

**Einfluss von hydrophilen und lipophilen Vehikeln auf die
Wirkstoffpenetration durch die Haut**

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Julia Lieken
aus Hannover

Düsseldorf 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Berichterstatter: Prof. Dr. B. C. Lippold

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Mannhold

Mündliche Prüfung: 10.02.2003

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazeutische Technologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Anleitung von

Herrn Prof. Dr. B. C. Lippold.

Für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, beste Betreuung und unermüdliche Diskussionsbereitschaft möchte ich mich herzlichst bedanken.

Neben der Unterstützung für meine Arbeit gilt Herrn Prof. Dr. B. C. Lippold mein besonderer Dank für seine umfangreiche Förderung, insbesondere die zahlreichen Möglichkeiten zur Fort- und Weiterbildung sowie für die Unterstützung bei der Organisation und Durchführung meines Ausland-aufenthaltes.

Herrn Prof. Dr. R. Mannhold danke ich weiterhin für die Übernahme des Korreferates und das meiner Arbeit entgegengebrachte Interesse.

Furthermore I would like to thank Prof. Dr. B. Michniak, NJ Center for Biomaterials, USA, for giving me the chance to join her research group and for introducing me into tissue culturing.

Weiterhin möchte ich Frau A. Schmitz für die gute Zusammenarbeit und die Durchführung der HPLC-Untersuchungen sowie Frau S. Ernst für die Durchführung der Diffusionsuntersuchungen danken.

Allen Probanden danke ich für die bereitwillige Beteiligung an meinen Studien.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei allen meinen Kolleginnen und Kollegen, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen und für den Spaß an der Arbeit und die gute Stimmung im Arbeitskreis gesorgt haben, so dass ich meine Zeit am Institut immer in bester Erinnerung behalten werde.

Für meine Familie

I	EINLEITUNG.....	1
II	ASPEKTE DER PERKUTANEN RESORPTION	3
1.	Arzneistofftransport durch die menschliche Haut.....	3
1.1	Gesetzmäßigkeiten.....	3
1.2	Abweichungen von den Gesetzmäßigkeiten.....	6
1.2.1	Vehikel-Barriere-Interaktionen	6
1.2.2	Arzneistoff-Barriere-Interaktionen.....	7
1.2.3	Vehikel-Arzneistoff-Interaktionen	8
2.	Das Stratum corneum als lipophile Verteilungsmembran	10
2.1	Permeabilität der Haut bei Verwendung wässriger Vehikel.....	10
2.2	Permeabilität der Haut bei Verwendung lipophiler Vehikel	13
2.3	Arzneistoffflux durch das Stratum corneum	15
3.	Der Widerstand der lebenden Epidermis	17
3.1	Die lebende Epidermis als Barriere bei lipophilen Vehikeln.....	17
3.2	Arzneistoffflux durch die lebende Epidermis.....	19
4.	Ziel der Arbeit	20
III	UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE.....	21
1.	Physikalisch-chemische Parameter der Vehikel und Arzneistoffe... 21	21
1.1	Vehikelauswahl	21
1.2	Auswahl der Modellarzneistoffe.....	23
1.3	Löslichkeiten.....	25
1.4	Lipophilieparameter	27
1.4.1	Verteilungskoeffizienten.....	27
1.4.2	R_{MW} -Werte	31
2.	In-vivo-Studien zur perkutanen Resorption menschlicher Haut	36
2.1	Durchführung der Probandenversuche	36
2.1.1	Kammermodell.....	36
2.1.2	Hautextraktivstoffe	37

2.1.3	Penetrationsprofile	38
2.1.4	Versuchsplanung	41
2.1.5	Auswertung der Probandenversuche	42
2.2	Hautpermeabilitäten	46
2.2.1	Ergebnisse der In-vivo-Studien	46
2.2.2	Korrelation der Permeabilitäten mit R_{MW} -Werten.....	47
2.2.2.1	Wasser als Vehikel.....	48
2.2.2.2	Paraffin als Vehikel.....	49
2.2.2.3	Hydrophiles und lipophiles Vehikel im Vergleich.....	50
2.2.2	Diskussion der Ergebnisse	52
2.2.4	Modellvorstellungen.....	53
2.3	Maximaler Flux	56
2.3.1	Berechnung des maximalen Fluxes.....	56
2.3.2	Vorhersage des maximalen Fluxes	58
2.3.3	Modellvorstellungen.....	59
2.3.4	Einfluss der Vehikel auf den Zustand der Haut.....	61
3.	In-vitro-Studien mit Kuheuterhaut.....	66
3.1	Ziel der Untersuchungen.....	66
3.2	Kuheuterhaut als Modellmembran.....	67
3.3	Durchführung der In-vitro-Versuche	68
3.3.1	Auswahl des Modellarzneistoffs.....	68
3.3.2	Modifizierte Franz-Diffusionszelle	68
3.3.3	Tape-stripping des Stratum corneum	69
3.3.4	Versuchsplanung	71
3.3.5	Auswertung der In-vitro-Versuche	71
3.4	Ergebnisse: Einfluss des Tape-stripping auf die Permeabilität.....	73
3.4.1	Paraffin als Vehikel.....	73
3.4.2	Wasser als Vehikel.....	75
3.5	Arzneistoffflux durch intakte Kuheuterhaut.....	77
3.6	Bewertung der Kuheuterhaut als Modellmembran	79
4.	Untersuchungen zum Vehikeleinfluss auf Polymermembranen	81

4.1	Ziel der Untersuchungen.....	81
4.2	Durchführung.....	82
4.2.1	Auswahl der Modellarzneistoffe	82
4.2.2	Auswahl der Polymermembranen.....	82
4.2.3	Quellung der Membranen im Vehikel	83
4.2.4	Arzneistofflöslichkeit in den Polymermembranen	85
4.2.5	Diffusionsuntersuchungen an Polymermembranen.....	89
4.2.5.1	Permeabilitäten der Polymermembranen.....	90
4.2.5.2	Maximaler Flux durch Polymermembranen.....	92
4.2.5.3	Diffusionskoeffizienten der Arzneistoffe	93
4.3	Interpretation der Ergebnisse	95
4.4	Vergleich von Haut- und Membranpermeabilitäten.....	98
5.	Untersuchungen an einem humanen Hautäquivalent.....	100
5.1	Humane Hautäquivalente	100
5.2.	Züchtung eines humanen Hautäquivalents	100
5.2.1	Isolierung und Kultivierung von Fibroblasten/Keratinozyten.....	100
5.2.2	Präparation von Dermis und Epidermis.....	102
5.3	Permeabilitätsuntersuchungen	103
5.3.1	Durchführung	103
5.3.2	Ergebnisse	104
5.4	Bewertung des humanen Hautäquivalents	106
IV	EXPERIMENTELLER TEIL	107
1.	Bestimmung der physikalisch-chemischen Parameter.....	107
1.1	Löslichkeiten.....	107
1.2	Spektralphotometrie	108
1.3	R _{MW} -Werte	108
2.	In-vivo-Studien	109
2.1	Durchführung.....	109
2.2	Berechnung der Kammerflächen.....	110
2.3	HPLC-Analytik.....	111

2.3.1	Analytik der wässrigen Proben	112
2.3.2	Analytik der Paraffinproben.....	113
2.4	Berücksichtigung der Restvolumina.....	114
3.	In-vitro-Studie mit Kuheuterhaut	116
3.1	Präparation der Kuheuterhaut	116
3.2	Tape-stripping des Stratum corneum	116
3.3	Aufbau und Funktion der Diffusionszelle	117
3.4	Durchführung.....	118
3.5	HPLC-Analytik.....	121
3.6	Korrektur der Akzeptorkonzentration.....	122
4.	Untersuchungen an Polymermembranen.....	122
4.1	Bestimmung der physikalisch-chemischen Parameter	122
4.1.1	Dicke der Membranen	122
4.1.2	Dichte	123
4.1.3	Quellung	123
4.1.4	Verteilungskoeffizienten.....	124
4.2	Diffusionsversuche mit Polymermembranen	124
5.	Untersuchungen an einem humanen Hautäquivalent.....	125
5.1	Züchtung des Hautäquivalents.....	125
5.1.1	Medien.....	125
5.1.2	Medienwechsel.....	126
5.1.3	Subkultivieren.....	127
5.1.4	Präparation des Hautäquivalents.....	127
5.2	Diffusionsuntersuchungen.....	128
6.	Bezugsquellen häufig verwendeter Substanzen und Materialien..	129
V	ZUSAMMENFASSUNG	130
VI	LITERATUR.....	135

I **EINLEITUNG**

Die kutane Applikation stellt für Arzneistoffe, die einen starken First-pass-Effekt zeigen, eine gute Alternative zur peroralen Applikation dar. Aber auch für die dermale und regionale Therapie ist die kutane Anwendung von großer Bedeutung. Um an den jeweiligen Wirkort zu gelangen, müssen die Arzneistoffe die geschwindigkeitsbestimmende Barriere der Haut, das Stratum corneum, überwinden. Nach dem 1. Fickschen Diffusionsgesetz ist die Verteilung eines Arzneistoffs zwischen der Barriere Stratum corneum und eingesetztem Vehikel bzw. Salbengrundlage von besonderer Bedeutung für den Arzneistofftransport durch die Haut. Der entsprechende Verteilungskoeffizient wird einerseits durch die Eigenschaften der Barriere selbst und andererseits durch physikalisch-chemische Eigenschaften des Arzneistoffs und des Vehikels bestimmt. Da der Penetrationsparameter Permeabilität P_B maßgeblich durch diesen Verteilungskoeffizienten determiniert ist, sollte sich bei einem Arzneistoff durch Variation des Vehikels der Verteilungskoeffizient und damit auch die Permeabilität verändern.

Obwohl in der Praxis häufig lipophile Salbengrundlagen wie Kohlenwasserstoffe, Fette und Wachse zum Einsatz kommen, werden die Permeabilitäten von Arzneistoffen überwiegend aus wässrigen Lösungen bestimmt. Mit steigender Lipophilie der untersuchten Arzneistoffe ergeben sich aufgrund der Lipophilie des Stratum corneum auch steigende Permeabilitäten. Bei lipophilen Vehikeln sind die Verhältnisse nur vereinzelt untersucht. Deshalb soll die Permeabilität verschiedener Arzneistoffe aus einem hydrophilen (Wasser) und einem lipophilen Vehikel (dünnflüssiges Paraffin) im Vergleich in vivo am Menschen bestimmt und in Abhängigkeit von der Lipophilie der Arzneistoffe betrachtet werden. Dabei ist gleichzeitig mittels Stripping-Versuchen zu klären, ob auch aus lipophilen Vehikeln das Stratum corneum die geschwindigkeitsbestimmende Barriere darstellt, da dies in letzter Zeit in Frage gestellt wurde.

Von der Seite der praktischen Anwendung ist besonders der maximale Flux J_{\max} von Interesse, da dieser Parameter die maximal durch die Haut penetrierende Arzneistoffmenge beschreibt.

Theoretisch korreliert der maximale Flux verschiedener Arzneistoffe ähnlicher Molekülgröße, unabhängig vom eingesetzten Vehikel, mit der Arzneistofflöslichkeit im Stratum corneum. Das bedeutet für einen Arzneistoff, dass sein maximaler Flux durch die Haut aus verschiedenen Vehikeln nahezu gleich sein sollte. Demzufolge ist in dieser Arbeit auch zu überprüfen, ob der maximale Flux eines Arzneistoffs tatsächlich vehikelunabhängig ist oder durch die Wahl des Vehikels signifikant beeinflusst werden kann.

II ASPEKTE DER PERKUTANEN RESORPTION

1. Arzneistofftransport durch die menschliche Haut

Das Stratum corneum ist die geschwindigkeitsbestimmende Barriere für den Arzneistofftransport durch die Haut (45, 59). Die Permeation durch die lebende Epidermis und weitere hydrophile Gewebe in den tiefer liegenden Hautschichten erfolgt in der Regel wesentlich schneller.

Der Arzneistofftransport durch die Haut wird einerseits beeinflusst durch die Beschaffenheit der Barriere und die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Arzneistoffs, andererseits aber auch durch die Wahl des Vehikels bzw. der Salbengrundlage oder anderer Träger.

1.1 Gesetzmäßigkeiten

Trotz seines heterogenen Aufbaus (24, 35) kann das Stratum corneum vereinfacht als isotrope Verteilungsmembran beschrieben werden (45, 53). Für den passiven Arzneistofftransport durch die Haut gilt somit näherungsweise das 1. Ficksche Diffusionsgesetz. Unter der Voraussetzung von Sink-Bedingungen in der lebenden Epidermis stellt sich nach einiger Zeit im Stratum corneum ein linearer Konzentrationsgradient ein. In diesem quasistationären Zustand lässt sich das 1. Ficksche Gesetz folgendermaßen formulieren:

$$-\frac{dc_v}{dt} = \frac{D_B \cdot F \cdot VK_{B/V}}{d_B \cdot V} \cdot c_v = kp_1 \cdot c_v \quad \text{Gl. 1}$$

$\frac{dc_v}{dt}$ Konzentrationsänderung des Arzneistoffs pro Zeit im Vehikel

D_B effektiver Diffusionskoeffizient des Arzneistoffs in der Barriere

d_B	Dicke der Barriere
F	Applikationsfläche
$VK_{B/V}$	Verteilungskoeffizient des Arzneistoffs zwischen Barriere und Vehikel
V	appliziertes Vehikelvolumen
c_V	eingesetzte Arzneistoffkonzentration im Vehikel
kp_1	Penetrationsgeschwindigkeitskonstante erster Ordnung

Demnach ist die Konzentrationsabnahme pro Zeiteinheit in einer auf die Haut applizierten Zubereitung direkt proportional dem Diffusionskoeffizient, dem Verteilungskoeffizient, der Applikationsfläche und der eingesetzten Arzneistoffkonzentration im Vehikel sowie umgekehrt proportional zur Dicke der Barriere und dem Vehikelvolumen. Die Konzentrationsabnahme im Vehikel bzw. die Arzneistoffdiffusion durch das Stratum corneum folgt einer Kinetik erster Ordnung. Aus experimentellen Penetrationsdaten ist die Penetrationskonstante erster Ordnung kp_1 bestimmbar.

Die experimentell nicht ohne weiteres zugänglichen Parameter D_B , d_B , $VK_{B/V}$ werden als Permeabilität zusammengefasst:

$$P_B = \frac{D_B \cdot VK_{B/V}}{d_B} \quad \text{Gl. 2}$$

P_B Permeabilität der Barriere ($\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$)

Die Permeabilität kann aus den experimentellen Penetrationsdaten (Fluxe) berechnet werden und ist unabhängig von der eingesetzten Arzneistoffkonzentration. Der Arzneistoffflux ist die penetrierte Arzneistoffmenge pro Flächen- und Zeiteinheit:

$$J = \frac{D_B \cdot VK_{B/V}}{d_B} \cdot c_V = P_B \cdot c_V$$

Gl. 3

J Flux durch die Barriere ($\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)

Der Flux ergibt sich rechnerisch ebenfalls aus der Multiplikation der Permeabilität mit der eingesetzten Arzneistoffkonzentration im Vehikel. Um den Flux eines Arzneistoffs aus verschiedenen Vehikeln oder verschiedener Arzneistoffe aus einem Vehikel vergleichen zu können, sind die Arzneistoffzubereitungen nicht in gleicher Konzentration, sondern in gleicher thermodynamischer Aktivität einzusetzen (25). Die thermodynamische Aktivität ist das Verhältnis der eingesetzten Arzneistoffkonzentration zur Sättigungskonzentration im gleichen Vehikel:

$$a_{\text{th}} = \frac{c_{\text{V}}}{c_{\text{sV}}} \quad \text{Gl. 4}$$

a_{th} thermodynamische Aktivität eines gelösten Arzneistoffs im Vehikel

c_{sV} Sättigungskonzentration des Arzneistoffs im Vehikel

Können die Arzneistofflösungen aus praktischen Gründen nicht bei gleicher thermodynamischer Aktivität eingesetzt werden, sind die resultierenden Fluxe rechnerisch auf die gleiche thermodynamische Aktivität zu extrapolieren.

Aus Gl. 4 folgt, dass die maximale thermodynamische Aktivität $a_{\text{th}}=1$ bei Applikation einer gesättigten Lösung bzw. einer Suspension erreicht wird. Werden Zubereitungen maximaler Aktivität eingesetzt, sind auch die erreichten Fluxe maximal:

$$J_{\text{max}} = \frac{D_{\text{B}} \cdot VK_{\text{B/V}}}{d_{\text{B}}} \cdot c_{\text{sV}} = P_{\text{B}} \cdot c_{\text{sV}} \quad \text{Gl. 5}$$

J_{max} maximaler Flux ($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)

Da man den Verteilungskoeffizienten des Arzneistoffs zwischen der Barriere und dem Vehikel durch die Sättigungskonzentrationen in den beiden Phasen annähern kann,

$$VK_{\text{B/V}} = \frac{c_{\text{sB}}}{c_{\text{sV}}} \quad \text{Gl. 6}$$

c_{sB} Sättigungskonzentration des Arzneistoffs in der Barriere

ergibt sich nach Einsetzen dieses Quotienten in Gl. 5:

$$J_{\max} = \frac{D_B \cdot c_{sB}}{d_B \cdot c_{sV}} \cdot c_{sV} \qquad J_{\max} = \frac{D_B \cdot c_{sB}}{d_B} \qquad \text{Gl. 7}$$

Aus Gl. 7 wird deutlich, dass der maximale Flux einer applizierten Substanz nur von seinem Diffusionskoeffizienten in der Barriere, der Dicke der Barriere und der Löslichkeit des Arzneistoffs in der Barriere abhängig ist. Demnach ist der maximale Flux eines Arzneistoffs aus verschiedenen Vehikeln immer gleich.

1.2 Abweichungen von den Gesetzmäßigkeiten

Selbst wenn alle oben genannten Voraussetzungen für die Gültigkeit des 1. Fickschen Diffusionsgesetzes erfüllt sind, können sich durch Interaktionen der einzelnen Komponenten miteinander Abweichungen von den beschriebenen Gesetzmäßigkeiten ergeben. Im Folgenden sollen die möglichen Wechselwirkungen des Vehikels mit der Barriere Stratum corneum und dem Arzneistoff sowie potenzielle Interaktionen zwischen Arzneistoff und Barriere näher erläutert werden.

1.2.1 Vehikel-Barriere-Interaktionen

Es sind viele unterschiedliche Einflüsse des Vehikels auf das Stratum corneum möglich, die sich auf die Permeation eines Arzneistoffs durch die Haut auswirken können. In den meisten Fällen kommt es zu einer Penetrationsbeschleunigung, die überwiegend durch die folgenden Mechanismen erklärt wird (6):

Am häufigsten tritt eine Interaktion des Vehikels mit den interzellulären Lipiden im Stratum corneum auf, die entweder zu einer Lipidfluidisierung oder sogar zu einem Herauslösen einiger Lipidfraktionen aus dem Stratum corneum führen kann. Interaktionen mit den Lipiden sind je nach Eigenschaft des Vehikels mit den polaren Kopfgruppen und/oder mit den lipophilen Fettsäureresten der Lipide

möglich. Außerdem führt das Eindringen größerer Mengen Vehikel in die Barriere zu einem Cosolventieneffekt. Neben dem Eindringen von Vehikel ist auch die verstärkte Hydratisierung des Stratum corneum unter okklusiven Bedingungen zu berücksichtigen. Bei hydratisiertem Stratum corneum wurden um Faktor 2 erhöhte Steady-state-Permeabilitäten gefunden (59). Des Weiteren werden auch Interaktionen mit intrazellulärem Keratin diskutiert, die sich einerseits auf den unbedeutenderen transzellulären Permeationsweg, aber auch indirekt auf den Ordnungszustand der interzellulären Lipide auswirken können (6).

Die Penetrationsbeschleunigung kommt in allen Fällen durch eine Erhöhung des Diffusionskoeffizienten des Arzneistoffs im Stratum corneum D_B und/oder durch eine Erhöhung der Sättigungskonzentration des Arzneistoffs in der Barriere c_{sB} zu Stande.

Da der Einfluss des pH-Wertes der Umgebung auf den Ordnungszustand von Lipidmischungen als Stratum-corneum-Modell nachgewiesen werden konnte (44), ist auch der pH-Wert des Vehikels im Hinblick auf eine Veränderung des pH-Gradienten im Stratum corneum zu berücksichtigen. Die bei der Lipidmischung gefundene Fluidisierung bei steigendem Umgebungs-pH-Wert wird durch Erhöhung des Dissoziationsgrades der freien Fettsäuren erklärt.

1.2.2 Arzneistoff-Barriere-Interaktionen

Neben den als Enhancer bekannten Substanzen, die sich gezielt zur Penetrationsbeschleunigung einsetzen lassen, weisen auch einige Arzneistoffe wie z.B. Harnstoff, Salicylsäure und Lokalanästhetika (13, 28, 33) penetrationsbeschleunigende Eigenschaften auf. Auch hier werden Interaktionen mit den interzellulären Lipiden und den intrazellulären Proteinen diskutiert.

Zudem ist beschrieben, dass der Diffusionskoeffizient unabhängig von einer penetrationsbeschleunigenden Wirkung nicht konstant, sondern konzentrationsabhängig ist (17).

1.2.3 Vehikel-Arzneistoff-Interaktionen

Für die Permeation eines Arzneistoffs durch die Haut sind Vehikel-Arzneistoff-Interaktionen von Bedeutung, die die eingesetzte Konzentration des Arzneistoffs im Vehikel c_v beeinflussen, da dies zu einer Veränderung der thermodynamischen Aktivität (Gl. 4) und somit auch zu einem veränderten Arzneistoffflux durch die Haut führt.

Die zur Penetration zur Verfügung stehende Menge Arzneistoff kann aus verschiedenen Gründen nicht der eingesetzten Konzentration entsprechen. Der Arzneistoff kann zum Beispiel von Komponenten des Vehikels bzw. der Salbengrundlage adsorbiert werden und somit nur in geringeren Mengen oder im Gleichgewicht mit der Desorption penetrieren (47). Ebenso hängt bei dissoziierenden Verbindungen die zur Penetration zur Verfügung stehende Arzneistoffmenge vom pH-Wert des Vehikels und dem pKs-Wert der Substanz ab, da in der Regel nur die lipophilere undissoziierte Form durch das Stratum corneum gelangt. Bei mehrphasigen Vehikelsystemen ist generell zu beachten, dass nur die Arzneistoffkonzentration in der äußeren Phase von Bedeutung ist.

Des Weiteren ist die Konzentrationsabhängigkeit von Verteilungskoeffizienten zu berücksichtigen. Nur in verdünnten Lösungen nähern sich die Aktivitätskoeffizienten der sich verteilenden Substanz in den beiden Phasen dem Wert 1, so dass nach Nernst der Verteilungssatz gilt:

$$VK_{a/b} = \frac{c_a}{c_b} = \text{konstant} \quad \text{Gl. 8}$$

$VK_{a/b}$ Verteilungskoeffizient einer Substanz zwischen Phase a und b

c_a bzw. c_b Konzentration der Substanz in Phase a bzw. b

Die Konzentrationsabhängigkeit der Verteilung wurde sowohl für das zur Lipophiliecharakterisierung von Substanzen üblicherweise verwendete System Octanol/Wasser als auch für Verteilungen von Arzneistoffen zwischen Kunststofffolien und Wasser gefunden und wird mit der Bildung von Assoziaten bei

höheren Konzentrationen erklärt, die sich nicht in die andere Phase verteilen (43, 73).

Aufgrund dieser Befunde ist zu bedenken, dass auch die Verteilung eines Arzneistoffs zwischen Vehikel und Stratum corneum je nach Vehikel konzentrationsabhängig sein kann. Als Konsequenz daraus würde man beim Einsatz unterschiedlicher Arzneistoffkonzentrationen im Vehikel unterschiedliche Permeabilitäten für einen Arzneistoff erhalten bzw. der Arzneistoffflux würde sich nicht proportional zur thermodynamischen Aktivität verhalten.

2. Das Stratum corneum als lipophile Verteilungsmembran

Wie bereits in Kap. II 1.1 beschrieben, lässt sich das Stratum corneum, die geschwindigkeitsbestimmende Barriere für den Arzneistofftransport durch die Haut, vereinfacht als isotrope Verteilungsmembran betrachten. Da das Stratum corneum trotz hydrophiler Bereiche als lipophile Membran bezeichnet werden kann, sollte es für lipophile Stoffe grundsätzlich besser permeabel sein und hydrophilen Arzneistoffen einen größeren Widerstand entgegensetzen.

Die Permeabilität des Stratum corneum P_B für einen Arzneistoff ist unter anderem proportional dem Verteilungskoeffizienten des Arzneistoffs zwischen Stratum corneum und eingesetztem Vehikel $VK_{SC/V}$ (Gl. 2).

Da der Einsatz unterschiedlicher Vehikel zu entsprechend unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten bei einem Arzneistoff führt, sollten unter diesen Bedingungen daraus auch unterschiedliche Permeabilitäten für einen Arzneistoff resultieren.

Im Folgenden soll der Vehikeleinfluss auf die Permeabilität der menschlichen Haut unter Berücksichtigung der Lipophilie der Arzneistoffe näher diskutiert werden.

2.1 Permeabilität der Haut bei Verwendung wässriger Vehikel

Unter der Annahme, dass sich Diffusionskoeffizienten niedermolekularer Arzneistoffe im Stratum corneum nur geringfügig unterscheiden und die Dicke des Stratum corneum relativ konstant ist, wird ersichtlich, dass beim Vergleich verschiedener Arzneistoffe im selben Vehikel sich die Permeabilität der Haut mit dem Verteilungskoeffizienten der Arzneistoffe zwischen der Haut und dem wässrigen Vehikel verändern sollte. Bei zu Grunde Legen der relativen Löslichkeiten der Arzneistoffe im wässrigen Vehikel und im lipophilen Stratum corneum kommt man zu folgender Relation:

Für hydrophile Substanzen, die aufgrund ihrer höheren Affinität zum wässrigen Vehikel einen kleineren Verteilungskoeffizienten zwischen Stratum corneum und

Vehikel $VK_{SC/Wasser}$ aufweisen, sollte die Haut auch eine geringe Permeabilität zeigen. Umgekehrt sollte die Haut für lipophile Arzneistoffe, wegen deren begrenzter Wasserlöslichkeit und des daraus folgenden höheren $VK_{SC/Wasser}$, besser permeabel sein. Wenn die Verteilung der Arzneistoffe in das Stratum corneum nicht behindert wird, z.B. durch adhärierende Schichten, dann sollte entsprechend Gl. 2 der Logarithmus der Permeabilitäten linear mit dem Logarithmus der Verteilungskoeffizienten $VK_{SC/Wasser}$ steigen:

$$\log P_B = \log \left(\frac{D_{SC}}{d_{SC}} \right) + \log VK_{SC/Wasser} \quad \text{Gl. 9}$$

D_{SC} effektiver Diffusionskoeffizient des Arzneistoffs im Stratum corneum

d_{SC} Dicke des Stratum corneum

$VK_{SC/Wasser}$ Verteilungskoeffizient des Arzneistoffs zwischen Stratum corneum und wässrigem Vehikel

Der $VK_{SC/Wasser}$ stellt auch ein Maß für die Lipophilie eines Arzneistoffs dar. Da dieser experimentell nicht einfach zu ermitteln ist, wird er oft durch andere Lipophilieparameter z.B. den Verteilungskoeffizienten zwischen Octanol und Wasser $VK_{Octanol/Wasser}$ ersetzt. Zu beachten ist, dass bei Ersatz des $VK_{SC/Wasser}$ durch andere Lipophilieparameter die Steigung der Geraden aus der Auftragung von $\log P_B$ gegen den Logarithmus des gewählten Lipophilieparameters mehr oder weniger stark von dem theoretischen Wert 1 abweicht (Kap. III 1.4.1).

Schematisch lässt sich die Abhängigkeit der Permeabilität von der Lipophilie der Arzneistoffe bei Applikation aus wässriger Lösung folgendermaßen darstellen:



Abb. 1: Schematische Darstellung der Abhängigkeit der Hautpermeabilität von der Lipophilie der Arzneistoffe bei Verwendung wässriger Vehikel

Diese Abhängigkeit konnte bereits *in vitro* und *in vivo* für niedermolekulare Arzneistoffe unterschiedlichen Molvolumens bestätigt werden (2, 23, 61). Auch ein Anstieg unspezifischer biologischer Aktivitäten mit zunehmender Lipophilie der Arzneistoffe wurde gefunden und mit der erhöhten Membrangängigkeit lipophiler Substanzen begründet (34).

Abweichungen von diesem linearen Zusammenhang zeigten sich insbesondere für besonders hydrophile und extrem lipophile Substanzen. Die Abweichungen sehr hydrophiler Arzneistoffe geringen Molekularvolumens lassen sich mit der ausschließlichen Permeation dieser Stoffe durch hydrophile bzw. wassergefüllte Regionen erklären (1, 2). Bei sehr lipophilen Substanzen kann aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit die Verteilung in hydrophile Bereiche wie z.B. die lebende Epidermis oder wässrige adhärierende Schichten geschwindigkeitsbestimmend werden (37, 61). Der lineare Bereich geht in diesem Fall in eine Plateauphase über oder es kommt sogar zu einer Abnahme der Permeabilität bei weiterer Zunahme der Lipophilie der untersuchten Arzneistoffe (74).

2.2 Permeabilität der Haut bei Verwendung lipophiler Vehikel

Bei der Verwendung lipophiler Vehikel, die weniger polar sind als das Stratum corneum, sollten sich die Verhältnisse theoretisch folgendermaßen umkehren. Lipophile Arzneistoffe sollten wegen ihrer hohen Affinität zu lipophilen Vehikeln einen kleinen Verteilungskoeffizienten zwischen Stratum corneum und gewähltem Vehikel $VK_{SC/Lipoid}$ aufweisen. Für hydrophile Substanzen, die sich nur geringfügig im lipophilen Vehikel lösen, sollte das Stratum corneum aufgrund des höheren Verteilungskoeffizienten auch eine höhere Permeabilität zeigen.

Betrachtet man eine Reihe unterschiedlich lipophiler und hydrophiler Arzneistoffe, so sollte bei Verwendung lipophiler Vehikel der Logarithmus der Permeabilität mit abnehmenden $VK_{SC/Lipoid}$ bzw. zunehmender Lipophilie der Substanzen sinken.

$$\log P_B = \log \left(\frac{D_{SC}}{d_{SC}} \right) + \log VK_{SC/Lipoid} \quad \text{Gl. 10}$$

$VK_{SC/Lipoid}$ Verteilungskoeffizient des Arzneistoffs zwischen Stratum corneum und lipophilem Vehikel

Dies gilt wieder nur unter der Voraussetzung, dass die Diffusionskoeffizienten und die Dicke des Stratum corneum relativ konstant sind.

Entsprechend diesen Überlegungen, wäre bei Verwendung lipophiler Vehikel die hier dargestellte Abhängigkeit der Permeabilität der Haut von der Lipophilie der Arzneistoffe zu erwarten:

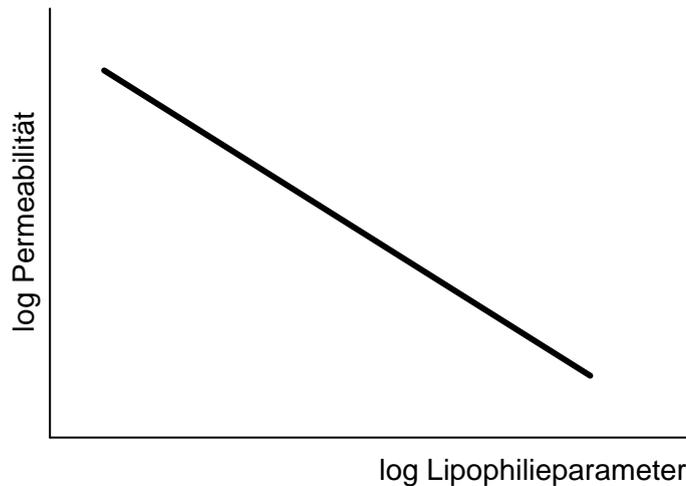


Abb. 2: Schematische Darstellung der Abhängigkeit der Permeabilität der Haut von der Lipophilie der Arzneistoffe bei Verwendung lipophiler Vehikel

Obwohl lipophile Salbengrundlagen wie Kohlenwasserstoffe, Fette und Wachse in der Praxis häufig angewendet werden, sind Untersuchungen über den Einfluss lipophiler Vehikel auf die Permeabilität von unterschiedlich lipophilen Arzneistoffen in der Literatur nur vereinzelt zu finden.

Blank (1964) führte In-vitro-Permeabilitätsstudien mit flüssigem Paraffin, Olivenöl und Isopropylmyristat als Vehikel und einer Reihe primärer, homologer Alkohole als Modellsubstanzen durch (9, 56). Da die Anzahl der C-Atome ein Maß für die Lipophilie der Alkohole ist, lässt sich die oben dargestellte Abhängigkeit bestätigen. Für die hydrophilen kurzkettigen Alkohole wie Ethanol und Propanol weist die Haut aus den lipophilen Vehikeln eine höhere Permeabilität auf als für das lipophile Octanol. Bei Betrachtung der Ergebnisse derselben Studie unter Verwendung eines wässrigen Vehikels stellt sich wieder die umgekehrte (Kap. II 2.1) Abhängigkeit ein.

Lee et al. führten In-vivo- und In-vitro-Permeabilitätsuntersuchungen mit 16 verschiedenen Arzneistoffen appliziert in einem lipophilen Vehikel (Caprylsäure-Triglycerid) durch (39). Die ausgewählten Arzneistoffe decken ein breites Hydrophilie-Lipophilie-Spektrum, gemessen als $VK_{\text{Octanol/Wasser}}$, von über fünf Zehnerpotenzen ab. Es werden ebenfalls höhere Permeabilitäten für die

hydrophilen Arzneistoffe erhalten, wobei allerdings die Korrelation des Logarithmus der prozentualen Permeationsrate pro Stunde mit dem $\log V_{K_{\text{Octanol/Wasser}}}$ nicht streng linear verläuft. In einer weiteren Untersuchung dieser Arbeitsgruppe werden die Permeabilitäten einiger dieser Substanzen mit den Permeabilitäten bei der Verwendung eines hydrophilen Vehikels verglichen (38). Auch hier ist wieder die umgekehrte Abhängigkeit von der Lipophilie entsprechend Kap. II 2.1 zu finden.

Erklärt werden die erhöhten Permeabilitäten hydrophiler Arzneistoffe in der Literatur ebenfalls mit der günstigeren Verteilung aus einem lipophilen Vehikel in die Haut, wenn das Vehikel weniger polar ist als das Stratum corneum.

Des Weiteren sind noch Untersuchungen zu einzelnen Substanzen bekannt, deren Permeabilität aus verschiedenen Vehikeln untersucht wurden (20, 27). Auch hier ist die Tendenz zu verzeichnen, dass Substanzen aus Vehikeln in denen sie schlecht löslich sind, höhere Permeabilitäten aufweisen, da hier ein günstigerer $V_{K_{\text{SC/Vehikel}}}$ vorliegt.

2.3 Arzneistoffflux durch das Stratum corneum

Trotz unterschiedlicher Permeabilitäten, die entsprechend den vorherigen Überlegungen aus der Applikation eines Arzneistoffs in hydrophilen und lipophilen Vehikeln resultieren, sollten sich die maximalen Fluxe aus beiden Vehikeln nicht unterscheiden:

Aus Gl. 7 wird deutlich, dass in die Berechnung des maximalen Fluxes als entscheidende arzneistoffspezifische Größe die Löslichkeit des Arzneistoffs in der Barriere eingeht. Da die geschwindigkeitsbestimmende Barriere sowohl bei hydrophilen als auch bei lipophilen Vehikeln im Allgemeinen das Stratum corneum ist, sollte auch die Arzneistofflöslichkeit in dieser Barriere und somit auch der maximale Flux gleich sein.

$$J_{\text{max}} = \frac{D_{\text{SC}} \cdot c_{\text{sSC}}}{d_{\text{SC}}} \quad \text{Gl. 11}$$

Abweichungen sind nur dann zu erwarten, wenn das eingesetzte Vehikel die Eigenschaften der Barriere beeinflusst (Kap. II 1.2.1).

Betrachtet man verschiedene Arzneistoffe unterschiedlicher Lipophilie, so sollten mit Substanzen, die eine gute Löslichkeit in der Barriere aufweisen, auch hohe maximale Fluxe zu erzielen sein. Da für lipophile Substanzen höhere Löslichkeiten im lipophilen Stratum corneum angenommen werden können, sollten lipophile Substanzen generell höhere maximale Fluxe zeigen als hydrophile Arzneistoffe.

Entgegen dieser Theorie gibt es aber auch Befunde, die für hydrophile Substanzen aus wässrigen Vehikeln hohe maximale Fluxe beschreiben (23).

3. Der Widerstand der lebenden Epidermis

Der Anteil des Widerstands der lebenden Epidermis am Gesamtwiderstand der Haut ist nur wenig untersucht. Lediglich für extrem lipophile Substanzen wird ein Einfluss hydrophiler Hautschichten auf die Permeabilität postuliert (37, 74). Wenn die lebende Epidermis entgegen den üblichen Annahmen keine idealen Sink-Bedingungen gewährleistet, muss auch der Widerstand der lebenden Epidermis berücksichtigt werden.

Die Gesamtpermeabilität einer mehrschichtigen Barriere ergibt sich aus dem reziproken Wert der addierten Widerstände (17):

$$\frac{1}{P_{a,b}} = R_{a,b} = R_a + R_b \quad \text{Gl. 12}$$

$P_{a,b}$ Gesamtpermeabilität

$R_{a,b}$ Gesamtwiderstand

R_a bzw. R_b Widerstand der Schicht a bzw. b

Nur wenn der Widerstand einer Schicht der Barriere sehr viel größer ist als der der anderen Schichten (Faktor 10), wird diese Schicht allein geschwindigkeitsbestimmend und determiniert die Permeabilität der gesamten Barriere.

3.1 Die lebende Epidermis als Barriere bei lipophilen Vehikeln

Wenkers und Lippold führten In-vivo-Studien mit einer Reihe nichtsteroidaler Antirheumatika (NSAR) unter Einsatz von dünnflüssigem Paraffin als Vehikel durch (68). Übereinstimmend mit den Überlegungen in Kap. II 2.2, nehmen auch in dieser Untersuchung die experimentell bestimmten Permeabilitäten mit zunehmender Lipophilie der NSAR ab.

