

3. Experimenteller Teil

3.1 Messmethoden

3.1.1 FTIR-ATR-spektroskopische Diffusionsexperimente

Alle FTIR-spektroskopischen Untersuchungen wurden mit einem FTIR-Spektrometer IFS 28 der Firma Bruker (Karlsruhe) durchgeführt. Die in dieser Arbeit detektierten Spektren der Diffusions- und Penetrationsexperimente wurden anfangs mit einer Einfachreflexionseinheit der Firma SpectraTec (Shelton, CT, USA) aufgenommen. Da diese Kristalle ab Ende 2002 nicht mehr erhältlich waren, wurden Fresnel-ATR-Kristalle von Thermo-Electron (Madison, WI, USA) verwendet, die mehrere Vorteile aufweisen. Diese Kristalle ermöglichen im Gegensatz zu den herkömmlichen ATR-Einheiten die gleichmäßige Detektion der gesamten Kristalloberfläche und sind zehnfach preiswerter.

ATR-Aufnahmen von Festsubstanzen wurden mit Hilfe einer 1,3 mm ZnSe Einfachreflexionseinheit 45° (Pike, Madison, USA), mit deren Hilfe Feststoffe auf die Kristalloberfläche aufgepresst werden können, detektiert. Somit kann auch für Feststoffe ein möglichst guter optischer Kontakt zwischen Probe und Kristall erzielt werden.

Die Spektren wurden mit folgenden Parametern detektiert:

Auflösung	2 cm ⁻¹
Anzahl Probescans	32
Anzahl Hintergrundscans	32
Akquisitionsmodus	Doppelseitig, Vorwärts-Rückwärts (double sided forward-backward)
Phasenauflösung	16
Phasen-Korrelationsmodus	Mertz
Zerofilling Faktor	2
Apodisationsfunktion	Blackman-Harris 3-Term

Eine Ausnahme bilden zwei Messungen in Kapitel 5.1, bei deren Detektion lediglich die Scanzahl auf zwei Scans reduziert wurde (siehe 5.1). Die Aufnahme und die Auswertung der Spektren erfolgte mit Hilfe der OPUS Software der Firma Bruker. Da bei ATR-Messungen die Eindringtiefe des IR-Strahles von der Wellenlänge abhängig ist, benötigen die Spektren vor der Auswertung eine Korrektur und müssen auf eine konstante Eindringtiefe normiert werden.

Diese Normierung wird von der OPUS Software automatisch nach folgendem Algorithmus durchgeführt (OPUS Handbuch):

$$ATR = AB \cdot \frac{X}{1000} \quad 3.1.1.1$$

Dabei steht X für die Wellenzahl und AB für Absorbanz.

Abb. 4 zeigt den Aufbau der ATR-Einheit für Penetrations- und Diffusionsuntersuchungen mit der herkömmlichen ATR-Anordnung.

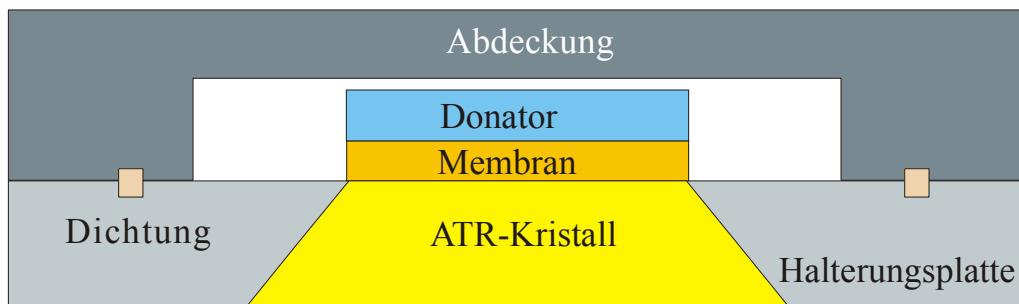


Abb. 4: Aufbau der horizontalen Standard-ATR-Einheit

Die künstlichen Membranen wurden mit einem Stopfenbohrer ausgestanzt und für die Diffusionsexperimente mit der konventionellen ATR-Anordnung auf den Kristall aufgelegt. Um einen engen Kontakt zwischen Membran und Kristall zu erzielen, wurden Collodiummatrixmembranen mit einem zellstoffumwickelten Glasstab glatt gestrichen (Hanh 2001, Hanh 2000 a,b). Im Falle der auf Silikonbasis verwendeten Membranen schmiegt sich diese bereits durch einfaches Auflegen vollständig an den Kristall an (siehe 5.1.1 und 5.1.2). Dieses zusätzliche Glattstreichen war nicht erforderlich.

Bei den Diffusionsexperimenten mit der herkömmlichen ATR-Anordnung wurden jeweils 300 µl Donatorlösung auf die auf einen Fresnel-Kristall aufgelegten Membranen aufgegeben. Eine 20%-ige wässrige Harnstofflösung wurde als äußerst hydrophile Standardformulierung für alle an den künstlichen Membranen durchgeführten Diffusionsuntersuchungen eingesetzt.

Das Spektrometer wird, um Störungen durch Wasserdampf und Kohlendioxid zu verhindern, mit einem trockenen, kohlendioxidfreien Luftstrom gespült.

Vor jedem Experiment wurde der größte Teil der feuchten Luft durch eine ca. 15 minütige Spülung der Messkammer mit trockener Luft entfernt. Anschließend erfolgte die Aufnahme des Hintergrundspektrums des leeren Kristalls.

Da es nicht möglich ist, eine völlig konstante Luftfeuchtigkeit in der Messkammer über den gesamten Zeitraum eines Penetrations- oder Diffusionsexperimentes aufrechtzuerhalten, treten zeitabhängige Signaländerungen von Wasserdampf in den

Spektren auf. Um diese durch den restlichen Wasserdampf verursachten Störungen zu entfernen, wurden in einem Experiment die ATR-Spektren der Luft im Probenraum 16 Stunden lang aufgezeichnet. Dies liefert das zeitabhängige Signal von Wasserdampf im Spektrum. Dieser Signalanteil wurde von jedem einzelnen Spektrum der Penetrations- oder Diffusionsversuche subtrahiert. Dadurch wird das IR-Signal von Wasserdampf, welches große relevante Spektralbereiche überlagert (ca. 1300-2000 cm^{-1} und ca. 3400-4000 cm^{-1}), eliminiert und ein korrigiertes Spektrum erhalten (Abb. 5). Gleichzeitig wird auch das IR-Signal von Kohlendioxid, welches jedoch kaum störend ist, entfernt. Mit einer neueren Version der OPUS Software, die ab Mitte 2003 zur Verfügung stand, konnte die Beseitigung der Wasserdampf- und Kohlendioxidbanden in den darauf folgenden Messungen automatisch durchgeführt werden. Die dadurch erhaltenen Spektren werden als kompensierte Spektren bezeichnet (Abb. 6). Für den Algorithmus, der dieser Eliminierung zugrunde liegt, wird nach Aussagen der Firma Bruker Optik GmbH eine Patentanmeldung angestrebt. Diese atmosphärische Kompensation bezieht sich auf Wasserdampfbanden knapp unter 4000 cm^{-1} und verwendet die Höhe dieser Banden als Referenz für einen Algorithmus zur Entfernung der restlichen Wasserdampfbanden im Spektrum (Hartmann 2004).

