

**Entwicklung gaschromatographisch-massenspektrometrischer Methoden
zur Untersuchung der intestinalen Cholesterinresorption und Bestimmung
von Ursodesoxycholsäure sowie deren Anwendung in klinischen Studien**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von

Tanja Liebing

aus

Bietigheim-Bissingen

Bonn 2005

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Erscheinungsjahr: 2006

Tag der Promotion: 16.03.2006

1. Referent: Prof. Dr. Klaus von Bergmann
2. Referent: Prof. Dr. Ulrich Jaehde

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	7
Trivialnamen und deren Nomenklatur nach IUPAC.....	10
1 Einleitung	11
1.1 Hintergrund und Ziele der Arbeit.....	11
1.1.1 Intestinale Resorption von Sterolen	11
1.1.2 Stabilitätsuntersuchung von Ursodesoxycholsäure (UDCA) und Prüfung auf Bioäquivalenz zweier Arzneimittelzubereitungen mit UDCA.....	12
2 Grundlagen	13
2.1 Steroide.....	13
2.1.1 Cholesterin	14
2.1.1.1 Struktur, Biosynthese, Vorkommen und Funktion	14
2.1.1.2 Metabolisierung der Sterole durch Darmbakterien.....	17
2.1.1.3 Transportmechanismen	18
2.1.2 Phytosterole.....	21
2.1.2.1 Struktur, Vorkommen und Funktion.....	21
2.1.3 Bedeutung von Cholesterin und Phytosterolen bei der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen.....	23
2.1.4 Ezetimib	26
2.1.5 Gallensäuren.....	31
2.1.5.1 Struktur, Biosynthese und Metabolismus	31
2.1.5.2 UDCA	33
3 Material und Methoden	38
3.1 Material.....	38
3.1.1 Chemikalien	38
3.1.2 Synthesen	39
3.1.2.1 Synthese von d ₆ -Coprostanon und d ₆ -Coprostanol.....	40
3.1.2.2 Synthese von d ₅ -Ethylcoprostanon, d ₅ -Methylcoprostanon, d ₅ -Ethylcoprostanol und d ₅ -Methylcoprostanol.....	41
3.1.3 Stammlösungen	44
3.2 Analytische Methoden	45
3.2.1 Theoretische Grundlagen	45
3.2.1.1 Gaschromatographie	45

3.2.1.2	Das Massenspektrometer als Detektor in der Gaschromatographie	46
3.2.2	Bestimmung neutraler und saurer Sterole	48
3.2.2.1	Quantifizierung mittels Gaschromatographie	48
3.2.2.2	Quantifizierung mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie.....	50
3.2.2.3	Interner Standard.....	50
3.2.3	Analytik zur Bestimmung neutraler fäkaler Sterole.....	50
3.2.3.1	Aufarbeitung von Stuhlproben.....	50
3.2.3.2	Gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung neutraler fäkaler Sterole	51
3.2.4	Analytik zur Bestimmung freier UDCA in Plasmaproben.....	52
3.2.4.1	Aufarbeitung von Plasmaproben.....	52
3.2.4.2	Gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung von UDCA in Plasmaproben.....	53
3.2.5	Validierung der Meßmethoden.....	54
3.2.5.1	Selektivität	54
3.2.5.2	Richtigkeit und Wiederfindung.....	56
3.2.5.3	Linearität.....	59
3.2.5.4	Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze.....	63
3.2.5.5	Präzision.....	64
3.2.5.6	Stabilität.....	69
3.2.6	Diskussion der Methoden.....	70
3.2.6.1	Diskussion der Methode zur Bestimmung neutraler fäkaler Sterole	70
3.2.6.2	Diskussion der Methode zur Bestimmung von UDCA in Plasmaproben	72
3.2.7	Statistik.....	74

4 Studien, Studienergebnisse und Diskussion..... 76

4.1 Einfluß von Ezetimib und Simvastatin auf die intestinale Cholesterin- sowie Campesterin- und Sitosterinresorption; eine randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte, 4-phasige Crossover-Studie..... 76

4.1.1	Hintergrund der Studie	76
4.1.2	Studienziele	77
4.1.3	Studiendesign	78
4.1.4	Probanden.....	79
4.1.5	Ergebnisse der Studie	80
4.1.6	Methodenvergleich.....	88
4.1.7	Diskussion	94

4.2	Stabilitätstest unkonjugierter (freier) UDCA in Plasmaproben	99
4.2.1	Hintergrund	99
4.2.2	Versuchsplan	99
4.2.3	Ergebnisse	100
4.2.4	Diskussion	104
4.3	Offene (nicht verblindete) randomisierte zweiphasige Studie im Crossover-Design zur Untersuchung der Bioäquivalenz einer Tablette mit 500 mg UDCA und zweier Kapseln mit je 250 mg UDCA	107
4.3.1	Hintergrund	107
4.3.2	Studienziele	109
4.3.3	Studiendesign	109
4.3.4	Probanden	110
4.3.5	Ergebnisse	110
4.3.6	Diskussion	114
5	Zusammenfassung	118
6	Literaturverzeichnis	120
7	Anhang	131
8	Danksagung	172

Abkürzungen

ABC-Transporter	ATP-Binding-Cassette-Transporter
ACAT	Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase
AN	Allokationsnummer
AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (Area under the curve)
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
C_{\max}	Maximalkonzentration
d_6 -Campesterin	$2,2,3,4,4,6\text{-}^2\text{H}_6$ -Campesterin
CETP	Cholesterinester-Transfer-Protein
d_6 -Chol	$26,26,26,27,27,27\text{-}^2\text{H}_6$ -Cholesterin
$d_6\text{-}\Delta^4$ -Cholesten-3-on	$26,26,26,27,27,27\text{-}^2\text{H}_6\text{-}\Delta^4$ -Cholesten-3-on
d_6 -Cholesterin	$26,26,26,27,27,27\text{-}^2\text{H}_6$ -Cholesterin
Chol-Res	Cholesterinresorption
CI	Chemische Ionisation
CK	Creatinkinase
d_6 -Coprol	$26,26,26,27,27,27\text{-}^2\text{H}_6$ -Coprostanol
d_6 -Coprostanol	$26,26,26,27,27,27\text{-}^2\text{H}_6$ -Coprostanol
d_6 -Coprostanon	$26,26,26,27,27,27\text{-}^2\text{H}_6$ -Coprostanon
CV	Variationskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoßionisation
d_6 -Epicoprostanol	$26,26,26,27,27,27\text{-}^2\text{H}_6$ -Epicoprostanol
d_5 -Epiethylcoprostanol	$2,2,4,6,6\text{-}^2\text{H}_5$ -Epiethylcoprostanol
d_5 -Epimethylcoprostanol	$2,2,4,6,6\text{-}^2\text{H}_5$ -Epimethylcoprostanol
d_5 -Ethylcoprostanol	$2,2,4,6,6\text{-}^2\text{H}_5$ -Ethylcoprostanol
d_6 -Ethylcoprostanon	$2,2,4,6,6\text{-}^2\text{H}_5$ -Ethylcoprostanon
ESI	Elektrosprayionisation
FDA	US Food and Drug Administration
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
HDL	High Density Lipoprotein

HF	Wechselspannung
HMG-CoA-Reduktase	Hydroxy-Methyl-Glutaryl-CoA-Reduktase
ICC	Intraclass Correlation Coefficient
ICH	International Conference on Harmonization
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IPP	Isopentenylpyrophosphat
ISTD	Interner Standard
KHK	Koronare Herzkrankheit
Konz.	Konzentration
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
LRC Trial	Lipid Research Clinics Trial
Lsg.	Lösung
d ₅ -Methylcoprostanol	2,2,4,6,6- ² H ₅ -Methylcoprostanol
d ₅ -Methylcoprostanon	2,2,4,6,6- ² H ₅ -Methylcoprostanon
MHC	Major histocompatibility complex
MRFIT	Multiple Risk Factor Intervention Trial
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
NPC1L1-Protein	Niemann-Pick C1 Like 1-Protein
n.q.	nicht quantifizierbar
n.v.	Probe nicht vorhanden
P	Proband
PBC	Primäre biliäre Zirrhose
Pd	Palladium
PSC	Primäre sklerosierende Cholangitis
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
Pt	Platin
SD	Standardabweichung
SID	single ion detection
SIM	single ion monitoring
d ₄ -Sitol	5,6,22,23- ² H ₄ -Sitostanol
d ₄ -Sitostanol	5,6,22,23- ² H ₄ -Sitostanol

d ₆ -Sitosterin	2,2,3,4,4,6- ² H ₆ -Sitosterin
SR-BI	scavenger receptor class B type 1
t _{max}	Zeit bis zur maximalen Konzentration
TMS	Trimethylsilylchlorid
U	Gleichspannung
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
UDCA	Ursodesoxycholsäure
d ₄ -Ursodesoxycholsäure	2,2,4,4- ² H ₄ -Ursodesoxycholsäure
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

Trivialnamen und deren Nomenklatur nach IUPAC

Avenasterol	(24Z)-Ethyl-5 α -cholesta-7,24(24 ¹)-dien-3 β -ol
Brassicasterol	(24R)-Methylcholesta-5,22-dien-3 β -ol
Δ^4 -Campesten-3-on	(24R)-Methylcholest-4-en-3-on
Δ^5 -Campesten-3-on	(24R)-Methylcholest-5-en-3-on
Campesterin	(24R)-Methylcholest-5-en-3 β -ol
Chenodesoxycholsäure	3 α ,7 α -Dihydroxy-5 β -cholan-24-säure
Δ^4 -Cholesten-3-on	Cholest-4-en-3-on
Δ^5 -Cholesten-3-on	Cholest-5-en-3-on
Cholesterin	Cholest-5-en-3 β -ol
Cholsäure	3 α ,7 α ,12 α -Trihydroxy-5 β -cholan-24-säure
Coprostanol	5 β -Cholestan-3 β -ol
Coprostanon	5 β -Cholestan-3-on
Desoxycholsäure	3 α ,12 α -Dihydroxy-5 β -cholan-24-säure
5,6-Epoxycholesterin	5 α ,6 α -Epoxy-cholestan-3 β -ol
Ethylcoprostanol	(24R)-Ethyl-5 β -cholestan-3 β -ol
Ethylcoprostanon	(24R)-Ethyl-5 β -cholestan-3-on
Fucosterol	(24E)-Ethyl-cholesta-5,24(28)-dien-3 β -ol
Hyodesoxycholsäure	3 α ,6 α -Dihydroxy-5 β -cholan-24-säure
7 β -Hydroxycholesterin	Cholest-5-en-3 β ,7 β -diol
7-Ketocholesterin	Cholest-5-en-3 β -ol-7-on
Lithocholsäure	3 α -Hydroxy-5 β -cholan-24-säure
Methylcoprostanol	(24R)-Methyl-5 β -cholestan-3 β -ol
Methylcoprostanon	(24R)-Methyl-5 β -cholestan-3-on
Sitostanol	(24R)-Ethyl-5 α -cholestan-3 β -ol
Δ^4 -Sitosten-3-on	(24R)-Ethylcholest-4-en-3-on
Δ^5 -Sitosten-3-on	(24R)-Ethylcholest-5-en-3-on
Sitosterin	(24R)-Ethylcholest-5-en-3 β -ol
Stigmasterin	(24R)-Ethylcholesta-5,22-dien-3 β -ol
Ursodesoxycholsäure	3 α ,7 β -Dihydroxy-5 β -cholan-24-säure

1 Einleitung

1.1 Hintergrund und Ziele der Arbeit

1.1.1 Intestinale Resorption von Sterolen

Verschiedene Leitlinien, wie beispielsweise die *European Guidelines on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice* oder *Adult Treatment Panel III* betonen, daß die Senkung des LDL-Cholesterins eine wesentliche Strategie zur Reduktion des kardiovaskulären Risikos darstellt (1-3).

Bei der medikamentösen Behandlung von Fettstoffwechselstörungen wurden früher hauptsächlich Nicotinsäure, Fibrate und Anionenaustauscherharze verwendet. Eine Revolution in der Primär- und Sekundärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen bildeten die HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine), welche die Cholesterinbiosynthese im Körper hemmen. Eine Vielzahl von Studien zeigte, daß die Behandlung mit einem Statin eine der effektivsten Maßnahmen zur Reduktion von kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität darstellt (4-8).

Eine neue Therapiestrategie konnte mit dem Arzneimittel Ezetimib entwickelt werden. Ezetimib ist bisher der einzige Vertreter der neuen Wirkstoffklasse der Cholesterinresorptionshemmer. Es senkt das LDL-Cholesterin, indem es die Aufnahme von mit der Nahrung zugeführtem und biliär sezerniertem Cholesterin aus dem Darm hemmt (9).

Da eine Vielzahl von Patienten mit Hypercholesterinämie die in den Leitlinien geforderten Zielwerte für LDL-Cholesterin unter einer Monotherapie mit Statinen nicht erreicht, stellt die Möglichkeit der Kombination von Ezetimib mit einem Statin für diese Patienten eine wichtige Therapieoption zur Erlangung ihrer LDL-Cholesterin-Zielwerte dar. Eine Verdopplung der Statindosis führt nur zu einer zusätzlichen Senkung des LDL-Cholesterins von 5-7 %, wobei es zu einem erhöhten Risiko für dosisabhängige Nebenwirkungen kommt. Mit der kombinierten Gabe von Ezetimib und Statin kann im Vergleich zur Statin-Monotherapie eine erheblich größere Anzahl von Patienten ihr Therapieziel bei verbessertem Nutzen-Risiko-Verhältnis erreichen (10).

Ziel dieser Arbeit sollte die Entwicklung und Validierung einer neuen gaschromatographisch-massenspektrometrischen Methode zur Bestimmung der intestinalen Resorption von

Cholesterin und der beiden Phytosterole Sitosterin und Campesterin auf der Grundlage der von Lütjohann et al. 1993 entwickelten Methode sein (11).

Die neu etablierte Methode sollte anschließend im Rahmen einer klinischen Studie zur Untersuchung des Einflusses von Ezetimib und Simvastatin auf die intestinale Resorption von Cholesterin und der beiden Phytosterole Sitosterin und Campesterin angewendet werden. Weiterhin sollte ein Vergleich der Methode von Lütjohann et al. und der in dieser Arbeit entwickelten Methode durchgeführt werden.

1.1.2 Stabilitätsuntersuchung von Ursodesoxycholsäure (UDCA) und Prüfung auf Bioäquivalenz zweier Arzneimittelzubereitungen mit UDCA

Seit 1985 wird UDCA zur Behandlung von primärer biliärer Zirrhose (PBC) und primärer sklerosierender Cholangitis (PSC) eingesetzt. Bisher sind für die Therapie cholestatischer Lebererkrankungen nur Kapseln mit 250 mg UDCA bzw. eine Suspension mit 50 mg UDCA/ml zugelassen. Für Patienten, die eine hochdosierte Langzeitbehandlung mit UDCA benötigen, wurde eine neue galenische Zubereitung in Form einer Tablette mit 500 mg UDCA entwickelt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten Entwicklung und Validierung einer gaschromatographisch-massenspektrometrischen Methode zur Bestimmung von freier UDCA in Plasmaproben durchgeführt werden.

Diese Methode sollte nachfolgend für eine Stabilitätsuntersuchung von UDCA in Plasmaproben bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen angewendet werden. Anschließend an diese Stabilitätsuntersuchung sollte die entwickelte Methode im Rahmen einer Bioäquivalenzstudie zweier Arzneimittelzubereitungen mit UDCA eingesetzt werden.

2 Grundlagen

2.1 Steroide

Das Grundgerüst der Steroide ist das Cyclopenta[*a*]phenanthren. Dieses kann sowohl an C-10 als auch an C-13 jeweils eine Methylgruppe und an C-17 eine Alkylseitenkette aufweisen. Bei Vorliegen einer Hydroxylgruppe an C-3 wird das Steroid als Sterol bezeichnet, wie z.B. Cholesterin (Cholesterol) (Abbildung 2.1). In der Seitenkette (C-24) können zusätzliche Kohlenstoffatome vorhanden sein; beispielsweise bei Sitosterin eine Ethyl- und bei Campesterin eine Methylgruppe (Abbildung 2.6). Die vier Ringe des Steroidgrundgerüsts werden mit A, B, C und D bezeichnet (Abbildung 2.1). Die Ringe A und B der natürlich vorkommenden Steroide sind entweder *cis*- oder *trans*-verknüpft, die Ringe B und C weisen immer *trans*-Verknüpfung auf, die Ringe C und D sind in den meisten Fällen *trans*-verknüpft. Die Bezeichnung der *cis*, *trans*-Isomeren hängt von der Stellung der Methylgruppe an C-10 ab, die in natürlich vorkommenden Steroiden, genauso wie die Alkylseitenkette an C-17, immer oberhalb der Ringebene steht. Nach Fieser und Fieser werden Substituenten, die sich oberhalb der Ringebene befinden, als β -ständig, die Substituenten unterhalb der Ringebene als α -ständig bezeichnet (12). Die Nomenklatur und die Stereochemie wird im folgenden am Beispiel des Cholestans, $C_{27}H_{48}$, erklärt (Abbildung 2.2). Die Methylgruppe an C-13, die Seitenkette an C-17 und das Wasserstoffatom an C-8 sind im Cholestan β -ständig, die Wasserstoffatome an C-9, C-14 und C-17 α -ständig. Handelt es sich um eine *trans*-Verknüpfung der Ringe A und B, ist das Wasserstoffatom an C-5 α -ständig, bei einer *cis*-Verknüpfung der Ringe A und B jedoch β -ständig. Danach bezeichnet man die beiden Stereoisomere als 5- α -Cholestan und 5- β -Cholestan (Abbildung 2.2).

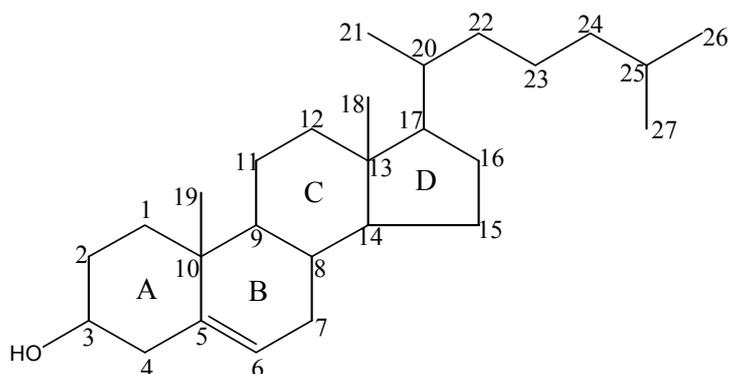


Abbildung 2.1: Strukturformel von Cholesterin

In den beiden in Abbildung 2.2 dargestellten stereoisomeren Kohlenwasserstoffen sind die Ringe B und C sowie C und D trans-verknüpft. Die Darstellung der beiden Cholestane in Abbildung 2.2 zeigt deren Konformation. Dabei sind die Ringe A, B und C in der Sesselform angeordnet, der Cyclopentanring zeigt ebenfalls eine nicht komplett planare Anordnung.

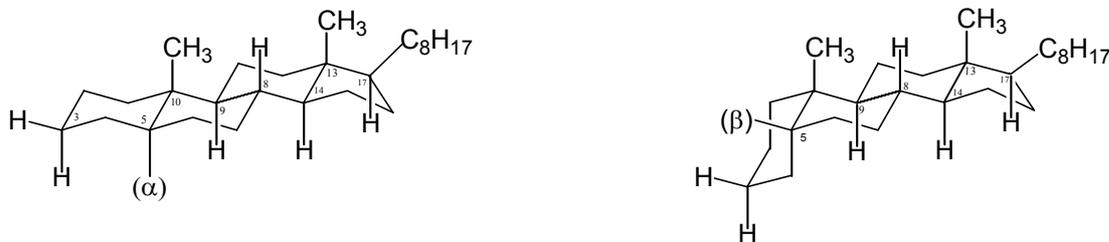


Abbildung 2.2: Stereochemie von 5- α -Cholestan und 5- β -Cholestan

Die α -ständigen Substituenten oder Wasserstoffatome sind axial angeordnet, die β -ständigen äquatorial. Bei Vorhandensein einer Doppelbindung in einem der Ringe A, B oder C (Cyclohexen), nimmt dieser Ring die sog. Halbsesselform ein (Abbildung 2.3). Die oben gezeigte Konformation gilt nur für gesättigte Ringsysteme.

2.1.1 Cholesterin

2.1.1.1 Struktur, Biosynthese, Vorkommen und Funktion

Cholesterin ist das am längsten bekannte Steroid. Es bildet den Hauptbestandteil von Gallensteinen und wurde daraus von Conradi im Jahre 1775 isoliert. Daher rührt auch die Bezeichnung Cholesterin (= feste Galle). Cholesterin besitzt eine 3β -OH-Gruppe sowie eine Doppelbindung im Ring B. Dadurch liegt Ring B in einer Halbsesselform vor und eine cis/trans-Isomerie zwischen Ring A und B ist nicht mehr möglich (Abbildung 2.3).

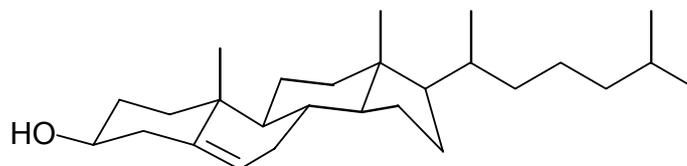


Abbildung 2.3: Konformation der Ringe A – D im Cholesterinmolekül

Cholesterin wird aus Acetat-Einheiten in fast allen Zellen, jedoch hauptsächlich in Leberzellen synthetisiert. Dabei kondensiert Acetyl-CoA mit Acetoacetyl-CoA zu 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Diese Reaktion findet, katalysiert von der HMG-CoA-Synthase, im Zytosol statt. Anschließend erfolgt im endoplasmatischen Retikulum mittels der HMG-CoA-Reduktase eine Reduktion zu Mevalonat. Es handelt sich dabei um eine NADPH-abhängige irreversible Reduktion, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Cholesterinbiosynthese darstellt. In den folgenden Syntheseschritten schließen sich Phosphorylierungen und Decarboxylierung zu Isopentenylpyrophosphat (aktives Isopren) sowie die anschließende Umsetzung zu Geranylpyrophosphat bzw. Farnesylpyrophosphat an. Durch Kondensationsreaktionen entsteht schließlich Squalen, welches durch Ringschluß, Hydroxylierung, Sättigung der Seitenkette und Demethylierung über Lanosterin und Zymosterin schließlich zum Cholesterin umgewandelt wird (Abbildung 2.4).

Cholesterin kommt im gesamten menschlichen Organismus frei und in Form von Cholesterinestern vor. Besonders angereichert ist Cholesterin in den Nebennieren, im Gehirn (10 % der Trockensubstanz), in der Haut (24 % des Hautfettes), außerdem in der Milz, den Ovarien, im Serum und in den Erythrozyten. Es ist ein wichtiger Bestandteil der Zellmembranen. Außerdem wird es als Ausgangssubstanz für die Synthese von Steroidhormonen benötigt. Die entsprechenden Reaktionen finden je nach Hormon in der Nebennierenrinde, den Ovarien, der Plazenta bzw. den Testes statt. Des Weiteren kann Cholesterin in 1,25-Dihydroxycholecalciferol, welches die intestinale Calciumresorption stimuliert, umgewandelt werden. In der Leber entstehen aus Cholesterin durch Verkürzung und Oxidation der Seitenkette und verschiedenen Hydroxylierungen am Ringsystem Gallensäuren. Es werden täglich ungefähr 200-500 mg Cholesterin in der Leber in Gallensäuren umgewandelt. Im terminalen Ileum werden über 95 % der Gallensäuren rückresorbiert. Sie gelangen erneut in die Leber und werden dann über die Galle wieder in den Darm ausgeschieden (13). Diese Menge muß daher dem Körper durch Neusynthese (endogenes Cholesterin) bzw. durch die Nahrung (exogenes Cholesterin) wieder zugeführt werden. Die mit der Nahrung aufgenommene Cholesterinmenge reicht von weniger als 50 mg/Tag bei Vegetariern bis zu 750 mg/Tag, die Neusynthese beträgt 500 mg/Tag bis 2400 mg/Tag (14). Cholesterin kommt nur in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs wie beispielsweise Eiern, Leber, Muskelfleisch, Wurst und Käse vor.

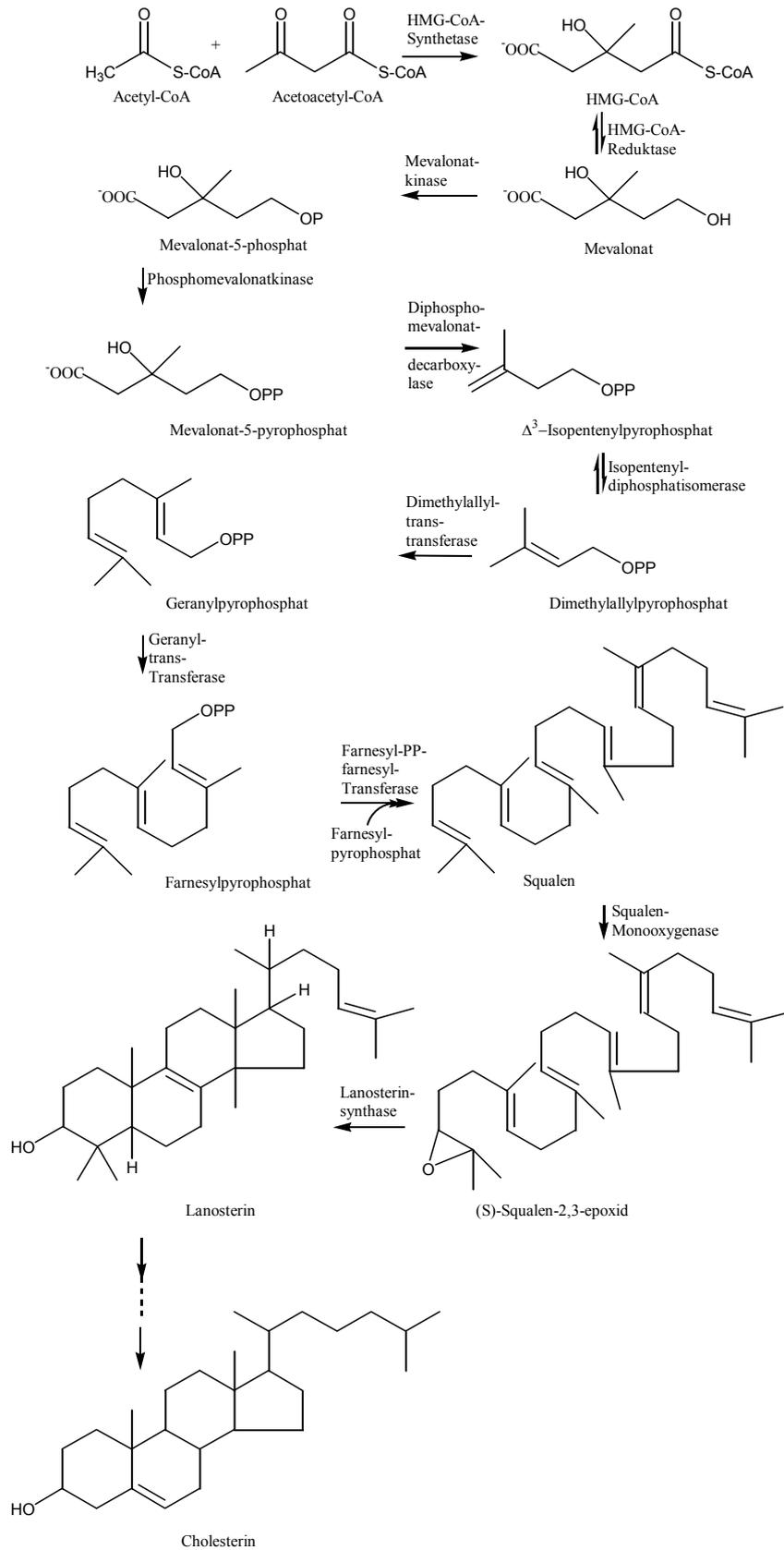


Abbildung 2.4: Biosynthese von Cholesterin

2.1.1.2 Metabolisierung der Sterole durch Darmbakterien

Die Umwandlung von Cholesterin zu Coprostanol durch Mikroorganismen im Darm kann auf zwei unterschiedlichen Wegen ablaufen. Beim indirekten Weg werden Δ^4 -Cholesten-3-on und Coprostanon als Zwischenprodukte gebildet, beim direkten Weg erfolgt eine direkte Reduktion der Doppelbindung zwischen den Positionen 5 und 6 (Abbildung 2.5).

Zur Ermittlung der Metabolisierung von Cholesterin wurden zahlreiche Versuche durchgeführt, die z.T. widersprüchliche Ergebnisse ergaben. Rosenfeld et al. beschrieben, daß die Umwandlung des Cholesterins durch direkte Reduktion der Doppelbindung an C-5 und C-6 zu Coprostanol erfolgt. Bei dieser Untersuchung wurde [3α - ^3H]Cholesterin eingesetzt (15). Jedoch konnte in einer späteren Arbeit dieses Ergebnis in Frage gestellt werden, als gezeigt werden konnte, daß während der mikrobiellen Umwandlung von [3α - ^3H]Cholesterin zu Coprostanol das 3α -Tritium entfernt und anschließend größtenteils in dieselbe Position wieder eingebaut wird und damit keine Unterscheidung der beiden Metabolisierungswege bei Einsatz eines solchen Substrates erfolgen konnte. Ergebnis dieser Arbeit war die Feststellung, daß die beiden möglichen Metabolisierungswege in gleichem Maße stattfinden (16). In einer weiteren Arbeit wurde beschrieben, daß der indirekte Weg der Metabolisierung überwiegt (17). Schließlich gelang es 1994 Freier et al., *Eubacterium coprostanoligenes* ATCC 51222 zu isolieren. Sie stellten fest, daß dieses Bakterium ca. 90 % des Cholesterins in einem Nährmedium reduzierte (18). Ren et al. führten Versuche zur Ermittlung der Metabolisierung von Cholesterin durch *E. coprostanoligenes* mit [4 - ^3H , 4 - ^{14}C]Cholesterin als Substrat durch (19). Sie konnten beweisen, daß die Metabolisierung von Cholesterin durch *E. coprostanoligenes* hauptsächlich über das Zwischenprodukt Δ^4 -Cholesten-3-on verläuft und durch anschließende Reduktion Coprostanon und schließlich Coprostanol gebildet werden.

In unterschiedlichen Untersuchungen neutraler fäkaler Sterole wurden für die beiden Phytosterole Campesterin und Sitosterin die entsprechenden Metabolisierungsprodukte (Methylcoprostanol und Methylcoprostanon bzw. Ethylcoprostanol und Ethylcoprostanon) gefunden (20, 21), was darauf hinweist, daß die Metabolisierung in der gleichen Weise wie bei Cholesterin stattfindet.

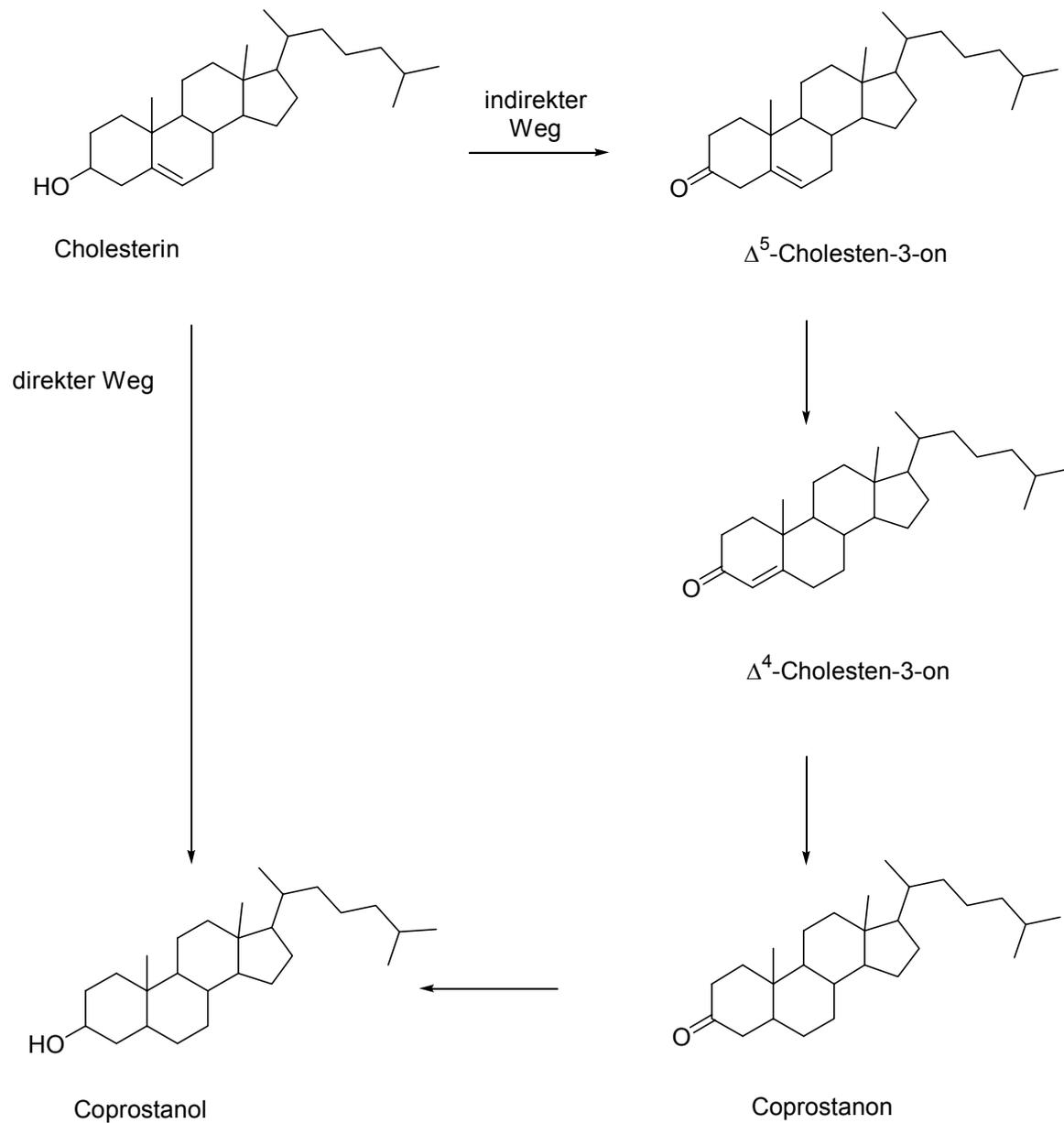


Abbildung 2.5: Möglichkeiten der Metabolisierung von Cholesterin durch Darmbakterien

2.1.1.3 Transportmechanismen

Die im Serum vorkommenden Lipide bestehen aus Cholesterin und Cholesterinestern, Phospholipiden, Triglyceriden und geringen Mengen unveresterter langkettiger Fettsäuren. Aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften müssen Lipide an spezifische Transportproteine gebunden werden, um im Plasma in Form von Lipoproteinen transportiert werden zu können. Diese Transportproteine werden auch als Apolipoproteine bezeichnet und sind für die jeweilige Lipoproteinklasse spezifisch. Sie besitzen sowohl lipophile als auch hydrophile Eigenschaften und ermöglichen durch ihre nach außen gekehrte hydrophile Seite den Transport von Lipiden im wässrigen Plasma. Zudem erfüllen die Apolipoproteine als

Rezeptorliganden oder Enzymaktivatoren wichtige Aufgaben im Metabolismus der Lipoproteine.

Die Lipoproteine können aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte mittels Ultrazentrifugation in vier Hauptklassen aufgetrennt werden. Dabei erfolgt eine Unterscheidung zwischen Lipoproteinen sehr geringer Dichte (very low density lipoproteins oder VLDL), geringer Dichte (low density lipoproteins oder LDL), hoher Dichte (high density lipoproteins oder HDL) und schließlich Lipoproteinen mit einer Dichte, die noch unterhalb derer des VLDL liegt (Chylomikronen). Die unterschiedliche Dichte dieser Klassen beruht auf einem unterschiedlichen Verhältnis von Lipiden zu Proteinen. So liegt in den Chylomikronen ein Lipid/Protein-Verhältnis von 90:1 vor, das sich bis zum HDL auf einen Wert von 50:50 ändert. Aufgrund des unterschiedlichen elektrophoretischen Verhaltens können die Lipoproteine in β -Lipoproteine (LDL), α -Lipoproteine (HDL) und in Prä- β -Lipoproteine (VLDL) elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Die Chylomikronen sind für den Transport von durch die Nahrung aufgenommenen Fettsäuren und Cholesterin zuständig. Sie werden bei der Lipidresorption in den Mucosazellen der Duodenumschleimhaut gebildet, an die Lymphe abgegeben und dann ins Plasma transportiert. Dort übernehmen sie von im Blut zirkulierendem HDL Apolipoprotein E und Apolipoprotein CII, welches als Aktivator der Lipoproteinlipase fungiert. Die Lipoproteinlipase hydrolysiert 70 bis 90 % der Triglyceride der Chylomikronen. Die dabei entstehenden Fettsäuren werden vom extrahepatischen Gewebe aufgenommen, das freie Glycerin wird zur Leber transportiert und dort phosphoryliert. Das Apolipoprotein A in der Proteinhülle der Chylomikronen wird auf HDL übertragen. Der cholesterinreiche Rest wird als Chylomikronen-Remnant bezeichnet, von der Leber aufgenommen und abgebaut. VLDL wird hingegen in der Leber synthetisiert und transportiert dort synthetisierte Triglyceride und Cholesterin zu extrahepatischen Geweben. Im Blutplasma erfolgt durch die Lipoproteinlipase der Abbau zu IDL (intermediate density lipoprotein). Aus IDL entstehen durch die hepatische Triglyceridlipase schließlich LDL-Partikel.

Die LDL-Partikel sind besonders cholesterinreich und besitzen die Aufgabe, in der Leber synthetisiertes Cholesterin zu extrahepatischen Geweben zu transportieren. Die LDL-Partikel binden an LDL-Rezeptoren und gelangen durch Endocytose in die Zellen. Durch intrazellulären enzymatischen Abbau wird dort Cholesterin freigesetzt. Das in den Zellen freigesetzte Cholesterin aktiviert die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT), was zu einer verstärkten Veresterung des Cholesterins führt. Die gebildeten Cholesterinester werden in der Zelle gespeichert. LDL-Rezeptoren werden zudem auch von Leberzellen exprimiert.

Das dort freigesetzte Cholesterin hemmt durch negative Rückkopplung die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase und führt durch Verminderung der Transkription des entsprechenden Gens zu einer Inhibition der Cholesterinbiosynthese

Die Hauptfunktion der HDL ist der Transport von extrahepatischem Cholesterin zurück zur Leber. Dabei wird freies Cholesterin mittels ABC1-Transporter durch die Zellmembran transportiert und von in der Leber und dem Darm gebildeten HDL aufgenommen. HDL sind in der Lage, das von der Leber synthetisierte Enzym Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT), das die Bildung von Cholesterinestern aus Cholesterin katalysiert, zu binden. Das Cholesterin wird mittels LCAT und dessen Co-Faktor Apolipoprotein-1 mit einer Fettsäure verestert. Anschließend wird HDL über den SR-BI-Rezeptor in die Leber aufgenommen. Dabei werden ca. 50 % der Cholesterinester in die Leber überführt, die restlichen 50 % werden mittels Cholesterinester-Transfer-Proteinen (CETP) auf VLDL, IDL und LDL übertragen und anschließend ebenfalls in die Leber aufgenommen. Von dort aus erfolgt die Ausscheidung des Cholesterins über die Metabolisierung zu Gallensäuren.

Erst vor einigen Jahren wurden zwei weitere Transportsysteme für Sterole im menschlichen Darm und der Leber entdeckt. Zum einen sind dies die beiden Transporter ABCG5 und ABCG8, die im Jahre 2000 von Berge et al. im Zusammenhang mit Phytosterolämie, einer autosomal rezessiv vererbten metabolischen Erkrankung, entdeckt wurden (22). Berge stellte fest, daß es sich bei dieser Erkrankung um einen Gendefekt handelt, von dem entweder der ABCG5- oder der ABCG8-Transporter betroffen sein kann. Beide Transporter werden in der äußeren Membran intestinaler Mucosazellen und in der kanalikulären Membran in der Leber exprimiert, wo sie freie Sterole aus der Zelle entweder zurück ins Darminnere oder in die Galle transportieren und damit sowohl für die Resorption als auch für die biliäre Ausscheidung von Cholesterin und den pflanzlichen Sterolen zuständig sind (23, 24). Ist einer der Transporter defekt, ist sowohl der Rücktransport der Sterole ins Darmlumen als auch die biliäre Sekretion der Sterole gestört, woraus entsprechend hohe Sterolkonzentrationen im Plasma resultieren.

Das zweite erst kürzlich entdeckte Transportsystem für Sterole steht in engem Zusammenhang mit der Entdeckung des Cholesterinresorptionshemmers Ezetimib. Es handelt sich dabei um einen Transporter, der Sterole in die Zellen transportiert und vermutlich eine Zielstruktur für Ezetimib darstellt (25). Altmann und Davis gelang es im Jahre 2004 das NPC1L1-Protein als diesen Transporter zu identifizieren (26), welches hauptsächlich im Duodenum und proximalen Jejunum exprimiert wird (siehe Kap. 2.1.4).

2.1.2 Phytosterole

2.1.2.1 Struktur, Vorkommen und Funktion

Phytosterole sind Sterole, die in Pflanzen und Mikroorganismen vorkommen. Hinsichtlich Struktur und Funktion innerhalb der Zellmembran sind Phytosterole dem Cholesterin sehr ähnlich. Biosynthetische Vorstufe sowohl der Phytosterole als auch des Cholesterins ist das Squalen. Pflanzliche Sterole bestehen wie Cholesterin aus einem tetracyclischen Cyclopenta[a]phenanthrenring und einer Seitenkette an C-17. Sie können in 3 Gruppen eingeteilt werden. Hierbei unterscheidet man die 4-Desmethyl-, die 4 α -Monomethyl- und die 4,4-Dimethylsterole, wobei die beiden letzteren als Phytosterolvorstufen bezeichnet werden können. Je nach Lage der Doppelbindung in Ring B werden die 4-Desmethylsterole in Δ^5 -, Δ^7 - und $\Delta^{5,7}$ -Sterole eingeteilt. Die meisten pflanzlichen Sterole besitzen eine Δ^5 -Doppelbindung und eine Methyl-, Ethyl- oder Ethylidengruppe an C-24. Weiterhin kann eine Δ^{22} -Doppelbindung vorliegen (Abbildung 2.6).

Phytosterole sind in allen pflanzlichen Nahrungsmitteln zu finden, am höchsten konzentriert sind sie in pflanzlichen Ölen, Fetten und Zerealien. Die am häufigsten vorkommenden Phytosterole sind Sitosterin, Campesterin und Stigmasterin. Phytosterole können vom menschlichen Organismus nicht synthetisiert werden, sondern werden mit der Nahrung zugeführt und aus dem Intestinaltrakt resorbiert. Die für den Menschen durchschnittliche Aufnahme von Phytosterolen mit der Nahrung beträgt zwischen 200 und 300 mg täglich, ist jedoch stark abhängig von den Ernährungsgewohnheiten. So kann bei Vegetariern die Phytosterolaufnahme bis zu 1 g täglich ansteigen (27).

Bei den Phytosterolen sind mehrere an Position C-3 derivatisierte Strukturen zu finden. Am häufigsten ist in der Pflanze die Veresterung mit langkettigen Fettsäuren, jedoch ebenfalls zu finden sind die Ferulsäureester. Zu einem kleinen Teil kommen Phytosterole auch in glycosylierter Form vor.

Freie Phytosterole sowie deren Glycoside haben große Bedeutung für Struktur und Funktion der pflanzlichen Zellwand. Die Ester der Phytosterole befinden sich intrazellulär und stellen zum Großteil eine Art Speicherform vergleichbar mit den Cholesterinestern in tierischen Zellen dar. Phytosterole besitzen amphiphile Eigenschaften. Die hydrophobe Seitenkette der Phytosterole ragt ins Membraninnere, während die polare hydrophile Hydroxylgruppe an C-3 nach außen zur wässrigen Phase hin zeigt. Phytosterole regulieren die Fluidität der Zellmembranen und spielen als Vorstufe der Brassinosteroide eine wichtige Rolle im

Entwicklungsprozess einer Pflanze. Sie sind außerdem für die Zelldifferenzierung und -proliferation von Bedeutung und, wie die Lipoproteine im tierischen Organismus, verantwortlich für Speicher- und Transportvorgänge innerhalb der Pflanze.

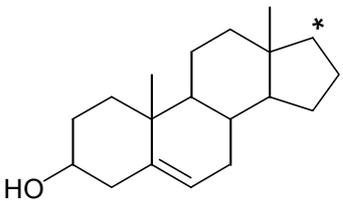
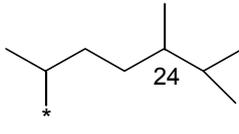
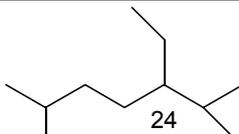
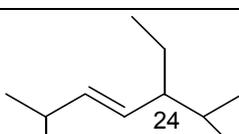
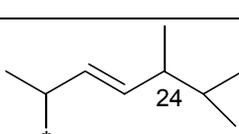
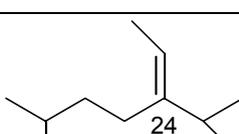
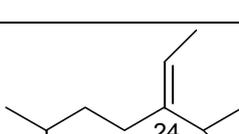
		Campesterin
		Sitosterin
		Stigmasterin
		Brassicasterol
		Fucosterol
		Avenasterol

Abbildung 2.6: Phytosterole

Die Biosynthese der Phytosterole unterscheidet sich beträchtlich von der des Cholesterins. Gemeinsam ist beiden das Isopentenylpyrophosphat (IPP) als Biosynthesegrundbaustein. Beteiligt sind mehr als 30 Enzym-katalysierte Reaktionen, die alle in der Zellmembran der Pflanze stattfinden.

Früher wurde angenommen, daß die mit der Nahrung aufgenommenen Phytosterole nicht resorbiert werden können (28). In Studien, die mit radioaktiv bzw. mit stabilen Isotopen markiertem Sitosterin durchgeführt wurden, konnte jedoch eine Resorption von 5-7 % nachgewiesen werden (29, 30). Die Resorption von Campesterin wurde von Heinemann et al. mittels der von Grundy und Mok entwickelten Intubationsmethode in einem 50 cm langen

Darmabschnitt ermittelt und betrug 9,6% (31). In einer anderen Studie wurde die Campesterinresorption über den gesamten Darm durch Gabe von mit stabilen Isotopen markierten Sterolen gemessen und betrug im Mittel 16 % (29).

2.1.3 Bedeutung von Cholesterin und Phytosterolen bei der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind in den meisten Industrieländern die häufigste Todesursache. Im Jahr 2002 waren nach Mitteilung des Statistischen Bundesamtes Herz-Kreislauf-Erkrankungen Ursache von 46,8 % aller Todesfälle in Deutschland. Bei Frauen treten kardiovaskuläre Erkrankungen im Durchschnitt 10 Jahre später auf als bei Männern, die Prognose ist aufgrund des höheren Lebensalters vergleichsweise schlechter (32, 33). Im Jahr 2000 machten kardiovaskuläre Erkrankungen 22 % aller DALYs (disability-adjusted life years) in Europa aus.

Ziel ist es, durch Verhinderung der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen, Morbidität und Mortalität zu verringern, die Lebensqualität zu verbessern sowie die Lebenserwartung zu erhöhen. Es konnte wissenschaftlich belegt werden, daß der Lebensstil und die damit mehr oder weniger vorhandenen Risikofaktoren eng mit der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen korrelieren. Die Reduktion von Risikofaktoren kann das Auftreten und Fortschreiten kardiovaskulärer Erkrankungen verhindern.

Cholesterin spielt bei der Entstehung der koronaren Herzkrankheit eine unumstrittene Rolle. Zahlreiche klinische Studien an Tieren und Menschen trugen dazu bei, die Reduktion des LDL-Cholesterins, das etwa 60-70 % des Gesamtcholesterins im Serum ausmacht, als maßgebliches Ziel für die Behandlung der koronaren Herzerkrankung zu machen. LDL-Cholesterin wurde als ein erheblicher Risikofaktor für ihre Entstehung deklariert. Zudem fand man, daß genetische Defekte wie beispielsweise die homozygote und die heterozygote Form der familiären Hypercholesterinämie zu einer beschleunigten Entstehung von Atherosklerose führen. Verschiedene epidemiologische Studien zeigen, daß eine erhöhte LDL-Cholesterin-Konzentration als atherogen einzustufen ist. So konnte in der Framingham Heart Study, im Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT) und im Lipid Research Clinics (LRC) Trial eine direkte Beziehung zwischen der LDL-Cholesterin-Konzentration bzw. der Gesamtcholesterin-Konzentration und dem Beginn der Entstehung einer koronaren Herzerkrankung bei Männern und Frauen festgestellt werden (34-37). Zudem wurde bewiesen, daß eine erhöhte LDL-Cholesterin-Konzentration mit erneuten koronaren

Ereignissen bei Patienten, die bereits zuvor ein koronares Ereignis erlitten hatten, in Verbindung gebracht werden kann (38-40).

Generell gilt, je höher die LDL-Cholesterin-Konzentration, desto höher das Risiko für koronare Ereignisse (36). In drei prospektiven Studien mit long-term-follow-up konnte bei jungen Erwachsenen mit erhöhten Serumcholesterin-Konzentrationen eine erhöhte Inzidenz der koronaren Herzerkrankung im mittleren Alter festgestellt werden (41, 42).

Die Bedeutung eines erhöhten LDL-Cholesterins für die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen kann eindeutig auch bei Patienten mit verschiedenen genetischen Formen der Hypercholesterinämie gezeigt werden. Bei diesen Patienten ist eine fortgeschrittene Atherosklerose und eine frühzeitige koronare Herzerkrankung feststellbar, obwohl keinerlei andere Risikofaktoren vorliegen. Eine Analyse von 28 randomisierten klinischen Studien mit über 46.000 männlichen Probanden und mehr als 4.000 Ereignissen, in denen entweder eine Diät, medikamentöse Therapie oder eine Operation durchgeführt wurden, zeigte, daß eine Reduktion des Cholesterins im Plasma um ca. 10 % mit einer 25 %igen Reduktion des Auftretens einer koronaren Herzerkrankung nach fünf Jahren einhergeht (43). In Übereinstimmung damit stehen fünf große klinische Studien mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine), in denen insgesamt über 30.000 Frauen und Männer mit und ohne koronare Herzerkrankung eine Therapie mit Statinen oder Placebo erhielten (Scandinavian Simvastatin Survival Study, Cholesterol and Recurrent Events trial, Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study, Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease) (4, 5, 7, 44). Beobachtet wurde, daß der Erfolg einer Therapie mit Statinen um so größer ist, je höher das Risiko des jeweiligen Patienten ist (45).

Die *European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice 2003* fordern für das Gesamtcholesterin im Plasma einen Wert < 190 mg/dl und für das LDL-Cholesterin einen Wert < 115 mg/dl. Bei bereits bestehender kardiovaskulärer Erkrankung und bei Vorliegen eines Diabetes mellitus sollten die Zielwerte etwas niedriger liegen (Gesamtcholesterin < 175 mg/dl und LDL-Cholesterin < 100 mg/dl) (3). Für HDL-Cholesterin und Triglyceride werden keine Zielwerte vorgegeben, jedoch dienen Werte von HDL-Cholesterin < 40 mg/dl bei Männern und < 46 mg/ml bei Frauen und ein Wert für Triglyceride > 150 mg/dl in nüchternem Zustand als Marker für ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer kardiovaskulären Erkrankung.

Eine ganz andere Bedeutung als Cholesterin besitzen im Hinblick auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen die pflanzlichen Sterole. Bereits seit den sechziger Jahren wird die cholesterinsenkende Eigenschaft der Phytosterole und Phytostanole in klinischen Studien

untersucht. Eine Metaanalyse von 41 Studien zeigte, daß die tägliche Aufnahme von 2 g Phytostanolen oder Phytosterolen zu einer Senkung der LDL-Cholesterin-Konzentration um 10% führt (46). Dabei ist die Effektivität der Senkung durch Phytostanole und Phytosterole etwa gleich. Die Cholesterin senkende Wirkung der pflanzlichen Sterole beruht vermutlich auf der Verdrängung des Cholesterins aus den aus Gallensalzen und Phospholipiden bestehenden gemischten Mizellen. Demnach konkurrieren die pflanzlichen Sterole mit Cholesterin um die Mizellen. Die Aufnahme von Sitosterin, welches im Vergleich zu Cholesterin eine höhere mizellare Affinität besitzt, ist gegenüber Cholesterin energetisch begünstigt (47). Es wird angenommen, daß die beiden Transportproteine ABCG5 und ABCG8 eine wichtige Rolle hinsichtlich des Wirkmechanismus der pflanzlichen Sterole spielen.

Wurden früher extrem große Mengen an pflanzlichen Sterolen zur Senkung der Cholesterinkonzentration eingesetzt (10-20 g/Tag), so werden heute nur noch etwa 2 g/Tag verabreicht, da neuere Studien zeigten, daß größere Mengen keinen erhöhten Effekt haben (46). Als Folge einer über einen längeren Zeitraum andauernden Gabe von Phytosterolen und der dadurch verursachten Reduktion der Cholesterinresorption wurde eine kompensatorische Zunahme der Cholesterinbiosynthese um 38-53 % sowie der LDL-Rezeptoren um 25-43 % beobachtet (48, 49).

Phytosterole besitzen jedoch möglicherweise neben ihren positiven Cholesterin senkenden Eigenschaften auch nachteilige Wirkungen. Bei mehreren an Phytosterolämie erkrankten Personen konnte als Folge erhöhter Phytosterolkonzentrationen in der Erythrozytenmembran ein größeres Risiko für eine Ruptur der Membran und einer dadurch verursachten Hämolyse festgestellt werden (50). In Tierversuchen wurde ein negativer Einfluß von Phytosterolen auf die Reproduktion und Fruchtbarkeit beobachtet (51). Außerdem wird die bei Phytosterolämie-Patienten sehr frühzeitig beginnende Atherosklerose mit erhöhten Sitosterin- und Campesterin-Konzentrationen im Blut in Verbindung gebracht. Daher ist unklar, ob durch eine vermehrte orale Aufnahme von Phytosterolen ein ungünstiger Effekt auf die Entstehung von Atherosklerose entstehen könnte. Weitere Studien sind notwendig, um den Zusammenhang zwischen pflanzlichen Sterolen und der Entstehung von Atherosklerose zu untersuchen. Die FDA (US Food and Drug Administration) hat die in Nahrungsmitteln enthaltenen Phytosterole und Phytostanole als sicher erklärt und ihre Wirksamkeit bestätigt. Bisher stehen Daten aus Studien mit Phytosterolen und -stanolen von über 5 Jahren zur Verfügung, und das Verhältnis von Risiko und Benefit scheint günstig zu sein. Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, daß bisher noch keine Langzeiterfahrungen vorliegen (46).

Zur Zeit gibt es im Bereich „functional food“ verschiedene Produkte mit Phytosterolen bzw. Phytostanolen. Phytosterole sind in mehreren Produkten der Firma Unilever enthalten. Dazu gehören eine Diät-Halbfettmargarine mit einem Anteil von 12,5 % Phytosterolen, Diät-Joghurt und Diät-Milchgetränk mit einem Anteil von 1 % bzw. 0,5 % Phytosterolen. Phytostanole sind in „Benecol[®]“ Joghurtdrink der Firma Emmi verarbeitet. Der Gehalt der Phytostanole beträgt in diesem Produkt 3 %.

2.1.4 Ezetimib

Ezetimib (Ezetrol[®]) ist ein 2-Azetidinon und gehört zu einer neuen Klasse von lipidsenkenden Stoffen. Es wurde im Oktober 2002 in Deutschland erstmals zugelassen. Ezetrol[®] wurde ursprünglich von der Firma Schering-Plough als Hemmstoff der Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) konzipiert. Spätere Befunde ergaben jedoch, daß Ezetimib durch einen bis dahin nicht bekannten Wirkmechanismus die Cholesterinresorption an der Darmwand hemmt. Mittels eines Hamstermodells konnte festgestellt werden, daß eine sehr cholesterinreiche Diät die Konzentration von verestertem Cholesterin in der Hamsterleber enorm erhöht und die Tiere dadurch besonders gut auf eine Hemmung der ACAT ansprechen (52). Die Serumcholesterinkonzentration wurde bei diesen Tieren durch Fütterung von Cholesterin kaum beeinflußt. Eine Reihe von Molekülen wurde in ihrer hemmenden Wirkung auf die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase optimiert. Ihre In-vivo-Aktivität im Hamstermodell war jedoch sehr gering oder gar nicht vorhanden. Es wurde daraufhin versucht, die In-vivo-Aktivität der Moleküle zu verbessern, während die ACAT-Aktivität außer Acht gelassen wurde. Dies führte zur Entwicklung eines Azetidinsons, welches der Prototyp der Cholesterinresorptionshemmer und der Ausgangspunkt für die weitere Entwicklungsarbeit werden sollte (Abbildung 2.7).

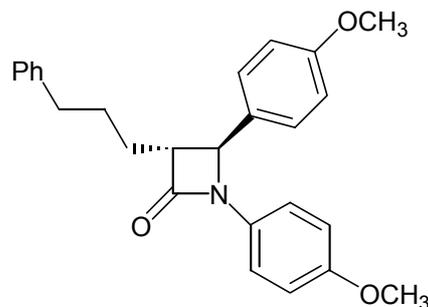


Abbildung 2.7: Prototyp der Cholesterinresorptionshemmer:
(3R,4S)-1,4-Bis-(4-methoxyphenyl)-3-(3-phenylpropyl)-2-azetidinon
(SCH 48461)

Man stellte fest, daß diese Leitstruktur zu einem erheblichen Maße metabolisiert wird. Dem Arbeitskreis um Van Heek gelang es, den Hauptmetaboliten zu identifizieren, dem die hauptsächliche Aktivität zuzuschreiben war (53, 54). Durch die Synthese bekannter und vermuteter Metaboliten konnte schließlich eine Struktur gefunden werden, die in einer Vielzahl von Tiermodellen eine höhere Aktivität als die Leitstruktur aufwies, und die heute unter dem Namen Ezetimib bekannt ist.

Ezetimib hemmt selektiv die intestinale Resorption von Cholesterin und Phytosterolen und ist zugelassen für die Behandlung der primären (heterozygoten familiären und nicht familiären) Hypercholesterinämie in Kombination mit einem Statin, wenn eine Monotherapie mit Statinen nicht die erwünschten Therapieziele herbeiführt. Für Patienten mit primärer (heterozygoter familiärer und nicht familiärer) Hypercholesterinämie, bei denen eine Statintherapie ungeeignet oder unverträglich ist, kann Ezetimib auch in Monotherapie angewendet werden. Außerdem besitzt Ezetimib die Zulassung für die Behandlung der homozygoten familiären Hypercholesterinämie zusätzlich zu einer Statintherapie und für die Behandlung der homozygoten Phytosterolämie.