Um die Verteilung der Arzneistoffe aus dem Vehikel in das Stratum corneum zu simulieren, wurde Octanol als übliches Modelllipid eingesetzt und die Verteilungskoeffizienten der NSAR zwischen Octanol und dem Vehikel Paraffin $VK_{\text{Octanol/Paraffin}}$ über die jeweiligen Löslichkeiten in den beiden Phasen bestimmt. Da die Korrelation der Permeabilitäten mit $VK_{\text{Octanol/Paraffin}}$ nicht zufriedenstellend war, wurde die Membrankontrolle des Stratum corneum in Frage gestellt und die lebende Epidermis als entscheidende Barriere in Betracht gezogen.

Wenn die lebende Epidermis als geschwindigkeitsbestimmende Barriere angesehen wird, dann ist die Verteilung der Arzneistoffe aus dem Vehikel in die lebende Epidermis zu betrachten, auch wenn andere Schichten geringeren Widerstands zwischen Vehikel und geschwindigkeitsbestimmender Barriere liegen (17).

Als Modell für die lebende Epidermis wurde Phosphatpuffer pH 7,4 gewählt und dementsprechend erfolgte die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten der Substanzen zwischen Phosphatpuffer und dem Vehikel Paraffin $VK_{\text{Puffer/Paraffin}}$. Da die Korrelation der experimentellen Permeabilitäten der jeweiligen NSAR mit ihrem $VK_{\text{Puffer/Paraffin}}$ deutlich besser war, ließ sich folgender Schluss ziehen:

Die hohe Permeabilität der Haut für hydrophile und die niedrige Permeabilität für lipophile Arzneistoffe bei Verwendung lipophiler Vehikel kann nicht ausreichend mit der Verteilung der Arzneistoffe aus dem lipophilen Vehikel in das relativ hydrophilere Stratum corneum erklärt werden. Laut Wenkers und Lippold ist deshalb die lebende Epidermis bei Einsatz lipophiler Vehikel die geschwindigkeitsbestimmende Barriere und analog Gl. 2 gilt:

$$\log P_B = \log \left(\frac{D_{EP}}{d_{EP}} \right) + \log VK_{EP/Lipoid} \quad \text{Gl. 13}$$

- D_{EP} effektiver Diffusionskoeffizient in der lebenden Epidermis
- d_{EP} Dicke der lebenden Epidermis
- $VK_{EP/Lipoid}$ Verteilungskoeffizient des Arzneistoffs zwischen lebender Epidermis und lipophilem Vehikel

3.2 Arzneistoffflux durch die lebende Epidermis

Wenn bei Einsatz lipophiler Vehikel die lebende Epidermis zur geschwindigkeitsbestimmenden Barriere wird, ist nicht mehr der gleiche maximale Flux aus hydrophilen und lipophilen Vehikeln zu erwarten.

Für hydrophile Vehikel gilt weiterhin Gl. 11 (Kap. II 2.3) und für lipophile Vehikel ergibt sich entsprechend folgender Zusammenhang:

$$J_{\max} = \frac{D_{EP} \cdot c_{sEP}}{d_{EP}} \quad \text{Gl. 14}$$

c_{sEP} Sättigungskonzentration des Arzneistoffs in der lebenden Epidermis

Neben dem sich ändernden Diffusionskoeffizient des Arzneistoffs und der veränderten Dicke der Barriere ist nun die Löslichkeit des Arzneistoffs in der lebenden Epidermis und nicht die Löslichkeit im Stratum corneum für den maximalen Flux entscheidend. Da die Zellen der lebenden Epidermis noch nicht vollständig keratinisiert sind und die lebende Epidermis insgesamt einen erheblich höheren Wassergehalt aufweist als das Stratum corneum (24, 45), sollten sich die Löslichkeiten für einen Arzneistoff in den beiden Schichten deutlich voneinander unterscheiden. Somit sollte die Verwendung eines lipophilen Vehikels für den selben Arzneistoff zu einem anderen maximalen Flux führen als der Einsatz eines wässrigen Vehikels.

Betrachtet man nun verschiedene Arzneistoffe unterschiedlicher Lipophilie, so kommt man analog Kap. II 2.3 zu folgendem Schluss:

Hydrophile Substanzen, für die höhere Löslichkeiten in der hydrophilen lebenden Epidermis anzunehmen sind, sollten generell höhere maximale Fluxe zeigen als lipophile Arzneistoffe, wenn sie in einem lipophilen Vehikel appliziert werden.

Entgegen diesen Überlegungen gibt es aber auch Befunde, die für lipophile Substanzen aus lipophilen Vehikeln hohe maximale Fluxe beschreiben (68).

4. Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, den Einfluss von hydrophilen und lipophilen Vehikeln auf den Arzneistofftransport durch die Haut zu untersuchen.

Als Vehikel werden zwei übliche Lösungsmittel, Wasser und dünnflüssiges Paraffin, ausgewählt, die sich stark in ihrer Polarität unterscheiden, um mögliche Einflüsse besser quantifizieren zu können.

Zunächst sollen die unterschiedlichen Korrelationen der Permeabilität der Haut mit der Lipophilie der Arzneistoffe bei beiden Vehikeln bestätigt werden (Abb. 1 und 2 in Kap. II 2.1 und 2.2). Dafür ist eine Reihe von Modellarzneistoffen notwendig, die ein möglichst breites Hydrophilie-Lipophilie-Spektrum abdeckt.

Zur Charakterisierung dieser Modellarzneistoffe werden verschiedene Lipophilieparameter und die Löslichkeiten in den Vehikeln herangezogen.

Alle ausgewählten Arzneistoffe sollen in einer In-vivo-Studie in beiden Vehikeln an Probanden appliziert werden, um die unterschiedliche Permeabilität der Haut für einen Arzneistoff aus verschiedenen Vehikeln direkt nachweisen zu können. Wenn sich die negative Abhängigkeit der Permeabilität von der Lipophilie der Arzneistoffe bei Einsatz lipophiler Vehikel bestätigen lässt, dann muss untersucht werden, ob es sich hierbei um ein Verteilungsphänomen bezüglich des Stratum corneum handelt (Kap. II 2.2) oder ob die lebende Epidermis zur geschwindigkeitsbestimmenden Barriere wird (Kap. II 3.1). Dies soll in vitro mit Hilfe von Stripping-Versuchen an Kuheuterhaut als Modellmembran geklärt werden.

Des Weiteren ist der maximale Arzneistoffflux zu untersuchen. Sollten sich bei den In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen Abweichungen von den diskutierten Gesetzmäßigkeiten ergeben, muss dieses Problem anhand von Diffusionsversuchen mit verschiedenen inerten Polymermembranen näher beleuchtet werden.

Zum Schluss soll noch ein Vergleich der Humanhaut in vivo und der Kuheuterhaut in vitro mit einem gezüchteten humanen Hautmodell anhand der Parameter – Permeabilität und Flux – erfolgen.

III UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE

1. Physikalisch-chemische Parameter der Vehikel und Arzneistoffe

In den folgenden Kapiteln sollen die Kriterien für die Auswahl der Vehikel und Modellarzneistoffe näher erläutert werden. Für die ausgewählten Substanzen sind die physikalisch-chemischen Parameter zu bestimmen, die für die Hautuntersuchungen von Bedeutung sind.

1.1 Vehikelauswahl

Für die Permeabilitätsuntersuchungen sind ein hydrophiles und ein lipophiles Vehikel notwendig, die sich möglichst stark in ihrer Polarität unterscheiden, um mögliche Einflüsse besser quantifizieren zu können. Das lipophile Vehikel muss weniger polar sein als das Stratum corneum, damit die in Kap. II 2.2 beschriebene umgekehrte Abhängigkeit der Hautpermeabilität von der Lipophilie der Arzneistoffe überprüfbar ist. Beide Vehikel sollen außerdem gut hautverträglich und in halbfesten Zubereitungen gebräuchlich sein. Der Einfluss des Vehikels auf die Barriereeigenschaft der Haut sollte sich in Grenzen halten.

Tab. 1 zeigt die engere Auswahl gängiger Vehikel mit ihren Dielektrizitätskonstanten und Löslichkeitsparametern als Maß für die Polarität. Octanol ist in dieser Reihe mit aufgeführt, da es oft als Modelllipid für das Stratum corneum verwendet wird und hier einen Hinweis auf dessen Polarität geben soll.

Tab. 1: Charakterisierung möglicher Vehikel durch Dielektrizitätskonstante ϵ und Löslichkeitsparameter d

Vehikel	ϵ , 20°C	d (MPa) ^{1/2}
Wasser	78,5 ¹⁾	47,9 ²⁾
Propylenglycol	32,0 ¹⁾	28,6 ²⁾
Octanol	10,3¹⁾	20,6²⁾
Mittelkettige Triglyceride	3,8 ⁴⁾	19,2 ³⁾
Düninfl. Paraffin	2,2 ⁴⁾	14,5 ²⁾

¹⁾ (66)

²⁾ (63), Umrechnungsfaktor: 2,0455 (7)

³⁾ (46)

⁴⁾ (67)

Um sicherzugehen, dass das Vehikel die Polarität des Stratum corneum deutlich unterschreitet, wird dünnflüssiges Paraffin als lipophiles Vehikel ausgewählt.

Als hydrophiles Vehikel ist Wasser trotz zu erwartender Löslichkeitsprobleme bei lipophilen Arzneistoffen Propylenglycol vorzuziehen, damit sich die Vehikel in ihren Polaritäten stärker voneinander unterscheiden. Zudem wird Propylenglycol eine penetrationsbeschleunigende Wirkung zugeschrieben (8, 66). Dies ist für die geplanten Permeationsuntersuchungen unerwünscht.

1.2 Auswahl der Modellarzneistoffe

Grundsätzlich sollen die anzuwendenden Arzneistoffe hautverträglich, nicht zu stark wirksam und möglichst kosmetisch-dermatologisch gebräuchlich sein. Für die Auswahl sind jedoch weitere Kriterien ausschlaggebend.

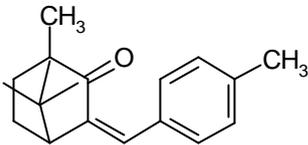
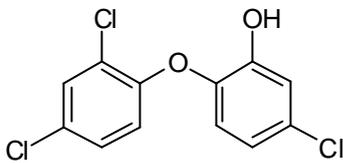
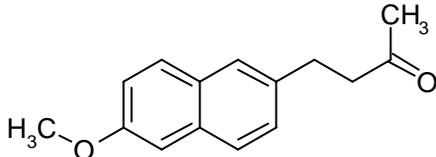
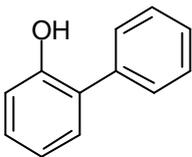
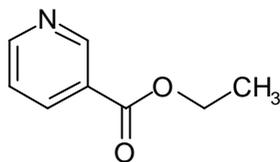
Da die Abhängigkeit der Hautpermeabilität von der Lipophilie der Arzneistoffe zu untersuchen ist, muss eine Reihe von Substanzen gefunden werden, die ein möglichst breites Hydrophilie-Lipophilie-Spektrum abdeckt. Die Breite des Spektrums ist allerdings durch die Löslichkeit in den beiden Vehikeln begrenzt, d.h. ein hydrophiler Arzneistoff muss eine ausreichende Löslichkeit in dünnflüssigem Paraffin aufweisen und umgekehrt sind nur lipophile Substanzen einzusetzen, die noch ausreichend wasserlöslich sind. Eine gewisse Löslichkeit ist erforderlich, damit auch nach mindestens einstündiger Applikation auf der Haut die Arzneistoffkonzentration im Vehikel noch über der Bestimmungsgrenze der HPLC liegt.

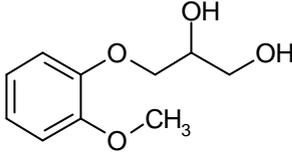
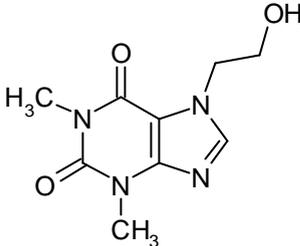
Eine weitere Voraussetzung ist, dass die Substanzen im wässrigen Vehikel nicht dissoziiert vorliegen. Im Fall dissoziierender Substanzen würde die Permeation durch die Haut vom Dissoziationsgrad abhängen, da nur die lipophilere, ungeladene Form gut durch die Haut permeiert (Kap. II 1.2.3). Somit können viele für die transdermale Anwendung interessante Arzneistoffe wie z.B. die meisten nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) nicht untersucht werden.

Auch von einigen in der Dermatologie häufig verwendeten Arzneistoffen wie Corticoiden und Hormonen ist aufgrund der nicht zulässigen Belastung für die Probanden abzusehen.

Für die Zustimmung der Ethikkommission zur Durchführung der Studie ist es erforderlich, dass jede eingesetzte Substanz in einem Handelsprodukt des Europäischen Marktes enthalten ist. Nach diesen Kriterien wurden die folgenden Substanzen als Modellarzneistoffe ausgewählt:

Tab. 2: Modellarzneistoffe (nach fallender Lipophilie geordnet, Kap. III 1.4)

Substanz / Anwendung	Strukturformel	MG (g/mol)
3-(4'-Methylbenzyliden)campher (MBC) UVB-Absorber		254,4
Triclosan (TCS) Antiseptikum		289,5
Nabumeton (NAB) Antirheumatikum		228,3
2-Phenylphenol (OPP) Antiseptikum		170,2
Ethylnicotinat (ETN) Rubefaciens		151,2

Guaifenesin (GLG) Expectorans		198,2
Etofyllin (ETO) Kardiotonikum		224,2

1.3 Löslichkeiten

Da in den Permeabilitätsuntersuchungen möglichst Arzneistofflösungen gleicher thermodynamischer Aktivität a_{th} eingesetzt werden sollen oder zumindest die experimentell erhaltenen Fluxe auf die gleiche thermodynamische Aktivität zu extrapolieren sind, ist die Kenntnis der Sättigungskonzentration jedes Arzneistoffs in beiden Vehikeln unerlässlich.

Die Löslichkeiten der Modellarzneistoffe werden der Hauttemperatur entsprechend bei 32°C in Wasser und dünnflüssigem Paraffin spektrophotometrisch bestimmt. Die ermittelten Sättigungskonzentrationen sind Mittelwerte aus drei Ansätzen.

Tab. 3 fasst Ergebnisse und Literaturdaten zusammen:

Tab. 3: Löslichkeiten der Modellarzneistoffe bei 32°C, (n = 3, s_{rel} i.A. < 6%)

Modellarzneistoffe	c_S Wasser (mg/100ml)	c_S Paraffin (mg/100ml)	c_S Octanol (mg/100ml)
3-(4'-Methylbenzyliden)campher	0,21 ¹⁾	11.540	31.760 ¹⁾
Triclosan	1,66 ¹⁾	7.604	85.240 ¹⁾
Nabumeton	0,84 ²⁾	351 ²⁾	2.457 ²⁾
2-Phenylphenol	79,5 ¹⁾	6.055	73.760 ¹⁾
Ethylnicotinat	4.700 ³⁾	13.560	103.400 ³⁾
Guaifenesin	8.157	18,62	30.180* ⁴⁾
Etofyllin	7.367	0,089	3.451* ⁴⁾

* aus $VK_{Octanol/Wasser}$ berechnet

¹⁾ (22)

²⁾ (67)

³⁾ (36)

⁴⁾ (21) bei 37°C

Die Wasserlöslichkeiten der einzelnen Substanzen unterscheiden sich um bis zu fünf Zehnerpotenzen und die Löslichkeiten in Paraffin sogar bis zu sechs Zehnerpotenzen. Betrachtet man die Sättigungskonzentrationen nur eines Arzneistoffs in beiden Vehikeln, so sind im Extremfall, wie bei 3-(4'-Methylbenzyliden)campher und Etofyllin, Löslichkeitsunterschiede von fünf Zehnerpotenzen zu verzeichnen. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass die Arzneistofflösungen in der Probandenstudie nicht in gleicher thermodynamischer Aktivität einsetzbar sind, da die Arzneistoffbelastung für die Probanden zu hoch und auch die analytische Bestimmung problematisch wäre.

Die Literaturdaten der Löslichkeiten in Octanol sind aus Gründen der Vollständigkeit mit aufgeführt. Sie sind für die Berechnung der Verteilungskoeffizienten (Kap. III 1.4.1) notwendig.

1.4 Lipophilieparameter

Der gängigste Parameter zur Charakterisierung der Lipophilie von Substanzen ist der Verteilungskoeffizient zwischen organischer und wässriger Phase. Verteilungskoeffizienten können durch Ausschütteln experimentell bestimmt oder auch mit Hilfe eines Inkrementsystems berechnet werden (49, 55). Bewährt haben sich auch chromatographische Methoden, mit denen sich ein dem Verteilungskoeffizienten vergleichbarer Lipophilieparameter ermitteln lässt (Kap. III 1.4.2).

1.4.1 Verteilungskoeffizienten

Verteilungskoeffizienten zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen stellen einerseits einen allgemeinen Lipophilieparameter dar. Andererseits werden sie bei der Wahl bestimmter Lösungsmittel auch zur Charakterisierung von Verteilungsvorgängen insbesondere zwischen Biomembranen und verschiedenen Vehikeln eingesetzt. Um die Verteilung eines Arzneistoffs zwischen Stratum corneum und einem Vehikel zu simulieren, wird meist Octanol als Modelllipid für das Stratum corneum herangezogen und der Verteilungskoeffizient zwischen Octanol und Vehikel, i.d.R. Wasser ($VK_{\text{Octanol/Wasser}}$), bestimmt (34).

Die Verwendung von Octanol als Modelllipid wird jedoch zunehmend als nicht ideal betrachtet und in der Literatur finden sich alternative Modelllipide wie Butanol (40), Amylcaproat (60) aber auch Liposomenzubereitungen (4).

In diesem Zusammenhang gibt Collander einen Ansatz zum Vergleich verschiedener Verteilungssysteme mit unterschiedlichen organischen Lösungsmitteln (11):

Collander untersuchte die Verteilung einer Reihe von Substanzen zwischen variierenden organischen Lösungsmitteln und Wasser und stellte folgende empirisch gefundene Beziehung zwischen dem Verteilungskoeffizienten eines

gewählten Standardsystems $VK_{\text{Lipoid}^{\text{ST}}/\text{Wasser}}$ und den Verteilungskoeffizienten weiterer Verteilungssysteme mit abweichender organischer Phase $VK_{\text{Lipoid}^{\text{X}}/\text{Wasser}}$ auf.

$$\log VK_{\text{Lipoid}^{\text{X}}/\text{Wasser}} = a \cdot \log VK_{\text{Lipoid}^{\text{ST}}/\text{Wasser}} + b \quad \text{Gl. 15}$$

a, b Konstanten

Die Konstanten a und b dienen zur Charakterisierung der Unterschiede im Lipophilieverhältnis zwischen den verschiedenen Verteilungssystemen. Die Steigung a gibt einen Hinweis auf die Polarität der organischen Phase, d.h. je größer a, desto lipophiler die organische Phase. Bei $a < 1$ ist der Polaritätsunterschied zwischen den beiden Phasen kleiner als im Standardsystem und bei $a > 1$ größer. Der Ordinatenabschnitt b gibt für $VK_{\text{Lipoid}^{\text{ST}}/\text{Wasser}} = 1$ direkt den $VK_{\text{Lipoid}^{\text{X}}/\text{Wasser}}$ an.

Die Anwendung dieser Gleichung reduziert die Lösungseigenschaften der organischen Phase auf ihre Polarität. Spezielle Lösungseigenschaften z.B. aufgrund unterschiedlicher funktioneller Gruppen sind hier nicht erfasst und führen zu Abweichungen.

Die Gleichung nach Collander kann auch genutzt werden, um Verteilungskoeffizienten zwischen Stratum corneum und Wasser mit Hilfe der Verteilungssysteme zwischen einem der oben genannten Modelllipide und Wasser zu beschreiben.

Der Verteilungskoeffizient einer Substanz zwischen zwei nicht mischbaren Phasen lässt sich einerseits experimentell durch Ausschütteln, aber andererseits auch rechnerisch aus den Sättigungskonzentrationen in den beiden Phasen bestimmen.

$$VK_{X/Y} = \left(\frac{c_{sX}}{c_{sY}} \right)$$

Gl. 16

$VK_{X/Y}$ Verteilungskoeffizient eines Arzneistoffs zwischen Phase X und Y
 c_{sX}, c_{sY} Sättigungskonzentration eines Arzneistoffs in Phase X bzw. Y

Zwischen den nach Gl. 16 berechneten und den experimentell gewonnenen Verteilungskoeffizienten sind Unterschiede zu erwarten, da sich immer eine gewisse Menge der einen Phase in der anderen löst und somit beim Ausschütteln nicht die reinen Phasen vorliegen. Das bedeutet z.B. für den experimentellen $VK_{Oct/W}$, dass die Sättigungskonzentration der Arzneistoffe in der octanolgesättigten Wasserphase und in der wassergesättigten Octanolphase bestimmt werden.

Vorteil der rechnerischen Methode ist, dass auch Verteilungskoeffizienten aus zwei mischbaren Lösungsmitteln ermittelbar sind. Von Interesse ist in dieser Arbeit u.a. der Verteilungskoeffizient zwischen Octanol und Paraffin $VK_{Oct/Par}$, um die Verteilung zwischen Stratum corneum und dem Vehikel Paraffin zu simulieren. Die Darstellung der Verteilung zwischen einer geschwindigkeitsbestimmenden wässrigen Barriere (Kap. II 3.1) und dem Vehikel Paraffin wird durch den $VK_{W/Par}$ angenähert.

Tab. 4: Vergleich der Logarithmen verschiedener Verteilungskoeffizienten

Modellarzneistoffe	log VK_{Oct/W}[*]	log VK_{W/Par}^{**}	log VK_{Oct/Par}^{**}
3-(4'-Methylbenzyliden)campher	5,13 ¹⁾	-4,74	0,44
Triclosan	4,53 ¹⁾	-3,66	1,05
Nabumeton	3,29 ²⁾	-2,62	0,85
2-Phenylphenol	3,07 ¹⁾	-1,88	1,09
Ethylnicotinat	1,34 ³⁾	-0,46	0,88
Guaifenesin	0,57 ⁴⁾	2,64	3,21
Etofyllin	-0,46 ⁴⁾	4,92	4,59

* Literaturdaten experimentell bestimmter VK-Werte

** VK-Werte berechnet aus den Sättigungskonzentrationen Tab. 3

¹⁾ (22)

²⁾ (67)

³⁾ (36)

⁴⁾ (21) bei 37°C

Die ausgewählten Modellarzneistoffe umfassen einen $VK_{\text{Octanol/Wasser}}$ -Bereich von sechs Zehnerpotenzen und decken somit ein breites Hydrophilie-Lipophilie-Spektrum ab. Tab. 4 zeigt deutlich, dass der $VK_{\text{Wasser/Paraffin}}$ dem $VK_{\text{Octanol/Wasser}}$ gegenläufig ist: Lipophile Substanzen haben einen hohen $VK_{\text{Octanol/Wasser}}$ und einen kleinen $VK_{\text{Wasser/Paraffin}}$. Umgekehrtes gilt für hydrophile Arzneistoffe. Aufgrund der guten Lösungseigenschaften von Octanol für hydrophile und lipophile Substanzen, ist eine Reihenfolge beim $VK_{\text{Octanol/Paraffin}}$ nur tendenziell zu verzeichnen.

1.4.2 R_{MW} -Werte

Es ist auch möglich, die Verteilung einer Substanz zwischen lipophiler und wässriger Phase chromatographisch zu ermitteln.

Diese chromatographischen Lipophiliebestimmungen werden überwiegend mittels Verteilungschromatographie an Reversed-Phase(RP-18)-Systemen durchgeführt. In der HPLC ist der zu bestimmende Parameter der Kapazitätsfaktor (10). Weniger aufwändig in Bezug auf Durchführung und Methodenentwicklung ist die dünnschichtchromatographische Bestimmung von Lipophilieparametern (14, 15). Aufgrund des Zusammenhangs zwischen Lipophilie und Laufstrecke einer Substanz werden bei dieser Methode die R_F -Werte bestimmt.

Die Modellarzneistoffe werden an RP-18-DC-Platten mit wässrigen mobilen Phasen eluiert, die einen variierenden Gehalt an organischem Modifier enthalten. Da die Verteilung der Substanzen in die stationäre Phase deutlich von den Eigenschaften der mobilen Phase und somit von den Eigenschaften des Modifiers (z.B. Dipolmoment oder Protonendonatoreigenschaften) abhängt, ist ein dem Wasser physikalisch-chemisch ähnlicher Modifier wie Methanol vorzuziehen. Zusätzlich wurde eine Versuchsreihe mit Acetonitril-Wasser-Mischungen durchgeführt, da eine polare Fließmittelmischung aus Wasser und Methanol sich erwartungsgemäß zu wenig differenzierend auf die lipophilen Modellarzneistoffe auswirkt.

Zur Ermittlung der thermodynamischen R_F -Werte aus den Laufstrecken der Substanzen ist die Kenntnis der sogenannten thermodynamisch wahren Position der Fließmittelfront notwendig, die allerdings nicht mit der sichtbaren Front übereinstimmt. Die thermodynamische Fließmittelfront ist vergleichbar mit der Totzeit bei der HPLC. Zu ihrer Bestimmung werden im Allgemeinen anorganische Salze verwendet.

Die Laufstrecke von Kaliumjodid beträgt definitionsgemäß 99% der thermodynamisch wahren Fließmittelfront, so dass nach Gl. 17 aus der Laufstrecke einer Substanz und der Laufstrecke von Kaliumjodid der thermodynamische R_F -Wert zu berechnen ist (14):

$$R_F = \frac{\text{Laufstrecke Substanz}}{\text{Laufstrecke Kaliumjodid}} \cdot 0,99 \quad \text{Gl. 17}$$

R_F thermodynamischer R_F -Wert

Je lipophiler eine chromatographierte Substanz, desto niedriger ist ihr R_F -Wert. Um einen direkten Zusammenhang zwischen Lipophilie und Laufstrecke herzustellen, wird aus dem R_F -Wert ein sogenannter R_M -Wert nach folgender Formel berechnet (15):

$$R_M = \log\left(\frac{1}{R_F} - 1\right) \quad \text{Gl. 18}$$

Der R_M -Wert entspricht dem Verteilungskoeffizienten zwischen RP-18-Phase und dem jeweiligen Fließmittelgemisch. Die R_M -Werte lassen sich für jede Fließmittelmischung berechnen und gegen den Gehalt an Modifier in der Mischung auftragen. Die R_M -Werte liegen auf einer Geraden und nach Extrapolation dieser Geraden auf die Ordinate, d.h. Extrapolation auf modifizierfreies Fließmittel, kann der R_{MW} -Wert im Schnittpunkt abgelesen werden. Dies ist der R_M -Wert, der sich bei Verwendung von reinem Wasser als Fließmittel ergeben würde (Abb. 3).

Für hydrophile Testsubstanzen sind in der Literatur Abweichungen von der Linearität der R_M -Werte bei hohen Modifikonzentrationen beschrieben (15). Diese Abweichungen (silanophiler Effekt) beruhen auf polaren Wechselwirkungen zwischen der Substanz und freien, nicht veretherten Silanolgruppen des RP-18-Materials. Bei hohem Wassergehalt sind diese freien Silanolgruppen ausreichend durch Wassermoleküle geschützt, bei geringem Wassergehalt können sie jedoch Interaktionen eingehen, d.h. Normalphasen-Verhalten zeigen. Bei den untersuchten Modellarzneistoffen wurde aber keine signifikante Abweichung bei hohen Modifizieranteilen gefunden.

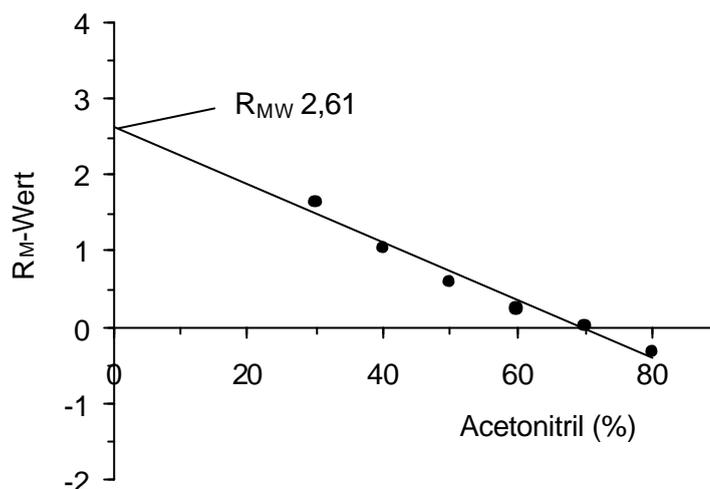


Abb. 3: Auftragung der R_{MW} -Werte von 2-Phenylphenol gegen den Acetonitrilgehalt der verwendeten Acetonitril-Wasser-Mischungen (V/V), Bestimmung des R_{MW} -Wertes durch Extrapolation

Tab. 5 listet die Ergebnisse der R_{MW} -Wert-Bestimmungen auf:

Tab. 5: Vergleich der R_{MW} -Werte mit Acetonitril (R_{MW}^{ACN}) und Methanol (R_{MW}^{MeOH}) als Modifizier

Modellarzneistoffe	R_{MW}^{ACN}	R_{MW}^{MeOH}
3-(4'-Methylbenzyliden)campher	4,02	6,72
Triclosan	3,71	4,88
Nabumeton	2,74	3,57
2-Phenylphenol	2,61	2,98
Ethylnicotinat	1,44	2,28
Guaifenesin	0,80	1,28
Etofyllin	0,04	0,72

Der Vergleich der beiden R_{MW} -Werte mit den $\log VK_{Octanol/Wasser}$ -Werten aus Tab. 5 zeigt deutlich, dass alle drei Parameter in der gleichen Größenordnung liegen. Entsprechend den Angaben in der Literatur liegen die R_{MW}^{ACN} -Werte etwas niedriger als die R_{MW}^{MeOH} -Werte. Abb. 4 und 5 zeigen die Korrelationen der

beiden R_{MW} -Werte mit dem $\log VK_{\text{Octanol/Wasser}}$. Die Korrelation des R_{MW}^{ACN} mit $\log VK_{\text{Octanol/Wasser}}$ ist eindeutig besser als die des R_{MW}^{MeOH} .

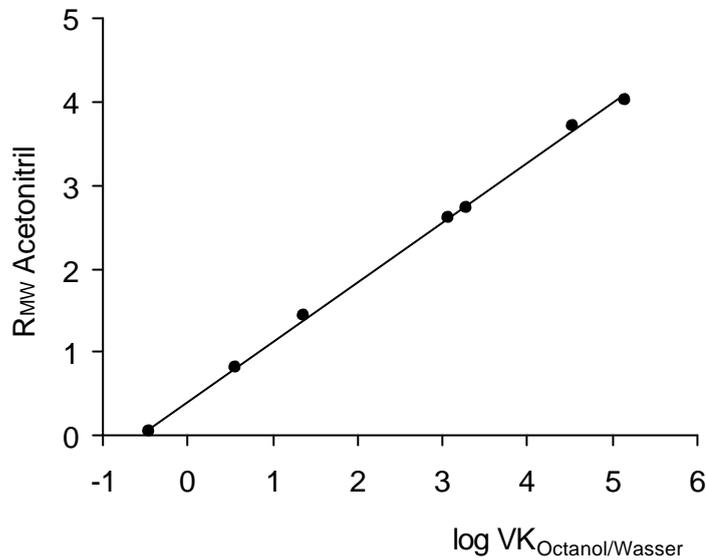


Abb. 4: Korrelation der R_{MW}^{ACN} -Werte mit $\log VK_{\text{Octanol/Wasser}}$ -Werten
 $R_{MW}^{\text{ACN}} = 0,716 \log VK_{\text{Oct/W}} + 0,403; r^2=0,999$

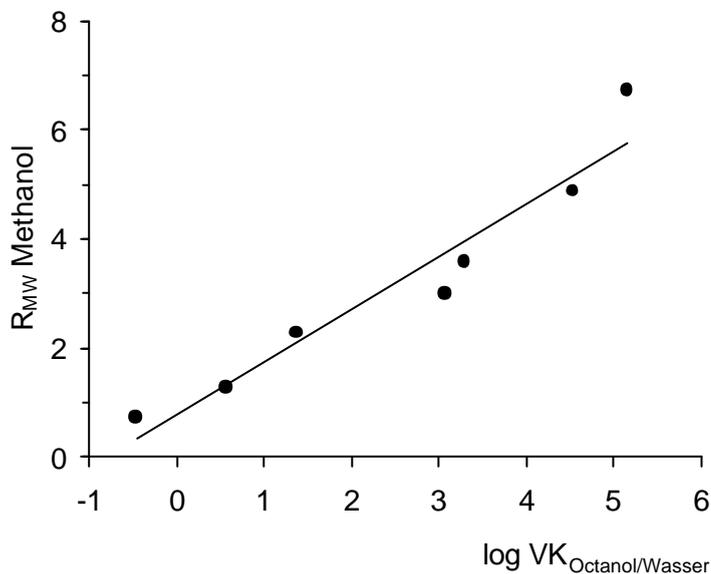


Abb. 5: Korrelation der R_{MW} -Werte mit $\log VK_{\text{Octanol/Wasser}}$ -Werten
 $R_{MW}^{\text{MeOH}} = 0,967 \log VK_{\text{Oct/W}} + 0,785; r^2=0,926$

Betrachtet man die Regressionsgleichungen im Hinblick auf die Gleichung von Collander, so ist zu erkennen, dass der Regressionskoeffizient von R_{MW}^{MeOH} vs.

$\log V_{K_{\text{Octanol/Wasser}}}$ nur geringfügig vom Wert 1 abweicht, d.h. die Polaritäten der beiden lipophilen Phasen (RP-18 und Octanol) sind sich sehr ähnlich. Aufgrund der besseren Korrelation wird aber im weiteren Verlauf der Arbeit der $R_{\text{MW}}^{\text{ACN}}$ als Lipophilieparameter herangezogen.

2. In-vivo-Studien zur perkutanen Resorption menschlicher Haut

2.1 Durchführung der Probandenversuche

2.1.1 Kammermodell

Die In-vivo-Studien lassen sich mit dem Kammermodell durchführen (42). Bei dieser Methode werden gewölbte Glaskammern eingesetzt, die in einem Drahtgestell mit elastischen Binden am Oberarm der Probanden zu befestigen sind. An jedem Oberarm können zwei Glaskammern befestigt werden. Das Füllvolumen der Kammern beträgt je nach Kammer und Auflagedruck 1,5 bis 4,5 ml. Durch die Applikationsfläche von 12 bis 13,5 cm² wird ein großes Flächen-Volumen-Verhältnis erreicht, so dass auch bei geringer Permeabilität der Arzneistoffe noch eine Erfassung der Konzentrationsabnahmen möglich ist. Das Entleeren der am Oberarm fixierten Kammern ermöglicht ein Einfüllstutzen. Die arzneistoffhaltige Lösung ist mit Hilfe einer Spritze mit flexibler PTFE-Kanüle luftblasenfrei in den Hohlraum zwischen Glaskammer und Oberarm einzufüllen. Aus der Differenz der Ausgangskonzentration zu Versuchsbeginn und der Konzentration der Arzneistofflösung nach Entnahme, lässt sich die Menge Arzneistoff ermitteln, die in diesem Zeitraum das Vehikel verlassen hat. Die Frage, ob die verschwundene Arzneistoffmenge im Stratum corneum kumuliert oder auch in tiefer liegende Hautschichten abtransportiert wird, kann erst anhand von Penetrationsprofilen geklärt werden. Problematisch in Bezug auf die Vergleichbarkeit mit anderen topischen Applikationen ist die starke Okklusion der Haut, die bei dieser Versuchsdurchführung unumgänglich ist.

2.1.2 Hautextraktivstoffe

Vor Beginn der Permeationsuntersuchungen sind Vorversuche mit den wirkstofffreien Vehikeln, Wasser und dünnflüssigem Paraffin, durchzuführen, um das Ausmaß der Stoffe zu bestimmen, die sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen aus der Haut herauslösen. Paraffin bzw. Wasser wird in die befestigten Glaskammern gefüllt, nach einer Stunde entnommen und spektral-photometrisch vermessen. Die selbe Kammer ist erneut mit frischem Vehikel zu befüllen, um nach einer weiteren Stunde die Hautextraktivstoffe zu messen, die sich nach zweistündiger Vehikelbehandlung noch aus der Haut herauslösen. Nach dieser Methode wird sechs Stunden lang verfahren. Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch an einem Probanden das Spektrum der Hautextraktivstoffe zu jeder Stunde.

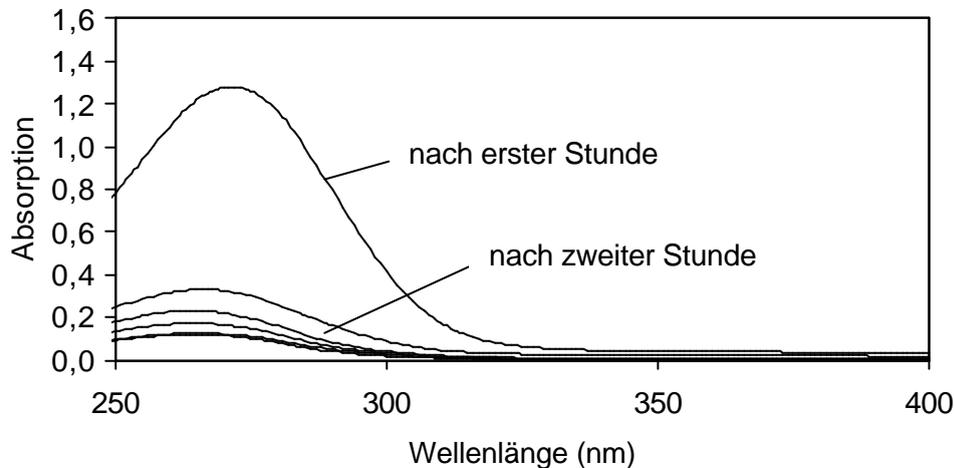


Abb. 6: Hautextraktivstoffe bei Verwendung von Wasser als Vehikel, Proband Nr. 1

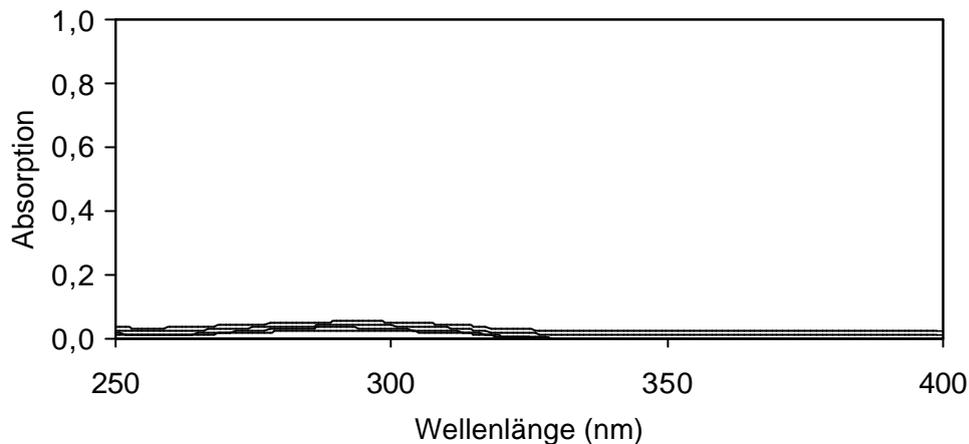


Abb. 7: Hautextraktivstoffe bei Verwendung von Paraffin als Vehikel, Proband Nr.3

Die Abbildungen zeigen, dass Wasser insgesamt deutlich mehr Stoffe aus der Haut herauslöst als Paraffin. Da die Absorption der Hautextraktivstoffe auch nach einer praktikablen Vorbehandlungszeit mit reinem Vehikel von ein bis zwei Stunden zu hoch ist, um geringe Konzentrationsdifferenzen im arzneistoffhaltigen Vehikel spektralphotometrisch vermessen zu können, müssen die Ausgangs- und Entnahmekonzentrationen der Probandenversuche mittels HPLC bestimmt werden.

