

PDF hosted at the Radboud Repository of the Radboud University Nijmegen

The following full text is a publisher's version.

For additional information about this publication click this link.

<http://hdl.handle.net/2066/143032>

Please be advised that this information was generated on 2017-12-05 and may be subject to change.

OORSPRONKELIJKE ARTIKELEN

Over de biologische beschikbaarheid van het geneesmiddel

II. Chemische aspecten¹

DRS. D. D. BREIMER²

ON THE BIOLOGICAL AVAILABILITY OF DRUGS

II. Chemical aspects

Biological availability refers to the relative amount of the administered dose of a drug that reaches the general circulation. On basis of this definition it can be expected that its specific chemical aspects are very limited, unless dose is interpreted in terms of amount of active principle. In that case carriers, such as salts and esters which liberate the active principle in vivo, bear a direct chemical relationship to the bioavailability of the active principle.

The importance of salt formation is evident (stability, watersolubility, etc.), while ester formation can serve the following purposes:

1. increase of hydrophilicity to obtain water soluble compounds, which are suitable for parenteral administration (Fig. 1 and 2);
2. decrease of watersolubility to obtain depot preparations (Fig. 3);
3. facilitation of absorption from the gastrointestinal tract as in the case of ampicillin (Fig. 4);
4. masking of unwanted side effects, as in the case of chloramphenicol esters to avoid the bitter taste.

In all cases the ester groups are not part of the drug in its active form; hydrolysis is a prerequisite for action. Another transport form mentioned is chloralhydrate, in vivo there is an immediate formation of the active metabolite trichloroethanol (Fig. 5).

The chemical aspects of the various pharmacokinetic processes are much more extensive. ARIËNS (1972) has written a very broad review on this subject. Certain chemical moieties in a drug molecule, which can be part of the molecule in its active form or which have to be disjuncted to liberate the active form, strongly influence absorption, distribution, metabolism or excretion of the drug.

Absorption. The presence of highly polar sulfonate groups in food colorants prevents absorption from the gastrointestinal tract and this is of importance in respect to toxicity (Fig. 6). The introduction of hydrophilic moieties in sulfonamides makes them suitable for treatment of bacterial infections of the bowel (Fig. 7). With intestinal disinfectants absorption is also undesirable; therefore the

introduction of a sulfonate group is a rational manipulation (Fig. 8).

Distribution. The distribution of a drug over the various compartments in the body is mainly governed by the pKa-value and lipophilicity. Highly ionized compounds – such as quaternary ammonium drugs – are very limited in their distribution behaviour. More lipophilic drugs are able to penetrate through all kinds of membranes and they are able to reach various tissues (Fig. 9).

Metabolism. Certain chemical moieties in a drug molecule have a predominant influence on the rate of metabolism. The presence of an ester group often results in rapid bioinactivation by hydrolysis. This is favourable in the case of suxamethonium when a short action is desired (Fig. 10) and in the case of local anaesthetics when no systemic action is wanted (Fig. 12). In oral antidiabetic agents groups of different chemical nature strongly influence their rate of metabolism (Fig. 11). In the environment the rate of biodegradation of chemical compounds is of great importance in relation to persistent pollution. The use of pesticides, detergents, etc., that are rapidly degraded is highly desirable (Fig. 13).

Excretion. Lipophilicity and the degree of ionization (pKa) of a drug are important factors in excretion processes. Chemical moieties determining these factors are used to modify the excretion pattern; in the case of diodone there is a shift from excretion in urine to the bile by increasing lipophilicity of the molecule (Fig. 14).

INLEIDING

Op grond van de definitie voor biologische beschikbaarheid (BREIMER 1973) is te verwachten dat de chemische aspecten ervan beperkt zijn. Immers het gaat om de dosis van één bepaalde stof en de fractie die daarvan in de circulatie komt. Dat betekent dat slechts de biologische beschikbaarheid van verschillende medicamenten (toedieningsvormen) waarin dezelfde stof is verwerkt met elkaar kan worden vergeleken.

¹ Dit artikel is deel II van een voordracht, gehouden op het KNMP-congres te Arnhem, 10 oktober 1972. Zie voor deel I *Pharm. Weekblad* (1973) 108, 309.

² Farmacologisch Laboratorium, Universiteit van Nijmegen, Nijmegen.

Het is per definitie onmogelijk de biologische beschikbaarheid van twee verschillende stoffen met elkaar te vergelijken, bijvoorbeeld van twee barbituraten of van twee tetracyclinen. Wel met elkaar vergelijkbaar zijn de farmacokinetische parameters van verschillende stoffen, zoals resorptiesnelheid, verdelingsvolume en eliminatiesnelheid. Chemisch zijn processen als resorptie, distributie, metabolisme en uitscheiding heel duidelijk te beïnvloeden, zonder dat daarbij de aard van de werking verloren hoeft te gaan (ARIËNS 1969, 1972).

In het tweede gedeelte van dit artikel zal daaraan nader aandacht worden geschonken.

CHEMISCHE ASPECTEN VAN DE BIOLOGISCHE BESCHIKBAARHEID EN RESORPTIESNELHEID
Het is bij biologisch beschikbaarheidsonderzoek zo, dat in de circulatie (plasma) niet steeds geheel dezelfde stof wordt gemeten als die welke is toegediend. Na het innemen van hexobarbitalnatrium wordt in het plasma hexobarbital-zuur gemeten en bij berekening zal ook de hoeveelheid van deze laatste stof als dosis worden aangemerkt. In werkelijkheid gebeurt dat steeds met zouten, die wat hoeveelheid werkzaam bestanddeel betreft op vrij zuur of vrije base worden omgerekend. Als dus maar onder dosis wordt verstaan de hoeveelheid werkzame stof, dan is het mogelijk de biologische beschikbaarheid en tevens de resorptiesnelheid van verschillende chemische vormen die hetzelfde actieve bestanddeel in vivo opleveren, met elkaar te vergelijken.

In de praktijk is de zoutvorming van zeer groot belang. De meeste geneesmiddelen zijn zwakke zuren of basen en de zoutvormen daarvan zijn vaak chemisch stabiel en farmaceutisch gemakkelijker verwerkbaar door hun kristallijn karakter. Voor de resorptie is tevens hun oplosbaarheid in water van grote betekenis; problemen omtrent biologische beschikbaarheid doen zich het meeste voor bij stoffen met een relatief geringe oplosbaarheid in water (BLAKE 1971).

In het geval van hexobarbital en hexobarbitalnatrium na orale toediening werd reeds een groot verschil in resorptiesnelheid geconstateerd, terwijl hetzelfde geldt na rectale toediening (BREIMER 1973). Bij fenoxymethylpenicilline (penicilline V) is ook de aard van de zoutvorm belangrijk gebleken, het kaliumzout wordt sneller geresorbeerd

dan het minder oplosbare calciumzout (JUNCHER en RAASCHOU 1957). Er werd hier een goede correlatie gevonden met de oplosbaarheid in vitro (WAGNER 1971). Bij o.a. benzylpenicilline (penicilline G) is van zoutvorming gebruik gemaakt door de vrije carboxylgroep te koppelen aan een organische base, waardoor slecht in water oplosbare zouten ontstaan die geschikt zijn als depotpreparaat (benzathinebenzylpenicilline, procainebenzylpenicilline) (WEINSTEIN 1970). Het zal duidelijk zijn dat vrije zuren en basen niet zonder meer door hun zoutvormen vervangbaar zijn en dit geldt omgekeerd uiteraard evenzeer.

Een andere belangrijke chemische vorm van het werkzame bestanddeel is de ester. Vele geneesmiddelen in hun actieve vorm bevatten een of meer vrije hydroxylgroepen, die met een geschikt zuur veresterd kunnen worden. De ester is op te vatten als een soort 'pro-drug'; hij is niet als zodanig werkzaam, maar door hydrolyse van de esterbinding moet de werkzame stof vrijkomen. Hiervoor zorgen de esterases die in grote mate in het lichaam aanwezig zijn. Het werkzame splitsingsproduct is dus te beschouwen als de actieve metaboliet van de ester.

Het doel van estervorming is vaak het bevorderen of afremmen van transport van het actieve bestanddeel. Dit wordt bereikt door een ester te kiezen waarvan de fysisch-chemische eigenschappen afgestemd zijn op de gewenste aard van dat transport. Aan de hand van een aantal voorbeelden zal duidelijk gemaakt worden wat hiermede wordt bedoeld.

De volgende indeling kan worden gemaakt.

1. *Estervormen die de oplosbaarheid in water bevorderen*

Om een stof intraveneus te kunnen toedienen is het noodzakelijk dat hij een redelijke oplosbaarheid in water bezit. Dit kan worden bereikt door weinig oplosbare stoffen, die een vrije hydroxylgroep bezitten, te veresteren met sterk hydrofiele zuren. In de praktijk worden vaak dubbelzuren gebruikt, waarbij naast verestering zoutvorming mogelijk is: hemisuccinaten, fosfaten, sulfaten etc. Een aantal willekeurig gekozen voorbeelden is in figuur 1 weergegeven (Informatorium 1972).