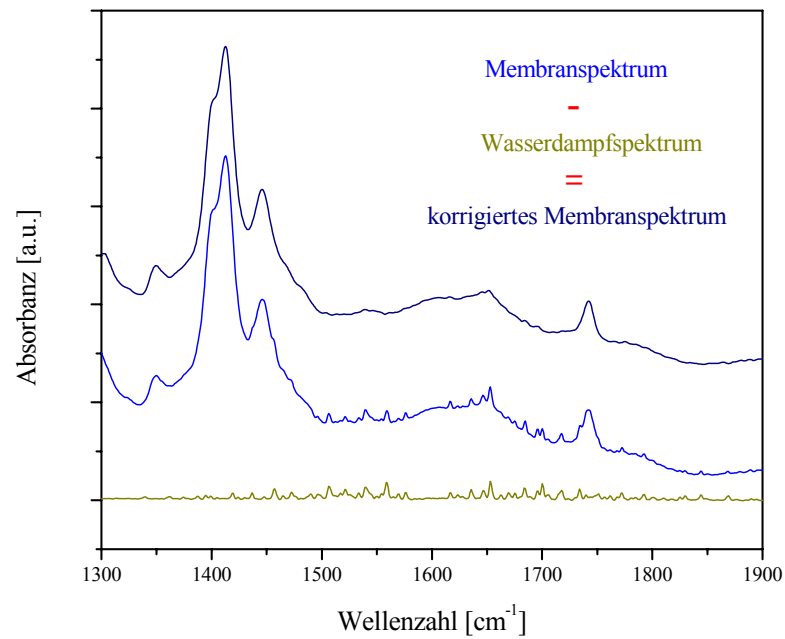


Abb. 5: Entfernung der durch Wasserdampf verursachten Störungen im Diffusionsexperiment von Wasser aus einer wässrigen Harnstofflösung durch eine Silicon-PEG-Membran

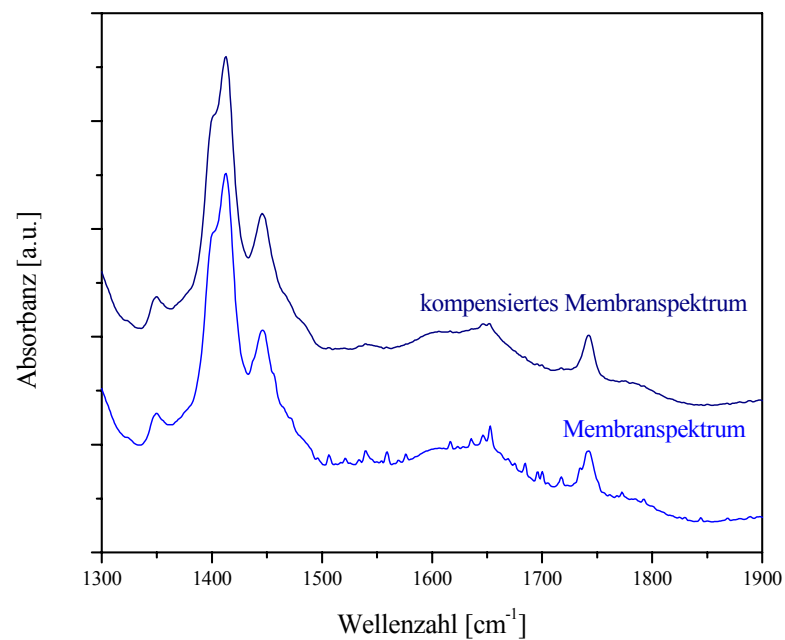


Abb. 6: Entfernung der durch Wasserdampf verursachten Störungen im Diffusionsexperiment von Wasser aus einer wässrigen Harnstofflösung durch eine Silicon-PEG-Membran mit dem ab Mitte 2003 zur Verfügung stehenden Algorithmus der atmosphärischen Kompensation der OPUS Software

3.1.2 FTIR-ATR-Diffusionszelle

Für die Diffusionsuntersuchungen mit der entwickelten FTIR-ATR-Diffusionszelle (Kapitel 7) wurde die horizontale ATR-Einheit von Thermo Electron (Madison, WI, USA) verwendet. Der Aufbau der Diffusionszelle erfolgte basierend auf der Grundplatte der Fresnel-Kristalle von Thermo Electron. Somit kann sie in gleicher Weise wie einfache Fresnel-Kristalle in die zugehörige horizontale ATR-Einheit eingesetzt werden. Der Aufbau der Zelle ist in Abb. 7 dargestellt.

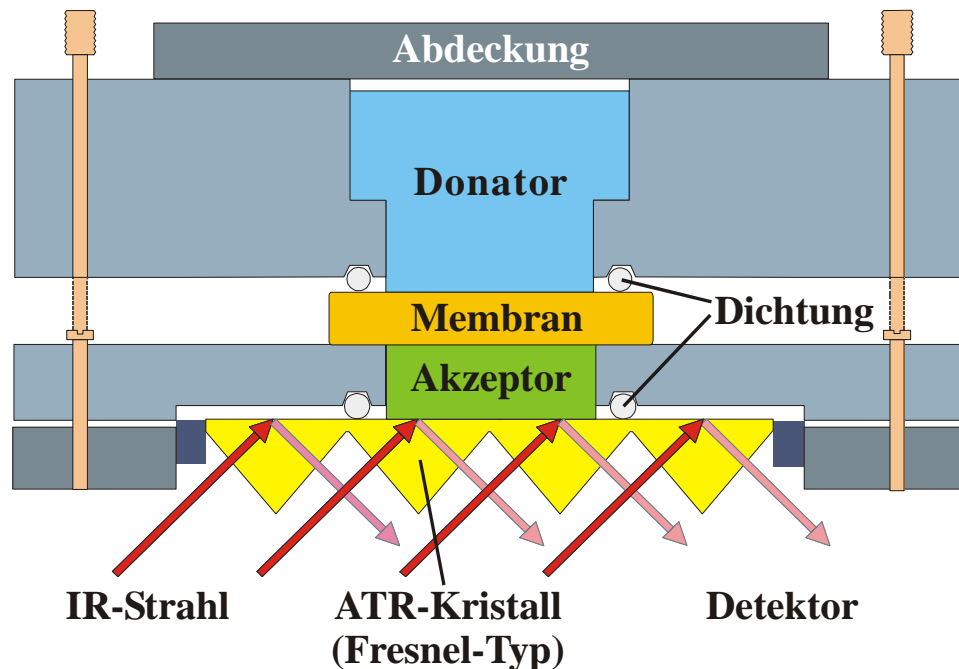


Abb. 7: Aufbau der ATR-Diffusionszelle

Vor dem Einsetzen in die ATR-Einheit wird die Akzeptorkammer auf dem Fresnel-Kristall befestigt. Die Abdichtung zum Kristall wird, ebenfalls wie die Abdichtung der Donator-Kammer zur Membran, durch O-Ringe aus Nitrilbutylgummi (NBR) der Firma VTE (Roitzsch) mit einem Schnurdurchmesser von 1 mm, gewährleistet. Verschiedene Dichtungen aus Silikon, Viton[®] und NBR wurden getestet, wobei sich Dichtringe aus NBR für den Einsatz in der Diffusionszelle als geeignet erwiesen. Sie sind über mehrere Experimente hinweg verwendbar und dichten die Zelle auch über einen Zeitraum von mindestens 26 Tagen durchgehend sicher ab. Im Gegensatz zu anderen getesteten Dichtungen trat bei NBR-Dichtringen PPG 2000 nicht aus der Akzeptorkammer aus. Vor jedem Experiment erfolgte die Aufnahme des Hintergrundspektrums von der montierten, unbefüllten Akzeptorkammer. Als Akzeptorflüssigkeit diente für die Wasserdiffusionsexperimente PPG 2000 und für die Harnstoffdiffusionsexperimente destilliertes Wasser. Die Füllhöhe der 5 mm breiten Akzeptorkammer betrug bei jedem Experiment 1,3 mm.

