

Solubilisation des Pyrens in wäßrigen Lösungen von Gallensäuren und einigen ihrer Salze

E. MITTERHAUSZEROVÁ und K. KRÁLOVÁ

*Wissenschaftliches Forschungsinstitut der Pharmazeutischen Fakultät
an der Komenský-Universität, 880 34 Bratislava*

Eingegangen am 28. Dezember 1972

Gewidmet dem Professor RNDr. L. Krasnec zu seinem 60. Geburtstag

Es wurde spektrophotometrisch die Solubilität des Pyrens in wäßrigen Lösungen von Gallensäuren und einigen ihrer Natriumsalze studiert. Die Kurve der Abhängigkeit der solubilisierten Pyrenmenge von der Konzentration der Gallensäuren und ihrer Salze weist diskontinuierliche Veränderungen der Solubilisationseigenschaften der studierten Lösungen als Folge einer stufenweisen Mizellenbildung auf. Die Solubilisation des Pyrens erwies sich nur im Falle des Natriumglykocholates und Natriumtaurocholates vom pH-Wert der Lösung abhängig, mit einem Maximum an Solubilisation im sauren Bereich (bei Natriumglykocholat bei pH 4 und Natriumtaurochololat bei pH 5).

Es wurde festgestellt, daß die Lage der Absorptionsmaxima des Pyrens in wäßrigen Lösungen von Gallensäuren und deren Salzen sich im Hinblick auf ihre Lage im Hexan in Richtung zu höheren Wellenlängen hin verschiebt; dabei ist in diesen Lösungen — bei einer gegebenen Pyrenmenge — die Intensität der Maxima immer niedriger als im Hexan.

Spectrophotometric method was used for investigating the solubility of pyrene in aqueous solutions of bile acids and some their salts. The dependence of solubilized pyrene on the concentration of bile acids and their salts showed discontinual changes in solubilizing properties of solutions investigated. This is due to the step-wise micelle formation. The dependence of the solubility of pyrene on the pH of solutions was found only in the case of sodium glycocholate and sodium taurocholate. The maximum of solubility was observed in acidic pH range (sodium glycocholate at pH 4 and sodium taurocholate at pH 5).

It was found, that the position of absorption maxima of pyrene in aqueous solutions of bile acids and their salts were shifted to higher wavelengths as compared to that in hexane. In these solutions (at given amounts of pyrene) the intensity of maxima is always lower than that in hexane.

Die Gallensäuren und ihre Salze haben in wäßrigen Lösungen einen halbkolloidalen Charakter, nach Überschreitung einer bestimmten Konzentration beginnen sie Mizelle zu bilden. Die mizellaren Lösungen dieser Substanzen solubilisieren gut in Wasser unlösliche lipophile Verbindungen [1]. In wäßrigen Lösungen von Natriumsalzen der Gallensäuren und einiger Fettsäuren bilden sich Mizelle stufenweise in einem verhältnis-

mäßig breitem Konzentrationsbereich [1]. Durch Messung der Lichtstreuung, durch osmotische Messungen, mittels Diffraktion von X-Strahlen [3, 4] wie auch durch Solubilitätsstudien [1, 2, 5] wurde festgestellt, daß sich die Eigenschaften dieser Lösungen mit steigender Konzentration diskontinuierlich verändern. Für Konzentrationen oder enge Konzentrationsbereiche, bei denen es zu Veränderungen kommt, wurde der Begriff Grenzkonzentration eingeführt [2]. So beobachtete z. B. *Ekkvoll* [2] in Lösungen des Natriumcholates drei Grenzkonzentrationen und zwar 0,015; 0,045 und 0,1–0,2 M. *Fonell* [3, 4] stellte fest, daß die Bildung von Molekülaggregaten der Cholaten bei der Grenzkonzentration 1 beginnt, die gebildeten Aggregate erreichen aber kolloidale Dimensionen erst im Grenzkonzentrationsbereich 3. Die mittels Studiums der Diffraktion von X-Strahlen und durch Viskositätsmessungen erzielten Ergebnisse weisen auf Veränderungen in der mizellaren Struktur oberhalb der Grenzkonzentration 3 hin [4].