Na toediening vindt in het algemeen snelle hydrolyse van de ester plaats, en zo komt het werkzame bestanddeel langs intraveneuze weg biolo-

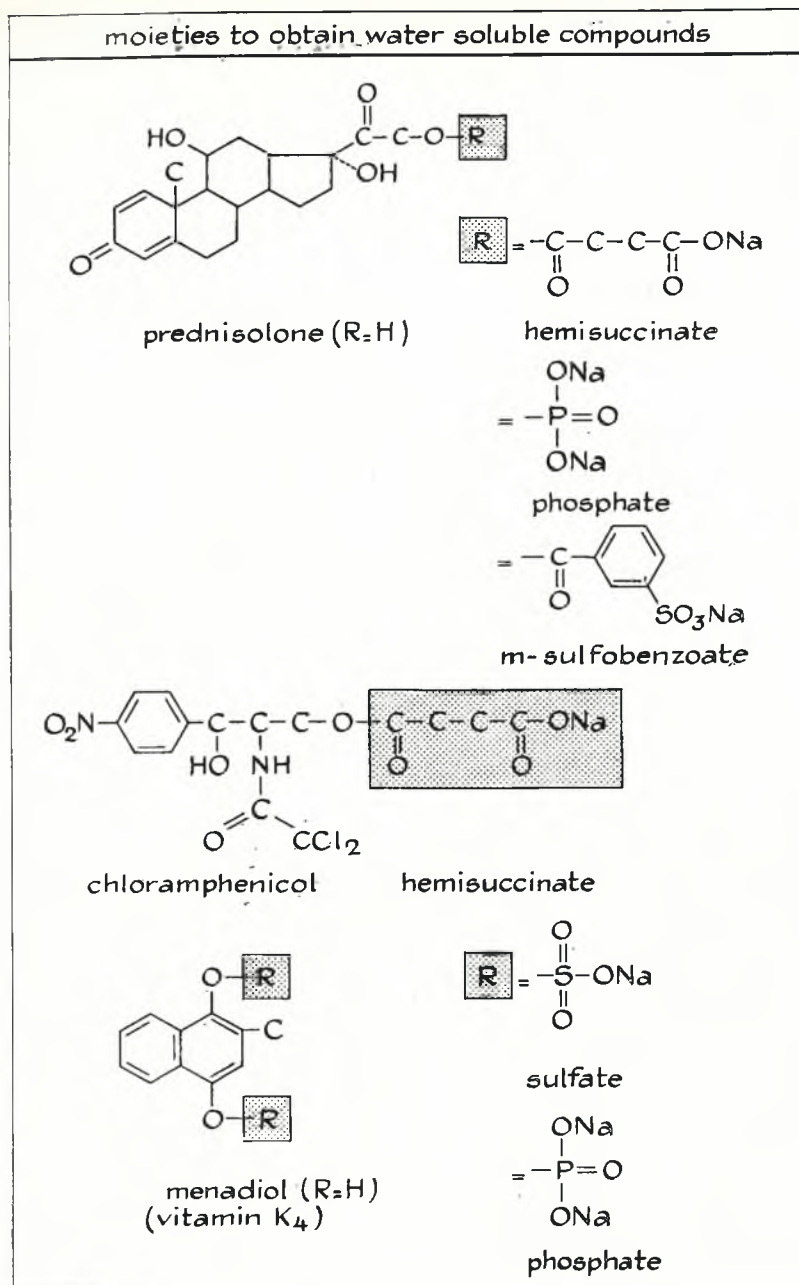


Fig. 1. Introduction of hydrophilic ester groups, with the possibility of salt formation to obtain water soluble compounds. These derivatives are suitable for parenteral administration; in plasma and tissues hydrolysis takes place by the esterases and the active compound is liberated

gisch beschikbaar. Voor intramusculaire injectie is dit principe eveneens belangrijk indien een snel transport van de plaats van injectie naar de circulatie gewenst is.

Een van de moeilijkheden bij het cannabis-onderzoek was tot voor kort het feit dat het belangrijkste werkzame bestanddeel, $\Delta^{1,2}$ -tetrahy-

drocannabinol, moeilijk parenteraal was toe te dienen vanwege de buitengewoon geringe wateroplosbaarheid. Veel onderzoek is gewijd aan farmaceutische kunstgrepen, bijv. bereiding van stabiele emulsies om de stof in een acceptabele injecteerbare vorm te brengen (ROZENKRANTZ e.a. 1972). ZITKO e.a. (1972) hebben recent ook hier-

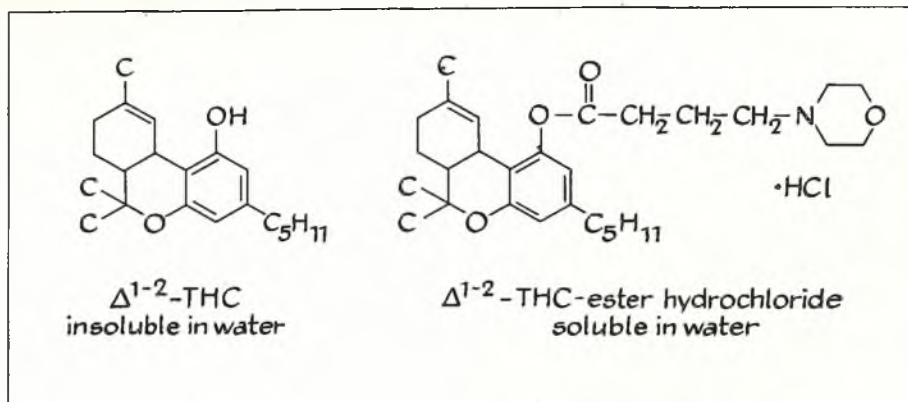


Fig. 2. Δ^{1-2} -Tetrahydrocannabinol (THC), which is resinous and insoluble in water, has been converted to an amine-containing ester. The hydrochloride salt of the ester is soluble in water and this is important for pharmacological studies with THC. In vivo rapid hydrolysis takes place and there is no loss of biological activity (According to ZITKO *et al.* 1972)

voor een estervorm gesynthetiseerd, waarvan het zoutzure zout goed oplosbaar is in water, terwijl in de circulatie snel hydrolyse optreedt (fig. 2).

2. Estervormen die de oplosbaarheid in water verminderen

Door verestering met zuren die een lipofiel karakter bezitten (bijv. vetzuren) is het mogelijk de oplosbaarheid van stoffen te verminderen. Van dit principe wordt gebruik gemaakt bij de steroidhormonen om depotpreparaten te verkrijgen. Deze esters zijn na intramusculaire of subcutane injectie zeer slecht oplosbaar in het spierweefsel en er vindt langzame afgifte van de ester uit het depot naar de circulatie plaats, waarna hydrolyse optreedt. De snelheid waarmee de actieve stof biologisch beschikbaar komt wordt op deze wijze sterk beïnvloed.

Het effect van verschillende testosteronesters na subcutane injectie bij de rat op het gewicht van de zaadblaasjes (fig. 3) neemt toe naarmate de lengte van de vetzuurketen toeneemt (JUNKMANN en WITZEL 1958). Een langzame afgifte uit het depot - bewerkstelligd door verestering met een vetzuur met lange keten - is dus duidelijk van voordeel op de intensiteit van het effect. Ook van vele andere steroidhormonen vinden verschillende esters toepassing (Informatorium 1972).

VAN DER VIES (1970) heeft een fraaie in-vitro-methode ontwikkeld voor het simuleren van de snelheid van afgifte van hormoonesters uit een intramusculair depot. De methode correleert goed met waarnemingen in vivo.

Ook bij de neuroleptica wordt gebruik gemaakt

van verestering, waardoor preparaten met verlengde werking ontstaan, een voorbeeld is het enanthaat van flufenazine (KINGSTONE 1968).

3. Estervormen die de resorptie bevorderen

Voor resorptie van een verbinding uit het maag-darmkanaal is het nodig dat de stof redelijk in water oplosbaar is om intensief contact met de biologische membranen te garanderen. Daarnaast is het voor passieve passage door die lipofiele membranen nodig dat de verbinding een zekere mate van oplosbaarheid in vet bezit; de pKa-waarde van de stof, de pH van het milieu en de lipofiliteit van het niet-geïoniseerde molecuul zijn hiervoor snelheidsbepalende factoren (BRODIE 1964; SCHANKER 1971). Een pharmacoon als zodanig kan dus, afgezien van de fysiologische omstandigheden, door twee oorzaken slecht geresorbeerd worden:

- a. de oplosbaarheid in water (hydrofiliteit) is te gering;
- b. de lipofiliteit is te gering.

Bij stoffen met zuur of basisch karakter is het eerste punt door zoutvorming gemakkelijk te ondervangen. In andere gevallen behoort verestering met een hydrofiele groep tot de mogelijkheden, zo is bijvoorbeeld het hemisuccinaat van griseofulvine gebruikt ter verbetering van de resorptie van deze sterk in water onoplosbare stof. Dit biedt tevens een mogelijkheid voor parenterale toediening.

Het tegenovergestelde is het geval met de goed in water oplosbare erytromycine waarvan verestering met lipofiele carbonzuren heeft plaats-

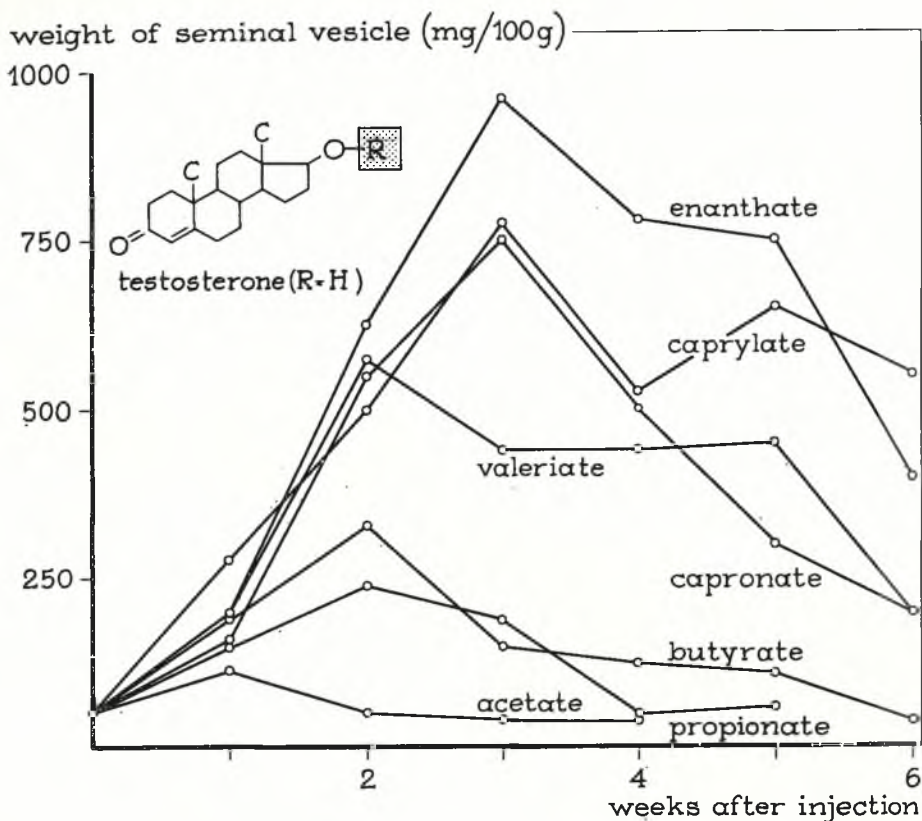


Fig. 3. Introduction of lipophilic ester groups in testosterone to desolubilize the hormone at the injection site. The influence of the esters upon the weight of the seminal vesicle of castrated rats, after a single subcutaneous injection of 20 mg in 0.4 ml of sesame oil, is shown. The increase in effect obtained with the esters of larger fatty acids, with the slower release from the injection site, indicates that the protracted supply with the hormone is favourable for action (According to JUNKMANN and WITZEL 1958)

gevonden (stearaat, estolaat, ethylcarbonaat). Het belangrijkste gevolg hiervan is, dat bij pH van het maagsap geen ontleding optreedt, terwijl dit voor de stof als zodanig wel het geval is. Toeneming in stabiliteit en in lipofiliteit bevordert hier de resorptie (MÜNDEL 1966; WEINSTEIN 1970).