Nach Aufnahme des Hintergrundspektrums wurde die Diffusionszelle bis zum Abschluss des jeweiligen Diffusionsexperimentes nicht mehr aus der horizontalen ATR-

Einheit entnommen. Die Stratum corneum-Membranen, die Rinderhufmembranen und die Silikon-PEG-Membranen wurden luftblasenfrei auf den befüllten Akzeptor aufgelegt. Im Anschluss daran erfolgte die Befestigung der Donatorkammer auf der Akzeptorkammer. Die Diffusionsfläche der Membranen betrug $19,6 \text{ mm}^2$.

Die 25 mm hohe Donatorkammer besitzt oberhalb der Membran den gleichen Durchmesser wie die Akzeptorkammer. Der obere Teil der Donatorkammer wurde jedoch auf einen Durchmesser von 14 mm erweitert. Somit konnte diese in jedem Experiment mit der 40fachen Flüssigkeitsmenge im Vergleich zum Akzeptorvolumen befüllt werden. Dieser Volumenüberschuss rechtfertigt die Annahme einer konstanten Donatorkonzentration für die Berechnung der Diffusionskoeffizienten (siehe Kapitel 4). Eine Abdeckung aus Glas, die zusätzlich mit Ramsey-Fett zur Donatorkammer abgedichtet wurde, verhinderte Verdunstungsprozesse der Donatorlösungen während der Diffusionsexperimente.

3.1.3 Rasterkraftmikroskopieaufnahmen

Die Rasterkraftmikroskopie wurde eingesetzt, um die Oberfläche der verwendeten Membranen zu charakterisieren. Hierbei handelt es sich um ein nichtinvasives, hochauflösendes Verfahren, anhand dessen sich kleinste, lichtmikroskopisch nicht sichtbare Oberflächenstrukturen darstellen lassen. Messprinzip ist das zeilenweise Abtasten einer Oberfläche in einer sehr geringen Entfernung mit einer feinen, extrem spitzen Tastspitze, die sich am Ende einer mikroskopisch kleinen Blattfeder (*Cantilever*) befindet. Dabei wird der Einfluss der auftretenden Oberflächenkräfte auf die Tastspitze gemessen. Die Auslenkung der Blattfeder wird mit Hilfe eines reflektierten Laserstrahles detektiert.

Im Gegensatz zu einer zweidimensionalen mikroskopischen Aufnahme ist die Methode der Rasterkraftmikroskopie imstande, zusätzlich die Höhenprofile an der Membranoberfläche zu messen. Hieraus können direkte Informationen über die dreidimensionale Oberflächenstruktur entnommen werden. Somit lassen sich bei den verwendeten Membranen eventuelle Defekte nachweisbar ausschließen. Weiterhin können geringe Änderungen im Oberflächenprofil dargestellt werden. Die Oberflächen der Membranen wurden umfangreich mit der Rasterkraftmikroskopie vermessen. Aufgrund der geringen Scangröße im Verhältnis zur Gesamtmembrangröße wurden für jede untersuchte Membran eine Vielzahl Abbildungen an verschiedenen Stellen der Membranoberfläche, deren Ergebnis übereinstimmte, aufgezeichnet. In dieser Arbeit ist insofern für jede Membran eine Abbildung dargestellt. Die durchgeführten AFM-Aufnahmen wurden mit einem AFM Explorer Discoverer TMX 2010 von Topometrix (Santa Clara, CA, USA) im Nicht-Kontakt Modus angefertigt. Die maximale Scanrate betrug 2 Hz. Die Authentizität aller Ergebnisse wurde durch doppelte Messungen mit

Änderung der Scanrichtung um 90° bestätigt. Es konnten in dem Fall immer die gleichen nur im entsprechenden Winkel gedrehten Abbildungen erhalten und somit Artefakte ausgeschlossen werden. Um die Oberfläche der Silikon-PEG-Membran nach einem Diffusionsexperiment zu charakterisieren, wurde zuvor auf eine Membranoberfläche von 19,6 mm² 19 µl einer 20%-igen wässrigen Harnstofflösung aufgegeben und nach sechs Stunden wieder entfernt. Die AFM-spektroskopischen Untersuchungen der isolierten Stratum corneum Membranen erfolgten unmittelbar nach zwölfstündiger Lagerung der frisch präparierten Membranen in destilliertem Wasser. Glycerol-Collodium-, Silikon-PEG- und Stratum corneum-Membranen wurden auf Glimmerplättchen aufgebracht. Die Rinderhufmembranen wurden zum Vermessen direkt auf dem Edelstahlprobenträger befestigt.

3.2 Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller	Chemical abstracts registry (CAS-Nummer)
Collodium (4%)	Caesar & Loretz GmbH, Hilden	[8050-70-2]
Dibutylzinndilaurat	Silikonwerke Nünchritz, Nünchritz	[77-58-7]
Deuteriumoxid 99,98%	Chemotrade Chemiehandelsgesellschaft mbH, Leipzig	[7789-20-0]
Diethylether	Kraemer und Martin GmbH, St. Augustin	[60-29-7]
Cetylstearylalkohol, Emulgierender (Typ A)	Synopharm, Barsbüttel	[10-0793]
Ethanol	Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Wittenberg	[64-17-5]
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe	[56-81-5]
Harnstoff	Merck KGaA, Darmstadt	[57-13-6]
Harnstoff-D4 99%	Chemotrade Chemiehandelsgesellschaft mbH Leipzig	[1433-11-0]

Ibuprofen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen	[15687-27-1]
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt	[144-55-8]
1,2-Octandiol	Acros Organics, Geel, Belgien	[1117-86-8]
Paraffin, dickflüssig	Caesar & Loretz GmbH, Hilden	[8020-83-5]
Polyethylenglykol 400	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz	[9002-90-8]
Polydimethylsiloxan Monomer	Silikonwerke Nünchritz, Nünchritz	[9016-00-6]
Tetraethylglykol	Lancaster Synthesis GmbH, Frankfurt/a.M.	[112-60-7]
Tween 80 Polyoxyethylensorbitanmonooleat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen	[9005-65-6]
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen	[9002-07-7]
Vaselin, Weißes	Caesar & Loretz GmbH, Hilden	[0008009-03-8]

