

7. Diffusionsexperimente mit der FTIR-ATR-Diffusionszelle

7.1 Entwicklung der FTIR-ATR-Diffusionszelle

ATR-spektroskopische Untersuchungen erfordern einen engen optischen Kontakt zwischen der zu charakterisierenden Probe und dem Messkristall während eines Experimentes. Geringe Änderungen im Probe/Kristall-Kontakt können durch Normierung auf eine Membranbande korrigiert werden. Dies ist indessen nur zulässig, wenn eine nahezu konstante Membranbande vorliegt, die im Verlauf des Experimentes nicht von anderen, sich in ihrer Konzentration verändernden Substanzen überlagert wird (Farinas et al. 1994, Mirabella und Harrick 1984).

Um diesen engen optischen Kontakt bei Diffusionsexperimenten aufrechtzuerhalten, wurden von Hemmelmann und Brandt bereits zu untersuchende Polyethylenfilme direkt auf den Messkristall aufgeschmolzen (Hemmelmann und Brandt 1986). Verfahren dieser Art sind jedoch nicht für jede Probe anwendbar und schränken zudem die genaue Schichtdickenbestimmung der Membran ein. Da die Schichtdicke der Filme in diesem Fall nicht direkt, sondern durch Vergleichsmessungen der Kristallhöhe vor und nach Aufschmelzen der Probe bestimmt wird, ist mit größeren Fehlern zu rechnen. Die korrekte Berechnung des Diffusionskoeffizienten einer Substanz in einer Membran anhand der experimentellen Daten setzt hingegen eine exakte Bestimmung der Membranschichtdicke voraus (siehe Kapitel 4).

Da die Eindringtiefe des IR-Strahles in die Probe sehr gering ist, müssen die Vorgänge an der Grenzschicht zum ATR-Kristall für eine exakte Interpretation der aufgenommenen Spektren bekannt sein (Kapitel 5.1.3).

Bei ATR-Diffusionsexperimenten von Flüssigkeiten durch Membranen stellen sich vielfach schwer zu beantwortende Fragen. Wird die Zunahme der Intensität einer Wirkstoffbande durch den Anstieg der Konzentration des in der Membran verbleibenden Diffusanten verursacht oder ist eventuell eine Filmbildung des Diffusanten zwischen Membran und Kristall für diesen Anstieg ursächlich? Die Klärung dieser Fragestellung ist in dieser Arbeit am Beispiel der Wasserdiffusion durch Silikon-PEG-Membranen näher erläutert (siehe 5.1.3 und 5.1.4).

Trotz der Kontaktschwierigkeiten bei der bisherigen ATR-Anordnung weist die ATR-Spektroskopie erhebliche Vorteile gegenüber anderen Methoden bei der Charakterisierung von Diffusionsprozessen auf. So lassen sich mit ihr Prozesse in Echtzeit vermessen, Konzentrationszunahmen direkt detektieren und eine große Anzahl von Messpunkten in kurzen Zeitintervallen aufnehmen. Für schnell verlaufende Vorgänge können wichtige Anfangsprozesse erfasst werden. Aus diesem Grund gelang es, das Verhalten der bisher wiederholt verwendeten Glycerol-Collodium-Membran bei Kontakt mit wasserhaltigen Systemen zu charakterisieren (siehe 5.1).

Für die Bestimmung eines Diffusions- oder Permeationskoeffizienten einer Substanz in künstlichen Membranen oder im Stratum corneum wird in der Literatur der Einsatz gesättigter Lösungen des Diffusanten als Donator beschrieben (Bunge et al. 1995, Cornwell und Barry 1994, Cross et al. 2001, Dias et al. 2001, 2004, Farinas et al. 1985, Feldstein et al. 1998, Gelotte und Lostritto 1990, Goates und Knutson 1994, Hadgraft 2001, Harrison et al. 1996, Hatanaka et al. 1993, McCarley und Bunge 2003, Moser et al. 2001, Pellett et al. 1997 a, Pellet et al. 1997 b, Stinchcomb et al. 1999, Sznitowska et al. 1998, Tojo et al. 1987). Bei FTIR-ATR-spektroskopischen Untersuchungen wurde die Annahme einer konstanten Konzentration der Diffusanten im Donator auch durch Einsatz ungesättigter Diffusantlösungen im Überschuss auf der Membran gewährleistet (Nardviriyakul et al. 1997).

Vorteilhaft erweist sich bei der Verwendung von Wirkstofflösungen, dass ein zusätzlicher störender Freisetzungsschritt des Wirkstoffes aus der Formulierung, wie er beispielsweise bei Suspensionssalben auftritt, entfällt. Überdies können bei der Verwendung von komplexeren Formulierungen, weitere Formulierungsbestandteile in eine künstliche oder natürliche Membran eindringen und diese verändern. Durch den Einsatz gesättigter Lösungen oder ungesättigter Diffusantlösungen im Überschuss kann zusätzlich die Wirkstoffkonzentration im Donator im Verlauf des Experimentes als konstant angesehen werden. Die Einhaltung dieser Bedingungen erleichtert die Berechnung des Diffusionskoeffizienten über ein mathematisches Modell.

Bei der bisherigen FTIR-ATR-Versuchsanordnung für Penetrations- oder Diffusionsexperimente wird die Akzeptormembran direkt auf den undurchdringlichen Messkristall aufgelegt (Kapitel 3.1.1). Die Bestimmung von Diffusionskoeffizienten hydrophiler Substanzen im Stratum corneum ist mit dieser herkömmlichen ATR-Anordnung deutlich erschwert. Ein konstanter Kontakt zwischen Messkristall und Stratum corneum lässt sich über den erforderlichen Messzeitraum meist nicht aufrechterhalten. Im Gegensatz zu der verwendeten Silikon-PEG-Membran weist isoliertes Stratum corneum eine schlechte Affinität zum Zinkselenidkristall auf. Bei einem Penetrationsexperiment mit der bisherigen ATR-Anordnung ist es nicht möglich, eine Hydratation des Gewebes über den gesamten Messzeitraum mit Sicherheit konstant zu erhalten. Für die Struktur des SC ist eine Hydratation jedoch entscheidend, da bereits eine relativ trockene Umgebung der Struktur des Stratum corneum schadet (Blank 1952, Denda 2000).

In Vorversuchen mit der bisherigen FTIR-ATR-Anordnung wurde festgestellt, dass Wasseraufgabe auf das Stratum corneum zu einer ausgeprägten Kontaktabnahme zwischen der isolierten Hornschicht und dem ATR-Kristall führt. Ursächlich war eine Filmbildung des Diffusanten zwischen dem Kristall und der Haut. Im Laufe eines Experimentes dieser Art ändern sich die Randbedingungen am unteren Membranrand sowie die Zusammensetzung des detektierten Systems und folglich die Eindringtiefe des Messstrahles (Kapitel 2.5 und 6.1). Eine Filmbildung zwischen dem Kristall und der

Probe während des Diffusionsexperimentes steht einer exakten Quantifizierung der spektroskopischen Daten entgegen. Selbst bei vollständigem optischen Kontakt zwischen dem Stratum corneum und dem Messkristall wird mit der FTIR-ATR-Technik nur etwa eine Tiefe, die der Dicke einer Korneozytenschicht entspricht, detektiert (Bommanan et al. 1990). Aufgrund der geringen Eindringtiefe des IR-Strahls in die Probe bei der ATR-Technik ist verständlich, dass bereits ein kleinster Flüssigkeitsfilm zwischen einer Membran und dem Kristall störend wirkt. Folglich konnten mit der bisherigen ATR-Anordnung keine exakten Aussagen zum Diffusionsverhalten hydrophiler Substanzen im Stratum corneum getroffen werden.