2.1.3 Penetrationsprofile

Grundsätzlich ist der Arzneistoffflux in die Haut zu Beginn eines Versuchs relativ hoch bis, unter Voraussetzung von Sink-Bedingungen, ein quasistationärer Zustand erreicht ist. Aufgrund der sinkenden Ausgangskonzentration im Donator nimmt der Arzneistoffflux im quasistationären Zustand nach Kinetik erster Ordnung weiter ab. In diesem quasistationären Zustand ist die Arzneistoffmenge im Stratum corneum annähernd konstant, d.h. die aus dem Vehikel in das Stratum corneum diffundierende Menge Arzneistoff ist gleich der Menge, die aus dem Stratum corneum in tiefer liegende Hautschichten abtransportiert wird.

Um im quasistationären Zustand konstante Arzneistofffluxe (Steady-state) zur Berechnung der Permeabilität zu erhalten, muss die Ausgangskonzentration des Arzneistoffs im Vehikel über den gesamten Zeitraum des Versuchs annähernd konstant gehalten werden. Zur Einstellung dieses sogenannten Steady-state-Zustands sind die applizierten Arzneistofflösungen während der gesamten Versuchsdauer mehrfach durch frische Ausgangslösungen zu ersetzen. Substanzen, die aufgrund ihrer geringen Löslichkeit im Vehikel nur in relativ geringer Konzentration aber in hoher thermodynamischer Aktivität eingesetzt werden können, entleeren sich schneller und sind somit öfter auszutauschen als Lösungen höherer Konzentrationen. Zur Abschätzung des notwendigen Austauschintervalls sind für einen hydrophilen Modellarzneistoff (Guaifenesin) und einen lipophilen Arzneistoff (2-Phenylphenol) in Paraffin beispielhaft Penetrationsprofile erstellt.

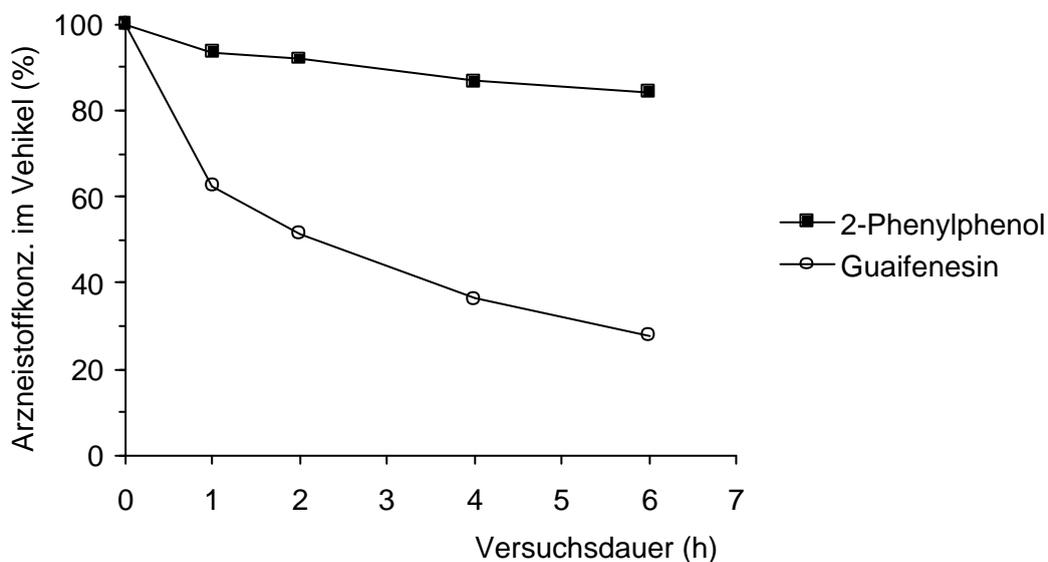


Abb. 8: Penetrationsprofil von 2-Phenylphenol (26,4mg/100ml, $a_{th}=0,004$) und Guaifenesin (6,4mg/100ml, $a_{th}=0,34$) in Paraffin ohne Vehikelaustausch

Abb. 8 zeigt, dass in der ersten Stunde in beiden Fällen die größte Arzneistoffmenge aus dem Vehikel verschwindet, da sich zunächst Arzneistoff im Stratum corneum anreichert. Danach nimmt die Geschwindigkeit der Konzentrationsabnahme ab, da der quasistationäre Zustand erreicht wird.

Aufgrund der sinkenden Arzneistoffkonzentration im Vehikel nimmt die Arzneistoffmenge, die das Vehikel zu jeder Versuchsstunde verlässt, entsprechend dem 1. Fickschen Gesetz nach Kinetik erster Ordnung auch im quasistationären Zustand weiter ab. In Abb. 9 ist die Abnahme der Arzneistoffkonzentration im Vehikel logarithmisch gegen die Versuchsdauer aufgetragen, um die Kinetik der Arzneistoffpenetration zu beurteilen. Die logarithmierte Arzneistoffkonzentration verläuft bereits nach ein bis zwei Versuchsstunden linear zur Versuchsdauer, d.h. nach Kinetik erster Ordnung.

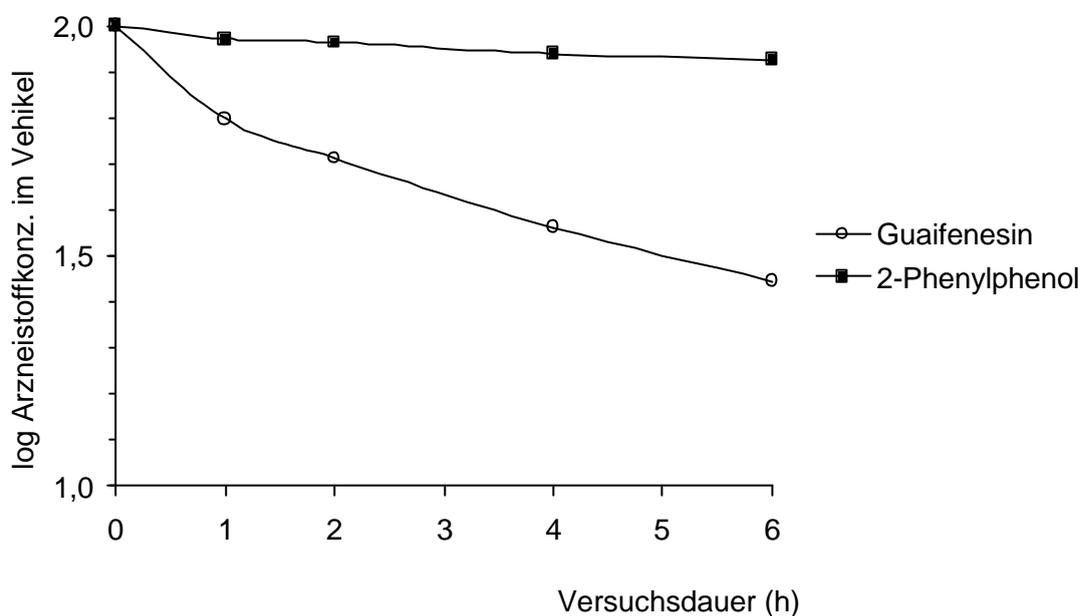


Abb. 9: Prüfung auf Kinetik erster Ordnung: Auftragung des Logarithmus der abnehmenden Arzneistoffkonzentration von 2-Phenylphenol ($a_{th}=0,004$) und Guaifenesin ($a_{th}=0,34$) im Vehikel Paraffin gegen die Versuchsdauer ohne Vehikelaustausch
Arzneistoffkonzentration in [%]

Wegen der geringen Ausgangskonzentration der Guaifenesinlösung bei hoher thermodynamischer Aktivität sinkt die prozentuale Arzneistoffkonzentration im Vehikel schnell ab. 2-Phenylphenol ist in Paraffin gut löslich und lässt sich deshalb in höherer Konzentration applizieren. Somit ist für die 2-Phenylphenollösung aufgrund der höheren Ausgangskonzentration und niedriger thermodynamischer Aktivität die relative Konzentrationsabnahme im Vehikel geringer.

Verallgemeinernd wird aus diesen Penetrationsprofilen folgendes Schema zum Vehikelaustausch für die Arzneistofflösungen abgeleitet:

Nach der ersten Versuchsstunde, die als Konditionierungsphase anzusehen ist, wird jede Arzneistofflösung durch frische Ausgangslösung ersetzt. Danach sind Lösungen, die wegen der begrenzten Löslichkeit des Arzneistoffs nur in geringen Konzentrationen appliziert werden können, stündlich zu erneuern. Arzneistofflösungen, die bei höherer Ausgangskonzentration eine geringe thermodynamische Aktivität aufweisen, sind nur alle 2 Stunden auszutauschen. Für Lösungen extrem geringer thermodynamischer Aktivität müssen die Austauschintervalle noch größer gewählt werden (maximal 5 Stunden), um analytisch messbare Konzentrationsabnahmen zu erzielen.

2.1.4 Versuchsplanung

Zum direkten Vergleich ist jede Substanz in beiden Vehikeln an einem Probanden zu applizieren. Aufgrund der zu erwartenden interindividuellen Schwankungen zwischen den Probanden läuft 2-Phenylphenol als Standard in beiden Vehikeln bei jedem Versuch mit. Daraus folgt, dass sich an einem Probanden nur ein Modellarzneistoff und der Standard jeweils in Wasser und Paraffin applizieren lässt. Die Arzneistoffe sind im Lateinischen Quadrat über die vier Oberarmpositionen anzuordnen, so dass jeder Arzneistoff beim Übergang von Proband zu Proband auf den nächsten Applikationsort, d.h. die nächste Oberarmposition rotiert. Auf diese Weise soll der eventuelle Einfluss eines Positionseffekts auf die Permeabilitätsdaten ausgeschaltet werden. Bei früheren Untersuchungen ließ sich jedoch kein Positionseffekt feststellen (22, 67). Jede Substanz ist an mindestens vier Probanden zu testen. Die Versuche werden über eine Dauer von sieben Stunden an hautgesunden Probanden im Alter von 22-32 Jahren durchgeführt.

Die verwendeten Arzneistofflösungen weisen unterschiedliche thermodynamische Aktivitäten auf. Würde man eine Substanz, die extrem unterschiedliche

Löslichkeiten in Wasser und Paraffin zeigt, in der selben thermodynamischen Aktivität in beiden Vehikeln einsetzen, dann müsste die Substanz in dem Vehikel mit der hohen Löslichkeit in einer extrem hohen Konzentration appliziert werden. Dies ist wegen der Überschreitung üblicher Anwendungskonzentrationen zu vermeiden. Außerdem sind sehr hohe Konzentrationen für eine HPLC-Analytik unpraktikabel.

2.1.5 Auswertung der Probandenversuche

Entsprechend den Austauschintervallen erhält man jede oder alle zwei Stunden Proben, deren Arzneistoffkonzentrationen sich mittels HPLC bestimmen lassen. Bevor diese Konzentrationen zur Berechnung der penetrierten Arzneistoffmengen und der Permeabilität herangezogen werden können, ist für jedes Versuchsintervall ein Korrekturfaktor zu berechnen, mit dem die Ausgangskonzentration im Vehikel zu multiplizieren ist. Dieser Korrekturfaktor berücksichtigt, dass nach jedem Entleeren der Glaskammern während des Versuchs ein Restvolumen verbleibt, das eine Verdünnung der neu eingefüllten Arzneistofflösung des nächsten Intervalls zur Folge hat. Aus den Vehikelkonzentrationen zum Entnahmezeitpunkt t und der korrigierten Ausgangskonzentration c_0 ist die Penetrationsgeschwindigkeitskonstante zu berechnen. Entsprechend dem 1. Fickschen Diffusionsgesetz lässt sich die Permeation eines Arzneistoffs durch die Haut durch Kinetik erster Ordnung beschreiben.

Beträgt die Konzentrationsabnahme der applizierten Lösung während eines Messintervalls weniger als 10%, dann kann man für die Arzneistoffabnahme im Vehikel vereinfachend Kinetik nullter Ordnung annehmen.

In Abb. 10 ist das Penetrationsprofil von Guaifenesin und 2-Phenylphenol in Paraffin dargestellt, das sich bei einem ein- bzw. zweistündigen Austauschintervall ergibt. Der Steady-state-Zustand wird nach drei bis vier Stunden erreicht. Die Lösung von 2-Phenylphenol in Paraffin zeigt trotz eines zweistündigen Austauschintervalls eine Konzentrationsabnahme im Vehikel von weniger als 10%.

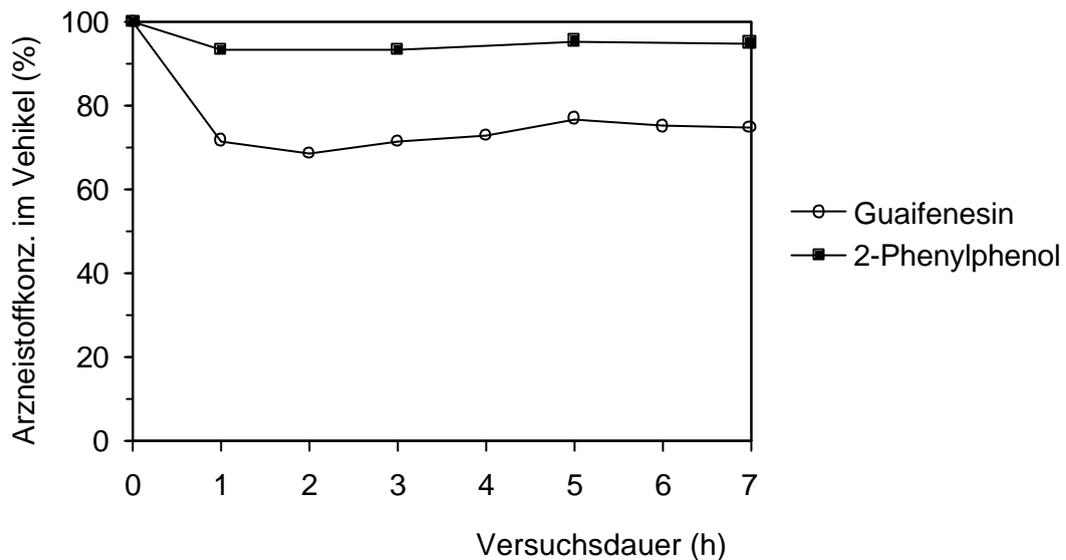


Abb. 10: Penetrationsprofil von 2-Phenylphenol (26,4mg/100ml) und Guaifenesin (6,4mg/100ml) in Paraffin mit Vehikelaustausch

Die Penetrationskonstante nullter Ordnung kp_0 wird durch die Konzentrationsdifferenz im Zeitintervall berechnet:

$$-\frac{dc}{dt} = \frac{D_B \cdot F \cdot VK_{B/V}}{d_B \cdot V} \cdot c_0 = kp_0 \quad \text{Gl. 19}$$

$$kp_0 = \frac{c_0 - c_t}{\Delta t} \quad \text{Gl. 20}$$

- kp_0 Penetrationsgeschwindigkeitskonstante nullter Ordnung
- c_0 korrigierte Ausgangskonzentration des Arzneistoffs im Vehikel
- c_t Arzneistoffkonzentration zum Zeitpunkt t
- Δt Zeitintervall (h)

Die Permeabilität P_B berechnet sich nach Gl. 21 aus der Penetrationsgeschwindigkeitskonstanten kp_0 , dem Volumen der applizierten Arzneistofflösung V , der Applikationsfläche F und der Ausgangskonzentration im Vehikel:

$$P_B = kp_0 \cdot \frac{V}{F \cdot c_0} \quad \text{Gl. 21}$$

Trotz stündlicher Erneuerung der Lösung von Guaifenesin in Paraffin nimmt die Arzneistoffkonzentration im Vehikel während eines Austauschintervalls um 20 - 30% ab. Für diesen Fall muss die Penetrationsgeschwindigkeitskonstante erster Ordnung entsprechend Gl. 1 berechnet werden.

Aus Integration von Gl. 1 folgt:

$$\log c_t = \log c_0 - \frac{kp_1 \cdot t}{2,303} \quad kp_1 = \log \left(\frac{c_t}{c_0} \right) \cdot \frac{2,303}{t} \quad \text{Gl. 22}$$

Die Permeabilität ergibt sich nach:

$$P_B = kp_1 \cdot \frac{V}{F} \quad \text{Gl. 23}$$

Nach Kinetik erster Ordnung werden nur die Probandenversuche mit Etofyllin und Guaifenesin in Paraffin und 2-Phenylphenol, Nabumeton, Triclosan und 3-(4'-Methylbenzyliden)campher in wässriger Lösung ausgewertet.

Der maximale Flux J_{\max} berechnet sich aus den Permeabilitäten und der Sättigungskonzentration c_S im Vehikel nach Gl. 5.

Zur Auswertung eines Probandenversuchs sind zunächst für jedes Messintervall die Penetrationsgeschwindigkeitskonstante und die Permeabilität zu berechnen. Zur Ermittlung der Permeabilität im Steady-state werden die errechneten Permeabilitäten der vierten bis siebten Versuchsstunde gemittelt. Entsprechend wird mit den Permeabilitäten der Standardsubstanz 2-Phenylphenol verfahren. Aus den Permeabilitäten der Standardsubstanz aller Probandenversuche lässt sich die mittlere Permeabilität einer durchschnittlichen Haut bestimmen. In Wasser appliziert, ergibt sich für 2-Phenylphenol eine durchschnittliche Permeabilität von $0,107 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$ und in Paraffin von $0,00347 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$. Der Quotient aus Permeabilität des Standards jedes einzelnen Versuchs und durchschnittlicher Permeabilität des

Standards stellt einen weiteren Korrekturfaktor dar, mit dem die Permeabilität des Modellarzneistoffs des selben Probandenversuchs zu multiplizieren ist, um alle Permeabilitäten auf eine durchschnittlich permeable Haut zu beziehen. Erst danach lässt sich der Mittelwert für jeden Modellarzneistoff über die verschiedenen Probanden berechnen. Da für die erhaltenen Permeabilitäten aufgrund der geringen Probandenzahl mit dem Kolmogoroff-Smirnow-Test weder eine Normalverteilung noch eine log-Normalverteilung nachgewiesen werden kann, wird entsprechend der Literatur (69, 72) unter Annahme einer log-Normalverteilung der Hautpermeabilitäten der geometrische Mittelwert gebildet.

2.2 Hautpermeabilitäten

2.2.1 Ergebnisse der In-vivo-Studien

Tab. 6 stellt die Ergebnisse der in vivo ermittelten Hautpermeabilitäten für alle verwendeten Modellarzneistoffe aus Wasser und Paraffin gegenüber.

Tab. 6: Permeabilitäten aus Wasser und Paraffin im Steady-state ($\bar{X}_{geo} \pm S_g$; n=4)

Modellarzneistoffe	P_B Wasser (cm·h ⁻¹)		P_B Paraffin (cm·h ⁻¹)	
3-(4'-Methylbenzyliden)campher	0,299	+0,249 -0,136	0,00132	+0,00247 -0,00086
Triclosan	0,357	+0,130 -0,095	0,00133	+0,00025 -0,00021
Nabumeton	0,109	+0,042 -0,030	0,00233	+0,00340 -0,00138
2-Phenylphenol	0,107	+0,084 -0,047	0,00347	+0,00259 -0,00148
Ethylnicotinat	0,0285	+0,0035 -0,0031	0,0141	+0,0213 -0,0086
Guaifenesin	0,00286	+0,00231 -0,00128	0,0470	+0,0239 -0,0159
Etofyllin	0,00306	+0,00201 -0,00121	0,104	+0,027 -0,021

Die Permeabilitäten aus Wasser liegen im Bereich von 0,00286 cm·h⁻¹ (Guaifenesin) bis 0,357 cm·h⁻¹ (Triclosan). Bei der Verwendung von Paraffin als Vehikel sind sie etwas geringer und liegen im Bereich von 0,00132 cm·h⁻¹ (3-(4'-Methylbenzyliden)campher) bis 0,104 cm·h⁻¹ (Etofyllin). Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Permeabilität der Haut für einen Arzneistoff in Abhängigkeit vom Vehikel stark ändert. Für die meisten Arzneistoffe sind Änderungen von ca. zwei Zehnerpotenzen zu verzeichnen. Mit Ausnahme der sehr hydrophilen Arzneistoffe Guaifenesin und Etofyllin weisen alle Modellsubstanzen appliziert in wässrigem Vehikel höhere Permeabilitäten auf als bei der Verwendung von Paraffin als

Vehikel. Die Standardabweichungen sind erwartungsgemäß relativ hoch und liegen in Einzelfällen bei fast 200%.

2.2.2 Korrelation der Permeabilitäten mit R_{MW} -Werten

Entsprechend den Ausführungen in Kap. II 2.1 ist der Logarithmus der Hautpermeabilität für die untersuchten Modellarzneistoffe, unter Voraussetzung ähnlicher Diffusionskoeffizienten, mit ihrer Lipophilie zu korrelieren.

Da in Abschnitt III 1.4 eine gute Korrelation der R_{MW}^{ACN} -Werte mit dem $\log VK_{Octanol/Wasser}$ festgestellt wurde, ist nun der Logarithmus der Permeabilitäten gegen die R_{MW}^{ACN} -Werte (Tab. 5) aufzutragen, um den Einfluss der Lipophilie der Modellarzneistoffe auf die Permeabilität der Haut in Abhängigkeit vom eingesetzten Vehikel beurteilen zu können.

Tab. 7: Logarithmus der Permeabilitäten aus Wasser und Paraffin ($\log \bar{X}_{geo} \pm s$; P_B in $[cm \cdot h^{-1}]$)

Modellarzneistoffe	$\log P_B$ Wasser	$\log P_B$ Paraffin
3-(4'-Methylbenzyliden)campher	$-0,524 \pm 0,263$	$-2,88 \pm 0,48$
Triclosan	$-0,447 \pm 0,135$	$-2,88 \pm 0,07$
Nabumeton	$-0,963 \pm 0,141$	$-2,63 \pm 0,39$
2-Phenylphenol	$-0,969 \pm 0,250$	$-2,46 \pm 0,24$
Ethylnicotinat	$-1,54 \pm 0,05$	$-1,85 \pm 0,40$
Guaifenesin	$-2,54 \pm 0,26$	$-1,33 \pm 0,19$
Etofyllin	$-2,52 \pm 0,22$	$-0,984 \pm 0,099$

2.2.2.1 Wasser als Vehikel

In Abb. 11 sind die logarithmierten, gemittelten Permeabilitäten bei der Verwendung von Wasser als Vehikel mit den jeweiligen R_{MW}^{ACN} -Werten der Modellarzneistoffe korreliert.

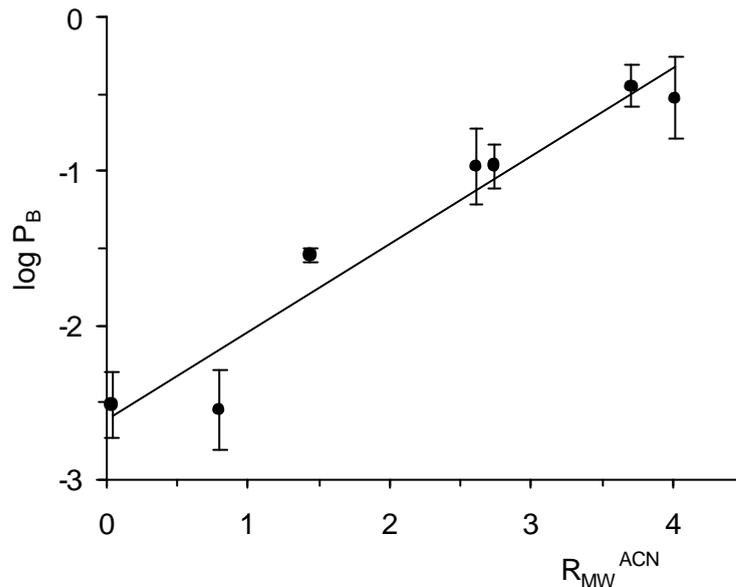


Abb. 11: Korrelation der In-vivo-Permeabilitäten aus Wasser mit den R_{MW}^{ACN} -Werten der Arzneistoffe, ($\log \bar{X}_{geo} \pm s$; $r^2 = 0,937$; P_B in [$\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$])

Es zeigt sich ein linearer Zusammenhang zwischen Logarithmus der Permeabilität und R_{MW}^{ACN} -Wert. Die Haut weist für die lipophilen Arzneistoffe mit den höheren R_{MW}^{ACN} -Werten erwartungsgemäß höhere Permeabilitäten als für die hydrophilen Substanzen auf, da das Stratum corneum eine lipophile Barriere darstellt. Ein deutlicher Übergang von einem linearen Bereich in eine Plateauphase bei steigender Lipophilie, aufgrund des beschriebenen zunehmenden Einflusses wässriger Schichten für extrem lipophile Stoffe, wird bei dieser Reihe der untersuchten Substanzen nicht gefunden (Kap. II 2.1). Nur bei Betrachtung des lipophilsten Modellarzneistoffs, 3-(4'-Methylbenzyliden)campher, ist keine Zunahme der Permeabilität im Vergleich zu Triclosan mehr festzustellen. Um in diesem Fall von einem Plateau sprechen zu können, wäre die Untersuchung

weiterer Substanzen höherer Lipophilie erforderlich, die sich jedoch aufgrund der unzureichenden Wasserlöslichkeit nicht untersuchen ließen.

Der sich aus der Graphik ergebende lineare Zusammenhang wird durch folgende Regressionsgleichung beschrieben:

$$\log P_B = 0,571 R_{MW}^{ACN} - 2,61 \quad \text{Gl. 24}$$

Mit Hilfe von Gl. 24 kann die Permeabilität eines niedermolekularen Arzneistoffs anhand ihres R_{MW}^{ACN} -Wertes abgeschätzt werden. Dies gilt nur, wenn als Vehikel Wasser ohne weitere Zusätze zum Einsatz kommt.

2.2.2.2 Paraffin als Vehikel

Abb. 12 zeigt die Abhängigkeit der gemittelten, logarithmierten Permeabilitäten von der Lipophilie der Modellarzneistoffe bei Verwendung des lipophilen Vehikels.

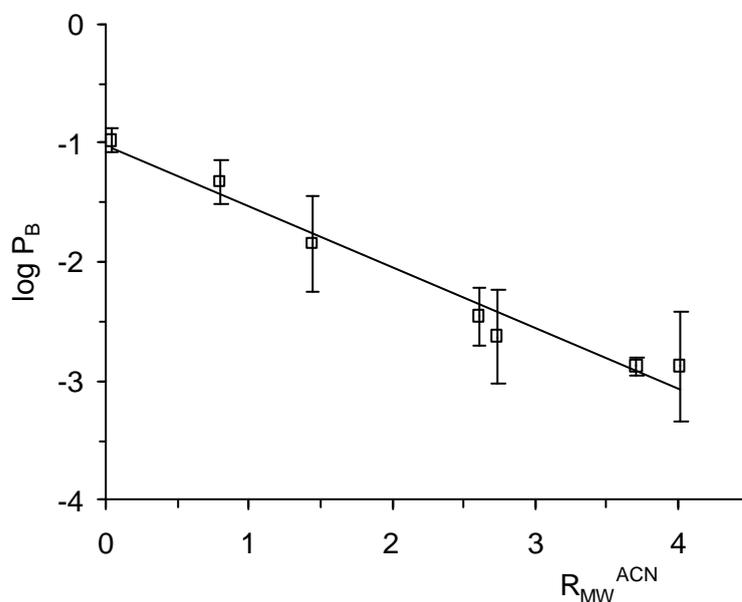


Abb. 12: Korrelation der In-vivo-Permeabilitäten aus Paraffin mit den R_{MW}^{ACN} -Werten der Arzneistoffe, ($\log \bar{X}_{geo} \pm s$; $r^2 = 0,966$; P_B in [$\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$])

Es zeigt sich ebenfalls ein linearer Zusammenhang zwischen Permeabilität und Lipophilie der Arzneistoffe, aber mit negativer Steigung. Bei Verwendung von Paraffin als Vehikel weist die Haut für die hydrophilen Modellarzneistoffe eine höhere Permeabilität auf als für die lipophilen. Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen von Blank (9), Lee et al. (39), Wenkers und Lippold (68), bei denen ebenfalls lipophile Vehikel verwendet wurden.

Der lineare Zusammenhang lässt sich durch folgende Regressionsgleichung beschreiben:

$$\log P_B = -0,506 R_{MW}^{ACN} - 1,04 \quad \text{Gl. 25}$$

Mit Hilfe dieser Gleichung ist es möglich die Hautpermeabilität für einen niedermolekularen Arzneistoff anhand seiner Lipophilie näherungsweise vorherzusagen, wenn Paraffin als Vehikel verwendet wird.

2.2.2.3 Hydrophiles und lipophiles Vehikel im Vergleich

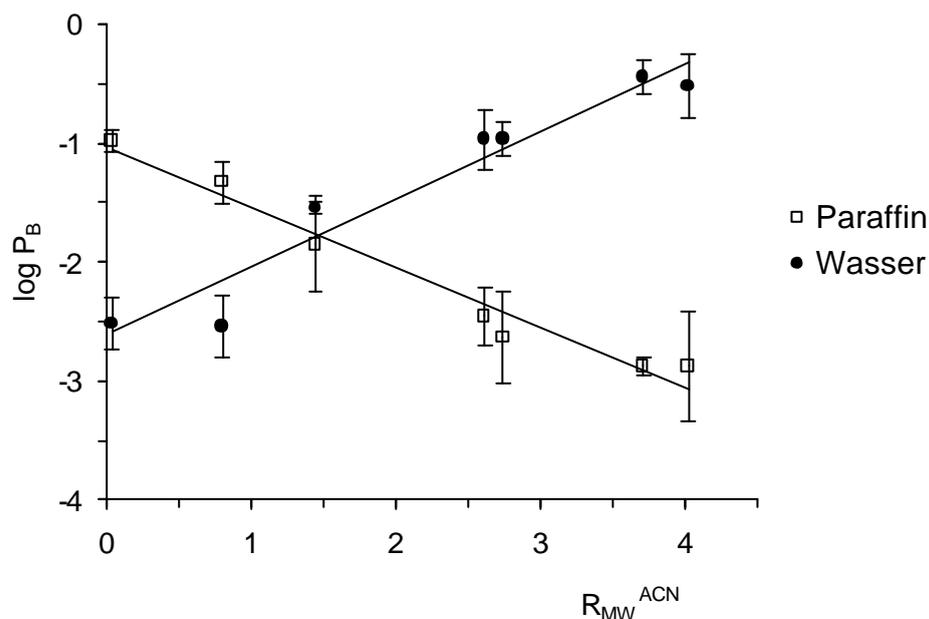


Abb. 13: Vergleich der In-vivo-Permeabilitäten aus Paraffin und Wasser, P_B in $[\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}]$

In Abb. 13 sind die beiden Korrelationen vergleichend in einem Diagramm dargestellt. Bei dieser Darstellung lässt sich die Hautpermeabilität einer Substanz aus beiden Vehikeln direkt vergleichen. Es wird deutlich, dass die Haut für lipophile Substanzen in wässriger Lösung auch absolut eine höhere Permeabilität aufweist als aus Paraffin. Umgekehrt erhält man für die hydrophilen Modellarzneistoffe Etofyllin und Guaifenesin höhere Permeabilitäten, wenn sie in Paraffin appliziert werden.

Nur Arzneistoffe wie Ethylnicotinat, die im Bereich des Schnittpunkts der beiden Regressionsgeraden liegen, zeigen in beiden Vehikeln ähnliche Permeabilitäten. Unter der Voraussetzung, dass bei Einsatz beider Vehikel das Stratum corneum die geschwindigkeitsbestimmende Barriere ist, lässt sich für Arzneistoffe im Bereich des Schnittpunktes folgende Näherung postulieren:

Da der Diffusionskoeffizient eines Arzneistoffs und die Dicke des Stratum corneum vom Vehikel nahezu unabhängig und somit gleich sein sollten, müssen auch die beiden Verteilungskoeffizienten aus den unterschiedlichen Vehikeln ins Stratum corneum gleich sein. Somit gilt näherungsweise für Ethylnicotinat (ETN):

$$VK_{SC/Paraffin}^{ETN} \sim VK_{SC/Wasser}^{ETN} \quad VK_{Paraffin/Wasser}^{ETN} \sim 1 \quad \text{Gl. 26}$$

Berechnet man für Ethylnicotinat den Verteilungskoeffizient zwischen den beiden Vehikeln aus den Sättigungskonzentrationen in Paraffin und Wasser (Tab. 3), so ergibt sich demgegenüber ein akzeptabler Wert von $VK_{Paraffin/Wasser}^{ETN}=2,9$.

Wenn entsprechend Kap. II. 3 die lebende Epidermis zur geschwindigkeitsbestimmenden Barriere bei Verwendung lipophiler Vehikel wird, gilt für Ethylnicotinat (ETN) nicht Gl. 26 sondern die folgende Gleichung:

$$VK_{EP/Paraffin}^{ETN} = VK_{SC/Wasser}^{ETN} \quad \text{Gl. 27}$$

Da die Löslichkeiten von Ethylnicotinat in der lebenden Epidermis (EP) und im Stratum corneum (SC) nicht bekannt sind, lässt sich diese Gleichung nicht überprüfen.

2.2.2 Diskussion der Ergebnisse

Der Vergleich der Permeabilitätsdaten mit Werten aus der Literatur zeigt einerseits, dass die ermittelten Permeabilitäten in der gleichen Größenordnung liegen und andererseits, dass die aus den Korrelationen erhaltenen Regressionsgeraden (Gl. 24 und 25) zur Vorhersage der Permeabilität einer Substanz anhand ihrer Lipophilie nur für Wasser und Paraffin und nicht allgemeingültig für hydrophile und lipophile Vehikel gelten.

Bei früheren Untersuchungen mit dem Kammermodell von Hagedorn-Leweke (22) wurde ein wässriges Vehikel mit 30% Propylenglycol eingesetzt, um die Löslichkeit der lipophilen Arzneistoffe im Vehikel zu erhöhen. Die in der früheren Studie ebenfalls verwendeten Substanzen 3-(4'-Methylbenzyliden)-campher, Triclosan und 2-Phenylphenol zeigten in dieser Vehikelmischung um Faktor drei bis fünf erniedrigte Permeabilitäten im Vergleich zu den Hautpermeabilitäten bei Einsatz des rein wässrigen Vehikels (Tab. 7). Aufgrund der erhöhten Löslichkeit der Substanzen um das 6 bis 13-fache in der Vehikelmischung im Vergleich zu Wasser verändert sich der $VK_{SC/Vehikel}$ der Substanzen zugunsten des Vehikels. Der kleinere Verteilungskoeffizient der Arzneistoffe führt entsprechend Gl. 2 zu einer geringeren Hautpermeabilität. Dies zeigt, dass selbst bei geringen Zusätzen anderer Lösungsmittel zum wässrigen Vehikel Abweichungen von Gl. 24 zu erwarten sind.

Auch bei lipophilen Vehikeln werden Permeabilitätsunterschiede bei Veränderung des Vehikels diskutiert. Wenkers (67) führte neben In-vivo-Permeabilitätsstudien mit dünnflüssigem Paraffin auch eine Untersuchung mit einem Vehikelgemisch von 10% Mittelkettigen Triglyceriden in Paraffin durch. Hierbei ließ sich neben einer erhöhten Löslichkeit ebenfalls eine Tendenz zur Verringerung der Permeabilität

bei Verwendung dieser Vehikelmischung verzeichnen. Somit dient auch Gl. 25 nur zur Permeabilitätsvorhersage, wenn reines Paraffin als Vehikel eingesetzt wird.

2.2.4 Modellvorstellungen

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass die Haut für einen Arzneistoff unterschiedliche Permeabilitäten aufweist, wenn dieser in unterschiedlichen Vehikeln appliziert wird. Die in Abb. 1 und 2 schematisch gezeichnete Abhängigkeit der Hautpermeabilität von der Lipophilie der Arzneistoffe lässt sich experimentell für die beiden Vehikel Wasser und Paraffin bestätigen.

Nicht geklärt ist allerdings der Grund für die umgekehrte Abhängigkeit der Hautpermeabilität von der Lipophilie der Arzneistoffe bei Einsatz eines lipophilen Vehikels. Um zu prüfen, ob es sich wie in Kap. II 2.2 dargestellt um einen Verteilungseffekt handelt, sollten die experimentell bestimmten Permeabilitätsdaten mit den Verteilungskoeffizienten der Modellarzneistoffe zwischen Stratum corneum und dem Vehikel Paraffin $VK_{SC/Paraffin}$ korreliert werden. Im Falle eines Verteilungseffektes ist für diese Korrelation ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Hautpermeabilität und dem $\log VK_{SC/Paraffin}$ zu erwarten. Da der $VK_{SC/Paraffin}$ oder die Löslichkeit der verwendeten Substanzen im Stratum corneum nicht bekannt ist, wird in Abb. 14 als Näherung der Verteilungskoeffizient zwischen Octanol und dem Vehikel Paraffin $VK_{Octanol/Paraffin}$ (Tab. 4) verwendet.

Zu beachten ist bei dieser Auftragung, dass sich für hydrophile Modellarzneistoffe hohe und für lipophile Substanzen eher niedrige Verteilungskoeffizienten ergeben. Somit kommt es im Unterschied zu Abb. 12 zu einer positiven Steigung der Regressionsgeraden. Abb. 14 ist zu entnehmen, dass der Parameter $VK_{Octanol/Paraffin}$ nicht ausreichend zwischen den lipophilen Modellarzneistoffen differenziert, da beide Lösungsmittel sehr lipophil sind. Die Polaritätsunterschiede machen sich anscheinend erst bei eher hydrophilen Substanzen bemerkbar. Das

breite Spektrum der lipophilen Substanzen (R_{MW}^{ACN} : 4 bis 1,5) wird durch einen sehr engen $\log VK_{\text{Octanol/Paraffin}}$ -Bereich von 0,4 bis 1,1 dargestellt.