3.3 Präparation der Membranen

3.3.1 Stratum corneum

Bei den verwendeten Hautexplantaten handelte es sich ausschließlich um Mammahaut, die bei Reduktionsplastiken entnommen wurde. Nach Entnahme der Haut erfolgte die mechanische Entfernung von Fettgewebe und Teilen der Dermis. Die Lagerung der so präparierten Hautstücke fand bei -80 °C statt. Diese ersten Aufbereitungsschritte der Hautproben wurden vom Deutschen Institut für Zell- und Gewebeersatz durchgeführt. Die weitere Aufarbeitung der intakten Haut erfolgte nach Kligman (Kligman 1963). Hierfür wurden die Hautproben mit der Epidermisseite nach unten zeigend auf einen Filterpapierstapel, bestehend aus 15 mit Trypsin getränkten Filterpapieren, aufgelegt. Dazu wurde eine Lösung von 0,001 % Trypsin in 0,5 %-iger Natriumhydrogencarbonatlösung hergestellt. Abhängig vom pH-Wert, der Temperatur, der Konzentration und der Einwirkzeit spaltet Trypsin Peptidbindungen zwischen lebender Epidermis und Dermis. Unter Verwendung von Natriumhydrogencarbonat wurde der

pH-Wert auf 8,5 für eine bestmögliche Aktivität des Enzyms eingestellt. Nach einer Einwirkzeit von ca. 14 Stunden in einer Thermostatkammer bei 37 °C (± 1 °C) wurden die Filterblätter in destilliertem Wasser flottiert. Dabei verblieben Epidermisreste mit Resten anhaftender Dermisstücke auf dem zu Boden sinkenden Filterpapier. Eine leichtere und schnellere Abtrennung des Stratum corneum konnte bei Verwendung von ca. 45 °C warmen Wasser erreicht werden. Die schwimmenden SC-Membranen wurden vorsichtig mit destilliertem Wasser abgespült. Die anschließende Lagerung der SC-Membranen erfolgte bei 22 °C für 14 Stunden in einer Kammer mit 90% relativer Luftfeuchte, um einen Wasserverlust zu vermeiden (Golden et al. 1987). Die Präparation der Stratum corneum Membranen fand vor jedem Experiment frisch statt. Auf eine Trocknung und längere Lagerung des präparierten SC wurde verzichtet, um unnötige unphysiologische Bedingungen für die äußere Hautschicht zu vermeiden.

Die Durchlässigkeit der Haut für extern applizierte Verbindungen variiert in Abhängigkeit des Alters und der Körperregion (Cronin und Stoughton 1962, Elias et al 1981, Feldman und Maibach 1967, Scheuplein und Blank 1971, Schwindt et al. 1998, Ziegenmeyer 1992). Insofern erfolgte die Auswahl der Gewebeproben aus der gleichen Entnahmeregion unter Berücksichtigung eines möglichst gleichen Alters der Spenderinnen.

Mit Hilfe der entwickelten ATR-Diffusionszelle sollte der Diffusionskoeffizient von Harnstoff durch das Stratum corneum ermittelt werden. Die Wahl der Hautproben nach engen Kriterien, betreffend Geschlecht, Alter und Entnahmeregion, diente dem Ziel, intra- und interindividuelle Schwankungen in den Hauteigenschaften bestmöglich einzugrenzen. In Tabelle 1 sind die Spezifikationen, die vom Deutschen Institut für Zell- und Gewebersatz zu den Gewebeproben mitgeteilt wurden, aufgelistet.

Die zur Verfügung stehenden Gewebeflächen je Spenderin waren jeweils für ein Diffusionsexperiment ausreichend.

Tabelle 1: Übersicht der Probenspezifikationen zu den verwendeten Gewebeproben, mit den zu den Spenderinnen vorliegenden Angaben.

Gewebeprobe	A		B		C	
Probeninformation						
Probenname	Humane	Haut	Humane	Haut	Humane	Haut
	für Forschungs- zwecke		für Forschungs- zwecke		für Forschungs- zwecke	
Entnahmeregion	Mamma		Mamma		Mamma	
Probenpräparation	Trennung	von	Trennung	von	Trennung	von
	Fett und	Teilen	Fett und	Teilen	Fett und	Teilen
	Dermis mittels		Dermis mittels		Dermis mittels	
	mechanischer		mechanischer		mechanischer	
	Präparation		Präparation		Präparation	
Spenderinformation						
Alter zur Zeit des chirurgischen Eingriffs	33		34		36	
Geschlecht	weiblich		weiblich		Weiblich	
Rasse	kaukasisch		kaukasisch		kaukasisch	
Art des chirurgischen Eingriffs	Plastische	Chi-	Plastische	Chi-	Plastische	Chi-
	rurgie (Mamma- reduktion)		rurgie (Mamma- reduktion)		rurgie (Mamma- reduktion)	
Permanente Medikation	Keine		Keine		Keine	
Rauchen	Nicht bekannt		Nein		Nein	

3.3.2 Rinderhufmembranen

Die Rinderhufmembranen wurden aus dem Huf eines drei Jahre alten männlichen Rindes präpariert. Direkt nach der Schlachtung erfolgte die Entnahme des Hufes. Dieser wurde bis zur weiteren Aufarbeitung, welche innerhalb von drei Wochen nach der Schlachtung erfolgte, bei -18 °C gelagert. Die anschließende Präparation des Hufes fand gemäß der von Mertin und Lippold beschriebenen Methode statt (Mertin und Lippold 1997). Hierfür wurde aus dem mittleren Teil des vorderen Hornballens ein

quaderförmiges Hornstück herausgeschnitten. Die Kantenlängen dieses Stückes betragen 20 mm x 20 mm an der Hufaußenseite und ca. 3 mm in der Hornstärke. Das Hornstück wurde durch einstündiges Einlegen in destilliertes Wasser vollständig gequollen. In diesem voll hydratisierten Zustand erfolgte die Präparation der etwa 100 µm dicken Mikrotomschnitte. Nur in dem voll hydratisierten Status des Hornes war die Anfertigung ebener, dünner Mikrotomschnitte möglich. Während der Trocknung der Rinderhufmembranen wurde festgestellt, dass diese wieder eine natürliche Wölbung annahmen. Aus diesem Grund wurden die Membranen bis zum Experiment, jedoch maximal sieben Tage, bei 8 °C in destilliertem Wasser eingelegt, aufbewahrt. Somit blieb die vollständige Hydratation der ebenen Hufmembranen erhalten.

3.3.3 Glycerol-Collodium-Membranen

Diese Membranen bestehen aus einer Collodiummatrix, in die das Glycerol eingebettet ist. Das Glycerol wird mit einem Diethylether-Ethanol-Gemisch ergänzt und anschließend mit Collodiumlösung versetzt. Es wurde folgende Rezeptur verwendet:

Glycerol 4,0 g

Diethylether : Ethanol (85/15 (V/V)) ad 100,0 g

Collodiumlösung ad 200,0 g

120 ml dieser Lösung wurden auf einem Filmziehgerät (institutsinterne Herstellung der Feinmechanikerwerkstatt der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) auf eine Glasplatte ausgegossen, wobei die gleichmäßige Verteilung durch eine mit konstanter Geschwindigkeit laufenden Schiene mit einer Spaltbreite von 0,82 mm erfolgte. Aus dieser ca. $18,2 \pm 0,4$ µm (Knorst 1997) dünnen Membranfolie wurden für die weitere Verwendung kreisförmige Stücke mit einem dem ATR-Kristall entsprechenden Durchmesser ausgestanzt.

Für die Herstellung ca. 30 µm dicker Membranen wurden 8,0 ml der Membranlösung in Glasringe von 6,8 cm Durchmesser, welche auf einer planen Glasplatte befestigt sind, ausgegossen. Nach einer Abdampfzeit von 12 h erfolgte die Entnahme der Membranen und ihre Aufbewahrung zwischen Aluminiumfolie 24 h im Exsikkator über Silicagel.

