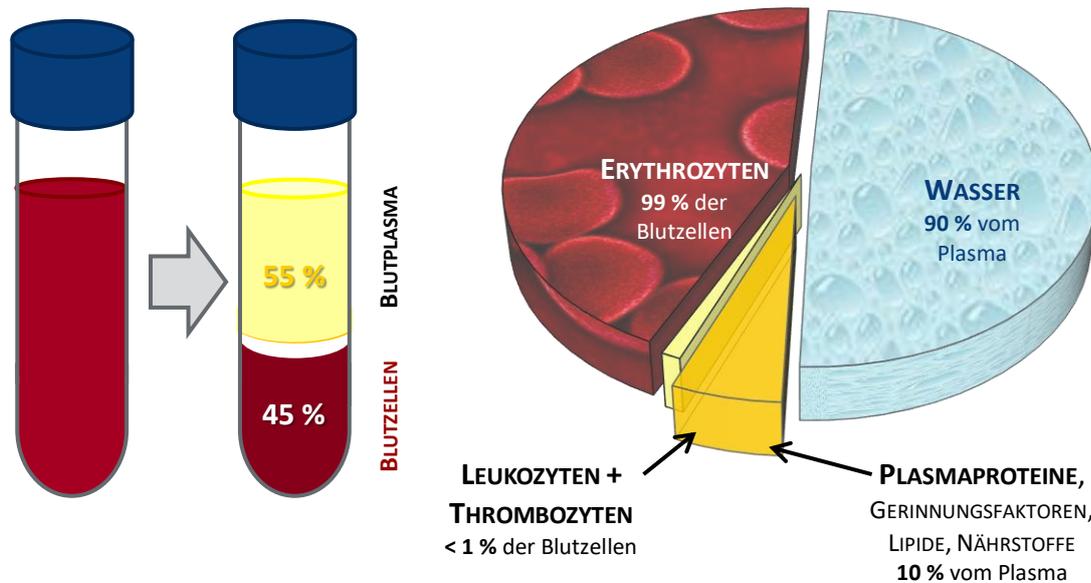


Abb. 3: Zusammensetzung des menschlichen Blutes ^[8,13]

Zu den Plasmaproteinen zählen insgesamt über hundert Proteine. Die meisten von ihnen sind Glykoproteine, die in der Leber synthetisiert werden. Die Plasmaproteine sorgen durch ihre negativ geladenen Aminosäureseitenketten für einen Ladungsausgleich im Blut – der sogenannten Anionenlücke – die durch den Kationenüberschuss im Blut zustande kommt. Die Aufgaben der Plasmaproteine sind vielfältig; unter anderem sorgen sie für eine Pufferung des Blut-pH-Wertes, sie transportieren körpereigene Stoffe, Abbauprodukte und Mineralien wie freies Häm oder Eisen und sie versorgen den Körper mit Nährstoffen. Außerdem spielen einige Plasmaproteine als Antikörper eine wichtige Rolle in der Immunabwehr. Durch die große Menge an Plasmaproteinen im Blut sind sie auch ein wichtiges Aminosäure-Reservoir im Körper.

Die Einteilung der Plasmaproteine in verschiedene Gruppen erfolgt aufgrund ihrer Fraktionierung in der Serumelektrophorese. Bei der Serumelektrophorese handelt es sich um eine Papierelektrophorese-Methode. Die Auftrennung der Plasmaproteine erfolgt dabei auf einem puffergetränkten Streifen aus Celluloseacetat (CA). Nach kathodenseitigem Probenauftrag und durch Wanderung der Proteine in Richtung Anode, werden die Plasmaproteine entsprechend ihrer Ladung und Größe aufgetrennt (siehe Abb. 4) ^[8,14-16].

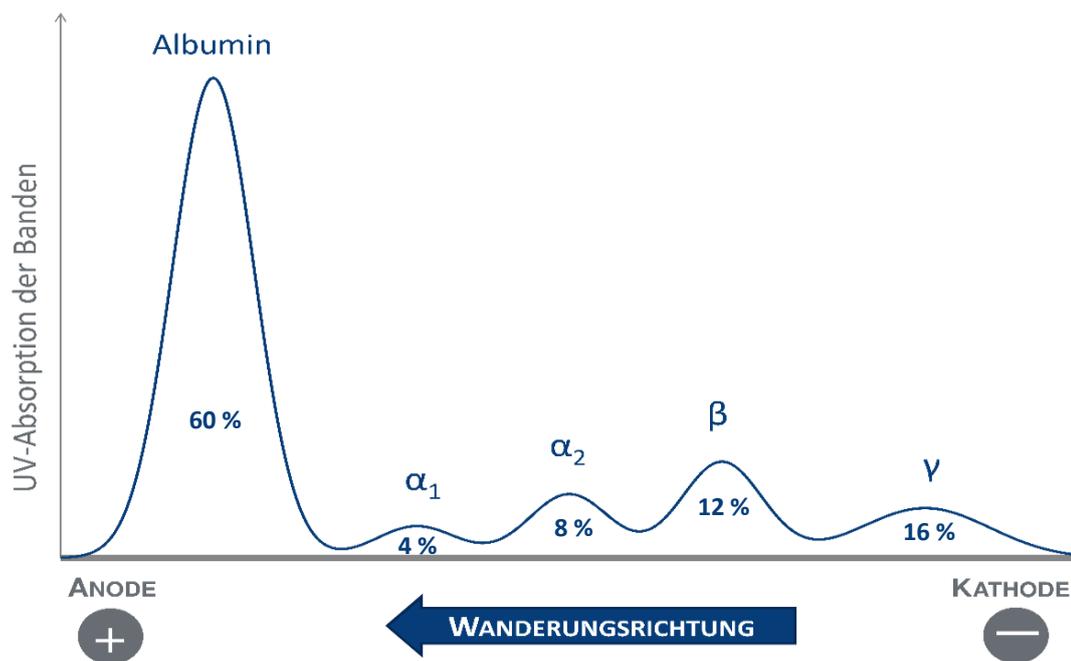


Abb. 4: Charakteristische Auftrennung der Plasmaproteine bei der Serumelektrophorese ^[8,14-16]

Ausgehend von der beschriebenen Serumelektrophorese unterteilt man die Plasmaproteine in fünf verschiedene Fraktionen: Albumin, α_1 -, α_2 -, β - und γ -Globuline. Die wichtigsten Vertreter jeder Fraktion sind in Tab. 1 aufgeführt ^[8].

Neben Albumin, das den größten Anteil der Plasmaproteine ausmacht, stellen Globuline die restlichen Plasmaproteinfraktionen dar. Die Bezeichnung Globuline beschreibt dabei eine sehr heterogene Gruppe globulärer Proteine mit verschiedenen Aufgabenbereichen. Die Globulinfraktionen α_1 , α_2 und β transportieren verschiedene endogene Stoffe wie Lipide, Hormone und Mineralstoffe, wohingegen γ -Globuline bei der Immunabwehr als Antikörper eine Rolle spielen ^[8,17]. Bei der Plasmaproteinbindung bzw. dem Transport von Arzneistoffen spielen insbesondere Albumin, das saure α_1 -Glykoprotein und die Lipoproteine eine wichtige Rolle ^[18-20].

Tab. 1: Übersicht der wichtigsten Vertreter der fünf Plasmaproteinfraktionen [8,14,16,21]
 M_R Molekulargewicht, c Plasmakonzentration, IP isoelektrischer Punkt, HDL high density lipoprotein, LDL low density lipoprotein, Ig Immunglobulin

	M _R / kDa	c / g x L ⁻¹	IP	Physiologische Bedeutung
Albumin 55 – 65 %				
Präalbumin	61	0,1 – 0,4	4,7	Thyroxin-Bindung
Albumin	67	35 – 55	4,9	Unspez. Transportfunktion, kolloidosmot. Druck
α₁-Globuline 3 – 5 %				
saures α ₁ -Glykoprotein	44	0,55 – 1,40	2,7	Transportfunktion
α ₁ -Lipoprotein (HDL)	200	2,90 – 7,70	5,1	Lipidtransport (HDL)
α ₁ -Antitrypsin	54	2 – 4	4,4	Proteinaseinhibitor
α₂-Globuline 6 – 10 %				
α ₂ -Makroglobulin	820	2,5	5,4	Plasmin- und Proteaseinhibition
α ₂ -Haptoglobin	85	0,8 – 3,0	4,1	Hämoglobintransport
Coeruloplasmin	160	0,2 – 0,6	4,4	Kupfertransport, Oxidase
Serumcholinesterase (Pseudocholinesterase)	348	3 000 – 8 000	4,0	Spaltung von Cholinestern, u.a. Acetylcholin
Plasminogen	143	0,06 – 0,25	-	Proenzym des Plasmins
β-Globuline 9 – 14 %				
β-Lipoprotein (LDL)	3 000 – 20 000	2,5 – 8,0	-	Lipidtransport (LDL)
Transferrin	90	2 – 4	5,8	Eisentransport
C-reaktives Protein	140	<0,012	4,8	Akute-Phase-Protein (Entzündungen)
Fibrinogen	340	2,0 – 4,5	5,8	Blutgerinnung
γ-Globuline 10 – 21 %				
IgG	156	8 – 18	5,8	Immunglobuline (Antikörper)
IgA	150 (+ Aggregate)	0,9 – 4,5	7,3	
IgM	960 (+ Aggregate)	♂ 0,6 – 2,5 ♀ 0,7 – 2,8	-	

2.1 Albumin

Albumin ist in allen Wirbeltieren vorzufinden, da das Plasmaprotein durch seine Transporteigenschaften eine wichtige Rolle im Körper spielt ^[22,23]. Nicht zuletzt deshalb steht Albumin seit sehr langer Zeit im Fokus der Wissenschaft. Die ersten wissenschaftlichen Beobachtungen zu Albumin fanden bereits in der Antike durch Hippocrates statt, wenn auch noch nicht unter dem Namen Albumin ^[24]. Serumalbumin zählt neben α -Fetoprotein, Afamin (α -Albumin) und Vitamin-D-bindendes Protein zu einer Gruppe homologer Proteine, die aufgrund ihrer Strukturähnlichkeit und Bindungseigenschaften als Albumin-Superfamilie bezeichnet werden. Vergleicht man die Primärstruktur von Serumalbumin bei verschiedenen Spezies, so zeigt sich, dass diese, insbesondere unter den Säugetieren, eine sehr hohe Ähnlichkeit aufweist ^[22,23,25,26].

Humanes Serumalbumin (HSA) ist ein einfaches, nicht-glykosyliertes, globuläres Protein, das aus 585 Aminosäuren aufgebaut ist und keine prosthetischen Gruppen enthält ^[23,27,28].

Es hat ein Molekulargewicht von 66 500 Da und liegt im Plasma in einer Konzentration von ca. 40 g/L bzw. 0,6 mM vor. Mit ca. 60 % stellt es den größten Anteil der Plasmaproteine dar ^[8,14,27-29]. Synthetisiert wird Albumin in der Leber, dabei entstehen jeden Tag 0,2 g/kg Körpergewicht Albumin in den Hepatozyten. Bei einem durchschnittlichen Erwachsenen mit 70 kg Körpergewicht entspricht das ca. 14 g pro Tag. Die Albumin-Synthese macht damit 25 % der gesamten Proteinsynthese in der Leber aus. Für den Bedarfsfall (z.B. bei Mangelernährung) gibt es im Körper bzw. der Leber jedoch keine HSA-Reserven, die zusätzlich freigesetzt werden könnten. Stattdessen können die Hepatozyten ihre HSA-Produktion um 200 – 300 % steigern, um den erhöhten Albuminbedarf zu decken. Die durchschnittliche Plasmahalbwertszeit von humanem Serumalbumin beträgt 19 Tage. Damit hat Albumin eine vergleichsweise lange durchschnittliche Lebensdauer von 28 – 36 Tagen, in der es ca. 15 000mal den gesamten Blutkreislauf durchströmt. HSA kommt jedoch nicht ausschließlich im Blutplasma vor: extravasal ist ein mengenmäßig größerer Teil an HSA anzufinden, jedoch in einer niedrigeren Konzentrationen als im Plasma ^[8,22,23,28,29].

2.1.1 Struktur

Bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 hat humanes Serumalbumin eine herzförmige Struktur mit einer Größe von 80 x 80 x 30 Å und ist aus drei homologen Domänen (I – III) mit jeweils zwei Subdomänen (A + B) aufgebaut (siehe Abb. 5 und Abb. 6) [8,23,27,28,30].

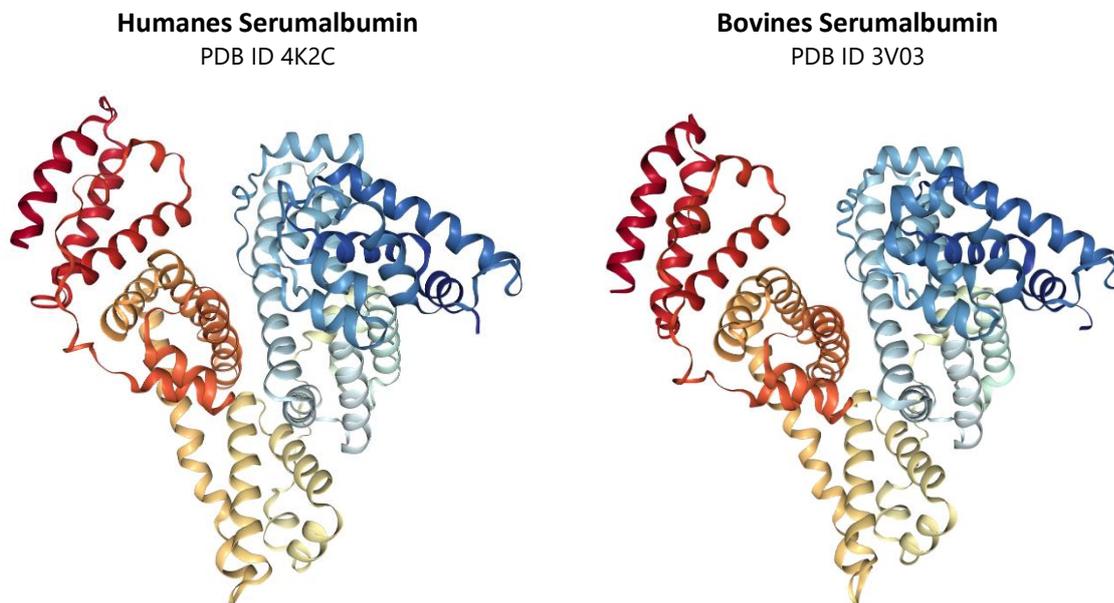


Abb. 5: 3-dimensionale Struktur von humanem und bovinem Serumalbumin [31,32]

Die drei Domänen des humanen Serumalbumins haben jeweils eine vergleichbare Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur – einschließlich der Kettenfaltung und der stabilisierenden Disulfidbrücken. Die Tertiärstruktur von Albumin besteht zu 67 % aus α -Helices und enthält keine β -Faltblatt-Strukturen. Jede der drei Domänen besteht aus je sechs (Subdomäne A) bzw. vier α -Helices (Subdomäne B).

In der Aminosäuresequenz von HSA sind 35 Cysteine (Cys) enthalten, die entscheidend zur Stabilität des Proteins beitragen. Durch die 17 Disulfidbrücken zwischen den einzelnen Cys-Resten wird die Konformation des HSA stabilisiert und die Funktionalität des Proteins über die gesamte Lebensdauer gewährleistet. Lediglich Cys34 in Subdomäne IA liegt als freie Thiolgruppe vor (siehe Abb. 6). Durch die Reaktivität und Bindeeigenschaften der freien Thiolgruppe ist Cys34 maßgeblich an einigen wichtigen Eigenschaften und Funktionen des Albumins im Körper beteiligt [23,27,28].

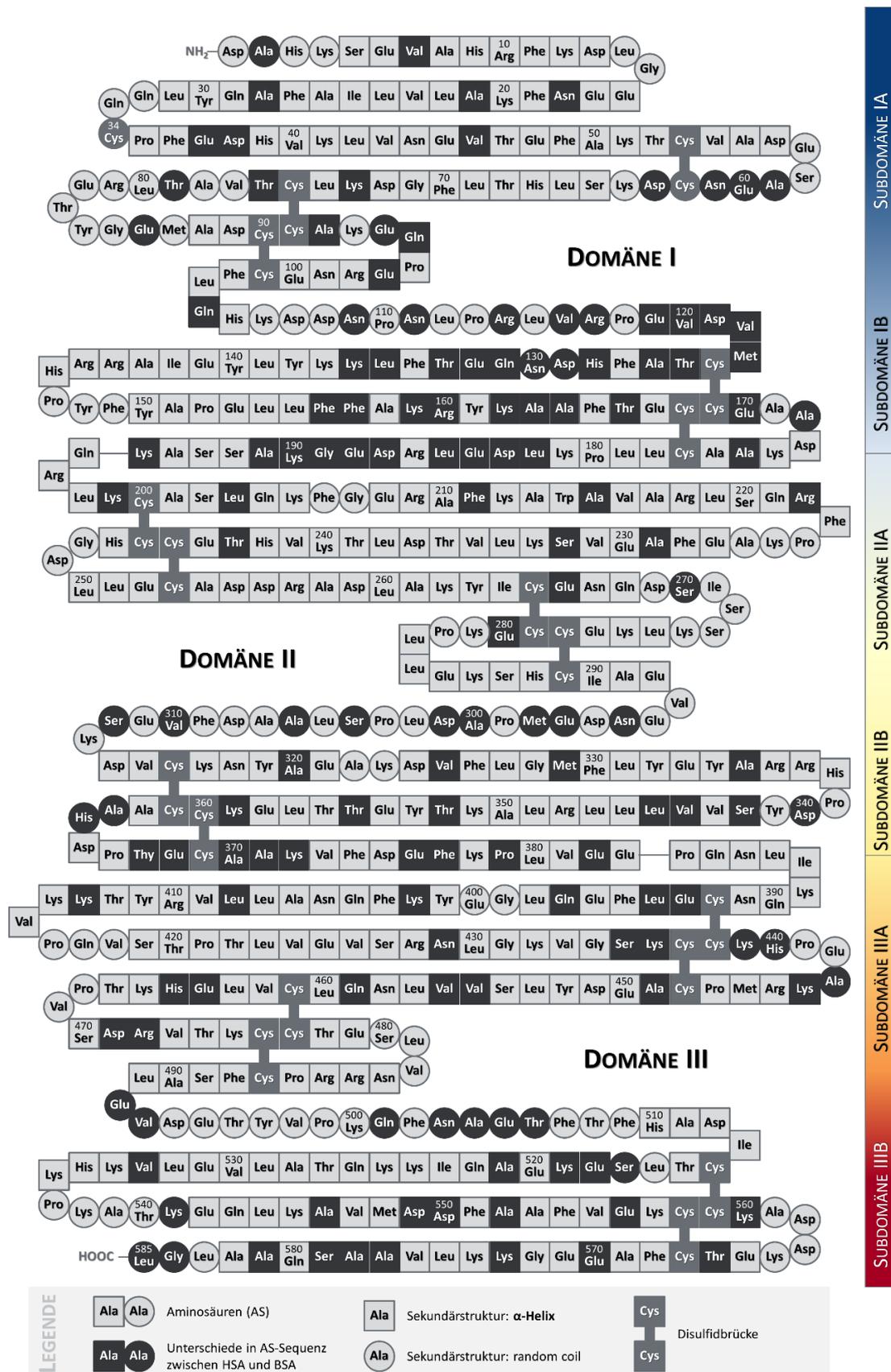


Abb. 6: Aminosäuresequenz von humanem Serumalbumin nach *Minghetti, Sugio, Meloun und Peters* [22,30,33,34].

Unter den 585 Aminosäuren sind vermehrt die Aminosäuren Leucin, Glutaminsäure und Lysin im Makromolekül enthalten. Die dadurch bedingte große Anzahl an ionisierbaren Resten im Protein sorgt für eine hohe Ladungsdichte im Makromolekül und erklärt die sehr gute Wasserlöslichkeit von über 20 % (m/m) ^[23,28,35]. Insgesamt enthält humanes Serumalbumin 98 saure – und 83 basische Aminosäuren. Da die sauren Aminosäuren überwiegen, hat HSA eine negative Nettoladung von -15 unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) ^[22,23]. Seine dreidimensionale Struktur behält Albumin trotz Bindung der Liganden weitestgehend bei, eine Konformationsänderung ist jedoch prinzipiell möglich. So kommt es beispielsweise in Abhängigkeit vom pH-Wert und bei der Bindung von Fettsäuren zu einer Änderung der dreidimensionalen Struktur von Albumin ^[23].

Wie bereits erwähnt weist Serumalbumin insbesondere bei den Säugetieren eine hohe Homologie in Bezug auf die Aminosäuresequenz des Proteins auf ^[22,23,25,26]. Bovines Serumalbumin (BSA) besteht zum Beispiel aus 583 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 66 411 g/mol ^[22,23]. Seine Primärstruktur stimmt zu 75,6 % mit der des humanen Serumalbumins überein ^[25]. Zudem hat BSA die gleiche herzförmige Struktur wie HSA mit den drei homologen Domänen (siehe Abb. 5). Nicht zuletzt deshalb wird BSA gerne als Ersatz für HSA bei *In-vitro*-Versuchen verwendet, auch wenn davon auszugehen ist, dass es Unterschiede bei der Bindung an HSA bzw. BSA gibt ^[26]. Der häufige Einsatz von BSA bei *In-vitro*-Modellen beruht auch darauf, dass BSA weit kostengünstiger und in höherer Reinheit erhältlich ist als HSA ^[22]. Das kommerziell erhältliche HSA wird immer noch zu einem Großteil aus gepooltem humanem Plasma hergestellt. Durch längeres Erhitzen bei der Herstellung von HSA, besteht nur ein geringes Infektionsrisiko ^[23].

2.1.2 Funktionen

Serumalbumin hat vielfältige Aufgaben im Plasma. Die Hauptaufgabe des Albumins ist die Bindung und der Transport endogener und exogener Substanzen im Blutkreislauf zum eigentlichen Wirkort im Körper (Depot- und Carrier-Funktion). Neben dem Transport von Stoffen innerhalb des Blutkreislaufes ist Albumin hauptverantwortlich für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks (25 – 33 mmHg) ^[8,23,36]. Aufgrund der Albuminkonzentration im Blut bzw. der Größe und Ladung von Albumin ist das Protein kaum membrangängig und reguliert damit die Flüssigkeitsverteilung zwischen Gewebe und Blut.

Das erklärt auch, weshalb es bei einem Albuminmangel vermehrt zur Ödembildung kommt. Des Weiteren trägt HSA zu Pufferung des Blut-pH-Wertes bei und zeigt (pseudo-)enzymatische Eigenschaften [4,8,13,23,27,28].

2.1.2.1 Depot- und Carrier-Funktion

Albumin ist in der Lage, viele verschiedene endogene und exogene Stoffe reversibel und irreversibel zu binden und zu transportieren. Gerade lipophile Stoffe können so durch den Blutkreislauf zu ihrem Wirkort gelangen, obwohl sie in ihrer freien Form im Plasma nicht ausreichend löslich sind. Albumin bindet wegen der Struktur der Bindetaschen und seiner negativen Nettoladung vorwiegend saure und neutrale Substanzen. Basische Stoffe werden hingegen weitestgehend vom sauren α_1 -Glykoprotein transportiert. Zu den von Albumin gebundenen Substanzen zählen unter anderem endogene Stoffe wie Fettsäuren, Hormone (Aldosteron, Thyroxin), toxische Metabolite (Bilirubin), Gallensäuren, Aminosäuren und Metallionen, aber auch viele Arzneistoffe [23,27,28]. Die Bindung an Albumin ermöglicht nicht nur den Transport von Arzneistoffen (Carrierfunktion), sondern schützt die Liganden auch vor dem Metabolismus bzw. der Elimination (Depotfunktion). Durch die Bindung bildet der an Albumin gebundene Anteil der Substanz ein Depot, welches die Pharmakokinetik der Substanz maßgeblich beeinflussen kann [23].

Der Transport von Substanzen – insbesondere der Arzneistoffe – erfolgt vorwiegend über Bindung an zwei Bindestellen auf der Oberfläche des Albumins – Sudlow I und Sudlow II – benannt nach *G. Sudlow*, der diese Bindestellen als erstes beschrieben und untersucht hat [37]. Die Bindestelle Sudlow I, auch Warfarin-Bindestelle genannt, befindet sich auf der Subdomäne IIA von Albumin. Der Eingang der Bindetasche weist in Richtung von Subdomäne IIIA, wodurch eine Stabilisierung der Bindung auch über Aminosäureseitenketten von Subdomäne IIIA und IIB möglich ist. Die Sudlow-I-Bindestelle ist eine große, flexible Bindestelle mit mindestens zwei unabhängigen, apolaren Binderegionen innerhalb der Bindetasche und einer zentral gelegenen polaren Region. Durch diesen Aufbau handelt es sich bei den Sudlow-I-Liganden meist um Dicarbonsäuren bzw. große Heterozyklen mit einer mittig im Molekül gelegenen negativen Ladung. Die große Flexibilität der Bindestelle ermöglicht die Bindung unterschiedlichster Liganden, bewirkt jedoch gleichzeitig auch eine nur geringe Stereoselektivität [23,27].

Die Benzodiazepin-Bindestelle oder Sudlow II befindet sich in der Subdomäne IIIA. Die vorwiegend apolare Bindetasche liegt in der Peripherie des Proteins und hat eine polare Gruppe direkt am Eingang der Bindetasche. Damit wird die Bindung an Sudlow II im Unterschied zu Sudlow I nicht durch Interaktion mit anderen Subdomänen beeinflusst. Es wird angenommen, dass diese Bindestelle generell kleiner bzw. enger ist, da große Liganden seltener an diese Position im Protein binden. Bei den Liganden handelt es sich meist um amphiphile, aromatische Carbonsäuren, bei denen die negativ geladene Carbonsäure räumlich vom hydrophoben, aromatischen Teil getrennt ist ^[23,27]. Eine Übersicht zu beiden Sudlow-Bindestellen und einige wichtige Arzneistoffliganden sind in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2: Wichtigste Liganden an den Bindestellen Sudlow I und Sudlow II ^[27,38]

Sudlow I	Sudlow II
Warfarin	Diazepam
Phenylbutazon	Ibuprofen
Indomethacin	Ketoprofen
Tolbutamid	Naproxen
Furosemid	Diclofenac
Sulfisoxazol	Clofibrat
Valproinsäure	
Phenytoin	
Tamoxifen	

Neben den gut untersuchten Sudlow-I- und Sudlow-II-Bindestellen binden Substanzen auch an andere Bereiche des Albumins. So gibt es unter anderem eine Digitoxin-Bindestelle, deren genaue Position auf dem Albumin-Molekül jedoch noch unklar ist ^[27,38-40]. Weiterhin gibt es Liganden, die mit dem freien Cystein in Position 34 auf der Subdomäne IA interagieren. Zu ihnen zählen D-Penicillamin, Captopril, Etacridinsäure, Disulfiram, Cisplatin und Goldkomplexe ^[23,27].

Albumin bindet aber nicht nur Xenobiotika, sondern auch körpereigene Stoffe wie Bilirubin (Subdomäne IB), Häm, Thyroxin und Fettsäuren. Dabei kann HSA bis zu neun Fettsäuremoleküle auf seiner Oberfläche binden. Die Bindung von Fettsäuren an HSA kann

einen Einfluss auf die Bindung von anderen Substanzen haben. So konkurriert Thyroxin mit den Fettsäuren um seine vier Bindestellen; gleichzeitig bewirkt die Konformationsänderung von HSA durch die Fettsäuren die Entstehung einer fünften Thyroxin-Bindestelle auf dem Protein ^[23].

2.1.2.2 (Pseudo-)Enzymatische Eigenschaften

Neben der Depot- und Carrierfunktion des Albumins zeigt das Protein auch (pseudo-)enzymatische Eigenschaften. HSA ist im Vergleich zu den anderen Plasmaproteinen ein nicht glykosyliertes Protein; daher werden die Aminosäuren des Makromoleküls nicht durch Kohlenhydratketten abgeschirmt und sind damit besser zugänglich für Reaktionen mit anderen Substanzen ^[23]. Die Esteraseaktivität von HSA wird vor allem durch zwei Reste verursacht: Lys199 auf Subdomäne IIA und Tyr411 auf Subdomäne IIIA. Ein sehr bekanntes Beispiel für die Esteraseaktivität am Lys199 ist die Spaltung von Acetylsalicylsäure ^[28].

Neben den (pseudo-)enzymatischen Eigenschaften wirkt Albumin zudem antioxidativ. Maßgeblich hierfür sind die sechs Methionin-Reste im Albumin, die als Metall-Chelator fungieren, und die freie Thiolgruppe des Cys34, ein Radikalfänger ^[23].

2.1.3 Indikationen

Albumin hat zahlreiche Anwendungsgebiete. So wird es zum einen als Plasmaexpander bei Hypovoluminämie und Blutverlusten durch Operationen, Traumata und Hämorrhagie verabreicht. Außerdem wird es bei Verbrennungen, Schock und zur Hämodialyse eingesetzt. Des Weiteren wird es bei der Behandlung von Albuminmangel in Folge von Mangelernährung, Albuminurie und akuten bzw. chronischen Lebererkrankungen verwendet ^[4,23]. In der Galenik findet Albumin als Drug-Carrier Anwendung. Durch die Bindung an HSA kann einerseits die Plasmahalbwertszeit bestimmter Wirkstoffe, wie den Insulinen (Levemir[®], Tresiba[®]) verlängert werden. Andererseits lässt sich durch die Albuminbindung die Anwendung bzw. Wirkung mancher Zytostatika (Aldoxorubicin, Abraxane[®]) gezielter steuern ^[29,41].

2.2 Saures α_1 -Glykoprotein

Das für den Arzneistofftransport neben Albumin wichtigste Plasmaprotein ist das saure α_1 -Glykoprotein (AGP) oder Orosomucoid, das zur Fraktion der α_1 -Globuline zählt. Wie der Name schon sagt, handelt es sich bei AGP um ein Glykoprotein, das beim Menschen aus 183 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 41 – 43 kDa hat. AGP hat vielfältige Aufgaben im Blut, die genaue biologische Funktion ist aber bisher noch unklar. Die Plasmakonzentration von AGP variiert stark, da es sich um ein Akute-Phase-Protein handelt, das je nach Bedarf in der Leber synthetisiert wird. Das Protein ist zu ca. 45 % glykosyliert, wobei der Glykosylierungszustand je nach Ausmaß einer Entzündung variieren kann. AGP hat immunmodulatorische sowie antiinflammatorische Eigenschaften und schützt somit vor oxidativem Stress, Gewebeschäden und Schock ^[19,42].

Als Transportprotein bindet AGP im Gegensatz zu Albumin vorwiegend neutrale und basische Liganden wie die Arzneistoffe Tamoxifen, Lidocain und Propranolol. Vereinzelt ist jedoch auch die Bindung von sauren Liganden wie dem Antiepiletikum Phenobarbital möglich. Bei den körpereigenen Stoffen dient AGP unter anderem als Transportvehikel für Steroide. Die Bindung erfolgt vor allem über hydrophobe aber auch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand. Damit korreliert die Bindungsaffinität zu AGP mit der Lipophilie und dem Ladungszustand der Liganden im physiologischen Milieu. Die stark variierende AGP-Konzentration im Blutplasma sorgt jedoch dafür, dass auch das Ausmaß der Plasmaproteinbindung der Liganden teilweise sehr schwanken kann ^[19,43].

KLINISCHE RELEVANZ – ÄNDERUNG DER PPB

Der Einfluss der Plasmaproteinbindung auf die Pharmakokinetik und –dynamik von Arzneistoffen wurde bereits erläutert. Dabei ist die klinische Relevanz der Plasmaproteinbindung im Vergleich zu den anderen genannten Einflussfaktoren in der Arzneimitteltherapie zunächst zweitrangig, solange sich das Ausmaß der Plasmaproteinbindung nicht maßgeblich ändert. In bestimmten Fällen kann das Ausmaß der Plasmaproteinbindung jedoch durchaus klinisch relevant werden. Dazu zählen zum einen eine veränderte Plasmaproteinkonzentration aufgrund von Mangelernährung, Alter oder

Krankheit. Zum anderen kann eine veränderte Affinität zu den Plasmaproteinen durch Konkurrenz mehrerer Liganden um die vorhandenen Bindestellen die freie Ligandkonzentration im Plasma beeinflussen ^[3,4,44,45].

3.1 Verdrängung aus der Plasmaproteinbindung

Über lange Zeit galt die Konkurrenz um die Bindestellen und die Verdrängung von Arzneistoffen aus der Plasmaproteinbindung, sei es nun die Bindung an Albumin oder andere Plasmaproteine, als Ursache für teilweise schwerwiegende Nebenwirkungen. In den letzten Jahren hat sich in der Literatur diese Meinung jedoch relativiert ^[44,46,47]. So wird heute die Verdrängung aus der Plasmaproteinbindung nicht mehr als alleinige Ursache für beobachteten Nebenwirkungen gesehen. Durch die Verdrängung des Wirkstoffs kommt es zwar kurzfristig zu einer Erhöhung der freien Konzentration im Plasma, jedoch stellt sich durch Elimination und Metabolismus das Gleichgewicht in den meisten Fällen sehr schnell wieder ein. Beim Zusammentreffen mehrerer Faktoren ist es jedoch möglich, dass es zu einer längerfristigen Erhöhung der freien Wirkstoffkonzentration und damit zu schwerwiegenden Nebenwirkungen kommen kann. Klinisch relevant wird der Fall meist nur bei sehr potenten Wirkstoffen mit einer geringen therapeutischen Breite, einer hohen Plasmaproteinbindung und einem geringen Verteilungsvolumen. In diesem Fall können auch kurzfristige Veränderungen der Proteinbindung durch eine starke Erhöhung der freien Plasmakonzentration zu toxischen Effekten führen ^[4,23,44-47].

Ein sehr bekanntes Beispiel für die Verdrängung aus der Proteinbindung als Ursache für beobachtete Nebenwirkungen ist Warfarin. Der Vitamin-K-Antagonist galt lange Jahre als das Paradebeispiel für die Entstehung von unerwünschten Arzneimittelwirkungen durch die Verdrängung aus der Plasmaproteinbindung ^[27,48]. Warfarin hat eine hohe Plasmaproteinbindung und bindet an die Sudlow-I-Bindestelle des Albumins, wodurch er durch andere Sudlow-I-bindende Wirkstoffe wie die nichtsteroidalen Antiphlogistika aus der Bindung verdrängt werden kann. Die Folgen der erhöhten freien Plasmakonzentration sind unter anderem innere Blutungen. Mittlerweile weiß man aber, dass die Verdrängung aus der Albuminbindung nicht die einzige Ursache dafür ist. Vielmehr bedingt ein veränderter Metabolismus über die Cytochrom-P450-Enzyme einen langsameren Abbau des Warfarins

und dadurch eine Erhöhung der Prothrombinzeit. Dieser Effekt muss insbesondere am Anfang einer Therapie beachtet werden, wenn noch kein Steady-State erreicht wurde ^[4,27]. Ein weiteres Beispiel ist Methotrexat. Der Folsäure-Antagonist hat wie Warfarin eine sehr enge therapeutische Breite und eine hohe Plasmaproteinbindung. Bei der gleichzeitigen Gabe von Salicylaten, Probenecid, Penicillinen oder Sulfonamiden kann es einerseits durch Verdrängung aus der Plasmaproteinbindung und andererseits durch Konkurrenz um die renale tubuläre Sekretion zu schwerwiegenden Nebenwirkungen, bedingt durch die Zytotoxizität des Methotrexats, kommen ^[4,49].

Eine Verdrängung aus der Proteinbindung betrifft jedoch nicht immer nur zwei Arzneistoffe. Auch körpereigene Stoffe (z.B. Bilirubin) können durch Arzneistoffe aus ihrer Proteinbindung verdrängt werden und durch die höheren Plasmaspiegel zu erheblichen Nebenwirkungen führen ^[4].

3.2 Veränderungen in Abhängigkeit vom Alter

Das Alter der Patienten kann neben anderen Einflussfaktoren auch einen entscheidenden Einfluss auf die Konzentration der Plasmaproteine haben. Föten und Neugeborene bis zur 5. Woche haben im Vergleich zum Erwachsenen eine erniedrigte Plasmaproteinkonzentration (75 – 80 % des erwachsenen HSA-Spiegels) und eine noch eingeschränkte Leber- und Nierenfunktion. Das Zusammenspiel und der Einfluss dieser Faktoren lässt sich am Beispiel des Bilirubin gut verdeutlichen. Bilirubin ist ein Abbauprodukt des Hämoglobins und schlecht wasserlöslich. Daher wird Bilirubin durch Bindung an Serumalbumin zur Leber transportiert, um dort verstoffwechselt zu werden. Durch den noch eingeschränkten Metabolismus kann sich das Bilirubin zunehmend im Körper anreichern, weshalb es bei Neugeborenen hin und wieder zur Hyperbilirubinämie kommt. Dieser Zustand normalisiert sich durch Steigerung des Metabolismus in den ersten Wochen meist von selbst. Bei der Arzneimitteltherapie von Neugeborenen bis zur 5. Woche und Mütter im 3. Trimenon müssen diese Einschränkungen jedoch beachtet werden. Wird ein Wirkstoff verabreicht, der Bilirubin aus der Bindung zu Albumin verdrängt, wie z.B. ein Sulfonamid oder Salicylat, wird die Konzentration an freiem Bilirubin zusätzlich gesteigert. Es kann vermehrt zu einer Hyperbilirubinämie und gegebenenfalls auch zu einem Kernikterus kommen. Bei einem Kernikterus gelangt das Bilirubin ins zentrale Nervensystem und bewirkt durch die

Ablagerung in den Basalganglien des Großhirns Schädigungen des Gehirns und Entwicklungsstörungen beim Neugeborenen [4,23,50].

Mit den Jahren und dem zunehmenden Alter des Menschen nehmen die Funktionsleistung der Leber und Niere und damit auch die Konzentration der Plasmaproteine wieder ab. Zusätzlich beeinflussen hier weitere Faktoren wie Multimorbidität und einer damit verbundenen Multimedikation bzw. Veränderung der Körperzusammensetzung und Verteilungsvolumina das Ausmaß der Plasmaproteinbindung im Alter. All diese Faktoren können damit die Arzneimitteltherapie im Alter maßgeblich beeinflussen [4,23].

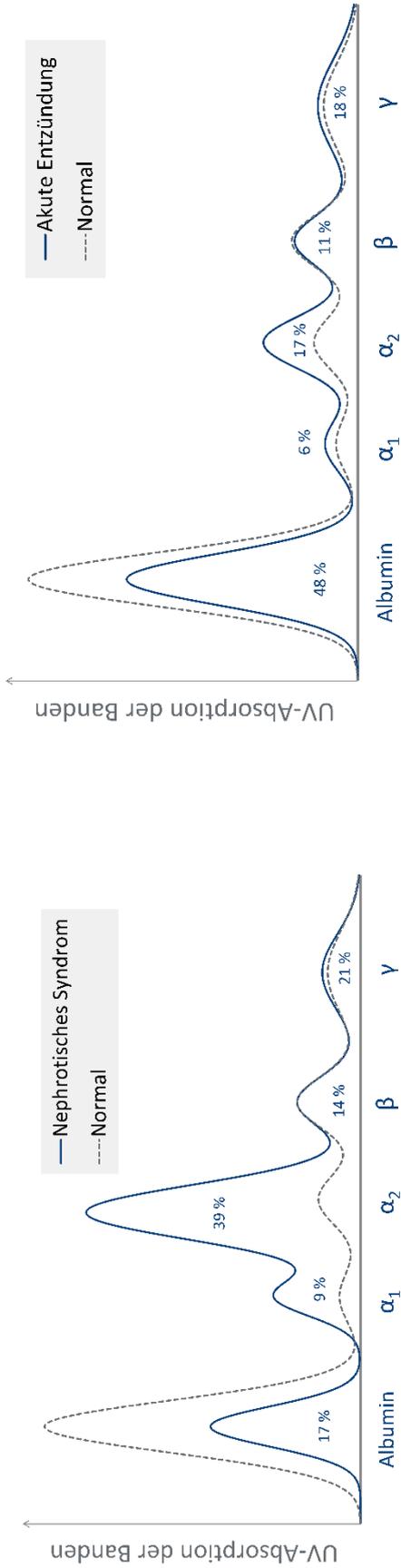
3.3 Pathophysiologische Veränderungen im Körper

Weiterhin können auch pathophysiologische Veränderungen im Körper zu einer Veränderung der Plasmaproteinkonzentration bzw. deren Verhältnisse führen. Diese Dysproteinämie kann ein Hinweis auf eine Krankheit sein. Manche Erkrankungen zeigen teilweise sehr charakteristische Veränderungen der Plasmaproteinfraktionen bei der Serumelektrophorese (siehe Abb. 7) [8,13-15].

Das nephrotische Syndrom wird beispielsweise durch eine Schädigung des Filtrationsapparats im Glomerulus verursacht. Die Folge ist eine Proteinurie, d.h. ein Verlust der Plasmaproteine über die Niere. Das spiegelt sich insbesondere in der erniedrigten Albuminkonzentration wider. Ein Symptom des nephrotischen Syndroms ist die Ödembildung, die durch den Albuminmangel hervorgerufen wird. Durch das fehlende Albumin kann der kolloidosmotische Druck in den Gefäßen nicht mehr in ausreichendem Maße aufrechterhalten werden. Als Folge diffundiert Wasser aus den Blutgefäßen in die umliegenden Gewebe. Weiterhin ist beim nephrotischen Syndrom eine Erhöhung der α_2 - und β -Fraktion charakteristisch (siehe Abb. 7 A) [13,14].

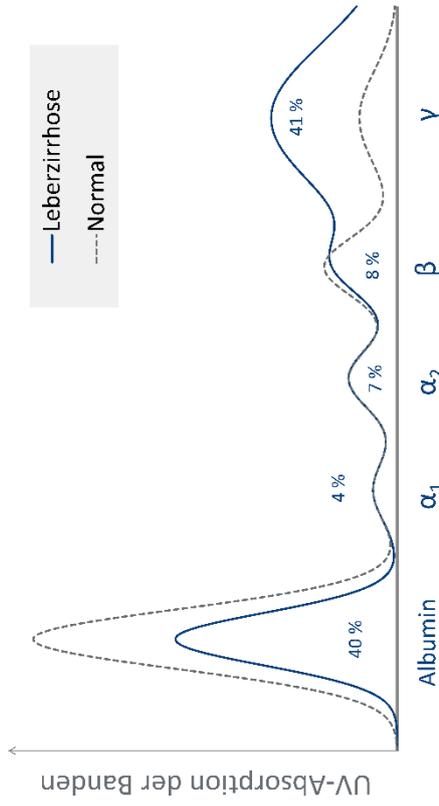
Anders verhält es sich bei einer akuten Entzündung. Hier verursachen die ausgeschütteten Zytokine einen Anstieg der Akute-Phase-Proteine der α_1 - und α_2 -Fraktion (siehe Abb. 7 B).

Bei einer Leberzirrhose ist die Synthesefähigkeit der Leber vermindert. Da die meisten Plasmaproteine in der Leber gebildet werden, geht die Leberzirrhose mit einer Erniedrigung dieser Plasmaproteinfraktionen einher. Die Erhöhung der Immunglobuline, die von Plasmazellen gebildet werden, ist ein Zeichen für eine chronische Entzündung – eine der Ursachen für Leberzirrhose (siehe Abb. 7 C) [13,14].



A Nephrotisches Syndrom

B Akute Entzündung



C Leberzirrhose

D Monoklonale Gammopathie

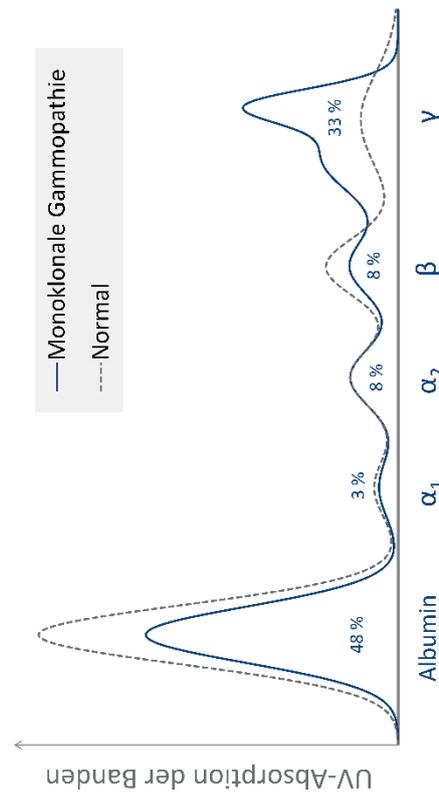


Abb. 7: Pathologische Veränderung der Plasmaproteinfractionen bei der Serumelektrophorese [13,14]

Eine Monoklonale Gammopathie wird häufig durch eine bösartige Veränderung der Plasmazellen im Knochenmark verursacht. Die entarteten Plasmazellen produzieren vermehrt γ -Globuline, wodurch ein schmaler Peak bei der Serumelektrophorese in der γ -Fraktion erkennbar ist (siehe Abb. 7 D) ^[13,14].

Eine Verringerung der Plasmaproteinkonzentration, insbesondere von Albumin, tritt auch bei Unterernährung auf. Durch Mangel an Nährstoffen und verminderter Proteinzufuhr kann die Leber Albumin nicht in dem Ausmaße produzieren, wie es bei einem gesunden, gut genährten Menschen der Fall ist. Beim Kwashiorkor- oder dem Hungerödem macht sich die Mangelernährung und der Albuminmangel ebenfalls durch eine Ascites, einer sichtbaren Ödembildung im Bauchbereich, bemerkbar ^[6,8,51,52].

Letztendlich führt nicht jede Veränderung in der Plasmaproteinbindung zwangsweise zu Nebenwirkungen und oft treten diese erst durch das Zusammenspiel mehrerer Faktoren auf. Jedoch sollte bei einer bekannten Veränderung in der Plasmaproteinbindung – sei es durch Krankheit oder das Alter – eine Dosisänderung bzw. eine Anpassung des Dosisintervalls durchaus in Betracht gezogen und genau abgewogen werden, um eine Schädigung des Patienten zu verhindern.

EPHEDRIN

Ephedrin ist ein Naturstoff, der in der Arzneidroge Ephedrakraut (*Ephedra herba*) vorkommt. Die alkaloidhaltige Droge wird aus den Rutenzweigen des Meerträubels (*Ephedra*) gewonnen und besitzt einen Gesamtalkaloidgehalt von 1 – 2 % ^[53-55]. Die Pflanze enthält neben (-)-Ephedrin als Hauptalkaloid auch (+)-Pseudoephedrin. Weiterhin kommen Nor- und Methylephedrin bzw. -pseudoephedrin vor. Als *Ma Huang* wird das Ephedrakraut seit ca. 5 000 Jahren in der Traditionellen Chinesischen Medizin eingesetzt. Angewendet wird es dort als schweißtreibendes Mittel bzw. als Bronchialmittel. In der westlichen Schulmedizin wird Ephedrakraut als Tee, in den USA auch als Mormonentee bekannt, bei Atemwegserkrankungen mit leichten Bronchospasmen eingesetzt. In der Antike wurde es zudem als schleimlösendes Mittel verwendet ^[53-55].

Die Alkaloide Ephedrin und Pseudoephedrin werden zu den indirekten Sympathomimetika gezählt, Ephedrin soll aber auch eine direkte α - und β -adrenerge Wirkung haben ^[9,53]. Bei der

indirekten adrenergen Wirkung der beiden Stoffe stehen die Vasokonstriktion mit Schleimhautabschwellung und Steigerung des systolischen Blutdrucks bzw. die kardiale Stimulation und die Broncholyse in Vordergrund ^[1,55,56]. Indiziert ist Ephedrin – als i.v. Bolusgabe neben Phenylephrin – zur Behandlung der Hypotonie, die bei Narkosen mit Propofol ^[57] oder Regionalanästhesien bei Hüftoperationen oder Kaiserschnitten auftreten kann ^[56,58,59]. Weiterhin wird es bei Bronchospasmen intramuskulär, subcutan oder intravasal verabreicht ^[56]. Off-Label wird es auch bei neuropathischen Ödemen eingesetzt, die bei der diabetischen Neuropathie auftreten ^[17]. Im OTC-Bereich werden Ephedrin und Pseudoephedrin als schleimhautabschwellende Mittel bei Erkältung oder allergischer Rhinitis eingesetzt ^[60].

Gewonnen wird Ephedrin heutzutage nicht mehr aus Ephedrakraut, sondern durch Totalsynthese oder auf mikrobiellem Weg über Hefen ^[55]. Ephedrakraut zählt zu den „*herbal ecstasies*“ und gilt als älteste überlieferte Aufputschdroge ^[54]. Durch seine Lipophilie ist Ephedrin gut ZNS-gängig und wirkt zentral stimulierend. Aus diesem Grund hat Ephedrin ein hohes Missbrauchspotenzial und wird wegen der amphetaminartigen Wirkung als Stimulans für Parties, als Lernhilfe oder als Dopingmittel verwendet ^[1,54,55]. Aufgrund der appetitmindernden Wirkung wird es auch missbräuchlich zur Gewichtsreduktion eingesetzt ^[55]. Durch die Einsatzmöglichkeit zur Synthese illegaler Drogen zählen Ephedrin und Pseudoephedrin zu den Grundstoffen der Kategorie I im Grundstoff-Überwachungsgesetz (GÜG). Weiterhin stehen beide Substanzen als Stimulanzien auf der Anti-Dopingliste der WADA (World Anti-Doping Agency) bzw. NADA (Nationale Anti Doping Agentur) ^[54].

STEREOSELEKTIVITÄT

Die Chiralität einer Substanz spielt auch in der Arzneimitteltherapie eine große Rolle, da viele Arzneimittelwirkungen auf Interaktionen mit Proteinen, wie Enzymen oder Rezeptoren, zurückzuführen sind. Da Proteine in der Regel chiral sind, sind auch viele Wechselwirkungen mit Proteinen und enzymatische Reaktionen enantioselektiv. Durch diese Enantioselektivität ist meist auch die pharmakologische Wirkung der Enantiomere unterschiedlich. Das pharmakologisch wirksamere Enantiomer des Racemats wird als Eutomer, das schwächer

wirksame Enantiomer als Distomer bezeichnet. Die meisten synthetisch hergestellten Arzneistoffe werden jedoch als Racemate eingesetzt, wohingegen viele natürlich vorkommende Wirkstoffe durch die Natur in enantiomerenreiner Form synthetisiert werden. Bei den meisten Vorgängen hängt die Enantioselektivität von der Affinität des Wirkstoffes zum Protein ab. Die Pfeiffer'sche Regel besagt, je höher die Affinität zum Target, desto höher auch die Stereoselektivität.

Zahlreiche Studien haben die Stereoselektivität bei der Bindung an humanes Serumalbumin untersucht. So bindet beim NSAID Ibuprofen und dem Cumarinderivat Warfarin bevorzugt das (R)-Enantiomer. Dieses weist eine 2,3mal bzw. 1,2mal so starke Affinität zum Albumin auf wie das (S)-Enantiomer ^[1,61-63]. Bei den Benzodiazepinen Oxazepam und Lorazepam hingegen zeigt das (S)-Enantiomer die höhere Affinität zu HSA und bindet 5 – 6mal bzw. 2 – 3mal stärker als das (R)-Enantiomer ^[64]. Doch nicht nur bei der Bindung von Wirkstoffen zeigt sich eine Stereoselektivität. L-Tryptophan bindet beispielsweise hundertmal stärker an humanes Serumalbumin als R-Tryptophan ^[61,65]. Die Bindung von Wirkstoffen erfolgt wie erwähnt vorwiegend an zwei Bindestellen am Albumin, Sudlow I und Sudlow II. Dabei wurde festgestellt, dass die kleinere und weniger flexible Bindestelle Sudlow II durch die räumliche Einschränkung für die meisten Liganden eine höhere Stereoselektivität aufweist als Sudlow I ^[27].

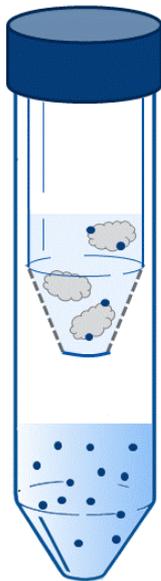
Auch bei anderen Plasmaproteinen wie dem sauren α_1 -Glykoprotein (AGP) konnte eine Stereoselektivität, insbesondere bei basischen Liganden nachgewiesen werden. So bindet das (-)-Enantiomer des Betablockers Propranolol 1,3mal stärker an AGP als das rechtsdrehende Enantiomer ^[66,67].

METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER PLASMAPROTEINBINDUNG

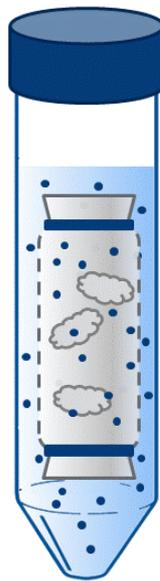
Es gibt unzählige Methoden zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung. Die klassischen Methoden – zu denen die Ultrafiltration, die Gleichgewichtsdialyse und die Ultrazentrifugation zählen ^[5] – basieren alle auf demselben Prinzip. Zur Bestimmung der Affinität wird der ungebundene Wirkstoffanteil von dem Protein-Wirkstoff-Komplex und dem freien Protein abgetrennt und quantifiziert. Da es sich bei der Proteinbindung um eine

Gleichgewichtsreaktion handelt, wird die Wirkstoff-Protein-Lösung vorher bzw. während der Trennung solange inkubiert, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat.

ULTRAFILTRATION



GLEICHGEWICHTSDIALYSE



ULTRAZENTRIFUGATION

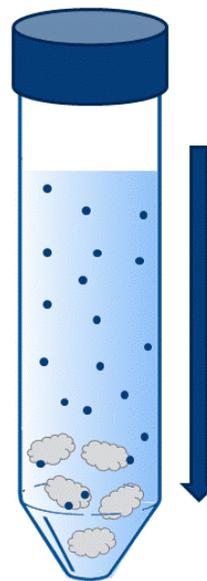


Abb. 8: Schematische Darstellung der klassischen Methoden zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung ^[5]

Bei der Ultrafiltration wird die Wirkstoff-Protein-Lösung nach Einstellen des Gleichgewichts durch einen Membranfilter mit definierter Porengröße filtriert, der das freie Makromolekül und den Makromolekül-Wirkstoff-Komplex selektiv zurückhält. Der freie Wirkstoffanteil kann anschließend im Filtrat quantifiziert werden. Die Gleichgewichtsdialyse nutzt zur Trennung ebenfalls eine semipermeable Membran. Der freie Wirkstoff diffundiert durch die Membran und verteilt sich gleichmäßig in der gesamten Lösung. Das freie Protein und der Protein-Ligand-Komplex hingegen können die Membran nicht passieren und verbleiben im Dialyseschlauch. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wird auf der Membranseite ohne Protein der freie Wirkstoffanteil bestimmt. Bei der Ultrazentrifugation macht man sich den Unterschied beim Molekulargewicht von Protein und niedermolekularem Wirkstoff zunutze. Die größeren Proteine und der Wirkstoff-Protein-Komplex werden durch die Zentrifugalkraft vom Rest der Lösung getrennt. Im Überstand bleibt damit nur der freie Wirkstoff ^[5,68].

Die klassischen Methoden zeichnen sich durch eine einfache Handhabung aus und viele Schritte sind automatisierbar, wodurch ein hoher Probendurchsatz möglich ist. Nicht nur deshalb erfreuen sich die klassischen Methoden heute immer noch großer Beliebtheit. Zusätzlich existieren instrumentelle Methoden, die ebenfalls auf der Trennung von ungebundenem und gebundenem Wirkstoffanteil beruhen ^[69]. Zu ihnen zählen unter anderem die Hummel Dreyer-Methode ^[70,71], die Frontalanalyse ^[72] und die Vacancy-Peak-Methode ^[73].

Neben der klassischen Trennung von ungebundenem und gebundenem Wirkstoffanteil gibt es auch andere Möglichkeiten die Interaktion von Protein und Ligand zu charakterisieren und zu quantifizieren. So lässt sich die Affinität einer Ligand-Protein-Interaktion auch mittels Affinitätschromatographie bzw. Affinitätskapillarelektrophorese bestimmen. Die Affinitätschromatographie verwendet als stationäre Phase unter anderem immobilisiertes humanes Serumalbumin. Je größer die Affinität zum Albumin, desto stärker wird der Wirkstoff durch die Wechselwirkung mit der stationären Phase zurückgehalten und desto länger ist seine Netto-Retentionszeit ^[74,75]. Bei der Affinitätskapillarelektrophorese wird Albumin, statt der stationären Phase aus HSA, als Pufferzusatz im Trennpuffer verwendet ^[73]. Durch den direkten Zusammenhang zwischen der Retentions- bzw. Migrationszeit und der Affinität zu Albumin lässt sich so das Ausmaß der Plasmaproteinbindung bestimmen ^[69].

Weitere instrumentelle Methoden, die zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung zum Einsatz kommen, nutzen die Änderungen bestimmter Parameter bzw. Stoffeigenschaften von Protein oder Ligand infolge der Bindung aus. Zur Messung eignen sich zum einen spektroskopische Methoden wie die NMR- und UV-Spektroskopie und zum anderen kalorimetrische Methoden ^[69,76,77]. Die Bestimmung der Affinität einer Substanz zu Albumin kann beispielsweise mittels Fluoreszenzlöschung des Proteins oder der Änderung der UV-Absorption des Liganden erfolgen. Viele Proteine, wie auch Albumin, zeigen durch die im Protein enthaltenen Aminosäuren eine Fluoreszenz. Diese Fluoreszenz kann sich je nach Umgebung bzw. Wechselwirkung mit anderen Molekülen verändern. Die Fluoreszenzlöschung, d.h. die Verringerung der Intensität des emittierten Lichts, hängt mit der Anzahl der gebundenen Ligand-Moleküle zusammen. Somit kann über die Veränderung des Fluoreszenzspektrums die Affinität des Liganden zum Protein bestimmt werden ^[78-80]. Besitzt ein Ligand ein UV-Absorptionsmaximum im längerwelligen Bereich, in dem das

Protein selbst nicht mehr absorbiert, wie z.B. Naphazolin, so kann auch die Veränderung der Wellenlänge des Absorptionsmaximums bzw. der UV-Absorption des Liganden zur Bestimmung der Affinität zum Protein herangezogen werden ^[81].

Neben den geänderten Stoffeigenschaften kann auch die Thermodynamik der Bindung zur Bestimmung der Affinität verwendet werden. Zur Bestimmung werden kalorimetrische Messmethoden wie die dynamische Differenzkalorimetrie (differential scanning calorimetrie, DSC) oder die isothermale Titrationskalorimetrie (iTC) eingesetzt. Bei der dynamischen Differenzkalorimetrie wird die Tatsache ausgenutzt, dass die Bindung des Liganden das Protein stabilisieren kann. Durch diesen von der Ligandkonzentration abhängigen Effekt kann die Affinität des Liganden zum Protein bestimmt werden ^[82]. Bei der isothermalen Titrationskalorimetrie wird die entstehende Bindungswärme bei der Bildung des Ligand-Protein-Komplexes bestimmt. Durch den Zusammenhang zwischen Wärmeentwicklung und Ligand-Protein-Verhältnis kann nicht nur die Bindungsstärke, sondern auch thermodynamische Parameter wie die Enthalpie ΔH und die Entropie ΔS des Bindungsvorgangs bestimmt werden ^[79,83-85].

Zusätzlich zu den experimentellen Methoden haben sich in den letzten Jahren immer mehr *In-silico*-Methoden etabliert, die erste Hinweise auf mögliche Bindungen geben bzw. experimentelle Daten untermauern können. Bei diesen Methoden wird anhand von Röntgen-Kristall-Strukturen ein 3D-Computermodell des Proteins und des Liganden erstellt. Bei Docking-Studien wird mithilfe statistischer Berechnungen prognostiziert, mit welcher Wahrscheinlichkeit und wo eine Interaktion zwischen Makromolekül und Ligand auftritt ^[2,86].

ZIEL DER ARBEIT

Ziel der Arbeit war es, das Ausmaß der Plasmaproteinbindung von Wirkstoffen mittels kontinuierlicher Ultrafiltration zu bestimmen. Im Fokus standen dabei die *Ephedra*-Alkaloide und die Untersuchung der Stereoselektivität der Plasmaproteinbindung. Obwohl die *Ephedra*-Alkaloide schon lange Zeit Bestandteil der Arzneimitteltherapie sind, gibt es nur wenige Publikationen, die das Ausmaß der Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide genauer bestimmt haben. Aufgrund dieser wenigen, sehr widersprüchlichen Untersuchungen in der Literatur bzw. den ungeklärten Ergebnissen von *Hörst*, wurden die

Ephedra-Alkaloide für diese Arbeit gewählt, um die noch offenen Fragen näher zu betrachten. Dazu wurden einerseits unterschiedliche Plasmaproteine wie humanes und bovines Serumalbumin, humanes saures α_1 -Glykoprotein und humanes Serum analysiert. Zum anderen wurden verschiedene orthogonale Bestimmungsmethoden wie die diskontinuierliche Ultrafiltration, die Affinitäts-Kapillarelektrophorese, die NMR-Spektroskopie und die isothermale Titrationskalorimetrie eingesetzt, um die Ergebnisse der kontinuierlichen Ultrafiltration zu untermauern. Am Beispiel der *Ephedra*-Alkaloide sollte so auch die Anwendbarkeit und Aussagekraft der verschiedenen Methoden untersucht werden. Zum besseren Verständnis der Ergebnisse und zur Ausarbeitung einer Struktur-Wirkungs-Beziehung bei der Plasmaproteinbindung, sollten neben den *Ephedra*-Alkaloiden zudem strukturell ähnliche Sympatomimetika getestet werden. Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit, als Teil der Charakterisierung neuer Substanzen, das Ausmaß der Plasmaproteinbindung von potentiellen Wirkstoffen bestimmt, die im Arbeitskreis Holzgrabe neu synthetisiert worden sind.



ULTRAFILTRATION

METHODEN

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, lässt sich die Plasmaproteinbindung von Substanzen mit verschiedenen Methoden bestimmen. Die Methode der kontinuierlichen Ultrafiltration (CUF) wird seit Jahren am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg angewendet, um das Ausmaß der Plasmaproteinbindung bekannter wie auch neu synthetisierter Substanzen zu bestimmen ^[87-90]. Zur Bestätigung der gemessenen Werte wurde, neben der kontinuierlichen Ultrafiltration, zusätzlich die diskontinuierliche Ultrafiltration (DUF) eingesetzt. Beide Ultrafiltrationsmethoden sind im Folgenden genauer beschrieben.

KONTINUIERLICHE ULTRAFILTRATION

Bei der Ultrafiltration besteht das grundlegende Messprinzip darin, dass gewisse Substanzen von der Filtermembran zurückgehalten werden, wohingegen andere Substanzen die Filtermembran ungehindert passieren können und im Filtrat quantifiziert werden können. Durch eine definierte Porengröße der Filtermembran werden alle Stoffe zurückgehalten, deren Molekulargewicht größer ist als diese Porengröße, angegeben als nominale Molekulargewichtsgrenze (NMGG; *engl. molecular weight cut-off, MWCO*).

Daher eignet sich das Prinzip der Ultrafiltration auch für die Bestimmung der Plasmaproteinbindung. Hierbei werden das freie Protein und der Protein-Ligand-Komplex von der Ultrafiltrationsmembran zurückgehalten, wohingegen der ungebundene, niedermolekulare Ligand die Membran ungehindert passieren kann. Durch Trennung des freien vom gebundenen Liganden und Quantifizierung des freien Liganden kann die Proteinbindung berechnet werden.

1.1. Aufbau und Optimierung der Anlage

Die ursprüngliche Anlage zur kontinuierlichen Ultrafiltration wurde von *Heinze* 2001, nach dem Vorbild von *Illy* und *Oehlmann* konstruiert ^[91,92]. Der Aufbau der Anlage ist in Abb. 9 dargestellt.

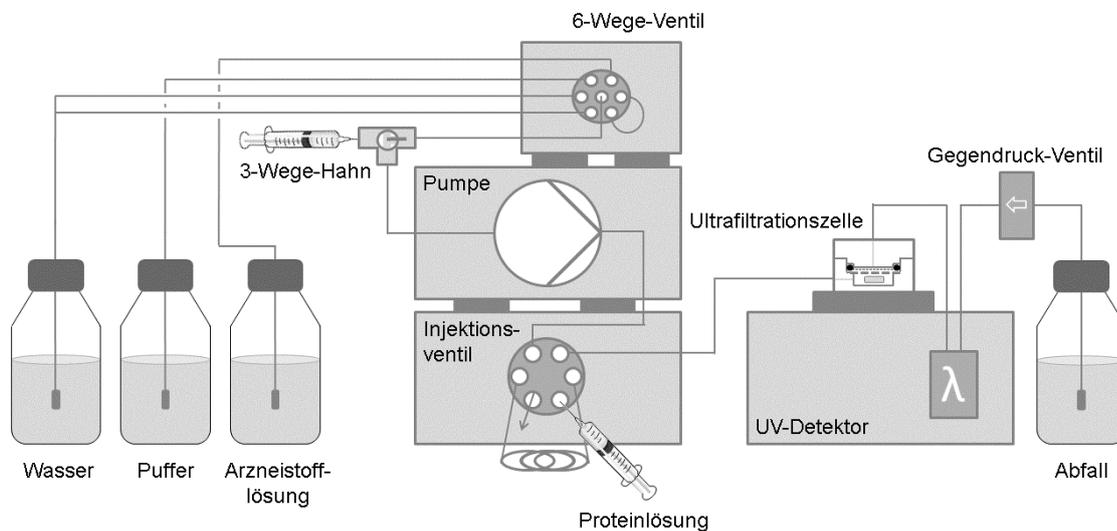


Abb. 9: Anlage zur kontinuierlichen Ultrafiltration nach *Heinze* ^[87,90]

Arzneistofflösung, Puffer und Wasser werden mithilfe einer HPLC-Pumpe durch die Anlage und die Messzelle gepumpt. Das 6-Wege-Ventil dient dazu, zwischen den verschiedenen Lösungen zu wechseln und je nach Versuchsabschnitt die entsprechende Lösung durch die Ultrafiltrationszelle zu pumpen. Der Zweck des 3-Wege-Hahns ist ausschließlich das Entfernen von Luftblasen vor der Pumpe, um Schwankungen in der Fließgeschwindigkeit zu vermeiden. Das Herzstück der Anlage ist die Ultrafiltrationszelle (Abb. 10), welche die Ultrafiltrationsmembran enthält. Diese Ultrafiltrationszelle entspricht in ihrem Aufbau den Zellen, die schon *Heinze*, *Albert* und *Hörst* verwendet haben ^[87-90]. Standardmäßig wird eine Zelle aus Polymethylmethacrylat (PMMA) verwendet.

Bei starker Adsorption an die Messzelle oder beim Einsatz von Puffer-zusätzen, bei denen PMMA unbeständig ist, kann auch eine Messzelle aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) verwendet werden ^[90]. Die verwendete Ultrafiltrationsmembran in der Messzelle weist eine definierte Porengröße auf und besteht in der Regel aus regenerierter Cellulose. In diesem

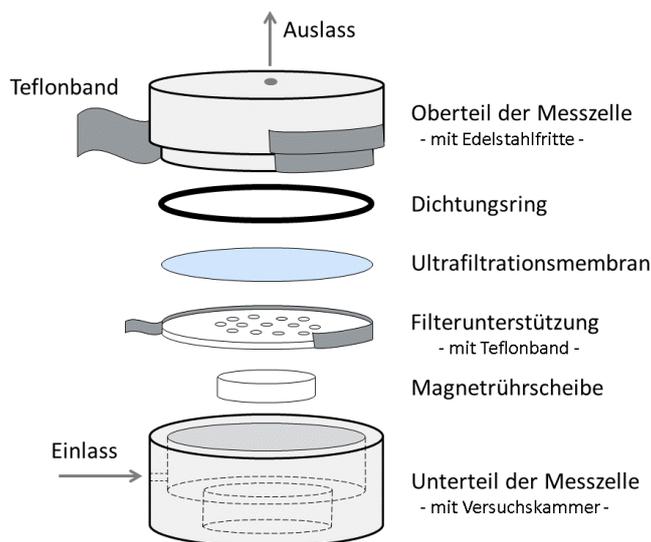


Abb. 10: Aufbau der Ultrafiltrationszelle

Versuchsaufbau hat die Membran eine nominale Molekulargewichtsgrenze (NMGG; *engl. molecular weight cut-off*, MWCO) von 10 kDa. Alle Stoffe, welche wie Albumin größer als 10 kDa sind, werden von der Membran zurückgehalten. Niedermolekulare Stoffe wie die meisten Arzneistoffe dagegen können die Membran ungehindert passieren. Bei nicht-spezifischer Bindung des Arzneistoffes an das

Filtermaterial kann auf Ultrafiltrationsmembranen aus Polyethersulfon (PES) zurückgegriffen werden. Die Magnetrührscheibe und der Magnetrührer sorgen dafür, dass sich Arzneistoff und Protein in der Messzelle homogen verteilen und sich so schneller ein Gleichgewicht zwischen gebundenem und freiem Arzneistoff einstellen kann. Wie erwähnt kann der freie Arzneistoffanteil die Membran passieren und erreicht so den Detektor; der Arzneistoff-Protein-Komplex hingegen wird ebenso wie das freie Protein vom Membranfilter zurückgehalten. Nach der Messzelle wird der freie Wirkstoff mithilfe eines VWD-UV-Detektors mit einem Wellenlängenbereich von 190 – 400 nm bzw. einem PDA-UV-Detektor mit einem Wellenlängenbereich von 190 – 395 nm bestimmt.