Der Wirkmechanismus von Ezetimib wurde noch nicht vollständig aufgeklärt. Bisher fand man heraus, daß es sich um ein anderes Wirkprinzip als bei den Phytosterolen und Phytostanolen handelt. In Studien mit intravenös verabreichtem ³H-Ezetimib konnte festgestellt werden, daß sich Ezetimib an der Bürstensaummembran des Darmes anlagert (54). In weiteren Studien wurde herausgefunden, daß die Wirkung von Ezetimib nicht mit den ABCA1-, ABCG5- oder ABCG8-Transportern zusammenhängt und auch der *Scavenger receptor class B type 1 (SR-BI)* im Wirkmechanismus des Ezetimibs keine Rolle spielt. Äußerst wichtig für die intestinale Aufnahme von Cholesterin und den pflanzlichen Sterolen scheint das *Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) -Protein* zu sein (26, 55). Jedoch konnte der Zusammenhang von Ezetimib und dem NPC1L1-Protein bisher noch nicht vollständig geklärt werden, und man geht davon aus, daß bei der Wirkung von Ezetimib weitere Proteine, wie beispielsweise der *Annexin-2-Caveolin-1-Komplex*, involviert sind (56). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden diese Behauptungen jedoch widerlegt und die Aminopeptidase N als ein molekulares Target für Ezetimib deklariert (57).

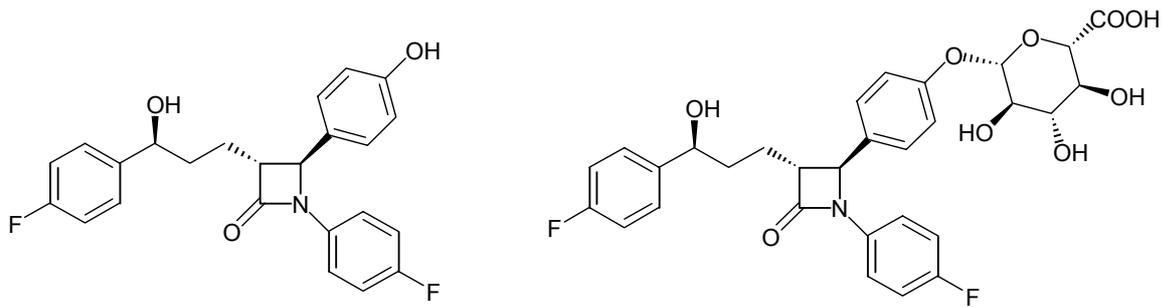


Abbildung 2.8: Ezetimib (links) und Ezetimib-Glucuronid (rechts)

Nach peroraler Gabe wird Ezetimib rasch resorbiert und im Dünndarm und in der Leber in einer Phase-II-Reaktion zu 98 % in das aktive Phenol-Glucuronid umgewandelt (Abbildung 2.8). Das Glucuronid wird aus dem Darm resorbiert und gelangt über die Pfortader in die Leber, wo es über die Galle erneut in den Darm ausgeschieden wird. Dadurch wird die Expositionszeit des Arzneistoffs an seinem Wirkort durch den enterohepatischen Kreislauf beträchtlich gesteigert (58). Die mittlere Plasmaspitzenkonzentration (C_{\max}) wird für das Glucuronid nach 1-2 Stunden, für nicht konjugiertes Ezetimib nach 4-12 Stunden erreicht. Die Elimination des Arzneistoffs und seines Metaboliten aus dem Plasma erfolgt aufgrund des enterohepatischen Kreislaufs nur langsam. Ezetimib wird zu 99,7 %, das Glucuronid zu 88-92 % an Plasmaproteine gebunden. Die Halbwertszeit beträgt etwa 22 Stunden. Daher ist lediglich eine einmal tägliche Verabreichung erforderlich. Da die gleichzeitige Nahrungsaufnahme keinen Einfluß auf die perorale Bioverfügbarkeit zeigte, kann Ezetimib unabhängig von den Mahlzeiten eingenommen werden. Ezetimib wird zu etwa 78 % mit den Fäzes und zu 11 % mit dem Urin ausgeschieden. Eine Dosisanpassung ist bei älteren Patienten sowie auch bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion (Kreatinin-Clearance ≤ 30 ml/min) nicht erforderlich. Auch bei Patienten mit leichter Leberinsuffizienz muß keine Dosisanpassung vorgenommen werden, jedoch wird bei Patienten mit mäßiger und schwerer Leberinsuffizienz die Einnahme von Ezetimib nicht empfohlen, da die Folgen einer erhöhten Exposition mit Gesamt-Ezetimib bei dieser Erkrankung nicht bekannt sind (59).

Bisher wurden die Ergebnisse einer Studie mit 18 Probanden zur Messung der intestinalen Cholesterinresorption nach Gabe von Ezetimib veröffentlicht. Dabei handelte es sich um eine randomisierte doppelblinde placebokontrollierte Studie. Die Behandlungsphase mit entweder 10 mg Ezetimib oder Placebo dauerte jeweils zwei Wochen. Die Cholesterinresorption wurde dabei im Mittel um 54 % gesenkt, die Senkung der Plasmakonzentration von LDL-Cholesterin betrug 20,4 % bezogen auf die Plasmakonzentration ohne Therapie (60).

In einer Phase-III-Studie mit 892 Patienten konnte ein ähnlicher Rückgang der Plasmakonzentration von LDL-Cholesterin beobachtet werden. Außerdem wurden zusätzliche vorteilhafte Wirkungen auf verschiedene für den Lipidstoffwechsel relevante Variablen gefunden. So konnte eine HDL-Cholesterin-Zunahme von 2,9 % und ein Rückgang der Triglyceride um 11,4 % festgestellt werden (61).

Es wurde auch ein kompensatorischer Anstieg der Cholesterinbiosynthese von 89 % gegenüber Placebo durch Hemmung der Cholesterinresorption unter der Einnahme von Ezetimib festgestellt (60). Durch die Kombination von Ezetimib mit einem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor (Statin) kann der durch Ezetimib verursachte Anstieg der Cholesterinbiosynthese beträchtlich eingeschränkt werden und hinsichtlich der Reduktion der Plasmakonzentration des LDL-Cholesterins eine synergistische Wirkung erzielt werden.

Statine sind die meist verordnete Arzneistoffgruppe, die zur Senkung der Cholesterinkonzentration eingesetzt werden. Sie zeigen sehr gute Wirkung im Hinblick auf die Senkung des LDL-Cholesterins. Viele Patienten erreichen mit der Monotherapie aber den in Therapieleitlinien geforderten LDL-Cholesterin-Wert nicht (1). Bei diesen Patienten ist eine Kombinationstherapie aus sich in ihrer Wirkung ergänzenden Arzneistoffen gefordert. So kann beispielsweise die Kombination eines Statins mit Fibraten, Gallensäure bindenden Harzen oder Niacin Vorteile gegenüber der Statin-Monotherapie aufweisen. Diese Kombinationen sind jedoch auch aufgrund eines höheren Risikos für unerwünschte Arzneimittelwirkungen, -unverträglichkeiten oder -interaktionen in ihrem Einsatz limitiert (1). Bei einer Kombinationstherapie mit Ezetimib und Statin kann die Dosis des Statins erheblich gesenkt werden. Auf Statine bezogene unerwünschte Arzneimittelwirkungen werden dadurch vermindert, und in vielen Fällen kann das vorher nicht erreichte Therapieziel erreicht werden. In vier Phase-III-Studien wurden Effektivität und Sicherheit von 10 mg Ezetimib einmal täglich verabreicht in Kombination mit Simvastatin, Atorvastatin, Pravastatin und Lovastatin bei Patienten mit primärer Hypercholesterinämie untersucht. Die dabei applizierten Statindosen waren 10, 20, 40 oder 80 mg für Simvastatin und Atorvastatin und 10, 20 oder 40 mg für Pravastatin und Lovastatin. Die Senkung der LDL-Cholesterin-Konzentration unter Ezetimib und Statin reichte je nach Statindosis von 44 % bis 57 % für Simvastatin, von 50 % bis 60 % für Atorvastatin, von 34 % bis 41 % für Pravastatin und von 33 % bis 45 % für Lovastatin (61).

In einer Studie mit Patienten mit homozygoter familiärer Hypercholesterinämie wurde die prozentuale Reduktion des LDL-Cholesterins ausgehend von einem Wert unter der Therapie mit 40 mg Atorvastatin oder 40 mg Simvastatin mit oder ohne begleitende LDL-Apherese

nach Verdopplung der Statindosis bzw. nach Gabe von Ezetimib plus Statin (40 mg/d oder 80 mg/d) untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß eine Verdopplung der Statindosis zu einer Reduktion des LDL-Cholesterins um 7 % führte, die Gabe von Ezetimib zu 40 mg des Statins eine Reduktion von 13 % und die Gabe zu 80 mg eines Statins zu einer Reduktion von 28 % führte (62). Durch den Cholesterinresorptionshemmer Ezetimib besteht auch für diese in der Behandlung sehr schwierige Patientengruppe die Möglichkeit, die LDL-Cholesterinkonzentration effektiv zu senken und sich so dem gegebenen Zielwert bestmöglichst anzunähern.

Außerdem ist Ezetimib für die Behandlung von Patienten mit Phytosterolämie, bei denen eine extrem hohe Campesterin- und Sitosterinplasmakonzentration zu einer frühzeitigen Atherosklerose führen, zugelassen. Ezetimib senkte in einer Studie über 8 Wochen mit 37 an Phytosterolämie erkrankten Patienten die Plasmakonzentration von Sitosterin um 21 % gegenüber einer Zunahme von 4 % in der Placebogruppe. Der Rückgang der Konzentration verlief progredient, so war bei im Abstand von 2 Wochen durchgeführten Visiten jeweils eine weitere Senkung zu verzeichnen. Die Plasmakonzentration von Campesterin wurde nach einer Behandlungsdauer von 8 Wochen um 24 % gegenüber einem Anstieg von 3 % in der Placebogruppe gesenkt (63). Mit dieser Studie konnte die Hypothese bestätigt werden, daß Ezetimib nicht nur die intestinale Resorption von Cholesterin sondern auch die der beiden Phytosterole Sitosterin und Campesterin senkt und dadurch zu einer Reduktion der Plasmakonzentrationen dieser Substanzen führt. Somit ist die Gabe von Ezetimib z.Zt. die einzige Möglichkeit, die an Phytosterolämie erkrankten Patienten effektiv zu therapieren. Ob Ezetimib die mit der Phytosterolämie verbundenen Komplikationen, wie beispielsweise Atherosklerose und Hämolyse, minimieren bzw. verhindern kann, muß in zukünftigen Studien abgeklärt werden.

Die gefährlichste unerwünschte Arzneimittelwirkung der Statine ist die Rhabdomyolyse, eine Myonekrose mit Freisetzung von Kreatin-Phosphokinase und Myoglobin, die zu einer Myoglobinämie und schließlich zu Nierenversagen führen kann. Die Inzidenz nimmt mit steigender Statindosis zu. Unter dem Aspekt der Reduktion des Auftretens unerwünschter Arzneimittelwirkungen unter einer Therapie mit Statinen ist besonders hervorzuheben, daß die zusätzliche Gabe von 10 mg Ezetimib zu 10 mg eines Statins zu einer vergleichbaren Reduktion des LDL-Cholesterins führt, wie die jeweils höchst mögliche Dosis an Statin (80 mg Simvastatin, 80 mg Atorvastatin, 40 mg Pravastatin, 80 mg Lovastatin) allein appliziert (64).

Das Nebenwirkungsprofil von Ezetimib in Mono- bzw. in Kombinationstherapie mit einem Statin wurde bisher als sehr gering bewertet. In verschiedenen Phase-II- und Phase-III-Studien mit insgesamt mehr als 2.000 Patienten unterschieden sich die unerwünschten Arzneimittelwirkungen in der Behandlungsphase mit Ezetimib nicht von denen in der Behandlungsphase mit Placebo (65, 66). Jedoch lagen im Jahre 2004 nach Angaben der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft mehrere Berichte vor, nach denen unter der Therapie mit Ezetimib eine Myopathie auftrat (67). In einigen der Fälle wurde gleichzeitig mit einem Statin behandelt. Da Ezetimib meist als Kombinationspartner eines Statins Anwendung findet, sollte dieser Aspekt in Zukunft noch genauer untersucht werden.

2.1.5 Gallensäuren

2.1.5.1 Struktur, Biosynthese und Metabolismus

In der Leber wird Cholesterin zu Gallensäuren metabolisiert. Neben einer Carboxylgruppe in der C-17-Seitenkette besitzen die Gallensäuren eine oder mehrere Hydroxylgruppen an den Positionen C-3, C-7 und an Position C-12 (Abbildung 2.9). Der Stammkörper der Gallensäuren ist die Cholansäure. Gallensäuren sind sowohl aus einem hydrophoben als auch einem hydrophilen Strukturteil aufgebaut, besitzen daher grenzflächenaktive Eigenschaften und sind zur Bildung von Mizellen befähigt. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Emulgierung und Verdauung von Fetten und Cholesterin aus der Nahrung.

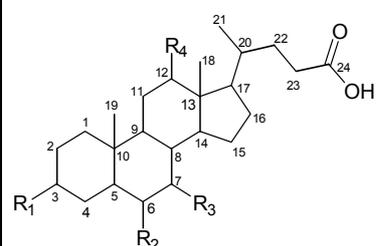
	Trivialname	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
	Lithocholsäure	α -OH	H	H	H
Desoxycholsäure	α -OH	H	H	α -OH	H
Ursodesoxycholsäure	α -OH	H	β -OH	H	H
Chenodesoxycholsäure	α -OH	H	α -OH	H	H
Cholsäure	α -OH	H	α -OH	α -OH	H
Hyodesoxycholsäure	α -OH	α -OH	H	H	H

Abbildung 2.9: Gallensäuren

Die Gallensäuren werden mit der Gallenflüssigkeit in den Darm abgegeben. Die Gallenflüssigkeit ist eine wäßrige Lösung, die zu einem beträchtlichen Anteil aus organischen, aber auch anorganischen Ionen zusammengesetzt ist. Der organische Teil besteht aus etwa 60 % Gallensäuren, 20 % Phospholipiden, 4-5 % Proteinen, 4 % Cholesterin, 0,3 % Bilirubin sowie weiteren exogenen und endogenen Substanzen wie Vitamine, Hormone und gegebenenfalls Arzneistoffe (68).

Gallensäuren unterscheiden sich in der Anzahl, Position und Orientierung ihrer Hydroxylgruppen. Die Hydrophobie einer Gallensäure steigt mit abnehmender Anzahl an Hydroxylgruppen. Außerdem spielt die räumliche Orientierung der Hydroxylgruppen eine weitere Rolle bezüglich der hydrophoben bzw. hydrophilen Eigenschaften der Gallensäuren. So besitzt UDCA mit der Hydroxylgruppe an Position C-7 in β -Stellung eine geringere Hydrophobie als Chenodesoxycholsäure mit einer Hydroxylgruppe an Position C-7 in α -Stellung. Eine wichtige Rolle spielt die Hydrophobie der Gallensäuren bei der Beurteilung ihrer Toxizität. Je größer die hydrophoben Eigenschaften einer Gallensäure, desto größer ist auch ihre Toxizität. Dabei nimmt die Hydrophobie in folgender Reihenfolge ab: Lithocholsäure > Desoxycholsäure > Chenodesoxycholsäure > Cholsäure > Ursodesoxycholsäure.

Die Biosynthese der Gallensäuren in der Leber kann zum einen über den klassischen (neutralen) Stoffwechselweg oder über den alternativen (sauren) Stoffwechselweg erfolgen. Der klassische Stoffwechselweg besteht aus 14 verschiedenen Stufen und findet ausschließlich in Leberzellen statt. Den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dieser Kaskade bildet die durch 7α -Hydroxylase katalysierte Hydroxylierung von Cholesterin zu 7α -Hydroxycholesterin. Es schließen sich Modifikationen des Steroidgrundgerüsts einschließlich Sättigung der Doppelbindung, Epimerisierung der 3β -Hydroxylgruppe sowie Hydroxylierung an der 7α - und 12α -Position an. Zuletzt erfolgt der oxidative Abbau der Seitenkette.

Der alternative Stoffwechselweg findet größtenteils im peripheren Gewebe statt, wobei im Unterschied zum klassischen Weg die durch die 27 -Hydroxylase katalysierte Oxidation der Seitenkette den Modifikationen des Steroidgrundgerüsts vorausgeht. Die Oxidationsprodukte $7\alpha,27$ -Dihydroxycholesterin bzw. $3\beta,7\alpha$ -Dihydroxy-5-cholestensäure werden hauptsächlich im peripheren Gewebe gebildet. Anschließend werden die Oxidationsprodukte zur Leber transportiert, um dort schließlich zu Gallensäuren umgewandelt zu werden (69). Unter physiologischen Bedingungen findet fast ausschließlich der klassische Weg statt.

In der menschlichen Galle überwiegen die beiden primären Gallensäuren Chenodesoxycholsäure [$3\alpha,7\alpha$ -Dihydroxy- 5β -cholan-24-säure] (28-54 %) und Cholsäure [$3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -Trihydroxy- 5β -cholan-24-säure] (21-45 %). Auch die sekundäre Gallensäure Desoxycholsäure [$3\alpha,12\alpha$ -Dihydroxy- 5β -cholan-24-säure] macht bis zu 20 % der Gesamtgallensäuren aus, während Lithocholsäure [3α -Hydroxy- 5β -cholan-24-säure] und Ursodesoxycholsäure [$3\alpha,7\beta$ -Dihydroxy- 5β -cholan-24-säure] nur in Spuren vorhanden sind (< 2 %).

Normalerweise liegen 90-95 % der Gallensäuren konjugiert mit Glycin oder Taurin vor. Nach Exkretion in die Galle werden > 97 % der Gallensäuren im Darm resorbiert, gelangen erneut in die Leber und werden wieder in die Galle sezerniert (enterohepatischer Kreislauf) (13). Primäre Gallensäuren, zu denen die Cholsäure und die Chenodesoxycholsäure zählen, werden durch bakterielle Dehydroxylierung im Darm zu sekundären Gallensäuren (hauptsächlich Desoxycholsäure und Lithocholsäure) umgewandelt.

2.1.5.2 UDCA

UDCA ist eine hydrophile Gallensäure mit zwei Hydroxylgruppen an den Positionen 3α und 7β . Sie wurde erstmals in der Gallenflüssigkeit des chinesischen Schwarzbären entdeckt und auch nach dieser Spezies benannt (*ursus* lat.: Bär) (70). Auch in der Gallenflüssigkeit des Menschen ist UDCA zu finden, wenn auch nur in sehr geringen Konzentrationen von 1-3 % bezogen auf den gesamten Gallensäurenpool. UDCA ist eine sekundäre Gallensäure, die bakteriell durch 7β -Epimerisierung der Chenodesoxycholsäure, einer primären Gallensäure, im Darm gebildet wird (71). Im Gegensatz dazu wird UDCA im Bären direkt aus Cholesterin synthetisiert und ist damit bei dieser Spezies eine primäre Gallensäure.

In China wurde getrocknete Bärengalle über Jahrhunderte hinweg als Heilmittel für Lebererkrankungen verwendet (72). Die Struktur von UDCA wurde im Jahre 1936 von Iwasaki aufgeklärt, direkt danach auch synthetisiert und in Japan in Kombination mit Vitaminen als ein hepatoprotektives Mittel vermarktet (73).

Chenodesoxycholsäure war die erste Gallensäure, die für die Behandlung von Patienten mit Gallensteinen eingesetzt wurde. Aufgrund von häufig auftretender Diarrhö und Erhöhung von Transaminasen war ihre Anwendung jedoch beschränkt. Nachdem man herausgefunden hatte, daß UDCA ebenfalls die Fähigkeit besitzt, Gallensteine aufzulösen, jedoch keine unerwünschte Wirkungen zeigt, wurde UDCA der Arzneistoff der Wahl für diese Indikation (74).

UDCA wird peroral in unkonjugierter Form als freie Säure verabreicht. Die intestinale Resorption von Gallensäuren hängt stark von ihren physikochemischen Eigenschaften ab. Als hydrophile Gallensäure wird UDCA durch passive nichtionische Diffusion langsamer resorbiert als hydrophobe Gallensäuren, wie beispielsweise Chenodesoxycholsäure. Die Löslichkeit stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der intestinalen Resorption der Gallensäuren dar. Sie ist abhängig vom pK_a -Wert. Danach ist UDCA erst bei einem pH-Wert $> 7,8$ löslich.

Nach peroraler Applikation wird UDCA im proximalen Teil des Dünndarms rasch resorbiert. Nach kurzer Zeit kann UDCA im peripheren Blut nachgewiesen werden. Die Plasmaspitzenkonzentration wird mit interindividuell variierenden Schwankungen 30 bis 50 Minuten nach Applikation erreicht (75). Jedoch ist das Ausmaß der intestinalen Resorption von UDCA bisher nicht vollständig bekannt. Sie nimmt mit ansteigender Dosis evtl. aufgrund der eingeschränkten Löslichkeit ab. Nach einer einmalig verabreichten Dosis von 250, 500, 1000 oder 2000 mg betrug die Wiederfindung in der Galle nach 24 h 60, 48, 31 und 21 %. Der First-Pass-Effekt von UDCA beträgt 50 bis 75 %. Die Aufnahme in die Leber ist teilweise Carrier-vermittelt und natriumabhängig (75).

Die Verteilung von peroral verabreichter UDCA ist auf den enterohepatischen Kreislauf begrenzt. Eine rasche Resorption und effiziente Aufnahme der UDCA in die Leber sind die Vorbedingungen, um optimale therapeutische Effekte mit UDCA zu erzielen (76). Die Ausscheidung von UDCA erfolgt entweder unverändert oder nach bakterieller Metabolisierung zu 7-Keto-Lithocholsäure oder Lithocholsäure über die Fäzes. Lithocholsäure ist hepatotoxisch und zeigte im Tierversuch Leberparenchymschäden. Beim Menschen wird sie jedoch nur zu einem kleinen Teil resorbiert, in der Leber sulfatiert und somit detoxifiziert, biliär und schließlich über die Fäzes ausgeschieden. Die Ausscheidung von UDCA über den Urin ist vernachlässigbar gering (77). Die Halbwertszeit der UDCA beträgt 3,5-5,8 Tage (78).

Nachdem man eine Beziehung zwischen der Hydrophobie von Gallensäuren und deren Hepatotoxizität sowie verbesserte Werte der Serumtransaminasen bei mehreren Patienten mit Gallensteinen und chronischer Hepatitis durch die Gabe von UDCA entdeckt hatte, wurde in zahlreichen klinischen Studien die Wirksamkeit dieser hydrophilen Gallensäure in der Therapie verschiedener chronischer Lebererkrankungen getestet. Es zeigten sich biochemische und klinische Verbesserungen sowie eine verzögerte Progression der primären biliären Zirrhose (79, 80).

Anfangs nahm man an, daß choleretische Eigenschaften der UDCA in Kombination mit ihrer Fähigkeit, das hydrophobe/hydrophile Gleichgewicht des Gallensäuren-pools beeinflussen zu können, den Wirkmechanismus von UDCA ausmachen (81). In den letzten Jahren hat man jedoch festgestellt, daß UDCA direkte Effekte auf zellulärer und molekularer Ebene ausübt. Dazu gehören beispielsweise Interaktionen mit Zellmembranen (82), Beeinflussung zellulärer Signaltransduktion (83, 84) und zahlreiche immunmodulatorische Effekte (85).

Die Gallenstein auflösende Eigenschaft der UDCA konnte erstmals Berichten aus Japan und Europa entnommen werden. Aus diesen Berichten ging auch hervor, daß UDCA keine hepatotoxischen Eigenschaften besitzt (71). 1985 veröffentlichte Leuschner seine Beobachtungen im Rahmen einer Pilotstudie, daß UDCA nicht nur zur Auflösung von Gallensteinen beitragen kann, sondern auch zu einer verbesserten Leberfunktion bei Patienten mit chronischer, aktiver Hepatitis führt (86). Diese ersten Berichte gaben den Anstoß für weitere Studien bezüglich der Verwendung von UDCA hauptsächlich bei chronischen cholestatischen Erkrankungen.

Durch hohe hepatische Konzentrationen an toxischen Gallensäuren, beispielsweise während einer Cholestase, kann es zu Nekrose, Apoptose, Fibrose und letztendlich zur Leberzirrhose kommen. Erfolgt eine kontinuierliche orale Therapie mit UDCA in einer Dosierung von 13-15 mg/kg/Tag, wird UDCA zur vorherrschenden Gallensäure im Serum und beträgt bis zu 60 % der gesamten Gallensäuren im Serum, 30 % in der Leber und 30-40 % in der Galle, wo sie stärker hydrophobe und dadurch toxische endogene Gallensäuren ersetzt (87-91). Die Leber und periphere Gewebe sind somit während einer Therapie mit UDCA einer wesentlich geringeren Konzentration endogener Gallensäuren, aber einer höheren Konzentration von UDCA ausgesetzt. Untersucht wurde die Kinetik von endogenen Gallensäuren sowie ihre Konzentrationen im Serum unter der Therapie mit UDCA meist bei Patienten mit primärer biliärer Zirrhose (PBC) oder primärer sklerosierender Cholangitis (PSC). Während die Konzentration an sekundären Gallensäuren durch eine Therapie mit UDCA meist unverändert blieb, kommt es zu einer Reduktion der primären Gallensäuren Cholsäure und Chenodesoxycholsäure. Grund für die Abnahme der Konzentration der primären Gallensäuren ist möglicherweise eine Stimulation der Exkretion hepatozellulärer Gallensäuren (73) sowie die Inhibition der intestinalen Resorption von Gallensäuren (92, 93). Jedoch war in verschiedenen Studien die Reduktion der Konzentration der primären Gallensäuren nach Applikation von UDCA bei an primärer biliärer Zirrhose bzw. an primärer sklerosierender Cholangitis erkrankten Patienten nicht signifikant (71).

Im Tierversuch konnte gezeigt werden, daß die Verabreichung hydrophober Gallensäuren, wie beispielsweise Lithocholsäure, als Auslöser von Leberzirrhose fungiert und ihr Konjugat Taurolithocholsäure eine starke cholestatische Wirkung besitzt. Ursache dafür ist zum einen die schädigende Wirkung der Gallensäuren auf Biomembranen zum anderen ihre zu Nekrose und Apoptose führenden Eigenschaften (73, 94). Durch die Gabe von UDCA können Hepatozyten und Epithelzellen der Gallengänge vor Nekrose und Apoptose geschützt werden. Diese protektiven Eigenschaften hängen vermutlich mit der membranstabilisierenden und antiapoptotischen Wirkung der UDCA zusammen. In verschiedenen Experimenten an Biomembranen, Erythrocyten und kultivierten Leberzellen von Ratte und Mensch wurde die protektive Wirkung von UDCA im millimolaren Konzentrationsbereich gegenüber den schädigenden Wirkungen hydrophober Gallensäuren festgestellt (82, 95, 96). Diese zytoprotektive Wirkung der UDCA gegenüber Leberzellen scheint ein spezifischer Schutz gegen Schädigungen durch Gallensäuren zu sein, da UDCA keinen Schutzeffekt gegenüber anderen zellschädigenden Substanzen gezeigt hat (73). Jedoch ist zu beachten, daß in diesen Experimenten eine unphysiologisch hohe Konzentration an UDCA eingesetzt wurde. Eine derart hohe Konzentration wird in der systemischen Zirkulation unter therapeutischen Bedingungen nicht erreicht, sondern ist lediglich in den Gallengängen zu finden. In anderen Studien, die zur Untersuchung der zytoprotektiven Eigenschaften von UDCA durchgeführt wurden, kam man zu dem Ergebnis, daß die membranstabilisierenden Eigenschaften der UDCA eher auf ihre Fähigkeit zur Bildung von gemischten Mizellen mit Phospholipiden zurückzuführen ist, als auf direkte Wechselwirkungen mit Membranen (97, 98). Aufgrund der relativ hohen Konzentrationen an hydrophoben Gallensäuren, die in den Gallengängen vorherrschen, spielen die protektiven Effekte der UDCA gegenüber den Epithelzellen der Gallengänge auch nur dort eine wesentliche Rolle.

Vermutlich tragen auch immunmodulatorische Effekte zu der Wirkung von UDCA bei. Unter cholestatischen Bedingungen ist die Expression von MHC-1-Molekülen in Hepatozyten erhöht, was diese Zellen möglicherweise für einen autoimmunen Angriff durch zytotoxische T-Lymphozyten anfällig macht. Die Behandlung mit UDCA führt zu einer Down-Regulation der Expression von MHC-1-Molekülen bei primärer biliärer Zirrhose und primärer sklerosierender Cholangitis (99, 100).

Außerdem wurden in verschiedenen Studien immunsuppressive Eigenschaften der UDCA festgestellt (101, 102). Auch antiinflammatorische und zytoprotektive Wirkungen durch Hemmung der Induktion der NO-Synthase werden der UDCA zugeschrieben (103).

Die Mobilisierung von potentiell toxischen Gallenbestandteilen, die bei einer cholestatischen Erkrankung in der Leber zurückgehalten werden sowie im Serum von betroffenen Patienten zu finden sind, könnte ebenfalls zu den nützlichen Eigenschaften der UDCA gezählt werden. UDCA führt zu einer Stimulation der Gallensekretion an isolierten Hepatozyten (104), bei Patienten mit PBC und PSC (105, 106) sowie bei Patienten mit zystischer Fibrose (107). Gleichermäßen wird durch die Behandlung mit UDCA eine Reduktion von endogenen Gallensäuren und Bilirubin bei PBC und PSC im Serum erreicht (105, 106). Durch den Einsatz von UDCA kann die Fähigkeit zur hepatobiliären Exkretion der Leber wieder hergestellt werden. Außerdem kommt es unter der Therapie mit UDCA möglicherweise zu einer Stimulation der Expression von Transportproteinen, die in einer Cholestase downreguliert sind (108). Dazu gehört beispielsweise der Cl-/HCO₃-Anionenaustauscher (AE2), dessen Expression bei Patienten mit PBC reduziert ist, dessen Aktivität jedoch für die hepatozelluläre Gallensekretion von Bedeutung ist (109). Weitere Studien werden notwendig sein, um herauszufinden, ob UDCA die Expression weiterer hepatobiliärer Transportproteine für Gallensäuren und auch Bilirubin stimuliert.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Cyclohexan	Merck, Darmstadt
Pyridin	Merck, Darmstadt
1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan	Merck, Darmstadt
Chlortrimethylsilan	Merck, Darmstadt
Diethylether	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
2,2-Dimethoxypropan	Merck, Darmstadt
Dichlormethan	Merck, Darmstadt
Aceton	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid 0,1 mol/l – 0,1 N Lsg.	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Ethanol	Merck, Darmstadt
5-alpha-Cholestan	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
26,26,26,27,27,27- ² H ₆ -Cholesterin	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg
Cholesterin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2,2,3,4,4,6- ² H ₆ -Sitosterin/	Sugaris GmbH, Münster
2,2,3,4,4,6- ² H ₆ -Campesterin (ca. 55 %/45 %)	
Sitosterin/Campesterin	Raisio Life Sciences, Raisio, Finnland
5,6,22,23- ² H ₄ -Sitostanol	Synthese Dr. H. Brzezinka
Ursodesoxycholsäure	Dr. Falk Pharma GmbH, Freiburg
2,2,4,4- ² H ₄ -Ursodesoxycholsäure	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg
Coprostanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
26,26,26,27,27,27- ² H ₆ -Coprostanol	Eigensynthese
Coprostanon	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
26,26,26,27,27,27- ² H ₆ -Coprostanon	Eigensynthese
2,2,4,6,6- ² H ₅ -Methyl-/Ethylcoprostanon	Eigensynthese
2,2,4,6,6- ² H ₅ -Methyl-/Ethylcoprostanol	Eigensynthese

Platin/Aktivkohle (10 % Pt)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Aluminium-tert.-butylat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Benzol	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Dichlormethan	Merck, Darmstadt
Platinasbest (15 % Pt)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
Natriummethylat	Synthese Dr. H. Brzezinka
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm)	Merck, Darmstadt
Methanol-d ₁	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
D ₂ O	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumsulfat wasserfrei	Merck, Darmstadt
Palladium/Aktivkohle (10 % Pd)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Wasserstoff	Linde, Höllriegelskreuth
Livio [®] Vitamin-Pflanzenöl	Unilever Bestfoods Deutschland GmbH, Hamburg

Alle Chemikalien waren analysenrein (p.a.).

3.1.2 Synthesen

Für die nachfolgenden Kapitel wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit folgende Abkürzungen verwendet:

d ₆ -Campesterin	2,2,3,4,4,6- ² H ₆ -Campesterin
d ₆ -Δ ⁴ -Cholesten-3-on	26,26,26,27,27,27- ² H ₆ -Δ ⁴ -Cholesten-3-on
d ₆ -Cholesterin	26,26,26,27,27,27- ² H ₆ -Cholesterin
d ₆ -Coprostanol	26,26,26,27,27,27- ² H ₆ -Coprostanol
d ₆ -Coprostanon	26,26,26,27,27,27- ² H ₆ -Coprostanon
d ₆ -Epicoprostanol	26,26,26,27,27,27- ² H ₆ -Epicoprostanol
d ₅ -Epiethylcoprostanol	2,2,4,6,6- ² H ₅ -Epiethylcoprostanol
d ₅ -Epimethylcoprostanol	2,2,4,6,6- ² H ₅ -Epimethylcoprostanol
d ₅ -Ethylcoprostanol	2,2,4,6,6- ² H ₅ -Ethylcoprostanol

d_6 -Ethylcoprostanon	$2,2,4,6,6\text{-}^2\text{H}_5$ -Ethylcoprostanon
d_5 -Methylcoprostanol	$2,2,4,6,6\text{-}^2\text{H}_5$ -Methylcoprostanol
d_5 -Methylcoprostanon	$2,2,4,6,6\text{-}^2\text{H}_5$ -Methylcoprostanon
d_6 -Sitosterin	$2,2,3,4,4,6\text{-}^2\text{H}_6$ -Sitosterin
d_4 -Sitostanol	$5,6,22,23\text{-}^2\text{H}_4$ -Sitostanol
$2,2,4,4\text{-}^2\text{H}_4$ -Ursodesoxycholsäure	d_4 -Ursodesoxycholsäure

3.1.2.1 Synthese von d_6 -Coprostanon und d_6 -Coprostanol

Als Ausgangssubstanz für die Synthese von d_6 -Coprostanon wurden 2 g d_6 -Cholesterin verwendet. 0,8 g Aluminium-tert.-butylat wurden in wasserfreiem Benzol unter Erwärmen gelöst, das in wasserfreiem Aceton gelöste d_6 -Cholesterin zugegeben und anschließend 10 Stunden unter Rückfluß gekocht (110). Zur Reinigung des Syntheseproduktes wurden 100 ml 10 %-ige Schwefelsäure zugegeben. Die Benzolphase wurde anschließend mit Aqua dest. ausgeschüttelt und über Natriumsulfat getrocknet.

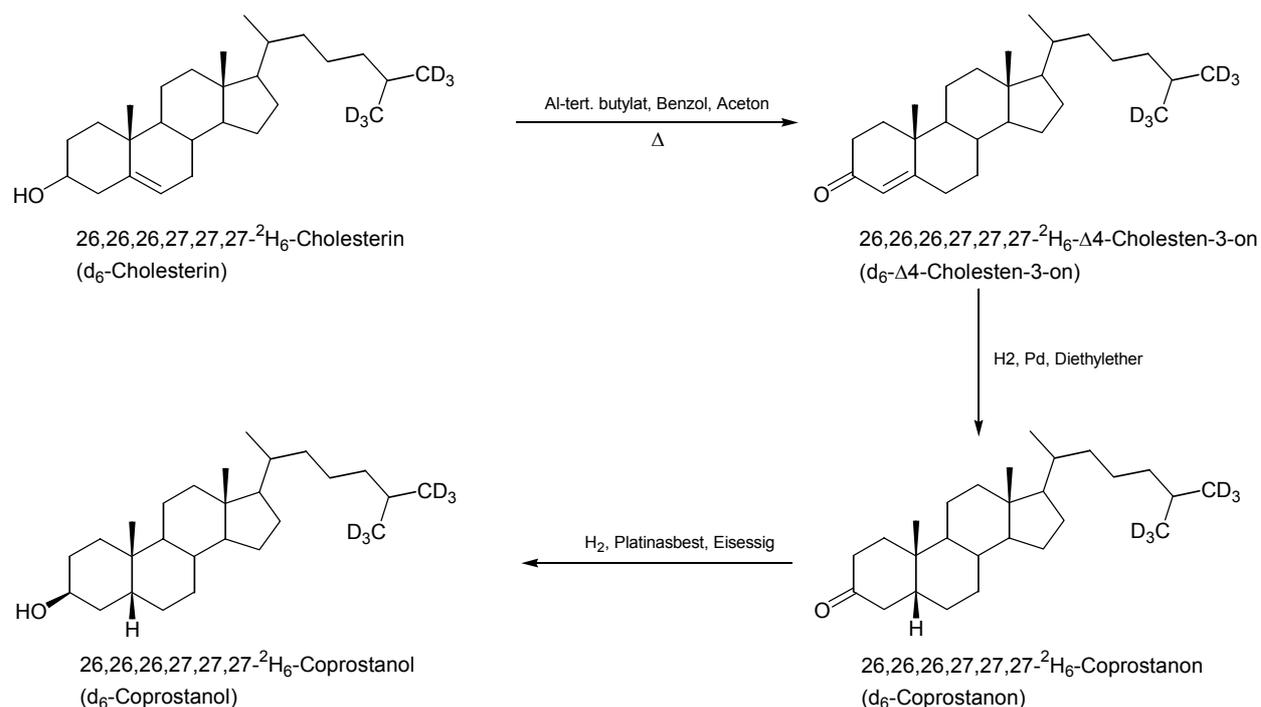


Abbildung 3.1: Synthese von d_6 -Coprostanon und d_6 -Coprostanol

Bei dem Reaktionsprodukt handelte es sich um ein Gemisch bestehend aus dem Ausgangsprodukt und $d_6\text{-}\Delta^4$ -Cholesten-3-on (Oppenauer-Oxidationsprodukt). Die Aufreinigung des Syntheseproduktes wurde mittels Säulenchromatographie durchgeführt. Als feste Phase wurde Kieselgel verwendet, die mobile Phase bestand aus einem Gemisch aus Cyclohexan mit einem steigenden Anteil an Dichlormethan. Begonnen wurde mit 16 l

Dichlormethan/Cyclohexan (10/90), dann wurde der Dichlormethan-Anteil in weiteren 16 l auf 15 % und schließlich in weiteren 16 l auf 20 % erhöht. Die d_6 - Δ^4 -Cholesten-3-on enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, in Diethylether gelöst und für die anschließende Hydrierung eingesetzt. Als Katalysator für die Hydrierung wurden 100 mg Palladium auf Aktivkohle (10 % Palladium) zugegeben und mit Wasserstoff bei einem Druck von ca. 0,8 bar und Ausschluß von Luft ca. 3 Stunden hydriert. Das Reaktionsprodukt bestand aus einem Gemisch von d_6 -Coprostanon und d_6 -Epicoprostanol. Mittels Säulenchromatographie mit Kieselgel als stationärer Phase und einem Gemisch aus 10 % Ethylacetat und 90 % Cyclohexan als mobiler Phase sollte das d_6 -Epicoprostanol abgetrennt werden, jedoch war dies aufgrund der sehr eng beieinander liegenden Retentionszeiten der beiden Substanzen nicht möglich. Daher wurde für die anschließende Hydrierung das Gemisch aus beiden verwendet.

Zur Hydrierung wurde das Substanzgemisch in wenig Cyclohexan gelöst und 100 ml Eisessig sowie 250 mg Platinasbest (15 % Pt) als Katalysator zugegeben. Bei einem H_2 -Druck von 2,5 bar wurde zwei Stunden unter Ausschluß von Luft hydriert (12). Das Reaktionsprodukt bestand aus einem Gemisch von d_6 -Coprostanol und d_6 -Epicoprostanol sowie Nebenprodukten der Reaktion. Die Abtrennung der Nebenprodukte erfolgte mittels Säulenchromatographie mit Kieselgel als stationärer Phase und einer Mischung von 10 % Ethylacetat und 90 % Cyclohexan als mobiler Phase (Reaktionsschema siehe Abbildung 3.1).

3.1.2.2 Synthese von d_5 -Ethylcoprostanon, d_5 -Methylcoprostanon, d_5 -Ethylcoprostanol und d_5 -Methylcoprostanol

Als Ausgangssubstanz für die Synthese wurden 4 g Sitosterin/Campesterin (ca. 55 %/45 %) verwendet. Es wurde von unmarkiertem Material ausgegangen, da bei der Oppenauer-Oxidation die Deuterium-Atome an den Positionen 2, 4 und 6 gegen H ausgetauscht werden. 2 g Aluminium-tert.-butylat wurden in 50 ml wasserfreiem Benzol unter Erwärmen gelöst und zu dem in 290 ml Aceton gelösten Sitosterin/Campesterin gegeben und anschließend 10 Stunden unter Rückfluß gekocht (110). Zur Reinigung des Syntheseproduktes wurden 100 ml 10%ige Schwefelsäure zugegeben. Die Benzolphase wurde anschließend mit Aqua dest. ausgeschüttelt und über Natriumsulfat getrocknet.

Bei dem Reaktionsprodukt handelte es sich um ein Gemisch bestehend aus den Ausgangsprodukten und einem Sitostenon/Campestenon-Gemisch (Oppenauer-Oxidationsprodukte). Die Aufreinigung der Syntheseprodukte wurde mittels

Säulenchromatographie durchgeführt. Als feste Phase wurde Kieselgel verwendet, die mobile Phase bestand aus einem Gemisch aus Cyclohexan mit einem steigenden Anteil an Dichlormethan. Begonnen wurde mit 16 l Dichlormethan/Cyclohexan (10/90), dann wurde der Dichlormethan-Anteil in weiteren 16 l auf 15 % und schließlich in weiteren 16 l auf 20 % erhöht. Die Sitostenon bzw. Campestenon enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und durch Zugabe von NaOCH_3 , CH_3OD und D_2O an den Positionen 2, 4 und 6 einem H/D-Austausch unterzogen. Die Reaktionsprodukte wurden in Diethylether gelöst und für die anschließende Hydrierung eingesetzt. Als Katalysator für die Hydrierung wurden 200 mg Palladium auf Aktivkohle (10 % Palladium) zugegeben und mit Wasserstoff bei einem Druck von 0,8 bar und unter Ausschluß von Luft ca. 3 Stunden hydriert. Das Reaktionsprodukt bestand aus einem Gemisch von d_5 -Methylcoprostanon/ d_5 -Ethylcoprostanon und d_5 -Epimethyl-/ d_5 -Epiethylcoprostanol. Mittels Säulenchromatographie mit Kieselgel als stationärer Phase und einem Gemisch aus 10 % Ethylacetat und 90 % Cyclohexan als mobiler Phase sollte das Gemisch aus d_5 -Epimethyl-/ d_5 -Epiethylcoprostanol abgetrennt werden, jedoch war dies aufgrund der sehr eng beieinander liegenden Retentionszeiten der beiden Substanzen nicht möglich. Daher wurde für die anschließende Hydrierung das Substanzgemisch verwendet. Zur Hydrierung wurde das Substanzgemisch in Cyclohexan gelöst und 200 ml Eisessig sowie 500 mg Platinasbest (15 % Platin) als Katalysator zugegeben. Bei einem H_2 -Druck von 2,5 bar wurde zwei Stunden unter Ausschluß von Luft hydriert (12). Das Reaktionsprodukt bestand aus einem Gemisch von d_5 -Methylcoprostanol/ d_5 -Ethylcoprostanol und d_5 -Epimethyl-/ d_5 -Epiethylcoprostanol sowie Nebenprodukten der Reaktion. Die Abtrennung der Nebenprodukte erfolgte mittels Säulenchromatographie mit Kieselgel als stationärer Phase und einer Mischung von 10 % Ethylacetat und 90 % Cyclohexan als mobiler Phase (Reaktionsschema siehe Abbildung 3.2).

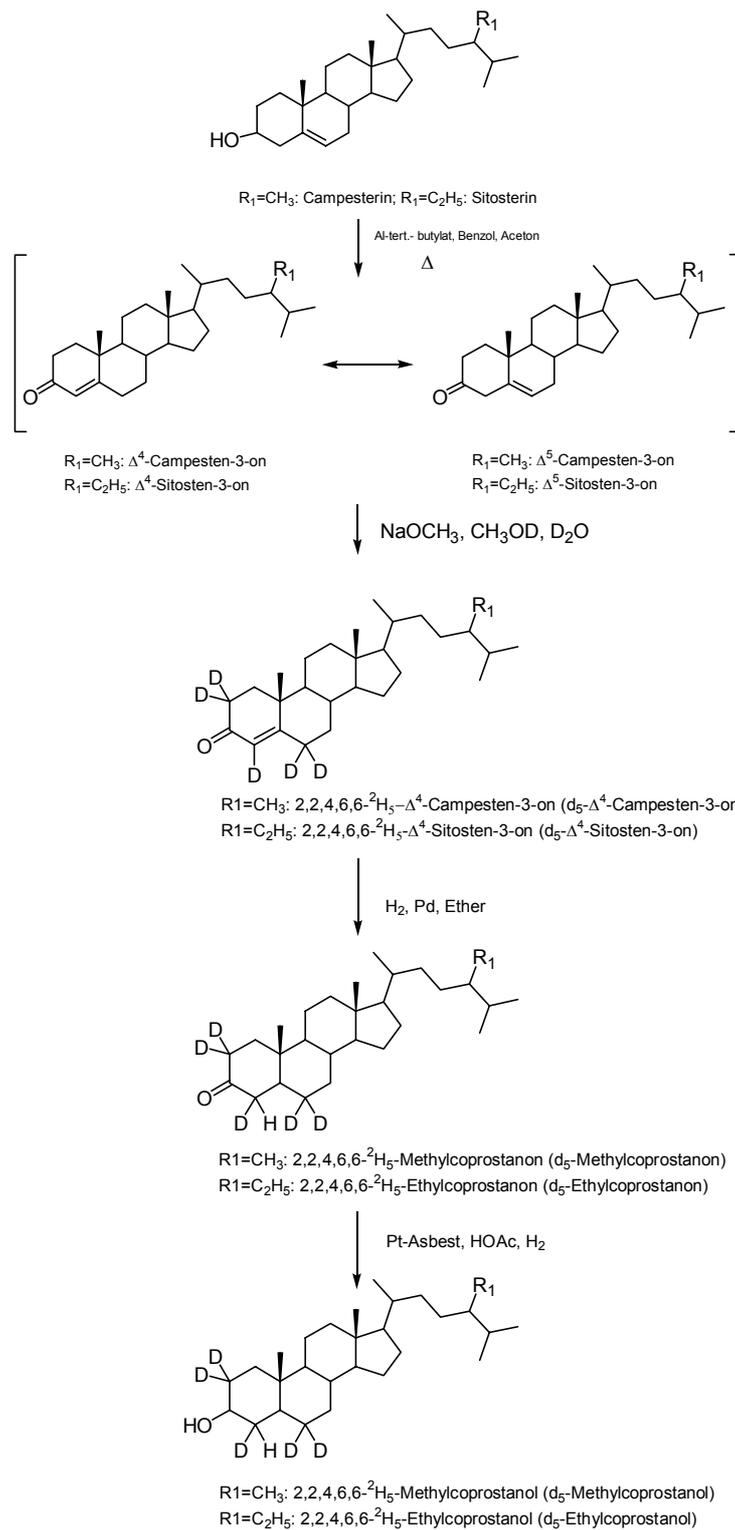


Abbildung 3.2: Synthese von d_5 -Ethylcoprostanon, d_5 -Methylcoprostanon, d_5 -Ethylcoprostanol und d_5 -Methylcoprostanol

3.1.3 Stammlösungen

Die zur Herstellung der Stammlösungen verwendeten Substanzen wurden in Cyclohexan bzw. Methanol gelöst. Davon wurden jeweils 1:10-Verdünnungen hergestellt. Da es sich bei den Substanzen zum Teil um Gemische der aus den Synthesen erhaltenen Produkte handelte, wurde der genaue Gehalt der 1:10 verdünnten Lösungen gaschromatographisch bestimmt. Die Referenzlösung, mittels derer die gaschromatographische Quantifizierung der neutralen Sterole erfolgte, war eine Lösung von 5 α -Cholestan in Cyclohexan mit der Konzentration 1 mg/ml.

Exakte Konzentrationen der Stammlösungen:

- 0,104 μg d₆-Cholesterin/ μl Cyclohexan
- 0,095 μg d₆-Coprostanon/ μl Cyclohexan
- 0,076 μg d₆-Coprostanol/ μl Cyclohexan
- 0,093 μg d₆-Sitosterin/ μl Cyclohexan
- 0,058 μg d₅-Ehylcoprostanon/ μl Cyclohexan
- 0,182 μg d₅-Ethylcoprostanol/ μl Cyclohexan
- 0,078 μg d₆-Campesterin/ μl Cyclohexan
- 0,054 μg d₅-Methylcoprostanon/ μl Cyclohexan
- 0,136 μg d₅-Methylcoprostanol/ μl Cyclohexan
- 0,095 μg d₄-Sitostanol/ μl Methanol

Für die UDCA- bzw. d₄-UDCA-Stammlösung wurde jeweils 10 mg Substanz in 10 ml 0,1N NaOH-Lösung gelöst. Davon wurde mit Aqua dest. eine 1:10-Verdünnung hergestellt. Die Referenzlösung, mittels derer die gaschromatographische Quantifizierung der sauren Sterole erfolgte, war eine Hyodesoxycholsäure-Lösung der Konzentration 0,1 mg/ml Lösungsmittel.

- 0,059 μg Ursodesoxycholsäure/ μl 0,1N NaOH
- 0,051 μg d₄-Ursodesoxycholsäure/ μl 0,1N NaOH

3.2 Analytische Methoden

3.2.1 Theoretische Grundlagen

3.2.1.1 Gaschromatographie

In der Gaschromatographie werden Substanzen in gasförmigem Zustand mittels einer gasförmigen mobilen Phase, dem Trägergas, und einer flüssigen oder festen stationären Phase voneinander getrennt. Schwerflüchtige Verbindungen lassen sich daher mit dieser chromatographischen Methode nur relativ schlecht analysieren. Um eine bessere Flüchtigkeit der zu trennenden Substanzen zu erreichen, kann eine Derivatisierung vorgenommen werden. Handelt es sich um flüssige stationäre Phasen beruht die Trennung eines Substanzgemisches auf Verteilungsvorgängen zwischen der gasförmigen mobilen Phase und der flüssigen stationären Phase. Wird eine feste stationäre Phase verwendet, erfolgt eine Trennung aufgrund von Adsorptionsvorgängen. Abbildung 3.3 zeigt den schematischen Aufbau eines Gaschromatographen. Die Verdampfungs- und Trenntemperatur können durch genaues Temperieren von Injektor, Säule und Detektor an die jeweiligen Eigenschaften der zu trennenden Substanzen angepaßt werden.

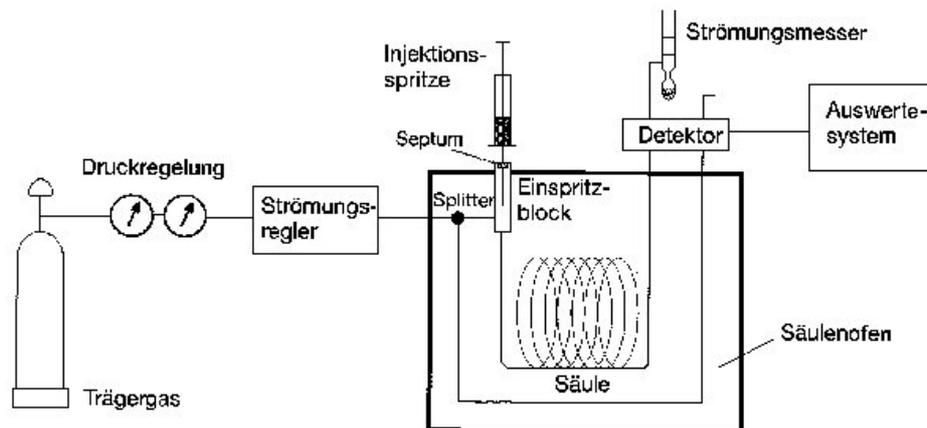


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau eines Gaschromatographen

Mit Hilfe des Injektors werden flüssige Substanzen in den gasförmigen Zustand überführt, anschließend wird das Gemisch durch das Trägergas auf die Säule transportiert. Bei den Säulen, die in der Gaschromatographie zur Anwendung kommen, handelt es sich um Kapillarsäulen. Die Trennleistung einer Säule ist bei gleichem Packungsmaterial um so

größer, je länger die Säule ist. Kapillarsäulen besitzen eine Säulenfüllung, die sich nicht über den kompletten Säulenquerschnitt erstreckt, sondern weisen einen Hohlraum im Innern der Säule auf, wodurch der Widerstand, der dem Trägergas entgegengesetzt wird, verringert wird. Dadurch wird eine Säulenlänge von 15-150 m ermöglicht. Die Wand der Kapillaren besteht meist aus synthetischem Quarz, das auf der Innenseite mit der flüssigen stationären Phase beschichtet wurde. Der Innendurchmesser beträgt gewöhnlich 0,2-0,75 mm, die Schichtdicken der flüssigen stationären Phase betragen zwischen 0,1 und 5 μm . Nachdem das Substanzgemisch beim Passieren der Säule aufgetrennt wurde, treffen die einzelnen Komponenten auf den Detektor und werden von diesem registriert.

Ein für die Gaschromatographie geeigneter Detektor ist der Flammenionisationsdetektor (FID). Hier erfolgt im Detektor ein Vermischen der Substanzen mit Knallgas. Dieses Gemisch wird nach dem Austritt aus einer Düse verbrannt. Die dabei entstehenden Ionen erzeugen einen Stromfluß zwischen zwei Elektroden, an die Spannung angelegt wurde, und es entsteht ein Signal. Beim FID handelt es sich, da eine Verbrennung der zu analysierenden Substanzen stattfindet, um einen destruktiven Detektor. Er ist ein gut geeigneter Detektor für organische Substanzen, besitzt eine hohe Empfindlichkeit und einen großen linearen Bereich, wodurch er vor allem für quantitative Bestimmungen einsetzbar ist. Bei diesem Detektor handelt es sich um einen Stoffmengendetektor, d.h., daß das erzeugte Signal proportional zur umgesetzten Stoffmenge ist.

3.2.1.2 Das Massenspektrometer als Detektor in der Gaschromatographie

Eine andere Möglichkeit der Detektion der voneinander getrennten Komponenten ist die Verwendung eines Massenspektrometers. Dabei wird der Gaschromatograph mit einem Massenspektrometer gekoppelt. Durch das Massenspektrometer erreicht man für die chromatographisch aufgetrennten Substanzen einen sehr selektiven und empfindlichen Nachweis. Zusätzlich zur Retentionszeit können die Substanzen durch ihr jeweiliges Massenspektrum charakterisiert und identifiziert werden. Im Massenspektrometer erfolgt die Ionisierung der Substanzen. Neben der Elektronenstoßionisation (EI), welche für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen angewandt wurde, gibt es auch die Chemische Ionisation (CI), eine sog. weiche Ionisationsmethode, bei der die Moleküle sehr schonend (energiearm) ionisiert werden, damit das Molekülion besser registriert werden kann. Bei der Elektronenstoßionisation wird senkrecht zum Molekülstrom der Probe ein von einer Glühkathode erzeugter Elektronenstrahl mit einer Energie von 70 eV zu einer Anode hin beschleunigt. Durch Wechselwirkung der Probenmoleküle mit den Elektronen können

entweder positive Ionen unter Abspaltung eines Elektrons entstehen, oder es kommt durch Einbau eines Elektrons in ein unbesetztes Orbital zur Bildung eines negativen Ions. Daneben können noch weitere Prozesse wie die Entfernung mehrerer Elektronen, Ionenpaarbildung oder Ionisierung verbunden mit einer Dissoziation ablaufen. Der wichtigste Vorgang ist jedoch die Bildung positiver Molekülionen ($AB \rightarrow AB^+ + e^-$). Durch Energieüberschuß im Molekül kommt es zu Rotationen und Schwingungen von Molekülteilen und schließlich zur Fragmentierung. Das Ausmaß der Fragmentierung ist abhängig von der Fähigkeit des Fragmentions zur Stabilisierung. Die Fragmentierungsreaktionen reduzieren die Anzahl von M^+ -Ionen und führen zur Bildung von stabilen Fragmenten. Nach der Ionisierung werden die Ionen zunächst aus der Ionisierungsregion der Ionenquelle entfernt. Anschließend erfolgt über ein Potentialgefälle eine Beschleunigung der Ionen. Durch elektrostatische Felder entsteht ein gebündelter Ionenstrahl, von dem ein schmaler Streifen durch einen Austrittsspalt gelangt. Die Geschwindigkeit der einzelnen Ionen ist abhängig von ihrer Masse und Ladung sowie von der Beschleunigungsspannung (111). Die Trennung der Ionen kann je nach Gerät auf verschiedene Arten erfolgen. Eine Möglichkeit ist die Auftrennung mittels eines Quadrupol-Analysators, der bei den Messungen für diese Arbeit angewandt wurde. Der Quadrupol ist aus vier parallel im Quadrat angeordneten Metallstäben aufgebaut. Jeweils zwei der Metallstäbe sind über Kreuz leitend miteinander verbunden (Abbildung 3.4). Die Trennung der Ionen erfolgt durch Ablenkung im elektrischen Feld. Dazu wird an zwei gegenüber liegenden Stäben eine Wechselspannung angelegt, wodurch abwechselnd positive und negative Felder aufgebaut werden. Das Maß der seitlichen Ablenkung der durch den Quadrupol fliegenden Ionen ist abhängig von der Masse der Ionen, von der angelegten Spannung und der Frequenz. Zusätzlich zu der Wechselspannung (HF) wird nun noch eine positive Gleichspannung angelegt, die eine generelle Ablenkung der Ionen zur Mittelachse hin erzeugt. Sind die Ionen schwer, dann überwiegt der Einfluß der Gleichspannung (U), d.h., sie sind in der Lage, das Stabsystem zu passieren. Leichte Ionen hingegen schwingen stark aus, treffen auf die Stäbe und werden dort entladen. An die beiden anderen Stäbe wird eine negative Gleichspannung und eine zeitlich versetzte Wechselspannung angelegt. Aufgrund der negativen Gleichspannung werden Ionen höherer Masse zu den Stäben hin abgelenkt, die Ionen mit niedriger Masse können mittels des positiven Feldes der Wechselspannung zur Mitte des Stabsystems gelangen. Das heißt, daß durch das eine Stäbepaar niedrige Massen und durch das andere Stäbepaar hohe Massen gesperrt werden. Indem man Gleich- und Wechselspannung in geeigneter Weise abstimmt, können jeweils nur Ionen einer bestimmten Masse die Stäbe passieren.