3.3.4 Einarbeitung weiterer Füllstoffe in die Collodiummatrix

Die Herstellung weiterer, im Rahmen dieser Arbeit recherchierter Modellmembranen auf der Basis der Collodiummatrix erfolgte durch geringe Modifikation der Rezeptur der Glycerol-Collodium Membran. Bei ferner analogen Herstellungsverfahren wurden lediglich der Anteil und die Art des Füllstoffes substituiert. Für die Herstellung von Polyethylenglykol-Collodium-Membranen wurde 1,0 g PEG 400, bei sonst gleich

bleibender Rezeptur verwendet (siehe 3.3.3). Bei Verarbeitung von 4,0 g PEG statt Glycerol ließen sich keine festen Membranen, sondern lediglich sehr leicht plastisch verformbare, klebende Filme herstellen. Durch Austausch des Glycerolanteils der unter 3.3.3 beschriebenen Rezeptur gegen 2,0 g Triethylenglykol bzw. 4,0 g Tetraethylenglykol erfolgte die Einarbeitung dieser Füllstoffe in die Matrix.

3.3.5 Silikon-Membranen

Zur Herstellung der Membranen wurde eine modifizierte Form der bei Richter beschriebenen Vorschrift verwendet (Richter 1985), um eine umweltschonendere Herstellung zu gewährleisten. Somit wurde als Lösungsmittel für die Silikonkautschukstammlösungen Ether statt Tetrachlorkohlenstoff verwendet und die Membranen anstatt auf Quecksilberoberflächen auf plane, polierte Teflonblöcke ausgegossen.

Als Stammlösung wurden 10,0 g Silikonkautschuk zu 100,0 ml Diethylether gelöst. Für die Herstellung einer etwa 80 µm dicken Membran wurden 5,4 ml dieser Stammlösung mit 3 Tropfen Vernetzer, einem Dibutylzinn-dilaurat, versetzt und 1 min lang mit einem Vortexmixer geschüttelt. Anschließend erfolgte das Ausgießen von 4,9 ml dieser Lösung auf eine polierte Teflonoberfläche in Glasringe mit 6,8 cm Durchmesser. Die Glasringe wurden mit Ramseyfett zum Teflon abgedichtet und nach dem Ausgießen der Membranlösung mit Aluminiumfolie abgedeckt, um ein zu schnelles Abdampfen des Lösungsmittels zu verhindern. Nach 12 Stunden konnten die ausgehärteten Membranen von der Teflonoberfläche entnommen werden.

3.3.5.1 Einarbeitung verschiedener Füllstoffe in die Silikon-Membranen

Um in die stabile lipophile Silikonmatrix einen Akzeptor für die Aufnahme hydrophiler Substanzen einzuarbeiten, wurde versucht, verschiedene amphiphile Substanzen, in denen hydrophile Verbindungen ausreichend löslich sind, in das Silikongerüst zu inkorporieren. Die Suche nach geeigneten Akzeptoren, mit denen sich gleichmäßige, stabile Silikonmembranen herstellen lassen, verläuft weitestgehend empirisch. Geeignete Füllstoffe müssen indes noch eine ausreichende Lipophilie besitzen, um sich in die Silikonmembran einarbeiten zu lassen (Richter 2002). Es erfolgte ein Screening zur Eignung verschiedener Substanzen auf ihre Inkorporation in die Silikonmatrix. Um bei der Testung erfasst zu werden, mussten die Substanzen gewissen Kriterien entsprechen. Sie mussten hydrophile Substanzen, wie Wasser, in der Menge aufnehmen, so dass diese im ATR-Spektrum ausgeprägt sichtbar waren und weiterhin auch lipophile Eigenschaften in ihrem Molekül aufweisen. Es wurden u.a. niederkettige Alkohole, wie

Pentanol, Hexanol, Heptanol, Dialkohole, wie 1,2-Octandiol, 2,4-Pentandiol und als weitere relativ amphiphile Substanzen Triethylenglykol, Tetraethylenglykol und Polyethylenglykol 400 getestet. PEG 400 wurde für die weitere Verwendung herangezogen, da sich durch die Einarbeitung dieser Substanz homogene Membranen herstellen ließen.

3.3.5.2 Silikon-Polyethylenglykol-Membranen (Silikon-PEG-Membranen)

Vom PEG 400 wurden 10,0 g in einem Gemisch von Diethylether/Ethanol (85/15 (V/V)) zu 100 ml gelöst. Von dieser Lösung wurden 12,5 Volumenteile mit 87,5 Volumenteilen der Silikonkautschuk-Stammlösung versetzt (siehe 3.3.5). Für die Herstellung von ca. 80 μm dicken Membranen wurden zu 4,9 ml der Silikonstammlösung 0,6 ml der PEG-Lösung zugesetzt und eine Minute mit einem Vortexmischer gemischt. Danach erfolgte die Zugabe von drei Tropfen Vernetzer mit erneuter einminütiger Vermischung. Für die Herstellung ca. 80 μm dicker Membranen wurden von dieser Lösung 4,8 ml in die oben beschriebene Anordnung der Glasringe auf einer Teflonplatte ausgegossen. Die Membranen ließen sich nach 12 Stunden von der Teflonoberfläche entnehmen.

3.3.6 Schichtdickenbestimmung

Zur Bestimmung der Schichtdicke der künstlichen und biologischen Membranen wurde ein Schichtdickenmessgerät (Heidenhain, Deutschland) verwendet. Der plane Messkopf des Gerätes erfasst bei jeder Messung einen Probenbereich von 4 mm Durchmesser. Herstellungsbedingt variiert die Membranschichtdicke der künstlichen Silikon-PEG-Membranen. Bei den biologischen Membranen treten ebenfalls natürlich bedingte Schwankungen der Schichtdicke auf. Vor jedem Versuch erfolgte die Schichtdickenbestimmung der verwendeten Membranen. Die Schichtdicken sind als Mittelwert aus zehn Messungen für jede Membran bei den Diffusionsexperimenten in den entsprechenden Kapiteln dieser Arbeit angegeben.

3.4 Quantitative Auswertung der Spektren

Im Falle der Diffusionsexperimente von Harnstoff durch das Stratum corneum und die Rinderhufmembran mit der Diffusionszelle konnte die Zunahme des Harnstoffgehaltes im wässrigen Akzeptor mit Hilfe einer spektroskopischen Kalibration quantifiziert werden. Für die quantitative Auswertung der Spektraldaten erfolgt zunächst die

Entfernung der unspezifischen Änderungen im Spektrum, die u.a. aus den durch Wasserdampf verursachten Störungen resultieren (siehe 3.1.1). Im nachfolgenden Schritt findet die Auswahl der auswertbaren Spektralbereiche statt. Hierfür dienen Frequenzbereiche, in denen Änderungen durch den Wirkstoff auftreten. Für die Quantifizierung des Harnstoffes diente der Bereich von $1220 - 1778 \text{ cm}^{-1}$ (Abb. 8). Im gewählten Frequenzbereich besteht eine gute Korrelation zwischen den Veränderungen des Spektral- und des Konzentrationsdatensatzes. Diese Eigenschaft ist bei der Auswahl eines geeigneten Frequenzbereiches von zentraler Bedeutung für die Qualität des Modells. Das Ausmaß dieser Korrelation lässt sich mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten R^2 abschätzen (Conzen 2001). Für die in dieser Arbeit erstellte und verwendete Methode beträgt R^2 99,99.