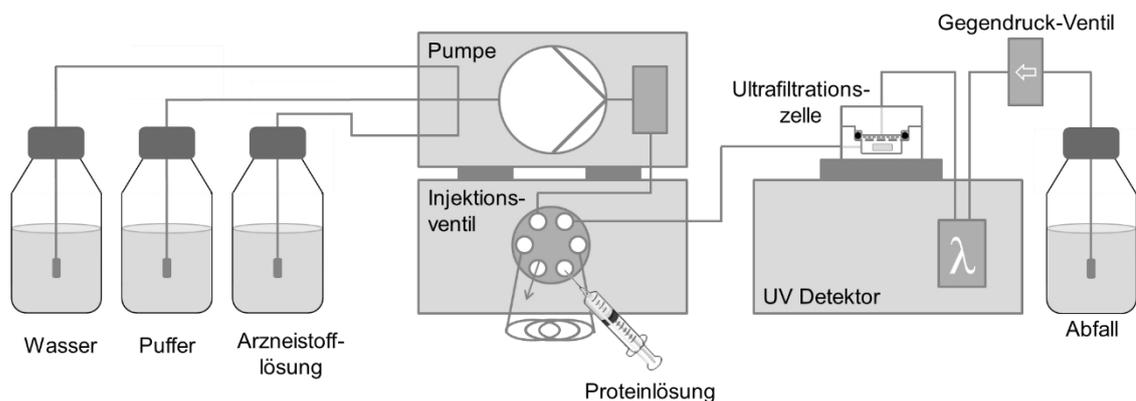


Abb. 11: Modifizierte Anlage zur kontinuierlichen Ultrafiltration

Nach mehr als zwölf Jahren Messbetrieb und immer wiederkehrenden Problemen bei der Versuchsdurchführung, einschließlich Messfehlern, wurde die Anlage leicht modifiziert, um wieder zuverlässige Ergebnisse zu erhalten. Der modifizierte Aufbau der Anlage ist in Abb. 11 dargestellt.

Treten Luftblasen während der Messung auf, so stören sie nicht nur das UV-Signal und führen zu Artefaktpeaks in der Absorptionskurve, sondern sie verändern auch die Fließgeschwindigkeit der Lösungen in der Anlage. Zur Vermeidung von Luftblasen werden zum einen die Wirkstoff- und Pufferlösungen vorher im Ultraschallbad für 15 Minuten entgast und zum anderen befindet sich ein Gegendruckventil am Ende der Anlage. Durch den Widerstand des Gegendruckventils wird ein Druck von 2 – 3 bar innerhalb der Anlage aufrechterhalten und verhindert so die Entstehung von Luftblasen durch plötzlichen Druckabfall auf Atmosphärendruck am Ende der Anlage. Das Gegendruckventil sorgt durch den konstanten Druck für eine konstante Fließgeschwindigkeit.

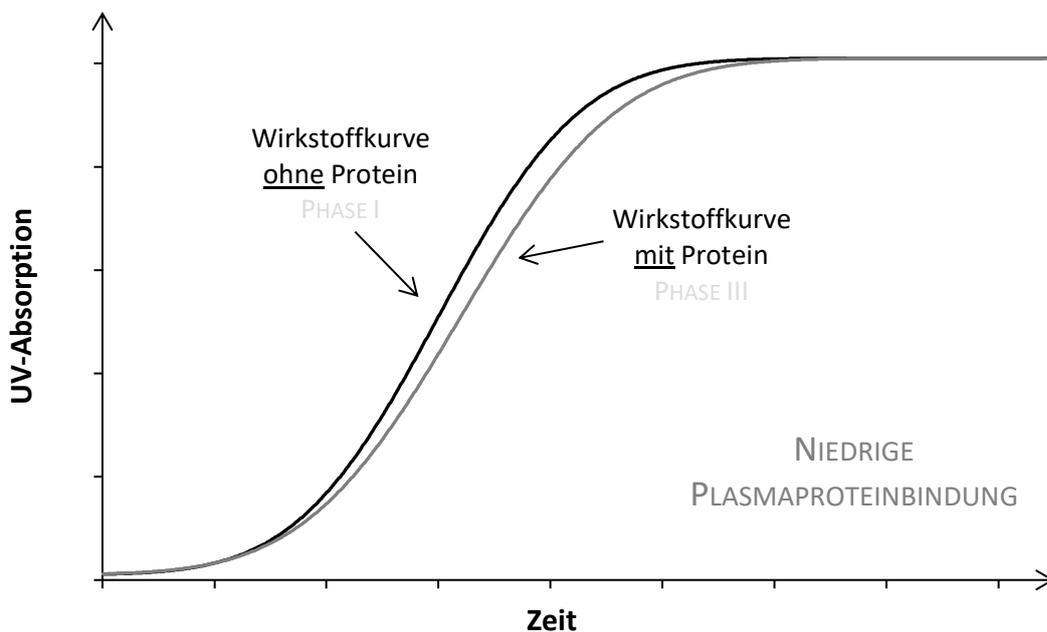


Abb. 12 A: Schematische Darstellung der Messkurven eines CUF-Versuchs; für eine Substanz mit niedriger Plasmaproteinbindung

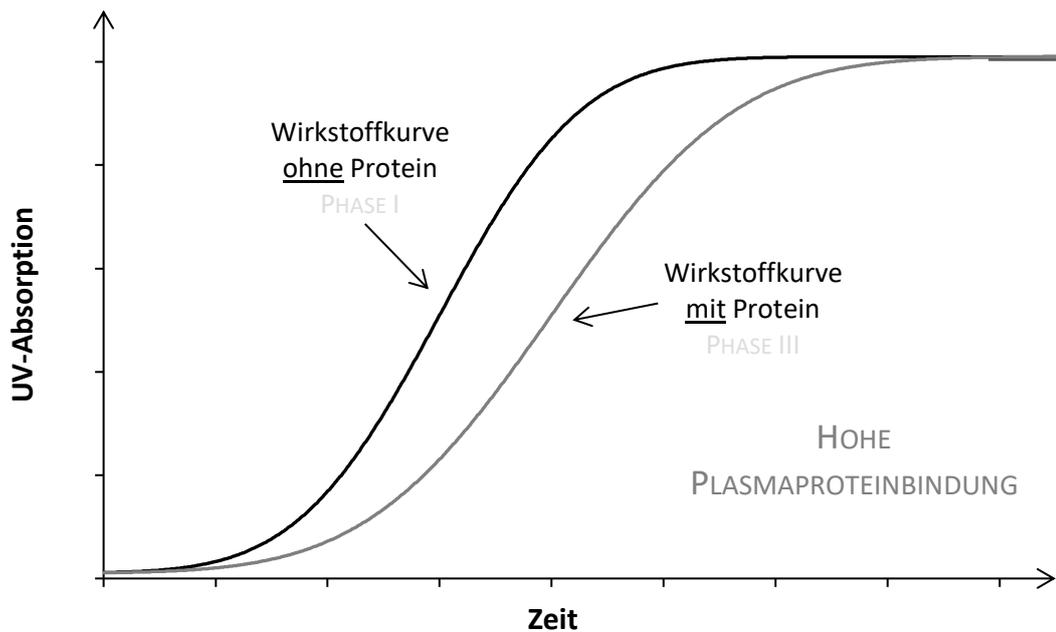


Abb. 12 B: Schematische Darstellung der Messkurven eines CUF-Versuchs; für eine Substanz mit hoher Plasmaproteinbindung

Eine konstante Fließgeschwindigkeit ist eine grundlegende Voraussetzung für die Bestimmung der Plasmaproteinbindung mittels kontinuierlicher Ultrafiltration, da die Proteinbindung letztendlich über den zeitlichen Versatz der beiden Kurven (siehe Abb. 12 A und Abb. 12 B) bestimmt wird. Führt allein eine über die Zeit sich verändernde Fließgeschwindigkeit zu einem zeitlichen Unterschied der beiden Messkurven, ist es unmöglich richtige und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Auch das Auftreten von Artefaktpeaks verändert die Fläche zwischen den beiden Kurven und führt zu falschen Ergebnissen.

Aus diesem Grund wurden das 6-Wege-Ventil und der 3-Wege-Hahn entfernt und die isokratische Pumpe durch eine neue quarternäre Niederdruck-Gradienten-Pumpe ersetzt (siehe Abb. 11). Der Vorteil der neuen Pumpe ist, dass sie durch mehrere Lösungsmittelkanäle selbstständig zwischen den Lösungen wechseln kann und dadurch kein separates Ventil mehr von Nöten ist, durch das Luftblasen in die Anlage gelangen könnten.

1.2. Allgemeiner Versuchsablauf

In den Vorratsflaschen auf der linken Seite (Abb. 11) befinden sich die Wirkstofflösung und der reine Phosphatpuffer, die beide für die Messung benötigt werden. Das Wasser dient lediglich zum Spülen der Anlage am Ende eines Versuchstages. Für die Wirkstofflösung wird die entsprechende Menge Wirkstoff in 100 mL Phosphatpuffer (127,7 mM, pH 7,4) gelöst. Dieselbe Pufferlösung befindet sich auch im zweiten Vorratsgefäß und wird zum Spülen zwischen den einzelnen Versuchsteilen verwendet.

Der Versuchsablauf entspricht trotz modifiziertem Aufbau der Anlage weiterhin der Vorgehensweise von *Heinze, Albert und Hörst* [87-90]. Vor Beginn der Messung – nach dem Einbau der Ultrafiltrationszelle mit der Filtermembran – wird die Anlage zunächst für mindestens 30 Minuten gründlich mit dem Puffer gespült, bis keine Luftblasen mehr in der Messzelle erkennbar sind und die UV-Absorption einen konstanten Wert erreicht hat. Nach der Nullpunkt-Einstellung der UV-Absorption und der Eingabe der für die Messung nötigen Daten, wird zunächst reine Wirkstofflösung von der HPLC-Pumpe durch die Anlage gepumpt. Das entspricht dem ersten Teil der Messung.

In diesem Teil des Hauptversuches befindet sich kein Protein in der Messzelle, sodass der komplette Wirkstoff am Detektor ankommt. Hier wird die UV-Absorption gegen die Zeit gemessen und man erhält eine typische sigmoidale Sättigungskurve (siehe Abb. 12). Die Kurvenform und der zeitliche Verlauf ergeben sich dadurch, dass der Wirkstoff zunächst durch die komplette Anlage gepumpt werden und sich in der Messzelle verteilen muss, ehe er den Detektor erreicht. In der Plateauphase am Ende der Messung befindet sich nun nur noch Wirkstofflösung in der kompletten Anlage und die gemessene UV-Absorption entspricht der Absorption der reinen Wirkstofflösung.

Die Anlage wird anschließend solange mit reinem Puffer gespült, bis am Detektor keine UV-Absorption mehr registriert wird. Im Anschluss folgt die Injektion der Proteinlösung, d.h. Phase zwei des Hauptversuches. Die Proteinlösung wird über das Injektionsventil – direkt hinter der Pumpe – zudosiert. Mithilfe einer Dosierschleife werden dabei genau 1,0 mL der Lösung injiziert. Beim Spülen mit Pufferlösung gelangt das Protein in die Messzelle, wo es durch die Ultrafiltrationsmembran zurückgehalten wird. Am Detektor wird dennoch eine veränderte UV-Absorption der Pufferlösung registriert. Diese wird durch Proteinfragmente

verursacht, die aufgrund der Lagerung der Proteine bzw. Herstellung der Proteinlösung unvermeidbar sind. Die Fragmente sind kleiner als 10 kDa und werden daher von der Membran nicht zurückgehalten. Um eine Veränderung der zweiten Sättigungskurve durch die zusätzliche UV-Absorption der Fragmente zu verhindern, wird solange mit Puffer gespült, bis am Detektor keine UV-Absorption der Lösung mehr registriert wird. Dieser Schritt dient gleichzeitig als Kontrolle der Integrität der Filtermembran. Sollte die Membran durch mehrfache Messungen und mechanische Beanspruchung nicht mehr die definierte Porengröße oder gar kleine, nicht sichtbare Risse haben, würde in diesem Schritt eine ungewöhnlich hohe Absorption der Proteinlösung detektiert werden. In diesem Fall würde auch ein Teil der nicht fragmentierten Plasmaproteine die Membran passieren und die Messung wäre nicht mehr aussagekräftig.

Ist die Filtermembran unbeschädigt, folgt nun Phase drei des Hauptversuches. Erneut wird Wirkstofflösung durch die Anlage gepumpt – vergleichbar mit Teil eins. Jedoch befindet sich in diesem Versuchsteil nun zusätzlich Protein in der Messkammer. Der Wirkstoff, der die Messzelle erreicht, bindet nun zum Teil an das Protein und wird dadurch von der Membran zurückgehalten. Wie im ersten Versuchsteil reichert sich der Wirkstoff langsam in der Ultrafiltrationszelle an. Dabei werden die Bindestellen auf dem Protein durch den Liganden nach und nach gesättigt bis die Konzentration der Arzneistofflösung erreicht ist. Es findet somit eine Titration des Proteins mit dem Liganden statt bis alle Bindestellen auf dem Protein belegt sind. Durch diesen Vorgang ergibt sich ebenfalls eine sigmoidale Messkurve, die jedoch zeitlich verschoben ist, da ein Teil des Wirkstoffes durch den dynamischen Prozess der Proteinbindung erst verspätet den Detektor erreicht.

In Abb. 13 ist der Verlauf der beiden Absorptions-Zeit-Kurven der drei Versuchsteile dargestellt. Bei diesem Beispiel handelt es sich um die (auf die maximal gemessene UV-Absorption) normierten Elutionskurven der Messung von Natriumsalicylat (25 µg/mL) mit bovinem Serumalbumin. Die linke sigmoidale Kurve stammt aus dem ersten Versuchsteil (Phase I) ohne Protein in der Messzelle, die rechte Kurve aus Phase III mit Protein in der Kammer. Die Fläche zwischen beiden Kurven ist relativ groß, was auf eine starke Affinität des Wirkstoffs zu den Plasmaproteinen hinweist. Laut Literatur liegt die Plasmaproteinbindung von Salicylsäure bei 85 – 90 %^[6].

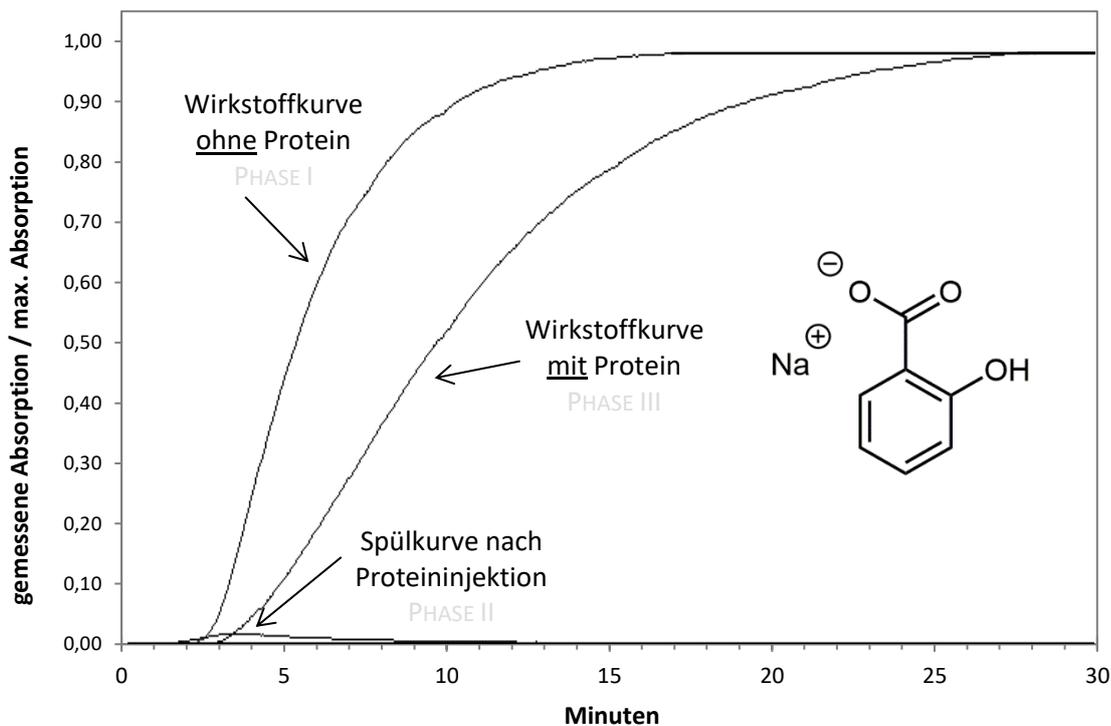


Abb. 13: Elutionskurven (normiert) der drei Versuchsteile der kontinuierlichen Ultrafiltration; Natriumsalicylat (25 µg/mL) mit bovinem Serumalbumin

Die untere Kurve mit dem flachen Peak wurde beim Spülvorgang direkt nach der Proteininjektion aufgenommen. Die geringe Absorption stammt von den Proteinf Fragmenten und weist auf eine intakte Ultrafiltrationsmembran hin. Da die hohe Bindungsaffinität von Natriumsalicylat zu Albumin bekannt ist, wird die Messung der Plasmaproteinbindung von Natriumsalicylat als Kontrolle der Anlage und Überprüfung der Systemeignung in regelmäßigen Abständen experimentell bestimmt.

1.3. Berechnung der Plasmaproteinbindung

Bei der oben beschriebenen Messung erhält man zwei Absorptions-Zeit-Kurven mit sigmoidalen Verlauf (siehe Abb. 13). Dabei ist die Kurve der Messung mit Protein im Vergleich zu der Messung ohne Protein – aus oben genanntem Grund – zeitlich verschoben. Zur Auswertung werden die von *Nickel* geschriebenen Programme NPBUW03 und NPBW127 (Programmiersprache HTBasic) verwendet. Nach Umwandlung der Daten in das zur Auswertung benötigte Format (NPBUW03) wird aus der Fläche zwischen beiden Messkurven eine Titrationskurve berechnet (NPBW127). Die Fläche zwischen den Kurven ist proportional

zur gebundenen Fraktion des Arzneistoffes. Je größer die Fläche zwischen beiden Kurven, desto größer ist das Ausmaß der Plasmaproteinbindung. Erklären lässt sich diese Beziehung dadurch, dass bei einer großen Affinität zu den Plasmaproteinen ein höherer Anteil des Wirkstoffes an das Protein bindet und so zusammen mit dem Protein von der Ultrafiltrationsmembran zurückgehalten wird; somit kommt von dem Wirkstoff zunächst weniger am Detektor an und es dauert länger bis die komplette Anlage mit ungebundenem Wirkstoff gesättigt ist.

Ausgehend von der berechneten Titrationskurve des Wirkstoffes kann mithilfe von Gleichgewichts-Berechnungen – ähnlich derer für Säure-Basen-Gleichgewichtsbestimmungen – neben der Proteinbindung (in Prozent) auch die Affinitätskonstante K_A ermittelt werden. Diese Berechnungen werden für zwei unterschiedliche Bindemodi durchgeführt, der unabhängigen und der abhängigen Bindung. Bei der unabhängigen Bindung geht man davon aus, dass alle verfügbaren Bindestellen gleichwertig sind und die Interaktion eines Arzneistoffmoleküls nicht die Interaktion eines zweiten oder dritten Moleküls beeinflusst. Bei der abhängigen oder kompetitiven Bindung ist die Bindungsaffinität abhängig von der Anzahl besetzter Bindestellen auf dem Protein. Die vorhandenen Bindestellen sind nicht gleichwertig und die Bindung eines Arzneistoffmoleküls kann die Bindung weiterer Moleküle beeinflussen ^[38,93].

DISKONTINUIERLICHE ULTRAFILTRATION

2.1. Ultrafiltration

Das grundlegende Prinzip der Messung entspricht dem der kontinuierlichen Ultrafiltration.

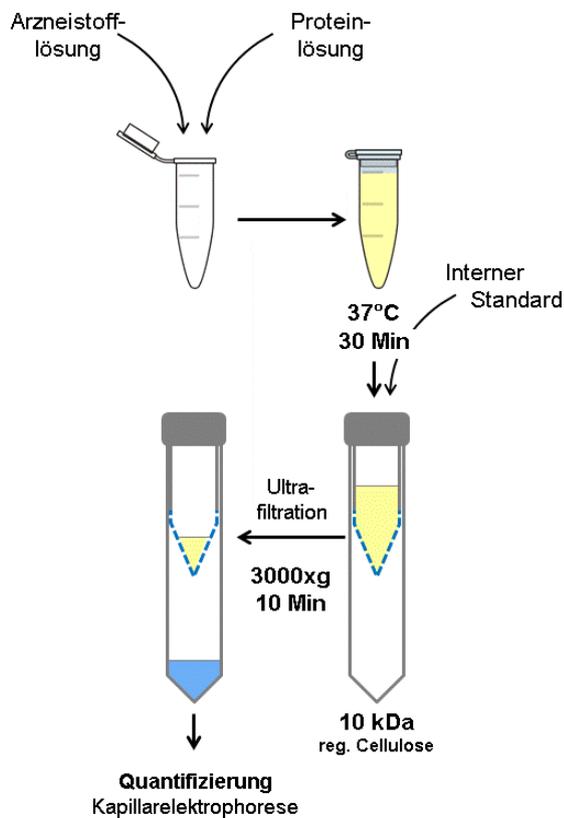


Abb. 14: Schematischer Ablauf der diskontinuierlichen Ultrafiltration

Auch hier wird durch eine Ultrafiltrationsmembran das freie Protein und der Protein-Wirkstoff-Komplex zurückgehalten, während der freie Wirkstoff die Membran ungehindert passieren und im Filtrat detektiert werden kann. Diese Methode trägt den Zusatz „diskontinuierlich“, da hierbei die verschiedenen Wirkstoff-Protein-Verhältnisse jeweils einzeln analysiert werden müssen. Bei den *Ephedra*-Alkaloiden erfolgt die Bestimmung der freien Wirkstoffkonzentration [F] im Filtrat durch eine zusätzliche instrumentelle Methode, in diesem Fall mittels UV-Kapillarzonenelektrophorese. Bei der diskontinuierlichen Ultrafiltration

kann pro Versuchsansatz nur ein bestimmtes Wirkstoff-Protein-Verhältnis vermessen werden. Zur Bestimmung des Ausmaßes der Plasmaproteinbindung müssen daher bei der diskontinuierlichen Ultrafiltration mehrere Wirkstoff-Protein-Verhältnisse einzeln vorbereitet, ultrafiltriert und vermessen werden. Diese einzelnen Aufarbeitungen machen die Methode der diskontinuierlichen Ultrafiltration daher deutlich arbeitsintensiver als die kontinuierliche Ultrafiltrations-Methode. Im Vergleich dazu wird bei der kontinuierlichen Ultrafiltration in nur einem Lauf direkt ein ganzer Bereich verschiedener Wirkstoff-Protein-Verhältnisse ultrafiltriert und gleichzeitig quantifiziert. Durch die Sättigung der Anlage mit der Wirkstofflösung ändert sich das Verhältnis von Protein zu freiem Wirkstoff bei der

kontinuierlichen Ultrafiltration stetig während der Messung – bei gleichzeitig konstanter Protein-Konzentration in der Messkammer. Der schematische Ablauf der diskontinuierlichen Ultrafiltration ist in Abb. 14 dargestellt.

Für die diskontinuierliche Ultrafiltration werden Amicon®-Ultra-Zentrifugen-Filtereinheiten (4 mL) mit dem gleichen Filtermaterial wie bei der kontinuierlichen Ultrafiltration verwendet (regenerierte Cellulose, NMGG 10 kDa). Zur Filtration wird eine Zentrifuge verwendet, bei der mithilfe der Zentrifugalkraft statt einem durch einen Pumpendruck bedingten Lösungsmittelfluss filtriert wird.

2.2. Quantifizierung der Ultrafiltrationsproben

Die freie Wirkstoffkonzentration im Filtrat wird anschließend mit einer geeigneten instrumentellen Methode quantifiziert. Bei den *Ephedra*-Alkaloiden wurde beispielsweise eine Kapillarelektrophorese-Methode verwendet. Die Kapillarelektrophorese (CE) wurde deshalb gewählt, da ohne großen Mehraufwand – durch Zusatz eines passenden chiralen Selektors – zeitgleich das Racemat in seine beiden Enantiomere aufgetrennt und damit die Stereoselektivität der Proteinbindung in nur einem Schritt untersucht werden kann. Durch den Einsatz vergleichsweise hoher Wirkstoffkonzentrationen ist die geringere Sensitivität der Kapillarelektrophorese – im Vergleich zur HPLC – zu vernachlässigen.

Um Fehler bei der Bestimmung der Plasmaproteinbindung durch Verluste während der Ultrafiltration und Unterschiede in der Injektionsmenge bei der hydrodynamischen Injektion zu verhindern, wird Atenolol als interner Standard verwendet. Verluste während der Filtration sind vorwiegend durch Adsorptionen des Wirkstoffes an das Filtermaterial bzw. an die Oberflächen der gesamten Filtereinheit zu erklären. Da im Gegensatz zur kontinuierlichen Ultrafiltration nicht zweimal dieselbe Messung – mit und ohne Protein – am selben Filter und mit der exakt gleichen Wirkstofflösung durchgeführt werden kann, können Verluste während der Ultrafiltration nicht einfach vernachlässigt werden. Daher wird in diesem Fall zusätzlich ein interner Standard benötigt. Des Weiteren wird bei der Kapillarelektrophorese – im Gegensatz zur HPLC – kein genaues Volumen über eine Dosierschleife injiziert. Die injizierte Menge wird bei der hydrodynamischen Injektion durch die Zeit bestimmt, in der der Druck am Inlet angelegt wird. Dadurch kann die injizierte Menge je nach Füllstand des Vials, der Temperatur und Viskosität der Lösung variieren. Um diese Unterschiede auszugleichen,

verwendet man für gewöhnlich bei Quantifizierungen mittels Kapillarelektrophorese einen internen Standard.

2.3. Berechnung der Plasmaproteinbindung

Die molare Konzentration des gebundenen Wirkstoffes [B] bzw. der gebundene Arzneistoffanteil f_b werden über die Differenz der Gesamtkonzentration des Wirkstoffs c_0 in der Probe und der freien Arzneistoffkonzentration im Filtrat [F] – mittels Kapillarelektrophorese bestimmt – berechnet. Folgende Gleichung liegt der Berechnung zugrunde ^[5,94]:

$$(6) \quad c_0 = [F] + [B] \qquad f_b = 1 - f_u = \frac{[B]}{c_0} \qquad (7)$$

[F] und [B] sind dabei die freie bzw. die gebundene Wirkstoffkonzentration (mol/L), c_0 ist die Gesamtkonzentration (mol/L) an Wirkstoff in der Probe; f_u und f_b sind der ungebundene und gebundene Wirkstoffanteil.

Zur Beschreibung bzw. Darstellung der Affinität eines Wirkstoffes zu einem Protein wird üblicherweise die Affinitätskonstante K_A (L/mol) verwendet. Teilweise wird auch die Dissoziationskonstante K_D (mol/L) zur Beschreibung herangezogen, die den Kehrwert von K_A darstellt. Die Gesamt-Affinitätskonstante K_A^n des Wirkstoff-Protein-Komplexes ist das Produkt aus den Affinitätskonstanten K_A der einzelnen Bindestellen. Geht man von nur einer Bindestelle ($n = 1$) auf dem Protein aus, vereinfacht sich die Berechnung und die Gesamt- bzw. makroskopische Bindungskonstante K_A^n entspricht der Bindungskonstanten K_A der einen Bindestelle ^[94]. In diesem Fall lässt sich K_A aus dem gebundenen Wirkstoffanteil und der Proteinkonzentration wie folgt berechnen ^[5,95]:

$$(8) \quad K_A = \frac{f_b}{(1 - f_b)} \times \frac{1}{[P]_{\text{tot}}}$$

$[P]_{\text{tot}}$ stellt dabei die Gesamtproteinkonzentration (mol/L) – in unserem Fall Albumin – dar. Diese Gleichung stellt ein vereinfachtes Modell der Plasmaproteinbindung dar. Sie setzt voraus, dass auf dem Protein nur eine einzige Bindestelle für den Wirkstoff vorhanden ist und die Wirkstoffkonzentration im Vergleich zur Proteinkonzentration so niedrig ist, dass es

zu keinen Sättigungseffekten an dieser Bindestelle kommt. Mithilfe der Affinitätskonstanten kann auf die Proteinbindung (%) in Serum extrapoliert werden ^[95]:

$$(9) \quad \text{PPB}(\%) = \frac{K_A^n \cdot [P]_{\text{tot}}}{(1 + K_A^n \cdot [P]_{\text{tot}})} \times 100$$

Zur genaueren Berechnung der Plasmaproteinbindung stehen verschiedene etablierte Methoden zur Verfügung, die eine graphische oder arithmetische Bestimmung zugrunde legen ^[95,96].

Geht man von folgender Gleichgewichtsreaktion aus, die bei der Plasmaproteinbindung zwischen n Arzneistoffmolekülen A und dem Protein P stattfindet ^[97]:



erhält man mithilfe des Massenwirkungsgesetzes das Verhältnis r, das sich aus der molaren Konzentration an gebundenem Wirkstoff [B] und Gesamtproteinkonzentration $[P]_{\text{tot}}$ berechnet ^[98]:

$$(11) \quad r = \frac{[B]}{[P]_{\text{tot}}} = \frac{n \cdot K_A^n \cdot [F]^n}{(1 + K_A^n \cdot [F]^n)}$$

Durch die Korrelation von r und der freien Wirkstoffkonzentration [F], können die Plasmaproteinbindung und die Gesamtaffinitätskonstante K_A^n ermittelt werden. K_A^n kann dabei für jeden gemessenen Wert berechnet werden ^[95]:

$$(12) \quad K_A^n = \frac{1}{[F]} \times \frac{r}{(1 - r)}$$

Im Fall einer spezifischen Bindung an das Protein sollte die berechnete Affinitätskonstante K_A^n über den ganzen Konzentrationsbereich hinweg konstant sein.

Eine bekannte graphische Auswertungsmethode ist der Scatchard-Plot, der auf einer x-reziproken Berechnung basiert ^[97]. Eine weitere, seit langem etablierte graphische Methode ist die doppelt-reziproke Auswertung nach *Klotz* ^[96,98]. Die Formeln zur Berechnung der beiden Graphen und die Ermittlung der Bindestellen und Affinitätskonstanten sind in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3: Graphische Bestimmung der Affinitätskonstante K_A^n und der Bindestellenanzahl n ^[95-97]
a Steigung der Regressionsgeraden, **b** Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y-Achse

	Scatchard-Plot	Klotz-Plot
Methode	x-reziprok	doppelt-reziprok
Gleichung	$\frac{r}{[F]} = n \cdot K_A^n - K_A^n \cdot r$	$\frac{1}{r} = \frac{1}{n \cdot K_A^n} \cdot \frac{1}{[F]} + \frac{1}{n}$
Graphische Darstellung	$\frac{r}{[F]}$ gegen r	$\frac{1}{r}$ gegen $\frac{1}{[F]}$
K_A^n	$-a$	$\frac{b}{a}$
n	$-\frac{b}{a}$	$\frac{1}{b}$

Im Fall von nur einer Bindestelle ($n = 1$) bzw. einer Bindeklasse ($m = 1$), mit gleichwertigen Bindestellen n , ergeben sowohl der Scatchard-Plot als auch der Klotz-Plot eine Gerade mit der Gleichung $y = ax + b$. Über die Steigung a und dem Schnittpunkt mit der y-Achse b der Geraden lassen sich die Affinitätskonstante K_A^n und die Anzahl der Bindestellen n berechnen (s. Abb. 15 A und Abb. 15 B). Bei mehr als einer Bindeklasse m , d.h. verschiedenen Bindestellen mit unterschiedlicher Affinitätskonstante, besteht kein linearer Zusammenhang mehr. Die Ermittlung der Affinitätskonstanten und der Anzahl mehrerer Bindestellen wird deutlich komplexer. In Abb. 15 A und Abb. 15 B sind beispielhaft die Kurven des Scatchard- und des Klotz-Plots für eine Bindeklasse m bzw. mehreren Bindeklassen m dargestellt ^[96].

Da Albumin ein großes Protein ist, dessen Hauptaufgabe der Transport von Substanzen im Plasma ist, wird es höchst wahrscheinlich mehr als eine Bindestelle für einen Ligand geben. Die klassischen graphischen Methoden nach Scatchard und Klotz sind für die Auswertung einfacher Bindungsvorgänge mit nur einer Bindungsklasse m ausgelegt, bei denen ein linearer Zusammenhang zwischen der freien Wirkstoffkonzentration $[F]$ und dem Verhältnis r besteht. Bei diesen Bindungsvorgängen lassen sich die Bindungsparameter K_A und n aus der linearen Regressionsgerade bestimmen, wie oben dargestellt. Da die Kurven der klassischen Auswertemethoden nach Scatchard und Klotz bei mehr als einer Bindeklasse m nicht mehr linear sind, wird die Auswertung über diese Plots deutlich komplexer.

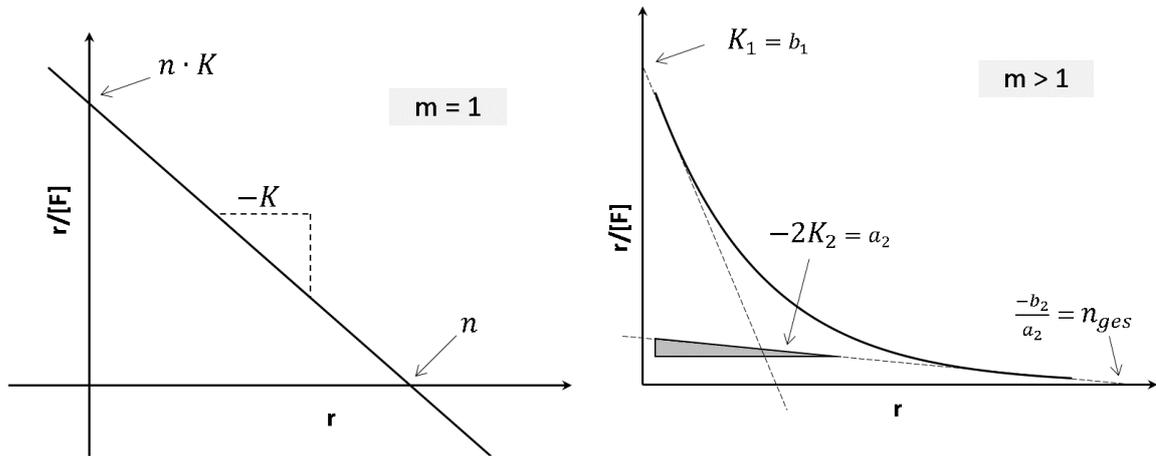


Abb. 15 A: Theoretische Darstellung des Scatchard-Plots für eine bzw. mehrere Bindungsklassen m

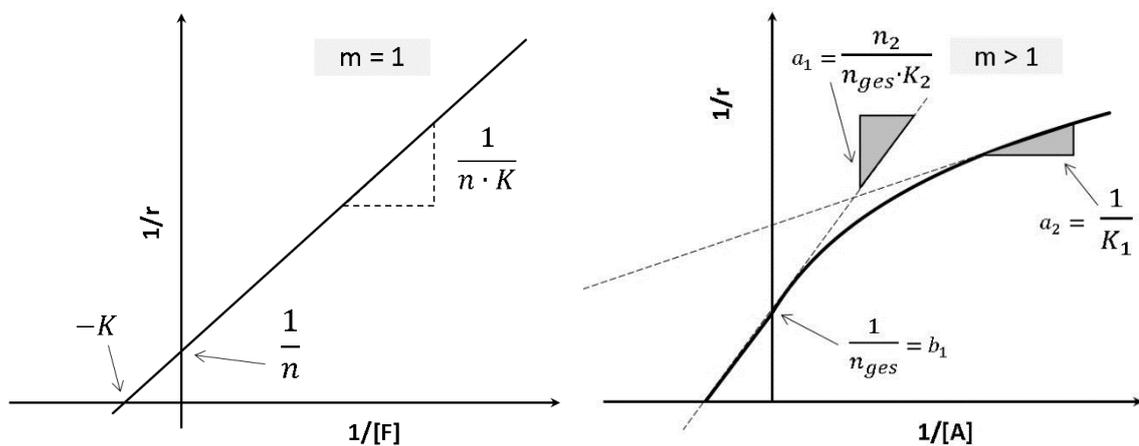


Abb. 15 B: Theoretische Darstellung des Klotz-Plots für eine bzw. mehrere Bindungsklassen m ; Entsprechend der linearen Gleichung $y = ax + b$ sind a_1 und a_2 die Steigungen der jeweiligen Regressionsgeraden; b_1 und b_2 die dazugehörigen y -Achsenabschnitte. Daraus errechnet sich gemäß Tab. 3 die Affinitätskonstante K und die Anzahl der Bindestellen n . Bei mehr als einer Bindungsklasse m ergeben sich aus den Regressionsgeraden die intrinsischen Bindungskonstanten K_1 und K_2 bzw. Anzahl an Bindestellen n_1 und n_2 der jeweiligen Bindungsklassen; n_{ges} ist die Gesamtzahl an Bindestellen ^[96].

Kurven, die man bei Bindungsvorgängen mit mehr als einer Bindungsklasse m erhält, können nicht mehr über eine lineare Regressionsgerade ausgewertet werden. Stattdessen müssen die Affinitätskonstanten und die Anzahl der Bindestellen mittels nicht-linearer Regression aus den erhaltenen Messkurven berechnet werden. Hierzu gibt es nicht-lineare Lösungsmethoden, ähnlich der Lösungsformel für quadratische Gleichungen.

Folgende Formel wird durch die Veränderung von K_A und n iterativ an die Messwerte angepasst ^[95]:

$$(13) \quad [F] = \frac{-(1 - K_A^n \cdot c_0 + n \cdot K_A^n \cdot [P]_{\text{tot}}) + \sqrt{(1 - K_A^n \cdot c_0 + n \cdot K_A^n \cdot [P]_{\text{tot}})^2 + 4 \cdot K_A^n \cdot c_0}}{2 \cdot K_A^n}$$

Dabei ist $[F]$ die gemessene, freie Konzentration, c_0 die Gesamtkonzentration des Wirkstoffes und $[P]_{\text{tot}}$ die Gesamtkonzentration an Protein (mol/L); K_A^n ist die Gesamtaffinitätskonstante (L/mol) und n die Anzahl an Bindestellen auf dem Makromolekül. Durch Optimierung von K_A^n und n wird die Gleichung den gemessenen freien Konzentrationen im Filtrat während des Versuchs solange angepasst bis die Standardabweichung zwischen gemessenen und berechneten Werten minimal ist. Dazu wurde das Programm OriginPro® 2016G (OriginLab, non-linear fit) verwendet.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

VERWENDETE SUBSTANZEN UND GERÄTE

3.1. Arzneistoffe

Für die in Teil B beschriebenen Versuche wurden folgende Wirkstoffe verwendet:

Wirkstoff	Bezugsquelle
(-)-Ephedrin-HCl	Caesar & Loretz GmbH (Hilden, Deutschland)
(+)-Ephedrin x ½ H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
(+)-Pseudoephedrin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
(-)-Pseudoephedrin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumsalicylat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Atenolol	Artesan Pharma GmbH & Co. KG (Lüchow, Deutschland)
Nalidixinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Orciprenalinsulfat	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG (Ingelheim am Rhein, Deutschland)
Oxilofrin-HCl	Hoechst GmbH (Frankfurt a.M., Deutschland)
Phenylephrin-HCl	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG (Ingelheim am Rhein, Deutschland)
Synephrintartrat	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG (Ingelheim am Rhein, Deutschland)

Außerdem wurden folgende im Arbeitskreis Holzgrabe synthetisierten Wirkstoffe verwendet:

Substanzgruppe	synthetisiert von	zuerst synthetisiert von
Mip-Inhibitoren	F. Seufert	<i>Seufert</i> ^[99,100]
Fluorchinolone	M. Berninger	<i>Hiltensperger, Berninger</i> ^[101-104]
Zimtsäurederivate	J. Glaser	<i>Glaser</i> ^[105-107]

3.2. Proteine und Sera

Für die Herstellung der Proteinlösungen wurde lyophilisiertes bovines und humanes Serumalbumin und saures α_1 -Glykoprotein der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) verwendet:

Bovines Serum Albumin, Hitze-Schock-Fraktion, pH 7, ≥ 98 %	Art. Nr. A7906
Albumin aus humanem Serum, lyophilisiertes Pulver, ≥ 96 %	Art. Nr. A1653
Acid Alpha-1-Glykoprotein (aus humanem Plasma)	Art. Nr. G9885

Des Weiteren wurde für die diskontinuierliche Ultrafiltration fertige humane Albuminlösung, Alburnorm® 20 % Lösung zur intravenösen Injektion, mit einer HSA-Konzentration von 200 g/L der Firma Otapharm GmbH (Langenfeld, Deutschland) herangezogen.

Zusätzlich wurde folgendes Blutserum bzw. -plasma eingesetzt:

Serum / Plasma	Bezugsquelle
Humanes Blutserum (gepoolt, n = 11, BG A)	Bayerischen Roten Kreuz (München, Deutschland)
Humanes Plasma (gepoolt, n = 6, Citrat, BG A / 0)	Bayerischen Roten Kreuz (München, Deutschland)

3.3. Chemikalien

Für die Versuchsdurchführung wurden folgende Chemikalien verwendet:

Chemikalien	Bezugsquelle
Acetonitril, gradient grade	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumacetat, HPLC (≥ 99 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Dtl.)
Benzalkoniumchlorid	Caesar & Loretz GmbH (Hilden, Deutschland)
β -Cyclodextrin	Wacker Chemie AG (München, Deutschland)
Diethylether, peroxidfrei	Bernd Kraft GmbH (Duisburg, Deutschland)
Dimethylsulfoxid, GC-grade	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Dtl.)
Essigsäure, HPLC (49 – 51 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Dtl.)
Ethanol (mit PE, 99.9 %)	CSC JÄKLECHEMIE GmbH & Co. KG (Nürnberg, Dtl.)
Harnstoff, rein	BASF SE (Ludwigshafen, Deutschland)

Chemikalien	Bezugsquelle
Isopropanol, p.a.	Bernd Kraft GmbH (Duisburg, Deutschland)
Kaliumnatriumtetrat x 4 H ₂ O, reinst	Grüssing GmbH (Filsum, Deutschland)
Kupfer-II-sulfat x 5 H ₂ O, p.a.	Grüssing GmbH (Filsum, Deutschland)
L-(+)-Ascorbinsäure, p.a.	Grüssing GmbH (Filsum, Deutschland)
Methanol, gradient grade	Honeywell Riedel-de Häen GmbH (Seelze, Dtl.)
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O, p.a.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Dtl.)
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O, p.a.	Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid, p.a.	Bernd Kraft GmbH (Duisburg, Deutschland)
Natriumdisulfit wfr., p.a.	Grüssing GmbH (Filsum, Deutschland)
Natriumhydroxid, p.a.	Bernd Kraft GmbH (Duisburg, Deutschland)
Natriumsulfat wfr., p.a.	ORG Laborchemie GmbH (Bunde, Deutschland)
Natronlauge (0,1 mol/L)	VWR International GmbH (Ismaning, Deutschland)
Phosphorsäure (85 % m/m)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Dtl.)
Polysorbat 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Dtl.)
Polysorbat 80	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Dtl.)
Salzsäure (0,1 mol/L)	VWR International GmbH (Ismaning, Deutschland)
Zitronensäure x H ₂ O, p.a.	Grüssing GmbH (Filsum, Deutschland)

3.4. Materialien

Für die Ultrafiltrationsversuche wurden:

Ultrafiltrations-Membranfilter (reg. Cellulose, 10 kDa)	Art. Nr. PLGC04710
Amicon® Ultra Zentrifugen-Filtereinheiten (reg. Cellulose, 10 kDa, 4 mL)	Art. Nr. UFC801096

der Firma Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Bei der Kapillarelektrophorese wurde eine Quarzglas-Kapillare der Firma BGB Analytik Vertrieb GmbH (Rheinfelden, Deutschland) eingesetzt:

TSP Standard fused silica Kapillare (50 µm ID, L = 50 / 60 cm)	Art. Nr. TSP-050375
--	---------------------

Zur Serumauflarbeitung, der Probenvorbereitung und der Pufferherstellung wurden Spritzenvorsatzfilter der Firma VWR International GmbH (Ismaning, Deutschland) mit Membranen aus Celluloseacetat (CA, 0,2 µm) und PTFE (0,45 µm) verwendet.

3.5. Wasser

Für alle hergestellten Lösungen wurde ausschließlich Millipore®-Wasser verwendet, das mittels Milli-Q®-Anlage (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) hergestellt wird.

3.6. Geräte

3.6.1. Kontinuierliche Ultrafiltration

Die Ultrafiltrationsanlage nach *Heinze* ^[87] war aus folgenden Bestandteilen aufgebaut: einer HPLC-Pumpe der Firma Bischoff (Modell HPLC Compact Pump 2250, Bischoff Chromatographie, Leonberg, Deutschland), einem 3-Wege-Hahn, einem 6-Wege-Ventil (Rheodyne, Modell 5011, Cotati, CA, USA) und einem 6-Wege-Injektionsventil (Modell 7010, Rheodyne, Cotati, CA, USA) mit einer 1,0-mL-Dosierschleife. Detektiert wurde der freie Wirkstoff mithilfe eines VWD-UV-Detektors (Modell M87, Knauer, Berlin, Deutschland) mit einem Wellenlängenbereich von 190 – 400 nm bzw. einem PDA-UV-Detektor (Modell DAD-3L, Bischoff Chromatographie, Leonberg, Deutschland) mit einem Messbereich von 190 – 395 nm. Der RCT-basic-Magnetrührer der Firma IKA-Werke (Staufen, Deutschland) diente zur homogenen Durchmischung der Lösungen in der Versuchskammer. Das Gegendruckventil (Modell SSI-06-0120, Spence Strainers International, Walden, NY, USA) sorgt für einen konstanten Fluss und einen gleichbleibenden Druck über die ganze Anlage hinweg. Die verwendeten Ultrafiltrationszellen aus Polymethylmethacrylat (PMMA) bzw. Polyvinylidenfluorid (PVDF) wurden von der Werkstatt des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg auf Maß angefertigt.

Bei der optimierten Anlage wurde die HPLC-Pumpe durch eine quaternäre Niederdruck-Gradienten-Pumpe der Firma Knauer (Modell Blue Shadow Pumpe 4OP, Knauer Wissenschaftliche Geräte GmbH, Berlin, Deutschland) mit LPG-Modul und einer Smartmix Mischkammer ersetzt. Die Detektion erfolgte weiterhin mit einem VWD-UV-Detektor

(Modell M87, Knauer, Berlin, Deutschland) mit einem Wellenlängenbereich von 190 – 400 nm.

Des Weiteren wurde eine Analysenwaage (Modell CPA225D-OCE, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) und ein Vortex-Mixer (Modell Genie® 2, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA) zur Herstellung der Proben und Lösungen verwendet.

Für die Bestimmung der Absorptionsmaxima neuer Substanzen wurde ein UVMini-1240 UV-Spektrometer der Firma Shimadzu (Kyoto, Japan) und zum Entgasen der Puffer- und Wirkstofflösungen wurde ein Sonorex® Ultraschallbad der Firma Bandelin (Berlin, Deutschland) verwendet. Die Einstellung des pH-Wertes der Puffer erfolgte unter Verwendung eines Labor-pH-Meters vom Typ 744 der Firma Deutsche Metrohm (Filderstadt, Deutschland).

3.6.2. Diskontinuierliche Ultrafiltration

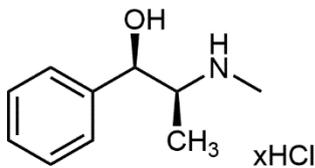
Das Wasserbad zur Inkubation der Proben bei Körpertemperatur war das Modell Isotemp 205 der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). Die Zentrifuge für die diskontinuierliche Ultrafiltration ist eine Centrifuge 5702 der Firma Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland). Zur Quantifizierung der *Ephedra*-Alkaloide im Filtrat wurde ein P/ACE-MDQ Capillary Electrophoresis System mit PDA-Detektor der Firma Beckmann Coulter (München, Deutschland) verwendet. Die Quantifizierung der Fluorchinolone erfolgte mittels Agilent HPLC-System (1100 Serien, Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) mit Entgasereinheit (Degasser G1322A), binärer Pumpe (BinPump G1312A), Säulenofen (Colcom G1316A), Autosampler (ALS G1313A) und PDA-Detektor (DAD G1315B).

KONTINUIERLICHE ULTRAFILTRATION

4.1. Vermessene Liganden

Folgende Substanzen wurden mittels kontinuierlicher Ultrafiltration vermessen:

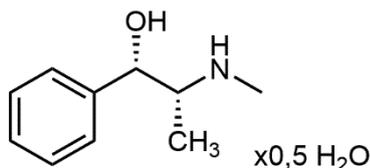
Ephedra-Alkaloide:



(-)-Ephedrin-HCl

(1*R*,2*S*)-2-Methylamino-1-phenylpropan-1-ol hydrochlorid

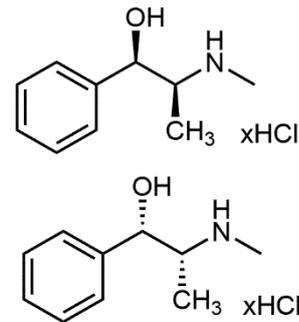
$M_R = 201,7 \text{ g/mol}$



(+)-Ephedrin x 0,5 H₂O

(1*S*,2*R*)-2-Methylamino-1-phenylpropan-1-ol hemihydrat

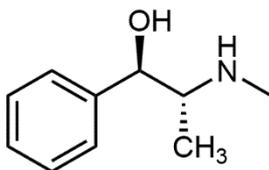
$M_R = 174,2 \text{ g/mol}$



***rac*-Ephedrin-HCl**

rac-erythro-2-Methylamino-1-phenylpropan-1-ol hydrochlorid

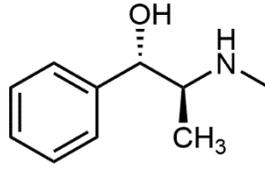
$M_R = 201,7 \text{ g/mol}$



(-)-Pseudoephedrin

(1*R*,2*R*)-2-Methylamino-1-phenylpropan-1-ol

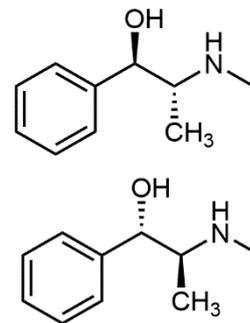
$M_R = 165,2 \text{ g/mol}$



(+)-Pseudoephedrin

(1*S*,2*S*)-2-Methylamino-1-phenylpropan-1-ol

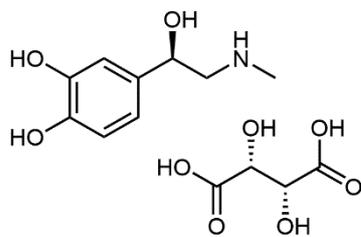
$M_R = 165,2 \text{ g/mol}$



***rac*-Pseudoephedrin**

rac-threo-2-Methylamino-1-phenylpropan-1-ol

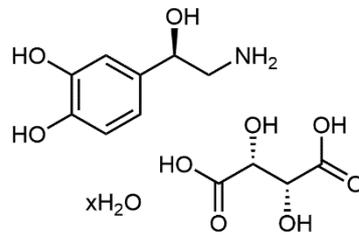
$M_R = 165,2 \text{ g/mol}$

Sympathomimetika:

**L-Adrenalin
D-hydrogentartrat**

(*R*)-4-[1-Hydroxy-2-(methylamino)-ethyl]-benzol-1,2-diol
D-hydrogentartrat

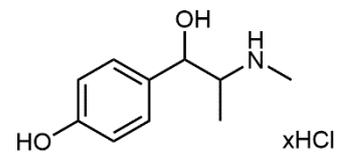
$M_R = 333,3 \text{ g/mol}$



**L-Noradrenalin
D-hydrogentartrat x H₂O**

(*R*)-4-[2-Amino-1-hydroxyethyl]-benzol-1,2-diol
D-hydrogentartrat

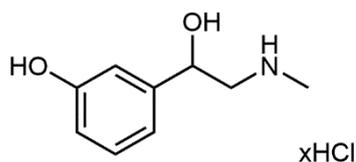
$M_R = 337,3 \text{ g/mol}$



rac-Oxilofrin-HCl

rac-4-[1-Hydroxy-2-(methylamino)propyl]phenol
hydrochlorid

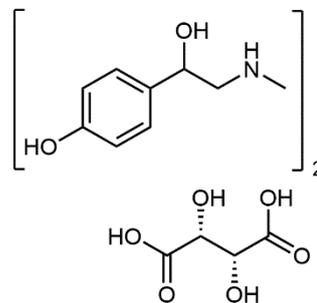
$M_R = 217,7 \text{ g/mol}$



rac-Phenylephrin-HCl

rac-3-[1-Hydroxy-2-(methylamino)ethyl]phenol
hydrochlorid

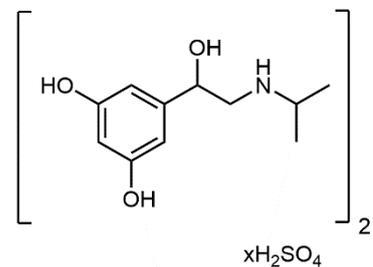
$M_R = 203,7 \text{ g/mol}$



rac-Synephrin-tartrat

rac-4-[1-Hydroxy-2-(methylamino)ethyl]phenol
D-tartrat

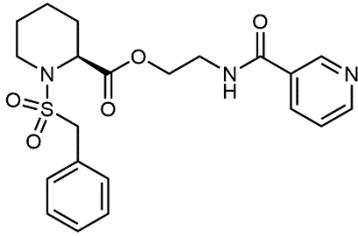
$M_R = 484,5 \text{ g/mol}$



rac-Orciprenalin-SO₄

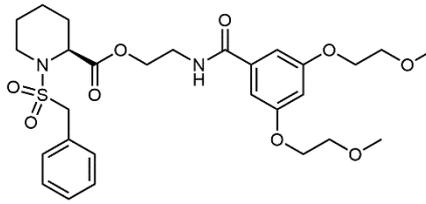
rac-5-[1-Hydroxy-2-(isopropylamino)ethyl]-benzol-1,3-diol sulfat

$M_R = 520,6 \text{ g/mol}$

Neu synthetisierte Arzneistoffe:**MIP-INHIBITOREN**Substanz **28B**

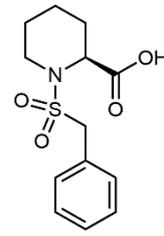
(S)-1-(Benzylsulfonyl)piperidin-
2-carbonsäure-[2'-amino-
(N-pyridin-3''-carbamoyl)]
-ethyl-1'-ester

$M_R = 431,5 \text{ g/mol}$

Substanz **28C**

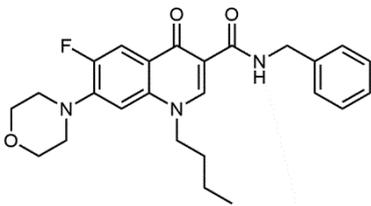
(S)-1-(Benzylsulfonyl)piperidin-
2-carbonsäure-[2'-amino-
(N-(3,5-(2'''-ethylmethoxy)-oxy)-
benzamid]]-ethyl-1'-ester

$M_R = 578,7 \text{ g/mol}$

Vorstufe **4a**
(freie Carbonsäure)

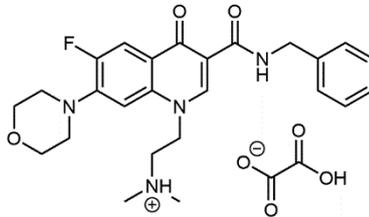
(S)-1-(Benzylsulfonyl)piperidin-
2-carbonsäure

$M_R = 283,4 \text{ g/mol}$

FLUORCHINOLONESubstanz **GHQ168**

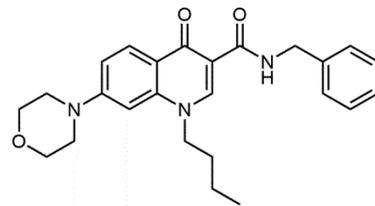
N-Benzyl-1-butyl-6-fluor-7-
morpholino-1,4-dihydro-4-oxo-
chinolin-3-carboxamid

$M_R = 437,5 \text{ g/mol}$

Substanz **GHQ2430x**

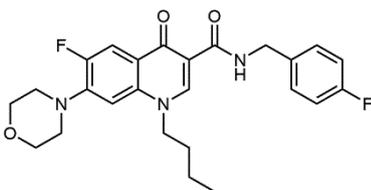
N-Benzyl-1-(2-dimethylamino)ethyl-
6-fluor-7-morpholino-1,4-dihydro-4-
oxo-chinolin-3-carboxamid-oxalat

$M_R = 542,6 \text{ g/mol}$

Substanz **MB161**

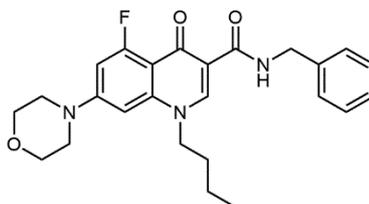
N-Benzyl-1-butyl-7-morpholino-1,4-
dihydro-4-oxo-chinolin-3-
carboxamid

$M_R = 419,5 \text{ g/mol}$

Substanz **MB209**

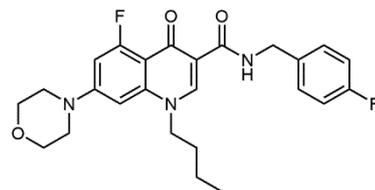
N-(4-Fluorbenzyl)-1-butyl-6-fluor-7-
morpholino-1,4-dihydro-4-oxo-
chinolin-3-carboxamid

$M_R = 455,5 \text{ g/mol}$

Substanz **MB343**

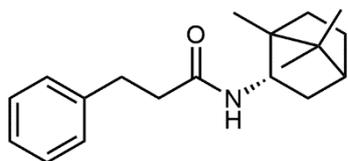
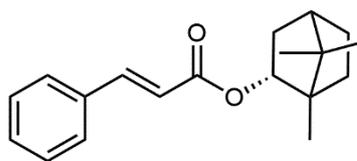
N-Benzyl-1-butyl-5-fluor-7-
morpholino-1,4-dihydro-4-oxo-
chinolin-3-carboxamid

$M_R = 437,5 \text{ g/mol}$

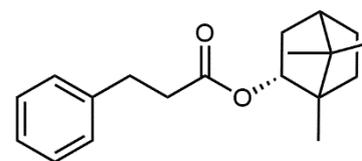
Substanz **MB444**

N-(4-Fluorbenzyl)-1-butyl-5-fluor-7-
morpholino-1,4-dihydro-4-oxo-
chinolin-3-carboxamid

$M_R = 455,5 \text{ g/mol}$

ZIMTSÄURE-DERIVATESubstanz **JGBEN51**Bornylamin-3-phenyl-
propionsäureamid $M_R = 285,4 \text{ g/mol}$ Substanz **JGBEO01**

Bornylcinnamat

 $M_R = 284,4 \text{ g/mol}$ Substanz **JGBEO44**

Bornyl-3-phenylpropionat

 $M_R = 286,4 \text{ g/mol}$ **4.2. Pufferlösung**

Zur besseren Vergleichbarkeit der erhaltenen Ergebnisse mit vorherigen Messergebnissen wurde derselbe Phosphatpuffer verwendet, der auch bei vorhergehenden Arbeiten für die Bestimmung der Plasmaproteinbindung mittels kontinuierlicher Ultrafiltration verwendet wurde^[90]. Der pH-Wert des Puffers liegt bei 7,4 – dem physiologischen pH-Wert des Blutes^[8].

Der Phosphatpuffer hat folgende Zusammensetzung:

Na_2HPO_4	22,6 mM	\cong	3,208 g/L
NaH_2PO_4	5,1 mM	\cong	0,611 g/L
NaCl	100 mM	\cong	5,844 g/L

Zur Herstellung des Phosphatpuffers wird die entsprechende Menge Puffersalz für einen Liter Pufferlösung eingewogen und in ca. 800 mL Millipore®-Wasser gelöst. Anschließend wird der pH-Wert der Lösung kontrolliert und gegebenenfalls mit 1 M Natronlauge bzw. 1 M Phosphorsäure eingestellt. Die Lösung wird ad 1000,0 mL mit Millipore®-Wasser aufgefüllt. Der fertige Puffer sollte wegen einer möglichen mikrobiologischen Kontamination maximal ein bis zwei Tage verwendet werden.

Aufgrund der großen Menge an Phosphatpuffer, die für jede Messung bzw. täglich benötigt wird, und der sehr langsamen Auflösungsrate der Puffersalze im Wasser, ist die tägliche

Herstellung sehr zeitintensiv. Alternativ kann ein Phosphatpuffer-Konzentrat hergestellt werden, das zehnfach höher konzentriert ist als die fertige Pufferlösung. Die hohe Tonizität des Pufferkonzentrats verhindert den mikrobiellen Befall. Somit ist das Pufferkonzentrat über mehrere Wochen haltbar. Vor der Verwendung muss das Pufferkonzentrat lediglich 1:10 mit Millipore®-Wasser verdünnt und der pH-Wert kontrolliert werden; die Verdünnung kann nach dem Entgasen direkt verwendet werden.

Der Puffer findet sowohl Verwendung als Spülpuffer bei der kontinuierlichen Ultrafiltrationsmessung als auch zur Herstellung der Arzneistoff- und Proteinlösung. Dadurch lassen sich Einflüsse auf die Plasmaproteinbindung durch Unterschiede im pH-Wert oder der Pufferkonzentration minimieren.

Zur Messung schwerlöslicher Substanzen können organische Lösungsmittel oder Tenside als Pufferzusatz verwendet werden ^[90]. So eignen sich Dimethylsulfoxid (DMSO), Acetonitril (ACN) und Methanol (MeOH) als Lösungsvermittler bei schwerlöslichen Substanzen. Da Proteine empfindlich gegenüber organischen Lösungsmitteln reagieren und in deren Gegenwart leicht denaturieren ^[108], können diese drei organischen Lösungsmittel nur in niedrigen Konzentrationen bei der kontinuierlichen Ultrafiltration verwendet werden. DMSO wird beispielsweise oft als Lösungsmittel für biochemischen Untersuchungen verwendet; laut Literatur kommt es bei Konzentrationen von bis zu 10 % DMSO zu keiner Veränderung der Plasmaproteinbindung, da die native Struktur von Albumin nicht beeinflusst wird ^[109]. *Hörst* zeigte bereits, dass Konzentrationen von bis zu 10 % DMSO bedenkenlos in der kontinuierlichen Ultrafiltration eingesetzt werden können, ohne das Ergebnis der Messung zu beeinflussen ^[90].

Neben der Verwendung von organischen Lösungsmitteln als Cosolventen eignet sich auch der Zusatz von Tensiden, um die Löslichkeit mancher Substanzen im Phosphatpuffer zu verbessern. Der von *Hörst* entwickelte Polysorbat-20-Puffer kann bei der kontinuierlichen Ultrafiltration mit einer maximalen Polysorbat-20-Konzentration von 1 mM verwendet werden. Geringere Konzentrationen als 100 µM liegen unterhalb der CMC von Polysorbat-20 ^[110] und führen durch die fehlende Mizellbildung zu keiner sichtbaren Verbesserung der Löslichkeit. Höhere Konzentrationen als 1 mM Polysorbat-20 jedoch bewirken durch die sehr großen Mizellen einen zu hohen Gegendruck, der die empfindliche Filtermembran schädigt. Ab einer Polysorbat-20-Konzentration von 2 mM baut sich an der

Pumpe bereits ein Druck von 1600 kPa (16 bar) auf. Die Integrität der Filtermembran hingegen ist laut Herstellerangaben nur bis zu einem Druck von 400 kPa (4 bar) gewährleistet. Die Herstellung erfolgt entsprechend der entwickelten Methode, wobei darauf zu achten ist, möglichst vorsichtig zu rühren oder zu schütteln, um unnötige Schaumbildung zu vermeiden ^[90].

4.3. Proteinlösung

Zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung mittels kontinuierlicher Ultrafiltration werden verschiedene Proteine, Sera bzw. humanes Plasma verwendet. Damit die Proteine zur Messung verwendet werden können, muss eine Proteinlösung hergestellt werden, die entsprechend dem Versuchsablauf in Kapitel B.1.2. injiziert werden kann. Alle der oben genannten Substanzen wurden zunächst mit einer Proteinlösung aus reinem bovinem Serumalbumin vermessen. Um während der Messung über die Dosierschleife genau 1,0 mL der Proteinlösung injizieren zu können, werden für jeden Versuch 2,0 mL der Proteinlösung hergestellt. Dazu werden 80 mg des gefriergetrockneten Serumalbumins, bovinem bzw. humanem Ursprungs, eingewogen und mit ca. 1,5 mL Phosphatpuffer versetzt, der auch für die Arzneistofflösungen und zum Spülen der Anlage verwendet wird. Durch leichtes Schwenken bzw. kurzzeitiges Stehenlassen, löst sich das Albumin komplett im Puffer und kann anschließend mit Phosphatpuffer auf 2,0 mL aufgefüllt werden.

4.3.1. Humanes Plasma

Bei dem verwendeten Plasma handelt es sich um gepooltes, humanes Citratplasma von 6 Probanden, dessen Gerinnung durch den Zusatz von Citrat (Verhältnis 1:9) unterbunden wurde. Für die Messung wird das Plasma 1:10 mit Phosphatpuffer verdünnt.

4.3.2. Humanes Serum

Bei den Proteinbindungsversuchen wird weiterhin gepooltes humanes Blutserum (11 Probanden, Blutgruppe A) verwendet. Vor der Verwendung des humanen Serums für die Bindungsversuche wird das Serum zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut, für zwei Minuten zentrifugiert (3000 x g) und anschließend mithilfe eines Spritzenvorsatz-

filters (CA, 0,2 µm) filtriert. Das zentrifugierte und filtrierte Serum wird anschließend im Verhältnis 1:10 mit Phosphatpuffer verdünnt und kann so für die Bestimmung verwendet werden.

4.3.2.1. Bestimmung der Plasmaproteinkonzentration im Serum

Da die Konzentration der Proteine im Serum von Mensch zu Mensch bzw. je nach Gesundheits- und Ernährungszustand sehr unterschiedlich sein kann und in der Literatur lediglich ein Mittelwert angegeben wird (ca. 40 g/L Albumin^[8,14]), wurde im Vorfeld die Gesamtproteinkonzentration und die Konzentration an Albumin im verwendeten Serum bestimmt. Bei den Versuchen wird gepooltes Blutserum von elf Probanden eingesetzt, wodurch sich die Plasmaproteinkonzentration mitteln sollte. Für die Berechnung wird jedoch die exakte Konzentration benötigt, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Die Bestimmung erfolgte mithilfe der Biuret-Reaktion, die Gornall *et al.*^[111] für die Plasmaproteine optimiert haben. Das für die Reaktion benötigte Biuret-Reagens enthält Kupfer-II-sulfat für die Komplexbildung und Kaliumnatriumtartrat zur Stabilisierung^[111].

Für die Herstellung des Biuret-Reagens werden 150 mg Kupfer-II-sulfat und 600 mg Kaliumnatriumtartrat in 50 mL Millipore®-Wasser gelöst und mit 30 mL 10%iger Natronlauge versetzt. Anschließend wird mit Wasser auf 100,0 mL aufgefüllt.