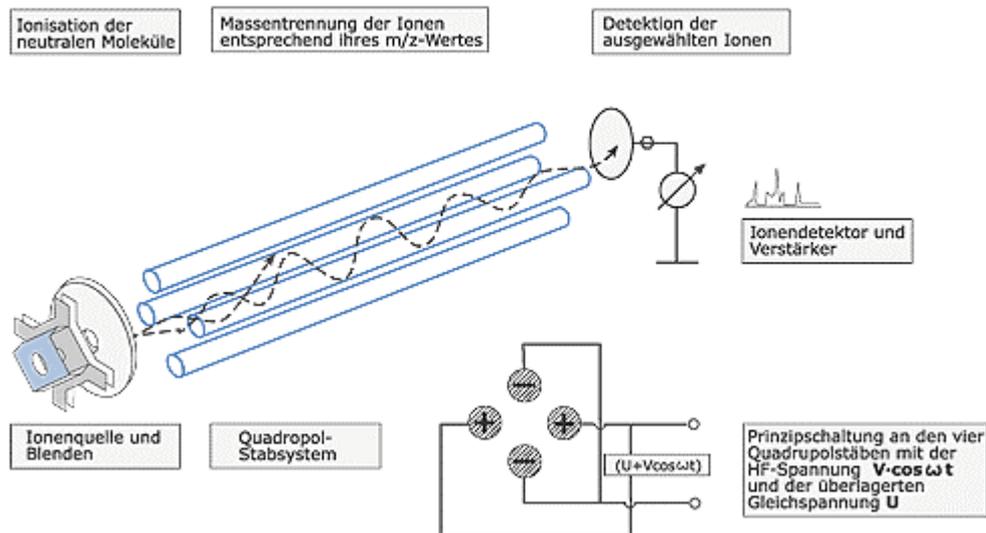


Abbildung 3.4: Schematischer Aufbau eines Quadrupol-Analysators

Da das Interesse bei der Ausgabe der Meßdaten nur bestimmten Komponenten der aufgearbeiteten Probe gilt, wird die Messung als „single ion detection“ (SID) oder „single ion monitoring“ (SIM) durchgeführt. Das heißt, es werden lediglich die Ionenströme von zuvor ausgewählten Massen registriert, wodurch die Empfindlichkeit der Messung stark verbessert wird. Die Registrierung der Ionen erfolgt mit Hilfe eines Sekundärelektronenvervielfachers (SEV). Dabei werden durch jedes auftreffende Ion mehrere Elektronen aus einer Dynode herausgeschlagen. Diese werden zu einer weiteren Dynode hin beschleunigt und schlagen dort erneut Elektronen heraus usw. Dies führt zu einer Vervielfachung der Elektronen und zu einer Verstärkung des elektrischen Signals, das der Menge der zu analysierenden Ionen proportional ist. Die Darstellung, Verarbeitung und Auswertung der Daten erfolgt über ein Rechnersystem. Dieses System ermöglicht die Aufnahme und Speicherung der Rohdaten und deren Verarbeitung. Außerdem wird die gesamte Steuerung des Gerätes über dieses Rechnersystem ausgeführt.

3.2.2 Bestimmung neutraler und saurer Sterole

3.2.2.1 Quantifizierung mittels Gaschromatographie

Zur Überprüfung des Gehalts der hergestellten Stammlösungen wurde eine gaschromatographische Messung durchgeführt. Dazu wurde eine definierte Menge eines

internen Standards bekannter Konzentration zusammen mit einer definierten Menge der zu analysierenden Stammlösung in ein Glasvial pipettiert, bei 65 °C unter Stickstoffbegasung eingedampft, in einem geeigneten Volumen Lösungsmittel aufgenommen und durch Zugabe von TMS-Reagenz eine Stunde bei 65 °C derivatisiert. Durch anschließende gaschromatographische Messung konnte über die Signalfläche und die bekannte Menge des internen Standards sowie der Signalfläche der zu quantifizierenden Substanz die Menge des Analyten ermittelt werden. Die Detektion erfolgte mittels FID.

Für die neutralen Sterole wurde eine Lösung von 5-alpha-Cholestan, für die sauren Sterole eine Lösung von Hyodesoxycholsäure als interner Standard verwendet.

Für die gaschromatographische Bestimmung neutraler und saurer Sterole wurden folgende Geräte, Einstellungen und folgendes Zubehör verwendet:

GC:	HP 6890 Hewlett Packard, Waldbronn
Säule:	DB-XLB; J&W Scientific (Folsom, California, USA)
	Länge: 30 m
	Durchmesser: 0,25 mm
	Filmdicke: 0,25 µm
Mobile Phase:	Wasserstoff; 1,1 ml/min
Injektor:	7683 Hewlett Packard, Waldbronn
	Modus: splitlos
	Injektionsvolumen: 2 µl
	Injektortemperatur: 280 °C
Ofen:	6890 Hewlett Packard
	Anfangstemperatur: 150 °C, 3 min
	Endtemperatur: 290 °C
	Heizrate: 30 °C/min
	Dauer: 22 min
Detektor:	6890 Hewlett Packard
	Wasserstofffluß: 30 ml/min
	Luftfluß: 400 ml/min
Software:	Rev. A. 08.03 [847], Agilent Technologies 1990-2000

3.2.2.2 Quantifizierung mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Zur Quantifizierung der verschiedenen Analyten wurden die jeweiligen Signalflächen den Chromatogrammen der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Messungen entnommen. Über eine Kalibrierfunktion konnte mittels des Signal-Flächenverhältnisses von Analyt und internem Standard die Menge der zu analysierenden Substanzen in der Probe ermittelt werden (Beschreibung der Probenaufarbeitung und zugehörige Meßmethodik siehe Kapitel 3.2.3.1).

3.2.2.3 Interner Standard

Eine Substanz, die als interner Standard eingesetzt wird, sollte bestimmte Voraussetzungen erfüllen:

- Sie darf nicht in der zu untersuchenden Probe enthalten sein.
- Sie muß chemisch stabil sein.
- Sie soll in möglichst hoher Reinheit vorliegen.
- Sie sollte unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen gut abgetrennt werden können.
- Sie sollte möglichst ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften, z.B. Retentionszeit und Löslichkeit, wie der Analyt aufweisen.

Optimal wäre also beispielsweise das Arbeiten mit einem deuterierten internen Standard (Isotopenverdünnungsmethode) mit Steroidgrundgerüst und entsprechender Art und Anzahl funktioneller Gruppen, z.B. 2,2,4,4-²H₄-UDCA, die in dieser Arbeit als interner Standard zur Analyse von UDCA verwendet wurde. Jedoch konnte solch eine Substanz aus Zeit- und Kostengründen für die Analytik deuteriummarkierter neutraler fäkaler Sterole nicht bezogen werden. Statt dessen wurde auf 5 α -Cholestan zurückgegriffen, das in der Literatur häufig als interner Standard in der Sterolanalytik beschrieben wurde.

3.2.3 Analytik zur Bestimmung neutraler fäkaler Sterole

3.2.3.1 Aufarbeitung von Stuhlproben

Für die Aufarbeitung der Stuhlproben wurde auf die Methode von Czubayko et al. (112) zurückgegriffen und in einigen Schritten variiert. Sie wird im folgenden kurz beschrieben:

- Von der abgegebenen Stuhlprobe wurde ein Aliquot von ca. 1 g in ein Kunststoffröhrchen überführt und die 2-fache Menge Aqua dest. zupipettiert. Das Röhrchen wurde 15 sec. auf einem Vortexer geschüttelt und dann bei 2000 U/min. zentrifugiert.
- Anschließend wurde die Probe 1 min mit einem Ultra-Turrax[®] homogenisiert (das Messer des Homogenisators wurde nach jeder Probe gründlich mit Methanol und anschließend mehrere Male mit Aqua dest. gereinigt).
- 200 µl des internen Standards 5-alpha-Cholestan der Konzentration 1 mg/ml Cyclohexan wurden in ein Kunststoffröhrchen pipettiert und bei 65 °C unter Stickstoffbegasung eingedampft. Nach dem Eindampfen wurden 200 µl des Stuhlhomogenats zugegeben.
- Anschließend wurde eine alkalische Hydrolyse durchgeführt. Dazu wurde 1 ml 1 N Natronlauge in 90 %igem Ethanol zugegeben und die Probe bei 67 °C im Schüttelwasserbad 1 h geschüttelt.
- Nach Abkühlen der Probe bei Raumtemperatur wurden 500 µl Aqua dest. zupipettiert und anschließend zweimal mit je 3 ml Cyclohexan extrahiert.
- Die vereinigten Cyclohexanphasen wurden unter Stickstoff bei 65 °C eingedampft.
- Anschließend wurde die Probe mit 1 ml Trimethylsilylchlorid 1 h bei 65 °C silyliert.
- Nach Abdampfen des verbliebenen Silylierungsreagenzes wurde die Probe in 2800 µl Cyclohexan und 200 µl Trimethylsilylchlorid aufgenommen und gaschromatographisch-massenspektrometrisch analysiert.

3.2.3.2 Gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung neutraler fäkaler Sterole

Für die gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung neutraler fäkaler Sterole wurden folgende Geräte, Einstellungen und folgendes Zubehör verwendet:

GC-MS:	Trace GC/MS, Thermo Electron, Dreieich
Säule:	DB-XLB; J&W Scientific (Folsom, California, USA)
	Länge: 30 m
	Durchmesser: 0,25 mm
	Filmdicke: 0,25 µm
Mobile Phase:	Helium

	Fluß: 1 ml/min
Injektor:	AS 2000, Carlo Erba, Mailand
	Modus: splitlos
	Injektionsvolumen: 2 µl
	Injektortemperatur: 270 °C
	Spülflüssigkeit: Cyclohexan
	Spülvorgänge vor Probeninjektion: 2
	Spülvorgänge nach Probeninjektion: 2
	Volumen der Spülflüssigkeit: 5 µl
Ofen:	Trace GC
	1. Temperaturstufe: 170 °C; 3,5 min
	Heizrate: 12 °C/min
	2. Temperaturstufe: 280 °C ; 3 min
	Heizrate: 5 °C/min
	3. Temperaturstufe: 330 °C; 3 min
	Dauer: 21,5 min
Säulenschaltzeiten:	15 min – 25 min Säulenfluß ins MS
Ionisationsmethode:	Elektronenstoß
Detektor:	Trace MS
Software:	Xcalibur™ Version 1.2, Finnigan Corp. 1998-2000

3.2.4 Analytik zur Bestimmung freier UDCA in Plasmaproben

3.2.4.1 Aufarbeitung von Plasmaproben

Für die Aufarbeitung der Plasmaproben wurde folgende Methode erarbeitet und verwendet.

- 3 µg des internen Standards d₄-UDCA (60 µl einer 1:10 verdünnten wäßrig alkalischen Stammlösung) wurden in ein Pyrex-Glasröhrchen pipettiert. Zu dem Standard wurden 100 µl einer 0,1 N wäßrigen Natriumhydroxid-Lösung, 500 µl Plasma und 1000 µl gesättigte Kochsalz-Lösung zugegeben.
- Die lipophilen nicht veresterten neutralen Sterole wurden zweimal mit je 4 ml Cyclohexan extrahiert und verworfen.

- Nach Einstellung des pH-Wertes auf 1-2 durch Zugabe von 50 µl konzentrierter Salzsäure wurden die Gallensäuren zweimal mit je 4 ml Diethylether extrahiert, in ein neues Pyrex-Glasröhrchen überführt und unter Stickstoffbegasung bei 30 °C eingedampft.
- Die Carboxylgruppe wurde durch Zugabe von 10 µl konzentrierter Salzsäure, 2 ml Methanol und 1,5 ml 2,2-Dimethoxypropan bei 60 °C zwei Stunden methyliert.
- Nach Abdampfen der Lösungsmittel erfolgte die Derivatisierung der Hydroxylgruppen der Gallensäuren. Hierzu wurde 1 ml TMS-Reagenz zugegeben und 1 h bei 60 °C derivatisiert.
- Nach Abdampfen der Lösungsmittel wurde die Probe in 100 µl n-Decan aufgenommen und gaschromatographisch-massenspektrometrisch analysiert.

3.2.4.2 Gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung von UDCA in Plasmaproben

Für die gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung von UDCA wurden folgende Geräte, Einstellungen und folgendes Zubehör verwendet:

Säule:	DB-XLB; J&W Scientific (Folsom, California, USA)
	Länge: 30 m
	Durchmesser: 0,25 mm
	Filmdicke: 0,25 µm
Mobile Phase:	Helium
	Fluß: 1 ml/min
Injektor:	AS 2000, CE
	Modus: splitlos
	Injektionsvolumen: 2 µl
	Injektortemperatur: 270 °C
	Spülflüssigkeit: Cyclohexan
	Spülvorgänge vor Probeninjektion: 2
	Spülvorgänge nach Probeninjektion: 2
	Volumen der Spülflüssigkeit: 5 µl
Ofen:	Trace GC
	1. Temperaturstufe: 170 °C; 2,5 min
	Heizrate: 12°C/min

2. Temperaturstufe: 290 °C ; 1 min

Heizrate: 5°C/min

3. Temperaturstufe: 320 °C; 2 min

Dauer: 21,5 min

Säulenschaltzeiten: 17,5 min – 19,5 min Säulenfluß ins MS

Ionisationsmethode: Elektronenstoß

Detektor: Trace MS

3.2.5 Validierung der Meßmethoden

Ziel einer Validierung ist das Erbringen des Nachweises, daß mit einer analytischen Methode eine ganz bestimmte Aufgabe erfüllt werden kann. Das heißt, daß die Methode auf ihre Brauchbarkeit hin überprüft wird. In dieser Arbeit wurde zum einen eine Validierung der Meßmethodik zur Charakterisierung der Cholesterinresorption und zum anderen eine Validierung der Meßmethodik zur Bestimmung freier UDCA in Plasmaproben durchgeführt. Die Durchführung der Validierung richtete sich nach den durch die Food and Drug Administration (FDA) vorgegebenen Empfehlungen (113). Danach muß die Methodvalidierung in der Bioanalytik zeigen, daß eine bestimmte Methode zur Quantifizierung eines Analyten in einer biologischen Matrix, wie beispielsweise Plasma, Serum oder Fäzes, verläßlich und reproduzierbar ist. Die Kriterien, die bei einer solchen Validierung berücksichtigt werden sollen, sind Selektivität, Richtigkeit, Wiederfindung, Linearität der Kalibrierfunktion, Präzision, Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze.

3.2.5.1 Selektivität

Selektivität ist die Fähigkeit einer Methode, verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störung zu erfassen und sie somit zu identifizieren (114).

Durch die Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie ist eine hohe Selektivität der Methode zu erwarten. Bei der Chromatographie werden die zu analysierenden Substanzen voneinander getrennt. Die Kombination mit einem massenselektiven Detektor sorgt zusätzlich zur Identifizierung über die Retentionszeit dafür, daß die zu analysierenden Substanzen über ihre Massen und die Intensitäten der Signale im Massenspektrum erkannt werden können. Aus Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 sind die zu analysierenden Substanzen mit ihrer jeweiligen Retentionszeit in den entsprechenden Zeitfenstern und das für die Messung verwendete Fragmention zu entnehmen.

d₆-Coprostanon konnte im weiteren Verlauf der Validierung nicht berücksichtigt werden, da es aufgrund von Matrixbestandteilen zu einer Überlagerung des Signals des d₆-Coprostanons kam. Auch durch eine Optimierung des Temperaturprogramms konnte das durch Matrixbestandteile bedingte Signal nicht von dem gewünschten Signal getrennt werden. Die Messung eines anderen Fragmentations des d₆-Coprostanons war ebenfalls durch eine Überlagerung von Matrixbestandteilen beeinträchtigt. Außerdem konnte keine eindeutige Quantifizierung des d₆-Coprostanons in Gegenwart des Derivatisierungsreagenz aufgrund von Keto-Enol-Tautomerie durchgeführt werden.

Tabelle 3.1: Fragmentmassen und Retentionszeiten der analysierten neutralen fäkalen Sterole

Zeitfenster	Substanz	Retentionszeit [min]	Meßmasse [m/z]
1 (17.0-18.5 min)	5-alpha-Cholestan	17.96	375
2 (18.5-24.5 min)	d ₆ -Coprostanol	19.79	376
2 (18.5-24.5 min)	d ₆ -Cholesterin	21.06	464
2 (18.5-24.5 min)	d ₆ -Coprostanon	21.52	392
2 (18.5-24.5 min)	d ₄ -Sitostanol	23.58	492

Tabelle 3.2: Fragmentmassen und Retentionszeiten der analysierten sauren Sterole

Zeitfenster	Substanz	Retentionszeit [min]	Meßmasse [m/z]
1 (17.50-19.50 min)	d ₄ -UDCA	18.64	464
1 (17.50-19.50 min)	UDCA	18.67	460

3.2.5.2 Richtigkeit und Wiederfindung

Die Richtigkeit einer Methode ist das Maß der Übereinstimmung zwischen dem gemessenen Wert und einem als richtig angesehenen Wert (Ausgangswert). Ist die Richtigkeit hoch, stimmt der Mittelwert aus mehreren Messungen mit dem Ausgangswert gut überein. Die Richtigkeit wird als relativer Fehler (Relative Error, RE) angegeben und sollte für mehrere Konzentrationsbereiche bestimmt werden.

Der relative Fehler wird nach folgender Formel berechnet:

$$RE[\%] = \frac{(c_{\text{gemessen}} - c_{\text{zugesezt}})}{c_{\text{zugesezt}}} \times 100$$

RE	Relativer Fehler
C_{gemessen}	Gemessene Konzentration des zudotierten Analyten
C_{zugesezt}	Zugesezte Konzentration des Analyten

Der zudotierte Gehalt sollte in etwa dem in den Proben zu erwartenden Gehalt entsprechen, da die Richtigkeit von der Analytkonzentration abhängig sein kann. Aus diesem Grund sollte die Prüfung auf Richtigkeit in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt werden.

Die Lösungsmittel, die bei diesem Verfahren zur Anwendung kommen, sollen so beschaffen sein, daß sie möglichst keine Veränderung der Probenmatrix zur Folge haben. Außerdem ist darauf zu achten, daß die Analyten homogen in der Probe vorliegen. Die Prüfung auf Richtigkeit wurde für zwei bzw. für drei verschiedene Konzentrationen der jeweiligen Substanzen durchgeführt (niedrige, mittlere und hohe Konzentration).

Die für die Prüfung auf Richtigkeit erforderlichen Leerproben für die Bestimmung neutraler fäkaler Sterole (Fäzes ohne Analyt) wurden durch Homogenisieren der von verschiedenen Personen stammenden Fäzes mit Hilfe eines Mixers hergestellt und jeweils 200 µl des Homogenats in Eppendorfhütchen abgefüllt. Der Prozeß der Abfüllung wurde unter ständigem Rühren durchgeführt, um das Absetzen von schweren Bestandteilen zu verhindern. Die für die Prüfung auf Richtigkeit erforderlichen Leerproben für die Bestimmung von freier UDCA (Plasma ohne Analyt) wurden mit von verschiedenen Personen stammendem gepooltem Plasma hergestellt.

Zur Überprüfung der Richtigkeit wurden die jeweiligen Leerproben mit verschiedenen Analytkonzentrationen gespikt, aufgearbeitet und vermessen. Die Ergebnisse sind Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4 zu entnehmen. Der mittlere relative Fehler sollte nicht mehr als 15 % vom Ausgangswert betragen (113).

Als zusätzliche Qualitätskontrolle zur Überwachung von Richtigkeit und Präzision (Kapitel 3.2.5.5) wurden bei jeder Meßserie Proben bekannter Konzentration mitgemessen.

Die Wiederfindung, die sich aus dem Vergleich des Meßsignals in der Matrix mit dem Meßsignal im Wasser ergibt, wurde aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit der neutralen und sauren Sterole nicht durchgeführt.

Tabelle 3.3: Richtigkeit der analysierten neutralen fäkalen Sterole für zwei verschiedene Konzentrationen

d₆-Coprostanol			
	Probe	Konzentration 1 [µg/500 µl Probe]	Konzentration 2 [µg/500 µl Probe]
C_{gemessen}	1	0,685	4,664
	2	0,708	4,523
	3	0,704	4,754
	4	0,702	4,681
	5	0,618	4,439
RE [%]	1	-9,87	2,28
	2	-6,84	-0,81
	3	-7,95	4,25
	4	-7,63	2,65
	5	-18,68	-2,65
MW RE [%]		-10,19	1,14
Relative SD [%]		4,87	2,80

Konz. 1_{zugesetzt} = 0,760 µg/500 µl Probe; Konz. 2_{zugesetzt} = 4,560 µg/500 µl Probe

d₆-Cholesterin			
	Probe	Konzentration 1 [µg/500 µl Probe]	Konzentration 2 [µg/500 µl Probe]
C _{gemessen}	1	0,814	5,061
	2	0,800	4,846
	3	0,807	4,973
	4	0,808	4,940
	5	0,787	4,936
RE [%]	1	-22,98	-18,89
	2	-23,08	-22,34
	3	-22,40	-20,30
	4	-22,31	-20,83
	5	-24,33	-20,90
MW RE [%]		23,02*	20,65*
Relative SD [%]		0,81	1,24

* abweichend von der durch die FDA vorgeschlagenen Grenze, jedoch aus den in Kapitel 3.2.6.1 genannten Gründen akzeptabel

Konz. 1_{zugesetzt} = 1,040 µg/500 µl Probe; Konz. 2_{zugesetzt} = 6,240 µg/500 µl Probe

d₄-Sitostanol			
	Probe	Konzentration 1 [µg/500 µl Probe]	Konzentration 2 [µg/500 µl Probe]
C _{gemessen}	1	1,063	5,819
	2	1,064	5,470
	3	1,105	5,588
	4	1,048	5,615
	5	1,047	5,646
RE [%]	1	11,89	2,09
	2	12,00	-4,04
	3	16,32	-1,96
	4	10,32	-1,49
	5	10,21	-0,95
MW RE [%] ± SD		12,15	-1,27
Relative SD [%]		2,48	2,21

Konz. 1_{zugesetzt} = 0,950 µg/500 µl Probe; Konz. 2_{zugesetzt} = 5,700 µg/500 µl Probe

Tabelle 3.4: Richtigkeit und Wiederfindung von UDCA für drei verschiedene Konzentrationen

		UDCA		
	Probe	Konz. 1 [µg/500 µl Probe]	Konz.2 [µg/500 µl Probe]	Konz. 3 [µg/ 500 µl Probe]
C _{gemessen}	1	0,184	5,438	10,140
	2	0,147	5,017	10,141
	3	0,126	5,064	11,081
	4	0,125	5,360	10,341
	5	0,137	5,062	10,618
RE [%]	1	25.17	-6.24	-12.59
	2	0.00	-13.50	-12.58
	3	-14.29	-12.69	-4.47
	4	-14.97	-7.59	-10.85
	5	-6.80	-12.72	-8.47
MW RE [%]		-2,18	-10,55	-9,79
Relative SD [%]		16,46	3,37	-9,79

Konz.1_{zugesezt}=0,147 µg/Probe; Konz.2_{zugesezt}=5,800 µg/Probe; Konz.3_{zugesezt}=11,600µg/Probe

3.2.5.3 Linearität

Die Linearität beschreibt die Fähigkeit einer Methode, über einen festgelegten Konzentrationsbereich Ergebnisse zu erbringen, die eine direkte Proportionalität zur Analytkonzentration aufweisen.

Die Linearität sollte über den gesamten Meßbereich nachgewiesen werden. Die empfohlene Anzahl der Kalibrierpunkte liegt zwischen 3 und 10. Mit Hilfe der Kriterien Responsefaktor - oder Steigung - und Korrelationskoeffizient können Aussagen bezüglich der Linearität einer Methode getroffen werden.

Der Nachweis der Linearität erfolgt über eine graphische Auswertung mit Angabe der Regressionsfunktion und des Korrelationskoeffizienten. Der Responsefaktor wird durch Umformulierung der Geradengleichung ermittelt. Er soll über den gesamten festgelegten Konzentrationsbereich relativ konstante Werte aufweisen.

$$m = \frac{y - c}{x}$$

c: Y-Achsenabschnitt; x: Kalibratorkonzentration; m:Responsefaktor
y: Flächenverhältnis von Kalibratorsignal und Signal des internen Standards

Im Folgenden soll beispielhaft für d_6 -Coprostanol der Nachweis der Linearität dargestellt werden. Tabelle 3.5 zeigt die Responsefaktoren für d_6 -Coprostanol über einen Bereich von 0,076 μg bis 4,56 $\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ Probe.

Für die Linearität der Meßmethodik zur Bestimmung neutraler fäkaler Sterole wurde festgelegt, daß die einzelnen Responsefaktoren nicht mehr als $\pm 15 \%$ vom Responsefaktor der Regressionsgerade abweichen sollen, d. h., für d_6 -Coprostanol in einem Bereich zwischen 3,533-4,781 liegen sollen. Bei der Betrachtung des Bereiches von 0,076 μg bis 4,56 $\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ Probe für den Analyten d_6 -Coprostanol lag der unterste Meßpunkt außerhalb dieses Bereiches. Er zeigte eine Abweichung vom Responsefaktor der Regressionsgerade von ca. 30 %. Daher wurde der Meßbereich eingeschränkt, indem der zweite Meßpunkt ausgeschlossen und der zu betrachtende lineare Bereich zwischen 0,152 μg und 4,560 $\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ Probe festgelegt wurde. Somit wurde auch der Responsefaktor der Regressionsgerade von 4,160 auf 4,157 erniedrigt. In Tabelle 3.6 sind die korrigierten Responsefaktoren aufgeführt. Es zeigte sich, daß diese für die Meßpunkte 3 bis 9 innerhalb des geforderten Bereiches von 3,533-4,781 lagen (Abbildung 3.5). In Tabelle 3.7 sind die linearen Bereiche der Substanzen, die ebenfalls quantifiziert wurden, aufgelistet.

Tabelle 3.5: Ermittlung des linearen Bereiches am Beispiel von d_6 -Coprostanol

Meßpunkt (k)	d_6 -Coprostanol-Konz. (x_k) [$\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ Probe]	Fläche ISTD	Fläche d_6 -Coprostanol	Flächenverhältnis (y_k)	Responsefaktor (m_k)
2	0,076	2945534	648758	0,220	5,427
3	0,152	2945446	1173709	0,399	3,886
4	0,380	3088886	3868624	1,252	3,802
5	0,760	3227043	9010095	2,792	3,927
6	1.140	3152558	13577795	4,307	3,947
7	1.520	3278047	20817650	6,351	4,305
8	3,040	3113450	38958017	12,513	4,179
9	4,560	3072526	57418765	18,688	4,140

Regressionsgerade: $y = 4,160 x - 0,224$

$r = 0,9997$

Meßpunkt 1 = Reagenzienblindwert

Tabelle 3.6: Parameter der Kalibrierfunktion von d₆-Coprostanol

Meßpunkt (k)	d ₆ -Coprostanol-Konz. (x _k) [µg/500 µl Probe]	Fläche ISTD	Fläche d ₆ -Coprostanol	Flächenverhältnis (y _k)	Responsefaktor (m _k)
3	0,152	2945446	1173709	0,399	3,886
4	0,380	3088886	3868624	1,252	3,802
5	0,760	3227043	9010095	2,792	3,927
6	1.140	3152558	13577795	4,307	3,947
7	1.520	3278047	20817650	6,351	4,305
8	3,040	3113450	38958017	12,513	4,179
9	4,560	3072526	57418765	18,688	4,140

Regressionsgerade: $y = 4,157 x - 0,215$ $r = 0,9996$

Meßpunkt 1 = Reagenzienblindwert; Meßpunkt 2 ausgeschlossen

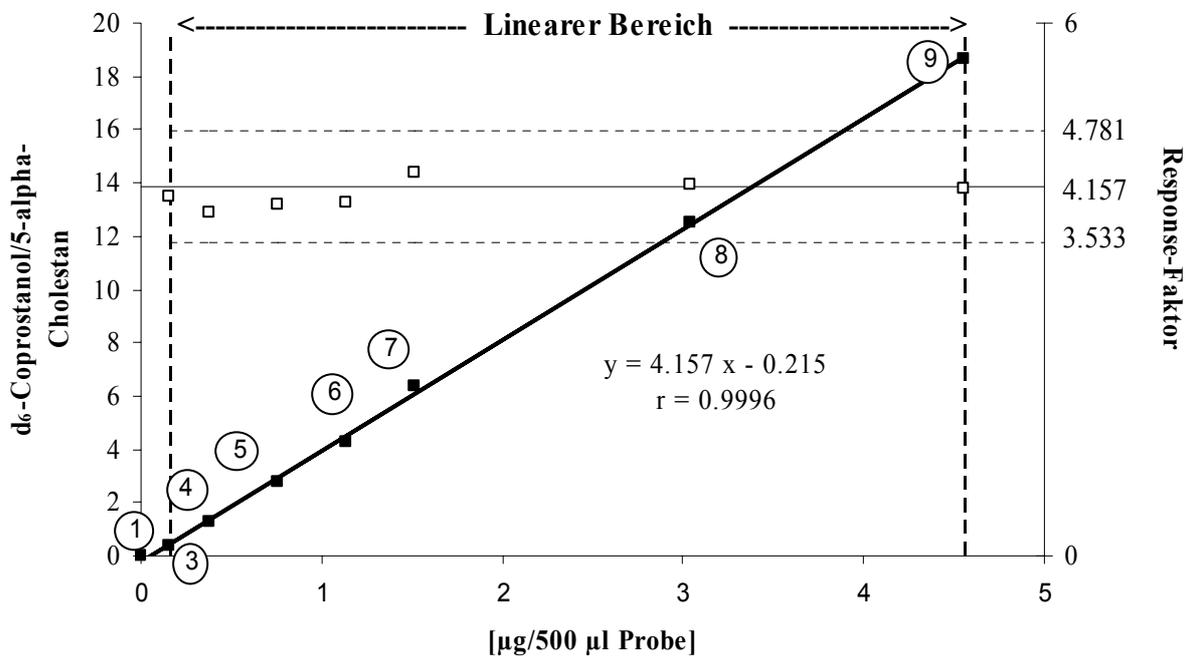


Abbildung 3.5: Kalibrationsgerade und linearer Bereich am Beispiel von d₆-Coprostanol

- : Meßpunkte (Nr. 1 = Reagenzienblindwert, Meßpunkt 2 = ausgeschlossen und nicht im Diagramm abgebildet)
- : Responsefaktoren der Meßpunkte

Tabelle 3.7: Linearer Bereich der analysierten neutralen fäkalen Sterole

Substanz	Linearer Bereich [$\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ Probe]
d_6 -Coprostanol	0,152 – 4,560
d_6 -Cholesterin	0,104 – 6,240
d_4 -Sitostanol	0,190 – 5,700

Tabelle 3.8 zeigt die Responsefaktoren für UDCA über einen Bereich von 0,59 μg bis 11,8 $\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ Probe. Für die Erstellung der Kalibrationsgerade wurde zur Verbesserung der Meßgenauigkeit jeder Meßpunkt doppelt bestimmt, so daß die Kalibrationsgerade aus 12 Meßpunkten bestand, wobei je zwei der Proben theoretisch die gleiche zugesetzte Konzentration an UDCA enthielten. Für die Meßmethodik zur Bestimmung von UDCA in Plasma wurde festgelegt, daß die Responsefaktoren nicht mehr als $\pm 15\%$ vom Responsefaktor der Regressionsgeraden abweichen sollen, d.h. in einem Bereich zwischen 0,381 und 0,515 liegen sollen. Die ermittelten Responsefaktoren lagen in dem festgelegten Bereich, so daß sich die Linearität über einen Bereich von 0,59 $\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ Probe bis 11,8 $\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ Probe erstreckte (Abbildung 3.6).

Tabelle 3.8: Parameter der Kalibrierfunktion von UDCA

Meßpunkt (k)	UDCA-Konz. (x_k) [$\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ Probe]	Fläche ISTD	Fläche UDCA	Flächenverhältnis (y_k)	Responsefaktor (m_k)
2-1	0,590	374458	1411238	0.265	0.492
2-2	0,590	4741869	17364673	0.273	0.505
3-1	1,180	5439557	9755079	0.558	0.494
3-2	1,180	315688	596299	0.529	0.470
4-1	2,360	1538596	1561783	0.985	0.428
4-2	2,360	975175	957402	1.019	0.442
5-1	3,540	4120737	2561294	1.609	0.462
5-2	3,540	3665092	2482448	1.476	0.424
6-1	5,900	2341807	922596	2.538	0.434
6-2	5,900	2402266	969322	2.478	0.424
7-1	11,800	10906309	2032309	5.366	0.457
7-2	11,800	2730657	518017	5.271	0.449

Regressionsgerade: $y = 0,448 x - 0,025$ $r = 0,9993$

Meßpunkt 1 = Reagenzienblindwert

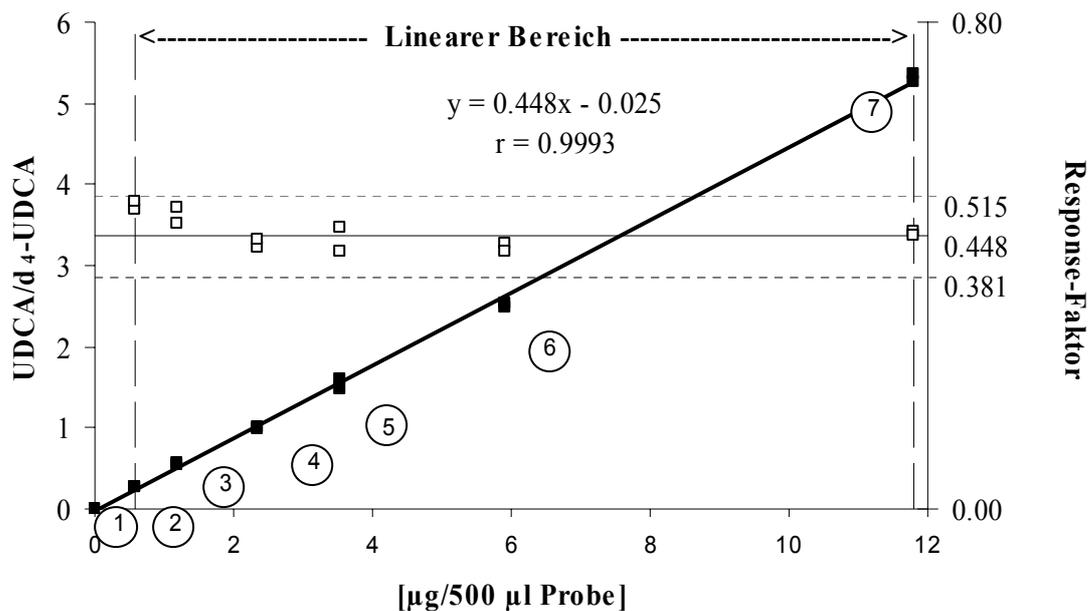


Abbildung 3.6 Kalibrationsgerade und linearer Bereich von UDCA

- : Meßpunkte (Nr. 1 = Reagenzienblindwert)
- : Responsefaktoren der Meßpunkte

3.2.5.4 Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze ist die kleinste erfassbare Menge des Analyten in einer Probe. Zur Ermittlung der Nachweisgrenze muß das Signal-Rausch-Verhältnis bestimmt werden. An der Nachweisgrenze soll das Signal dreifach so hoch wie die mittlere Rauschbreite sein.

Die Bestimmungsgrenze, auch Quantifizierungsgrenze genannt, ist die kleinste quantifizierbare Menge des Analyten in der Probe. In der Literatur wird für die Bestimmungsgrenze ein Signal-Rausch-Verhältnis von 9:1 gefordert, wonach also folgendes gilt: Bestimmungsgrenze = 3 x Nachweisgrenze (114).

Signale, die diese Bedingung nicht erfüllen, können somit nicht korrekt quantifiziert werden und müssen bei der Auswertung entsprechend gekennzeichnet werden.

Die mittlere Rauschbreite der Basislinie wurde über den Bereich von hundert Scans betrachtet. In Tabelle 3.9 sind die Nachweisgrenzen und die Bestimmungsgrenzen von d₆-Coprostanol, d₆-Cholesterin und d₄-Sitostanol aufgelistet.

Tabelle 3.9: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der analysierten neutralen fäkalen Sterole

Substanz	Nachweisgrenze [$\mu\text{g}/500 \mu\text{l Probe}$]	Bestimmungsgrenze [$\mu\text{g}/500 \mu\text{l Probe}$]
d_6 -Coprostanol	0,0055	0,017
d_6 -Cholesterin	0,0235	0,07
d_4 -Sitostanol	0,039	0,117

Die Nachweisgrenze, die für die Untersuchung der Stabilität von UDCA in Plasmaproben ermittelt wurde, lag bei $0,032 \mu\text{g}/\text{ml}$. Bei einer Definition der Quantifizierungsgrenze als den dreifachen Wert der Nachweisgrenze wurde die Quantifizierungsgrenze zu $0,096 \mu\text{g}/\text{ml}$ berechnet.

3.2.5.5 Präzision

Die Präzision einer Methode ist das Maß für die gegenseitige Annäherung von voneinander unabhängigen Analyseergebnissen bei mehrfacher Anwendung eines festgelegten Analyseverfahrens unter vorgegebenen Bedingungen. Die statistische Größe der Präzision ist die Standardabweichung bzw., wenn die Streuungen von Stichproben mit verschiedenen Mittelwerten miteinander verglichen werden sollen, der Variationskoeffizient. Die Streuung resultiert aus zufälligen Fehlern.

Es wird zwischen einer "Intra-day" Präzision und einer "Inter-day" Präzision unterschieden.

Mit der Intra-day-Präzision soll die Streuung der Meßergebnisse, die durch Aufarbeitung und Messung mehrerer aus einem Pool stammender Aliquots an einem Tag resultiert, festgestellt werden. Damit soll ermittelt werden, ob die Aufarbeitung einer Serie von Proben zu gleichen Ergebnissen führt.

Die Inter-day-Präzision zeigt die Streuung der Meßergebnisse von Tag zu Tag. Dadurch soll die Streuung der Meßergebnisse mehrerer aus einem Pool stammender Aliquots an unterschiedlichen Tagen ermittelt werden. Diese Streuung zeigt, ob die Art der Aufarbeitung von Proben an unterschiedlichen Tagen divergiert und inwieweit das Gerät, das zur Messung der Proben verwendet wird, von Tag zu Tag Schwankungen zeigt.

Die Bestimmung der Präzision der entwickelten Methoden wurde bei jeder der zu analysierenden Substanzen in zwei unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Tabelle 3.10, Tabelle 3.11 und Tabelle 3.12 zeigen die Intra-day-Präzision der zu messenden neutralen fäkalen Sterole. Pro Konzentration wurde die zu analysierende Substanz zu jeweils 5 Aliquots eines vorher hergestellten Fäzes-Pools pipettiert, die Proben aufgearbeitet und gemessen. Aus diesen 5 Proben wurden Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient berechnet.

Tabelle 3.13, Tabelle 3.14 und Tabelle 3.15 sind die Ergebnisse der Inter-day-Präzision über einen Zeitraum von 5 Tagen zu entnehmen. Hierfür wurden jeweils 5 Proben an 5 aufeinanderfolgenden Tagen aufgearbeitet.

Der Variationskoeffizient sollte nicht größer als 15 % sein (113).

Tabelle 3.10: Intra-day-Präzision der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Bestimmung von d_6 -Coprostanol

d_6-Coprostanol		
Probe	Konz. 1 [$\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ Probe]	Konz. 2 [$\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ Probe]
1	0,608	4,770
2	0,655	4,747
3	0,603	4,788
4	0,678	4,694
5	0,677	4,674
MW	0,644	4,735
SD	0,036	0,049
CV	5,637	1,028

Konz. 1 = 0,760 $\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ Probe; Konz. 2 = 4,560 $\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ Probe

Tabelle 3.11: Intra-day-Präzision der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Bestimmung von d₆-Cholesterin

d₆-Cholesterin		
Probe	Konz. 1 [µg/500 µl Probe]	Konz. 2 [µg/500 µl Probe]
1	0,770	4,933
2	0,780	5,093
3	0,795	5,182
4	0,855	5,090
5	0,839	4,919
MW	0,808	5,043
SD	0,037	0,114
CV	4,625	2,251

Konz. 1 = 1,040 µg/500 µl Probe; Konz. 2 = 6,240 µg/500 µl Probe

Tabelle 3.12: Intra-day-Präzision der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Bestimmung von d₄-Sitostanol

d₄-Sitostanol		
Probe	Konz. 1 [µg/500 µl Probe]	Konz. 2 [µg/500 µl Probe]
1	1,143	6,081
2	1,130	6,396
3	1,163	6,374
4	1,268	6,362
5	1,245	6,189
MW	1,190	6,280
SD	0,063	0,139
CV	5,255	2,208

Konz. 1 = 0,950 µg/500 µl Probe; Konz. 2 = 5,700 µg/500 µl Probe

Tabelle 3.13: Inter-day-Präzision bei der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Bestimmung von d₆-Coprostanol an 5 aufeinanderfolgenden Tagen

d₆-Coprostanol		
Tag	Konz. 1 [µg/500 µl Probe]	Konz. 2 [µg/500 µl Probe]
1	0,629	4,545
2	0,644	4,735
3	0,677	4,507
4	0,693	4,753
5	0,683	4,612
MW	0.665	4.630
SD	0.027	0.110
CV	4.109	2.386

Konz. 1 = 0,760 µg/500 µl Probe; Konz. 2 = 4,560 µg/500 µl Probe

Tabelle 3.14: Inter-day-Präzision bei der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Bestimmung von d₆-Cholesterin an 5 aufeinanderfolgenden Tagen

d₆-Cholesterin		
Tag	Konz. 1 [µg/500 µl Probe]	Konz. 2 [µg/500 µl Probe]
1	0,776	4,835
2	0,808	5,043
3	0,802	4,854
4	0,858	5,164
5	0,803	4,951
MW	0.809	4.969
SD	0.030	0.137
CV	3.694	2.756

Konz. 1 = 1,040 µg/500 µl Probe; Konz. 2 = 6,240 µg/500 µl Probe

Tabelle 3.15: Inter-day-Präzision bei der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Bestimmung von d₄-Sitostanol an 5 aufeinanderfolgenden Tagen

d₄-Sitostanol		
Tag	Konz. 1 [µg/500 µl Probe]	Konz. 2 [µg/500 µl Probe]
1	1,133	5,993
2	1,190	6,280
3	1,161	5,881
4	1,210	6,241
5	1,065	5,628
MW	1.152	6.005
SD	0.057	0.269
CV	4.915	4.476

Konz. 1 = 0,950 µg/500 µl Probe; Konz. 2 = 5,700 µg/500 µl Probe

Die Bestimmung der Intra-day-Präzision für die gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung von UDCA wurde bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen (5,8 µg/500 µl Probe und 11,8 µg/500 µl Probe) durchgeführt. Jede Konzentration wurde 5-mal aufgearbeitet und gemessen. Tabelle 3.16 sind die Ergebnisse für die beiden Konzentrationen zu entnehmen.

Tabelle 3.16: Intra-day-Präzision bei der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Bestimmung von UDCA

UDCA		
Probe	Konz. 1 [µg/500 µl Probe]	Konz. 2 [µg/500 µl Probe]
1	5,4	10,1
2	5,0	10,1
3	5,1	11,1
4	5,4	10,3
5	5,1	10,6
MW	5,2	10,4
SD	0,2	0,4
CV	3,6	4,0

Konz. 1 = 5,9 µg/500 µl Probe; Konz. 2 = 11,8 µg/500 µl Probe

Die Inter-day-Präzision wurde an 5 unterschiedlichen Tagen aus den Qualitätskontrollen, die bei jeder Serie in zwei unterschiedlichen Konzentrationen gemessen wurden, ermittelt (Tabelle 3.17).

Tabelle 3.17: Inter-day-Präzision bei der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Bestimmung von UDCA

UDCA		
Tag	Konz. 1 [$\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ Probe]	Konz. 2 [$\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ Probe]
1	6,5	14,1
2	5,7	13,4
3	5,5	12,0
4	5,8	14,1
5	5,9	11,8
MW	5,9	13,1
SD	0,4	1,1
CV	6,4	8,5

Konz. 1 = 5,9 $\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ Probe; Konz. 2 = 11,8 $\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ Probe

3.2.5.6 Stabilität

Die Stabilität einer Substanz in biologischem Material ist abhängig von den Lagerungsbedingungen, den chemischen Eigenschaften, der Probenmatrix sowie dem Behältnis, in dem die gewonnene Probe aufbewahrt wird. Müssen Proben über einen längeren Zeitraum gelagert werden, bevor sie analysiert werden können, sollte die Stabilität der zu bestimmenden Substanzen gesichert sein.

Im allgemeinen sollte die Prüfung auf Stabilität eines Analyten in biologischem Material sowohl bei kürzerer Lagerungszeit bei Raumtemperatur als auch bei langer Lagerungszeit bei entsprechenden Lagerungstemperaturen erfolgen. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob mehrmalige Auftau- und Einfriervorgänge zu einer Beeinträchtigung des Analyten in den Proben führen.

Ausführliche Untersuchungen wurden zur Stabilität von UDCA in Plasma durchgeführt. Die Vorgehensweise und Ergebnisse dazu werden im Kapitel 4.2 beschrieben.

3.2.6 Diskussion der Methoden

3.2.6.1 Diskussion der Methode zur Bestimmung neutraler fäkaler Sterole

Mit der bisher angewandten Methode (11) war keine Quantifizierung der einzelnen Sterole möglich. Im Gegensatz dazu kann die in dieser Arbeit entwickelte Methode validiert werden, wodurch eine zuverlässige Quantifizierung der Analyten gewährleistet ist. Gerade die Komplexität der Probenmatrix (Fäzes) erfordert validierte analytische Methoden, um zufällige Analyseergebnisse auszuschließen.

Die Prüfung der Richtigkeit ergab für d_6 -Coprostanol und d_4 -Sitostanol sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Konzentrationen konstante reproduzierbare Ergebnisse. Die mittleren relativen Fehler der Richtigkeit bei der Bestimmung beider Substanzen lagen in den definierten Grenzen (113).

Der mittlere relative Fehler von d_6 -Cholesterin lag bei beiden getesteten Konzentrationen im Mittel bei ca. -20 % bezogen auf die Ausgangskonzentration. Zwar zeigten auch hier die einzelnen Meßergebnisse eine hohe Konstanz und Reproduzierbarkeit, die Ursache für den im Vergleich zu d_6 -Coprostanol und d_4 -Sitostanol höher liegenden mittleren relativen Fehler ist jedoch unklar. Möglicherweise könnte ein Zusammenhang mit der bakteriellen Umwandlung des d_6 -Cholesterins bestehen. Die Reduktion der Doppelbindung zwischen Position 5 und 6 durch im Stuhl enthaltene Darmbakterien könnte über die Zwischenstufe des Δ^4 -Cholesten-3-ons zur Bildung von d_6 -Coprostanon geführt haben (Kapitel 2.1.1.2) und so die zu niedrigen Meßergebnisse für d_6 -Cholesterin erklären. Eine weitere mögliche Ursache könnte die unterschiedliche Struktur des d_6 -Cholesterins verglichen mit der Struktur der beiden anderen Analyten darstellen. Zum einen kann die im Cholesterin vorhandene Doppelbindung durch Luftsauerstoff zum 5,6-Epoxycholesterin (Abbildung 3.7) oxidiert werden, zum anderen begünstigt die im Cholesterin vorhandene Doppelbindung eine Oxidation an Position C-7 und könnte damit zu der Bildung von 7-Ketocholesterin bzw. von 7β -Hydroxycholesterin geführt haben. Bei d_6 -Coprostanol und d_4 -Sitostanol hingegen ist keine Doppelbindung im Molekül vorhanden. Auch eine strukturell bedingte unterschiedliche Adsorption der jeweiligen Analyten an Matrixbestandteile kann für die Unterschiede im Bereich der Prüfung auf Richtigkeit verantwortlich sein.

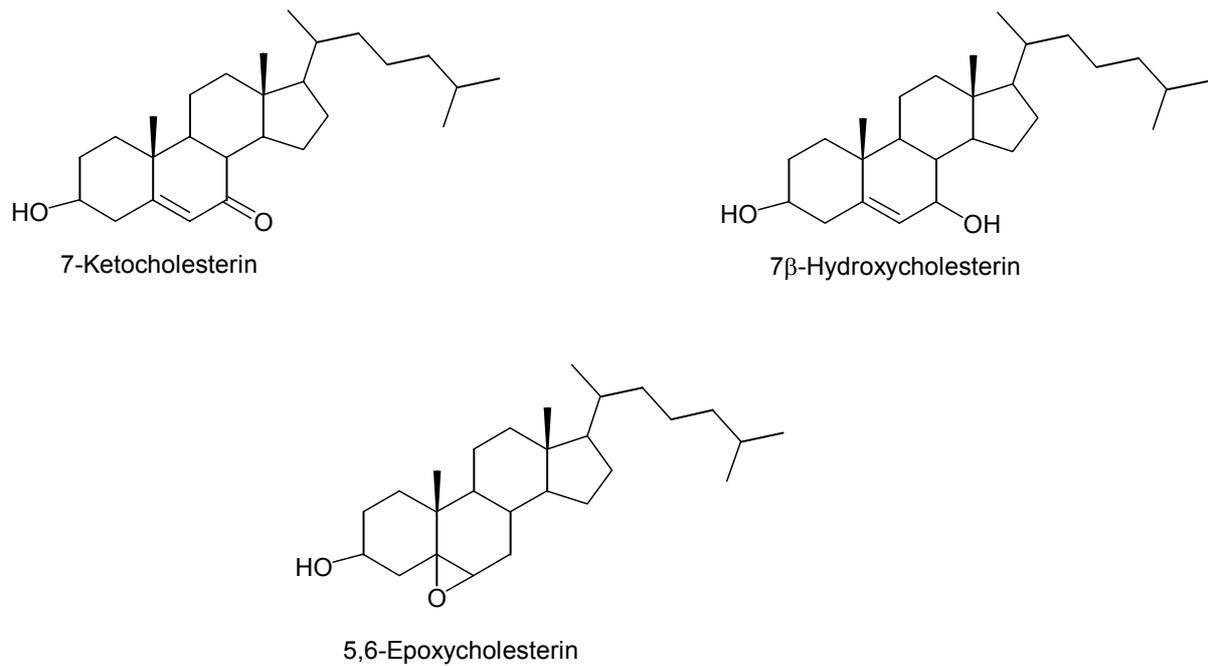


Abbildung 3.7: Mögliche Oxidationsprodukte des Cholesterins (d_6 -Cholesterin verhält sich analog)

Aufgrund der Komplexität der Probenmatrix wäre eine Quantifizierung der neutralen Sterole über die multiple Standardadditionsmethode besser geeignet als eine Quantifizierung über Kalibrationsgeraden. Durch Anwendung der multiplen Standardadditionsmethode, ein Spezialfall der Kalibrierung, kann der Einfluß der Matrixkomponenten auf das Meßsignal korrekt berücksichtigt werden. Sie kommt vor allem dann zum Einsatz, wenn eine starke Beeinflussung des Meßsignals durch die Matrix gegeben ist. Dabei wird die zu analysierende Probe mehrfach aufgestockt. Meist wird die Konzentration des Analyten in der Probe abgeschätzt und in gleichen Intervallen bis zur doppelten geschätzten Konzentration zudosiert. Aus den Meßwerten ergibt sich eine Gerade, mittels derer man durch Extrapolation die gesuchte Konzentration des Analyten bei $y = 0$ ermitteln kann (Abbildung 3.8).

Aufgrund der großen Anzahl an zu analysierenden Stuhlproben und einem damit verbundenen hohen Zeitaufwand für die Durchführung der Standardadditionsmethode konnte diese für die Bestimmung der neutralen fäkalen Sterole in dieser Studie nicht angewendet werden.

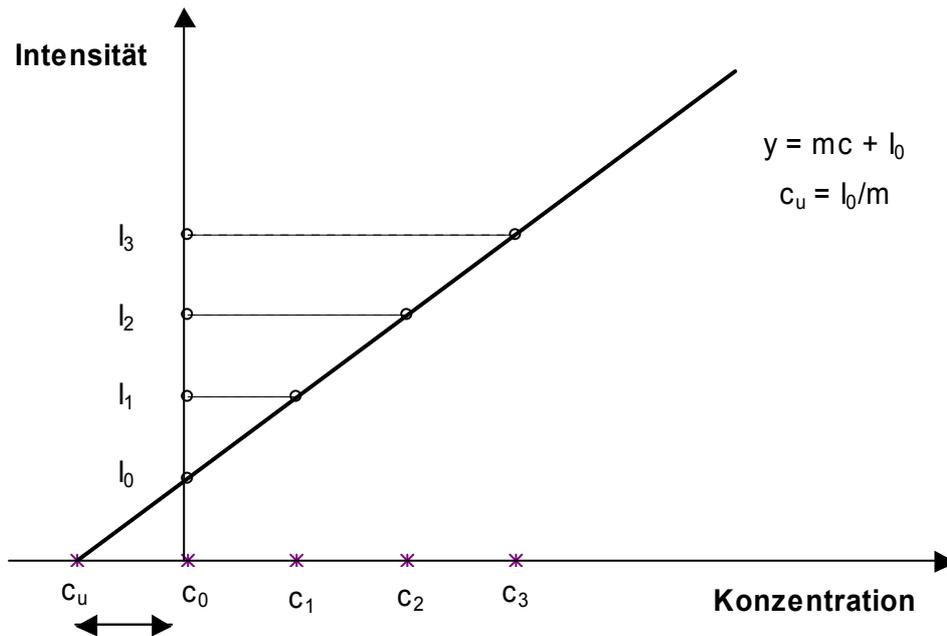


Abbildung 3.8: Standardadditionsmethode

 c_u : gesuchte Konzentration c_1, c_2, c_3 : abgestuft zugesetzte Konzentrationen I_i : gemessene Intensitätswerte

Die Prüfung der Intra-day-Präzision sowie der Inter-day-Präzision zeigte für alle zu bestimmenden Substanzen sehr gute Ergebnisse mit Variationskoeffizienten $< 15\%$. Die Probenaufarbeitung innerhalb einer Serie von 5 Proben ergab nahe beieinander liegende Meßergebnisse, wodurch die Gleichmäßigkeit und Qualität der Probenaufarbeitung sowie der Probenmessung innerhalb einer Serie abgesichert ist. Vergleich und Bewertung der Präzision zwischen verschiedenen Tagen zeigte ebenfalls eine sehr geringe Streuung der Analyseergebnisse, wodurch die Gleichmäßigkeit und Qualität von Aufarbeitung und Messung auch an unterschiedlichen Tagen bestätigt ist.

3.2.6.2 Diskussion der Methode zur Bestimmung von UDCA in Plasmaproben

Bei der für die Bestimmung von UDCA verwendeten UDCA bzw. d_4 -UDCA handelte es sich um hochreine Referenzsubstanzen, die eine hohe Spezifität der analytischen Methode durch exakte Identifizierung über Retentionszeit und Masse mittels GC-MS ermöglichten. Um die Spezifität der Methode noch zusätzlich zu verbessern und dadurch beispielsweise auftretende Störsignale besser erkennen zu können, kann eine Erfassung von einem bzw. von zwei zusätzlichen für den Analyten charakteristischen Fragmentionen durchgeführt werden.

Das in dieser Untersuchung gemessene Fragmention besitzt ein Masse/Ladungsverhältnis m/z 460 und entsteht durch die Abspaltung einer TMS-Gruppe vom Molekülion. Mögliche

Fragmentionen, auf denen zusätzlich gemessen werden könnte, sind zum einen das durch Abspaltung einer weiteren TMS-Gruppe entstehende Ion mit m/z 370 sowie das durch zusätzliche Abspaltung einer Methylgruppe entstehende Ion mit m/z 355 (Abbildung 3.9). Die Ratio der Flächen auf diesen Ionenmassen sollte bei allen zu messenden Proben den gleichen Wert ergeben und mit der Reinsubstanz übereinstimmen. Damit kann eine Überlagerung der Signale durch Fremdstoffen ausgeschlossen werden.

Die Kalibrationsgerade bestand aus 8 Kalibrationspunkten, wobei jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

Die Prüfung der Richtigkeit der Methode ergab für alle drei getesteten Konzentrationen gute Ergebnisse mit Werten innerhalb der definierten Grenzen (113).

Die Untersuchung der Präzision wurde für zwei verschiedene Konzentrationen mit jeweils 5 Proben an einem Tag durchgeführt. Bei beiden Konzentrationen wurden eine sehr niedrige Standardabweichung und ein Variationskoeffizient von ca. 4 % ermittelt, woraus sich eine sehr geringe Streuung der Analysenergebnisse und damit eine hohe Präzision der Methode ergibt. Auch die Bestimmung der Inter-day-Präzision ergab mit Variationskoeffizienten von 6,4 % bzw. 8,5 % gute Ergebnisse.