Die Bestimmung von Permeations- und Diffusionskoeffizienten verschieden polarer Substanzen in der Haut erfolgte vorwiegend mit Diffusionszellen (Elias et al. 1981, Feldstein et al. 1998, Franz 1975, Goates und Knutson 1994, Harrison et al. 1996, Hatanaka et al. 1993, Liang et al. 1985, Peck et al. 1995, Rastogi und Singh 2001, Sznitowska et al. 1998, Yamashita et al. 1994). In einer Diffusionszelle ist die Haut oder eine andere Membran zwischen einer Akzeptorflüssigkeit und einer wirkstoffhaltigen Donatorlösung eingespannt. Hierbei wird sich besser an physiologische Bedingungen angenähert, als bei einem Penetrationsexperiment mit der herkömmlichen ATR-Anordnung, bei dem die isolierte Hautschicht auf einem undurchdringlichen, trockenen Messkristall aufliegt. Permeiert ein Arzneistoff durch das Stratum corneum bzw. durch darunterliegende Hautschichten, liegen ihm im menschlichen Körper ebenfalls weitere Hautschichten oder Gefäße als mögliche Akzeptoren vor. Exakte physiologische Bedingungen lassen sich mit Modellen jedoch nicht simulieren. Es kann nur versucht werden, sich im Rahmen eines Modells so weit wie möglich an diese Verhältnisse zu nähern.

In Diffusionszellen wird die durch die Haut permeierende Wirkstoffmenge im Akzeptor bestimmt. Hierfür wird zu verschiedenen Zeiten ein geringes Volumen Akzeptorlösung entnommen und der Diffusantengehalt mittels HPLC (Hatanaka et al. 1993, Hatanaka et al. 1994, Rastogi und Singh 2001, Sznitowska et al. 1998), IR (Hatanaka et al. 1994), Radioaktivitätsmessungen (Elias et al. 1981, Goates and Knutson 1994, van der Merwe und Ackermann 1987, Peck et al. 1995, Yamashita et al. 1994, Zhao und Singh 2000), oder anderen analytischen Methoden bestimmt. Dieser zusätzliche Schritt ist unvorteilhaft und birgt aufgrund der durch die Probenentnahme nicht unbeeinflusst bleibenden Akzeptorlösung und der lediglich indirekten Messung der Konzentrationszunahme weitere Fehlerquellen in sich. Diffusionszellen, wie die Diffusionszelle nach Franz (Franz 1975), besitzen weitere Nachteile. Der Diffusionsprozess wird nicht in Echtzeit detektiert. Es kann nur eine begrenzte Anzahl an Messpunkten erfasst werden. Der zeitliche Abstand zwischen diesen ist, im Vergleich zu den mit der ATR-Technik realisierbaren Messintervallen, sehr groß.

Vorteilhaft ist bei Diffusionszellen, dass sich Diffusionsprozesse durch Membranen bestimmen lassen, die für eine Charakterisierung mit der bisherigen ATR-Technik kaum

geeignet sind. Hierunter fallen Membranen, die eine sehr unebene Oberfläche besitzen bzw. eine schlechte Affinität zum ATR-Kristall aufweisen, wie die Stratum corneum- oder auch Rinderhufmembranen. Kontaktprobleme zwischen Membranen und einem Messkristall, wie sie bei der herkömmlichen ATR-Anordnung auftreten, kommen bei Diffusionszellen nicht vor. Die Messbedingungen einer Diffusionszelle sind gegenüber der herkömmlichen ATR-Anordnung besser definiert.

Die beschriebenen Vorteile der Diffusionszelle und der ATR-Technik boten den Anreiz zu testen, ob es gelingt, die positiven Eigenschaften beider Techniken in einem Modell zu vereinen. Dies warf gleichzeitig die Frage auf, ob dabei die Nachteile der jeweiligen Methode so weit wie möglich ausgeschlossen werden können.

Das Ziel, diese Fragen positiv zu beantworten, war ein Grund, der zur Entwicklung der ATR-Diffusionszelle führte. Da eine solche Messeinrichtung nicht existiert, erfolgte eine Eigenentwicklung (Abb. 39).

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte ATR-Diffusionszelle wurde basierend auf einem in eine Metallplatte eingelassenen Fresnel-ATR-Kristall von 20 mm Durchmesser aufgebaut.

In herkömmlichen Zellen wird die Akzeptorlösung, welche oft mehr als 20 ml beträgt (van der Merwe 1987), meist gerührt und der Wirkstoff im Akzeptor somit schnell und gleichmäßig verteilt (Feldstein et al. 1998, Gelotte et al. 1990, Harrison et al. 1996, Hatanaka et al. 1994, van der Merwe 1987, Peck et al. 1995, Pellett et al. 1997, Rastogi und Singh 2001, Zhao und Singh 2000). Eine aktive Durchmischung des Akzeptors lässt sich bei der verwendeten ATR-Anordnung technisch nicht mit angemessenem Aufwand realisieren. Weiterhin ist das ATR-Signal eines Diffusanten mit zunehmender Verdünnung im Akzeptor von meist unter 0,5 % stark verrauscht. Aus diesen Gründen wurde die Akzeptorhöhe sehr klein gewählt. Somit besitzt die Diffusionsgeschwindigkeit des Diffusanten im Akzeptor einen vernachlässigbaren Einfluss. Unter diesem Aspekt wird der Konzentrationsausgleich des Wirkstoffs innerhalb des Akzeptors als sehr schnell angesehen (Kapitel 4), ähnlich wie in einer größeren Zelle mit gerührtem Akzeptor.