Zweck der Arbeit war die Bestätigung der Abhängigkeit der Solubilisierung des Pyrens von der Konzentration der Gallensäuren und einiger ihrer Natriumsalze. Es wurde die Beeinflussung der Solubilisierung als Folge von Veränderungen in der mizellaren Struktur der Lösungen und pH-Wertsveränderungen dieser Lösung studiert.

Experimenteller Teil

Material und Methoden

Gallensäuren (Cholsäure (CHA), Desoxycholsäure (DOCHA) und Dehydrocholsäure (DHCHA) und die Natriumsalze der Gallensäuren (Natriumcholat (NaCH), Natriumtaurocholat (NaTCH) und Natriumglykocholat (NaGCH)) wurden von n. p. Lachema.

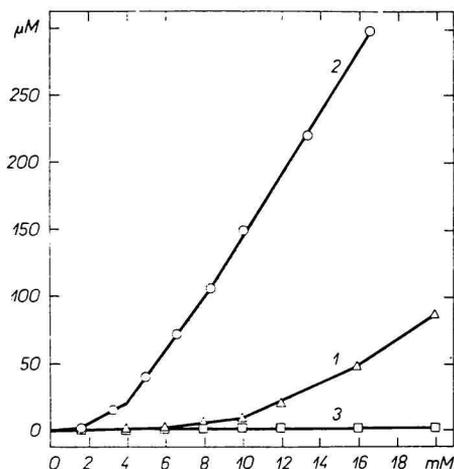


Abb. 1. Abhängigkeit der Solubilisierung des Pyrens von der Konzentration der Cholsäure (1), Desoxycholsäure (2) und Dehydrocholsäure (3) in einer Sörensen-Phosphat-Pufferlösung vom pH 7,4 ($t = 37^{\circ}\text{C}$).

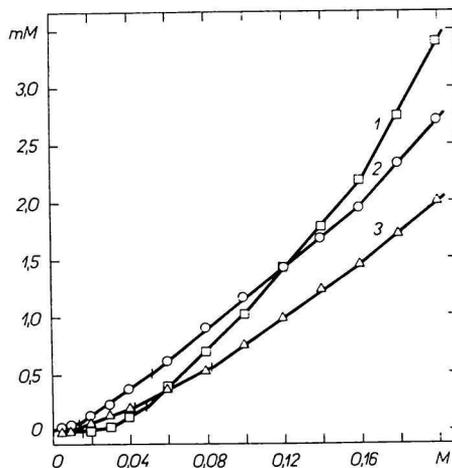


Abb. 2. Abhängigkeit der Solubilisierung des Pyrens von der Konzentration des Natriumcholates (1), des Natriumtaurocholates (2) und Natriumglykocholates (3) in wässriger Lösung im Konzentrationsbereich 0–0,2 M ($t = 37^{\circ}\text{C}$).

Tabelle 1

Grenzkonzentrationen, bei denen Diskontinuitäten der Solubilisationskurven des Pyrens in Gallensäurenlösungen bestimmt wurden

Säure	Grenzkonzentration in mM		
	1	2	3
CHA	6,0	10,0	16,0
DOCHA	1,7	4,0	8,4
DHCHA	—	—	—

Brno und Zdravotnické zásobování, Praha geliefert. Der Reinheitsgrad der erhaltenen Präparate war puris. Pyren wurde durch Umkristallisieren gereinigt und seine Reinheit mittels spektraler Methoden bestätigt.