Das Blutserum wird für die Bestimmung der Plasmaproteinkonzentration zunächst auf dieselbe Weise zentrifugiert und filtriert wie für die Herstellung der Proteinlösung für die Ultrafiltration. Anschließend werden 100 µL des filtrierten Serums mit 22,6%iger Natriumsulfatlösung ad 2,0 mL verdünnt und durch leichtes Umschwenken gemischt.

Für die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration im Serum werden 400 µL dieser Lösung in ein Reaktionsgefäß (T) überführt. Für die Bestimmung der Albuminkonzentration in der Probe wird die restliche Serum-Verdünnung mit 600 µL Diethylether versetzt, für 30 Sekunden auf dem Vortex gemischt und anschließend für eine Minute zentrifugiert (3000 x g), um eine klare Phasentrennung der organischen und wässrigen Phase zu erhalten. Von der wässrigen Phase werden nun ebenfalls 400 µL in ein Reaktionsgefäß (A) transferiert. Beide Proben (A) und (T) werden mit 1600 µL Biuret-Reagens versetzt und ausgiebig vermischt. Die Lösungen werden danach für 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach der Reaktionszeit werden die Lösungen bei 540 nm photometrisch

vermessen. Vor der Messung der Proben wird eine Blindprobe vermessen, die statt der Serumlösung lediglich 400 μL 22,6%ige Natriumsulfatlösung enthält. Es erfolgt eine dreifache Aufarbeitung der Serumproben.

Um aus der gemessenen Absorption der Proben die Konzentration der Plasmaproteine bestimmen zu können, werden Kalibrierlösungen hergestellt und vermessen. Diese Kalibrierlösungen werden nach Gornall *et al.* ebenfalls aus Serum hergestellt, das zunächst 1:10 mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt wird. Die Lösung wird entsprechend unten stehender Verdünnungsreihe (siehe Tab. 4) mit 22,6%iger Natriumsulfatlösung versetzt und genau wie die Proben nach Zugabe des Biuret-Reagenz und der Reaktionszeit bei 540 nm photometrisch vermessen. Jeder Kalibrierpunkt wird doppelt aufgearbeitet.

Tab. 4: Verdünnungsreihe Kalibriergerade mit humanem Serum, Proteinbestimmung

c (Serum)	0%	20%	40%	60%	80%	100%	120%	140%
V (Serum-Lösung) / μL	-	50	100	150	200	250	300	350
V (Na_2SO_4 -Lösung) / μL	500	450	400	350	300	250	200	150

Um eine absolute Albuminkonzentration im Serum bestimmen zu können, wurde zusätzlich zu der nach Gornall *et al.* geforderten Kalibrierreihe aus humanem Serum eine weitere Kalibrierreihe aus reinem humanem Serumalbumin (HSA) herstellt. Dazu werden 250 μL fertige HSA-Lösung (Albunorm® 20 % Lösung, 200 mg/mL HSA) mit 0,9%iger NaCl-Lösung ad 5,0 mL verdünnt. Diese HSA-Lösung (10 mg/mL) wird entsprechend Tab. 5 mit Natriumsulfatlösung weiter verdünnt.

Tab. 5: Verdünnungsreihe Kalibriergerade mit HSA, Proteinbestimmung

c (HSA) / g x L⁻¹ Serum	20	25	30	35	40	45	50	55
V (HSA-Lösung) / μL	50	62,5	75	87,5	100	112,5	125	137,5
V (Na_2SO_4 -Lösung) / μL	450	437,5	425	412,5	400	387,5	375	362,5
c (HSA) / g x L⁻¹ Serum	60	65	70	75	80	85	90	95
V (HSA-Lösung) / μL	150	162,5	175	187,5	200	212,5	225	237,5
V (Na_2SO_4 -Lösung) / μL	350	337,5	325	312,5	300	287,5	275	262,5

Die vorbereiteten Verdünnungen werden analog zur Serum-Kalibrierreihe und den Proben mit Biuret-Reagenz versetzt und nach der Reaktionszeit photometrisch vermessen. Auch bei der Kalibrierreihe aus reinem HSA erfolgt eine doppelte Aufarbeitung für jeden Kalibrierpunkt.

4.4. Arzneistofflösung

Zur Herstellung der Arzneistofflösung wird zunächst eine Stammlösung hergestellt, für die der Arzneistoff mit einem Lösungsmittel versetzt wird, in dem er gut löslich ist. Anschließend wird eine entsprechende Menge Stammlösung mit ca. 80 mL Phosphatpuffer verdünnt und der pH-Wert kontrolliert. Die Lösung wird mit Phosphatpuffer auf 100 mL aufgefüllt, um die gewünschte Endkonzentration zu erhalten. Vor der Verwendung der Lösung wird diese 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

4.4.1. *Ephedra*-Alkaloide

Die Herstellung der Stammlösungen bzw. im Versuch verwendeten Arzneistofflösungen erfolgt entsprechend Tab. 6, Tab. 7 und Tab. 8. Die Stammlösung wird wie oben beschrieben mit Phosphatpuffer verdünnt und anschließend entgast.

Tab. 6: Arzneistofflösungen der *Ephedra*-Alkaloide (Vorabmessungen, 400 mg/L, CUF)

	(-) E	(+) E	<i>racE</i>	(-) P	(+) P	<i>racP</i>
Molare Masse / g x mol ⁻¹	201,7	174,2	201,7	165,2	165,2	165,2
Einwaage	40 mg			40 mg		
Lösungsmittel	H ₂ O	0,1 M HCl	H ₂ O	0,1 M HCl		
c (Stammlösung)	20 mg/mL			20 mg/mL		
Volumen Stammlösung (ad 100 mL Phosphatpuffer)	2000 µL			2000 µL		
Messwellenlänge	257 nm			257 nm		

(-)**E** (-)-Ephedrin-HCl, (+)**E** (+)-Ephedrin x0,5 H₂O, *rac-E* *rac*-Ephedrin-HCl, (-)**P** (-)-Pseudoephedrin, (+)**P** (+)-Pseudoephedrin, *rac-P* *rac*Pseudoephedrin

Tab. 7: Arzneistofflösungen der *Ephedra*-Alkaloide (Vergleichsmessung, 2 mM, CUF)

	(-)E	(+)E	racE	(-)P	(+)P	racP
Molare Masse / g x mol ⁻¹	201,7	174,2	201,7	165,2	165,2	165,2
Einwaage	40 mg			40 mg		
Lösungsmittel	H ₂ O	0,1 M HCl	H ₂ O	0,1 M HCl		
c (Stammlösung)	20 mg/mL			10 mg/mL		
	(-)E	(+)E	racE	(-)P	(+)P	racP
Volumen Stammlösung (ad 100 mL Phosphatpuffer)	2017 µL	1742 µL	2017 µL	3306 µL		
Messwellenlänge	257 nm			257 nm		

(-)E (-)-Ephedrin-HCl, **(+)E** (+)-Ephedrin x0,5 H₂O, **rac-E** rac-Ephedrin-HCl, **(-)P** (-)-Pseudoephedrin, **(+)P** (+)-Pseudoephedrin, **rac-P** racPseudoephedrin

Tab. 8: Arzneistofflösungen der *Ephedra*-Alkaloide (0,2 mM, CUF);

	(-)E	(+)E	(-)P	(+)P
Molare Masse / g x mol ⁻¹	201,7	174,2	165,2	165,2
Einwaage	40 mg		40 mg	
Lösungsmittel	H ₂ O	0,1 M HCl	0,1 M HCl	
c (Stammlösung)	20 mg/mL		10 mg/mL	
Volumen Stammlösung (ad 100 mL Phosphatpuffer)	204 µL	176 µL	332 µL	
Messwellenlänge	218 nm		218 nm	

(-)E (-)-Ephedrin-HCl, **(+)E** (+)-Ephedrin x0,5 H₂O, **rac-E** rac-Ephedrin-HCl, **(-)P** (-)-Pseudoephedrin, **(+)P** (+)-Pseudoephedrin, **rac-P** racPseudoephedrin

4.4.2. Sympathomimetika

Auch bei den anderen Sympathomimetika wurden die optimale Messwellenlänge und die benötigte Konzentration vorab bestimmt, siehe Tab. 9.

Tab. 9: Arzneistofflösungen der zusätzlichen Sympathomimetika (0,2 mM, CUF);

	A	NA	Oxi	Phe	Syn	Orc
Molare Masse / g x mol ⁻¹	333,3	337,3	217,7	203,7	484,4	520,6
Einwaage	20 mg		20 mg			
Lösungsmittel	0,1 M HCl		0,1 M HCl			
c (Stammlösung)	10 mg/mL		10 mg/mL			
Volumen Stammlösung (ad 100 mL Phosphatpuffer)	333 µL	338 µL	218 µL	204 µL	243 µL	261 µL
Messwellenlänge	279 nm		273 nm			278 nm

A L-Adrenalintartrat, **NA** L-Noradrenalinhydrogentartrat, **Oxi** *rac*-Oxilofrin-HCl, **Phe** *rac*-Phenylephrin-HCl, **Syn** *rac*-Synephrintartrat, **Orc** *rac*-Orciprenalinsulfat

4.4.3. Mip-Inhibitoren

Für die Vermessung der oben dargestellten Mip-Inhibitoren wurden folgende Konzentrationen und Messwellenlängen vorab bestimmt, siehe Tab. 10.

Tab. 10: Arzneistofflösungen der Mip-Inhibitoren, CUF

	Substanz 28B	Substanz 28C	Vorstufe 4a
Molare Masse / g x mol ⁻¹	431,5	578,7	283,4
Einwaage	15 mg	15 mg	120 mg
Lösungsmittel	DMSO	DMSO	DMSO
c (Stammlösung)	20 mg/mL	10 mg/mL	100 mg/mL
Volumen Stammlösung (ad 100 mL Phosphatpuffer)	200 µL	300 µL	267 µL
Messwellenlänge	260 nm	248 nm	258 nm
c (Arzneistofflösung)	40 µg/mL	30 µg/mL	267 µg/mL

4.4.4. Fluorchinolone

Folgende Konzentrationen und Messwellenlängen werden bei der Vermessung der Fluorchinolone mittels kontinuierlicher Ultrafiltration verwendet, siehe Tab. 11. Aufgrund der schlechten Löslichkeit wird dem Phosphatpuffer Polysorbat-20 als Lösungsvermittler zugesetzt. Die Konzentration des Polysorbat-20 wurde so gewählt, dass die Substanz möglichst gut löslich, die Konzentration des Tensids – wegen der zunehmenden Größe der Mizellen – jedoch auch möglichst gering ist.

Tab. 11: Arzneistofflösungen der Fluorchinolone, CUF

	GHQ168	GHQ 2430x	MB161	MB209	MB343	MB444
Molare Masse / g x mol ⁻¹	437,5	542,6	419,5	455,5	437,5	455,5
Einwaage	5 mg	5 mg	5 mg	5 mg	5 mg	5 mg
Lösungsmittel	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
c (Stammlösung)	5 mg/mL	5 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL
Volumen Stammlösung (ad 100 mL Puffer)	84 µL	70 µL	200 µL	400 µL	200 µL	250 µL
Polysorbat-20-Puffer	1 mM	1 mM	0,1 mM	0,5 mM	0,2 mM	0,2 mM
Messwellenlänge	282 nm	278 nm	284 nm	279 nm	286 nm	287 nm
c (Arzneistofflösung) / µg x mL ⁻¹	4,2	3,5	2	4	2	2,5

4.4.5. Zimtsäure-Derivate

Zur Messung der Zimtsäure-Derivate werden folgende Konzentrationen und Messwellenlängen verwendet, siehe Tab. 12. Wegen der schlechten Löslichkeit der drei Substanzen in Phosphatpuffer, wird Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsvermittler zugesetzt, um einen 10%igen DMSO-Phosphatpuffer zu erhalten ^[109].

Tab. 12: Arzneistofflösungen der Zimtsäure-Derivate, CUF

	Substanz JGBEN51	Substanz JGBEO01	Substanz JGBEO44
Molare Masse / g x mol ⁻¹	285,4	284,4	286,4
Einwaage	1 mg	1 mg	1 mg
Lösungsmittel	DMSO	DMSO	DMSO
c (Stammlösung)	10 mg/mL	10 mg/mL	10 mg/mL
Volumen Stammlösung	1500 µL	100 µL	1500 µL
Volumen DMSO (ad 100 mL Phosphatpuffer)	8500 µL	9900 µL	8500 µL
Messwellenlänge	234 nm	280 nm	234 nm
c (Arzneistofflösung)	150 µg/mL	10 µg/mL	150 µg/mL

4.5. Ultrafiltrationsmembran

Vor der Verwendung einer neuen Ultrafiltrationsmembran für die Messung mittels kontinuierlicher Ultrafiltration muss diese zunächst mit Millipore®-Wasser konditioniert werden. Dazu wird die neue Membran mit der Filterseite nach unten für 15 Minuten in Millipore®-Wasser gelegt. Der Vorgang wird drei weitere Male wiederholt, wobei jedes Mal das Wasser ersetzt wird. Anschließend kann der Filter in die Ultrafiltrationszelle eingesetzt und verwendet werden.

Nach einer Messung muss das Protein, das sich in den Poren befindet bzw. an der Membran anhaftet, entfernt werden. Vorher kann die Membran nicht erneut eingesetzt werden. Dieser Reinigungsschritt geschieht, indem die Membran nach dem Ausbau aus der Messzelle zunächst vorsichtig mit Millipore®-Wasser gespült wird, um die überschüssige Protein-Arzneistofflösung zu entfernen. Anschließend wird die Membran für 30 Minuten in 1 M NaOH-Lösung gelegt. Diese Zeit sollte um nicht mehr als zehn Minuten überschritten werden, da sonst die Membran zunehmend angegriffen wird. Danach wird die Membran mehrfach mit Millipore®-Wasser gespült, um überschüssige NaOH-Lösung zu entfernen. Soll die Membran am selben Tag weiterverwendet werden, so kann sie zu diesem Zeitpunkt wieder in die Messzelle eingebaut werden. Erfolgt die nächste Messung nicht direkt im Anschluss,

wird die Membran in 10%igem Ethanol im Kühlschrank abgedeckt gelagert, um das Austrocknen und eine mikrobielle Kontamination zu verhindern.

Eine Ultrafiltrationsmembran kann bis zu 20 Mal für die Messung verwendet werden, wenn sie richtig gereinigt und gelagert wird. Es muss sichergestellt werden, dass die Membran während der Lagerung und Verwendung nicht austrocknet, da sie sonst für weitere Messungen unbrauchbar ist. Eine Kontrolle der Integrität der Membran erfolgt im Rahmen jeder Messung (siehe Kapitel B.1.2).

4.6. Versuchsvorbereitungen

Bei der Vermessung neuer Substanzen mittels kontinuierlicher Ultrafiltration, wird zunächst das UV-Maximum dieser Substanzen ermittelt. Um später optimale Messkurven zu erhalten sollte die Detektion – sofern möglich – bei der Wellenlänge mit der größten UV-Absorption erfolgen und die Konzentration der Substanz so gewählt werden, dass bei reiner Wirkstofflösung – in der Plateauphase am Ende der Messung – eine UV-Absorption von 0,2 – 1,5 AU gemessen wird ^[112]. Zur Bestimmung der eingesetzten Konzentration werden verschiedene Konzentrationen der Substanz im UV-Maximum vermessen. Bei schlechtlöslichen Substanzen erfolgt zeitgleich die Optimierung des Phosphatpuffers für die Wirkstofflösung durch Zusatz verschiedener organischer Lösungsmittel oder Tenside ^[90].

4.7. Versuchsdurchführung

Soll das Ausmaß der Plasmaproteinbindung mittels kontinuierlicher Ultrafiltration bestimmt werden, so wird als erstes die Filtermembran für die Messung vorbereitet. Dazu wird entweder eine neue Membran konditioniert (siehe Kapitel B.0) oder eine bereits gebrauchte Membran wiederverwendet. Die zu verwendende Membran wird zunächst vorsichtig mit Millipore®-Wasser gespült und bis zur Messung bei Raumtemperatur in Pufferlösung konditioniert.

Nach der Herstellung und dem Entgasen der Arzneistoff- und Pufferlösung werden beide Lösungen an die Anlage angeschlossen. Die Pumpe wird für jeweils 5 Minuten mit jeder Lösung durchspült. Im Anschluss wird die komplette Anlage – zunächst ohne Messzelle – für einige Minuten mit Pufferlösung gespült.

Die Messzelle (siehe Kapitel B.1.1, Abb. 10) wird nun bei laufender Pumpe eingebaut, um das Entstehen von Luftblasen in der Kammer zu vermeiden. Dazu wird der Einlass an das Unterteil der Messzelle angeschlossen und der Rührfisch hineingelegt. Wenn das Unterteil der Messzelle sich mit Pufferlösung gefüllt hat, wird die Filterunterstützung eingesetzt. Die beim Einsetzen entstandenen Luftblasen werden mit einer Pipette bzw. durch Rühren vorsichtig entfernt. Sind alle Luftblasen entfernt, wird die empfindliche Membran eingesetzt und mit dem Dichtungsring fixiert. Nach Aufsetzen des Oberteils wird die ganze Zelle in der Halterung fixiert und der Magnetrührer eingeschaltet. Um zu verhindern, dass die Lösung seitlich aus der Messzelle austritt, werden die Filterunterstützung und das Oberteil der Messzelle mit Teflonband umwickelt. Dadurch wird die Messzelle komplett abgedichtet, der Austritt von Lösung und das Entstehen von Luftblasen im System vermieden. Der Auslass der Messzelle wird nach erfolgreichem Zusammenbau der Messzelle abschließend mit dem Detektor verbunden. Das ganze System wird für mindestens 30 Minuten mit Pufferlösung eingespült, um alle Luftblasen und sonstige störende Stoffe aus der Anlage zu spülen ehe mit der eigentlichen Messung begonnen wird.

Nach dem Einspülen der Anlage kann die eigentliche Messung gestartet werden. Das von *Heinze* und *Reyer* selbst programmierte Messprogramm „WSA-Protein“ steuert die Messung vollautomatisch^[93]. Die Messung erfolgt nach dem allgemeinen Versuchsablauf, der in Kapitel B.1.2 beschrieben ist. Nach dem ersten Versuchsteil – dem Aufzeichnen der ersten Wirkstoffkurve und dem Spülen mit Pufferlösung – erfolgt eine automatische Pause im Versuchsablauf. Zu diesem Zeitpunkt muss die Proteinlösung manuell injiziert werden und das Programm manuell weitergeschaltet werden. Dabei wird das Injektionsventil so geschaltet, dass die Injektionsschleife für mindestens zehn Minuten mit Pufferlösung durchspült wird, um sicher zu stellen, dass die komplette Menge an Protein in die Kammer gelangt. Der Rest der Messung erfolgt wieder vollautomatisch.

Die Dauer der einzelnen Versuchsabschnitte kann je nach verwendeter Messwellenlänge, Adsorptionseffekten des Wirkstoffes an die Ultrafiltrationsmembran oder Teile der Messzelle und die Plasmaproteinbindung der zu untersuchenden Substanz stark variieren. Die benötigten Messzeiten werden vor dem Versuch in der entsprechenden Maske im Programm eingegeben. Bei Messungen im längerwelligen UV-Bereich, mit geringen

Adsorptionserscheinungen des Wirkstoffes und/oder bei Stoffen mit niedriger Plasmaproteinbindung sind kürzere Zeiten ausreichend, da die UV-Absorption schnell das Plateau erreicht bzw. nach sehr kurzer Zeit keine Absorption der Lösung mehr registriert wird.

4.8. Abbau und Lagerung der Anlage

Nach einer Versuchsmessung muss die Anlage gründlich gereinigt werden, um weiterhin zuverlässige Messungen zu gewährleisten. Dazu wird wie folgt verfahren: Am Ende der Messung wird die Pumpe angehalten und die Messzelle komplett ausgebaut. Die Anlage wird im Anschluss ohne Messzelle ausgiebig gespült, um Reste der Arzneistoff- bzw. Proteinlösung zu entfernen. Soll direkt ein weiterer Versuch stattfinden, werden die Arzneistoff- und Pufferlösung gegebenenfalls ersetzt und die Anlage mit Pufferlösung neu konditioniert. Ist kein weiterer Versuch vorgesehen, wird die Anlage mindestens 30 Minuten lang mit Millipore®-Wasser gespült, um zu gewährleisten, dass sich kein Puffer mehr in der Anlage befindet. Bei stehender Anlage würden die Puffersalze den Pumpenkopf angreifen und durch Auskristallisieren der Puffersalze die Anlage langfristig schädigen.

Sind über einen längeren Zeitraum keine weiteren Versuche geplant, wird die Anlage – zum Schutz vor Korrosion und mikrobieller Kontamination – nach dem Spülschritt mit Millipore®-Wasser auf 80%igen Methanol umgespült.

Die Messzelle selbst wird nach der Messung vorsichtig auseinandergebaut und die Membran entsprechend Kapitel B.0 behandelt. Die anderen Teile der Messzelle werden ausgiebig mit Wasser gespült; im letzten Schritt werden alle Teile noch mit Millipore®-Wasser nachgespült. Danach wird die Zelle entweder wieder eingebaut, falls eine weitere Messung erfolgen soll, oder zum Trocknen vor Staub geschützt in ein Handtuch gelegt.

DISKONTINUIERLICHE ULTRAFILTRATION

5.1. Vermessene Liganden

Mittels diskontinuierlicher Ultrafiltration wurden die optisch aktiven *Ephedra*-Alkaloide, (-)-Ephedrin-HCl, (+)-Ephedrin x ½ H₂O, (-)-Pseudoephedrin und (+)-Pseudoephedrin vermessen. Zudem wurden Versuche mit den Fluorchinolonen GQH168 und GHQ243Ox durchgeführt.

5.2. Pufferlösung

Um die erhaltenen Ergebnisse mit den vorherigen Messergebnissen der kontinuierlichen Ultrafiltration vergleichen zu können, wird für die Bindungsversuche und Ultrafiltration der gleiche Phosphatpuffer pH 7,4 als Probelösungsmittel verwendet, der auch bei der Bestimmung der Plasmaproteinbindung mittels kontinuierlicher Ultrafiltration Anwendung findet. Der Zusatz von Polysorbat-20 zum verwendeten Phosphatpuffer für schwerlösliche Substanzen wie den Fluorchinolonen GHQ168 und GHQ243Ox erfolgte analog zur kontinuierlichen Ultrafiltration. Aufgrund der unterschiedlichen Filtrationsmethoden (Zentrifugation statt Druck) können höhere Tensid-Konzentrationen im Probelösungsmittel von bis zu 5 mM Polysorbat-20 verwendet werden.

5.3. Proteinlösung

Für die bei der Messung genutzte Proteinlösung wird aufgrund der großen benötigten Menge eine fertige Albuminlösung (Albunorm® 20 % Lösung) eingesetzt, die vor der Verwendung mit Phosphatpuffer entsprechend verdünnt wird. Die Endkonzentration an humanem Albumin in der Proteinlösung entspricht der Konzentration im Blut (0,6 mM). Das humane Serum wird zur Herstellung der Arzneistoff-Proteinlösung unverdünnt eingesetzt; es wird vorher wie in Kapitel B.4.3.2 beschrieben lediglich zentrifugiert und filtriert.

5.4. Arzneistofflösung

Alle Arzneistofflösungen werden wie bei der kontinuierlichen Ultrafiltration mit dem oben genannten Phosphatpuffer hergestellt. Von den Arzneistoffen wird zunächst eine Stammlösung hergestellt, die je nach gewünschtem Konzentrationsbereich entsprechend mit Phosphatpuffer verdünnt und mit der Proteinlösung bzw. dem Serum versetzt wird.

5.4.1. *Ephedra*-Alkaloide

Da die stereoselektive Proteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide untersucht werden sollte, wird zunächst eine racemische Stammlösung der beiden Ephedrin- bzw. Pseudoephedrin-Enantiomere hergestellt. Dazu werden 50 mg der beiden Ephedrin- bzw. Pseudoephedrin-Enantiomere jeweils einzeln eingewogen und in 10,0 mL Phosphatpuffer gelöst. Das entsprechende Volumen der beiden optisch aktiven Enantiomerlösungen wird zur Herstellung des Racemats gemischt und mit Phosphatpuffer auf 25,0 mL verdünnt. Die racemische Stammlösung hat damit eine Endkonzentration von 5 mM *rac*-Ephedrin bzw. *rac*-Pseudoephedrin.

5.4.2. Fluorchinolone

Für beide GHQ-Substanzen wird zunächst eine 5 mg/mL konzentrierte Stammlösung hergestellt. Wegen der schlechten Wasserlöslichkeit beider Substanzen wird als Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Diese Stammlösung wird entsprechend mit 2 mM bzw. 5 mM Polysorbat-20-Phosphatpuffer verdünnt, um in einen Konzentrationsbereich von 0,5 – 75 µg/mL (GHQ168) bzw. 1 – 110 µg/mL (GHQ243Ox) zu kommen. Die Arzneistofflösungen zur Analyse mit GHQ168-2 und GHQ243Ox enthalten zusätzlich 20 µg/mL Nalidixinsäure als internen Standard.

Für HPLC-Methode GHQ168-1 wird das Ultrafiltrat und die ursprüngliche Probelösung zusätzlich mit einem Spritzenfilter (CA, 0,2 µm) filtriert und anschließend in die HPLC injiziert. Für die optimierten HPLC-Methoden GHQ168-2 und GHQ243Ox werden 50 µL Filtrat bzw. Probelösung zunächst mit 300 µL Acetonitril versetzt, mittels Vortex mindestens eine Minute gemischt und anschließend für eine Minute bei 3000 x g zentrifugiert. 250 µL Überstand

werden mit 750 µL Methanol-Wasser (1:1 V/V) versetzt und für die Injektion in HPLC-Vials überführt.

5.5. Interner Standard

5.5.1. Ephedra-Alkaloide

Für die Messung der *Ephedra*-Alkaloide mittels diskontinuierlicher Ultrafiltration wird der β -Blocker Atenolol als interner Standard (IS) verwendet. Zur Herstellung der Atenolol-Stammlösung wird 53 mg Atenolol in 10,0 mL Dimethylsulfoxid gelöst; es wird DMSO als Lösungsmittel verwendet, da Atenolol in diesen Konzentrationen in wässrigem Puffer nicht ausreichend löslich ist. Die Stammlösung hat damit eine Endkonzentration von 20 mM.

5.5.2. Fluorchinolone

Bei der diskontinuierlichen Ultrafiltration der Fluorchinolone wird Nalidixinsäure als interner Standard verwendet. Die Stammlösung enthält 5 mg Nalidixinsäure, die zunächst mit 1 mL 1 M Natronlauge vorgelöst wird. Anschließend wird die Lösung mit Millipore®-Wasser auf 10 mL verdünnt.

5.6. Kalibrierlösungen

5.6.1. Ephedra-Alkaloide

Die Kalibrierlösungen für die Quantifizierung der *Ephedra*-Alkaloide werden durch Verdünnen der racemischen Stammlösung (5 mM) mit Phosphatpuffer ad 2,0 mL entsprechend dem unten gezeigten Verdünnungsschema (siehe Tab. 13) hergestellt. Jede Kalibrierlösung enthält zudem 50 µL Atenolol-Stammlösung, um eine Konzentration von 500 µmol/L des internen Standards in der fertigen Lösung zu erhalten. Die Kalibrierlösungen werden gut gemischt und in Vials abgefüllt.

Tab. 13: Verdünnungsreihe Kalibriergerade *Ephedra*-Alkaloide, DUF, ad 2,0 mL Phosphatpuffer, mit 500 µM internem Standard (IS, Atenolol)

Konzentration / mM Racemat	0,1	0,2	0,3	0,5	1,0	1,5	2,0	2,7	3,3	4,0	4,5	5,0
Volumen / µL Stammlsg.	20	40	60	100	200	300	400	540	660	800	900	1000
Volumen IS / µL Stammlsg	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

5.6.2. Fluorchinolone

Die Quantifizierung der Fluorchinolone GHQ168 und GHQ243Ox im Ultrafiltrat erfolgt mittels HPLC. Bei HPLC-Methode GHQ168-1 wurde das Fluorchinolon mittels externem Standard analysiert. Zur Herstellung der Kalibrierlösungen werden zunächst 200 µL der GHQ168-Stammlösung (5 mg/mL in DMSO) mit 2 mM bzw. 5 mM Polysorbat-20-Phosphatpuffer auf 2 mL verdünnt. Diese Lösung (GHQ168-1, 500 µg/mL) wird anschließend entsprechend Tab. 14 weiter verdünnt und ad 2,0 mL mit 2 mM bzw. 5 mM Polysorbat-20-Phosphatpuffer aufgefüllt. Die Kalibrierlösungen der erste Versuchsreihe wurden dabei mit 2 mM Polysorbat-20-Puffer hergestellt, der aufgrund von Löslichkeitsproblemen bei den weiteren Versuchen auf 5 mM erhöht wurde.

Tab. 14: Verdünnungsreihe Kalibriergerade DUF **GHQ168-1**, aus Lösung GHQ168-1 (500 µg/mL GHQ168) ad 2,0 mL 2 mM bzw. 5 mM Polysorbat-20-Phosphatpuffer

Konzentration / µg/mL GHQ168	0,5	2,5	5,0	25,0	50,0	75,0
Volumen / µL GHQ168-1	2	10	20	100	200	300

Die Herstellung der Kalibrierlösungen für die HPLC-Methoden GHQ168-2 und GHQ243Ox sind in Tab. 15 und Tab. 16 dargestellt. Bei beiden Methoden wird mittels internem Standard quantifiziert. Aufgrund der anderen Probenaufarbeitung im Vergleich zu Methode GHQ168-1 werden die Kalibrierlösungen stärker verdünnt. Vorweg werden jeweils 50 µL der GHQ168- bzw. GHQ243Ox-Stammlösung (jeweils 5 mg/mL in DMSO) ad 10,0 mL mit Methanol/Millipore®-Wasser (1:1 V/V) verdünnt. Diese Lösungen (GHQ168-2 und GHQ243-1) werden entsprechend Tab. 15 und Tab. 16 mit dem internen Standard

(500 µg/mL Nalidixinsäure) und Acetonitril (ACN) versetzt und mit Methanol/Wasser (1:1 V/V) auf 2,0 mL aufgefüllt. Die Endkonzentration an Nalidixinsäure in den Kalibrierlösungen liegt bei 1 µg/mL.

Tab. 15: Verdünnungsreihe Kalibriergerade DUF **GHQ168-2**, aus Lösung GHQ168-2 (25 µg/mL GHQ168), ad 2,0 mL Methanol/Wasser (1:1 V/V)

Konzentration in Probe / µg/mL GHQ168	1	5	10	20	40	50
Volumen / µL GHQ168-2	4	20	40	80	160	200
Volumen IS / µL Stammlösung	4	4	4	4	4	4
Volumen ACN / µL	425	425	425	425	425	425

Tab. 16: Verdünnungsreihe Kalibriergerade DUF **GHQ243Ox**, aus Lösung GHQ243-1 (25 µg/mL GHQ243) ad 2,0 mL 2 mM bzw. 5 mM Polysorbat-20-Phosphatpuffer

Konzentration in Probe / µg/mL GHQ243Ox	1	5	10	20	40	50
Volumen / µL GHQ243-1	4	20	40	80	160	200
Volumen IS / µL Stammlösung	4	4	4	4	4	4
Volumen ACN / µL	425	425	425	425	425	425

5.7. Filtrervorbehandlung

Die Vermessung der antitrypanosomalen Fluorchinolone (GHQ-Substanzen) erforderte eine Vorbehandlung der Amicon® Ultrafiltrationseinheiten. Zur Reduktion der nicht-spezifischen Bindung der Substanzen an das Filtermaterial, werden die Filtereinheiten nach Lee *et. al.* mit 5%iger Polysorbat-80-Lösung (Lösungsmittel Phosphatpuffer, pH 7,4) bzw. 5%iger Benzalkoniumchlorid-Lösung (Lösungsmittel Phosphatpuffer, pH 7,4) vorbehandelt^[113]. Dazu werden die Filter für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 3000 x g ultrafiltriert. Die restlichen Lösungen werden verworfen und die Filtereinheit mit 4 mL Phosphatpuffer gespült, um überschüssiges Polysorbat-80 bzw. Benzalkoniumchlorid aus den Filtereinheiten zu entfernen.

5.8. Arzneistoff-Protein-Probelösungen

Zur Bestimmung der Proteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide werden aus den racemischen Wirkstoff-Stammlösungen und der Proteinlösung bzw. dem humanen Serum mehrere Probelösungen hergestellt, die unterschiedliche Protein-Arzneistoff-Verhältnisse enthalten. Das entsprechende Volumen der Arzneistoff-Stammlösung wird mit Phosphatpuffer verdünnt und gemischt; 1,9 mL dieser Arzneistoff-Verdünnung werden in einem 15-mL-Kunststoffröhrchen mit 2,0 mL Proteinlösung bzw. humanem Serum versetzt, vorsichtig durchmischt und für 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, um eine Gleichgewichtseinstellung zwischen ungebundenem und gebundenem Arzneistoff zu erreichen. Damit dieses Gleichgewicht zwischen Arzneistoff und Protein nicht durch den internen Standard beeinflusst wird, wird dieser erst direkt vor der Ultrafiltration zugegeben. Dazu wird zu der inkubierten Probelösung 100 µL Atenolol-Stammlösung hinzugefügt. Die Probelösung wird gemischt, in die Filtrationseinheit überführt und sofort für 10 Minuten bei Raumtemperatur mittels Zentrifuge (3000 x g) ultrafiltriert. Die Konzentration der einzelnen Enantiomere in den finalen Probelösungen liegen im Bereich von $2,4 \times 10^{-4}$ mol/L bis $10,7 \times 10^{-4}$ mol/L; der interne Standard Atenolol ist in einer Konzentration von 500 µmol/L in der Probelösung enthalten. Der ungebundene Anteil der *Ephedra*-Alkaloide wird mittels Kapillarelektrophorese-Methode im Filtrat quantifiziert. Dazu wird das Filtrat direkt in Vials abgefüllt und in die CE injiziert.

5.9. *Ephedra*-Alkaloide

5.9.1. Trennpuffer

Beim Trennpuffer für die kapillarelektrophoretische Trennung der *Ephedra*-Alkaloide handelt es sich um einen 100 mM Phosphatpuffer, pH 2,5, mit folgender Zusammensetzung;

NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	69 mM	≅	9,5 g/l
H ₃ PO ₄	31 mM	≅	3,0 g/l
Harnstoff	4 M	≅	240,4 g/l
β-Cyclodextrin	30 mM	≅	34,0 g/l

Für die Herstellung des Trennpuffers wird die entsprechende Menge des Puffersalzes und der anderen Zusatzstoffe eingewogen und in ca. 30 mL Millipore®-Wasser durch Rühren bzw. unter Verwendung des Ultraschallbads gelöst. Die Phosphorsäure wird volumengenau zudosiert, der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls mit 1 M NaOH-Lösung korrigiert. Die Lösung wird ad 50,0 mL mit Millipore®-Wasser aufgefüllt. Vor der Verwendung in der Kapillarelektrophorese wird der Puffer filtriert (Spritzenvorsatzfilter, CA, 0,2 µm) und in CE-Vials überführt.

5.9.2. Konditionierung der Kapillare

Zu Beginn und Ende jeden Tages bzw. der Sequenz wird die Kapillare bei 137,9 kPa (20 psi) für zehn Minuten mit Millipore®-Wasser, zehn Minuten mit 2-Propanol, fünf Minuten mit Millipore®-Wasser, zehn Minuten mit 0,1 M Natronlauge und zuletzt fünf Minuten mit Millipore®-Wasser konditioniert und gereinigt.

Vor jedem Lauf wird die Kapillare zunächst unter 275,8 kPa (40 psi) Druck für zwei Minuten mit Millipore®-Wasser, zwei Minuten mit 2-Propanol, eine Minute mit Millipore®-Wasser, für zwei Minuten mit 0,1 M Natronlauge und für eine Minute mit Millipore®-Wasser gespült. Vor der Injektion der Probe wird die Kapillare zusätzlich vier Minuten, bei 137,9 kPa (20 psi) Druck, mit dem entsprechenden Trennpuffer gespült. Am Ende jeden Laufes erfolgte ein weiterer Spülschritt, um in der Kapillare verbliebene Probenbestandteile zu entfernen. Dazu wird die Kapillare erneut bei 137,9 kPa (20 psi) Druck für 3 Minuten mit Trennpuffer gespült.

5.10. Fluorchinolone

5.10.1. Mobile Phase (HPLC)

Die Quantifizierung der freien Wirkstoffmenge im Filtrat erfolgte bei den Fluorchinolonen mittels HPLC-Methode (isokratisch). Die mobile Phase der ursprünglich verwendeten HPLC-Methode GHQ168-1 besteht aus Millipore®-Wasser und Acetonitril, die im Verhältnis 28:72 (V/V) gemischt werden. Für HPLC-Methode GHQ168-2 setzt sich die mobile Phase aus 40 Volumenteilen 10 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 4,0) und 60 Volumenteilen Acetonitril zusammen. Für den Ammoniumacetatpuffer werden 770,8 mg Ammoniumacetat in Millipore®-Wasser gelöst, der pH-Wert kontrolliert und ggf. mit 50%iger Essigsäure

eingestellt. Der Puffer wird auf 1000,0 mL mit Millipore®-Wasser aufgefüllt und im entsprechenden Verhältnis mit Acetonitril gemischt. Zur Quantifizierung von GHQ2430x enthält die mobile Phase mehr Acetonitril als bei GHQ168: 20 Volumenteile 10 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 4,0) und 80 Volumenteile Acetonitril. Die mobile Phase wird gut gemischt und im Ultraschallbad entgast.

ERGEBNISSE

NEU SYNTHETISIERTE ARZNEISTOFFE

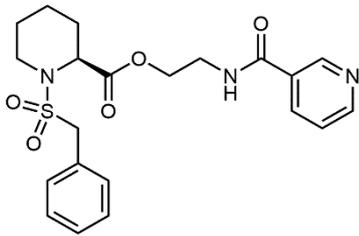
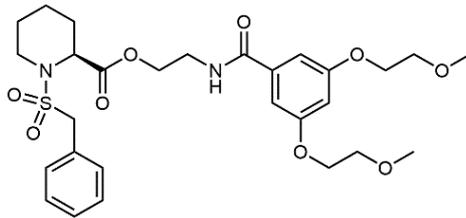
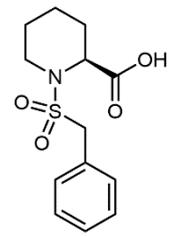
Die Resistenzentwicklung gegenüber Antibiotika stellt ein immer größer werdendes Problem in der Therapie bakterieller Infekte dar. Die Entwicklung neuer Antibiotika mit neuen Angriffspunkten im bakteriellen Organismus bzw. bei der Vermehrung der Bakterien spielt demzufolge eine wichtige Rolle ^[114,115].

6.1. Proteinbindung der Mip-Inhibitoren

Ein neuer Ansatzpunkt ist die Entwicklung spezifischer Inhibitoren von Virulenzfaktoren. Durch die Verringerung der Virulenz der Bakterien können die menschlichen Zellen vor Infektionen geschützt werden ohne zwangsläufig den Erreger abzutöten. Theoretisch soll das den evolutionären Druck verringern und so die Resistenzentwicklung verlangsamen ^[114]. Einer dieser Virulenzfaktoren, gegen den spezifische Inhibitoren entwickelt werden, ist das „macrophage infectivity potentiator“-Protein, kurz Mip genannt. Mip-Proteine gehören zur Familie der FK506-Bindungsproteine und spielen unter anderem bei der Legionellose (*Legionella pneumophila*) und der Melioidose (*Burkholderia pseudomallei*) eine Rolle ^[116,117]. Durch die Hemmung des Mip-Oberflächenproteins kann die Infektion der Makrophagen deutlich verringert werden ^[118].

Im Arbeitskreis Holzgrabe wurden folgende Mip-Inhibitoren entwickelt und synthetisiert, die zukünftig bei Infektionen mit *Legionella pneumophila* und *Burkholderia pseudomallei* eingesetzt werden könnten ^[99,100]. Ein Teil der Charakterisierung dieser potentiellen

Antibiotika ist die Bestimmung der Plasmaproteinbindung der aussichtsreichsten Substanzen und der Carbonsäure-Vorstufe.

Substanz **28B** $M_R = 431,5 \text{ g/mol}$ Substanz **28C** $M_R = 578,7 \text{ g/mol}$ Vorstufe **4a**
(freie Carbonsäure) $M_R = 283,4 \text{ g/mol}$

Als Sulfonsäureamide – mit zusätzlicher Amidstruktur in der Seitenkette – besitzen alle drei Substanzen einen schwach sauren Charakter und sollten in der Theorie an das Albumin im Plasma binden. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, haben Stoffe mit einer hohen Bindungsaffinität zu Albumin vermehrt saure Stoffeigenschaften wie die NSAIDs oder Warfarin, wohingegen basische Stoffe oft eine höhere Affinität zum sauren α_1 -Glykoprotein als zu Albumin zeigen ^[23]. Die Ergebnisse der Messung für **28B** und **28C** mit humanem und bovinem Serumalbumin sind in Abb. 16 und Tab. 17 dargestellt.

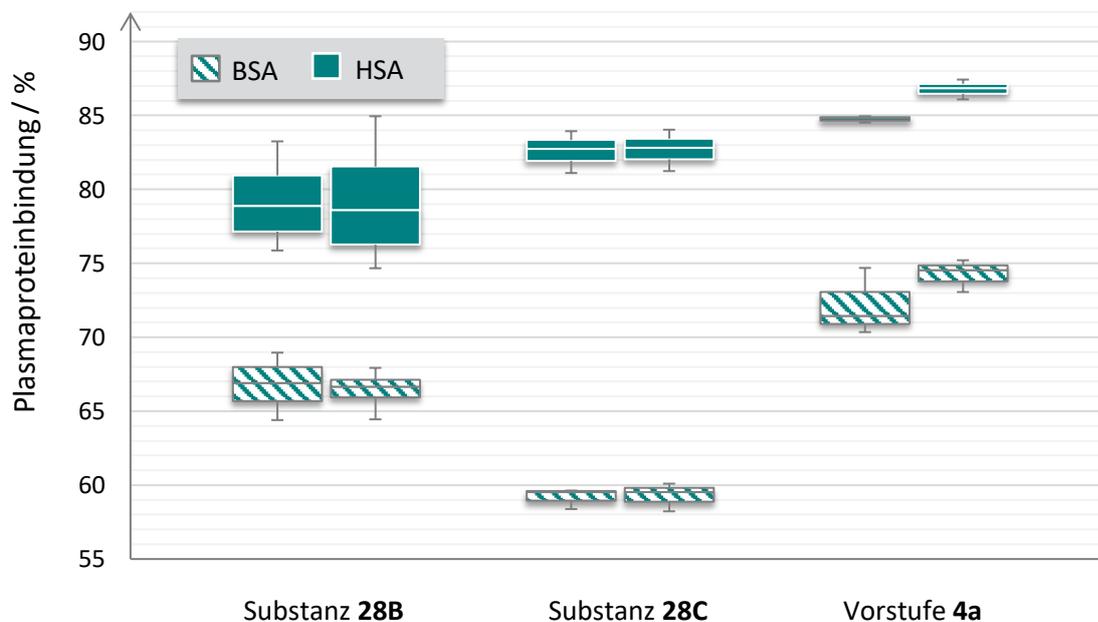


Abb. 16: Plasmaproteinbindung / % der drei Mip-Inhibitoren; für bovines - (BSA) und humanes Serumalbumin (HSA), Ergebnisse der unterschiedlichen Bindungsmodelle: unabhängige - (links) und abhängige Bindung (rechts)

Tab. 17: Plasmaproteinbindung der Mip-Inhibitoren, Substanz **28B** und **28C**

Substanz 28B							
	c = 40 mg/L	Unabhängige Bindestellen			Abhängige Bindestellen		
	Messung	Proteinbindung (%)	pK ₁	pK ₂	Proteinbindung (%)	pK ₁	pK ₂
BSA	1	64,40	3,45	2,23	64,45	3,48	-
	2	66,12	3,49	2,24	66,44	3,52	-
	3	68,96	3,54	2,35	66,85	3,53	2,94
	4	67,68	3,53	2,07	67,93	3,55	-
	Mittelwert	66,79	3,50	2,22	66,42	3,52	2,94
	sdv	1,97	0,04	0,12	1,45	0,03	-
	rel sdv	2,95	1,17	5,19	2,19	0,84	-
HSA	1	83,25	3,70	3,52	84,95	3,97	-
	2	80,18	3,82	2,19	80,41	3,84	-
	3	75,87	3,70	2,27	74,67	3,69	2,81
	4	77,58	3,74	2,47	76,81	3,74	2,79
	Mittelwert	79,22	3,74	2,61	79,21	3,81	2,80
	sdv	3,22	0,06	0,62	4,50	0,12	0,01
	rel sdv	4,06	1,51	23,59	5,68	3,24	0,51
Substanz 28C							
	c = 30 mg/L	Unabhängige Bindestellen			Abhängige Bindestellen		
	Messung	Proteinbindung (%)	pK ₁	pK ₂	Proteinbindung (%)	pK ₁	pK ₂
BSA	1	59,54	3,38	1,91	59,54	3,39	-
	2	59,63	3,38	1,74	60,10	3,40	-
	3	58,38	3,33	2,32	58,23	3,37	-
	Mittelwert	59,18	3,36	1,99	59,29	3,39	-
	sdv	0,70	0,03	0,30	0,96	0,02	-
rel sdv	1,18	0,86	14,98	1,62	0,45	-	
HSA	1	81,11	3,85	1,94	81,24	3,86	-
	2	82,74	3,88	2,53	82,83	3,91	-
	3	83,94	3,93	2,12	84,04	3,94	-
	Mittelwert	82,60	3,89	2,20	82,70	3,90	-
	sdv	1,42	0,04	0,30	1,40	0,04	-
rel sdv	1,72	1,04	13,77	1,70	1,04	-	

Tab. 18: Plasmaproteinbindung der Mip-Inhibitoren, Vorstufe 4a

Vorstufe 4a							
c = 267 mg/L		Unabhängige Bindestellen					
Messung	Proteinbindung (%)	pK ₁	pK ₂	pK ₃	pK ₄	pK ₅	
BSA	1	74,69	3,30	3,12	2,90	2,70	2,50
	2	71,45	3,20	3,03	2,85	2,68	2,50
	3	70,35	3,22	3,04	2,86	2,69	-
	Mittelwert	72,16	3,24	3,06	2,87	2,69	2,50
	sdv	2,26	0,05	0,05	0,03	0,01	0,00
	rel sdv	3,13	1,63	1,61	0,92	0,37	0,00
Abhängige Bindestellen							
Messung	Proteinbindung (%)	pK ₁	pK ₂	pK ₃	pK ₄	pK ₅	
BSA	1	74,53	3,69	3,29	2,80	2,63	-
	2	73,06	3,66	3,18	2,98	2,49	-
	3	75,21	3,70	3,18	3,00	2,71	2,53
	Mittelwert	74,27	3,68	3,22	2,93	2,61	2,53
	sdv	1,10	0,02	0,06	0,11	0,11	-
	rel sdv	1,48	0,57	1,97	3,76	4,27	-
Unabhängige Bindestellen							
Messung	Proteinbindung (%)	pK ₁	pK ₂	pK ₃	pK ₄	pK ₅	
HSA	1	84,52	3,62	3,43	3,25	2,66	-
	2	84,82	3,75	3,22	3,04	2,85	2,25
	3	84,95	3,67	3,48	3,19	2,37	-
	Mittelwert	84,76	3,68	3,38	3,16	2,63	2,25
	sdv	0,22	0,07	0,14	0,11	0,24	-
	rel sdv	0,26	1,78	4,09	3,42	9,20	-
Abhängige Bindestellen							
Messung	Proteinbindung (%)	pK ₁	pK ₂	pK ₃	pK ₄	pK ₅	
HSA	1	86,85	4,04	3,39	3,11	2,47	-
	2	86,09	4,01	3,36	3,12	2,48	2,31
	3	87,43	4,06	3,38	3,01	2,43	-
	Mittelwert	86,79	4,04	3,38	3,08	2,46	2,31
	sdv	0,67	0,03	0,02	0,06	0,03	-
	rel sdv	0,77	0,62	0,45	1,97	1,08	-

Die Vorstufe **4a** mit der freien Carbonsäuregruppe zeigt entsprechend dieser Annahme durch die zusätzliche saure Struktur die höchste Proteinbindung (siehe Abb. 16). Zusätzlich berechnet sich für die Vorstufe **4a** eine größere Anzahl an Bindestellen am Albumin (siehe Tab. 18 und Abb. 17).

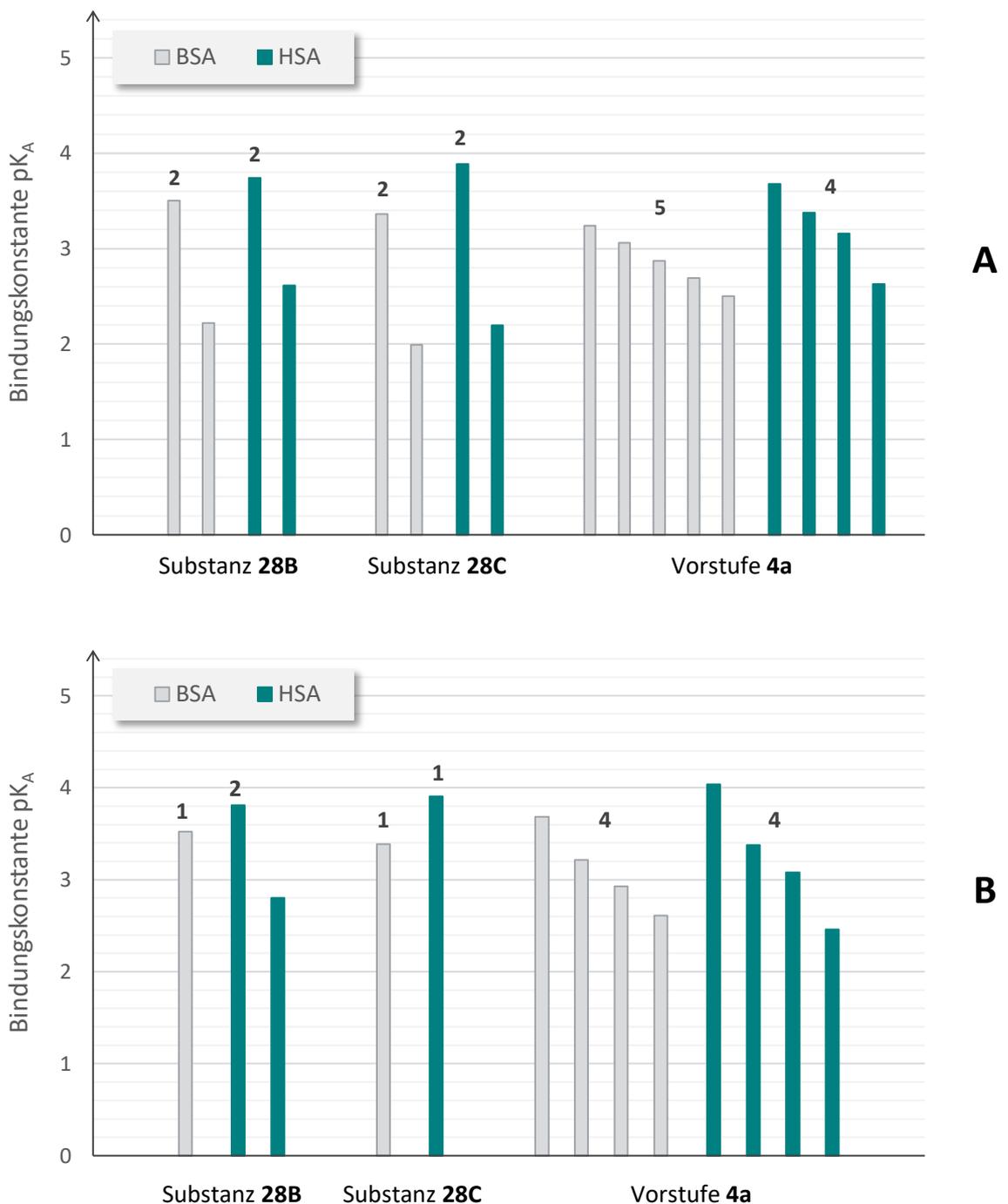


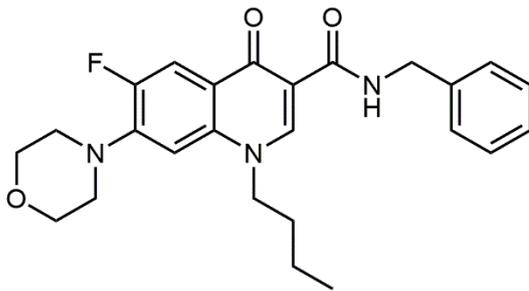
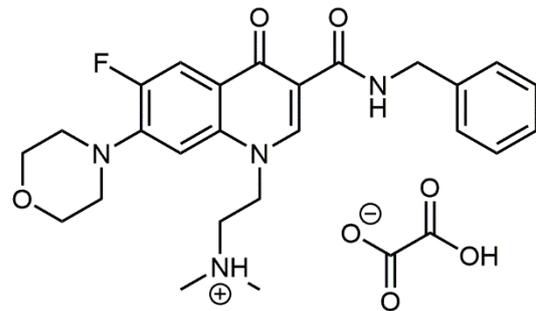
Abb. 17: Bindungskonstanten pK_A der drei Mip-Inhibitoren; für die unabhängige (A) und abhängige Bindung (B); für bovines – (BSA) und humanes Serumalbumin (HSA), die Zahlen stellen die durchschnittliche Anzahl an Bindestellen n auf Albumin dar.

6.2. Proteinbindung der Fluorchinolone

Fluorchinolone stellen eine wichtige Gruppe von Antibiotika dar, die unter anderem bei Infektionen mit *Legionella* eingesetzt werden ^[119]. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Fluorchinolone zusätzlich eine antitrypanosomale Aktivität aufweisen bei gleichzeitig niedriger Toxizität ^[120]. Trypanosomen sind eine Gattung von Erregern, deren verschiedene Vertreter unter anderem verantwortlich sind für die Chagas-Krankheit, die humane Afrikanische Trypanosomiasis und die (viscerale) Leishmaniose, die alle zu den vernachlässigten Tropenkrankheiten (*engl.* neglected tropical diseases) zählen. Diese drei Krankheiten haben die höchsten Todeszahlen unter den vernachlässigten Tropenkrankheiten ^[121] und es gibt nur wenige, vor sehr langer Zeit entwickelte Arzneistoffe, die für die medikamentöse Behandlung zur Verfügung stehen. Diese Arzneistoffe haben oft schwere Nebenwirkungen und es haben sich bereits Resistenzen gegen sie entwickelt ^[122]. Daher ist es wichtig an neuen Antibiotika gegen diese Erkrankungen zu forschen bzw. weiter zu optimieren, um eine bessere Wirksamkeit und geringere Toxizität zu erhalten.

Zur genaueren Analyse der antitrypanosomalen Aktivität wurde eine Substanzbibliothek verschiedener Fluorchinolone synthetisiert, um Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung und Wirksamkeits-Optimierungen durchführen zu können. Diese neu synthetisierten Substanzen wurden *in-vitro* gegen *Trypanosoma brucei brucei* und *Trypanosoma brucei rhodesiense* (den Erregern der humanen Afrikanischen Trypanosomiasis) getestet ^[101-104]. Die vielversprechendsten Vertreter der Substanzbibliothek wurden bereits auf ihre Affinität zu humanem Serumalbumin mittels kontinuierlicher Ultrafiltration hin untersucht ^[90].

6.2.1. GHQ-Substanzen

Substanz **GHQ168** $M_R = 437,5 \text{ g/mol}$ Substanz **GHQ243Ox** $M_R = 542,6 \text{ g/mol}$

Die Plasmaproteinbindung der von *Hiltensperger* synthetisierten Substanzen GHQ168 und GHQ243Ox wurden durch *Hörst* mittels kontinuierlicher Ultrafiltration untersucht.

Die Substanz GHQ168 bereitete durch die hohe Adsorption an die Filtermembran bei der Bestimmung jedoch einige Probleme, wodurch letztendlich nur ein einziger Wert (80,51 % gebunden; unabhängige Bindung an HSA ^[90]) gemessen werden konnte. Bei der von *Hörst* durchgeführten Untersuchung wurden verschiedene organische Lösungsmittel als Pufferzusätze untersucht und letztendlich ein mizellarer Puffer mit Polysorbat-20 entwickelt, der die Löslichkeit der Substanz verbessern sollte. Weiterhin wurden verschiedene Filtermaterialien getestet, um die Adsorption an den Filter zu verringern. Letztendlich war nur die Inkubation der Filtermembran (Polyethersulfon, PES) mit dem Wirkstoff erfolgreich, wenn auch zu substanzintensiv für weitere Messungen ^[90].

6.2.1.1. Kontinuierliche Ultrafiltration

Das Ziel dieser Untersuchung war es, das gemessene Ausmaß der Plasmaproteinbindung von GHQ168 mittels kontinuierlicher bzw. diskontinuierlicher Ultrafiltration zu überprüfen, um das ursprüngliche Messergebnis durch weitere Messungen zu bestätigen.

Erste Vorversuche mittels kontinuierlicher Ultrafiltration mit einer Filtermembran aus regenerierter Cellulose (NMGG 10 kDa) zeigten das bekannte Adsorptionsproblem von GHQ168 an das Filtermaterial (Wirkstofflösung: 4,2 mg/mL GHQ168 in 1 mM Polysorbat-20-Phosphatpuffer, pH 7,44, ohne Protein). In Abb. 18 ist die Ultrafiltrationskurve mit und ohne

Filtermembran (jeweils ohne Proteininjektion) in Verbindung mit einer PMMA-Messzelle (Polymethylmethacrylat) dargestellt.

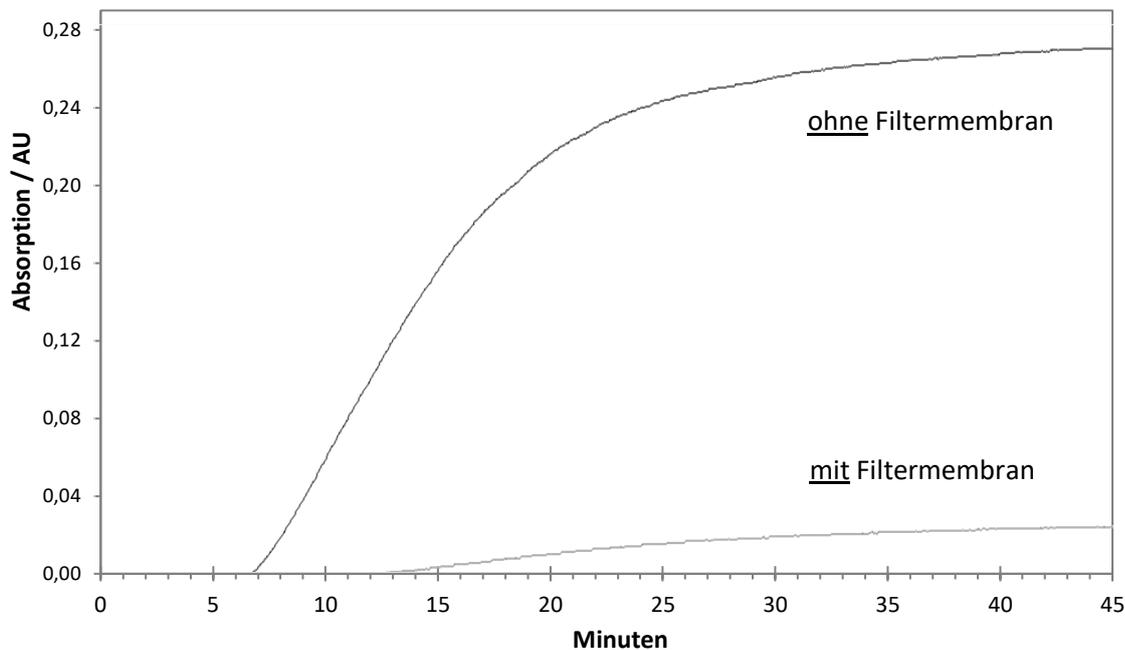


Abb. 18: Ultrafiltrationskurve GHQ168 mit/ohne Filtermembran
 Wirkstofflösung: 4,2 mg/mL GHQ168 in 1 mM Polysorbat-20-Phosphatpuffer, pH 7,44;
 UV-Detektion ($\lambda = 282 \text{ nm}$), Filtermembran aus reg. Cellulose (NMGG 10 kDa), PMMA-Zelle

Die untere Kurve wurde mit der Filtermembran aufgenommen und zeigt, dass nur ca. 10 % der Substanz am Detektor ankommt. Die obere Kurve zeigt die Messung derselben Wirkstofflösung ohne Filtermembran. Bei der Messung ohne Filtermembran erreicht die gewünschte Menge GHQ168 den Detektor und man erhält die benötigte UV-Absorption ($\lambda = 282 \text{ nm}$) von $> 0,2 \text{ AU}$ am Ende der Messung.

Aufgrund der starken Adsorption der Substanz GHQ168 an alle verfügbaren Filtermaterialien war eine Messung mittels kontinuierlicher Ultrafiltration nicht durchführbar. Zudem kristallisierte der schlecht wasserlösliche Wirkstoff nach einiger Zeit im Vorratsgefäß der Wirkstofflösung sichtbar aus. Die starke Adsorption der Substanz an das Filtermaterial bedingt einen langen Messzeitraum. Um der Rekristallisation entgegenzuwirken, müsste die Versuchszeit jedoch drastisch verkürzt werden. Abhilfe bietet hierbei die diskontinuierliche Ultrafiltration, bei der der eigentliche Ultrafiltrationsschritt auf wenige Minuten beschränkt ist.

6.2.1.2. Diskontinuierliche Ultrafiltration

Bei den Ultrafiltrationseinheiten für die diskontinuierliche Ultrafiltration war bis auf regenerierte Cellulose mit verschiedenen NMGG und Volumina kein anderes Filtermaterial verfügbar. Es wurde jedoch gezeigt, dass durch Inkubation von regenerierten Cellulose-Filtern mit bestimmten Substanzen die nicht-spezifische Bindung reduziert werden kann ^[113]. Der Wirkstoffgehalt im Filtrat (ungebundener Wirkstoffanteil) und der der Ausgangslösung (gesamte Wirkstoffmenge) sollte mit folgender HPLC-UV-Methode quantifiziert werden, die bereits für Löslichkeitsversuche entwickelt wurde ^[102].

Methode GHQ168-1:

Säule:	Synergi 4 μ MAX-RP, 80 Å, 4 μ m, 150 x 4,6 mm; Vorsäule MAX-RP
Mobile Phase:	Wasser / Acetonitril (28:72 V/V)
Flussrate:	1,2 mL/min, isokratisch
Temperatur:	40 °C
Injektionsvolumen:	20 μ L
Detektion:	UV; λ = 280 nm
Dauer:	5 Minuten

In ersten Vorversuchen wurde zunächst die Nachweis- und Bestimmungsgrenze, die Linearität und die Wiederfindungsrate analysiert, um die Verwendbarkeit der diskontinuierlichen Ultrafiltration zur Überwindung der bekannten Löslichkeits- und Adsorptionsprobleme hin zu untersuchen. Als Probelösungsmittel wurde dabei derselbe Polysorbat-20-Puffer verwendet, der auch bei den späteren Ultrafiltrationsversuchen verwendet werden sollte. Nach ersten Löslichkeitsversuchen erschien eine Polysorbat-20 Konzentration von 2 mM als erfolgversprechendste Variante. Diese lag demnach höher als bei den Proteinbindungsbestimmungen nach *Hörst* ^[90].

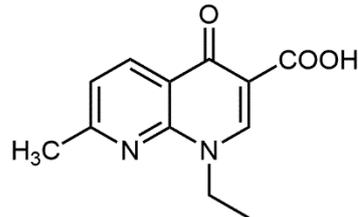
GHQ168 zeigte mit der oben genannten HPLC-Methode eine Retentionszeit von 3,7 Minuten. Die ermittelte Nachweisgrenze lag bei 0,10 μ g/mL, die Bestimmungsgrenze bei 0,30 μ g/mL und die Kalibriergerade (0,5– 75,0 μ g/mL) hatte ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9998$. Bei der Bestimmung der Wiederfindungsrate (2,5 – 50 μ g/mL) zeigte sich wieder das bekannte

Adsorptionsproblem: Im Chromatogramm war bei der typischen Retentionszeit von GHQ168 nach 3,7 Minuten keine Substanz detektierbar. Erst ab einer Konzentration von GHQ168 von $> 33 \mu\text{g/mL}$ in der Probelösung zeigten sich minimale Peaks, deren Fläche jedoch unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Um nachzuweisen, dass der fehlende Wirkstoff durch Adsorption an das Filtermaterial erklärbar ist, wurden die verwendeten Filter weiter untersucht. Nach dem Entfernen der Lösungen des Ultrafiltrationsversuchs, wurden die gebrauchten Filter zweimal mit $1000 \mu\text{L}$ DMSO für 10 Minuten inkubiert und anschließend 20 Minuten filtriert, um den adsorbierten Wirkstoff zu extrahieren. Die beiden Filtrate wurden vereinigt und mittels HPLC-UV auf ihren Wirkstoffgehalt hin untersucht. Dabei zeigte sich eine Wiederfindungsrate von 89 % im DMSO-Filtrat im Vergleich zur ursprünglichen Lösung. Zusätzlich wurde beobachtet, dass bei einer Wirkstoffkonzentration von $50 \mu\text{g/mL}$ mit der Zeit ein Teil des Wirkstoffes im HPLC-Vial sichtbar auskristallisiert.

Es stellt sich die Frage, ob der hohe Verlust an GHQ168 allein auf die starken Wechselwirkungen mit dem Filtermaterial zurückzuführen ist, oder ob ein Teil des Wirkstoffes durch die geringe Löslichkeit während des Versuches auskristallisiert. Durch den Membranfilter, der nur gelöste Moleküle durchlässt, die kleiner als 10 kDa sind, werden die großen Kristalle zurückgehalten.

Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde die Konzentration an Polysorbat-20 auf 5 mM erhöht und die Linearität und Wiederfindungsrate erneut bestimmt. Das Bestimmtheitsmaß der zweiten Kalibriergeraden lag bei $R^2 = 0,9999$, jedoch verbesserte die höhere Polysorbat-20 Konzentration die Wiederfindungsrate nur minimal. Die Wiederfindungsrate im Filtrat lag bei dieser Polysorbat-20-Konzentration im Puffer bei 0,14 %. Die Peakflächen in den Chromatogrammen lagen bei allen Konzentrationen über der Nachweisgrenze, jedoch waren erst Konzentrationen $> 33 \mu\text{g/mL}$ quantifizierbar. Zusätzlich wurde auch untersucht, ob durch die 30-minütige Inkubation der Proben bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ vor der Ultrafiltration bereits ein Teil des Wirkstoffes verloren ging bzw. zersetzt wurde. Bei der Untersuchung der inkubierten Proben, stellte sich jedoch heraus, dass auch nach der Inkubation noch 98,5 % des Wirkstoffes in der Probe vorhanden war. Der Verlust des Wirkstoffes lag demnach ausschließlich an der Adsorption von GHQ168 an die Filtermembran.

Bei den nächsten Versuchsschritten wurde mit einem internen Standard gearbeitet. Als interner Standard wurde Nalidixinsäure ausgewählt – die Ausgangssubstanz der Fluorchinolone ^[4].