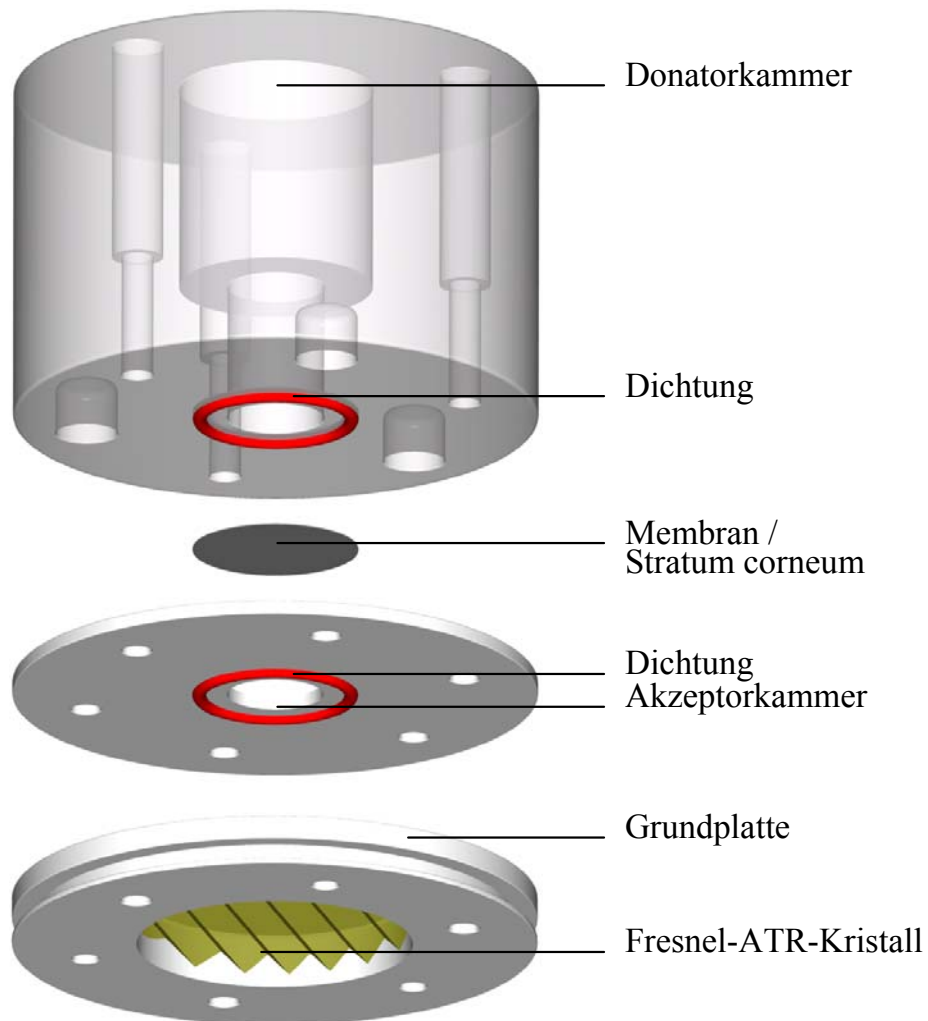


Abb. 39: Abbildung der entwickelten FTIR-ATR-Diffusionszelle

Die Erfahrungen aus der Konzeption mehrerer Prototypen flossen in die Entwicklung der neuen Methodik ein und führten zu der Konstruktion der im folgenden beschriebenen ATR-Diffusionszelle, mit der die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse erhalten werden konnten.

Unter der Zielsetzung, die Diffusion von Wirkstoffen durch das Stratum corneum zu charakterisieren, musste der Durchmesser der Diffusionszelle entsprechend klein sein. Die verfügbaren Hautproben besaßen nur einen geringen Durchmesser (Kapitel 3.3.1). Von den davon präparierten SC-Stücken konnten auch nur Areale verwendet werden, die keine Risse oder Löcher aufwiesen. Solche Defekte werden meist nicht durch mechanische Beanspruchung, sondern durch ehemalige Haarfollikel verursacht. Dies schränkte die Größe der zur Verfügung stehenden Proben weiterhin ein. Unter diesem Gesichtspunkt wurde für die Zelle der geringe Innendurchmesser von 5 mm gewählt, so dass sich bereits Diffusionsexperimente an Membranen mit kleiner Fläche durchführen lassen. Mit dieser Zelle konnten des Weiteren die Ergebnisse der fernerhin durchgeführten Diffusionsexperimente an Rinderhufmembranen erhalten werden (siehe

7.4). Da der Durchmesser handelsüblicher geeigneter Fresnel-ATR-Kristalle 20 mm beträgt, musste die Probenfläche auf dem Kristall entsprechend verringert werden. Bei der Fresnel-ATR-Anordnung detektiert der IR-Strahl die gesamte Kristalloberfläche. In Abb. 39 ist der Aufbau der ATR-Diffusionszelle dargestellt. Auf die Grundplatte, in die der Fresnel-ATR-Kristall eingefasst ist, wurde eine 1 mm dünne Edelstahlplatte vom gleichen Durchmesser der Grundplatte befestigt.

Bei der Entwicklung der ATR-Diffusionszelle war sicherzustellen, dass ein Stofftransport in der Zelle ausschließlich durch die Membran erfolgt. Es musste ausgeschlossen werden, dass ein Anteil des Diffusanten durch Undichtigkeiten um die Membran herum in den Akzeptor gelangt. Der Durchmesser der Membranen wurde ca. 3 mm größer gewählt als der Außendurchmesser der Dichtringe. Zur Überprüfung der Dichtigkeit der Anordnung wurde nach Abschluss eines Experimentes die Donatorlösung gegen Methylenblaulösung ausgetauscht und die gesamte Zelle über einen Zeitraum von 14 Stunden in ein mit destilliertem Wasser gefülltes Becherglas eingetaucht. Es war kein Austreten der Farbstofflösung aus der Zelle sichtbar. Das destillierte Wasser blieb klar und auch außerhalb der Dichtringe traten weder an der Membran, noch an Teilen der Zelle Färbungen auf. Dies beweist, dass die entwickelte Anordnung dicht und ein Stofftransport vom Donator in den Akzeptor nur durch die Membran möglich ist. Vorteilhaft erweist sich weiterhin aus mehreren Gründen, dass die Akzeptorkammer durch Auflage der Dichtringe direkt auf dem Messkristall abgedichtet wird und dabei nur einen Teil des gesamten Kristalls bedeckt. Die Kristalloberfläche ist poliert und damit ebener als die Metallfassung um den ATR-Kristall, so dass an dieser Stelle eine sichere Abdichtung des Akzeptors einfacher realisierbar ist. Zusätzlich kann bei den Experimenten ein Austreten von Akzeptorlösung auch während der Versuche ausgeschlossen werden. Dies wurde direkt im Laufe eines jeden Diffusionsexperimentes überprüft. Bei der Fresnel-ATR-Anordnung detektiert der IR-Strahl die gesamte Kristalloberfläche. Ein Austreten der Lösung aus der Akzeptorkammer auf die restliche Kristallfläche hätte somit zu Intensitätsänderungen der ATR-Banden der Akzeptorflüssigkeit geführt. Auch die spektralen Ergebnisse bestätigen jedoch die sichere Abdichtung des Akzeptors. Zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten anhand der experimentell ermittelten Daten wurde das unter Kapitel 4 erläuterte mathematische Modell entwickelt.

Die in dieser Arbeit entwickelte ATR-Diffusionszelle eröffnet innovative Perspektiven zur Charakterisierung von Diffusionsprozessen durch Membranen, die mit der bisherigen Anordnung oft nicht sicher zugänglich waren.