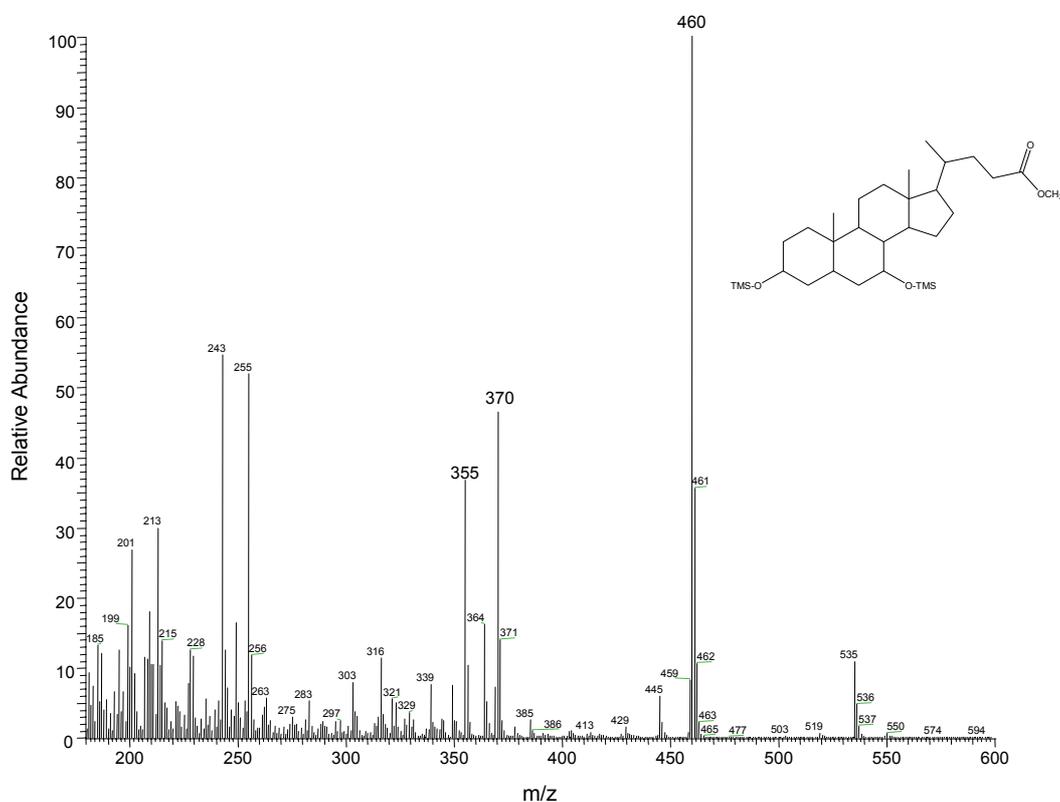


Abbildung 3.9: Massenspektrum von derivatisierter UDCA

Die Stabilität von UDCA in Plasmaproben wurde ausführlich in einer separaten Untersuchung ermittelt und in Kapitel 4.2 umfangreich dargestellt. Dabei wurde insbesondere die Stabilität bei unterschiedlichen Temperaturen über einen jeweils definierten Zeitraum sowie die Stabilität nach mehreren Einfrier- und Auftauprozessen untersucht.

Auffallend bei der Probenaufarbeitung war eine nach erstmaliger Extraktion der Proben mit Cyclohexan auftretende Emulsion, die vermutlich beim Schütteln der Probe aus Plasmaproteinen und zugesetztem Lösungsmittel sowie weiteren Plasmabestandteilen gebildet wurde und die nachfolgenden Arbeitsschritte, wie beispielsweise das Überführen der lipophilen Phase in ein separates Probenröhrchen, erschwerte. Zukünftig sollte die Methode deshalb so variiert werden, daß das Auftreten dieser Emulsion ausgeschlossen werden kann. Zu beachten gilt hierbei, daß eine starke alkalische Hydrolyse zur Denaturierung der Plasmaproteine nicht durchgeführt werden kann, da dies eine Spaltung der konjugierten UDCA zur Folge hätte und damit die alleinige Bestimmung der im Körper unkonjugiert vorliegenden UDCA (freie UDCA), wie bei der in dieser Arbeit durchgeführten Bioäquivalenzstudie gefordert, nicht mehr möglich wäre.

Eine Variationsmöglichkeit zur Vermeidung der Emulsionsbildung ist die Zugabe von ethanolischer statt wäßriger NaOH-Lösung zu Beginn der Probenaufarbeitung. Durch den Alkohol kommt es vermutlich zu einer Herabsetzung der Oberflächenspannung, damit zu einer verminderten Schaumbildung und folglich zu einer verbesserten Probenhandhabung.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Extraktion von sowohl sauren als auch neutralen Sterolen zu Beginn der Probenaufarbeitung durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure und anschließender Extraktion mit Diethylether. Nach Zugabe von NaOH kommt es zur Na⁺-Salzbildung der sauren Sterole; die Etherphase wird verworfen. Anschließend wird die wäßrige Phase mit Salzsäure versetzt und die sauren Sterole mit Diethylether extrahiert, verestert und mit TMS derivatisiert.

3.2.7 Statistik

Die gemessenen Werte werden als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) angegeben, um die Streuung der Werte innerhalb einer Gruppe darzustellen. Statistische Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit dem t-Test (zweiseitig, gepaart) untersucht. Das Ergebnis wurde als signifikant betrachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % lag ($p < 0,05$). Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,001$ lag ein höchstsignifikantes Ergebnis vor.

Die Korrelation zwischen verschiedenen Meßreihen wurde mit dem Pearson'schen Korrelationskoeffizienten ermittelt. Alle Berechnungen wurden mit Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corp.) sowie mit SPSS 12.0 (SPSS Inc.) durchgeführt.

4 Studien, Studienergebnisse und Diskussion

Im folgenden werden drei verschiedene Studien beschrieben, die Ergebnisse dargestellt und anschließend diskutiert. Die Analytik zur Bestimmung der verschiedenen Sterole in den Stuhl- bzw. Plasmaproben wurde gaschromatographisch-massenspektrometrisch durchgeführt.

In der ersten Studie wurde der Einfluß von Ezetimib und Simvastatin auf die intestinale Resorption von Cholesterin und den beiden Phytosterolen Campesterin und Sitosterin untersucht.

In der zweiten Studie wurde die Stabilität des Arzneistoffes UDCA nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen und das „Freeze and Thaw“-Verhalten, also die Stabilität nach mehreren Einfrier- und Auftauzyklen, untersucht.

Bei der dritten Studie handelte es sich um eine Studie zur Überprüfung der Bioäquivalenz zweier unterschiedlicher galenischer Zubereitungen von UDCA.

4.1 Einfluß von Ezetimib und Simvastatin auf die intestinale Cholesterin- sowie Campesterin- und Sitosterinresorption; eine randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte, 4-phasige Crossover-Studie

4.1.1 Hintergrund der Studie

Cholesterin gelangt zum einen durch Aufnahme mit der Nahrung, zum anderen durch biliäre Sekretion von endogenem Cholesterin in den Darm (115). Da eine erhöhte Cholesterinkonzentration im Serum als ein wichtiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen gilt, ist die Resorption von Cholesterin aus dem Gastrointestinaltrakt ein wichtiger Faktor, den es bei der Untersuchung des Cholesterinstoffwechsels zu beachten gilt.

In den letzten 40 Jahren wurden verschiedene Methoden zur Bestimmung der intestinalen Cholesterinresorption beschrieben. Bei den meisten dieser Methoden wurde radioaktiv markiertes Cholesterin verwendet. Die Radioaktivität des ausgeschiedenen Cholesterins wurde in eine Mengeneinheit umgerechnet, mit der anschließend die prozentuale Cholesterinresorption berechnet werden konnte. Diese Methoden haben viel dazu beigetragen, die Resorption von Cholesterin im Menschen zu erforschen, sind jedoch auch mit einigen Nachteilen und Schwierigkeiten behaftet. Aus ethischen Gründen wurden meist Frauen,

Kinder und Jugendliche bei Verwendung der radioaktiven Markersubstanzen aus den Studien ausgeschlossen. Bei einigen der Studien konnte lediglich eine einzelne Messung nach einer einzigen Dosierung der radioaktiv markierten Substanz durchgeführt werden, und es war daher nicht möglich, die durchschnittliche Cholesterinresorption über eine längere Zeit zu ermitteln.

Crouse und Grundy entwickelten 1978 eine Methode zur Bestimmung der Cholesterinresorption mit [¹⁴C]Cholesterin und [³H]β-Sitosterol als nichtresorbierbaren Marker, die auf der Messung der Isotope während 10 Tagen basierte (116). Diese Methode, die auch „continuous feeding dual-isotope method“ genannt wird, war die erste Methode, die eine Messung über einen relativ langen Zeitraum und somit die Ermittlung einer durchschnittlichen Cholesterinresorption nach Einstellung eines Gleichgewichtes des Flow-Markers (hier [³H]β-Sitosterol) ermöglichte.

Eine Variation dieser Methode wurde 1993 von Lütjohann et al. etabliert, indem man die radioaktiven Marker durch mit stabilen Isotopen markierte Substanzen austauschte (11). Damit war es möglich, Untersuchungen zur Resorption von Cholesterin im Menschen nun auch an Frauen im gebärfähigen Alter und an Kindern problemlos und reproduzierbar durchzuführen. Die von Lütjohann entwickelte Methode (11), die auf einer Berechnung der prozentualen Cholesterinresorption über gaschromatographisch-massenspektrometrisch ermittelte Flächen basiert, bildete die Grundlage der in dieser Arbeit angewandten Methode. Hierbei wurde eine Quantifizierung der neutralen fäkalen Sterole durchgeführt und durch Einsetzen der absoluten Mengen in die von Crouse und Grundy entwickelte Formel (116) die Cholesterinresorption bestimmt.

4.1.2 Studienziele

Primäres Ziel dieser Studie war die Untersuchung des Einflusses einer Kombination aus 10 mg Ezetimib und 20 mg Simvastatin auf die intestinale Cholesterinresorption. Sekundär galt es festzustellen, welchen Einfluß 10 mg Ezetimib und 20 mg Simvastatin jeweils allein verabreicht auf die intestinale Cholesterinresorption ausüben, und wie die Cholesterinbiosynthese durch die beiden Arzneistoffe in Kombination und jeweils allein verabreicht beeinflusst wird. Außerdem sollte die Verträglichkeit der beiden Arzneistoffe in der entsprechenden Dosierung sowie ihr Einfluß auf die Plasmakonzentration und die intestinale Resorption der beiden Phytosterole Campesterin und Sitosterin untersucht werden. Inhalt dieser Arbeit war die Bestimmung der intestinalen Cholesterin-, Campesterin- und Sitosterinresorption während 4 verschiedener Behandlungsphasen.

Zur Veranschaulichung des Zusammenhangs von Cholesterinresorption und endogener Cholesterinbiosynthese wurden die Biosynthesedaten (unveröffentlichte Daten) in Form von Diagrammen in die Arbeit mit aufgenommen.

4.1.3 Studiendesign

Es handelte sich um eine randomisierte doppelblinde placebokontrollierte 4-phasige Crossover-Studie mit einer Gesamtdauer von 30,5 Wochen (drei Tage Screening, eine zwei Wochen dauernde Run-in-Placebo-Phase und 4 Behandlungsphasen über jeweils 7 Wochen). Während dieser Zeit mußten die Probanden 11 mal das Studienzentrum aufsuchen. Zusätzlich gab es jeweils zur Halbzeit einer Behandlungsphase Telefonkontakt mit den Probanden, um die Compliance hinsichtlich Diät, Studienmedikation und Einschränkung des Alkoholkonsums aufrechtzuerhalten bzw. zu verbessern. Zwei Wochen nach Visite 11 wurde nochmals telefonischer Kontakt mit den Studienteilnehmern zwecks Erfragung und Erfassung von unerwünschten Arzneimittelwirkungen aufgenommen .

Visite 1 diente zur Durchführung diverser im Studienprotokoll geforderter Untersuchungen.

In Visite 2 wurden den Probanden nach Einweisung Ernährungstagebücher für 7 Tage zur Dokumentation der konsumierten Nahrungsmittel nach Art und Menge ausgehändigt. Diese sollten während der ersten Woche der Run-in-Placebo-Phase ausgefüllt und bei der nächsten Visite zurückgegeben werden. Außerdem wurden die Probanden dazu angehalten, ihre normalen Eßgewohnheiten beizubehalten. Mittels der geführten Ernährungstagebücher konnte die tägliche Cholesterinaufnahme, die laut Studienprotokoll ≥ 200 mg/d und ≤ 500 mg/Tag betragen sollte, berechnet werden.

Die anschließenden 4 Behandlungsphasen erstreckten sich von Visite 3 bis Visite 11 mit einer Dauer von je 7 Wochen. Jeweils während der letzten sieben Tage einer Behandlungsphase nahmen die Probanden dreimal täglich während der Mahlzeiten die ihnen mitgegebenen Markerkapseln ein. Diese enthielten je ein Gemisch aus 3,045 mg d_6 -Cholesterin, 1,157 mg d_6 -Campesterin, 1,201 mg d_6 -Sitosterin und 2,638 mg d_4 -Sitostanol gelöst in jeweils 400 μ l Livio-Vitamin-Pflanzenöl[®]. Die Einnahme der Markerkapseln war für die Ermittlung der intestinalen Cholesterin-, Campesterin- und Sitosterinresorption notwendig (Kapitel 4.1.5).

Die Probanden wurden aufgefordert, jeweils während der letzten 4 Tage einer Behandlungsphase täglich eine Stuhlprobe zu sammeln und diese zur Klinik zu bringen (Abbildung 4.1).

Zwecks Förderung der Compliance wurden Erinnerungszettel bezüglich Studienmedikation, Markerkapseln und Sammlung der Stuhlproben ausgeteilt. Zusätzlich gab es jeweils 3

Wochen nach Beginn einer Behandlungsphase regelmäßige Telefonkontakte. Außerdem wurden die Probanden während der Einnahmephase der Markerkapseln dazu aufgefordert, mindestens ein- besser zweimal pro Tag in die Klinik zu kommen, damit die Einnahme direkt überprüft werden konnte. Falls dies für den Probanden nicht möglich war, wurde er einmal pro Tag angerufen.

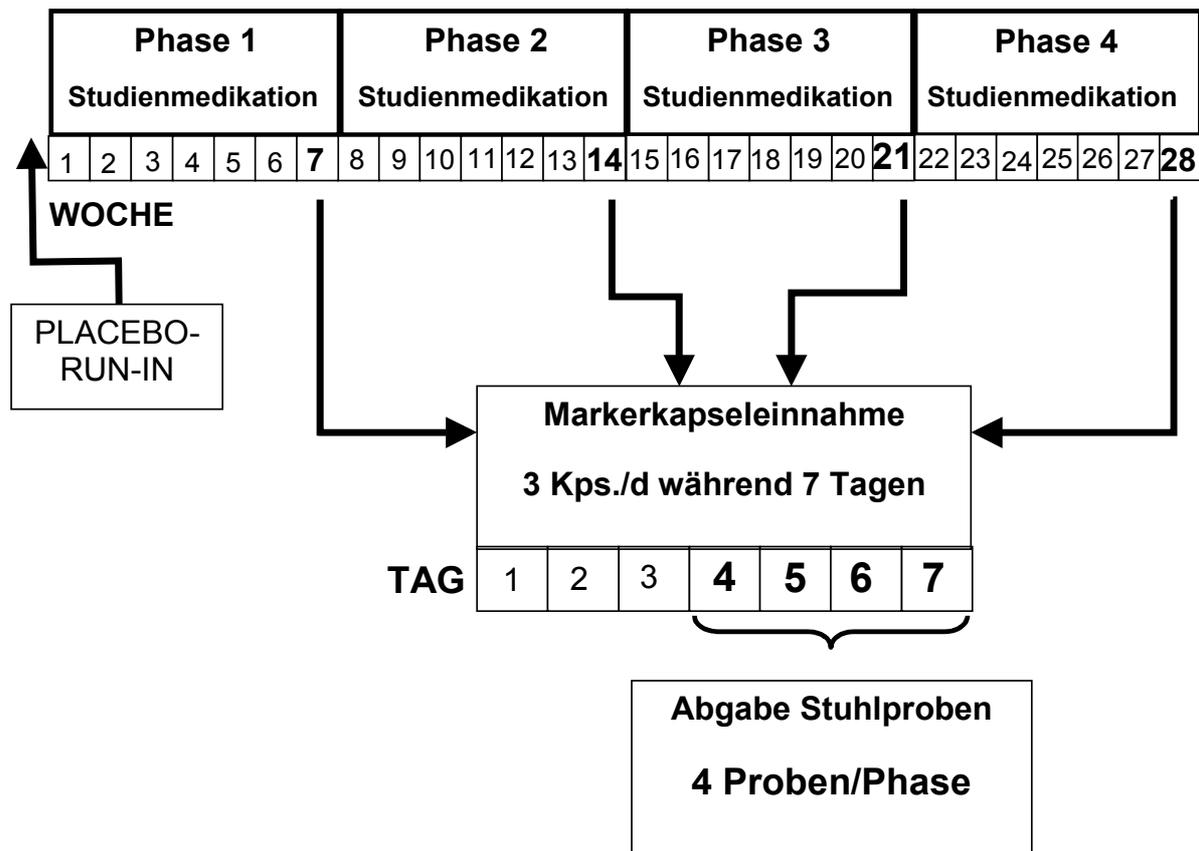


Abbildung 4.1: Studiendesign

4.1.4 Probanden

Das Probandenkollektiv bestand aus 41 gesunden Männern zwischen 18 und 55 Jahren mit einer leichten bis mäßigen Erhöhung des LDL-Cholesterins (130 bis 180 mg/dl). Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie war, daß die Probanden bisher noch keine cholesterinsenkenden Arzneimittel, Nahrungsergänzungsmittel oder Margarinen mit cholesterinsenkenden Zusätzen angewendet haben sowie normale Laborbefunde hatten.

Die Ergebnisse dreier Probanden (AN 212, AN 217, AN 232) konnten aufgrund vorzeitiger Beendigung der Studie wegen Antibiotikaeinnahme und dadurch Veränderung der Darmflora

bzw. wegen fehlender Compliance (mehrere Stuhlproben nicht abgegeben, evtl. fehlerhafte oder unregelmäßige Einnahme von Studienmedikation oder Markerkapseln) nicht berücksichtigt werden.

Das Studienprotokoll ist von der Ethikkommission der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn beraten worden, und alle Probanden haben schriftlich ihr Einverständnis gegeben, an der Studie teilzunehmen.

4.1.5 Ergebnisse der Studie

Die intestinale Cholesterinresorption wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Chol - Res [\%]} = \left[1 - \frac{\frac{m(d_6 - \text{Cholesterin}_{\text{Fäzes}}) + m(d_6 - \text{Coprostanol}_{\text{Fäzes}}) + m(d_6 - \text{Coprostanon}_{\text{Fäzes}})}{m(d_4 - \text{Sitostanol}_{\text{Fäzes}})}}{\frac{m(d_6 - \text{Cholesterin}_{\text{Kapsel}})}{m(d_4 - \text{Sitostanol}_{\text{Kapsel}})}} \right] \times 100$$

Gleichung 4.1: Berechnung der Cholesterinresorption

Chol-Res: Cholesterinresorption [%]
m: Masse [µg]

d_6 -Coprostanol und d_6 -Coprostanon, die durch Metabolisierung des d_6 -Cholesterins durch Darmbakterien entstehen (Kapitel 2.1.1.2), müssen dabei mit erfaßt werden, um den durch Metabolisierung entstandenen Verlust an Cholesterin zu berücksichtigen. Voraussetzung für die Richtigkeit der oben aufgeführten Formel (Gleichung 4.1) ist jedoch, daß die beiden Metabolisierungsprodukte des d_6 -Cholesterins - d_6 -Coprostanol und d_6 -Coprostanon - nicht aus dem Darmlumen resorbiert werden können, da sonst ein fehlerhaftes Ergebnis ermittelt würde. Bhattacharyya fand, daß es sich bei Coprostanol um ein nicht resorbierbares Sterol handelt (117), jedoch konnten auch durch eine intensive Literaturrecherche keine Angaben darüber gefunden werden, ob es sich bei Coprostanon ebenfalls um ein nichtresorbierbares Steroid handelt. Da aber bei der Metabolisierung von Cholesterin zum größten Teil Coprostanol und nur zu einem sehr kleinen Teil Coprostanon gebildet wird (21), führt eine eventuelle Resorption des Coprostanons zu keiner nennenswerten Verfälschung der Ergebnisse für die Cholesterinresorption. Zudem wurde aus den in Kapitel 3.2.5.1 genannten Gründen Coprostanon im Rahmen dieser Arbeit nicht in die Berechnung mit einbezogen.

Die Probanden erhielten Markerkapseln mit den stabilen Isotopen d_6 -Cholesterin, d_6 -Campesterin und d_6 -Sitosterin, die aufgrund ihrer Deuterium-Markierung gaschromatographisch-massenspektrometrisch von den jeweiligen nicht markierten im Körper

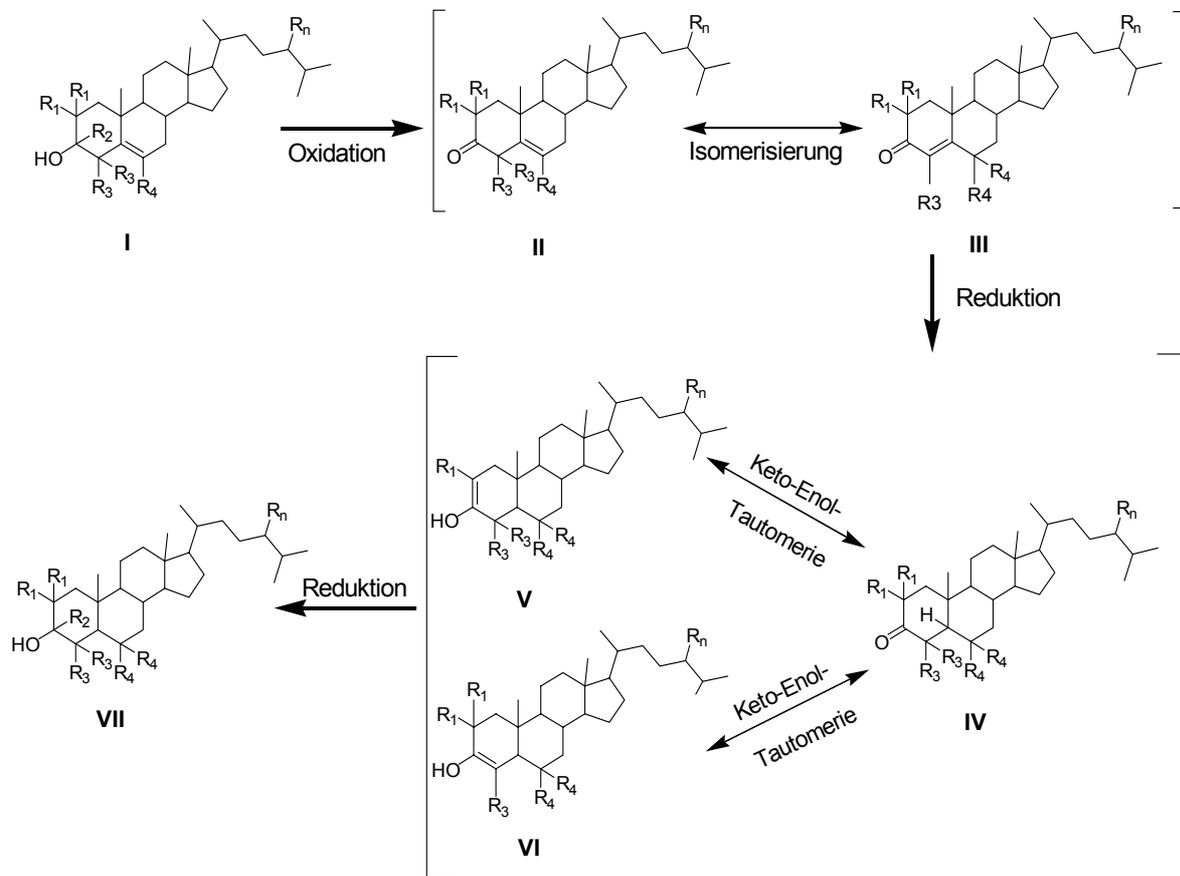
vorkommenden Sterolen unterschieden werden können (Kapitel 4.1.3). Da jeweils nur ein Aliquot der pro Tag ausgeschiedenen Stuhlmenge von den Probanden gesammelt und im Labor analysiert wurde, mußte den Kapseln ein nicht resorbierbarer Flow-Marker, das d₄-Sitostanol, zugesetzt werden.

Der Flow-Marker d₄-Sitostanol muß ähnlich einem internen Standard verschiedene Voraussetzungen erfüllen. Er darf nicht aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert werden. Er sollte nicht von den im Darm befindlichen Bakterien metabolisiert werden und er sollte mit etwa den gleichen Eigenschaften wie die zu messenden Substanzen durch den Magen-Darm-Trakt transportiert werden. Außerdem sollte er sich bei der Probenaufarbeitung etwa gleich verhalten wie die anderen zu extrahierenden Substanzen, das heißt er sollte eine vergleichbare Molekülgröße und Löslichkeit besitzen, um korrekt erfaßt werden zu können. Es ist von Vorteil, wenn der Flow-Marker mit denselben analytischen Methoden wie die zu messenden Substanzen erfassbar ist. In der GC/MS-Analytik sollte er somit eine ähnliche Retentionszeit wie die zu bestimmenden Substanzen besitzen, jedoch sauber von diesen abtrennbar sein, und er sollte ein identisches bzw. ähnliches Derivatisierungs- und Verdampfungsverhalten aufweisen. Bezüglich des d₄-Sitostanol liegen aus bereits durchgeführten Untersuchungen und Studien viele Daten vor, die diese Voraussetzungen bestätigen (11, 29, 60, 112).

Durch das gemessene Verhältnis von d₆-markiertem Cholesterin und der Metaboliten im Stuhl zu d₄-Sitostanol sowie durch das Verhältnis von d₆-Cholesterin zu d₄-Sitostanol in den Markerkapseln konnte das relative Verschwinden von Cholesterin aus dem Darmlumen und damit die Resorption von Cholesterin berechnet werden (Gleichung 4.1).

Aufgrund des Einsatzes von ringmarkiertem Campesterin bzw. Sitosterin konnte keine Analyse der entsprechenden Metabolisierungsprodukte und folglich auch keine Resorption der beiden Phytosterole ermittelt werden. Grund dafür war die Elimination der Deuterium-Atome durch die im Darm stattfindende bakterielle Metabolisierung (Abbildung 4.2). Durch Oxidation der Hydroxylgruppe an Position C-3 wird das an C-3 vorhandene Deuterium-Atom eliminiert (II). Aufgrund der Elektronegativität des Sauerstoffs an C-3 kommt es zur Isomerisierung der Doppelbindung, durch welche die beiden Deuterium-Atome an C-4 und das Deuterium-Atom an C-6 ebenfalls eliminiert werden können (II, III). Es erfolgt Reduktion zum Methyl- bzw. Ethylcoprostanon. In leicht basischem Milieu, welches im Darm vorzufinden ist, wird bei diesem Molekül die Keto-Enol-Tautomerie stark begünstigt. Das führt schließlich dazu, daß die beiden Deuterium-Atome an C-2 und C-4 des Moleküls ebenfalls durch Wasserstoffatome ausgetauscht werden können (IV, V, VI), so daß nach

erfolgter Darmpassage die Markierung der Substanzen teilweise bzw. komplett verloren geht (VII).



I:	R ₁ = D	II/III:	R ₁ = D	IV/V/VI:	R ₁ = D od. H	VII:	R ₁ = D od. H
	R ₂ = D		R ₂ = fällt weg		R ₃ = D od. H		R ₂ = H
	R ₃ = D		R ₃ = D od. H		R ₄ = D od. H		R ₃ = D od. H
	R ₄ = D		R ₄ = D od. H				R ₄ = D od. H

Abbildung 4.2: Elimination der Deuterium-Atome während der Metabolisierung

Die Werte für die zur Ermittlung der Cholesterinresorption zu berücksichtigenden Substanzen d₆-Coprostanol, d₆-Cholesterin und d₄-Sitostanol sowie die daraus errechnete Cholesterinresorption sind im Anhang A für jeden Probanden in der jeweiligen Behandlungsphase aufgelistet.

In Abbildung 4.3 ist die Cholesterinresorption in den unterschiedlichen Behandlungsphasen dargestellt. Verwendet wurden hierfür jeweils die Mittelwerte aus 4 Messungen entsprechend der pro Phase abgegebenen 4 Stuhlproben jedes Probanden.

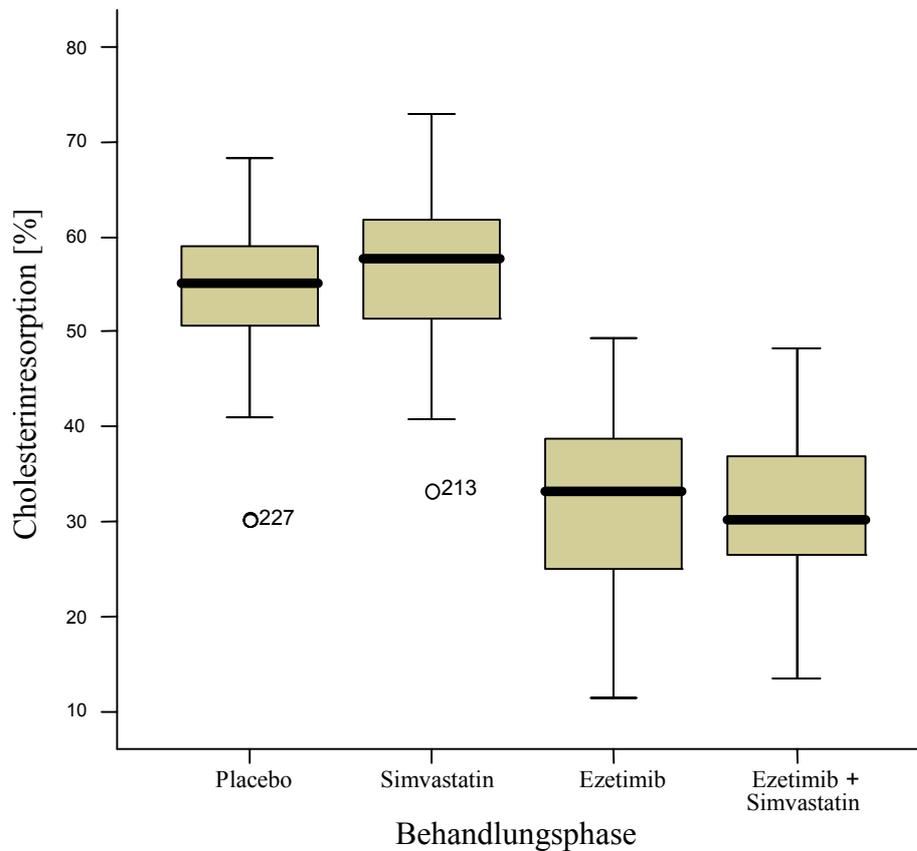


Abbildung 4.3: Cholesterinresorption in den unterschiedlichen Behandlungsphasen

Unter der Placebo-Gabe betrug die mittlere Cholesterinresorption $54,1 \pm 8,6$ %. Unter der Simvastatin-Gabe betrug die mittlere Cholesterinresorption $56,2 \pm 8,6$ %. Unter der Ezetimib-Gabe betrug die mittlere Cholesterinresorption $31,8 \pm 9,8$ % und unter der kombinierten Gabe von Ezetimib und Simvastatin betrug die mittlere Cholesterinresorption $31,4 \pm 8,9$ %.

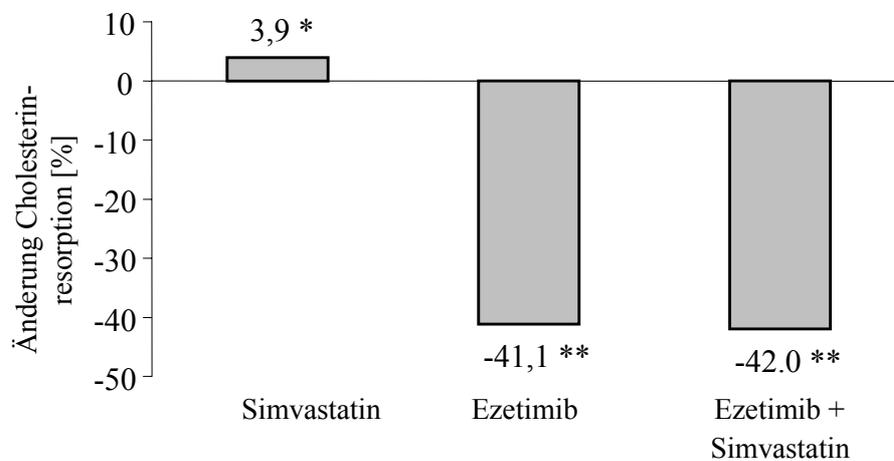


Abbildung 4.4: Prozentuale Änderung der Cholesterinresorption bezogen auf Placebo

*: $p < 0,05$, **: $p < 0,001$

Damit konnte bezogen auf die Cholesterinresorption unter Placebo durch Gabe von Simvastatin eine Zunahme der mittleren Cholesterinresorption um 3,9 % ($p < 0,05$) berechnet werden. Für die Ezetimib-Phase konnte eine Abnahme der mittleren Cholesterinresorption um 41,1 % ($p < 0,001$) berechnet werden. Für die Ezetimib-Simvastatin-Phase wurde eine Abnahme der mittleren Cholesterinresorption von 42,0 % ($p < 0,001$) berechnet (Abbildung 4.4).

Des Weiteren konnte festgestellt werden, daß die cholesterinresorptionshemmende Wirkung von Ezetimib erhebliche interindividuelle Unterschiede bei den einzelnen Probanden zeigte (Abbildung 4.5). Auf welche Ursachen dies zurückzuführen ist, wurde im Rahmen dieser Studie nicht untersucht. Jedoch sind zukünftige Untersuchungen geplant, um herauszufinden, welche Unterschiede zwischen Ezetimib-Respondern und Non-Respondern existieren.

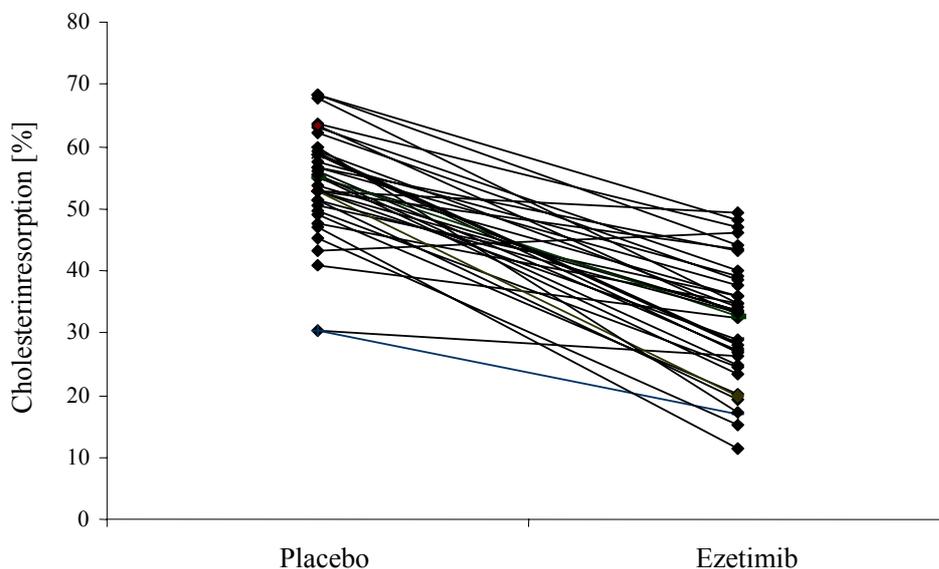


Abbildung 4.5: Individuelle Cholesterinresorption nach einer 7-wöchigen Therapie mit Placebo und Ezetimib

Um jedoch die Bedeutung der Abnahme der Cholesterinresorption in der Behandlungsphase mit Ezetimib bzw. der Kombination aus Ezetimib und Simvastatin richtig interpretieren und einordnen zu können, sollte diese auch im Zusammenhang mit der endogenen Cholesterinbiosynthese, die es als sekundäres Studienziel außerhalb dieser Arbeit zu bestimmen galt, in den entsprechenden Behandlungsphasen betrachtet werden.

Die Cholesterinbiosynthese läßt sich aus der Bestimmung der sog. „fecal balance“, der Summe an neutralen und sauren Sterolen, die pro Tag mit dem Stuhl ausgeschieden werden, und der Menge an durch die Nahrung aufgenommenem Cholesterin berechnen. Die Menge des mit der Nahrung zugeführten Cholesterins wurde aus den von den Probanden geführten

Ernährungstagebüchern mit Hilfe der Software Prodi[®] 4.5 ermittelt. Durch Subtraktion des Nahrungscholesterins von der Summe aus neutralen und sauren Sterolen, die pro Tag ausgeschieden wurden (fecal balance), war es möglich, die endogene Cholesterinbiosynthese zu ermitteln.

In Abbildung 4.6 sind die aus jeweils 4 Messungen von 4 Stuhlproben gebildeten Mittelwerte der endogenen Cholesterinbiosynthese von allen 38 Probanden gezeigt. Dem Schaubild ist eine gegenüber Placebo stark angestiegene Biosynthese unter Ezetimib-Monotherapie zu entnehmen, die durch die Kombination mit Simvastatin wieder leicht zurückgeht.

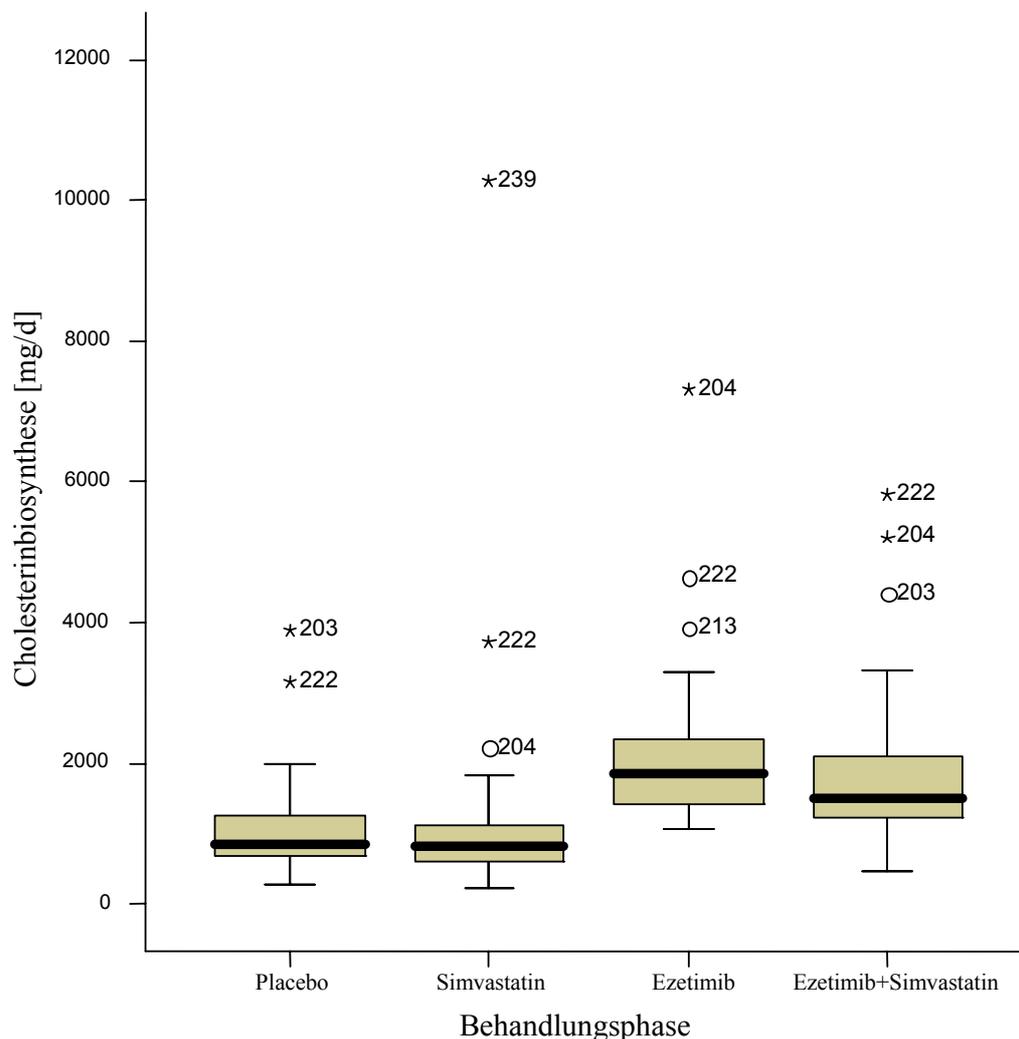


Abbildung 4.6: Cholesterinbiosynthese in [mg/d]

Die aus dem Schaubild ersichtlichen Ausreißer und Extremwerte weisen teilweise sehr hohe Werte für die Cholesterinbiosynthese auf. Diese kamen vermutlich durch eine fehlerhafte Einnahme der Markerkapseln (Einnahme wurde vergessen?) oder durch fehlerhaft geführte Ernährungsprotokolle mit einer daraus resultierenden zu hohen „fecal balance“ und folglich

einer zu hohen Cholesterinbiosynthese zustande. Unter Simvastatin-Therapie konnte gegenüber Placebo keine Reduktion der Cholesterinbiosynthese festgestellt werden. Der Mittelwert für die Cholesterinbiosynthese aller 38 Meßwerte ergab für die Placebo-Phase 1080 mg/dl und für die Simvastatin-Phase 1202 mg/dl. Jedoch kann die höhere Cholesterinbiosynthese in der Simvastatin-Phase durch den bei Proband 239 gemessenen unnatürlich hohen Wert, der in Abbildung 4.6 als Extremwert markiert ist, erklärt werden. Es ist anzunehmen, daß dieser Proband die Einnahme der Markerkapseln in dieser Behandlungsphase vergessen hat.

Betrachtet man den Verlauf der Cholesterinbiosynthese parallel zum Verlauf der intestinalen Cholesterinresorption so ist zu erkennen, daß sich diese annähernd spiegelbildlich zueinander verhalten (Abbildung 4.7). Bezogen auf Placebo konnte gezeigt werden, daß eine verminderte Cholesterinbiosynthese in der Simvastatin-Phase mit einer hohen Cholesterinresorption einhergeht, daß in der Ezetimib-Phase eine stark gesenkte Cholesterinresorption einer gesteigerten endogenen Cholesterinbiosynthese gegenübersteht, und daß eine in der Kombinationsphase von Ezetimib und Simvastatin verminderte Cholesterinresorption von einer gesteigerten Cholesterinbiosynthese begleitet wird, die aber einen geringeren Wert als unter Ezetimib-Monotherapie aufweist.

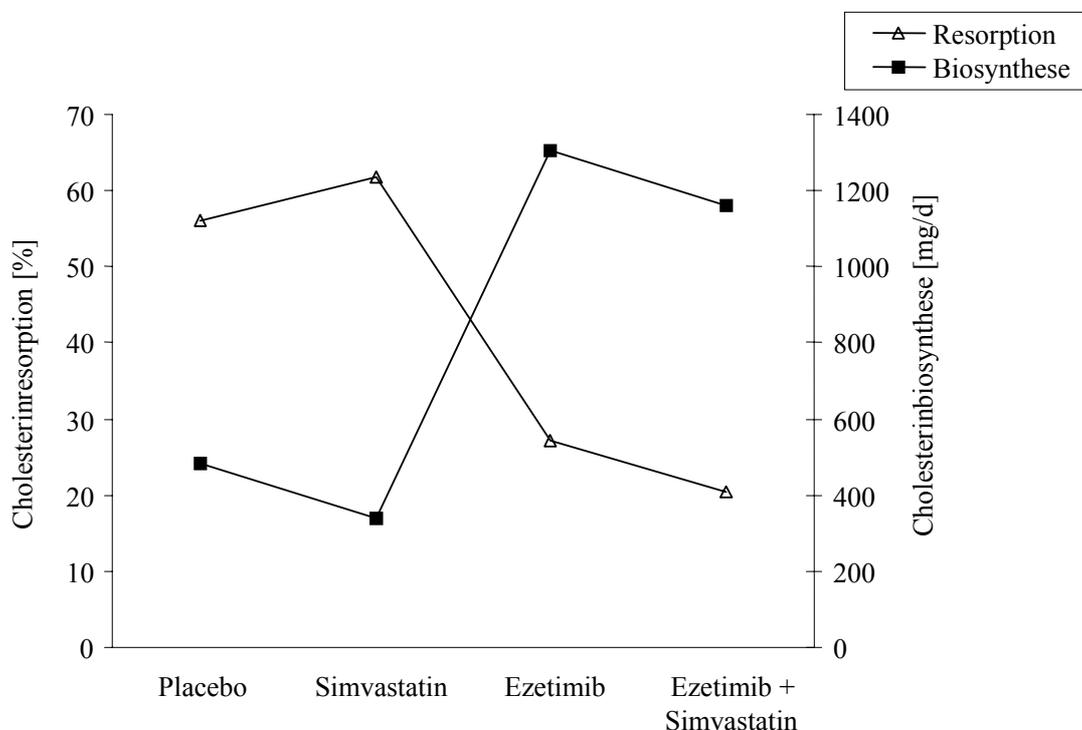


Abbildung 4.7: Cholesterinresorption und Cholesterinbiosynthese von Proband 201

Beispielhaft hierfür wurden die Werte für die Cholesterinresorption und für die Cholesterinbiosynthese eines Probanden herausgegriffen und im Schaubild dargestellt (Abbildung 4.7).

Außerdem konnte über die Quantifizierung der einzelnen Substanzen das Ausmaß der Metabolisierung und damit das prozentuale Vorkommen von d_6 -Coprostanol und d_6 -Cholesterin während der verschiedenen Behandlungsphasen ermittelt werden (d_6 -Coprostanol konnte aus den in Kapitel 3.2.5.1 genannten Gründen nicht berücksichtigt werden). Bisher war unbekannt, ob die Gabe von Ezetimib zu einem veränderten Verhalten der Darmbakterien und dadurch zu einem veränderten Ausmaß der Metabolisierung von Cholesterin führt.

Mittels der durchgeführten Messungen konnte gezeigt werden, daß weder Ezetimib alleine verabreicht, noch die Kombination von Ezetimib und Simvastatin, noch Simvastatin alleine verabreicht zu einer nennenswerten Veränderung des Metabolisierungsmusters von Cholesterin führte.

In Abbildung 4.8 wird die prozentuale Verteilung von d_6 -Coprostanol und d_6 -Cholesterin in den einzelnen Behandlungsphasen dargestellt. Die entsprechenden Einzelwerte sind dem Anhang A zu entnehmen.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Meßwerte für den Flow-Marker d_4 -Sitostanol zeigen ebenfalls über alle Behandlungsphasen sehr konstant bleibende Konzentrationen (Abbildung 4.9).

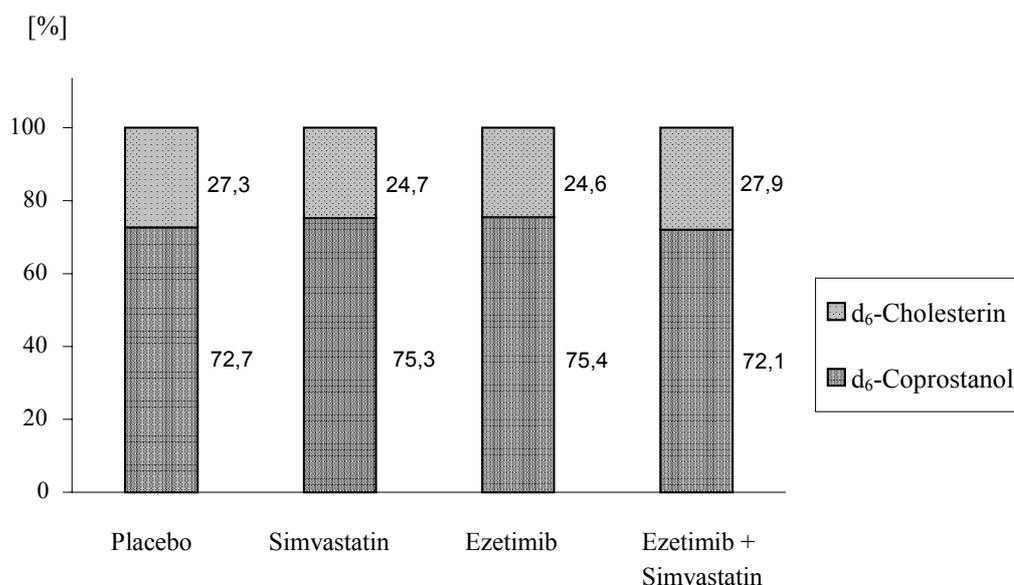


Abbildung 4.8: Prozentuale Verteilung von d_6 -Coprostanol und d_6 -Cholesterin in den einzelnen Behandlungsphasen

Die Unterschiede für die d_4 -Sitostanol-Konzentration in den jeweiligen Behandlungsphasen sind nicht signifikant.

Die Entwicklung dieser Methode, mit welcher alle zu messenden Substanzen über Kalibriergeraden quantifiziert werden können, erlaubt somit auch eine Überprüfung der Tauglichkeit des eingesetzten d_4 -Sitostanol als sog. „Flow-Marker“ zur Bestimmung der intestinalen Cholesterinresorption.

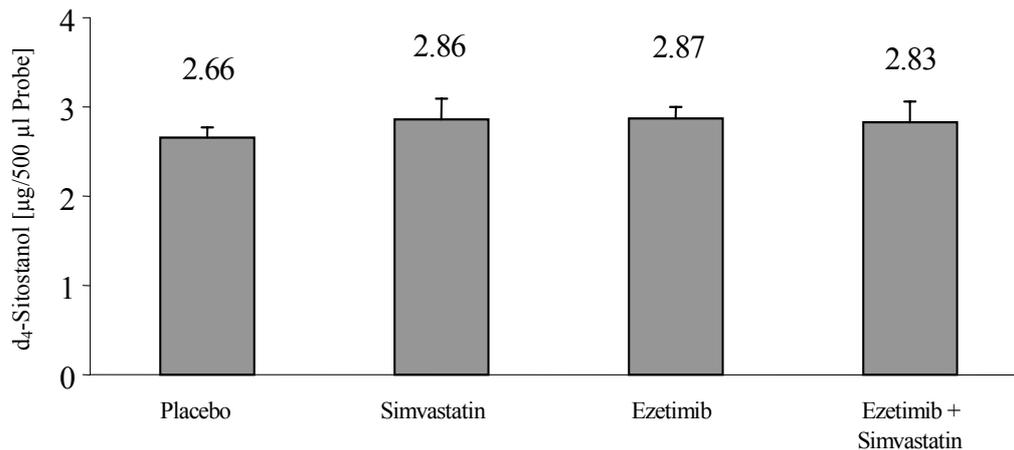


Abbildung 4.9: Menge an d_4 -Sitostanol in den unterschiedlichen Behandlungsphasen

4.1.6 Methodenvergleich

Durch den Vergleich der bisher verwendeten Meßmethode, die eine Berechnung der Cholesterinresorption über gaschromatographisch-massenspektrometrisch bestimmte Flächen der Analyten beinhaltet (Methode I, Flächenmethode) und der in dieser Arbeit etablierten Methode über eine Quantifizierung der jeweiligen Analyten (Methode II, Quantifizierungsmethode) sollte überprüft werden, inwieweit die Ergebnisse der beiden Methoden übereinstimmen.

Die Vorgehensweise bei der Probenaufarbeitung verläuft bei beiden Methoden identisch, jedoch ist die zusätzliche Erstellung und Messung von Kalibrationsgeraden bei Methode II erforderlich. Bei Anwendung der Methode I müssen gaschromatographisch sog. Korrekturfaktoren ermittelt werden, um eine unterschiedliche Fragmentierung der Analyten im Massenspektrometer korrigieren zu können (siehe unten), so daß der Zeitaufwand bei beiden Methoden nahezu identisch ist.

Bei Methode I wird die Resorption der Sterole über die gaschromatographisch-massenspektrometrisch gemessenen Flächen von d_6 -Cholesterin, d_6 -Coprostanol und d_6 -

Coprostanon berechnet. Um diese Flächen addieren zu können (Gleichung 4.1), muß zuvor aufgrund ihres unterschiedlichen massenspektrometrischen Fragmentierungsverhaltens eine Multiplikation mit einem Korrekturfaktor erfolgen. Die Ermittlung der Korrekturfaktoren erfolgt durch gaschromatographisch-massenspektrometrische Messung einer Cholesterin-, Coprostanol- und Coprostanonlösung bekannter und genau gleicher Konzentration. Durch Bildung zum einen des Quotienten aus den Signalflächen des unmarkierten Coprostanols und des unmarkierten Cholesterins und zum anderen des Quotienten aus den Signalflächen des unmarkierten Coprostanons und des unmarkierten Cholesterins werden die Korrekturfaktoren ermittelt, mit denen die Signalflächen des gemessenen d_6 -Coprostanols bzw. d_6 -Coprostanons multipliziert werden müssen. Die Ermittlung der Korrekturfaktoren muß für jede Probensequenz neu durchgeführt werden.

Durch den Einsatz von synthetisierten Referenzsubstanzen bei Methode II entfällt die Ermittlung von Korrekturfaktoren zur Berichtigung der unterschiedlichen Fragmentierung der jeweiligen Analyten und es ergeben sich einfach nachvollziehbare Rechenoperationen.

Inwieweit die beiden Methoden hinsichtlich der Meßergebnisse übereinstimmen, wird im folgenden erläutert.

Werden die Daten, die man mittels Bestimmung der intestinalen Cholesterinresorption nach Methode I erhält, mit den Daten, die man mit Methode II erhält, in einem X-Y-Plot dargestellt, kann ein erster Eindruck darüber gewonnen werden, wie gut die Ergebnisse beider Methoden miteinander korrelieren. In Abbildung 4.10 ist der X-Y-Plot für die Meßergebnisse aus den beiden Meßmethoden dargestellt. Aus dieser Abbildung ist eine sehr gute Korrelation der Meßergebnisse beider Methoden nachweisbar. Die zugehörige Regressionsgerade zeigt einen Ordinatenabschnitt von $b = -1,964$, sowie eine Steigung von $m = 0,951$ und einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,9657$. Die Betrachtung der Korrelation zweier Methoden im X-Y-Plot ist jedoch für die Beurteilung der Übereinstimmung der Methoden nicht ausreichend, da der Korrelationskoeffizient zwar den linearen Zusammenhang zwischen zwei Meßreihen charakterisiert, nicht aber die Höhe der Meßwerte. So kann eine aus einem Methodenvergleich stammende Regressionsgerade mit einem Korrelationskoeffizienten von $r=1$ charakterisiert sein, wenn die Meßergebnisse der einen Methode jeweils immer um denselben Betrag höher liegen als die Meßergebnisse der anderen Methode.

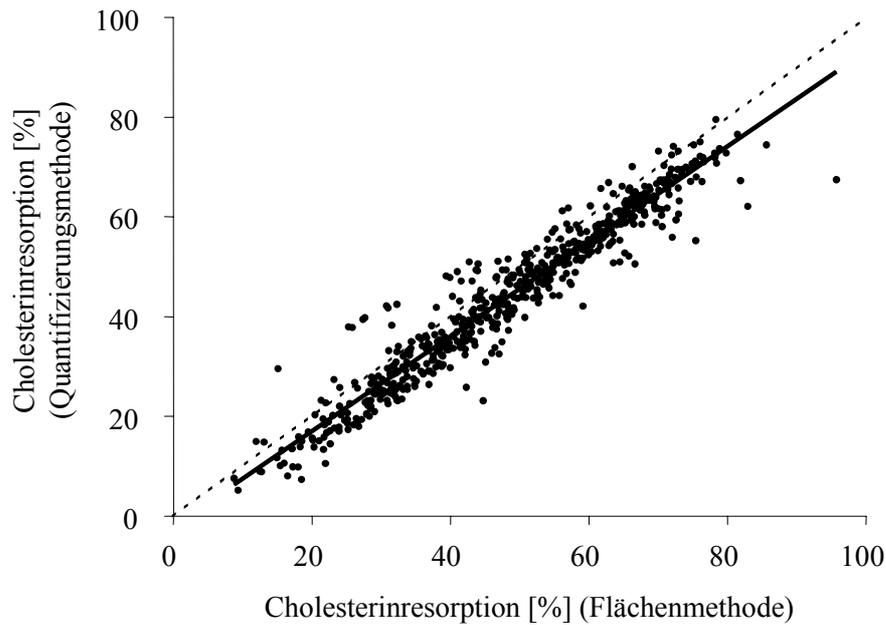


Abbildung 4.10: Gesamtkorrelation der Ergebnisse von Flächen- und Quantifizierungsmethode; Regressionsgerade: $y = 0,951x - 1,964$ $r = 0,9657$

Abbildung 4.11 bis Abbildung 4.14 zeigen die Korrelation von Quantifizierungs- und Flächenmethode in den einzelnen Behandlungsphasen (verwendet wurden die Mittelwerte aus jeweils 4 abgegebenen Stuhlproben).