Ampicilline is relatief stabiel ten opzichte van zuur, maar de resorptie is na orale toediening vrij gering. De biologische beschikbaarheid in vergelijking tot parenterale toediening bedraagt slechts 25-30% (KIRBY en KIND 1967; KUNIN 1967). Dit is een gevolg van het dipoolkarakter van de stof (basische en zure groep in één molecuul verenigd): ionisatie is vrijwel bij elke pH het geval. Door verestering van de carboxylgroep wordt dit dipoolkarakter opgeheven. Wanneer dit echter gebeurt met eenvoudige aromatische of alifatische alcoholen ontstaan esters die slechts langzaam in vivo worden gehydrolyseerd. Men heeft recent een aantal acyloxymethylesters van ampicilline

gesynthetiseerd (fig. 4) en deze worden wél snel gesplitst (VON DAEHNE e.a. 1970). Het meest geschikt is de pivaloyloxymethylester gebleken en deze is onlangs o.a. onder de merknaam Pivatil in de handel gebracht. Deze stof wordt goed geresorbeerd en de plasmaspiegels verkregen na orale toediening zijn hoger dan na een equivalente orale dosis van de vrije ampicilline (fig. 4) (FOLTZ e.a. 1970). De biologische beschikbaarheid van ampicilline is in dit geval veel groter dan 25-30%.

De estervorm kan ook geschikt zijn om stoffen beter in de huid te laten penetreren. Als externe antireumatica zijn bijv. esters van salicylzuur en van cinchofeen in gebruik, daarnaast kan nog de toepassing van esters van nicotinezuur als rube-facientia worden genoemd (IPPEN 1968). Ook esters van corticosteroiden worden veel lokaal toegepast, bijv. het hydrocortisonacetaat en -valeraat. Het binnendringen van deze stoffen in de huid geschiedt gemakkelijker naarmate de ester-

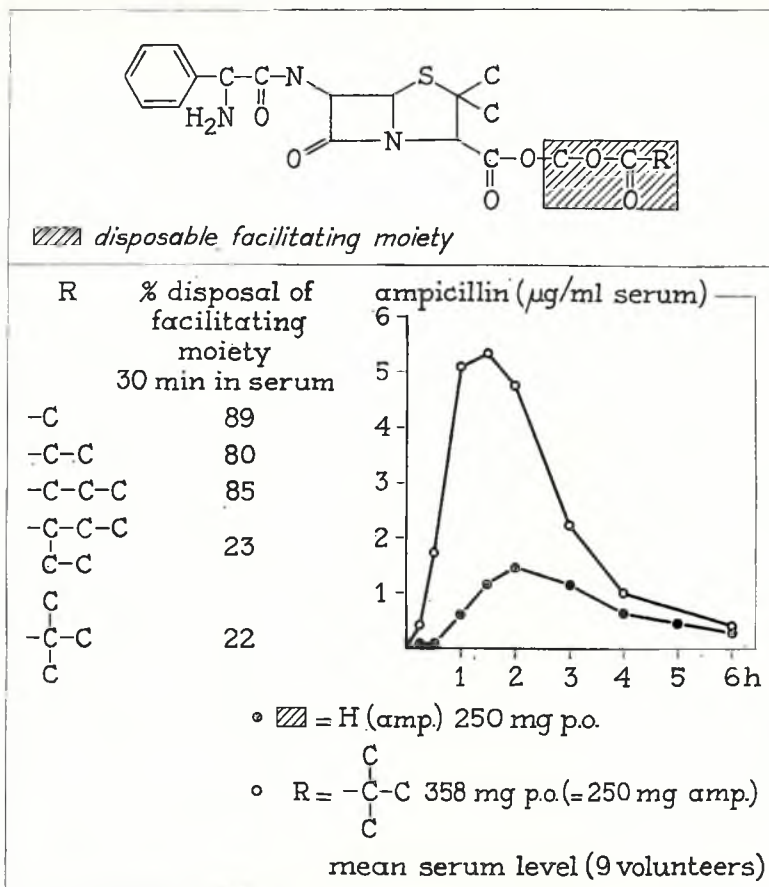


Fig. 4. Introduction of acyloxymethylester groups in ampicillin to facilitate gastrointestinal absorption. In the general circulation rapid hydrolysis takes place and high ampicillin serum levels are obtained. The biological availability of the antibiotic is greatly increased (According to VON DAEHNE *et al.* 1970)

vorming een grotere mate van lipofiliteit tot gevolg heeft (KATZ en SHAIKH 1965). Het is waarschijnlijk dat al deze estervormen in de huid worden gehydrolyseerd en dan pas hun werking uitoefenen.

4. Estervormen die ongewenste neveneffecten maskeren

Dit is een aspect wat losstaat van de eigenlijke biologische beschikbaarheid en resorptiesnelheid, maar volledigheidshalve wordt het hier vermeld. Als voorbeeld kunnen de palmitine- en stearinezure esters van chlooramfenicol worden genoemd, die worden toegepast om de bijzonder bittere smaak van het vrije chlooramfenicol te maskeren. Ditzelfde geldt voor de esters van lincomycine. Een ander voorbeeld is het laxans bisacodyl dat twee estergroepen bevat; in de darm vindt hydrolyse plaats waardoor vrije fenolgroepen ontstaan. Dit hydrolyseprodukt is irriterend en daarop berust de laxerende werking (FERLEMANN en VOGT

1965). Ook het acetylsalicylzuur zou in dit verband genoemd kunnen worden, waarin de fenolische OH-groep is gemaskeerd en waardoor minder maagirritatie optreedt dan bij het vrije salicylzuur. Deze ester is echter niet alleen als transportvorm te beschouwen, maar hij bezit ook zelf waarschijnlijk een analgetische werking (KRANE 1972).

Een interessante ester tot slot is nog die van acetylsalicylzuur met paracetamol, die recent in Engeland in de handel is gebracht onder de naam Benorylate. In vivo komen beide verbindingen bij de esterhydrolyse vrij en de stof is dus te beschouwen als een combinatiepreparaat van twee analgetica. De resorptiesnelheid van de ester is echter geringer dan die van het paracetamol en acetylsalicylzuur indien afzonderlijk toegediend (alle drie in tabletvorm) (ROBERTSON e.a. 1972). Daarom is de ester minder geschikt voor gebruik bij incidentele pijnen, zoals hoofdpijn, kiespijn etc.,

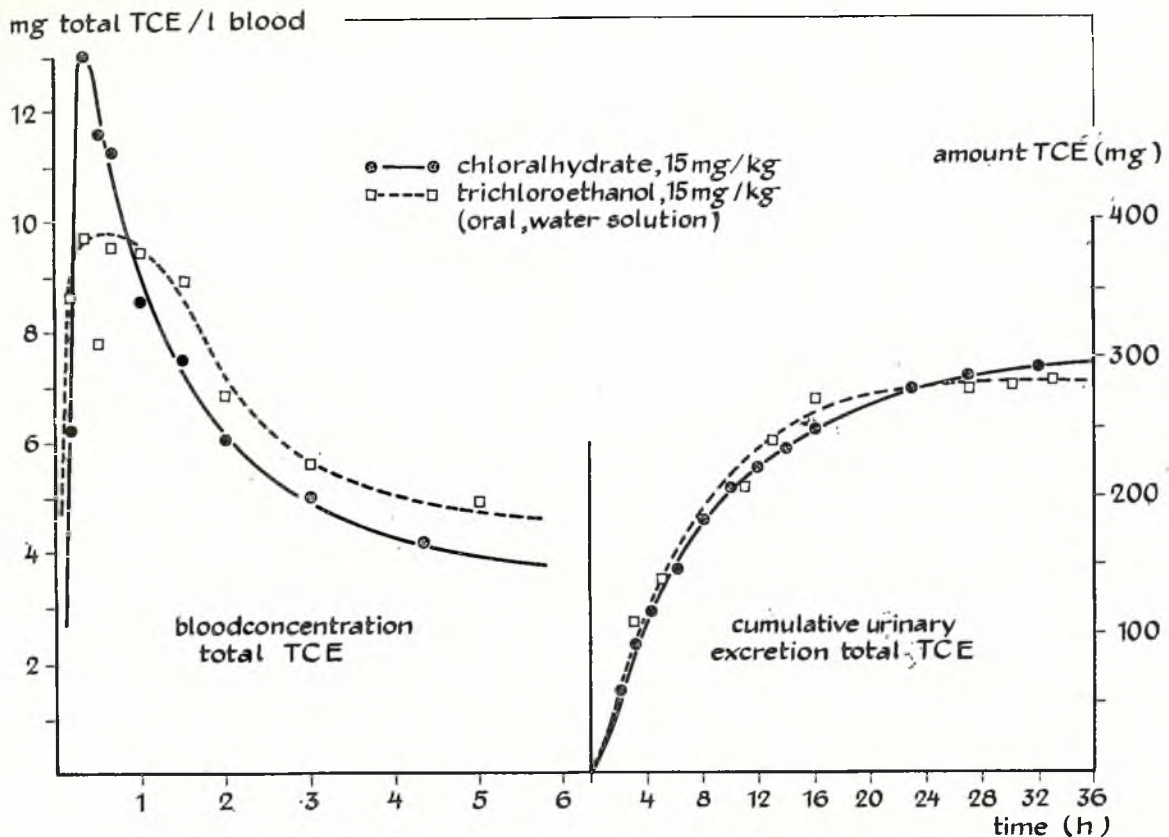


Fig. 5. *Left.* Trichloroethanol (TCE) blood concentration curves, obtained after oral administration of chloralhydrate (CH) and of TCE to two different human subjects of approximately the same body weight. No unchanged CH could be detected, there is an immediate formation of TCE. CH can be considered as a transport form for the active metabolite TCE. (Total TCE means free TCE + TCE as glucuronide).