7.2 Diffusion durch eine Silikon-PEG-Membran

Mit der entwickelten ATR-Zelle wurden Wasserdiffusionsexperimente an der Silikon-PEG-Membran durchgeführt. Hierfür diente als Donator wiederum eine 20%-ige wässrige Harnstofflösung. Diese Formulierung wurde im Vergleich zu den Diffusionsexperimenten mit der herkömmlichen ATR-Anordnung beibehalten. Infolgedessen können die Ergebnisse mit den, anhand der bisherigen ATR-Anordnung erhaltenen Resultaten (siehe 6.1), gegenübergestellt werden. Eventuelle Einflüsse durch eine veränderte Formulierung lassen sich somit ausschließen. Als Akzeptor für Wasser diente PPG 2000 (Gagnon 1986). Vorteilhaft erwies sich bei diesem begrenzt wassermischbaren Polymer, wie in Abb. 13 (Kapitel 3.4) und Abb. 40 ersichtlich ist, dass PPG 2000 im Wellenzahlbereich bei ca. 1640 cm^{-1} , bei dem die Deformationsschwingung des Wassers auftritt, keine Banden aufweist. Überlagerungen zwischen Akzeptor- und Wasserbanden können in diesem Bereich ausgeschlossen werden. Die Wasserdiffusion kann somit anhand des zeitlichen Zuwachses der Bande der Deformationsschwingung bei ca. 1640 cm^{-1} deutlich nachvollzogen werden.

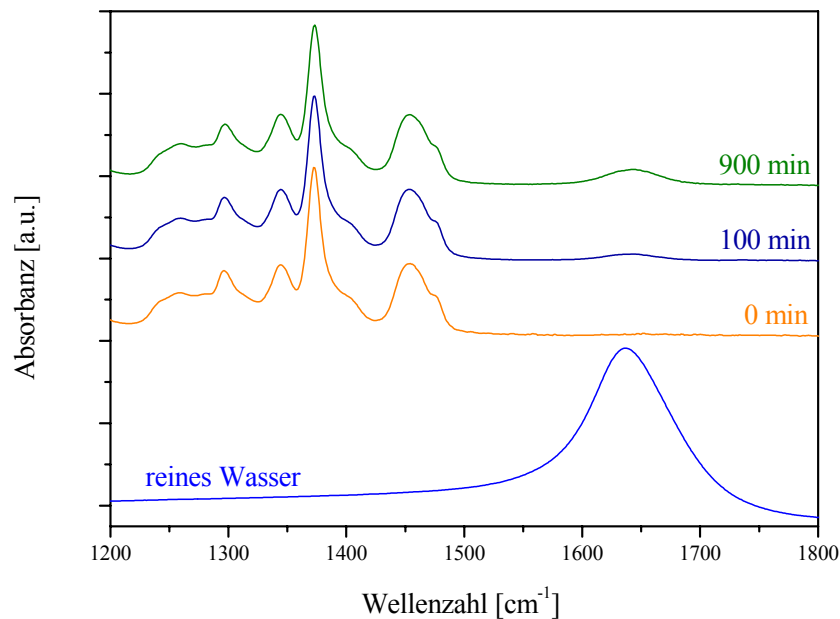


Abb. 40: ATR-Spektren des Systems Wasser/Silikon-PEG-Membran/Polypropylenglykol zu verschiedenen Zeiten. Das Spektrum zum Zeitpunkt 0 min entspricht reinem Polypropylenglykol. Zum Vergleich ist das Spektrum von reinem Wasser abgebildet.

Des Weiteren konnte bei der Verwendung von PPG 2000 vorteilhafter Weise keine Penetration des Polymers in die Membran und keine Quellung selbiger festgestellt werden (Kapitel 6.1). Hierfür wurde eine etwa 80 µm dicke Silikon-PEG-Membran direkt auf den Messkristall aufgebracht und mit 300µl PPG 2000 bedeckt. Über einen Zeitraum von 24 Stunden konnte keine Diffusion des Polymers in die Membran detektiert werden. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass PPG 2000 als Akzeptorlösung die Membraneigenschaften nicht verändert. Dies war ebenfalls ein wichtiges Auswahlkriterium für einen Akzeptor, das vielfach in Vorversuchen die Verwendung anderer Akzeptorsubstanzen, wie z.B. Alkohole bis zur Kettenlänge des Pentanols, ausschloss. Die Alkohole führten zu einer Membranquellung, wobei davon auszugehen ist, dass sich in diesem Fall die Membraneigenschaften wesentlich verändern. Dabei müsste ein neuer Ansatz für die Bestimmung eines Diffusionskoeffizienten, der hierbei voraussichtlich nicht konstant ist, erstellt werden. Längerkettige Alkohole besitzen eine für die Methode unzureichende Wasserlöslichkeit. Die Berechnung des Diffusionskoeffizienten erfolgt ausgehend von der Annahme, dass der Konzentrationsausgleich des Wassers im flüssigen Akzeptor sehr schnell geschieht. Um dies zu bekräftigen, wurde eine 1,3 mm hohe Schicht PPG 2000 in der Diffusionszelle ohne Membran direkt mit Wasser überschichtet. Der anhand der experimentell ermittelten Daten mit dem mathematischen Modell berechnete Diffusionskoeffizient von Wasser im PPG 2000 beträgt $(1,82 \pm 0,06) \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ (Abb. 42). Zum besseren Vergleich ist in Abb. 42 die Diffusion des Wassers in PPG in direkter Gegenüberstellung zum anfänglichen Verlauf der Wasserdiffusion durch die Silikon-PEG-Membran dargestellt. Die Diffusionsgeschwindigkeit von Wasser im PPG 2000 ist wesentlich schneller als in der Silikon-PEG-Membran (vergleiche Tabelle 5). Dieses Ergebnis bekräftigt, dass die Annahme eines sehr schnellen Konzentrationsausgleiches von Wasser im flüssigen Akzeptor PPG 2000 bei der Berechnung des Diffusionskoeffizienten von Wasser in der Silikon-PEG-Membran gerechtfertigt ist.

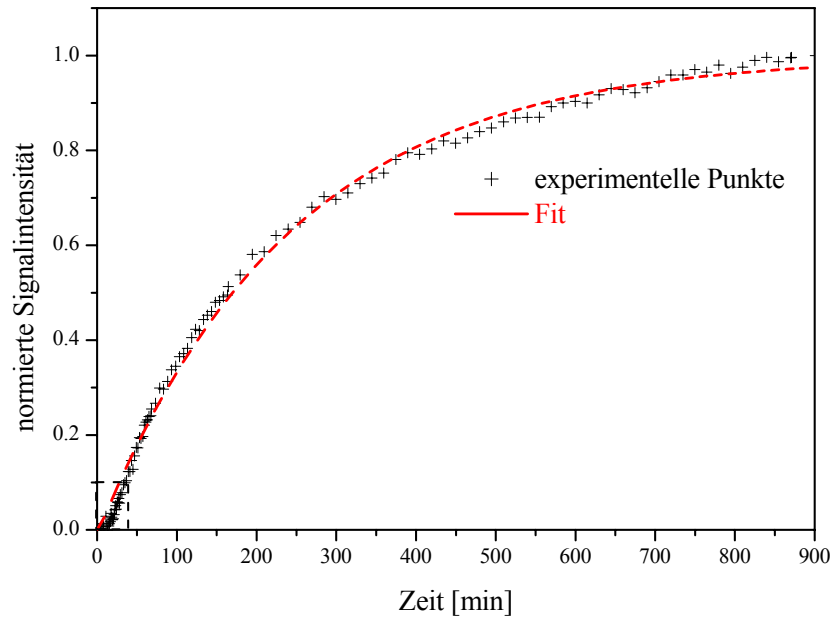


Abb. 41: Zunahme der normierten Signalintensität von Wasser während der Diffusion von Wasser aus einer als Donator fungierenden 20%-igen wässrigen Harnstofflösung durch eine Silicon-PEG-Membran. Die Akzeptorlösung bestand aus PPG 2000.