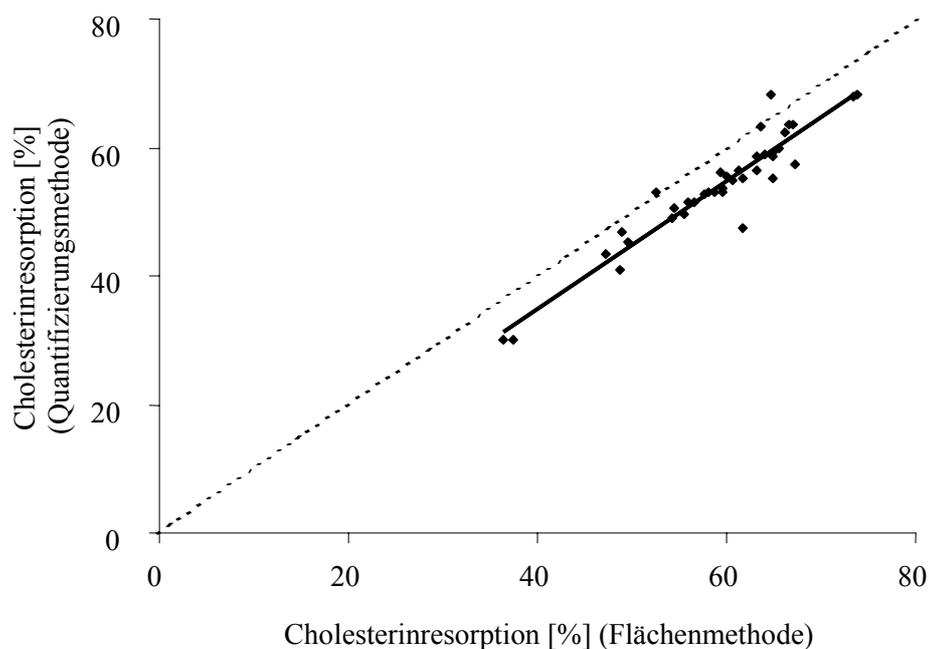


Abbildung 4.11: Methodenvergleich Placebo-Phase
Regressionsgerade: $y = 0,997x - 4,938$ $r = 0,9434$

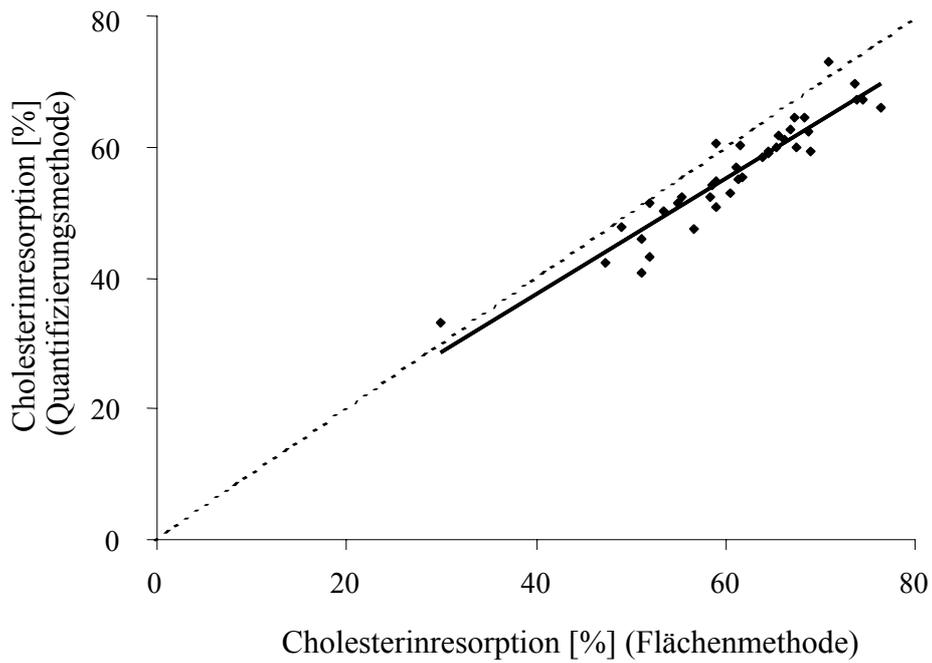


Abbildung 4.12: Methodenvergleich Simvastatin-Phase
 Regressionsgerade: $y = 0,881x + 2,383$ $r = 0,9361$

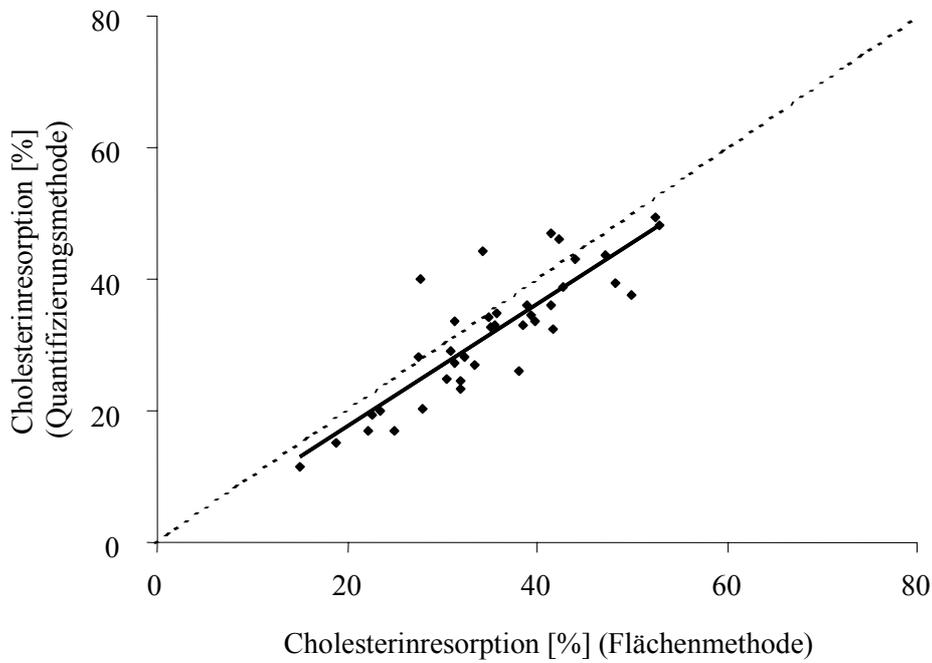


Abbildung 4.13: Methodenvergleich Ezetimib-Phase
 Regressionsgerade: $y = 0,924x - 0,707$ $r = 0,8566$

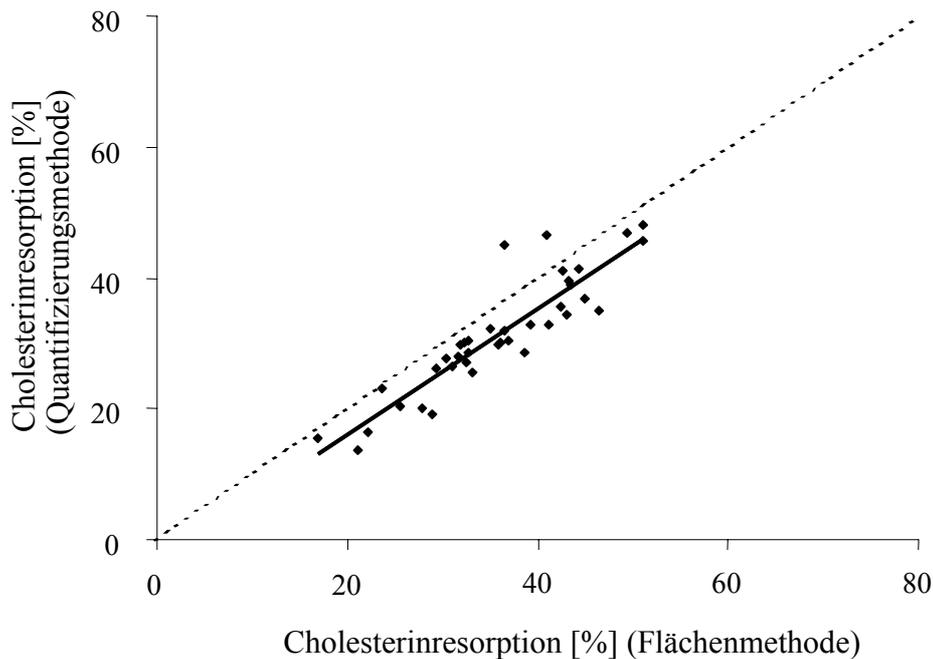


Abbildung 4.14: Methodenvergleich Ezetimib-Simvastatin-Phase

Regressionsgerade: $y = 0,971x - 3,429$ $r = 0,9301$

Die X-Y-Plots zeigen, daß in allen 4 Behandlungsphasen eine sehr gute Korrelation zwischen den Ergebnissen der Flächen- und Quantifizierungsmethode besteht. Die Anwendung der Flächenmethode liefert nur gering höhere Werte für die Cholesterinresorption als die Anwendung der Quantifizierungsmethode. Die Ursache dafür ist unklar. Es könnte sich um einen systematischen Fehler bei der Ermittlung der Ergebnisse nach der Flächenmethode handeln, der in Zusammenhang mit der am Anfang des Kapitels beschriebenen Bestimmung der Korrekturfaktoren stehen könnte. Generell handelt es sich bei der Flächenmethode um eine nicht validierbare Methode, bei der unterschiedliche Fehlerquellen zu fehlerhaften Ergebnissen führen können (Kapitel 4.1.7).

Eine Darstellung der erhaltenen Meßwerte im Box-Whisker-Diagramm (Abbildung 4.15), in dem zwischen dem 25 %- und dem 75 %-Perzentil ein Kasten aufgebaut wird, in den 50 % der Beobachtungen fallen, zeigt, daß diese 50 % der Meßwerte bei der Bestimmung der Cholesterinresorption nach Methode I nur wenig höher liegen als bei Methode II und beide Methoden vergleichbare Ergebnisse liefern. Weder mit der Darstellung der Meßwerte im X-Y-Plot und der daraus resultierenden Regressionsgeraden noch mit der Darstellung der Meßwerte im Box-Whisker-Diagramm kann das Maß der Übereinstimmung der beiden Methoden in einen Zahlenwert gefaßt werden.

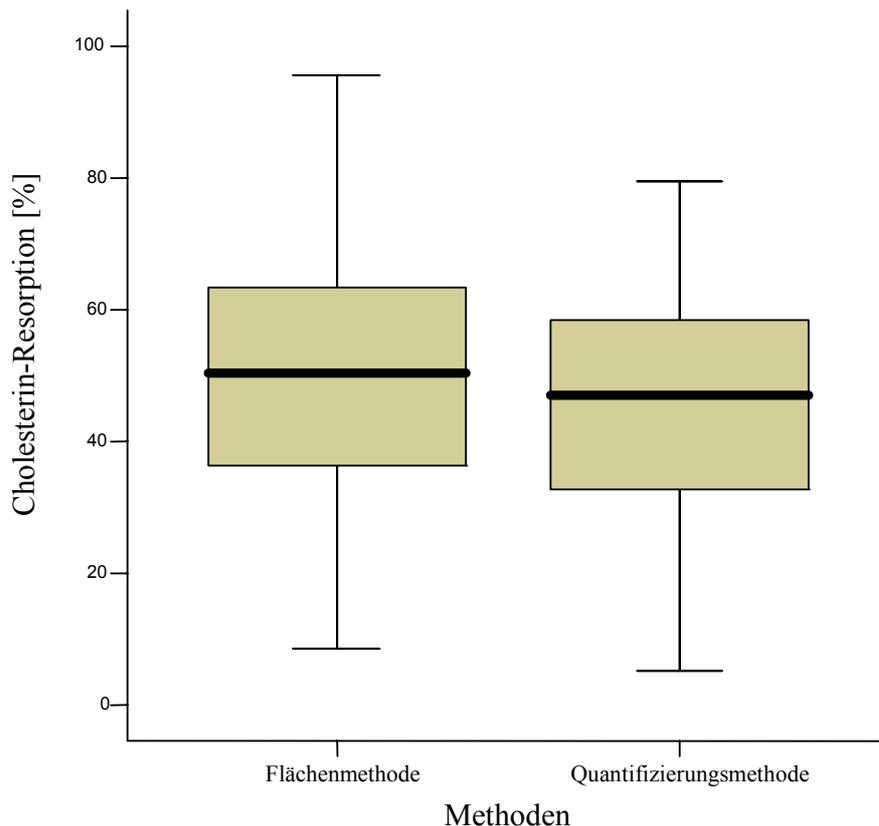


Abbildung 4.15: Cholesterinresorption berechnet nach Flächen- und Quantifizierungsmethode

Solch einen Zahlenwert erhält man jedoch bei der Bestimmung des Ausmaßes der Übereinstimmung zweier Methoden in Form des intraclass correlation coefficient (ICC) (118). Der ICC wird mittels Varianzanalyse mit Meßwiederholung berechnet. In den ICC fließen die Quadratsumme der Abweichungen der Ergebnisse zwischen den Proben eines einzelnen Probanden und die Quadratsumme der Abweichungen der Ergebnisse jeweils zwischen den beiden Methoden ein.

Für die beiden hier zu vergleichenden Methoden bei einer Probenanzahl von $n=630$ ist der $ICC=0,966$ mit einem Konfidenzintervall von $0,959$ bis $0,970$. Die bestmögliche Übereinstimmung zweier Methoden läge bei einem $ICC=1$ vor, so daß bei dem hier durchgeführten Methodenvergleich mit einem $ICC=0,966$ eine sehr gute Übereinstimmung der beiden Methoden festgestellt werden konnte.

Abschließend ist zu sagen, daß es mit der Entwicklung dieser neuen Methode gelungen ist, eine validierbare analytische Meßmethodik zur Bestimmung der intestinalen Cholesterinresorption zu etablieren, die den heutigen Anforderungen im Bereich der bioanalytischen Methodenentwicklung Rechnung trägt und eine gute Übereinstimmung mit der ihr zugrunde liegende Methode zeigt.

4.1.7 Diskussion

Die Cholesterinhomöostase im Körper wird durch verschiedene Mechanismen, die für ein Gleichgewicht zwischen Aufnahme und Ausscheidung von Cholesterin sorgen, aufrecht erhalten. Eine erhöhte Konzentration von Cholesterin im Plasma gilt als bedeutender Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen (119). Vor diesem Hintergrund kommt der Untersuchung der intestinalen Cholesterinresorption, die wesentlich zur Cholesterinhomöostase beiträgt, eine wichtige Bedeutung zu.

In den letzten 40 Jahren wurde eine Vielzahl von Methoden zur Bestimmung der Cholesterinresorption entwickelt. Diese Methoden können eingeteilt werden in Methoden, bei denen radioaktive Isotope zum Einsatz kommen, in Methoden, bei denen stabile Isotope verwendet werden und in Methoden, bei denen stabile Perfusionen angewendet werden (13). Die in dieser Arbeit entwickelte Methode beinhaltet die Verwendung stabiler Isotope und ist eine Variation der von Lütjohann et al. etablierten Methode (11). Sie basiert auf der *continuous isotope feeding method* von Crouse und Grundy (116).

Der Einsatz stabiler Isotope zeigt gegenüber dem Einsatz radioaktiver Isotope erhebliche Vorteile. Es besteht kein Risiko für die Probanden und entsprechende Untersuchungen könnten auch bei Frauen im gebärfähigen Alter und sogar bei Kindern durchgeführt werden.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten eine hochsignifikante Senkung der Cholesterinresorption während der Gabe von Ezetimib (-41,1 %) bzw. einer Kombination von Ezetimib und Simvastatin (-42,0 %) verglichen mit der Cholesterinresorption unter Placebo (Abbildung 4.4).

Vergleichbare Ergebnisse konnten bei der von Sudhop et al. durchgeführten Untersuchung zur Bestimmung der Cholesterinresorption festgestellt werden (60). Bei dieser Studie wurde unter der Behandlung mit Placebo eine Resorption von $49,8 \pm 13,8$ % und unter Ezetimib eine Resorption von $22,7 \pm 25,8$ % ermittelt. Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen ergaben eine Cholesterinresorption von $54,1 \pm 8,6$ % in der Placebo-Phase und $31,8 \pm 9,8$ % in der Ezetimib-Phase und damit eine vergleichbare Cholesterinresorption, die sich nur um eine 4,3 % höhere Cholesterinresorption in der Placebo-Phase und um 9,1 % höhere Cholesterinresorption in der Ezetimib-Phase unterschied. Die Ursachen für die geringen Unterschiede bezüglich der Cholesterinresorption gegenüber der zuvor durchgeführten Studie (60) liegen möglicherweise in unterschiedlichen analytischen Bedingungen bei der Bestimmung der Cholesterinresorption, in einer höheren Probandenanzahl (38 gegenüber 18 Probanden) sowie in einer kürzeren Behandlungsdauer

der Patienten in der zuerst durchgeführten Studie (2 Wochen gegenüber 7 Wochen). Im Vergleich dazu liegt die Behandlungsdauer für weitere klinische Studien zur Beurteilung der Wirksamkeit von Ezetimib bei 8-12 Wochen (61). Bei einer Behandlungsdauer von lediglich zwei Wochen konnten sich möglicherweise noch keine stabilen Resorptionsbedingungen einstellen. Ein Vergleich der in der jetzigen Arbeit erhaltenen Ergebnisse für die Cholesterinresorption unter der Therapie mit Ezetimib kann nur mit den Ergebnissen der von Sudhop et al. durchgeführten Studie erfolgen, da bisher keine weiteren Untersuchungen zur Cholesterinresorption unter Gabe von Ezetimib durchgeführt wurden.

Der für die Hemmung der Cholesterinresorption zugrunde liegende Wirkmechanismus ist bisher noch nicht abschließend geklärt. Einerseits konnte festgestellt werden, daß Ezetimib weder Veränderungen in der Zusammensetzung und Größe des Gallensäurepools auslöst noch die Expression von Proteinen beeinflusst, die für den Transport von Sterolen aus den Enterozyten zurück ins Darmlumen verantwortlich sind, sondern, daß Ezetimib die Aufnahme von Sterolen aus dem Darmlumen über die im Dünndarm vorhandenen Microvilli inhibiert (120). Andererseits konnten in verschiedenen Studien Hinweise darauf gefunden werden, daß die Wirkung von Ezetimib möglicherweise auf der Hemmung des NPC1L1-Transporters oder zugehöriger Untereinheiten beruht (26, 55, 56, 121). Diese Aussagen wurden jedoch in einer von Kramer et al. veröffentlichten Studie widerlegt. Danach konnte die Aminopeptidase N als ein molekulares Target für Ezetimib identifiziert werden (57).

Wie in der zuvor von Sudhop et al. durchgeführten Studie (60) wurde auch im Rahmen dieser Studie ein Anstieg der Cholesterinbiosynthese unter Ezetimib-Therapie festgestellt (Abbildung 4.6). Bei der ersteren handelte es sich um einen Anstieg von 90 %, bei der letzteren um einen Anstieg von fast 100 % gegenüber Placebo.

Die Ursache des Anstiegs der Cholesterinbiosynthese unter der Therapie mit einem Cholesterin-Resorptionshemmer ist durch eine deutlich verminderte intestinale Cholesterinresorption zu erklären, die auf eine Aktivierung des Schlüsselenzyms der Cholesterinbiosynthese, der HMG-CoA-Reduktase, zurückzuführen ist (55, 122).

Nahezu identische Werte für die Cholesterinresorptionshemmung konnten in der Ezetimib- und in der Kombinationstherapie (Ezetimib plus Simvastatin) (Abbildung 4.4) ermittelt werden. Die Monotherapie mit Ezetimib führte jedoch zu einer LDL-C-Senkung um ca. 20 %; die Senkung des LDL-C in der Kombinationsphase betrug hingegen mehr als 50 % (unveröffentlichte Daten). Diese Ergebnisse zeigen sehr deutlich den Vorteil einer Kombinationstherapie von Ezetimib und Simvastatin gegenüber einer Ezetimib- bzw. Simvastatin-Monotherapie. Die durch die Resorptionshemmung gesteigerte

Cholesterinbiosynthese wird durch eine Hemmung der HMG-CoA-Reduktase mit Simvastatin kompensiert. Diese additive Wirkung von Cholesterinresorptions- und HMG-CoA-Reduktase-Hemmer führt zu einer deutlicheren Reduktion des LDL-C im Plasma als eine Verdoppelung der Statindosis. Aufgrund der additiven Wirkung kann eine erheblich größere Anzahl an Patienten die empfohlenen Zielkriterien der Richtlinien erreichen.

Da die Inzidenz von Nebenwirkungen und besonders von Rhabdomyolysen mit steigender Statindosis zunimmt, scheint die Kombination von Ezetimib mit einem niedrig dosierten Statin eine optimale Lösung zur effektiven Senkung des LDL-C mit erniedrigtem Risiko für Statin bedingte Nebenwirkungen zu sein. Jedoch ist zu berücksichtigen, daß im Jahre 2004 laut einer Meldung der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft im Rahmen der UAW-Spontanerfassung 15 Berichte vorlagen, die sich auf eine Myopathie unter der Therapie mit Ezetimib bezogen (67). In 10 von 15 Fällen wurde jedoch gleichzeitig mit einem Statin behandelt. In fünf der gemeldeten Fälle wurde von einer Myalgie berichtet, in vier Fällen von einer CK-Erhöhung und in sechs Fällen von einer CK-Erhöhung plus Myalgie und/oder Myopathie. Von einzelnen Patienten wurde das Statin ohne Ezetimib zuvor oder nach dem Absetzen von Ezetimib gut vertragen. Außerdem wurde in 15 weiteren Fällen von einem Anstieg von Transaminasen berichtet. In verschiedenen mit Ezetimib durchgeführten Studien konnte gegenüber der Statin-Monotherapie bzw. gegenüber Placebo keine signifikant erhöhte Häufigkeit der genannten UAW festgestellt werden (60, 62, 123-125). Die bisher als gut bewertete Verträglichkeit des Cholesterinresorptionshemmers wurde jedoch insoweit in Frage gestellt, als daß die bisher durchgeführten Studien nicht primär dafür angelegt waren, die Inzidenz von durch Ezetimib getriggerten Myopathien bei einer bereits bestehenden Statintherapie zu untersuchen (126). Dazu kommt, daß im Gegensatz zu den beiden HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren Simvastatin und Pravastatin, bei denen ein lebensverlängernder Effekt bei Patienten mit atherosklerotischen Erkrankungen belegt ist, für Ezetimib bisher noch keine Langzeitstudien vorliegen (127).

Neben der primären und der homozygoten familiären Hypercholesterinämie ist Ezetimib zugelassen für die Behandlung der Phytosterolämie, einer autosomal rezessiv vererbten Erkrankung, die mit erhöhten Plasmakonzentrationen pflanzlicher Sterole einhergeht. In einer Studie von Salen et al. wurde festgestellt, daß die Gabe von Ezetimib zu einer Reduktion der Plasmakonzentrationen von Campesterin und Sitosterin von 24 % bzw. 21 % führte (63). Zur Untersuchung der intestinalen Resorption der beiden hauptsächlich vorkommenden Phytosterole Campesterin und Sitosterin unter der Therapie mit Ezetimib liegen bisher noch keine Daten vor. Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Studie sollten erste

Erkenntnisse über das Ausmaß der Resorptionssenkung dieser beiden Phytosterole unter der Gabe von Ezetimib gewonnen werden. Jedoch konnte eine Bestimmung der Resorption von Campesterin und Sitosterin aufgrund des beschriebenen Deuteriumverlustes nicht ermittelt werden (Abbildung 4.2). Die hauptsächlich über die Bildung von Δ^4 -Campesten-3-on bzw. Δ^4 -Sitosten-3-on ablaufende indirekte Metabolisierung durch Bakterien während der Darmpassage führte zu einem teilweisen bzw. kompletten Verlust der Deuteriummarkierung und machte dadurch eine Bestimmung der intestinalen Resorption unmöglich. Für zukünftige Untersuchungen sollte die Markierung von Sitosterin und Campesterin ebenso wie von Cholesterin in der Seitenkette erfolgen. Alternativ dazu wäre auch eine Markierung der Moleküle mit ^{13}C denkbar.

Durch die Entwicklung der neuen Methode zur Bestimmung der Cholesterinresorption über eine Quantifizierung der markierten fäkalen neutralen Sterole im Rahmen dieser Arbeit ist es möglich, zukünftig mit einer nach FDA-Richtlinien validierten analytischen Methode zu arbeiten (113).

Mit dem Einsatz von Referenzsubstanzen zur Erstellung der Kalibrationsgeraden der jeweiligen Analyten konnte die Spezifität der neuen Methode gegenüber der alten erheblich gesteigert werden, da neben dem Fragmentierungsmuster die exakte Retentionszeit der Analyten bekannt war. Außerdem konnte bei der Quantifizierungsmethode im Rahmen der Validierung der lineare Bereich der Kalibrationskurven der einzelnen Analyten genau festgelegt sowie die Präzision ermittelt werden. Zusätzlich ermöglichte die Methode die Bestimmung von Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen sowie die Bestimmung der Wiederfindung der Analyten in verschiedenen Konzentrationsbereichen (Kapitel 3.2.5). Je nach Forschungsschwerpunkt kann die Quantifizierung der einzelnen Analyten für Untersuchungen eingesetzt werden, für die eine genaue Bestimmung der Masse der Analyten in den Proben gefordert ist (Kapitel 4.1.5).

Der Vergleich von Flächen- und Quantifizierungsmethode zeigte nur geringfügige Unterschiede zwischen den beiden Methoden. Die Ermittlung des ICC = 0,966 führte zu dem Ergebnis, daß zwischen den beiden Methoden eine sehr gute Übereinstimmung besteht.

Zu berücksichtigen gilt es, daß es sich bei der bisher verwendeten Flächenmethode um eine nicht validierbare Methode handelt. Deshalb ist eine Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze nicht möglich und es können keine Aussagen darüber gemacht werden, ob die ermittelten Flächen oberhalb dieser Grenzen liegen und damit verwertbare Ergebnisse darstellen oder nicht. Des weiteren ist bei der Flächenmethode die Festlegung eines linearen Meßbereiches für die einzelnen Analyten nicht möglich, so daß nicht überprüft werden kann,

ob die durch die Messung erhaltenen Ergebnisse innerhalb des linearen Bereiches liegen und damit gewertet werden können.

Die Vorbereitungen für die in dieser Arbeit entwickelte Methode nehmen gegenüber der Methode von Lütjohann et al. (11) jedoch wesentlich mehr Zeit in Anspruch bzw. verursachen höhere Kosten. Die Ursache dafür liegt in den notwendigen Synthesen der Referenzsubstanzen im Vorfeld der Studie. Die Substanzen sind momentan nur durch Auftragssynthese bzw. eigene Synthese erhältlich.

Letztendlich aber ist festzustellen, daß mögliche Fehlerquellen bei einer nicht validierten Methode nicht vorhersehbar und entstandene Fehler nicht erkennbar sind. Um verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, sollte daher eine validierte Methode zum Einsatz kommen (113).

Für die Zukunft ist es vorstellbar, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode zur Bestimmung der Cholesterinresorption als Basis für weitergehende Untersuchungen im Bereich des Cholesterinmetabolismus einzusetzen. Dazu zählt beispielsweise die Bestimmung der Cholesterinresorption unter der Therapie von eventuell zukünftigen innovativen Arzneimitteln in der Therapie von Lipidstoffwechselstörungen.

Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz dieser Methode zur Bestimmung der Cholesterinresorption im Rahmen von Untersuchungen genetischer Unterschiede zwischen Individuen, die auf eine Ezetimib-Therapie ansprechen bzw. nicht ansprechen (Responder und Non-Responder). Dieser Aspekt wurde in den bisherigen mit Ezetimib durchgeführten Studien nicht untersucht, jedoch konnten sowohl in der von Sudhop et al. durchgeführten Studie sowie auch in dieser Studie interindividuelle Unterschiede in Hinblick auf die resorptionshemmende Wirkung von Ezetimib festgestellt werden (60). Diese Untersuchungen könnten sehr bedeutend für das Erreichen von Therapiezielen und damit für den Therapieerfolg unter einer Ezetimib-Therapie sein .

Weiterhin ist denkbar, die entwickelte Methode unter Verwendung geeigneter markierter Standards auf die Bestimmung der intestinalen Resorption pflanzlicher Sterole auszuweiten und dadurch neue Erkenntnisse in Hinblick auf die seltene Erkrankung Phytosterolämie zu gewinnen, um künftig eine Optimierung der Therapiemöglichkeiten dieser Erkrankung durchführen zu können.

Zusätzlich kann die Methode als Referenzmethode für die Etablierung zukünftiger Methoden zur Bestimmung der Cholesterinresorption eingesetzt werden.

4.2 Stabilitätstest unkonjugierter (freier) UDCA in Plasmaproben

4.2.1 Hintergrund

Die Stabilität eines Arzneistoffes in biologischen Proben ist die Voraussetzung für die Durchführung pharmakokinetischer Untersuchungen. Die Ursachen für eine mögliche Beeinträchtigung der Stabilität eines Arzneistoffes können die Eigenschaften des Arzneistoffes selbst oder die Eigenschaften der biologischen Matrix, in welcher der Arzneistoff vorliegt, sein. Außerdem spielen auch äußere Einflüsse auf das gewonnene Probenmaterial, wie beispielsweise die Temperatur, eine nicht unbedeutende Rolle für die Stabilität eines Arzneistoffes.

Die Stabilität von unkonjugierter UDCA in Plasmaproben bildete die Voraussetzung für eine Bioäquivalenzstudie zweier Kapseln mit jeweils 250 mg UDCA und einer neu entwickelten Tablette mit 500 mg UDCA (Kapitel 4.3) (113). Mittels einer Stabilitätsuntersuchung sollte bewiesen werden, daß UDCA über einen bestimmten Konzentrations- und Zeitbereich in entsprechendem biologischem Material bei bestimmten Transport- und Lagertemperaturen und nach mehreren Einfrier- und Auftauprozessen stabil bleibt. Einfrier- und Auftauprozesse sind in der Bioanalytik meist nicht zu vermeiden, da beispielsweise Probenmaterial aus klinischen Studien oft nicht unmittelbar nach Probenabnahme aufgearbeitet und gemessen werden kann, sei es, weil sich Studienzentrum und analytisches Labor nicht am selben Ort befinden, oder weil die sofortige Aufarbeitung und Menge an Studienproben die Kapazität des analytischen Labors übersteigt.

4.2.2 Versuchsplan

Für die Stabilitätsuntersuchung wurde gepooltes Humanplasma mit UDCA in vier verschiedenen Konzentrationen gespikt. Es handelte sich dabei um zwei niedrige (1,3 und 2,6 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 0,51 und 1,02 $\mu\text{g/ml}$) und zwei hohe Konzentrationen (20 und 24 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 7,85 und 9,42 $\mu\text{g/ml}$). Das gespikte Plasma wurde anschließend bei 4 unterschiedlichen Temperaturen unterschiedlich lange gelagert: eine Woche bei +4 °C (Kühlschranklagerung), 12 Stunden, 1, 2, 7 und 28 Tage bei + 20 °C (Raumtemperaturlagerung) und 1 Monat und 3 Monate bei –20 und –80 °C (Tieftemperaturlagerung). Außerdem wurde die Stabilität von UDCA nach einem Einfrier- (-20 °C) und Auftauzyklus an drei aufeinanderfolgenden Tagen überprüft (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Zeitplan für die Stabilitätsuntersuchung

Lagerungstemperatur [°C]	Lagerung [Tage]	Konz. 1	Konz. 2	Konz. 3	Konz. 4
		[µg/ml]	[µg/ml]	[µg/ml]	[µg/ml]
		Anzahl der Messungen			
Einfrieren/Auftauen*		12	12	12	12
+4	7	3	3	3	3
+20	0,5	3	3	3	3
+20	1	3	3	3	3
+20	2	3	3	3	3
+20	7	3	3	3	3
+20	28	3	3	3	3
-20	28	3	3	3	3
-20	84	3	3	3	3
-80	28	3	3	3	3
-80	84	3	3	3	3

Konz. 1 = 0,51 µg/ml; Konz. 2 = 1,02 µg/ml; Konz. 3 = 7,85 µg/ml; Konz. 4 = 9,42 µg/ml

* jeweils 3 Messungen pro Konzentration vor dem ersten Einfrieren sowie 3 Messungen pro Konzentration nach jedem Auftauprozess

4.2.3 Ergebnisse

Die aus jeweils 3 Proben ermittelte durchschnittliche UDCA-Konzentration nach der Lagerung über einen Zeitraum von 4 Wochen bei Raumtemperatur (+20 °C) bezogen auf den zudotierten Ausgangswert betrug 83 bis 128 %. Nach der Lagerung über einen Zeitraum von einer Woche bei +4 °C wurde eine UDCA-Konzentration von 92 bis 113 % bezogen auf den Ausgangswert gemessen. Bei der Langzeitlagerung der Proben über einen bzw. drei Monate bei -20 °C wurden für die beiden niedrigen Konzentrationen Werte von 68 bis 123 % und für die beiden hohen Konzentrationen Werte von 97 bis 108 % bezogen auf den Ausgangswert gemessen.

Über denselben Zeitraum erfolgte die Lagerung der Plasmaproben bei -80 °C, was für die niedrigen Konzentrationen Werte von 68 bis 133 % und für die hohen Werte von 88 bis 106 % bezogen auf den Ausgangswert ergab.

Tabelle 4.2: Mittlere prozentuale UDCA-Konzentration bezogen auf den Ausgangswert nach Lagerung bei unterschiedlichen Bedingungen (n=3)

Lagerungstemperatur [°C]	Lagerung [Tage]	Konz. 1* [µg/ml]	Konz. 2* [µg/ml]	Konz. 3* [µg/ml]	Konz. 4* [µg/ml]
+4°C	7 (\triangleq t _{End})	113	104	94	92
+20°C	0,5	114	105	100	98
	1	102	101	100	98
	2	128	109	95	83
	7	114	101	92	93
	28 (\triangleq t _{End})	103	95	101	102
-20°C	30	68	82	102	97
	90 (\triangleq t _{End})	123	115	108	106
-80°C	30	68	80	88	93
	90 (\triangleq t _{End})	133	119	97	106

Konz. 1 = 0,51 µg/ml; Konz. 2 = 1,02 µg/ml; Konz. 3 = 7,85 µg/ml; Konz. 4 = 9,42 µg/ml

* UDCA-Konzentration nach Lagerung bezogen auf den zudotierten Ausgangswert in Prozent

Wurden die Plasmaproben an drei aufeinanderfolgenden Tagen aufgetaut und wieder eingefroren, betrug die UDCA-Konzentration bezogen auf den zudotierten Ausgangswert 94 bis 116 % (Tabelle 4.3).

Die Stabilitätsuntersuchungen zeigten, daß UDCA-Plasmaproben der untersuchten Konzentrationen mindestens eine Woche im Kühlschrank ohne eine Beeinträchtigung der Stabilität aufbewahrt werden können.

Auch die Lagerung der Proben über einen Zeitraum von 4 Wochen bei Raumtemperatur zeigte keine negativen Auswirkungen auf die Stabilität der UDCA. Die Stabilitätswerte lagen nach Aufbewahrung der Plasmaproben über einen Zeitraum von 28 Tagen am 28. Tag mit Werten von 95 bis 103 % bezogen auf die Ausgangskonzentration ebenfalls in einem tolerierbaren Bereich (Tabelle 4.2).

Damit wird ein unkomplizierter Transport von gewonnenen Plasmaproben beispielsweise vom Studienzentrum zum analytischen Labor gewährleistet. Eine Kühlung der Proben mit Trockeneis oder Kühlelementen ist nicht notwendig, solange eine Temperatur von 20°C während des Transportes nicht überschritten wird.

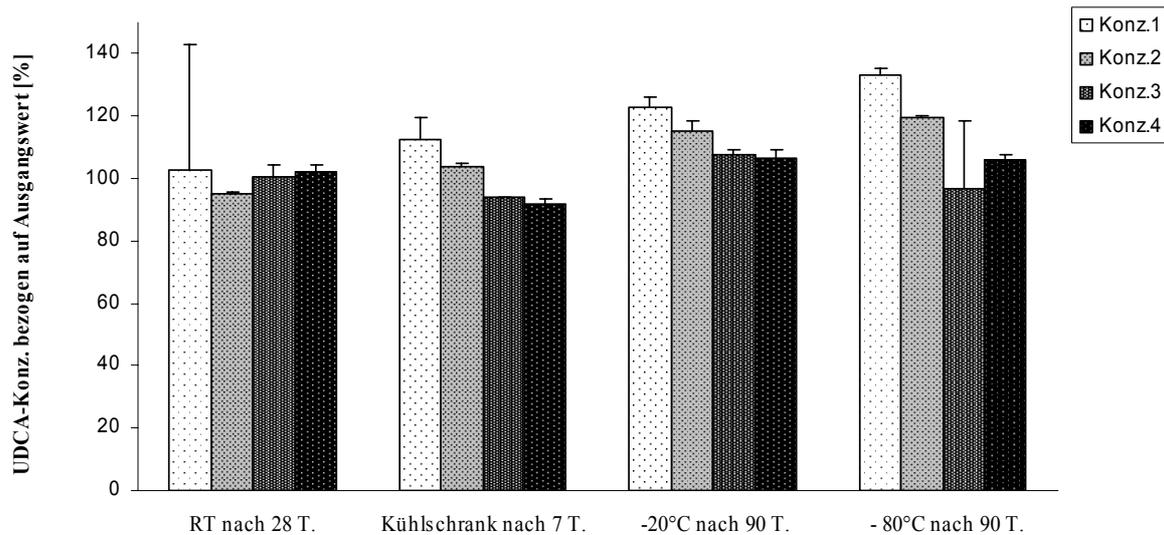


Abbildung 4.16: Mittlere UDCA-Konzentration \pm Standardabweichung ($n=3$) nach Lagerung nach t_{End} bei Raumtemperatur, im Kühlschrank, bei -20°C und bei -80°C bezogen auf den zudotierten Ausgangswert in Prozent (t_{End} siehe Tabelle 4.2)

Leichte Vorteile der Langzeitlagerung der Proben über 3 Monate konnten für eine Temperatur von -20°C gegenüber der Lagerung bei einer Temperatur von -80°C festgestellt werden. Außerdem wurden Unterschiede hinsichtlich der Stabilität von UDCA in niedrig konzentrierten und höher konzentrierten Proben sichtbar (Kapitel 4.2.4). So waren jeweils bei den niedrigen Konzentrationen schlechtere Werte zu finden als bei den höheren Konzentrationen. In den beiden niedrigen Konzentrationen lagen die Werte für -20°C zwischen 68 % und 123 %, für -80°C betragen die Werte 68 %-133 % bezogen auf die Ausgangskonzentration. Für die beiden hohen Konzentrationen ergaben sich für eine Temperatur von -20°C Werte zwischen 97 % und 108 %, für die Temperatur von -80°C Werte zwischen 88 % und 106 %. Die Lagerung bei einer Temperatur von -20°C ist demnach sowohl für niedrig als auch für höher konzentrierte Proben besser als eine Lagerung bei -80°C .

Ein weiterer wichtiger Parameter bei Stabilitätsuntersuchungen eines Arzneistoffes ist die Überprüfung der Stabilität nach mehreren Einfrier- und Auftauzyklen. Es muß sichergestellt sein, daß der zu bestimmende Analyt durch die dadurch verursachten Temperaturschwankungen keine Stabilitätsbeeinträchtigung erfährt. Da aufgrund von gerätespezifischen Problemen nicht selten Wiederholungsmessungen einer Probe notwendig sind, ist dieses sog. „Freeze-and-thaw-Verhalten“ in einer Stabilitätsuntersuchung unbedingt zu berücksichtigen.

Tabelle 4.3: Mittlere prozentuale UDCA-Konzentration bezogen auf den Ausgangswert nach mehreren Einfrier- und Auftauzyklen (n=3)

Zyklus	Konz. 1* [µg/ml]	Konz. 2* [µg/ml]	Konz. 3* [µg/ml]	Konz. 4* [µg/ml]
1	116	109	100	101
2	108	107	97	94
3	113	104	98	97

Konz. 1 = 0,51 µg/ml; Konz. 2 = 1,02 µg/ml; Konz. 3 = 7,85 µg/ml; Konz. 4 = 9,42 µg/ml

* UDCA-Konzentration nach Lagerung bezogen auf den zudotierten Ausgangswert in Prozent

Die durchschnittliche Konzentration nach 3 Einfrier- und Auftauzyklen lag zwischen 97 % und 113 % bezogen auf die Ausgangskonzentration. Dabei entfällt der schlechteste Wert von 113 % auf die Probe mit der niedrigsten UDCA-Konzentration (Kapitel 4.2.4). Die restlichen drei Konzentrationen liegen mit Werten von 104 %, 98 % und 97 % in einem tolerierbaren Bereich (Tabelle 4.3, Abbildung 4.17).

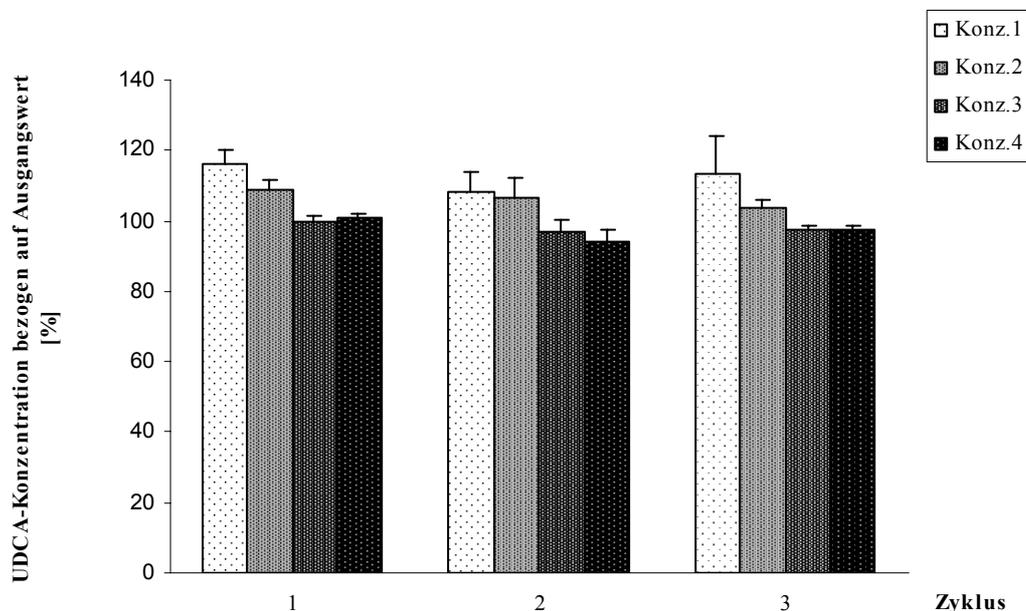


Abbildung 4.17: Stabilität der UDCA nach Einfrier- und Auftauzyklen

Die Ergebnisse der Messungen nach mehreren Einfrier- und Auftauzyklen machen das mehrfache Auftauen und Einfrieren von UDCA-Plasmaproben ohne Beeinflussung der

Stabilität der UDCA möglich. Das heißt, daß die Proben problemlos mehrfach solch starken Temperaturschwankungen ausgesetzt werden können. Somit ist gewährleistet, daß die Proben für eventuell durchzuführende Nachmessungen geeignet sind, und die Stabilität nach mehrmaligem Auftauen nicht beeinträchtigt wird.

4.2.4 Diskussion

Die Planung der Untersuchung von UDCA in humanem Plasma orientierte sich hinsichtlich der getesteten Konzentrationen und der Lagerungstemperaturen an der sich anschließenden Bioäquivalenzstudie zweier UDCA-Arzneimittelzubereitungen. Die für die Stabilitätsuntersuchung relevanten Konzentrationen wurden dabei so gewählt, daß der in der Bioäquivalenzstudie zu erwartende Konzentrationsbereich möglichst abgedeckt werden konnte. Auch die getesteten Temperaturen wurden so ausgewählt, daß anschließend Aussagen zur Stabilität der Bioäquivalenzproben, beispielsweise während des Transportes oder der Lagerung bei Tieftemperaturen getroffen werden konnten.

Bei einer Stabilitätsuntersuchung eines Arzneistoffes in der Bioanalytik ist darauf zu achten, daß der zu untersuchende Arzneistoff einer Matrix zudotiert wird, in der er im lebenden Organismus auch tatsächlich vorzufinden ist. Wichtige Aspekte stellen dabei die zu erwartende Konzentration des Arzneistoffes in der Probe sowie die Art und Weise, wie der Arzneistoff in der Probe vorliegt, dar (113). Eine UDCA-Stammlösung mit Cyclohexan als Lösungsmittel schien daher für diese hier durchgeführte Studie wenig sinnvoll. Außerdem könnten organische Lösungsmittel die Matrixbestandteile verändern und zu einer nicht homogenen Verteilung des Analyten in der Matrix führen. Deshalb wurde als Lösungsmittel für die UDCA eine 4,2 %ige NaHCO₃-Lösung (pH-Wert 7,42) gewählt, um einen dem Plasma möglichst ähnlichen pH-Wert zu schaffen. Die Mengen des zudotierten Analyten wurden so gewählt, daß der für die nachfolgende Bioäquivalenzstudie erwartete Konzentrationsbereich nahezu komplett abgedeckt werden konnte.

Erwartungsgemäß erhielt man bei der Messung niedrig konzentrierter Proben von dem Ausgangswert stärker abweichende Werte als bei der Messung von höher konzentrieren. In den beiden niedrigen Konzentrationen lagen die ermittelten Werte für eine Lagerungstemperatur von -20 °C zwischen 68 % und 123 %, für -80 °C zwischen 68 % und 133 % bezogen auf die Ausgangskonzentration. Für die beiden hohen Konzentrationen ergaben sich für eine Temperatur von -20 °C Werte zwischen 97 % und 108 %, für die Temperatur von -80 °C Werte zwischen 88 % und 106 % (Tabelle 4.2).

Die Ursache für die relativ starken Abweichungen vom Ausgangswert (100 %) jeweils in der am niedrigsten konzentrierten Probe könnte möglicherweise darin liegen, daß diese Konzentration teilweise im Bereich der Quantifizierungsgrenze der verwendeten Methode lag (Kapitel 3.2.5.4). In diesem Konzentrationsbereich kann es beispielsweise durch eine abnehmende Empfindlichkeit des Messgerätes und eine zunehmende Rauschbreite bedingt durch Verunreinigung der Ionenquelle oder eine abnehmende Qualität der verwendeten Säule zu erheblichen Ungenauigkeiten in der Quantifizierung der zu messenden Substanz kommen. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, daß die Stabilität von UDCA bei den untersuchten Lagerungsbedingungen nicht beeinträchtigt wird. Dies ermöglicht für zukünftige Studien, bei denen eine Analyse von UDCA-Plasmaproben notwendig ist, einen Transport der Proben bei Raumtemperatur, wenn dafür nicht mehr als 7 Tagen benötigt werden. Weiterhin können die nach Einnahme von UDCA gewonnenen Plasmaproben ohne eine Beeinträchtigung der Stabilität der UDCA bei einer Temperatur von -20 °C über einen Zeitraum von 3 Monaten gelagert werden.

Auch durch mehrmaliges Auftauen und Einfrieren der Plasmaproben konnte kein negativer Einfluß auf die Stabilität von UDCA festgestellt werden. Dadurch können, wenn dies aus analytischen Gründen notwendig ist, die Proben beispielsweise für Wiederholungsmessungen erneut aufgetaut und anschließend wieder eingefroren werden, ohne daß die Stabilität der UDCA beeinträchtigt wird.

Ein Vergleich der durch die Stabilitätsuntersuchung erhaltenen Daten mit Ergebnissen anderer Untersuchungen ist nicht möglich, da bisher keine Untersuchungen zu diesem Sachverhalt durchgeführt wurden. Jedoch ist die Untersuchung der Stabilität eines Analyten in einer biologischen Matrix Bestandteil der Empfehlungen der FDA für die bioanalytische Methodenentwicklung (113) und sollte daher bei der Validierung bioanalytischer Methoden berücksichtigt werden.

Für zukünftige Untersuchungen, bei denen eine Analyse von UDCA-Plasmaproben erforderlich ist, kann bezüglich der Stabilitätsdaten auf die in dieser Studie erhaltenen Ergebnisse zurückgegriffen werden. Jedoch ist dabei zu beachten, daß es sich bei den zu untersuchenden Proben um dieselbe Probenmatrix wie in der bereits durchgeführten Stabilitätsuntersuchung handeln sollte und die UDCA zumindest in einer ähnlichen Konzentration wie in der hier durchgeführten Untersuchung vorliegt, da sowohl die Probenmatrix als auch die Konzentration des Analyten in der Probe Einfluß auf die Stabilität des Analyten ausüben kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde im Anschluß an die Stabilitätsuntersuchung eine Studie zur Überprüfung der Bioäquivalenz zweier unterschiedlicher galenischer UDCA-Zubereitungen durchgeführt. Mittels der durch die Stabilitätsuntersuchung erhaltenen Daten konnte für diese Studie eine optimale Zeitplanung hinsichtlich der Probenlagerung bis zur Aufarbeitung und Analyse erarbeitet werden. Zudem konnte durch die Stabilitätsuntersuchung für einen hinsichtlich der Stabilität der Studienproben problemlosen Transport vom Studienzentrum zum analytischen Labor garantiert werden.

4.3 Offene (nicht verblindete) randomisierte zweiphasige Studie im Crossover-Design zur Untersuchung der Bioäquivalenz einer Tablette mit 500 mg UDCA und zweier Kapseln mit je 250 mg UDCA

4.3.1 Hintergrund

Nach der Richtlinie des Ausschusses für Arzneispezialitäten der Europäischen Gemeinschaft CPMP (Committee for Proprietary Medicinal Products) sind zwei Arzneimittel bioäquivalent, wenn sie pharmazeutisch äquivalent oder pharmazeutisch alternativ sind und wenn sie sich in ihrer Bioverfügbarkeit nach Verabreichung derselben molaren Dosis so gleichen, daß sie bezüglich Wirksamkeit und Unbedenklichkeit im wesentlichen übereinstimmen (128). Dabei versteht man unter pharmazeutisch äquivalenten Präparaten Arzneimittel, die den gleichen Arzneistoff in gleicher chemischer Form und gleicher Menge enthalten und außerdem in Arzneiform und Applikationsweg identisch sind. Zu den pharmazeutisch alternativen Präparaten zählen Arzneimittel, die den gleichen chemischen Bestandteil in chemisch unterschiedlicher Form enthalten, sowie Arzneimittel, die den gleichen Arzneistoff enthalten, sich aber in der Darreichungsform oder der Dosisstärke unterscheiden.

Voraussetzung für die Bioäquivalenz zweier Arzneimittel ist die pharmazeutische Qualität. Dazu zählen Identität, Reinheit, Dosierungsgenauigkeit, Freisetzungsgeschwindigkeit und Haltbarkeit. Weitere wichtige Parameter sind Chargenhomogenität und Chargenkonformität. Die Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe zweier bioäquivalenter Arzneimittel müssen sich somit ähnlich sein, wobei Akzeptanzgrenzen für das Ausmaß der systemisch verfügbaren Arzneistoffmenge (AUC) i.a. von 80-125 % bezogen auf die AUC des Referenzpräparates akzeptiert werden.

Um die Bioverfügbarkeit eines Arzneimittels zu bestimmen, wird meist die Konzentration des Arzneistoffes im Plasma nach Gabe einer Einzeldosis oder nach Mehrfachapplikation ermittelt. Der resultierende Plasmakonzentrations-Zeit-Verlauf wird bestimmt durch die Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (AUC), der Höhe der maximalen Arzneistoffkonzentration im Plasma (C_{\max}) sowie der Zeit bis zum Auftreten der maximalen Arzneistoffkonzentration im Plasma (t_{\max}). Normalerweise verhält sich die AUC proportional zu der Arzneistoffmenge, die in die systemische Zirkulation gelangen konnte. Zur Berechnung der AUC können verschiedene Methoden herangezogen werden. Dazu zählen die sogenannte Trapezregel oder die computergestützte Datenanalyse, bei der die Abschätzung

der Modellparameter mittels geeigneter Programme wie beispielsweise Kinetica[®] oder Win Nonlin[®] durchgeführt wird.

Die Höhe der maximalen Arzneistoffkonzentration (C_{\max}) wird durch das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Resorption bestimmt. Die Zeit bis zum Auftreten der maximalen Arzneistoffkonzentration (t_{\max}) wird allein durch die Geschwindigkeit der Resorption des Arzneistoffes beeinflusst. Durch die Bestimmung von t_{\max} können somit Aussagen über den zu erwartenden Wirkungseintritt gemacht werden.

Da die Werte für C_{\max} und t_{\max} direkt aus den ermittelten Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven entnommen werden, ist bei der Planung von Bioäquivalenzstudien unbedingt darauf zu achten, daß im Bereich von t_{\max} eine ausreichend hohe Anzahl an Meßwerten festgelegt wird. Der Vergleich der Fläche unter der Kurve von Test- bzw. Referenzpräparat bildet die Grundlage der Entscheidung über die Bioäquivalenz der geprüften Arzneimittel. Üblicherweise werden zusätzlich die beiden Zielgrößen C_{\max} und t_{\max} bei der vergleichenden Beurteilung mit berücksichtigt.

Bei der statistischen Auswertung von Bioäquivalenzstudien werden normalerweise die logarithmierten Werte von AUC und C_{\max} verwendet (dadurch kann die an parametrische statistische Verfahren geknüpfte Voraussetzung der Normalverteilung erfüllt werden).

Das Akzeptanzkriterium für die AUC bei der in dieser Arbeit durchgeführten Bioäquivalenzstudie lag bei 80-125 % im Vergleich zum Referenzpräparat.

Für die Bewertung der C_{\max} wurden die Grenzen 70 und 143 % festgelegt. Diese relativ weit gesteckten Grenzen für C_{\max} wurden damit begründet, daß die Verabreichung von zwei Kapseln (Referenz) im Vergleich mit einer einzelnen verabreichten Tablette (Test) zu einer höheren Variabilität bei der Zubereitung führen kann, die in zweifacher Dosierung verabreicht wurde. Dieses bereits bekannte Phänomen ist darauf zurückzuführen, daß der Zeitpunkt des Austritts der beiden Kapseln aus dem Magen unterschiedlich sein kann (129). Das heißt, daß die Resorption des Arzneistoffs aus der Kapsel, die zuerst den Magen verläßt früher einsetzt als bei der Kapsel, die erst eine gewisse Zeit später aus dem Magen in den Darm gelangt. Die Konzentrations-Zeit-Kurve hätte folglich einen flacheren Verlauf als die Konzentrations-Zeit-Kurve der einzeln dosierten Tablette.

Die statistische Bewertung der t_{\max} -Werte ist nur sinnvoll, wenn ein schneller Wirkungseintritt aus therapeutischen Gründen erforderlich ist oder wenn die Geschwindigkeit der Resorption des Arzneistoffes mit dem Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen korreliert.

4.3.2 Studienziele

Primäres Ziel dieser Studie war es, die Bioäquivalenz einer Tablette mit 500 mg UDCA und zweier Kapseln mit jeweils 250 mg UDCA zu zeigen. Dabei wurden zwei primäre Zielvariablen festgelegt: Zum einen die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve ab der Zeit der Applikation bis zur letzten Blutabnahme, zum anderen die maximale Plasmakonzentration des verabreichten Arzneistoffes, welche direkt aus den gemessenen Konzentrationen zu ermitteln war. Die Untersuchung von Art und Häufigkeit unerwünschter Arzneimittelwirkungen wurde als sekundäres Studienziel festgesetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die für diese Studie notwendige Analytik, das heißt die Bestimmung von unveresterter UDCA im Plasma, etabliert und verwendet.

4.3.3 Studiendesign

Es handelte sich um eine nicht verblindete randomisierte zweiphasige Studie mit einmaliger Verabreichung der jeweiligen Studienmedikation im Crossover-Design. Die Studienmedikation bestand aus der Referenz- und der Testsubstanz. Als Referenzsubstanz wurden zwei URSOFALK[®] Kapseln mit schnell freisetzender Galenik mit jeweils 250 mg UDCA verwendet. Testsubstanz war eine URSOFALK[®] Tablette mit schnell freisetzender Galenik mit 500 mg UDCA.

Die Studie wurde im intraindividuellen Crossover-Design durchgeführt, um die Variabilität bezüglich pharmakokinetischer Parameter gering zu halten. Im Anschluß an die erste Behandlungsphase wurde eine zweiwöchige Auswaschphase angeschlossen, um sicher zu gehen, daß eine komplette Elimination des Arzneistoffs der jeweils vorangegangenen Behandlungsphase stattgefunden hatte.

Gemäß bereits veröffentlichter Daten waren mit der verabreichten Dosis maximale Plasmakonzentrationen zwischen 5,23 und 9,53 µg/ml zu erwarten (130). Da die Quantifizierungsgrenze in der für diese Studie verwendeten Analytik mit 0,096 µg/ml bestimmt wurde, konnte angenommen werden, daß bei einer Verabreichung von 500 mg UDCA die Plasmakonzentrationen über die beobachtete Zeit ausreichend gut bestimmt werden konnten. Da eine tägliche Dosierung von UDCA bis zu 20 mg/kg Körpergewicht in verschiedenen Studien gut vertragen wurde, war eine Beeinträchtigung der Sicherheit der Probanden aufgrund der gewählten Dosierung nicht zu erwarten (131, 132).

4.3.4 Probanden

Das Probandenkollektiv umfaßte 12 weibliche und 12 männliche gesunde Personen aus Mitteleuropa zwischen 18 und 55 Jahren mit einem Body-Mass-Index von 18 bis 26 kg/m².

Nach Abschluß der Voruntersuchungen wurden die Probanden für eine Nacht stationär aufgenommen. Am nächsten Morgen nach stationärer Aufnahme erfolgte eine Stunde vor Applikation der Studienmedikation die erste Blutabnahme. Das Referenz- bzw. Testprodukt wurde zwischen 6 Uhr und 9 Uhr mit 200 ml Wasser (Raumtemperatur) in stehender Position eingenommen. Anschließend wurde durch Überprüfung der Mundhöhle die ordnungsgemäße Einnahme der Studienmedikation abgesichert. Die Probanden hielten anschließend über einen Zeitraum von 4 Stunden eine sitzende Position ein. Nach Verabreichung von Referenz- bzw. Testprodukt wurden insgesamt 17 Blutabnahmen zu folgenden Zeiten durchgeführt: nach 20 min, 40 min, 60 min, 1 h 20 min, 1 h 40 min, 2 h, 2 h 30 min, 3 h, 3 h 30 min, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h, 9 h, 10 h und nach 12 h. Dabei wurden jeweils 4,9 ml Blut abgenommen. Die Blutproben wurden in EDTA Monovetten gesammelt und innerhalb 15 min zentrifugiert. Der aus Plasma bestehende Überstand wurde bei -20 °C bis zur Analyse eingefroren.

Während ihres stationären Aufenthaltes erhielten die Probanden 10 Stunden vor Applikation der Studienmedikation ein standardisiertes Abendessen sowie standardisierte Mahlzeiten 4 und 8 Stunden nach Applikation. Die Aufnahme von Wasser war bis 4 Stunden vor Applikation erlaubt. Nach Einnahme der Studienmedikation wurde auch die Aufnahme von Wasser über einen Zeitraum von 12 Stunden für alle Probanden standardisiert. Demnach nahmen die Probanden 2 bis 10 Stunden nach Einnahme der Studienmedikation alle 2 Stunden 300 ml Mineralwasser ohne Kohlensäure zu sich (insgesamt 1500 ml).

Das Studienprotokoll ist von der Ethikkommission der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn beraten worden, und alle Probanden haben schriftlich ihr Einverständnis gegeben, an der Studie teilzunehmen.

4.3.5 Ergebnisse

Die Meßergebnisse aller 24 Probanden wurden in die Analyse der pharmakokinetischen Daten einbezogen (Anhang C). Alle Probanden beendeten die Studie, keiner schied vorzeitig aus. Die einzelnen Konzentrations-Zeit-Kurven im Plasma sind im Anhang C wiedergegeben. In Abbildung 4.18 sind die Konzentrations-Zeit-Kurven von UDCA nach Einnahme einer Tablette mit 500 mg UDCA (Test) aller 24 Probanden übereinander liegend dargestellt.

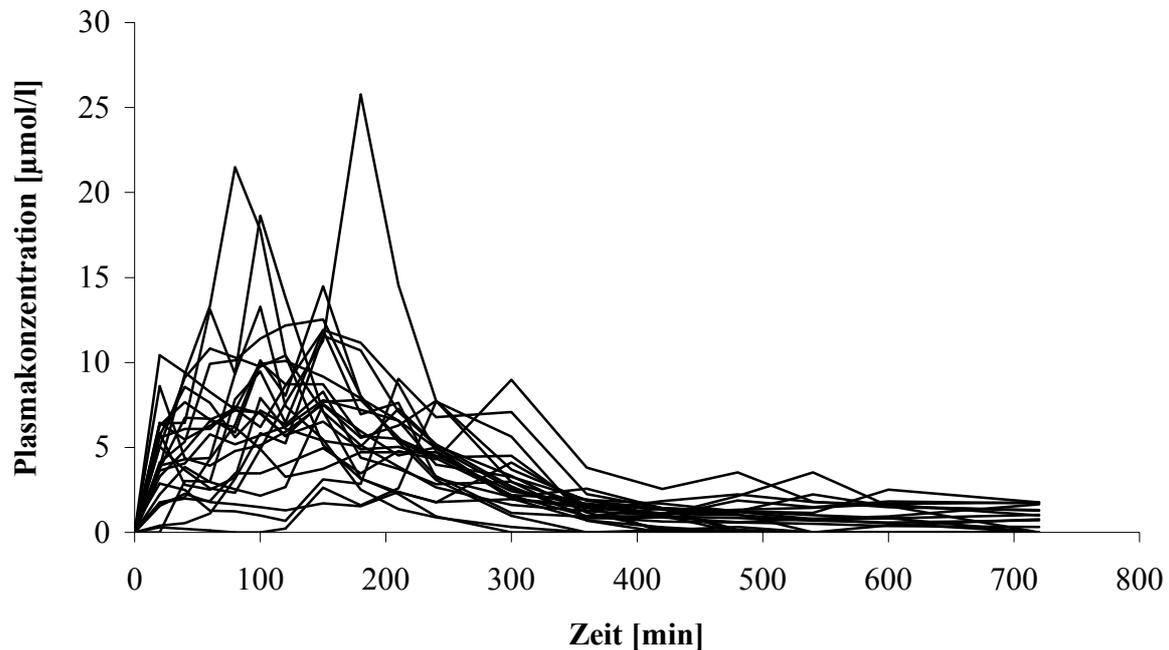


Abbildung 4.18: Konzentrations-Zeit-Kurven von UDCA aller 24 Probanden nach Einnahme des Testpräparates

In Abbildung 4.19 sind die Konzentrations-Zeit-Kurven von UDCA nach Einnahme von 2 Kapseln à 250 mg UDCA (Referenz) aller 24 Probanden zu sehen.