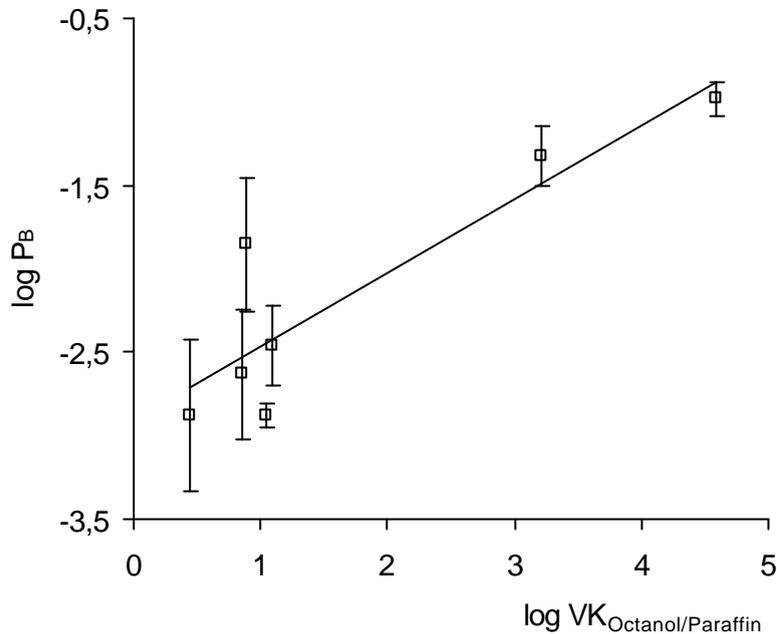


Abb. 14: Korrelation des Logarithmus der Hautpermeabilitäten aus Paraffin mit $\log VK_{\text{Octanol/Paraffin}}$, ($\log \bar{X}_{\text{geo}} \pm s$; P_B in $[\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}]$)
 $\log P_B = 0,441 \log VK_{\text{Octanol/Paraffin}} - 2,91$; $r^2 = 0,799$

Es deutet sich aus dieser Abbildung zwar ein linearer Zusammenhang zwischen den beiden Parametern an, aber die Korrelation ist nicht sehr zufriedenstellend. Dies könnte einerseits darauf zurückgeführt werden, dass die Verteilung eines Arzneistoffs in das Modelllipid Octanol die Verteilung ins Stratum corneum nicht ausreichend gut charakterisiert. Andererseits ließe dies auch den Schluss zu, dass den experimentellen Permeabilitätsdaten nicht die Verteilung vom Vehikel Paraffin ins Stratum corneum zu Grunde liegt, sondern wie in Kap. II 3.1 diskutiert, die lebende Epidermis bei Verwendung lipophiler Vehikel geschwindigkeitsbestimmend ist.

Um zu überprüfen, ob die lebende Epidermis tatsächlich die Permeabilität beim Einsatz von Paraffin als Vehikel determiniert, sollten die experimentellen Permeabilitätsdaten mit dem Verteilungskoeffizienten der Modellarzneistoffe zwischen der lebenden Epidermis und dem Vehikel Paraffin $VK_{\text{EP/Paraffin}}$ korreliert

werden. Ein linearer Zusammenhang ist zu erwarten, wenn tiefere, wässrige Schichten in der Haut einen überproportionalen Einfluss auf die Hautpermeabilität nehmen. Da der $VK_{EP/Paraffin}$ der verwendeten Substanzen ebenfalls nicht bekannt ist, wird die Arzneistofflöslichkeit in der Epidermis durch die Löslichkeit in Wasser angenähert und der $VK_{Wasser/Paraffin}$ über die Sättigungskonzentrationen berechnet (Tab. 4).

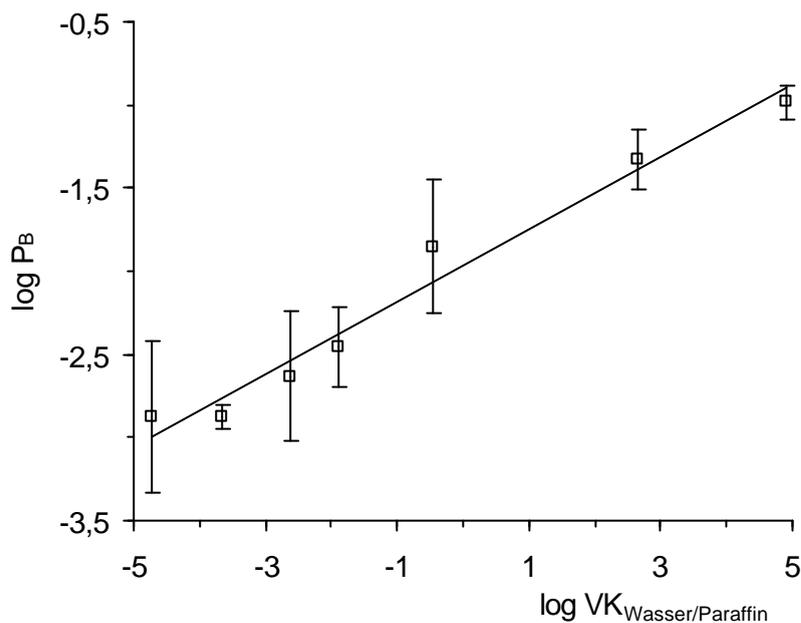


Abb. 15: Korrelation des Logarithmus der Hautpermeabilitäten aus Paraffin mit $\log VK_{Wasser/Paraffin}$, ($\log \bar{X}_{geo} \pm s$; P_B in $[cm \cdot h^{-1}]$)
 $\log P_B = 0,216 \log VK_{Wasser/Paraffin} - 1,97$; $r^2 = 0,971$

Bei dieser Betrachtung ergeben sich ebenfalls hohe Verteilungskoeffizienten für hydrophile und niedrige Verteilungskoeffizienten für lipophile Arzneistoffe. Da die Korrelation der Hautpermeabilitäten mit dem $VK_{Wasser/Paraffin}$ deutlich besser als die mit dem $VK_{Octanol/Paraffin}$ ist, liegt es nahe, die lebende Epidermis als die geschwindigkeitsbestimmende Barriere anzusehen. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass die Löslichkeit der Modellarzneistoffe in der zellreichen, lebenden Epidermis nicht mit deren Löslichkeit in Wasser übereinstimmt.

Da sich die Frage nach der geschwindigkeitsbestimmenden Barriere mit Hilfe dieser Modellvorstellungen nicht mit Sicherheit klären lässt, sind In-vitro-Untersuchungen an einer Modellhaut mit und ohne Stratum corneum notwendig,

um den Einfluss des Stratum corneum oder der lebenden Epidermis beim Einsatz lipophiler Vehikel abzusichern (Kap. III 3.).

2.3 Maximaler Flux

Als maximalen Flux bezeichnet man die Substanzmenge, die pro Flächen- und Zeiteinheit bei Applikation einer gesättigten Zubereitung, d.h. einer Lösung der thermodynamischen Aktivität $a_{th}=1$, durch die Haut diffundiert. Wenn das Vehikel die Eigenschaften der geschwindigkeitsbestimmenden Barriere nicht beeinflusst, ist der maximale Flux unabhängig vom eingesetzten Vehikel immer gleich (Gl. 7).

2.3.1 Berechnung des maximalen Fluxes

Da in den In-vivo-Studien ungesättigte Lösungen in Paraffin und Wasser verwendet wurden, ist der maximale Flux entweder aus den experimentellen Fluxen durch Extrapolation auf eine gesättigte Ausgangskonzentration oder durch Multiplikation der erhaltenen Permeabilität mit der Löslichkeit des betrachteten Modellarzneistoffs im eingesetzten Vehikel zu berechnen (Gl. 5). Die Konzentrationslinearität des kutanen Fluxes wurde von Wenkers und Lippold am Beispiel von Ketoprofen überprüft (70) und wird als allgemeingültig vorausgesetzt. Tab. 8 gibt einen Überblick über die maximalen Fluxes der untersuchten Substanzen, berechnet aus Permeabilität und Sättigungskonzentration für beide Vehikel im Vergleich. Der Arzneistoffflux aus Wasser reicht von weniger als einem Mikrogramm (MBC: $0,63 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) bis über ein Milligramm (ETN: $1,34 \text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) pro cm^2 und Stunde, wobei Ethylnicotinat im Vergleich zu den anderen Substanzen einen extrem hohen Flux aufweist. In Paraffin appliziert, zeigt Etofyllin den niedrigsten Arzneistoffflux ($0,09 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) und Ethylnicotinat ($1,9 \text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) wieder mit Abstand den höchsten. Betrachtet man die einzelnen Arzneistoffe bezüglich der Vehikel Wasser und Paraffin, so resultieren entgegen den

theoretischen Erwartungen aus Wasser und Paraffin erstaunlicherweise nicht die gleichen maximalen Fluxe.

Tab. 8: Maximaler Flux aus Wasser und Paraffin, berechnet aus den vehikelspezifischen Permeabilitäten und Sättigungskonzentrationen

Modellarzneistoffe	J_{\max} Wasser ($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	J_{\max} Paraffin ($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	$\log J_{\max}$ Wasser	$\log J_{\max}$ Paraffin
3-(4'-Methylbenzyliden)campher	0,00063	0,153	-3,20	0,816
Triclosan	0,00593	0,101	-2,23	-0,995
Nabumeton	0,00914	0,00819	-3,04	-2,087
2-Phenylphenol	0,0853	0,210	-1,07	-0,677
Ethylnicotinat	1,34	1,90	0,128	0,280
Guaifenesin	0,233	0,00875	-0,632	-2,06
Etofyllin	0,225	0,00009	-0,647	-4,03

Die Prüfung der Fluxdaten mittels F- und T-Test auf einem Signifikanzniveau von 95% ergibt für alle untersuchten Substanzen einen signifikanten Unterschied zwischen maximalem Flux aus Wasser und Paraffin.

Nur für Nabumeton liegt der Unterschied der beiden maximalen Fluxe noch unter 12%. Beim Nicotinsäureester ist der Unterschied immerhin noch geringer als 50% und die Standardsubstanz 2-Phenylphenol zeigt aus Paraffin nur einen um Faktor 2,5 höheren maximalen Flux. Aber die extrem lipophilen Modellarzneistoffe (TCS und MBC) weisen in Paraffin appliziert um 17- bzw. 243-fach erhöhte Fluxe im Vergleich zur wässrigen Lösung auf. Auch die sehr hydrophilen Vertreter zeigen stärkere Abweichungen: Der Guaifenesinflux ist aus Wasser ca. 27mal und der Etofyllinflux sogar drei Zehnerpotenzen größer aus Wasser als aus Paraffin.

Jiang et al. (27) finden ebenfalls unterschiedliche Fluxe von 3-Benzophenon aus acht verschiedenen Vehikeln gleicher thermodynamischer Aktivität durch exzidierte Humanhaut in vitro und führen diese Ergebnisse auf Interaktionen zwischen der Haut und den verschiedenen Vehikeln zurück.

Betrachtet man nun die Reihe der Substanzen, so wird deutlich, dass sich mit Ausnahme von Ethylnicotinat, das aus beiden Vehikeln auffallend hohe und ähnliche Fluxe aufweist, mit den hydrophilen Modellarzneistoffen aus Wasser höhere Fluxe erzielen lassen als mit den lipophilen Substanzen. Umgekehrt zeigen die lipophilen Arzneistoffe aus Paraffin höhere Fluxe als die hydrophilen. Dieser von der Theorie abweichende Befund soll in den folgenden Kapiteln näher untersucht werden.

2.3.2 Vorhersage des maximalen Fluxes

Da mit Hilfe von Gl. 24 und 25 die Permeabilität von Arzneistoffen über ihre R_{MW}^{ACN} -Werte vorhersagbar ist, sollte nach Einsetzen dieser Gleichungen in die logarithmierte Form von Gl. 5 auch der maximale Flux zu berechnen sein:

$$\log J_{\max \text{ Wasser}} = -2,61 + 0,571 R_{MW}^{ACN} + \log c_{S \text{ Wasser}} \quad \text{Gl. 28}$$

$$\log J_{\max \text{ Paraffin}} = -1,04 - 0,506 R_{MW}^{ACN} + \log c_{S \text{ Paraffin}} \quad \text{Gl. 29}$$

Für die Vorhersage des maximalen Fluxes weiterer Substanzen ähnlicher Molekülgröße aus Wasser bzw. Paraffin ist demnach nur der R_{MW}^{ACN} -Wert und die jeweilige Löslichkeit notwendig. Die nach Gl. 28 und 29 berechneten maximalen Fluxe der Modellarzneistoffe sind in Abb. 16 gegen die aus den experimentellen Permeabilitätsdaten ermittelten maximalen Fluxe aufgetragen.

Die Korrelation ist erwartungsgemäß sehr gut. Die berechneten und experimentellen J_{\max} -Werte stimmen gut miteinander überein, da die Regressionsgerade nahezu durch den Ursprung verläuft und ihre Steigung nahe dem Wert 1 ist.

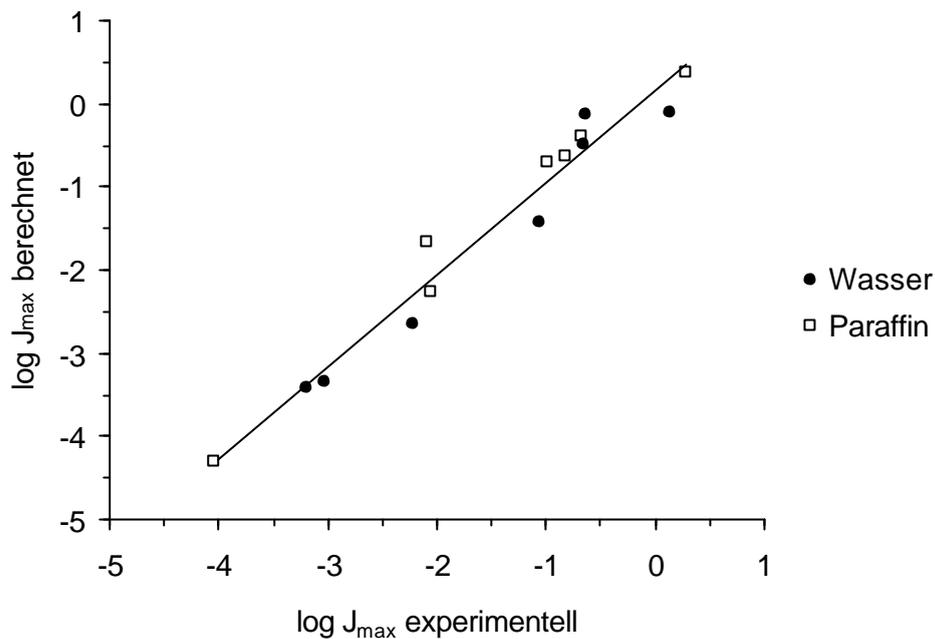


Abb. 16: Korrelation der Logarithmen der berechneten maximalen Fluxe nach Gl. 28 und 29 mit experimentell ermittelten maximalen Fluxen, J_{\max} in $[\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}]$
 $\log J_{\max\text{ber.}} = 1,11 \log J_{\max\text{exp.}} + 0,16; r^2 = 0,964$

2.3.3 Modellvorstellungen

Nach Gl. 7 ist der maximale Flux nur abhängig vom Diffusionskoeffizienten, der Dicke der Barriere und der Löslichkeit des Arzneistoffs in der Barriere und unabhängig vom eingesetzten Vehikel. Unter der Annahme, dass sich Diffusionskoeffizienten niedermolekularer Arzneistoffe nur geringfügig unterscheiden und die Dicke der Hautschichten relativ konstant ist, sollten die maximalen Fluxe der Modellarzneistoffe mit ihren Sättigungskonzentrationen in der geschwindigkeitsbestimmenden Barriere korrelieren. Entsprechend den Untersuchungen von Karsting et. al. (29) sind die J_{\max} -Werte mit den Octanollöslichkeiten als Modellparameter für die Arzneistofflöslichkeit im Stratum corneum zu korrelieren.

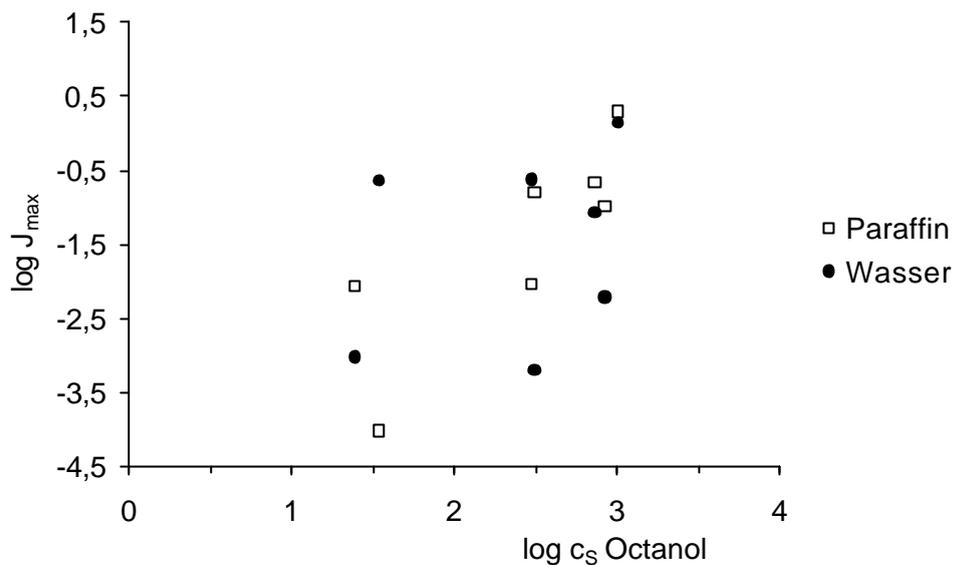


Abb. 17: Korrelation der $\log J_{\max}$ -Werte mit dem Logarithmus der Arzneistofflöslichkeit in Octanol, J_{\max} in $[\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}]$, c_s in $[\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}]$

Entgegen den Erwartungen zeigen weder die Arzneistofffluxe aus Wasser noch aus Paraffin einen klaren Zusammenhang mit der Octanollöslichkeit.

Da die Frage nach der geschwindigkeitsbestimmenden Barriere bei Verwendung von Paraffin als Vehikel noch nicht geklärt ist, sind die maximalen Fluxe aus Paraffin zusätzlich noch mit den Arzneistofflöslichkeiten in Wasser, als Näherung an die Löslichkeit in der lebenden Epidermis, zu korrelieren.

Aber auch in Abb. 18 ist kein Zusammenhang zwischen den Arzneistofffluxen aus Paraffin und der Wasserlöslichkeit zu erkennen.

Da im Fall der Permeabilitäten die Korrelationen deutlich besser sind (Kap. III 2.2.4), obwohl dort ebenfalls Octanol und Wasser als Modelle für Stratum corneum und lebende Epidermis herangezogen werden, lassen sich die schlechten Korrelationen aus Abb. 17 und 18 nicht mit der abweichenden Arzneistofflöslichkeit in Octanol und Wasser von der Löslichkeit in den Hautschichten erklären.

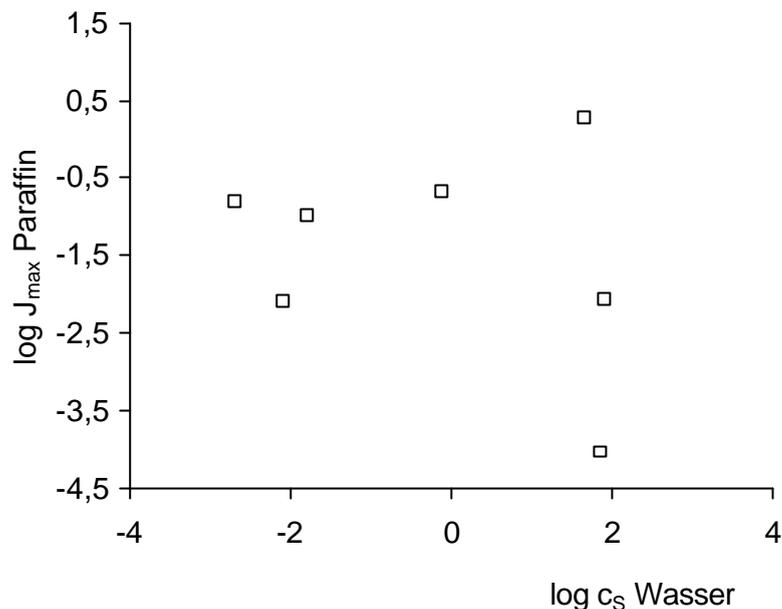


Abb. 18: Korrelation der log J_{max}-Werte aus Paraffin mit dem Logarithmus der Arzneistofflöslichkeit in Wasser, J_{max} in [mg·cm⁻²·h⁻¹], c_s in [mg·ml⁻¹]

2.3.4 Einfluss der Vehikel auf den Zustand der Haut

Da mit Hilfe der Korrelationen zu den Modellvorstellungen die unterschiedlichen maximalen Fluxe aus Wasser und Paraffin nicht erklärbar sind, soll der Einfluss der Vehikel auf den Zustand der Haut näher untersucht werden.

Anlass zur Untersuchung der Interaktionen zwischen den verwendeten Vehikeln und der Haut gibt auch die gefundene Korrelation aus Abb. 19. Entgegen der aus dem 1. Fickschen Gesetz abgeleiteten Theorie (Gl. 7) ist hier ein Zusammenhang zwischen maximalem Flux und Arzneistofflöslichkeit im Vehikel zu finden. Es zeigt sich, dass bei hoher Löslichkeit eines Arzneistoffs im eingesetzten Vehikel auch ein hoher Arzneistoffflux resultiert. Diese Auftragung ist aber entsprechend Gl. 28 und 29 eigentlich nicht zulässig, da die Permeabilität ($\log P_B = a \cdot R_{MW}^{ACN} + b$) hierbei vollkommen vernachlässigt wird und sie somit entgegen dem 1. Fickschen Gesetz keinen Einfluss auf den maximalen Flux hätte.

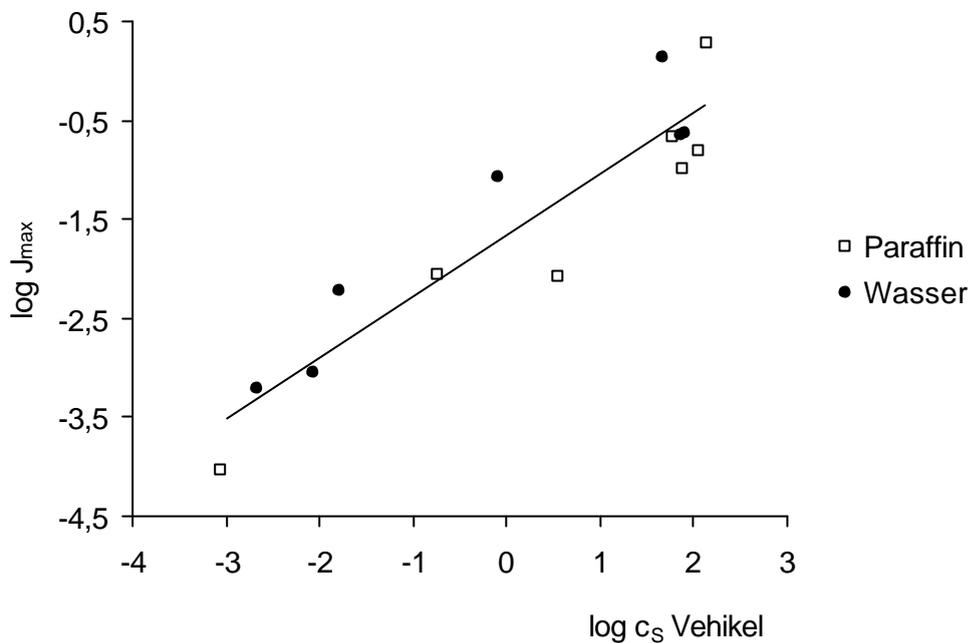


Abb. 19: Korrelation der $\log J_{\max}$ -Werte aus Wasser und Paraffin mit dem Logarithmus der Vehikellöslichkeiten, J_{\max} in $[\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}]$, c_s in $[\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}]$
 $\log J_{\max} = 0,616 \log c_s \text{ Vehikel} - 1,66$; $r^2 = 0,862$

Eine gute Korrelation zwischen maximalem Flux und Löslichkeit der applizierten Substanzen im Vehikel (Propylenglycol-Wasser-Mischung) findet sich auch bei Hagedorn-Leweke (22).

Da sich nicht die nach Gl. 7 erwartete Abhängigkeit des maximalen Fluxes der Modellarzneistoffe von ihrer Löslichkeit in der Barriere bzw. in der entsprechenden Modellflüssigkeit, sondern eine Abhängigkeit von der Löslichkeit im Vehikel zeigt, liegt die Vermutung nahe, dass ein Teil des jeweiligen Vehikels in die Haut eindringt und so die Arzneistofflöslichkeit in der geschwindigkeitsbestimmenden Barriere, Stratum corneum oder ggf. lebende Epidermis, maßgeblich beeinflusst (Cosolventieneffekt, Kap. II 1.2.1).

Es werden erneut Versuche mit den Glaskammern durchgeführt, bei denen die Haut der Probanden unterschiedlich vorzubehandeln ist. Die Kammern werden wie üblich befestigt und zunächst nur mit wirkstofffreiem Vehikel befüllt. Zwei

Oberarmpositionen eines Probanden sind auf diese Weise mit Paraffin und die anderen beiden Positionen mit Wasser vorzukonditionieren. Nach zwei Stunden werden die Kammern abgenommen, die behandelten Hautareale von anhaftendem Vehikel befreit und die Kammern an der selben Stelle wieder befestigt. Danach ist in alle Kammern eines Probanden eine wässrige Lösung von Guaifenesin bzw. 2-Phenylphenol einzufüllen. Da sich die unterschiedliche Vorbehandlung am stärksten zu Beginn der Arzneistoffbehandlung auswirken sollte, ist der resultierende maximale Flux von den unterschiedlich vorbehandelten Positionen in der ersten Stunde nach Vorkonditionierung, d.h. in der dritten Versuchsstunde, zu vergleichen.

Wenn die Vorbehandlung Einfluss auf den Flux haben sollte, wäre durch Wasserbehandlung ein erhöhter Flux für einen hydrophilen Arzneistoff (Guaifenesin) und bei Paraffinvorbehandlung ein erhöhter Flux für eine lipophile Substanz (2-Phenylphenol) zu erwarten.

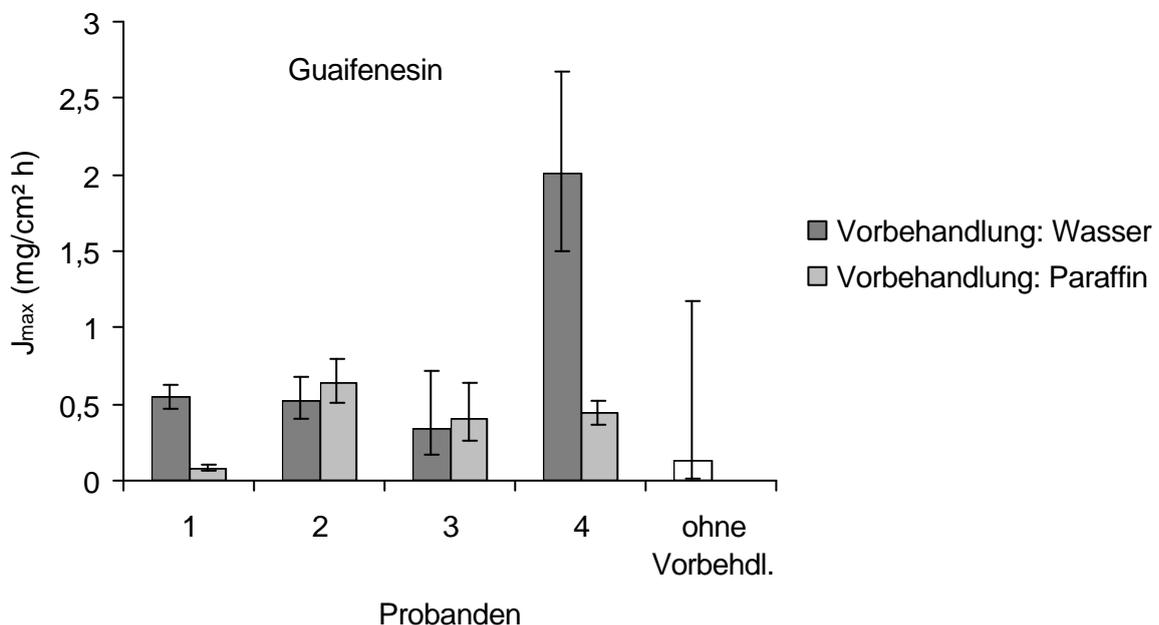


Abb. 20: Maximale Fluxe der ersten Versuchsstunde aus wässriger Guaifenesinlösung, Vorbehandlung mit Wasser und Paraffin im Vergleich, $\bar{X}_{\text{geo}} \pm s_g$, 4 Probanden (n= 2 Oberarmpositionen) ohne Vorbehdl.: $\bar{X}_{\text{geo}} \pm s_g$ (n=4, Proband Nr. 27-29 u. 31 des Hauptversuchs)

Abb. 20 zeigt, dass sich der Guaifenesinflux der ersten Stunde durch Vorbehandlung mit Wasser und Paraffin tendenziell steigern lässt. Die maximalen Fluxe bei Proband Nr. 2 und 3 unterscheiden sich trotz unterschiedlicher Vorbehandlung kaum. Bei den beiden anderen Probanden ist ein deutlich erhöhter Flux nach Vorbehandlung mit Wasser im Vergleich zur Paraffinvorbehandlung zu verzeichnen.

In Abb. 21 sind die maximalen Fluxe aus der wässrigen 2-Phenylphenollösung nach unterschiedlicher Vorbehandlung bei zwei Probanden dargestellt. Entsprechend den maximalen Fluxen im Steady-state sind auch die Fluxe der ersten Stunde von 2-Phenylphenol aus wässriger Lösung geringer als die von Guaifenesin.

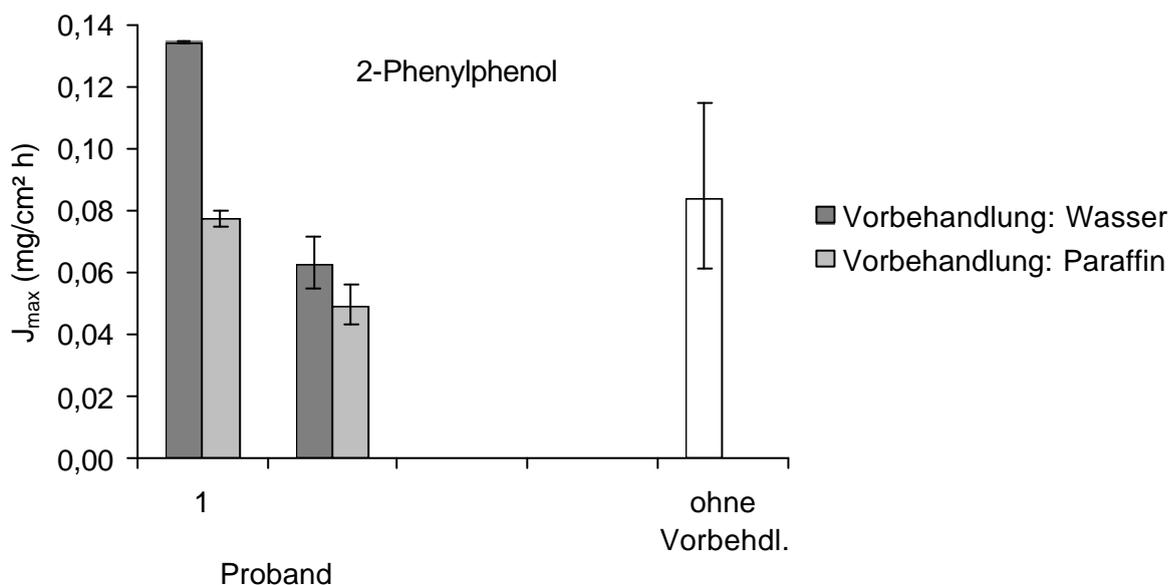


Abb. 21: Maximale Fluxe der ersten Versuchsstunde aus wässriger 2-Phenylphenollösung, Vorbehandlung mit Wasser und Paraffin im Vergleich, $\bar{x}_{\text{geo}} \pm s_{\text{g}}$, 2 Probanden (n=2 Oberarmpositionen) ohne Vorbehdl.: $\bar{x}_{\text{geo}} \pm s_{\text{g}}$ (n=4, Proband Nr. 27-29 u. 31 des Hauptversuchs)

Erstaunlicherweise sind auch hier leicht erhöhte Fluxe nach Vorbehandlung mit Wasser im Vergleich zur Paraffinvorbehandlung zu verzeichnen. Entgegen den obigen Überlegungen zeigt 2-Phenylphenol, als lipophiler Vertreter der Modellarzneistoffe, keinen erhöhten Flux nach Vorkonditionierung mit Paraffin. Der

Einfluss der Vorbehandlung auf lipophile Arzneistoffe ist nach diesen Untersuchungen generell als sehr gering einzustufen.

Für hydrophile Arzneistoffe scheinen sich aber beide Vorbehandlungsarten leicht penetrationsbeschleunigend auszuwirken. Die stärkere Hydratisierung des Stratum corneum unter den okklusiven Versuchsbedingungen kann als Erklärung für die erhöhten Fluxe herangezogen werden (18, 57).

Eine Veränderung der Arzneistofflöslichkeit in der Barriere und ein damit einhergehender Unterschied im maximalen Flux durch eindringendes lipophiles oder hydrophiles Vehikel konnte mit dieser Methode nicht gezeigt werden.

3. In-vitro-Studien mit Kuheuterhaut

3.1 Ziel der Untersuchungen

Da in Kap. III 2.2 anhand der Modellvorstellungen die Frage nach der geschwindigkeitsbestimmenden Barriere für den Arzneistofftransport durch die Haut bei Verwendung lipophiler Vehikel nicht geklärt werden konnte, ist der Einfluss des Stratum corneum und der lebenden Epidermis experimentell näher zu untersuchen.

Der Einfluss der Hautschichten sollte sich mit Hilfe von Probandenversuchen überprüfen lassen, bei denen die Haut der Probanden durch Schädigung des Stratum corneum verändert ist. Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass sich die Barriereeigenschaft der Haut durch partielles Entfernen des Stratum corneum mittels Tape-stripping, Behandlung mit Tensiden oder organischen Lösungsmitteln reduzieren lässt (16, 48, 64, 65). Nach Schädigung der Hornschicht werden erhöhte Arzneistofffluxe und ein stärkerer transepidermaler Wasserverlust (TEWL) gemessen.

Wenn das Stratum corneum auch bei der Verwendung lipophiler Vehikel die geschwindigkeitsbestimmende Barriere darstellt, sind nach seiner Schädigung erhöhte Fluxe und Permeabilitäten im Vergleich zur intakten Haut zu erwarten. Ist aber die lebende Epidermis beim Einsatz lipophiler Vehikel determinierend, dann sollte eine Schädigung des Stratum corneum keinen Effekt auf den Steady-state-Flux und die Permeabilität zeigen.

Da es nicht zu vertreten ist, bei Probanden eine der Applikationsfläche der Glaskammern entsprechend große Hautfläche zu schädigen, sind die geplanten Versuch in Diffusionszellen in vitro durchzuführen.

Zusätzlich soll die in Kap. III 2.3 gefundene Abhängigkeit des maximalen Arzneistofffluxes vom eingesetzten Vehikel in vitro an intakter Haut überprüft werden.

3.2 Kuheuterhaut als Modellmembran

Für die In-vitro-Versuche ist eine geeignete Modellhaut auszuwählen. Die ideale Membran in Bezug auf Vergleichbarkeit mit der In-vivo-Studie wäre exzidierte Humanhaut, die allerdings nur selten in der erforderlichen Größe und ausreichender Menge zur Verfügung steht. Deshalb wird als Modellhaut neben synthetischen Membranen (Kap. III 4.) und gezüchteten Hautäquivalenten (Kap. III 5.) überwiegend Tierhaut verwendet. Allerdings sind die Hautpermeabilitäten der üblichen Labortiere, wie speziellen Maus- und Rattenarten oder Meerschweinchen, gegenüber der menschlichen Haut deutlich erhöht. Bessere Übereinstimmungen bezüglich der Hautbarriere finden sich dagegen bei Hunden und Affen (26, 71).

Als gutes Modell für In-vitro-Untersuchungen hat sich in letzter Zeit auch das Kuheuter bewährt (30, 32). Euterhaut zeigt histologisch gute Übereinstimmung mit Humanhaut in Bezug auf Epidermisdicke, Oberflächenbeschaffenheit, Behaarung und Faltung. Die Arzneistoffpermeation wurde überwiegend am isoliert perfundierten Kuheuter und nur selten anhand von Kuheuterhaut in Diffusionszellen (31, 58) untersucht. Günstig bezüglich der Variabilität der Versuchsergebnisse ist die große Hautfläche eines Euters, so dass sich mehrere Diffusionsversuche mit der Euterhaut eines Tieres durchführen lassen.

Ausschlaggebender Vorteil der Verwendung von Kuheuterhaut als Modellmembran ist, dass die Euter im Schlachthof als Abfallprodukt anfallen und sich somit die Tötung von Labortieren zu Versuchszwecken vermeiden lässt.

3.3 Durchführung der In-vitro-Versuche

3.3.1 Auswahl des Modellarzneistoffs

Für die In-vitro-Versuche ist aus der Reihe der Modellarzneistoffe eine möglichst hydrophile Substanz auszuwählen, da das Stratum corneum einer hydrophilen Substanz einen größeren Widerstand entgegensetzt als einer lipophilen. Für einen hydrophilen Modellarzneistoff ist demzufolge ein größerer Unterschied des Arzneistofffluxes durch die Haut bzw. der Hautpermeabilität zwischen geschädigter und intakter Haut zu erwarten, wenn das Stratum corneum auch beim Einsatz lipophiler Vehikel die geschwindigkeits-bestimmende Barriere darstellen sollte. Der Arzneistoff sollte jedoch noch ausreichend in Paraffin löslich sein, um einigermaßen hohe Arzneistoffkonzentrationen im Vehikel zu gewährleisten und eine schnelle Entleerung des Vehikels vor Versuchsende zu vermeiden. Unter diesen Aspekten wird Guaifenesin als Modellarzneistoff ausgewählt.

3.3.2 Modifizierte Franz-Diffusionszelle

Die Diffusionsuntersuchungen lassen sich in einer modifizierten Franzzelle im Wasserbad bei 32°C durchführen.