Right. Cumulative excretion of total TCE in urine. The amounts excreted are in both cases almost equal. The conclusion might be drawn that the biological availability of TCE is the same after administration of TCE and CH. This conclusion, however, is only valid if the percentage of excretion and glucuronidation of TCE in the two subjects has been the same (According to BREIMER and KETELAARS 1972)

wanneer een snel effect wordt beoogd. Daarentegen is het 'sustained release'-karakter van de ester van voordeel bij chronische reumatische aandoeningen, omdat dan gedurende langere tijd een constante spiegel aan werkzame stoffen (paracetamol en salicylzuur) gewenst is. Bovendien hebben CROFT e.a. (1972) vastgesteld dat de ester minder maagirritatie veroorzaakt dan het vrije acetylsalicylzuur. In de eerste plaats is deze estervorming dus van invloed op de snelheid waarmee de werkzame bestanddelen biologisch beschikbaar komen, in de tweede plaats worden door de estervorming ongewenste neveneffecten gemaskeerd.

In alle genoemde gevallen van estervorming is hydrolyse noodzakelijk om het werkzame bestanddeel biologisch beschikbaar te maken. De

estergroep maakt dus geen deel uit van het pharmacoon in zijn actieve vorm. Natuurlijk zijn er geneesmiddelen waarbij dit wel het geval is (atropine, procaine), maar deze kunnen met betrekking tot de hier uiteengezette chemische aspecten van de biologische beschikbaarheid buiten beschouwing worden gelaten.

In principe zouden hier ook de stoffen besproken moeten worden die zelf niet actief zijn, doch actieve metabolieten opleveren (afgezien van de zojuist besproken estervormen waarbij dit als uitgangspunt gold). Als voorbeeld dient het chloralhydraat; reeds 10 minuten na toediening van een oplossing van de stof in water kan geen chloralhydraat in het bloed worden aangetoond en heeft omzetting plaatsgevonden in het actieve reductieproduct, het trichloorethanol (fig. 5). Het

chloralhydraat (kristallijn) is een soort transportvorm voor het trichloorethanol (vloeistof). De biologische beschikbaarheid wordt nu betrokken op deze laatste stof. De cumulatieve uitscheiding in de urine (als glucuronide) is globaal gelijk na toediening van chloralhydraat en van trichloorethanol, waaruit geconcludeerd zou kunnen worden dat de biologische beschikbaarheid in beide gevallen gelijk is. Beide stoffen zijn echter niet aan dezelfde persoon toegediend zodat vergelijking in kwantitatieve zin niet geheel mogelijk is¹.

Bij verschillende geneesmiddelen worden uit de oorspronkelijke, wél werkzame verbindingen in het lichaam één of meer metabolieten gevormd. Deze kunnen onwerkzaam zijn of ook zelf een bepaalde activiteit bezitten, zoals bijv. vaak het geval is na N-desalkylering van N-alkyl-gesubstitueerde pharmaca (imipramine, diazepam, methamfetamine). Deze stoffen gaan in het lichaam hun eigen leven leiden met eigen karakteristieke farmacokinetische parameters, waarbij slechts de vormingssnelheid uit de oorspronkelijke verbinding een afhankelijke parameter is.

Nu kan het onderzoek naar de biologische beschikbaarheid van de toegediende stof ook op basis van metabolietmetingen geschieden, mits het omzettingpercentage van oorspronkelijke stof in metaboliet constant is. Het onderzoek met toedieningsvormen van acetylsalicylzuur wordt vrijwel steeds op grond van salicylzuurmetingen in plasma of urine gedaan, omdat de halfwaardetijd van acetylsalicylzuur slechts 20 minuten bedraagt en van salicylzuur 6 uur (LEVY en SAHLI 1962; LOO en RIEGELMAN 1968). Ook analytisch-chemische overwegingen met betrekking tot de bepalingmethode kunnen in een aantal gevallen van doorslaggevende betekenis zijn om in plaats van de

¹ Bij het farmacokinetisch en biofarmaceutisch onderzoek van chloralhydraat bij de mens bleek het trichloorazijnzuur als belangrijke metaboliet te worden gevormd. Deze stof bereikt reeds zeer kort na toediening van chloralhydraat als oplossing in water een hoge concentratie in het bloed, terwijl de halfwaardetijd 4-5 dagen (!) bedraagt. In een chronisch experiment kon cumulatie tot 100 mg/l worden vastgesteld. De vraag rees of deze ongewenste metaboliet ook in belangrijke mate zou ontstaan indien het trichloorethanol werd toegediend, in plaats van het hoger geoxideerde chloralhydraat. Dit bleek wél het geval te zijn, zij het dat de vormingssnelheid geringer was (BREIMER en KETELAARS 1972).

oorspronkelijke stof een metaboliet in een lichaamsvloeistof te bepalen (VAN ROSSUM e.a. 1971).

Het zal op grond van het voorgaande duidelijk zijn dat de specifiek chemische aspecten van de biologische beschikbaarheid slechts beperkt zijn; zoutvorming en estervorming zijn daarvan de belangrijkste.

CHEMISCHE ASPECTEN VAN DE FARMACOKINETIEK

Aan dit onderwerp heeft ARIËNS (1972) een groot overzichtsartikel gewijd onder de titel: 'Modulation of pharmacokinetics by molecular manipulation'. Het gaat hierbij om de mogelijkheid door chemische veranderingen in een molecuul de farmacokinetische processen waaraan de stof is blootgesteld selectief te beïnvloeden zonder dat de aard van de werking wordt aangetast. Het formele verschil met de chemische aspecten van de biologische beschikbaarheid zit in het feit dat de chemische groepen waar het hier om gaat wél vaak deel uitmaken van het pharmacon in zijn actieve vorm.

De meeste pharmaca bezitten een zekere 'bulk-tolerance' waarmee wordt bedoeld dat er zich groepen in het molecuul bevinden die niet wezenlijk zijn voor de pharmacon-receptorinteractie, maar wel sterk bijv. de fysisch-chemische eigenschappen van het pharmacon mede bepalen en daardoor vaak hun stempel drukken op processen als resorptie en distributie van de stof over de verschillende weefsels of organen. Daarnaast kunnen sommige groepen sterk van invloed zijn op de snelheid waarmee een stof wordt gemetaboliseerd. Binnen een groep pharmaca met gelijke werking zal in het algemeen een bepaalde diversiteit aan farmacokinetische eigenschappen voor de verschillende stoffen bestaan. Dit biedt de mogelijkheid op grond van kinetische overwegingen een bepaalde selectie toe te passen die afgestemd is op het therapeutisch gestelde doel: korte of lange werking, lokale of algemene werking, perifeer of ook centraal etc.

Een beperkt aantal voorbeelden zal worden gegeven van chemische beïnvloeding van de farmacokinetische processen: resorptie, distributie, metabolisme en uitscheiding. Voor de fysisch-chemische grondslagen van deze processen wordt verwezen naar FRESÉN (1972).

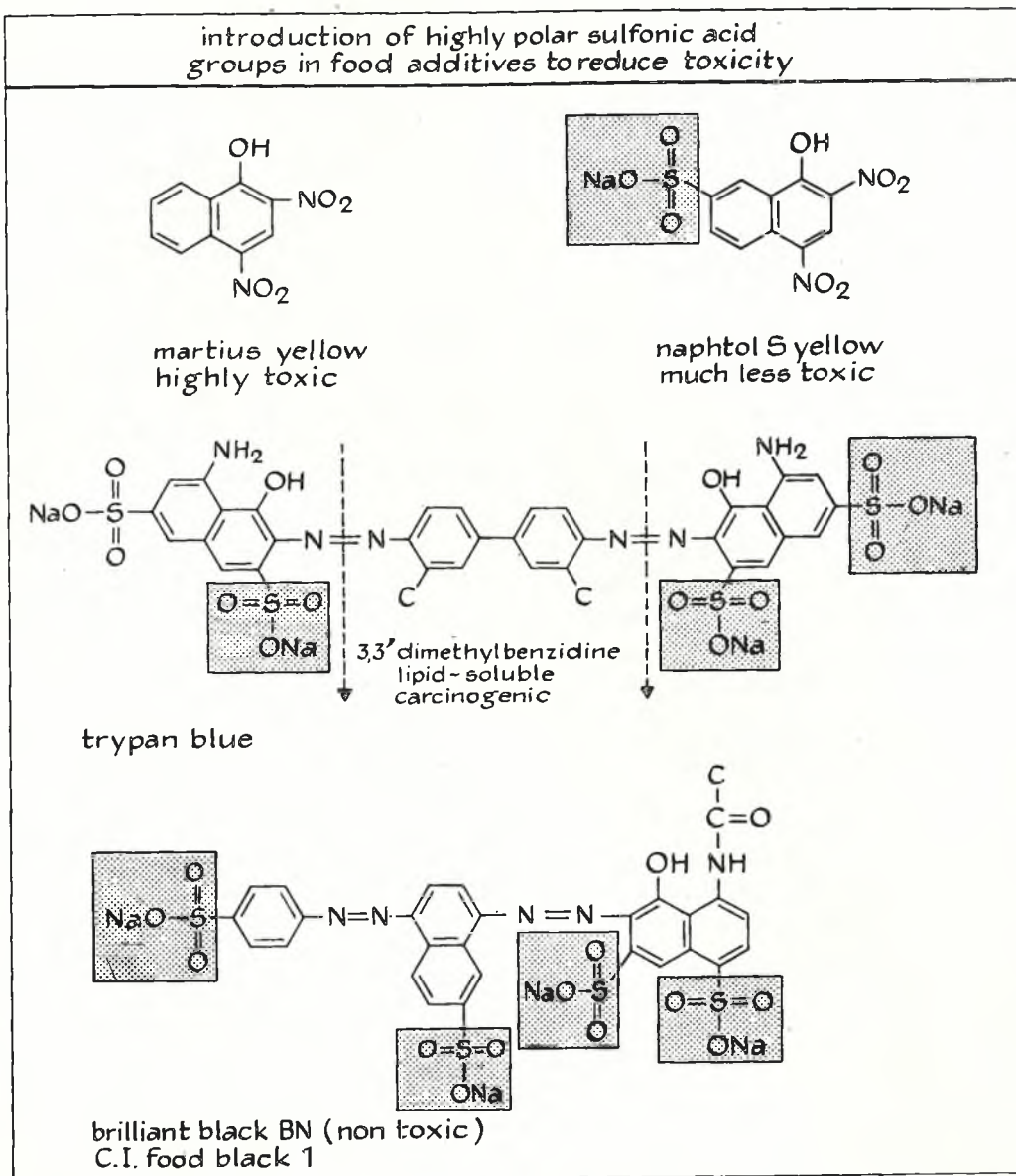


Fig. 6. Introduction of highly polar sulfonate groups in food additives. Absorption as well as distribution is greatly limited and therefore toxicity is reduced. Many dyes contain azo links, which can be split by the intestinal flora. In the case of trypan blue a lipid soluble carcinogenic amine is liberated, which can be rapidly absorbed and penetrate into cells. For this reason all azo dyes used as food colorants bear sulfonate groups in all sections of the molecule, so that hardly any absorption or toxic action of the separate parts can occur. An example is brilliant black