Beim Studium der Konzentrationsabhängigkeiten wurde die Stammlösung der solubilisierenden Substanz (Natriumsalze der Gallensäuren im destillierten Wasser und die

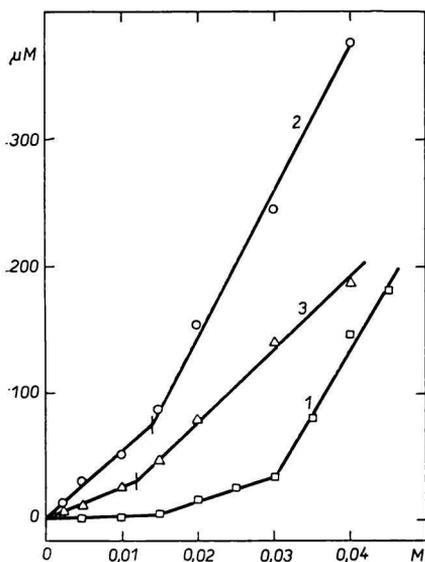


Abb. 3. Abhängigkeit der Solubilisation des Pyrens von der Konzentration des Natriumcholates (1), Natriumtaurocholates (2) und Natriumglykocholates (3) in wässriger Lösung im Konzentrationsbereich 0–0,05 M ($t = 37^\circ\text{C}$).

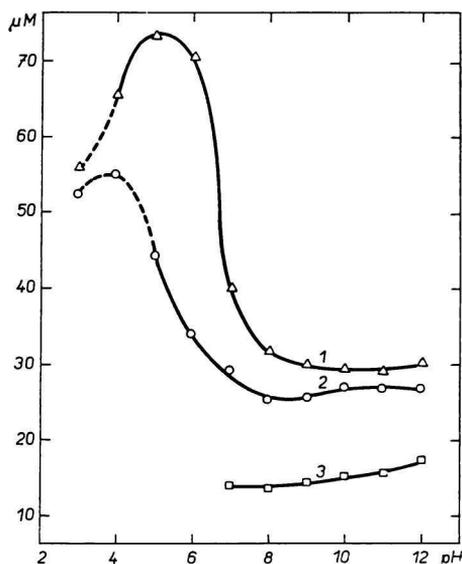


Abb. 4. Abhängigkeit der Solubilisation des Pyrens vom pH der Lösung des Natriumtaurocholates (1), Natriumglykocholates (2) und Natriumcholates (3) in Britton–Robinson-Pufferlösungen. Im gestrichelten pH-Bereich entstand infolge der herabgesetzten Löslichkeit des Salzes bei der gemessenen Konzentration eine Trübung ($t = 37^\circ\text{C}$).

Gallensäuren im Sörensen-Phosphat-Puffer vom pH 7,4) mit einem Überschuß des Pyrens in der Schüttelmaschine bis zur Gleichgewichtseinstellung (zwei Stunden) bei konstanter Temperatur ($37 \pm 0,2^\circ\text{C}$) geschüttelt. Nach Einstellung des Gleichgewichtes wurde der Überschuß an ungelöstem Pyren durch Filtration entfernt. Die maximale solubilierte Pyrenmenge wurde spektrophotometrisch bestimmt. Die Extinktionswerte wurden auf dem einstrahligen Spektrophotometer VSU 2-P bei charakteristischen Wellenlängen gemessen, die den Absorptionsmaxima des Pyrens im gegebenen Lösungs-

Tabelle 2

Grenzkonzentrationen, bei denen Diskontinuitäten der Solubilisationskurven des Pyrens in Lösungen von Salzen der Gallensäuren bestimmt wurden

Solubilisator	Grenzkonzentration in M				
	1	2	3	4	5
NaTCH	0,014	0,052	0,160	—	—
NaGCH	0,012	0,043	0,083	0,160	—
NaCH	0,015	0,031	0,049	0,100	0,160

Tabelle 3

Anzahl Mole des Solubilisatoren, die auf ein Mol Pyren in den einzelnen linearen Bereichen der Solubilisationskurven entfallen

Solubilisator	Mol/Mcl in Grenzkonzentrationsbereichen					
	0—1	1—2	2—3	3—4	über 4	über 5
NaTCH	200	85	76	52	—	—
NaCH	5560	501	107	62	54	33
NaGCH	387	159	114	88	73	—
DOCHA	500	128	51	43	—	—
CHA	2000	571	154	105	—	—
DHCHA			7220			