Es werden Zellen mit einer großen Diffusionsfläche von 12,566 cm² konstruiert, um möglichst hohe Arzneistofffluxe zu erhalten. Da der ausgewählte Modellarzneistoff Guaifenesin relativ geringe Löslichkeit in Paraffin aufweist, muss ein großes Volumen dieser Guaifenesinlösung eingesetzt werden, um eine ausreichende Menge Arzneistoff für die Penetration zur Verfügung zu stellen. Dementsprechend besitzt das Donatorkompartiment ein großes Volumen (mind. 50 ml). Im Gegensatz dazu hat das Akzeptorkompartiment ein geringes Volumen (ca. 15 ml), um bei geringen Mengen penetrierten Arzneistoffs bereits messbare Konzentrationen zu erhalten.

Um adhärierende, arzneistoffarme Schichten auf der Donatorseite nahe der Membran zu minimieren, ist nicht nur im Akzeptor, sondern auch im Donator zu rühren.

Als Akzeptormedium kommt Phosphatpuffer pH 7,4 Ph.Eur. zum Einsatz, der mit 0,02% Natriumazid konserviert ist. Aufgrund der hohen Wasserlöslichkeit von Guaifenesin ist es möglich, die erforderlichen Sink-Bedingungen im Akzeptormedium über die gesamte Versuchsdauer zu gewährleisten.

3.3.3 Tape-stripping des Stratum corneum

Die Barriereeigenschaft des Stratum corneum lässt sich wie anfangs beschrieben auf verschiedene Arten reduzieren. Ein Problem dabei ist, die Hornschicht verschiedener Hautstücke für die Diffusionsversuche möglichst reproduzierbar zu schädigen.

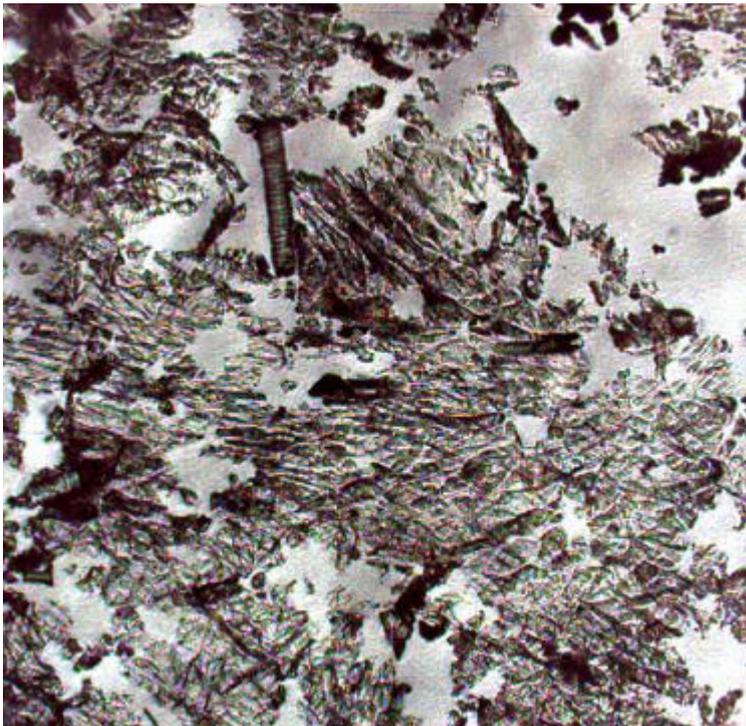
Da Reste von organischen Lösungsmitteln und Tensiden auf oder in der Modellhaut unerwünscht sind, soll das Stratum corneum durch Tape-stripping teilweise entfernt werden.

Bei dieser Methode sind handelsübliche Klebestreifen auf die rasierte Kuheuterhaut aufzukleben und wieder abzuziehen. Beim Abziehen der Klebestreifen werden die obersten Zellen des Stratum corneum mitgerissen. Je öfter dieser Vorgang wiederholt wird, desto mehr Zellschichten des Stratum corneum lassen sich entfernen. Eine Erhöhung der Hautpermeabilität bzw. des Arzneistofffluxes nach Tape-stripping ist mit der Abnahme der Dicke der Barriere d_B , d.h. der Dicke des Stratum corneum, zu erklären (Gl. 2 und Gl. 7).

In-vivo-Versuche an hautgesunden Probanden haben gezeigt, dass bereits 8-maliges Aufkleben der Klebestreifen (8 Strips) die Lag-time für die Arzneistoffpenetration erniedrigt und den transepidermalen Wasserverlust (TEWL) deutlich erhöht (16). Für Untersuchungen mit Kuheuterhaut in Franz-Diffusionszellen ergibt sich nach 10 Strips ein stark erhöhter Arzneistoffflux, der ungefähr dem Flux acetonbehandelter Haut entspricht (31). Weitere

Untersuchungen an Mäusehaut in vitro zeigen, dass sich der Arzneistoffflux durch das 20- und 30-fache Strippen weiter steigern lässt (64). Auch bei 30 Strips ist nicht davon auszugehen, dass das Stratum corneum komplett entfernt ist.

Bei den durchzuführenden In-vitro-Diffusionsversuchen wird mit einer mittleren Anzahl von 15 Strips gearbeitet. Die Kuhhauterhaut ist nach dieser Behandlung etwas heller als zuvor. Zur Erfolgskontrolle der Zellentfernung dient die mikroskopische Betrachtung der Hautschuppen auf den Klebestreifen (Abb. 22).



$\frac{3}{4} \frac{3}{4}$ 500 μm

Abb. 22 Mikroskopische Aufnahme der Klebestreifen mit entfernten Hautschuppen

3.3.4 Versuchsplanung

Zusätzlich zu Lösungen von Guaifenesin in Paraffin werden Versuche mit wässriger Guaifenesinlösung als Donator durchgeführt, um auch das Maß der Penetrationsbeschleunigung durch die Schädigung für hydrophile und lipophile Vehikel zu vergleichen.

Da die extrapolierten maximalen Fluxe für die jeweiligen Arzneistoffe aus beiden Vehikeln der In-vivo-Studien (Kap. III 2.3) entgegen der Theorie nicht gleich sind, sollen auch die Arzneistofffluxe in den Diffusionsversuchen näher betrachtet werden. Die Guaifenesinlösung in Paraffin und Wasser ist in gleicher thermodynamischer Aktivität einzusetzen, da nur dann aus beiden Vehikeln der gleiche kutane Flux zu erwarten ist.

Aufgrund der zu erwartenden geringen Penetration eines hydrophilen Arzneistoffs wie Guaifenesin werden die Diffusionsversuche über eine Dauer von sechs Tagen durchgeführt. Zu Versuchsbeginn sind stündlich bis alle zwei Stunden mit Hilfe einer Spritze mit langer PTFE-Kanüle über den Entnahmestutzen Proben aus dem Akzeptorkompartiment zu entnehmen. Nach den ersten 11 oder 12 Stunden werden die Proben nur noch im 12-Stunden-Rhythmus gezogen. Das entnommene Volumen ist mit wirkstofffreiem Puffer zu ersetzen.

Die Guaifenesinkonzentration der gezogenen Proben lässt sich mittels HPLC bestimmen.

3.3.5 Auswertung der In-vitro-Versuche

Zunächst ist die mit Hilfe der HPLC bestimmte Arzneistoffkonzentration zu korrigieren, da sich die Akzeptorkonzentration durch Ersetzen des entnommenen Probevolumens mit Puffer verdünnt.

Aufgrund der geringen Ausgangskonzentration von Guaifenesin in Paraffin entleert sich der Donator relativ schnell, so dass der Auswertung eine Kinetik erster Ordnung zu Grunde gelegt wird. Aus der penetrierten Arzneistoffmenge im

Akzeptor ist die Menge Arzneistoff im Donator zu jedem Entnahmezeitpunkt zu berechnen:

$$m_t^{\text{Donator}} = m_0^{\text{Donator}} - m_t^{\text{Akzeptor}} \quad \text{Gl. 30}$$

m_t^{Donator} , m_t^{Akzeptor} Arzneistoffmenge im Donator/Akzeptor zum Zeitpunkt t
 m_0^{Donator} eingesetzte Arzneistoffmenge im Donator

Dabei wird nicht berücksichtigt, dass sich ein Teil des Arzneistoffs in der geschwindigkeitsbestimmenden Barriere anreichert und somit die berechnete Menge Arzneistoff im Donator etwas höher ist als die reale Menge. Im quasistationären Zustand sollte dieser Fehler jedoch zu jedem Zeitpunkt gleich sein, so dass er vernachlässigt werden kann.

Der Logarithmus der prozentualen Arzneistoffmenge im Donator ist gegen die Versuchsdauer aufzutragen und die Steigung im linearen Teil der Geraden zu bestimmen. Entsprechend Gl. 22 lässt sich aus der Steigung die Penetrationsgeschwindigkeitskonstante erster Ordnung k_{p1} und mittels Gl. 23 die Permeabilität bestimmen.

Da im wässrigen Vehikel die eingesetzte Ausgangskonzentration bei gleicher thermodynamischer Aktivität sehr viel höher ist, entleert sich der Donator über die gesamte Versuchsdauer weniger als 10%. Es kann daher vereinfachend eine Kinetik nullter Ordnung angenommen und die Permeabilität direkt aus der Arzneistoffkonzentration im Akzeptor bestimmt werden. Die Arzneistoffkonzentration im Akzeptor zu jedem Entnahmezeitpunkt ist gegen die Versuchsdauer aufzutragen und die Penetrationsgeschwindigkeitskonstante nullter Ordnung entspricht dem Regressionskoeffizienten des linearen Bereichs. Die Permeabilität lässt sich nach Gl. 21 aus der Steigung bzw. der Penetrationsgeschwindigkeitskonstante k_{p0} berechnen.

3.4 Ergebnisse: Einfluss des Tape-stripping auf die Permeabilität

3.4.1 Paraffin als Vehikel

In Abb. 23 ist die resultierende Guaifenesinkonzentration im Akzeptor bei Verwendung von dünnflüssigem Paraffin als Vehikel gegen die gesamte Versuchsdauer aufgetragen.

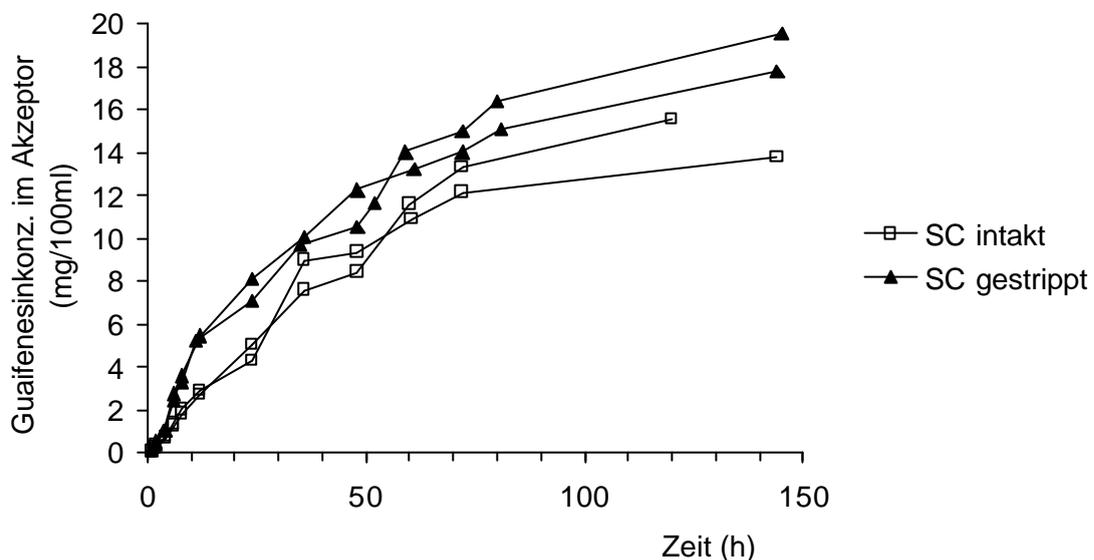


Abb. 23: Guaifenesinkonzentration im Akzeptor bei gestrippter und intakter Kuheuterhaut im Vergleich
Donatorlösung: 3,9mg/60ml Paraffin, ($a_{th}=0,35$)

Grundsätzlich ist der Arzneistoffflux durch die gestrippte Kuheuterhaut größer als durch die intakte Haut. Besonders deutlich sind die Unterschiede im Anfangsbereich. Im weiteren Versuchsverlauf streuen die ermittelten Konzentrationen aber stärker und die Unterschiede im Arzneistoffflux zwischen intakter und gestrippter Haut werden geringer. Dies ließe sich darauf zurückführen, dass die lange Versuchsdauer von mehreren Tagen unter starker Okklusion durch Paraffin negative Auswirkungen auf die Barriereigenschaften des zu Versuchsbeginn noch intakten Stratum corneum zeigt. Deshalb wird für die weitere Betrachtung nur der Anfangsbereich herangezogen. Auf diese Weise ist auch eine

bessere Vergleichbarkeit mit den In-vivo-Studien gegeben, da diese nur über sieben Stunden durchgeführt werden konnten.

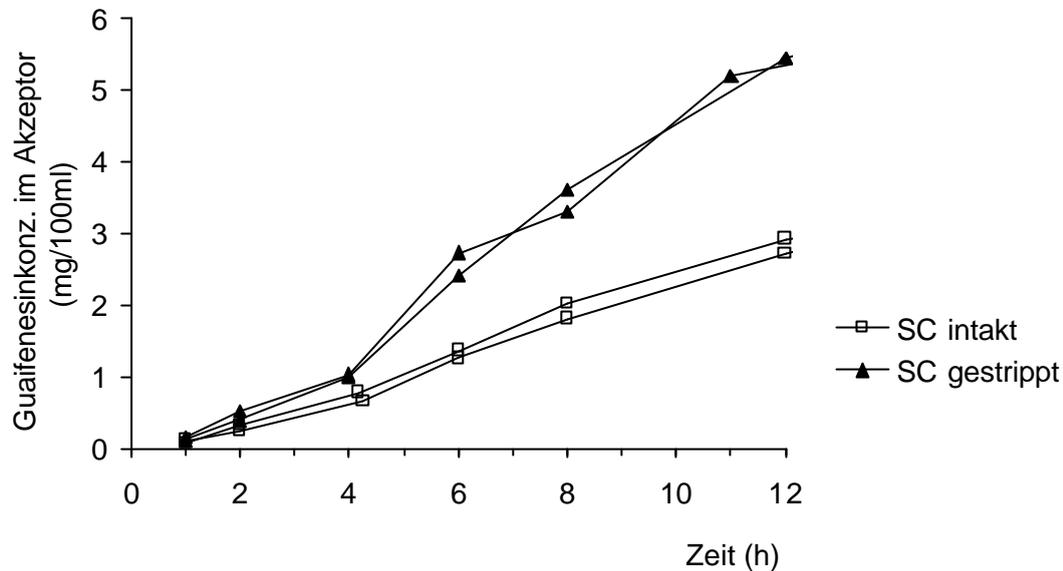


Abb. 24: Guaifenesinkonzentration im Akzeptor, gestrippte und intakte Kuheuterhaut im Vergleich, Anfangsbereich
Donatorlösung: 3,9mg/60ml Paraffin, ($a_{th}=0,35$)

Abb. 24 zeigt, dass der Arzneistoffflux durch die geschädigte Kuheuterhaut nach der vierten Versuchsstunde im Vergleich zur intakten Haut deutlich ansteigt.

Die Permeabilitäten werden nach Kinetik erster Ordnung aus den Versuchsdaten berechnet.

Tab. 9: Permeabilität der Kuheuterhaut für Guaifenesin in Paraffin, (berechnet im Anfangsbereich; Versuchsstunde 4-12)

	Permeabilität P_B ($cm \cdot h^{-1}$)	
	SC intakt	SC gestrippt
Versuch 1	0,0628	0,115
Versuch 2	0,0537	0,120
\bar{x}_{geo}	0,0581	0,118

Da sich die Permeabilität der Kuheuterhaut für Guaifenesin nach Tape-stripping des Stratum corneum auf etwa das Doppelte erhöht, ist davon auszugehen, dass der Widerstand des Stratum corneum auch bei der Verwendung lipophiler maßgeblich von Bedeutung ist. Somit ist die in Kap. III 2.2 gefundene negative Abhängigkeit der Hautpermeabilität in vivo von der Lipophilie der Modellarzneistoffe unter Einsatz von Paraffin als Vehikel auf einen Verteilungseffekt (Kap. II 2.2) zurückzuführen.

Nach diesen Ergebnissen wäre allerdings eine bessere Korrelation der Permeabilitäten mit dem $VK_{\text{Octanol/Paraffin}}$ in Kap. III 2.2.4 (Modellvorstellungen, Abb. 14) zu erwarten gewesen. Der berechnete Verteilungskoeffizient zwischen Octanol und Paraffin $VK_{\text{Octanol/Paraffin}}$ ist somit kein idealer Modellparameter für die Verteilung der Modellarzneistoffe zwischen Stratum corneum und dem Vehikel Paraffin.

3.4.2 Wasser als Vehikel

Um auch das Ausmaß der Penetrationsbeschleunigung durch Tape-stripping für hydrophile und lipophile Vehikel vergleichen zu können, werden beispielhaft ($n=1$) Diffusionsversuche mit wässriger Donatorlösung durchgeführt.

In Abb. 25 ist die resultierende Guaifenesinkonzentration im Akzeptor unter Einsatz von Wasser im Donator über die gesamte Versuchsdauer aufgetragen. Erwartungsgemäß ist hier der Arzneistoffflux durch die gestrippte Kuheuterhaut ebenfalls höher als durch die intakte Haut. Die Unterschiede zwischen intakter und gestrippter Haut scheinen allerdings bei Verwendung von Wasser über die gesamte Versuchsdauer größer zu sein als bei Paraffin.

Um eine bessere Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen des lipophilen Vehikels zu erzielen, ist auch hier für die weitere Auswertung nur der Anfangsbereich heranzuziehen.

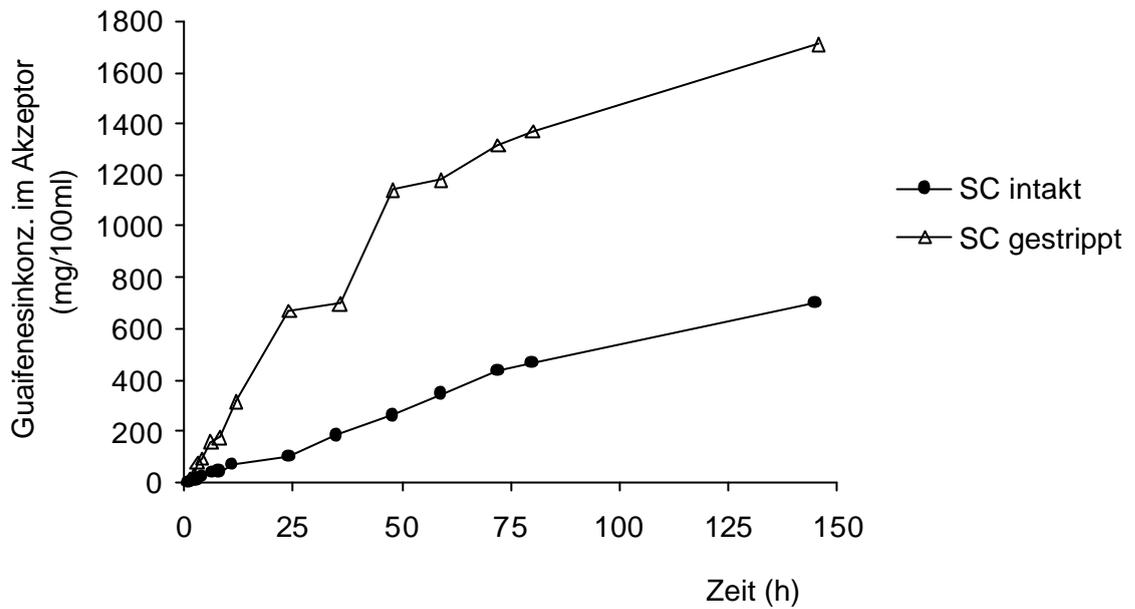


Abb. 25: Guaifenesinkonzentration im Akzeptor bei gestrippter und intakter Kuheuterhaut im Vergleich, n=1
 Donatorlösung: 1420mg/50ml Wasser, ($a_{th}=0,35$)

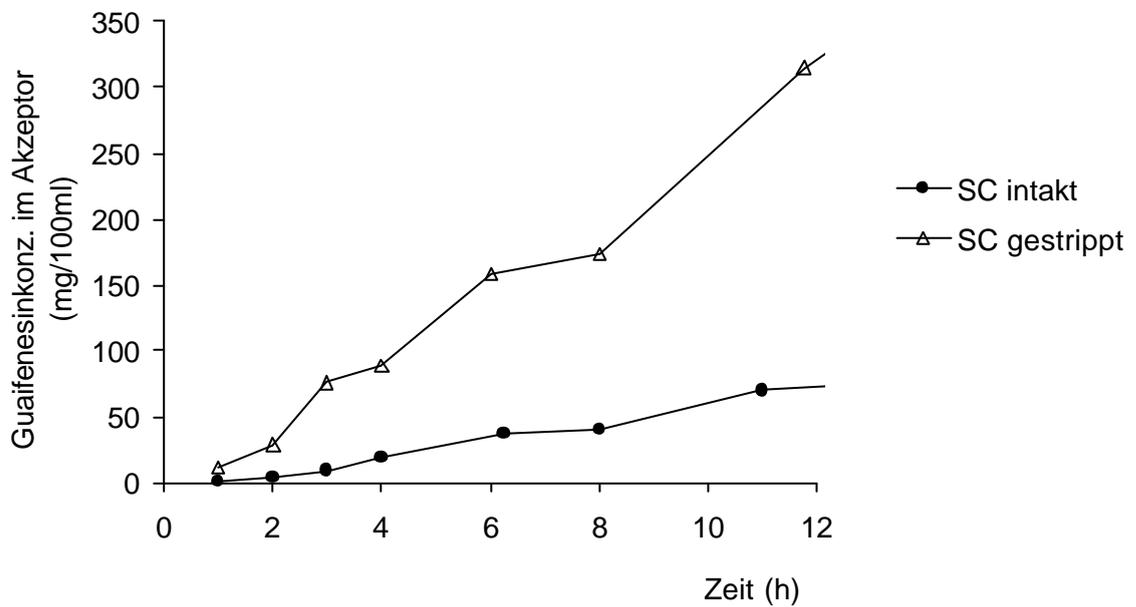


Abb. 26: Guaifenesinkonzentration im Akzeptor bei gestrippter und intakter Kuheuterhaut im Vergleich, Anfangsbereich, n=1
 Donatorlösung: 1420mg/50ml Wasser, ($a_{th}=0,35$)

Die Hautpermeabilitäten sind nach Kinetik nullter Ordnung aus den Guaifenesinkonzentrationen im Akzeptor der zweiten bis zwölften Stunde berechnet.

Tab. 10: Permeabilität der Kuheuterhaut für Guaifenesin in Wasser (berechnet im Anfangsbereich; Versuchsstunde 2-12)

	Permeabilität P_B ($\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$)	
	SC intakt	SC gestrippt
Versuch 1	0,00310	0,0120

Tab. 10 zeigt, dass sich die Hautpermeabilität durch Stripping bei Verwendung von Wasser als Vehikel nicht nur wie bei Paraffin verdoppeln, sondern fast um Faktor 4 steigern lässt. Die selbe Tape-stripping-Methode wirkt sich je nach Vehikel unterschiedlich stark auf die Penetrationsbeschleunigung aus. Dieses Ergebnis deutet an, dass die Steigerung der Permeabilität durch Tape-stripping nicht nur durch Reduktion der Dicke des Stratum corneum zu erklären ist, sondern auch der Verteilungskoeffizient zwischen Stratum corneum und Vehikel und/oder der Diffusionskoeffizient im Vergleich zur intakten Haut verändert sind (Gl. 2).

3.5 Arzneistoffflux durch intakte Kuheuterhaut

Weiteres Ziel der Versuche mit Kuheuterhaut als Modellmembran ist die Untersuchung des kutanen Fluxes aus den beiden Vehikeln Paraffin und Wasser durch intakte Kuheuterhaut, da bei den In-vivo-Untersuchungen in Kap. III 2.3 entgegen der Theorie des 1. Fickschen Diffusionsgesetzes eine Abhängigkeit des maximalen Fluxes von der Löslichkeit im eingesetzten Vehikel gefunden wurde.

Um den Arzneistoffflux aus verschiedenen Vehikeln oder Zubereitungen direkt vergleichen zu können, ist der Arzneistoff nicht in gleicher Konzentration sondern in gleicher thermodynamischer Aktivität a_{th} im jeweiligen Vehikel einzusetzen (Kap. II 1.1).

Abb. 27 zeigt den Guaifenesinflux aus Wasser und Paraffin durch intakte Kuheuterhaut. Die Guaifenesinlösungen in Wasser und Paraffin weisen jeweils die gleiche thermodynamische Aktivität $a_{th}=0,35$ auf.

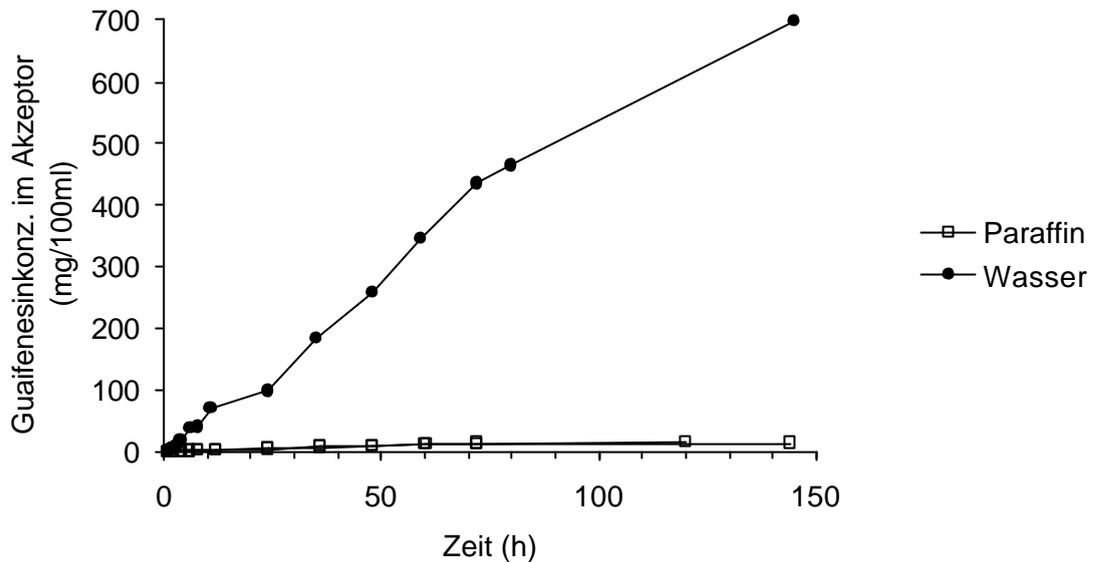


Abb. 27: Guaifenesinkonzentration im Akzeptor bei intakter Kuheuterhaut, Wasser und Paraffin als Vehikel im Vergleich
 Donatorlösung: 1420mg/50ml Wasser, ($a_{th}=0,35$, $n=1$)
 Donatorlösung: 3,9mg/60ml Paraffin, ($a_{th}=0,35$, $n=2$)

Theoretisch ist für Guaifenesin aus Wasser und Paraffin aufgrund der gleichen thermodynamischen Aktivität der Ausgangslösungen der gleiche Flux zu erwarten. In Abb. 27 wird jedoch deutlich, dass der Guaifenesinflux beim Einsatz von Wasser als Vehikel erheblich höher ist als bei Paraffin. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der In-vivo-Versuche findet sich bei hoher Arzneistofflöslichkeit im Vehikel auch ein hoher Flux durch die Haut.

Zur Bestimmung der maximalen Fluxes ($a_{th}=1$) sind die erhaltenen Permeabilitäten der Kuheuterhaut aus Tab. 9 und 10 entsprechend Gl. 5 mit der Löslichkeit von Guaifenesin im jeweiligen Vehikel zu multiplizieren.

Tab. 11: Maximaler Flux von Guaifenesin aus Wasser und Paraffin durch intakte Kuheuterhaut, (berechnet aus P_B in Tab. 9 bzw. 10 und c_{sv})

	$J_{max} \text{ (mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\text{)}$	
	Wasser	Paraffin
Guaifenesin	0,253	0,0108

Der maximale Flux aus den beiden eingesetzten Vehikeln ist nicht gleich, sondern im Anfangsbereich aus Wasser bereits um Faktor 23 erhöht. Der Unterschied zwischen den maximalen Fluxen für Guaifenesin bei den In-vivo-Untersuchungen ist ähnlich und liegt bei Faktor 27.

Wie bei den In-vivo-Versuchen lassen sich auch hier bei hoher Löslichkeit des Arzneistoffs im Vehikel unerwartet hohe maximale Fluxe erzielen. Diese erstaunliche Vehikelabhängigkeit des maximalen Fluxes soll in Kap. III 4. weiter untersucht werden.

3.6 Bewertung der Kuheuterhaut als Modellmembran

Da Permeabilität und maximaler Flux von Guaifenesin sowohl für Human- als auch für Kuheuterhaut ermittelt wurden, lässt sich anhand eines Vergleichs dieser Parameter die Eignung der Kuheuterhaut als Modellmembran beurteilen. Beim Vergleich der beiden Hauttypen ist zu beachten, dass in dieser Arbeit verschiedene Methoden der Ermittlung der Parameter dienen. Permeabilität und Flux bei der Humanhaut werden in vivo durch Messung der Arzneistoffkonzentrationsabnahme im Donator ermittelt. Die Kuheuterhaut wird dagegen in vitro in einer Diffusionszelle eingesetzt. Permeabilität und Flux lassen sich aus der ansteigenden Arzneistoffkonzentration im Akzeptor bestimmen.

Tab. 12 stellt Permeabilität und Flux der beiden Hauttypen für Guaifenesin gegenüber.

Tab. 12: Vergleich von Human- und Kuheuterhaut anhand von Permeabilität und maximalem Flux für Guaifenesin

Guaifenesin	Humanhaut, in vivo	Kuheuterhaut, in vitro
P_B Wasser ($\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$)	0,00286	0,00310
P_B Paraffin ($\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$)	0,0470	0,0581
J_{max} Wasser ($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	0,233	0,253
J_{max} Paraffin ($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	0,00875	0,0108

Sowohl Permeabilität als auch maximaler Flux bei Human- und Kuheuterhaut stimmen trotz unterschiedlicher Bestimmungsmethoden erstaunlich gut überein. Die Kuheuterhaut zeigt nur geringfügig erhöhte Permeabilitäten. Diese sind bei Verwendung von Wasser als Vehikel um 7% und bei Paraffin um 24% gegenüber Humanhaut erhöht. Die maximalen Fluxe verhalten sich entsprechend.

Die deutliche Erhöhung der Hautpermeabilität des Kuheuters bei Einsatz von Paraffin könnte mit einer stärkeren Hydratisierung der Haut durch das Akzeptormedium bei den In-vitro-Versuchen im Vergleich zu den In-vivo-Versuchen erklärt werden.

Abschließend ist also festzuhalten, dass sich Kuheuterhaut als Modellmembran in einer Diffusionszelle gut zur Vorhersage der Permeabilität der menschlichen Haut in vivo eignet.

4. Untersuchungen zum Vehikeleinfluss auf Polymermembranen

4.1 Ziel der Untersuchungen

In Kap. III 2.3 sind die Ergebnisse des maximalen Fluxes aus den Vehikeln Wasser und Paraffin der In-vivo-Permeations-Studie dargestellt. Entgegen dem 1. Fickschen Diffusionsgesetz ist der gefundene maximale Flux aus den beiden Vehikeln nicht gleich, sondern zeigt eine gute Korrelation mit der Löslichkeit im jeweiligen Vehikel (Abb. 19). Dies ist anhand der Modellvorstellungen (Kap. III 2.3.3) nicht zu erklären. Unterschiedliche kutane Fluxe trotz gleicher thermodynamischer Aktivität der Ausgangslösungen resultieren ebenfalls aus den In-vitro-Untersuchungen an intakter Kuheuterhaut bei Verwendung von Wasser und Paraffin als Vehikel (Kap. III 3.5).

Die Vermutung, dass ein Teil des Vehikels in das Stratum corneum eindringt und so die Löslichkeit eines Arzneistoffs in der Barriere maßgeblich beeinflusst (Cosolventieneffekt Kap. II 1.2.1), ließ sich mit Hilfe der Untersuchungen zum Einfluss der Vehikel auf den Hautzustand (Kap. III 2.3.4) durch unterschiedliche Vorkonditionierung der Haut mit Wasser oder Paraffin nicht eindeutig bestätigen. Deshalb ist mittels Diffusionsversuchen an vergleichsweise inerten Polymermembranen (Kunststofffolien) zu prüfen, ob sich auch hier unterschiedliche maximale Fluxe beim Einsatz verschiedener Vehikel finden. Um den Einfluss der Vehikel auf die Membranen zu untersuchen, ist die Quellung der Polymermembranen in den Vehikeln, die Löslichkeit und der Diffusionskoeffizient verschiedener Arzneistoffe in den Membranen zu bestimmen.

4.2 Durchführung

4.2.1 Auswahl der Modellarzneistoffe

Aus der Liste der Modellarzneistoffe sind eine lipophile und eine hydrophile Substanz auszuwählen, deren maximale In-vivo-Fluxe (Tab. 8) sich aus Wasser und Paraffin maßgeblich unterscheiden. Zusätzlich sollten die Arzneistoffe in beiden Vehikeln ausreichend löslich sein, um hohe Ausgangskonzentrationen im Donator einsetzen zu können und so eine schnelle Entleerung der Donatorlösung während des Versuchs zu vermeiden.

Von der Auswahl eines extrem lipophilen Arzneistoffs (3-(4-Methylbenzyliden)-campher oder Triclosan) ist aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit nicht nur in Bezug auf die schnelle Entleerung der wässrigen Donatorlösung abzusehen, sondern auch um Sink-Bedingungen im wässrigen Akzeptormedium über die gesamte Versuchsdauer gewährleisten zu können. Da Nabumeton aus Wasser und Paraffin nahezu die gleichen maximalen Fluxe liefert, wird 2-Phenylphenol als Vertreter der lipophilen Modellarzneistoffe ausgewählt. Der maximale 2-Phenylphenolflux in vivo ist aus Paraffin im Vergleich zu Wasser um Faktor 2,5 erhöht.

Da der Guaifenesinflux in vivo aus Wasser um Faktor 27 höher ist als aus Paraffin und sich auch in vitro ähnlich unterschiedliche Fluxe finden, wird Guaifenesin als hydrophiler Arzneistoff ausgewählt.

4.2.2 Auswahl der Polymermembranen

Wenn Vehikel Polymermembranen beeinflussen können, so dass unterschiedliche maximale Fluxe resultieren, dann sollte dieser Effekt unter Verwendung der extrem unterschiedlich polaren Vehikel Wasser und Paraffin bei sehr lipophilen und sehr hydrophilen Membranen am stärksten auftreten. Für die Untersuchungen sind eine

lipophile und eine hydrophile Membran auszuwählen, die für 2-Phenylphenol und Guaifenesin ausreichend permeabel sind, um nach einer möglichst kurzen Lagetime spektralphotometrisch messbare Fluxe zu erhalten. Zudem dürfen sich aus den verwendeten Folien keine Substanzen herauslösen, die die spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der Arzneistoffe stören.

Nach einigen Vorversuchen zur Arzneistoffpermeabilität werden eine Silikonmembran (Si) und eine Polyamid-6-Membran (PA-6) für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

Tab. 13: Durchschnittliche Dicke und Dichte der Polymermembranen
(Dichtebestimmung: $\bar{x} \pm s$; n=3)

	Silikon	Polyamid-6
Dicke (μm)	131	29
Dichte ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	$1,0715 \pm 0,002$	$1,3778 \pm 0,09$

4.2.3 Quellung der Membranen im Vehikel

Da der Einfluss der Vehikel auf die Silikon- und Polyamid-6-Membran zu bestimmen ist, soll zunächst die Quellung der Membranen in beiden Vehikeln untersucht werden. Für diese Bestimmung lässt sich die Zunahme der Foliendicke nach 24-stündiger Quellung im Vehikel bei 32°C heranziehen. Da davon auszugehen ist, dass sich die Polymere in alle Richtungen gleich stark ausdehnen, wird für Breite und Länge der Folienstücke die gleiche relative Ausdehnung wie in der Dicke angenommen und so die Volumenzunahme ermittelt.

Tab. 14: Quellung von Silikon in Wasser und Paraffin nach 24h bei 32°C
($\bar{x} \pm s$; n=6x6 Ansätze)

Silikon	Dickenzunahme (%)	Volumenzunahme (%)
Wasser	4,0 ± 3,5	12,5
Paraffin	-19,5 ± 7,1	-47,8

Tab. 15: Quellung von Polyamid-6 in Wasser und Paraffin nach 24h bei 32°C
($\bar{x} \pm s$; n=6x2 Ansätze)

Polyamid-6	Dickenzunahme (%)	Volumenzunahme (%)
Wasser	8,7 ± 1,9	28,4
Paraffin	10,4 ± 1,8	34,6

Die Quellung von Silikon und Polyamid-6 in den beiden Vehikeln ist zwar nicht sehr ausgeprägt, aber deutlich unterschiedlich. Obwohl Polyamid ein vergleichsweise hydrophiles Polymer ist, zeigt es sowohl in Wasser als auch in Paraffin ähnliche Quellung von ca. 30%. Für Silikon ist dagegen unterschiedliches Verhalten in den beiden Vehikeln festzustellen. In Wasser lässt sich erwartungsgemäß nur geringe Volumenzunahme von 12,5% bestimmen. Erstaunlicherweise zeigt die Silikonmembran in Paraffin keine Quellung, sondern eine Volumenabnahme auf fast die Hälfte des eingesetzten Volumens. Da die Absorption der beiden Vehikel, Paraffin und Wasser, nach Quellung der Silikonmembran keine deutlichen Unterschiede ergibt, könnte das Herauslösen spektralphotometrisch inaktiver Verbindungen als Grund für die beobachtete Volumenabnahme in Paraffin herangezogen werden. Alternativ ist auch denkbar, dass die Quellung in Paraffin Einfluss auf die Anordnung der Polymerketten des Silikons zur Folge hat. Eine engere Packung der Polymerketten des Silikons könnte ebenfalls zu einer Volumenabnahme führen.