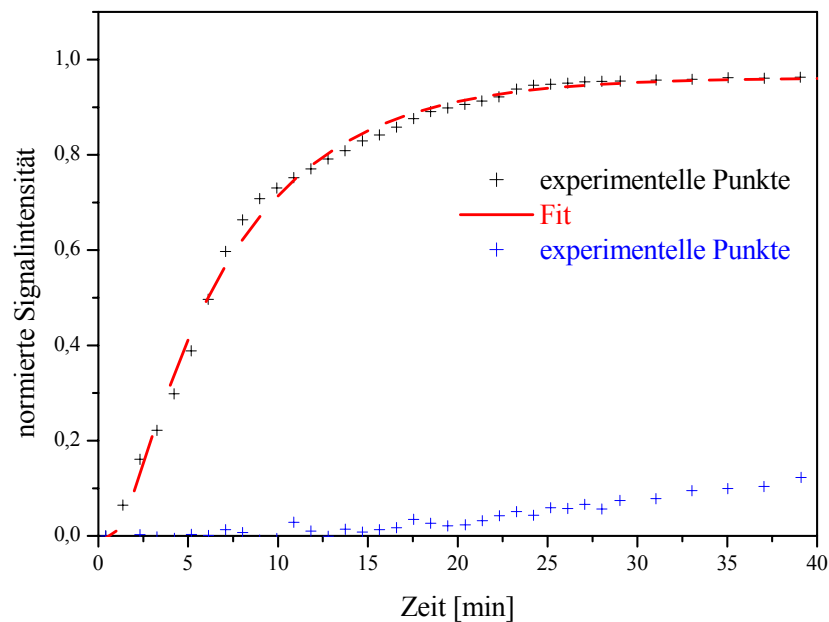


Abb. 42: Zunahme der normierten Signalintensität von Wasser während der Wasserdiffusion ohne Membran direkt in PPG 2000 (schwarze Punkte). Als Donator diente Wasser und als Akzeptor PPG 2000. Zum Vergleich ist die Zunahme der normierten Signalintensität von Wasser zu Beginn des Wasserdiffusionsexperimentes (eingerahmter Bereich in Abb. 41) durch eine Silicon-PEG-Membran in PPG 2000 aus Abb. 41 dargestellt (blaue Punkte).

Der Diffusionskoeffizient von Wasser in der Membran wurde durch eine Anpassungsrechnung auf der Basis von Gleichung 4.7 (Kapitel 4) an die experimentellen Daten ermittelt (Abb. 41).

In Tabelle 5 sind die Werte für die Experimente der Wasserdiffusion durch die Silikon-PEG-Membranen aufgelistet.

Tabelle 5: Werte der Membrandicke, der ausgewerteten Messzeit und des Diffusionskoeffizienten für die Experimente der Wasserdiffusion durch eine Silikon-PEG-Membran mit der ATR-Diffusionszelle

Ex-periment	Membrandicke (µm)	Messzeit (min)	$D_{\text{Wasser}} (10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s})$	relatives Vertrauensintervall in %
1	82 ± 2 (N=10)	900	$6,19 \pm 0,15$	$\pm 2,4$
2	84 ± 5 (N=10)	900	$7,69 \pm 0,25$	$\pm 3,3$
3	87 ± 3 (N=10)	900	$6,72 \pm 0,26$	$\pm 3,9$

Im Gegensatz zur bisherigen ATR-Anordnung (siehe 6.1 und 6.2) liegt bei Verwendung der ATR-Diffusionszelle ein bestmöglicher und über den gesamten Diffusionszeitraum vollständiger Kontakt zwischen der Akzeptorlösung und dem ATR-Kristall vor. Die bei der herkömmlichen ATR-Anordnung auftretenden Kontaktschwierigkeiten, die in den vorangegangenen Kapiteln der Arbeit beschrieben sind, treten bei der ATR-Diffusionszelle nicht auf.

Aus Abb. 41 ist ersichtlich, dass die Verläufe zwischen experimentell ermittelten Daten und der berechneten Kurve, die einen ausschließlichen Diffusionsprozess beschreibt, generell übereinstimmen. Die geringen relativen Vertrauensintervalle (Tabelle 5) kennzeichnen ebenfalls die Qualität der berechneten Diffusionskoeffizienten. Die Ergebnisse zeigen, dass die Kombination von mathematischem Modell und der entwickelten ATR-Diffusionszelle vorteilhafter ist als bei Verwendung der bisherigen ATR-Anordnung (siehe Kapitel 6.1). Dies zeigt sich auch an den etwas kleineren relativen Vertrauensintervallen der berechneten Diffusionskoeffizienten bei der ATR-Diffusionszelle im Vergleich zur bisherigen ATR-Anordnung. Der Mittelwert der hier ermittelten Diffusionskoeffizienten von Wasser in der Silikon-PEG-Membran (Tabelle 5) beträgt $(6,87 \pm 0,76) \times 10^{-8} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$. Die Vergleiche zwischen den mit der bisherigen ATR-Anordnung und den anhand der ATR-Diffusionszelle ermittelten Diffusionskoeffizienten zeigen, dass letztere Werte geringfügig größer sind. Als Ursache wird gesehen, dass der Diffusionsstrom am unteren Membranrand bei der ATR-Diffusionszelle gleichmäßiger stattfindet als bei der bisherigen ATR-Anordnung. Während eines Diffusionsexperimentes mit der herkömmlichen ATR-Anordnung reichert sich der Diffusant in der Membran an. Dagegen liegt bei der ATR-Diffusionszelle im Verlauf des Diffusionsprozesses ein weiteres Konzentrationsgefälle

am unteren Membranrand vor und der Diffusant diffundiert weiter in den Akzeptor. Die Vertrauensintervalle quantifizieren bei gleich bleibendem Messfehler die Qualität der, basierend auf dem mathematischen Modell erfolgten, einzelnen Anpassungsrechnungen an die experimentellen Daten. Dies ist ebenfalls anhand des Vergleiches zwischen experimentellem Kurvenverlauf und dem Verlauf der berechneten Daten erkennbar. Die Verwendung eines flüssigen Akzeptors, mit demzufolge bestmöglichem Kontakt zum Messkristall, führt an der ATR-Diffusionszelle zu besser definierten und gleichmäßigeren Bedingungen während der Diffusionsexperimente im Vergleich zu der herkömmlichen ATR-Anordnung.