Tabelle 4

Verhältnis der Intensität der Absorptionsmaxima des Pyrens im Hexan und in Lösungen von Gallensäuren und ihrer Salze

Solubilisator	Absorptionsmaximum bei λ [nm]		
	334	318,5	272,3
CHA	1,42	1,17	1,18
DOCHA	1,50	1,27	1,37
DHCHA	1,60	—	—
NaCH	1,27	1,11	1,08
NaGCH	1,38	1,12	1,13
NaTCH	1,32	1,16	1,14

Tabelle 5

Wellenlängen der Absorptionsmaxima des Pyrens in Lösungen von Gallensäuren und ihrer Salze und Verschiebungen gegenüber den Wellenlängen des Pyrens im Hexan

Solubilisator	λ	$\Delta\lambda$	λ	$\Delta\lambda$	λ	$\Delta\lambda$
CHA	337,5	3,5	321,5	3,0	274,2	1,9
DOCHA	337,5	3,5	322,0	3,5	274,5	2,2
DHCHA	337,0	3,0	—	—	—	—
NaCH	338,0	4,0	322,0	3,5	274,5	2,2
NaGCH	338,0	4,0	321,5	3,0	274,5	2,2
NaTCH	338,0	4,0	322,0	3,5	275,0	2,7

mittel entsprechen. Beim Studium der pH-Abhängigkeit wurden Britton—Robinson-Pufferlösungen benutzt. Bei einer gegebenen Pyrenmenge entsprach die Absorptionsintensität des gemessenen Maximums in wäßrigen Lösungen der Gallensäuren nicht dessen Intensität im Hexan (in jedem Falle war sie niedriger als im Hexan). Daher wurde zwecks quantitativer Auswertung der Solubilisierten Pyrenmenge dieses in Hexan ausgeschüttelt, und die maximale solubilierte Menge wurde aufgrund von Eichkurven des Pyrens im Hexan bestimmt. Parallel wurde unter den gleichen Bedingungen auch die eigene Löslichkeit des Pyrens im entsprechenden Puffer und im Wasser bestimmt.

Ergebnisse

Abhängigkeit der Solubilisierung des Pyrens von der Konzentration der Gallensäuren und ihrer Natriumsalze in wäßrigen Lösungen

Die Gallensäuren wurden in einem Konzentrationsintervall von 0—20 mM geprüft. Höhere Konzentrationen der Gallensäuren ließen sich wegen ihrer geringen Löslichkeit im gegebenen Puffer (pH 7,4) nicht herstellen. Der Verlauf der Solubilisationskurven der Cholsäure und Desoxycholsäure (Abb. 1) weist Brüche auf, während bei der Dehydrocholsäure die Abhängigkeit des solubilierten Pyrens von ihrer Konzentration linear ist. Die absoluten Werte der Solubilisierten Pyrenmengen in Lösungen der Dehydrocholsäure sind wesentlich niedriger als die Werte, die den gleichen molaren Konzentrationen der weiteren zwei Gallensäuren entsprechen. In Tabelle 1 sind die Grenzkonzentrationen der Gallensäuren angegeben, bei denen es zu Brüchen der Solubilisationskurve kommt.

Bei den Natriumsalzen der Gallensäuren erscheinen die Brüche auf den Solubilisationskurven in allen drei Fällen (Abb. 2; Detail im Grenzkonzentrationsbereich 1 auf Abb. 3). Das geprüfte Konzentrationsintervall war 0—0,2 M. Die Grenzkonzentrationen der Gallensäurensalze sind in Tabelle 2 angegeben.

In Tabelle 3 sind die Molverhältnisse des Solubilisatoren und des solubilierten Pyrens (Mol Solubilisator/Mol Pyren) für die einzelnen Gallensäuren und ihrer Salze in Konzentrationsintervallen angegeben, die durch die Grenzkonzentrationen des Solubilisatoren gegeben sind.