Nalidixinsäure
(Interner Standard)

1-Ethyl-7-methyl-1,4-dihydro-4-oxo-1,8-naphthyridin-3-carbonsäure

$M_R = 232,2 \text{ g/mol}$

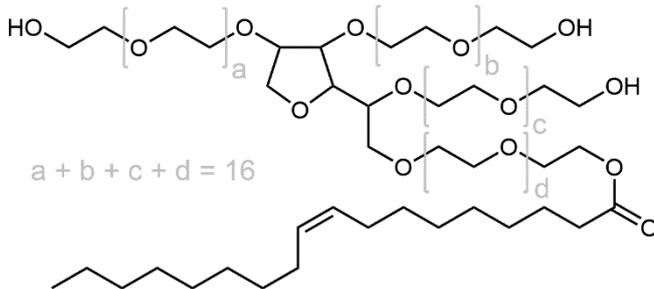
Dazu musste die HPLC-UV-Methode angepasst werden. Die HPLC-Methode zur Bestimmung der Stabilität im Plasma ^[102] wurde vereinfacht und optimiert. Da in den Proben nur der Wirkstoff GHQ168 und der interne Standard Nalidixinsäure (20 µg/mL) vorhanden sind und nicht nach Abbauprodukten gesucht wird, ist eine isokratische Methode ausreichend. Außerdem wurde eine andere Wellenlänge gewählt, um Nalidixinsäure besser detektieren zu können. Letztendlich wurde folgende optimierte Methode verwendet:

Methode GHQ168-2:

Säule:	Synergi 4µ MAX-RP, 80 Å, 4 µm, 150 x 4,6 mm; Vorsäule MAX-RP
Mobile Phase:	10 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH = 4) / ACN = (40:60 V/V)
Flussrate:	0,8 mL/min, isokratisch
Temperatur:	40 °C
Injektionsvolumen:	20 µL
Detektion:	UV; $\lambda = 270 \text{ nm}$
Dauer:	10 Minuten
Interner Standard:	Nalidixinsäure (20 µg/mL)
Probenaufarbeitung:	50 µL Probe + 300 µL Acetonitril → 250 µL Überstand + 750 µL Methanol/H ₂ O (1:1 V/V)

Mit dieser neuen Methode (GHQ168-2) zeigte GHQ168 eine Retentionszeit von 8,4 Minuten, Nalidixinsäure hatte eine Retentionszeit von 3,5 Minuten. Zusätzlich wurde die Aufarbeitung der Proben bzw. das Probenlösungsmittel verändert, um den Löslichkeitsproblemen und der Rekristallisation im HPLC-Vial entgegenzuwirken. Die Probelösung – Filtrat oder Ausgangslösung – wurde zunächst mit Acetonitril versetzt. Dadurch denaturieren eventuell vorhandenen Plasmaproteine und nach Zentrifugation lässt sich im Überstand der freie Wirkstoff bestimmen. Für die Injektionslösung wurde der Überstand mit Methanol / Wasser (1:1 V/V) versetzt und injiziert.

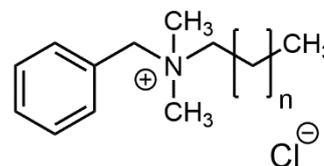
Auch mit der neuen Methode zeigte die Kalibriergerade eine gute Linearität ($R^2 = 0,9893$). Bei der Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde zusätzlich versucht die nicht-spezifische Bindung der Wirkstoffe an das Filtermaterial zu reduzieren. Laut Literatur kann durch Inkubation der Filtermembran mit bestimmten Substanzen vor der Zugabe der Probelösung die nicht-spezifische Bindung reduziert werden. Für neutrale oder saure Verbindungen – wie es bei GHQ168 und Nalidixinsäure der Fall ist – inkubiert man den Filter mit einer 5%igen Polysorbat-80-Lösung für 5 Minuten. Bei basischen Verbindungen verwendet man eine 5%ige Benzalkoniumchlorid-Lösung ^[113].



Polysorbat-80

Polyoxyethylensorbitan-monooleat
Tween® 80

$M_R = 1309,7 \text{ g/mol}$



Benzalkoniumchlorid

N-Alkyl-*N*-benzyl-*N,N*-
dimethylammoniumchlorid

Durch die Inkubation mit Polysorbat-80 konnte die Adsorption von GHQ168 an das Filtermaterial jedoch nicht verringert werden. Erneut konnte in Proben mit und ohne Polysorbat-80-Inkubation kein GHQ168 detektiert werden. Der interne Standard Nalidixinsäure wurde im Filtrat mit einer Wiederfindungsrate von 89 % detektiert. Die

Inkubation mit Polysorbat-80 hatte auch bei Nalidixinsäure keinerlei Einfluss auf die wiedergefundene Konzentration im Filtrat. Da kein anderes Filtermaterial für die diskontinuierliche Ultrafiltration verfügbar war, konnte von GHQ168 keine Plasmaproteinbindung bestimmt werden.

Neben GHQ168 sollte auch die Plasmaproteinbindung von GHQ243Ox mittels diskontinuierlicher Ultrafiltration bestimmt werden. Bei GHQ243Ox sollte dadurch die im Vorfeld gemessene Plasmaproteinbindung von 45,93 % bzw. 44,02 % (unabhängige bzw. abhängige Bindung, humanes Serumalbumin) ^[90] bestätigt werden.

Die HPLC-UV Methode - inklusive der Probenaufarbeitung zur Quantifizierung der Wirkstoffe nach der Ultrafiltration - entspricht weitestgehend der Methode GHQ168-2. Die mobile Phase und die Fließgeschwindigkeit wurden nur geringfügig angepasst, um eine gute Trennung bei gleichzeitig kurzer Analysendauer zu gewährleisten.

Methode GHQ243Ox:

Säule:	Synergi 4 μ MAX-RP, 80 Å, 4 μ m, 150 x 4,6 mm; Vorsäule MAX-RP
Mobile Phase:	10 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH = 4)/ ACN = (20:80 V/V)
Flussrate:	0,4 mL/min, isokratisch
Temperatur:	40 °C
Injektionsvolumen:	20 μ L
Detektion:	UV; λ = 270 nm
Dauer:	10 Minuten
Interner Standard:	Nalidixinsäure (20 μ g/mL)
Probenaufarbeitung:	50 μ L Probe + 300 μ L ACN → 250 μ L Überstand + 750 μ L MeOH/H ₂ O (1:1 V/V)

Auch für GHQ243Ox war eine isokratische Methode vollkommen ausreichend mit Retentionszeiten von 5,3 Minuten für den internen Standard und 6,2 Minuten für GHQ243Ox. Zunächst wurden wieder Nachweis- und Bestimmungsgrenze, sowie Linearität und Wiederfindungsrate bestimmt. Nachweisbar ist GHQ243Ox mit dieser Methode ab einer Konzentration von 0,4 μ g/mL, quantifizierbar ab 1,1 μ g/mL.

Die Kalibriergerade (1 – 50 µg/mL) hatte ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9847$. Die Wiederfindungsrate von GHQ243Ox lag in diesem Bereich bei 10,34 %. Dies zeigt, dass GHQ243Ox weniger an den Filter adsorbiert wie GHQ168. Der Verlust von 90 % der Wirkstoffkonzentration ist jedoch immer noch zu hoch, um aussagekräftige Untersuchungen zur Proteinbindung mit diesem Versuchsaufbau durchführen zu können.

GHQ243Ox unterscheidet sich von GHQ168 durch ein zusätzliches tertiäres Amin in der Butyl-Seitenkette. Im Gegensatz zu GHQ168 – für das sich kein pK_s -Wert im Bereich von $pH = 2 - 12$ bestimmen lässt – hat GHQ243Ox durch das tertiären Amin eine basische Gruppe im Molekül für die ein pK_s -Wert von 6,86 potentiometrisch bestimmt wurde ^[102].

Zur Verbesserung der Wiederfindungsrate wurde auch für GHQ243Ox versucht die nicht-spezifische Bindung der Substanz an die Filtermembran zu verringern. Im Fall von GHQ243Ox wurde der Filter für kurze Zeit mit einer 5%igen Benzalkoniumchlorid-Lösung statt einer Polysorbat-80-Lösung inkubiert, da GHQ243Ox bei $pH = 7,4$ teilweise protoniert und damit positiv geladenen vorliegt. In der Theorie soll das positiv geladene Benzalkoniumchlorid mit den freien Säuregruppen der Cellulose, die im Zuge der Herstellung entstehen, in Wechselwirkung treten und so die Interaktion der positiv geladenen Wirkstoffe mit dem Filtermaterial verhindern ^[113].

Die Fluorchinolon-Konzentration in den Probelösungen zur Bestimmung der Wiederfindungsrate lag hierfür deutlich höher (40 – 110 µg/mL; $R^2 = 0,9914$), damit auch bei starker Bindung an das Filtermaterial die Fläche des Substanzpeaks im Chromatogramm oberhalb des Bestimmungsgrenze liegt.

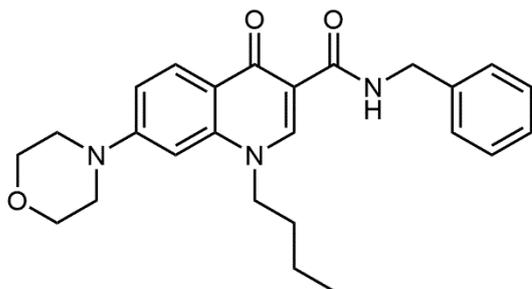
Bei den unbehandelten Filtern konnte die Substanz im Bereich von 80 – 110 µg/mL detektiert werden; die Wiederfindungsrate liegt hier bei 53,58 %. Damit ist die in diesem Versuchsaufbau gemessene Wiederfindungsrate höher als die zu anfangs bestimmte Wiederfindungsrate im niedrigeren Konzentrationsbereich (1 – 50 µg/mL). Dies lässt sich auf eine Sättigung des Filtermaterials mit dem Wirkstoff zurückführen, die schon bei der Plasmaproteinbindungs-Bestimmung von GHQ168 mittels kontinuierlicher Ultrafiltration ausgenutzt wurde ^[90]. Leider ist dieser Sättigungseffekt sehr substanzintensiv und nur schwer reproduzierbar. Der gebundene Wirkstoff kann sich außerdem während der Messung unkontrolliert wieder vom Filter lösen, wodurch die ermittelten Werte für die Protein-Wirkstoff-Wechselwirkung verfälscht werden ^[113].

Die Wiederfindungsrate bei den mit Benzalkoniumchlorid behandelten Filtern lag mit nur 33,43 % sogar noch niedriger als die der unbehandelten Filter. Damit scheint die nicht-spezifische Bindung durch die Behandlung mit Benzalkoniumchlorid sogar eher verstärkt zu werden statt sich zu verringern.

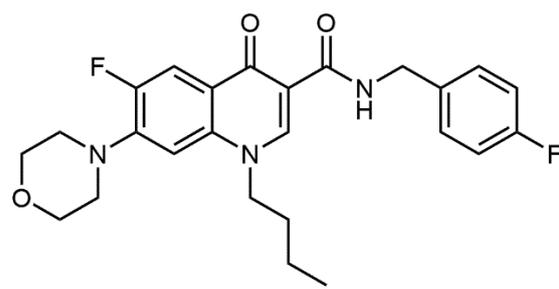
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch für GHQ2430x mithilfe der diskontinuierlichen Ultrafiltration die Plasmaproteinbindung nicht zuverlässig bestimmt werden kann. Selbst bei einer Wiederfindungsrate von 50 % sind die Verluste immer noch zu hoch, um zu einem aussagekräftigen Wert zu kommen, gerade auch weil dazu ein Konzentrationsbereich verwendet werden muss, bei dem der Wirkstoff im mehrfachen Überschuss zum Protein vorliegt. In diesem Fall sind höchstwahrscheinlich alle Bindestellen auf dem Albumin gesättigt, der freie Wirkstoffanteil ist dadurch zu hoch und die so bestimmte Plasmaproteinbindung ist zu niedrig. Wenn man in einem niedrigeren Konzentrationsbereich einen Verlust von 90 % des Wirkstoffes allein durch die nicht-spezifische Bindung an das Filtermaterial hat und von den übrigen 10 % Wirkstoff nun auch noch zusätzlich ein Teil an das Albumin bindet, ist es möglich, dass die restliche freie Wirkstoffkonzentration unterhalb der Bestimmungsgrenze liegt.

6.2.2. MB-Substanzen

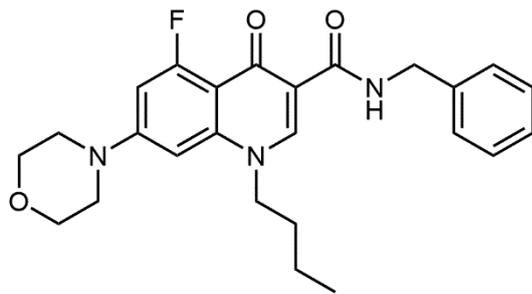
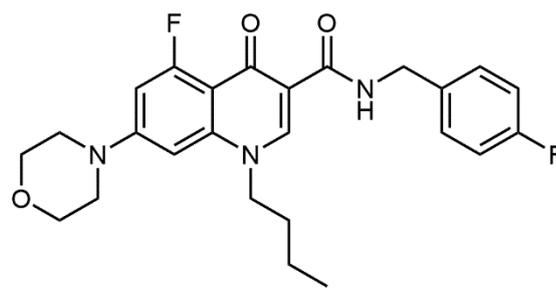
Ausgehend von GHQ168 wurden im Arbeitskreis Holzgrabe weitere Fluorchinolone entwickelt und synthetisiert, die sich in der Anzahl und Position der gebundenen Fluoratome unterscheiden ^[103,104]. Im Zuge der Charakterisierung dieser neuen Wirkstoffe sollte auch das Ausmaß der Plasmaproteinbindung mittels kontinuierlicher Ultrafiltration bestimmt werden.



Substanz **MB161**
M_R = 419,5 g/mol



Substanz **MB209**
M_R = 455,5 g/mol

Substanz **MB343** $M_R = 437,5 \text{ g/mol}$ Substanz **MB444** $M_R = 455,5 \text{ g/mol}$

Alle vier Substanzen zeigten die gleiche Schwierigkeit, die bereits bei GHQ168 und GHQ243Ox beobachtet wurde. Auch diese vier Wirkstoffe zeichnen sich durch eine starke nicht-spezifische Bindung an das Filtermaterial der Membranfilter aus. So erhält man beispielsweise für MB343 Messkurven mit einem Absorptionsmaximum von 34 mAU in der Plateauphase am Ende der Messung. Bei der verwendeten Konzentration von 4 $\mu\text{g/mL}$ sollte jedoch laut vorher bestimmtem Absorptionskoeffizient eine UV-Absorption von ca. 670 mAU erreicht werden. Dadurch ergibt sich eine Wiederfindungsrate von 5 %. Ein weiterer Punkt, weshalb eine Bestimmung mittels kontinuierlicher Ultrafiltration nicht möglich ist, ist die sehr schlechte Löslichkeit der Substanzen in 1 mM Polysorbat-20-Puffer – der höchsten Konzentration, die in der kontinuierlichen Ultrafiltration aufgrund des resultierenden Drucks eingesetzt werden kann ^[90]. Auch bei einer anfänglich klaren Lösung der Substanzen bilden sich im Laufe der Messung deutliche Kristalle bzw. Flocken im Vorratsgefäß mit der Wirkstofflösung. Diese werden in der Messzelle durch den Pumpendruck gegen die Filtermembran gedrückt und schlagen sich dort nieder. Der ausgefallene Wirkstoff führt zur Bildung eines Filterkuchens, der die feinen Poren des Membranfilters verstopft – ein Nachteil der Oberflächenfiltration ^[123]. Dieser Filterkuchen verursacht einen starken Druckanstieg in der Anlage von bis zu 2000 kPa (20 bar). Dadurch wird der Filter stark beschädigt; die Poren werden vergrößert und es entstehen mikroskopisch kleine Risse im Filtermaterial. Da sich die Konzentration des Lösungsvermittlers nicht weiter erhöhen lässt, wäre nur eine schnellere Messung zielführend, um dem langsamen Ausfällen des Wirkstoffes zuvorzukommen. Eine Verkürzung der Messzeit ist bei der kontinuierlichen Ultrafiltration jedoch nicht möglich, da die komplette Messung selbst unter den besten Bedingungen – bei niedriger nicht-spezifischer Bindung und geringer Affinität zu Albumin – mindestens zwei bis drei

Stunden in Anspruch nimmt. Bei einem hohen Ausmaß der Plasmaproteinbindung kann die Messung aber auch bis zu sechs Stunden dauern. Das sichtbare Ausfallen der MB-Wirkstoffe tritt bereits innerhalb der ersten halben Stunde der Messung auf. Daher ist die Bestimmung der Plasmaproteinbindung von MB161, MB209, MB343 und MB444 mittels kontinuierlicher Ultrafiltration nicht möglich.

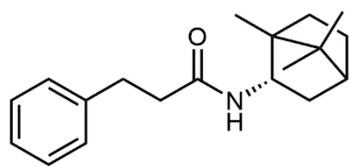
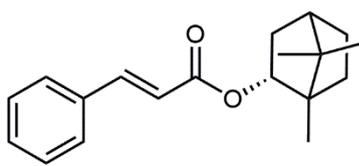
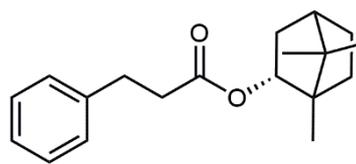
6.3. Proteinbindung der Zimtsäurederivate

Neben der humanen Afrikanischen Schlafkrankheit zählen auch Leishmaniose und Schistosomatose (Bilharziose) zu den vernachlässigten Tropenkrankheiten.

Die Behandlung der Leishmaniose hängt stark von der Form der Erkrankung und der geographischen Region ab. Wie bei vielen der vernachlässigten Tropenkrankheiten sind zur Behandlung der Leishmaniose immer noch sehr toxische Wirkstoffe wie fünfwertige Antimon-Verbindungen im Einsatz ^[124]. Auch bei der Leishmaniose braucht man daher dringend neuere, sicherere und wirksame Medikamente mit einfacher peroraler Anwendung.

Zur Therapie der Schistosomatose steht seit über 25 Jahren nur ein Wirkstoff zur Verfügung: Praziquantel. Praziquantel ist ein Antihelminthikum, das sicher und mit Heilungsraten von bis zu 100 % sehr wirksam ist. Nicht zuletzt deshalb wird es in den betroffenen Gebieten seit einiger Zeit zur medikamentösen Massenbehandlung eingesetzt, unabhängig davon, ob die betroffene Person infiziert ist oder nicht. Das große Risiko bei diesem Vorgehen und nur einer wirksamen Behandlungsmöglichkeit stellt die große Gefahr der Resistenzentwicklung dar ^[125,126].

Bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe geht man gerne von Naturstoffen aus, die in Bezug auf ihre Wirksamkeit und Toxizität hin optimiert werden. Im Arbeitskreis Holzgrabe wurde ein Chloroform-Extrakt aus dem Wurzelstock einer Baldrianart (*Valeriana wallichii*) auf Komponenten hin untersucht, die eine Aktivität gegen Leishmanien oder Schistosoma zeigen. Ausgehend von den wirksamen Bestandteilen wurde eine Substanzbibliothek entwickelt und synthetisiert ^[105-107]. Die vielversprechendsten Substanzen wurden bezüglich ihrer Bindung an Plasmaproteine charakterisiert.

Substanz **JGBEN51** $M_R = 285,4 \text{ g/mol}$ Substanz **JGBEO01** $M_R = 284,4 \text{ g/mol}$ Substanz **JGBEO44** $M_R = 286,4 \text{ g/mol}$

Wie schon bei den Fluorchinolonen ist die Löslichkeit der Zimtsäure-Derivate ausschlaggebend für die Durchführbarkeit der Messung mittels kontinuierlicher Ultrafiltration. Alle drei Substanzen zeigen eine gute Löslichkeit in Dimethylsulfoxid, jedoch eine schlechte Löslichkeit in Phosphatpuffer. Das UV-Maximum der drei Substanzen liegt bei 234 nm für JGBEN51 und JGBEO44 bzw. bei 280 nm für JGBEO01. Aufgrund ihrer geringen UV-Absorption müssen zur Messung von JGBEN51 und JGBEO44 hohe Konzentrationen von mindestens 150 µg/mL eingesetzt werden. Bei JGBEO01 ist hingegen – aufgrund des größeren Chromophors – eine Konzentration von 10 µg/mL ausreichend.

Wegen der guten Löslichkeit der Substanzen in DMSO wäre der Zusatz von 10 % DMSO zum Phosphatpuffer sinnvoll. Mit einer Grenzwellenlänge von 268 nm^[127] ist jedoch die Eigenabsorption von DMSO bei Wellenlängen unterhalb von 268 nm zu hoch. Dadurch würde aufgrund eines zu hohen Grundrauschens das Lösungsmittel selbst die Messung verfälschen. Deshalb wurde der Einsatz anderer organischer Lösungsmittel untersucht, die eine niedrigere Grenzwellenlänge als DMSO haben. Die Löslichkeit in Methanol – mit einer Grenzwellenlänge von 205 nm^[127] – ist jedoch bei allen drei Substanzen nicht ausreichend. Die Löslichkeit in Acetonitril – die Grenzwellenlänge liegt bei 190 nm^[127] – ist besser als in Methanol, jedoch immer noch nicht hoch genug in der maximal einsetzbaren Acetonitrilkonzentration.

Organische Lösungsmittel sind zur Bestimmung des Ausmaßes der Plasmaproteinbindung nur bis zu einer gewissen Konzentration als Pufferzusatz einsetzbar. Neben hohen Temperaturen und Salzkonzentrationen führen organische Lösungsmittel ab einer bestimmten Konzentration zur Denaturierung von Proteinen^[108,128]. Die Proteinfällung der verschiedenen Lösungsmittel wurde untersucht, indem bovines Serumalbumin mit Puffergemischen versetzt wurde, die unterschiedliche Konzentrationen an organischem Lösungsmittel enthielten. Für DMSO, Methanol und Acetonitril konnte bei einem Zusatz von

10 – 30 % keine sichtbare Proteinfällung von BSA beobachtet werden. Bei höheren Konzentrationen kommt es zu einer sichtbaren Fällung des Albumins und einer Trübung der Proteinlösung.

Letztendlich waren alle drei Substanzen in 30 % DMSO bzw. 30 % ACN nur teilweise löslich. Neben der Inkompatibilität mit Proteinen ist die chemische Beständigkeit der Kunststoffe gegenüber organischen Lösungsmitteln nicht immer gewährleistet. Die standardmäßig verwendete Messzelle aus Polymethylmethacrylat (PMMA) ist unbeständig gegenüber höheren Konzentrationen an Acetonitril und Methanol, nur Polyvinylidenfluorid (PVDF) zeigt eine chemische Beständigkeit gegenüber diesen Lösungsmitteln ^[129].

Für schlechtlösliche Substanzen wurde, wie bereits erwähnt, von *Hörst* eine mizellare Methode entwickelt, bei der durch Zusatz von Polysorbat-20 (max. 1 mM) zum Phosphatpuffer die Löslichkeit der Substanzen verbessert werden kann ^[90].

JGBEN51 und JGBEO44 sind auch bei dem maximal einsetzbaren Pufferzusatz von 1 mM Polysorbat-20 nicht ausreichend löslich. JGBEO01 ist im 1 mM Polysorbat-20-Puffer löslich und konnte daher mit folgenden Materialien vermessen werden:

Verwendete Messzellen: PMMA, PVDF

Verwendetes Filtermaterial: reg. Cellulose, Polyethersulfon

Wie schon bei den Fluorchinolonen, so zeigt auch JGBEO01 bei allen verwendeten Materialien eine starke Adsorption an die Messzelle und das verwendete Filtermaterial. Zudem fällt auch das Zimtsäure-Derivat nach einiger Zeit im Vorratsgefäß der Wirkstofflösung wieder aus.

Wegen der sehr schlechten Löslichkeit im wässrigen System und die starke Adsorption an die Materialien der Anlage, ist auch die Bestimmung des Ausmaßes der Plasmaproteinbindung für JGBEN51, JGBEO44 und JGBEO01 mittels kontinuierlicher Ultrafiltration nicht möglich.

KONTINUIERLICHE ULTRAFILTRATION

7.1. *Ephedra*-Alkaloide

Die aus dem Ephedrakraut (*Ephedra herba*) stammenden Alkaloide werden seit langer Zeit erfolgreich bei der Therapie verschiedener Krankheiten eingesetzt und sind heutzutage immer noch in apothekenpflichtigen Präparaten gegen Erkältungskrankheiten und Heuschnupfen enthalten ^[60]. Im stationären Bereich wird Ephedrin genau wie Phenylephrin als Notfallmedikation bei Hypotension während Hüftoperationen und Kaiserschnitten eingesetzt ^[56,58]. Trotz der langjährigen Erfahrung mit diesen Substanzen in der Arzneimitteltherapie und der Veröffentlichung der chemischen Eigenschaften von Ephedrin in den 1920ern durch *Chen und Kao* ^[130], gibt es kaum Angaben zu der Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide in der Literatur ^[53]. Fünf wissenschaftliche Publikationen zu Ephedrin bzw. Pseudoephedrin beschreiben deren Bindung an humanes bzw. bovines Serumalbumin ^[131-135]. Jede dieser fünf Publikationen verwendet eine andere Analysenmethode, wodurch ein direkter Vergleich nur bedingt möglich ist (siehe Tab. 19), nicht zuletzt auch weil die erhaltenen Ergebnisse stark variieren.

Tab. 19: Affinität der Phenylethylamine gegenüber Albumin oder humanem Plasma in der Literatur ^[131-135]

	Till und Benet, 1979	Guo <i>et al.</i> , 2003	Ye <i>et al.</i> , 2007	Yang <i>et al.</i> , 2011	Huang <i>et al.</i> , 2011
Alkaloid	<i>rac</i> -Pseudoeph.	<i>rac</i> -Ephedrin	(-)-Ephedrin, (+)-Pseudoeph. (-)-Norephedrin (+)-Norpseudo.	<i>rac</i> Ephedrin.	<i>rac</i> -Ephedrin (E) <i>rac</i> -Pseudo. (P)
Plasma- protein	Humanes Plasma	BSA	BSA	BSA	HSA
Methode	Ultrazentri- fugation	Kapillarelektro- phorese (partial filling technique)	Kapillarelektro- phorese (BSA als chiraler Selektor)	Mikrodialyse; Kapillarelektro- phorese	UV-/ Fluoreszenz- spektroskopie
Anzahl Bindestellen	-	-	-	8,52	-
PPB	20,6 %	95,3 %	-	90,3 %	93,8 % (E) 92,4 % (P)

Außerdem wurden alle fünf Experimente unter verschiedenen, nicht physiologischen Bedingungen durchgeführt, was den Bezug der Ergebnisse auf die Plasmaproteinbindung im menschlichen Körper erschwert.

Die Ergebnisse von Yang *et al.*, Guo *et al.* und Huang *et al.* aus Tab. 19 weisen auf eine hohe Bindungsaffinität gegenüber Albumin hin. Diese Bindungsaffinitäten sind vergleichbar mit der Plasmaproteinbindung von Warfarin oder den Nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID)^[136]. Die Erkenntnisse widersprechen jedoch dem erfolgreichen Einsatz von Ephedrin in der Notfallmedizin. Bei der Behandlung eines zu niedrigen Blutdrucks während einer Operation ist ein schneller Wirkeintritt und eine kurze Wirkdauer essentiell, um den Patienten nicht zu gefährden und die Wirkung des verabreichten Arzneistoffes gut kontrollieren zu können^[137]. Die Wirkung einer Substanz mit hohem Plasmaproteinbindungsvermögen tritt jedoch meist nur langsam ein, hält dafür aber auch deutlich länger an. In der Notfallmedizin werden daher vielfach Stoffe mit einem niedrigen bis mittleren Ausmaß an Plasmaproteinbindung und einer kurzen Plasmahalbwertszeit $t_{1/2}$ wie Adrenalin ($t_{1/2}$ 1 – 3 Minuten), Atropin (2 – 40 % PPB, $t_{1/2}$ 2 Stunden), Dopamin ($t_{1/2}$ 5 – 10 Minuten), Morphin (20 - 35 % PPB, $t_{1/2}$ 2,5 Stunden) oder Lidocain (60 % PPB, $t_{1/2}$ 1,5 – 2 Stunden) verwendet^[138,139]. Letztendlich passen einzig die Ergebnisse von Till und Benet^[131] mit einem geringen Ausmaß an Plasmaproteinbindung zu diesem Anwendungsgebiet von Ephedrin. Da der Artikel jedoch den Hauptaugenmerk auf die renale Ausscheidung von Pseudoephedrin in Ratten legt, geht aus dieser Veröffentlichung nicht hervor, wie das Ergebnis genau bestimmt wurde.

Laut Literatur hat Ephedrin eine Plasmahalbwertszeit $t_{1/2}$ von drei bis sechs Stunden, wobei die Wirkung bei peroraler Gabe mit einem First-Pass-Effekt von 88 % nach 30 – 60 Minuten einsetzt. Pseudoephedrin erreicht die maximale Plasmakonzentration c_{max} nach zwei Stunden und weist eine Plasmahalbwertszeit $t_{1/2}$ von ca. 5,5 Stunden auf^[139].

Ein Ziel dieser Untersuchungen war es, das Ausmaß der Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide mit verschiedenen Methoden zu bestimmen und damit die in der Literatur veröffentlichten, sehr widersprüchlichen Ergebnisse zu überprüfen. Wie man auch anhand der in Tab. 19 dargestellten Ergebnisse sieht, kann unter anderem die Methode und die verwendeten Messbedingungen Einfluss auf die experimentell bestimmte Bindungskapazität der Plasmaproteine haben. Um daher aussagekräftige Ergebnisse zum Ausmaß der

Plasmaproteinbindung im menschlichen Körper zu erhalten, wurden die Bedingungen für die *In-vitro*-Versuche so gewählt, dass diese möglichst nah an die physiologischen Voraussetzungen im Blut herankommen.

7.1.1. Vorversuche

Die Affinität der einzelnen Ephedrin-Stereoisomere gegenüber bovinem Serumalbumin wurde bereits in einer vorhergehenden Arbeit von Hörst untersucht ^[90]. Diese Ergebnisse sind in Tab. 20 und Abb. 19 dargestellt. Bei dieser Messung wurde ausschließlich bovines Serumalbumin verwendet; die Messwellenlänge zur Detektion des freien Arzneistoffanteils lag bei 256 nm. Die *Ephedra*-Alkaloide wurden jeweils in einer Konzentration von 400 mg/L eingesetzt ^[90].

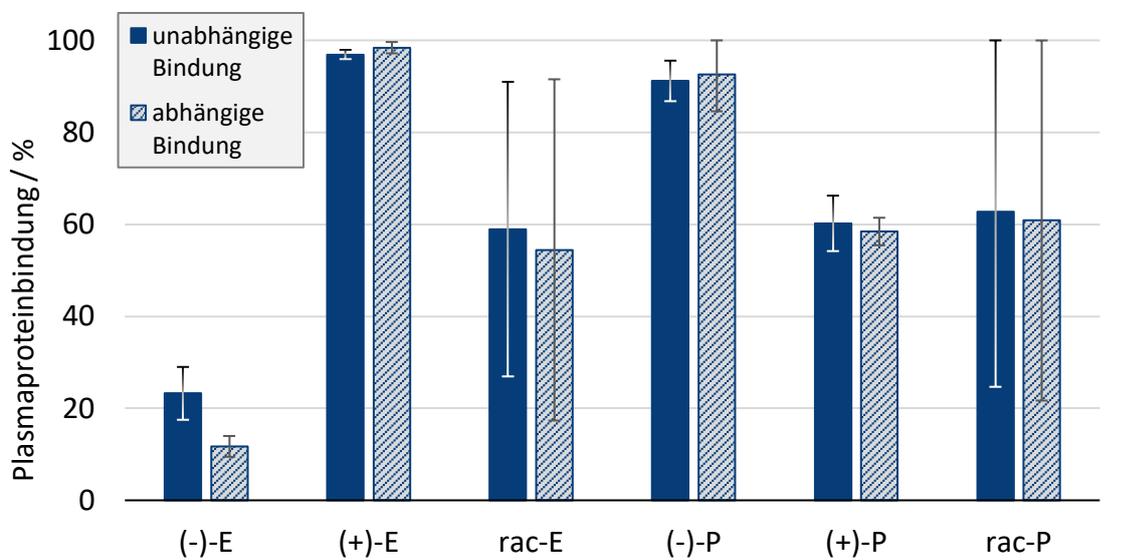


Abb. 19: Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide nach Hörst ^[90];
 (-)-E (-)-Ephedrin, (+)-E (+)-Ephedrin, **rac-E** *rac*-Ephedrin, (-)-P (-)-Pseudoephedrin,
 (+)-P (+)-Pseudoephedrin, **rac-P** *rac*-Pseudoephedrin

Die Einzelwerte der von Hörst bestimmten Plasmaproteinbindung der Racemate weisen eine auffallend hohe Streuung auf (siehe Abb. 19). Beim racemischen Ephedrin streuen die Werte für die abhängige Plasmaproteinbindung beispielsweise zwischen 12,09 % und 99,98 % ^[90]. Außerdem stimmen die gemessenen Werte nicht mit den für die Therapie unabdingbaren pharmakokinetischen Eigenschaften der Substanzen im Körper überein. Der schnelle Wirkeintritt und die kurze Wirkdauer von Ephedrin ist bei der intravenösen Gabe für die gute

Steuerbarkeit der Therapie ausschlaggebend und lässt daher, wie oben erwähnt, eher auf eine niedrige Affinität zu den Plasmaproteinen schließen.

Tab. 20: Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide, CUF-Ergebnisse nach Hörst^[90]

<i>Ephedra</i> -Alkaloide	Unabhängige Bindung		Abhängige Bindung	
	pK _A	PPB / %	pK _A	PPB / %
(-)-Ephedrin	2,59	23,26 ± 5,74	2,34; 2,19	11,72 ± 2,26
(+)-Ephedrin	4,67; 3,47; 2,97	96,93 ± 1,00	5,11; 3,10; 2,91	98,41 ± 1,23
<i>rac</i> -Ephedrin	3,67; 3,10; 2,38	58,96 ± 32,02	3,71; 2,61; 2,39	54,44 ± 37,09
(-)-Pseudoephedrin	4,18; 3,33; 2,79	91,18 ± 4,40	4,64; 3,12; 2,94	92,59 ± 8,01
(+)-Pseudoephedrin	3,31; 2,57; 2,13	60,21 ± 6,03	3,37; 2,55; 1,95	58,44 ± 2,99
<i>rac</i> -Pseudoephedrin	3,58; 2,16	62,76 ± 38,08	3,50; 2,34; 2,26	60,84 ± 39,15

pK_A Affinitätskonstante, PPB / % Plasmaproteinbindung

Die Aussagekraft dieser Ergebnisse ist daher als fragwürdig anzusehen, was auch schon von Hörst thematisiert wurde^[90]. Aus diesem Grund wurde die Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide im Rahmen dieser Doktorarbeit weiter untersucht.

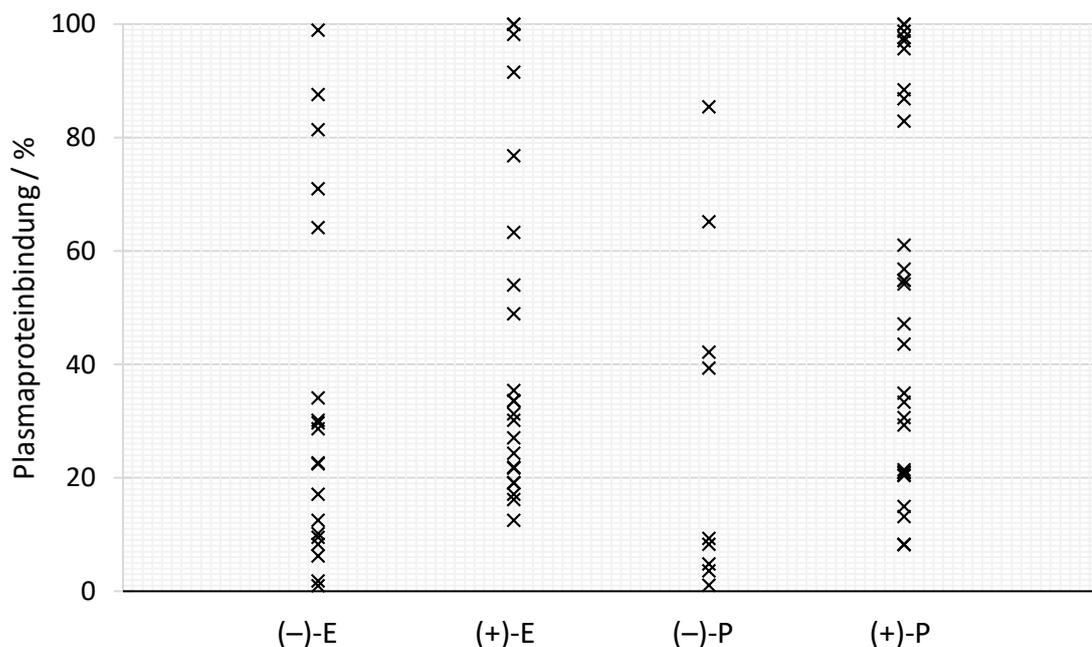


Abb. 20: Streuung der Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide bei den Vorabmessungen an der Original-Anlage nach Heinze^[87]; unabhängige Bindungstellen; BSA; 400 mg/L (-)-E (-)-Ephedrin, (+)-E (+)-Ephedrin, (-)-P (-)-Pseudoephedrin, (+)-P (+)-Pseudoephedrin

Die ersten Vorabmessungen zeigten, dass der Aufbau der Anlage nach *Heinze* [87] immer wieder zu Unregelmäßigkeiten während der Messung und zu schwankenden Ergebnissen führte (siehe Abb. 20). Die größte Herausforderung bei der Messung waren die immer wiederkehrenden Luftblasen durch die Undichtigkeiten der Anlage.

Nach der Optimierung der Anlage (siehe Kap. B.1.1) wurden die Messungen analog zu den Vorabmessungen wiederholt. Diese Vergleichsmessungen wurden erneut unter denselben Bedingungen und unter Verwendung von bovinem Serumalbumin durchgeführt wie die Messung von *Hörst*. Der einzige Unterschied zu den Messungen von *Hörst* war die Durchführung der Analysen an der optimierten Anlage. Die eingesetzte Konzentration der einzelnen *Ephedra*-Alkaloide wurde minimal angepasst, da für die Messung unterschiedliche Salze bzw. die freien Basen der Ephedrin-Stereoisomere eingesetzt werden. Daher wurden jeweils Lösungen mit einer molaren Konzentration von 2 mM für die Vergleichsmessung hergestellt und verwendet. Beim Ephedrin-Hemihydrat und den Pseudoephedrinen wurde zur Verbesserung der Löslichkeit statt Millipore®-Wasser 0,1 M HCl zur Herstellung der Stammlösung verwendet. Aufgrund der etwas schlechteren Löslichkeit der freien Pseudoephedrin-Basen wurde bei der Herstellung der Stammlösung die doppelte Menge Lösungsmittel (HCl) verwendet.

Die Ergebnisse der Vergleichsmessungen (siehe Tab. 21 und Abb. 21) zeigen ein einheitlicheres Bild mit weniger Streuung und einer deutlich niedrigeren Plasmaproteinbindung, die gut zu den pharmakokinetischen Eigenschaften der Substanzen passen.

Tab. 21: Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide, CUF-Vergleichsmessungen 2 mM, BSA pK_A Affinitätskonstante, PPB / % Plasmaproteinbindung, n Anzahl der Bindestellen

<i>Ephedra</i> -Alkaloide	Unabhängige Bindung			Abhängige Bindung		
	PPB / %	pK_A	n	PPB / %	pK_A	n
(-)-Ephedrin	9,32 ± 0,95	2,08; 1,83	2	7,36 ± 0,71	2,12; 1,97	2
(+)-Ephedrin	19,32 ± 2,30	2,31; 2,09; 1,82	3	16,77 ± 0,57	2,53; 2,28; 2,17	3
<i>rac</i> -Ephedrin	15,58 ± 0,35	2,23; 2,05	2	11,07 ± 0,64	2,31; 2,14	2
(-)-Pseudoephedrin	5,54 ± 3,06	1,82; 1,64	2	5,15 ± 1,76	1,94	1
(+)-Pseudoephedrin	9,91 ± 2,86	2,09; 1,65	2	7,57 ± 1,54	2,13	1
<i>rac</i> -Pseudoephedrin	9,33 ± 1,80	1,99; 1,78	2	7,28 ± 0,16	2,09	1

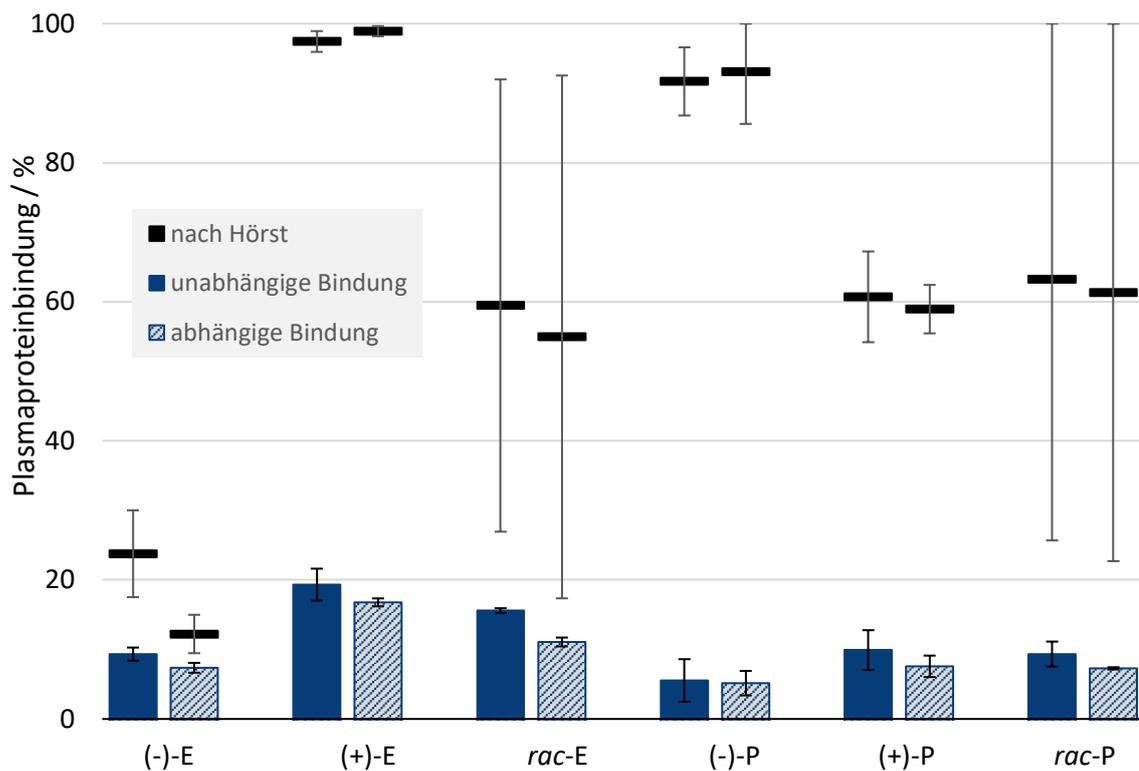


Abb. 21: Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide: Vergleichsmessungen zu Hörst^[90]; 2mM, BSA
 (-)-E (-)-Ephedrin, (+)-E (+)-Ephedrin, **rac-E** *rac*-Ephedrin, (-)-P (-)-Pseudoephedrin,
 (+)-P (+)-Pseudoephedrin, **rac-P** *rac*-Pseudoephedrin

Da die *Ephedra*-Alkaloide bei der Messwellenlänge von 257 nm einen sehr geringen Absorptionskoeffizienten haben (siehe Tab. 22), werden entsprechend hohe Konzentrationen von 2 mM benötigt. Bei einer Konzentration von 2 mM liegen die *Ephedra*-Alkaloide bei diesem Versuchsaufbau im zehnfachen Überschuss zum Albumin vor (Volumen der Messzelle = 2,8 mL; Endkonzentration von Albumin in der Messzelle ca. 0,2 mM). Daher kann es möglicherweise zu einer Sättigung der Bindestellen am Albumin kommen. Eine Sättigung der Bindestellen bewirkt eine Verfälschung der Messergebnisse, da ein scheinbar größerer Anteil der Wirkstoffe ungebunden in der Lösung vorliegt und die Affinität zu Albumin damit niedriger bestimmt wird, als sie in Wirklichkeit ist.

7.1.2. Weiterführende Untersuchungen

Aufgrund dieser ersten Ergebnisse und zur Untersuchung möglicher Sättigungsphänomene sollten die optisch aktiven Isomere der *Ephedra*-Alkaloide zusätzlich in einer niedrigeren

Endkonzentration vermessen werden. Die Vermessung der racemischen *Ephedra*-Alkaloide in den Vorversuchen ergaben keine neuen Erkenntnisse. Die Plasmaproteinbindung des Racemats stellt lediglich den Mittelwert der Proteinbindung der beiden Enantiomere dar. Daher wurde bei den folgenden Versuchen auf die Messung der Racemate verzichtet.

Um eine Messung mit einer niedrigeren Alkaloid-Konzentration durchführen zu können, wurden die Absorptionsmaxima und molaren Absorptionskoeffizienten der Isomere erneut bestimmt (siehe Tab. 22). Für aussagekräftige Ergebnisse und ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis ist eine ausreichend hohe UV-Absorption der Substanz zwingend erforderlich. Die gemessene UV-Absorption sollte dazu am Ende der Messung im linearen Bereich nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (200 – 1500 mAU) liegen ^[112].

Die *Ephedra*-Alkaloide weisen bei der Bestimmung der Absorptionsmaxima neben 257 nm ein zusätzliches UV-Absorptionsmaximum bei 205 nm auf (siehe Tab. 22).

Tab. 22: Experimentell bestimmter molarer Absorptionskoeffizient der *Ephedra*-Alkaloide; $\epsilon / \text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ Konzentration der Lösung 0,02 mM

Absorptions- -maximum	(-)-Ephedrin	(+)-Ephedrin	(-)-Pseudoephedrin	(+)-Pseudoephedrin
205 nm	7044	7046	7240	7347
257 nm	141	140	136	140

In diesem Wellenlängenbereich absorbieren zahlreiche Substanzen, unter anderem auch das Albumin selbst. Da es bei der Messung bei 205 nm zu einem starken Rauschen kommt, ist die Auswertung der Kurven bei dieser Messwellenlänge nicht möglich. Daher wurde eine Messwellenlänge von 218 nm für die Bestimmung der *Ephedra*-Alkaloide gewählt. Diese Wellenlänge stellte einen Kompromiss zwischen möglichst geringem Rauschen und möglichst hoher UV-Absorption der *Ephedra*-Alkaloide dar. Mit einer Konzentration von 0,2 mM liegen die Ephedrin-Isomere damit in der Messzelle im äquimolaren Verhältnis zum Albumin vor und weisen bei 218 nm gleichzeitig eine ausreichende UV-Absorption auf, um zuverlässige Messkurven zu erhalten.

In Abb. 22 sind die normalisierten Messkurven eines Ultrafiltrationsversuchs von (+)-Ephedrin dargestellt. Die linke Kurve stellt die Elutionskurve von (+)-Ephedrin ohne Protein dar, die rechte Kurve die Messkurve mit Albumin in der Ultrafiltrationszelle. Durch

den sehr geringen Zeitunterschied beider Messkurven errechnet sich in diesem Beispiel eine niedrige Plasmaproteinbindung von 9,6 % (unabhängiges Bindungsmodell). Die dritte Kurve am unteren Rand der Graphik stellt die Spülkurve nach der Proteininjektion dar; ein Nachweis für die Integrität der Filtermembran.

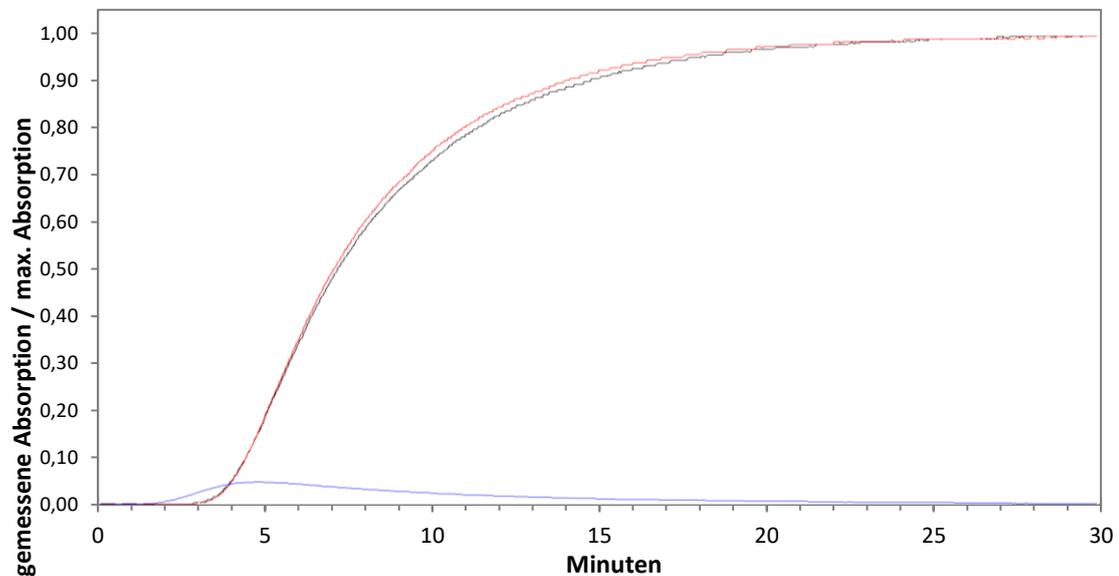


Abb. 22: Normalisierte Messkurven des kontinuierlichen Ultrafiltrationsversuchs von (+)-Ephedrin; 0,2 mM mit bovinem Serumalbumin (BSA)

Alle vier Stereoisomere zeigen auch bei einer niedrigeren Konzentration von 0,2 mM eine vergleichbar niedrige Plasmaproteinbindung von 5 – 10 % gegenüber BSA. Die Ergebnisse der Bindungsversuche sind in Tab. 23 A – D dargestellt.

Tab. 23 A: Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide, 0,2 mM, CUF: (–)-Ephedrin-HCl mit bovinem Serumalbumin (BSA), humanem Serumalbumin (HSA) und humanem Serum
 pK Affinitätskonstante, PPB / % Plasmaproteinbindung, n Anzahl der Bindestellen, sdv Standardabweichung

(–)-Ephedrin											
Unabhängige Bindestellen							Abhängige Bindestellen				
	Messung	PPB / %	pK_1	pK_2	pK_3	n	PPB / %	pK_1	pK_2	pK_3	n
BSA	1	7,77	1,94	1,73	-	2	6,93	2,09	-	-	1
	2	8,04	1,94	1,77	-	2	7,60	2,14	-	-	1
	3	1,50	1,40	-	-	1	1,50	1,40	-	-	1
	Mittelwert	5,77	1,76	1,75	-	2	5,34	1,88	-	-	1
	sdv	3,70	0,31	0,03	-	-	3,35	0,41	-	-	-

Tab. 23 A: Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide, 0,2 mM, CUF: (-)-Ephedrin-HCl mit bovinem Serumalbumin (BSA), humanem Serumalbumin (HSA) und humanem Serum

(-)-Ephedrin											
Unabhängige Bindestellen							Abhängige Bindestellen				
Messung	PPB / %	pK ₁	pK ₂	pK ₃	n	PPB / %	pK ₁	pK ₂	pK ₃	n	
HSA	1	5,06	1,73	1,54	-	2	2,56	1,64	-	-	1
	2	4,60	1,68	1,51	-	2	4,63	1,91	-	-	1
	3	5,14	1,73	1,56	-	2	5,02	1,94	-	-	1
	Mittelwert	4,93	1,71	1,54	-	2	4,07	1,83	-	-	1
	sdv	0,29	0,03	0,03	-	-	1,32	0,17	-	-	-
Serum	1	29,44	2,62	2,44	-	2	24,62	2,74	-	-	1
	2	28,85	2,61	2,43	-	2	24,60	2,74	-	-	1
	3	28,93	2,51	2,33	2,15	3	21,88	2,67	-	-	1
	Mittelwert	29,07	2,58	2,40	2,15	2	23,70	2,71	-	-	1
	sdv	0,32	0,06	0,06	-	-	1,58	0,04	-	-	-

Tab. 23 B: Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide, 0,2 mM, CUF: (+)-Ephedrin x0,5H₂O mit bovinem Serumalbumin (BSA), humanem Serumalbumin (HSA) und humanem Serum

(+)Ephedrin											
Unabhängige Bindestellen							Abhängige Bindestellen				
Messung	PPB / %	pK ₁	pK ₂	pK ₃	n	PPB / %	pK ₁	pK ₂	pK ₃	n	
BSA	1	8,45	1,86	1,69	1,51	3	8,88	2,21	-	-	1
	2	9,63	2,09	1,74	-	2	8,99	2,22	-	-	1
	3	7,68	1,82	1,64	1,47	3	7,26	2,12	-	-	1
	Mittelwert	8,59	1,92	1,69	1,49	3	8,38	2,18	-	-	1
	sdv	0,98	0,15	0,05	0,03	-	0,97	0,06	-	-	-
HSA	1	5,39	1,76	1,58	-	2	5,08	1,95	-	-	1
	2	7,34	1,99	1,55	-	2	7,00	2,10	-	-	1
	3	8,05	1,98	1,71	-	2	7,45	2,13	-	-	1
	Mittelwert	6,93	1,91	1,61	-	2	6,51	2,06	-	-	1
	sdv	1,38	0,13	0,09	-	-	1,26	0,10	-	-	-
Serum	1	33,74	2,60	2,43	2,25	3	32,35	2,90	-	-	1
	2	39,76	2,75	2,51	2,34	3	33,53	2,92	-	-	1
	3	35,71	2,64	2,47	2,29	3	33,63	2,93	-	-	1
	Mittelwert	36,40	2,66	2,47	2,29	3	33,17	2,92	-	-	1
	sdv	3,07	0,08	0,04	0,05	-	0,17	0,02	-	-	-

Tab. 23 C: Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide, 0,2 mM, CUF: (-)-Pseudoephedrin mit bovinem Serumalbumin (BSA), humanem Serumalbumin (HSA) und humanem Serum

(-)-Pseudoephedrin											
Unabhängige Bindestellen							Abhängige Bindestellen				
	Messung	PPB / %	pK ₁	pK ₂	pK ₃	n	PPB / %	pK ₁	pK ₂	pK ₃	n
BSA	1	9,21	2,01	1,83	-	2	8,70	2,20	-	-	1
	2	4,66	1,59	1,41	1,23	3	3,82	1,82	-	-	1
	3	3,40	1,55	1,37	-	2	3,38	1,77	-	-	1
	Mittelwert	5,76	1,72	1,54	1,23	2	5,30	1,93	-	-	1
	sdv	3,06	0,25	0,25	-	-	2,95	0,24	-	-	-
HSA	1	6,39	1,83	1,66	-	2	5,56	1,99	-	-	1
	2	7,09	1,90	1,68	-	2	6,06	2,03	-	-	1
	3	6,28	1,83	1,65	-	2	5,48	1,98	-	-	1
	Mittelwert	6,59	1,85	1,66	-	2	5,70	2,00	-	-	1
	sdv	0,44	0,04	0,02	-	-	0,31	0,03	-	-	-
Serum	1	23,04	2,48	2,30	-	2	17,80	2,56	-	-	1
	2	25,47	2,53	2,36	-	2	21,13	2,65	-	-	1
	3	19,09	2,59	-	-	1	17,92	2,56	-	-	1
	Mittelwert	22,53	2,54	2,33	-	2	18,95	2,59	-	-	1
	sdv	3,22	0,06	0,04	-	-	1,89	0,05	-	-	-

Tab. 23 D: Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide, 0,2 mM, CUF: (+)-Pseudoephedrin mit bovinem Serumalbumin (BSA), humanem Serumalbumin (HSA) und humanem Serum

(+)Pseudoephedrin											
Unabhängige Bindestellen							Abhängige Bindestellen				
	Messung	PPB / %	pK ₁	pK ₂	pK ₃	n	PPB / %	pK ₁	pK ₂	pK ₃	n
BSA	1	4,51	1,67	1,50	-	2	4,66	1,91	-	-	1
	2	3,58	1,47	1,29	1,11	3	3,68	1,80	-	-	1
	3	9,28	2,23	-	-	1	9,11	2,22	-	-	1
	Mittelwert	5,79	1,79	1,40	1,11	2	5,82	1,98	-	-	1
	sdv	3,06	0,39	0,15	-	-	2,89	0,22	-	-	-
HSA	1	7,33	1,90	1,72	-	2	6,56	2,07	-	-	1
	2	7,44	1,91	1,73	-	2	6,71	2,08	-	-	1
	3	5,31	1,75	1,57	-	2	5,24	1,96	-	-	1
	Mittelwert	6,69	1,85	1,67	-	2	6,17	2,04	-	-	1
	sdv	1,20	0,09	0,09	-	-	0,81	0,07	-	-	-

Tab. 23 D: Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide, 0,2 mM, CUF: (+)-Pseudoephedrin mit bovinem Serumalbumin (BSA), humanem Serumalbumin (HSA) und humanem Serum

(+)-Pseudoephedrin											
	Unabhängige Bindestellen						Abhängige Bindestellen				
	Messung	PPB / %	pK ₁	pK ₂	pK ₃	n	PPB / %	pK ₁	pK ₂	pK ₃	n
Serum	1	22,63	2,36	2,19	2,01	3	19,76	2,61	-	-	1
	2	23,74	2,49	2,32	-	2	18,89	2,59	-	-	1
	3	29,90	2,54	2,34	2,16	3	23,20	2,70	-	-	1
	Mittelwert	25,42	2,47	2,28	2,09	3	20,62	2,63	-	-	1
	sdv	3,91	0,09	0,08	0,11	-	2,28	0,06	-	-	-

7.1.3. Plasmaproteine

Um aussagekräftigere Rückschlüsse auf die Plasmaproteinbindung im menschlichen Körper treffen zu können und Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies zu sehen, wurde neben bovinem Serumalbumin auch humanes Serumalbumin bei der kontinuierlicher Ultrafiltration eingesetzt. In den Veröffentlichungen ^[131-135] zur Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide (siehe Tab. 19) wird sowohl bovines-, als auch humanes Serumalbumin verwendet. Da neben Albumin auch weitere Plasmaproteine, wie das saure α_1 -Glykoprotein, am Transport von Substanzen im Blut beteiligt sind, wurden außerdem Versuche mit humanem Plasma bzw. humanem Serum durchgeführt.

Die hohe Viskosität von reinem Serum bzw. Plasma erfordert, dass sowohl humanes Serum wie auch Plasma vor der Verwendung mit Phosphatpuffer verdünnt werden müssen. Unterscheidet sich die Viskosität der Lösung in der Messzelle signifikant zwischen Versuchsteil eins und drei (Messung ohne und mit Protein in der Messzelle), kommt es allein durch die veränderte Viskosität zu einer zeitlichen Verschiebung der Messkurve und damit zu einer Verfälschung der Messergebnisse. Daher wurden Plasma und Serum vor der Verwendung jeweils 1:10 verdünnt.

Die Verwendung von humanem Plasma für die Bindungsversuche mittels kontinuierlicher Ultrafiltration gestaltete sich schwierig. Aufgrund der im Plasma enthaltenen Gerinnungsfaktoren kam es im Laufe der Messung immer wieder zu einem Verstopfen der Membranporen und zu einem rapiden Druckanstieg innerhalb der Messzelle.

Die Gerinnung des verwendeten gepoolten, humanen Citratplasma wird durch Zusatz von Citrat (Verhältnis 1:9) verhindert. Um eine Gerinnung des Plasmas auch während des kontinuierlichen Ultrafiltrationsexperiments zu verhindern, wurde Zitronensäure als Pufferzusatz dem Phosphatpuffer zugesetzt. Doch selbst der Zusatz von Citrat zum Phosphatpuffer zeigte keine Verbesserung der Gerinnungsproblematik. Daher konnte für die weiteren Messungen kein Plasma verwendet werden. Stattdessen wurde humanes Serum eingesetzt, in dem keine Gerinnungsfaktoren mehr enthalten sind.

Auf den Zusatz anderer gerinnungshemmender Stoffe wie Heparin oder EDTA wurde verzichtet, da fragwürdig ist, ob die Zusatzstoffe nicht selbst den Wirkstoff binden und dadurch die gemessenen Ergebnisse verfälschen würden.

Für die Proteinbindungsversuche wurde letztendlich gepooltes humanes Blutserum ($n = 11$, Blutgruppe A) verwendet. Vor der Verwendung des humanen Serums wird dieses zentrifugiert und filtriert. Diese Vorbereitung soll Schwebstoffe und Lipidtröpfchen aus dem Serum entfernen, die zu Problemen während der Messung führen können, da sie die Poren der Ultrafiltrationsmembran verstopfen könnten.

7.1.3.1. Bestimmung der Plasmaproteinkonzentration im Serum

Die Konzentration der Plasmaproteine im Serum kann von Mensch zu Mensch bzw. je nach Gesundheits- und Ernährungszustand sehr stark variieren. In der Literatur wird lediglich ein Mittelwert angegeben (ca. 40 g/L Albumin)^[8,14]. Daher wurden im Vorfeld die Gesamtproteinkonzentration und die Konzentration an Albumin im verwendeten Serum bestimmt (siehe Kap. B.4.3.2.1). Da bei den Versuchen gepooltes Blutserum von elf Probanden eingesetzt wurde, sollte sich die Plasmaproteinkonzentration mitteln. Für die Berechnung wird jedoch die exakte Konzentration benötigt, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

Die Bestimmung erfolgte mithilfe der Biuret-Reaktion nach Gornall *et al.*^[111]. Das untersuchte Serum weist eine Gesamtproteinkonzentration (T) von $101,7 \% \pm 5,0 \%$ bzw. $72,8 \pm 3,6 \text{ g/L}$ auf, was genau dem mittleren Wert des Literaturwertes von $65 - 80 \text{ g/L}$ ^[8] entspricht. Die Albuminkonzentration (A) im Serum liegt bei $69,8 \% \pm 5,1 \%$ bzw.

49,9 ± 3,7 g/L und ist damit leicht erhöht im Vergleich zum Literaturwert von ca. 60 % der Gesamtproteinkonzentration bzw. 40 g/L [8].

7.1.4. Diskussion

Die niedrige Plasmaproteinbindung der optisch aktiven *Ephedra*-Alkaloide, die bereits bei den Vergleichsmessungen beobachtet wurde, konnte auch bei der weiterführenden Untersuchung bestätigt werden (siehe Tab. 23 A – D und Abb. 23). So liegt das Ausmaß der Plasmaproteinbindung der vier Stereoisomere im Bereich zwischen 4 % und 9 % bei der Verwendung von reinem Albumin. Der Ursprung des Albumins, bovin oder human, scheint keinen wesentlichen Einfluss auf die Plasmaproteinbindung der Substanzen zu haben. Die vermutete Stereoselektivität der Bindung lässt sich ausschließlich bei den Ephedrin-Enantiomeren beobachten. Hier zeigt sich eine geringfügig höhere Affinität des rechtsdrehenden Isomers. Jedoch ist diese Stereoselektivität für (+)-Ephedrin bei der Messung mit BSA und HSA nicht signifikant. Bei den Pseudoephedrinen hingegen ist kein Unterschied zwischen den Enantiomeren erkennbar.

Im humanen Serum ist die Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide mit 19 – 37 % sichtbar erhöht. Dabei zeigen (+)- und (–)-Pseudoephedrin mit 19 – 25 % PPB eine geringere Affinität zu den Plasmaproteinen als die Ephedrin-Enantiomere mit 24 – 37 % PPB. Bei den Ephedrinen ist erneut eine Stereoselektivität für das rechtsdrehende Isomer feststellbar; wohingegen sich bei den Pseudoephedrinen erneut kein Unterschied zwischen den zwei Enantiomeren zeigt (siehe Abb. 23). Im humanen Serum ist die beobachtete Stereoselektivität des Ephedrins signifikant.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Literaturwerten für die Plasmaproteinbindung der Neurotransmitter Adrenalin und Noradrenalin und des strukturell verwandten Amphetamins. Laut Literatur liegt die Plasmaproteinbindung von Adrenalin bei ca. 20 %, die von Noradrenalin bei ca. 13 % Amphetamin weist ebenfalls eine Plasmaproteinbindung von ca. 20 % auf; die Bestimmung erfolgte mittels Gleichgewichtsdialyse in humanem Plasma [140].

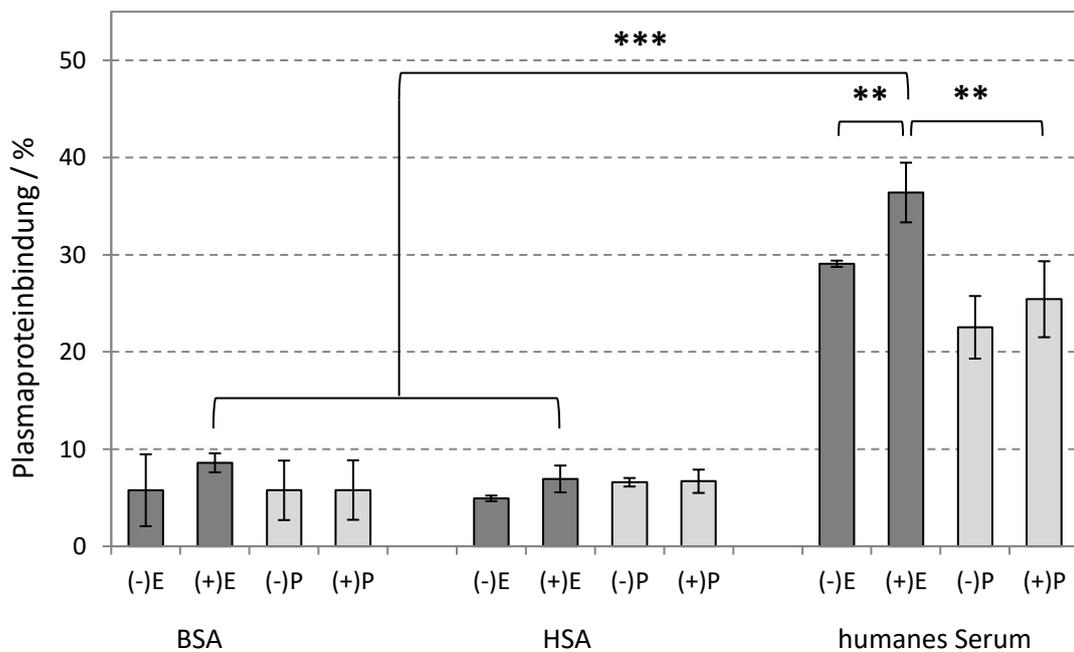


Abb. 23: Plasmaproteinbindung / % der *Ephedra*-Alkaloide; abhängige Bindung, mit Serumalbumin (BSA und HSA) und in humanem Serum

(-)E (-)-Ephedrin, (+)E (+)-Ephedrin, (-)P (-)-Pseudoephedrin, (+)P (+)-Pseudoephedrin

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Laut Literatur weisen Substanzen, die eine hohe Affinität zu Albumin zeigen, üblicherweise eine saure Struktur im Molekül auf, wie beispielsweise Warfarin oder viele nichtsteroidale Antiphlogistika. Neutrale oder basische Substanzen hingegen zeigen häufig eine größere Affinität zum sauren α_1 -Glykoprotein als zu Albumin^[18]. Durch die basischen Eigenschaften des aliphatischen Amins in der Struktur der *Ephedra*-Alkaloide, sollten diese laut Theorie eine höhere Affinität zu dem sauren α_1 -Glykoprotein haben als zu Albumin. Dieser Zusammenhang erklärt die höhere Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide in humanem Serum im Vergleich zum reinen Albumin (BSA und HSA), da im Serum neben Albumin noch weitere Plasmaproteine wie das saure α_1 -Glykoprotein (AGP) enthalten sind. Die Bindung an AGP erklärt auch die zusätzliche Bindestelle, die teilweise bei den *Ephedra*-Alkaloiden im Serum bestimmt wurde (siehe Tab. 23 A – D).

Erste Versuche zur Bindung der *Ephedra*-Alkaloide an saures α_1 -Glykoprotein mittels kontinuierlicher Ultrafiltration wurden mit (-)-Ephedrin-HCl durchgeführt. Das vorläufige Ergebnis mit 66,4 % berechneter Plasmaproteinbindung ist vielversprechend und unterstützt die oben genannte Theorie.

Die Auswertungsprogramme der kontinuierlichen Ultrafiltration (NPBUW03 und NPBW127, von WSA) wurden jedoch speziell zur Messung von Albumin programmiert. Daher bewirkt die Berechnung der Plasmaproteinbindung – bei Verwendung anderer Plasmaproteine mit unterschiedlichen Molekularmassen – häufig einen Systemabsturz des Programms. Dieser Fehler wird durch intern programmierte Grenzen für das Molekulargewicht und die verwendete Proteinkonzentration verursacht. Ein großer Unterschied in den Molekularmassen, wie es zwischen saurem α_1 -Glykoprotein und Albumin der Fall ist, führt daher zu einem Programmfehler und – absturz.