7.3 Harnstoffdiffusion durch isoliertes Stratum corneum

Diffusionssexperimente mit der entwickelten ATR-Diffusionszelle wurden an isoliertem Stratum corneum zur Klärung der bisher offenen Fragestellung, wie schnell Harnstoff durch diese Hautschicht diffundiert, durchgeführt. Ziel war es, anhand der erhaltenen Ergebnisse den Diffusionskoeffizienten der Substanz in der äußeren Hautschicht zu berechnen. Der Einsatz einer 10 %-igen wässrigen Harnstofflösung als Donatorsubstanz entspricht einer therapeutisch relevanten Konzentration der Substanz. Ab einer Konzentration von 0,5 % (m/m) Harnstoff ist die Signalintensität der Substanz im wässrigen Akzeptor ausreichend, um eine Kinetik deutlich zu detektieren.

Die Harnstoffkonzentration wird im Donator des Weiteren auf 10 % festgelegt, da beim Einsatz deutlich höher konzentrierter Zubereitungen keratoplastische Effekte beschrieben sind (Proksch 2000, Vanscheidt 1992, Wohlrab 2001). Eine dermale Applikation von Harnstoff in einer Konzentration von 10 % verursacht gemäß van der Merwe und Ackermann jedoch keine Veränderungen der strukturellen und physikalischen Eigenschaften der Haut (van der Merwe und Ackermann 1987). Die Harnstoffdiffusion durch das Stratum corneum ist anhand des zeitlichen Anwachsens der Bande bei 1463 cm^{-1} sichtbar (Abb. 43), welche hauptsächlich von der C-N-Streckschwingung der Substanz verursacht wird (Hadži et al. 1976, Kutzelnigg und Mecke 1961, Steward 1957, Vijay et al. 1993). Die Berechnung der Diffusionskoeffizienten von Harnstoff im Stratum corneum setzt eine sehr hohe Diffusionsgeschwindigkeit und demzufolge einen sehr schnellen Konzentrationsausgleich der Substanz innerhalb des flachen wässrigen Akzeptors voraus. Der Diffusionskoeffizient von Harnstoff in Wasser wird bei 25 °C mit $D=1,378 \times 10^{-5}\text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ angegeben (Kampp 1970, Longworth 1954, Sorell und Myerson 1982). Die annähernd 10^5 fach schnellere Diffusion der Substanz in Wasser gegenüber der Diffusionsgeschwindigkeit in der äußeren Hautschicht (Tabelle 6) rechtfertigt diese Annahme.

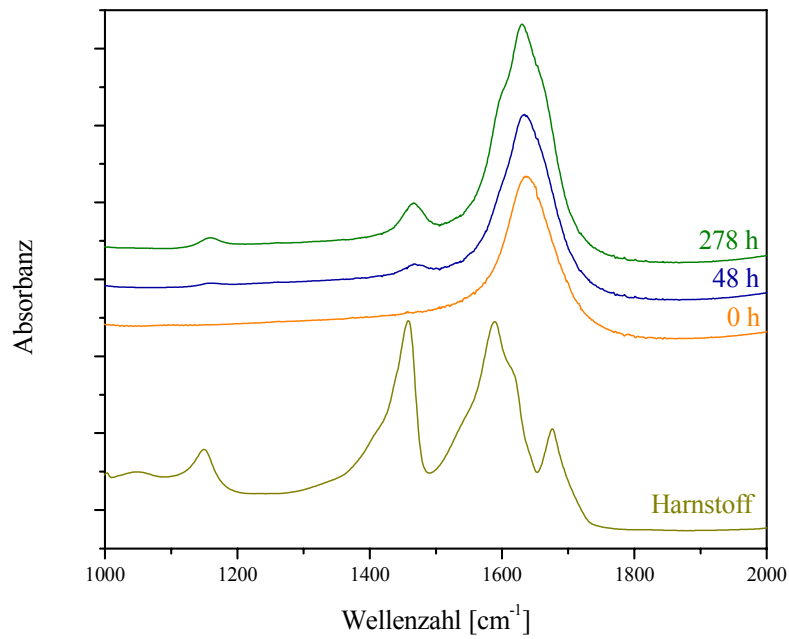


Abb. 43: ATR-Spektren des Systems Harnstoff/Stratum corneum/Wasser zu verschiedenen Zeiten des Diffusionsexperimentes. Zum Vergleich ist das Spektrum von reinem Harnstoff angegeben.

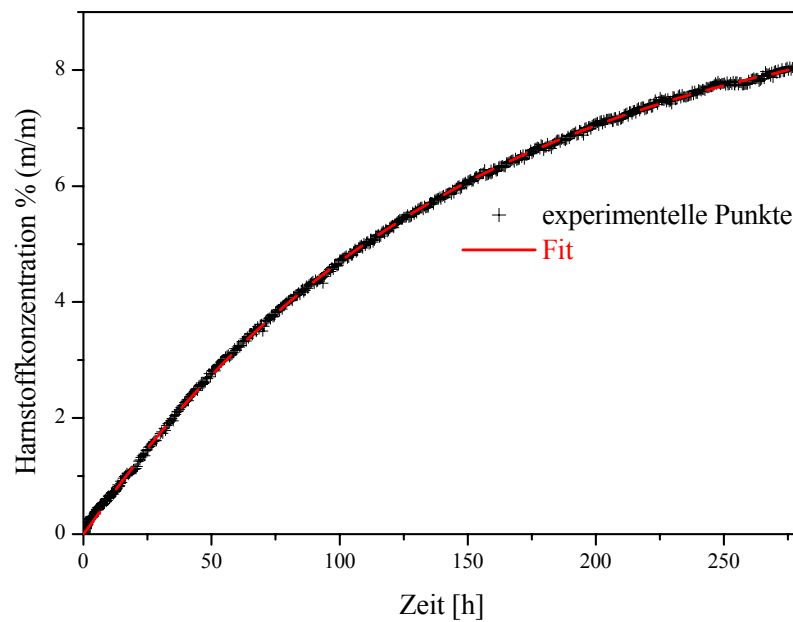


Abb. 44: Zunahme der Harnstoffkonzentration im Akzeptor während der Diffusion von Harnstoff durch Stratum corneum

In der vorliegenden Arbeit wurde die Diffusion des Harnstoffs durch isoliertes, voll hydratisiertes Stratum corneum mit der entwickelten ATR-Diffusionszelle mittels Realzeitmessung charakterisiert.

Zur Geschwindigkeit dieses Prozesses konnten aus der Literatur erste Abschätzungen durch die Arbeit von Ackermann et al. getroffen werden (Ackermann et al. 1985). In diesen, an isolierter Nacktmaushaut in einer Diffusionszelle durchgeführten Studien, wird bereits auf eine deutlich langsamere Diffusion der Substanz im Gegensatz zu Wasser, Methanol oder Ethanol verwiesen.

Die Berechnung der Diffusionskoeffizienten von Harnstoff in der Hornschicht erfolgte durch eine Anpassungsrechnung auf der Basis des mathematischen Modells (siehe 4.3) an den experimentellen Daten (Abb. 44).