Resorptie

Reeds is gewezen op het feit dat voor de resorptie van een stof uit de maag-darmtractus zowel een zekere mate van hydrofiliiteit als van lipofiliiteit van belang is. Sterk polaire verbindingen worden slecht geresorbeerd en van groepen die dit polaire karakter bevorderen wordt gebruik gemaakt als resorptie niet gewenst is. Dit is bijvoorbeeld het geval met kleurstoffen die aan voedsel worden toegevoegd. Deze mogen niet toxisch zijn en dit

kan worden bereikt door introductie van de sterk zure sulfonzuurgroep, waardoor de resorptie beperkt blijft (REITH 1960) (fig. 6, boven). Bovendien zal de geringe fractie die wel geresorbeerd wordt, door het polaire karakter van de stof snel in de urine worden uitgescheiden. De distributie blijft beperkt tot de extracellulaire vloeistof en er treedt geen penetratie in de cellen op. Nu zijn vele van de in gebruik zijnde kleurstoffen azo-verbindingen, die onder invloed van de darmflora worden ge-

splijst. In sommige gevallen komen daarbij toxische aminen vrij die wel geresorbeerd worden, zoals bij trypanblauw (fig. 6, midden). De aanwezigheid van sulfonzuurgroepen in een kleurstof is dus nog geen garantie voor het niet toxisch zijn. Voorwaarde is dat zich in alle afsplitsbare delen van het molecuul sulfonzuurgroepen bevinden, zodat geen resorptie kan optreden van de afzonderlijke delen. Dit is dan ook in feite het geval met vrijwel alle kleurstoffen die zijn toegestaan (Food Agr. Organ. UN 1963). Het briljantzwart in figuur 6 (onder) is hiervan een voorbeeld.

Indien de farmacologische werking van een stof is gericht op een aandoening in het maag-darmkanaal, dan is het uiteraard niet de bedoeling dat door resorptie een snelle afvoer van het pharmacum uit dat werkingsgebied plaatsvindt. Het ligt daarom voor de hand dat ter bestrijding van darminfecties bijv. sulfonamiden worden gekozen die gekoppeld zijn aan sterk polaire groepen (fig.

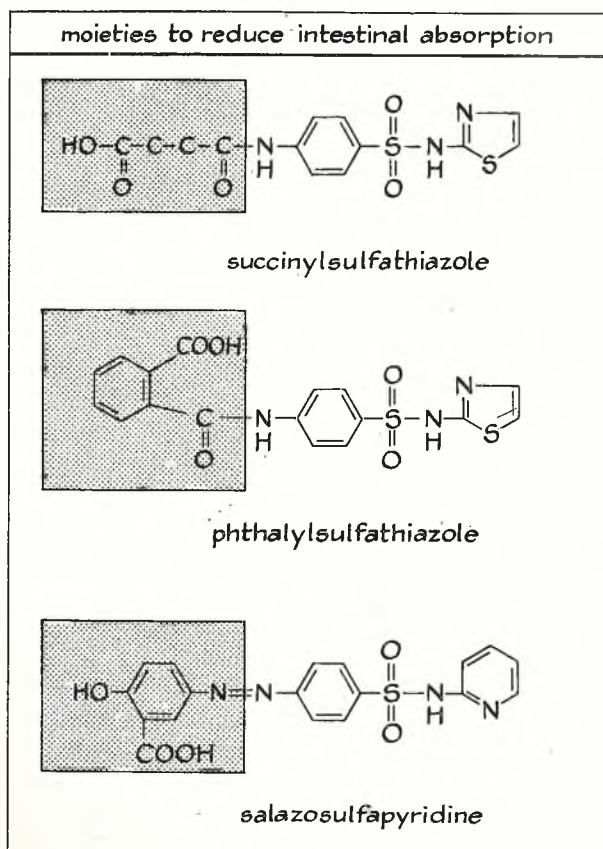


Fig. 7. Introduction of hydrophilic groups in sulfonamides, to reduce absorption from the gut. The amide link is slowly hydrolyzed and there is a gradual liberation of active compound in the intestinal tract. This is favourable for the treatment of certain bacterial infections of the bowel

7). Onder invloed van de darmflora vindt langzame splitsing van de amide- of azobinding plaats, waardoor het vrije sulfonamide beschikbaar komt voor antibacteriële activiteit. Door de aanwezigheid van geioniseerde groepen in het molecuul wordt snelle resorptie voorkomen en het gevolg is dat gedurende langere tijd actief bestanddeel in de darm vrijkomt.

Zeer recent is het gebruik van de darmdesinfec-tantia aan beperkende maatregelen onderworpen op grond van aangetoonde neurotoxische verschijnselen van clioquinol (KEWITZ en SCHULZ 1972; PANNEKOEK 1972). Dat bepaalde stoffen uit deze groep geresorbeerd worden en ook in het centrale zenuwstelsel doordringen is op grond van hun chemische structuur en fysisch-chemische eigenschappen te verwachten (fig. 8). Vanwege die toxiciteit en het feit dat ze hun werking in de

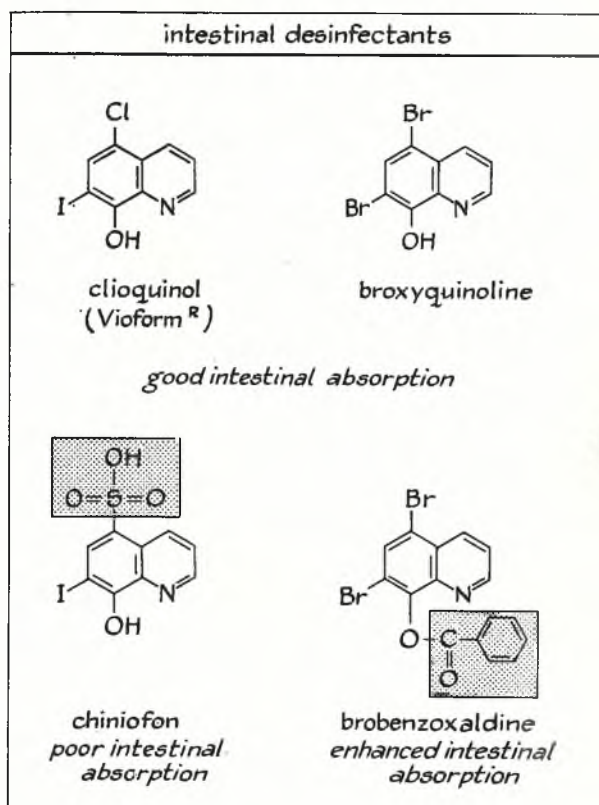


Fig. 8. Recently restrictions have been put on the use of intestinal disinfectants, because of reported neurotoxic action of clioquinol. This compound and broxyquinoline are well absorbed from the gastrointestinal tract, which is unfavourable for their intended action. Replacement of the chlorine atom in clioquinol by a sulfonate group strongly reduces absorption (chiniofon). The introduction of a lipophilic ester group in broxyquinoline even facilitates absorption (brobenzoxaldine)

darm zelf moeten uitoefenen is het zeer ongewenst dat resorptie plaatsvindt. Dit kan weer voorkomen worden door het invoeren van een sulfonzuurgroep zoals bij chiniofon is gebeurd. Bij brobenzoxaldine is de resorptie nog verbeterd in vergelijking tot de structuuranalogue broxyquinoline door de invoering van een estergroep met sterk lipofiel karakter. Gelet op het therapeutische doel van deze stoffen moet dit als niet zinvol worden beschouwd. Afgezien van de vraag of bij een darminfectie (diarree) het gebruik van dit type stoffen gewenst is, lijkt het in ieder geval meer rationeel een verbinding toe te passen die weinig wordt geresorbeerd.

Hetzelfde geldt voor anticholinergica (parasympatholytica) die hun werking in of op de maag-darmtractus moeten uitoefenen. Zo worden bijvoorbeeld de afgeleiden van atropine en scopolamine die een kwaternaire stikstof bezitten – methyلاتropine en butylscopolamine – slechts in geringe mate geresorbeerd (BEERMANN e.a. 1972). Het omgekeerde, namelijk het bevorderen van de resorptie, kan worden bereikt door invoering van lipofiele groepen in een polair molecuul. Ester-vorming kan daartoe geschikt zijn, zoals in het voorbeeld van ampicilline (fig. 4) is getoond.