Die durchschnittlichen Plasmakonzentrations-Zeit-Profile der Test- und der Referenzsubstanz sind in Abbildung 4.20 dargestellt. Beide Formulierungen zeigen hier sowohl in der Zeitspanne von 0 bis 2 Stunden als auch in der Zeitspanne von 3 bis 12 Stunden einen sehr ähnlichen Verlauf. Innerhalb der ersten Stunde ist bei beiden Formulierungen ein Anstieg der Plasmakonzentrationen zu erkennen. Dieser Anstieg verläuft für die Testformulierung etwas steiler als für die Referenzformulierung. Bei der Referenzsubstanz ist jedoch ein Trend hin zu höheren Werten zu erkennen. Die mittlere maximale Plasmakonzentration liegt bei 11,3 µmol/l nach einer Zeit von 2 h 30 min für die Referenz- und bei 7,5 µmol/l nach 2 h 20 min für die Testformulierung. Nach einer Zeit von 3 Stunden nach Applikation nehmen die Plasmakonzentrationen beider Formulierungen rasch ab und erreichen 6 Stunden nach Applikation einen Wert von 1,0 µmol/l. Anschließend erfolgt eine etwas langsamere Abnahme der Plasmakonzentration über den Zeitraum von 6 bis 12 Stunden nach Applikation bis zu einem Wert von 0,4 µmol/l.

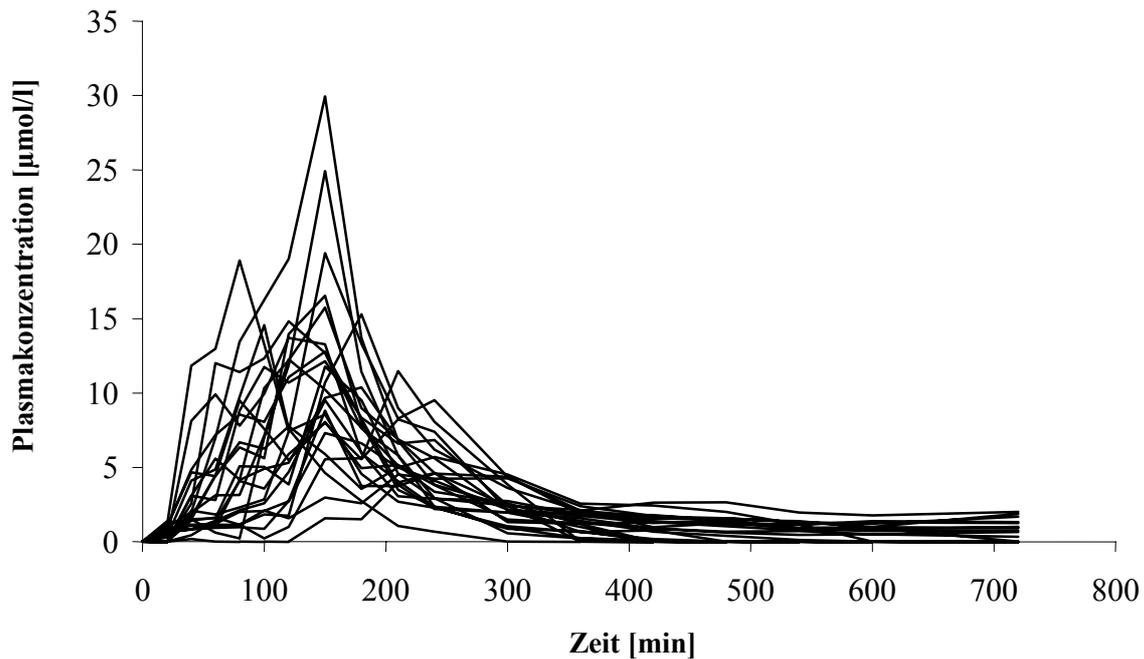


Abbildung 4.19: Konzentrations-Zeit-Kurven von UDCA aller 24 Probanden nach Einnahme des Referenzpräparates

Bei einzelnen Probanden ist bei beiden Formulierungen eine Verzögerung bis zum Beginn der Resorption zu erkennen (lag-time). In einzelnen Fällen ist nach der Verabreichung der Studienmedikation eine Verzögerung der Resorption zu beobachten, z.B. bei Proband 9 nach Applikation von sowohl Referenz- als auch Testpräparat oder bei Proband 7 nach Applikation des Referenzpräparates.

Des Weiteren ist in den Schaubildern eine hohe Variabilität hinsichtlich der maximalen Konzentration und der Zeit, nach der diese erreicht wird, zu erkennen. Außerdem sind bei vielen Probanden sowohl nach Verabreichung der Testformulierung als auch nach Verabreichung der Referenzformulierung mehrere Konzentrationsspitzen zu erkennen. Bei einigen Probanden kommt es am Ende des Beobachtungszeitraumes zu einem erneuten Anstieg der Plasmakonzentration der UDCA.

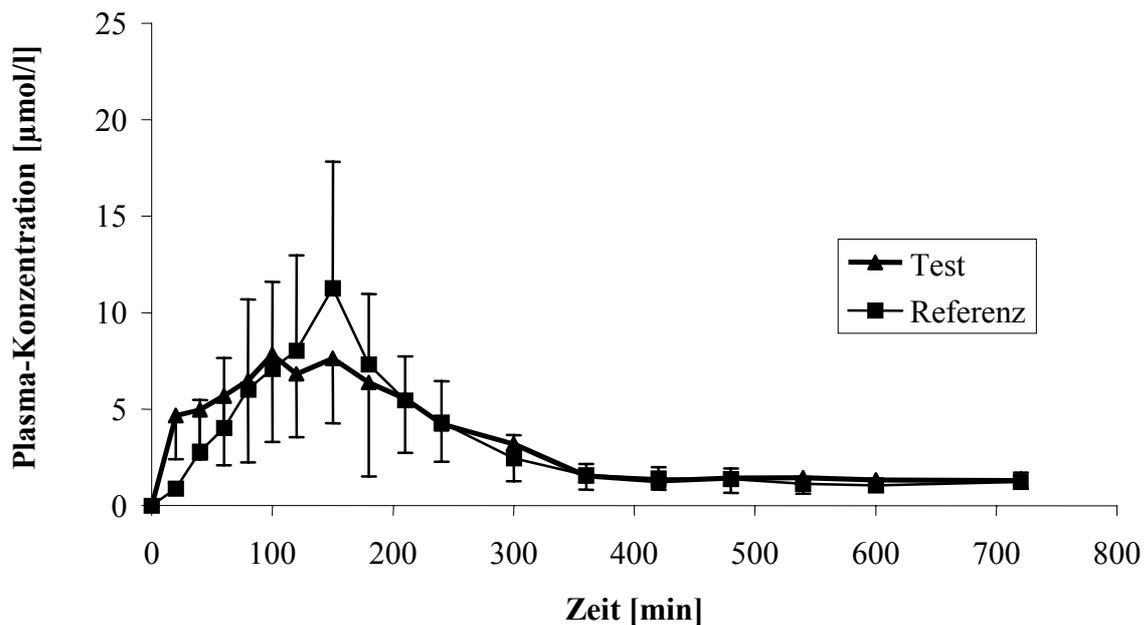


Abbildung 4.20: Durchschnittliche Plasmakonzentrations-Zeit-Profile der Test- und Referenzsubstanz

Die pharmakokinetischen Parameter wurden von einem unabhängigen Dienstleistungszentrum (SocraTec R&D GmbH, Oberursel) berechnet und werden hier nur in Kürze erläutert.

Der geometrische Mittelwert für die maximale Plasmakonzentration (C_{\max}) betrug für das Testpräparat 10,2 $\mu\text{mol/l}$ und liegt damit etwas niedriger als die maximale Plasmakonzentration des Referenzproduktes, die mit 11,9 $\mu\text{mol/l}$ angegeben wird. Das geometrische Mittel für die $AUC_{0-t_{\text{last}}}$, die nach einem Beobachtungszeitraum von 12 Stunden bestimmt wurde, war für beide Produkte nahezu identisch mit einem Wert von 31,3 $\text{h } \mu\text{mol/l}$ für das Testprodukt und 29,5 $\mu\text{mol/l}$ für das Referenzprodukt.

Die durchschnittlichen Werte für t_{\max} lagen für das Testprodukt bei 2,3 h und bei 2,5 h für das Referenzprodukt. Der Bereich für t_{\max} lag für die Testformulierung zwischen 0,3 und 5,0 h und umfaßte eine größere Zeitspanne als beim Referenzprodukt. Bei diesem wurde eine Zeitspanne für t_{\max} von 1,3 – 4,0 h ermittelt.

Die Daten zeigen eine sehr hohe intraindividuelle Variabilität von C_{\max} ($CV = 37,7\%$). Diese kann zum einen auf den enterohepatischen Kreislauf des Arzneistoffes zurückzuführen sein. So konnte beispielsweise die terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante bei einigen

Probanden aufgrund eines Konzentrationsanstieges nicht bestimmt werden, was sehr häufig bei Arzneistoffen, die einem enterohepatischen Kreislauf unterliegen, beobachtet wird.

Zum anderen könnte auch die Applikation des Referenzproduktes in Form von zwei einzelnen Kapseln für eine hohe Variabilität von C_{\max} mitverantwortlich sein.

Die statistische Auswertung der Daten zeigte, daß die bezüglich der Bioäquivalenz wichtigsten pharmakokinetischen Parameter $AUC_{0-t_{\text{last}}}$ und C_{\max} die im Studienplan festgelegten Akzeptanzkriterien mit einem Konfidenzintervall für $AUC_{0-t_{\text{last}}}$ von 98-116 % und für C_{\max} von 73-100 % erfüllten. Somit können die beiden Formulierungen URSOFALK[®] 500 mg Filmtablette und zwei URSOFALK[®] 250 mg Kapseln als bioäquivalent angesehen werden.

4.3.6 Diskussion

Die Gallensäure UDCA wurde bisher zur Therapie von hepatobiliären Erkrankungen in Form von Kapseln bzw. einer Suspension (bei einem Körpergewicht < 34 kg) eingesetzt. Die Dosierung richtet sich nach Körpergewicht und Erkrankung des Patienten.

Die in dieser Arbeit entwickelte gaschromatographisch-massenspektrometrische Methode zur Bestimmung von UDCA im Plasma sollte der Bewertung der Bioäquivalenz einer neu entwickelten Tablette mit dem Arzneistoff UDCA und einer bereits zugelassenen Kapsel mit UDCA im Rahmen einer klinischen Studie dienen.

Bei der Durchführung klinischer Studien, insbesondere bei Studien zur Ermittlung der pharmakokinetischen Eigenschaften eines Arzneistoffes, ist es besonders wichtig, eine standardisierte Einnahme der Studienmedikation bei allen Probanden sicherzustellen, um möglichst gleiche Ausgangsbedingungen für die Freisetzung des Arzneistoffes aus der jeweiligen Arzneiform zu schaffen. Daher wurde im Rahmen dieser Studie eine bestimmte mit der Medikation einzunehmende Menge an Wasser festgelegt und auf eine anschließende 4-stündige sitzende Position der Probanden geachtet, um ein Anhaften der Arzneiformen an die Speiseröhre zu verhindern und für eine bei allen Probanden in etwa gleich schnelle Passage der Studienmedikation durch die Speiseröhre zu sorgen. Durch Festlegung entsprechender standardisierter Vorgehensweisen im Studienprotokoll konnte sichergestellt werden, daß die Ausgangsbedingungen für die Resorption der Medikamente aus dem Gastrointestinaltrakt bei allen Probanden gleich waren.

Obwohl für die Wirkung der UDCA ihre Konzentration in der Gallenflüssigkeit ausschlaggebend ist, müssen für eine Untersuchung der Bioäquivalenz zweier

Arzneimittelzubereitungen jeweils die Flächen unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve sowie die maximale Konzentration der Arzneistoffe im Plasma, evtl. auch die Zeit, nach der eine maximale Plasmakonzentration auftritt, bestimmt werden (128, 133).

Bei der Studienplanung ist darauf zu achten, daß um den erwarteten Zeitpunkt von C_{\max} eine ausreichende Anzahl von Blutentnahmen vorgesehen wird, um den tatsächlichen Zeitpunkt für C_{\max} möglichst genau erfassen zu können. Für die Studie wurden die Blutabnahmen ab Einnahme der Studienmedikation während zwei Stunden alle 20 min durchgeführt, danach im Abstand von 30 bzw. 60 min (Kapitel 4.3.4). Es wurden die durchschnittlichen Werte für t_{\max} beim Referenzprodukt bei 2 h 30 min und beim Testprodukt bei 2 h 20 min bestimmt. Betrachtet man die Werte für t_{\max} für die einzelnen Probanden so fällt auf, daß bei einigen Probanden die Werte für t_{\max} erheblich höher lagen als der entsprechende Mittelwert. Besonders auffallende Werte sind für die Konzentrations-Zeit-Profile nach Einnahme des Testproduktes beispielsweise bei den Probanden 5 und 9 sowie nach Einnahme des Referenzproduktes bei den Probanden 5 und 7 zu erkennen (Anhang C). Genauere Ergebnisse hätten evtl. mittels einer engmaschigeren Blutabnahme im Zeitraum von 5 h nach Applikation der Studienmedikation erreicht werden können. Dadurch wäre eine optimale zeitliche Erfassung der Konzentrationsspitzen des Arzneistoffes im Plasma möglich gewesen.

Für die Bewertung von C_{\max} wurden die Grenzen für die Akzeptanz der Bioäquivalenz mit 70 bis 143 % festgelegt. Diese relativ weit gesteckten Grenzen für C_{\max} wurden damit begründet, daß es bei der Verabreichung von 2 Kapseln (Referenzprodukt) im Vergleich mit einer einzelnen verabreichten Tablette (Testprodukt) zu einer höheren Variabilität der maximalen Plasmakonzentration bei der Zubereitung führen kann, die in Form von zwei einzelnen Kapseln verabreicht wurde (134). Dabei handelt es sich um ein bereits bekanntes Phänomen, welches beispielsweise mittels des Magnetic Marker Monitoring festgestellt werden kann. Diese Methode ermöglicht eine kontinuierliche Untersuchung der Gastrointestinalpassage von festen Arzneiformen mittels einer magnetischen Markierung der entsprechenden Arzneiform durch Inkorporation von pulverisiertem Magnetit (Fe_3O_4) (129, 135). Vorstellbar wäre, daß eine Kapsel den Magen früher verläßt als die andere, und es so zu einem zeitlichen Unterschied beim Beginn der Resorption des Arzneistoffes kommt, was zu einem flacheren Verlauf der Konzentrations-Zeit-Kurven und zu einer hohen interindividuellen und intraindividuellen Variabilität der Plasmaspitzenkonzentrationen führt.

Das Auftreten mehrerer Konzentrationsspitzen innerhalb des Profils eines einzelnen Probanden könnte auch Folge der enterohepatischen Rezirkulation der UDCA sein. Nach peroraler Applikation wird die UDCA über aktive und passive Transportvorgänge aus dem

Darm resorbiert und gelangt über die Pfortader zur Leber, wo die Konjugation mit Taurin oder Glycin erfolgt; der First-Pass-Effekt beträgt 50-75 % (75). Nach Konjugation werden sowohl die UDCA-Konjugate als auch freie UDCA, jedoch in einem sehr geringen Ausmaß, in die Galle sezerniert und gelangen in den Darm, wo sie erneut resorbiert werden. Für die Bestimmung der UDCA im Plasma hätte dies je nach Resorptionsgeschwindigkeit zur Folge, daß mehrere Plasmaspitzenkonzentrationen innerhalb des Konzentrations-Zeit-Profiles eines einzelnen Probanden auftreten können. Zudem könnte die enterohepatische Rezirkulation der UDCA den Anstieg der schon nahe Null liegenden Plasmakonzentration mehrere Stunden nach Einnahme der Studienmedikation erklären, wie es bei den Probanden 3, 13, 14, 19 und 24 in der ersten Behandlungsphase (Periode 1) und bei den Probanden 14, 17, 22 und 23 in der zweiten Behandlungsphase (Periode 2) zu sehen ist (Anhang C).

Die Plasmaspitzenkonzentrationen in der ersten Behandlungsphase erreichten Werte von 4,11 – 29,94 $\mu\text{mol/l}$, in der zweiten Phase wurden Werte von 7,74 – 25,78 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt. Auffallend war Proband 7, bei dem die maximale Plasmakonzentration nach 150 min in der zweiten Behandlungsphase (24,91 $\mu\text{mol/l}$) mehr als doppelt so hoch wie in der ersten Behandlungsphase war (11,56 $\mu\text{mol/l}$) (Anhang C). Wiederholungsmessungen bestätigten das erhaltene Ergebnis, so daß die anfangs gemessenen Werte für die weiteren Berechnungen verwendet wurden.

Abschließend ist zu sagen, daß, obwohl bisher diverse Bioäquivalenzstudien mit unterschiedlichen galenischen Formen von UDCA durchgeführt wurden, ein Vergleich dieser Studien mit der in dieser Arbeit durchgeführten Studie relativ schwierig ist. Die Ursachen dafür sind sowohl ein unterschiedliches Studiendesign als auch unterschiedliche analytische Methoden und von dieser Studie abweichende galenische Formen der UDCA (133, 136). So wurde beispielsweise in einer Studie zur Bewertung der Bioäquivalenz der Ursolfalk[®] Suspension und der Ursolfalk[®] Kapsel eine analytische Methode verwendet, bei der sowohl freie als auch konjugierte UDCA erfaßt wurden, was folglich zu höheren Werten für AUC und C_{max} führte (133). Daher ist ein Vergleich dieser beiden Parameter mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen, für welche nur die freie UDCA im Plasma erfaßt wurde, nicht möglich. Ein Vergleich der in dieser Studie ermittelten Ergebnisse für t_{max} zeigte jedoch mit 2 h 30 min für die Kapseln eine gute Übereinstimmung mit der zuvor genannten Bioäquivalenzstudie (133), bei der für die Kapseln ein Wert für t_{max} von 2 h 40 min ermittelt wurde.

Die neue Formulierung mit 500 mg UDCA ermöglicht eine reduzierte Anzahl der täglich zu verabreichenden UDCA-Dosen und kann so zur Verbesserung der Compliance der Patienten,

bei denen meist eine lange Therapiedauer erforderlich ist, beitragen. Außerdem wird das Auftreten zweier Konzentrationsspitzen, die durch die Verabreichung zweier Kapseln durch eine unterschiedliche Gastrointestinalpassage auftreten können, durch die Gabe einer einzelnen Tablette minimiert.

Fazit der Bioäquivalenzstudie ist, daß die ermittelten Werte für die $AUC_{0-t_{last}}$ in einem Bereich von 98-116 %, die Werte für C_{max} in einem Bereich von 73-100 % lagen und somit die für den Nachweis der Bioäquivalenz der beiden Formulierungen festgelegten Grenzen von 80-125 % für $AUC_{0-t_{last}}$ bzw. 70-143 % für C_{max} eingehalten wurden.

5 Zusammenfassung

Zur Bestimmung der intestinalen Cholesterinresorption wurde aufbauend auf einer etablierten Methode eine neue gaschromatographisch-massenspektrometrische Methode entwickelt, validiert und in einer klinischen Studie eingesetzt. Im Gegensatz zu der bisher angewendeten Methode zur Ermittlung der Cholesterinresorption ermöglichte die neue Methode die Quantifizierung der neutralen fäkalen Sterole, die zur Berechnung der Sterolresorption notwendig sind.

Die Methode wurde erfolgreich unter Studienbedingungen zur Bestimmung der Cholesterinresorption unter der Therapie von Simvastatin und des Cholesterinresorptionshemmers Ezetimib eingesetzt. Die Ergebnisse der Studie zeigten eine höchstsignifikante Reduktion der Cholesterinresorption unter Ezetimib-Monotherapie um ca. 41 % gegenüber Placebo und ebenfalls eine höchstsignifikante Reduktion unter der Kombinationstherapie mit Ezetimib und Simvastatin von ca. 42 % gegenüber Placebo. Ein signifikanter Anstieg der Cholesterinresorption von ca. 4 % gegenüber Placebo konnte in der Behandlungsphase mit Simvastatin ermittelt werden.

Cholesterinbiosynthese und Cholesterinresorption verhielten sich nahezu gegenläufig und die Ergebnisse zeigten, daß aufgrund der verminderten Cholesterinresorption unter der Therapie mit Ezetimib eine gesteigerte Biosynthese vorliegt. Durch den kombinierten Einsatz von Cholesterinresorptionshemmer und Statin konnte die unter Ezetimib gesteigerte Synthese reduziert werden.

Die Quantifizierung der Analyten ermöglichte einen prozentualen Vergleich der Mengen der Analyten in den unterschiedlichen Behandlungsphasen. Es zeigten sich in allen Behandlungsphasen sehr einheitliche, gleichbleibende Werte für die Analyten d_6 -Coprostanol bzw. d_6 -Cholesterin, wodurch eine Änderung im Metabolisierungsverhalten der Darmbakterien in den jeweiligen Behandlungsphasen ausgeschlossen werden kann.

Auch die Menge des intestinalen Flow-Markers d_4 -Sitostanol wurde in den unterschiedlichen Behandlungsphasen quantifiziert. Die Ergebnisse zeigten eine sehr konstante Menge des Flow-Markers über alle vier Behandlungsphasen. Damit konnten Ergebnisse früherer Untersuchungen bestätigt werden, wonach d_4 -Sitostanol als verlässliche Markersubstanz in der Bestimmung der intestinalen Cholesterinresorption genannt und eingesetzt wurde.

Es ist anzunehmen, daß die neue Methode zukünftig bei stabiler Deuteriummarkierung der eingesetzten Markersubstanzen ebenso zur Bestimmung der Resorption der beiden Phytosterole Sitosterin und Campesterin eingesetzt werden kann.

Der Vergleich der von Lütjohann entwickelten Methode mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode zeigte eine ausgezeichnete Korrelation.

Im Gegensatz zu der bisher angewandten Methode ist die neue Methode nach internationalen Leitlinien validierbar. Mit der Validierung konnte nachgewiesen werden, daß die Messungen den allgemein geforderten Qualitätskriterien nach GLP entsprechen, und die Methode zur Bestimmung neutraler fäkaler Sterole im Rahmen der Untersuchung der Cholesterinresorption geeignet ist.

Des weiteren wurde in dieser Arbeit eine gaschromatographisch-massenspektrometrische Methode zur Bestimmung von Ursodesoxycholsäure in humanem Plasma entwickelt. Diese wurde zur Untersuchung des Stabilitätsverhaltens von Ursodesoxycholsäure eingesetzt, um Erkenntnisse über den Einfluß unterschiedlicher Lagerungsbedingungen auf die Stabilität des Arzneistoffes im Plasma zu gewinnen. Die Untersuchung belegte die Stabilität des Analyten bei verschiedenen für den Probentransport und die Probenlagerung relevanten Temperaturen und Lagerungszeiträumen.

Der Nachweis der Stabilität von Ursodesoxycholsäure bildete Grundlage und Voraussetzung für die nachfolgende Bioäquivalenzstudie zweier Arzneimittelzubereitungen mit Ursodesoxycholsäure.

Für die Bioäquivalenzstudie wurden Konzentrations-Zeit-Profile von 24 Probanden nach Einnahme der Ursodesoxycholsäure-Testformulierung (Tablette à 500 mg UDCA) und nach Einnahme der Referenzformulierung (zwei Kapseln à 250 mg Ursodesoxycholsäure) mit der in dieser Arbeit entwickelten gaschromatographisch-massenspektrometrischen Methode erstellt. Die Bioäquivalenz wurde aus diesen Profilen von einem unabhängigen Dienstleistungszentrum (SocraTec R&D GmbH, Oberursel) ermittelt. C_{\max} und $AUC_{0-t_{\text{last}}}$ erfüllten die im Studienplan festgelegten Akzeptanzkriterien mit einem 90 %-Konfidenzintervall für C_{\max} von 73-100 % und für $AUC_{0-t_{\text{last}}}$ von 98-116 %. Jedoch bemängelte die deutsche Zulassungsbehörde (BfArM) die im Vorfeld der Studie festgelegten Akzeptanzkriterien für C_{\max} als zu weit ausgelegt (90 %-Konfidenzintervall von 70-143 %) und forderte deshalb die Durchführung einer weiteren Studie mit den üblichen Akzeptanzkriterien für C_{\max} und $AUC_{0-t_{\text{last}}}$ (90 %-Konfidenzintervall 80-125 %). Somit steht die abschließende Entscheidung der deutschen Zulassungsbehörde über Zustimmung oder Ablehnung des Zulassungsantrages noch aus.

6 Literaturverzeichnis

1. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 106:3143-3421, 2002.
2. Grundy, S.M., Cleeman, J.I., Merz, C.N., Brewer, H.B., Jr., Clark, L.T., Hunninghake, D.B., Pasternak, R.C., Smith, S.C., Jr., and Stone, N.J. 2004. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation* 110:227-239.
3. De Backer, G., Ambrosioni, E., Borch-Johnsen, K., Brotons, C., Cifkova, R., Dallongeville, J., Ebrahim, S., Faergeman, O., Graham, I., Mancia, G., et al. 2003. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: third joint task force of European and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts). *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 10:S1-S10.
4. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). 1994. *Lancet* 344:1383-1389.
5. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. 1998. *N Engl J Med* 339:1349-1357.
6. Collins, R., Peto, R., and Armitage, J. 2002. The MRC/BHF Heart Protection Study: preliminary results. *Int J Clin Pract* 56:53-56.
7. Downs, J.R., Clearfield, M., Weis, S., Whitney, E., Shapiro, D.R., Beere, P.A., Langendorfer, A., Stein, E.A., Kruyer, W., and Gotto, A.M., Jr. 1998. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* 279:1615-1622.
8. Sacks, F.M., Pfeffer, M.A., Moye, L.A., Rouleau, J.L., Rutherford, J.D., Cole, T.G., Brown, L., Warnica, J.W., Arnold, J.M., Wun, C.C., et al. 1996. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 335:1001-1009.
9. Ruof, J., Klein, G., Marz, W., Wollschlager, H., Neiss, A., and Wehling, M. 2002. Lipid-lowering medication for secondary prevention of coronary heart disease in a German outpatient population: the gap between treatment guidelines and real life treatment patterns. *Prev Med* 35:48-53.
10. Shepherd, J. 2003. Combined lipid lowering drug therapy for the effective treatment of hypercholesterolaemia. *Eur Heart J* 24:685-689.
11. Lütjohann, D., Meese, C.O., Crouse, J.R., 3rd, and von Bergmann, K. 1993. Evaluation of deuterated cholesterol and deuterated sitostanol for measurement of cholesterol absorption in humans. *J Lipid Res* 34:1039-1046.

12. Fieser, L., and Fieser, M. 1959. *Steroide*. New York: Reinhold Publishing.
13. Mok, H.Y., von Bergmann, K., and Grundy, S.M. 1979. Effects of continuous and intermittent feeding on biliary lipid outputs in man: application for measurements of intestinal absorption of cholesterol and bile acids. *J Lipid Res* 20:389-398.
14. von Bergmann, K., Sudhop, T., and Lütjohann, D. 2005. Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *Am J Cardiol* 96:10D-14D.
15. Rosenfeld, R.A., and Gallagher, T.F. 1964. Further studies of the biotransformation of cholesterol to coprostanol. *Steroids* 4:515-520.
16. Björkhem, I., and Gustafsson, J.A. 1971. Mechanism of microbial transformation of cholesterol into coprostanol. *Eur J Biochem* 21:428-432.
17. Parmentier, G., and Eyssen, H. 1974. Mechanism of biohydrogenation of cholesterol to coprostanol by *Eubacterium* ATCC 21408. *Biochim Biophys Acta* 348:279-284.
18. Freier, T.A., Beitz, D.C., Li, L., and Hartman, P.A. 1994. Characterization of *Eubacterium coprostanoligenes* sp. nov., a cholesterol-reducing anaerobe. *Int J Syst Bacteriol* 44:137-142.
19. Ren, D., Li, L., Schwabacher, A.W., Young, J.W., and Beitz, D.C. 1996. Mechanism of cholesterol reduction to coprostanol by *Eubacterium coprostanoligenes* ATCC 51222. *Steroids* 61:33-40.
20. Jackson, E.M., Kloss, C.A., Weintraub, S.T., and Mott, G.E. 1985. Fractionation of fecal neutral steroids by high performance liquid chromatography. *J Lipid Res* 26:893-897.
21. Miettinen, T.A., Ahrens, E.H., Jr., and Grundy, S.M. 1965. Quantitative Isolation and Gas-Liquid Chromatographic Analysis of Total Dietary and Fecal Neutral Steroids. *J Lipid Res* 6:411-424.
22. Berge, K.E., Tian, H., Graf, G.A., Yu, L., Grishin, N.V., Schultz, J., Kwiterovich, P., Shan, B., Barnes, R., and Hobbs, H.H. 2000. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 290:1771-1775.
23. Kosters, A., Frijters, R.J., Schaap, F.G., Vink, E., Plosch, T., Ottenhoff, R., Jirsa, M., De Cuyper, I.M., Kuipers, F., and Groen, A.K. 2003. Relation between hepatic expression of ATP-binding cassette transporters G5 and G8 and biliary cholesterol secretion in mice. *J Hepatol* 38:710-716.
24. Wang, D.Q. 2003. New concepts of mechanisms of intestinal cholesterol absorption. *Ann Hepatol* 2:113-121.
25. Rosenblum, S.B., Huynh, T., Afonso, A., Davis, H.R., Jr., Yumibe, N., Clader, J.W., and Burnett, D.A. 1998. Discovery of 1-(4-fluorophenyl)-(3R)-[3-(4-fluorophenyl)-(3S)-hydroxypropyl]-(4S)-(4-hydroxyphenyl)-2-azetidinone (SCH 58235): a designed, potent, orally active inhibitor of cholesterol absorption. *J Med Chem* 41:973-980.

26. Altmann, S.W., Davis, H.R., Jr., Zhu, L.J., Yao, X., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Iyer, S.P., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., et al. 2004. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 303:1201-1204.
27. Piironen, V., Lindsay, D.G., Miettinen, T.A., Toivo, J., and Lampi, A.M. 2000. Review Plant Sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J Sci Food Agric* 80:939-966.
28. Grundy, S.M., Ahrens, E.H., Jr., and Salen, G. 1968. Dietary beta-sitosterol as an internal standard to correct for cholesterol losses in sterol balance studies. *J Lipid Res* 9:374-387.
29. Lütjohann, D., Björkhem, I., Beil, U.F., and von Bergmann, K. 1995. Sterol absorption and sterol balance in phytosterolemia evaluated by deuterium-labeled sterols: effect of sitostanol treatment. *J Lipid Res* 36:1763-1773.
30. Salen, G., Ahrens, E.H., Jr., and Grundy, S.M. 1970. Metabolism of beta-sitosterol in man. *J Clin Invest* 49:952-967.
31. Heinemann, T., Axtmann, G., and von Bergmann, K. 1993. Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. *Eur J Clin Invest* 23:827-831.
32. Marrugat, J., Sala, J., Masia, R., Pavesi, M., Sanz, G., Valle, V., Molina, L., Seres, L., and Elosua, R. 1998. Mortality differences between men and women following first myocardial infarction. RESCATE Investigators. Recursos Empleados en el Síndrome Coronario Agudo y Tiempo de Espera. *JAMA* 280:1405-1409.
33. Vaccarino, V., Parsons, L., Every, N.R., Barron, H.V., and Krumholz, H.M. 1999. Sex-based differences in early mortality after myocardial infarction. National Registry of Myocardial Infarction 2 Participants. *N Engl J Med* 341:217-225.
34. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. I. Reduction in incidence of coronary heart disease, 1984. *JAMA* 251:351-364.
35. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. II. The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering, 1984. *JAMA* 251:365-374.
36. Stamler, J., Wentworth, D., and Neaton, J.D. 1986. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA* 256:2823-2828.
37. Wilson, P.W., D'Agostino, R.B., Levy, D., Belanger, A.M., Silbershatz, H., and Kannel, W.B. 1998. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 97:1837-1847.
38. Pekkanen, J., Linn, S., Heiss, G., Suchindran, C.M., Leon, A., Rifkind, B.M., and Tyroler, H.A. 1990. Ten-year mortality from cardiovascular disease in relation to cholesterol level among men with and without preexisting cardiovascular disease. *N Engl J Med* 322:1700-1707.

39. Rossouw, J.E., Lewis, B., and Rifkind, B.M. 1990. The value of lowering cholesterol after myocardial infarction. *N Engl J Med* 323:1112-1119.
40. Wong, N.D., Wilson, P.W., and Kannel, W.B. 1991. Serum cholesterol as a prognostic factor after myocardial infarction: the Framingham Study. *Ann Intern Med* 115:687-693.
41. Klag, M.J., Ford, D.E., Mead, L.A., He, J., Whelton, P.K., Liang, K.Y., and Levine, D.M. 1993. Serum cholesterol in young men and subsequent cardiovascular disease. *N Engl J Med* 328:313-318.
42. Stamler, J., Daviglius, M.L., Garside, D.B., Dyer, A.R., Greenland, P., and Neaton, J.D. 2000. Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity. *JAMA* 284:311-318.
43. Law, M.R., Wald, N.J., and Thompson, S.G. 1994. By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? *BMJ* 308:367-372.
44. Lewis, S.J., Moye, L.A., Sacks, F.M., Johnstone, D.E., Timmis, G., Mitchell, J., Limacher, M., Kell, S., Glasser, S.P., Grant, J., et al. 1998. Effect of pravastatin on cardiovascular events in older patients with myocardial infarction and cholesterol levels in the average range. Results of the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial. *Ann Intern Med* 129:681-689.
45. Smith, G.D., Song, F., and Sheldon, T.A. 1993. Cholesterol lowering and mortality: the importance of considering initial level of risk. *BMJ* 306:1367-1373.
46. Katan, M.B., Grundy, S.M., Jones, P., Law, M., Miettinen, T., and Paoletti, R. 2003. Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc* 78:965-978.
47. Armstrong, M.J., and Carey, M.C. 1987. Thermodynamic and molecular determinants of sterol solubilities in bile salt micelles. *J Lipid Res* 28:1144-1155.
48. Jones, P.J., Raeini-Sarjaz, M., Ntanos, F.Y., Vanstone, C.A., Feng, J.Y., and Parsons, W.E. 2000. Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus phytostanol esters. *J Lipid Res* 41:697-705.
49. Ling, W.H., and Jones, P.J. 1995. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci* 57:195-206.
50. Wang, C., Lin, H.J., Chan, T.K., Salen, G., Chan, W.C., and Tse, T.F. 1981. A unique patient with coexisting cerebrotendinous xanthomatosis and beta-sitosterolemia. *Am J Med* 71:313-319.
51. Whittaker, M.H., Frankos, V.H., Wolterbeek, A.P., and Waalkens-Berendsen, D.H. 1999. Two-generation reproductive toxicity study of plant stanol esters in rats. *Regul Toxicol Pharmacol* 29:196-204.
52. Schnitzer-Polokoff, R., Compton, D., Boykow, G., Davis, H., and Burrier, R. 1991. Effects of acyl-CoA: cholesterol O-acyltransferase inhibition on cholesterol absorption

- and plasma lipoprotein composition in hamsters. *Comp Biochem Physiol A* 99:665-670.
53. Clader, J.W. 2004. The discovery of ezetimibe: a view from outside the receptor. *J Med Chem* 47:1-9.
54. van Heek, M., Farley, C., Compton, D.S., Hoos, L., Alton, K.B., Sybertz, E.J., and Davis, H.R., Jr. 2000. Comparison of the activity and disposition of the novel cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, and its glucuronide, SCH60663. *Br J Pharmacol* 129:1748-1754.
55. Davis, H.R., Zhu, L.J., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Maguire, M., Liu, J., Yao, X., Iyer, S.P., Lam, M.H., Lund, E.G., et al. 2004. Niemann-pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 279:33586-33592.
56. Smart, E.J., De Rose, R.A., and Farber, S.A. 2004. Annexin 2-caveolin 1 complex is a target of ezetimibe and regulates intestinal cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3450-3455.
57. Kramer, W., Girbig, F., Corsiero, D., Pfenninger, A., Frick, W., Jahne, G., Rhein, M., Wendler, W., Lottspeich, F., Hochleitner, E.O., et al. 2005. Aminopeptidase N (CD13) is a molecular target of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in the enterocyte brush border membrane. *J Biol Chem* 280:1306-1320.
58. Simard, C., and Turgeon, J. 2003. The pharmacokinetics of ezetimibe. *Can J Clin Pharmacol* 10 Suppl A:13A-20A.
59. Fachinformation "Ezetrol", MSD, Essex Pharma, 2004.
60. Sudhop, T., Lütjohann, D., Kodali, A., Igel, M., Tribble, D.L., Shah, S., Perevozskaya, I., and von Bergmann, K. 2002. Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans. *Circulation* 106:1943-1948.
61. Ballantyne, C.M. 2002. Ezetimibe: efficacy and safety in clinical trials. *Eur Heart J* 4(Suppl J):J9-J18.
62. Gagne, C., Gaudet, D., and Bruckert, E. 2002. Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with atorvastatin or simvastatin in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation* 105:2469-2475.
63. Salen, G., von Bergmann, K., Lütjohann, D., Kwiterovich, P., Kane, J., Patel, S.B., Musliner, T., Stein, P., and Musser, B. 2004. Ezetimibe effectively reduces plasma plant sterols in patients with sitosterolemia. *Circulation* 109:966-971.
64. Harris, M., Davis, W., and Brown, W.V. 2003. Ezetimibe. *Drugs Today (Barc)* 39:229-247.
65. Bays, H.E., Moore, P.B., Drehobl, M.A., Rosenblatt, S., Toth, P.D., Dujovne, C.A., Knopp, R.H., Lipka, L.J., Lebeaut, A.P., Yang, B., et al. 2001. Effectiveness and tolerability of ezetimibe in patients with primary hypercholesterolemia: pooled analysis of two phase II studies. *Clin Ther* 23:1209-1230.

66. Dujovne, C.A., Ettinger, M.P., McNeer, J.F., Lipka, L.J., LeBeaut, A.P., Suresh, R., Yang, B., and Veltri, E.P. 2002. Efficacy and safety of a potent new selective cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, in patients with primary hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 90:1092-1097.
67. Bundesärztekammer. 2004. "Aus der UAW-Datenbank", Myopathien bzw. Leberreaktionen unter Ezetimib (Ezetrol). *Deutsches Ärzteblatt* 101:A-959.
68. Feldman, M., Friedman, L.S., Sleisenger, M.H., and B.F., S. 2002. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology/Diagnosis/Management (2 Volume Set)*: W.B. Saunders.
69. Chiang, J.Y. 2004. Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J Hepatol* 40:539-551.
70. Hagey, L.R., Crombie, D.L., Espinosa, E., Carey, M.C., Igimi, H., and Hofmann, A.F. 1993. Ursodeoxycholic acid in the Ursidae: biliary bile acids of bears, pandas, and related carnivores. *J Lipid Res* 34:1911-1917.
71. Trauner, M., and Graziadei, I.W. 1999. Review article: mechanisms of action and therapeutic applications of ursodeoxycholic acid in chronic liver diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 13:979-996.
72. Beuers, U., Boyer, J.L., and Paumgartner, G. 1998. Ursodeoxycholic acid in cholestasis: potential mechanisms of action and therapeutic applications. *Hepatology* 28:1449-1453.
73. Poupon, R., and Poupon, R.E. 1995. Ursodeoxycholic acid therapy of chronic cholestatic conditions in adults and children. *Pharmacol Ther* 66:1-15.
74. Lang, T., and Wirth, S. 2002. "Cholelithiasis, Gallensteine" Leitlinien der Gesellschaft für Pädiatrische Gastroenterologie und Ernährung (GPGE), AWMF-Leitlinien-Register Nr. 068/006.
75. Crosignani, A., Setchell, K.D., Invernizzi, P., Larghi, A., Rodrigues, C.M., and Podda, M. 1996. Clinical pharmacokinetics of therapeutic bile acids. *Clin Pharmacokinet* 30:333-358.
76. Fedorowski, T., Salen, G., Calallilo, A., Tint, G.S., Mosbach, E.H., and Hall, J.C. 1977. Metabolism of ursodeoxycholic acid in man. *Gastroenterology* 73:1131-1137.
77. Ward, A., Brogden, R.N., Heel, R.C., Speight, T.M., and Avery, G.S. 1984. Ursodeoxycholic acid: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 27:95-131.
78. Fachinformation "Ursofalk", Dr. Falk Pharma GmbH, 2004.
79. Poupon, R.E., Poupon, R., and Balkau, B. 1994. Ursodiol for the long-term treatment of primary biliary cirrhosis. The UDCA-PBC Study Group. *N Engl J Med* 330:1342-1347.
80. Rubin, R.A., Kowalski, T.E., Khandelwal, M., and Malet, P.F. 1994. Ursodiol for hepatobiliary disorders. *Ann Intern Med* 121:207-218.

81. Hofmann, A.F., and Popper, H. 1987. Ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis. *Lancet* 2:398-399.
82. Guldutuna, S., Zimmer, G., Imhof, M., Bhatti, S., You, T., and Leuschner, U. 1993. Molecular aspects of membrane stabilization by ursodeoxycholate [see comment]. *Gastroenterology* 104:1736-1744.
83. Beuers, U., Nathanson, M.H., and Boyer, J.L. 1993. Effects of tauroursodeoxycholic acid on cytosolic Ca²⁺ signals in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology* 104:604-612.
84. Bouscarel, B., Gettys, T.W., Fromm, H., and Dubner, H. 1995. Ursodeoxycholic acid inhibits glucagon-induced cAMP formation in hamster hepatocytes: a role for PKC. *Am J Physiol* 268:G300-310.
85. Yoshikawa, M., Tsujii, T., Matsumura, K., Yamao, J., Matsumura, Y., Kubo, R., Fukui, H., and Ishizaka, S. 1992. Immunomodulatory effects of ursodeoxycholic acid on immune responses. *Hepatology* 16:358-364.
86. Leuschner, U., Leuschner, M., Sieratzki, J., Kurtz, W., and Hubner, K. 1985. Gallstone dissolution with ursodeoxycholic acid in patients with chronic active hepatitis and two years follow-up. A pilot study. *Dig Dis Sci* 30:642-649.
87. Batta, A.K., Arora, R., Salen, G., Tint, G.S., Eskreis, D., and Katz, S. 1989. Characterization of serum and urinary bile acids in patients with primary biliary cirrhosis by gas-liquid chromatography-mass spectrometry: effect of ursodeoxycholic acid treatment. *J Lipid Res* 30:1953-1962.
88. Batta, A.K., Salen, G., Arora, R., Shefer, S., Tint, G.S., Abroon, J., Eskreis, D., and Katz, S. 1989. Effect of ursodeoxycholic acid on bile acid metabolism in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 10:414-419.
89. Crosignani, A., Podda, M., Battezzati, P.M., Bertolini, E., Zuin, M., Watson, D., and Setchell, K.D. 1991. Changes in bile acid composition in patients with primary biliary cirrhosis induced by ursodeoxycholic acid administration. *Hepatology* 14:1000-1007.
90. Stiehl, A., Raedsch, R., and Rudolph, G. 1990. Acute effects of ursodeoxycholic and chenodeoxycholic acid on the small intestinal absorption of bile acids. *Gastroenterology* 98:424-428.
91. Stiehl, A., Rudolph, G., Raedsch, R., Moller, B., Hopf, U., Lotterer, E., Bircher, J., Folsch, U., Klaus, J., Endeke, R., et al. 1990. Ursodeoxycholic acid-induced changes of plasma and urinary bile acids in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 12:492-497.
92. Eusufzai, S., Ericsson, S., Cederlund, T., Einarsson, K., and Angelin, B. 1991. Effect of ursodeoxycholic acid treatment on ileal absorption of bile acids in man as determined by the SeHCAT test. *Gut* 32:1044-1048.
93. Marteau, P., Chazouilleres, O., Myara, A., Jian, R., Rambaud, J.C., and Poupon, R. 1990. Effect of chronic administration of ursodeoxycholic acid on the ileal absorption of endogenous bile acids in man. *Hepatology* 12:1206-1208.

94. Patel, T., Roberts, L.R., Jones, B.A., and Gores, G.J. 1998. Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: an overview. *Semin Liver Dis* 18:105-114.
95. Galle, P.R., Theilmann, L., Raedsch, R., Otto, G., and Stiehl, A. 1990. Ursodeoxycholate reduces hepatotoxicity of bile salts in primary human hepatocytes. *Hepatology* 12:486-491.
96. Heuman, D.M., Mills, A.S., McCall, J., Hylemon, P.B., Pandak, W.M., and Vlahcevic, Z.R. 1991. Conjugates of ursodeoxycholate protect against cholestasis and hepatocellular necrosis caused by more hydrophobic bile salts. In vivo studies in the rat. *Gastroenterology* 100:203-211.
97. Heuman, D.M., Bajaj, R.S., and Lin, Q. 1996. Adsorption of mixtures of bile salt taurine conjugates to lecithin-cholesterol membranes: implications for bile salt toxicity and cytoprotection. *J Lipid Res* 37:562-573.
98. Puglielli, L., Amigo, L., Arrese, M., Nunez, L., Rigotti, A., Garrido, J., Gonzalez, S., Mingrone, G., Greco, A.V., Accatino, L., et al. 1994. Protective role of biliary cholesterol and phospholipid lamellae against bile acid-induced cell damage. *Gastroenterology* 107:244-254.
99. Beuers, U., Spengler, U., Zwiebel, F.M., Pauletzki, J., Fischer, S., and Paumgartner, G. 1992. Effect of ursodeoxycholic acid on the kinetics of the major hydrophobic bile acids in health and in chronic cholestatic liver disease. *Hepatology* 15:603-608.
100. Calmus, Y., Gane, P., Rouger, P., and Poupon, R. 1990. Hepatic expression of class I and class II major histocompatibility complex molecules in primary biliary cirrhosis: effect of ursodeoxycholic acid. *Hepatology* 11:12-15.
101. Calmus, Y., Guehot, J., Podevin, P., Bonnefis, M.T., Giboudeau, J., and Poupon, R. 1992. Differential effects of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor-alpha production by monocytes. *Hepatology* 16:719-723.
102. Calmus, Y., Weill, B., Ozier, Y., Chereau, C., Houssin, D., and Poupon, R. 1992. Immunosuppressive properties of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids in the mouse. *Gastroenterology* 103:617-621.
103. Invernizzi, P., Salzman, A.L., Szabo, C., Ueta, I., O'Connor, M., and Setchell, K.D. 1997. Ursodeoxycholate inhibits induction of NOS in human intestinal epithelial cells and in vivo. *Am J Physiol* 273:G131-138.
104. Ohiwa, T., Katagiri, K., Hoshino, M., Hayakawa, T., and Nakai, T. 1993. Tauroursodeoxycholate and tauro-beta-muricholate exert cytoprotection by reducing intrahepatocyte taurochenodeoxycholate content. *Hepatology* 17:470-476.
105. Beuers, U., Spengler, U., Kruis, W., Aydemir, U., Wiebecke, B., Heldwein, W., Weinzierl, M., Pape, G.R., Sauerbruch, T., and Paumgartner, G. 1992. Ursodeoxycholic acid for treatment of primary sclerosing cholangitis: a placebo-controlled trial. *Hepatology* 16:707-714.
106. Heathcote, E.J., Cauch-Dudek, K., Walker, V., Bailey, R.J., Blendis, L.M., Ghent, C.N., Michieletti, P., Minuk, G.Y., Pappas, S.C., Scully, L.J., et al. 1994. The

- Canadian Multicenter Double-blind Randomized Controlled Trial of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 19:1149-1156.
107. Colombo, C., Castellani, M.R., Balistreri, W.F., Seregini, E., Assaisso, M.L., and Giunta, A. 1992. Scintigraphic documentation of an improvement in hepatobiliary excretory function after treatment with ursodeoxycholic acid in patients with cystic fibrosis and associated liver disease. *Hepatology* 15:677-684.
108. Trauner, M., Meier, P.J., and Boyer, J.L. 1998. Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med* 339:1217-1227.
109. Prieto, J., Qian, C., Garcia, N., Diez, J., and Medina, J.F. 1993. Abnormal expression of anion exchanger genes in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 105:572-578.
110. Horning, E.C. 1955. *Organic Synthesis Collective Volume 3*. New York: Wiley & Sons.
111. Budzikiewicz, H. 1998. *Massenspektrometrie*. Weinheim: Wiley-VCH.
112. Czubayko, F., Beumers, B., Lammsfuss, S., Lütjohann, D., and von Bergmann, K. 1991. A simplified micro-method for quantification of fecal excretion of neutral and acidic sterols for outpatient studies in humans. *J Lipid Res* 32:1861-1867.
113. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. FDA 2001.
114. Kromidas, S. 2000. *Handbuch Validierung in der Analytik*. Weinheim: Wiley-VCH.
115. Grundy, S.M. 1983. Absorption and metabolism of dietary cholesterol. *Annu Rev Nutr* 3:71-96.
116. Crouse, J.R., and Grundy, S.M. 1978. Evaluation of a continuous isotope feeding method for measurement of cholesterol absorption in man. *J Lipid Res* 19:967-971.
117. Bhattacharyya, A.K. 1986. Differences in uptake and esterification of saturated analogues of cholesterol by rat small intestine. *Am J Physiol* 251:G495-500.
118. Bartko, J.J. 1994. Measures of agreement: a single procedure. *Stat Med* 13:737-745.
119. Matthan, N.R., and Lichtenstein, A.H. 2004. Approaches to measuring cholesterol absorption in humans. *Atherosclerosis* 174:197-205.
120. Repa, J.J., Dietschy, J.M., and Turley, S.D. 2002. Inhibition of cholesterol absorption by SCH 58053 in the mouse is not mediated via changes in the expression of mRNA for ABCA1, ABCG5, or ABCG8 in the enterocyte. *J Lipid Res* 43:1864-1874.
121. Simon, J.S., Karnoub, M.C., Devlin, D.J., Arreaza, M.G., Qiu, P., Monks, S.A., Severino, M.E., Deutsch, P., Palmisano, J., Sachs, A.B., et al. 2005. Sequence variation in NPC1L1 and association with improved LDL-cholesterol lowering in response to ezetimibe treatment. *Genomics*.
122. Davis, H.R., Jr., Pula, K.K., Alton, K.B., Burrier, R.E., and Watkins, R.W. 2001. The synergistic hypocholesterolemic activity of the potent cholesterol absorption inhibitor,

- ezetimibe, in combination with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors in dogs. *Metabolism* 50:1234-1241.
123. Ballantyne, C., Hourii, J., Notarbartolo, A., Melani, L., Lipka, L., LeBeaut, A., Suresh, R., Sun, S., and Veltri, E. 2002. Ezetimibe co-administered with atorvastatin in 628 patients with primary hypercholesterolemia. *JACC* 39 [suppl 1]:227.
 124. Davidson, M.H., McGarry, T., Bettis, R., Melani, L., Lipka, L.J., LeBeaut, A.P., Suresh, R., Sun, S., and Veltri, E.P. 2002. Ezetimibe coadministered with simvastatin in patients with primary hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 40:2125-2134.
 125. Kosoglou, T., Meyer, I., Veltri, E.P., Statkevich, P., Yang, B., Zhu, Y., Mellars, L., Maxwell, S.E., Patrick, J.E., Cutler, D.L., et al. 2002. Pharmacodynamic interaction between the new selective cholesterol absorption inhibitor ezetimibe and simvastatin. *Br J Clin Pharmacol* 54:309-319.
 126. Fux, R., Morike, K., Gundel, U.F., Hartmann, R., and Gleiter, C.H. 2004. Ezetimibe and statin-associated myopathy. *Ann Intern Med* 140:671-672.
 127. 2004. Ezetimib plus Simvastatin (inegy). *arznei-telegramm* 35:46-47.
 128. Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence. CPMP London. 2001.
 129. Weitschies, W. 2000. [Magnets instead of radioisotope: pills in the gastrointestinal tract]. *Pharm Unserer Zeit* 29:115-120.
 130. Williams, C.N., Al-Knawy, B., and Blanchard, W. 2000. Bioavailability of four ursodeoxycholic acid preparations. *Aliment Pharmacol Ther* 14:1133-1139.
 131. Mitchell, S.A., Bansi, D.S., Hunt, N., von Bergmann, K., Fleming, K.A., and Chapman, R.W. 2001. A preliminary trial of high-dose ursodeoxycholic acid in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 121:900-907.
 132. Paumgartner, G., and Beuers, U. 2002. Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology* 36:525-531.
 133. Setchell, K.D., Galzigna, L., O'Connell, N., Brunetti, G., and Tauschel, H.D. 2005. Bioequivalence of a new liquid formulation of ursodeoxycholic acid (Ursofalk suspension) and Ursofalk capsules measured by plasma pharmacokinetics and biliary enrichment. *Aliment Pharmacol Ther* 21:709-721.
 134. Anshütz, M. 2004. Open, randomised, two-period cross-over, single dose bioequivalence study of 500 mg ursodeoxycholic acid tablet and 2 x 250 mg ursodeoxycholic acid capsules in healthy volunteers of both sexes (Integrated Clinical Study Report). 6:1-66.
 135. Weitschies, W., Kotitz, R., Cordini, D., and Trahms, L. 1997. High-resolution monitoring of the gastrointestinal transit of a magnetically marked capsule. *J Pharm Sci* 86:1218-1222.

-
136. Simoni, P., Sabatini, L., Baraldini, M., Mirasoli, M., Roda, A., and Roda, E. 2002. Pharmacokinetics and bioavailability of four modified-release ursodeoxycholic acid preparations for once-a-day administration. *Int J Clin Pharmacol Res* 22:37-45.