Weitere Untersuchungen mittels diskontinuierlicher Ultrafiltration sind geplant und sollen zur Untermauerung der Theorie genauer untersucht werden.

An dem Transport endo- und exogener Substanzen im Blut sind neben Albumin und dem sauren α_1 -Glykoprotein auch noch weitere Plasmaproteine beteiligt. Laut Literatur binden beispielsweise Arzneistoffe wie das Immunsuppressivum Ciclosporin A an die Lipoproteine im Blut ^[20]. Da Lipoproteine im Plasma jedoch vorwiegend für den Transport von Fettsäuren und Cholesterin verantwortlich sind ^[8], ist es nicht sehr wahrscheinlich, dass sie auch am Transport kleiner Moleküle mit hydrophilen Eigenschaften, wie den Phenylethylaminen, beteiligt sind. Daher wurden weitere Ligand-bindende Plasmaproteine wie die Lipoproteine im Rahmen dieser Arbeit nicht betrachtet.

7.2. Sympathomimetika

Um die Beobachtungen zur basischen Struktur der *Ephedra*-Alkaloide und deren dadurch bedingten Affinität zu Albumin bzw. saurem α_1 -Glykoprotein weiter zu untersuchen und mögliche Struktur-Wirkungsbeziehungen zu definieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Sympathomimetika betrachtet. Für diese zusätzliche Untersuchung sollten die Neurotransmitter Adrenalin und Noradrenalin sowie weitere zu Ephedrin strukturell ähnliche Sympathomimetika – *rac*-Oxilofrin, *rac*-Synephrin, *rac*-Phenylephrin und *rac*-Orciprenalin – näher betrachtet werden. Alle diese Substanzen weisen mindestens eine zusätzliche schwach saure Phenolgruppe im Molekül auf.

Die Plasmaproteinbindung aller sechs Substanzen wurde mittels kontinuierlicher Ultrafiltration, in einer Konzentration von 0,2 mM und unter Verwendung von bovinem Serumalbumin bestimmt. Das Ziel dieser Untersuchung war es herauszufinden, ob obigen

Substanzen durch ihre sauren Stoffeigenschaften eine höhere Affinität zu Albumin zeigen als die *Ephedra*-Alkaloide, die ausschließlich ein aliphatisches Amin enthalten. Eine mögliche Stereoselektivität wurde dabei zunächst nicht weiter betrachtet. Zur Bestätigung der gemessenen Ergebnisse sollen die experimentell bestimmten Plasmaproteinbindungen der Sympathomimetika mit Literaturwerten verglichen werden.

7.2.1. Adrenalin und Noradrenalin

Als Kontrollgruppe sollte zunächst die Plasmaproteinbindung der Neurotransmitter Adrenalin und Noradrenalin mittels kontinuierlicher Ultrafiltration bestimmt werden. Diese Messung diene auch dazu, die Aussagekraft der CUF-Messung durch Vergleich mit den Literaturwerten ^[140] zu bestätigen.

Die Vermessung von Adrenalin und Noradrenalin gestaltete sich schwierig, da beide Stoffe in Lösung sehr oxidationsempfindlich sind und sich die Lösung durch Einwirkung von Licht und Sauerstoff mit der Zeit braun verfärbt. Eine Verfärbung der Lösung und die dadurch veränderte UV-Absorption im Laufe der Messung führen zu einer Verfälschung der berechneten Plasmaproteinbindung. Die Verfärbung der Lösung wird durch die sogenannte Adrenochromreaktion verursacht, bei der Adrenalin und Noradrenalin zu Adrenochrom bzw. Noradrenochrom oxidiert werden. (Abb. 24, ^[141])

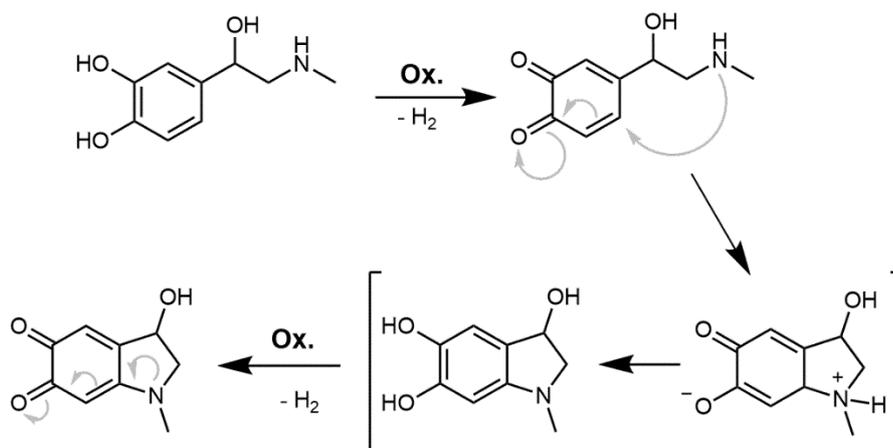


Abb. 24: Adrenochrom-Reaktion ^[141]

Da eine kontinuierliche Ultrafiltrationsmessung je nach Bindungsaffinität der Substanz jedoch mehrere Stunden dauern kann, die Adrenochromreaktion aber bereits nach wenigen Minuten abläuft, wurden verschiedene Schritte unternommen die Oxidation der Katecholamine zu verhindern. Zunächst wurde das Gefäß mit der Arzneistofflösung mit

Alufolie umwickelt, um diese vor Licht zu schützen. Der Lichtschutz verlangsamt die Oxidation geringfügig, verhindert sie jedoch nicht. Eine Messung unter Schutzgasatmosphäre zum Ausschluss von Sauerstoff ist durch den Aufbau der Anlage bedingt nicht möglich.

Daher wurden dem Phosphatpuffer und der Arzneistofflösung verschiedene Antioxidantien wie Ascorbinsäure (20 mg/L) und Natriumdisulfit (0,5 – 1 mg/mL) zugesetzt. Beide Stoffe werden in Fertigarzneimittelzubereitungen als Antioxidantien eingesetzt; Natriumdisulfit nicht zuletzt in einer Noradrenalin-Injektionslösung (Fertigpräparat, Arterenol® 1 mL/25 mL, 1 mg/mL Injektionslösung, Sanofi-Aventis Dtl. GmbH, mit max. 0,5 mg Natriummetabisulfit (Ph. Eur.) pro mL (entspr. max. 0,34 mg SO₂) als Antioxidans ^[60]).

Beide Antioxidantien zeigten nicht den gewünschten Erfolg. Ascorbinsäure absorbiert selbst in dem Wellenlängenbereich, der für die Messung gewählt wurde. Daher konnten mit Ascorbinsäure im Puffer keine auswertbaren Absorptionskurven gemessen werden.

Bei der Verwendung von Natriumdisulfit als Pufferzusatz wurde beim Spülen der Anlage nach der Proteininjektion eine untypisch hohe Absorption gemessen. Natriumdisulfit scheint entweder die Filtermembran anzugreifen oder zur Denaturierung des Albumins zu führen und ist daher für die Verwendung als Pufferzusatz unbrauchbar. Eine Messung der beiden Neurotransmitter mittels kontinuierlicher Ultrafiltration war daher nicht möglich.

7.2.2. Weitere Sympathomimetika

Die vier übrigen Sympathomimetika hingegen zeigten keine Instabilitäten während der Messung. Bisher ist mit 10 % jedoch nur die Plasmaproteinbindung von *rac*-Orciprenalin in der Literatur zu finden ^[139,142]. Das mittels kontinuierlicher Ultrafiltration ermittelte Ausmaß der Plasmaproteinbindung der Sympathomimetika ist in Tab. 24 und Abb. 25 abgebildet.

Tab. 24: Plasmaproteinbindung der Sympathomimetika, 0,2 mM; mit bovinem Serumalbumin (BSA) mittels CUF

pK Affinitätskonstante, PPB / % Plasmaproteinbindung, n Anzahl der Bindestellen

<i>rac</i> -Oxilofrin										
Unabhängige Bindestellen						Abhängige Bindestellen				
Messung	PPB / %	<i>pK</i> ₁	<i>pK</i> ₂	<i>pK</i> ₃	n	PPB / %	<i>pK</i> ₁	<i>pK</i> ₂	<i>pK</i> ₃	n
1	6,75	1,94	1,54	-	2	6,43	2,06	-	-	1
2	11,17	2,10	2,26	-	2	9,79	2,26	-	-	1
3	19,47	2,61	-	-	1	13,47	2,41	-	-	1
Mittelwert	12,46	2,22	1,90	-	2	9,90	2,24	-	-	1
sdv	6,46	0,35	0,51	-	-	3,52	0,18	-	-	-

<i>rac</i> -Synephrin										
Unabhängige Bindestellen						Abhängige Bindestellen				
Messung	PPB / %	<i>pK</i> ₁	<i>pK</i> ₂	<i>pK</i> ₃	n	PPB / %	<i>pK</i> ₁	<i>pK</i> ₂	<i>pK</i> ₃	n
1	7,79	1,93	1,75	-	2	7,64	2,14	-	-	1
2	7,34	2,00	1,51	-	2	7,04	2,10	-	-	1
3	6,95	2,02	1,30	-	2	7,00	2,10	-	-	1
Mittelwert	7,36	1,98	1,52	-	2	7,23	2,11	-	-	1
sdv	0,42	0,05	0,23	-	-	0,36	0,02	-	-	-

<i>rac</i> -Phenylephrin										
Unabhängige Bindestellen						Abhängige Bindestellen				
Messung	PPB / %	<i>pK</i> ₁	<i>pK</i> ₂	<i>pK</i> ₃	n	PPB / %	<i>pK</i> ₁	<i>pK</i> ₂	<i>pK</i> ₃	n
1	5,16	1,74	1,56	-	2	4,52	1,90	-	-	1
2	9,34	1,91	1,73	1,56	3	7,63	2,14	-	-	1
3	7,40	1,99	1,55	-	2	6,84	2,09	-	-	1
Mittelwert	7,30	1,88	1,61	-	2	6,33	2,04	-	-	1
sdv	2,09	0,13	0,10	-	-	1,62	0,13	-	-	-

<i>rac</i> -Orciprenalin										
Unabhängige Bindestellen						Abhängige Bindestellen				
Messung	PPB / %	<i>pK</i> ₁	<i>pK</i> ₂	<i>pK</i> ₃	n	PPB / %	<i>pK</i> ₁	<i>pK</i> ₂	<i>pK</i> ₃	n
1	8,97	2,17	1,24	-	2	8,92	2,21	-	-	1
2	9,46	2,08	1,74	-	2	9,27	2,23	-	-	1
3	11,25	2,29	1,18	-	2	11,06	2,32	-	-	1
Mittelwert	9,89	2,18	1,39	-	2	9,75	2,25	-	-	1
sdv	1,20	0,11	0,31	-	-	1,15	0,06	-	-	-

7.2.3. Diskussion

Alle vier Sympathomimetika zeigen eine niedrige Plasmaproteinbindung von ca. 10 % (siehe Tab. 24 und Abb. 25). Damit entsprechen die Ergebnisse der Sympathomimetika denen der *Ephedra*-Alkaloide. Die ermittelte Plasmaproteinbindung von Orciprenalin stimmt mit $9,89 \pm 1,20$ % bzw. $9,75 \pm 1,15$ % dabei sehr gut mit dem Literaturwert von 10 % überein ^[139].

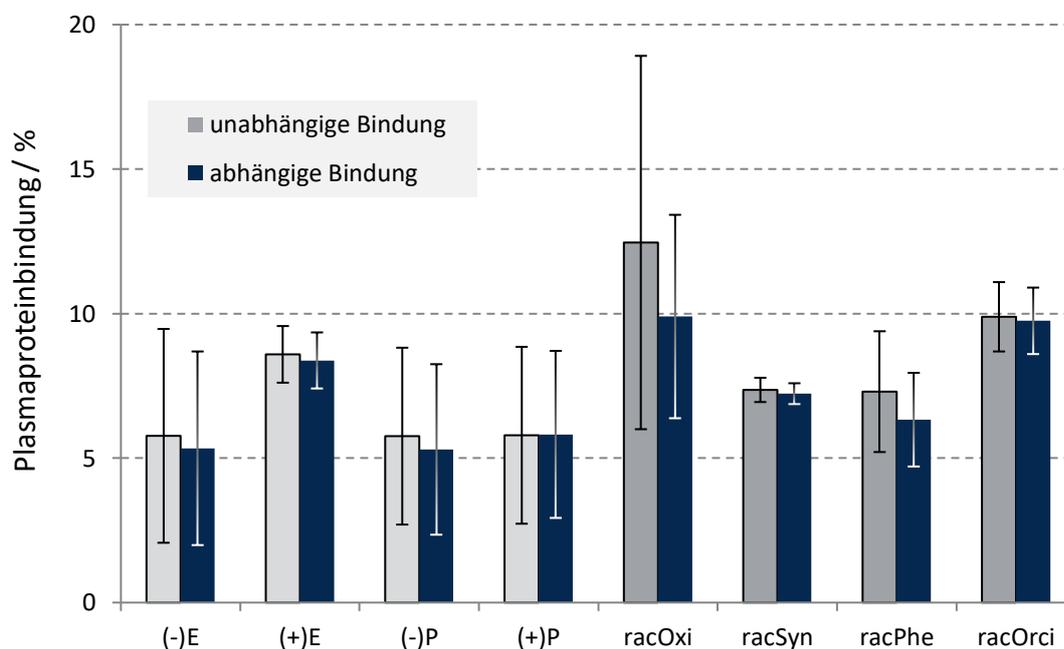


Abb. 25: Plasmaproteinbindung der Sympathomimetika und *Ephedra*-Alkaloide; 0,2 mM mit bovinem Serumalbumin (BSA) mittels CUF
 (-)E (-)-Ephedrin, (+)E (+)-Ephedrin, (-)P (-)-Pseudoephedrin, (+)P (+)-Pseudoephedrin,
racOxi *rac*-Oxilofrin, **racSyn** *rac*-Synephrin, **racPhe** *rac*-Phenylephrin, **racOrci** *rac*-Orciprenalin

Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Azidität einer bzw. zwei zusätzlicher Phenolgruppen im Molekül nicht ausreicht, um die Affinität zum Albumin signifikant zu erhöhen. Die Basizität des aliphatischen Amins scheint weiterhin ausschlaggebend zu sein. Geht man von einem durchschnittlichen pK_s -Wert der Phenolgruppe von 10 aus, so liegen bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 nur ca. 0,25 % der Phenolgruppen deprotoniert vor. Wohingegen ein Großteil des aliphatischen Amins protoniert und damit positiv geladen ist. Zusätzlich ist die Oberfläche des solvatisierten Moleküls bei den Sympathomimetika durch die zusätzlichen Phenolgruppen größer als die der *Ephedra*-Alkaloide. Diese größere Oberfläche scheint die Bindung an sterisch eingeschränkte Bindestellen zusätzlich zu

erschweren. Es ist auffällig, dass Oxilofrin im Vergleich zu den anderen Sympathomimetika eine deutlich größere Streuung der Werte ausweist (siehe Abb. 25). Diese höhere Variabilität weisen auch (–)-Ephedrin und die Pseudoephedrine auf. Oxilofrin hat genau wie die *Ephedra*-Alkaloide ein zweites Stereozentrum mit einer zusätzlichen Methylgruppe. Die drei anderen Sympathomimetika hingegen haben alle nur ein Stereozentrum in Position 1.

Die Messergebnisse deuten darauf hin, dass dieses zusätzliche Stereozentrum bzw. die Methylgruppe am 2. Stereozentrum an der Bindung zu Albumin beteiligt ist bzw. die Bindung in irgendeiner Form sterisch verhindert. Die räumliche Position der Methylgruppe scheint die Plasmaproteinbindung bzw. die Stabilität des Komplexes entweder zu fördern oder abzuschwächen.

DISKONTINUIERLICHE ULTRAFILTRATION

8.1. *Ephedra*-Alkaloide

Die kontinuierliche Ultrafiltrationsmessung hat gezeigt, dass alle vier *Ephedra*-Alkaloide eine niedrige Bindungsaffinität im Bereich von 5 – 10 % gegenüber Albumin haben. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse, die mittels kontinuierlicher Ultrafiltration bestimmt wurden, werden die optisch aktiven Ephedrin-Isomere zusätzlich mittels diskontinuierlicher Ultrafiltration vermessen.

Wie bereits erwähnt müssen die verschiedenen Protein-Ligand-Verhältnisse bei der diskontinuierlichen Ultrafiltration dabei einzeln analysiert werden. Bei diesem Vorgehen wird allgemein entweder die Konzentration an Protein oder an Arzneistoff variiert und die jeweils andere Konzentration konstant gehalten. In dem hier beschriebenen Versuchsaufbau wird die Konzentration an Protein konstant gehalten, da dieses Prinzip auch bei der kontinuierlichen Ultrafiltration verwendet wird.

8.1.1. Ultrafiltration

In Anlehnung an die für die Gyrasehemmer von *Zlotos* entwickelte Methode, wurde die diskontinuierliche Ultrafiltrationsmethode (DUF) für die Bestimmung der *Ephedra*-Alkaloide optimiert ^[143]. Bei der durch *Zlotos* optimierten DUF-Methode, wird die Probelösung aus Gyrasehemmer (Endkonzentration 0,005 – 1,000 µmol/mL) und humanem Plasma (1:19 V/V) zunächst für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird 1 mL dieser Lösung bei 2000 x g für 20 Minuten bei 10 °C mittels Amicon-Ultrafiltrationseinheit (NMGG 30 kDa) ultrafiltriert. Der freie Arzneistoff im Ultrafiltrat wird mittels HPLC-Methode quantifiziert ^[143].

Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit der beiden Ultrafiltrationsmethoden (CUF und DUF) zu erhalten, wurde die Ultrafiltrationsmethode angepasst, damit die Parameter weitestgehend mit denen der kontinuierlichen Ultrafiltration übereinstimmen. So werden zum einen Ultrafiltrationseinheiten verwendet, deren Filtermembran eine nominale Molekulargewichtsgrenze (NMGG) von 10 kDa aufweist, wie sie auch bei der CUF zum Einsatz kommt. Des Weiteren erfolgt die Filtration wie bei der CUF bei Raumtemperatur. Um ein

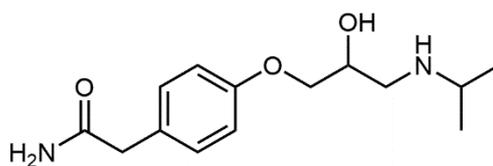
ausreichendes Volumen des Filtrats für die Quantifizierung zu erhalten, werden 4 mL Probelösung in entsprechend größeren Ultrafiltrationseinheiten filtriert.

Damit das Gleichgewicht zwischen gebundenem und ungebundenem Wirkstoff während der Filtration möglichst wenig beeinflusst bzw. verschoben wird, sollte so kurz wie möglich ultrafiltriert werden. Die Ultrafiltrationszeit wurde daher entsprechend verkürzt, da laut Herstellerangaben bei einer Porengröße von 10 kDa bereits nach 10 Minuten ein Großteil des Probevolumens (3,8 mL von 4,0 mL) filtriert ist ^[144]. Die Beschleunigung wurde im Gegenzug auf 3000 x g (4400 rpm) erhöht. Außerdem ist eine Filtrationszeit von 20 Minuten im Vergleich zur Inkubationszeit von 30 Minuten unverhältnismäßig lang.

Eine zu lange Filtrationsdauer bewirkt, dass sich das Gleichgewicht durch das Entfernen des freien Wirkstoffes während der Ultrafiltration, immer wieder neu einstellt und immer mehr Wirkstoff vom Protein dissoziiert. Dadurch wäre die freie Wirkstoffkonzentration im Filtrat deutlich höher als in der inkubierten Probe und die bestimmte Plasmaproteinbindung wäre niedriger als es in Wirklichkeit der Fall ist. Dieses Phänomen zeigte sich auch bei ersten Kontrollmessungen (Ultrafiltrationszeit von 20 Minuten) mit Natriumsalicylat, für das eine Plasmaproteinbindung von 75,9 % bestimmt wurde. Laut Literaturwert sollte die Plasmaproteinbindung von Natriumsalicylat bei 80 – 95 % liegen ^[6].

8.1.2. Interner Standard

Bei der Messung mittels diskontinuierlichen Ultrafiltration wird ein interner Standard benötigt. Es sollen damit Verluste des Wirkstoffs bei der Ultrafiltration und zum anderen Ungenauigkeiten durch die hydrodynamische Injektion der Probelösung in der Kapillarelektrophorese ausgeglichen werden. Als interner Standard wird der β -Blocker Atenolol verwendet, da er strukturelle Ähnlichkeiten zu den *Ephedra*-Alkaloiden aufweist und laut Literatur eine sehr niedrige Plasmaproteinbindung von 3 % besitzt ^[139].



Atenolol
(Interner Standard)

(*RS*)-2-[4-(2-Hydroxy-3-isopropyl-aminopropoxy)phenyl]acetamid

$M_R = 266,3 \text{ g/mol}$

Die Atenolol-Stammlösung wurde, aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit des Atenolols mit Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel hergestellt. In der Probelösung liegt die finale Konzentration von DMSO letztendlich unter 5 %. Nach Inkubation der Proben bei 37 °C für 30 Minuten erfolgte die umgehende Aufarbeitung der Proben, um das Gleichgewicht nicht unnötig zu beeinflussen und die Ergebnisse nicht zu verfälschen. Sofort nach der Entnahme der Proben aus dem Wasserbad wurde die Atenolol-Stammlösung der Probelösung hinzugefügt, die Lösung wurde gemischt und direkt in die Ultrafiltrationseinheiten überführt und zentrifugiert.

8.1.3. Kapillarelektrophorese

Zur Quantifizierung der freien Arzneistoffmenge im Filtrat wurde eine Kapillarelektrophorese-Methode verwendet. Diese hat den Vorteil, dass durch Einsatz des Racemats in der Probelösung die Plasmaproteinbindung beider Enantiomere gleichzeitig, in direkter Konkurrenz um die Bindestellen auf dem Albumin, bestimmt werden kann. Die Kapillarelektrophorese (CE) ermöglicht durch Zusatz eines geeigneten chiralen Selektors im Trennpuffer die Auftrennung der beiden Enantiomere. Da der chirale Selektor im Laufpuffer enthalten ist und nicht wie bei der HPLC als stationäre Phase verwendet wird, können die Bedingungen für die chirale Trennung einfacher angepasst und verändert werden, um eine optimale Trennung zu erreichen. Daher wurde eine Kapillarelektrophorese-Methode anstatt einer HPLC-Methode zur Quantifizierung der Enantiomere verwendet.

Zur Trennung der *Ephedra*-Alkaloide wurde β -Cyclodextrin als chiraler Selektor ausgewählt, das bereits erfolgreich zur Auftrennung der *Ephedra*-Alkaloide eingesetzt werden konnte ^[145].

Bei Cyclodextrinen handelt es sich um zyklische Oligosaccharide, deren einzelne Glucose-Bausteine über eine 1,4-glucosidische Bindung miteinander verbunden sind. Die natürlichen Cyclodextrine (α -, β - und γ -Cyclodextrin) werden durch Abbau von Stärke gewonnen und bestehen aus 6, 7 oder 8 Glucose-Bausteinen. Der gebildete Ring hat eine trichterförmige Struktur mit einem hydrophoben Hohlraum, in den sich schlecht wasserlösliche Stoffe einlagern können. Nach außen hin sind die Cyclodextrine hydrophil, was ihren Einsatz als Lösungsvermittler erklärt ^[146,147].

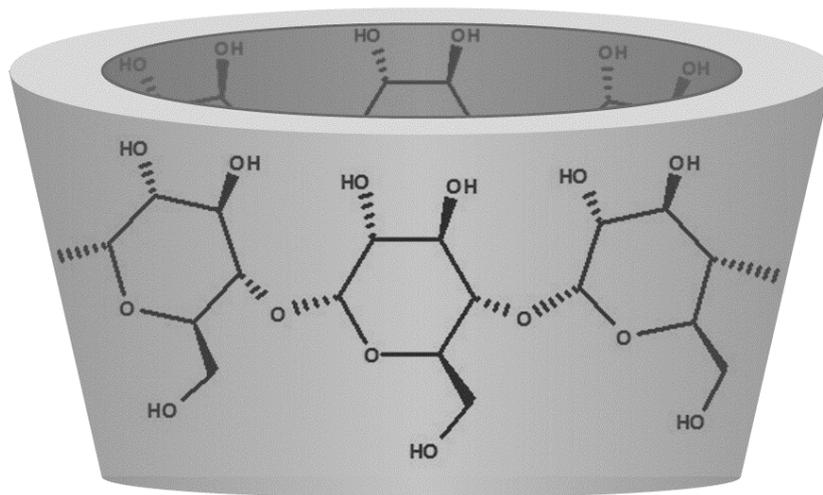


Abb. 26: Schematische Abbildung von β -Cyclodextrin

Die Inklusionskomplexe verbessern jedoch nicht nur die Löslichkeit der eingelagerten Substanzen, sondern können diese auch vor äußeren Einflüssen schützen. Daher werden Cyclodextrine in zahlreichen Produkten der Lebensmittel-, Kosmetik- und Pharmaindustrie verwendet ^[147]. Durch die chiralen Eigenschaften der Glucose und die Einlagerungsmöglichkeit von Substanzen in den Hohlraum der Cyclodextrine, eignen sich diese auch als chirale Selektoren zur Auftrennung von Enantiomeren in der HPLC und CE. Die natürlichen Cyclodextrine sind durch ihre Struktur neutral und wandern durch die fehlende Ladung in der CE mit dem EOF. Durch eine Derivatisierung ergeben sich zahlreiche Möglichkeiten Cyclodextrine mit unterschiedlichsten Eigenschaften in Bezug auf Ladung, Löslichkeit und Komplexbindung zu erhalten, was ihren breiten Einsatz als chirale Selektoren bei verschiedensten Trennproblemen ermöglicht.

Für die optimale Auftrennung der *Ephedra*-Alkaloide wurden unterschiedliche Trennpuffer^[148,149] untersucht und die Konzentration des Phosphatpuffers, vom Harnstoff und β -Cyclodextrin (β -CD) variiert (siehe Abb. 27). Da die elektrophoretische Auflösung R_s der beiden Ephedrin-Isomere im Elektropherogramm geringer war als die der Pseudoephedrin-Isomere, wurde die Optimierung mit *rac*-Ephedrin durchgeführt. Die Verwendung von Harnstoff als chaotroper Zusatz im Trennpuffer erhöht die Löslichkeit von β -Cyclodextrin und hilft dadurch die Trennung der *Ephedra*-Alkaloide zu verbessern.

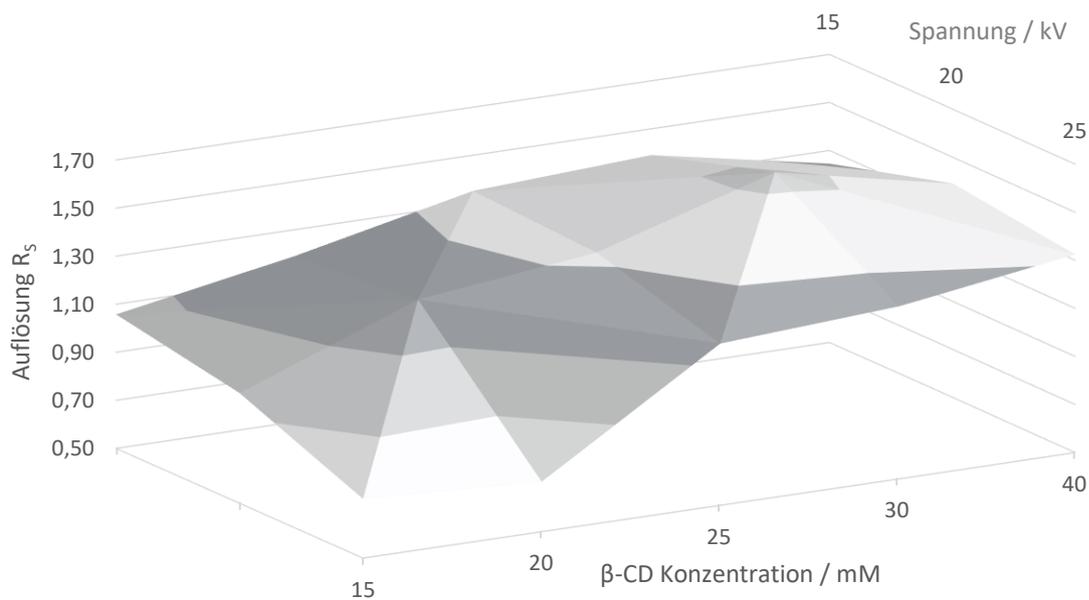


Abb. 27: Optimierung der kapillarelektrophoretischen Trennung der *Ephedra*-Alkaloide

Die Variation der Phosphat- und Harnstoffkonzentration führte zu keiner signifikanten Verbesserung der Auflösung R_s der beiden Ephedrin Peaks. Eine Erniedrigung der Harnstoffkonzentration hingegen verschlechterte die Löslichkeit des β -Cyclodextrins. Der optimierte, für die Messung verwendete Trennpuffer ist ein 100 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 2,5, mit 4 M Harnstoff und 30 mM β -Cyclodextrin als Zusatz; die optimale Spannung für die Trennung liegt bei 20 kV.

Die optimierte CE-Methode zur Quantifizierung der Ultrafiltrationsproben sah wie folgt aus:

Methode DUF:

Kapillare:	uncoated <i>fused silica</i> Kapillare, 50 µm Innendurchmesser, 50 cm / 62,5 cm Länge
Trennpuffer	100 mM Phosphatpuffer, pH 2,5; 4 M Harnstoff; 30 mM β-Cyclodextrin
Spannung:	20 kV
Temperatur:	15 °C
Injektion:	hydrodynamisch; 3,4 kPa (0,5 psi) für 20 Sekunden

Methode DUF (Fortsetzung):

Detektion:	UV; $\lambda = 210$ nm kathodenseitig
Dauer:	40 Minuten

Zu Beginn und Ende des Tages bzw. der Sequenz wurde die Kapillare entsprechend Kapitel B.5.9.2 konditioniert.

Die Migrationszeit der Ephedrin-Enantiomere liegt bei 26,8 und 27,5 Minuten ($R_s = 1,4$), wobei (+)-Ephedrin die kürzere Migrationszeit besitzt. Die Pseudoephedrin-Enantiomere werden bei 25,0 und 26,8 Minuten detektiert ($R_s = 1,8$); hier wandert (-)-Pseudoephedrin schneller als (+)-Pseudoephedrin. Der interne Standard Atenolol hat eine durchschnittliche Migrationszeit von 33,5 Minuten. Durch seine größere Molekülstruktur ist Atenolol zu groß, um sich in die Kavität des β-Cyclodextrins (Innendurchmesser 6,4 Å)^[146] einzulagern. Daher wird das racemische Atenolol mit dieser Methode nicht in seine beiden Enantiomere aufgetrennt und man detektiert nur einen einzelnen Peak für den internen Standard im Elektropherogramm.

Die Wiederfindungsraten (WFR) und Bestimmungsgrenzen (*limit of quantification*, LOQ) der Methode und das Bestimmtheitsmaß R^2 der Kalibriergeraden sind in Tab. 25 dargestellt.

Tab. 25: Wiederfindungsrate, Bestimmungsgrenzen und Bestimmtheitsmaß der diskontinuierlichen Ultrafiltrationsmethode

<i>Ephedra</i> -Alkaloide	WFR	LOQ / mol x L ⁻¹	R ²
(-)-Ephedrin	94,58 %	1,63 x 10 ⁻⁵	0,9996
(+)-Ephedrin	98,16 %	1,81 x 10 ⁻⁵	0,9995
(-)-Pseudoephedrin	97,93 %	1,83 x 10 ⁻⁵	0,9992
(+)-Pseudoephedrin	99,58 %	1,67 x 10 ⁻⁵	0,9991

8.1.4. Messergebnisse

Aus der mittels CE im Filtrat quantifizierten freien Menge an Wirkstoff [F] und der bekannten Gesamtkonzentration von Wirkstoff c_0 und Protein $[P]_{\text{tot}}$ kann, wie in Kapitel B.2.3. beschrieben, die Plasmaproteinbindung und die Affinitätskonstante K_A berechnet werden ^[95,96].

Ausgehend von der vereinfachten Sichtweise der Plasmaproteinbindung (Gleichung (8)) mit nur einer Bindestelle auf dem Protein und fehlenden Sättigungsphänomenen, lässt sich die mittlere Affinitätskonstante pK_A mithilfe der Proteinkonzentration und dem gebundenen Wirkstoffanteil für alle vier optisch aktiven Stereoisomere berechnen (siehe Tab. 26). Durch Extrapolation auf die Albuminkonzentration im Serum (Gleichung (9)), ergibt sich aus der Affinitätskonstanten pK_A die Plasmaproteinbindung der Isomere im Serum.

Tab. 26: Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide mittels DUF, entspr. Gleichung (8); für HSA und humanes Serum

<i>Ephedra</i> -Alkaloide	HSA		Humanes Serum	
	pK_A	PPB / %	pK_A	PPB / %
(-)-Ephedrin	2,01	5,8	2,86	30,5
(+)-Ephedrin	2,51	16,3	3,03	39,0
(-)-Pseudoephedrin	1,74	3,2	1,90	4,6
(+)-Pseudoephedrin	2,03	6,1	2,28	10,2

pK_A Affinitätskonstante, PPB / % Plasmaproteinbindung im Serum

Basierend auf den Berechnungen nach Scatchard^[95,97], lässt sich die makroskopische Gesamtaffinitätskonstante K_A^n auch aus der freien Wirkstoffkonzentration $[F]$ und dem Verhältnis r ausrechnen (vgl. Gleichung (12)). Berechnet man die Gesamtaffinitätskonstante für jeden einzelnen Messpunkt, sollte diese bei tatsächlicher Bindung an das Plasmaprotein über den gesamten Messbereich hinweg einen konstanten Wert ergeben (siehe Abb. 28). Dies trifft bei den Ephedrin Stereoisomeren sowohl bei HSA wie auch in humanem Serum zu. Bei Pseudoephedrin zeigt sich dieses konstante Verhalten hingegen nur in humanem Serum, nicht aber in reiner HSA-Lösung. Bei den Bindungsversuchen von reinem HSA und Pseudoephedrin lässt sich außerdem nicht für jeden Punkt eine Affinitätskonstante berechnen.

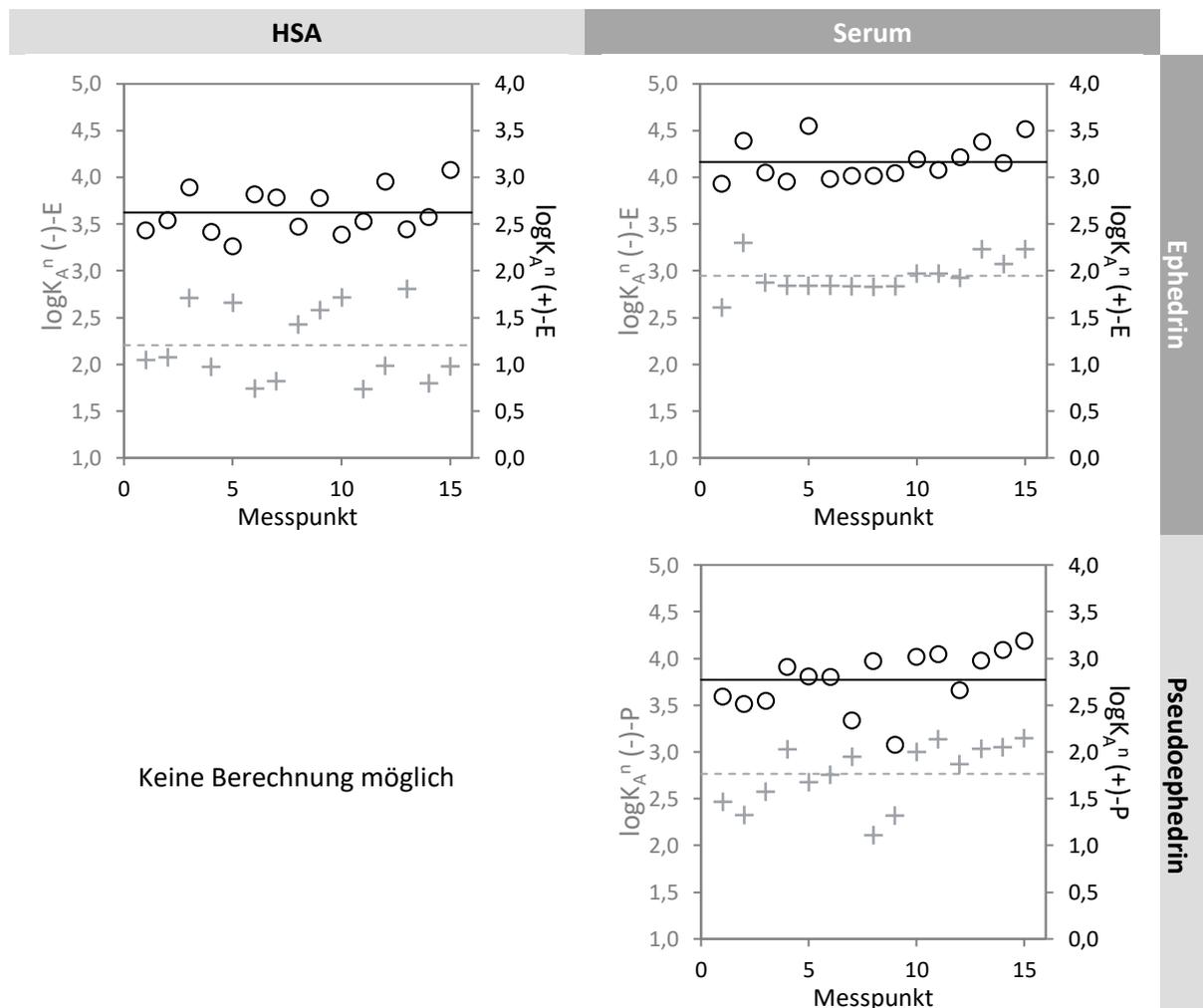


Abb. 28: Errechnete Gesamtaffinitätskonstante pK_A^n der *Ephedra*-Alkaloide für jeden einzelnen Messpunkt; mittels DUF für HSA und humanes Serum; entspr. Gleichung (12); (-)-Stereoisomere [+] und (+)-Stereoisomere [O], die horizontale Linie entspricht dem jeweiligen Mittelwert

Die mittlere Gesamtaffinitätskonstante K_A^n , die sich aus den berechneten Werten der einzelnen Messpunkte ergibt, ist in Tab. 27 dargestellt.

Tab. 27: Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide mittels DUF, entspr. Gleichung (12); für HSA und humanes Serum

<i>Ephedra</i> -Alkaloide	HSA			humanes Serum		
	K_A^n	pK _A	PPB / %	K_A^n	pK _A	PPB / %
(-)-Ephedrin	1,60 x10 ²	2,20 ± 0,40	8,8	8,85 x10 ²	2,95 ± 0,19	34,8
(+)-Ephedrin	4,22 x10 ²	2,62 ± 0,24	20,2	1,46 x10 ³	3,17 ± 0,20	46,8
(-)-Pseudoephedrin	-	-	-	5,83 x10 ²	2,77 ± 0,33	26,0
(+)-Pseudoephedrin	-	-	-	5,92 x10 ²	2,77 ± 0,31	26,3

pK_A Affinitätskonstante, PPB / % Plasmaproteinbindung im Serum

Die klassische graphische Auswertung der Proteinbindungskurven nach Scatchard basiert auf einer x-reziproken Berechnung. Neben dem Scatchard-Plot kann auch die doppelt reziproke Berechnung mittels Klotz-Plot erfolgen ^[96], siehe auch Kap.B.2.3.

Bei einer einzigen Bindestelle n bzw. einer Bindeklasse m ergeben beide Graphen eine Gerade, über deren Steigung und Schnittpunkt mit der y-Achse man die Bindungsaffinität des Liganden zum Plasmaprotein berechnen kann. Als Haupttransportprotein im Plasma besitzt Albumin jedoch für viele Stoffe mehr als nur eine Bindestelle oder Bindeklasse auf seiner Oberfläche. Der Scatchard- und Klotz-Plot sind in diesem Fall nicht mehr linear, wodurch die Ableitung bzw. Berechnung der einzelnen Bindungsaffinität erschwert wird und nicht mehr direkt aus der Steigung der Geraden berechnet werden kann ^[96].

Als Alternative zum Scatchard- und Klotz-Plot lässt sich in diesem Fall die Plasmaproteinbindung aus den Messdaten auch mittels nichtlinearer Regression und quadratischer Gleichung berechnen (vgl. Gleichung (8), B.2.). Die nichtlineare Regression der Messwerte erfolgte mit OriginPro® 2016G (Origin Lab, non-linear fit). Die an die Messwerte mittels nicht-linearer Regression angepasste Kurve ist beispielhaft für (+)-Ephedrin und HSA in Abb. 29 A dargestellt. Die Korrelation von der im Versuch bestimmten freien Wirkstoffkonzentration und der mittels Regressionskurve berechneten Werte ist in Abb. 29 B zu sehen. Sie zeigt mit $R^2 = 0,9979$ eine hohe Übereinstimmung der Werte.

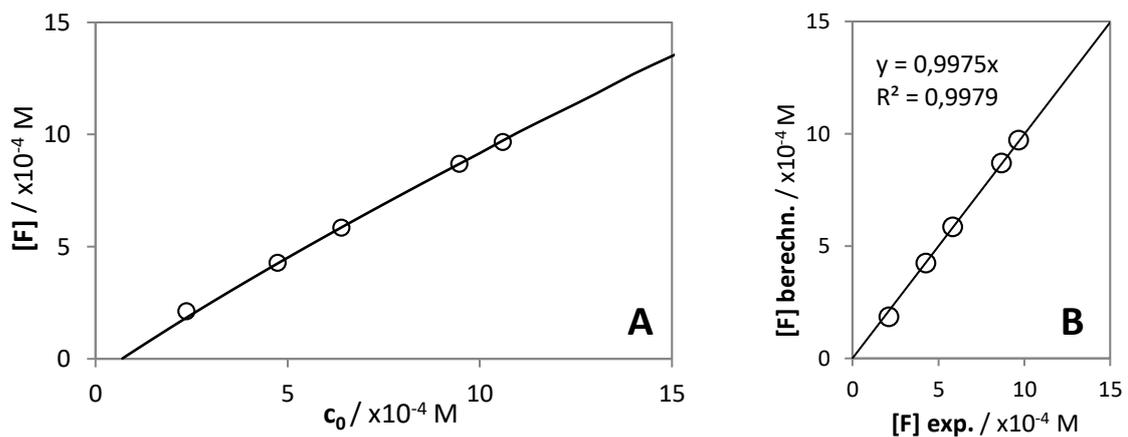


Abb. 29: Nichtlineare Regression für (+)-Ephedrin und HSA: (A) Angepasste Messkurve, (B) Korrelation zwischen gemessenen Werten [F] exp. und den aus der Regressionskurve berechneten Werten [F] berechn.

Die Ergebnisse der graphischen Auswertungen der *Ephedra*-Alkaloide sind in Tab. 28 dargestellt. Eine Auswertung mittels Scatchard- bzw. Klotz-Plot war nur für die beiden Ephedrin Stereoisomere möglich. Die Pseudoephedrin-Enantiomere hingegen ließen sich mit den graphischen Methoden nicht auswerten; es zeigte sich keinerlei Korrelation der Messwerte beim Scatchard- oder Klotz-Plot.

Tab. 28: Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide mittels DUF, graphische Auswertung nach Scatchard, Klotz und Nichtlinear; für HSA und humanes Serum

	HSA				humanes Serum			
	n	pK _A	Gesamt pK _A ⁿ	PPB	n	pK _A	Gesamt pK _A ⁿ	PPB
<i>Scatchard-Plot</i>								
(-)-Ephedrin	0,2	1,86; 2,47	2,16	8,1%	1	2,21; 2,92	2,56	18,0%
(+)-Ephedrin	1	2,12; 2,63	2,37	12,5%	2	2,41; 3,06	2,77	26,1%
<i>Klotz-Plot</i>								
(-)-Ephedrin	0,1	1,66; 2,83	2,24	9,6%	2	1,98; 2,89	2,43	14,1%
(+)-Ephedrin	2	2,09; 2,62	2,35	12,0%	3	2,03; 3,10	2,56	18,0%

Tab. 28: Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide mittels DUF, graphische Auswertung nach Scatchard, Klotz und Nichtlinear; für HSA und humanes Serum

<i>Nichtlineare Regression</i>	HSA				humanes Serum			
	n	R ²	pK _A ⁿ	PPB	n	R ²	pK _A ⁿ	PPB
(-)-Ephedrin	1	0,9395	2,71	23,6%	1	0,9919	3,09	42,4%
(+)-Ephedrin	1	0,9453	2,90	32,5%	1	0,9900	3,24	51,0%
(-)-Pseudoephedrin	1	0,9848	2,42	13,8%	1	0,9668	3,09	42,4%
(+)-Pseudoephedrin	1	0,9853	2,59	19,1%	1	0,9668	3,07	41,5%

n Anzahl an Bindestellen, *pK_A* Affinitätskonstante, *PPB* Plasmaproteinbindung

Eine Gegenüberstellung der Messergebnisse der kontinuierlichen Ultrafiltration und der verschiedenen Auswertungsmethoden der diskontinuierlichen Ultrafiltration sind in Abb. 30 dargestellt.

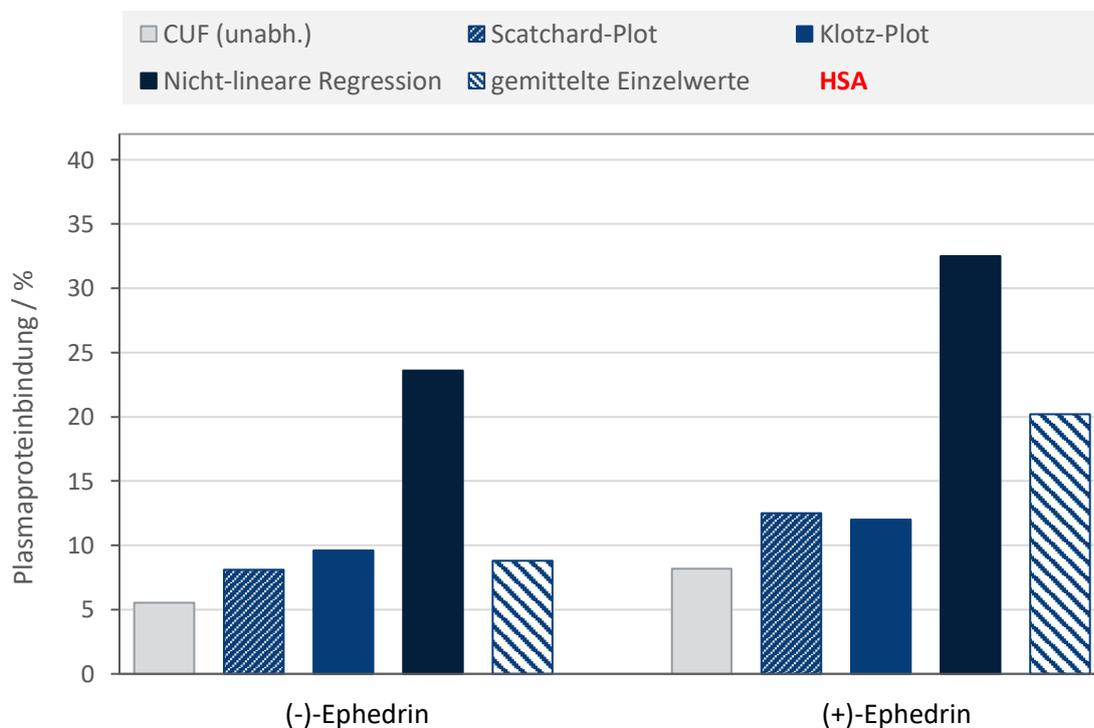


Abb. 30 A: Gegenüberstellung der Plasmaproteinbindung der Ephedrin-Enantiomere für die Ultrafiltrationsmessungen; humanes Serumalbumin; Ergebnisse der kontinuierlicher Ultrafiltration, unabhängige Bindung, und diskontinuierlicher Ultrafiltration, Scatchard-Plot, Klotz-Plot, nicht-linearer Regression und den gemittelten Einzelwerten entspr. Gleichung (12) der DUF.

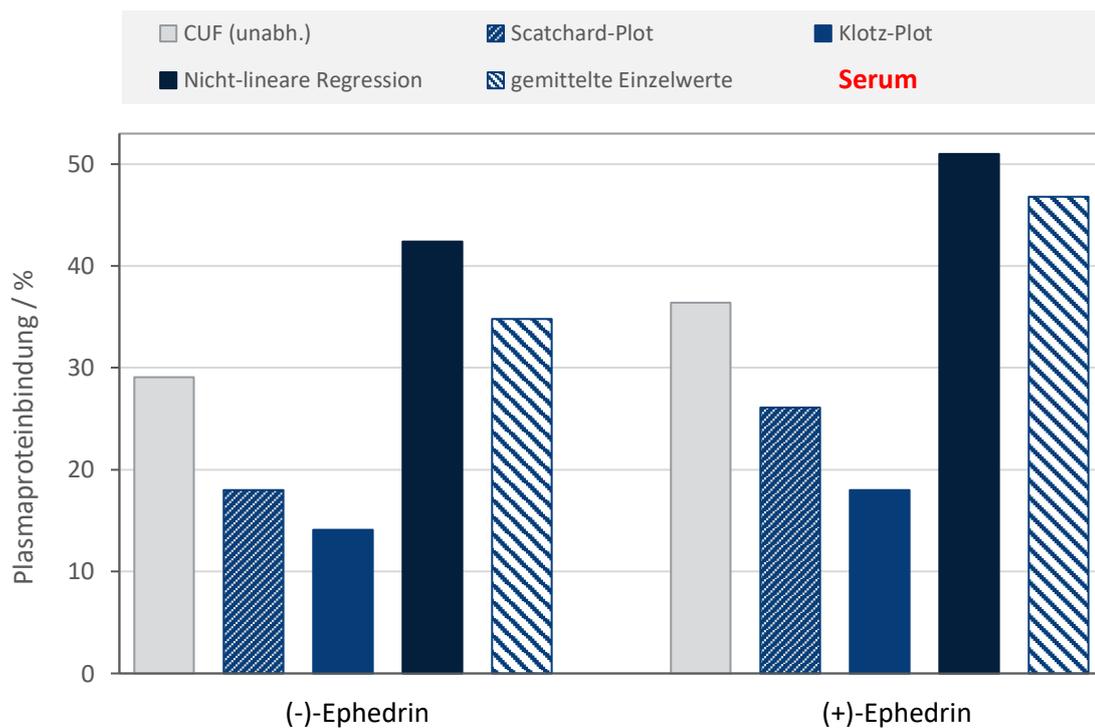


Abb. 30 B: Gegenüberstellung der Plasmaproteinbindung der Ephedrin-Enantiomere für die Ultrafiltrationsmessungen; humanes Serum; Ergebnisse der kontinuierlicher Ultrafiltration, unabhängige Bindung, und diskontinuierlicher Ultrafiltration, Scatchard-Plot, Klotz-Plot, nicht-linearer Regression und den gemittelten Einzelwerten entspr. Gleichung (12) der DUF.

Abb. 30 A zeigt das Ausmaß der Plasmaproteinbindung der Ephedrine zu reinem humanem Serumalbumin, wohingegen Abb. 30 B die Ergebnisse der Proteinbindung in humanem Serum abbildet. In Abb. 30 sind dabei nur die Ergebnisse der Ephedrin-Enantiomere dargestellt, da sich die Plasmaproteinbindung der Pseudoephedrine nicht mit jeder Methode auswerten lässt.

8.1.5. Diskussion

Genau wie bei der kontinuierlichen Ultrafiltration wurde erneut eine niedrige Plasmaproteinbindung der vier *Ephedra*-Alkaloide gemessen. Dabei lag die Proteinbindung gegenüber reinem humanem Serumalbumin im Bereich von 8 – 12 %, die Plasmaproteinbindung in humanem Serum lag erneut etwas höher bei 14 – 26 %.

Die unterschiedlichen Auswertemethoden führen zu leicht variierenden Ergebnissen, der allgemeine Trend der Ergebnisse hingegen bleibt unverändert im Vergleich zur kontinuierlichen Ultrafiltration.

Auch die Messergebnisse der DUF bestätigen die niedrige Affinität der *Ephedra*-Alkaloide gegenüber humanem Serumalbumin. Die Ephedrin-Enantiomere zeigen dabei sowohl eine Bindung gegenüber reinem humanem Serumalbumin wie auch in humanem Serum, was die gleichbleibende Affinitätskonstante über den gesamten Messbereich beweist. Die Plasmaproteinbindung der Pseudoephedrine ist erneut niedriger als die der Ephedrine, wobei die fehlende Korrelation der Pseudoephedrine gegenüber HSA im Scatchard- und Klotz-Plot die Frage aufwirft, ob es sich bei der Bindung in reiner Albuminlösung tatsächlich um eine spezifische Bindung an eine Bindestelle des Albumins handelt oder ob die gemessene Bindungsaffinität eher auf unspezifische Adsorptionsphänomene zurückzuführen ist. Dabei legt die leicht erhöhte Bindungsaffinität und die größere Anzahl an berechneten Bindestellen im Serum abermals nahe, dass die *Ephedra*-Alkaloide neben Albumin auch vermehrt an andere Plasmaprotein im Blut binden.

Weiterhin hat sich genau wie bei den kontinuierlichen Ultrafiltrationsexperimenten erneut die Stereoselektivität der Bindung für (+)-Ephedrin bestätigt. Für (-)-Ephedrin hingegen errechnen sich 0,1 bzw. 0,2 Bindestellen auf Albumin. Damit ist jedoch fraglich, ob (-)-Ephedrin tatsächlich an eine der spezifischen Bindestellen von Albumin bindet, oder ob hier nicht auch eher eine unspezifische Bindung gegenüber Albumin besteht.

Die Gegenüberstellung der Messergebnisse (siehe Abb. 30) zeigt, dass bei der Plasmaproteinbindung zu reinem Serumalbumin die Ergebnisse der kontinuierlichen Ultrafiltration und die Ergebnisse aus Scatchard- und Klotz-Plot weitestgehend übereinstimmen. Bei einer Bindestelle am Albumin, lassen sich die Messpunkte wie oben erwähnt sehr gut mittels Scatchard- und Klotz-Plot auswerten. Bei mehr als einer Bindestelle wie es bei den Messergebnissen in humanem Serum der Fall ist, kommen die graphischen Auswertungen nach Scatchard und Klotz hingegen an ihre Grenzen, da hier kein linearer Zusammenhang mehr besteht.

Im Serum stimmen die mittels CUF bestimmten Werte eher mit den Ergebnissen der nicht-linearen Regression überein, statt mit den klassischen Auswertemethoden nach Scatchard und Klotz. Auffallend bei der nicht-linearen Regression ist, dass die berechnete

Plasmaproteinbindung deutlich höher ist, als die Ergebnisse der anderen Rechenmethoden. Die Kurven in humanem Serum weisen aufgrund ihrer nicht-linearen Form auf mehrere Bindestellen hin, jedoch berechnet sich mittels nicht-linearer Regression lediglich eine Bindestelle für alle vier Stereoisomere. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es bei der Bindung an die Plasmaproteine im Serum nur eine Bindungsklasse m gibt mit mehreren gleichwertigen Bindestellen n .

Alles in allem bestätigen die Ergebnisse der diskontinuierlichen Ultrafiltration die Beobachtung der kontinuierlichen Ultrafiltrationsexperimente ^[150].



**AFFINITÄTS-
KAPILLARELEKTROPHORESE**

METHODE

1.1 Messprinzip

Die Elektrophorese wird in der Biochemie häufig zur Trennung von Proteinen verwendet. Das grundlegende Trennprinzip bei der Affinitäts-Kapillarelektrophorese (ACE), ist wie bei allen elektrophoretischen Methoden, die Wanderung von geladenen Teilchen im elektrischen Feld. Je nach Ladung der Teilchen findet diese Wanderung in Richtung der Kathode oder Anode statt. Neben der Ladung spielen aber auch Größe des solvatisierten Moleküls bzw. Komplexes und die äußere Form eine Rolle. Größe und Form des Teilchens sind daher von Bedeutung, da für die Wanderungsgeschwindigkeit letztendlich die Ladungsverteilung auf der Oberfläche des Teilchens ausschlaggebend ist. Bei kleinen Analyten mit einer idealen Kugelform, verteilt sich die Ladung auf einer minimalen Oberfläche. Daraus resultiert eine hohe Ladungsdichte auf der Oberfläche. Dadurch wandert dieses schneller als ein großes, asymmetrisches Teilchen, bei dem sich dieselbe Ladung auf einer wesentlich größeren Fläche verteilt. Bei Analyten mit großer Oberfläche spielt außerdem die Reibung eine größere Rolle, die der Wanderung der Teilchen entgegengesetzt ist ^[146].

Bei der Serumelektrophorese wird die Wanderung der geladenen Proteine im elektrischen Feld ausgenutzt, um die Plasmaproteine in die verschiedenen Fraktionen zu trennen, siehe auch Kapitel A.2. Bei der Gelelektrophorese, z.B. der SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese), werden die Proteine nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Hierbei wird der Porendurchmesser des Gels als zusätzliches Trennprinzip genutzt ^[14].

Bei der Kapillarelektrophorese wird anstelle eines Gels eine Kapillare genutzt, deren Innendurchmesser in der Regel 50 bis 100 μm beträgt ^[146]. Der geringe Durchmesser macht die Auftrennung der Analyten erst möglich, da so Konvektionseffekte in der Lösung verhindert werden. Zudem kann durch die große Oberfläche der Kapillarwand im Vergleich zum Puffervolumen die Joulsche Wärme sehr gut abgeleitet werden, die durch den Stromfluss im Inneren entsteht und die Trennung negativ beeinflusst. Dadurch ist – im Vergleich zur Gelelektrophorese – die Verwendung von höheren Spannungen möglich,

wodurch eine bessere Auftrennung und höhere Selektivität erzielt werden kann. Durch Wahl eines geeigneten Materials für die Trennkapillare ist die direkte Detektion in der Kapillare mittels UV- oder Fluoreszenz-Detektor möglich, ähnlich zu anderen instrumentellen Methoden wie der Chromatographie. Üblicherweise besteht die Kapillare aus Quarzglas mit einer Polyimid-Beschichtung, deren Zweck es ist, die Kapillare vor Bruch zu schützen und das Einspannen der Kapillare in das Gerät zu ermöglichen. Um die Lichtdurchlässigkeit und damit eine online-Detektion zu ermöglichen, muss die Polyimid-Beschichtung am Detektionsfenster – der Teil der Kapillare, der sich im Strahlengang befindet – entfernt werden. Die Detektion erfolgt in der Regel kathodenseitig, ein allgemeiner Aufbau ist in Abb. 31 dargestellt ^[146].

Ein weiterer Effekt, den man sich für die Trennung in der Kapillarelektrophorese zunutze macht, ist der elektroosmotische Fluss (EOF). Der EOF sorgt dafür, dass nicht nur Kationen detektiert werden können, die durch ihre Ladung in Richtung des Detektors wandern, sondern auch ungeladene Teilchen bzw. Anionen, die sich in die entgegengesetzte Richtung (Richtung Anode) bewegen ^[146].

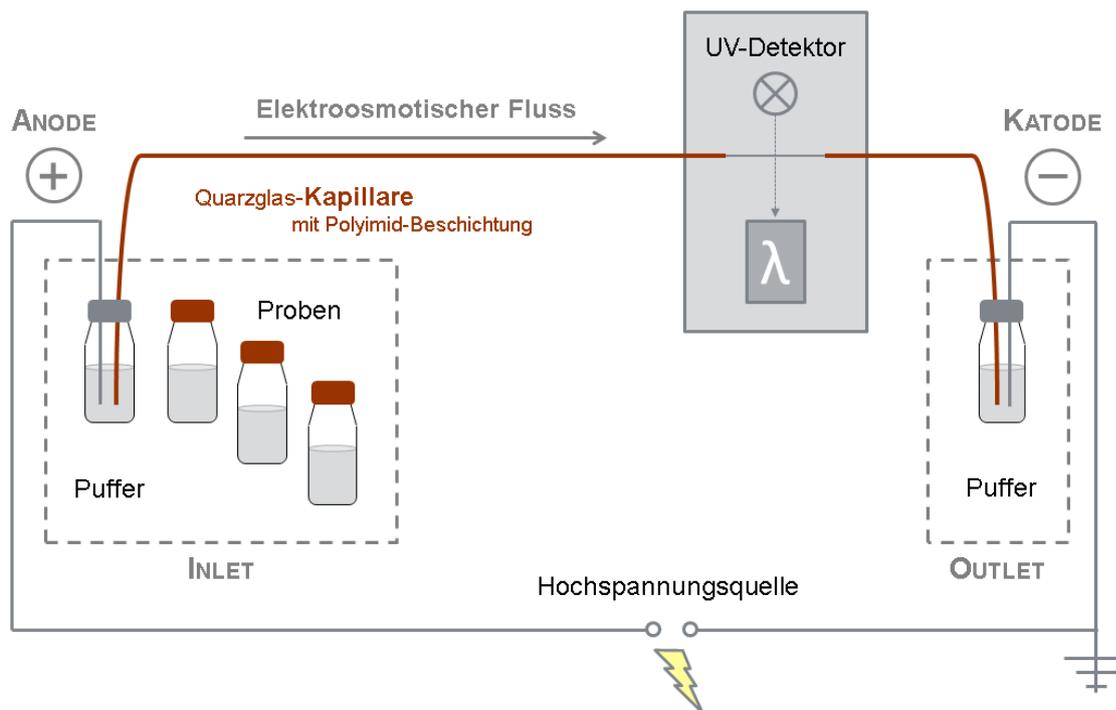


Abb. 31: Schematischer Aufbau einer Kapillarelektrophorese-Apparatur, in Anlehnung an Engelhardt ^[146]

Die Silanolgruppen der Quarzglas-Kapillare an der Innenseite der Kapillarwand sind bei einem pH-Wert > 2 teilweise deprotoniert. Dadurch erhält das Innere der Kapillarwand eine negative Ladung. An diese negative Ladung lagern sich die positiv geladenen Pufferbestandteile u.a. Na^+ -Ionen an. Dabei entstehen zwei Schichten, die innere und die äußere Sternschicht ^[151]. In der inneren, starren Grenzschicht ist der Abstand zwischen den positiv geladenen Ionen und der negativ geladenen Wand so gering und die Anziehung bzw. das Potential so groß, dass die Kationen fest adsorbiert sind und auch durch das Anlegen der Spannung nicht bewegt werden können. Je größer der Abstand zwischen der negativ geladenen Kapillarwand und den Kationen des Puffers, desto geringer wird die elektrostatische Wechselwirkung. In dieser äußeren, diffusen Grenzschicht ist die Anziehung zwischen Kationen und Kapillarwand jedoch so schwach, dass die Kationen aus dem Puffer durch ihre Ladung beim Anlegen der Trennungsspannung zur Kathode hin beschleunigt werden. Bei ihrer Wanderung in Richtung Kathode ziehen die Kationen die Anionen aus dem Puffer mit sich, die mit den Kationen zusammen die diffuse Doppelschicht bilden. Zusätzlich werden durch den osmotischen Druck auch die Wassermoleküle im Puffer beschleunigt und durch die Wanderung der Kationen mitgezogen. Letztendlich wird dadurch der gesamte Inhalt der Kapillare in Richtung Kathode transportiert: Kationen erfahren durch den EOF eine zusätzliche Beschleunigung in Richtung Kathode und ungeladene Moleküle wandern ausschließlich mit dem EOF. Anionen werden zur Anode hin beschleunigt, wandern aber durch den EOF in Richtung Kathode und sind damit detektierbar, sofern die Beschleunigung durch den EOF die Anziehung in Richtung Anode überwiegt ^[146].

Die Wanderung der Moleküle innerhalb der Kapillare wird damit durch zwei Effekte beeinflusst: Zum einen werden alle Teilchen in der Kapillare, sowohl Analyten wie auch Pufferbestandteile durch den EOF zur Kathode hin bewegt. Zum anderen erfahren alle geladenen Teilchen durch das elektrische Feld je nach Ladungszustand und Größe eine Beschleunigung zur Kathode bzw. Anode.

Zur Charakterisierung der Beweglichkeit der Moleküle im elektrischen Feld wird die elektrophoretische Mobilität μ verwendet, die von der Größe und Ladung des Teilchens und der Viskosität des Trennpuffers abhängig ist ^[146].

$$(14) \quad \mu_{\text{app}} = \frac{z \cdot F}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta \cdot N_A}$$

In der Gleichung ist μ_{app} die scheinbare elektrophoretische Mobilität der Analyten, F die Faraday Konstante, N_A die Avogadro Zahl und η die dynamische Viskosität des Trennpuffers; z stellt die effektive Ladung und r den Stokeschen Radius des geladenen Analyten dar.

Die elektrophoretische Mobilität steht weiterhin im direkten Zusammenhang zur Migrationszeit t_M der Analyten, der Länge der Kapillare und der angelegten Spannung U bzw. der elektrischen Feldstärke E ^[146]:

$$(15) \quad \mu_{\text{app}} = \frac{l_{\text{eff}}}{E \cdot t_M} = \frac{L_{\text{ges}} \cdot l_{\text{eff}}}{U \cdot t_M}$$

Dabei gehen sowohl die Gesamtlänge der Kapillare L_{ges} als auch die effektive Kapillarlänge l_{eff} , von Inlet bis zum Detektorfenster, in die Gleichung mit ein. Die Gesamtlänge der Kapillare wird berücksichtigt, da das elektrische Feld über die gesamte Kapillare anliegt, wohingegen der Analyt bereits bei der effektiven Kapillarlänge detektiert wird und sich die Migrationszeit somit auf die effektive Länge der Kapillare bezieht. μ_{app} ist dabei die scheinbare Mobilität der Analyten, die experimentell beobachtet wird. Da die Teilchen innerhalb der Kapillare sowohl durch das elektrische Feld als auch durch den EOF beschleunigt werden, erhält man durch Korrektur um die durch den EOF bedingte Mobilität μ_{EOF} die effektive elektrophoretische Mobilität μ_i .

$$(16) \quad \mu_i = \mu_{\text{app}} - \mu_{\text{EOF}}$$

Indem der osmotische Druck des EOFs auf alle Wassermoleküle in der Kapillare gleichermaßen wirkt, erhält man ein stempelförmiges Flussprofil. Dieses Flussprofil sorgt für sehr schmale Peaks und ermöglicht eine bessere Trennung und höhere Selektivität als das laminare Flussprofil der Chromatographie ^[146].

Da bei der Kapillarelektrophorese direkt in der Kapillare detektiert wird, die einen Innendurchmesser von 50 – 100 μm hat, ist jedoch die Sensitivität durch den kürzeren Lichtweg im Vergleich zur Chromatographie deutlich geringer ^[146].

Ein weiterer Vorteil der Kapillarelektrophorese im Vergleich zur Chromatographie ist, dass für unterschiedliche Trennprobleme keine unterschiedlichen stationären Phasen nötig sind.

Durch die entsprechenden Pufferzusätze im Trennpuffer können in derselben Kapillare unterschiedlichste Trennungen durchgeführt werden.

So ermöglicht der Zusatz von Tensiden wie SDS (Natriumdodecylsulfat) die Trennung von ungeladenen Stoffen. Die Trennung erfolgt in Abhängigkeit von Lipophilie und Einlagerungswahrscheinlichkeit der Analyten in die Mizellen (Mizellare elektrokinetische Chromatographie, MEKC). Durch Zusatz von chiralen Selektoren zum Trennpuffer, wie den Cyclodextrinen oder bestimmten Proteinen, lassen sich mittels Kapillarelektrophorese auch Enantiomere trennen ^[146].

1.2 Bestimmung von Bindungsaffinitäten

Zur Untersuchung von Bindungsaffinitäten können unterschiedliche Versuchsmethoden in der Kapillarelektrophorese verwendet werden. Zum einen können Bestimmungsmethoden wie Hummel-Dreyer, Vacancy-Peak und Frontalanalyse eingesetzt werden, die ursprünglich mit chromatographischen Methoden entwickelt wurden ^[70-73,142]. Zum anderen finden Methoden wie die Affinitäts-Kapillarelektrophorese (ACE) und die *partial filling technique* Anwendung, die das Trennprinzip der Kapillarelektrophorese ausnutzen ^[73].