Distributie

Bij de verdeling van een pharmacoon over de verschillende organen en weefsels in het lichaam, spelen twee eigenschappen van de stof een belangrijke rol, namelijk pKa-waarde en lipofiliteit. De pKa-waarde van een stof bepaalt bij pH 7,4 (plasma) voor welk deel de stof is geïoniseerd. Alleen het ongedissocieerde deel (en daarvan de niet-eiwitgebonden fractie) kan de membranen passeren en wel beter naarmate de lipofiliteit groter is. Van groepen die aan een molecuul een sterk zuur karakter geven (sulfonzuurgroep) of een sterk basisch karakter (kwaternaire ammoniumgroep) wordt gebruik gemaakt indien penetratie in weefsels en cellen niet gewenst is. Hun pKa-waarde verschilt zo sterk van de fysiologische pH dat zij vrijwel voor 100% gedissocieerd zijn. De invloed hiervan is reeds voldoende duidelijk geworden bij de resorptie, waar dezelfde principes van toepassing zijn. Bij parenterale toediening van een kwaternaire ammoniumverbinding blijkt deze niet in staat de bloed-hersenbarrière te passeren. In figuur 9 is de distributie van twee antihistamini-

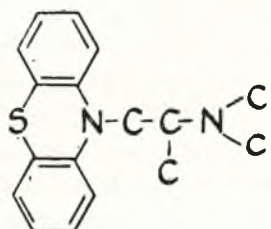
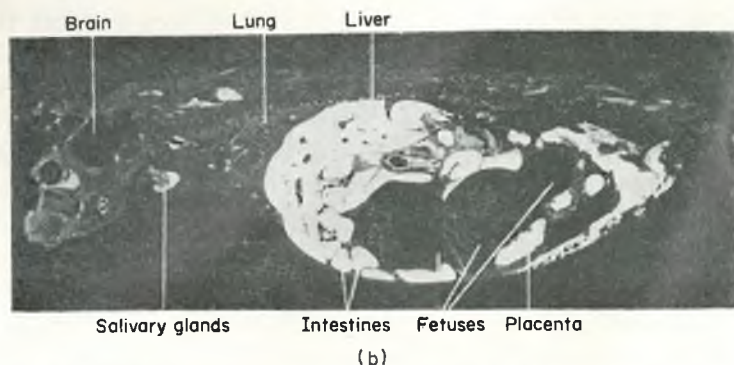
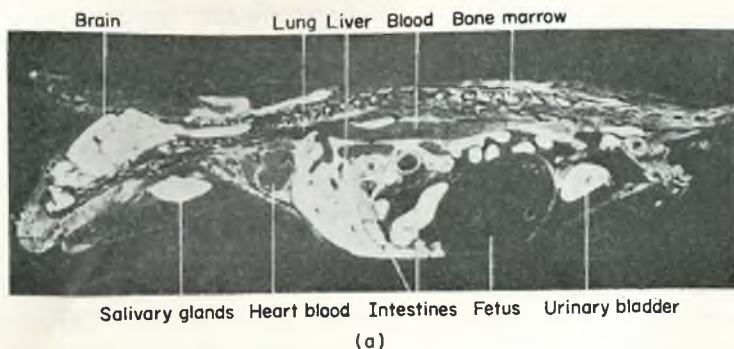
ca, promethazine (tertiaire stikstof) en Aprobit (kwaternaire stikstof) met elkaar vergeleken, na intramusculaire toediening van met ³⁵S radioactief gemerkte stoffen aan muizen (HANSSON en SCHMITERLÖW 1967). De verdeling van de kwaternaire ammoniumverbinding blijft voornamelijk beperkt tot de lever en darmen. Daarentegen is de verdeling van promethazine veel uitgebreider, waarbij vooral ook in de hersenen hoge concentraties worden bereikt. Dit verklaart de sterk sedatieve eigenschappen van deze stof, het is zelfs zo dat tegenwoordig de belangrijkste toepassing van de stof is gericht op dit effect. Bij de anticholinergica doet zich hetzelfde verschijnsel voor. Zo vertoont atropine duidelijk centrale effecten, terwijl methyلاتropine daar vrij van is.

Na intraveneuze injectie van de sterk lipofiele thiobarbituraten treedt onmiddellijk effect op, terwijl dit bij hun zuurstof-analogen enige tijd duurt (MARK e.a. 1958). Er is een duidelijke correlatie tussen de snelheid waarmee deze stoffen de bloed-hersenbarrière passeren en hun lipofiliteit. Bovendien duurt het anesthetisch effect van de sterk lipofiele barbituraten slechts kort vanwege de snel verlopende redistributie over de andere weefsels, waardoor de hersenconcentratie weer snel daalt (PRICE e.a. 1960).

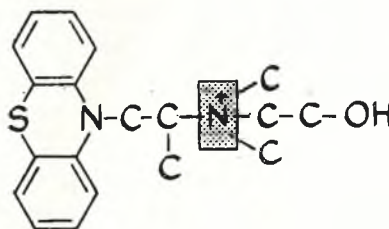
In het algemeen kan worden gesteld dat chemische groepen die in sterke mate de fysisch-chemische eigenschappen van een molecuul als geheel bepalen (hydrofiel-lipofielbalans en pKa), van grote betekenis zijn voor het distributiepatroon van de stof in het lichaam. Een zeer belangrijke factor die daar nog bij komt is de binding aan plasma-eiwitten. Deze binding kan zeer aanzienlijk zijn en alleen de niet-gebonden fractie kan vrij diffunderen. De betekenis hiervan voor de distributie van een stof in het lichaam en ook voor de eliminatie, is samengevat door KEEN (1971).

Metabolisme

De snelheid waarmee een pharmacoon wordt gemetaboliseerd is in die gevallen waarin de uitscheiding als onveranderde stof in urine of faeces van geringe betekenis is, in het algemeen bepalend voor de werkingsduur. Binnen een bepaalde klasse van pharmacona met gelijke werking bevinden zich meestal vertegenwoordigers met korte en lange verblijfsduur in het lichaam. De halfwaardetijd is daarvoor een maat. De aanwezigheid in een mole-



promethazine
strongly sedative



Aprobit
no CNS effects

Fig. 9. Distribution pattern of two antihistaminic agents, promethazine (a) and Aprobit (b), in mice after intramuscular administration of the ³⁵S labelled compounds. There is a high concentration of promethazine in the brain and other tissues, while the distribution of the quaternary amine is restricted mainly to the liver and the intestines. This explains that Aprobit has no CNS effects, while promethazine has sedative properties
(According to HANSSON and SCHMITERLÖW 1967)

kuul van meer of minder metabool kwetsbare groepen is voor zijn omzettingssnelheid van doorslaggevende betekenis. Reeds is gewezen op de metabool weinig stabiele estergroep en een bekend voorbeeld waarbij de introductie hiervan leidt tot een verkorting van de werkingsduur, is het spierrelaxans suxamethonium (succinylcholine) (fig. 10). De ester wordt snel gehydrolyseerd tot succinylmonocholine, terwijl deze afbraakmogelijkheid niet aanwezig is bij de oorspronkelijke verbinding, het decamethonium. Therapeutisch is de zeer

korte werking van een spierrelaxans een groot voordeel (KOELLE 1970). Bij sommige mensen is de halfwaardetijd van suxamethonium veel langer en dit berust in een aantal gevallen op het voorkomen van een abnormaal plasmacholinesterase, dat minder goed in staat is de stof te hydrolyseren. Dit heeft waarschijnlijk een erfelijke factor als oorzaak (KALOW 1962; VESELL 1972).

Een van de eerste orale antidiabetica was het tolbutamide, een stof met een gemiddelde halfwaardetijd van 5,7 uur. Dit is betrekkelijk kort

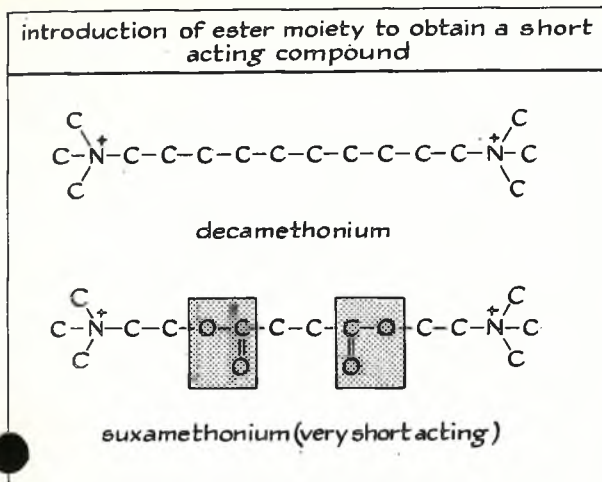


Fig. 10. The presence of ester groups in suxamethonium results in a rapid bioinactivation by plasma esterases. The compound is very short acting in comparison to decamethonium

voor een stof die chronisch moet worden toegediend. Door vervanging echter van de methylgroep aan de aromatische kern door een chlooratoom bleek de halfwaardetijd verlengd te worden tot gemiddeld 33 uur (MCMAHON 1964). Dus substitutie van een metabool kwetsbare groep (oxidatieve afbraak) door een metabool stabiele groep leidt tot een stof met veel langere werking (fig. 11). Een ander voorbeeld in deze groep verbindingen is het acetohexamide, waarbij oxidatie van de acetylgroep bepalend is voor de korte halfwaardetijd. Daarentegen zorgt de aromatische aminogroep in carbutamide voor een goede bescherming tegen snelle afbraak.