7 Anhang

Anhang A

Neutrale fäkale Sterole und Cholesterinresorption bestimmt nach neuer Methode (über Quantifizierung der einzelnen Analyten = Quantifizierungsmethode) und nach alter Methode (Berechnung der Cholesterinresorption über ermittelte und korrigierte Flächen der Analyten = Flächenmethode)

In den unten stehenden Tabellen werden aus Gründen der Übersichtlichkeit folgende Abkürzungen verwendet:

d ₆ -Coprol	d ₆ -Coprostanol
d ₆ -Chol	d ₆ -Cholesterin
d ₄ -Sitol	d ₄ -Sitostanol
Chol-Res	Cholesterinresorption
n.v.	Probe nicht vorhanden
LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)

Proband 201

Phase Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
	[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1 4	14,08	3,65	19,69	30,0	130310106	39861095	98530135	33,4
1 5	12,58	1,87	13,94	19,4	118024043	17945690	70005115	25,1
1 6	15,21	2,39	16,44	16,8	132501395	22756995	76849670	22,1
1 7	19,03	2,29	19,70	15,9	190714995	24704785	106099795	21,7
2 4	2,47	1,31	7,20	59,2	18579318	9784305	31333140	65,1
2 5	2,60	1,58	9,86	67,0	20217880	13272880	45010515	71,3
2 6	5,67	2,56	17,55	63,6	47828213	24885660	82824515	66,1
2 7	7,55	2,93	18,99	57,1	71129094	32199375	98709955	59,6
3 4	4,47	2,16	11,39	54,7	35996844	19622280	51209145	58,1
3 5	4,44	2,41	13,37	60,2	34312852	21615345	58225200	63,0
3 6	2,69	1,99	7,54	51,7	21335723	18344915	34253095	55,3
3 7	3,58	2,15	10,56	57,9	28002037	19291590	46924690	61,1
4 4	10,03	3,23	15,85	35,0	87270923	32888020	74804880	38,1
4 5	16,03	3,75	21,84	29,6	138781989	38362545	102309240	33,2
4 6	13,67	2,17	16,05	23,3	122186348	20719720	77084480	28,5
4 7	14,69	3,04	17,38	20,7	124471794	29530660	79270480	25,1

Proband 202

		Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
Phase	Tag	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
		[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1	4	6,55	1,84	15,23	58,1	41205592	12597035	49530795	60,9
1	5	10,59	1,91	20,32	53,2	66827713	12908790	65673510	56,4
1	6	6,04	1,56	11,37	49,2	37264568	10000430	35966820	52,8
1	7	9,66	2,36	17,89	48,9	64771296	17881250	61436625	51,6
2	4	5,80	0,99	6,09	15,3	38044935	5501950	19594070	20,1
2	5	6,79	1,58	7,79	18,3	43300612	10412505	24690650	21,8
2	6	8,79	1,75	9,27	13,5	53443965	11287815	28059225	17,1
2	7	8,69	3,18	12,97	30,4	54072631	23487975	40912120	31,8
3	4	8,87	2,67	10,90	19,6	54055825	18804230	33405040	21,6
3	5	8,97	4,01	12,38	20,3	55793285	30413540	38954740	20,4
3	6	14,62	4,11	19,39	26,6	92893315	31427555	62518465	28,5
3	7	3,17	2,80	6,12	25,8	17749278	19580525	17650165	24,0
4	4	5,37	0,73	10,67	56,6	32421552	2947220	33132405	61,6
4	5	7,38	0,89	14,55	56,8	45480440	4296080	46019685	61,1
4	6	6,91	0,98	12,59	52,3	42729215	5059635	39791875	56,8
4	7	4,84	1,23	7,73	40,3	29505459	7259920	23881290	44,7

Proband 203

		Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
Phase	Tag	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
		[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1	4	14,51	1,56	19,51	35,4	99790393	11043110	63280385	38,5
1	5	9,82	2,45	16,45	41,5	66337126	18798495	52771200	43,3
1	6	4,71	1,19	7,34	37,0	29807948	7496275	22193045	40,9
1	7	14,43	1,62	17,99	29,9	95685106	11170245	56121110	33,1
2	4	2,55	0,75	4,41	41,4	13353960	3243220	11299340	48,4
2	5	1,96	1,24	7,02	64,2	10716609	7648720	20453065	68,4
2	6	2,39	0,55	4,26	45,8	13610166	1956570	11950565	54,2
2	7	1,70	1,55	8,09	68,5	9086829	10341510	24047670	71,6
3	4	2,49	1,00	7,42	63,1	6098320	2427275	9323265	67,9
3	5	1,98	0,73	4,64	54,1	10990697	3448360	13232550	61,7
3	6	1,37	0,45*	2,11	32,5	7060618	1085500	5402955	47,0
3	7	1,66	1,05	4,56	53,3	8526273	5960035	12530975	59,4
4	4	1,87	0,91	4,07	46,5	9955763	4806075	11121835	53,4
4	5	3,51	2,70	9,64	49,4	21477362	20372315	29357100	49,9
4	6	2,11	3,37	9,08	52,7	11534243	25025510	26490280	51,5
4	7	3,66	0,91	6,40	44,0	21816980	4902320	18466515	49,2

* außerhalb des linearen Bereiches (Kap. 3.2.5.3)

Proband 204

Phase Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
	[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1 4	3,29	1,56	8,19	61,0	8191728	3654350	14957135	68,0
1 5	4,73	1,96	9,66	54,4	12722881	5366955	18465610	60,4
1 6	4,79	1,47	8,68	52,4	13140036	3501065	16777440	59,9
1 7	4,67	1,80	10,30	58,6	12596706	4765305	19842475	64,6
2 4	3,11	1,02	4,88	44,2	8134875	1678810	8955280	55,7
2 5	5,53	1,54	7,81	40,3	15677258	3867135	15289895	48,3
2 6	5,99	3,43	10,21	39,1	17009312	11619145	20255995	42,9
2 7	7,45	1,32	7,55	23,5	21906038	2972230	14995740	32,9
3 4	8,90	1,38	9,49	28,6	26371414	3217280	19121060	37,5
3 5	3,18	0,88	3,98	32,7	8465690	1087810	7144930	46,0
3 6	1,05	1,10	2,45	42,2	2010159	2065240	4029140	59,1
3 7	3,74	1,03	5,93	46,9	10188605	1744385	11284650	57,3
4 4	3,38	1,39	11,39	72,4	9283183	3270870	23284175	78,2
4 5	3,11	1,19	8,62	67,1	7994229	2332940	16450545	74,6
4 6	2,94	1,21	8,55	68,0	7637458	2454715	16610995	75,4
4 7	3,78	1,16	8,47	61,6	10491953	2299855	16978580	69,5

Proband 205

Phase Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
	[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1 4	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
1 5	6,39	2,05	12,76	52,3	19994117	6866900	25422195	56,5
1 6	3,19	1,25	8,31	61,4	9686961	3479840	16643065	67,5
1 7	4,55	1,02	11,14	63,9	14986427	2565855	23795485	69,7
2 4	12,26	1,46	13,24	25,3	41768388	4545250	28028595	32,0
2 5	23,69*	2,28	24,95	24,9	76540318	7832640	50352290	31,1
2 6	13,87	1,80	14,50	22,1	46796989	6058130	30401500	28,5
2 7	11,45	1,19	14,07	35,2	37338881	3182930	28639935	41,8
3 4	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
3 5	6,56	1,56	9,13	35,9	21155138	4857130	18407955	41,9
3 6	9,30	1,03	11,48	35,1	29220642	2381625	22480255	42,2
3 7	18,42	2,37	20,82	28,0	62322571	8619865	44005840	33,7
4 4	5,52	0,73	11,28	60,1	18289001	1155050	23903985	66,5
4 5	7,54	0,76	13,54	55,8	24376626	1235175	27716920	62,0
4 6	5,85	1,11	12,12	58,6	18491988	2780400	24480695	64,3
4 7	6,31	0,67	12,61	60,1	20449648	874820	26086020	66,4

* außerhalb des linearen Bereiches (Kap. 3.2.5.3)

Proband 206

Phase Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
	[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1 4	9,11	1,52	9,22	17,1	28532111	4489785	17778730	23,9
1 5	19,27	2,39	18,07	13,9	61109399	8164420	35620870	20,3
1 6	14,32	2,63	15,09	19,2	40831743	8339000	26749245	24,7
1 7	15,70	3,81	16,62	15,7	60689175	17424355	40015640	20,0
2 4	6,33	1,35	12,55	56,0	19645526	3796145	24829580	61,3
2 5	10,27	2,26	19,18	53,0	33465614	7951145	39550730	57,1
2 6	15,06	1,88	25,87	52,9	48444710	6084795	52466090	57,4
2 7	19,58	2,56	35,12*	54,7	51936975	7445510	58755965	58,6
3 4	9,47	1,64	19,41	58,8	28026151	4736835	36475355	63,2
3 5	7,02	1,81	12,14	47,7	22510566	5948880	24638760	52,7
3 6	8,33	0,83	13,36	50,7	25334858	1485260	25598505	57,1
3 7	12,49	1,89	16,93	38,9	40300775	6205560	34223560	44,3
4 4	15,69	0,99	15,61	23,2	47560959	2091075	29405675	30,8
4 5	11,90	1,27	11,92	20,6	38653624	3516170	23963455	27,9
4 6	19,37	1,23	16,43	9,9	64296780	3362570	33799810	18,0
4 7	11,30	0,75	11,89	27,1	34016130	1125600	22168785	35,0

Proband 207

Phase Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
	[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1 4	6,44	2,14	13,73	56,1	19498197	7090835	26104335	60,7
1 5	1,87	1,77	9,11	71,9	4438337	4979030	15404920	76,4
1 6	2,81	3,37	12,43	65,0	7239520	11407045	21579680	66,7
1 7	2,99	1,90	7,75	55,6	7959418	5658855	13383605	60,8
2 4	9,80	3,80	16,78	43,0	30152922	14250855	32047930	46,6
2 5	1,61	1,34	3,12	33,5	3807919	3390700	4791665	42,1
2 6	5,81	3,58	11,10	40,6	17717129	13490240	21186095	43,2
2 7	13,19	4,05	19,60	38,2	40530625	15179185	37229160	42,3
3 4	9,14	9,19	23,57	45,3	27520836	36796615	44549430	44,4
3 5	6,31	3,39	11,08	38,5	19162848	12579020	20957080	41,6
3 6	4,91	1,39	7,21	38,7	14391898	3765930	13029970	46,3
3 7	12,57	2,09	15,18	32,1	37787966	6656475	28010975	38,9
4 4	3,18	2,46	11,25	64,8	9464919	8842650	22092235	68,1
4 5	4,65	3,66	17,26	66,2	13351495	13237260	32033690	68,0
4 6	4,09	2,10	11,91	63,4	9510900	5499480	17841870	67,6
4 7	3,21	1,65	9,56	64,2	8976263	4864615	17434865	69,4

* außerhalb des linearen Bereiches (Kap. 3.2.5.3)

Proband 208

Phase	Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
		d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
		[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1	4	4,82	1,18	7,34	40,5	13524642	2786070	12727140	48,8
1	5	11,38	1,60	14,64	35,5	33761230	4526340	26707600	42,8
1	6	10,15	6,56	17,92	32,1	29487096	24672460	32352415	33,1
1	7	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
2	4	3,51	3,60	11,11	53,4	9352292	12396715	19330720	55,1
2	5	6,83	4,26	18,67	56,7	19378798	15233385	33527950	58,8
2	6	12,82	2,09	19,28	43,7	37291070	6421285	34666960	49,6
2	7	6,82	1,81	12,18	48,4	19009125	5182050	21137310	54,3
3	4	3,57	1,30	9,61	63,1	9274427	3100120	16127535	69,4
3	6-	14,09	2,34	24,90	51,9	42230892	7664260	46293365	57,0
3	6-	7,36	1,76	12,99	48,9	20680508	5006410	22722405	54,9
3	7	8,78	1,25	13,36	45,4	25239225	3008430	23744205	52,5
4	4	6,14	2,03	8,96	33,6	18007746	6417430	16191360	39,8
4	5	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
4	6	7,43	1,63	8,85	25,4	20598332	4434575	14952125	33,1
4	7	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
4	8	13,27	1,52	13,13	18,0	39049412	4149165	23541815	26,7

Proband 209

Phase	Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
		d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
		[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1	4	2,65	5,75	17,87	65,4	6312562	19915580	28132625	65,7
1	5	1,23	5,89	11,78	55,5	2364480	20695240	18427920	54,0
1	6	5,86	4,38	19,45	61,3	15545726	14710555	31083275	64,2
1	7	10,21	4,06	25,28	58,5	27403506	13180950	39915430	62,6
2	4	11,30	6,32	24,50	47,1	27422894	19798000	34818235	50,1
2	5	15,82	2,92	24,57	43,9	40931528	8321965	36850310	50,8
2	6	14,46	7,08	35,28*	55,1	36431998	23145990	52051455	57,9
2	7	5,34	8,04	20,31	51,5	12654122	26278965	29232910	51,0
3	4	7,92	3,46	17,20	51,3	18403530	9491560	23515410	56,4
3	5	9,52	1,57	14,56	44,0	22539131	3077870	19984950	52,8
3	6	13,72	2,05	19,26	39,7	34571626	4975420	28041970	48,1
3	7	2,15	6,09	11,67	48,1	4193828	18131935	15396225	46,7
4	4	2,33	3,88	12,24	62,7	4592229	10654675	16088960	65,1
4	5	10,05	2,64	21,99	57,5	22968182	6535595	29478940	63,2
4	6	16,55	1,74	23,91	43,7	39183529	3591020	32747105	51,9
4	7	10,25	4,68	21,11	48,0	25032908	14198755	30188975	52,2

* außerhalb des linearen Bereiches (Kap. 3.2.5.3)

Proband 210

Phase	Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
		d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
		[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1	4	6,92	6,36	20,99	50,8	4530100	5173465	7785880	50,7
1	5	4,52	6,95	15,69	43,2	2857197	5817540	5852945	41,3
1	6	3,41	5,15	11,98	44,5	2067341	4206320	4458075	44,3
1	7	5,32	4,42	11,43	33,8	9192599	17765940	17714265	39,7
2	4	5,47	2,40	15,80	61,3	3417321	1544515	5665425	65,3
2	5	1,52	2,13	6,85	58,5	661533	1364520	2391475	66,5
2	6	6,97	2,23	14,82	51,8	4727686	1478625	5602430	56,1
2	7	5,10	3,64	14,96	54,6	3108261	2613590	5275985	57,1
3	4	1,47	1,35	5,39	59,4	594589	612200	1739665	72,5
3	5	3,76	2,23	10,19	54,3	2068700	1310340	3327625	59,8
3	6	7,33	3,76	17,54	50,9	4670669	2720725	6251730	53,2
3	7	3,59	1,48	7,52	47,7	2185380	758635	2661280	56,2
4	4	6,88	2,23	11,64	39,2	3775648	1196670	3509455	43,9
4	5	4,70	4,75	12,98	43,4	2760068	3495280	4419370	44,0
4	6	3,84	3,67	9,89	41,0	2383050	2804345	3606860	43,1
4	7	6,02	2,39	11,30	42,2	3907453	1581705	4082695	46,8

Proband 211

Phase	Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
		d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
		[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1	4	1,26	1,36	4,27	50,5	354158	485220	1034695	66,7
1	5	0,72*	1,15	3,97	62,1	53684	351975	975445	82,9
1	6	1,45	1,89	4,47	39,9	494286	931210	1188990	50,7
1	7	0,84	2,28	4,02	37,5	129109	1227380	1044690	46,6
2	4	3,59	3,25	9,91	44,3	1717339	1891855	2830355	47,6
2	5	6,29	2,72	12,37	41,3	3716517	1707305	4071985	45,2
2	6	8,20	6,42	18,14	35,0	5257012	5047120	6451750	34,3
2	7	3,59	5,20	12,62	43,8	2004604	3870805	4285135	43,6
3	4	1,33	4,11	8,41	47,8	445862	2752170	2579395	49,0
3	5	3,56	4,52	10,10	35,5	1827812	3030985	3109065	35,8
3	6	0,75	3,74	4,95	26,9	83165	2515350	1446450	26,2
3	7	10,02	2,93	14,65	28,7	6327549	1924640	4998205	32,1
4	4	1,67	2,44	8,05	58,8	672174	1435555	2492235	65,2
4	5	2,69	1,10	9,29	67,0	1329240	356810	2925165	76,3
4	6	2,12	1,37	6,84	58,8	946800	566005	2050435	69,7
4	7	2,68	2,86	9,80	54,5	1379517	1863300	3247710	59,0

* außerhalb des linearen Bereiches (Kap. 3.2.5.3)

Proband 213

Phase	Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
		d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
		[µg/ml]		[%]		Signalfläche [Counts]			[%]
1	4	9,10	2,70	17,17	39,0	4334221	1376035	4534555	46,0
1	5	19,49	2,11	28,97*	33,8	10002686	1019070	8072590	41,5
1	6	16,31	2,77	23,67	28,5	9033521	1612520	7132755	36,0
1	7	12,18	3,76	17,60	19,6	7236045	2576595	5714765	26,4
2	4	6,04	3,14	9,98	18,4	2980723	1792105	2765875	26,0
2	5	11,85	1,94	13,21	7,3	6745624	1013015	4078505	18,4
2	6	5,02	3,95	8,92	10,6	2675736	2619595	2701915	16,0
2	7	7,67	3,91	12,52	17,8	4282903	2604105	3879175	23,9
3	4	3,61	3,25	8,08	24,7	1679983	1882005	2228890	31,5
3	5	2,83	1,01	4,43	23,2	1339782	262765	1242415	44,7
3	6	6,05	5,32	14,63	31,0	3042918	3433325	4185915	33,7
3	7	0,87	2,06	3,51	25,9	201978	1089835	958945	42,2
4	4	4,82	2,15	12,04	48,7	2220557	1025880	3216590	56,7
4	5	6,89	2,60	14,19	40,7	3885806	1577300	4501375	48,0
4	6	20,04	1,47	15,81	-20,8	11894821	656560	5025505	-7,1
4	7	12,92	1,59	14,40	10,6	7590621	757545	4585480	21,9

Proband 214

Phase	Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
		d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
		[µg/ml]		[%]		Signalfläche [Counts]			[%]
1	4	5,25	1,56	9,89	49,0	15773224	4816785	15362720	53,2
1	5	5,54	1,29	9,97	49,3	17821050	3903835	16535855	54,1
1	6	4,71	2,44	11,51	54,0	15813615	9568645	20263365	56,2
1	7	5,88	2,34	11,70	48,0	19302132	8763485	19945550	50,8
2	4	1,76	4,42	9,45	51,6	5295861	18644465	16179075	48,3
2	5	3,88	7,68	16,19	47,1	13058473	34861855	29426490	43,1
2	6	5,28	8,73	18,56	44,1	18210728	40090750	34104385	40,3
2	7	6,37	9,91	20,75	41,9	17147385	35526325	29665990	38,0
3	4	0,98	4,04	7,60	51,1	2670107	17523980	13271165	46,8
3	5	1,11	4,89	8,41	47,1	3017124	20808420	14236530	41,5
3	6	1,51	5,20	8,05	38,3	4644118	23318065	14264100	31,5
3	7	1,44	5,78	10,52	49,2	4304029	25824825	18766740	43,9
4	4	5,30	2,06	10,77	49,4	18381977	7981105	19416500	52,6
4	5	7,69	1,08	11,79	44,9	25692931	3052295	20269760	50,4
4	6	8,36	1,18	11,75	39,9	28682245	3577900	20690630	45,5
4	7	7,68	3,50	13,55	39,0	25536949	14113025	23359550	40,7

* außerhalb des linearen Bereiches (Kap. 3.2.5.3)

Proband 215

Phase Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
	[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1 4	10,87	1,83	13,07	22,6	64864466	11720230	22253390	34,9
1 5	14,96	3,60	16,01	7,6	100951674	28632465	30057150	23,4
1 6	5,33	3,11	8,71	22,7	35914870	25368905	16161105	28,5
1 7	5,81	4,07	10,26	23,3	38840176	33554030	19110535	29,2
2 4	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
2 5	10,09	1,35	16,10	43,4	59855909	8013685	26183275	52,2
2 6	7,52	2,06	13,61	43,9	51323626	15711395	27252745	53,0
2 7	9,34	1,26	13,01	35,1	63984483	8438815	27264820	48,4
3 4	3,59	3,45	13,16	57,4	22401718	27198450	25298270	60,5
3 5	6,10	2,87	16,86	57,6	40487602	22673135	32941315	63,2
3 6	3,18	1,62	7,43	48,6	20191270	11691370	13845380	55,9
3 7	3,85	3,00	11,09	50,8	24495600	23587485	22264340	58,5
4 4	5,01	3,99	10,89	34,1	32573450	32305980	21836770	41,0
4 5	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
4 6	4,78	4,29	10,82	33,3	28290301	31949540	20438245	41,3
4 7	5,91	1,22	5,21	-9,0	50834706	9881535	9682780	11,7

Proband 216

Phase Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
	[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1 4	< LOD	7,85	9,96	39,5	< LOD	83248280	43634320	27,4
1 5	< LOD	6,52	8,65	42,2	< LOD	63292065	34798185	30,7
1 6	< LOD	5,55	7,08	39,8	< LOD	57836920	30437835	27,6
1 7	< LOD	5,24	6,48	38,0	< LOD	53893970	27458420	25,3
2 4	1,56	2,58	8,97	64,6	10100107	23084885	37687490	66,5
2 5	2,58	3,95	12,05	58,4	18726896	38458370	52083625	58,2
2 6	1,52	4,91	14,58	66,2	9876937	49086370	63695820	64,8
2 7	0,66*	2,36	6,30	63,3	2705978	21312265	26384790	65,3
3 4	2,72	6,02	15,57	57,0	20231353	62205445	69275635	54,7
3 5	3,60	7,48	20,07	57,6	27301753	77434110	88746520	55,1
3 6	3,32	6,92	20,80	62,2	25856160	73916805	95426110	60,2
3 7	3,47	4,43	17,75	65,9	27298362	45666655	81457320	65,9
4 4	11,91	4,83	18,99	32,3	91063613	45355685	78797810	34,1
4 5	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
4 6	6,88	2,65	9,93	26,4	51895205	22922740	40353490	29,4
4 7	12,13	5,48	19,57	30,9	93193804	52296530	81630545	32,1

* außerhalb des linearen Bereiches (Kap. 3.2.5.3)

Proband 218

Phase	Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
		d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
		[µg/ml]		[%]		Signalfläche [Counts]			[%]
1	4	9,18	3,01	16,94	41,8	10039914	3649305	6746805	49,1
1	5	5,58	2,36	9,50	32,4	6088861	2733500	3820580	42,1
1	6	5,85	2,47	11,11	39,5	5677648	2577435	4003620	48,3
1	7	15,09	2,84	18,87	23,2	19017578	3786550	8459455	32,4
2	4	3,16	2,15	9,63	55,4	1847633	1408640	2297585	64,4
2	5	7,93	2,76	14,74	41,4	6589707	2493125	4483650	49,2
2	6	4,80	1,85	9,63	44,2	3909337	1427810	2959350	54,8
2	7	5,80	1,98	12,30	48,9	6274336	2066975	4981235	58,0
3	4	6,94	2,91	15,13	47,4	7425400	3499450	6009440	54,4
3	5	8,99	2,51	16,79	44,7	11108479	3215125	7568595	52,5
3	6	10,66	3,31	17,97	37,1	11998473	4222400	7309075	44,3
3	7	10,83	2,24	16,08	34,3	12603205	2545215	6726475	43,5
4	4	8,23	2,72	13,64	35,1	9327931	3337275	5614495	43,4
4	5	15,85	2,88	21,75	30,4	14440735	2780420	7072920	38,9
4	6	15,76	3,50	21,96	29,1	19560806	4901850	9733685	37,0
4	7	7,15	1,25	10,44	35,0	4046687	433355	2136770	47,4

Proband 219

Phase	Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
		d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
		[µg/ml]		[%]		Signalfläche [Counts]			[%]
1	4	4,71	1,32	11,81	61,8	3416914	656100	3289320	71,3
1	5	8,85	1,71	16,89	53,2	22707612	3678685	15829795	61,3
1	6	3,11	1,16	8,09	60,6	7018147	1596055	7384525	72,9
1	7	5,57	1,54	13,89	61,7	4492522	996940	4244370	70,0
2	4	9,65	1,42	14,49	42,8	8154426	838165	4409470	52,7
2	5	11,71	2,50	19,89	46,5	7467951	1623035	4579145	53,9
2	6	2,06	2,70	5,73	37,9	1247232	2332400	1540520	46,1
2	7	16,66	1,55	19,41	29,8	18152969	1252705	7500365	40,0
3	4	8,57	1,35	11,83	37,3	6886362	716435	3415730	48,3
3	5	10,00	3,29	15,09	34,1	9156101	3414475	4974840	41,4
3	6	5,84	1,39	8,17	33,8	5600706	943725	2833995	46,4
3	7	8,01	n.a.	n.a.	n.v.	7043656	120853975	58826170	49,5
4	4	2,86	1,53	6,95	52,8	1923124	930785	1902095	65,2
4	5	2,79	2,07	8,77	58,6	1793545	1514405	2369160	67,6
4	6	3,45	1,49	10,03	63,2	2640907	951770	3086685	73,0
4	7	5,06	2,02	11,80	55,1	4708361	1855750	4166070	63,4

Proband 220

Phase Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
	[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1 4	2,19	3,96	10,10	46,2	1030992	2734180	1876460	49,6
1 5	7,92	3,52	18,72	46,0	5459082	2777695	4278055	51,6
1 6	8,73	3,21	21,40	50,7	4927860	2008425	4001745	56,4
1 7	8,66	4,32	22,72	49,6	5456796	3256825	4754770	54,0
2 4	7,11	1,76	26,99	71,0	4463685	911890	5750640	76,5
2 5	14,43	3,68	36,83*	56,6	10638278	3043945	8912430	61,4
2 6	2,58	2,19	14,94	71,8	1731102	1649430	3889990	78,2
2 7	1,47	2,76	14,20	73,7	542018	1597390	2539225	78,8
3 4	1,80	1,01	7,56	67,2	678025	171835	1176355	81,8
3 5	6,47	1,65	30,59*	76,6	2802641	568710	4554180	81,4
3 6	1,87	5,72	17,64	62,0	759295	3869045	3106510	62,6
3 7	10,23	2,05	29,74*	63,5	6323759	1134805	6097965	69,3
4 4	3,03	4,05	13,01	51,9	1641936	2967040	2600255	55,5
4 5	14,26	4,90	31,89*	46,9	6984759	2873380	5110565	51,5
4 6	3,61	5,39	13,25	40,0	1974328	4074800	2584930	41,2
4 7	8,39	8,27	28,47	48,3	7267698	9501935	8277535	49,1

Proband 221

Phase Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
	[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1 4	10,46	2,04	31,00*	65,7	6394776	1116630	6286155	71,1
1 5	14,34	3,09	34,69*	57,3	8670006	1993500	6880485	62,5
1 6	13,93	2,20	30,63*	55,2	7348143	1066150	5287190	61,5
1 7	14,53	2,93	33,02*	55,0	9725180	2048670	7235760	60,6
2 4	9,74	1,28	10,24	17,4	91446795	10590480	46503570	23,9
2 5	19,18	2,91	25,20	25,5	9037363	1418010	3818530	33,8
2 6	25,24*	3,79	33,37*	26,0	19597101	3272225	8344570	33,7
2 7	22,12	3,37	30,59*	29,1	13614799	2242215	6068395	36,8
3 4	20,22	3,42	30,69*	34,5	11744343	2154675	5759425	41,6
3 5	8,06	3,08	15,83	40,2	4240605	1780395	2733260	46,7
3 6	10,64	2,90	16,60	30,7	5736811	1648290	2894235	38,3
3 7	15,97	4,09	26,94	36,7	9027704	2652815	4937820	42,8
4 4	9,82	2,89	24,93	56,7	5332588	1660355	4477755	62,2
4 5	12,75	3,30	25,78	47,1	9055654	2565210	5982595	53,0
4 6	14,96	3,49	29,52*	46,9	9584586	2466225	6165680	52,7
4 7	13,14	2,69	25,67	47,6	7968868	1655640	5077175	54,2

* außerhalb des linearen Bereiches (Kap. 3.2.5.3)

Proband 222

Phase	Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
		d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
		[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1	4	0,85	0,81	2,94	55,2	2366296	1828355	5594520	75,4
1	5	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
1	6	8,58	1,76	8,88	8,1	41841987	8353485	19730760	16,5
1	7	5,19	0,87	4,55	-5,2	24237073	2231580	9350610	7,0
1	8	5,12	3,54	9,41	27,4	25705568	21789675	22315305	30,1
2	4	< LOD	0,86	1,38	50,8	< LOD	2247510	2022045	63,5
2	5	< LOD	2,02	6,40	75,1	< LOD	10723795	14683350	76,0
2	6	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
2	7	< LOD	2,45	7,22	73,2	< LOD	14117565	17079035	72,9
2	8	< LOD	2,21	4,20	58,6	< LOD	11999580	9117030	56,8
3	4	< LOD	0,89	1,68	58,1	< LOD	2587350	2883790	70,5
3	5	< LOD	4,58	9,44	61,8	< LOD	29719805	22684340	57,0
3	6	< LOD	1,26	2,62	62,1	< LOD	5142770	5151725	67,2
3	7	< LOD	2,48	7,08	72,4	< LOD	13941255	16320700	72,0
4	4	< LOD	1,73	2,69	49,4	< LOD	8851450	5533975	47,5
4	5	< LOD	1,55	2,34	47,8	< LOD	7013590	4309360	46,6
4	6	< LOD	5,29	8,18	49,0	< LOD	34789055	19349830	41,0
4	7	< LOD	9,69	13,11	41,8	< LOD	68822735	32740655	31,0

Proband 223

Phase	Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
		d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
		[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1	4	18,13	7,79	31,82*	34,6	108140898	59227510	88485555	36,7
1	5	5,39	4,27	11,08	30,0	27517670	27489270	26883125	31,6
1	6	10,83	4,45	18,40	33,3	59979562	30057465	47586875	36,7
1	7	8,73	4,74	16,49	34,4	46787383	31532825	41507545	36,9
2	4	2,03	1,94	9,56	66,7	8950685	10210965	22829705	71,9
2	5	5,52	3,47	23,74	69,6	29449696	22467245	61734680	71,9
2	6	7,40	5,10	28,59*	64,9	40298696	35140560	74827000	66,3
2	7	7,73	2,05	16,63	52,8	42508605	11697225	43221725	58,0
3	4	12,42	2,06	23,96	51,5	69248107	11707185	62563850	56,7
3	5	12,68	2,53	27,41	55,5	70550612	15284755	71593805	59,9
3	6	11,13	4,03	29,35*	58,5	62574656	27221920	77921015	61,5
3	7	12,09	2,64	25,58	53,8	67125668	16094010	66659155	58,2
4	4	14,04	5,57	21,94	28,2	75718140	37380060	55085985	31,3
4	5	8,56	3,21	12,24	22,9	45176581	19736600	30013460	27,7
4	6	7,16	2,31	10,16	25,2	36888230	12899850	24313405	31,5
4	7	7,67	6,42	17,72	36,2	42458920	45887995	46467240	36,4

Proband 224

Phase Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
	[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1 4	3,46	1,27	9,57	60,7	16872507	5334540	22967170	68,0
1 5	5,25	1,10	12,36	59,2	26508737	4037410	29914950	66,2
1 6	2,80	2,08	8,35	53,5	12711042	10890750	19093410	59,1
1 7	6,46	1,79	12,47	47,4	32597150	8948760	29716925	53,7
2 4	9,11	3,10	14,92	34,9	49239054	19355180	37674430	39,7
2 5	19,84	2,87	24,47	26,2	108628714	17395970	62015220	32,7
2 6	12,76	1,25	15,12	26,4	71542134	5468245	39129680	34,8
2 7	7,38	1,96	11,20	33,7	40064748	10908775	28324115	40,4
3 4	9,22	1,19	10,77	23,2	50330349	4909270	27052510	32,4
3 5	15,29	1,39	17,12	22,5	84250237	6388550	43490320	31,0
3 6	10,87	1,22	12,55	23,4	58731739	5098265	31198265	32,2
3 7	11,45	1,62	13,67	24,0	62523318	8137655	34429485	32,0
4 4	3,01	2,02	8,73	54,1	14952624	11282660	21588575	59,7
4 5	1,94	2,13	7,25	55,4	8508191	11638910	17047310	60,8
4 6	4,89	1,30	10,46	53,0	24557780	5501055	25090845	60,3
4 7	4,91	1,32	12,25	59,5	23755831	5467070	28495880	66,0

Proband 225

Phase Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
	[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1 4	5,56	1,79	17,36	65,3	29081461	9414295	43856255	70,1
1 5	5,86	2,47	17,66	61,4	29619123	14014675	43011520	65,4
1 6	5,86	2,47	17,66	61,4	29619123	14014675	43011520	65,4
1 7	7,85	2,41	22,55	62,8	40590633	13593115	55587085	66,8
2 4	8,67	2,84	13,88	32,2	44736746	16589945	33426825	37,4
2 5	12,85	2,30	19,64	36,9	69556150	13130220	49468925	43,0
2 6	11,30	2,28	16,41	32,3	60687201	12928110	40959230	38,7
2 7	14,38	2,32	20,49	33,3	77579561	13173410	51318640	39,7
3 4	8,65	1,24	11,57	30,1	44316007	5001750	27429285	38,7
3 5	8,35	1,18	12,72	38,7	42343024	4560630	30030850	46,7
3 6	11,68	1,46	15,34	29,9	59837082	6504925	36385915	37,8
3 7	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
4 4	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
4 5	5,76	1,23	11,86	51,7	28786045	4933790	28102145	59,1
4 6	7,18	1,31	14,27	51,3	36682952	5557635	34407155	58,1
4 7	8,51	1,50	18,43	55,5	45491381	7210475	46480150	61,3

Proband 226

Phase Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
	[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1 4	5,29	3,18	10,85	36,0	32944784	23000275	33645225	39,2
1 5	10,53	3,29	16,16	29,9	72992423	25311410	54024770	33,4
1 6	5,89	3,34	11,40	33,6	37689756	24860580	36023880	36,5
1 7	5,94	4,24	11,86	29,6	38348324	33185055	37864680	30,9
2 4	3,91	1,60	8,45	46,5	23912997	9209660	26289080	53,9
2 5	5,69	2,68	12,13	43,4	37094877	19316420	39352240	47,6
2 6	5,95	2,23	11,67	42,5	40112806	15539890	38836640	47,6
2 7	4,77	2,30	11,77	50,8	30894535	15972110	38620240	55,6
3 4	4,79	3,29	14,68	54,9	29802597	24244740	46764430	57,7
3 5	1,93	1,93	6,49	51,2	10040363	12240245	19810340	58,8
3 6	5,46	2,72	16,48	59,3	36495303	20289155	55831765	62,8
3 7	8,96	1,56	15,84	45,6	61048588	9004545	52457055	51,1
3 8	8,78	2,12	17,80	49,8	61752509	14752325	61226275	54,3
3 9	3,92	2,31	10,13	49,6	24818950	16138070	33025455	54,6
4 4	5,42	6,01	15,16	38,2	34288936	48848790	48511455	37,3
4 5	2,79	4,57	9,01	33,0	16956127	38193895	29779060	32,2
4 6	3,52	2,70	6,29	18,9	22272418	20135830	19985180	22,4
4 7	2,00	2,26	4,71	25,9	8653584	12538370	11321715	31,5

Proband 227

Phase Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
	[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1 4	10,50	2,94	14,69	25,7	67297101	20429165	45237765	29,7
1 5	10,18	2,11	12,04	17,1	66781439	13503125	37610620	22,6
1 6	18,94	2,47	19,35	10,1	130031505	17134750	63067840	15,4
1 7	6,47	1,97	8,08	15,1	42125033	12587100	25109255	21,0
2 4	4,21	2,14	8,99	42,6	26498039	14375310	28621000	48,2
2 5	10,60	3,29	18,60	39,3	72652646	25062010	61747645	42,6
2 6	4,86	1,56	6,43	18,9	31777212	9181750	20226405	26,6
2 7	5,08	1,41	6,60	20,1	32822761	7617865	20451700	28,3
3 4	2,41	0,85	5,40	51,0	13457427	2402115	16169355	64,4
3 5	2,89	1,10	6,05	46,4	17117279	4755130	18631885	57,4
3 6	9,49	1,72	15,82	42,5	65195476	10586425	52685540	47,8
3 7	10,57	1,90	15,10	32,9	72990868	12211210	50115435	38,4
4 4	2,38	1,03	4,02	30,9	13189345	4045825	11373585	45,1
4 5	6,96	1,78	10,35	31,4	34537542	8229500	24835730	37,6
4 6	3,54	1,21	5,25	26,4	21847337	5782395	15868880	36,9
4 7	5,14	1,22	6,99	26,0	34298184	6071020	22466390	34,9

Proband 228

Phase Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
	[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1 4	< LOD	3,03	11,77	79,6	< LOD	19466570	31973615	78,3
1 5	< LOD	3,99	9,59	66,9	< LOD	30856650	29587165	62,8
1 6	< LOD	3,69	8,56	65,7	< LOD	27681710	25748405	61,7
1 7	< LOD	3,91	8,03	61,3	< LOD	31072195	25236950	56,1
2 4	< LOD	4,35	6,02	42,5	< LOD	33437770	17586765	32,2
2 5	< LOD	2,72	4,38	50,6	< LOD	19681825	12514770	44,0
2 6	< LOD	7,80	9,98	37,9	< LOD	66051845	31715905	25,8
2 7	< LOD	2,05	3,23	49,4	< LOD	13361145	8456805	43,7
3 4	< LOD	3,17	4,84	47,8	< LOD	23701060	14055295	39,9
3 5	< LOD	3,45	3,90	29,6	< LOD	26581245	11155545	15,1
3 6	< LOD	4,66	7,15	48,1	< LOD	37476095	22032690	39,4
3 7	< LOD	5,38	8,74	51,0	< LOD	45674265	28414675	42,7
4 4	< LOD	4,41	13,09	73,2	< LOD	36027825	42825115	70,0
4 5	< LOD	4,65	12,37	70,1	< LOD	39653510	41862645	66,2
4 6	< LOD	1,76	5,49	74,4	< LOD	11899280	17034495	75,1
4 7	< LOD	3,08	9,46	74,1	< LOD	24149775	30891700	72,1

Proband 229

Phase Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
	[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1 4	4,44	1,42	12,07	62,0	24126295	6845975	30711645	66,8
1 5	7,63	1,84	15,07	50,7	51150309	11973225	46023200	54,8
1 6	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
1 7	1,03	1,00	3,33	52,1	4635191	4345125	8635625	65,7
1 8	1,05	0,79	3,27	55,9	4765361	2336240	8365020	72,0
2 4	1,84	2,06	4,77	35,8	10234325	13852640	13053590	39,2
2 5	8,90	2,20	11,87	26,8	62876207	15904185	37508325	30,8
2 6	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
2 7	11,21	1,85	13,32	23,2	79271262	12527785	42004260	28,0
3 4	6,76	3,79	12,34	33,1	46417604	30668965	38544355	34,1
3 5	8,89	3,78	15,75	36,9	65866955	32504275	52876010	38,7
3 6	13,44	4,55	21,40	34,1	103458579	41203225	74402575	36,0
3 7	13,07	1,64	15,71	26,6	98185875	11110690	52763980	31,8
4 4	5,28	1,79	15,39	64,0	35229346	11698995	47916825	67,7
4 5	5,40	2,07	15,47	62,1	39251908	15571915	52393260	65,5
4 6	2,56	1,00	6,15	54,6	13790895	3890880	15782165	63,1
4 7	3,25	1,44	8,30	55,6	18480501	7602285	22252675	61,4

Proband 230

Phase Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
	[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1 4	7,38	0,87	8,44	25,0	44546555	6202565	17172090	28,2
1 5	9,85	0,73	9,43	14,0	58753234	5010105	18960055	18,3
1 6	12,06	1,02	12,59	20,3	72098590	7285100	25434150	24,2
1 7	7,68	1,11	8,45	20,2	47633201	8286575	17650535	23,0
2 4	4,86	2,91	11,77	49,4	30458332	23064680	25022480	48,0
2 5	5,38	3,76	14,75	52,5	33296058	29599735	31014715	50,7
2 6	9,54	3,80	24,08	57,5	56591398	28609255	48482925	57,3
2 7	5,23	0,97	9,97	52,3	30839749	6866925	19902825	54,0
3 4	3,61	2,28	9,75	53,7	20215827	16042935	18519365	52,4
3 5	9,79	1,61	17,31	49,4	58840210	11953775	35245590	51,2
3 6	5,69	1,30	10,45	48,7	32780367	9126895	20379735	50,0
3 7	4,65	1,21	9,62	53,3	26121729	8265935	18292255	54,3
4 4	4,11	3,64	8,19	27,4	22714730	25669465	15306605	23,2
4 5	10,58	1,37	10,08	9,1	61958137	9787985	19906815	12,4
4 6	9,84	1,07	9,19	8,9	56141288	7335260	17664615	12,7
4 7	9,00	1,47	9,66	16,9	54071129	10816550	19572420	19,4

Proband 231

Phase Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
	[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1 4	13,06	1,15	15,07	25,5	68032410	7247735	26558955	29,0
1 5	11,01	3,10	15,47	27,9	59116158	21020180	28103535	28,6
1 6	11,51	1,37	14,39	29,2	63611399	9267270	26887915	32,1
1 7	13,31	1,33	16,17	28,5	72502264	8809820	29818395	31,7
2 4	7,31	1,32	13,60	49,8	36114661	7966870	22743205	51,5
2 5	7,47	2,15	14,51	47,6	42698421	15336075	28103965	48,3
2 6	10,85	2,42	19,77	47,0	63510537	17733915	39240575	48,2
2 7	3,20	0,62	5,63	46,5	17984202	3952210	10672200	48,5
3 4	5,95	0,92	8,98	39,5	31661164	5840155	16134760	41,8
3 5	10,77	0,87	16,67	44,8	59685903	5683760	31308225	47,7
3 6	6,08	1,42	11,93	50,3	33700682	9672715	22387980	51,5
3 7	10,38	1,65	20,26	53,1	57362210	11254885	37963375	54,8
4 4	14,18	1,46	13,05	5,2	68322595	8624310	21240005	9,3
4 5	8,75	1,03	9,09	15,0	46920522	6602530	16439080	18,5
4 6	18,74	2,14	19,10	13,6	82222111	11728205	28374420	17,1
4 7	17,11	2,36	17,44	11,7	80762869	13940910	27855185	14,9

Proband 233

Phase	Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
		d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
		[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1	4	3,59	3,35	8,12	33,2	12165831	14246430	9730620	33,9
1	5	5,16	4,77	12,12	35,9	18728817	21917530	15330620	35,4
1	6	2,99	3,24	7,35	33,7	10677547	14748915	9420150	34,2
1	7	3,26	2,87	7,30	34,2	11660400	12677130	9255970	35,9
2	4	3,19	2,42	11,95	63,3	11171662	10057955	15382990	66,4
2	5	0,92	2,00	5,18	55,9	1975487	7647800	6046415	61,2
2	6	1,97	1,21	5,44	54,2	6419275	3852715	6737800	62,9
2	7	3,19	1,25	9,45	63,2	11594997	4127810	12447590	69,2
3	4	2,82	1,00	7,51	60,3	9951140	2715530	9659960	68,0
3	5	3,47	1,30	9,68	61,5	12727034	4350660	12739855	67,3
3	6	4,04	1,46	10,51	59,0	15342189	5308385	14115355	64,4
3	7	6,57	2,27	16,73	58,6	26488063	9912365	23362660	62,0
4	4	4,99	2,18	7,49	25,2	18486040	8822620	9388480	29,1
4	5	7,92	4,35	14,22	32,5	30675542	20474195	18758480	33,6
4	6	8,92	3,35	13,45	28,7	34764165	15155575	17700020	31,3
4	7	5,64	4,01	11,77	35,8	20728668	18132425	14926900	36,6

Proband 234

Phase	Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
		d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
		[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1	4	3,63	1,08	8,38	56,6	13458826	3192190	10971435	63,5
1	5	3,81	1,19	7,99	51,7	13916441	3701985	10224195	58,6
1	6	5,03	1,08	10,82	56,4	19452831	3199090	14513005	62,5
1	7	6,38	1,54	13,89	55,9	25176756	5726230	18881685	60,6
2	4	4,03	1,52	9,71	55,8	14683978	5416645	12449955	61,2
2	5	6,18	3,06	12,26	41,8	24483331	14169590	16679230	44,3
2	6	10,78	3,29	18,22	40,4	43504565	15218965	24898075	43,3
2	7	3,13	2,00	6,19	36,0	11389762	8193995	7907500	40,4
3	4	7,39	3,84	12,07	28,2	29163445	18146785	16155950	29,6
3	5	3,70	1,82	5,67	24,7	13384253	7030790	6959080	29,4
3	6	3,37	1,56	5,14	25,9	12292461	5786355	6372495	31,8
3	7	6,45	3,85	10,70	25,7	25903693	18723550	14614285	26,6
4	4	5,31	1,51	13,36	60,6	20380411	5478080	17894950	65,2
4	5	2,80	1,31	7,87	59,7	10081387	4510625	10366535	66,1
4	6	5,97	1,08	10,94	50,3	24098881	3302090	15126655	56,4
4	7	9,18	1,15	13,57	41,2	37458420	3673235	18668380	47,0

Proband 235

Phase	Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
		d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
		[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1	4	6,71	2,38	9,84	30,1	21214390	8244860	10648425	35,1
1	5	7,31	3,70	14,31	41,9	23293330	14150450	15836795	44,5
1	6	11,05	3,64	19,52	43,1	37739866	14598365	22943350	46,5
1	7	13,99	3,43	23,26	43,3	48997870	13853975	27937940	47,2
2	4	2,13	0,94	5,84	60,3	5593669	1760650	5845880	70,5
2	5	5,39	1,70	14,78	63,7	18245006	5647315	17757935	68,4
2	6	7,24	1,87	18,50	62,8	24747954	6432860	22179735	67,0
2	7	3,31	1,08	8,77	62,1	10235963	2581290	9862610	69,5
3	4	3,57	1,83	10,41	60,8	11397970	6223165	12117650	65,9
3	5	3,63	2,22	11,16	60,3	11901249	8262995	13345720	64,5
3	6	3,94	1,75	9,68	55,5	12740470	5839205	11216535	61,1
3	7	4,43	1,60	11,23	59,4	14590635	5120810	13200395	65,0
4	4	5,00	4,31	12,45	43,5	16527461	18002125	14608705	44,5
4	5	4,43	4,14	10,72	39,6	15025913	17817255	12941575	40,4
4	6	2,03	3,17	4,62	14,9	5956413	12808305	5064770	13,1
4	7	1,90	3,48	4,78	15,0	5722540	14916985	5499660	11,9

Proband 236

Phase	Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
		d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
		[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1	4	6,06	1,28	16,56	66,8	32153351	6291565	41687630	71,0
1	5	7,20	1,55	17,35	62,3	38900552	8294690	44130555	66,3
1	6	6,17	1,01	11,98	55,2	32369791	4174560	29407280	60,9
1	7	10,15	1,60	17,59	50,0	56498779	8850830	45519335	54,8
2	4	11,15	2,28	15,30	34,3	48752788	11008020	30873075	39,0
2	5	6,77	2,03	8,72	24,5	37755574	12365785	22262935	29,1
2	6	9,23	1,38	10,67	25,6	53823134	7577640	28447960	32,0
2	7	11,08	1,49	12,29	23,5	63448321	8259350	32200185	29,9
3	4	11,80	3,50	16,12	29,0	66781626	23542090	42108705	32,4
3	5	12,25	2,86	15,96	29,2	70710623	18996940	42479895	33,5
3	6	10,48	2,18	13,46	29,7	60521730	13738085	35779940	34,6
3	7	7,12	2,21	9,25	24,6	38517288	13267905	22938045	28,9
4	4	3,57	1,24	12,35	70,9	18460767	6021150	31173010	75,3
4	5	4,13	1,34	14,72	72,2	22298606	7012185	38475400	76,0
4	6	3,78	1,27	11,76	67,9	20228459	6415115	30475665	72,5
4	7	5,30	1,57	15,75	67,4	28684205	8627810	40704795	71,1

Proband 237

Phase Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
	[µg/ml]		[%]		Signalfläche [Counts]			[%]
1 4	10,00	1,52	13,88	36,1	55803800	8253570	35737450	41,9
1 5	9,75	1,78	11,72	24,3	52269771	9822335	28807050	30,1
1 6	18,77	2,86	20,22	17,7	107834945	18770775	53470295	23,2
1 7	10,47	4,97	16,40	27,6	58229956	34423190	42300230	29,0
2 4	6,03	1,33	15,73	64,0	31926633	6609400	39439280	68,3
2 5	8,66	2,15	19,60	57,5	46153713	12524785	48956010	61,1
2 6	5,77	1,60	12,16	53,4	30810718	8721165	30537525	58,0
2 7	9,69	1,99	19,12	53,0	51782276	11385360	47689795	57,0
3 4	4,00	1,16	10,58	62,5	19993615	5189760	25324705	67,7
3 5	4,80	1,90	13,58	62,0	25025577	10830455	33800455	65,6
3 6	11,52	2,29	21,94	51,6	63274880	13833060	56171620	55,5
3 7	9,88	1,96	16,99	46,3	53539174	11271605	42784310	50,9
4 4	9,96	1,75	12,40	27,3	53225587	9566610	30435585	33,1
4 5	11,23	2,34	13,99	25,3	59422050	13748910	34026645	30,3
4 6	12,75	1,98	15,08	24,8	65473812	10782625	35599900	30,5
4 7	17,49	2,33	19,61	22,2	95845431	13963415	49483100	28,0

Proband 238

Phase Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
	[µg/ml]		[%]		Signalfläche [Counts]			[%]
1 4	13,91	1,50	18,94	35,1	74395174	7718520	46816700	41,0
1 5	18,56	2,87	25,64	33,3	96968117	17157520	61995700	38,0
1 6	16,71	1,77	21,26	30,6	90564746	9745815	53202080	36,5
1 7	24,11*	3,31	33,08*	33,8	134272175	21488525	85302735	38,5
2 4	7,66	1,31	15,88	54,9	39780532	6250665	38630310	59,9
2 5	5,21	1,17	9,78	48,0	26597760	5270410	23367435	54,1
2 6	7,57	1,51	15,95	54,6	39335169	7692805	38835715	59,2
2 7	8,89	1,51	16,12	48,5	48943795	8129645	41332925	53,5
3 4	6,81	1,65	15,82	57,3	34099641	8417425	37273015	61,6
3 5	14,08	3,15	27,62	50,2	89174030	23261750	81558325	53,6
3 6	19,24	4,59	37,87*	49,7	107521925	31249525	98526120	52,6
3 7	16,93	3,97	32,60*	48,8	95554503	26877535	85648790	51,9
4 4	20,90	1,78	27,44	34,0	118992257	10316040	72253450	39,8
4 5	20,66	1,49	26,54	33,4	127214629	8765875	75568270	39,4
4 6	22,17	1,59	24,20	21,6	111309191	7757730	55994530	28,4
4 7	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.

* außerhalb des linearen Bereiches (Kap. 3.2.5.3)

Proband 239

Phase	Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
		d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
		[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1	4	1,28	n.n.	5,40	74,5	5591620	< LOD	13168580	85,6
1	5	2,17	1,11	9,71	72,8	11029341	5270215	25329645	78,1
1	6	20,67	3,67	50,36*	61,0	120840069	25431740	137387605	63,8
1	7	17,83	2,35	44,10*	63,1	107678096	15612310	124387170	66,3
2	4	3,50	2,96	8,19	36,4	19548446	20514030	21857050	37,7
2	5	20,40	2,40	29,68*	38,1	121090650	15693540	81622330	43,1
2	6	25,88*	2,90	35,58*	34,8	160851007	20542350	102433305	39,8
2	7	23,74*	2,19	25,69	18,6	145998388	14512505	72851630	25,1
3	4	22,08	3,55	34,43*	40,0	136795628	25924235	98983965	44,1
3	5	26,52*	3,06	37,94*	37,1	158090780	20988535	104828635	42,0
3	6	35,79*	4,93	51,42*	36,2	222601244	37303550	148306165	40,5
3	7	31,49*	2,52	36,65*	25,2	188021615	16675340	101189575	31,3
4	4	0,40	n.n.	2,08	67,5	575791	< LOD	4565760	95,7
4	5	1,55	0,91	7,31	72,8	7523086	3862740	19177810	79,8
4	6	13,09	2,55	33,40*	62,3	78542977	17173615	93881665	65,4
4	7	12,22	2,34	30,25*	61,2	74399294	15747140	86241540	64,5

* außerhalb des linearen Bereiches (Kap. 3.2.5.3)

Proband 240

Phase	Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
		d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -CoproI	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
		[µg/ml]			[%]	Signalfläche [Counts]			[%]
1	4	5,03	1,07	13,04	63,3	32316326	5633075	40464475	68,6
1	5	5,11	1,36	12,05	57,9	30535965	7639105	34615585	63,1
1	6	5,70	1,38	14,14	60,7	35714603	8175375	42588415	65,5
1	7	6,81	1,12	16,76	62,9	46401793	6253195	54703415	67,8
2	4	7,21	1,07	7,86	17,4	43242328	5114510	21642260	25,2
2	5	10,77	1,02	10,81	14,5	66433999	4774660	30793410	22,6
2	6	11,47	1,09	12,22	19,4	71308123	5423830	35260690	27,2
2	7	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
3	4	4,14	1,00	5,09	21,0	23065681	4327760	12919180	29,1
3	5	8,70	0,99	8,78	13,4	53151783	4529140	24629225	21,6
3	6	9,84	1,21	10,88	20,4	60993170	6412385	31269455	27,9
3	7	9,99	1,32	11,96	25,8	65336617	7766745	36399375	32,8
4	4	2,10	0,75	5,80	61,4	10838769	2365945	14995015	70,5
4	5	2,94	0,82	8,30	64,5	16058429	2969090	22379325	71,6
4	6	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
4	7-1	6,15	1,05	13,57	58,4	38614769	5210620	40730235	64,0
4	7-2	5,24	4,75	17,64	55,6	30522908	35436730	50078780	55,9

Proband 241

Phase	Tag	Quantifizierungsmethode				Flächenmethode			
		d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res	d ₆ -Coprol	d ₆ -Chol	d ₄ -Sitol	Chol-Res
		[µg/ml]		[%]	Signalfläche [Counts]			[%]	
1	4	14,80	6,34	21,57	22,1	83005148	45060365	56957040	24,0
1	5	13,23	5,51	17,72	15,9	73942077	38661830	46476710	18,1
1	6	15,49	1,97	15,41	9,9	88328921	11782215	40883110	17,2
1	7	11,22	4,58	14,48	13,2	41296539	20907405	24942570	15,7
2	4	8,25	1,86	15,76	49,0	47804567	11313010	43293665	53,8
2	5	6,55	1,26	10,70	41,9	36802063	6310115	28271095	48,4
2	6	10,44	2,90	20,05	47,1	60209520	19425120	54807775	50,9
2	7	7,76	3,77	16,03	42,8	45030201	26834510	44271775	45,1
3	4	7,55	1,24	12,49	44,0	43543205	6327550	33946195	50,3
3	5	12,37	3,09	21,31	42,3	72413654	21200625	58985360	46,3
3	6	11,61	3,54	21,34	43,6	67525138	24654455	58796225	47,0
3	7	12,10	1,96	18,56	39,8	71347179	12179670	51574490	45,2
4	4	16,70	3,19	22,84	33,1	159035538	34733380	10631898	36,8
4	5	8,44	1,71	11,75	31,3	48784825	10083775	31779325	37,4
4	6	11,97	1,39	14,68	27,6	72527176	7777175	41541335	34,6
4	7	15,61	1,65	19,36	29,1	90990496	9477995	52878825	35,8

Mittelwerte der einzelnen Behandlungsphasen berechnet nach Quantifizierungsmethode und nach Flächenmethode

Proband	Cholesterinresorption Placebo-Phase [%]			
	Quantifizierungsmethode MW ± SD (CV)		Flächenmethode MW ± SD (CV)	
201	56,1 ± 3,7	(6.6)	59,4 ± 3,4	(5.7)
202	51,5 ± 7,8	(15.0)	56,1 ± 7,9	(14.1)
203	55,0 ± 13,4	(24.4)	60,7 ± 11,1	(18.4)
204	56,6 ± 3,9	(6.9)	63,2 ± 3,8	(6.0)
205	58,6 ± 2,0	(3.4)	64,8 ± 2,1	(3.3)
206	49,1 ± 8,2	(16.8)	54,3 ± 7,9	(14.6)
207	62,2 ± 7,8	(12.6)	66,2 ± 7,4	(11.2)
208	50,6 ± 5,7	(11.3)	54,5 ± 3,8	(6.9)
209	53,0 ± 8,7	(16.4)	58,1 ± 7,0	(12.1)
210	56,5 ± 4,2	(7.4)	61,2 ± 5,4	(8.8)
211	47,5 ± 11,2	(23.7)	61,7 ± 16,6	(26.8)
213	30,2 ± 8,3	(27.4)	37,5 ± 8,4	(22.5)
214	43,3 ± 4,9	(11.2)	47,3 ± 5,3	(11.2)
215	53,6 ± 4,6	(8.6)	59,5 ± 3,1	(5.2)
216	63,1 ± 3,4	(5.3)	63,7 ± 3,7	(5.9)
218	40,9 ± 6,2	(15.1)	48,7 ± 5,6	(11.4)
219	57,4 ± 4,5	(7.9)	67,3 ± 4,2	(6.2)
220	68,3 ± 7,9	(11.6)	73,7 ± 8,3	(11.2)
221	49,5 ± 4,8	(9.6)	55,5 ± 4,5	(8.1)
222	63,6 ± 6,2	(9.7)	66,7 ± 6,8	(10.1)
223	63,5 ± 7,4	(11.6)	67,0 ± 6,6	(9.8)
224	55,2 ± 6,0	(10.9)	61,7 ± 6,6	(10.7)
225	52,9 ± 2,3	(4.4)	59,5 ± 1,6	(2.8)
226	52,7 ± 5,8	(11.0)	57,6 ± 4,8	(8.4)
227	30,2 ± 12,5	(41.3)	36,4 ± 10,7	(29.2)
228	68,4 ± 7,9	(11.5)	64,7 ± 9,5	(14.7)
229	55,2 ± 5,0	(9.1)	64,8 ± 7,2	(11.1)
230	52,9 ± 3,4	(6.3)	52,5 ± 4,0	(7.6)
231	46,9 ± 6,0	(12.8)	49,0 ± 5,6	(11.3)
233	59,2 ± 4,8	(8.0)	64,9 ± 3,6	(5.5)
234	52,9 ± 9,1	(17.2)	58,7 ± 9,0	(15.2)
235	59,0 ± 2,4	(4.1)	64,1 ± 2,1	(3.2)
236	58,6 ± 7,5	(12.7)	63,2 ± 7,0	(11.0)
237	55,6 ± 8,0	(14.3)	59,9 ± 8,1	(13.5)
238	51,5 ± 3,8	(7.3)	56,7 ± 3,3	(5.9)
239	67,9 ± 6,8	(10.0)	73,5 ± 10,2	(13.9)
240	60,0 ± 3,8	(6.4)	65,5 ± 7,2	(11.0)
241	45,2 ± 3,4	(7.5)	49,6 ± 3,7	(7.5)
MW	54.1		59.2**	
SD	8.6		8.2	
CV	16.0		13.8	

** p < 0,001

Proband	Cholesterinresorption Simvastatin-Phase [%]			
	Quantifizierungsmethode		Flächenmethode	
	MW ± SD (CV)		MW ± SD (CV)	
201	61,7 ± 4,4	(7.2)	65,5 ± 4,8	(7.3)
202	52,4 ± 4,3	(8.2)	55,4 ± 4,2	(7.6)
203	50,8 ± 12,9	(25.5)	59,0 ± 8,7	(14.8)
204	67,3 ± 4,4	(6.6)	74,5 ± 3,6	(4.9)
205	59,2 ± 6,1	(10.4)	64,6 ± 7,0	(10.9)
206	54,2 ± 1,5	(2.7)	58,6 ± 1,9	(3.3)
207	64,6 ± 1,2	(1.8)	68,3 ± 0,8	(1.2)
208	52,3 ± 7,7	(14.7)	58,4 ± 7,5	(12.9)
209	60,2 ± 4,2	(7.0)	61,6 ± 5,3	(8.5)
210	53,1 ± 5,0	(9.4)	60,4 ± 8,5	(14.1)
211	59,8 ± 5,3	(8.8)	67,5 ± 7,3	(10.8)
213	33,3 ± 20,1	(60.3)	29,9 ± 28,7	(96.1)
214	50,1 ± 2,7	(5.3)	53,6 ± 2,2	(4.2)
215	40,8 ± 4,9	(12.1)	51,2 ± 2,4	(4.8)
216	60,7 ± 4,2	(6.9)	59,0 ± 5,3	(8.9)
218	47,5 ± 6,1	(12.9)	56,6 ± 6,4	(11.3)
219	59,3 ± 4,1	(6.9)	68,9 ± 5,2	(7.5)
220	67,3 ± 6,5	(9.7)	73,8 ± 9,5	(12.8)
221	58,3 ± 5,0	(8.6)	63,9 ± 4,8	(7.6)
222	64,4 ± 11,7	(18.2)	67,3 ± 8,8	(13.1)
223	54,8 ± 3,0	(5.4)	59,1 ± 2,1	(3.5)
224	55,5 ± 2,9	(5.2)	61,7 ± 2,9	(4.7)
225	62,7 ± 1,9	(3.0)	66,9 ± 2,2	(3.3)
226	45,8 ± 3,7	(8.1)	51,2 ± 4,2	(8.2)
227	43,2 ± 7,7	(17.8)	52,0 ± 11,4	(21.8)
228	73,0 ± 2,0	(2.7)	70,9 ± 3,7	(5.3)
229	59,1 ± 4,7	(7.9)	64,4 ± 2,8	(4.3)
230	51,3 ± 2,6	(5.0)	52,0 ± 1,8	(3.5)
231	47,7 ± 1,5	(3.1)	49,1 ± 1,6	(3.2)
233	59,9 ± 1,3	(2.1)	65,4 ± 2,8	(4.2)
234	55,2 ± 2,3	(4.2)	61,3 ± 2,2	(3.5)
235	62,2 ± 1,5	(2.3)	68,9 ± 1,5	(2.2)
236	69,6 ± 2,3	(3.3)	73,7 ± 2,3	(3.1)
237	57,0 ± 5,1	(9.0)	61,1 ± 5,1	(8.3)
238	51,5 ± 3,9	(7.6)	54,93 ± 4,51	(8.2)
239	65,9 ± 5,3	(8.1)	76,3 ± 14,7	(19.3)
240	61,2 ± 2,5	(4.0)	66,3 ± 2,5	(3.7)
241	42,4 ± 1,9	(4.5)	47,2 ± 2,2	(4.6)
MW	56.2		61.1**	
SD	8.6		9.1	
CV	15.2		14.9	