Abb. 44 demonstriert, dass der berechnete Kurvenverlauf mit dem der experimentell ermittelten Daten übereinstimmt und unterstützt die Annahme, dass die Passage des Harnstoffs durch das Stratum corneum einem passiven Diffusionsvorgang entspricht. Dies wird durch Literaturangaben, denen zufolge der Stoffdurchgang der meisten relevanten chemischen Substanzen durch die Haut als passiver Diffusionsprozess erfolgt, bekräftigt (Buchwald und Bodor 2001, Schäfer et al. 1982, Wiechers 1989).

Für die Diffusionsexperimente, die durchgehende Versuchszeiten von teilweise mehr als 600 Stunden erforderten, wurde das isolierte Stratum corneum von drei Mammahautproben verwendet. Hierfür gelang es, Gewebeproben nahezu altersgleicher Spenderinnen zu erhalten (siehe 3.3.1). Die Aufarbeitung, der aus der gleichen Entnahmeregion stammenden Hautproben, erfolgte identisch (Kapitel 3.3.1). Alle Diffusionsexperimente am Stratum corneum wurden im voll hydratisierten Zustand der isolierten äußeren Hautschichten durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.1). Im Rahmen dieser Arbeit war es weder das Ziel, noch aufgrund der langen Versuchszeiten durchführbar, eine breite Stratum corneum-Statistik zum Diffusionsverhalten von Harnstoff zu realisieren. Vielmehr wurde ebenfalls Wert auf die gewissenhafte Auswertung der Einzelmessungen gelegt (siehe 6.1). In Tabelle 6 sind die Werte für die Harnstoffdiffusionsexperimente aufgelistet.

Tabelle 6: Werte der Stratum corneum-Dicke (vollhydratisiert), der ausgewerteten Messzeit und des Diffusionskoeffizienten für die Experimente der Harnstoffdiffusion durch Stratum corneum mit der ATR-Diffusionszelle

SC-Probe	Dicke (μm)	Messzeit (h)	$D_{\text{Harnstoff}}$ ($10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$)	relatives Vertrauensintervall in %
A	24 \pm 2 (N=10)	278	6,04 \pm 0,04	0,7
B	30 \pm 2 (N=10)	640	0,63 \pm 0,05	7,9
C	36 \pm 4 (N=10)	615	1,88 \pm 0,08	4,3

Trotz enger Alterseingrenzung der Spenderinnen und gleicher Entnahmeregion lassen sich die Schwankungen zwischen den einzelnen Diffusionskoeffizienten weniger auf die verwendete Messmethode, sondern vielmehr auf interindividuelle Unterschiede in den Gewebeeigenschaften zurückführen. Im Gegensatz zu Experimenten mit künstlichen Membranen (siehe 6.1, 6.2, 7.2) handelt es sich hier um Messungen an biologischem Material verschiedener Spenderinnen, welches in seiner Beschaffenheit größeren Variationen unterliegt. Dies zeigt sich beim Vergleich mit den geringeren Schwankungen der Diffusionskoeffizienten von Wasser in der künstlichen Silikon-PEG-Membran (Kapitel 7.2). Des Weiteren soll auf die im nachfolgenden Kapitel 7.4 erörterten wesentlich geringeren Unterschiede der einzelnen ermittelten Harnstoffdiffusionskoeffizienten in den Rinderhufmembranen verwiesen werden, bei denen es sich ebenfalls um biologische, allerdings aus einer Entnahmeregion eines Individuums stammende Membranen handelt. Die hier zum Vergleich herangezogenen Messungen betreffen ebenfalls Ergebnisse, die mit dem gleichen Messprinzip der entwickelten ATR-Diffusionszelle erhalten wurden. Dies beweist, dass die größeren Schwankungen der Diffusionskoeffizienten von Harnstoff im Stratum corneum nicht durch die Messmethode verursacht werden. Aus der Variabilität der Gewebe resultieren auch die verschiedenen Endzeiten der einzelnen Diffusionsexperimente an der isolierten äußeren Hautschicht. Die Harnstoffdiffusion am Stratum corneum wurde bis zum Erreichen einer Harnstoffakzeptorkonzentration von mindestens 7% (m/m) detektiert, da die Kurven bis zu dieser Konzentration eine deutliche Krümmung aufweisen. Dies ist erforderlich, da aus dem alleinigen, nahezu linearen, anfänglichen zeitlichen Verlauf der Messdaten keine Berechnung des Diffusionskoeffizienten möglich ist. In Abb. 44 ist erkennbar, dass die Einstellung eines annähernden Gleichgewichtes des Diffusionsprozesses noch nicht erreicht ist. Aufgrund der einerseits bis dahin noch notwendigen Messzeit und der Auslastung des Spektrometers andererseits, trotz der das Maximum an potenzieller Messzeit genutzt wurde, waren längerdauernde Messungen nicht realisierbar. Die Diffusionskoeffizienten sind ferner aus den experimentell ermittelten Kurvenverläufen berechenbar. Mit der in dieser Arbeit neu entwickelten Methodik der ATR-Diffusionszelle können Konzentrationszunahmen im Akzeptor in

Realzeit direkt und exakt bestimmt werden. Die Genauigkeit der Methode ist auch an dem nahezu idealen Verlauf der gemessenen Daten im Vergleich zur berechneten Kurve ersichtlich (Abb. 44). Die Wiederholung dieser Messungen an einer Franz-Diffusionszelle lässt keine neuen und genaueren Aussagen erwarten, da dabei die Harnstoffkonzentration im Akzeptor nicht direkt bestimmt wird, dieser nicht unbeeinflusst bleibt und nur wenige Messpunkte erfasst werden können (siehe 6.1). Da es sich bei der durchgeführten Charakterisierung der Harnstoffdiffusion um eine neue Methodik handelt und der Diffusionskoeffizient dieser Substanz im Stratum corneum bisher nicht bekannt war, sollen die Ergebnisse mit weiteren verschiedenen in der Literatur vorgestellten Diffusionsstudien am Stratum corneum diskutiert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass der mit einem Octanol/Wasser Verteilungskoeffizienten von $\log K_{OW} = -2,11$ sehr hydrophile Harnstoff (Sangster 1997), im Vergleich zu den aus der Literatur bekannten Diffusionskoeffizienten des polaren Wassers (siehe Tabelle 7), langsamer durch das Stratum corneum diffundiert.