Die hohe Flexibilität der Trennmethoden durch unterschiedliche Pufferzusätze macht man sich in der ACE zunutze. So können nicht nur Tenside und chirale Selektoren dem Trennpuffer hinzugefügt werden, sondern auch Makromoleküle bzw. Liganden, deren Affinität untersucht werden soll. Je nach Versuchsaufbau kann entweder das Makromolekül oder der Ligand zum Trennpuffer hinzugefügt werden. Der jeweilig andere Bindungspartner wird als Probe injiziert und die Veränderung der Migrationszeit bzw. der elektrophoretischen Mobilität ausgewertet ^[95,152,153].

Für die Bestimmung des Ausmaßes der Plasmaproteinbindung wird humanes oder bovines Serumalbumin zum Trennpuffer hinzugefügt. Humanes Serumalbumin hat bei einem physiologischem pH-Wert von 7,4 eine negative Gesamtladung von etwa -15 pro Molekül ^[22,23] und wandert damit in Richtung Anode. Geht man bei dem zu untersuchenden Liganden von einem Alkaloid aus, so liegt dieses bei pH 7,4 am Amin teilweise protoniert vor. Als Kation wandert es durch die elektrokinetische Beschleunigung und den EOF in Richtung Kathode. Bindet das Alkaloid an Albumin, überwiegt bei der Wanderungsgeschwindigkeit des Ligand-Albumin-Komplexes die negative Ladung des Proteins. Durch das Gleichgewicht

zwischen gebundenem und freiem Wirkstoff, wandert das Ephedrin teilweise als Kationen und teilweise im Komplex mit Albumin, wodurch das Alkaloid durch die langsamere Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins insgesamt zurückgehalten wird. Bei Anwesenheit von Albumin im Trennpuffer hat das Alkaloid damit eine deutlich längere Migrationszeit im Vergleich zum Trennpuffer ohne Albumin.

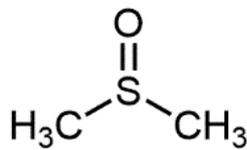
Die Bindung eines Liganden an ein Protein ist ein Gleichgewichtsprozess bei dem die Dauer, in der der Ligand an das Protein gebunden vorliegt, je nach Affinität variiert. Bei einer hohen Proteinbindung ist das Gleichgewicht zugunsten des Protein-Ligand-Komplexes hin verschoben. Da in der Regel die Ladung und Größe des Makromoleküls, im Vergleich zum niedermolekularen Liganden, deutlich überwiegen, wird der Ligand bei hoher Affinität zum Protein entsprechend stärker zurückgehalten und später detektiert, als eine Substanz, die nur geringfügig an das Protein bindet.

1.3 Allgemeiner Versuchsaufbau

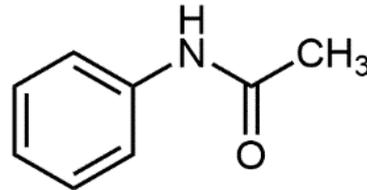
Wie oben erwähnt gibt es zwei prinzipielle Versuchsaufbauten für die Bestimmung der Bindungsaffinität zwischen Makromolekül und Ligand in der ACE. Entweder ist das Makromolekül im Trennpuffer enthalten und der Ligand wird als Probe injiziert oder umgekehrt. Die elektrophoretische Mobilität der als Probe injizierten Substanz sollte bei Bildung des Komplexes eine möglichst große Änderung erfahren, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Bei einem nur geringen Ausmaß an Proteinbindung kann die Aussagekraft der ACE daher ihre Grenzen haben. Da es sich bei Albumin um ein großes Molekül mit einer hohen negativen Nettoladung handelt, geht man davon aus, dass sich dessen Ladung und damit die elektrophoretische Mobilität von Albumin durch die Bindung der *Ephedra*-Alkaloide zu wenig ändert, um nachweisbar zu sein. Anders ist es jedoch bei den *Ephedra*-Alkaloiden. Diese wandern in ihrer ungebundenen Form als Kationen, im Komplex mit Albumin jedoch wie Anionen, da die Ladung und Größe von Albumin die der *Ephedra*-Alkaloide um ein vielfaches übertrifft. Die elektrophoretische Mobilität der *Ephedra*-Alkaloide sollte sich daher bei der Komplexierung deutlich stärker ändern als die des Albumins.

Daher wurde in diesem Versuchsaufbau Albumin als Trennpufferzusatz und die *Ephedra*-Alkaloide als Proben verwendet. Um Schwankungen in der Migrationszeit durch

minimale Änderungen des elektrischen Felds, des EOFs bzw. der Größe der Probenzone vernachlässigen zu können, ist bei der ACE ein EOF- bzw. Neutral-Marker in den Probelösungen enthalten. Bei dem EOF-Marker handelt es sich um eine ungeladene Substanz wie Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Acetanilid, die ausschließlich durch den EOF in Richtung Kathode wandert und dort detektiert wird ^[145,152,153]. Somit ist es durch Verwendung des EOF-Markers möglich die Geschwindigkeit des EOFs sichtbar zu machen.

**DMSO**

Dimethylsulfoxid
 $M_R = 78,1 \text{ g/mol}$

**Acetanilid**

N-Phenylacetamid
 $M_R = 135,2 \text{ g/mol}$

Um eine Affinitätskonstante K_A bestimmen zu können, reicht es nicht aus, nur eine Konzentration an Protein im Trennpuffer zu verwenden. Damit lässt sich nur die Aussage treffen, dass der mögliche Ligand bindet, falls sich seine Migrationszeit verändert. Zur Bestimmung des Ausmaßes der Plasmaproteinbindung müssen daher unterschiedliche Ligand-Protein-Verhältnisse analysiert werden, wie bei der diskontinuierlichen Ultrafiltration.

Bindet ein basischer und damit im Trennpuffer (pH 7,4) positiv geladener Wirkstoff selektiv an das negativ geladene Albumin, so sollte sich die Migrationszeit bei steigender Albuminkonzentration im Puffer entsprechend verlängern.

1.4 Berechnung der Plasmaproteinbindung

Zur Berechnung der Affinitätskonstanten K_A wird die elektrophoretische Mobilität μ verwendet. Da es sich bei der Bindung an Albumin um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, setzt sich die experimentell beobachtete effektive elektrophoretische Mobilität μ_i aus der Mobilität des Komplexes μ_c und der Mobilität des ungebundenem Liganden μ_f unter Berücksichtigung des ungebundenen Wirkstoffanteils f_u wie folgt zusammen ^[154]:

$$(17) \quad \mu_i = f_u \cdot \mu_f - (1 - f_u) \cdot \mu_c$$

Ausgehend von einer einzigen Bindestelle ergibt sich damit folgende Gleichung für die Affinitätskonstante K_A ^[155]:

$$(18) \quad K_A \cdot [A] = \frac{(\mu_f - \mu_i)}{(\mu_i - \mu_c)}$$

[A] stellt in der Gleichung die Konzentration an freiem Arzneistoff unter Gleichgewichtsbedingung dar. Mithilfe der oben genannten elektrophoretischen Mobilitäten und der variierenden Proteinkonzentration [HSA] kann die Auswertung analog zur diskontinuierlichen Ultrafiltration mittels linearer Regression anhand des Scatchard- oder Klotz-Plot erfolgen (siehe Kap. B.2.3).

Tab. 29: Graphische Bestimmung der Affinitätskonstante K_A in der ACE ^[95,96] mithilfe der elektrophoretischen Mobilitäten anhand der linearen Regressionsgeraden $y = ax + b$; a Steigung der Regressionsgeraden, b Schnittpunkt mit der y-Achse

	Scatchard-Plot	Klotz-Plot
Methode	x-reziprok	doppelt-reziprok
Gleichung	$\frac{(\mu_i - \mu_f)}{[HSA]} = K_A \cdot (\mu_c - \mu_f) - K_A \cdot (\mu_i - \mu_f)$	$\frac{1}{(\mu_i - \mu_f)} = \frac{1}{K_A \cdot (\mu_c - \mu_f)} \cdot \frac{1}{[HSA]} + \frac{1}{(\mu_c - \mu_f)}$
Graphische Darstellung	$\frac{(\mu_i - \mu_f)}{[HSA]}$ gegen $(\mu_i - \mu_f)$	$\frac{1}{(\mu_i - \mu_f)}$ gegen $\frac{1}{[HSA]}$
K_A	- a	$\frac{b}{a}$
n	$-\frac{b}{a}$	$\frac{1}{b}$

Unter der Voraussetzung, dass der Ligand an nur eine Bindeklasse ($m = 1$) mit gleichwertigen Bindestellen n auf dem Protein bindet, errechnet sich die Affinitätskonstante K_A aus der Steigung a bzw. dem Schnittpunkt mit der y-Achse b der Regressionsgeraden ($y = ax + b$) wie in Tab. 29 gezeigt.

Bei mehr als einer Bindeklasse m für die Bindestellen des Liganden auf dem Protein muss eine nicht-lineare Auswertung der Kurven, analog zur diskontinuierlichen Ultrafiltration, erfolgen.

Die elektrophoretische Mobilität, die zur Berechnung der Bindungsaffinität verwendet wird, ist jedoch stark abhängig von der dynamischen Viskosität η des Trennpuffers und der angelegten Spannung U – vgl. Gleichung (14) und (15).

Eine erhöhte Viskosität des Trennpuffers bewirkt eine Verlängerung der Migrationszeit aller in der Kapillare enthaltenen Teilchen. Durch die Variation der Proteinkonzentration im Trennpuffer kann sich die Viskosität des Trennpuffers und damit die elektrophoretische Mobilität der Substanzen ändern und dadurch die Ergebnisse für die Bindungsaffinität verfälschen.

Auch minimale Schwankungen bei der angelegten Spannung zwischen den verschiedenen Läufen können die Wanderungsgeschwindigkeit der Liganden verändern und dadurch das Ergebnis beeinflussen. Eine Veränderung der Viskosität bzw. der Spannung zeigt sich durch Schwankungen der Migrationszeit bzw. Mobilität des EOF-Markers, die auch bei zunehmender Bindung des Liganden an das Protein konstant sein sollten. Abhilfe schafft hier die Verwendung der Mobilitätsverhältnisse M ^[73,156]:

$$(19) \quad M = \frac{\mu_i + \mu_{\text{EOF}}}{\mu_{\text{EOF}}}$$

Die Gleichung (19) lässt sich weiter vereinfachen, sodass die Migrationszeiten des EOF-Markers t_{EOF} und des Liganden t_A zur Berechnung der Affinität verwendet werden können ^[156].

$$(20) \quad M = \frac{t_{\text{EOF}}}{t_A} + 1$$

Andere Faktoren wie die Viskosität, die Kapillarlänge und die angelegte Spannung haben damit keinen Einfluss mehr auf die berechnete Plasmaproteinbindung der Substanz. Dadurch eignet sich die Verwendung der Mobilitätsverhältnisse gut, um trotz starker Schwankungen des EOFs zuverlässige Ergebnisse zu erhalten ^[73]. Die Berechnung mithilfe von Scatchard- oder Klotz-Plot erfolgt entsprechend Tab. 30. ΔM stellt die Differenz der Mobilitätsverhältnisse des Analyten in An- und Abwesenheit von Albumin dar. ΔM_c ist der

Unterschied der Mobilitätsverhältnisse des freien Analyten und dem zu 100% gebundenen Analyten, analog zur Berechnung mittels elektropheretischer Mobilität in Tab. 29.

Tab. 30: Graphische Bestimmung der Affinitätskonstante K_A in der ACE mithilfe der Mobilitätsverhältnisse ^[73] anhand der lineare Regressionsgeraden $y = ax + b$; a Steigung der Regressionsgeraden, b Schnittpunkt mit der y-Achse

	Scatchard-Plot	Klotz-Plot
Methode	x-reziprok	doppelt-reziprok
Gleichung	$\frac{\Delta M}{[HSA]} = K_A \cdot \Delta M_C - K_A \cdot \Delta M$	$\frac{1}{\Delta M} = \frac{1}{K_A \cdot \Delta M_C} \cdot \frac{1}{[HSA]} + \frac{1}{\Delta M_C}$
Graphische Darstellung	$\frac{\Delta M}{[HSA]}$ gegen ΔM	$\frac{1}{\Delta M}$ gegen $\frac{1}{[HSA]}$
K_A	- a	$\frac{b}{a}$
n	$-\frac{b}{a}$	$\frac{1}{b}$

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

2.1 Zusätzlich verwendete Substanzen und Geräte

Die meisten für die ACE-Versuche eingesetzten Substanzen und Chemikalien wurden auch für die Ultrafiltrationsversuche verwendet. Die für die ACE-Versuche zusätzlich benötigten Substanzen sind im Folgenden aufgeführt.

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
Acetanilid, reinst	Grüssing GmbH (Filsum, Deutschland)
β -Cyclodextrin	Wacker Chemie AG (München, Deutschland)

2.1.2 Geräte

Für die Untersuchung mittels Affinitätskapillarelektrophorese wurde ebenfalls das P/ACE-MDQ Capillary Electrophoresis System der Firma Beckmann Coulter (München, Deutschland) mit PDA-Detektor verwendet. Sowohl der Probenraum wie auch die Kapillare sind temperierbar und ermöglichen die Messung bei Körpertemperatur.

2.2 Vermessene Liganden

Da die Ultrafiltrationsexperimente für die Enantiomere (-)-Ephedrin-HCl und (+)-Ephedrin x 0,5 H₂O die vielversprechendsten Ergebnisse gezeigt haben, wurden die beiden Ephedrin-Enantiomere zur Bestätigung der bestimmten Affinität zu Albumin zusätzlich mittels Affinitäts-Kapillarelektrophorese vermessen.

2.3 Trennpuffer

Als Trennpuffer für die ACE wird der gleiche Phosphatpuffer verwendet, der auch bei den Ultrafiltrationsexperimenten eingesetzt wurde. Um die Affinität der *Ephedra*-Alkaloide gegenüber Serumalbumin zu bestimmen, enthält der Trennpuffer zusätzlich humanes Serumalbumin in verschiedenen Konzentrationen.

Für die ersten Versuche mittels ACE wurde gebrauchsfertige HSA-Injektionslösung (Albunorm®, 20 % HSA) zur Herstellung des Trennpuffers verwendet. Die Injektionslösung wird entsprechend Tab. 31 verdünnt.

Tab. 31: Verdünnungsreihe ACE-Trennpuffer, 0,4 – 0,9 mM humanes Serumalbumin (HSA)

Konzentration / mM HSA	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
Volumen / μ L HSA-Lösung	1333	1667	2000	2333	2667	3000

Das jeweilige Volumen Injektionslösung wird dabei mit 1,0 mL Phosphatpufferkonzentrat (zehnfach konzentriert, 1,28 mol/L) versetzt und mit ca. 7 mL Millipore®-Wasser verdünnt. Der pH-Wert der Lösung wird kontrolliert, falls erforderlich mit 1 M Natronlauge bzw. 1 M Phosphorsäure eingestellt und mit Millipore®-Wasser auf 10,0 mL aufgefüllt.

Für die weiteren Versuche erfolgte die Herstellung der Trennpuffer aus gefriergetrocknetem Albumin. Dazu wird 400 mg gefriergetrocknetes humanes Serumalbumin in 2,0 mL Millipore®-Wasser gelöst, um zunächst eine 20%ige HSA-Stammlösung herzustellen. Das entsprechende Volumen Albumin-Stammlösung (siehe Tab. 32 und Tab. 33) wird wie oben beschrieben mit Pufferkonzentrat und Wasser ad 10,0 mL verdünnt.

Tab. 32: Verdünnungsreihe ACE-Trennpuffer, 25 – 75 μ M humanes Serumalbumin (HSA)

Konzentration / μ M HSA	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75
Volumen / μ L HSA-Lösung	83	100	117	133	150	167	183	200	217	233	250

Tab. 33: Verdünnungsreihe ACE-Trennpuffer, 2,5 – 25 μ M humanes Serumalbumin (HSA)

Konzentration / μ M HSA	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	17,5	20,0	22,5	25,0
Volumen / μ L HSA-Lösung	8	17	25	33	41	50	58	66	74	83

Nach vorsichtigem Mischen wird die Lösung filtriert (Spritzenvorsatzfilter, Celluloseacetat, 0,2 μ m) und in CE-Vials für die Messung abgefüllt. Die Vials mit dem Trennpuffer werden zur

Konditionierung mindestens 30 Minuten vor der Messung in das auf 37 °C temperierte Kapillarelektrophorese-Gerät gestellt.

2.4 Arzneistofflösung

Die fertige Probelösung enthält jeweils eines der beiden Ephedrin-Enantiomere in einer Konzentration von 5,0 mM. Zur Herstellung der Probelösung wird zunächst eine Stammlösung hergestellt. Für diese wird 40 mg des Enantiomers eingewogen und mit der entsprechenden Menge Millipore®-Wasser bei (-)-Ephedrin-HCl bzw. 0,1 M HCl bei (+)-Ephedrin-Hemihydrat verdünnt, um eine 100 mM konzentrierte Stammlösung zu erhalten.

Die Probelösung enthält neben einem der beiden Enantiomere zusätzlich als EOF-Marker Dimethylsulfoxid bzw. Acetanilid. Auch von den EOF-Markern werden zunächst Stammlösungen hergestellt, die jeweils 3 % Dimethylsulfoxid bzw. 6 mM Acetanilid in Millipore®-Wasser enthalten.

Für die fertige Probelösung wird das entsprechende Volumen der Stammlösung des jeweiligen Ephedrin-Enantiomers und der entsprechenden EOF-Marker-Stammlösung mit Phosphatpuffer verdünnt. Die Endkonzentration der Probelösung liegt bei 5 mM (-)-Ephedrin bzw. (+)-Ephedrin und 1 % DMSO bzw. 2 mM Acetanilid. Die Probelösung wird gut gemischt und vor dem Abfüllen in die CE-Vials genau wie die Trennpuffer filtriert.

2.5 Konditionierung der Kapillare

Die Konditionierung der Kapillare zu Beginn und Ende des Tages bzw. der Sequenz ist identisch mit der Konditionierung für die Quantifizierung der diskontinuierlichen Ultrafiltrationsproben (siehe Kap. B.5.9.2).

Da im Trennpuffer bei der ACE zusätzlich Albumin enthalten ist, wurden jedoch die Spülschritte vor jedem Lauf leicht modifiziert, um sicherzustellen, dass kein Albumin vom vorhergehenden Lauf in der Kapillare verbleibt. Auch bei den Spüllösungen gibt es Unterschiede, so wird aufgrund des enthaltenen Albumins 1 M Natronlauge statt der 0,1 M Natronlauge zum Spülen verwendet.

Bei der ACE wird die Kapillare vor jedem Lauf zunächst mit Druck (275,8 kPa, 40 psi) für zwei Minuten mit Millipore®-Wasser, zwei Minuten mit 2-Propanol, zwei Minuten mit Millipore®-Wasser, für vier Minuten mit 1 M Natronlauge und für zwei Minuten mit Millipore®-Wasser gespült. Anschließend wird die Kapillare vor der Injektion der Probe vier Minuten lang mit dem entsprechenden Trennpuffer gespült (137,9 kPa, 20 psi). Am Ende jedes Laufes wird die Kapillare erneut bei 137,9 kPa (20 psi) Druck für zwei Minuten mit Millipore®-Wasser gespült.

2.6 Versuchsablauf

Sowohl Probelösungen als auch Trennpuffer werden nach der Herstellung für mindestens 30 Minuten in dem Kapillarelektrophorese-Gerät auf 37 °C temperiert, bevor eine Messung erfolgt. Um die Bindungsaffinität des Liganden zu bestimmen, wird für jeden Lauf ein anderer Trennpuffer mit einer veränderten Albuminkonzentration verwendet. Die injizierte Probelösung ist hingegen immer dieselbe.

Die Methode für die Affinitäts-Kapillarelektrophorese sieht wie folgt aus:

Methode ACE:

Kapillare:	uncoated <i>fused silica</i> Kapillare, 50 µm Innendurchmesser, 40 cm / 50 cm Länge
Trennpuffer	127,7 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, + humanes Serumalbumin
Spannung:	10 kV
Temperatur:	37 °C
Injektion:	hydrodynamisch; 3,4 kPa (0,5 psi) für 10 Sekunden
Detektion:	UV; $\lambda = 210$ nm kathodenseitig
Dauer:	25 Minuten

ERGEBNISSE

Die Bestimmung der Bindungsaffinität von Ligand zu Protein erfolgt bei der Affinitäts-Kapillarelektrophorese über eine Veränderung der Migrationszeit bzw. der elektrophoretischen Mobilität des Liganden in Anwesenheit des Makromoleküls. Da es sich bei den *Ephedra*-Alkaloiden um basische Substanzen handelt, die bei physiologischem pH-Wert positiv geladen sind, wandern diese in der Kapillarelektrophorese vor dem Elektroosmotischen Fluss. Denn Kationen werden sowohl durch das elektrische Feld wie auch den EOF zur Kathode hin beschleunigt und haben daher kurze Migrationszeiten und hohe elektrophoretische Mobilitäten.

Albumin hingegen wandert durch seine Größe und die hohe negative Ladung durch die EOF nur langsam in Richtung Kathode und verlängert dadurch die Migrationszeit der gebundenen Liganden in Abhängigkeit von der Bindungsaffinität.

3.1 Veränderungen des EOFs

Da die Bindungsaffinität letztendlich über eine Veränderung der Migrationszeiten des Liganden bestimmt wird, müssen Migrationszeitveränderungen aufgrund von Unterschieden im Elektroosmotischen Fluss ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund werden bei der Affinitäts-Kapillarelektrophorese EOF-Marker verwendet, um diese Schwankungen schlussendlich vernachlässigen zu können.

Veränderungen des EOFs können in der Kapillarelektrophorese unterschiedliche Gründe haben. Hierbei ist insbesondere die Zusammensetzung des Trennpuffers entscheidend, da die Faktoren Temperatur und Spannung in der verwendeten Methode festgelegt sind und durch das Kapillarelektrophorese-Gerät kontrolliert und gesteuert werden.

Für eine gute Vergleichbarkeit der Messergebnisse zwischen den verschiedenen orthogonalen Methoden, hatte der Trennpuffer für die ACE dieselbe Endkonzentration (127,7 mM) und denselben pH-Wert (7,4) wie der Phosphatpuffer bei den beiden Ultrafiltrationsmethoden. Um sicherzustellen, dass der EOF nicht durch sich verändernde pH-Werte bzw. Ionenstärken der Trennpuffer beeinflusst wird, wird für die Herstellung der Trennpuffer immer dasselbe Phosphatpufferkonzentrat verwendet.

3.2 Versuchsbedingungen

Ziel des Versuches war die Bestimmung der Affinität der *Ephedra*-Alkaloide zu humanem Serumalbumin mittels Affinitätskapillarelektrophorese. Dazu wurden zunächst nur die zwei Ephedrin-Enantiomere (-)-Ephedrin und (+)-Ephedrin untersucht.

Der Versuchsaufbau ist bei der ACE in der Regel so gewählt, dass das Makromolekül im Trennpuffer enthalten ist und der Ligand als Probe injiziert wird. Dabei wird die Konzentration des Proteins im Trennpuffer variiert und die Konzentration des Liganden konstant gehalten. Diese Herangehensweise wurde auch für die Untersuchung zur Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide gewählt.

Bei der Durchführung der Messung wurde dieselbe Probelösung (5 mM) des jeweiligen Enantiomers mehrfach injiziert. Es wurde aber für jeden Lauf ein Trennpuffer mit verschiedenen Konzentrationen an humanem Serumalbumin verwendet. Die sich verändernde Migrationszeit des Liganden wird dokumentiert und entsprechend den klassischen graphischen Methoden nach Scatchard und Klotz ausgewertet ^[73,155].

Die gemessenen Veränderungen in der Migrationszeit des Liganden dürfen ausschließlich auf eine Retardierung durch die Komplexbildung mit dem Albumin zurückzuführen sein und nicht durch Veränderungen des EOFs verursacht werden. Bei der Herstellung der Trennpuffer und der Durchführung der Messung muss daher sichergestellt werden, dass sich die Einflussfaktoren Ionenstärke, pH-Wert und Temperatur zwischen den unterschiedlichen Läufen nicht wesentlich verändern.

Eine gleichbleibende Ionenstärke und der konstante pH-Wert werden dadurch sichergestellt, dass bei der Herstellung der Trennpuffer die verwendete Albuminlösung für alle Trennpuffer mit demselben Pufferkonzentrat und Millipore®-Wasser verdünnt wird, statt mit dem fertigen Phosphatpuffer aus den Ultrafiltrationsversuchen. Eine konstante Ionenstärke und pH-Wert des Trennpuffers sind wichtig, da diese Einfluss auf den EOF und damit auf die Trennung und die Migrationszeit der Analyten haben. Eine höhere Ionenstärke führt zu einer Verlangsamung des EOFs, wohingegen eine Änderung beim pH-Wert die Ladung der Liganden und damit deren Migrationszeit verändern kann ^[146].

Um Temperaturschwankungen zu vermeiden, werden sowohl Probelösung wie auch Trennpuffer nach der Herstellung für mindestens 30 Minuten in der Kapillarelektrophorese auf 37 °C temperiert, bevor eine Messung erfolgt.

3.3 Messergebnisse

Die ersten Versuche zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung mittels ACE wurden bei einer Konzentration von 0,4 – 0,9 mM HSA im Trennpuffer durchgeführt, die den *in vivo* vorherrschenden Konzentrationsbereich von HSA im Serum abdeckt. Als EOF-Marker wurde DMSO verwendet. Diese Messungen ergaben keine auswertbaren Elektropherogramme, da die Absorption der Trennpuffer durch den HSA-Zusatz zu hoch war. Die Elektropherogramme zeigten eine stark schwankende Basislinie ohne erkennbare Peaks von Ephedrin oder dem EOF-Marker.

Da die Bestimmung der Proteinbindung bei diesen HSA-Konzentrationen nicht möglich war, wurde im zweiten Schritt die Konzentration des Albumins im Trennpuffer auf 25 – 75 µM erniedrigt. Als EOF-Marker wurde weiterhin 1% DMSO verwendet. Außerdem wurde die Herstellungsweise der Trennpuffer geändert. Die Herstellung der Trennpuffer erfolgte bei den ersten Versuchen mithilfe einer gebrauchsfertigen 20%igen HSA-Injektionslösung (Albunorm®, 200 mg/mL HSA). Diese gebrauchsfertige HSA-Lösung enthält neben HSA auch Natrium- und Kaliumsalze für die Isotonie der Injektionslösung. Um auszuschließen, dass die variabel zugesetzten Volumina der verwendeten HSA-Lösung die Ionenstärke der Trennpuffer beeinflusst, wurden die Trennpuffer für die weiteren Versuche mit gefriergetrocknetem HSA statt der fertigen Injektionslösung hergestellt. Die Messung wurde jeweils dreimal für beide Ephedrin-Enantiomere durchgeführt.

Die Elektropherogramme zeigten bei diesen HSA-Konzentrationen eindeutige Peaks für Ephedrin und DMSO und ein weitaus geringeres Basislinienrauschen. Bei diesen Versuchen wurde sowohl für (-)-Ephedrin, wie auch für (+)-Ephedrin eine Verlangsamung der Migrationszeit bzw. Abnahme der elektrophoretischen Mobilität bei steigender HSA-Konzentration im Trennpuffer beobachtet. Diese Veränderung zeigte sich jedoch auch bei der Migrationszeit bzw. Mobilität von DMSO (siehe Abb. 32).

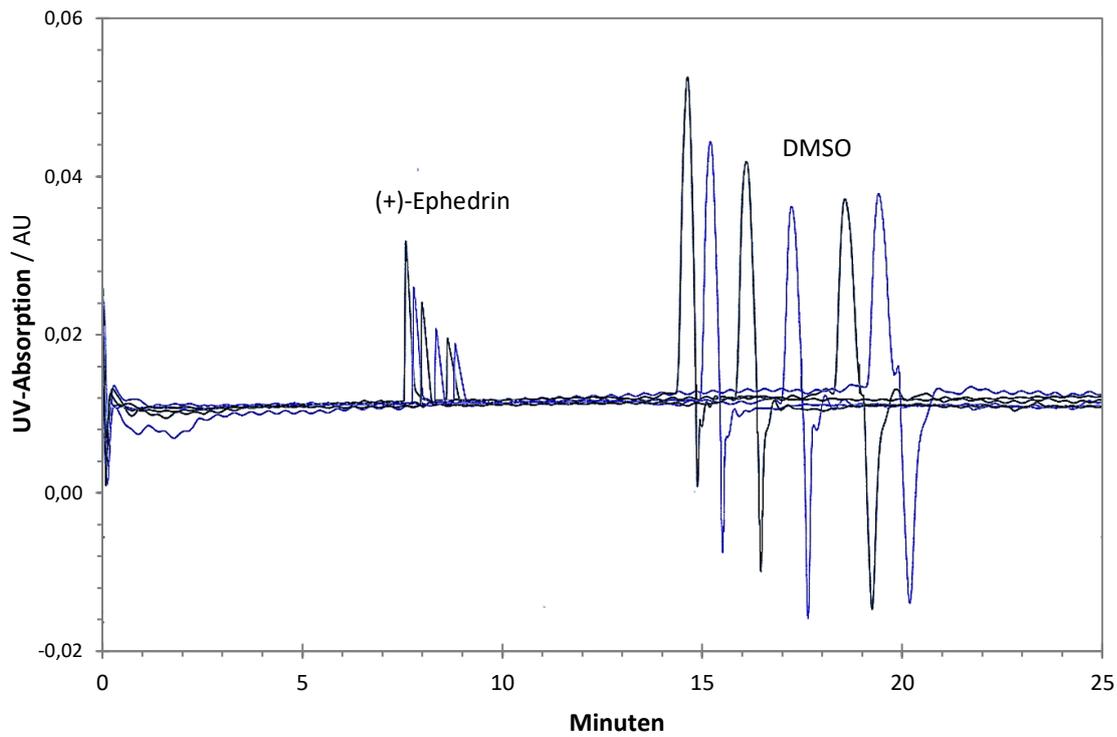


Abb. 32: Elektropherogramme von (+)-Ephedrin mit DMSO als EOF-Marker, 25 – 75 μM HSA

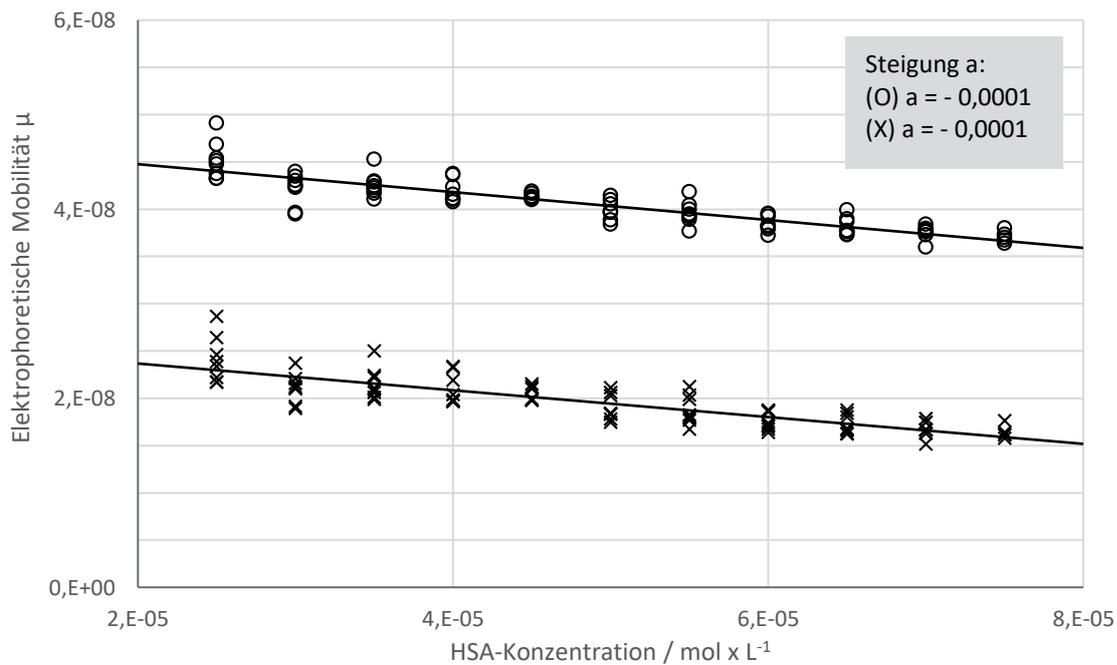


Abb. 33 A: Änderung der elektrophoretischen Mobilität vom EOF und (-)-Ephedrin; μ_{app} (o) von (-)-Ephedrin im Vergleich zu μ_{EOF} (x) von DMSO, in Abhängigkeit von der HSA-Konzentration im Trennpuffer; 25 – 75 μM HSA

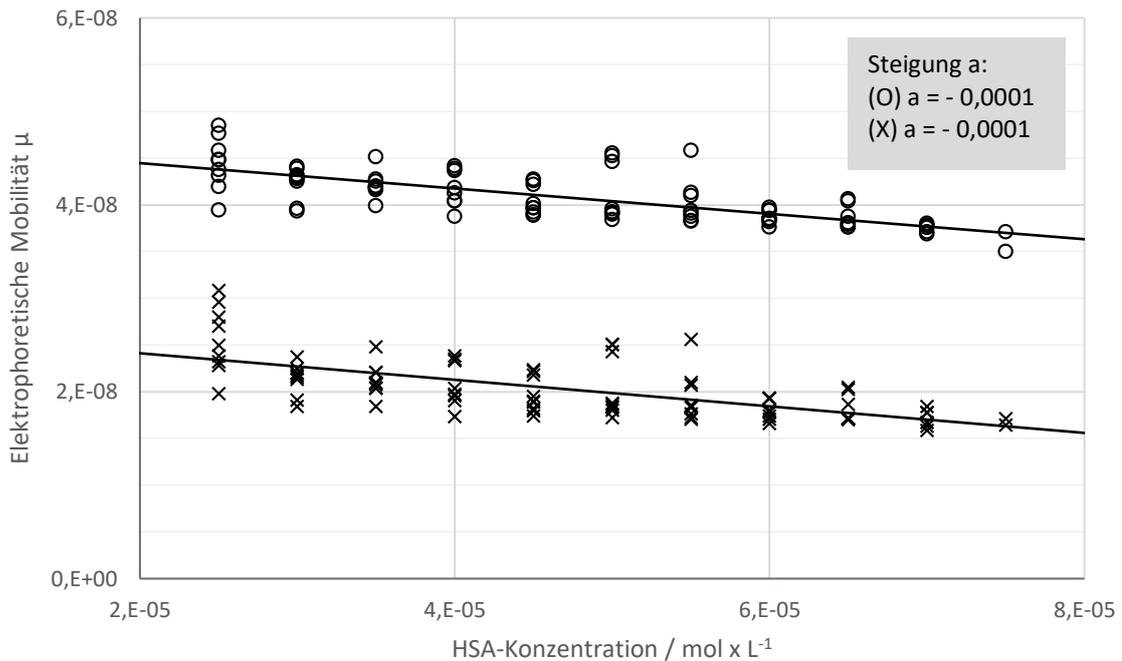


Abb. 33 B: Änderung der elektrophoretischen Mobilität vom EOF und (+)-Ephedrin; μ_{app} (o) von (+)-Ephedrin im Vergleich zu μ_{EOF} (x) von DMSO, in Abhängigkeit von der HSA-Konzentration im Trennpuffer; 25 – 75 μM HSA

Bei genauerer Betrachtung der elektrophoretischen Mobilitäten konnte festgestellt werden, dass sich die Mobilität der Liganden und des EOF-Marker gleichermaßen ändert. Bei der Darstellung der Mobilität gegenüber der HSA-Konzentration im Trennpuffer ergeben sowohl die scheinbare Mobilität μ_{app} der Liganden und als auch die Mobilität μ_{EOF} von DMSO Geraden mit identischer Steigung (siehe Abb. 33 A und B, $a = - 0,0001$).

Bindet der Ligand an das Plasmaprotein, so sollte sich seine elektrophoretische Mobilität aber stärker ändern als die des EOF-Markers. Daher war eine Berechnung der Plasmaproteinbindung über die Änderung der elektrophoretischen Mobilität nicht möglich. Sowohl Scatchard- wie auch Klotz-Plot ergaben keine auswertbaren Kurven.

Die starken Migrationszeitveränderungen des EOF-Markers lassen darauf schließen, dass andere Einflussfaktoren wie die Viskosität der Trennpuffer letztendlich für die Verlangsamung der Migrationszeiten von Ligand und EOF-Marker verantwortlich sind. Die steigende Konzentration an HSA im Trennpuffer erhöht die Viskosität der Puffer entsprechend. Wie in Gleichung (14) ersichtlich führt allein die Erhöhung der Viskosität zu einer Erniedrigung der elektrophoretischen Mobilität. Um diesen Einfluss der Viskosität bei der Berechnung der Plasmaproteinbindung vernachlässigen zu können, wurde für die

Auswertung zusätzlich das Mobilitätsverhältnis M statt der elektrophoretischen Mobilität μ verwendet ^[73,155], siehe dazu Kap. C.1.4.

Eine Auswertung mittels Scatchard- und Klotz-Plot war in diesem Fall prinzipiell möglich, jedoch ist durch die starke Streuung der Messwerte die Aussagekraft der Ergebnisse mehr als fraglich. Die berechneten Ergebnisse bei den drei Messungen von (-)-Ephedrin liegt beispielsweise zwischen 21,4 % und 91,2 % Plasmaproteinbindung mit 2 bis 21 errechneten Bindestellen. Durch die sehr niedrigen eingesetzten HSA-Konzentrationen kommt es zu einer stärkeren Gewichtung kleinster Migrationszeitänderungen bzw. Messungenauigkeiten, wodurch die teilweise sehr hohen berechneten Proteinbindungen zu erklären sind.

Die steigende Viskosität der Trennpuffer bei steigender Albuminkonzentration war vermutlich die Ursache für die starke Veränderung des EOFs. Deshalb wurden die Versuche mit noch niedrigeren Albuminkonzentrationen im Trennpuffer (5 – 25 μM) wiederholt, um den Einfluss der Viskosität auf die Migrationszeit zu verringern. Aufgrund der sich je nach HSA-Konzentration verändernden Peakform des DMSO wurde zusätzlich ein anderer EOF-Marker (Acetanilid) verwendet.

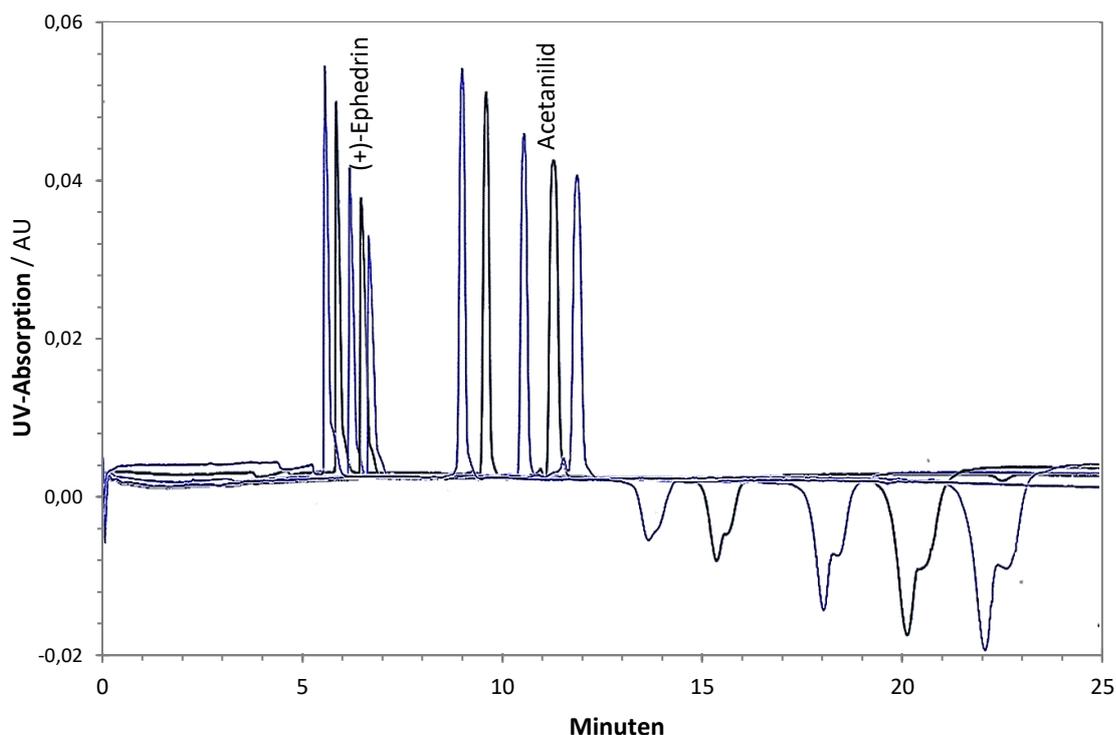


Abb. 34: Elektropherogramme von (+)-Ephedrin mit Acetanilid als EOF-Marker, 5 - 20 μM HSA

Auch bei dem sehr niedrig konzentrierten HSA zeigt sich dasselbe Bild wie zuvor. Es ist erneut eine Veränderung der Migrationszeiten sowohl der Ephedrine wie auch des DMSO zu sehen (siehe Abb. 34). Es überwiegt jedoch erneut die Migrationszeitänderung des EOF-Markers. Die Änderung der elektrophoretischen Mobilität ist wie bei den vorhergehenden Versuchen für Ligand und EOF-Marker identisch.

Eine Auswertung über die elektrophoretische Mobilität mittels Scatchard- und Klotz-Plot war auch bei diesen HSA-Konzentrationen nicht möglich. Die Auswertung über die Mobilitätsverhältnisse ist durch die breite Streuung der Werte wiederum fraglich.

Weiterhin fällt bei diesen Messungen auf, dass im hinteren Bereich des Elektropherogramms ein negativer Doppelpeak sichtbar ist, der mit zunehmender HSA-Konzentration steigt. Gleichzeitig nehmen die Flächen von Ephedrin und Acetanilid bei steigender HSA-Konzentration ab.

3.4 Diskussion

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine zuverlässige Bestimmung der Plasmaproteinbindung der Ephedrin-Enantiomere mittels Affinitätskapillarelektrophorese nicht möglich war. Daher wurde auf eine weitere Untersuchung der Pseudoephedrin-Isomere verzichtet.

Die fehlende Auswertbarkeit der Versuchsreihe hat verschiedene Ursachen. Zunächst ist eine Messung bei physiologischen HSA-Konzentrationen wegen des starken Hintergrundrauschens durch die hohe UV-Absorption der HSA-Trennpuffer nicht durchführbar. Daher musste bei deutlich niedrigeren HSA-Konzentrationen gemessen werden, die bei 1/10 bzw. 1/100 der physiologischen HSA-Konzentration liegen.

Es konnte zwar bei beiden Konzentrationsbereichen eine Veränderung der Migrationszeit der Liganden beobachtet werden, jedoch war die Änderung der elektrophoretischen Mobilität von Ligand und EOF-Marker identisch. Diese Änderung ist daher eher auf Einflussfaktoren wie eine steigende Viskosität der Trennpuffer als auf eine Verlangsamung durch die Affinität zu Albumin zurückzuführen. Auch eine Auswertung über die Mobilitätsverhältnisse, wodurch Änderungen des EOF vernachlässigt werden können, führte zu keinem aussagekräftigen Ergebnis.

Geht man davon aus, dass der im hinteren Teil des Elektropherogramms erscheinende negative Doppelpeak durch den Komplex von HSA und Ligand bzw. HSA und EOF-Marker bedingt ist, lässt sich diese Peakfläche nicht zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung verwenden. Der negative Peak im Elektropherogramm ist auf eine veränderte UV-Absorption des Albumin-Ephedrin-Komplexes im Vergleich zum freien Albumin zurückzuführen. Durch die Komplexierung ändert sich die Hintergrundabsorption des Trennpuffers, was sich in einem negativen Peak bemerkbar, der auch bei der „Vacany Peak“-Methode^[73] auftritt. Eine Quantifizierung des gebundenen Liganden ist nicht möglich, da der Absorptionskoeffizient des Komplexes nicht mit dem des freien Ephedrins übereinstimmt. Eine Bestimmung des Absorptionskoeffizienten des Komplexes ist durch das vorliegende, sich immer neu einstellende Gleichgewicht praktisch nicht durchführbar.

Letztendlich lässt sich sagen, dass die Affinitätskapillarelektrophorese für die Bestimmung sehr niedriger Plasmaproteinbindungen, wie es bei den *Ephedra*-Alkaloiden der Fall ist, nicht geeignet ist. Um die Plasmaproteinbindung mittels ACE zuverlässig bestimmen zu können, müsste sich die Migrationszeit bzw. elektrophoretische Mobilität des Liganden stärker ändern, als es bei den *Ephedra*-Alkaloiden der Fall ist. Bei so geringen Änderungen hat die Messungenauigkeit einen viel zu großen Einfluss, um tatsächlich aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.



NMR-SPEKTROSKOPIE

METHODE

1.1 Messprinzip

Das Messprinzip der Kernspinresonanzspektroskopie oder NMR-Spektroskopie (*engl.* nuclear magnetic resonance) besteht darin, dass sich die positiv geladenen Atomkerne innerhalb eines Magnetfelds ausrichten, sofern sie durch ihre Zusammensetzung aus Protonen und Neutronen einen Eigendrehimpuls P und damit ein magnetisches Moment μ besitzen.

Durch Anregung der Atome bzw. Moleküle mithilfe von Radiowellen in der jeweiligen Resonanzfrequenz der Atomkerne, auch Larmorfrequenz ω genannt, wird die Orientierung dieser Atomkerne im Magnetfeld kurzfristig geändert. Nach kurzer Zeit fallen die Kerne durch Relaxationsprozesse zurück in den energetisch günstigeren Grundzustand und geben dabei die aufgenommene Energie nach und nach wieder ab. Durch Fourier-Transformation kann diese Abnahme der freiwerdenden Energie (FID, free induction decay) entsprechend umgewandelt werden und man erhält ein auswertbares Spektrum mit Signalen, die der Resonanzfrequenz ω der verschiedenen Atomkerne entsprechen.

Da die Aufspaltung der Signale und die entsprechende Larmorfrequenz ω bzw. chemische Verschiebung δ der Kerne stark von der Umgebung und Abschirmung der Kerne abhängig sind, können damit Rückschlüsse auf die Molekülstruktur und den Abstand der einzelnen Kerne zueinander getroffen werden ^[112,157]. Die für die Strukturaufklärung organischer Verbindungen wohl bedeutendsten Kerne in der NMR-Spektroskopie sind ^1H und ^{13}C , die in allen organischen Strukturen enthalten sind.

1.2 Untersuchung der Bindungen zwischen Molekülen

Die Bindung zweier Moleküle verändert auch die chemische Umgebung der einzelnen Atomkerne beider Substanzen, was sich in den NMR-Spektren bemerkbar macht. Die Informationen zur Molekülstruktur und dem Abstand der einzelnen Kerne, die die NMR-Spektroskopie liefert, beschränken sich dabei jedoch nicht nur auf die Atomkerne innerhalb eines Moleküls. Auch der Abstand der Atomkerne zweier Moleküle innerhalb eines Komplexes lässt sich mittels NMR-Spektroskopie bestimmen.

Daher ist die NMR-Spektroskopie eine sehr informative Methode zur Untersuchung von Interaktionen zwischen verschiedenen Molekülen, wie beispielsweise den Wirkstoff-Protein-Komplexen bei der Plasmaproteinbindung. Die NMR-Spektroskopie hat im Vergleich zu den anderen verwendeten Methoden den Vorteil, dass sie nicht nur Informationen zur Stärke der Bindung liefert, sondern dass mithilfe der NMR-Spektroskopie auch die an der Bindung beteiligten Strukturen im Protein bzw. Ligand identifiziert werden können [76].

1.2.1 Änderungen im Spektrum

Bereits in einem einfachen ^1H -NMR-Spektrum sind Veränderungen aufgrund von Bindungsvorgängen erkennbar, da sich die chemische Umgebung der beiden Bindungspartner ändert, sobald der Wirkstoff mit dem Protein in Wechselwirkung tritt. Diese Änderung in der chemischen Umgebung verursacht einerseits eine Änderung der chemischen Verschiebung der Signale, je nachdem ob die Kerne durch den Komplex stärker abgeschirmt oder entschirmt werden. Zum anderen kann durch die veränderte Umgebung und die Komplexbildung teilweise auch die Bewegung der Kerne eingeschränkt sein. In diesem Fall kommt es zur Änderung der transversalen Relaxationszeit T_2 und damit zu einer Verbreiterung des Signals.

Die Änderungen in der chemischen Verschiebung ermöglicht es, die Teile des Moleküls zu identifizieren, die direkt an der Komplexbildung beteiligt sind. Nicht spezifische Bindungen verursachen nur sehr geringe Änderungen [76,77].

1.2.2 Veränderte Stoffeigenschaften

Doch nicht nur die Spektren der Substanzen verändern sich durch die Bindung an die Plasmaproteine. Auch die Stoffeigenschaften der Bindungspartner können sich durch die Komplexbildung verändern.

So verändert sich beispielsweise die Diffusion des gebundenen Arzneistoffmoleküls im Vergleich zum freien Wirkstoff. Gerade bei der Bindung von niedermolekularen Stoffen an Makromoleküle, wie es bei der Plasmaproteinbindung von zahlreichen Arzneistoffen der Fall ist, kann die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten D eine Möglichkeit darstellen, die Plasmaproteinbindung einer Substanz zu charakterisieren. Der Diffusionskoeffizient D einer Substanz kann unter anderem mittels NMR-Diffusionsexperimenten bestimmt werden.

Entsprechend der Stokes-Einstein-Gleichung (siehe Gleichung (21)) zeigen niedermolekulare Stoffe durch ihre geringe Größe eine schnelle Selbstdiffusion. Kleine Moleküle, wie der Wirkstoff Ephedrin bewegen sich schnell in Lösung und haben daher einen großen Diffusionskoeffizienten D . Makromoleküle wie die Plasmaproteine bewegen sich nur langsam in Lösung und haben entsprechend einen kleinen Diffusionskoeffizienten D .

$$(21) \quad D = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot R_0}$$

Laut Stokes-Einstein-Gleichung ist der Diffusionskoeffizient D einer Substanz abhängig von der Boltzmann-Konstante k_B , der Viskosität η und der Temperatur T der Lösung und vom hydrodynamischen Radius R_0 des Teilchens.

Bei der Bindung des Arzneistoffs an das Plasmaprotein überwiegt bei niedermolekularen Liganden dabei die Größe des Proteins. Somit entspricht auch der Diffusionskoeffizient des Komplexes weitestgehend dem von Albumin, da die Größe des Albumins hier größeren Einfluss auf den Diffusionskoeffizienten hat als die Größe des Liganden ^[77,89,158].

1.3 Berechnung der Plasmaproteinbindung

1.3.1 Änderungen der chemischen Verschiebung

Zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung einer Substanz können ^1H -NMR-Spektren von Probelösungen mit verschiedenen Ligand-Protein-Verhältnissen herangezogen werden. Je nach Geschwindigkeit der Komplexbildung lassen sich in An- und Abwesenheit des Plasmaproteins Veränderungen im Spektrum beobachten. Man unterscheidet bei Komplexen zwischen einer schnellen, mittleren oder langsamen Austauschrate bzw. Gleichgewichtseinstellung.

Bei einer langsamen Komplexbildung sind in den Spektren jeweils zwei Signale der beteiligten Atomkerne mit unterschiedlicher chemischer Verschiebung erkennbar. Ein Signal wird durch den freien Liganden und das zweite Signal durch den gebundenen Liganden hervorgerufen (siehe Abb. 35). Die Intensität der beiden Signale verändert sich dabei je nach Anteil der gebundenen bzw. freien Form. Eine Bestimmung der Bindungsstärke kann in diesem Fall über die Veränderung der Signalintensität erfolgen.

Bei Protein-Ligand-Wechselwirkungen mit einer schnellen Austauschrate ist hingegen weiterhin nur ein einziges Signal im Spektrum sichtbar. Die chemische Verschiebung dieses Signals verändert sich dabei je nach Sättigungsgrad des Proteins. Die Intensität des Signals bleibt jedoch weitestgehend unverändert (siehe Abb. 35). Daher ist es bei Komplexbildungen mit schneller Gleichgewichtseinstellung möglich die Bindungsaffinität über die Veränderung der chemische Verschiebung des Signals zu quantifizieren ^[77].

Schnelle Gleichgewichtseinstellung

Langsame Gleichgewichtseinstellung

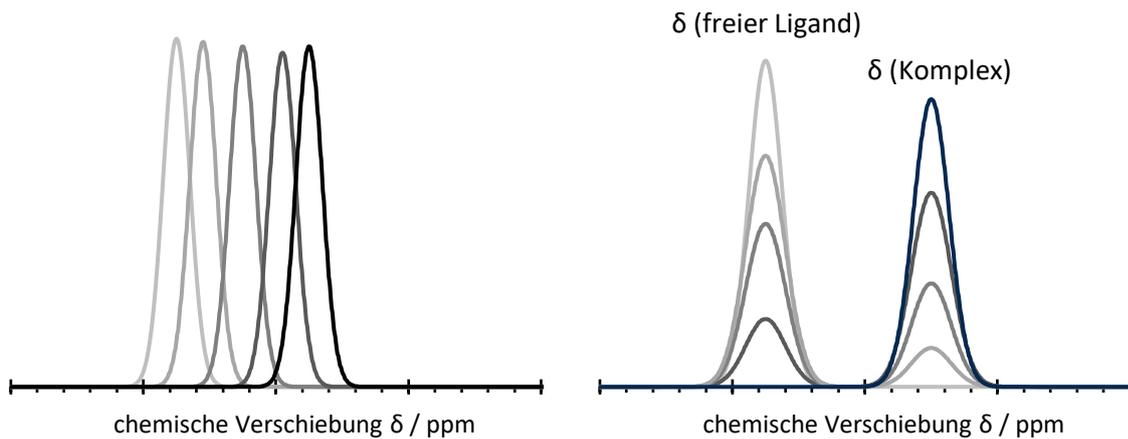


Abb. 35: Veränderung der Signale im NMR-Spektrum je nach Austauschrate des Komplexes (nach Teilum *et. al* ^[77])

Anhand der chemischen Verschiebung der Signale bei unterschiedlichen Ligand-Protein-Verhältnissen kann die Dissoziationskonstante K_D mithilfe folgender Formel bestimmt werden ^[77]:

$$(22) \quad \Delta\delta_{\text{obs}} = \Delta\delta_{\text{max}} \cdot \frac{([\text{P}]_{\text{tot}} + c_0 + K_D) - \sqrt{([\text{P}]_{\text{tot}} + c_0 + K_D)^2 - 4 \cdot [\text{P}]_{\text{tot}} \cdot c_0}}{2 \cdot [\text{P}]_{\text{tot}}}$$

$\Delta\delta_{\text{obs}}$ und $\Delta\delta_{\text{max}}$ sind die gemessene und die maximale Änderung der chemischen Verschiebung. $[\text{P}]_{\text{tot}}$ ist die Gesamtproteinkonzentration und c_0 ist die eingesetzte Ligandkonzentration.

1.3.2 Bestimmung des Diffusionskoeffizienten D

Die Affinität zu Albumin kann weiterhin durch Bestimmung des Diffusionskoeffizienten quantifiziert werden. Dieser Diffusionskoeffizient hängt wie bereits erwähnt stark von der Molekülgröße der Substanzen ab. Bindet ein kleines Molekül wie Ephedrin an eine größere Struktur wie Albumin, so ändert sich der Diffusionskoeffizient von Ephedrin bei der Bindung stärker als der von Albumin. Daher ist es sinnvoller den Diffusionskoeffizienten des niedermolekularen Liganden zu bestimmen, da sich dieser bei der Bindung stärker ändert als der des Plasmaproteins.

Der gemessene Diffusionskoeffizient D_{obs} des Liganden liegt dabei im Mittel zwischen der freien und der gebundenen Form des Ephedrins. Je nach Lage des Gleichgewichts entspricht der gemessene Diffusionskoeffizient D_{obs} hierbei mehr oder weniger dem Diffusionskoeffizienten des Komplexes D_B ^[89]:

$$(23) \quad D_{\text{obs}} = f_b \cdot D_B + (1 - f_b) \cdot D_F$$

In Gleichung (23) ist f_b der gebundene Wirkstoffanteil, D_B der Diffusionskoeffizient des Komplexes und D_F der Diffusionskoeffizient des freien Liganden.

Aus Gleichung (23) lässt sich über die in Kap. B.2.3 beschriebenen Zusammenhänge folgende Formel zur Berechnung der Dissoziationskonstante K_D herleiten ^[89]:

$$(24) \quad \frac{2 \cdot (D_{\text{obs}} - D_F)}{(D_B - D_F)} = 1 + \left(\frac{K_D}{[P]_{\text{tot}}} \right) \cdot \left(\frac{[P]_{\text{tot}}}{c_0} \right) + n \cdot \left(\frac{[P]_{\text{tot}}}{c_0} \right) - \sqrt{\left[1 + \left(\frac{K_D}{[P]_{\text{tot}}} \right) \cdot \left(\frac{[P]_{\text{tot}}}{c_0} \right) + n \cdot \left(\frac{[P]_{\text{tot}}}{c_0} \right) \right]^2 - 4 \cdot n \cdot \left(\frac{[P]_{\text{tot}}}{c_0} \right)}$$

Dabei stellt n die Anzahl der Bindestellen des Proteins und c_0 die Gesamtkonzentration (mol/L) des Liganden dar.

Um aus den Messdaten die Dissoziationskonstante K_D des Komplexes zu erhalten, wird die Formel durch Anpassung der Parameter ($K_D/[P]_{\text{tot}}$), n , D_F und D_B an die erhaltenen Messwerte für D_{obs} gefittet.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

2.1 Zusätzlich verwendete Substanzen und Geräte

Für die NMR-Versuche wurden zusätzlich folgende Substanzen und Geräte verwendet:

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
Deuteriumoxid, 99.9 % D + 0.05 % Natriumtrimethylsilylpropionat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Dtl.)
Deuteriumoxid, 99.9 % D	Deutero GmbH (Kastellaun, Deutschland)
Maleinsäure, ≥ 99 % (HPLC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Dtl.)
Natriumhydroxid-d Lösung NaOD, 40 %, in D ₂ O, 99 % D	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Dtl.)
Trideuterophosphorsäure-d ₃ D ₃ PO ₄ , 85 %, in D ₂ O, 98 % D	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Dtl.)

2.1.2 Geräte

Zur Vermessung der Proben wurden Standard 5 mm NMR-Röhrchen (Boro-5-7) und 5 mm NMR Coaxialröhrchen der Firma Deutero GmbH (Kastellaun, Germany) verwendet. Die ¹H-NMR-Spektren wurden an einem Bruker Avance III Spektrometer (400,13 MHz; Bruker, Rheinstetten, Germany), ausgestattet mit einem 5 mm Protonenkopf (BBO) mit Z-gradient, aufgenommen. Die Datenprozessierung erfolgte mittels TopSpin® 3.2 Software (Bruker).

2.2 Vermessene Liganden

Da die Ephedrin-Enantiomere in den vorhergegangenen Versuchen die vielversprechendsten Ergebnisse geliefert haben, wurden mittels NMR-Spektroskopie zunächst nur (-)-Ephedrin-HCl bzw. (+)-Ephedrin x 0,5 H₂O analysiert.

2.3 Pufferlösung

Wie bei den anderen orthogonalen Analysenmethoden wurde auch für die NMR-Spektroskopie der gleiche Phosphatpuffer (127,7 mM) wie bei den Ultrafiltrationsexperimenten eingesetzt. Zur Verwendung in der NMR-Spektroskopie musste dieser mit Deuteriumoxid (D_2O) anstelle von Millipore®-Wasser als Lösungsmittel hergestellt werden.

2.4 Chemische Verschiebung

2.4.1 Pufferlösung

Zur Herstellung des Phosphatpuffers für die Bestimmung der Veränderungen in der chemischen Verschiebung wird die entsprechende Menge an Puffersalzen in 10,0 mL D_2O gelöst. Der pH- bzw. pD-Wert der Pufferlösung wird kontrolliert und mit NaOD- bzw. D_3PO_4 -Lösung auf 7,8 eingestellt. Dabei gilt, dass der pD-Wert in D_2O um 0,41 höher ist als der pH-Wert in Wasser; ein pD-Wert von 7,8 in D_2O entspricht damit einem pH-Wert von 7,4 in Wasser ^[159-161].

Für die ersten Versuche wurde Maleinsäure als interner Standard zur Referenzierung der chemischen Verschiebung verwendet. Maleinsäure wurde in einer Konzentration von 50 mM dem D_2O -Phosphatpuffer zugesetzt. Für die weiteren Versuche wurde Trimethylsilylpropionat (TSP) als externer Standard verwendet, das als 0,05%ige Lösung in D_2O kommerziell erhältlich ist.

2.4.2 Probelösung

Für die Probelösungen der NMR-Messungen wird zunächst jeweils eine Stammlösung der einzelnen Ephedrin-Enantiomere hergestellt. Als Plasmaprotein enthalten die Probelösungen für die Experimente zur chemischen Verschiebung humanes Serumalbumin. Während der ersten Versuche, bei denen Maleinsäure als interner Standard zum Einsatz kam, wurde zunächst nur (-)-Ephedrin-HCl vermessen. Die benötigte Ephedrin-Stammlösung enthält 100 mM (-)-Ephedrin, gelöst in D_2O -Phosphatpuffer. Für die Versuche wird jeweils 700 μ L Probelösung entsprechend Tab. 34 hergestellt, gemischt und in Standard 5 mm NMR-Röhrchen abgefüllt und vermessen.

Tab. 34: Verdünnungsreihe NMR-Probelösungen (δ), Maleinsäure: 2 mM (-)-Ephedrin-HCl, 0,06 – 0,6 mM HSA in D₂O-Phosphatpuffer, **interner Standard 50 mM Maleinsäure**

Konzentration / mM HSA	-	0,6	0,06	0,2	0,6
Konzentration / mM (-)-Ephedrin	2	-	2	2	2
Konzentration / mM Maleinsäure	50	50	50	50	50
Einwaage HSA	-	27,9 mg	2,8 mg	10,0 mg	27,9 mg
Volumen Ephedrin-Stammlösung	14 μ L	-	14 μ L	14 μ L	14 μ L
Volumen D ₂ O-Phosphatpuffer	686 μ L	700 μ L	686 μ L	686 μ L	686 μ L

Tab. 35: Verdünnungsreihe NMR-Probelösungen (δ), TSP: 2 mM (-)-Ephedrin-HCl bzw. (+)-Ephedrin x 0,5 H₂O; 0,06 – 0,6 mM HSA in D₂O-Phosphatpuffer, **externer Standard 0,05 % TSP in D₂O im Insert**

Konzentration / mM HSA	-	0,6	0,06	0,3	0,6
Konzentration / mM (-)-Ephedrin bzw. (+)-Ephedrin	2	-	2	2	2
Einwaage HSA	-	27,9 mg	2,8 mg	14,0 mg	27,9 mg
Volumen Ephedrin-Stammlösung	14 μ L	-	14 μ L	14 μ L	14 μ L
Volumen D ₂ O-Phosphatpuffer	686 μ L	700 μ L	686 μ L	686 μ L	686 μ L

Für die weiteren Versuche werden die Probelösungen gemäß Tab. 35 aus der (-)-Ephedrin- bzw. (+)-Ephedrin-Stammlösung (100 mM) hergestellt. Die Probelösungen werden gemischt und in die äußeren Röhrchen der NMR Coaxialröhrchen eingefüllt. Im inneren Röhrchen befindet sich jeweils die 0,05%ige TSP-D₂O-Lösung als externer Standard.

2.4.3 Versuchsdurchführung

Zur Untersuchung von Änderungen in der chemischen Verschiebung der Ephedrin-Signale in Anwesenheit von Albumin werden ^1H -NMR-Spektren der verschiedenen Probelösungen („zg“-Sequenz von Bruker, siehe Tab. 36) aufgenommen und die beobachtete Änderung der chemischen Verschiebung entsprechend ausgewertet.

Tab. 36: Messparameter ^1H -Spektren zur Auswertung der chemischen Verschiebung (zg-Sequenz von Bruker)

Aquisition

Parameter	Wert
Datenpunkte (TD)	131k
Scans (NS)	16
Dummy Scans (DS)	2
Lösungsmittel	D ₂ O
Spektrale Bandbreite (SW/SWH)	30,04 ppm / 12019,23 Hz
Auflösung (FIDRES)	0,183 Hz / pt
Aquisitionszeit (AQ)	5,453 s
Offset (O1)	6,175 ppm
90°-Pulslänge (P1)	8,8 μs
Pulsleistung (PLW1)	10,4 W

Prozessierung

Parameter	Wert
Prozessierte Datenpunkte (SI)	131k
Fensterfunktion (WDW)	EM

Das ^1H -NMR-Spektrum von (-)-Ephedrin ist beispielhaft in Abb. 36 zu sehen. Die Zuordnung der Signale wurde der Literatur^[157] entsprechend vorgenommen. Die chemische Verschiebung und die Kopplungskonstanten sind in Tab. 37 dargestellt.

Tab. 37: Zuordnung der Signale im ¹H-NMR-Spektrum von Ephedrin

Struktur	Integral	δ / ppm	Multiplizität	J / Hz
Aromatische H	5,04	7,45	m	8,5 [³ J(H,H)]
CH ₂ -OH (Stereozentrum 1)	1,20	5,14	d	3,6 [³ J(H,H)]
CH-CH ₃ (Stereozentrum 2)	1,00	3,56	dq	3,6 [³ J(H,H)] 6,8 [³ J(H,H)]
N-CH ₃	3,05	2,78	s	-
CH-CH ₃ (Stereozentrum 2)	3,11	1,14	d	6,8 [³ J(H,H)]

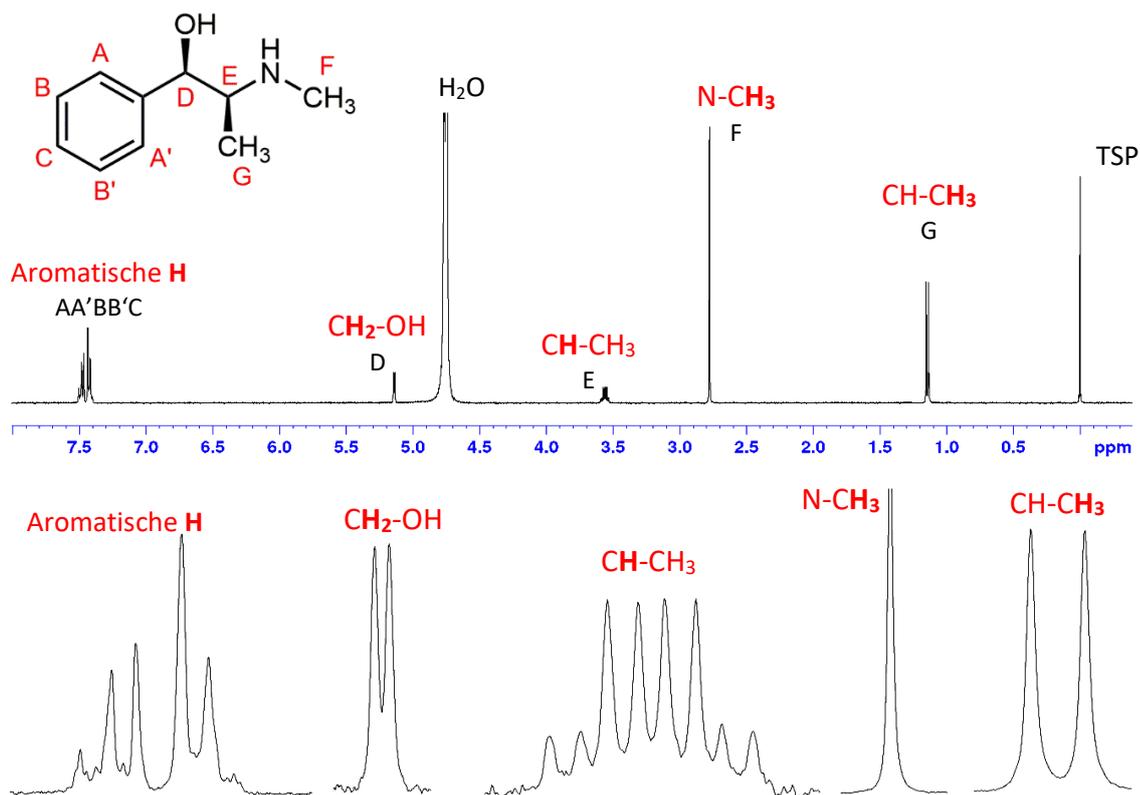


Abb. 36: ¹H-NMR-Spektrum von 2 mM (-)-Ephedrin-HCl in D₂O-Phosphatpuffer (pD = 7,8)

2.5 Diffusionskoeffizient

2.5.1 Pufferlösung

Die Herstellung des Phosphatpuffers für die NMR-Diffusionsexperimente erfolgt analog zu den NMR-Versuchen zur chemischen Verschiebung.