** p < 0,001

Proband	Cholesterinresorption Ezetimib-Phase [%]			
	Quantifizierungsmethode		Flächenmethode	
	MW ± SD (CV)		MW ± SD (CV)	
201	27,2 ± 6,4	(23.7)	31,2 ± 5,7	(18.1)
202	19,4 ± 7,6	(39.2)	22,7 ± 6,4	(28.2)
203	35,9 ± 4,8	(13.2)	39,0 ± 4,4	(11.2)
204	37,6 ± 8,4	(22.4)	50,0 ± 10,2	(20.3)
205	26,9 ± 5,7	(21.4)	33,4 ± 5,8	(17.5)
206	20,2 ± 7,4	(36.5)	27,9 ± 7,3	(26.0)
207	38,7 ± 5,4	(14.0)	42,8 ± 3,3	(7.6)
208	36,0 ± 4,2	(11.6)	41,6 ± 7,9	(19.0)
209	49,4 ± 4,9	(10.0)	52,5 ± 3,6	(6.9)
210	43,1 ± 7,0	(16.3)	44,0 ± 4,8	(11.0)
211	34,7 ± 9,5	(27.3)	35,8 ± 9,7	(27.1)
213	26,2 ± 3,4	(12.9)	38,0 ± 6,4	(16.9)
214	46,2 ± 4,2	(9.0)	42,4 ± 4,5	(10.5)
215	33,7 ± 0,6	(1.7)	31,3 ± 17,0	(54.2)
216	39,9 ± 1,7	(4.3)	27,8 ± 2,3	(8.1)
218	32,4 ± 3,1	(9.5)	41,7 ± 4,7	(11.2)
219	39,3 ± 7,3	(18.5)	48,2 ± 6,5	(13.4)
220	48,1 ± 2,4	(4.9)	52,9 ± 3,0	(5.6)
221	24,5 ± 5,0	(20.4)	32,0 ± 5,6	(17.6)
222	47,0 ± 3,6	(7.6)	41,5 ± 7,6	(18.3)
223	33,1 ± 2,1	(6.5)	35,5 ± 2,6	(7.4)
224	23,3 ± 0,6	(2.6)	31,9 ± 0,6	(2.0)
225	33,7 ± 2,2	(6.5)	39,7 ± 2,4	(6.0)
226	29,0 ± 8,4	(29.0)	30,9 ± 6,2	(20.2)
227	17,0 ± 6,5	(38.2)	22,2 ± 5,9	(26.6)
228	44,2 ± 9,8	(22.2)	34,3 ± 12,9	(37.6)
229	32,7 ± 4,4	(13.3)	35,1 ± 2,9	(8.4)
230	19,9 ± 4,5	(22.9)	23,4 ± 4,1	(17.4)
231	11,4 ± 4,3	(37.9)	15,0 ± 4,0	(27.0)
233	34,2 ± 1,2	(3.5)	34,9 ± 1,0	(2.8)
234	43,5 ± 8,6	(19.7)	47,3 ± 9,4	(19.9)
235	28,2 ± 15,5	(54.8)	27,5 ± 17,4	(63.3)
236	28,2 ± 2,4	(8.4)	32,4 ± 2,5	(7.7)
237	24,9 ± 2,1	(8.4)	30,5 ± 2,1	(6.8)
238	33,2 ± 1,9	(5.6)	38,5 ± 1,8	(4.8)
239	34,6 ± 6,5	(18.8)	39,5 ± 5,7	(14.4)
240	17,1 ± 2,5	(14.6)	25,0 ± 2,3	(9.1)
241	15,3 ± 5,2	(33.8)	18,7 ± 3,6	(19.4)
MW	31.8		35.2**	
SD	9.8		9.1	
CV	30.7		25.8	

** p < 0,001

Proband	Cholesterinresorption Ezetimib-Simvastatin-Phase [%]			
	Quantifizierungsmethode		Flächenmethode	
	MW \pm SD (CV)		MW \pm SD (CV)	
201	20,5 \pm 6,5	(31.7)	25,6 \pm 5,4	(21.2)
202	23,1 \pm 3,6	(15.8)	23,6 \pm 3,6	(15.1)
203	48,1 \pm 3,8	(7.8)	51,0 \pm 1,9	(3.7)
204	36,8 \pm 9,1	(24.8)	45,0 \pm 9,6	(21.3)
205	33,0 \pm 4,4	(13.2)	39,3 \pm 4,8	(12.3)
206	16,5 \pm 2,3	(13.8)	22,2 \pm 2,4	(10.8)
207	38,8 \pm 4,1	(10.5)	43,6 \pm 2,1	(4.8)
208	25,7 \pm 7,8	(30.5)	33,2 \pm 6,5	(19.6)
209	45,8 \pm 5,0	(10.9)	51,0 \pm 4,5	(8.7)
210	41,4 \pm 1,8	(4.3)	44,4 \pm 1,6	(3.6)
211	41,1 \pm 4,3	(10.4)	42,7 \pm 5,8	(13.6)
213	13,6 \pm 5,4	(40.2)	21,1 \pm 4,7	(22.1)
214	46,4 \pm 5,7	(12.2)	40,9 \pm 6,7	(16.3)
215	19,1 \pm 7,6	(40.1)	29,0 \pm 4,7	16.2)
216	29,9 \pm 3,1	(10.4)	31,9 \pm 2,4	(7.4)
218	34,2 \pm 8,4	(24.5)	43,0 \pm 7,7	(18.0)
219	35,1 \pm 1,9	(5.5)	46,4 \pm 3,6	(7.8)
220	46,8 \pm 5,0	(10.7)	49,3 \pm 6,0	(12.2)
221	35,5 \pm 4,0	(11.2)	42,4 \pm 3,5	(8.2)
222	30,3 \pm 23,7	(78.3)	32,3 \pm 30,3	(93.9)
223	28,1 \pm 5,8	(20.6)	31,7 \pm 3,6	(11.3)
224	30,3 \pm 4,7	(15.4)	36,9 \pm 3,8	(10.2)
225	32,9 \pm 5,0	(15.2)	41,1 \pm 4,9	(12.0)
226	32,3 \pm 3,1	(9.5)	35,0 \pm 3,6	(10.3)
227	28,7 \pm 2,9	(9.9)	38,6 \pm 4,5	(11.6)
228	45,1 \pm 6,0	(13.3)	36,4 \pm 9,0	(24.6)
229	28,6 \pm 6,5	(22.8)	32,7 \pm 5,8	(17.8)
230	15,6 \pm 8,7	(56.1)	16,9 \pm 5,3	(31.2)
231	27,7 \pm 1,6	(5.8)	30,4 \pm 1,8	(6.0)
233	30,5 \pm 4,6	(15.1)	32,6 \pm 3,2	(9.8)
234	26,1 \pm 1,5	(5.6)	29,3 \pm 2,1	(7.3)
235	39,6 \pm 6,4	(16.0)	43,3 \pm 5,6	(12.9)
236	27,0 \pm 5,0	(18.4)	32,5 \pm 4,5	(13.9)
237	26,4 \pm 7,7	(29.0)	31,0 \pm 7,8	(25.2)
238	29,7 \pm 7,0	(23.5)	35,9 \pm 6,5	(18.0)
239	32,0 \pm 9,0	(28.1)	36,4 \pm 7,9	(21.5)
240	20,2 \pm 5,1	(25.4)	27,9 \pm 4,6	(16.7)
241	30,3 \pm 2,4	(8.1)	36,1 \pm 1,2	(3.3)
MW	31.4		35.9**	
SD	8.9		8.3	
CV	28.4		23.1	

** p < 0,001

Anhang B

Stabilitätsuntersuchung von UDCA

Stabilität nach Lagerung bei Raumtemperatur

Dauer [d]	Ausgangswert [μmol/l]	Gemessener Wert [μmol/l]	Stabilität [%]	Mittelwert [%]
0,5	1,330	1,534	115,4	114,5
		1,510	113,6	
		1,521	114,4	
	2,644	2,773	104,9	105,3
		2,759	104,4	
		2,824	106,8	
	19,772	19,760	99,9	99,7
		19,463	98,4	
		19,892	100,6	
	24,271	23,722	97,7	97,7
		23,721	97,7	
		23,696	97,6	
1	1,330	1,338	100,6	101,7
		1,335	100,4	
		1,382	103,9	
	2,644	2,942	111,3	101,1
		2,676	101,2	
		2,404	90,9	
	19,772	19,734	99,8	100,2
		19,559	98,9	
		20,143	101,9	
	24,271	23,393	96,4	98,5
		24,081	99,2	
		24,241	99,9	
2	1,330	1,674	125,9	127,9
		1,730	130,1	
		1,698	127,7	
	2,644	2,871	108,6	109,4
		2,902	109,8	
		2,908	110,0	
	19,772	18,193	92,0	94,7
		19,574	99,0	
		18,417	93,1	
	24,271	20,274	83,5	83,4
		20,209	83,3	
		20,238	83,4	

Fortsetzung Stabilität von UDCA nach Lagerung bei Raumtemperatur

Dauer [d]	Ausgangswert [$\mu\text{mol/l}$]	Gemessener Wert [$\mu\text{mol/l}$]	Stabilität [%]	Mittelwert [%]
7	1,330	1,509	113,5	113,9
		1,543	116,0	
		1,494	112,3	
	2,644	2,618	99,0	101,3
		2,743	103,8	
		2,673	101,1	
	19,772	18,220	92,2	92,5
		18,539	93,8	
		18,096	91,5	
	24,271	21,841	90,0	92,5
		22,818	94,0	
		22,717	93,6	
28	1,330	1,988	149,5	102,6
		1,063	79,9	
		1,043	78,5	
	2,644	2,504	94,7	95,1
		2,516	95,2	
		2,527	95,6	
	19,772	19,527	98,8	100,7
		20,753	105,0	
		19,447	98,4	
	24,271	24,944	102,8	102,3
		25,251	104,0	
		24,323	100,2	

Stabilität nach 1 Woche bei +4 °C im Kühlschrank

Dauer [d]	Ausgangswert [μmol/l]	Gemessener Wert [μmol/l]	Stabilität [%]	Mittelwert [%]
7	1,330	1,464	110,1	112,6
		1,604	120,7	
		1,424	107,1	
	2,644	2,729	103,2	103,8
		2,777	105,0	
		2,731	103,3	
	19,772	18,502	93,6	93,9
		18,532	93,7	
		18,650	94,3	
	24,271	21,895	90,2	91,7
		22,222	91,6	
		22,662	93,4	

Stabilität nach Lagerung bei -20 °C

Dauer [d]	Ausgangswert [µmol/l]	Gemessener Wert [µmol/l]	Stabilität [%]	Mittelwert [%]
28	1,330	1,321	99,4	68,3
		0,716	53,8	
		0,687	51,7	
	2,644	1,902	71,9	
		2,389	90,4	
		2,218	83,9	
	19,772	18,805	95,1	
		20,277	102,6	
		21,187	107,2	
	24,271	24,271	100,0	
		22,750	93,7	
		23,965	98,7	
64	1,330	1,595	119,9	122,9
		1,628	122,4	
		1,682	126,5	
	2,644	2,951	111,6	
		3,045	115,1	
		3,130	118,4	
	19,772	20,866	105,5	
		21,532	108,9	
		21,404	108,3	
	24,271	25,086	103,4	
		25,821	106,4	
		26,594	109,6	

Stabilität nach Lagerung bei -80 °C

Dauer [d]	Ausgangswert [$\mu\text{mol/l}$]	Gemessener Wert [$\mu\text{mol/l}$]	Stabilität [%]	Mittelwert [%]
28	1,330	0,799	60,1	68,3
		0,899	67,6	
		1,027	77,2	
	2,644	2,060	77,9	79,8
		2,146	81,2	
		2,123	80,3	
	19,772	15,823	80,0	88,2
		17,635	89,2	
		18,883	95,5	
	24,271	22,160	91,3	92,6
		21,998	90,6	
		23,278	95,9	
64	1,330	1,771	133,2	133,0
		1,801	135,5	
		1,734	130,4	
	2,644	3,184	120,4	119,4
		3,144	118,9	
		3,144	118,9	
	19,772	21,987	111,2	96,7
		21,213	107,3	
		14,148	71,6	
	24,271	25,947	106,9	105,8
		25,253	104,0	
		25,823	106,4	

Stabilität nach mehreren Einfrier- und Auftauzyklen

Zyklus	Ausgangswert [$\mu\text{mol/l}$]	Gemessener Wert [$\mu\text{mol/l}$]	Stabilität [%]	Mittelwert [%]
1	1,330	1,490	112,1	116,3
		1,566	117,8	
		1,584	119,1	
	2,644	2,790	105,5	108,6
		2,881	109,0	
		2,948	111,5	
	19,772	19,962	101,0	99,8
		19,381	98,0	
		19,857	100,4	
	24,271	24,061	99,1	100,7
		24,596	101,3	
		24,698	101,8	
2	1,330	1,503	113,1	108,0
		1,349	101,5	
		1,455	109,4	
	2,644	2,722	102,9	106,7
		2,990	113,1	
		2,749	104,0	
	19,772	18,523	93,7	97,2
		19,317	97,7	
		19,814	100,2	
	24,271	22,502	92,7	94,1
		23,818	98,1	
		22,179	91,4	
3	1,330	1,646	123,8	113,3
		1,508	113,4	
		1,366	102,7	
	2,644	2,679	101,3	103,6
		2,796	105,8	
		2,743	103,8	
	19,772	19,174	97,0	97,7
		19,215	97,2	
		19,550	98,9	
	24,271	23,317	96,1	97,4
		23,603	97,2	
		24,015	98,9	

Anhang C**UDCA-Bioäquivalenzstudie****Randomisierung**

Proband	Periode 1	Periode 2
1	TEST	REFERENZ
2	REFERENZ	TEST
3	TEST	REFERENZ
4	REFERENZ	TEST
5	REFERENZ	TEST
6	REFERENZ	TEST
7	TEST	REFERENZ
8	REFERENZ	TEST
9	TEST	REFERENZ
10	TEST	REFERENZ
11	REFERENZ	TEST
12	TEST	REFERENZ
13	REFERENZ	TEST
14	TEST	REFERENZ
15	TEST	REFERENZ
16	REFERENZ	TEST
17	REFERENZ	TEST
18	REFERENZ	TEST
19	TEST	REFERENZ
20	REFERENZ	TEST
21	TEST	REFERENZ
22	REFERENZ	TEST
23	TEST	REFERENZ
24	TEST	REFERENZ

UDCA-Plasmakonzentrationen

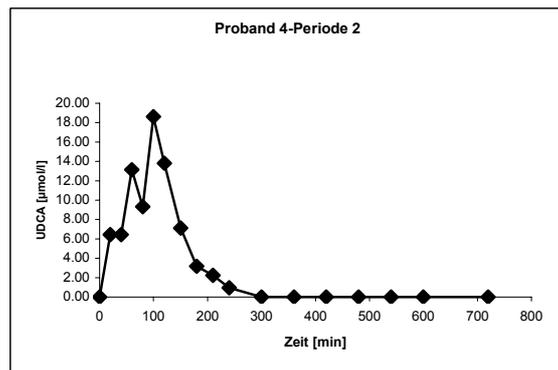
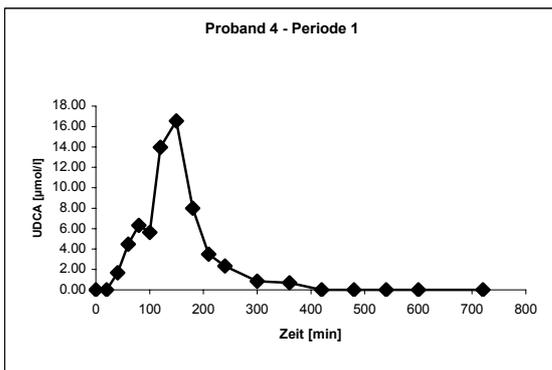
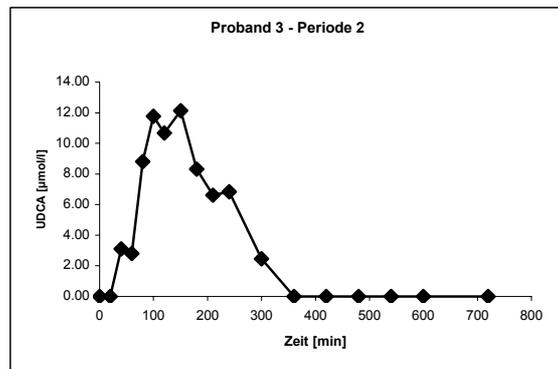
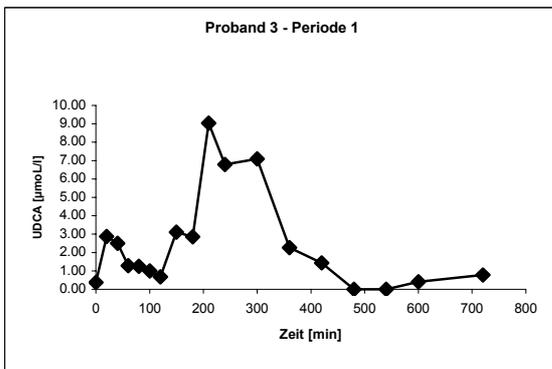
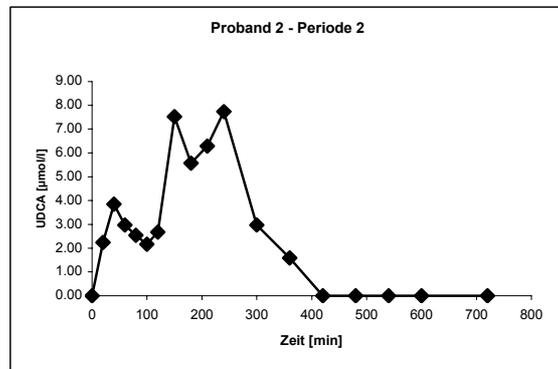
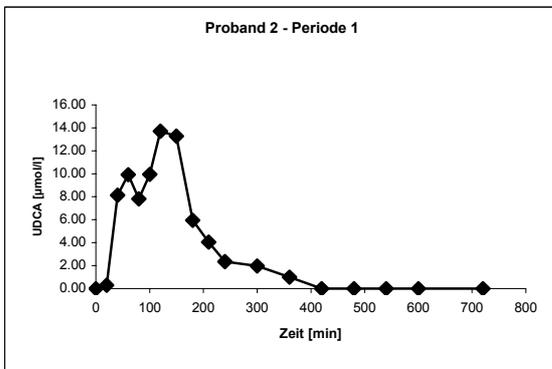
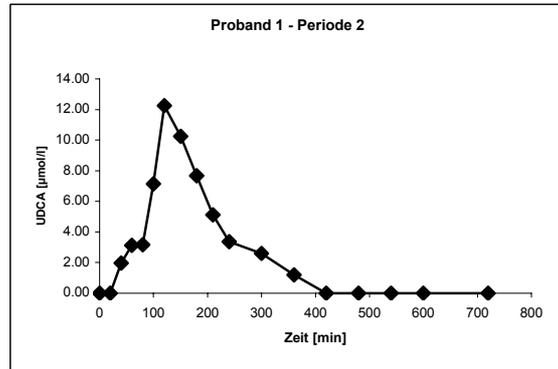
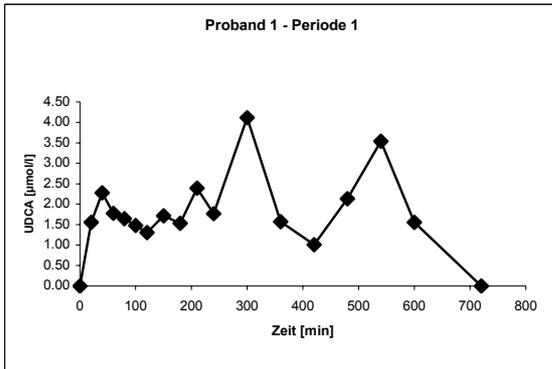
Konzentrationen in den nachfolgenden Tabellen in [$\mu\text{mol/l}$]

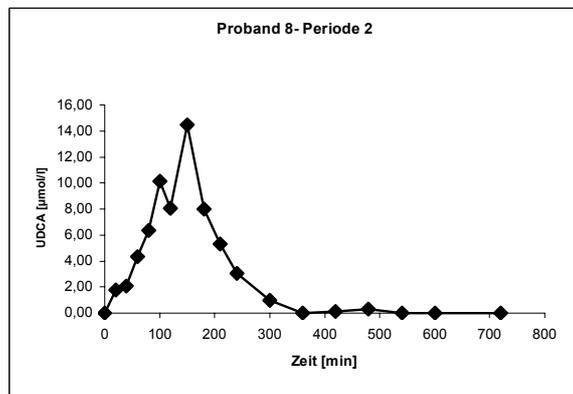
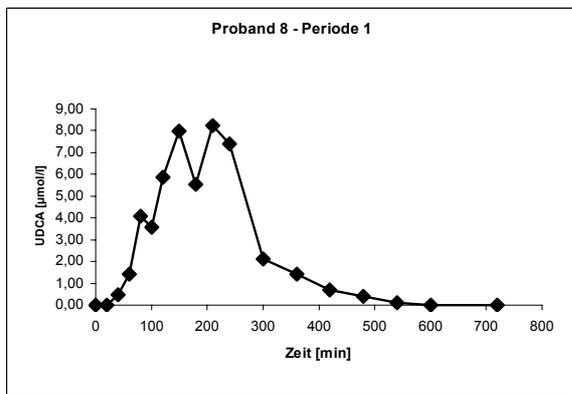
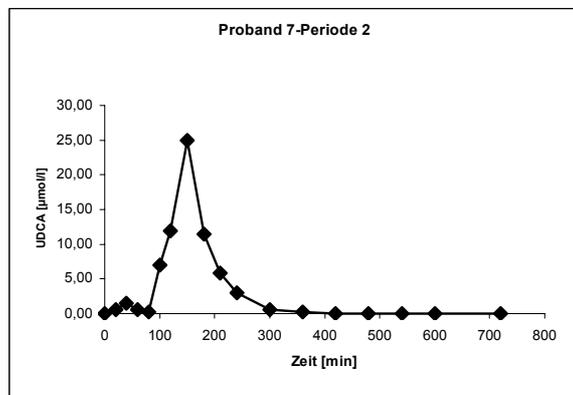
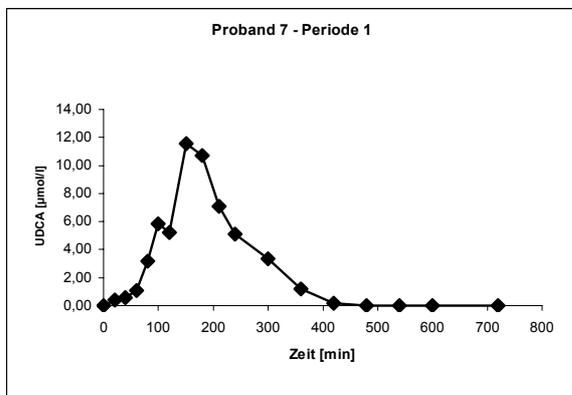
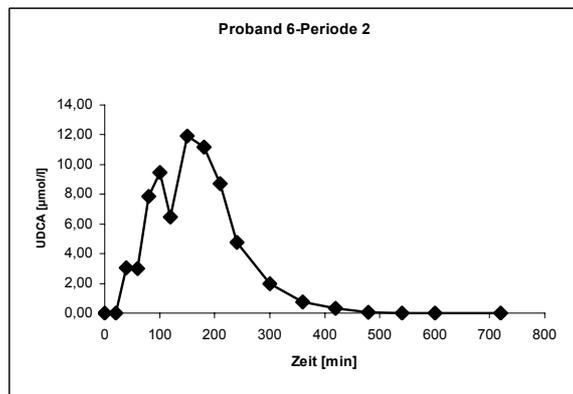
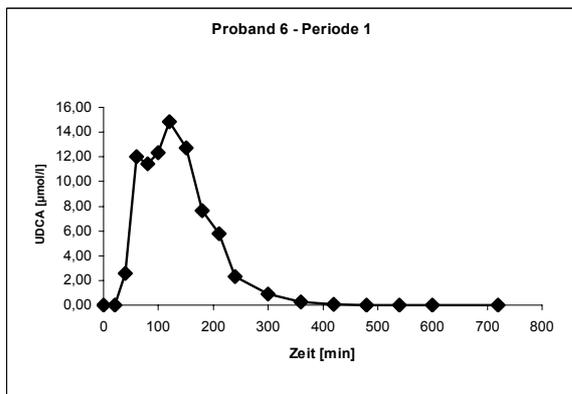
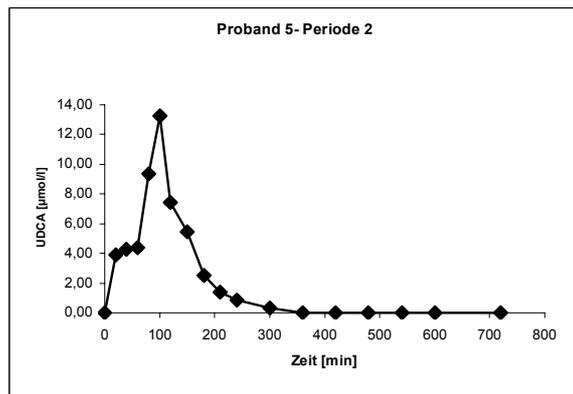
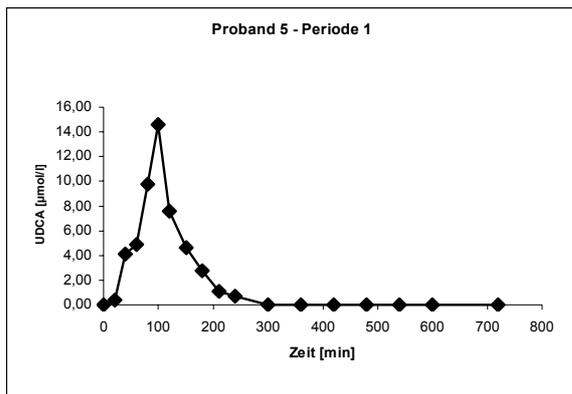
PERIODE 1												
Zeit [min]	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	P 10	P 11	P 12
0	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.
20	1,56	n.q.	2,87	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	3,83	1,00	3,75
40	2,28	8,12	2,50	1,67	4,12	2,56	0,54	n.q.	n.q.	9,32	1,99	6,75
60	1,78	9,91	1,28	4,46	4,86	12,02	1,10	1,41	n.q.	13,31	6,97	6,69
80	1,65	7,80	1,25	6,33	9,75	11,41	3,16	4,08	n.q.	21,48	13,45	5,88
100	1,48	9,95	1,00	5,62	14,56	12,35	5,84	3,58	n.q.	17,79	16,27	9,93
120	1,30	13,70	0,68	13,96	7,59	14,82	5,24	5,88	n.q.	10,41	19,02	10,09
150	1,71	13,28	3,11	16,53	4,62	12,71	11,56	7,99	2,62	7,11	29,94	9,17
180	1,54	5,94	2,85	7,99	2,75	7,62	10,71	5,54	1,60	5,14	13,70	7,89
210	2,39	4,07	9,03	3,49	1,07	5,81	7,10	8,22	2,60	3,88	6,80	6,57
240	1,77	2,35	6,79	2,36	0,68	2,34	5,10	7,38	7,70	2,64	3,84	4,95
300	4,11	1,97	7,09	0,85	n.q.	0,93	3,32	2,13	5,64	1,61	2,41	1,97
360	1,57	1,01	2,26	0,70	n.q.	n.q.	1,17	1,41	0,69	1,25	2,14	1,44
420	1,01	n.q.	1,43	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	0,70	n.q.	0,97	0,99	1,09
480	2,13	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	1,24	1,02
540	3,53	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	0,85	0,74
600	1,55	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	0,74	0,82
720	n.q.	n.q.	0,77	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	0,78	1,03

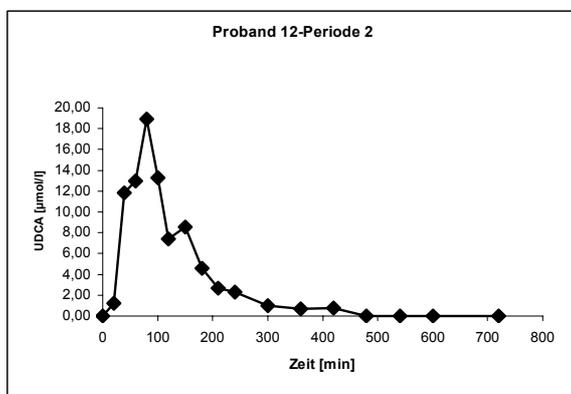
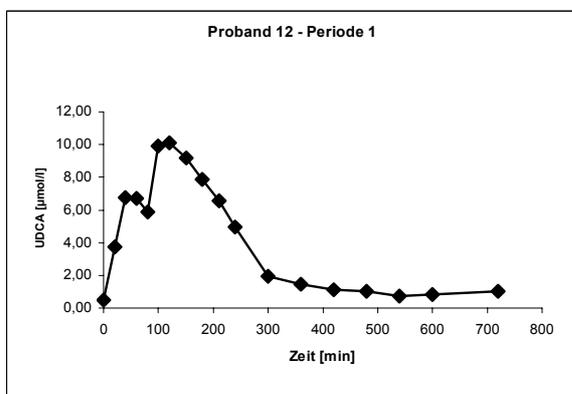
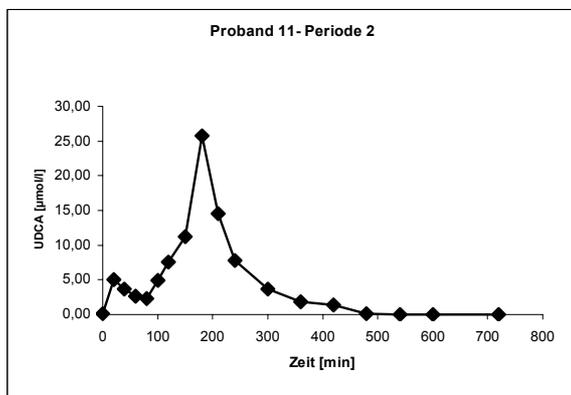
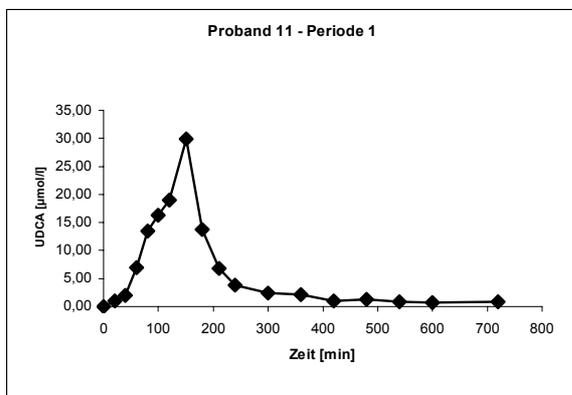
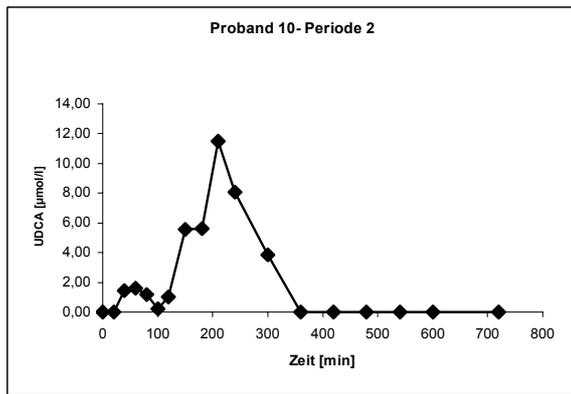
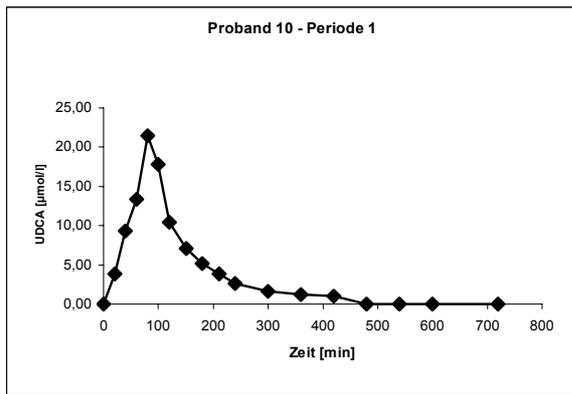
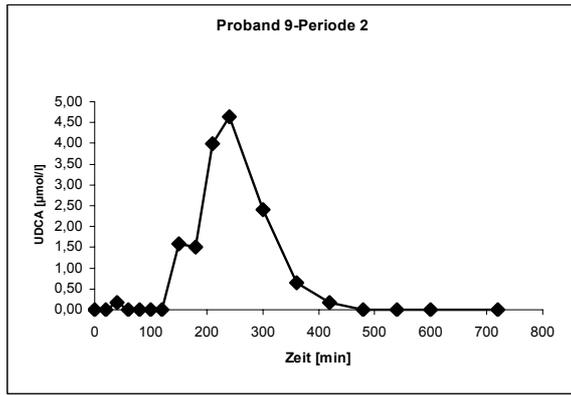
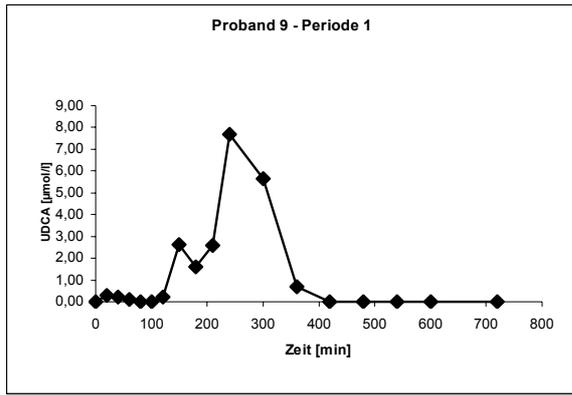
PERIODE 1												
Zeit [min]	P 13	P 14	P 15	P 16	P 17	P 18	P 19	P 20	P 21	P 22	P 23	P 24
0	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.
20	0,54	5,82	3,29	0,75	1,19	1,05	5,71	n.q.	10,42	n.q.	1,74	6,44
40	1,10	2,80	4,83	1,52	1,51	4,84	8,57	3,08	9,40	2,10	1,99	5,47
60	1,09	2,52	6,56	4,45	1,57	7,18	7,62	5,60	8,26	1,85	1,85	6,28
80	1,13	3,24	6,18	9,48	5,07	8,54	5,59	4,18	7,23	2,31	3,48	7,17
100	1,85	7,90	4,90	7,57	5,04	8,05	7,17	10,34	10,00	2,85	3,48	7,04
120	1,75	6,10	3,26	5,48	3,86	11,08	6,36	12,22	8,72	7,40	4,04	5,70
150	10,69	5,40	3,75	8,07	11,78	12,79	8,29	15,74	8,71	19,39	4,97	6,51
180	15,30	5,05	4,71	4,96	9,53	8,28	4,39	8,97	5,67	13,31	3,47	4,89
210	9,00	7,27	4,71	5,16	4,59	3,84	3,73	6,89	5,51	8,26	4,78	5,03
240	6,20	5,19	4,71	3,82	2,92	2,20	2,84	5,62	4,50	9,51	4,29	4,42
300	3,62	2,70	2,17	1,50	2,44	1,97	2,98	2,14	2,43	4,38	8,97	4,50
360	2,08	0,93	0,95	1,27	1,93	1,58	0,83	1,81	1,69	2,10	3,82	1,29
420	1,72	1,43	0,93	0,90	1,32	0,90	0,88	1,34	1,34	2,63	2,56	1,85
480	1,59	1,24	0,85	0,68	1,04	0,61	0,61	1,16	1,07	2,65	3,54	2,24
540	1,33	2,23	0,70	0,72	0,77	n.q.	0,82	1,15	n.q.	1,97	1,80	1,79
600	1,00	1,54	0,59	n.q.	0,81	0,51	0,93	n.q.	n.q.	1,78	1,48	1,64
720	1,88	1,28	0,72	0,65	1,01	n.q.	1,66	n.q.	n.q.	2,02	1,31	1,00

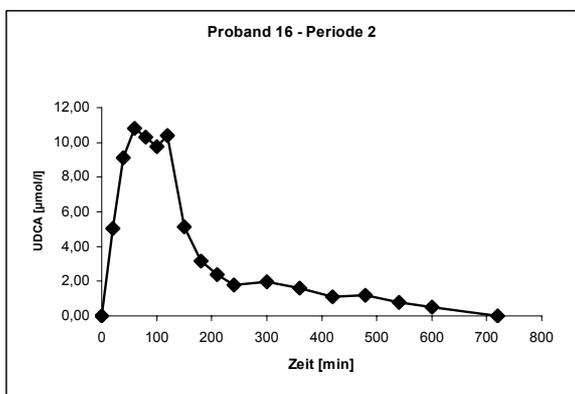
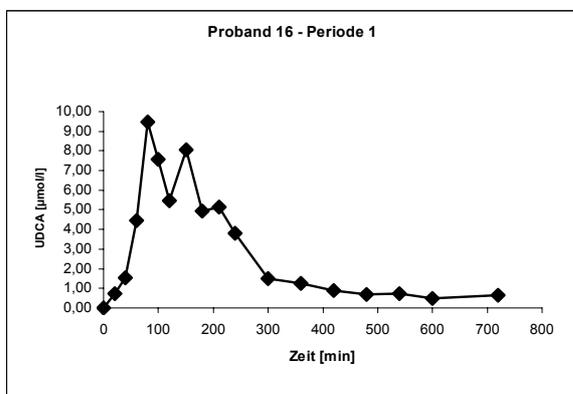
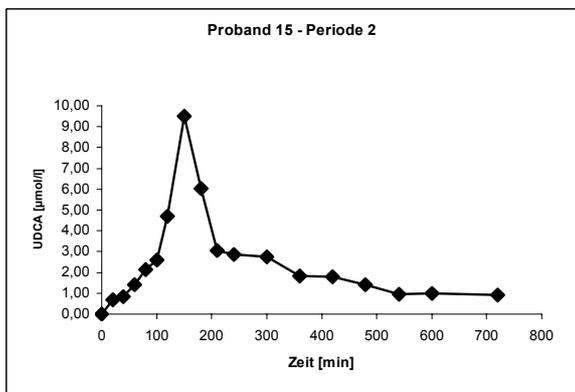
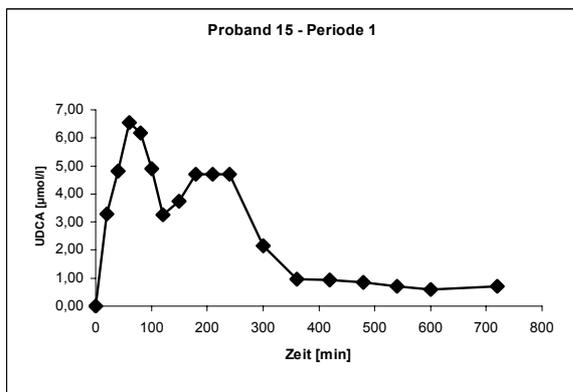
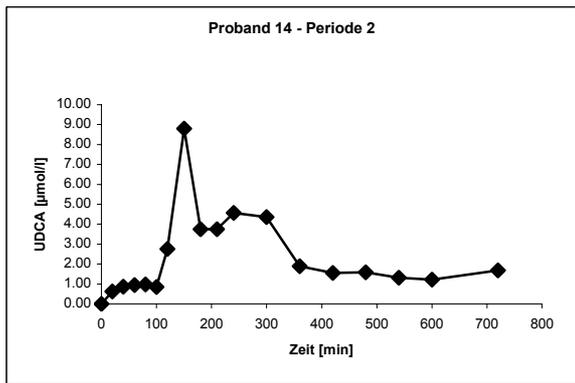
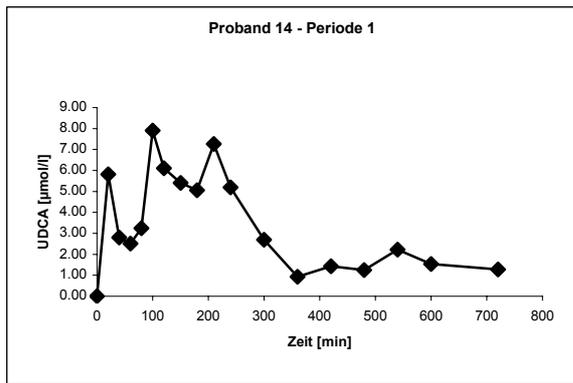
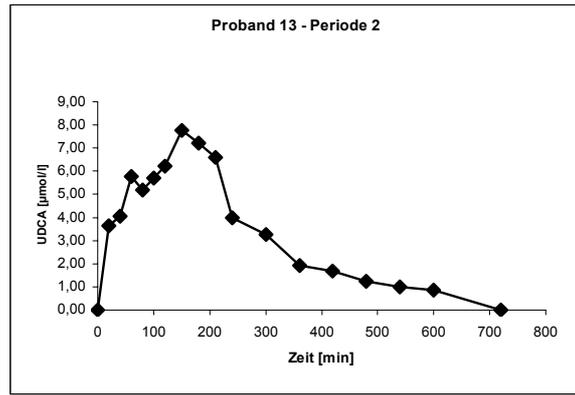
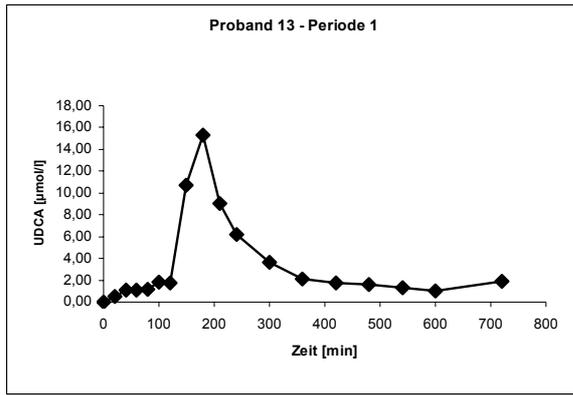
PERIODE 2													
Zeit [min]	P 13	P 14	P 15	P 16	P 17	P 18	P 19	P 20	P 21	P 22	P 23	P 24	
0	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	
20	3,64	0,62	0,67	5,05	8,61	5,57	0,69	4,11	1,04	6,29	1,40	0,94	
40	4,07	0,87	0,83	9,11	4,36	6,09	0,81	5,33	4,66	7,66	1,11	1,13	
60	5,76	0,94	1,41	10,82	3,92	6,09	0,99	9,91	4,42	6,63	1,22	1,14	
80	5,18	0,98	2,12	10,29	4,80	7,39	4,15	10,13	6,69	7,26	2,02	1,13	
100	5,71	0,85	2,59	9,76	5,14	6,98	1,90	11,40	6,25	6,21	2,07	2,10	
120	6,23	2,75	4,68	10,41	5,91	5,66	5,32	12,17	7,76	8,64	2,73	1,59	
150	7,77	8,80	9,51	5,15	7,55	7,68	9,68	12,52	5,89	11,90	7,31	2,98	
180	7,22	3,75	6,03	3,16	5,95	7,79	10,38	8,02	3,56	6,96	6,61	2,58	
210	6,58	3,75	3,05	2,37	4,54	5,57	6,86	5,35	4,98	7,62	4,96	4,51	
240	3,97	4,57	2,88	1,78	4,99	3,30	4,63	4,35	4,12	3,19	5,70	4,25	
300	3,26	4,36	2,73	1,96	2,56	1,14	1,33	2,21	2,16	2,09	4,53	4,25	
360	1,92	1,89	1,82	1,61	1,53	0,91	1,21	1,93	1,75	2,57	2,57	2,39	
420	1,69	1,55	1,79	1,09	1,13	0,64	1,32	0,96	1,27	1,43	2,44	1,74	
480	1,24	1,59	1,42	1,20	1,34	0,58	1,26	1,87	1,48	1,24	2,02	1,38	
540	1,01	1,32	0,95	0,78	1,44	n.q.	1,18	1,49	1,39	1,14	1,15	0,83	
600	0,85	1,21	0,98	0,53	1,68	n.q.	1,31	1,83	0,95	2,51	1,40	0,88	
720	n.q.	1,68	0,92	n.q.	1,76	n.q.	1,24	1,71	n.q.	1,77	1,33	0,93	

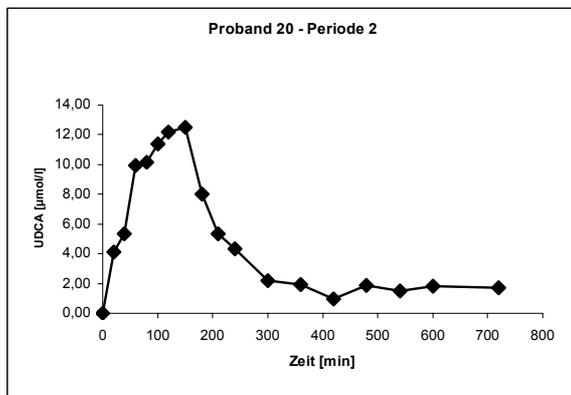
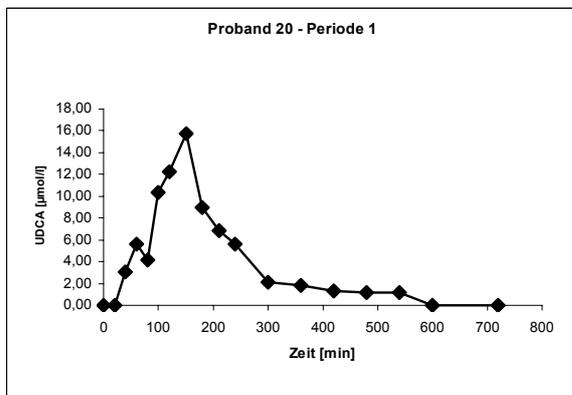
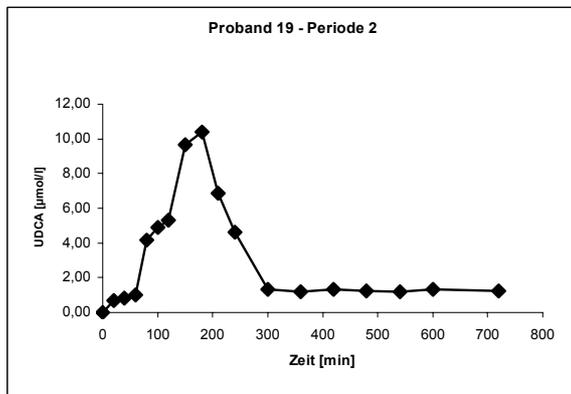
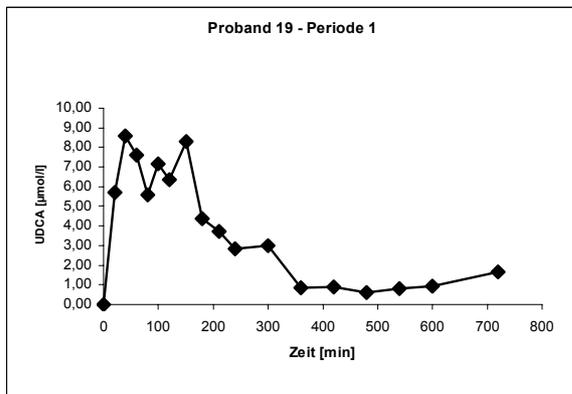
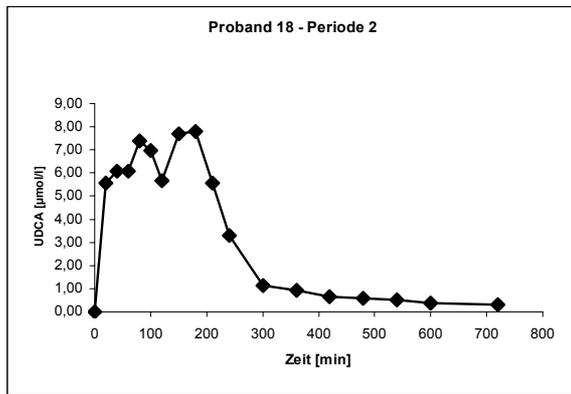
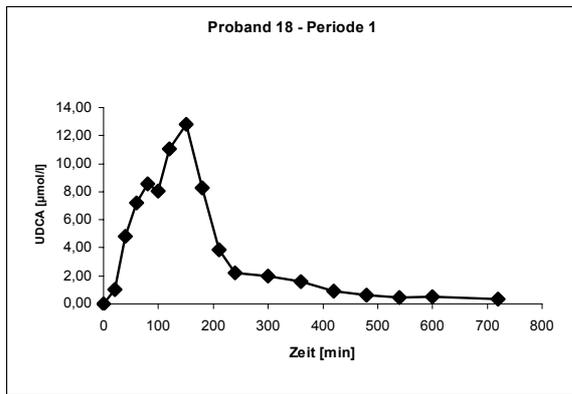
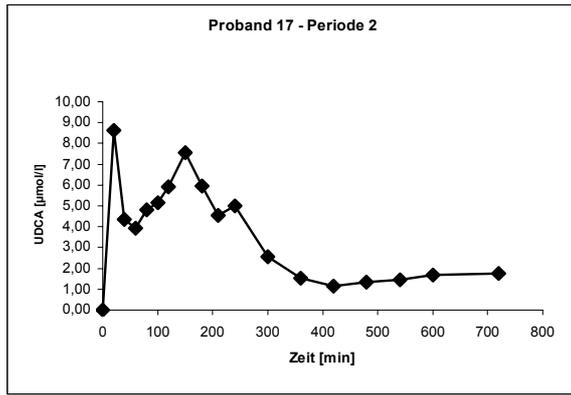
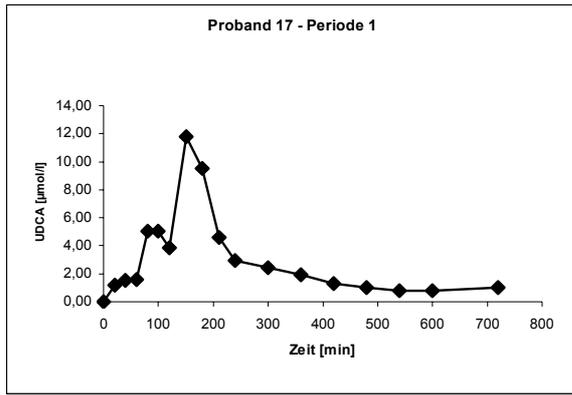
Konzentrations-Zeit-Profile der UDCA-Bioäquivalenzstudie

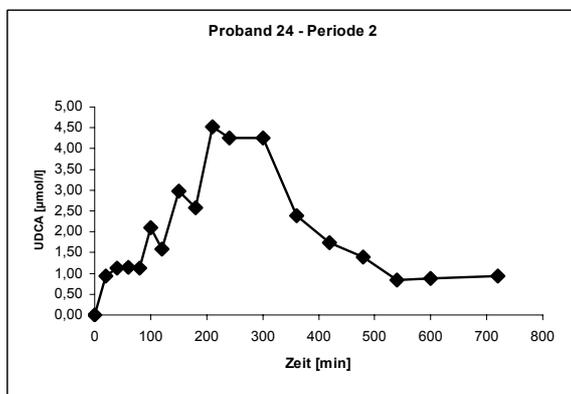
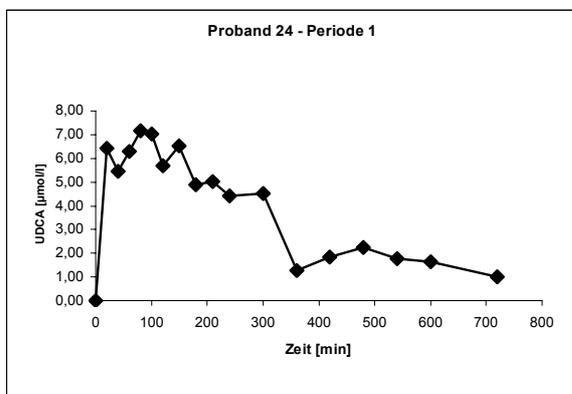
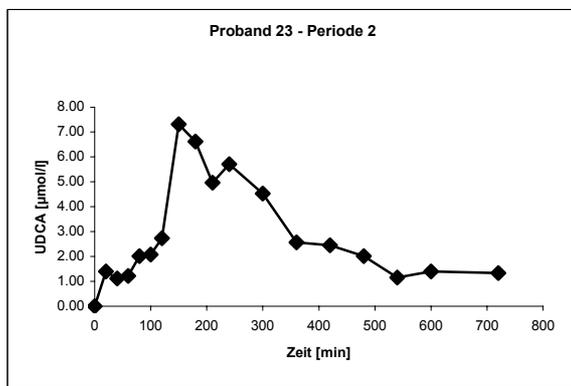
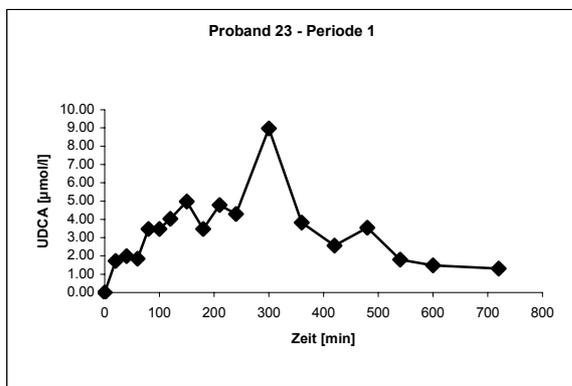
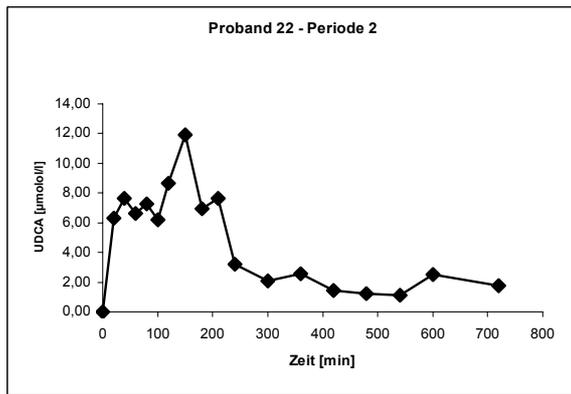
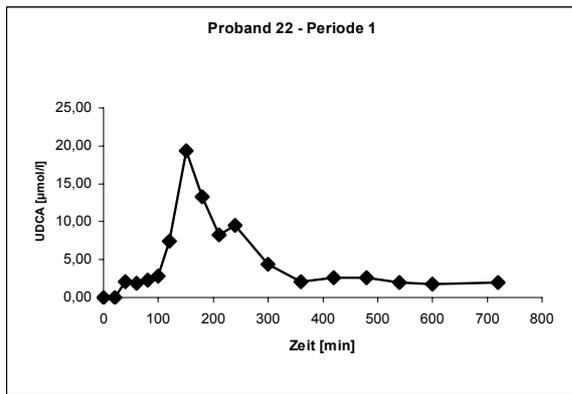
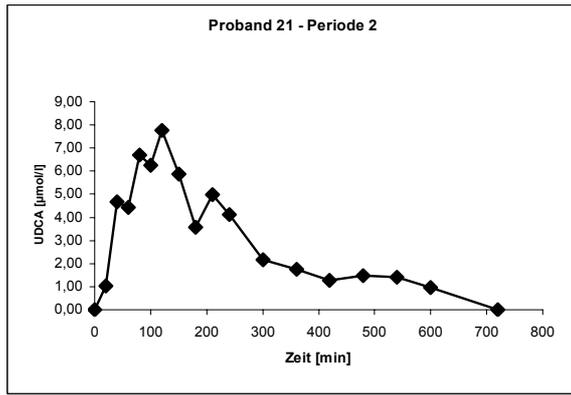
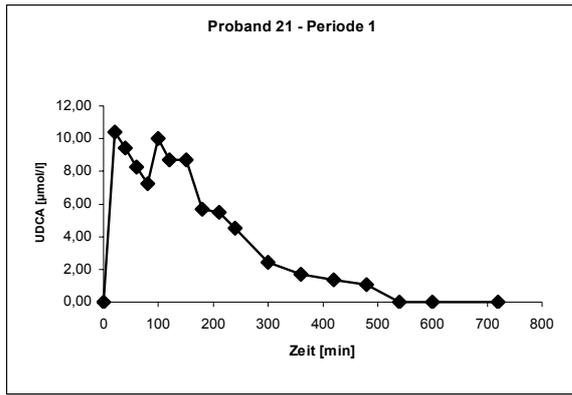












8 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Klaus von Bergmann für die Überlassung dieses interessanten Themas. Seine kompetente Betreuung und sein stetiges Engagement haben entscheidend zum Gelingen dieser Dissertationsarbeit beigetragen. Danken möchte ich ihm auch für das gute Arbeitsklima in der von ihm geleiteten Abteilung für Klinische Pharmakologie.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde für seine begleitende Betreuung und nützlichen Hinweise zu dieser Arbeit. Auch für die Begutachtung der Arbeit und die Förderung der interdisziplinären Zusammenarbeit möchte ich ihm danken.

Ich danke auch PD Dr. Dr. Dieter Lütjohann für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei methodischen Fragestellungen sowie für viele hilfreiche Anregungen.

Besonders erwähnen möchte ich Dr. Harald Brzezinka, der die Arbeit von Anfang bis Ende begleitet hat, und dem ich für die Synthesen diverser deuterierter Standards, für die Einführung in die Thematik und die vielen konstruktiven Anregungen herzlich danke.

Mein Dank gilt des weiteren allen Mitarbeitern der Abteilung für Klinische Pharmakologie für die Unterstützung dieser Arbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Meryem Gültekin, Silvia Friedrichs und Christiane Fricke danke ich für die Unterstützung bei der Probenaufarbeitung. Dr. Wolfgang Prange danke ich für seine Hilfsbereitschaft bei EDV-Fragen und für viele inspirierende Gespräche. Mein Dank gilt ebenso den in die Studien involvierten Ärzten PD Dr. Thomas Sudhop und Dr. Michael Reber der Station Naunyn sowie unserer Study Nurse Beate Harzheim für die gute Zusammenarbeit.

Des weiteren danke ich PD Dr. Karin Dilger für ihr stetes Interesse am methodischen Fortgang der Ursodesoxycholsäure-Bestimmung sowie für die Unterstützung bei der Beschaffung von Literatur.

Danken möchte ich auch Claudia Nicolay für ihre wertvolle Hilfe bei statistischen Fragestellungen.

Besonders herzlich danke ich meiner Familie, die mich stets in meinem Handeln unterstützte und am allermeisten meinem Lebensgefährten Simon, dessen Unterstützung und Motivation mir ganz besonders hilfreich waren.