Bij lokale anaesthetica is het de bedoeling dat de werking beperkt blijft tot de plaats van toediening. Zodra resorptie naar de algemene circulatie plaatsvindt, moeten ze hun werking verliezen

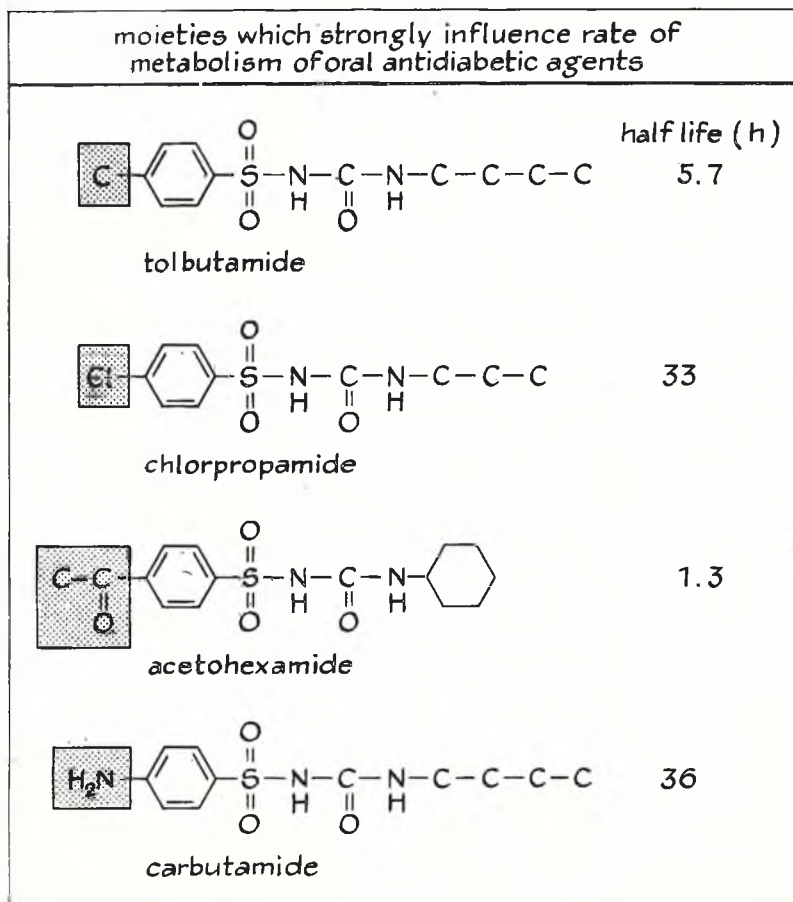


Fig. 11. The presence of certain chemical moieties in oral antidiabetic agents strongly influences their rate of metabolism. Replacement of the methyl group in tolbutamide by the metabolically stable chlorine results in a much longer half life (chlorpropamide)

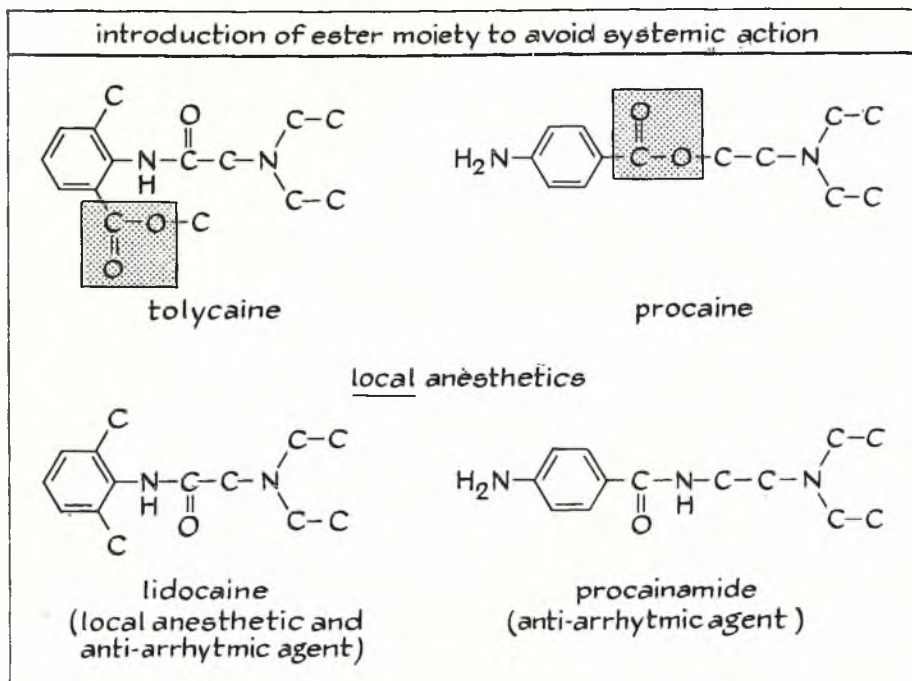


Fig. 12. The presence of ester groups in local anaesthetic agents results in rapid bioinactivation when the general circulation is reached. Their action is restricted to the application site and systemic action is avoided. The amide-link in lidocaine and procaine amide is metabolically more stable and this makes these compounds suitable for systemic action as anti-arrhythmic agents

om ongewenste neveneffecten te voorkomen. Dit is in sommige gevallen bewerkstelligd door het invoeren van estergroepen, die zodra ze de circulatie bereiken door de plasma-esterases worden gehydrolyseerd. Voorbeelden zijn de esters van para-aminobenzoëzuur (procaine, tetracaine) en tolycaïne (fig. 12). Stoffen met een grote structuurverwantschap, maar met een amide- in plaats van een estergroep (procainamide en lidocaine) zijn metabool veel stabiel en kunnen daardoor systemisch toegepast worden als antiarrhythmicum. Eveneens wordt van sommige lokale anaesthetica met amidebinding gebruik gemaakt in de anesthesie vanwege hun langdurige werking. Bupivacaïne is hiervan een voorbeeld (NOLTE en MEYER 1971).

De kwestie van afbreekbaarheid van stoffen speelt ook een belangrijke rol bij de actuele milieu-problematiek. Het feit dat sommige stoffen niet of slechts zeer langzaam worden afgebroken (bijv. pesticiden) leidt tot accumulatie en verstoort ten slotte het natuurlijk evenwicht. Er wordt dan ook algemeen naar gestreefd de afbreekbaarheid van stoffen die in het milieu 'geloosd' worden te vergroten door het invoeren van metabool kwetsbare groepen, waarbij dezelfde principes gelden als bij

genesmiddelen. Een interessant voorbeeld hiervan wordt gevonden bij de detergentia, meest gesulfoneerde alkyl- of arylalkylderivaten. Die met vertakte ketens zijn resistent tegen de afbraak door micro-organismen die normaal in het water voorkomen, terwijl die met rechte ketens snel oxidatief worden afgebroken (fig. 13) (HUYSER 1960). De eerste groep kan tot ernstige vervuiling van het oppervlaktewater aanleiding geven (harde detergentia), terwijl de tweede groep dat niet doet (zachte detergentia).

Bij pesticiden kan een bepaalde selectiviteit in metabole omzetting voor verschillende species erg belangrijk zijn. Stoffen die in de te bestrijden insectensoort niet of slechts langzaam door metabole afbraak onwerkzaam worden gemaakt – terwijl dit juist bij zoogdieren en de mens wel snel gebeurt – verdienen uiteraard de voorkeur boven stoffen, waarbij deze selectiviteit niet optreedt. Het bekendste voorbeeld hiervan is het malathion dat in insecten snel gebioactiveerd wordt tot mala-oxon, terwijl bij de mens en zoogdieren naast deze bioactivering snelle esterhydrolyse plaatsvindt, waardoor de toxiciteit slechts gering is (O'BRIEN 1965).

HARD DETERGENTS		SOFT DETERGENTS			
	residue left %	after days	residue left %	after days	
$\begin{array}{c} \text{C} \\ \\ \text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{SO}_4\text{Na} \\ \quad \\ \text{C} \quad \text{C} \end{array}$	100	18	$\text{C}-(-\text{C}-)_n-\text{SO}_4\text{Na}$	0	1-3
$\begin{array}{c} \text{C} \\ \\ \text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{SO}_4\text{Na} \\ \quad \\ \text{C} \quad \text{C} \end{array}$	100	18	$\text{C}-(-\text{C}-)_n-\text{SO}_3\text{Na}$	0	3
$\begin{array}{c} \text{C} \\ \\ \text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{SO}_3\text{Na} \\ \quad \quad \quad \\ \text{C} \quad \text{C} \quad \text{C} \quad \text{C} \end{array}$	97	28	$\text{C}-(-\text{C}-)_n-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3\text{Na}$	0	4
$\begin{array}{c} \text{C} \\ \\ \text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{SO}_3\text{Na} \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{C} \quad \text{C} \quad \text{C} \quad \text{C} \quad \text{C} \end{array}$			$\text{C}-(-\text{C}-)_n-\text{C}(\text{C})_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3\text{Na}$	0	5-11

storage test in river water 20°C, dark, open bottles

Fig. 13. The presence of branched alkyl chains in detergents results in resistance to biodegradation (hard detergents). When only straight alkyl chains are present rapid biodegradation takes place and persistent pollution is avoided (soft detergents). (According to HUYSER 1960)

Voor het metabolisme van chemische verbindingen in het lichaam of biodegradatie in het milieu zijn bepaalde chemische groepen, of hun rangschikking, bepalend voor de aard van de omzetting en de snelheid waarmee die plaatsvindt.

Dit proces is onafhankelijk van het specifieke biologische effect van de verbindingen, maar kan in grote mate de duur daarvan bepalen. Evenals structuur-werkingsrelaties zijn opgesteld ten aanzien van een farmacologisch effect, zal het ook mogelijk blijken deze relaties te leggen tussen structuur, fysisch-chemische eigenschappen en metabolisme. HANSCH (1972) heeft daartoe een eerste poging ondernomen, waarbij vooral op de lipofiliteit is gelet.

Uitscheiding

Naast het metabolisme is de uitscheiding in urine of faeces het belangrijkste eliminatieproces voor een geneesmiddel. Vele polaire verbindingen worden na ultrafiltratie in de nieren niet of weinig teruggeresorbeerd en voor een groot deel onveranderd in de urine uitgescheiden. Meer lipofiele stoffen worden eerst vaak door metabolisme in

de lever omgezet in meer polaire omzettingsproducten (bijv. hydroxylering gevolgd door glucuronidering) en deze worden in de urine uitgescheiden. In de gal worden vele stoffen uitgescheiden die relatief een vrij hoog molekulgewicht bezitten (carbonzuur, sulfonzuur, kwaternaire ammonium, glucuronzuur) (SMITH 1971). Hoogstwaarschijnlijk spelen hierbij specifieke transportprocessen in de lever een rol, waarbij toch ook lipofiliteit een belangrijke factor is. Van een selectiviteit in uitscheiding wordt gebruik gemaakt bij de röntgencontrastmiddelen. Voor het zichtbaar maken van bepaalde organen is het noodzakelijk dat de stof zich daar selectief ophoopt. Zo zijn sterk polaire joodbevattende verbindingen geschikt als urineweg-contrastmiddelen, terwijl meer lipofiele verbindingen naar de gal worden getransporteerd. Door wijziging in de hydrofiel-lipofiel-balans binnen een molecuul is het mogelijk de uitscheiding selectief te beïnvloeden, zoals in figuur 14 voor diodon wordt aangetoond (ARCHER e.a. 1951). Naarmate de lipofiliteit van het molecuul door verlenging van de alkylketen toeneemt, vindt een overgang plaats van excretie in de urine

excretion in urine or bile of X-ray contrast media		
diodone (R=H) derivatives		
R	urine	bile
- H	+++	-
- C	+++	-
- C-C	++	+
- C-C-C	+	++
- C-C-C-C	-	+++
- C-C-C-C-C	-	+++