Die Ermittlung des Harnstoffgehaltes, der von den ATR-Spektren während der Diffusionsexperimente hergeleitet wurde, erfolgte unter Verwendung der multivariaten Analyse Quant2 der Opus Software. Diese Methode ermöglicht verbesserte Aussagen im Vergleich zur Analyse einzelner Variablen, insbesondere im Fall der Überlagerung von Banden des Wirkstoffs und des Akzeptors. Es wird eine gesamte spektrale Struktur zur Kalibration herangezogen. Die Funktion der multivariaten Methode besteht darin, aus den spektroskopischen Daten in Form des Extinktionsvektors auf die Konzentration der Komponente in Form des Konzentrationsvektors zu schließen. Die Verknüpfung beider Vektoren erfolgt durch die Faktormatrix:

$$\begin{bmatrix} E_1 \\ \cdot \\ \cdot \\ E_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} K_{1,1} & \cdots & K_{1,n} \\ \cdot & & \cdot \\ \cdot & & \cdot \\ K_{n,1} & \cdots & K_{n,n} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} C_1 \\ \cdot \\ \cdot \\ C_n \end{bmatrix} \quad \text{oder: } E = KC . \quad 3.4.1$$

Hierbei bezeichnet E den Extinktionsvektor, K die Faktormatrix und C den Konzentrationsvektor. Die Faktormatrix K wird durch eine Kalibrierung bestimmt (Coates 2002, Mark 2002).

Eine Zweikomponentenmischung lässt sich bereits anhand weniger Spektren zuverlässig kalibrieren. Von Conzen wurde als Untergrenze für diesen Zweck ein Kalibrationsdatensatz von mindestens 20 Proben genannt (Conzen 2001). In dieser Arbeit wurde ein aussagekräftiges Modell anhand eines Kalibrationsdatensatzes, bestehend aus 36 unabhängig hergestellten Harnstoff/Wasser-Mischungen mit einem Harnstoffgehalt im Bereich von 0 bis 10% (m/m), erstellt. Die Kalibrationspektren wurden im Rahmen der Modellerstellung keiner weiteren Datenvorbehandlung unterzogen. Die Qualität der Kalibrierung wurde des Weiteren mithilfe der OPUS Software anhand von Kreuzvalidierungstests (Vorhersage vs. Wahr, Differenz vs. Wahr, RMSECV vs. Rang) kontrolliert (Abb. 9, Abb. 10).

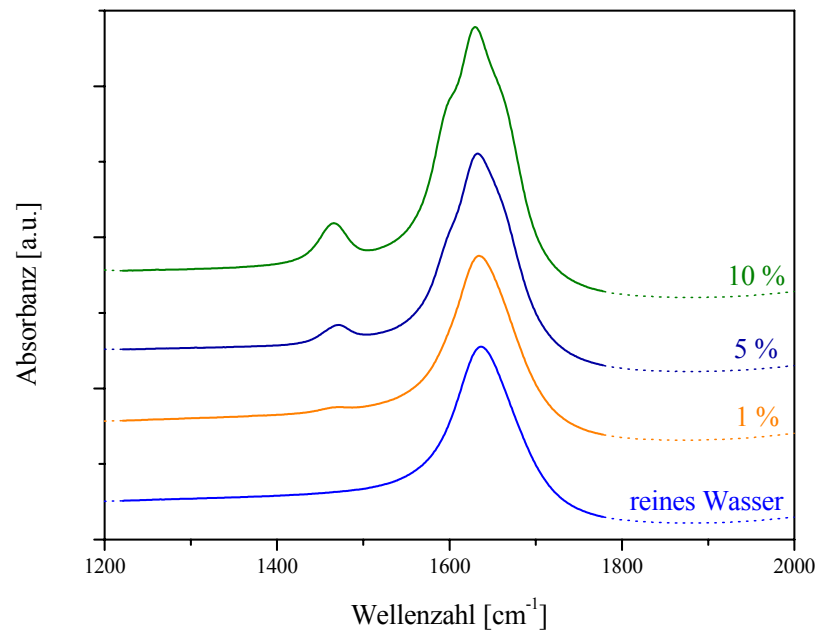


Abb. 8: Spektralbereich zur Kalibrierung bei den Diffusionsexperimenten (durchgehende Linie) von Harnstoff durch Stratum corneum und durch Rinderhufmembranen mit der ATR-Diffusionszelle. Von den Kalibrationspektren sind auszugswise reines Wasser und wässrige Lösungen mit 1%, 5% und 10% Harnstoff abgebildet.

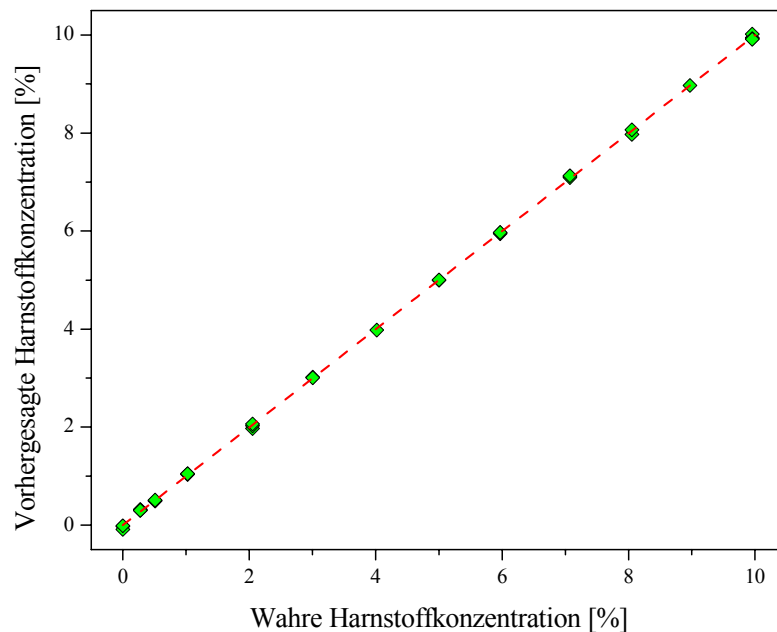


Abb. 9: Validierungstest für die Kalibrierung der Diffusionsexperimente von Harnstoff durch Stratum corneum- und Rinderhufmembranen. Gegenüberstellung der vorhergesagten und der wahren Harnstoffkonzentration in % (m/m) aus einer Mischung aus Harnstoff und Wasser; RMSECV = 0,0347, Rang 4, $R^2=99,99$

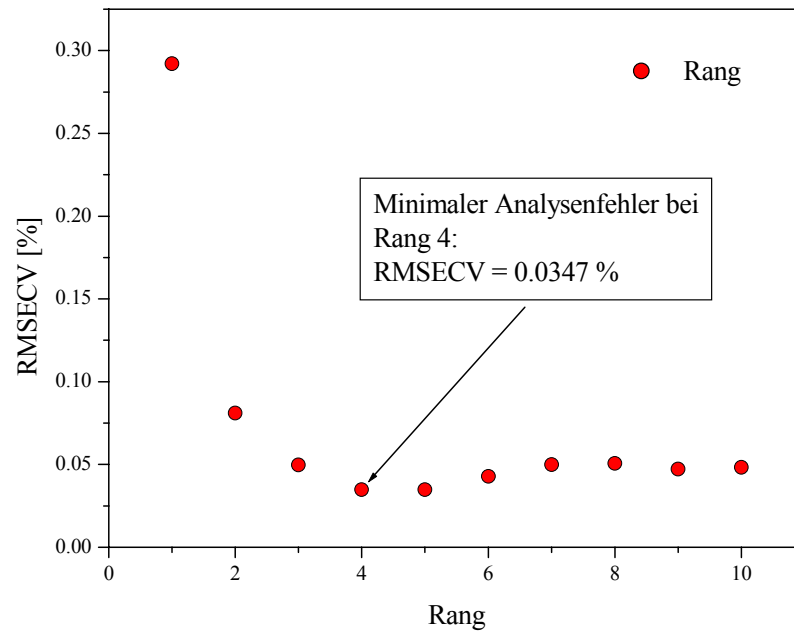


Abb. 10: Mittlerer Vorhersagefehler der Harnstoffkonzentration in Abhängigkeit des Ranges für die verwendete chemometrische Methode.

