

Diss. ETH Nr. 9721

**ATR-IR-spektroskopische Untersuchung der  
Lokalanästhetika-Phospholipid-Modellmembran-Interaktion  
und dampfdruckosmometrische Bestimmung der Assoziation  
von Lokalanästhetika in wässriger Lösung**

ABHANDLUNG  
zur Erlangung des Titels einer  
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN  
der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZÜRICH

vorgelegt von  
**JEANNETTE ERIKA GOETTE**  
eidg. dipl. Apothekerin  
geboren am 10. Juni 1961  
von Wildhaus SG

Angenommen auf Antrag von:  
Prof. Dr. X. Perlia, Referent  
Prof. Dr. U. P. Fringeli, Korreferent  
Prof. Dr. G. Folkers, Korreferent

Zürich 1992

## I. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von Lokalanästhetika mit Phospholipidmembranen mittels abgeschwächter Totalreflexions-Infrarot-Spektroskopie (ATR IR) untersucht. Die Adsorption von Dibucain-HCl an orientierte Bilayermembranen wurde quantitativ ausgewertet. Die experimentellen Daten lassen sich gut mit der Langmuir-Isotherme beschreiben. Bei einer bulk-Konzentration von 10mM Dibucain-HCl wurde eine Oberflächenkonzentration von  $\Gamma(\text{Dibu}_{\text{tot}}) = 7,36 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/m}^2$  bzw. für den protonierten Anteil ein  $\Gamma(\text{Dibu}^+) = 3,88 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/m}^2$  gefunden, was bei einem mittleren Querschnitt des Dibucains von  $67 \text{ \AA}^2$  einer 3-Schicht- bzw. einer 1-2-Schichtbelegung entspricht. Da nach dem Langmuir-Modell maximal eine Monolayerbelegung erfolgt, können die ausgeglichenen Parameter nicht die physikalische Bedeutung nach Langmuir haben.

Für den Grenzfall der bulk-Konzentration  $c \rightarrow 0$  kann aus den ausgeglichenen Langmuir-Parametern der Verteilungskoeffizient für Dibucain bezüglich der verwendeten Modellmembranen berechnet werden. Für das protonierte und deprotonierte Dibucain resultierte  $k_{p_{\text{tot}}} = 1410$  bezüglich DPPA/POPC bzw.  $k_{p_{\text{tot}}} = 388$  bezüglich DMPC-d<sub>54</sub>/DMPC und für den protonierten Anteil  $k_{p^+} = 668$  bzw.  $k_{p^+} = 114$ . Die in der Literatur häufig verwendeten Oberflächen-Verteilungskoeffizienten, welche als Verhältnis der Oberflächenkonzentration [Mol Adsorbat/Mol Phospholipid] zur Gleichgewichtskonzentration definiert sind, können nach Umrechnen der Oberflächenkonzentration entsprechend berechnet werden:  $k_{o_{\text{tot}}} = 2844 \text{ l/Mol}$  bzw.  $k_{o_{\text{tot}}} = 782 \text{ l/Mol}$  und  $k_{o^+} = 1348 \text{ l/Mol}$  bzw.  $k_{o^+} = 230 \text{ l/Mol}$ .

Aus dem Verhältnis der Base zur protonierten Form des membrangebundenen Dibucains kann eine Abnahme des pKa vermutet werden, wobei zu beachten ist, dass die Base von der Membranoberfläche ins Innere der Membran diffundieren kann. Ein Hinweis dafür ist die Veränderung des dichroitischen Verhältnisses der C-H-Streckschwingungen der Kohlenwasserstoffketten der Phospholipide beider Layer, welche auf eine Störung der Kettenordnung hindeutet. Eine Abnahme der Kettenordnung wurde bereits bei bulk-Konzentrationen unterhalb von 1mM gefunden. Parallel dazu wurden Veränderungen an Kopfgruppenschwingungen festgestellt, was auf Konformationsänderungen im polaren Teil des Phospholipids hinweist. Die Wechselwirkung von Lokalanästhetika mit der Lipidkopfgruppe konnte zusätzlich durch Untersuchung verschiedener lokalanästhetisch wirksamer Substanzen mit Phospholipidmultilayern gezeigt werden.