2.5.2 Probelösung

Die Herstellung der Probelösungen für die NMR-Diffusionsexperimente erfolgte wie bei den Untersuchungen der chemischen Verschiebung aus einer Ephedrin-Stammlösung. Diese Stammlösung enthält 50 mM (-)-Ephedrin-HCl in D₂O-Phosphatpuffer (127,7 mM, pD 7,8).

Bei den NMR-Diffusionsexperimenten wurde die Plasmaproteinbindung zu bovinem Serumalbumin bestimmt. Für die Probelösungen wird jeweils 40,0 mg bovines Serumalbumin eingewogen und mit dem entsprechendem Volumen Ephedrin-Stammlösung (siehe Tab. 38 und Tab. 39) versetzt. Diese Lösung wird ad 1,0 mL mit D₂O-Phosphatpuffer aufgefüllt. Die Probelösung wird vorsichtig gemischt, um Schaumbildung durch das enthaltene Albumin zu verhindern. Anschließend wird die Lösung in NMR-Röhrchen abgefüllt und vermessen.

Tab. 38: Verdünnungsreihe NMR-Probelösungen (D), 0,5 – 8 mM (-)-Ephedrin-HCl, 40 g/L BSA in D₂O-Phosphatpuffer

Konzentration / mM (-)-Ephedrin	0,5	1	1,5	2	5	8
Volumen / μ L Ephedrin- Stammlösung	10	20	30	40	100	160

Damit enthält jede Probelösung jeweils 40 g/L BSA und eine variierende Konzentration an (-)-Ephedrin. Für die ersten Versuche lag die Ephedrin-Konzentration im Bereich von 0,5 – 8 mM. Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Auswertung der Spektren wurde diese Konzentration bei den weiteren Versuchen auf 3 – 20 mM erhöht.

Tab. 39: Verdünnungsreihe NMR-Probelösungen (D), 3 – 20 mM (-)-Ephedrin-HCl, 40 g/L BSA in D₂O-Phosphatpuffer

Konzentration / mM (-)-Ephedrin	3	10	12	15	20
Volumen / μ L Ephedrin- Stammlösung	60	200	240	300	400

Zur Bestimmung der T₁-Relaxationszeit und der Diffusionskoeffizienten des freien Ephedrins wurde eine 20 mM (-)-Ephedrin-Probelösung ohne BSA in D₂O-Phosphatpuffer hergestellt.

2.5.3 Versuchsdurchführung

Vor Durchführung der Diffusions-Messung müssen die Temperatur und der Gradient kalibriert werden. Außerdem sollten die Parameter Diffusionszeit Δ und Gradientenlänge δ für die Messung und den zu vermessenden Liganden optimiert werden. Dieses Vorgehen ist notwendig, da der bestimmte Diffusionskoeffizient stark von der Temperatur und dem verwendeten Gradienten abhängt.

2.5.3.1 Temperaturkalibrierung und -konstanz

Wie in der Stokes-Einstein-Gleichung (Gleichung (21)) dargestellt, ist der Diffusionskoeffizient von der Temperatur der Lösung abhängig. Bei der NMR-Messung wird zwar die Temperatur standardmäßig gemessen, jedoch befindet sich der Temperaturfühler nicht direkt in der Probelösung, sondern nur in unmittelbarer Nähe. Daher wird vor der Versuchsdurchführung der Temperaturfühler des NMRs kalibriert. Die Temperaturkalibrierung erfolgt durch Vermessung eines 99,8%igen deuterierten Methanol-Standards (MeOD, „zg“-Sequenz von Bruker), dessen chemische Verschiebung der Signale temperaturabhängig ist. Der kalibrierte Bereich für die Messung liegt bei 290 – 310 K, in Messschritten von 2 K. Die Temperaturkalibrierung ergibt folgende Kalibriergerade mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9998$ (Abb. 37):

$$(25) \quad T_{\text{Fühler}} = 0,882 \cdot T_{\text{Probe}} + 34,785$$

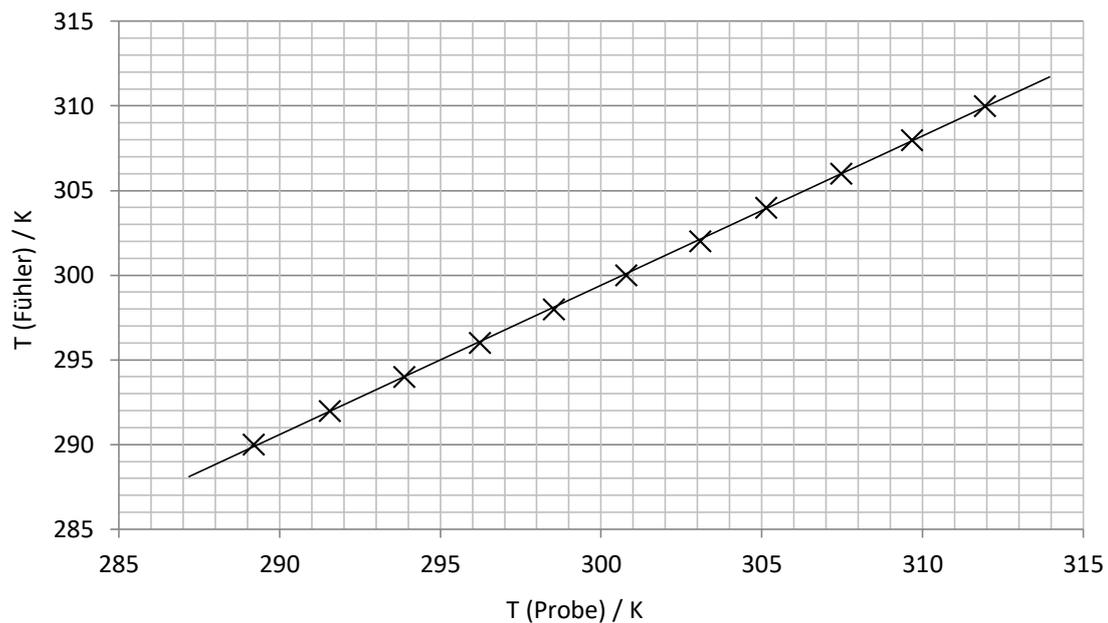


Abb. 37: Temperaturkalibrierung des Temperaturfühlers mittels 99,8 % MeOD

Um eine Proben­temperatur von beispielsweise 298 K (25 °C) zu erhalten, muss der Temperaturfühler daher auf eine Temperatur von 297,6 K eingestellt sein.

Wichtiger noch als das Wissen über die tatsächliche Proben­temperatur ist eine Temperaturkonstanz während der Messung. Eine unzureichende Temperaturkonstanz kann dazu führen, dass zusätzlich ein Temperaturgradient in der Probe entsteht. Ein Temperaturgradient, d.h. unterschiedliche Temperaturen im oberen Teil und am Boden der Probe, kann je nach Viskosität der Lösung zu Konvektionsströmen führen. Diese Konvektionsströme können eine Bewegung der Moleküle bewirken, genau wie die Selbstdiffusion, und damit das Ergebnis verfälschen.

Daher wurde bei einer eingestellten Fühler­temperatur von 300,0 K minütlich ein ^1H -NMR-Spektrum des 99,8%igen MeOD-Standards über einen Zeitraum von 60 Minuten gemessen und daraus die Temperaturkonstanz der Probe berechnet, siehe dazu Abb. 38.

Wie in Abb. 38 zu sehen, ist nach einer anfänglichen Aufheizphase von ca. 15 Minuten die Proben­temperatur bei einem Mittelwert von 300,67 K und einer relativen Standardabweichung von 0,0065 % konstant und streut nur geringfügig. Die gemessene Temperatur liegt nach dieser Zeit nah an der eingestellten Soll­temperatur der Probe (300,70 K). Es kann davon ausgegangen werden, dass die Temperatur über die Messung hinweg konstant bleibt. In den ersten 15 Minuten erfolgen lediglich

Messvorbereitungen und noch keine eigentliche Messung, sodass die anfängliche Aufheizphase die Diffusionsmessungen nicht beeinflusst.

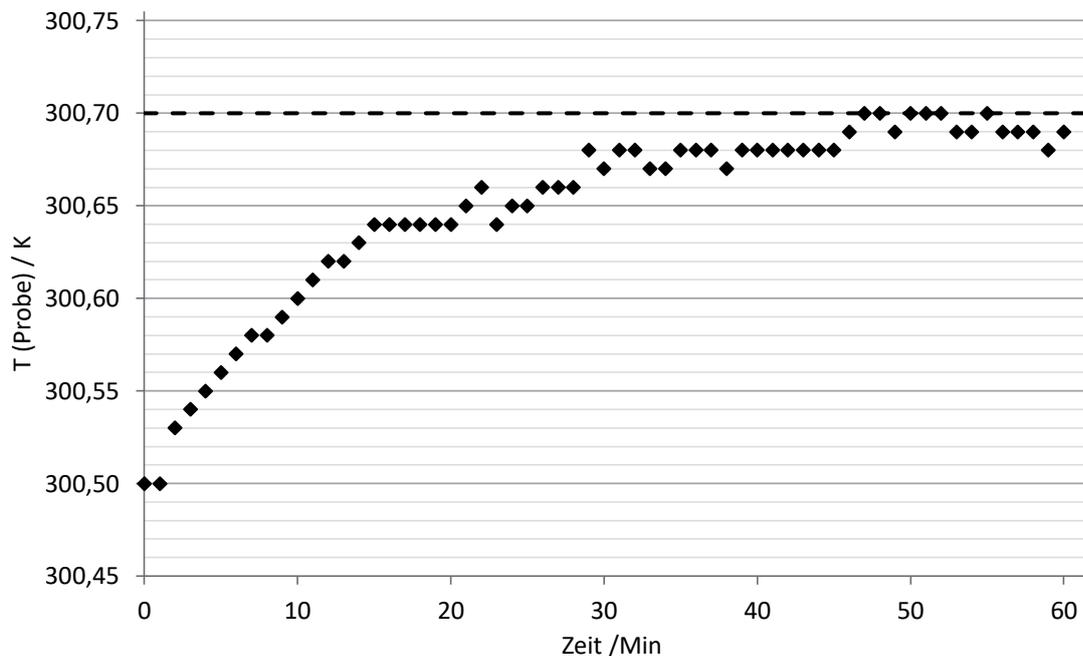


Abb. 38: Temperaturkonstanz mittels 99,8 % MeOD, eingestellte Fühlertemperatur = 300,0 K. Die gestrichelte Linie stellt die Soll-Temperatur der Probe (300,7 K) dar.

2.5.3.2 Gradientenkalibrierung

Um den Diffusionskoeffizienten D zu bestimmen, ist es wichtig die genaue maximale Gradientenstärke zu kennen. Zu diesem Zweck wird im Vorfeld eine Gradientenkalibrierung durchgeführt. Die Durchführung der Gradientenkalibrierung erfolgte mit einem „doped-water“-Standard mittels `ledbpgp2s`-Sequenz bei einer Diffusionszeit Δ von 50 ms und einer Gradientenlänge δ von $2 \times 1,46$ ms bei 2 % Gradientenstärke.

Die so bestimmte maximale Gradientenstärke liegt bei dem verwendeten Spektrometer bei 5,48 G/mm. Der bestimmte Diffusionskoeffizient von Wasser liegt bei $1,891 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$, laut Literatur sollte dieser bei $1,902 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ liegen ^[162].

Der für die Diffusionsmessung benötigte Gradient wird über die Gradientenstärke g und die Gradientenlänge δ definiert. Während des Experiments werden diese Parameter zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten variiert und die jeweilige Intensität des Echos gemessen. Um einheitliche Messzeiten für alle Messungen zu erhalten, wird generell die

Gradientenstärke g variiert. Die Gradientenlänge δ hingegen bleibt für alle Messungen konstant. Für möglichst aussagekräftige Messergebnisse mit einem geringen Fehler müssen die Diffusionszeit Δ und die Gradientenlänge δ vorweg optimiert werden. Dazu werden zwei Spektren bei 2 % bzw. 95 % Gradientenstärke aufgenommen. Bei einer konstanten Diffusionszeit Δ von 50 ms wird die Gradientenlänge δ so gewählt, dass die Restsignalintensität des 95 %-Spektrums bei 5 % des 2 %-Spektrums liegt. Die für die Messung optimierte Gradientenlänge δ liegt somit bei 3 ms.

2.5.3.3 Diffusionskoeffizient freies Ephedrin

Vor der eigentlichen Bestimmung des Diffusionskoeffizienten D_{obs} von Ephedrin in Anwesenheit von Albumin werden der Diffusionskoeffizient D_F und die T_1 -Relaxationszeit des freien Ephedrins bestimmt. Zur Bestimmung wird eine reine 20 mM (-)-Ephedrin-Lösung vermessen. Diese Informationen zum ungebundenen Wirkstoff werden für die spätere Bestimmung der Bindungsaffinität bzw. die Durchführung der Messung benötigt.

Durch Variation der Gradientenstärke g bei der Messung erhält man Spektren mit unterschiedlichen Signalintensitäten. Aus dem daraus resultierenden Diffusionsplot (siehe Abb. 39), bei dem die Signalintensität I gegen die Gradientenstärke g aufgetragen wird, lässt sich der Diffusionskoeffizient der Substanz berechnen.

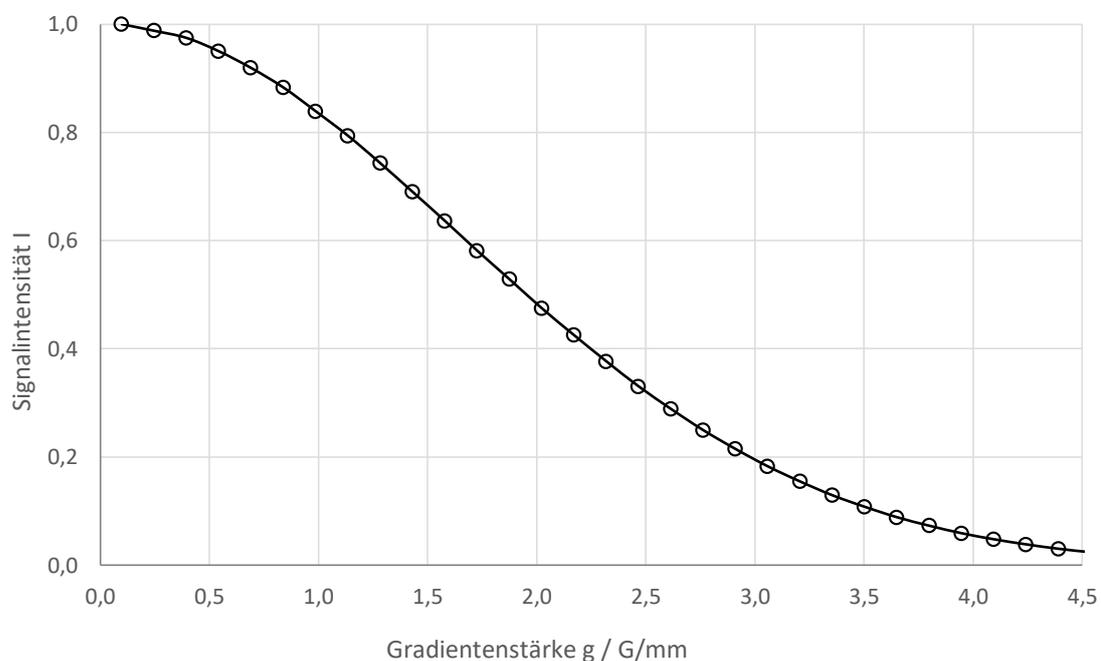


Abb. 39: Diffusionsplot von (-)-Ephedrin-HCl, gemessen in D_2O -Phosphatpuffer

Der bestimmte Diffusionskoeffizient liegt für das freie Ephedrin bei einem Wert von $5,78 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, berechnet über die Signalintensität des aromatischen Protons bei 7,392 ppm. Die gemessene T_1 -Relaxationszeit von Ephedrin, die letztendlich die Dauer einer Messung bestimmt, liegt bei 1,44 ms.

2.5.3.4 Messparameter

Der Diffusionskoeffizient wird per Feldgradienten-NMR (*engl.* pulse field gradient, PFG) mittels stimulierter Echo-Puls-Sequenz („pulse field gradient stimulated echo“, PFG-STE-Experiment) mit bipolarem Gradienten bestimmt („ledbpgp2s“-Sequenz von Bruker, siehe Tab. 40) ^[163].

Tab. 40: Messparameter NMR-Diffusionsmessung (ledbpgp2s-Sequenz von Bruker)

Aquisition

Parameter	Wert
Datenpunkte (TD)	65k
Scans (NS)	128
Dummy Scans (DS)	8
Lösungsmittel	D ₂ O
Spektrale Bandbreite (SW/SWH)	20,55 ppm / 8223,69 Hz
Auflösung (FIDRES)	0,125 Hz / pt
Aquisitionszeit (AQ)	3,985 s
Offset (O1)	6,175 ppm
90°-Pulslänge (P1)	9,0 μs
180°-Pulslänge (P2)	18,0 μs
Pulsleistung (PLW1)	22,7 W
Spoil-Gradient (P19)	-17,13% bei 0,6 ms
Longitudinal Eddy Current Delay (D21, LED)	5 ms

Tab. 40: Messparameter NMR-Diffusionsmessung (ledbpgp2s-Sequenz von Bruker)

Aquisition

Parameter	Wert
Gradienten-Pulslänge (P30, $\frac{1}{2} \times \delta$)	1,5 ms
Gradientenlänge (δ)	3,0 ms
Diffusionszeit (Δ , D20)	50 ms
Gradientenrampe	linear aus 32 Einzelmessungen bei 2% bis 95% Gradientenstärke

Prozessierung

Parameter	Wert
Prozessierte Datenpunkte (SI)	65k
Fensterfunktion (WDW)	EM

Während der Diffusionsmessungen liegt die Diffusionszeit Δ bei 50 ms und die Gradientenlänge δ bei 3 ms. Für das Experiment wird eine lineare Gradientenrampe aus jeweils 32 Gradienten mit 2 – 95 % der maximalen Gradientenstärke (5,5 G/mm) verwendet. Der Diffusionskoeffizient D wird durch Extrapolation der Signalflächen der aromatischen Protonen im Bereich von 7,3 bis 7,5 ppm bestimmt. Die Messung erfolgt bei einer Temperatur von 300,0 K.

3.1 Messergebnisse

3.1.1 Chemische Verschiebung

Die aufgenommenen ^1H -Spektren der verschiedenen Ligand-Protein-Verhältnisse sind am Beispiel von (-)-Ephedrin für die einzelnen Signale in Abb. 40 und Abb. 41 dargestellt.

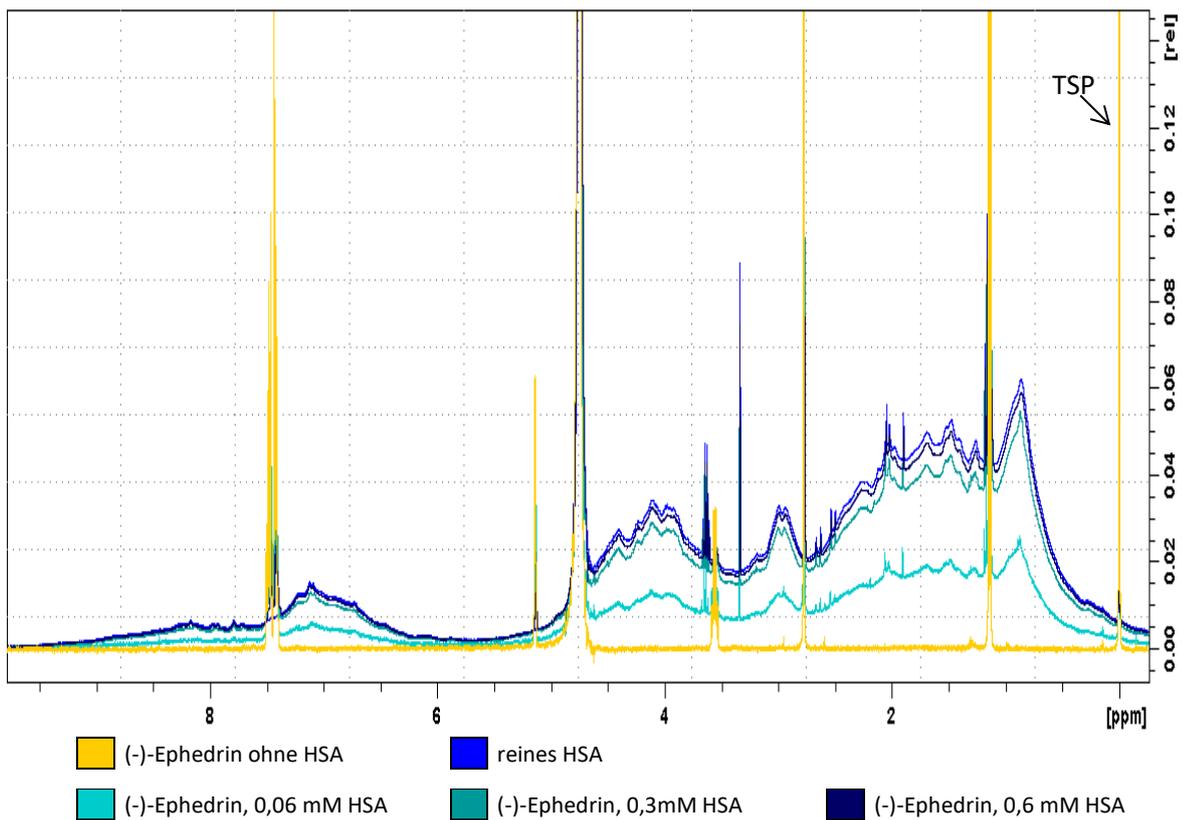


Abb. 40: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren von (-)-Ephedrin in An- und Abwesenheit von HSA; 2 mM (-)-Ephedrin bei verschiedenen HSA-Konzentrationen (ohne, 0,06 mM, 0,3 mM, 0,6mM) bzw. reinem HSA (0,6 mM); jeweils überlagert

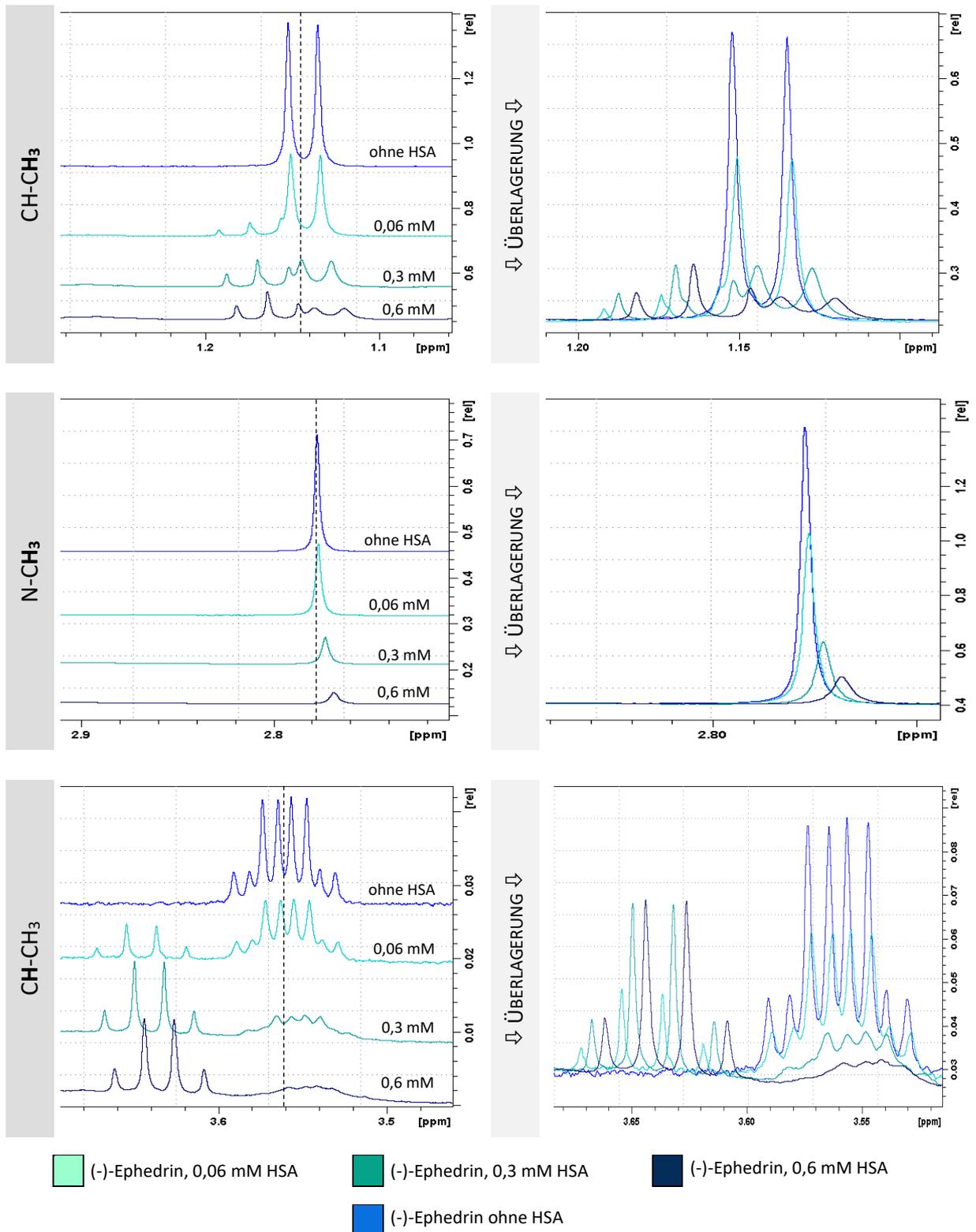


Abb. 41: Gegenüberstellung der (-)-Ephedrin-Signale im 1H-NMR-Spektren bei verschiedenen HSA-Konzentrationen (0,06 mM, 0,3 mM und 0,6 mM, jeweils überlagert)

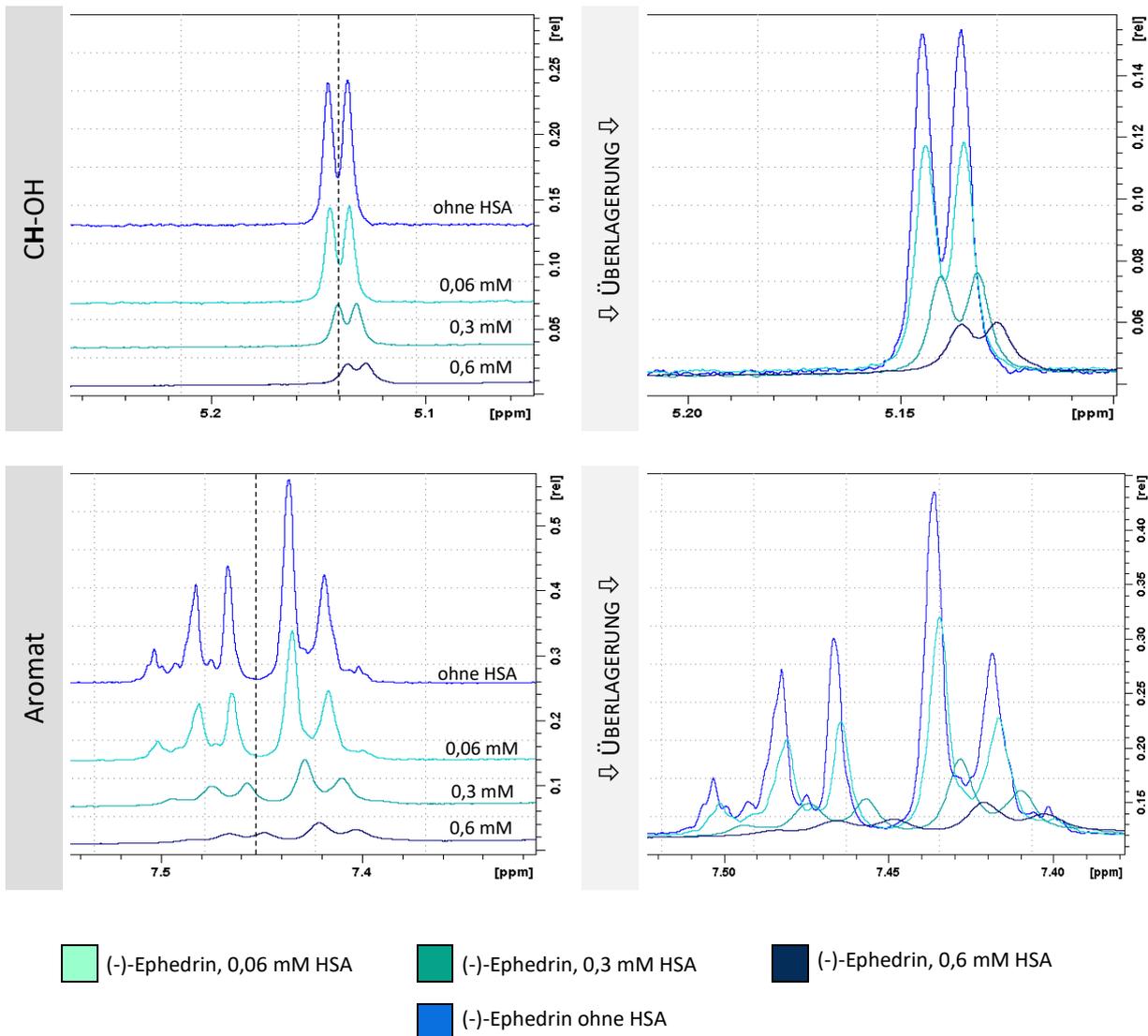


Abb. 41: Gegenüberstellung der (-)-Ephedrin-Signale im ^1H -NMR-Spektren bei verschiedenen HSA-Konzentrationen (0,06 mM, 0,3 mM und 0,6 mM, jeweils überlagert)

Aufgrund von Wechselwirkungen der Maleinsäure mit Albumin in der Probelösung wurde schlussendlich eine fertige 0,05%ige Trimethylsilylpropionat Lösung in D_2O als Standard zur Referenzierung der chemischen Verschiebung verwendet. Damit es zwischen Standard und Protein zu keiner Interaktion kommt, die die Proteinbindung des Wirkstoffs verändern könnte, wurden für die Messungen NMR Coaxialröhrchen verwendet, bei denen sich die Standard-Lösung im inneren Röhrchen befindet. Die chemische Verschiebung wurde in Bezug auf TSP für jedes Signal bestimmt.

Beim Vergleich der einzelnen ^1H -NMR-Spektren fällt auf, dass alle Ephedrin-Signale eine zunehmende Hochfeldverschiebung bei steigender HSA-Konzentration zeigen. Die stärksten Verschiebungen im Spektrum, die auf eine Bindung an Albumin deuten, weisen die Signale der CH-CH_3 (Stereozentrum 2) und N-CH_3 Protonen auf. Alle anderen Signale des Ephedrins zeigen die gleiche Hochfeldverschiebung wie die Signale des Albumins (u.a. Singulett bei 3,33 ppm und Quartett bei 3,63 ppm, 7,1 Hz $^3J(\text{H,H})$). Diese Veränderungen der chemischen Verschiebung, die in Abhängigkeit von der HSA-Konzentration zwischen 0,3 und 2,9 Hz liegen, sind signifikant größer als die Auflösung der Spektren mit 0,183 Hz/pt. Demnach scheinen die Protonen CH-CH_3 und N-CH_3 tatsächlich an einer Bindung mit Albumin beteiligt zu sein und die Veränderung im Spektrum basiert nicht nur auf Schwankungen aufgrund von Messungenauigkeiten während des Versuchs. Die Hochfeldverschiebung der Signale ist dabei sowohl beim rechts- wie auch beim linksdrehenden Ephedrin-Enantiomer zu beobachten (siehe Abb. 42).

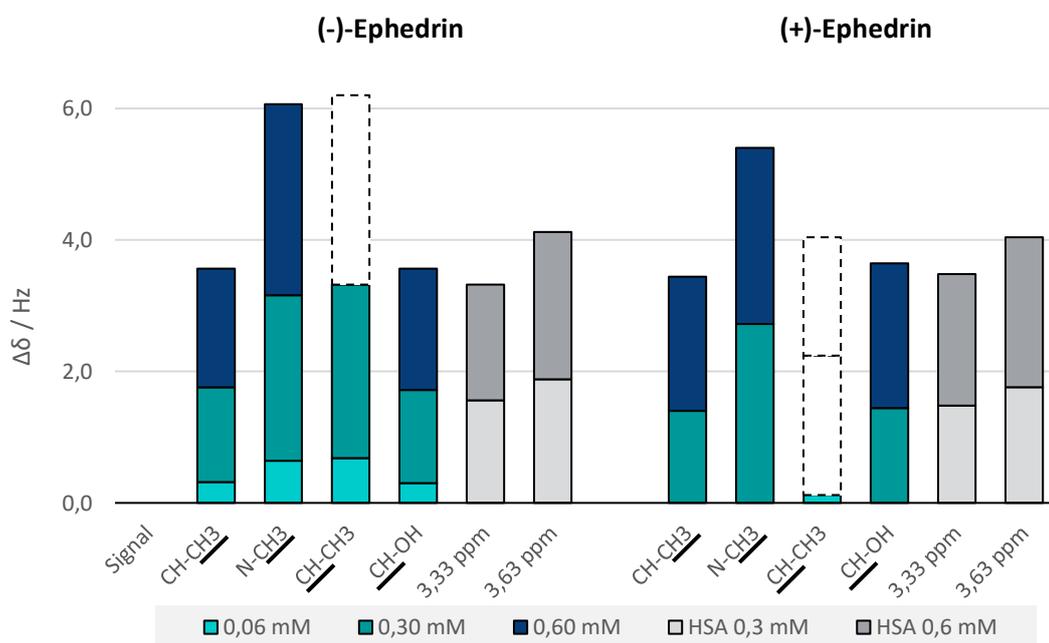


Abb. 42: Veränderungen der chemischen Verschiebung $\Delta\delta$ in den ^1H -NMR-Spektren von (-)- und (+)-Ephedrin in Hz.

In grau die Veränderung der HSA-Signale bei 3,33 ppm (s) und 3,63 ppm (q). Die gestrichelten Balken stellten die Ergebnisse der wegen der Überlagerungen nur schwer auswertbaren Signale dar.

Bei (+)-Ephedrin ist nur beim Signal der N-CH₃ Protonen eine stärkere Verschiebung zu beobachten als bei den übrigen Signalen. In dieser Messreihe ist das CH-CH₃-Signal von (+)-Ephedrin bereits bei einer HSA-Konzentration von 0,3 mM so stark vom Albumin überlagert, dass es nicht mehr auswertbar ist. Es ist nur noch ein breites, sehr schwaches Signal ohne jegliche Aufspaltung im Spektrum erkennbar.

Die sehr breiten Resonanzbanden des Albumins mit nur wenigen deutlich erkennbaren Signale machen die Auswertung der Spektren gerade im Bereich von 1 – 5 ppm sehr schwierig (siehe Abb. 40). In diesem Bereich werden die Signale des Ephedrins durch die breiten Albuminbanden stark überlagert. Insbesondere das Signal der CH-CH₃ Protonen am Stereozentrum 2 zeigt die gleiche chemische Verschiebung wie zwei sich überlagernde HSA-Signale (Triplett bei 1,16 ppm, 7,1 Hz ³J(H,H) und Dublett bei 1,15 ppm, 6,2 Hz ³J(H,H), siehe Abb. 41). Auch im Bereich des CH-CH₃-Signals tritt ein deutliches Signal von Albumin auf (Quartett bei 3,63 ppm, 7,1 Hz ³J(H,H)). In diesem Fall erschwert jedoch nicht nur die Überlagerung durch das Albumin-Signal die Auswertung, sondern auch die zunehmende Unschärfe des Ephedrin-Signals bei steigender HSA-Konzentration. Diese Unschärfe macht sich bei den hoch aufgespaltenen Ephedrin-Signalen des Aromaten und des CH-CH₃-Signals am stärksten bemerkbar, die mit zunehmender Albuminkonzentration immer schwächere, breitere Banden aufweisen (siehe Abb. 41). Auch eine Verbreiterung der Signale kann auf eine Beteiligung der Protonen an einer Bindung deuten. In diesem Versuch zeigen jedoch alle Signale die gleiche Signalverbreiterung bei steigender HSA-Konzentration. Diese Zunahme der Signalbreite erschwert insbesondere die Auswertung von Signalen mit einer hohen Signalaufspaltung, wie die des Aromaten und CH-CH₃-Signals, da hier die einzelnen Signale des Multiplets mit zunehmender Signalbreite immer stärker ineinander übergehen. Laut Literatur führt die Auswertung der Signalbreite zur Untersuchung der an der Bindung beteiligten Protonen vor allem bei langsam austauschenden Komplexen zu reproduzierbaren Ergebnissen ^[77].

Eine Berechnung der Dissoziationskonstante K_D war aus diesen Gründen trotz sichtbarer Veränderungen in der chemischen Verschiebung der Ephedrin-Signale nicht möglich. Weder die Berechnung mittels Gleichung (22) ^[77] noch die Auswertung mithilfe des Job-Plots ^[164] lieferten sinnvolle Ergebnisse für die Dissoziationskonstante K_D und das Ausmaß der Plasmaproteinbindung von Ephedrin gegenüber humanem Serumalbumin.

3.1.2 Diffusionskoeffizient

Die Messungen wurden mit einer konstanten Proteinkonzentration (40 g/L BSA) und variierenden (-)-Ephedrin Konzentrationen durchgeführt. Die resultierenden Spektren der Diffusionsmessungen werden in Anlehnung an den Versuchsaufbau von *Waibel* auf den Restwasserpeak bei 4,75 ppm referenziert ^[161].

In Anwesenheit von Albumin in der Probelösung sind auch bei den Diffusionsexperimenten die Signale des Ephedrins teilweise von den Albumin-Signalen überlagert. Insbesondere im Bereich von 1 – 5 ppm sind wieder sehr breite Banden von Albumin erkennbar. Eine Auswertung der Spektren war nur über die Signalflächen statt den Signalintensitäten möglich. Für die Berechnung der Diffusionskoeffizienten werden aufgrund der Signalüberlagerungen die aromatischen Protonen im Bereich von 7,3 bis 7,5 ppm herangezogen. Die berechneten Diffusionskoeffizienten D_{obs} werden gegen den Quotienten $[P]_{\text{tot}}/c_0$ der eingesetzten Protein- $[P]_{\text{tot}}$ und Ligandkonzentration c_0 aufgetragen (Abb. 43 und Abb. 44). Durch Optimierung der Parameter $K_A/[P]_{\text{tot}}$, n , D_F und D_G wird die Kurve entsprechend Gleichung (24) an die Messwerte angepasst. Die Ergebnisse der Berechnung sind in Tab. 41 dargestellt.

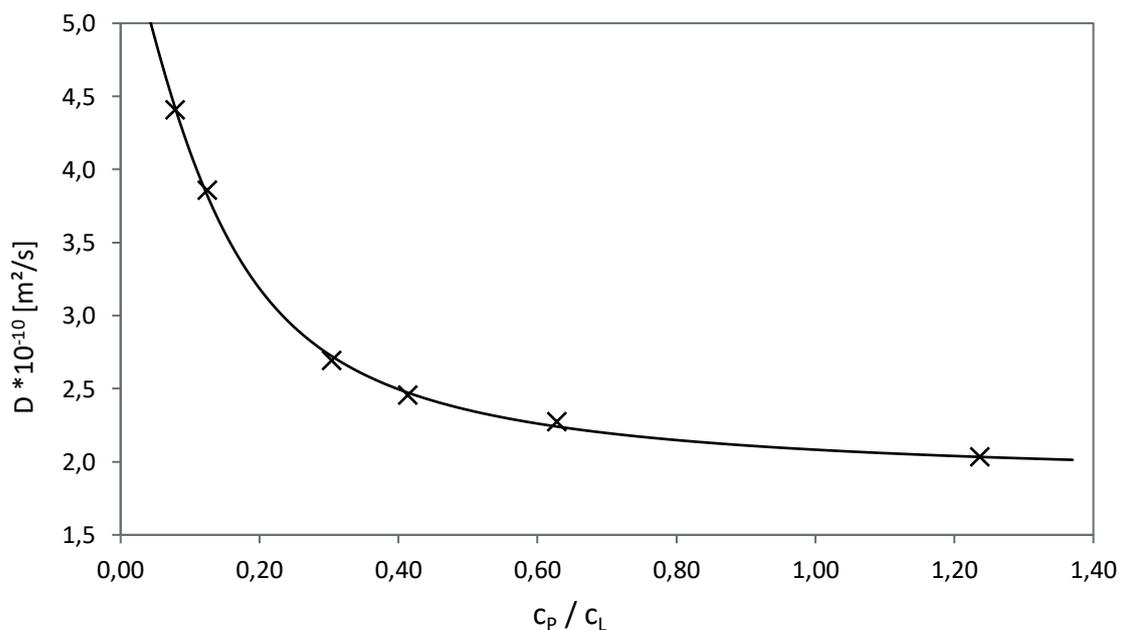


Abb. 43: Plot der gemessenen Diffusionskoeffizienten gegen den Konzentrationsquotienten $[P]_{\text{tot}}/c_0$, (0,5 – 8 mM Ephedrin), erste Versuchsreihe mit 40 g/L BSA,

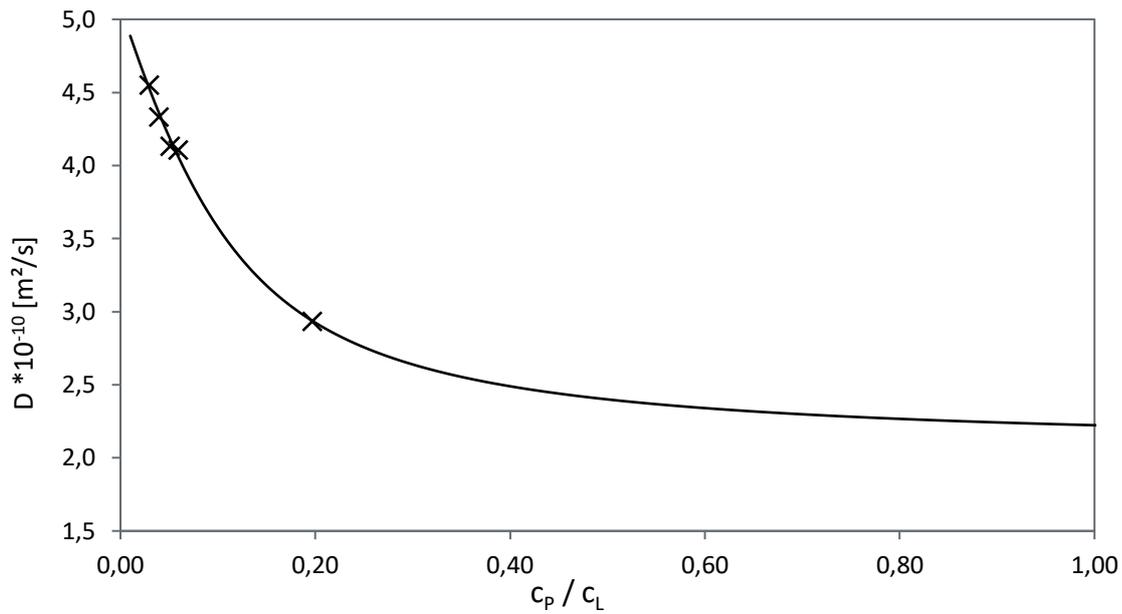


Abb. 44: Plot der gemessenen Diffusionskoeffizienten gegen den Konzentrationsquotienten $[P]_{\text{tot}} / c_0$, (3 – 20 mM Ephedrin), zweite Versuchsreihe mit 40 g/L BSA,

Tab. 41: Berechnete Konstanten aus den Diffusionsmessungen entsprechend Gleichung (24); PPB = Plasmaproteinbindung

	1. Versuchsreihe	2. Versuchsreihe
<i>(-)-Ephedrin-Konzentration</i>	0,5 – 8 mM	3 – 20 mM
<i>BSA-Konzentration</i>	40 g/L	40 g/L
$K_A / [P]_{\text{tot}} =$	1,613	2,449
$n =$	3,714	4,325
$D_F =$	5,862	5,087
$D_G =$	0,090	0,339
$R^2 =$	0,9989	0,9983
$D_F =$	$5,86 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$5,09 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$
$D_G =$	$0,09 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$0,34 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$
$K_D =$	0,97 mmol/L	1,47 mmol/L
$n =$	4	4
$pK_A =$	3,01	2,83
PPB =	38,26 %	29,00 %

Bei den ersten Versuchen (0,5 – 8 mM (-)-Ephedrin, Abb. 43) sind bei einer Ephedrin-Konzentration von 0,5 mM im Spektrum nur sehr kleine Signale des Liganden erkennbar. Dadurch sind die Spektren mit einer niedrigen Ephedrin-Konzentration nur schwer auswertbar. Bei den weiteren Versuchen wurde daher die Ephedrin-Konzentration auf 3 – 20 mM erhöht, um besser auswertbare Signale zu erhalten. Die Ergebnisse der Messung sind in Abb. 43 und Tab. 41 abgebildet.

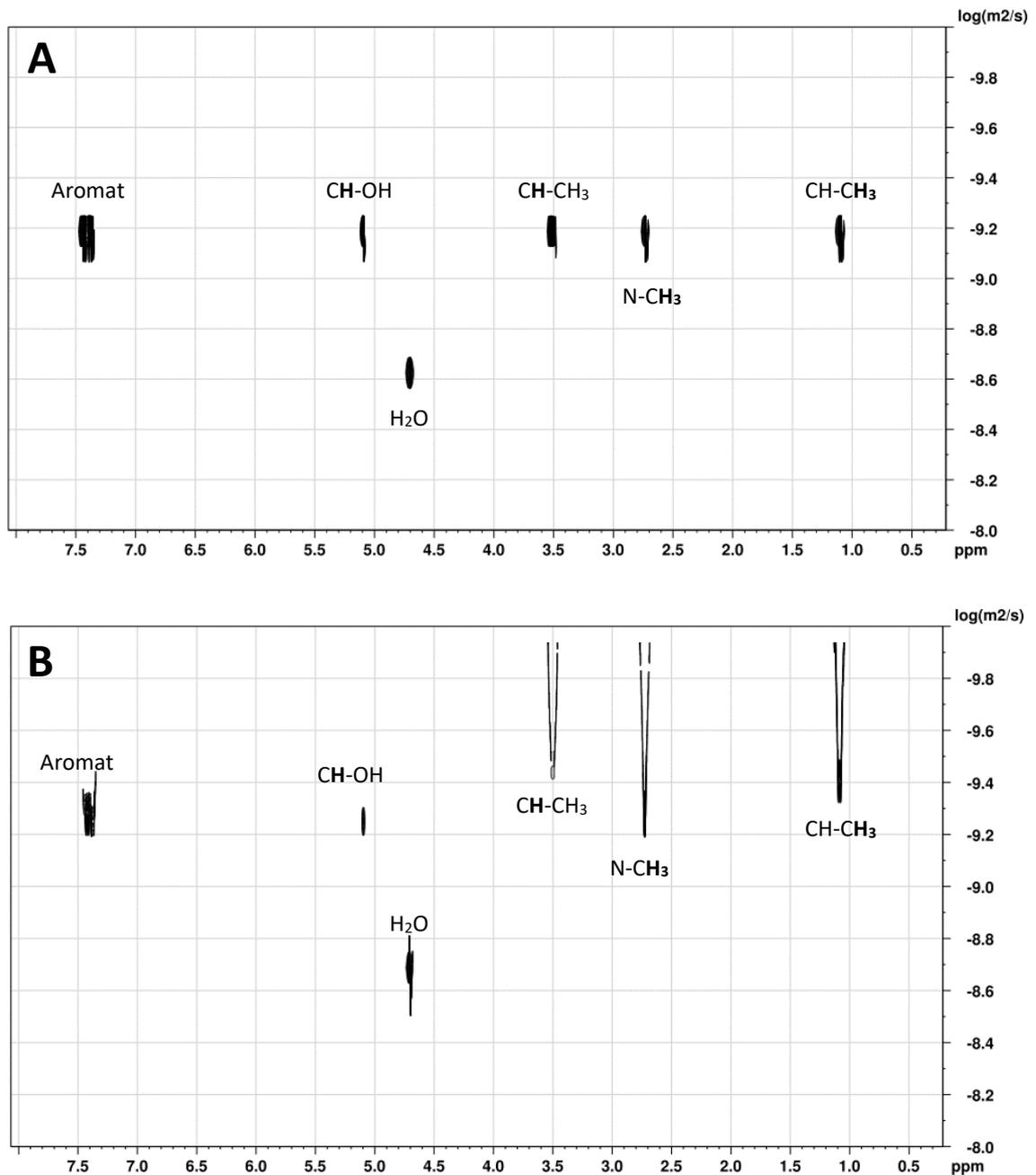


Abb. 45: 2D-Spektren der Diffusionsexperimente (Diffusionskoeffizient D_{obs} gegen chem. Verschiebung δ); (A) reine (-)-Ephedrinlösung (20 mM), (B) (-)-Ephedrinlösung (10 mM) in Anwesenheit von BSA (40 g/L)

In den 2D-Spektren, die bei den Diffusionsmessungen aufgenommen wurden, ist erkennbar, dass insbesondere die Diffusionskoeffizienten der im Hochfeld liegenden Signale durch die Anwesenheit von Albumin keine eindeutigen Ergebnisse liefern (siehe Abb. 45 B). Für die N-CH₃ Protonen liegt der berechnete Diffusionskoeffizient D im Bereich von $1,3 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ und $7,9 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ (siehe Abb. 45 B).

3.2 Diskussion

3.2.1 Chemische Verschiebung

Die ¹H-NMR-Spektren des Ephedrins zeigen, dass es sich bei der Plasmaproteinbindung vermutlich um eine schnelle Komplexbildung handelt, bei der sich das Gleichgewicht in kürzester Zeit einstellt. Das wird dadurch deutlich, dass jeweils nur ein Signal pro Atomgruppe im Spektrum sichtbar ist und nicht zwei.

Die Hochfeldverschiebung der Signale von Ephedrin im ¹H-NMR-Spektrum in Anwesenheit von Albumin weist darauf hin, dass die Protonen mit zunehmender HSA-Konzentration stärker abgeschirmt werden. Diese Hochfeldverschiebung ist jedoch nicht nur bei den Signalen des Ephedrins, sondern auch bei den HSA-Signalen zu beobachten. Diese allgemeine Verschiebung der Signale ins Hochfeld scheint daher nicht durch eine Bindung des Ephedrins an das Plasmaprotein verursacht zu werden. Diese Beobachtung lässt sich besser durch die große Elektronenhülle des Plasmaproteins erklären, die für die zunehmende Abschirmung der Signale verantwortlich ist. Durch Erhöhung der Proteinkonzentration in der Probelösung nehmen auch die Abstände der einzelnen Atomkerne von Protein und Ligand zueinander ab. Die stärkere Verschiebung der CH-CH₃- und N-CH₃-Signale deuten auf eine Beteiligung dieser Protonen an der Bindung zum Albumin. Die reversible Bindung an Albumin kann unter anderem durch Wasserstoffbrücken, ionische - und hydrophobe Wechselwirkungen zustande kommen^[1]. Eine Annäherung der Methylgruppe am Stickstoff (N-CH₃) und mögliche Abschirmung der Protonen durch eine hydrophobe Wechselwirkung mit den Aminosäureresten einer Bindetasche des Albumins könnte die Hochfeldverschiebung des Signals erklären. Das 2. Stereozentrum (CH-CH₃) wird aufgrund seiner Struktur nicht direkt mit dem Plasmaprotein in Wechselwirkung treten können. Viel wahrscheinlicher ist es, dass

der benachbarte Stickstoff über Wasserstoffbrücken oder ionische Wechselwirkungen mit dem Albumin interagiert. Der Stickstoff des sekundären Amins ist bei physiologischem pH-Wert zu einem großen Anteil positiv geladen. Somit könnte dieser mit den negativ geladenen Resten bzw. den Wasserstoffbrücken-Donatoren des Albumins in Wechselwirkung treten. Die erhöhte Elektronendichte am Stickstoff würde sich auch auf die Protonen des benachbarten Stereozentrums (CH-CH₃) und der Methylgruppe am Stickstoff (N-CH₃) auswirken und die stärkere Abschirmung dieser Protonen erklären.

Letztendlich scheint diese Methode jedoch, wie viele andere Ansätze zur Bestimmung des Ausmaßes der Plasmaproteinbindung, vor allem für Liganden mit einer hohen Affinität zu Albumin geeignet zu sein. Zwar lassen sich mit dieser Methode einzelne Protonen identifizieren, die an der Bindung zu Albumin beteiligt sind, wie die CH-CH₃ und N-CH₃ Protonen im Ephedrin. Jedoch müssen die Signale eine deutlich stärkere Hoch- bzw. Tieffeldverschiebung zeigen als sie in dieser Versuchsreihe zu beobachten war, damit sich K_D und das Ausmaß der Plasmaproteinbindung aus den Veränderungen der chemischen Verschiebung der Signale tatsächlich berechnen lassen. Nur Liganden, die eine hohe Plasmaproteinbindung aufweisen, erfüllen diese Voraussetzungen. Die anderen, in dieser Arbeit verwendeten Methoden haben jedoch gezeigt, dass die *Ephedra*-Alkaloide nur zu einem geringen Anteil an Albumin binden. Dies erklärt auch, weshalb die verlässliche Bestimmung der Proteinbindung mit diesem Versuchsaufbau nicht möglich ist. Aufgrund der ohnehin schon zu geringen Änderungen im Spektrum sind auch Unterschiede, die mit einer Stereoselektivität der Bindung einhergehen, nicht erkennbar.

Eine Optimierung der Versuchsbedingungen wie beispielsweise einer konstanten Protein- und variablen Ligandkonzentration könnte die Aussagekraft des Versuchs durch Verminderung der Störfaktoren verbessern. Ein Ansatzpunkt wäre sicherlich die Temperatur während der Messung zu senken, da eine niedrigere Temperatur den Austausch zwischen dem freiem Ephedrin und dem Ephedrin-Albumin-Komplex verlangsamen würde und damit die Bestimmung der Affinität begünstigt. Jedoch ist fraglich, ob aufgrund der starken Überlagerung der Ephedrin-Signale durch die breiten Resonanzbanden des Albumins eine repräsentative Messung mit diesem Versuchsaufbau überhaupt möglich ist.

3.2.2 Diffusionskoeffizient

Bei den NMR-Diffusionsexperimenten war es, anders als bei den Versuchen zur chemischen Verschiebung, möglich die Dissoziationskonstante K_D , die Anzahl der Bindestellen n und die Plasmaproteinbindung zu berechnen.

Im Gegensatz zu den vorhergehenden NMR-Experimenten zur chemischen Verschiebung wurde in dieser Versuchsreihe eine konstante Proteinkonzentration statt einer konstanten Ligandkonzentration eingesetzt. In den vorweg aufgenommenen ^1H -NMR-Spektren ist auffällig, dass sich die chemische Verschiebung der Ephedrin-Signale hier nicht zu ändern scheint. Ob diese Beobachtung tatsächlich auf eine fehlende Interaktion mit dem Protein zurückzuführen ist, ist fraglich. Zumal die chemische Verschiebung der Signale in Anlehnung an die Versuchsdurchführung von *Waibel* bei den Diffusionsexperimenten auf den Restwasserpeak bei 4,75 ppm statt dem üblichen TSP-Standard referenziert wurde ^[161].

Auch bei den Diffusionsexperimenten war die Überlagerung der Ephedrin-Signale im Bereich von 1 – 5 ppm durch das Plasmaprotein problematisch. Zum einen konnten die Diffusionskoeffizienten nur mithilfe der aromatischen Protonen bestimmt werden. Zum anderen mussten wegen der Überlagerung im Spektrum die Signalflächen statt der Signalintensitäten zur Berechnung herangezogen werden. Die Signalüberlagerung erschwert dabei die genaue Abgrenzung der einzelnen Ligand-Signale und bringt dadurch einen nicht zu vernachlässigen Messfehler in die Berechnung mit ein. Dies macht sich nicht zuletzt auch in der starken Streuung der Diffusionskoeffizienten im Hochfeld bemerkbar (siehe Abb. 45). Insbesondere die Signale CH-CH_3 (3,56 ppm, dq) und CH-CH_3 (1,14 ppm, d) sind in den aufgenommenen Spektren sehr breit und nur schwer abgrenzbar.

Die Intensität der Albumin-Signale ist im Bereich der aromatischen Protonen nicht so stark wie im Bereich von 1 – 5 ppm. Jedoch überlagern die Resonanzbanden des Albumins auch hier zum Teil die Signale des Ephedrins. Diese Messunschärfe, die durch die Überlagerung der Signale verursacht wird, zeigt sich auch bei den berechneten Ergebnissen. Sowohl die Ergebnisse der ersten und zweiten Messreihe sind auffällig hoch (38,3 % bzw. 29,0 % Proteinbindung), obwohl die Veränderung der Diffusionskoeffizienten, wie in Abb. 45 ersichtlich, eher gering ist.

Die minimale Änderung der Diffusionskoeffizienten in Anwesenheit von Albumin im Vergleich zu der reinen Ephedrinlösung ist dabei wohl eher auf die Änderung der Viskosität durch den Proteinzusatz statt auf eine starke Proteinbindung des Ephedrins zurückzuführen. Dies macht sich in einer identischen Verbreiterung aller Ephedrin-Signale in Anwesenheit von Albumin bemerkbar.

Auch hier zeigt sich, dass diese Methode eher für die Bestimmung der Plasmaproteinbindung stark bindender Arzneistoffe geeignet ist, bei denen es zu einer größeren Änderung der Diffusionskoeffizienten kommt. Dadurch wird der Einfluss der Messungenauigkeit durch die Signalüberlagerung geringer und die Ergebnisse zuverlässiger.



**ISOTHERMALE
TITRATIONS-KALORIMETRIE**

METHODE

1.1 Messprinzip

Bei der isothermalen Titrationskalorimetrie (iTC) wird die Wärme bestimmt, die bei der Bindung von zwei Stoffen frei bzw. verbraucht wird, je nachdem, ob es sich bei der Reaktion um einen exothermen oder endothermen Vorgang handelt. Dadurch kann man mittels iTC nicht nur die Bindungsstärke bestimmen, sondern auch thermodynamische Parameter wie die Enthalpie ΔH und die Entropie ΔS berechnen, die die ablaufende Reaktion charakterisieren^[83,84,165]. Bei den meisten Geräten beruht die Bestimmung der Reaktionswärme auf einer Wärmekompensation. Die Geräte sind so aufgebaut, dass sie aus einer Mess- und einer Referenzzelle bestehen (siehe Abb. 46). In der Messzelle befindet sich

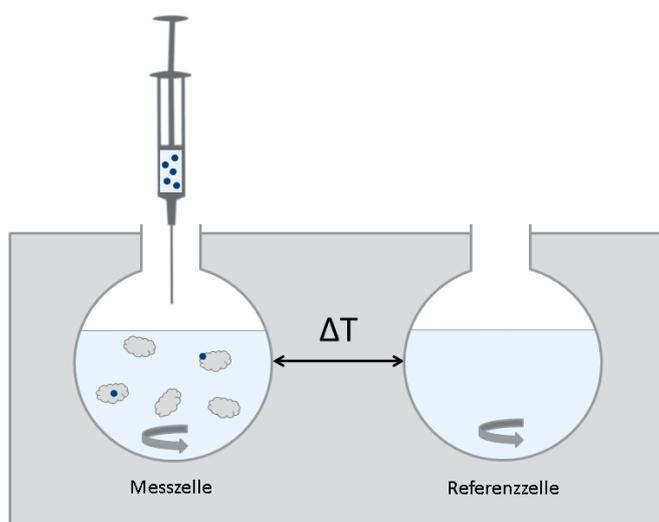


Abb. 46: Schematischer Aufbau der iTC Messapparatur

einer der beiden Bindungspartner – i.d.R. das Protein – gelöst in Puffer. Die Referenzzelle hingegen enthält ausschließlich Puffer. Der Ligand befindet sich in einer Spritze und wird unter ständigem Rühren volumen-genau zudosiert. Bei der schrittweisen Zugabe der Ligandenlösung und der Bindung des Liganden an das Makromolekül kommt es zu einem Temperatur-

unterschied zwischen Mess- und Referenzzelle. Das Gerät misst die Leistung ($\mu\text{cal}/\text{sec}$), die nötig ist, um diesen Temperaturunterschied zwischen den beiden Zellen auszugleichen. Dabei erhält man den in Abb. 47 schematisch dargestellten typischen Verlauf der Messkurve; die Peakfläche entspricht dabei der entstandenen Wärme Q .

Bei jedem weiteren Titrationschritt verringert sich die Menge an freien Bindestellen auf dem Protein, entsprechend weniger neue Bindungen können eingegangen werden. Dadurch wird die Peakfläche und damit die gemessene Wärme bei jeder Zugabe des Liganden immer

geringer, bis bei vollständiger Sättigung aller Bindestellen auf dem Protein kein Temperaturunterschied zwischen beiden Zellen mehr registrieren werden sollte. Die minimalen Temperaturunterschiede zwischen den beiden Zellen in der Plateauphase am Ende der Messung (Abb. 47) sind auf mechanische Effekte bzw. Lösungsvorgänge des Liganden zurückzuführen ^[83].

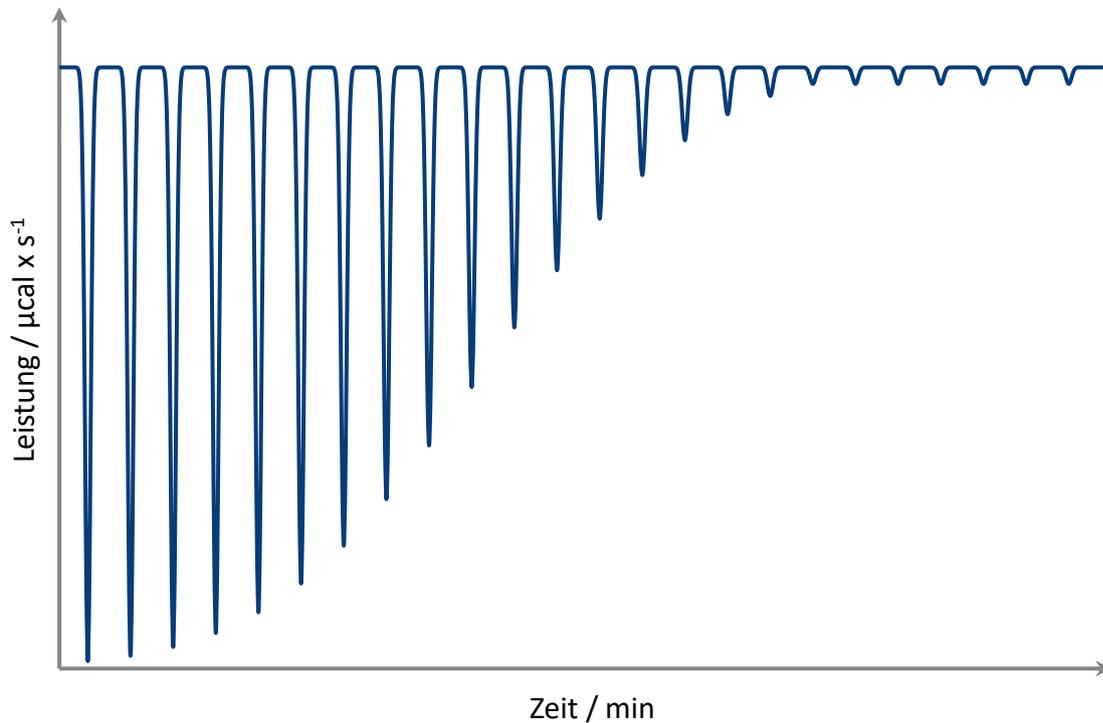


Abb. 47: Theoretischer Verlauf der Messkurve bei einer iTC-Messung ^[84]

Aufgrund der Weiterentwicklung der Messtechnik mit einer Verbesserung der Sensitivität bietet die iTC viele Möglichkeiten und Vorteile ^[84,165]. Die iTC eignet sich nicht nur zur thermodynamischen Charakterisierung einer Bindung, sondern kann auch zur Bestimmung von Bindungsstöchiometrie und -affinität herangezogen werden ^[83,166]. Dadurch ist die iTC ideal für die Untersuchung der Interaktionen im menschlichen Körper, zu der auch die Plasmaproteinbindung zählt ^[84]. Bei der Messung der freiwerdenden Bindungsenergie werden dabei nur spezifische Bindungen von Ligand und Makromolekül betrachtet, wohingegen unspezifische Bindungen nicht beachtet werden ^[167].

Weiterhin können verschiedene Parameter untersucht werden, die Einfluss auf die Interaktion haben können, wie der pH-Wert und damit der Protonierungsgrad des Liganden;

aber auch der Einfluss der Salzkonzentration und Wechselwirkungen mit anderen Zusatzstoffen wie Tensiden sind bestimmbar [83,168].

1.2 Berechnung der Plasmaproteinbindung

Die bei der Bindung an das Makromolekül entstehende Wärme hängt von der Bindungsenthalpie $\Delta_B H$, der Konzentration des Liganden und der Anzahl der Bindestellen auf dem Makromolekül ab und lässt sich mit folgender Formel berechnen [83,165]:

$$(26) \quad Q = n \cdot f \cdot [A]_{\text{total}} \cdot \Delta_B H \cdot V$$

Dabei stellt $[A]_{\text{total}}$ die Gesamtkonzentration des Liganden bzw. Arzneistoffes (mol/L), n die Anzahl an Bindestellen auf dem Makromolekül, f den Grad der Sättigung und V das Volumen innerhalb der Messzelle (L) dar. Durch nichtlineare Regression wird aus der Messkurve die Wiseman-Isotherme (siehe Abb. 48) berechnet, anhand derer sich Affinitätskonstante K_A^n und Anzahl der Bindestellen n berechnen lassen.

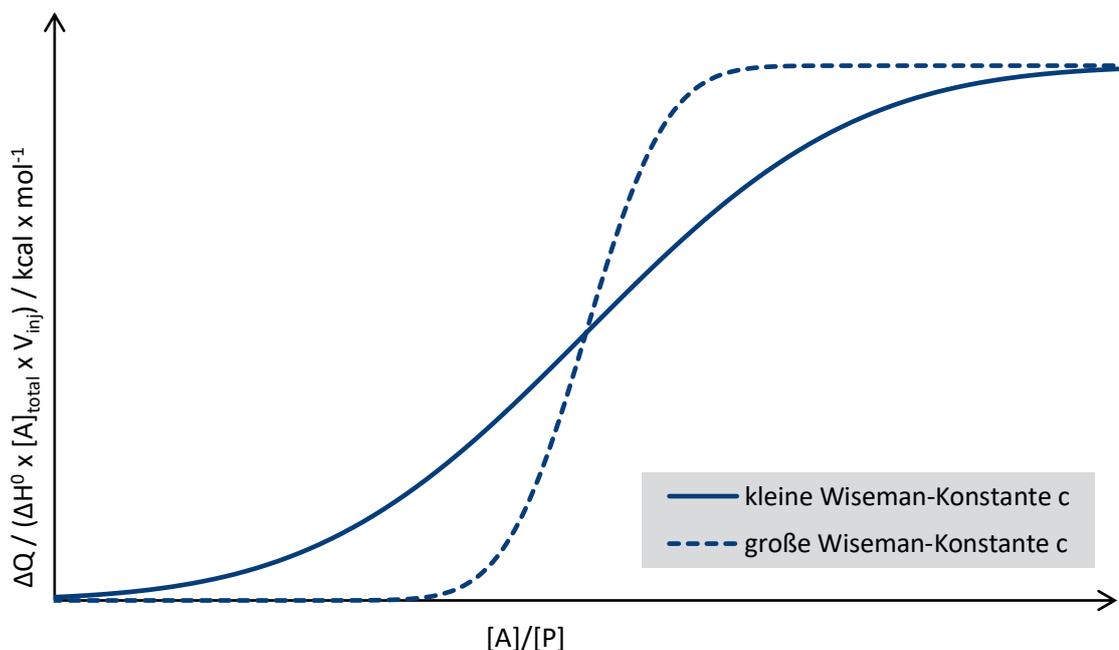


Abb. 48: Beispielhafter Verlauf der Wiseman-Isotherme
 ΔQ gemessene Wärmedifferenz, ΔH^0 Enthalpie, $[A]_{\text{total}}$ Ligandkonzentration in der Spritze,
 V_{inj} injiziertes Volumen, $[A]/[P]$ molares Verhältnis Ligand zu Protein

Die Form der Kurve hängt von dem Term c ab (siehe Abb. 48), der sogenannten Wiseman-Konstanten, die in folgendem Zusammenhang mit der Bindungsaffinität steht ^[84]:

$$(27) \quad c = n \cdot K_A^n \cdot [P]$$

Damit die Kurve auswertbar ist, sollte c im Bereich von 10 – 500 liegen. Bei Werten außerhalb dieses Bereichs sind die Fehler der Regression zu groß und die Werte zu ungenau ^[84].