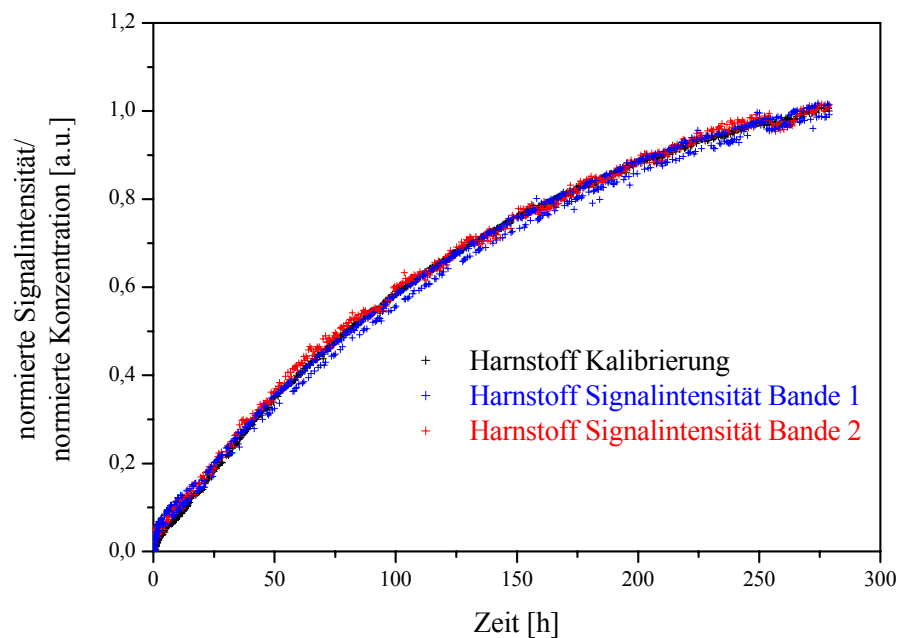


Abb. 11: Zunahme der mittels spektraler Kalibration ermittelten normierten Konzentration von Harnstoff und der normierten Signalintensität der Harnstoffbanden im Bereich von $1391\text{-}1504\text{ cm}^{-1}$ (Bande 1) und $1102\text{-}1193\text{ cm}^{-1}$ (Bande 2) im Akzeptor während der Diffusion von Harnstoff durch humanes Stratum corneum

In Abb. 9 ist die Gegenüberstellung der Analysenwerte und der korrespondierenden Referenzdaten für das angewandte Modell dargestellt. Es ist ersichtlich, dass eine treffende Übereinstimmung zwischen beiden Werten gefunden wird.

Der „Rang“ bezeichnet die Zahl der Faktoren eines chemometrischen Modells, auf die die in Matrixform kodierten Spektral- und Konzentrationsdaten reduziert werden. Bei einer zu geringen Faktorenzahl werden Veränderungen in den Spektral- und Konzentrationsdaten nur unzureichend erklärt. Demgegenüber veranlasst eine zu große Faktorenzahl das Modell zu dem Versuch, noch geringste Veränderungen, wie z.B. spektrales Rauschen in den Datensätzen, zu erklären. Ein aussagefähiges Modell charakterisiert sich darin, dass die Werte des mittleren Vorhersagefehlers (RMSECV) für den optimalen Rang ein Minimum durchlaufen (Conzen 2001, Hasegawa 2002). Das verwendete Modell erfüllt diese Bedingungen bei Rang 4 (Abb. 10).

Mit Hilfe der Kalibration ist es somit realisierbar, die chemische Zusammensetzung bei den einzelnen spektroskopischen Messungen in den Experimenten der Harnstoffdiffusion durch das SC und die Rinderhufmembran zu quantifizieren. Aus dem mit Hilfe der spektralen Kalibration ermittelten Kurvenverlauf der experimentellen Daten lässt sich auch das Ausmaß eines Arzneistoffs, welches nach einer entsprechenden Zeit durch die Membran permeiert ist, entnehmen.

Der mittels Kalibrierung erhaltene Kurvenverlauf entspricht dem Kurvenverlauf der zeitabhängigen Zunahme der Signalintensität der Harnstoffbanden. Abb. 11 demonstriert die am Beispiel der Harnstoffdiffusion durch humanes Stratum corneum ermittelten Kurvenverläufe, die sowohl mittels der spektralen Kalibration (vergleiche Kapitel 7.3) als auch durch Integration zweier Harnstoffbandenflächen im Wellenzahlbereich von $1391\text{-}1504\text{ cm}^{-1}$ (Bande 1) und im Bereich von $1193\text{-}1102\text{ cm}^{-1}$ (Bande 2) erhalten wurden (siehe Kapitel 7.3, Abb. 43). Zum besseren Vergleich wurden sowohl die Endwerte der Konzentration als auch der Signalintensitäten auf Eins normiert. Dies zeigt, dass auch der zeitliche Zuwachs der Signalintensität dem Verlauf des Konzentrationsanstieges entspricht.

Die Kalibrierung der Wasserdiffusionsexperimente stellt sich wesentlich schwerer dar. Es lässt sich nicht arrangieren, Silikon-PEG-Membranen mit verschiedenem und konstantem Wassergehalt herzustellen. Zum einen lässt sich Wasser im Herstellungsprozess nicht in die Membran einarbeiten, da es sich während des Abdampfprozesses der Lösungsmittel ebenfalls verflüchtigt. Zum anderen verdampft das während des Experimentes in die Membran hineindiffundierte Wasser innerhalb weniger Minuten nahezu vollständig aus dem detektierbaren Bereich der Membranoberfläche, wenn sich die Membran an der Luft befindet (Abb. 12).

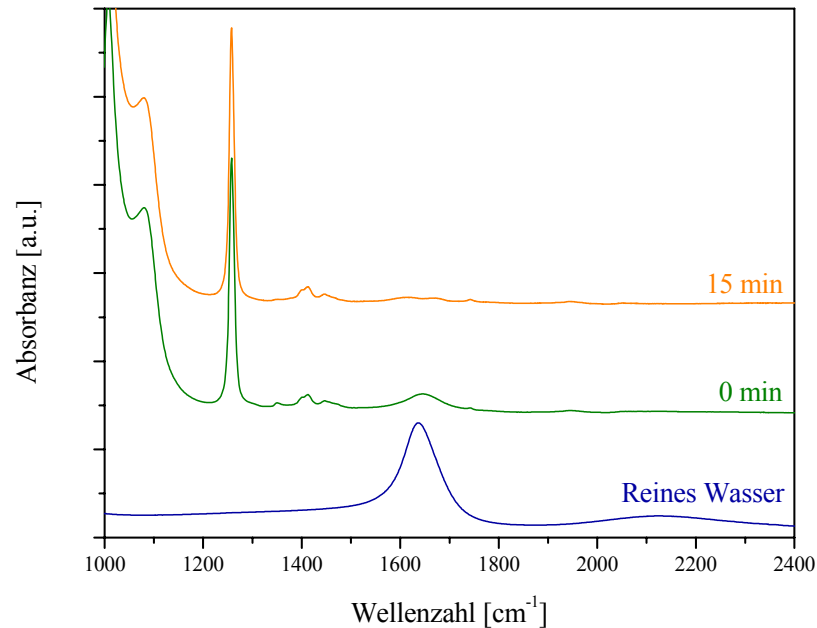


Abb. 12: ATR-Spektren des Systems wässrige Harnstofflösung/Silikon-PEG-Membran unmittelbar nach Abschluss des Diffusionsexperimentes und der Silikon-PEG-Membran; 15 min, nachdem der Donator entfernt und die Membran an Luft aufbewahrt wurde. Zum Vergleich ist das ATR-Spektrum von reinem Wasser angegeben.