Anhand der Quellung lässt sich einerseits der Einfluss der Vehikel auf die Polymere beurteilen. Andererseits ist die Kenntnis der Quellung auch notwendig,

um die Verteilungskoeffizienten der Arzneistoffe zwischen der gequollenen Membran und den Vehikeln bestimmen zu können (Kap. III 4.2.4). Da die Quellung nur nach 24 Stunden bestimmt wurde, ist sie für die weiteren Berechnungen als über die Zeit konstant anzunehmen.

4.2.4 Arzneistofflöslichkeit in den Polymermembranen

Da man den Verteilungskoeffizient eines Arzneistoffs zwischen Barriere bzw. Membran und Vehikel durch die Sättigungskonzentrationen in den beiden Phasen annähern kann (Gl. 6), lässt sich auch umgekehrt die Arzneistofflöslichkeit in den ausgewählten Polymermembranen aus Verteilungskoeffizient und Sättigungskonzentration des Arzneistoffs im Vehikel berechnen:

$$C_{s\text{Polymer}} = VK_{\text{Polymer/Vehikel}} \cdot C_{sV} \quad \text{Gl. 31}$$

$C_{s\text{Polymer}}$ Arzneistofflöslichkeit in Polymermembran
 $VK_{\text{Polymer/Vehikel}}$ Verteilungskoeffizient zwischen Polymermembran und Vehikel

Die Verteilungskoeffizienten von 2-Phenylphenol und Guaifenesin zwischen den Polymermembranen und den Vehikeln werden nach einer kurzen Verteilungszeit von 1 bis 3 Stunden und nach längeren Verteilungszeiten von 24 und 48 Stunden bei 32°C bestimmt, um die Verteilungsgeschwindigkeit beurteilen zu können. Da sich in allen Fällen nach 24 Stunden das Verteilungsgleichgewicht eingestellt hat, ist die Bestimmung nach 48 Stunden in Tab. 16 und 17 nicht aufgeführt. Für die Berechnung der Verteilungs-koeffizienten ist das Volumen der gequollenen Membranen zu Grunde gelegt. Die Angaben ohne Berücksichtigung der Quellung sind zum Vergleich in Klammern angegeben.

Tab. 16: Verteilungskoeffizienten von 2-Phenylphenol zwischen Polymermembran und Vehikel bei 32°C (VK_{Silikon/Vehikel} n=1; VK_{Polyamid-6/Vehikel} n=2)

2-Phenylphenol	1 – 3 h	24 h
VK _{Silikon/Wasser}	70,8 (36,9)*	81,2 (42,3)
VK _{Silikon/Paraffin}	52,2 (27,2)*	49,6 (25,9)
VK _{Polyamid-6/Wasser}	1011 (1299)**	2096 (2692)
VK _{Polyamid-6/Paraffin}	37,0 (49,9)**	84,5 (113)

* 180min

** 90min

Tab. 17: Verteilungskoeffizienten von Guaifenesin zwischen Polymermembran und Vehikel bei 32°C (n=2)

Guaifenesin	1 – 3 h	24 h
VK _{Silikon/Wasser}	3,8 (4,3)*	19,5 (21,9)
VK _{Silikon/Paraffin}	21,8 (11,4)*	17,7 (9,2)
VK _{Polyamid-6/Wasser}	16,1 (18,1)**	7,6 (12,2)
VK _{Polyamid-6/Paraffin}	14,9 (21,9)**	183,2 (265,7)

* 180min

** 60min

Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt zunächst auf, dass die Einstellung des Verteilungsgleichgewichts nach 1 bis 3 Stunden noch nicht bei allen Ansätzen erreicht ist. Die Gleichgewichtseinstellung von Guaifenesin dauert bei beiden Membranen länger als 3 Stunden. Das Verteilungsgleichgewicht von 2-Phenylphenol zwischen Silikonmembran und den beiden Vehikeln stellt sich schnell, zwischen Polyamid-6 und den Vehikeln aber erst später ein.

Sollte sich auch die Verteilung der Arzneistoffe zwischen Stratum corneum und eingesetztem Vehikel langsam einstellen, dann würde sich über die Dauer eines Langzeitversuchs (24 Stunden) mit steigendem Verteilungskoeffizient auch die Permeabilität und der maximale Flux erhöhen. Für eine kurzzeitige Applikation wäre schon unter diesen Umständen nicht der gleiche maximale Flux aus

verschiedenen, gesättigten Vehikeln zu erwarten, da sich die Sättigungskonzentration im Stratum corneum noch nicht eingestellt hätte.

Erstaunlich hoch ist der Verteilungskoeffizient von 2-Phenylphenol zwischen Polyamid-6 und Wasser verglichen mit dem Verteilungskoeffizient zwischen Silikon und Wasser. Das bedeutet, dass Polyamid-6 zwar im Vergleich zu anderen Polymeren als hydrophil gilt, aber in Bezug auf die verwendeten Modellarzneistoffe eher lipophil ist.

Generell wäre zu erwarten gewesen, dass sich die Verteilungskoeffizienten der Arzneistoffe zwischen einer Membran und den extrem unterschiedlichen Vehikeln stärker unterscheiden.

Nach Gl. 31 ist die Arzneistofflöslichkeit in der Silikon- und Polyamid-6-Membran aus den ermittelten Verteilungskoeffizienten in Abhängigkeit vom Vehikel zu berechnen. Da Permeabilität und Flux in dieser Arbeit immer zu frühen Zeitpunkten, in vivo zwischen 4 und 7 Stunden und in vitro unter 12 Stunden bestimmt werden, sind zur Berechnung der Arzneistofflöslichkeiten in den Membranen auch die frühen Verteilungskoeffizienten heranzuziehen.

Tab. 18: Vehikelabhängige Löslichkeit von 2-Phenylphenol und Guaifenesin in Silikon und Polyamid-6; berechnet aus Verteilungskoeffizienten Tab. 16 und 17

	Vehikel: Wasser	Vehikel: Paraffin
2-Phenylphenol		
c_S in Silikon (mg·cm ⁻³)	56	3160
c_S in Polyamid-6 (mg·cm ⁻³)	804	2242
Guaifenesin		
c_S in Silikon (mg·cm ⁻³)	309	4,1
c_S in Polyamid-6 (mg·cm ⁻³)	1314	2,8

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Löslichkeit der beiden Modellarzneistoffe in den beiden Membranen vehikelabhängig ist. 2-Phenylphenol

und Guaifenesin zeigen sowohl in Silikon als auch in Polyamid-6 unterschiedliche Sättigungskonzentrationen beim Einsatz unterschiedlicher Vehikel.

Der stärkste Löslichkeitsunterschied dieser Untersuchungen ergibt sich für Guaifenesin in Polyamid-6. Die beiden Sättigungskonzentrationen nach Quellung in Wasser und Paraffin unterscheiden sich um Faktor 470. Generell ist die Löslichkeit für das hydrophile Guaifenesin unter Verwendung von Wasser erhöht und entsprechend findet man höhere Löslichkeiten für das lipophile 2-Phenylphenol, wenn Paraffin als Vehikel verwendet wird.

Die Frage, auf welchen Effekt die Veränderung der Sättigungskonzentration in der Membran durch die Vehikel zurückzuführen ist, bleibt bei dieser Untersuchung noch offen. Möglich wären ein Cosolventieneffekt durch eingeschlepptes Vehikel oder Interaktionen der Vehikel mit den Polymeren bzw. Polymerketten.

Da sich das Volumen des eindringenden Vehikels aus den Quellungsdaten ermitteln lässt, kann auch die Arzneistoffmenge berechnet werden, die maximal durch Vehikel eingeschleppt wird. So zeigt beispielsweise die Polyamid-6-Membran in Wasser eine Volumenzunahme von 28,4% (Tab. 14). Dies entspricht einem Anteil von 0,22 ml Wasser pro cm^3 gequollener Membran. In 0,22 ml Wasser lösen sich 17,95 mg Guaifenesin bzw. 0,18 mg 2-Phenylphenol (Tab. 3). Nach dieser Rechnung liegt die Arzneistoffmenge, die im jeweils eingeschleppten Vehikel löslich ist, in allen Fällen unter 20 mg pro cm^3 Polymermembran. Somit lassen sich die vehikelabhängigen Löslichkeitsunterschiede von 300 bis über 3000 mg/cm^3 in den gequollenen Membranen (Tab. 18) nicht allein auf einen Cosolventieneffekt zurückführen.

Verbesserte Membranlöslichkeiten ließen sich auch mit einem Übergang vom glasartigen in den gummielastischen Zustand nach Absenkung der Glasübergangstemperatur unter 32°C durch eines der eindringenden Vehikel erklären. Da aber Silikon bereits bei Raumtemperatur im gummielastischen Zustand vorliegt, kann dies zumindest für diese Membran ausgeschlossen werden.

4.2.5 Diffusionsuntersuchungen an Polymermembranen

Aufgrund der gefundenen unterschiedlichen Arzneistofflöslichkeiten in den Polymermembranen in Abhängigkeit vom eingesetzten Vehikel sind für die geplanten Diffusionsversuche bei Verwendung von Wasser und Paraffin als Vehikel auch unterschiedliche maximale Fluxe für einen Arzneistoff zu erwarten.

Die Diffusionsuntersuchungen lassen sich in der modifizierten Franzzelle, die bereits bei den In-vitro-Versuchen mit Kuheuterhaut verwendet wurde (Kap. III 3.3.2), im Wasserbad bei 32°C durchführen.

In den Donator sind 50 ml der zu untersuchenden Arzneistofflösung einzufüllen. Als Akzeptormedium dient Wasser ohne weitere Zusätze. Da sich in Blindversuchen, d.h. in Diffusionsversuchen mit arzneistofffreiem Vehikel im Donator, sowohl mit Silikon- als auch mit Polyamid-6-Folie nur eine geringe spektrale Absorption des Akzeptormediums Wasser durch migrierte Substanzen zeigt, kann die Konzentrationsbestimmung der permeierten Arzneistoffe spektralphotometrisch erfolgen. Vorteilhaft bei dieser Methode ist, dass die entnommene Menge des Akzeptors nach der Messung wieder zurückgegeben werden kann. Nur im Falle einer notwendigen Verdünnung des entnommenen Akzeptormediums für die spektralphotometrische Bestimmung ist das entsprechende Volumen durch reines Wasser zu ersetzen und die Verdünnung der Akzeptorkonzentration rechnerisch zu korrigieren (Gl. 35).

Die Arzneistofflösungen werden in unterschiedlichen thermodynamischen Aktivitäten von 10 bis 100% eingesetzt, um zu überprüfen, ob sich die Höhe der Ausgangskonzentration auf die Arzneistoffpermeabilität der Membranen auswirkt. Niedrige thermodynamische Aktivitäten können auch versuchsbedingt erforderlich sein, um über einen längeren Zeitraum nicht zu hohe, sondern analytisch gut messbare Fluxe zu erhalten, oder um Sink-Bedingungen über die gesamte Versuchsdauer zu gewährleisten.

Die Versuche werden über eine Dauer von 24 Stunden durchgeführt und der Zeitraum konstanter Arzneistofffluxe für die Bestimmung der Permeabilität herangezogen. Die Auswertung erfolgt analog der Auswertung der In-vitro-

Versuche mit Kuheuterhaut (Kap. III 3.3.5). Nach Kinetik erster Ordnung sind die Diffusionsversuche auszuwerten, bei denen die Ausgangskonzentration im Donator über die Versuchsdauer stark abnimmt (2-Phenylphenol in Wasser und Guaifenesin in Paraffin). Kinetik nullter Ordnung lässt sich vereinfachend annehmen, wenn die Abnahme der Donatorkonzentration über die zur Auswertung herangezogene Versuchsdauer $< 10\%$ ist (2-Phenylphenol in Paraffin und Guaifenesin in Wasser).

4.2.5.1 Permeabilitäten der Polymermembranen

Die 2-Phenylphenollösungen werden in geringen thermodynamischen Aktivitäten von 13 bis 48% eingesetzt, da bei höheren Konzentrationen und damit einhergehenden höheren Fluxen, aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit von 2-Phenylphenol, Sink-Bedingungen ($c_t < 10\% c_s$) im Akzeptor nicht über mehrere Stunden aufrecht zu erhalten sind. Die ermittelten Permeabilitäten sind in Tab. 19 aufgeführt.

Tab. 19: Permeabilität der Polymermembranen für 2-Phenylphenol in Abhängigkeit vom eingesetzten Vehikel, $\bar{X}_{geo} \pm s_g$, $n=2$

2-Phenylphenol	P_B Wasser ($\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$)	P_B Paraffin ($\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$)
Silikon	0,595 + 0,00498 - 0,00502	0,00850 + 0,0014 - 0,0012
Polyamid-6	0,0698* + 0,011 - 0,0095	0,00193 + $5\cdot 10^{-6}$ - $4,9\cdot 10^{-6}$

* $n=3$

Die thermodynamischen Aktivitäten der eingesetzten Guaifenesinlösungen liegen zwischen 46 und 100%. Nur die Donatorlösung Guaifenesin in Wasser bei Einsatz der Polyamid-6-Membran ist mit niedrigerer thermodynamischer Aktivität von 10% herzustellen, da bei höheren Konzentrationen innerhalb weniger Minuten die

Akzeptorkonzentration extrem ansteigt und keine exakte Messung mehr möglich ist (P_B -Werte in Tab. 20).

Tab. 20: Permeabilität der Polymermembranen für Guaifenesin in Abhängigkeit vom eingesetzten Vehikel, $\bar{X}_{geo} \pm S_g$

Guaifenesin	P_B Wasser (cm·h⁻¹)		P_B Paraffin (cm·h⁻¹)	
Silikon	0,00036 ⁿ⁼³	+ 0,000054 - 0,000047	0,105 ⁿ⁼⁴	+ 0,0586 - 0,0376
Polyamid-6	0,00259 ⁿ⁼²	+ 0,00012 - 0,000011	0,122 ⁿ⁼³	+ 0,0255 - 0,0211

Entsprechend der Verteilungstheorie finden sich für einen lipophilen Arzneistoff wie 2-Phenylphenol höhere Membranpermeabilitäten, wenn ein hydrophiles Vehikel wie Wasser verwendet wird. Umgekehrt zeigen die eingesetzten Membranen für eine hydrophile Substanz wie Guaifenesin höhere Permeabilitäten beim Einsatz von Paraffin als Vehikel. Die ermittelten Permeabilitäten aus Wasser und Paraffin unterscheiden sich um 1 bis zu 3 Zehnerpotenzen, wobei sich die Silikon-Permeabilitäten aus den beiden Vehikeln für einen Arzneistoff stärker unterscheiden als die Permeabilitätswerte für Polyamid-6.

Die lipophile Silikonmembran ist deutlich besser permeabel für 2-Phenylphenol, aber Polyamid-6 zeigt nur eine leicht erhöhte Permeabilität für Guaifenesin im Vergleich zu 2-Phenylphenol.

Die gefundenen Standardabweichungen sind für inerte Polymermembranen relativ hoch. Die Höhe der Ausgangskonzentration im Donator bzw. der thermodynamischen Aktivität zeigt erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Permeabilität.

4.2.5.2 Maximaler Flux durch Polymermembranen

Der maximale Flux durch die Polymermembranen ist entsprechend den vorangehenden Untersuchungen durch Multiplikation von Permeabilität und Arzneistofflöslichkeit im eingesetzten Vehikel nach Gl. 5 zu berechnen. Die Tab. 21 und 22 fassen die Ergebnisse zusammen.

Tab. 21: Maximaler Flux von 2-Phenylphenol durch die Polymermembranen , \bar{X}_{geo} , (s_g und n siehe Tab. 19)

2-Phenylphenol	J_{max} Wasser (mg·cm⁻²·h⁻¹)	J_{max} Paraffin (mg·cm⁻²·h⁻¹)
Silikon	0,473	0,515
Polyamid-6	0,0555	0,117

Tab. 22: Maximaler Flux von Guaifenesin durch die Polymermembranen, \bar{X}_{geo} , (s_g und n siehe Tab. 20)

Guaifenesin	J_{max} Wasser (mg·cm⁻²·h⁻¹)	J_{max} Paraffin (mg·cm⁻²·h⁻¹)
Silikon	0,0302	0,0196
Polyamid-6	0,212	0,0227

Auffällig ist der um fast eine Zehnerpotenz höhere maximale Guaifenesinflux durch die gequollene Polyamid-6-Membran aus Wasser im Vergleich zu Paraffin. Da die Wasserlöslichkeit von Guaifenesin erheblich höher ist als die Löslichkeit in Paraffin, zeichnet sich in diesem Fall wie bei der In-vivo- und In-vitro-Studie mit Haut eine Abhängigkeit des maximalen Fluxes von der Arzneistofflöslichkeit im Vehikel ab. Dagegen sind der maximale Guaifenesinflux durch die wenig bzw. negativ quellende Silikonmembran und der maximale 2-Phenylphenolflux durch beide Membranen aus Wasser und Paraffin sehr ähnlich bzw. unterscheiden sich höchstens um Faktor 2. Deutliche Abhängigkeit des maximalen Fluxes vom eingesetzten Vehikel konnte in diesen Fällen also nicht festgestellt werden.

Vergleichsweise ähnlich sind die Flux-Verhältnisse für 2-Phenylphenol der In-vivo-Studie. Der maximale Flux aus Paraffin ist in vivo ebenfalls nur um das 2,5-fache gegenüber dem Flux aus Wasser erhöht.

Da sich aus den Verteilungskoeffizienten der Arzneistoffe zwischen Polymermembran und Vehikel (Kap. III 4.2.4) unterschiedliche Sättigungskonzentrationen in den Membranen in Abhängigkeit vom eingesetzten Vehikel ergeben, wären für die Diffusionsversuche entsprechend Gl. 7 generell unterschiedliche maximale Fluxe für einen Arzneistoff durch die selbe Membran aus Wasser und Paraffin zu erwarten. Vergleicht man die vehikelabhängigen Unterschiede der Sättigungskonzentrationen für je einen Arzneistoff in einer Membran, so findet sich der größte Unterschied in der Löslichkeit von Guaifenesin in Polyamid-6 (Tab. 18). Die Sättigungskonzentration ist in diesem Fall um das 470-fache höher, wenn die Quellung der Membran in Wasser statt in Paraffin erfolgt. In Übereinstimmung damit ist der Unterschied des maximalen Fluxes aus beiden Vehikeln bei Guaifenesin durch Polyamid-6 am größten. Unterschiedliche Membranlöslichkeiten um Faktor 60 bis 75 in Abhängigkeit vom Vehikel scheinen keinen Unterschied im maximalen Flux zu bewirken. Insgesamt lässt sich also keine einfache lineare Beziehung zwischen maximalem Flux und Arzneistofflöslichkeit in der Barriere finden. Allerdings ist zu bedenken, dass nur bei gleichem und vehikelunabhängigem Diffusionskoeffizient eines Arzneistoffs in einer Membran eine einfache Beziehung zu erwarten ist.

4.2.5.3 Diffusionskoeffizienten der Arzneistoffe

Der Einfluss eines Vehikels auf Polymermembranen kann sich auch auf den Diffusionskoeffizient des diffundierenden Arzneistoffes erstrecken. Der Diffusionskoeffizient einer Substanz in einer Membran bei konstanter Temperatur ist an sich unabhängig vom eingesetzten Vehikel. Wenn das Vehikel allerdings einen Einfluss auf die Membran insbesondere auf die Membranstruktur hat, sollte sich dies auch in einem veränderten Diffusionskoeffizient zeigen.

Da maximaler Arzneistoffflux (Tab. 21 und 22) und Löslichkeit der eingesetzten Arzneistoffe in den gequollenen Membranen (Tab. 18), sowie Dicke der Membranen im gequollenen Zustand bekannt sind, können die Diffusionskoeffizienten in den gequollenen Membranen berechnet werden. Durch Umformung von Gl. 7 ergibt sich:

$$D_{\text{Polymer}} = \frac{J_{\text{max}} \cdot d_{\text{Polymer}}}{C_{\text{sPolymer}}} \quad \text{Gl. 32}$$

D_{Polymer} Diffusionskoeffizient eines Arzneistoffs in gequollener Polymermembran ($\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$)

d_{Polymer} Dicke der gequollenen Membran (cm)

Tab. 23: Diffusionskoeffizienten von 2-Phenylphenol und Guaifenesin in gequollener Silikon und Polyamid-6-Membran

	Vehikel: Wasser	Vehikel: Paraffin
D_B in Silikon ($\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$)		
2-Phenylphenol	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$1,7 \cdot 10^{-6}$
Guaifenesin	$1,3 \cdot 10^{-6}$	$5,1 \cdot 10^{-5}$
D_B in Polyamid-6 ($\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$)		
2-Phenylphenol	$2,2 \cdot 10^{-7}$	$1,7 \cdot 10^{-7}$
Guaifenesin	$5,1 \cdot 10^{-7}$	$2,6 \cdot 10^{-5}$

Tab. 23 zeigt deutlich, dass Vehikel den Diffusionskoeffizienten eines Arzneistoffs in den Polymermembran verändern können. Es lassen sich z.T. Unterschiede von fast 2 Zehnerpotenzen in Abhängigkeit vom eingesetzten Vehikel feststellen.

Beide Arzneistoffe zeigen in der Silikonmembran je nach Vehikel unterschiedliche Diffusionskoeffizienten. Bei der Polyamid-6-Membran wirkt sich der Vehikeleinfluss nur auf den Diffusionskoeffizient von Guaifenesin aus. Der Diffusionskoeffizient von 2-Phenylphenol bleibt trotz möglicher

Strukturveränderungen der Polyamid-6-Membran nahezu konstant. Eine Korrelation der maximalen Arzneistofffluxe durch die Polymermembranen (Kap. III 4.2.5.2) allein mit den vehikelabhängigen Diffusionskoeffizienten ist jedoch nach Gl. 7 erwartungsgemäß nicht möglich.

Darüber hinaus sind neben den diskutierten Vehikel-Membran-Interaktionen auch Arzneistoff-Membran-Interaktionen möglich, die bei diesen Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden können.

4.3 Interpretation der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Untersuchungen an den Polymermembranen zeigen, dass Vehikel die Löslichkeit von Arzneistoffen in Membranen beeinflussen und auch Diffusionskoeffizienten verändern können. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wirken sich unterschiedliche Sättigungskonzentrationen in einer Membran für einen Arzneistoff allerdings nur dann deutlich auf den maximalen Flux aus, wenn die Unterschiede extrem groß sind.

Bei Übertragung der Ergebnisse von Polymermembranen auf die Haut ist zunächst die Quellung zu berücksichtigen. Unter Annahme einer durchschnittlichen Dicke des Stratum corneum von 10 bis 15 μm im Normalzustand und ca. 80 μm nach Quellung in Wasser (45) ergibt sich eine Dickenzunahme von 400 bis 700%. Da das Stratum corneum sowohl hydrophile als auch lipophile Bereiche aufweist, ist auch eine starke Quellung in Paraffin anzunehmen. Dagegen ist die Dickenzunahme der Polymermembranen mit maximal 10% sehr gering. Da sich in den Membranen trotz geringer Quellung bereits deutlich unterschiedliche Sättigungskonzentrationen für einen Arzneistoff je nach Vehikel einstellen, sind für die Haut aufgrund der extremen Quellung viel größere vehikelbedingte Unterschiede in der Arzneistofflöslichkeit im Stratum corneum zu erwarten. Diese Unterschiede in der Stratum-corneum- bzw. Barrierelöslichkeit können dann entsprechend den In-vivo-Studien (Kap. III 2.3) zu unterschiedlichen maximalen Fluxen beim Einsatz verschiedener Vehikel führen.

Um den Einfluss der Vehikel auf die Arzneistofflöslichkeit in den Membranen auf einfache Weise darzustellen, werden die Löslichkeiten der Arzneistoffe in den gequollenen Membranen mit den Arzneistofflöslichkeiten im Vehikel korreliert. In Abb. 28 sind die vehikelabhängigen Membranlöslichkeiten (Tab. 18) von Guaifenesin und 2-Phenylphenol in Silikon und Polyamid-6 gegen die Arzneistofflöslichkeit im eingesetzten Vehikel (Tab. 3) doppeltlogarithmisch aufgetragen.

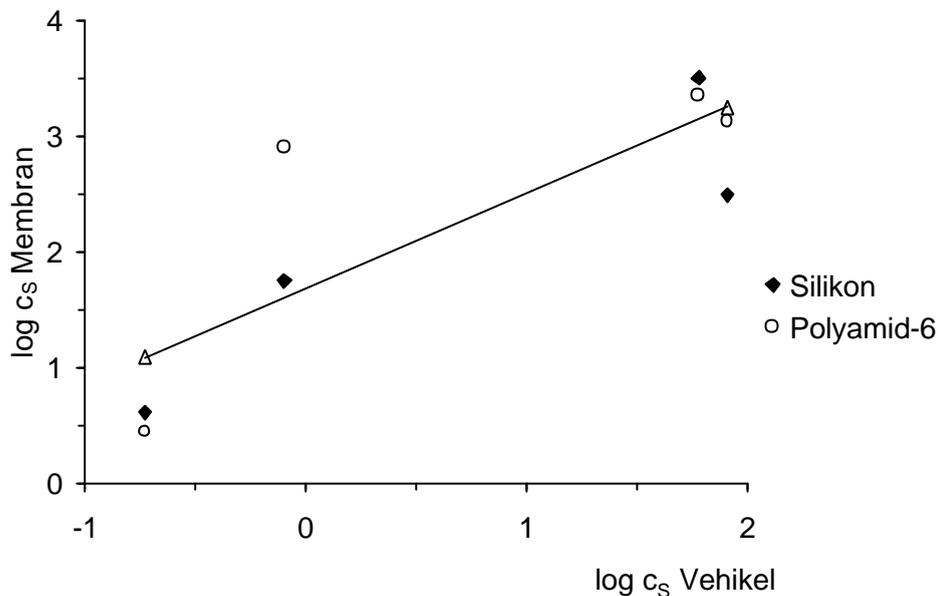


Abb. 28: Korrelation des Logarithmus der vehikelabhängigen Arzneistofflöslichkeiten in den Membranen mit den Vehikellöslichkeiten für Guaifenesin und 2-Phenylphenol
 $\log c_s \text{Membran} = 0,816 \log c_s \text{Vehikel} + 1,69; r^2 = 0,694$

Trotz mäßiger Quellung der Polymermembranen ist eine deutliche Abhängigkeit der Arzneistofflöslichkeit in den gequollenen Membranen von der Löslichkeit im eingesetzten Vehikel zu erkennen. Die Tatsache, dass die Arzneistofflöslichkeit im Vehikel die Arzneistofflöslichkeit in der Membran maßgeblich beeinflusst, erklärt auch die gute Korrelation des maximalen kutanen Fluxes mit der Vehikellöslichkeit in Abb. 19 (Kap. III 2.3.4).

Vergleichbare Ergebnisse finden sich bei Bach (5): Bei Ablassungsversuchen mit Betameton-17-benzoat als Modellarzneistoff steigt der penetrationsbeschleunigende Effekt der eingesetzten Enhancer mit zunehmender Löslichkeit

des Modellarzneistoffs in den Penetrationsbeschleunigern. Als Mechanismus wird ein Cosolventieneffekt postuliert, der zur Erhöhung der Löslichkeit des Modellarzneistoffs im Stratum corneum führt.

Jiang et al. (27) verglichen die Fluxe des Sonnenschutzmittels 3-Benzophenon aus acht verschiedenen Vehikeln gleicher thermodynamischer Aktivität durch eine HDPE-Membran und exzidierte Humanhaut in vitro und erhalten in Abhängigkeit vom eingesetzten Vehikel ebenfalls unterschiedliche Fluxe, deren Differenz allerdings geringer ist als in der In-vivo-Studie dieser Arbeit. Die Bestimmung der 3-Benzophenonmengen in den Membranen nach Ende der Diffusionsversuche zeigt ebenfalls einen Trend zu höheren Arzneistoffmengen in den Membranen, wenn Vehikel hoher 3-Benzophenonlöslichkeit im Donator eingesetzt werden. In einer weiteren Untersuchung dieser Arbeitsgruppe wurde der Hydrocortisonflux aus 13 verschiedenen Vehikeln durch eine Silikonmembran untersucht (12). Neben unterschiedlichen maximalen Fluxen sind ebenfalls variierende Mengen Hydrocortison in der Silikonmembran zu finden, wobei der maximale Flux stärker variiert als die jeweils gelöste Arzneistoffmenge in der Membran. Der Logarithmus des maximalen Fluxes korreliert linear mit der Volumenfraktion des sorbierten Vehikels. Des Weiteren werden Veränderungen des Diffusions- und Verteilungskoeffizienten beim Einsatz der verschiedenen Vehikel beobachtet, die jedoch entsprechend den hier vorgelegten Untersuchungen keine einfache Korrelation mit dem maximalen Flux ergeben. Somit wird in dieser Arbeit der unterschiedliche maximale Flux ebenfalls mit variierender Membranlöslichkeit und veränderlichem Diffusionskoeffizienten für einen Arzneistoff aufgrund der Quellung der Membran im jeweils eingesetzten Vehikel erklärt.

4.4 Vergleich von Haut- und Membranpermeabilitäten

Ziel der Untersuchung war es, zwei möglichst unterschiedlich polare Polymermembranen für die Diffusionsversuche auszuwählen. Zusätzlich sollen nun die ausgewählte Polyamid-6- und Silikonmembran auf ihre Eignung als Modell für die Humanhaut überprüft werden. Deshalb sind Abb. 29 und 30 die ermittelten Membranpermeabilitäten beider Polymere für Guaifenesin und 2-Phenylphenol aus Wasser und Paraffin mit den Hautpermeabilitäten in vivo korreliert.

Die Korrelation der Permeabilitäten von Polyamid-6-Membran und Humanhaut in vivo ist mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,908$ sehr gut und nur geringfügig besser als die Korrelation im Fall der Silikonmembran. Entscheidend für die positive Bewertung der Polyamid-6-Membran ist, dass der Regressionskoeffizient bei 1 liegt und der Achsenabschnitt der Regressionsgeraden nahe null ist, d.h. die Permeabilität der Polyamid-6-Membran und der Haut sind sehr ähnlich. Regressionskoeffizient und Achsenabschnitt der Regressionsgleichung für die Silikonmembran weichen erheblich stärker von 1 bzw. null ab.

Als Modellmembranen für die Haut werden üblicherweise sehr lipophile Polymermembranen wie Silikon- oder Polyethylenmembranen (12, 27, 62) verwendet. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit scheint aber die hydrophilere Polyamid-6-Membran zur Vorhersage der Permeabilität der Haut besser geeignet zu sein.

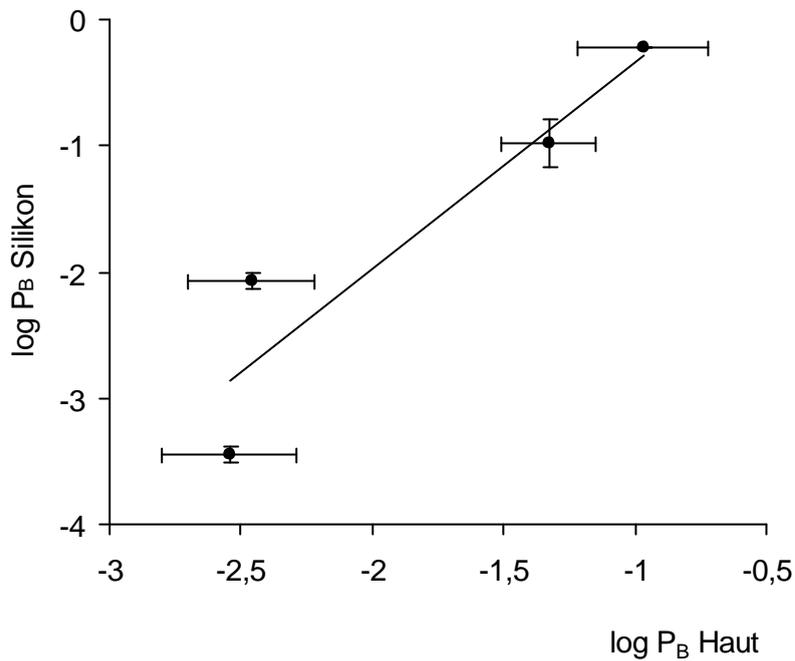


Abb. 29: Korrelation der Logarithmen der Silikon- mit den Hautpermeabilitäten in vivo von Guaifenesin und 2-Phenylphenol aus Wasser und Paraffin
 $\log \bar{x}_{\text{geo}} \pm s; P_B$ in $[\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}]$
 $\log P_B \text{Silikon} = 1,639 \log P_B \text{Haut} + 1,31; r^2 = 0,867$

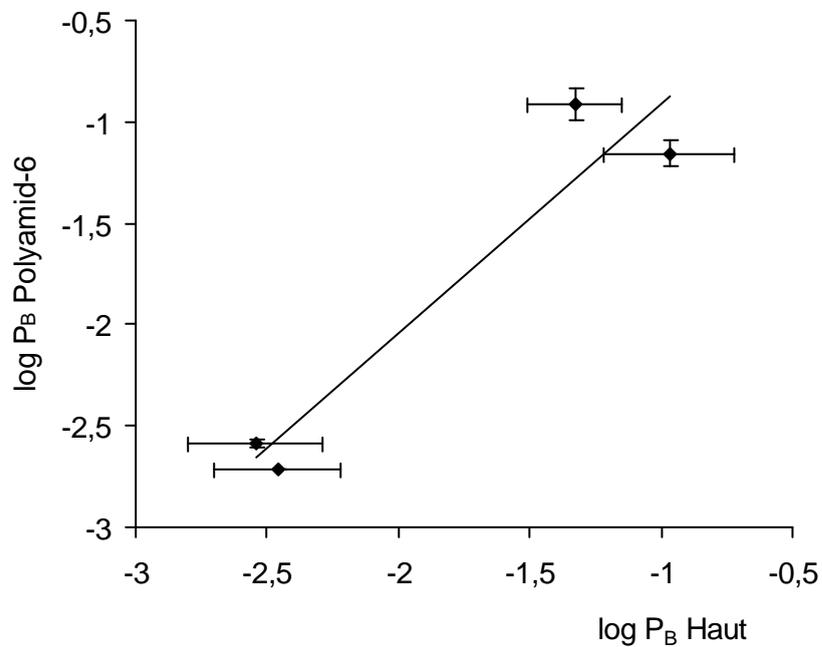


Abb. 30: Korrelation der Logarithmen der Polyamid-6- mit den Hautpermeabilitäten in vivo von Guaifenesin und 2-Phenylphenol aus Wasser und Paraffin
 $\log \bar{x}_{\text{geo}} \pm s; P_B$ in $[\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}]$
 $\log P_B \text{Polyamid-6} = 1,126 \log P_B \text{Haut} + 0,21; r^2 = 0,908$

5. Untersuchungen an einem humanen Hautäquivalent

5.1 Humane Hautäquivalente

Ursprünglich wurden humane Hautäquivalente für die Durchführung von Hautverträglichkeitstest als Ersatz für Tierversuche entwickelt (50, 52). In letzter Zeit finden humane Hautäquivalente auch vermehrt als permanenter Hautersatz für Brandopfer und als Modell für Metabolismus-, Toxizitäts- und Permeabilitätsuntersuchungen von Arzneistoffen Verwendung (67). Weiteres Einsatzgebiet ist die Erforschung verschiedener Hautkrankheiten.

Bei den Hautäquivalenten ist generell zwischen Zellkulturmonolayern von Fibroblasten oder Keratinozyten und dreidimensionalen Dermis-, Epidermis- oder Ganzhautmodellen zu unterscheiden (51). Das Ganzhautmodell setzt sich aus Dermis- und Epidermisäquivalent zusammen.

Bei der Züchtung der Epidermis- und Ganzhautmodelle ist die Differenzierung der Keratinozyten und damit die Ausbildung eines Stratum corneum sehr problematisch. Deshalb zeigen die meisten gezüchteten Hautäquivalente eine geringere Barrierefunktion als die menschliche Haut (3).

In dieser Arbeit soll ein humanes Ganzhautmodell gezüchtet und die Barriereeigenschaft durch Permeationsuntersuchungen charakterisiert werden.

5.2. Züchtung eines humanen Hautäquivalents

5.2.1 Isolierung und Kultivierung von Fibroblasten und Keratinozyten

Keratinozyten und Fibroblasten werden aus der Vorhaut Neugeborener nach Beschneidung isoliert. Zunächst ist die Vorhaut mit antibiotikahaltigem Medium zu waschen, alle weiteren Schritte sind unter aseptischen Bedingungen

durchzuführen. Zur Trennung von Dermis und Epidermis ist die Vorhaut 22 bis 24 Stunden mit 0,25%iger Trypsin-EDTA-Lösung im Kühlschrank (4°C) zu inkubieren. Danach lässt sich die Dermis leicht von der Epidermis abziehen. Um die Fibroblasten aus der Dermis isolieren zu können, muss sie mit Trypsin über 24 Stunden im Inkubator bei 37°C behandelt werden. Zur Isolierung der Keratinozyten aus der Epidermis ist eine Inkubation mit Trypsin von 10 Minuten bei 37°C ausreichend. Nach Inkubation werden die behandelten Hautschichten jeweils mechanisch zerkleinert und die sich von den Hautfragmenten ablösenden Fibroblasten bzw. Keratinozyten in der Trypsinlösung suspendiert. Nach Erhalt einer trüben Zellsuspension ist das Trypsin durch Zugabe von Rinderserum zu inaktivieren. Die abzentrifugierten Zellen lassen sich in Fibroblasten- bzw. Keratinozytenmedium resuspendieren und in handelsüblichen T-Flaschen für Zellkulturen überführen. Beide Zellkulturen sind bei 37°C, 5% CO₂ zu inkubieren. Alle lebenden Zellen haften nach einigen Stunden am Boden der T-Flasche, so dass spätestens nach 24 Stunden das Medium erstmalig ausgetauscht werden kann, um tote Zellen, die frei im Medium schwimmen, zu entfernen. Da das Medium der Ernährung der Zellen dient, sind weitere Medienwechsel in der Regel alle 2 bis 3 Tage erforderlich bis Confluence, d.h. ein lückenloser Zellverband auf dem Boden des Kulturgefäßes, erreicht ist. Durch Zellteilung erreichen die Fibroblasten nach 6 bis 8 Tagen 100% Confluence. Sie lassen sich dann subkultivieren, um eine größere Anzahl von Zellen zu erhalten oder direkt für die Präparation der Dermis weiter verwenden. Die Keratinozyten sollten nur bis ca. 70% Confluence, d.h. ca. 10 bis 14 Tage, kultiviert werden, da sonst die Gefahr frühzeitiger Differenzierung besteht.