Damit ist die Bestimmung mittels iTC bei sehr hohen bzw. sehr niedrigen Bindungsaffinitäten direkt nicht möglich. Bei sehr schwachen Wechselwirkungen sind deutlich höhere Konzentrationen nötig, um ausreichend hohe Signale zu bekommen; dies ist aufgrund der Löslichkeit jedoch nur begrenzt möglich. Bei sehr hohen Bindungsaffinitäten hingegen ist der ungebundene Anteil sehr niedrig und geht im Rauschen unter ^[166].

Umgehen lässt sich dieses Problem unter anderem durch Verdrängungsexperimente ^[83,85] oder durch das Messen bei höheren Temperaturen, da die Bindungsaffinität in der Regel bei höheren Temperaturen herabgesetzt ist. Mittels Van't-Hoffscher-Gleichung können die Ergebnisse für die gewünschte Temperatur extrapoliert werden. In Fällen, bei denen der pH-Wert der Lösung eine Rolle spielt und der Zusammenhang zwischen pH-Wert und ΔH bekannt ist, kann auch die Messung bei anderen pH-Werten ein Lösungsansatz sein ^[166].

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

2.1 Zusätzlich verwendete Geräte

2.1.1 Geräte

Bei dem verwendeten Isothermalen Titrationskalorimeter handelt es sich um ein MicroCal iTC200 System (GE Healthcare Northampton, MA, USA). Die Bearbeitung und Auswertung der Messergebnisse erfolgt mittels Origin® (OriginLab) Software.

2.2 Vermessene Liganden

Als weitere orthogonale Methode wurde die isothermale Titrationskalorimetrie zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide verwendet. Mittels iTC wurden die optisch aktiven Stereoisomere (-)-Ephedrin-HCl, (+)-Ephedrin x 0,5 H₂O, (-)-Pseudoephedrin und (+)-Pseudoephedrin vermessen.

2.3 Pufferlösung

Für die Vergleichbarkeit der Messergebnisse wurde auch für die iTC-Messungen der gleiche Phosphatpuffer (pH 7,4) verwendet, der auch bei den Ultrafiltrationsexperimenten eingesetzt wurde. Der Puffer wird sowohl für die Herstellung der Arzneistoff- und Proteinlösung als auch für die Referenzzelle verwendet. Vor der Verwendung des Phosphatpuffers wird dieser filtriert (CA, 0,2 µm) und für 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

2.4 Proteinlösung

Zur Herstellung der Proteinlösung wird bovines Serumalbumin verwendet. Dazu werden 6,6 mg gefriergetrocknetes Albumin eingewogen und in 1,0 mL Phosphatpuffer gelöst.

Die fertige Proteinlösung hat eine BSA-Konzentration von 0,1 mM.

Nach ersten fehlgeschlagenen Messungen wurde der Versuch mit einer höheren Proteinkonzentration (1 mM) wiederholt. Hierzu wird 66 mg bovines Serumalbumin in

ca. 800 μL filtriertem Phosphatpuffer vorgelöst und ad 1,0 mL mit Phosphatpuffer aufgefüllt. Vor Einsatz der Proteinlösungen in der iTC werden diese genau wie der Phosphatpuffer filtriert (CA, 0,2 μm).

2.5 Arzneistofflösung

Für die ersten Versuche in der iTC wurden jeweils 2mM Arzneistofflösungen aller vier optisch aktiven *Ephedra*-Alkaloide hergestellt. Zur Herstellung wird die in der kontinuierlichen Ultrafiltration verwendete Stammlösung der Enantiomere in Millipore®-Wasser bzw. 0,1 M HCl verwendet. Diese Stammlösungen werden entsprechend Tab. 42 mit ca. 4,5 mL Phosphatpuffer versetzt, der pH-Wert wird kontrolliert und ggf. korrigiert. Die Lösung wird anschließend mit Phosphatpuffer ad 5,0 mL aufgefüllt.

Tab. 42: ITC-Probelösungen der *Ephedra*-Alkaloide (2 mM);
(-)-E (-)-Ephedrin-HCl, (+)-E (+)-Ephedrin x0,5 H₂O, (-)-P (-)-Pseudoephedrin, (+)-P (+)-Pseudoephedrin

	(-)-E	(+)-E	(-)-P	(+)-P
Molare Masse / g x mol ⁻¹	201,7	174,2	165,2	165,2
Einwaage	40 mg		40 mg	
Lösungsmittel	H ₂ O	0,1 M HCl	0,1 M HCl	
c (Stammlösung)	20 mg/mL		10 mg/mL	
Volumen Stammlösung	101 μL	87 μL	165 μL	
Volumen Phosphatpuffer	ad 5,0 mL			

Bei den weiteren Versuchen wurde zunächst nur (-)-Ephedrin analysiert. Wie bei der Proteinlösung wurde auch bei der Arzneistofflösung die Konzentration des Ephedrins, in diesem Fall auf 5 mM, erhöht. Bei der Herstellung der höher konzentrierten Arzneistofflösung wird auf die Zubereitung einer Stammlösung verzichtet. Stattdessen werden 5 mg des Alkaloids direkt eingewogen und dieses ad 5,0 mL mit Phosphatpuffer verdünnt. Auch die Arzneistofflösungen werden wie der Puffer und die Proteinlösung vor Einsatz filtriert (CA, 0,2 μm).

2.6 Versuchsablauf

Für die Bestimmung des Ausmaßes der Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide mittels iTC wird die entstehende Bindungswärme gemessen, die bei der Titration der Proteinlösung mit einer Liganden- bzw. Arzneistofflösung freigesetzt bzw. aufgenommen wird. Die Versuchsanordnung entspricht dem in Abb. 46 dargestellten Aufbau. In der Messzelle befindet sich die Proteinlösung mit dem bovinen Serumalbumin; die Referenzzelle enthält ausschließlich Phosphatpuffer. Die Arzneistofflösung mit dem Liganden befindet sich in einer Spritze, die mit einer Umdrehungszahl von 500 rpm die Lösung homogenisiert. Während der Messung wird nun die Arzneistofflösung schrittweise über die Spritze volumengenau zudosiert (insgesamt 20 Injektionen alle 150 Sekunden). Die Durchführung der Messung erfolgt bei 37 °C.

ERGEBNISSE

Über den durch die Bindungsenthalpie verursachten Wärmeunterschied zwischen Mess- und Referenzzelle kann das Ausmaß der Plasmaproteinbindung auch mittels isothermaler Titrationskalorimetrie bestimmt werden.

3.1 Messergebnisse

Für die ersten iTC-Versuche wurde die Plasmaproteinbindung aller vier optisch aktiven Stereoisomere der *Ephedra*-Alkaloide gegenüber bovinem Serumalbumin untersucht. Die Konzentration der *Ephedra*-Alkaloide wurde mit 2 mM dabei so gewählt wie sie auch bei den Vergleichsmessungen in der kontinuierlichen Ultrafiltration eingesetzt wurden.

Da BSA durch seine oberflächenaktiven Eigenschaften zur Schaumbildung neigt, wenn die Lösung gerührt wird, wurde mit 0,1 mM eine Albumin Konzentration gewählt, die etwas niedriger liegt als die physiologische Konzentration (0,6 mM^[8]) im Serum.

Diese ersten Messungen ergaben für keines der vier *Ephedra*-Alkaloide auswertbare Messkurven. Es konnten zwar teilweise minimale Wärmeunterschiede bei der Zugabe der Wirkstofflösung zwischen Mess- und Referenzzelle registriert werden, jedoch zeigte sich nicht der typische Verlauf der iTC-Messkurve, der auf eine tatsächliche Bindung an Albumin

hinweist. Es wird angenommen, dass die entstehende Bindungswärme der ersten Versuchsreihe aufgrund der niedrigen Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide zu gering war, um mittels iTC messbar zu sein. Deshalb wurde die Konzentration beider Bindungspartner erhöht.

Für die weiteren Versuche wurde die Konzentration des bovinen Serumalbumins um das zehnfache auf 1 mM erhöht, die eingesetzte Ephedrin-Konzentration lag bei 5 mM.

Bei diesen weiterführenden Versuchen wurde zunächst nur (-)-Ephedrin-HCl untersucht, um zu ergründen, ob weitere Untersuchungen mittels iTC überhaupt erfolgsversprechend zur Bestimmung des Ausmaßes der Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide verwendet werden können.

Eine Erhöhung der Plasmaprotein- bzw. Ligand-Konzentrationen ergab ebenfalls keine auswertbaren Messkurven. Auch bei diesen zusätzlichen Messungen konnten keine signifikanten Wärmeunterschiede zwischen Mess- und Referenzzelle registriert werden. Aufgrund der oberflächenaktiven Eigenschaften des Albumins wurde die Messung durch Schaumbildung der Proteinlösung zusätzlich erschwert.

3.2 Diskussion

Wie bei der Methodenbeschreibung erwähnt, hat die Bestimmung der Plasmaproteinbindung mittels iTC bei einer sehr geringen Bindungsaffinität zu den Plasmaproteinen Schwachpunkte. Dies zeigte sich auch bei den Versuchen zur Bestimmung der Bindungsaffinität der *Ephedra*-Alkaloide gegenüber bovinem Serumalbumin.

Wegen des kleinen Anteils an bindendem Liganden ist die freiwerdende Bindungswärme zu gering um als Wärmedifferenz zwischen den beiden Zellen messbar zu sein. Man erhält keine auswertbaren Messkurven und kann daher auf diese Weise keine Plasmaproteinbindung bestimmen. Die minimalen Wärmeunterschiede, die bei den iTC-Versuchen gemessen wurden, sind höchstwahrscheinlich auf Lösungsvorgänge und mechanische Effekte zurückzuführen.

Wie sich in den Versuchen gezeigt hat, hilft auch eine Erhöhung der Konzentration beider Bindungspartner nicht unbedingt weiter. Eine mögliche Herangehensweise wäre hier die Entwicklung von Verdrängungsexperimenten, wie es *Sigurskjold* und *Leavitt* bei der Bestimmung niedriger Bindungsaffinitäten empfehlen ^[83,85]. Da jedoch noch nicht klar ist, an

welche der vielen Bindestellen auf dem Albumin die *Ephedra*-Alkaloide tatsächlich binden, ist die Wahl eines geeigneten Verdrängungspartners schwierig. Durch den hohen benötigten Zeitaufwand für die Entwicklung einer solchen Versuchsreihe, wurde dieser Ansatz im Rahmen der Doktorarbeit nicht weiter verfolgt. Ein weiterer Störfaktor bei der Messung war die Schaumbildung in der Messzelle, die sich aufgrund der oberflächenaktiven Eigenschaften des Albumins jedoch kaum vermeiden lässt, außer man setzt es in nur sehr verdünnten Konzentrationen ein.

Letztendlich zeigen die Versuche, dass auch die isothermale Titrationskalorimetrie wie die meisten analytischen Methoden bei der Bestimmung sehr niedriger Plasma-proteinbindungen an ihre Grenzen kommt und für solche Problemstellungen nur bedingt einsetzbar ist.



ZUSAMMENFASSUNG

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität von Liganden zu den Plasmaproteinen, insbesondere Albumin, wurden über die Jahre zahlreiche Methoden entwickelt. Die Grundlage dieser Arbeit war die Bestimmung der Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide unter Verwendung einzelner dieser etablierten Methoden. Aufgrund ihres Anwendungsgebiets als Notfallmedikation bei Anästhesie-bedingter Hypotonie und den damit verbundenen Anforderungen an die Pharmakokinetik, sollten die *Ephedra*-Alkaloide niedrig-affine Liganden der Plasmaproteine darstellen. In der Literatur und in vorhergehenden Arbeiten wurden für die *Ephedra*-Alkaloide jedoch sehr unterschiedliche, teilweise der Indikation widersprechende Affinitäten bestimmt. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit das Ausmaß der Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide weiter untersucht und die Affinität zu Albumin bzw. anderen Plasmaproteinen im humanen Serum bestimmt werden. Neben der Affinität sollte auch die Stereoselektivität der Bindung genauer betrachtet werden, die bei der Bindung vieler Wirkstoffe eine Rolle spielt. Als Referenzmethode diente die kontinuierliche Ultrafiltration, die auch schon bei Hörst verwendet wurde.

Folgende Schlussfolgerungen konnten aus den Ergebnissen dieser Arbeit gezogen werden:

1) Die Ergebnisse der kontinuierlichen Ultrafiltration zeigten, dass die *Ephedra*-Alkaloide, Ephedrin und Pseudoephedrin, ein nur geringes Ausmaß an Plasmaproteinbindung von 4 – 9 % gegenüber bovinem und humanem Serumalbumin zeigen. Eine deutlich höhere Plasmaproteinbindung von 19 – 37 % konnte hingegen bei der Verwendung von humanem Serum bestimmt werden. Die Affinität von Pseudoephedrin war dabei jeweils geringer als die von Ephedrin.

2) Diese Ergebnisse mit humanem Serum und die Tatsache, dass Albumin vorwiegend saure Stoffe bindet, legen nahe, dass die *Ephedra*-Alkaloide vermehrt an andere Plasmaproteine in Serum binden. Erste Messergebnisse mit saurem α_1 -Glykoprotein bestätigen diese Vermutung.

3) Eine Stereoselektivität konnte nur in geringem Maß bei (+)-Ephedrin beobachtet werden, wobei der Unterschied nur im Serum signifikant ist. Pseudoephedrin dagegen zeigte keinerlei Stereoselektivität. Diese Beobachtung passt zu den Schlussfolgerungen der Pfeiffer'schen Regel zur Stereoselektivität einer Bindung.

4) Andere Sympathomimetika mit einer zusätzlichen Phenolgruppe im Molekül zeigen eine ähnlich niedrige Affinität zu Albumin von ca. 10 %. Eine zusätzliche Phenolgruppe

scheint die sauren Eigenschaften des Liganden nicht ausreichend zu erhöhen, um die Affinität zu Albumin signifikant zu steigern.

5) Das tertiäre Kohlenstoffatom am Stickstoff des Ephedrins scheint in gewisser Weise an der Bindung zu Albumin beteiligt zu sein. Sympathomimetika mit einer zusätzlichen Methylgruppe an diesem Kohlenstoffatom, wie Ephedrin, Pseudoephedrin und Oxilofrin, zeigen eine größere Streuung der Messergebnisse. Eine zusätzliche Methylgruppe in dieser Position scheint die Bindung daher sterisch zu hindern.

6) Die Ergebnisse der diskontinuierlichen Ultrafiltration bestätigen weitestgehend die Ergebnisse der kontinuierlichen Ultrafiltration

7) Eine Bestimmung des Ausmaßes der Plasmaproteinbindung von niedrig-affinen Stoffen ist mit den anderen orthogonalen Methoden ACE, NMR und iTC nicht möglich. Diese drei verwendeten Methoden trennen nicht wie die klassischen Methoden den gebundenen vom ungebundenen Wirkstoff, sondern beruhen auf einer Veränderung bestimmter Messparameter: bei der ACE die Migrationszeit, bei der NMR-Spektroskopie die chemische Verschiebung der Signale bzw. der Diffusionskoeffizient und bei der iTC die frei werdende Bindungswärme. Bei allen drei Methoden war die Änderung der Messgröße aufgrund der niedrigen Plasmaproteinbindung zu gering, um auswertbar zu sein.

8) Eine Störgröße bei die orthogonalen Methoden war vielfach auch das Albumin selbst bzw. dessen Eigenschaften. Bei der Affinitäts-Kapillarelektrophorese sind physiologische HSA-Konzentrationen wegen des starken Basislinienrauschens nicht messbar. Zudem bewirkt der Albuminzusatz im Trennpuffer eine Viskositätsänderung, die den EOF verlangsamt und so die Messung stört. Bei der NMR-Spektroskopie können wegen der Überlagerung der Signale durch die breiten Albuminbanden weder Veränderungen in der chemischen Verschiebung noch des Diffusionskoeffizienten zuverlässig bestimmt werden. In der iTC erschwerte die Schaumbildung der Lösung, die durch die Oberflächenaktivität des Albumins verursacht wird, die Messung.

In dieser Arbeit konnte somit das Ausmaß der Plasmaproteinbindung der *Ephedra*-Alkaloide mit verschiedenen Methoden erfolgreich bestimmt werden. Damit bestätigte diese Arbeit, dass die *Ephedra*-Alkaloide, wie deren Indikation vermuten lässt, zu den niedrig affinen Liganden des Albumins zählen. Um genauer eingrenzen zu können durch welche Plasmaproteine im Blutserum die *Ephedra*-Alkaloide transportiert werden, sollten die

Untersuchungen zum sauren α_1 -Glykoprotein fortgesetzt und gegebenenfalls durch weitere Bestimmungen mit anderen Plasmaproteinen ergänzt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben auch gezeigt, dass viele der unzähligen Methoden zur Untersuchung der Plasmaproteinbindung bei der Bestimmung von niedrig affinen Liganden ihre Grenzen haben. Nach wie vor sind zur Bestimmung einer niedrigen Bindungsaffinität weiterhin die klassischen Methoden, wie die kontinuierliche Ultrafiltration, Mittel der Wahl. Nicht zuletzt deshalb erfreuen sich diese Methoden auch heute noch großer Beliebtheit.



Over the years many methods have been developed to determine the binding affinity of ligands towards the plasma proteins, especially to albumin. The focus of this thesis was the determination of the plasma protein binding of the *Ephedra* alkaloids using several of those long established methods. Due to their application as emergency drugs for anaesthetic induced hypotension and the associated demands on pharmacokinetics, *Ephedra* alkaloids should display a low binding affinity towards plasma proteins. Yet in literature and in previous studies the *Ephedra* alkaloids showed a great variety of binding affinities, in parts even contradictory to their indication. Therefore the *Ephedra* alkaloids' extent of plasma protein binding was further examined and the affinity towards albumin and other plasma proteins in human serum determined in the course of this study. Next to its affinity the bindings' stereoselectivity was analysed as well, playing an important role in the binding of many drugs. The continuous ultrafiltration served as a reference method formerly also used by Hörst. The following conclusions can be drawn from the results of this study:

1. The results of the continuous ultrafiltration experiments show that the *Ephedra* alkaloids, ephedrine and pseudoephedrine, only have a low extent of 4 – 9 % of plasma protein binding towards bovine and human serum albumin. However using human serum a significantly higher plasma protein binding of 19 – 37 % can be measured. The affinity of pseudoephedrine was lower than ephedrine each time.
2. These results with human serum and the fact that albumin mainly binds acidic substances leads to the conclusion that *Ephedra* alkaloids principally bind to other plasma proteins in serum. First findings with α_1 -acid glycoprotein corroborate this hypothesis.
3. A minor stereoselectivity was observed only for (+)-ephedrine, although the difference was merely significant in human serum. Pseudoephedrine on the other hand didn't display any kind of stereoselectivity. These observations coincide with the reasoning of Pfeiffer's rule regarding the stereoselectivity of binding.
4. Other sympathomimetics with an additional phenolic group in the molecule demonstrate a similar low binding affinity towards albumin of approx. 10 %. An additional phenolic group doesn't seem to elevate the acidity of the ligand sufficiently in order to increase the affinity towards albumin significantly.

5. The tertiary carbon atom bound to the nitrogen in ephedrine appears to be involved in the binding to albumin in some way. Measured results display a higher variance for sympathomimetics with an additional methyl group in this position like ephedrine, pseudoephedrine and oxilofrine. The additional methyl group seems to hinder the binding sterically.
6. The results of the discontinuous ultrafiltration confirm the results of the continuous ultrafiltration experiments for most parts.
7. The determination of the extent of plasma protein binding is not feasible with the other orthogonal methods ACE, NMR and iTC for low affinity ligands. Those three methods don't rely on the separation of bound and unbound drug as the classical methods do. Instead they are based on the alteration of certain measuring parameters: for the ACE it's the migration time, in NMR spectroscopy it's the chemical shift or the diffusion coefficient and using iTC it's the released binding heat. For all three methods the change of those parameters was too low to be evaluable.
8. One disturbance with the orthogonal methods was often albumin itself or its properties. In affinity capillary electrophoresis physiological HSA concentrations are not measurable due to the high background noise caused by albumin. Furthermore the addition of albumin in the background electrolyte leads to a change in viscosity, slowing the EOF and thus falsifying the measurement. Using NMR spectroscopy neither changes in the chemical shift nor the diffusion coefficient can be reliably determined due to overlap of the albumin and ligand signals. During iTC experiments the foaming of the solution caused by the surface activity of albumin itself hinders the measurement.

In summary the extent of plasma protein binding was successfully determined for the *Ephedra* alkaloids using different measuring techniques. Thereby this study confirmed that the *Ephedra* alkaloids are low affinity ligands of albumin as was suggested by their current use in drug therapy. To narrow down by which plasma proteins the *Ephedra* alkaloids are transported in serum further analysis with α_1 -acid glycoprotein and if applicable with other plasma proteins is necessary.

The results of this study also show that countless methods for determining the extent of plasma protein binding fail to produce reliable results for low affinity ligands. After all the

classical methods such as continuous ultrafiltration are still the methods of choice when it comes to determine low affinity binding. If nothing else this is the reason why those methods are still so popular to date.

ANHANG

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

ORIGINALARBEITEN

M. Volpp, U. Holzgrabe:

Determination of plasma protein binding for sympathomimetic drugs by means of ultrafiltration; *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019** 127: 175-84

POSTERPRÄSENTATIONEN

M. Volpp; U. Holzgrabe:

Determination of plasma protein binding of ephedrine and its stereoisomers
DPhG-Jahrestagung in München, 2016

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

*-HCl	*hydrochlorid	CUF	kontinuierliche Ultrafiltration
³ J	vicinale Kopplung	Cys	Cystein
ACE	Affinitätskapillar- elektrophorese	d	Dublett
ACN	Acetonitril	D ₂ O	Deuteriumoxid
AGP	saures α ₁ -Glykoprotein	Da	Dalton
AU	absorbance units	DAD	Diodenarray-Detektor
AUC	Fläche unter der Plasmaspiegelkurve	DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
β-CD	β-Cyclodextrin	DMSO	Dimethylsulfoxid
BG	Blutgruppe	dq	Dublett vom Quartett
BSA	bovines Serumalbumin	DSC	dynamischen Differenzkalorimetrie
CA	Celluloseacetat	DUF	diskontinuierliche Ultrafiltration
CE	Kapillarelektrophorese	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
CMC	kritische Mizellbildungs- konzentration	EOF	elektroosmotische Fluss

<i>et al.</i>	<i>lat. et alia</i> , und andere	NSAID	Nichtsteroidales Antiphlogistikum
GC	Gaschromatographie		
HDL	high density lipoprotein	OTC	<i>engl. over the counter</i> , frei verkäufliche Arzneimittel
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	NMR	Kernspinresonanz
HSA	humanes Serumalbumin	p.a.	<i>lat. pro analysi</i> , zur Analyse
i.v.	intravenös	PDA	Photodioden-Array-Detektor
ID	Innendurchmesser	PE	Petrolether
IgA	Immunglobulin A	PES	Polyethersulfon
IgG	Immunglobulin G	Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
IgM	Immunglobulin M	pK _A	Affinitätskonstante
IP	isoelektrischer Punkt	pK _S	Säurekonstante
IS	Interner Standard	PMMA	Polymethylmethacrylat
iTC	isothermale Titrationskalorimetrie	PPB	Plasmaproteinbindung
K _A	Bindungskonstante	PTFE	Polytetrafluorethylen
K _A ⁿ	Gesamt-Affinitätskonstante	PVDF	Polyvinylidenfluorid
K _D	Dissoziationskonstante	R ²	Bestimmtheitsmaß
LDL	low density lipoprotein	rel sdv	relative Standardabweichung
LOQ	Bestimmungsgrenze	R _S	Auflösung
Lys	Lysin	s	Singulett
m	Multiplett	SDS	Natriumdodecylsulfat
MEOD	deutერიertes Methanol	SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
MeOH	Methanol	sdv	Standardabweichung
Mip	macrophage infectivity potentiator	TSP	Trimethylsilylpropionat
M _R	Molekulargewicht	Tyr	Thyrosin
MWCO	molecular weight cut-off	UV	Ultraviolett
NADA	Nationale Anti Doping Agentur	VWD	Variabler Wellenlängendetektor
NMGG	nominale Molekulargewichtsgrenze	WADA	World Anti-Doping Agency
		WFR	Wiederfindungsrate
		wfr.	wasserfrei

TABELLENVERZEICHNIS

TAB. 1: ÜBERSICHT DER WICHTIGSTEN VERTRETER DER FÜNF PLASMAPROTEINFRAKTIONEN	12
TAB. 2: WICHTIGSTE LIGANDEN AN DEN BINDESTELLEN SUDLOW I UND SUDLOW II	18
TAB. 3: GRAPHISCHE BESTIMMUNG DER AFFINITÄTSKONSTANTE K_A^N UND DER BINDESTELLENANZAHL N	48
TAB. 4: VERDÜNNUNGSREIHE KALIBRIERGERADE MIT HUMANEM SERUM, PROTEINBESTIMMUNG.....	63
TAB. 5: VERDÜNNUNGSREIHE KALIBRIERGERADE MIT HSA, PROTEINBESTIMMUNG.....	63
TAB. 6: ARZNEISTOFFLÖSUNGEN DER <i>EPHEDRA</i> -ALKALOIDE (VORABMESSUNGEN, 400 MG/L, CUF)	64
TAB. 7: ARZNEISTOFFLÖSUNGEN DER <i>EPHEDRA</i> -ALKALOIDE (VERGLEICHSMESSUNG, 2 MM, CUF)	65
TAB. 8: ARZNEISTOFFLÖSUNGEN DER <i>EPHEDRA</i> -ALKALOIDE (0,2 MM, CUF);.....	65
TAB. 9: ARZNEISTOFFLÖSUNGEN DER ZUSÄTZLICHEN SYMPATHOMIMETIKA (0,2 MM, CUF);	66
TAB. 10: ARZNEISTOFFLÖSUNGEN DER MIP-INHIBITOREN, CUF	66
TAB. 11: ARZNEISTOFFLÖSUNGEN DER FLUORCHINOLONE, CUF	67
TAB. 12: ARZNEISTOFFLÖSUNGEN DER ZIMTSÄURE-DERIVATE, CUF.....	68
TAB. 13: VERDÜNNUNGSREIHE KALIBRIERGERADE <i>EPHEDRA</i> -ALKALOIDE, DUF	75
TAB. 14: VERDÜNNUNGSREIHE KALIBRIERGERADE DUF GHQ168-1 , AUS LÖSUNG GHQ168-1.....	75
TAB. 15: VERDÜNNUNGSREIHE KALIBRIERGERADE DUF GHQ168-2 , AUS LÖSUNG GHQ168-2.....	76
TAB. 16: VERDÜNNUNGSREIHE KALIBRIERGERADE DUF GHQ2430x , AUS LÖSUNG GHQ243-1	76
TAB. 17: PLASMAPROTEINBINDUNG DER MIP-INHIBITOREN, SUBSTANZ 28B UND 28C	81
TAB. 18: PLASMAPROTEINBINDUNG DER MIP-INHIBITOREN, VORSTUFE 4A	82
TAB. 19: AFFINITÄT DER PHENYLETHYLAMINE GEGENÜBER ALBUMIN ODER HUMANEM PLASMA IN DER LITERATUR	98
TAB. 20: PLASMAPROTEINBINDUNG DER <i>EPHEDRA</i> -ALKALOIDE, CUF-ERGEBNISSE NACH <i>HÖRST</i>	101
TAB. 21: PLASMAPROTEINBINDUNG DER <i>EPHEDRA</i> -ALKALOIDE, CUF-VERGLEICHSMESSUNGEN 2 MM.....	102
TAB. 22: EXPERIMENTELL BESTIMMTER MOLARER ABSORPTIONSKOEFFIZIENT DER <i>EPHEDRA</i> -ALKALOIDE.....	104
TAB. 23: PLASMAPROTEINBINDUNG DER <i>EPHEDRA</i> -ALKALOIDE, 0,2 MM, CUF	105
TAB. 24: PLASMAPROTEINBINDUNG DER SYMPATHOMIMETIKA, 0,2 MM	115
TAB. 25: WIEDERFINDUNGSRATE, BESTIMMUNGSGRENZEN UND BESTIMMTHEITSMAB DER DISKONTINUIERLICHEN ULTRAFILTRATIONSMETHODE	124
TAB. 26: PLASMAPROTEINBINDUNG DER <i>EPHEDRA</i> -ALKALOIDE MITTELS DUF, ENTSPR. GLEICHUNG (8)	124
TAB. 27: PLASMAPROTEINBINDUNG DER <i>EPHEDRA</i> -ALKALOIDE MITTELS DUF, ENTSPR. GLEICHUNG (12)	126
TAB. 28: PLASMAPROTEINBINDUNG DER <i>EPHEDRA</i> -ALKALOIDE MITTELS DUF, GRAPHISCHE AUSWERTUNG NACH SCATCHARD, KLOTZ UND NICHTLINEAR	127
TAB. 29: GRAPHISCHE BESTIMMUNG DER AFFINITÄTSKONSTANTE K_A IN DER ACÉMITHILFE DER ELEKTROPHORETISCHEN MOBILITÄTEN	142
TAB. 30: GRAPHISCHE BESTIMMUNG DER AFFINITÄTSKONSTANTE K_A IN DER ACE MITHILFE DER MOBILITÄTSVERHÄLTNISSE.....	144
TAB. 31: VERDÜNNUNGSREIHE ACE-TRENNPUFFER, 0,4 – 0,9 MM HUMANES SERUMALBUMIN (HSA)	146
TAB. 32: VERDÜNNUNGSREIHE ACE-TRENNPUFFER, 25 – 75 μ M HUMANES SERUMALBUMIN (HSA)	146
TAB. 33: VERDÜNNUNGSREIHE ACE-TRENNPUFFER, 2,5 – 25 μ M HUMANES SERUMALBUMIN (HSA)	146
TAB. 34: VERDÜNNUNGSREIHE NMR-PROBELÖSUNGEN (Δ), MALEINSÄURE	166
TAB. 35: VERDÜNNUNGSREIHE NMR-PROBELÖSUNGEN (Δ), TSP	166
TAB. 36: MESSPARAMETER ^1H -SPEKTREN ZUR AUSWERTUNG DER CHEMISCHEN VERSCHIEBUNG	167
TAB. 37: ZUORDNUNG DER SIGNALE IM ^1H -NMR-SPEKTRUM VON EPHEDRIN	168
TAB. 38: VERDÜNNUNGSREIHE NMR-PROBELÖSUNGEN (D), 0,5 – 8 MM (-)-EPHEDRIN-HCL	169
TAB. 39: VERDÜNNUNGSREIHE NMR-PROBELÖSUNGEN (D), 3 – 20 MM (-)-EPHEDRIN-HCL	170
TAB. 40: MESSPARAMETER NMR-DIFFUSIONSMESSUNG.....	174
TAB. 41: BERECHNETE KONSTANTEN AUS DEN DIFFUSIONSMESSUNGEN ENTSPRECHEND GLEICHUNG (24);.....	182
TAB. 42: ITC-PROBELÖSUNGEN DER <i>EPHEDRA</i> -ALKALOIDE (2 MM).....	196

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABB. 1: PHASEN DER PHARMAKOLOGISCHEN WIRKUNG BEI PERORALER GABE NACH <i>MUTSCHLER</i>	4
ABB. 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PLASMASPIEGELKURVEN VON WIRKSTOFFEN MIT EINER HOHEN UND NIEDRIGEN PLASMAPROTEINBINDUNG	9
ABB. 3: ZUSAMMENSETZUNG DES MENSCHLICHEN BLUTES.....	10
ABB. 4: CHARAKTERISTISCHE AUFTRENNUNG DER PLASMAPROTEINE BEI DER SERUMELEKTROPHORESE	11
ABB. 5: 3-DIMENTIONALE STRUKTUR VON HUMANEM UND BOVINEM SERUMALBUMIN.....	14
ABB. 6: AMINOSÄURESEQUENZ VON HUMANEM SERUMALBUMIN NACH <i>MINGHETTI, SUGIO, MELOUN</i> UND <i>PETERS</i>	15
ABB. 7: PATHOLOGISCHE VERÄNDERUNG DER PLASMAPROTEINFRAKTIONEN BEI DER SERUMELEKTROPHORESE	24
ABB. 8: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER KLASSISCHEN METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER PLASMAPROTEINBINDUNG	28
ABB. 9: ANLAGE ZUR KONTINUIERLICHEN ULTRAFILTRATION NACH <i>HEINZE</i>	36
ABB. 10: AUFBAU DER ULTRAFILTRATIONSZELLE	37
ABB. 11: MODIFIZIERTE ANLAGE ZUR KONTINUIERLICHEN ULTRAFILTRATION.....	37
ABB. 12: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER MESSKURVEN EINES CUF-VERSUCHS	39
ABB. 13: ELUTIONSKURVEN (NORMIERT) DER DREI VERSUCHSTEILE DER KONTINUIERLICHEN ULTRAFILTRATION	42
ABB. 14: SCHEMATISCHER ABLAUF DER DISKONTINUIERLICHEN ULTRAFILTRATION	44
ABB. 15: THEORETISCHE DARSTELLUNG DES SCATCHARD- UND KLOTZ-PLOTS FÜR EINE BZW. MEHRERE BINDUNGSKLASSEN M	49
ABB. 16: PLASMAPROTEINBINDUNG / % DER DREI MIP-INHIBITOREN	80
ABB. 17: BINDUNGSKONSTANTEN PK_A DER DREI MIP-INHIBITOREN	83
ABB. 18: ULTRAFILTRATIONSKURVE GHQ168 MIT/OHNE FILTERMEMBRAN	86
ABB. 19: PLASMAPROTEINBINDUNG DER <i>EPHEDRA</i> -ALKALOIDE NACH <i>HÖRST</i>	100
ABB. 20: STREUUNG DER PLASMAPROTEINBINDUNG DER <i>EPHEDRA</i> -ALKALOIDE BEI DEN VORABMESSUNGEN AN DER ORIGINAL-ANLAGE NACH <i>HEINZE</i>	101
ABB. 21: PLASMAPROTEINBINDUNG DER <i>EPHEDRA</i> -ALKALOIDE: VERGLEICHSMESSUNGEN ZU <i>HÖRST</i>	103
ABB. 22: NORMALISIERTE MESSKURVEN DES KONTINUIERLICHEN ULTRAFILTRATIONSVERSUCHS VON (+)-EPHEDRIN	105
ABB. 23: PLASMAPROTEINBINDUNG / % DER <i>EPHEDRA</i> -ALKALOIDE.....	111
ABB. 24: ADRENOCHROM-REAKTION.....	113
ABB. 25: PLASMAPROTEINBINDUNG DER SYMPATHOMIMETIKA UND <i>EPHEDRA</i> -ALKALOIDE.....	116
ABB. 26: SCHEMATISCHE ABBILDUNG VON β -CYCLODEXTRIN	121
ABB. 27: OPTIMIERUNG DER KAPILLARELEKTROPHORETISCHEN TRENNUNG DER <i>EPHEDRA</i> -ALKALOIDE	122
ABB. 28: ERRECHNETE GESAMTAFFINITÄTSKONSTANTE PK_A^N DER <i>EPHEDRA</i> -ALKALOIDE FÜR JEDEN EINZELNEN MESSPUNKT; MITTELS DUF FÜR HSA UND HUMANES SERUM; ENTSPR. GLEICHUNG (12);	125
ABB. 29: NICHTLINEARE REGRESSION FÜR (+)-EPHEDRIN UND HSA.	127
ABB. 30: GEGENÜBERSTELLUNG DER PLASMAPROTEINBINDUNG DER EPHEDRIN-ENANTIOMERE FÜR DIE ULTRAFILTRATIONSMESSUNGEN.....	129
ABB. 31: SCHEMATISCHER AUFBAU EINER KAPILLARELEKTROPHORESE-APPARATUR, IN ANLEHNUNG AN <i>ENGELHARDT</i>	136
ABB. 32: ELEKTROPHEROGRAMME VON (+)-EPHEDRIN MIT DMSO ALS EOF-MARKER, 25 – 75 μ M HSA	152
ABB. 33: ÄNDERUNG DER ELEKTROPHORETISCHEN MOBILITÄT VOM EOF UND (-)-EPHEDRIN.....	152
ABB. 34: ELEKTROPHEROGRAMME VON (+)-EPHEDRIN MIT ACETANILID ALS EOF-MARKER, 5 - 20 μ M HSA	154
ABB. 35: VERÄNDERUNG DER SIGNALE IM NMR-SPEKTRUM JE NACH AUSTAUSCHRATE DES KOMPLEXES	162
ABB. 36: 1H -NMR-SPEKTRUM VON 2 MM (-)-EPHEDRIN-HCL IN D_2O -PHOSPHATPUFFER	168
ABB. 37: TEMPERATURKALIBRIERUNG DES TEMPERATURFÜHLERS MITTELS 99,8 % MEOD	171
ABB. 38: TEMPERATURKONSTANZ MITTELS 99,8 % MEOD.	172
ABB. 39: DIFFUSIONSPLOT VON (-)-EPHEDRIN-HCL, GEMESSEN IN D_2O -PHOSPHATPUFFER.....	173

ABB. 40: VERGLEICH DER ^1H -NMR-SPEKTREN VON (-)-EPHEDRIN IN AN- UND ABWESENHEIT VON HSA	176
ABB. 41: GEGENÜBERSTELLUNG DER (-)-EPHEDRIN-SIGNALE IM ^1H -NMR-SPEKTREN BEI VERSCHIEDENEN HSA-KONZENTRATIONEN	178
ABB. 42: VERÄNDERUNGEN DER CHEMISCHEN VERSCHIEBUNG $\Delta\delta$ IN DEN ^1H -NMR-SPEKTREN VON (-)- UND (+)-EPHEDRIN	179
ABB. 43: PLOT DER GEMESSENEN DIFFUSIONSKOEFFIZIENTEN GEGEN DEN KONZENTRATIONSQUOTIENTEN $[P]_{\text{TOT}} / C_0$, (0,5 – 8 MM EPHEDRIN), ERSTE VERSUCHSREIHE	181
ABB. 44: PLOT DER GEMESSENEN DIFFUSIONSKOEFFIZIENTEN GEGEN DEN KONZENTRATIONSQUOTIENTEN $[P]_{\text{TOT}} / C_0$, (3 – 20 MM EPHEDRIN), ZWEITE VERSUCHSREIHE	182
ABB. 45: 2D-SPEKTREN DER DIFFUSIONSEXPERIMENTE (DIFFUSIONSKOEFFIZIENT D_{OBS} GEGEN CHEM. VERSCHIEBUNG δ)	183
ABB. 46: SCHEMATISCHER AUFBAU DER ITC MESSAPPARATUR	191
ABB. 47: THEORETISCHER VERLAUF DER MESSKURVE BEI EINER ITC-MESSUNG	192
ABB. 48: BEISPIELHAFTER VERLAUF DER WISEMAN-ISOTHERME	193

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] D. Steinhilber, *et al.*: *Medizinische Chemie: Targets, Arzneistoffe, Chemische Biologie*; 2. Auflage **2010**, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart
- [2] G. Klebe: *Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*; 2. Auflage **2009**, Spektrum Akademischer Verlag (Springer-Verlag), Heidelberg
- [3] T. Bohnert, L.-S. Gan: *Plasma protein binding: From discovery to development*; *J. Pharm. Sci.* **2013**, 102 (9): 2953-94
- [4] E. Mutschler, *et al.*: *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie*; 10. Auflage **2013**, Wiss. Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- [5] H. Derendorf, *et al.*: *Pharmakokinetik kompakt: Grundlagen und Praxisrelevanz*; 3. Auflage **2011**, Wiss. Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- [6] K. Aktories, *et al.*: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*; 12. Auflage **2017**, Urban & Fischer Verlag (Elsevier), München
- [7] K. Aktories, *et al.*: *Repetitorium Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*; 2. Auflage **2013**, Urban & Fischer Verlag (Elsevier), München
- [8] R. F. Schmidt, *et al.*: *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie*; 31. Auflage **2017**, Springer-Verlag, Berlin
- [9] H. Lüllmann, *et al.*: *Taschenatlas Pharmakologie*; 7. Auflage **2014**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- [10] G. R. Wilkinson, D. G. Shand: *A physiological approach to hepatic drug clearance*; *Clin. Pharmacol. Ther.* **1975**, 18 (4): 377-90
- [11] S. H. Curry, R. Whelpton: *Introduction to Drug Disposition and Pharmacokinetics*; **2017**, Wiley,
- [12] S. Schaal, *et al.*: *Der Mensch in Zahlen: Eine Datensammlung in Tabellen mit über 20000 Einzelwerten*; **2015**, Springer Berlin Heidelberg,
- [13] J. Huppelsberg, K. Walter: *Kurzlehrbuch Physiologie*; 4. Auflage **2013**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- [14] M. Königshoff, T. Brandenburger: *Kurzlehrbuch Biochemie*; 4. Auflage **2018**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- [15] J. Hallbach: *Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg*; 2. Auflage **2006**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- [16] P. C. Heinrich, *et al.*: *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*; 9. Auflage **2014**, Springer-Verlag, Berlin
- [17] W. Pschyrembel, *et al.*: *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*; 267. Auflage **2017**, W. De Gruyter, Berlin
- [18] J. M. Kremer, *et al.*: *Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease*; *Pharmacol. Rev.* **1988**, 40 (1): 1-47
- [19] T. Fournier, *et al.*: *Alpha-1-acid glycoprotein*; *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1482 (1): 157-71
- [20] M. Lemaire, J. Tillement: *Role of lipoproteins and erythrocytes in the in vitro binding and distribution of cyclosporin A in the blood*; *J. Pharm. Pharmacol.* **1982**, 34 (11): 715-18
- [21] M.-F. Clere, *et al.*: *Labelling of colloidal gold with IgE*; *Histochemistry* **1988**, 89 (4): 343-49
- [22] T. Peters: *All about Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical applications*; 1. Auflage **1996**, Academic Press (Elsevier), San Diego

- [23] G. Fanali, *et al.*: *Human serum albumin: From bench to bedside*; Mol. Aspects Med. **2012**, 33 (3): 209-90
- [24] T. Peters, A. J. Stewart: *Albumin research in the 21st century*; Biochim. Biophys. Acta **2013**, 1830 (12): 5351-53
- [25] K. A. Majorek, *et al.*: *Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins*; Mol. Immunol. **2012**, 52 (3): 174-82
- [26] T. Kosa, *et al.*: *Species differences of serum albumins: I. Drug binding sites*; Pharm. Res. **1997**, 14 (11): 1607-12
- [27] K. Yamasaki, *et al.*: *Albumin–drug interaction and its clinical implication*; Biochim. Biophys. Acta **2013**, 1830 (12): 5435-43
- [28] U. Kragh-Hansen: *Molecular and practical aspects of the enzymatic properties of human serum albumin and of albumin–ligand complexes*; Biochim. Biophys. Acta **2013**, 1830 (12): 5535-44
- [29] D. Sleep, *et al.*: *Albumin as a versatile platform for drug half-life extension*; Biochim. Biophys. Acta **2013**, 1830 (12): 5526-34
- [30] S. Sugio, *et al.*: *Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution*; Protein Eng. **1999**, 12 (6): 439-46
- [31] PDB ID: 4K2C (HSA Ligand Free); Y. Wang, *et al.*: *Structural mechanism of ring-opening reaction of glucose by human serum albumin*; J. Biol. Chem. **2013** 288 (22): 15980-7
- [32] PDB ID: 3V03 (Crystal structure of Bovine Serum Albumin); K. A. Majorek, *et al.*: *Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins*; Mol. Immunol. **2012** 52 (3): 174-82
- [33] P. P. Minghetti, *et al.*: *Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within q11-22 of chromosome 4*; J. Biol. Chem. **1986**, 261 (15): 6747-57
- [34] B. Meloun, *et al.*: *Complete amino acid sequence of human serum albumin*; FEBS Lett. **1975**, 58 (1-2): 134-37
- [35] F. Kratz: *Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles*; J. Control. Release **2008**, 132 (3): 171-83
- [36] T. Evans: *Albumin as a drug—Biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure*; Aliment. Pharmacol. Ther. **2002**, 16 6-11
- [37] G. Sudlow, *et al.*: *The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin*; Mol. Pharmacol. **1975**, 11 (6): 824-32
- [38] I. Sjöholm, *et al.*: *Binding of drugs to human serum albumin*; Mol. Pharmacol. **1979**, 16 (3): 767-77
- [39] U. Kragh-Hansen: *Relations between high-affinity binding sites of markers for binding regions on human serum albumin*; Biochem. J. **1985**, 225 (3): 629-38
- [40] U. Kragh-Hansen, *et al.*: *Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin*; Biol. Pharm. Bull. **2002**, 25 (6): 695-704
- [41] F. Kratz: *A clinical update of using albumin as a drug vehicle—A commentary*; J. Control. Release **2014**, 190 331-36
- [42] T. Hochepped, *et al.*: *α1-Acid glycoprotein: An acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties*; Cytokine Growth F.R. **2003**, 14 (1): 25-34

- [43] S. Taheri, *et al.*: *Hydrophobic and ionic factors in the binding of local anesthetics to the major variant of human α 1-acid glycoprotein*; J. Pharmacol. Exp. Ther. **2003**, 304 (1): 71-80
- [44] S. Schmidt, *et al.*: *Significance of protein binding in pharmacokinetics and pharmacodynamics*; J. Pharm. Sci. **2010**, 99 (3): 1107-22
- [45] D. A. Smith, *et al.*: *The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: Misconceptions in drug discovery*; Nat. Rev. Drug Discov. **2010**, 9 (12): 929
- [46] L. Z. Benet, B.-A. Hoener: *Changes in plasma protein binding have little clinical relevance*; Clin. Pharmacol. Ther. **2002**, 71 (3): 115-21
- [47] P. Rolan: *Plasma protein binding displacement interactions — Why are they still regarded as clinically important?*; Br. J. Clin. Pharmacol. **1994**, 37 (2): 125-28
- [48] P. M. Aggeler, *et al.*: *Potentiation of anticoagulant effect of warfarin by phenylbutazone*; N. Engl. J. Med. **1967**, 276 (9): 496-501
- [49] M. S. Lam, R. J. Ignoffo: *A guide to clinically relevant drug interactions in oncology*; J. Oncol. Pharm. Pract. **2003**, 9 (2-3): 45-85
- [50] P. J. McNamara, J. Alcorn: *Protein binding predictions in infants*; AAPS Pharmsci. **2002**, 4 (1): 19-26
- [51] R. G. Whitehead, *et al.*: *Serum albumin concentration and the onset of Kwashiorkor*; Lancet **1973**, 301 (7794): 63-66
- [52] M. G. Coulthard: *Oedema in kwashiorkor is caused by hypoalbuminaemia*; Paediatr. Int. Child H. **2015**, 35 (2): 83-89
- [53] W. Blaschek, *et al.*: *Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen*; 8. Auflage **2010**, Springer-Verlag, Berlin
- [54] T. Geschwinde: *Rauschdrogen: Marktformen und Wirkungsweisen*; 7. Auflage **2013**, Springer-Verlag, Berlin
- [55] R. Hänsel, O. Sticher: *Pharmakognosie-Phytopharmazie*; 9. Auflage **2009**, Springer-Verlag, Berlin
- [56] S. Shunker: *Drug Guideline: Ephedrine*; Liverpool Hospital, Sydney **2016**
- [57] M. Farhan, *et al.*: *Prevention of hypotension associated with the induction dose of propofol: A randomized controlled trial comparing equipotent doses of phenylephrine and ephedrine*; J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol. **2015**, 31 (4): 526-30
- [58] *NICE Clinical Guideline: Caesarean Section*; National Institute for Health and Care Excellence, Manchester **2011**
- [59] R. Abbasivash, *et al.*: *Comparing prophylactic effect of phenylephrine and ephedrine on hypotension during spinal anesthesia for hip fracture surgery*; Advanced biomedical research **2016**, 5 167
- [60] o.V.: *ROTE LISTE® 2019*; 59. Auflage **2019**, Rote Liste® Service, Frankfurt/Main
- [61] V. T. G. Chuang, M. Otagiri: *Stereoselective binding of human serum albumin*; Chirality **2006**, 18 (3): 159-66
- [62] T. Itoh, *et al.*: *Stereoselectivity and enantiomer - enantiomer interactions in the binding of ibuprofen to human serum albumin*; Chirality **1997**, 9 (7): 643-49
- [63] J.-Y. He, *et al.*: *Protein-binding high-performance frontal analysis of (R)- and (S)-warfarin on HSA with and without phenylbutazone*; J. Pharm. Sci. **1997**, 86 (1): 120-25

- [64] I. Fitos, *et al.*: *Stereoselective binding of 3-acetoxy-, and 3-hydroxy-1,4-benzodiazepine-2-ones to human serum albumin: Selective allosteric interaction with warfarin enantiomers*; *Biochem. Pharmacol.* **1986**, 35 (2): 263-69
- [65] R. H. McMenamy, J. Oncley: *The specific binding of L-tryptophan to serum albumin*; *J. Biol. Chem.* **1958**, 233 (6): 1436-47
- [66] U. K. Walle, *et al.*: *Stereoselective binding of propranolol to human plasma, α 1-acid glycoprotein, and albumin*; *Clin. Pharmacol. Ther.* **1983**, 34 (6): 718-23
- [67] F. Albani, *et al.*: *Stereoselective binding of propranolol enantiomers to human alpha 1- acid glycoprotein and human plasma*; *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1984**, 18 (2): 244-46
- [68] A. H. Brockman, *et al.*: *Simple method provides resolution of albumin, lipoprotein, free fraction and chylomicron to enhance the utility of protein binding assays*; *J. Med. Chem.* **2015**, 58 (3): 1420-25
- [69] K. Vuignier, *et al.*: *Drug-protein binding: A critical review of analytical tools*; *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 398 (1): 53-66
- [70] J. P. Hummel, W. J. Dreyer: *Measurement of protein-binding phenomena by gel filtration*; *Biochim. Biophys. Acta* **1962**, 63 (3): 530-32
- [71] L. Soltes: *The Hummel-Dreyer method: Impact in pharmacology*; *Biomed. Chromatogr.* **2004**, 18 (4): 259-71
- [72] J. Østergaard, N. H. Heegaard: *Capillary electrophoresis frontal analysis: Principles and applications for the study of drug - plasma protein binding*; *Electrophoresis* **2003**, 24 (17): 2903-13
- [73] K. L. Rundlett, D. W. Armstrong: *Methods for the determination of binding constants by capillary electrophoresis*; *Electrophoresis* **2001**, 22 (7): 1419-27
- [74] M. Kurlbaum, P. Högger: *Plasma protein binding of polyphenols from maritime pine bark extract (USP)*; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, 54 (1): 127-32
- [75] D. S. Hage, *et al.*: *Characterization of drug-protein interactions in blood using high - performance affinity chromatography*; *J. Sep. Sci.* **2009**, 32 (5 - 6): 835-53
- [76] G. Otting: *Experimental NMR techniques for studies of protein-ligand interactions*; *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, 3 (5): 760-68
- [77] K. Teilum, *et al.*: *(S)Pinning down protein interactions by NMR*; *Protein Sci.* **2017**, 26 (3): 436-51
- [78] T. Förster: *Fluoreszenz Organischer Verbindungen*; 1. Auflage **1982**, Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen
- [79] S. Neamtu, *et al.*: *The artifactual nature of stavudine binding to human serum albumin. A fluorescence quenching and isothermal titration calorimetry study*; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, 72 134-38
- [80] R. L. Levine: *Fluorescence-quenching studies of the binding of bilirubin to albumin*; *Clin. Chem.* **1977**, 23 (12): 2292-301
- [81] S. Zhu, Y. Liu: *Spectroscopic analyses on interaction of Naphazoline hydrochloride with bovine serum albumin*; *Spectrochim. Acta A* **2012**, 98 142-47
- [82] J. F. Brandts, L. N. Lin: *Study of strong to ultratight protein interactions using differential scanning calorimetry*; *Biochemistry* **1990**, 29 (29): 6927-40
- [83] S. Leavitt, E. Freire: *Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry*; *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, 11 (5): 560-66
- [84] W. B. Turnbull, A. H. Daranas: *On the value of c : can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry?*; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125 (48): 14859-66

- [85] B. W. Sigurskjold: *Exact analysis of competition ligand binding by displacement isothermal titration calorimetry*; Anal. Biochem. **2000**, 277 (2): 260-6
- [86] M. L. Hall, *et al.*: *Automated ligand- and structure-based protocol for in silico prediction of human serum albumin binding*; J. Chem. Inf. Model. **2013**, 53 (4): 907-22
- [87] A. Heinze, U. Holzgrabe: *Determination of the extent of protein binding of antibiotics by means of an automated continuous ultrafiltration method*; Int. J. Pharm. **2006**, 311 (1-2): 108-12
- [88] C. Albert: *Die Kontinuierliche Ultrafiltration als Screeningtechnik zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung von Arzneistoffen*, Dissertation; Julius-Maximilians-Universität Würzburg **2009**
- [89] B. Waibel, *et al.*: *Evaluation of the extent of protein binding by means of NMR diffusion and relaxation experiments, and automated continuous ultrafiltration*; Eur. J. Pharm. Sci. **2009**, 37 (3-4): 191-97
- [90] A. Hörst: *Aspekte der Bestimmung des Ausmaßes der Proteinbindung mittels kontinuierlicher Ultrafiltration*, Dissertation; Julius-Maximilians-Universität Würzburg **2013**
- [91] H. J. Illy: *Optimierung eines rechnergesteuerten Verfahrens zur Bestimmung der Protein-Bindung von Arzneistoffen*, Dissertation; Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn **1991**
- [92] M. Oehlmann: *Bestimmung der Blut-Eiweißbindung von Suramin und Analogen*, Dissertation; Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn **1996**
- [93] A. Heinze: *Bestimmung des Ausmaßes der Proteinbindung von Arzneistoffen mittels automatisierter kontinuierlicher Ultrafiltration*, Dissertation; Julius-Maximilians-Universität Würzburg **2004**
- [94] R. Winter, F. Noll: *Methoden der Biophysikalischen Chemie*; 2. Auflage **2011**, Vieweg & Teubner Verlag (Springer-Verlag), Wiesbaden
- [95] L. Asensi-Bernardi, *et al.*: *Evaluation of enantioselective binding of fluoxetine to human serum albumin by ultrafiltration and CE – Experimental design and quality considerations*; Electrophoresis **2010**, 31 (19): 3268-80
- [96] I. M. Klotz, D. L. Hunston: *Properties of graphical representations of multiple classes of binding sites*; Biochemistry **1971**, 10 (16): 3065-9
- [97] G. Scatchard: *The attractions of proteins for small molecules and ions*; Ann. N. Y. Acad. Sci. **1949**, 51 (1): 660-72
- [98] I. M. Klotz, *et al.*: *The binding of organic ions by proteins*; J. Am. Chem. Soc. **1946**, 68 (8): 1486-90
- [99] F. Seufert, *et al.*: *Development, synthesis and structure–activity-relationships of inhibitors of the macrophage infectivity potentiator (Mip) proteins of Legionella pneumophila and Burkholderia pseudomallei*; Biorg. Med. Chem. **2016**, 24 (21): 5134-47
- [100] A. Reimer, *et al.*: *Inhibitors of macrophage infectivity potentiator-like PPIases affect neisserial and chlamydial pathogenicity*; Int. J. Antimicrob. Agents **2016**, 48 (4): 401-08
- [101] G. Hiltensperger, *et al.*: *Synthesis and structure–activity relationships of new quinolone-type molecules against Trypanosoma brucei*; J. Med. Chem. **2012**, 55 (6): 2538-48

- [102] G. Hiltensperger, *et al.*: *Quinolone amides as antitrypanosomal lead compounds with in vivo activity*; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, 60 (8): 4442-52
- [103] M. Berninger, *et al.*: *Novel lead compounds in pre-clinical development against African sleeping sickness*; *MedChemComm* **2017**, 8 (10): 1872-90
- [104] M. Berninger, *et al.*: *Fluorine walk: The impact of fluorine in quinolone amides on their activity against African sleeping sickness*; *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 152 377-91
- [105] J. Glaser, *et al.*: *Antileishmanial lead structures from nature: Analysis of structure-activity relationships of a compound library derived from caffeic acid bornyl ester*; *Molecules* **2014**, 19 (2): 1394-410
- [106] J. Glaser, *et al.*: *Antileishmanial and cytotoxic compounds from *Valeriana wallichii* and identification of a novel nepetolactone derivative*; *Molecules* **2015**, 20 (4): 5740-53
- [107] J. Glaser, *et al.*: *Anti-schistosomal activity of cinnamic acid esters: Eugenyl and thymyl cinnamate induce cytoplasmic vacuoles and death in schistosomula of *Schistosoma mansoni**; *Molecules* **2015**, 20 (6): 10873-83
- [108] F. Lottspeich, *et al.*: *Bioanalytik*; 3. Auflage **2012**, Spektrum Akademischer Verlag (Springer-Verlag), Heidelberg
- [109] A. Pabbathi, *et al.*: *Structural transformation of bovine serum albumin induced by dimethyl sulfoxide and probed by fluorescence correlation spectroscopy and additional methods*; *ChemPhysChem* **2013**, 14 (11): 2441-9
- [110] B. Farhadieh: *Determination of CMC and partial specific volume of polysorbates 20, 60, and 80 from densities of their aqueous solutions*; *J. Pharm. Sci.* **1973**, 62 (10): 1685-88
- [111] A. G. Gornall, *et al.*: *Determination of serum proteins by means of the biuret reaction*; *J. Biol. Chem.* **1949**, 177 (2): 751-66
- [112] A. Dominik, D. Steinhilber: *Instrumentelle Analytik*; 2. Auflage **2002**, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart
- [113] K. J. Lee, *et al.*: *Modulation of nonspecific binding in ultrafiltration protein binding studies*; *Pharm. Res.* **2003**, 20 (7): 1015-21
- [114] H. O. Sintim, *et al.*: *Paradigm shift in discovering next-generation anti-infective agents: targeting quorum sensing, c-di-GMP signaling and biofilm formation in bacteria with small molecules*; *Future Med. Chem.* **2010**, 2 (6): 1005-35
- [115] C. Vogler, K. Happe: *Antibiotika: Grenzen der Entwicklung?*, Runder Tisch Antibiotika Forschung, Halle, Leopoldina **2014**
- [116] G. Fischer, *et al.*: *Mip protein of *Legionella pneumophila* exhibits peptidyl-prolyl-cis/trans isomerase (PPIase) activity*; *Mol. Microbiol.* **1992**, 6 (10): 1375-83
- [117] I. H. Norville, *et al.*: *A *Burkholderia pseudomallei* macrophage infectivity potentiator-like protein has rapamycin-inhibitable peptidylprolyl isomerase activity and pleiotropic effects on virulence*; *Infect. Immun.* **2011**, 79 (11): 4299-307
- [118] N. Cianciotto, *et al.*: *A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection*; *Infect. Immun.* **1989**, 57 (4): 1255-62
- [119] S. Ewig, *et al.*: *S3-Leitlinie: Behandlung von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie und Prävention- Update 2016*; Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beratungsgemeinschaft, der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für

- Chemotherapie, der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie und vom Kompetenznetzwerk CAPNETZ, **2016**
- [120] J. Keiser, C. Burri: *Evaluation of quinolone derivatives for antitrypanosomal activity*; Trop. Med. Int. Health **2001**, 6 (5): 369-89
- [121] P. J. Hotez, et al.: *Control of Neglected Tropical Diseases*; N. Engl. J. Med. **2007**, 357 (10): 1018-27
- [122] A. Cavalli, M. L. Bolognesi: *Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against Trypanosoma and Leishmania*; J. Med. Chem. **2009**, 52 (23): 7339-59
- [123] K. H. Bauer, et al.: *Bauer/Frömming/Führer Pharmazeutische Technologie*; 10. Auflage **2016**, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- [124] N. K. Copeland, N. E. Aronson: *Leishmaniasis: Treatment updates and clinical practice guidelines review*; Curr. Opin. Infect. Dis. **2015**, 28 (5): 426-37
- [125] F. Mutapi, et al.: *Human schistosomiasis in the post mass drug administration era*; Lancet Infect. Dis. **2017**, 17 (2): e42-e48
- [126] C. R. Caffrey: *Chemotherapy of schistosomiasis: Present and future*; Curr. Opin. Chem. Biol. **2007**, 11 (4): 433-9
- [127] B. Jackson: *Solvent Guide*; **2003**, Honeywell International, Japan
- [128] M. H. Gey: *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*; 3. Auflage **2015**, Springer-Verlag, Berlin
- [129] *Die chemische Beständigkeit der Kunststoffe*;
http://www.heratech.ch/pdf/chemische_Bestaendigkeit_der%20Kunststoffe.pdf;
Stand: 24.02.2014
- [130] K. K. Chen, C. H. Kao: *Ephedrine and pseudoephedrine, their isolation, constitution, isomerism, properties, derivatives and synthesis*; J. Am. Pharm. Assoc. **1926**, 15 (8): 625-39
- [131] A. E. Till, L. Z. Benet: *Renal excretion of pseudoephedrine in the rat*; J. Pharmacol. Exp. Ther. **1979**, 211 (3): 555-60
- [132] B. Guo, et al.: *Study on the Interaction of Ephedrine, Caffeine and Acetaminophen with Bovine Serum Albumin by Capillary Electrophoresis with Partial Filling Technique*; Chin. J. Chromatogr. **2003**, 21 (4): 367-70
- [133] N. Ye, et al.: *Chiral separation of ephedrine isomers by capillary electrophoresis using bovine serum albumin as a buffer additive*; J. Chromatogr. Sci. **2007**, 45 (5): 246-50
- [134] R. Yang, et al.: *Capillary electrophoresis coupled with end-column electrochemiluminescence for the determination of ephedrine in human urine, and a study of its interactions with three proteins*; Luminescence **2011**, 26 (5): 374-9
- [135] Q. Huang, et al.: *Study on the interaction of ephedrine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride with human serum albumin by spectroscopy*; J. Anal. Sci. **2011**, 4 10
- [136] G. Sudlow, et al.: *Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin*; Mol. Pharmacol. **1976**, 12 (6): 1052-61
- [137] M. Bastigkeit: *Medikamente in der Notfallmedizin*; 9. Auflage **2019**, Stumpf+ Kossendey Verlag, Edewecht
- [138] A. Ruß, S. Endres: *Arzneimittel pocket plus 2018*; 14. Auflage **2017**, Börm Bruckmeier Verlag, Grünwald

- [139] H. P. T. Ammon: *Arzneimittelneben- und -wechselwirkungen*; 4. Auflage **2001**, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- [140] G. Franksson, E. Änggård: *The Plasma Protein Binding of Amphetamine, Catecholamines and Related Compounds*; *Acta Pharmacol. Tox.* **1970**, 28 (3): 209-14
- [141] K. Eger, et al.: *Arzneistoffanalyse: Reaktivität-Stabilität-Analytik*; **2005**, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart
- [142] J. C. Kraak, et al.: *Study of protein-drug binding using capillary zone electrophoresis*; *J. Chromatogr. A* **1992**, 608 (1): 257-64
- [143] G. Zlotos, et al.: *Plasma protein binding of gyrase inhibitors*; *J. Pharm. Sci.* **1998**, 87 (2): 215-20
- [144] Merck Millipore Ltd.: *Gebrauchsanleitung Amicon® Ultra-4 10k Zentrifugen-Filtereinheiten*; http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Amicon-Ultra-4-Centrifugal-Filter-Unit,MM_NF-UFC801096#overview; Stand: 23.10.2019
- [145] J. Wahl, et al.: *Characterization of complexes between phenethylamine enantiomers and β -cyclodextrin derivatives by capillary electrophoresis—Determination of binding constants and complex mobilities*; *Electrophoresis* **2017**, 38 (8): 1188-200
- [146] H. Engelhardt, et al.: *Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten*; 1. Auflage **2012**, Springer Vieweg Verlag, Wiesbaden
- [147] W. Saenger: *Cyclodextrin-Einschlußverbindungen in Forschung und Industrie*; *Angew. Chem.* **1980**, 92 (5): 343-61
- [148] S. Fanali: *Use of cyclodextrins in capillary zone electrophoresis*; *J. Chromatogr. A* **1991**, 545 (2): 437-44
- [149] E. D. Vega, et al.: *Separation of enantiomers of ephedrine by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral selectors: Comparative CE, NMR and high resolution MS studies*; *Electrophoresis* **2011**, 32 (19): 2640-7
- [150] M. Volpp, U. Holzgrabe: *Determination of plasma protein binding for sympathomimetic drugs by means of ultrafiltration*; *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, 127 175-84
- [151] O. Stern: *Zur Theorie der elektrolytischen Doppelschicht*; *Z. Elektrochem. Angew. P.* **1924**, 30 (21 - 22): 508-16
- [152] D. El-Hady, et al.: *Precision in affinity capillary electrophoresis for drug-protein binding studies*; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, 52 (2): 232-41
- [153] S. Redweik, et al.: *Precise, fast, and flexible determination of protein interactions by affinity capillary electrophoresis: Part 1: Performance*; *Electrophoresis* **2012**, 33 (22): 3316-22
- [154] M. S. Bellini, et al.: *Determination of apparent binding constants of drugs by capillary electrophoresis using β -cyclodextrin as ligand and three different linear plotting methods*; *J. Chromatogr. A* **2001**, 924 (1-2): 483-91
- [155] K. L. Rundlett, D. W. Armstrong: *Examination of the origin, variation, and proper use of expressions for the estimation of association constants by capillary electrophoresis*; *J. Chromatogr. A* **1996**, 721 (1): 173-86
- [156] J. Kawaoka, F. A. Gomez: *Use of mobility ratios to estimate binding constants of ligands to proteins in affinity capillary electrophoresis*; *J. Chromatogr. B.* **1998**, 715 (1): 203-10
- [157] M. Hesse, et al.: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*; 8. Auflage **2014**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

- [158] M. Liu, *et al.*: *Analysis of drug–protein binding using nuclear magnetic resonance based molecular diffusion measurements*; *Anal. Commun.* **1997**, 34 (8): 225-28
- [159] R. Mesmer, D. Herting: *Thermodynamics of ionization of D2O and D2PO4–*; *J. Solution Chem.* **1978**, 7 (12): 901-12
- [160] P. K. Glasoe, F. A. Long: *Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide*; *J. Phys. Chem.* **1960**, 64 (1): 188-90
- [161] B. Waibel: *NMR-Methoden zur Identifizierung von Makromolekül-Ligand-Interaktionen*, Dissertation; Julius-Maximilians-Universität Würzburg **2008**
- [162] M. Holz, H. Weingartner: *Calibration in accurate spin-echo self-diffusion measurements using 1H and less-common nuclei*; *J. Magn. Reson.* **1991**, 92 (1): 115-25
- [163] D. Wu, *et al.*: *An improved diffusion-ordered spectroscopy experiment incorporating bipolar-gradient pulses*; *J. Magn. Reson., Ser A* **1995**, 115 (2): 260-64
- [164] P. Job: *Formation and stability of inorganic complexes in solution*; *Ann. chim.* **1928**, 9 (113)
- [165] J. E. Ladbury, B. Z. Chowdhry: *Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions*; *Chem. Biol.* **1996**, 3 (10): 791-801
- [166] M. L. Doyle: *Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry*; *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, 8 (1): 31-5
- [167] L. Fielding, *et al.*: *Determination of protein–ligand binding affinity by NMR: Observations from serum albumin model systems*; *Magn. Reson. Chem.* **2005**, 43 (6): 463-70
- [168] S. Choudhary, N. Kishore: *Unraveling the energetics and mode of the recognition of antibiotics tetracycline and rolitetracycline by bovine serum albumin*; *Chem. Biol. Drug Des.* **2012**, 80 (5): 693-705