Den spektroskopischen Daten kann somit der für eine Kalibration notwendige Gehalt der Komponenten in der Membran nicht exakt zugeordnet werden. Die Bestimmung des Wassergehaltes mittels geeigneter Referenzmethoden in der Membran ist einerseits aufgrund der schnellen Verdunstung des Wassers nicht exakt zu verwirklichen. Zum anderen verursacht eine solche Methode auch unter Außerachtlassung des Verdunstungsprozesses einen zu großen Fehler auf Grund des zusätzlichen Schrittes der Extraktion des Diffusanten aus der Membran.

Während des Diffusionsexperimentes spielen Verdunstungsprozesse jedoch keine Rolle, da eine Membranseite mit einem Überschuss Donatorlösung bedeckt ist und die Oberfläche vis-a-vis auf den für Wasser undurchdringlichen ATR-Kristall aufliegt. Das gesamte System Donator/Silikon-PEG-Membran ist zusätzlich luftdicht abgedeckt. Zur Auswertung der Wasserdiffusion diente daher die von Membranbanden isolierte Deformationsschwingung des Wassers bei ca. 1640 cm^{-1} . Diese Schwingung wurde herangezogen, da die Valenzschwingung des Wassers oberhalb 3000 cm^{-1} von PEG-Signalen überlagert wird. Weiterhin erweist sich die Auswertung der Deformationsschwingung als vorteilhaft, da es sich um eine scharfe Bande, mit einem gut zu charakterisierenden Maximum, handelt. Die Charakterisierung der Wasserdiffusion in Polymere anhand der Zunahme der Bandenintensität bei ca. 1640 cm^{-1} unter der Annahme, dass diese Intensitätszunahme proportional zur Konzentrationszunahme des Wassers in der Membran verläuft, wurde bereits

beschrieben (Mountz et al. 2001). Shen und Wu nutzten diese Bande ebenfalls, um mit Hilfe der ATR-Spektroskopie die Wasserdiffusion in einen Polypropylenfilm auszuwerten (Shen und Wu 2003). Die Bandenintensitätsauswertung wurde auch mehrfach zur Bestimmung des Wassergehaltes in künstlichen und natürlichen Membranen mit der ATR-Technik durchgeführt (Branagan et al. 2000, Brancaleon et al. 2001, Lucassen et al. 1998, Potts et al. 1985, Sammon et al. 2000). Solange die Fremdmolekülkonzentration viel kleiner ist als die Konzentration der Gastmoleküle, ist die Extinktionszunahme einer Substanz proportional der Konzentrationszunahme (Brandt 1985, Coates 2002). In diesem Fall müssen Konzentrationen nicht mit Alternativmethoden bestimmt werden (Brandt 1985). Bereits im Falle der Harnstoffdiffusionsexperimente konnte gezeigt werden, dass die zeitliche Änderung der Bandenintensität der mittels der multivariaten Kalibration bestimmten Konzentrationsänderung entspricht (Abb. 11).

Dementsprechend wurde die Wasserdiffusion in eine Silikon-PEG-Membran anhand der zeitlichen Zunahme der Wasserbandenintensität mit der beschriebenen Annahme, dass sie proportional zur Konzentration der Wassermoleküle verläuft, charakterisiert. In Analogie zu den Wasserdiffusionsexperimenten wurde auch die Diffusion von Deuteriumoxid in eine Silikon-PEG-Membran, basierend auf der zeitlichen Zunahme der Intensität der Bande, die im Wellenzahlbereich von $920\text{-}1327\text{ cm}^{-1}$ liegt, bestimmt. Die Charakterisierung der Wasserdiffusion durch die Silikon-PEG-Membran mit der ATR-Diffusionszelle erfolgte anhand der Zunahme der Intensität der Bande der Deformationsschwingung des Wassers im Wellenzahlbereich von $1645\text{-}1731\text{ cm}^{-1}$. Aus einer PPG/Wasser-Mischung verdunstet das Wasser relativ schnell, sofern die Akzeptorlösung der Luft ausgesetzt wird. Bereits nach 18 min ist das Wasser bei nicht abgedecktem Akzeptor aus dem Polymer soweit verdampft, dass es nicht mehr detektierbar war (Abb. 13).

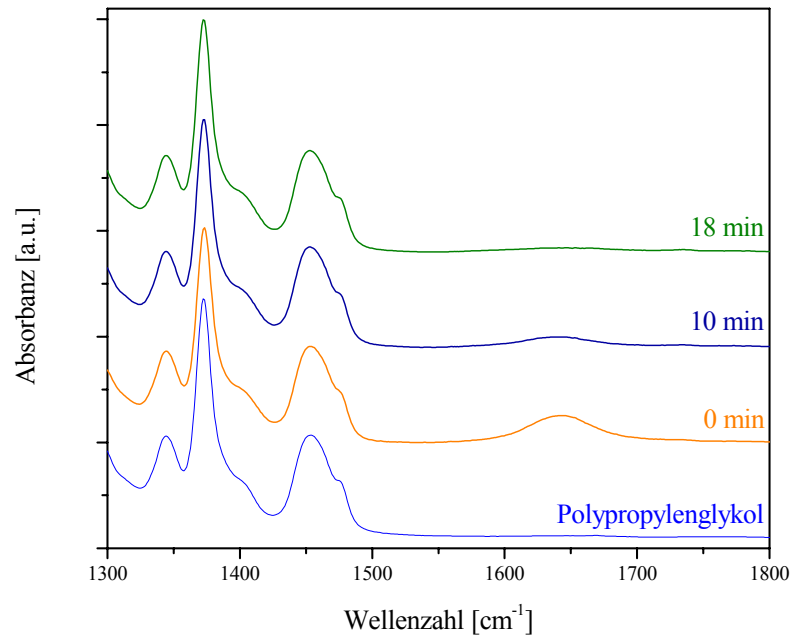


Abb. 13: ATR-Spektren des Systems Polypropylenglykol / Wasser zu verschiedenen Zeiten. Zum Vergleich ist das Spektrum von reinem Polypropylenglykol angegeben.

Während der Diffusionsexperimente spielen diese Verdampfungsprozesse keine Rolle, da die Membran luftblasenfrei auf dem Akzeptor aufliegt. Die Membran ist wiederum mit der wässrigen Donatorlösung überschichtet. Das gesamte System ist zusätzlich abgedichtet. Allerdings steht die schnelle Wasserverdunstung aus dem PPG einer exakten Kalibrierung entgegen. Von diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass die Integration der Bandenfläche im vorliegenden Fall exaktere Ergebnisse liefert, als eine mit Unsicherheiten belastete Kalibrierung.