Beim Ausschütteln des Pyrens in Hexan wurde in jedem Falle die Extinktion der entsprechenden Absorptionsmaxima erhöht. Das Verhältnis der in Hexan ausgeschüttelten solubilierten Pyrenmenge und der direkt in wäßriger Lösung bzw. in der Puffer-

lösung bestimmten solubilierten Pyrenmenge (bei Verwendung einer Hexan-Eichkurve) war im geprüften Konzentrationsintervall bei jeder der studierten Substanzen konstant. Diese Faktoren sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Die Absorptionsmaxima des Pyrens waren in wäßrigen Lösungen und in Pufferlösungen der Gallensäuren und ihrer Salze im Vergleich mit ihrer Lage im Hexan in Richtung zu höheren Wellenlängen hin verschoben. Die Lage und die Verschiebung der Maxima in den einzelnen Lösungen sind in Tabelle 5 angegeben.

Abhängigkeit der Solubilisation des Pyrens vom pH-Wert der Lösungen der Gallensäuren und ihrer Natriumsalze

Die Abhängigkeit der Solubilisation des Pyrens vom pH der Natriumsalzlösung der Gallensäuren ist auf Abb. 4 veranschaulicht. Im Falle NaTCH und NaGCH war es möglich, das studierte pH-Intervall auch auf den sauren pH-Bereich auszudehnen, während bei den übrigen geprüften Substanzen in diesem Bereich die eigene Löslichkeit des Solubilisatoren herabgesetzt war. Die Abhängigkeit der Solubilisation des Pyrens vom pH-Wert zeigte ein Maximum im Falle des NaTCH bei pH 5 und des NaGCH bei pH 4. Im alkalischen pH-Bereich ($\text{pH} > 7$) wurde die solubilierte Menge durch pH-Wertsveränderungen schon nicht beeinflußt.

Die Konzentration der Gallensäuren und ihrer Salze war in jedem Falle niedriger als die Grenzkonzentration 1 der entsprechenden Substanz. Die Solubilisation des Pyrens in Lösungen von Gallensäuren und des Natriumcholates im pH-Intervall 7–12 zeigte keine Abhängigkeit vom pH.

Diskussion

Die Ergebnisse des Studiums der Solubilisation des Pyrens in wäßrigen Lösungen von Gallensäuren und einigen ihrer Salze bestätigen, daß man sie im Gegenteil zu den anionischen und kationischen Tensiden nicht eindeutig durch eine kritische Mizellkonzentration charakterisieren kann. In diesen Fällen erfolgt die Bildung von Mizellen nicht auf einmal bei einer bestimmten Konzentration, sondern stufenweise. Unter der Voraussetzung, daß die Molekülassoziation der Cholaten in wäßrigen Lösungen bei einer Grenzkonzentration von 1 [3, 4] beginnt, kann die Solubilisation des Pyrens im Konzentrationsbereich 0 bis Grenzkonzentration 1 als Folge einer Donor-Akzeptor-Wechselwirkung angesehen werden. Bei NaCH ist in diesem Konzentrationsbereich die Pyrenmenge annähernd auf dem Niveau der Löslichkeit des Pyrens im Wasser (Löslichkeit des Pyrens mit der gleichen Methode bestimmt bei einer Temperatur von 37°C beträgt $0,62 \mu\text{M}$), während er bei NaTCH und NaGCH bedeutend höher liegt (NaTCH bei einer Grenzkonzentration 1–70 μM und NaGCH — 31 μM). Es ist wahrscheinlich, daß innerhalb des Grenzkonzentrationsintervalles 1–2 nur teilweise Mizellenbildung erfolgt, und die mizellaren Eigenschaften noch nicht voll entwickelt sind. Weitere Brüche können der Tatsache zugeschrieben werden, daß es mit Erhöhung der Konzentration des Solubilisatoren zu einer Veränderung des Assoziationsgrades der Mizellen und ihrer Form kommt. Die hohen Konzentrationen des Solubilisatoren (bei den Natriumsalzen der Gallensäuren im Grenzbereich 3) beginnt auch die Wechselwirkung zwischen den einzelnen Mizellen wirksam zu werden.

