

Diss ETH 6294

INTERAKTION DER TETRACYCLIN-ANTIBIOTIKA MIT IONEN UND CHELATOREN:

- KOMPLEXBILDUNG ALS GRUNDLAGE FUER DIE ANALYTIK IM BIOLOGISCHEN MATERIAL
- EINFLUSS DER KOMPLEXBILDUNG AUF DIE INTESTINALE ABSORPTION

A B H A N D L U N G

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Technischen Wissenschaften
der
EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von

Poiger Hermann
dipl. Ing. LMT
geboren am 12. Mai 1944
von Oesterreich

Angenommen auf Antrag von
Prof. Ch. Schlatter, Referent
Prof. A. Schürch, Korreferent

Ch. Schlatter

1978

Separatdrucke: Analyst 101 (1976), 808
Eur. J. Clin. Pharmacol. 14 (1978) 129
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. (1979)
(im Druck)

Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit wurden einige Eigenschaften der Tetracycline untersucht, die für deren Analytik wichtig sind, darunter vor allem deren Fluoreszenz-Eigenschaften sowie Extrahierbarkeit mit organischen Lösungsmitteln. Durch Zusatz von Mg-Ionen konnte, im alkalischen Bereich, eine optimale Fluoreszenzquantenausbeute erreicht werden; allerdings lieferten die 3 untersuchten Tetracycline (Tetracyclin, Chlor- und Oxytetracyclin) nahezu identische Fluoreszenzspektren. Das Verteilungsverhältnis der Verbindungen zwischen verschiedenen wässrigen und organischen Phasen wurde zuerst an Modellsystemen untersucht: Aus schwach sauren Lösungen war eine teilweise, ungenügende Extraktion möglich, im alkalischen Bereich dagegen konnte, nach Zusatz von Ca-Ionen, etwa 60 % des Chlortetracyclins in die organische Phase extrahiert werden. Mehrere organische Verbindungen, wie Trichloracetat, Salicylat, Benzoat etc., wurden auf ihre Eigenschaft geprüft, den Uebergang der Antibiotika in organische Lösungsmittel zu induzieren. Bei Anwesenheit von Ca^{++} und Trichloracetat waren 90 - 100 % Tetracyclin bzw. Chlortetracyclin aus der wässrigen Phase extrahierbar, Oxytetracyclin dagegen blieb unter diesen Bedingungen unbeeinflusst. Wurde Salicylat anstelle von Trichloracetat zugesetzt, konnte auch dieses Derivat zu etwa 70 % extrahiert werden. Nach Sättigung der wässrigen Phase mit NaCl gingen alle 3 Derivate fast vollständig in die organische Phase über. Die Bildung lipophiler Komplexe der Tetracycline mit Ca^{++} und diesen organischen Gruppen konnte deshalb postuliert werden.

Diese Erkenntnisse wurden für die Analytik der Tetracyclin-Antibiotika im biologischen Material ausgenützt. Für Chlortetracyclin wurden dabei folgende Nachweisgrenzen gefunden: Serum 0.05 $\mu\text{g/ml}$, Muskelgewebe 0.125 $\mu\text{g/g}$, Niere 0.15 $\mu\text{g/g}$, Leber 0.3 $\mu\text{g/g}$, Kälbermilchpulver 2 $\mu\text{g/g}$. Zwischen 30 - 45 % der zugesetzten Verbindungen wurden wiedergefunden, wobei

die Verluste hauptsächlich während der Probenvorbereitung und nicht bei der Extraktion auftraten.

Im 2. Teil der Arbeit wurde die intestinale Absorption von Tetracyclin, insbesondere nach Bildung lipophiler Komplexe mit den erwähnten Verbindungen untersucht. Verschieden experimentelle Techniken kamen dabei zum Einsatz:

- Messung der Absorption an Bürstensaummembran-Vesikeln
- Perfusion des Kaninchen-Dünndarms
- Messung der Urinausscheidung bei der Ratte und beim Menschen nach oraler Applikation.

Unter dem Einfluss von Ca^{++} sowie anderen 2-wertigen Kationen war die Tetracyclin-Absorption erheblich reduziert. Bei diesem Effekt, der in der Therapie allgemein erhebliche Schwierigkeiten bereitet, schien die Bindung des Antibiotikums an biologische Makromoleküle eine wichtige Rolle zu spielen. EDTA als Chelator dieser Ionen erhöhte, zumindest in den Tierexperimenten, signifikant die Aufnahme von Tetracyclin, hier wahrscheinlich durch die Komplexbildung von endogenem Ca^{++} . Komplexbildung mit Ca^{++} und Salicylat-Ionen erhöhte die Permeation des Antibiotikums ebenfalls signifikant, verglichen mit Experimenten, bei denen ausschliesslich Ca^{++} zugegen war. Mögliche Mechanismen für diese Effekte wurden diskutiert.

Die Versuche am Menschen wurden eher praxisbezogen durchgeführt. Milch reduzierte wegen ihres Ca^{++} -Gehaltes die Tetracyclin-Ausscheidung auf etwa 20 % gegenüber den Kontrollexperimenten. Durch eine zum enthaltenen Ca^{++} äquimolare Menge EDTA wurde dieser Einfluss vollständig kompensiert. Eine eventuelle Anwendung dieses Komplexbildners in der Tetracyclin-Therapie wurde diskutiert, weil Nahrungsmittel, die zum Teil erhebliche Mengen zwei- und dreiwertige Kationen enthalten, ganz allgemein die Absorption von gleichzeitig oral verabreichtem Tetracyclin beeinträchtigen.

Summary

Parameters, necessary for fluorimetric analysis of tetracycline-antibiotics were investigated in the first part of the work. Above all the influence of Ca^{2+} , Mg^{2+} and some other di- and trivalent cations on fluorescence properties and extractability of the antibiotics from aqueous into organic solvents was examined. Fluorescence was induced maximum by Mg^{2+} -ions in the alkaline pH-range. Extraction could be achieved to some extent from buffer pH 7-11, containing Ca^{2+} . In addition, a few organic groups, such as trichloroacetate, salicylate, benzoate etc. were tested for their ability to favour transition of the tetracyclines into the organic solvent. Some of these compounds - in presence of Ca^{2+} -caused almost complete extraction of the three derivatives, tetracycline, oxy- and chlorotetracycline; thus, formation of lipophilic complexes was postulated. Evaluation of the findings led to the development of an analytical method for determination of tetracycline residues in biological materials. Methods for sample preparation are given.

In the second part of the thesis influence of some cations, as well as complex formation on intestinal absorption of tetracycline was investigated. By using several techniques it could be demonstrated that the intestinal transfer rate of tetracycline was changed in presence of these compounds: Divalent cations decreased, complex formation with Ca^{2+} and salicylate, to a certain extent, increased tetracycline uptake. EDTA, as a chelator of metallic cations also showed a positive effect on tetracycline permeation in the rat but not in man. Binding of the antibiotic to biological macromolecules seemed to play an important role. In man, absorption was investigated under the influence of concomitantly ingested milk. The poor rates, caused by calcium content of the milk could be counteracted by simultaneous administration of EDTA. The possible use of EDTA during tetracycline-therapy was proposed.

Vorbemerkung

Die im zweiten Teil der Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur intestinalen Tetracyclin-Absorption haben keinen direkten Zusammenhang mit dem eher analytischen ersten Teil, obwohl dort einige wesentliche Grundlagen für die Untersuchungen im zweiten Teil zu suchen sind.

Da jedoch beide Teile eine unterschiedliche Leserschaft interessieren dürften, wurden sie völlig in sich abgeschlossen.