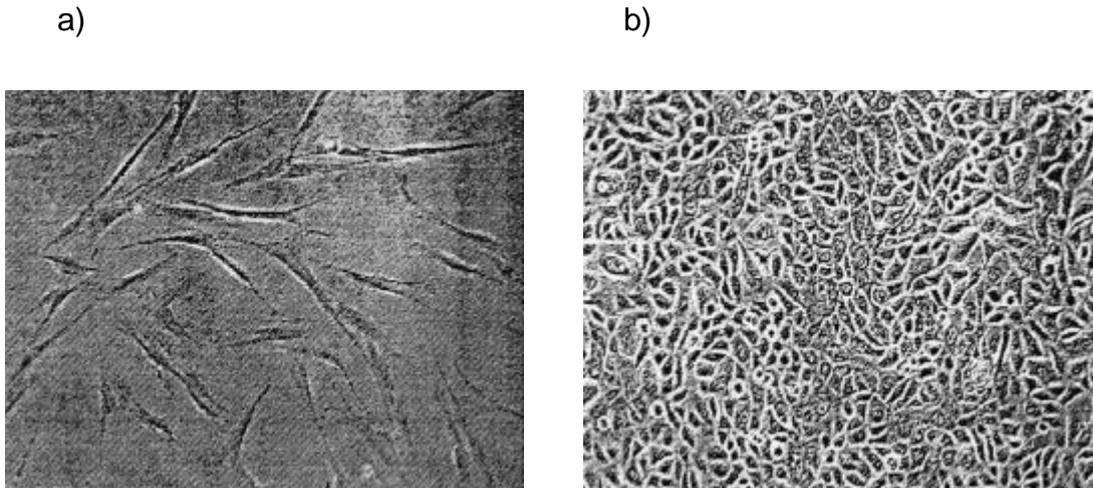


Abb. 31: Mikroskopische Aufnahme: a) Fibroblasten, b) Keratinozyten

5.2.2 Präparation von Dermis und Epidermis

Zur Präparation des Hautäquivalents werden Fibroblasten in eine Collagenmatrix eingebettet und Keratinozyten auf die Matrixoberseite gepflanzt. Dabei ist wie folgt vorzugehen (19):

Zu einer Mischung aus konzentriertem Fibroblastenmedium mit Rinderserum und flüssigem, dermalen Rindercollagen in einer kleinen Petrischale ist die erforderliche Anzahl Fibroblasten hinzu zu pipettieren und gleichmäßig zu verteilen. Beim vorsichtigen Schwenken der Petrischale ist bereits eine gelartige Membran sichtbar. Die Mischung ist ca. 7 Tage bei 37°C und 10% CO₂ zu inkubieren. In dieser Zeit vermehren sich die Fibroblasten und kontrahieren das hydratisierte Collagen zu einer gewebeartigen Struktur (Dermisäquivalent), in der sie selbst inkorporiert sind. Der Mechanismus der Collagenkontraktion ist bis heute nicht vollständig geklärt, Ausmaß und Geschwindigkeit der Kontraktion steigen aber mit zunehmender Fibroblasten- und Serumkonzentration (3). Das kontrahierte Dermisäquivalent ist in eine Titerplatte mit Einsatz (Snapwell Insert System) zu transferieren, die eine getrennte Versorgung von Dermisober- und unterseite erlaubt. Wenige Mikroliter einer konzentrierten Keratinozytensuspension werden

auf der Dermisoberseite appliziert. Innerhalb von 3 Stunden adhären die Keratinozyten auf der Dermisoberseite. Inkubation erfolgt bei 37°C und 10% CO₂. Für weiteres Zellwachstum sind die Zellen die ersten 3 Tage von Dermisober- und unterseite mit serumhaltigem Medium zu versorgen. Danach wird das Medium von der Dermisoberseite entfernt und die Versorgung findet nur noch von der Unterseite statt, damit sich die Keratinozyten in Kontakt zur Gasphase differenzieren können. Innerhalb weiterer 7 bis 10 Tage bildet sich eine keratinisierte Epidermis aus.

5.3 Permeabilitätsuntersuchungen

Um die Barriereeigenschaft des gezüchteten, humanen Hautäquivalents zu beurteilen, werden Diffusionsuntersuchungen durchgeführt und die daraus resultierende Permeabilität mit der Hautpermeabilität in vivo (Kap. III 2.2) und der Permeabilität der Kuheuterhaut in vitro (Kap. III 3.4) verglichen.

Bei der Züchtung des Hautäquivalents ist die Ausbildung des Stratum corneum der kritische Schritt. Deshalb ist für die Diffusionsversuche ein hydrophiler Modellarzneistoff auszuwählen, dem die lebende Epidermis und Dermis nur wenig Widerstand entgegensetzt und für den das Stratum corneum eine große Permeabilitätsbarriere darstellt. Aus der Reihe der hydrophilen Arzneistoffe wird wieder Guaifenesin ausgewählt, um die Ergebnisse auch mit der Kuheuterstudie vergleichen zu können.

5.3.1 Durchführung

Die Permeationsversuche lassen sich in einer modifizierten Franz-Diffusionszelle durchführen. Da die gezüchteten Hautäquivalente relativ klein sind, ist auch die Diffusionsfläche der verwendeten Zelle mit 0,196 cm² sehr gering. Das Volumen des Akzeptors beträgt 4,1 ml und der Donator fasst maximal ein Volumen von 500

µl. Als Akzeptormedium kommt Phosphatpuffer pH 7,4 zum Einsatz. Zur Aufrechterhaltung der Versuchstemperatur von 32°C dient ein Temperiermantel, der an ein Wasserbad angeschlossen ist. Als Donatorlösung wird eine konzentrierte, wässrige Guaifenesinlösung eingesetzt. Die Versuche sind über eine Dauer von 24 Stunden durchzuführen.

Über einen Entnahmestutzen lassen sich aus dem Akzeptor Proben entnehmen und die entnommenen Probevolumina durch Puffer ersetzen. Zu Versuchsbeginn sind stündlich Proben zu ziehen, später sind die Entnahmeintervalle größer zu wählen. Die Guaifenesinkonzentration im Akzeptor lässt sich mittels HPLC bestimmen.

Für die Auswertung ist zunächst die ermittelte Guaifenesinkonzentration im Akzeptor zu korrigieren, da sich das Akzeptormedium durch Ersetzen des entnommenen Probevolumens mit wirkstofffreiem Puffer verdünnt. Aufgrund der hohen Permeabilität des gezüchteten Hautäquivalents entleert sich der Donator relativ schnell, so dass die Diffusionsversuche nach Kinetik erster Ordnung entsprechend den In-vitro-Versuchen mit Kuheuterhaut (Kap. III 3.3.5) auszuwerten sind.

5.3.2 Ergebnisse

Die Permeabilitätsuntersuchungen werden an drei gezüchteten Hautäquivalenten durchgeführt, die einer Charge entstammen, d.h. die am gleichen Tag aus den gleichen Zellkulturen (Fibroblasten und Keratinozyten) angesetzt und gleichzeitig inkubiert wurden.

In Abb. 32 ist die resultierende Guaifenesinkonzentration im Akzeptor gegen die Versuchsdauer aufgetragen. Die Streuung über die drei Diffusionsversuche ist erstaunlich gering. Der Arzneistoffflux durch das Hautäquivalent steigt zu Versuchsbeginn schnell an, eine Lag-time ist nicht erkennbar.

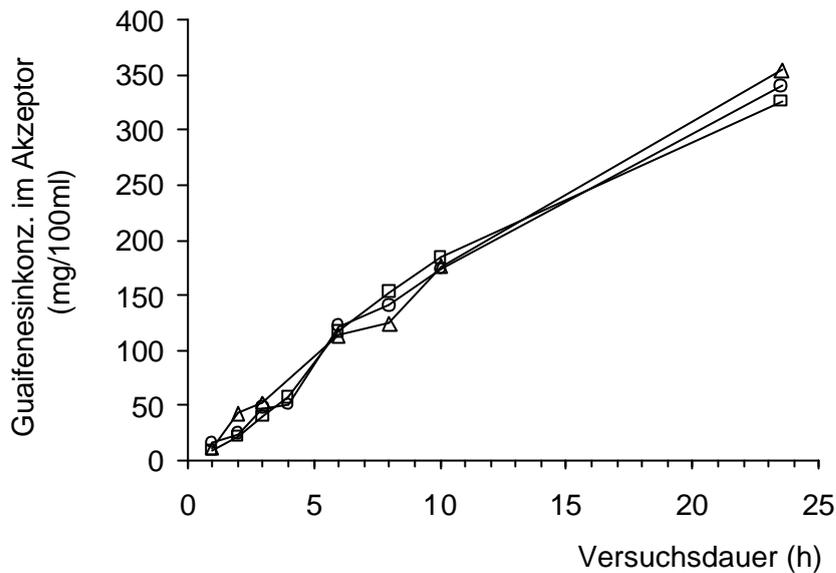


Abb 32: Guaifenesinkonzentration im Akzeptor über die Versuchsdauer (n=3)
 Donatorlösung: 16,26mg/250 μ l Wasser ($a_{th}=0,80$)

Da bei diesen Versuchen andere Diffusionszellen, insbesondere Zellen geringer Diffusionsfläche mit kleinvolumigem Akzeptor, zum Einsatz kommen, ist der Guaifenesinflux nicht direkt mit dem Flux durch die intakte Kuheuterhaut in Abb. 25 bzw. 26 (Kap. III 3.4.2) vergleichbar. Deshalb ist zunächst die Permeabilität des gezüchteten Hautäquivalents zu berechnen, um die verschiedenen Hauttypen bewerten zu können.

Tab. 24: Permeabilität des humanen Hautäquivalents für Guaifenesin aus Wasser

	Permeabilität P_B (cm \cdot h $^{-1}$)
Versuch 1	0,0898
Versuch 2	0,0801
Versuch 3	0,0718
\bar{x}_{geo}	0,0802

5.4 Bewertung des humanen Hautäquivalents

Anhand der Guaifenesinpermeabilität soll nun die Barriereeigenschaft des gezüchteten Hautäquivalents im Vergleich zur Human- und Kuheuterhaut beurteilt werden. Tab. 25 fasst die Ergebnisse zusammen:

Tab. 25: Guaifenesinpermeabilität der untersuchten Hauttypen aus Wasser

	Permeabilität P_B ($\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$)
Humanhaut	0,00286 (Tab. 6)
Kuheuterhaut	0,00310 (Tab. 10)
Hautäquivalent	0,0802 (Tab. 24)

Der Vergleich der Permeabilitäten zeigt, dass das gezüchtete Hautäquivalent deutlich permeabler ist als Humanhaut in vivo und Kuheuterhaut in vitro. Die Permeabilität des Hautäquivalents ist gegenüber der Humanhaut um Faktor 28 erhöht. Somit ist die Barriereeigenschaft des gezüchteten Stratum corneum noch deutlich geringer die der menschlichen Haut. Für eine umfassende Bewertung wäre es jedoch notwendig, die Permeabilität verschiedener hydrophiler und lipophiler Arzneistoffe zu ermitteln.

In einigen Arbeitsgruppen wird versucht, durch Zusatz verschiedener Hormone, Vitamine und anderer Substanzen zu den Zellkulturen oder auch durch Veränderung der Inkubationsbedingungen (relative Feuchte, CO_2 -Gehalt), die Barriereeigenschaften des Stratum corneum humaner Hautäquivalente weiter zu verbessern. In der Literatur finden sich bereits Hautäquivalente, deren Permeabilität nur 5-fach gegenüber Humanhaut in vitro erhöht ist (3). Betrachtet man die Permeabilität des Hautäquivalents und die Hautpermeabilität der überwiegend eingesetzten Labornagetiere im Vergleich zur Humanhaut, so scheidet das Hautäquivalent relativ gut ab. Die Permeabilitäten der üblichen Labornagetiere sind ebenfalls um eine Zehnerpotenz und mehr gegenüber der Humanhaut erhöht (3, 26, 71).

IV EXPERIMENTELLER TEIL

1. Bestimmung der physikalisch-chemischen Parameter

1.1 Löslichkeiten

In einer Glasflasche (100 ml) mit Schraubverschluss und PTFE-Dichtung ist zunächst ein Überschuss an Substanz in ca. 30 ml Vehikel zu suspendieren. Durchmischung erfolgt durch das Rotieren der Glasgefäße in einer Halterung im Wasserbad bei $32\pm 1^\circ\text{C}$ mit einer Geschwindigkeit von 30 ± 2 Umdrehungen pro Minute über eine Dauer von 24 Stunden.

Der Überstand der wässrigen Suspension wird durch einen temperierten Rundfilter (Schleicher & Schuell GmbH, Dassel) filtriert. Der Paraffinansatz ist zunächst in ein temperiertes Zentrifugenglas zu transferieren und dann für ca. 10 min mit einer Drehzahl von $4000\pm 10\text{ min}^{-1}$ zu zentrifugieren (Varifuge, Heraeus Christ GmbH, Osterode). Der Überstand nach Zentrifugation muss zusätzlich durch einen temperierten Polyethersulfon-Filter der Porengröße $0,8\ \mu\text{m}$ (Supor[®]-800, GelmannScience, MI, USA) filtriert werden, um die gesättigte Lösung von restlichen Arzneistoffpartikeln zu befreien.

Die gesättigten Lösungen sind bei hohen Löslichkeiten geeignet zu verdünnen, Arzneistofflösungen in Paraffin mit 2-Propanol. Die Konzentrationen der verdünnten Lösungen sind in einer 1cm-Quarzküvette spektralphotometrisch im jeweiligen Absorptionsmaximum der Substanz im Lösungsmittel (Tab. 26) zu bestimmen (Lambda 40 UV/VIS-Spektralphotometer, Perkin Elmer, Überlingen). Nur die Löslichkeit von Etofyllin in Paraffin ist zu gering, so dass sie mittels HPLC bestimmt wird (Kap. IV 2.4).

Die Löslichkeit ergibt sich als Mittelwert aus drei Bestimmungen. Die Linearität im Messbereich ist anhand von Eichgeraden aus je drei Einwaagen zu überprüfen.

1.2 Spektralphotometrie

Tab. 26: Parameter der Spektralphotometrie

Substanz*	Lösungsmittel	λ_{\max} (nm)	Verdünnung (gesättigter Lsg.)	$A_{1\text{cm}}^{1\%}$
MBC	2-Propanol	295nm	0,5 : 10.000	1043
TCS	2-Propanol	282nm	0,3 : 1.000	190
OPP	2-Propanol	284nm	1,25 : 10.000	262
ETN	2-Propanol	263nm	0,3 : 1.000	189
GLG	2-Propanol	275nm	1:10	142
GLG	Wasser	273nm	0,5 : 1.000	120
ETO	Wasser	273nm	0,35 : 1.000	428

* Abkürzungen siehe S.22

1.3 R_{MW} -Werte

Zur Bestimmung der R_{MW} -Werte dienen DC-Fertigplatten RP-18 F₂₅₄, 20 x 20 cm (E. Merck, Darmstadt) als stationäre Phase. Zu Beginn erfolgt die Aktivierung der Platten für ca. 15 min. bei 120± 2°C im Trockenschrank. Es werden konzentrierte Lösungen der Modellarzneistoffe in Ethanol hergestellt, die zweifach pro Platte je 1 cm vom unteren Plattenende entfernt aufzutragen sind, bis eine deutlichen Fluoreszenzlöschung bei 254 nm zu erkennen ist. Der Abstand zur nächsten Substanz beträgt ebenfalls 1 cm und der zum seitlichen Plattenrand 2 cm. Als Frontmarker kommt eine konzentrierte Kaliumjodidlösung in einer Ethanol-Wasser-Mischung (25:75 V/V) zum Einsatz, die dreifach pro Platte aufgetragen wird. Die Entwicklung der Platten erfolgt über eine Laufstrecke von 8 cm in DC-Kammern (Desaga, Heidelberg), deren Wände mit Filterpapier ausgekleidet sind, um die erforderliche Kammersättigung schneller zu erreichen. Zur Konditionierung stehen die Kammern in einem Brutschrank (Memmert GmbH&Co.KG, Schwabach) bei 30±0,5 °C zusammen mit einem wassergefüllten Becherglas, um eine konstante Luftfeuchte zu gewährleisten.

Als mobile Phasen sind Methanol-Wasser-Mischungen mit 30-95% (V/V) Methanol und Acetonitril-Wasser-Mischungen mit 30-80% (V/V) Acetonitril zu verwenden. Jeder Modellarzneistoff ist mit jeder Methanol-Wasser-Mischung und mit jeder Acetonitril-Wasser-Mischung zu eluieren, so dass zwei verschiedene R_{MW} -Werte pro Substanz erhalten werden.

Nach Trocknung der Platten an der Luft bei Raumtemperatur erfolgt die Detektion der Substanzflecken durch Fluoreszenzlösung unter UV-Licht bei 254 nm. Die Laufstrecken der Substanzen werden mit dem Lineal vom Startpunkt bis zur Mitte des gewanderten Substanzflecks gemessen.

2. In-vivo-Studien

2.1 Durchführung

Die gewölbten Glaskammern sind der Form eines durchschnittlichen Oberarms angepasst (42) und werden in einem Drahtgestell mit Hilfe elastischer Binden mit aufgenähten Klettverschlüssen an beiden Oberarmen der Probanden befestigt. Über die Einstellung der Bandagen lässt sich der Druck, mit dem die Kammern auf den Oberarmen aufliegen, regulieren. Es sollte ein Auflagedruck angelegt werden, der einerseits ein Auslaufen der Versuchslösung auch bei leichter Armbewegung verhindert und andererseits für die Probanden über sieben Stunden akzeptabel ist. Der Auflagedruck ist meistens nach ein oder zwei Stunden nachzuregulieren. Zu beachten ist dabei, dass sich das Füllvolumen der Kammer mit zunehmendem Druck verringert. Sollte das Aufliegen der Kammerinnenseite auf der Haut nicht zu vermeiden sein, ist auf gute Benetzung dieser Hautareale beim Einfüllen der Versuchslösung zu achten.

Die Kammern verbleiben über die gesamte Versuchsdauer am Oberarm und werden auch nach der Konditionierungsphase (erste Versuchsstunde) nicht abgenommen.

Die verwendeten 5ml-Spritzen (Microliter™ Syringes, Hamilton Bonaduz AG, Schweiz) mit flexibler PTFE-Kanüle ermöglichen die Volumenkontrolle der eingefüllten und entnommenen Versuchslösung. Die entnommenen Lösungen jedes Versuchsintervalls werden in braunen 10ml-Chromatographie-Schraubdeckelgläsern kühl gelagert. Aufgrund der mikrobiellen Anfälligkeit der wässrigen Probe sind diese bis zur weiteren Aufarbeitung einzufrieren.

An der In-vivo-Studie nehmen hautgesunde Probanden im Alter von 22 bis 32 Jahren teil.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Studien-Nr. 1421).

2.2 Berechnung der Kammerflächen

Die Applikationsfläche jeder Glaskammer zeigt die Form einer gewölbten Ellipse. Unter Berücksichtigung des Wölbungsradius berechnet sich die Applikationsfläche folgendermaßen (41):

$$F = \frac{a \cdot \pi^2 \cdot \arcsin\left(\frac{b}{r}\right)}{360}$$

Gl. 33

F	Applikationsfläche
a	langer Innendurchmesser der Ellipse
b	kurzer Innendurchmesser der Ellipse
r	Wölbungsradius der Kammer (r = 47 mm)

2.3 HPLC-Analytik

Die Konzentrationsbestimmungen der Probandenproben werden mit einer HPLC-Anlage (LC 6A Shimadzu, Duisburg) mit den folgenden Komponenten durchgeführt:

Autoinjektor (SIL-6B, Shimadzu, Duisburg)

UV/VIS-Detektor (SPD-6AV, Shimadzu, Duisburg)

Integrator (C-R4AX Chromatopac, Shimadzu, Duisburg)

Säulenofen (Thermasphere[®] TS-430, Phenomenex, Aschaffenburg)

Jede Probe wird viermal vermessen. Als externer Standard ist der zu bestimmende Arzneistoff in definierter Konzentration nach je drei Proben erneut zu chromatographieren. Alle Proben lassen sich isokratisch eluieren und sind über die Peakhöhen mit Hilfe des externen Standards zu quantifizieren:

$$c_P = \frac{H_P \cdot c_{ST}}{H_{ST}} \quad \text{Gl. 34}$$

c_P, c_{ST} Konzentration der Probe bzw. des Standards

H_P, H_{ST} Peakhöhe der Probe bzw. des Standards

Die Linearität der Peakhöhen ist für alle Modellarzneistoffe auf der verwendeten Säule im gesamten Messbereich an mindestens drei Konzentrationen des Analyten zu überprüfen. Die Präzision (Wiederholbarkeit) ist mittels drei Bestimmungen auf 100%-Niveau sicherzustellen.

2.3.1 Analytik der wässrigen Proben

Die wässrigen Proben sind nach dem Auftauen falls erforderlich mit einer 10%(V/V)-igen 2-Propanol-Wasser-Mischung mittels Pipette (Finnpipette[®] 100-1000 µl, Labsystems, Finnland oder Transferpette[®] 20-100 µl, Brand GmbH&Co., Wertheim) zu verdünnen. Die externen Standards sollten in der gleichen Lösungsmittelmischung hergestellt werden. Die Standards für die lipophilen Arzneistoffe sind aufgrund begrenzter Wasserlöslichkeit direkt in der Fließmittelmischung anzusetzen. Für die HPLC wurde die folgende Reversed-Phase-Säule verwendet:

Tab. 27: Säulenparameter

MN Nucleosil[®] 100 5 C18 HD (Macherey-Nagel, Düren)

Größe	250 x 4 mm
Partikelgröße	5 µm
Porendurchmesser	10 nm
Vorsäule	Nucleosil [®] 100 5 C18 HD (70 x 2 mm)

Tab. 28: HPLC-Parameter für Modellarzneistoffe in Wasser der In-vivo-Studie

Substanz	Fließmittel	Wellenlänge (nm)	Flussrate (ml/min)	Temperatur (°C)
	Acetonitril/ Wasser (V/V)			
MBC	70/30	309	1,5	25
TCS	70/30	282	1,5	RT*
NAB	80/20	270	0,8	25
OPP	60/40	289	1,0	25
ETN	70/30	263	0,8	25
GLG	70/30	273	0,7	25
ETO	70/30	273	0,7	25

* RT keine Temperierung im Säulenofen

2.3.2 Analytik der Paraffinproben

Die Paraffinproben sind mit 2-Propanol auf eine praktikable Konzentration zu verdünnen. Da die oben genannten Pipetten nur wässrige Lösungen exakt dosieren, ist der zu verdünnende Anteil der Paraffinprobe abzuwiegen und mit 2-Propanol auf das angestrebte Volumen zu ergänzen. Die ermittelten Konzentrationen der HPLC-Bestimmung werden bei der Auswertung auf eine Durchschnittseinwaage bezogen. Um eine gute Wiederfindung zu gewährleisten, sind die Standards ebenfalls zunächst in Paraffin herzustellen und dann mit 2-Propanol zu verdünnen. Die Analyse erfolgt mittels Normalphasen-Chromatographie an einer Cyanosäule und einem Fließmittelgemisch aus Heptan und 2-Propanol.

Tab. 29: Säulenparameter

LUNA[®] 5 μ CN (Phenomenex, Aschaffenburg)

Größe	250 x 4,6 mm
Partikelgröße	5 μ m
Porendurchmesser	10 nm
Vorsäule	LUNA [®] 5 μ CN (4 x 30 mm)

Tab. 30: HPLC-Parameter für Modellarzneistoffe in Paraffin der In-vivo-Studie

Substanz	Fließmittel	Wellenlänge (nm)	Flussrate (ml/min)	Temperatur (°C)
	Heptan/2-Propanol (V/V)			
MBC	88/12	310	1,25	25
TCS	75/25	282	1,25	25
NAB	95/5	266	1,0	RT*
OPP	90/10	289	1,25	25
ETN	75/25	263	1,0	RT*
GLG	80/20	275	1,5	25
ETO	65/35	271	1,75	25

* RT keine Temperierung im Säulenofen

2.4 Berücksichtigung der Restvolumina

Während des Versuchs verbleibt in jeder Kammer nach Entnahme der Versuchslösung immer ein Restvolumen. Da sich dieses Restvolumen im folgenden Versuchsintervall mit der neu eingefüllten Ausgangslösung vermischt und diese verdünnt, ist die korrigierte Ausgangskonzentration für die weitere Auswertung des Versuchs zu berechnen.

Da eine unbekannte Menge des Vehikels in die Haut penetriert, kann das Restvolumen nicht aus der Differenz von Einfüll- und Entnahmenvolumen berechnet werden, sondern ist experimentell zu bestimmen.

Das Restvolumen ist für Paraffin und Wasser an ungequollener und gequollener Haut, d.h. für den Hautstatus zu Versuchsbeginn und zu späteren Versuchszeiten zu ermitteln. Um zunächst das Restvolumen bei ungequollener Haut zu bestimmen, sind 4 Kammern wie üblich an den Oberarmen von 2 Probanden zu befestigen, um dann arzneistofffreies Vehikel sofort nach dem Befüllen der Kammern wieder zu entnehmen und aus der Differenz das Restvolumen zu berechnen. Für die Ermittlung des Restvolumens bei gequollener Haut verbleiben die mit Vehikel gefüllten Kammern auf den Oberarmen und werden erst nach zwei Stunden abgenommen, gereinigt und wieder auf dem selben Hautareal befestigt. Die Haut ist nun gequollen und das Restvolumen ist durch Einfüllen und sofortiges Entnehmen des Vehikels zu bestimmen.

Tab. 31: Wasserrestvolumina der Kammern (A - D) bei gequollener und ungequollener Haut (2 Probanden)

Restvolumen	Kammer				\bar{x}
	A	B	C	D	
ungequollen	0,1	0,1	0,1	0,05	0,088
ungequollen	0,05	0,1	0,05	0,1	0,075
gequollen	0,05	0,1	0,1	0,55	0,075
gequollen	0,05	0,1	0,1	0,05	0,075
					0,08

Tab. 32: Paraffinrestvolumina der Kammern (A - D) bei gequollener und ungequollener Haut (2 Probanden)

Restvolumen Paraffin (ml)	Kammer				\bar{x}
	A	B	C	D	
ungequollen	0,15	0,15	0,13	0,13	0,140
ungequollen	0,1	0,15	0,18	0,13	0,140
gequollen	0,1	0,2	0,12	0,15	0,143
gequollen	0,1	0,05	0,13	0,1	0,095
					0,13

Die Ergebnisse der Tabellen 31 und 32 zeigen, dass die Restvolumina bei den verschiedenen Probanden und Kammern leicht differieren. Unterschiede zwischen den Restvolumina bei gequollener und ungequollener Haut sind nicht festzustellen. Als Näherung wird das Restvolumen für alle Kammerpositionen mit dem Mittelwert für wässrige Versuchslösungen von 0,08 ml und für Paraffinlösungen mit 0,13 ml festgesetzt.

Die korrigierte Ausgangskonzentration für die weitere Versuchsauswertung ist wie folgt zu berechnen (41):

$$c_{\text{korr}}^0 = \frac{V_R \cdot c_{\text{HPLC}}^{n-1} + V_E \cdot c^0}{V_R + V_E} \quad \text{Gl. 35}$$

c_{korr}^0 korrigierte Ausgangskonzentration

c^0 Ausgangskonzentration

c_{HPLC}^{n-1} Konzentration der vorangehenden Probe (HPLC-Konzentration)

V_R Restvolumen

V_E Eingabevolumen

3. In-vitro-Studie mit Kuheuterhaut

3.1 Präparation der Kuheuterhaut

Die Kuheuterhaut entstammt einer nicht laktierenden Kuh des Düsseldorfer Schlachthofs direkt nach der Schlachtung. Sie ist zunächst mit Wasser von beiden Seiten gründlich zu waschen. Für die Präparation lässt sich die Haut mit der Dermisseite nach oben auf eine Styroporplatte mit Hilfe von Injektionskanülen aufspannen. Mit einer stumpfen Präparierschere sind Kollagen- und Fettgewebe bestmöglich zu entfernen ohne die Haut zu verletzen. Danach wird der Bereich der Zitzen großzügig ausgeschnitten, und die Haut in runde Stücke von ca. 7 cm Durchmesser zugeschnitten. Die einzelnen Hautstücke lassen sich in handelsübliche Gefrierbeutel verpacken und mit flüssigem Stickstoff schockgefrieren. Die Lagerung über mehrere Wochen erfolgt im Gefrierschrank bei -18°C (54, 58).

Vor Versuchsbeginn ist das benötigte Hautstück bei Raumtemperatur aufzutauen. Nach dem Auftauen wird die Haut befeuchtet und vorsichtig mit einem Einwegrasierer rasiert, ohne das Stratum corneum zu verletzen.

3.2 Tape-stripping des Stratum corneum

Die rasierte Kuheuterhaut ist mit Kosmetiktüchern gründlich abzutrocknen, damit die Klebestreifen (Scotch[®], 3M Deutschland GmbH, Neuss) auf dem Stratum corneum haften. Es werden 3 bis 4 Klebestreifen nebeneinander aufgebracht bis die gesamte Fläche des Hautstücks abgeklebt ist. Um verschiedene Hautstücke gleichmäßig durch Tape-stripping zu schädigen, ist das abgeklebte Hautstück für eine bestimmte Zeit mit einem gewählten Auflagedruck über die gesamte Fläche zu belasten (10 s; 6,4 kg). Danach werden die Klebestreifen von der Haut

abgezogen. Dieser gesamte Vorgang ist mit neuen Klebestreifen 14mal zu wiederholen.

3.3 Aufbau und Funktion der Diffusionszelle

Für die In-vitro-Versuche wird die Diffusionszelle aus Glas vom Typ der modifizierten Franz-Diffusionszelle aus Abb. 33 verwendet. Das Donatorkompartiment ist extrem großvolumig (ca. 100 ml) und das Akzeptorkompartiment vergleichsweise klein (15 ml). Zusätzlich zur Standardzelle wird die Donatorlösung mit einem Glasrührer in Schlifführung gerührt. Das Akzeptormedium ist mittels Magnetrührer zu durchmischen. Durch einen seitlich angebrachten Einfüll- und Entnahmestutzen ist die Befüllung des Akzeptors und die Probenentnahme während des Versuchs möglich.

Das Donator- und Akzeptorkompartiment lassen sich mit Hilfe leicht flexibler Halteringe aus Polyoxymethylen fest miteinander verschrauben. Aufgrund der Elastizität der Haut ist eine Dichtung zwischen den beiden Kompartimenten nicht notwendig.

Die Durchmischung des Akzeptorkompartiments lässt sich überprüfen, indem der offene Akzeptor bis zum Rand mit Wasser befüllt und mittels Magnetrührer gerührt wird. Nach Zugabe weniger Tropfen Methylenblau ist die Durchmischung visuell zu verfolgen. Der Farbstoff verteilt sich zwar in weniger als 10 Sekunden im Akzeptorkompartiment, aber auch nach 60 min erfolgt keine Durchmischung mit dem Akzeptormedium im Einfüllstutzen. Deshalb muss vor jeder Probeentnahme aus dem Akzeptor mehrmals etwas Akzeptorlösung mit der Glasspritze (Kap. IV 2.1) aufgezogen und wieder eingefüllt werden, um vollständige Durchmischung auch im Einfüllstutzen zu gewährleisten.

Ausreichende Durchmischung des Donatorkompartiments lässt sich überprüfen, indem Parafilm[®] zwischen Donator- und Akzeptorkompartiment gespannt wird. Akzeptor- und Donatorkompartiment sind mit Paraffin zu befüllen. In die Donatorlösung sind zusätzlich drei Tropfen Sudan III zu geben. Bei einer Rührgeschwindigkeit von ca. 50 Umdrehungen pro Minute im Donator ist eine

vollständige Durchmischung innerhalb von 40 Sekunden gegeben. Der Versuch wird mit Wasser in beiden Kompartimenten wiederholt. In die Donatorlösung sind nun wenige Tropfen Methylenblau zu zusetzen. Vollständige Durchmischung ist nach 15 Sekunden erreicht. Die Durchmischungszeiten sind als völlig ausreichend anzusehen.

Zur Prüfung auf Dichtigkeit der Kompartimente werden beide Versuchsansätze über 48 Stunden im Wasserbad bei $32\pm 1^\circ\text{C}$ temperiert. Da weder im Akzeptorkompartiment noch im Wasserbad nach visueller Beurteilung Spuren der Farbstoffe zu erkennen sind, ist davon auszugehen, dass Dichtigkeit der Diffusionszelle auch über einen längeren Zeitraum gegeben ist.

3.4 Durchführung

Die Kuheuterhaut wird mit der Epidermisseite nach oben zwischen Donator- und Akzeptorkompartiment gelegt und die beiden Kompartimente über die Halteringe fest verschraubt.

Das auf 32°C erwärmte Akzeptormedium (Phosphatpuffer pH 7,4 Ph.Eur. mit 0,02% Natriumazid) ist mittels Glasspritze (Kap. IV 2.1) über den seitlichen Einfüllstutzen möglichst luftblasenfrei einzufüllen. Da das Akzeptorvolumen aufgrund der Elastizität der Haut und des Drucks der eingefüllten Donatorlösung leicht schwankt, ist Volumenkontrolle beim Befüllen notwendig.

Nach dem Einfüllen der Donatorlösung wird die Diffusionszelle im Wasserbad bei $32\pm 1^\circ\text{C}$ temperiert (Thermostat: Julabo EM, Juchheim Labortechnik, Seelbach). Es ist darauf zu achten, dass der Magnetrührer im Akzeptor störungsfrei rotiert (Ikamag[®] EOA 9, Janke & Kunkel GmbH & Co.KG, Staufen i.Br.).

Die Entnahme einer Probe (1,5 ml) aus dem Akzeptor erfolgt in festgelegten Abständen und das Probenvolumen ist durch erwärmten Puffer zu ersetzen.

Die entnommenen Proben werden in braune 10ml-Chromatographie-Schraubdeckelgläser gefüllt und wegen der mikrobiellen Anfälligkeit bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren.

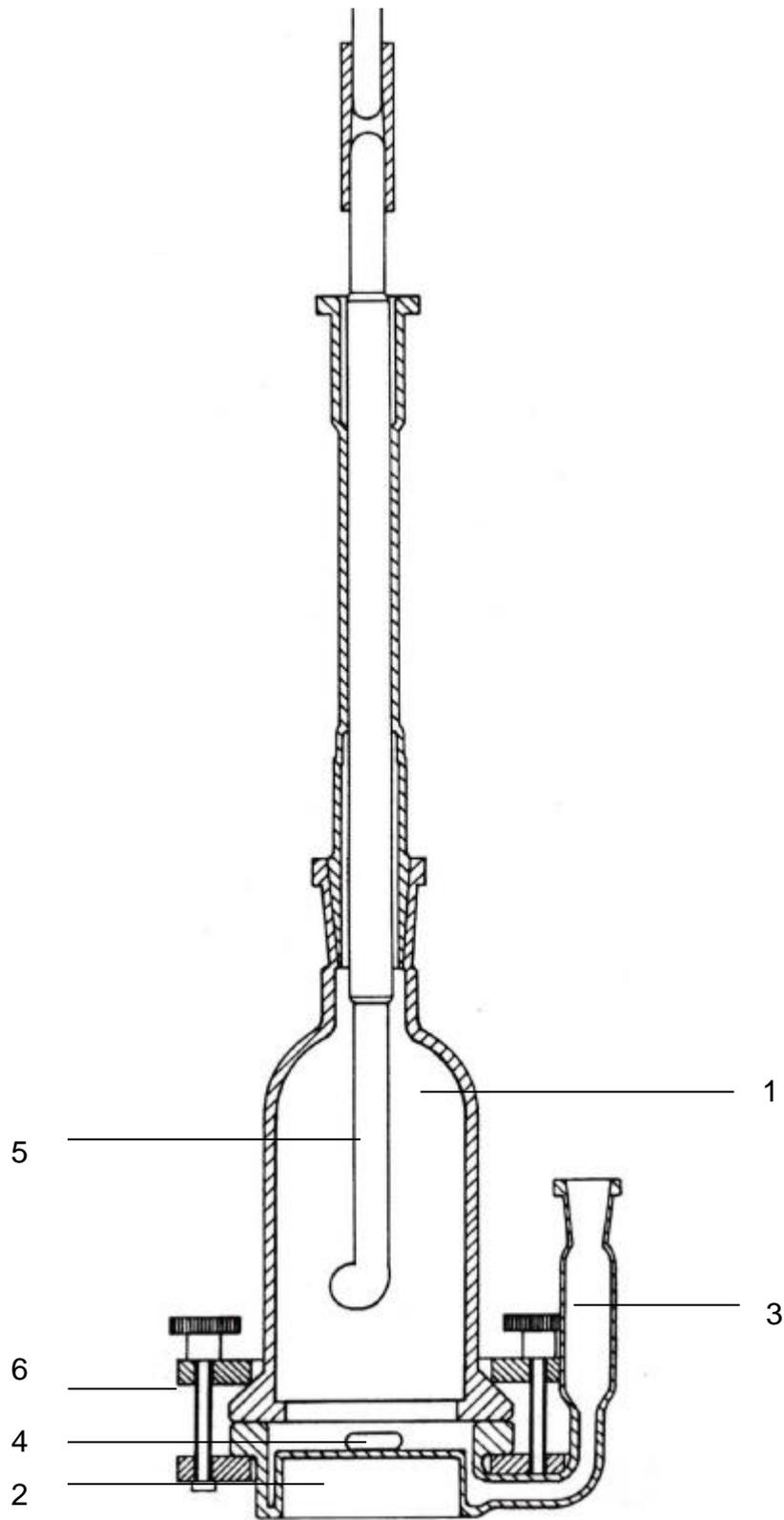


Abb. 35: Modifizierte Franz-Diffusionszelle

- | | | | |
|---|----------------------|---|--------------|
| 1 | Donatorkompartiment | 4 | Magnetrührer |
| 2 | Akzeptorkompartiment | 5 | Glasrührer |
| 3 | Einfüllstutzen | 6 | Halteringe |

3.5 HPLC-Analytik

Die Proben sind nach dem Auftauen bei Raumtemperatur mit destilliertem Wasser auf eine geeignete Konzentration zu verdünnen (1:10 bis 1:1000). Der Standard ist ebenfalls in destilliertem Wasser herzustellen.

Bei der Konzentrationsbestimmung ist entsprechend Kap. IV 2.4. vorzugehen.