Im zweiten Teil wurde die Assoziation verschiedener Lokalanästhetika in wässriger Lösung untersucht. Dampfdruckosmometrische Messungen (VPO) zeigten, dass Dibu-

cain-HCl und Tetracain-HCl in 20mM Natriumphosphatpuffer mit 100mM NaCl mizellisieren. Für Tetracain-HCl wurde eine kritische Mizellbildungskonzentration von  $CMC = 46$  mmolal gefunden, bei Dibucain-HCl setzt die Mizellbildung im Bereich 20 bis 40 mmolal ein. Oxybuprocain-HCl, Procain-HCl, quaternäres Procain-Br und Procain-Methansulfonat zeigten eine schrittweise Assoziation. Mit Hilfe einer Ausgleichsrechnung wurden aus den VPO-Daten die Assoziationsparameter für ein einfaches Modell berechnet, wobei angenommen wurde, dass die Lokalanästhetika-Hydrochloride beim Lösen vollständig dissoziieren, dass sowohl die Lokalanästhetika als auch die Gegenionen assoziieren und dass die Dimerisierung mit der Konstanten  $K_2$  und die Tri- und Multimerisierung mit der Konstanten  $K_3$  beschreibbar ist.

Die Bestimmung der Chloridionen-Aktivität mittels ionenselektiver Elektrode in Lokalanästhetika-Hydrochlorid-Lösungen zeigte ebenfalls die Assoziation der Substanzen an. Konzentrationsabhängige IR-Messungen bestätigten die Mizellbildung bei Dibucain-HCl und die schrittweise Assoziation bei Procain-Derivaten.

## Summary

The interaction of local anesthetics with phospholipid model membranes was investigated by means of attenuated total reflection infrared spectroscopy (ATR IR). The adsorption of dibucaine to oriented bilayer membranes was quantified. The experimental data can be described by the Langmuir isotherm. At the dibucaine concentration of 10mM a surface concentration  $\Gamma(\text{Dibu}_{\text{tot}})$  of  $7.36 \cdot 10^{-6} \text{ mol/m}^2$  was found corresponding to 3 layers, assuming a mean area of  $67 \text{ \AA}^2$  for the dibucaine molecule, while the protonated part gives rise to a surface concentration  $\Gamma(\text{Dibu}^+)$  of  $3.88 \cdot 10^{-6} \text{ mol/m}^2$ , indicating the formation of 1 layer to 2 layers. Since the Langmuir model assumes a maximum monolayer covering the fitted parameters cannot have the physical meaning according to Langmuir. However in the case of lower dibucaine concentration (i. e. bulk concentration  $c \rightarrow 0$ ), meaningful information including the partition coefficient for dibucaine can be extracted from the fitted Langmuir parameters. The partition coefficient ( $k_{p_{\text{tot}}}$ ) of dibucaine to DPPA/POPC and to DMPC-d<sub>54</sub>/DMPC was 1410 and 388, respectively. The corresponding values for the protonated dibucaine ( $k_{p^+}$ ) are 668 and 114, respectively. The surface partition coefficient  $k_o$ , defined as the ratio of surface concentration [mol substance adsorbed/mol Phospholipid] to equilibrium concentration [mol/l] were determined:  $k_{o_{\text{tot}}} = 2844 \text{ l/mol}$  and  $k_{o_{\text{tot}}} = 782 \text{ l/mol}$  for DPPA/POPC and  $k_{o^+} = 1348 \text{ l/mol}$  and  $k_{o^+} = 230 \text{ l/mol}$  for DMPC-d<sub>54</sub>/DMPC, respectively.

The ratio of deprotonated to protonated form of the membrane bound dibucaine shows a presumable decrease of the pKa, where it must be taken into account that the deprotonated dibucaine can diffuse from the surface into the membrane. The change in dichroic ratio of the C-H-stretching vibration of the phospholipid chains during dibucaine adsorption indicated perturbation in the chain ordering. A decrease of the order was already found at a bulk concentration of dibucaine below 1mM. Changes in the headgroup vibrations were detected pointing out conformational changes in the polar part of the phospholipid. The interaction of local anesthetics with the headgroup of the lipids could also be demonstrated by studying the effect of different local anesthetics on phospholipid multilayers.

The association of different local anesthetics in aqueous solution was investigated. Vapor pressure osmometric measurements (VPO) showed formation of dibucaine and tetracaine micelles in 20mM sodium phosphate buffer containing 100mM sodium chloride. In the case of tetracaine the critical micelle concentration cmc was 46 mmolal. The formation of dibucaine micelles began between 20 and 40 mmolal. Oxybuprocaine-HCl, Procaine-HCl, quaternary Procaine-Br and Procaine methansulfonate showed a

stepwise association. The association parameters for a postulated model were estimated from the VPO data by means of least square fit calculations. The used model assumes that the local anesthetics are fully dissociated before association, that the local anesthetics and the counter ions associate and that the dimerisation can be described by the  $K_2$  constant and the trimerisation and multimerisation by the  $K_3$  constant.

The determination of the chloride ion activity with ion selective electrodes in local anesthetic hydrochloride solutions demonstrated also the self association of these substances. Concentration dependent IR absorption measurements confirmed the formation of dibucaine micelles and the stepwise self association of procaine and procaine derivatives.