Fig. 14. Introduction of alkyl chains in diiodone results in less hydrophilic compounds. With an increase of the size of the substituent R, the excretion shifts from the urine to the bile (According to ARCHER *et al.* 1951)

naar die in de gal. Bij stoffen met zuur of basisch karakter zijn voor de uitscheiding via de nieren de mate van ionisatie en de lipofiliteit van het ongedissocieerde molecuul belangrijke factoren. Uit het ultrafiltraat zullen de niet-geïoniseerde molekulen worden teruggeresorbeerd en wel beter naarmate hun lipofiliteit groter is. De mate van ionisatie wordt bepaald door de pKa-waarde van de stof en de pH van het ultrafiltraat (urine). Een zwak basische verbinding zal bij zure urine (pH 5) voor het overgrote deel gedissocieerd zijn en in de urine terecht komen. Echter bij een pH van 7-8 zal het merendeel ongedissocieerd zijn en worden teruggeresorbeerd, waardoor de stof veel langer in het lichaam verblijft. Een en ander is uitvoerig bestudeerd aan amfetamineachtige verbindingen (BECKETT e.a. 1969; VREE 1973). Chemisch van invloed zijn in dit verband dus vooral die groepen die in sterke mate de pKa-waarde van een molecuul bepalen. Daarnaast zal het duidelijk zijn dat ook bij de uitscheiding de hydrofiel-lipofielbalans van belang is.

CONCLUSIE

De chemische aspecten van de biologische beschikbaarheid zijn niet principieel verschillend van die van de farmacokinetiek in het algemeen. Het gaat om de chemische beïnvloeding van de hoeveelheid van het actief bestanddeel dat in de circu-

latie komt en de snelheid waarmee dit gebeurt. Dit betekent dat het resorptieproces het belangrijkste doel is van de chemische voorbehandeling.

Onder de farmacokinetiek vallen behalve de resorptie nog de distributie, het metabolisme en de uitscheiding van een pharmacon. Bij de behandeling van elk van deze processen is niet gestreefd naar volledigheid, maar is slechts een aantal voorbeelden gekozen welke illustratief zijn voor de chemische beïnvloeding van het desbetreffende proces. Algemeen kan worden gesteld dat bij alle kinetische processen de hydrofiel-lipofielbalans van een molecuul van grote betekenis is, alsmede bij zuren en basen de pKa-waarde. Chemische groepen die op één of beide van deze factoren invloed hebben zijn dan ook in dit verband het belangrijkste. Bij het metabolisme spelen daarnaast nog meer specifieke chemische groepen een rol.

Het onderwerp betreft een boeiende symbiose tussen farmacochemie en farmacokinetiek die kan leiden, en in het verleden al heeft geleid, tot rationalisatie en optimalisering van de farmacotherapie.

DANKBETUIGING

Voor de waardevolle discussies over dit onderwerp gevoerd met Prof. Dr. E. J. ARIËNS, Farmacologisch Laboratorium te Nijmegen en Prof. Dr.

J. S. FABER, Laboratorium voor Farmaceutische en Analytische Chemie te Groningen, ben ik zeer erkentelijk.

Dit artikel, alsmede deel I, is tot stand gekomen met steun van de Stichting voor Zuiver Wetenschappelijk Onderzoek te 's-Gravenhage.

LITERATUUR

- ARCHER, S., J. O. HOPPE, T. R. LEWIS en M. N. HASKELL (1951) *J. Pharm. Sci.* 40, 143.
- ARIËNS, E. J. (1969) *Pure Appl. Chem.* 19, 187; (1972) *Drug Design*, Vol. II, Chapter I. Academic Press, New York.
- BECKETT, A. H., J. A. SALMON en M. MITCHARD (1969) *J. Pharm. Pharmacol.* 21, 251.
- BEERMANN, B., K. HELLSTRÖM en A. ROSÈN (1972) *European J. Clin. Pharmacol.* 5, 87.
- BLAKE, M. I. (1971) *J. Am. Pharm. Assoc. NS* 11, 603.
- BREIMER, D. D. (1973) *Pharm. Weekblad* 108, 309.
- BREIMER, D. D. en H. C. J. KETELAARS (1972) Unpublished results.
- BRODIE, B. B. (1964) Physicochemical factors in drug absorption. In: *Absorption and distribution of drugs*, p. 16. T. B. BINNS, ed. E. S. Livingstone, Edinburgh.
- CROFT, D. N., J. H. P. CUDDIGAN en C. SWEETLAND (1972) *Brit. Med. J.* 2, 545.
- DAEHNE, W. VON, E. FREDERIKSEN, E. GUNDERSEN, F. LUND, P. MORCH, H. J. PETERSEN, K. ROHOLT, L. TYBRING en W. O. GODTFREDSSEN (1970) *J. Med. Chem.* 13, 607.
- FERLEMANN, G. en W. VOGT (1965) *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.* 250, 479.
- FOLTZ, E. L., J. W. WEST, I. H. BRESLOW en H. WALICK (1970) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 10, 442.
- Food Agr. Organ. UN (1963) *Specifications for identity and purity of food additives*, Vol. II (Food Colours FAO), Rome.
- FRESEN, J. A. (1972) Voordracht KNMP-congres, 10 oktober 1972 over 'De fysisch-chemische aspecten van de biologische beschikbaarheid van het geneesmiddel'.
- HANSCH, C. (1972) *Drug Metab. Revs.* 1, 1.
- HANSSON, E. en C. G. SCHMITERLÖW (1967) *Arch. Intern. Pharmacodyn.* 131, 309.
- HUYSER, H. W. (1960) *Original lectures 3rd Intern. Congr. of Surface Activity*, Vol. III, Section C., p. 295, Keulen.
- Informatorium Medicamentorum* (1972) KNMP, 's-Gravenhage.
- IPPEN, H. (1968) *Index Pharmacorum*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- JUNCHER, H. en F. RAASCHOU (1957) *Antibiot. Med. Clin. Therapy* 4, 497.
- JUNKMANN, K. en H. WITZEL (1958) *Z. Vitamin-, Hormon-, Fermentforsch.* 9, 227.
- KALOW, W. (1962) *Pharmacogenetics: heredity and the response to drugs*. W. B. Saunders, Philadelphia.
- KATZ, M. en Z. I. SHAIKH (1965) *J. Pharm. Sci.* 54, 591.
- KEEN, P. (1971) In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. XXVIII. *Concepts in Biochemical Pharmacology*, Part I, Chapter 10, ed. by B. B. BRODIE en J. R. GILLETTE, in cooperation with H. S. ACKERMAN. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- KINGSTONE, E. (1968) *Intern. J. Clin. Pharmacol.* 1, 413.
- KIRBY, W. M. M. en C. KIND (1967) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 145, 291.
- KOBLE, G. B. (1970) In: *The Pharmacological basis of Therapeutics*, 4th ed., Chapter 28. L. S. GOODMAN en A. GILMAN, eds. MacMillan, New York.
- KRANE, S. M. (1972) *Brit. Med. J.* 286, 317.
- KUNIN, C. M. (1967) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 145, 282.
- LEVY, G. en B. A. SAHLI (1962) *J. Pharm. Sci.* 51, 58.
- LOO, J. C. K. en S. RIEGELMAN (1968) *J. Pharm. Sci.* 57, 18.
- MARK, L. C., J. J. BURNS, L. BRAND, C. I. CAMPOMANES, N. TROUSOF, E. M. PAPPER en B. B. BRODIE (1958) *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 123, 70.
- MCMAHON, F. G. (1964) *Advan. Chem. Ser.* 45, 102.
- MÜNZEL, K. (1966) *Progr. Drug Res.* 10, 206.
- NOLTE, H. en J. MEYER Eds. (1971) *Regionale Anästhesie mit dem Langzeitanästhetikum Bupivacain*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- O'BRIEN, R. D. (1965) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 123, 156.
- PANNEKOEK, J. H. (1972) *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 116, 1611.
- PRICE, H. L., P. J. KOVNAT, J. N. SAFER, E. H. CONNER en M. L. PRICE (1960) *Clin. Pharmacol. Therap.* 1, 16.
- REITH, J. F. (1960) *Kleur van levensmiddelen*, blz. 15. D.B. Centen's Uitg. Mij., Hilversum, Nederland.
- ROBERTSON, A., J. P. GLYNN en A. K. WATSON (1972) *Xenobiotica* 2, 339.
- ROSENKRANTZ, H., G. R. THOMPSON en M. C. BRAUDE (1972) *J. Pharm. Sci.* 61, 1106.
- ROSSUM, J. M. VAN, D. D. BREIMER, C. A. M. VAN GINNEKEN, J. M. G. VAN KORDELAAR en T. B. VREE (1971) *Clin. Chim. Acta* 34, 311.
- SCHANKER, L. S. (1971) In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. XXVIII. *Concepts in Biochemical Pharmacology*, Part I, Chapter 2, ed. by B. B. BRODIE en J. R. GILLETTE, in cooperation with H. S. ACKERMAN. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- SMITH, R. L. (1971) In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. XXVIII. *Concepts in Biochemical Pharmacology*, Part I, Chapter 19, ed. by B. B. BRODIE en J. R. GILLETTE, in cooperation with H. S. ACKERMAN, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- VESELL, E. S. (1972) *Federation Proc. N.Y. Acad. Sci.* 31, 1253.
- VIES, J. VAN DER (1970) *Acta Endocrinol.* 64, 656.
- VREE, T. B. (1973) Proefschrift Nijmegen.
- WAGNER, J. G. (1971) *Biopharmaceutics and relevant pharmacokinetics*, p. 140. Drug Intelligence Publications, Hamilton, Illinois.
- WEINSTEIN, L. (1970) In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 4th ed., section XIV. L. S. GOODMAN and A. GILMAN, eds. MacMillan, New York.
- ZITKO, B. A., J. F. HOWES, R. K. RAZDAN, B. C. DALZELL, H. C. DALZELL, J. C. SHEEHAN, H. G. PARS, W. L. DEWEY and L. S. HARRIS (1972) *Science* 177, 442.

Maart 1973.