Von den Gallensäuren weist die DOCHA die höchste Solubilisation auf (Abb. 1). DHCHA zeigt im studierten Konzentrationsbereich (0–20 mM) keinerlei Anzeichen, die auf Mizellenbildung hinweisen, der Solubilitätsverlauf des Pyrens ist im gesamten

Konzentrationsintervall linear (ohne Brüche), und die absoluten Werte des solubilierten Pyrens sind sehr niedrig. Fontell [4] fand beim Studium der Solubilisation des *p*-Xylols in einer Natriumdehydrocholatlösung Brüche der Solubilisationskurven erst bei Konzentrationen von 0,14–0,15 M.

Bei NaTCH beobachteten wir 3, bei NaCH 5 und NaGCH 4 Grenzkonzentrationen, bei denen sich der Richtungskoeffizient der Abhängigkeit der solubilierten Pyrenmenge von der Konzentration des Solubilisatoren änderte. Die Veränderungen der Richtungskoeffizienten der einzelnen linearen Bereiche der Solubilisationskurven nach den Grenzkonzentrationen sind bei NaTCH und NaGCH verhältnismäßig gering und annähernd gleich (Abb. 2). Eine größere Abhängigkeit der Solubilisation des Pyrens von der Mizellenbildung in Lösung trat bei NaCH auf.

Die Lage der Absorptionsmaxima des Pyrens in wäßrigen Lösungen von Gallensäuren und ihrer Salze ist sehr nahe (maximaler Unterschied 0,8 nm). Im Vergleich mit ihrer Lage im Hexan sind sie allerdings in Richtung zu höheren Wellenlängen hin verschoben. Die größte Verschiebung wurde bei dem Absorptionsmaximum des Pyrens im Hexan bei 334 nm beobachtet (3,5 bis 4 nm). Eine ähnliche Verschiebung wurde beim solubilierten Pyren in wäßrigen Lösungen des Polyvinylpyrrolidons und des Blutalbumins (4 nm) festgestellt, während bei der Tetramethylharnsäure eine Verschiebung von 6,3 nm verzeichnet wurde [6].

Eine Veränderung der Solubilisation des Pyrens in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung trat nur bei NaTCH und NaGCH auf. Beim Studium der Abhängigkeit der Solubilisation des Pyrens vom pH der Lösung war die Konzentration des NaTCH und NaGCH 0,01 M und die Konzentration des NaCH 0,02 M (Abb. 4). Ein ausdrucksvolleres Maximum der Solubilisation im sauren Bereich zeugt vom Einfluß des Dissoziationsgrades und der Beteiligung der Azidogruppe an der Solubilisation. Eine ähnliche Abhängigkeit der Solubilisation vom pH der Lösung wurde bei Biopolymeren beobachtet, die saure und basische Gruppen enthielten [6]. Oberhalb der Grenzkonzentration 1 nimmt der Effekt des pH ab. So ist für NaTCH bei 0,01 M Konzentration ($c < \text{Grenzkonzentration } 1$) das Verhältnis des maximalen Solubilisationswertes des Pyrens bei pH 5 (Maximum der Kurve) und des Wertes bei pH 9 2,46; bei Konzentrationen von 0,03 M ($c > \text{Grenzkonzentration } 1$) ist das Verhältnis dieser Werte 2,05.

Die Autoren danken Frau L. Chobujová für die technische Zusammenarbeit.

Literatur

1. Ekwall, P., Setälä, K. und Sjöblom, L., *Acta Chem. Scand.* **5**, 175 (1951).
2. Ekwall, P., *J. Colloid Sci.* **9**, 66 (1954).
3. Fontell, K., *Kolloid-Z. Z. Polym.* **244**, 246 (1971).
4. Fontell, K., *Kolloid-Z. Z. Polym.* **250**, 333 (1972).
5. Tsukurina, N. N., Markina, Z. N., Chirova, G. A. und Reh binder, P. A., *Kolloid. Zh.* **30**, 292 (1968).
6. Mitterhauszerová, L., Králová, K., Šulková, A. und Krasnec, I., *Acta Facult. Pharm.*, im Druck.

Übersetzt von A. Muchová