Tab. 33: Säulenparameter

MN Nucleosil[®] 100 5 C18 (Macherey-Nagel, Düren)

Größe	125 x 4 mm
Partiklegröße	5 µm
Porendurchmesser	10 nm
Vorsäule	Nucleosil [®] 100 5 C (70 x 2 mm)

Tab. 34: HPLC-Parameter für Guaifenesin der In-vitro-Studie

Substanz	Fließmittel Acetonitril/Wasser (V/V)	Wellenlänge (nm)	Flussrate (ml/min)	Temperatur (°C)
Guaifenesin	20/80	273	1,0	22

3.6 Korrektur der Akzeptorkonzentration

Da das entnommene Probevolumen zu jedem Zeitpunkt durch wirkstofffreien Puffer zu ersetzen ist, muss diese Verdünnung der Akzeptorkonzentration entsprechend Gl. 35 korrigiert werden.

$$c_{\text{korr}}^n = c^n + c_{\text{korr}}^{n-1} - c^{n-1} \cdot \frac{V_A - V_P}{V_A} \quad \text{Gl. 35}$$

c_{korr}^n korrigierte Akzeptorkonzentration

c^n verdünnte Akzeptorkonzentration

c_{korr}^{n-1} bzw. c^{n-1} korrigierte bzw. verdünnte Akzeptorkonzentration der zuvor gezogenen Probe

V_A gesamtes Akzeptorvolumen

V_P entnommenes Probevolumen

4. Untersuchungen an Polymermembranen

4.1 Bestimmung der physikalisch-chemischen Parameter

4.1.1 Dicke der Membranen

Die Dicke der Polymermembranen ist nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank (Memmert GmbH&Co.KG, Schwabach) bei $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ mittels Mikrometerschraube (SR44 1.5V Mitutoyo, Japan) mehrfach pro untersuchtem Folienstück zu bestimmen.

4.1.2 Dichte

Die Dichtebestimmung wird in 10ml-Messkolben durchgeführt, deren Volumen zunächst titrimetrisch zu bestimmen ist. Die Polymerfolien sind in möglichst kleine Streifen zu schneiden und eine Menge von ca. 700 mg (Silikon) bzw. 500 mg (Polyamid-6) genau gewogen in die Kolben einzufüllen. Das verbleibende Volumen lässt sich mit 2-Propanol titrieren, wobei anhaftende Luftblasen durch leichtes Klopfen an der Kolbenwand zu entfernen sind. Die Dichte ist aus der Volumendifferenz und der Einwaage der Polymerfolien zu berechnen.

4.1.3 Quellung

Die Quellung der Polymermembranen in Wasser und Paraffin wird über die Zunahme der Foliendicke nach 24-stündiger Inkubation mit beiden Vehikeln bestimmt.

Aus der Folie sind kleine Stücke von ca. 3 x 3 cm zu schneiden und bei $32\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank zu lagern. Nach 24 Stunden ist die Foliendicke entsprechend Kap. IV 4.1.1. zu bestimmen. Diese Folienstücke sind in Glasflaschen (100 ml) mit Schraubverschluss und PTFE-Dichtung zu überführen. In die Gefäße sind ca. 80 ml Wasser bzw. Paraffin zu füllen. Dann werden sie in einer Halterung im Wasserbad bei $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ mit einer Geschwindigkeit von 30 ± 2 Umdrehungen pro Minute bewegt (Kap. IV 1.1). Nach 24 Stunden sind die Folienstücke zu entnehmen, anhaftendes Vehikel mit einem Papiertuch zu entfernen und die Dicke der Membranen erneut zu bestimmen. Unter der Annahme, dass sich die Folienstücke in alle Richtungen gleich stark ausdehnen, wird für Breite und Länge der Folienstücke die gleiche relative Ausdehnung wie in der Dicke angenommen und so die Volumenzunahme durch Quellung berechnet.

4.1.4 Verteilungskoeffizienten

Die Folie ist kleine Stücke von ca. 3 x 3 cm zu schneiden und eine Menge von ca. 1,5 g genau gewogen in Glasflaschen (100 ml) mit Schraubverschluss und PTFE-Dichtung zu überführen. Die Konzentrationen der eingesetzten Arzneistofflösungen von Guaifenesin und 2-Phenylphenol in Wasser und Paraffin liegen zwischen 46 und 48% maximaler thermodynamischer Aktivität. 80 bis 90 ml dieser Arzneistofflösungen sind in die vorbereiteten Glasflaschen zu füllen. Die gefüllten Glasgefäße werden in einer Halterung im Wasserbad bei $32\pm 1^\circ\text{C}$ mit einer Geschwindigkeit von 30 ± 2 Umdrehungen pro Minute bewegt (Kap. IV 1.1). Die Konzentrationen der eingesetzten Arzneistofflösungen sind nach einer kurzen Verteilungszeit von 1 bis 3 Stunden, nach 24 und 48 Stunden spektralphotometrisch zu bestimmen (Kap. IV 1.1). Falls erforderlich werden die Arzneistofflösungen vor der Messung verdünnt.

Neben den Verteilungskoeffizienten sind auch Blindwerte für die Polymerfolien in wirkstofffreiem Vehikel zu ermitteln, um die Migration von Zuschlagstoffen oder anderen Substanzen aus der Folie in das Vehikel zu bestimmen. Die Absorption der Vehikel ist ebenfalls nach 1 bis 3 Stunden, 24 und 48 Stunden zu messen. Im Blindversuch ist die Absorption der Vehikel generell gering und liegt nur im Ausnahmefall von Wasser und Polyamid-6 bei maximal 0,13. Diese Blindwerte sind bei der Konzentrationsbestimmung von Guaifenesin und 2-Phenylphenol entsprechend der Verdünnung zu berücksichtigen.

4.2 Diffusionsversuche mit Polymermembranen

Für die Diffusionsversuche wird die Diffusionszelle aus Kap. IV 3.3 eingesetzt. Die zu untersuchende Polymermembran ist analog der Kuheuterhaut (Kap. IV 3.4) zwischen Donator- und Akzeptorkompartiment zu spannen und der Akzeptor mit Wasser zu füllen. Im Donator sind 50 ml der Arzneistofflösung in Paraffin und Wasser in unterschiedlicher thermodynamischer Aktivität von 10 bis 100%

einzusetzen. Die Diffusionszellen sind ebenfalls analog Kap. IV 3.4 im Wasserbad zu temperieren.

Die Zeitpunkte der Probeentnahme sind der Geschwindigkeit der Arzneistoffdiffusion anzupassen, d.h. Entnahmeintervalle von 10 Minuten bis zu einer Stunde. Die Konzentrationsbestimmung im Akzeptorkompartiment erfolgt spektralphotometrisch (Spekol 1200, Analytik Jena GmbH, Jena) und das untersuchte Probevolumen ist in den Akzeptor zurückzugeben. Sollte eine Verdünnung notwendig sein, ist das entnommene Probevolumen durch Wasser zu ersetzen und die Akzeptorkonzentration rechnerisch entsprechend Gl. 35 zu korrigieren.

Um eine spektralphotometrische Bestimmung durchführen zu können, sind Blindversuche erforderlich, bei denen die Absorption von migrierten Substanzen aus der Folie in den Akzeptor erfasst wird. Für diese Blindversuche ist wirkstofffreies Vehikel im Donator einzusetzen. Die ermittelte Absorption des Akzeptors ist allerdings über 24 Stunden bei beiden Folien und Vehikeln so gering, dass sie bei den Diffusionsversuchen vernachlässigt werden kann.

5. Untersuchungen an einem humanen Hautäquivalent

5.1 Züchtung des Hautäquivalents

5.1.1 Medien

Antibiotika-Stammlösungen:

PenicillinV/Streptomycin (10 mg/ml)

Gentamicin (50 mg/ml)

Fibroblastenmedium:

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), 10% Kalbsserum (Fetal bovine serum, FBS), 1% PenicillinV/Streptomycin-Stammlösung, 0,1% Gentamicin-Stammlösung

Keratinocytenmedium:

MCDB153-Lb Medium, Insulin (5 µg/ml), Transferrin (10 mg/ml), Trijodthyronin (10 nM), Epidermal Growth Faktor (5 ng/ml), boviner Hypophysenextrakt (35 mg/ml), CaCl₂ (0,1 mM), 1% PenicillinV/Streptomycin-Stammlösung, 0,1% Gentamicin-Stammlösung

Waschmedium:

Keratinocytenmedium, 2% PenicillinV/Streptomycin-Stammlösung, 0,2% Gentamicin-Stammlösung

Transportmedium für Vorhaut:

MCDB153-Lb Medium, 5% Kalbsserum, 1% Gentamicin-Stammlösung

5.1.2 Medienwechsel

Ein Mediumwechsel ist alle 2 bis 3 Tage fällig und am Umschlag des Indikators Phenolrot von rot nach orange zu erkennen. Das verbrauchte Medium ist mit Hilfe einer Vakuumpumpe und sterilem Glasaufsatz abzusaugen. Lebende Zellen haften am Boden der T-Flasche, tote Zellen schwimmen im Medium und werden beim Wechsel entfernt. Frisches Medium ist im Wasserbad auf ca. 37°C zu erwärmen und langsam in das Kulturgefäß zu pipettieren, um die empfindlichen Zellen nicht zu schocken.

5.1.3 Subkultivieren

Sobald die Zellen Confluence erreichen, müssen sie für weiteres Zellwachstum subkultiviert werden. Der gleiche Vorgang ist erforderlich, wenn die Zellen zur Weiterverwendung vom Boden der T-Flasche abgelöst werden sollen.

Nach Absaugen des Mediums werden 5 ml erwärmter, 0,25%-iger Trypsin-EDTA-Lösung in das Kulturgefäß gegeben und bei $37\pm 0,5$ °C ca. 10 min (Keratinozyten) bzw. 2 min (Fibroblasten) inkubiert. Das Trypsin ist mit 0,5 ml Kalbsserum zu inaktivieren, sobald sich alle Zellen vom Boden gelöst haben und frei im Medium schwimmen (mikroskopische Kontrolle). Die Zellsuspension ist in ein steriles Zentrifugenröhrchen zu transferieren und bei einer Drehzahl von 1000 ± 10 min⁻¹ zu zentrifugieren. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt und die Zellen in 5 ml des jeweiligen erwärmten Mediums resuspendiert. Zum Zählen der Zellen sind 20 µl dieser Zellsuspension mit 80 µl Trypan-Blau anzufärben. 10 µl dieser Mischung lassen sich mit Hilfe des Hemacytometers unter dem Mikroskop auszählen.

In der Regel werden 1 Millionen Zellen in ein neues Kulturgefäß eingefüllt und bis zur Confluence erneut kultiviert. Sind die Zellen direkt weiterzuverwenden, so ist die gewünschte Anzahl Zellen zu diesem Zeitpunkt der Suspension zu entnehmen.

5.1.4 Präparation des Hautäquivalents

Zur Präparation der Dermis ist 2-fach konzentriertes DMEM (1,6 ml) mit Kalbsserum (1,6 ml) und 0,1 N-NaOH (0,4 ml) und Rindercollagen (2,0 ml Vitrogene[®], Celtrix, Kanada) in einer kleinen Petrischale (60 mm) zu mischen. Zu dieser Mischung sind 150.000 Fibroblasten in ca. 1 ml DMEM hinzu zu pipettieren. Nach 7 Tagen bei $37\pm 0,5$ °C, 10% CO₂ ist dieses Dermisäquivalent in ein steriles Snapwell Insert System (Corning Costar Corp., USA) zu transferieren. 150.000 Keratinozyten in ca. 30 µl Medium werden auf der Dermisoberseite appliziert. Die Kultur ist 3 Tage lang von oben und unten mit Fibroblastenmedium zu versorgen.

Danach lässt sich das Medium von der Oberseite vorsichtig absaugen und das Medium der Dermisunterseite wird alle 2 bis 3 Tage ausgetauscht. Inkubation erfolgt bei $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, 10% CO_2 , 75% relative Feuchte über 7 bis 10 Tage.

5.2 Diffusionsuntersuchungen

Das humane Hautäquivalent ist mit einer stumpfen Pinzette vorsichtig aus dem Snapwell Insert zu entnehmen und zwischen Akzeptor (4,1 ml) und Donator der modifizierten Franz-Diffusionszelle (Diffusionsfläche: $0,196\text{ cm}^2$) zu legen. Die beiden Kompartimente lassen sich mit einer Metallklammer fest verschließen. Über einen Einfüllstutzen ist phosphat-gepufferte Salzlösung (BioChemika Tabletten / Fluka 79382, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze) luftblasenfrei in den Akzeptor einzufüllen. Im Donator werden 250 μl wässrige Guaifenesinlösung (65,05 mg/ml) eingesetzt. Ein kleiner Magnetrührer dient der Durchmischung des Akzeptorkompartiments. Die Versuche sind bei $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ über eine Dauer von 24 Stunden durchzuführen. Zu Versuchsbeginn sind stündlich Proben von 300 μl über den Einfüllstutzen aus dem Akzeptor zu entnehmen. Nach den ersten 4 Stunden werden die Entnahmeintervalle größer. Das Probevolumen ist jeweils durch wirkstofffreien Puffer zu ersetzen. Aufgrund des geringen Probevolumens werden die Proben in HPLC-Vials mit Einsatz (300 μl) eingefüllt und bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren.

Die Konzentrationsbestimmung mittels HPLC wird entsprechend Kap. IV 3.5 durchgeführt.

6. Bezugsquellen häufig verwendeter Substanzen und Materialien

6.1 Modellarzneistoffe

3-(4'-Methylbenzyliden)- campher, Eusolex [®] 6300	Merck KGaA, Darmstadt
Triclosan, Irgasan [®] DP300	Ciba Geigy GmbH, Wehr
Nabumeton	SmithKline Beecham, UK
2-Phenylphenol, Preventol [®] GmbH&Co.KG, Köln	Bayer Industrieprodukte
Ethylnicotinat	Aldrich-Chemie, Steinheim
Guaifenesin Gross-Gerau	Procter&Gamble GmbH&Co.,
Etofyllin	Knoll AG, Ludwigshafen

6.2 Lösungsmittel und Medien

Acetonitril Rotisolv [®]	Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe
n-Heptan Rotisolv [®]	Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe
2-Propanol Rotisolv [®]	Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe
Düninfl. Paraffin, P615 Hamburg	Parafluid Mineralölgesellschaft mbH,
DMEM	Gibco Laboratories Inc., NY, USA
MCDB153-LB	Gibco Laboratories Inc., NY, USA
Kalbsserum (FBS)	Sigma Chemical Co., MO, USA
Trypsin	Sigma Chemical Co., MO, USA

6.3 Membranen

Polyamid-6 Ultramid [®] B4	BASF AG, Ludwigshafen
Silikon Silastic [®]	Dow Cornig Corp., MI, USA

V ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit ist, den Einfluss von hydrophilen und lipophilen Vehikeln auf den Arzneistofftransport durch die Haut zu klären.

Als Vehikel werden zwei kosmetisch-dermatologisch gebräuchliche Lösungsmittel mit stark unterschiedlicher Polarität, Wasser und dünnflüssiges Paraffin, eingesetzt, um mögliche Einflüsse besser quantifizieren zu können. Die sieben ausgewählten Modellarzneistoffe umfassen einen weiten Bereich des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten $VK_{\text{Octanol/Wasser}}$ von sechs Zehnerpotenzen und decken somit ein breites Hydrophilie-Lipophilie-Spektrum ab.

1. Lipophilie der Modellarzneistoffe

Als gute Methode zur Charakterisierung der Lipophilie der Modellarzneistoffe hat sich die dünnschichtchromatographische Bestimmung von R_{MW} -Werten erwiesen. Die mit Acetonitril und Methanol als organische Modifier jeweils ermittelten R_{MW} -Werte ($R_{\text{MW}}^{\text{ACN}}$ bzw. $R_{\text{MW}}^{\text{MeOH}}$) korrelieren sehr gut mit den logarithmierten $VK_{\text{Octanol/Wasser}}$ -Werten aus Literaturangaben und lassen sich über die Collandergleichung zueinander in Beziehung setzen.

2. Vehikeleinfluss auf die perkutane Resorption durch die menschliche Haut in vivo

Mit Hilfe des Glaskammermodells lässt sich die Permeabilität und der maximale Flux im Steady-state für die ausgewählten Modellarzneistoffe aus Wasser und Paraffin ermitteln.

Die Permeabilität der Haut für die Arzneistoffe hängt erwartungsgemäß stark vom eingesetzten Vehikel ab: Sie variiert um bis zu zwei Zehnerpotenzen. Für lipophile Substanzen zeigt die Haut eine höhere Permeabilität, wenn sie aus Wasser appliziert werden. Bei Verwendung von Paraffin als Vehikel finden sich dagegen für hydrophile Arzneistoffe höhere Permeabilitäten. Die Logarithmen der

Hautpermeabilitäten aus den beiden Vehikeln, Wasser und Paraffin, zeigen jeweils eine lineare Beziehung zur Lipophilie (R_{MW} -Wert) der Substanzen, allerdings mit negativer Steigung im Fall von Paraffin. Als Grund hierfür lässt sich einerseits der Verteilungseffekt anführen, da in Paraffin schlecht lösliche, hydrophile Arzneistoffe einen größeren Verteilungskoeffizienten zwischen der geschwindigkeitsbestimmenden Barriere Stratum corneum und dem Vehikel Paraffin zeigen sollten als lipophile Substanzen, die sich gut in Paraffin lösen. Andererseits wird auch ein Einfluss des Widerstands der lebenden Epidermis auf den Arzneistofftransport durch die Haut diskutiert.

Unter zu Grunde Legen des Zusammenhangs zwischen Permeabilität und R_{MW} -Wert der Modellarzneistoffe lassen sich Gleichungen zur Vorhersage von maximalen Fluxen anderer Arzneistoffe ähnlicher Molekülgröße über R_{MW} -Wert und Löslichkeit in Wasser bzw. Paraffin ableiten:

$$\log J_{\max \text{ Wasser}} = -2,61 + 0,571 R_{MW}^{\text{ACN}} + \log c_{S \text{ Wasser}}$$

$$\log J_{\max \text{ Paraffin}} = -1,04 - 0,506 R_{MW}^{\text{ACN}} + \log c_{S \text{ Paraffin}}$$

Entgegen dem 1. Fickschen Diffusionsgesetz werden allerdings z.T. sehr unterschiedliche maximale Fluxe aus Wasser und Paraffin beobachtet. Besonders ausgeprägt ist der Unterschied bei den extrem lipophilen und extrem hydrophilen Substanzen (maximal Faktor 2.500). Es findet sich eine starke Abhängigkeit der maximalen Fluxe von der Arzneistofflöslichkeit im jeweils eingesetzten Vehikel. Als Erklärungsansatz werden Vehikel-Barriere-Interaktionen diskutiert, die zu einer Veränderung der Löslichkeit und auch des Diffusionskoeffizienten der Arzneistoffe in der geschwindigkeitsbestimmenden Barriere führen.

3. In-vitro-Studie mit Kuheuterhaut zur Ermittlung der geschwindigkeitsbestimmenden Barriere

Um die Frage nach der geschwindigkeitsbestimmenden Barriere beim Arzneistofftransport durch die Haut unter Verwendung von Paraffin als Vehikel zu klären, werden Permeationsversuche in Diffusionszellen mit Kuheuterhaut als Modellmembran und Guaifenesin als Modellarzneistoff durchgeführt. Durch partielles Entfernen des Stratum corneum mittels Tape-stripping lässt sich die Permeabilität der Kuheuterhaut in vitro im Vergleich zur intakten Euterhaut ungefähr auf das Doppelte erhöhen. Daraus folgt, dass auch bei Einsatz lipophiler Vehikel der Widerstand des Stratum corneum von maßgeblicher Bedeutung ist. Der maximale Arzneistoffflux durch intakte Kuheuterhaut zeigt ebenfalls eine starke Abhängigkeit vom eingesetzten Vehikel. Wie bei der In-vivo-Studie am Menschen lassen sich auch hier bei hoher Löslichkeit des Arzneistoffs im Vehikel unerwartet hohe maximale Fluxe erzielen.

Sowohl Permeabilität als auch maximaler Flux bei Human- und Kuheuterhaut stimmen trotz unterschiedlicher Bestimmungsmethoden erstaunlich gut überein. Die Kuheuterhaut zeigt nur geringfügig erhöhte Permeabilitäten für Guaifenesin. Diese sind bei Verwendung von Wasser als Vehikel um 7% und bei Paraffin um 24% gegenüber Humanhaut erhöht. Somit ist Kuheuterhaut im Fall von Guaifenesin als Modellmembran bei Diffusionsversuchen sehr gut zur Vorhersage der Permeabilität der menschlichen Haut in vivo geeignet. Für eine Verallgemeinerung sind weitere Untersuchungen verschiedener Substanzen erforderlich.

4. Untersuchungen an Polymermembranen zur Abklärung des Vehikeleinflusses

Da der maximale Flux der In-vivo- und In-vitro-Studie aus den beiden Vehikeln nicht gleich ist, sondern gut mit der Löslichkeit im jeweiligen Vehikel korreliert, wird der Einfluss der Vehikel Wasser und Paraffin an relativ inerten Polymermembranen, einer lipophilen Silikon- und einer hydrophilen Polyamid-6-Membran, untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass Vehikel in die Membranen eindringen (Volumenzunahme maximal 35%) und die Löslichkeit von Arzneistoffen in diesen Membranen beeinflussen (Veränderungen bis maximal Faktor 470) sowie auch deren Diffusionskoeffizienten verändern können (Unterschiede von fast zwei Zehnerpotenzen). Unterschiedliche Sättigungskonzentrationen eines Arzneistoffs in einer Membran wirken sich allerdings nur dann deutlich auf den maximalen Flux aus, wenn die Unterschiede extrem groß sind. Die veränderten Sättigungskonzentrationen bzw. Diffusionskoeffizienten zeigen keine einfache Korrelation mit den maximalen Arzneistofffluxen. Die Arzneistofflöslichkeit in den gequollenen Membranen zeigt dagegen eine deutliche Abhängigkeit von der Arzneistofflöslichkeit im eingesetzten Vehikel.

Da sich in Polymermembranen trotz mäßiger Quellung bereits deutlich unterschiedliche Sättigungskonzentrationen für einen Arzneistoff je nach Vehikel einstellen, sind für die menschliche und tierische Haut aufgrund ausgeprägterer Quellung viel größere vehikelbedingte Unterschiede vor allem in der Arzneistofflöslichkeit im Stratum corneum zu erwarten. Diese Unterschiede in der Stratum-corneum-Löslichkeit können dann zu den in vivo und in vitro beobachteten unterschiedlichen maximalen Fluxen beim Einsatz verschiedener Vehikel führen. Aufgrund der veränderlichen Diffusionskoeffizienten ist auf vehikelbedingte Strukturveränderungen in den Membranen zu schließen und auch für das Stratum corneum zu postulieren.

Aus der Korrelation der Membranpermeabilitäten mit den Permeabilitäten der menschlichen Haut ergibt sich, dass die relativ hydrophile Polyamid-6-Membran besser zur Vorhersage der Hautpermeabilität in vivo geeignet ist, als die üblicherweise verwendeten lipophilen Membranen wie z.B. Silikon.

5. Humanes Hautäquivalent im Vergleich zu menschlicher und tierischer Haut

Die in Diffusionsversuchen ermittelte Permeabilität des in dieser Arbeit kultivierten humanen Hautäquivalents ist gegenüber der Permeabilität der Humanhaut in vivo deutlich erhöht (Faktor 28 für Modellarzneistoff Guaifenesin). Somit ist die Barriereeigenschaft des gezüchteten Stratum corneum erheblich geringer die der menschlichen Haut.

Fazit

Aufgrund des ausgeprägten Einflusses von Vehikeln auf Membranen kann das Stratum corneum nicht länger als inerte Verteilungsmembran im Sinne der Fickschen Diffusionsgesetze betrachtet werden. Vielmehr hat sich gezeigt, dass Membranen durch eindringendes Vehikel erheblichen Veränderungen ausgesetzt sind, die sich auf die Löslichkeit und den Diffusionskoeffizienten von penetrierenden Arzneistoffen deutlich auswirken können.

Um hohe Arzneistofffluxe durch die Haut zu erzielen, ist bei der Entwicklung kutaner Arzneiformen im Hinblick auf die Auswahl von Vehikeln nicht nur auf hohe thermodynamische Aktivitäten, sondern auch auf hohe Löslichkeiten der Arzneistoffe im Vehikel zu achten.

VI LITERATUR

1. Ackermann C., Flynn G.L., Ether-water partitioning and permeability through nude mouse skin in vitro. I. Urea, thiourea, glycerol and glucose, *Int. J. Pharm.* **36**, 61-66 (1987)
2. Ackermann C., Flynn G.L., Smith W.M., Ether-water partitioning and permeability through nude mouse skin in vitro. II. Hydrocortisone 21-n-alkyl esters, alkanols and hydrophilic compounds, *Int. J. Pharm.* **36**, 67-71 (1987)
3. Asbill C., Kim N., El-Kattan A., Creek K., Wertz P., Michniak B., Evaluation of a human bio-engineered skin equivalent for drug permeation studies, *Pharm. Res.* **17**, 1092-1097 (2000)
4. Avdeef A., Box K.J., Comer J.E.A., Hibbert C., Tam K.Y., pH-Metric logP 10. Determination of liposomal membrane-water partition coefficients of ionizable drugs, *Pharm. Res.* **15**, 209-215 (1998)
5. Bach M., Einfluss von potentiellen lipophilen Penetrationsbeschleunigern auf die Wirkung von Modellarzneistoffen, Dissertation Düsseldorf 1995
6. Barry B.W., Lipid-Protein-Partitioning theory of skin penetration enhancement, *J. Controlled Release* **15**, 237-248 (1991)
7. Barton A.F.M., *CRC Handbook of solubility parameters and other cohesion parameters*, CRC Press London 1991
8. Bendas B., Schmalfuß U., Neubert R., Influence of propylene glycol as cosolvent on mechanism of drug transport from hydrogels, *Int. J. Pharm.* **116**, 19-30 (1995)
9. Blank I.H., Penetration of low molecular-weight alcohols into skin, *J. Invest. Dermatol.* **43**, 415-420 (1964)
10. Braumann T., Determination of hydrophobic parameters by reversed-phase liquid chromatography: Theory, experimental techniques and application in studies on quantitative structure-activity relationships, *J. Chromatogr.* **373**, 191-225 (1986)

11. Collander R., On "Lipoid solubility", *Acta. Physiol. Scand.* **13**, 363-381 (1947)
12. Cross S.E., Pugh W.J., Hadgraft J., Roberts M.S., Probing the effect of vehicles on topical delivery: Understanding the basic relationship between solvent and solute penetration using silicone membranes, *Pharm. Res.* **18**, 999-1005 (2001)
13. De Paula E., Schreier S., Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction, *Braz. Med Biol. Res.* **29**, 877-894 (1996)
14. Dross K., Sonntag C., On the precise estimation of R_M values in reversed-phase thin-layer chromatography including aspects of pH dependence, *J. Chromatogr.* **639**, 287-294 (1993)
15. Dross K., Sonntag C., Mannhold R., Determination of the hydrophobicity parameter R_{MW} by reversed-phase thin-layer chromatography, *J. Chromatogr. A* **673**, 113-124 (1994)
16. Dupont C., Kompaore F., Marty J.P., Skin pharmacokinetics modifications induced by removal of the stratum corneum, *S.T.P. Pharma Science* **1**, 97-99 (1991)
17. Flynn G.L., Yalkowsky S.H., Roseman T.J., Mass transport phenomena and models: Theoretical concepts, *J. Pharm. Sci.* **63**, 479-509 (1974)
18. Frömder A., Lippold B.C., Water vapour and occlusivity in vivo of lipophilic excipients used in ointments, *Int. J. Cos. Sci.* **15**, 113-124 (1993)
19. Godwin D.A., Michniak B.B., Creek K.E., Evaluation of transdermal penetration enhancers using a novel skin alternative, *J. Pharm. Sci.* **86**, 1001-1005 (1997)
20. Gorukanti S.R., Li L., Kim K.H., Transdermal delivery of antiparkinsonian agent, benzotropine. I. Effect of vehicles on skin permeation, *Int. J. Pharm.* **192**, 159-172 (1999)
21. Gunder W., Mechanismus der Freisetzung von Arzneistoffen aus Ethylcellulose-Mikrokapseln, Dissertation Düsseldorf 1992

22. Hagedorn-Leweke U., Penetration von Sonnenschutzsubstanzen und anderen Verbindungen durch die menschliche Haut in vivo, Dissertation Düsseldorf 1995
23. Hagedorn-Leweke U., Lippold B.C., Absorption of sunscreens and other compounds through human skin in vivo: Deviation of a method to predict maximum fluxes, *Pharm. Res.* **12**, 1354-1360 (1995)
24. Heymann E., Der chemische Aufbau der Haut (1), *PZ Dermopharmazie* **142**, 4-9 (1997)
25. Higuchi T., Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments, *J. Soc. Cosmet. Chem.* **11**, 85-97 (1960)
26. Howes D., A comparative study of in vitro percutaneous absorption test, *Animal Alternatives, Welfare and Ethics* **27**, 1113-1121 (1997)
27. Jiang R., Benson H.A.E., Cross S.E., Roberts M.S., In vitro human epidermal and polyethylen membrane penetration and retention of the sunscreen Benzophenone-3 from a range of solvents, *Pharm. Res.* **15**, 1863-1868 (1998)
28. Kadir R., Barry B.W., Fairbrother J.E., Hollingsbee D.A., Delivery of triamcinolone acetonide through human epidermis: Effect of Actiderm, a new hydrocolloid dermatological patch, *Int. J. Pharm.* **60**, 139-145 (1990)
29. Karsting G.B., Smith R.L., Cooper E.R., Effect of lipid solubility and molecular size on percutaneous absorption, *Pharmacol. Skin* **1**, 138-153 (1987)
30. Kietzmann M., Arens D., Löscher W., Lubach D., Studies on percutaneous absorption of dexametasone using a new in vitro model, the isolated perfused bovine udder, in: Scott R.C., Guy R.H., Hadgraft J., Bodde H.E., Prediction of percutaneous penetration, methods, measurements, modelling, IBC 1991
31. Kietzmann M., Blume B., Meyer K., Itzel-Kietzmann V.M., Pittermann W., The isolated perfused bovine udder as a model for simultaneous studies of

- transdermal penetration, permeation and absorption, in: Perspectives in Percutaneous Penetration, Frankreich 1997
32. Kietzmann M., Löschner W., Arens D., Maaß P., Lubach D., The isolated perfused bovine udder as an in vitro model of percutaneous drug absorption - Skin viability and percutaneous absorption of dexamethasone, benzoyl peroxide and etofenamate, *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* **30**, 75-84 (1993)
 33. Kim C.K., Kim J.-J., Chi S.C., Shim C.-K., Effect of fatty acids and urea on the penetration of ketoprofen through rat skin, *Int. J. Pharm.* **99**, 109-118 (1993)
 34. Kubiny H., Lipophilie und biologische Aktivität, *PZ Wissenschaft* **136**, 265-268 (1991)
 35. Landmann L., Die Permeabilitätsbarriere der Haut, *Pharmazie in unserer Zeit* **20**, 155-163 (1991)
 36. Le V.-H., Einfluss von Substanzeigenschaften auf Permeabilität und maximalen Flux von homologen Nicotinsäureestern in vitro und in vivo, Dissertation Düsseldorf 1993
 37. Le V.H., Lippold B.C., The influence of physico-chemical properties of homologous nicotinic acid esters on the permeability and maximum flux through an octanol membrane, *Int. J. Pharm.* **163**, 11-22 (1998)
 38. Lee C.K., Uchida T., Kitagawa K., Yagi A., Kim N.-S., Goto S., Effect of hydrophilic and lipophilic vehicles on skin permeation of Tegafur, Alcofenac and Ibuprofen with and without permeation enhancer, *Biol. Pharm. Bull* **16**, 1264-1269 (1993)
 39. Lee C.K., Uchida T., Kitagawa K., Yagi A., Kim N.-S., Goto S., Skin permeability of various drugs with different lipophilicity, *J. Pharm. Sci.* **83**, 562-565 (1994)
 40. Lee G., Swarbrick J., Kiyohara G., Payling D.W., Drug permeation through human skin . III. Effect of pH on the partitioning behavior of a chromone-2-carboxylic acid, *Int. J. Pharm.* **23**, 43-45 (1985)

41. Leopold C.S., Enhancer-Effekte von lipophilen Salbengrundstoffen auf die Steady-state-Penetration von Methylnicotinat durch die Haut, Dissertation Düsseldorf 1992
42. Leopold C.S., Lippold B.C., A new application chamber for skin penetration studies in vivo with liquid preparations, *Pharm. Res.* **9**, 1215-1218 (1992)
43. Lichey J., Konstanter Arzneistofftransport durch Verteilungsmembranen und Vorhersagemöglichkeiten mit Hilfe der Polymereigenschaften, Dissertation Düsseldorf 1982
44. Lieckfeldt R., Villalain J., Gomez-Fernandez J.-C., Lee G., Apparent pKa of the fatty acids within ordered mixtures of model human stratum corneum lipids, *Pharm. Res.* **12**, 1614-1617 (1995)
45. Lippold B.C., Kutane Resorption - Möglichkeiten, Modelle, Beeinflussung, *Acta Pharm. Technol.* **27**, 1-9 (1981)
46. Lippold B.C., Reimann H., Wirkungsbeeinflussung bei Lösungssalben durch Vehikel am Beispiel von Methylnicotinat. Teil I: Relative thermodynamische Aktivität des Arzneistoffes in verschiedenen Vehikeln und Freisetungsverhalten, *Acta Pharm. Tech.* **35**, 128-135 (1989)
47. Lippold B.C., Schneemann H., The influence of vehicles on the local bioavailability of betamethasone-17-benzoate from solution- and suspension-type ointments, *Int. J. Pharm.* **22**, 31-43 (1984)
48. Man M.-Q., Feingold K.R., Elisa P.M., Exogenous lipids influence permeability barrier recovery in acetone-treated murine skin, *Arch. Dermatol.* **129**, 728-737 (1993)
49. Mannhold R., Rekker R.F., Sonntag C., Laak A.M., Dross K., Polymeropoulos E.E., Comparative evaluation of the predictive power of calculation procedures for molecular lipophilicity, *J. Pharm. Sci.* **84**, 1410-1419 (1995)
50. Perkins M.A., Osborne R., Rana F.R., Ghassemi A., Robinson M.K., Comparison of in vitro and in vivo human skin response to consumer

- products and ingredients with a range of irritancy potential, *Toxicol. Sci.* **48**, 218-229 (1999)
51. Podhaisky H.P., Huschka C., Wohlrab W., Optimierung der topischen Therapie: Einsatz von In-vitro-Modellen, *Pharmazie* **54**, 871-875 (1999)
 52. Ponec M., In vitro models to predict skin irritation, in: Bioäquivalenz dermalen Arzneizubereitungen APV e.V., Halle (Saale) 1999
 53. Poulsen B.J., Diffusion of drugs from topical vehicles: An analysis of vehicle effects, in: Montagana W., van Scott E.J., Stoughton R.B. (Eds.), *Pharmacology and the skin*, Adv. Biol. Skin, Appleton, New York 1972
 54. Reifenrath W., Kempainen B., Skin storage conditions, in: Bronaugh R.L., Maibach H.I. (Eds.), *In vitro percutaneous absorption: Principles, fundamentals and applications*, CRC Press, Boca Ranton 1991
 55. Rekker R.F., Mannhold R., Calculation of drug lipophilicity - The hydrophobic fragmental constant approach, VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim 1992
 56. Roberts M.S., Structure-permeability considerations in percutaneous absorption, in: Scott R.C., Guy R.H., Boddé H.E. (Eds.), *Prediction of percutaneous penetration*, IBC Technical Services, London 1990
 57. Roberts M.S., Walker M., Water: the most natural penetration enhancer, in: Walters K.A., Hadgraft J. (Eds.), *Pharmaceutical skin penetration enhancement*, Marcel Dekker Inc., New York 1993
 58. Römmer C., Einfluss von Lokalanästhetika-Basen auf die perkutane Kopenetration des Corticosteroids Betamethason-17-benzoat: In-vivo und In-vitro-Untersuchungen, Dissertation Düsseldorf 2000
 59. Scheuplein R.J., Mechanism of percutaneous absorption. I. Routes of penetration and the influence of solubility, *J. Invest. Dermatol.* **45**, 334-346 (1965)
 60. Scheuplein R.J., Blank I.H., Brauner G.J., MacFarlane D.J., Percutaneous absorption of steroids, *J. Invest. Dermatol.* **52**, 63-70 (1969)

61. Tayar N.E., Tsai R.-S., Testa B., Carrupt P.-A., Hansch C., Leo A., Percutaneous penetration of drugs: A quantitative structure-permeability relationship study, *J. Pharm. Sci.* **80**, 744-749 (1991)
62. Twist J.N., Zatz J.L., Influence of solvents on paraben permeation through idealized skin model membranes, *J. Soc. Chem.* **37**, 429-444 (1986)
63. Vaughan C.D., Using solubility parameters in cosmetics formulation, *J. Soc. Cosmet. Chem.* **36**, 319-333 (1985)
64. Wang D.P., Gun Y.-B., Chang L.-C., In vitro delivery of fluocinolone acetonid in FAPG base, *Drug Development and Industrial Pharmacy* **23**, 95-98 (1997)
65. Warner R.R., Boissy Y.L., Lilly N.A., Spears M.J., McKillop K., Marshall J.L., Stone K.J., Water disrupts stratum corneum lipid lamellae: Damage is similar to surfactants, *J. Invest. Dermatol.* **113**, 960-966 (1999)
66. Weast R.C., Astle M.J., Beyer W.H., *CRC Handbook of chemistry and physics*, CRC Press, Boca Ranton 1985
67. Wenkers B.P., Penetration von nichtsteroidalen Antirheumatika aus einem lipophilen Vehikel durch die menschliche Haut in vivo, Dissertation Düsseldorf 1998
68. Wenkers B.P., Lippold B.C., Skin penetration of nonsteroidal antiinflammatory drugs out of a lipophilic vehicle: Influence of the viable epidermis, *J. Pharm. Sci.* **88**, 1326-1331 (1999)
69. Wenkers B.P., Lippold B.C., The statistical distribution of in-vivo skin permeabilities, *Pharm. Pharmacol. Commun.* **5**, 425-427 (1999)
70. Wenkers B.P., Lippold B.C., Prediction of the efficacy of cutaneously applied nonsteroidal anti-inflammatory drugs from a lipophilic vehicle, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **50**, 275-280 (2000)
71. Wester R.C., Maibach H.I., Animal models for transdermal delivery - clinical consideration, in: Kydonieus A.F., Berner B. (Eds.), *Transdermal delivery of drugs*, CRC Press, Boca Ranton 1987

72. Williams A.C., Cornwall P.A., Barry B.W., On the non-Gaussian distribution of human skin permeabilities, *Int. J. Pharm.* **86**, 69-77 (1992)
73. Yalkowsky S.H., Valvani S.C., Roseman T.J., Solubility and partitioning VI: Octanol solubility and octanol-water partition coefficients, *J. Pharm. Sci.* **72**, 866-870 (1983)
74. Yano T., Nakagawa A., Tsuji M., Noda K., Skin permeability of various non-steroidal anti-inflammatory drugs in man, *Life Sci.* **39**, 1043-1050 (1986)