Die Literaturangaben zu den Diffusionskoeffizienten von Wasser in der Hornschicht sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Literaturangaben des Diffusionskoeffizienten von Wasser im humanen Stratum corneum

$D_{\text{Wasser}} (10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s})$	Referenz
0,3 – 1,0	Blank et al. 1984
$3,8 \pm 1,3$	Kalia et al. 1996, 2000
0,88	Norlen et al. 1999
$4,4 \pm 2,2$	Pierot et al. 1998
0,85 – 5,1	Schwindt et al. 1998

Blank et al. untersuchten die Diffusion von tritiummarkiertem Wasser durch isoliertes Stratum corneum mit verschiedenem Wassergehalt. Dabei wurde mit steigender Hydratation der drei untersuchten Hautproben eine größere Diffusionsgeschwindigkeit in der äußeren Hautschicht festgestellt. Der geringe, von den anderen Angaben abweichende D-Wert von Blank et al. mit $D = 0,3 \times 10^{-9} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ wurde für isoliertes Stratum corneum bestimmt, welches einer relativen Luftfeuchte von lediglich 46% ausgesetzt war. Dieser Wert kann somit nicht als Vergleich zu den in dieser Arbeit an voll hydratisiertem Stratum corneum bestimmten Diffusionskoeffizienten herangezogen werden. Der Diffusionskoeffizient einer Substanz in der Hornschicht ist sowohl von der Molekülgröße als auch von der –struktur abhängig (Pugh et al 1996, 2000). Wiechers verwies weiterhin auf den Einfluss des Ionisierungsgrades eines Diffusanten auf die Diffusionsgeschwindigkeit in der äußeren Hautschicht (Wiechers 1989). Hierbei ist auch dargestellt, dass der Einfluss eines einzelnen Faktors sehr schwer charakterisierbar

ist, da diese physikochemischen Parameter eng miteinander verknüpft sind. Für Moleküle mit annähernd gleicher Polarität kann die allgemeine Abschätzung getroffen werden, dass diese bei kleinerer Molmasse schneller permeieren (Bos und Meinardi 2000, Flynn 1985, Wiechers 1989). Die langsamere Diffusion des von der Molekülmasse deutlich größeren Harnstoffs durch die äußere Hautschicht, im Vergleich zu den erwähnten Literaturangaben von Wasser, deckt sich mit dieser Aussage. Flynn begründet die langsamere Diffusion größerer Moleküle (Flynn 1985) ausgehend von einem sogenannten Porendiffusionsweg (vergleiche Kapitel 2.1.2). Abhängig vom effektiven Radius dieser Poren können die Diffusionskoeffizienten von Arzneistoffen mit zunehmender Molekülgröße deutlich abnehmen, da größere Moleküle in ihrer Diffusion stärker behindert werden. Weiterhin können bei Arzneistoffen ähnlicher Molekülgröße verschiedene Hautpermeabilitäten aus unterschiedlichen Octanol/Wasser Verteilungskoeffizienten resultieren (Buchwald und Bodor 2001, Flynn 1985, Potts und Guy 1992). Allerdings stellten Scheuplein et al. bereits bei verschiedenen Corticoiden, die sich lediglich durch das Einfügen zusätzlicher Hydroxylgruppen in das Grundgerüst des Progesterons unterschieden, fest, dass Molekülgröße und Octanol/Wasser Verteilungskoeffizient lediglich einen anteiligen Einfluss auf ein unterschiedliches Diffusionsverhalten von Arzneistoffen besitzen (Scheuplein et al. 1969). Bei diesen Steroiden reduzierte sich der Diffusionskoeffizient um den Faktor 33, während das Molekulargewicht lediglich um 15% zunahm.

Die Diffusionskoeffizienten von Arzneistoffen im hydratisierten Stratum corneum liegen in der Größenordnung von 10^{-9} bis 10^{-13} cm^2s^{-1} (Michaels et al. 1975, Idson 1978, Scheuplein und Ross 1970). Dementsprechend können die in dieser Arbeit in diesem Gewebe ermittelten Diffusionsgeschwindigkeiten des Harnstoffs als schnell angesehen werden. Der Vergleich mit anderen häufig topisch applizierten Substanzen, für die kleinere Diffusionskoeffizienten durch die äußere Hautschicht ermittelt wurden, bekräftigt diese Feststellung (Scheuplein et al. 1969). Entsprechende Diffusionskoeffizienten werden für Hydrocortison mit $4,8 \times 10^{-13}$ cm^2s^{-1} und für Cortexolon mit $3,61 \times 10^{-12}$ cm^2s^{-1} durch 40 μm dickes, voll hydratisiertes Stratum corneum angegeben (Scheuplein et al. 1969, Wiechers 1989).

Die Diskussion mit anderen Untersuchungen zeigt, dass es fraglich ist, ob das Diffusionsverhalten von Arzneistoffen in der Hornschicht generell theoretisch genau vorausgesagt werden kann. Aufgrund der auftretenden intraindividuellen Schwankungen in den Gewebeeigenschaften werden weniger die einzelnen absoluten Werte, sondern vielmehr die Größenordnungen des Diffusionskoeffizienten eines Arzneistoffs im humanen Stratum corneum als relevant angesehen. Diese lassen sich durch entsprechende Experimente am isolierten humanen Stratum corneum, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, bestimmen.

Zu den hier erhaltenen Ergebnissen soll hinzugefügt werden, dass es sich, wie bei allen an Diffusionszellen durchgeführten Experimenten, um ex vivo Versuche handelt.

Entsprechende *in vivo* Werte können von den hier ermittelten Diffusionskoeffizienten abweichen, obwohl Franz bereits gute Korrelationen zwischen der perkutanen Absorption verschiedenerer Substanzen *in vivo* und deren *in vitro* Permeabilität ermittelte (Franz 1975).

Die frisch entnommene Haut wurde, bis zur unmittelbar vor dem jeweiligen Experiment erfolgten Präparation des Stratum corneum, tiefgefroren (siehe 3.3.1). Hierbei handelt es sich um eine gängige Vorgehensweise (Elias et al. 1981, Haftek et al. 1998, Johnson et al. 1997, Rosado et al. 2003, Wohlrab und Hassler 1981). Für frisch entnommene Hautpräparate wurde von Swarbrick et al. eine geringere Permeabilität des Stratum corneum publiziert als für solche, die vor den Permeationsexperimente bei -17°C gelagert wurden (Swarbrick et al. 1982). Dementgegen stellten Harrison et al. in einer späteren Arbeit keine Unterschiede zwischen den Diffusionsgeschwindigkeiten des Wassers in frisch entnommener Haut und Hautpräparaten, die bis zu 466 Tage bei -20°C gelagert wurden, fest (Harrison et al. 1984). Unter dieser Annahme, dass eine über mehrere Monate tiefgefrorene Lagerung der Haut ihre Barriereigenschaften nicht verändert, setzten weitere Arbeitsgruppen entsprechend aufbewahrte Haut für Permeationsexperimente ein (Rosado et al. 2003). Inwieweit das Diffusionsverhalten für Harnstoff zwischen frisch entnommenen und tiefgefroren gelagerten Hautproben differenziert, kann von den hier erhaltenen Ergebnissen nicht abgeleitet werden. An dieser Stelle ist ein Ansatz für weitere Untersuchungen. Vielfach werden topisch angewandte Arzneistoffe auch auf erkrankter Haut appliziert, deren Permeabilität gegenüber gesunder Haut oft erhöht ist (Idson 1978, Wiechers 1999). Bisher existieren keine einheitlichen Vorgehensweisen für die Durchführung von Permeationsexperimenten an der äußeren Hautschicht. Bei quantitativen *in vitro* Permeabilitätsuntersuchungen der Haut wird jedoch meist voll hydratisiertes Stratum corneum eingesetzt (van der Merwe und Ackermann 1997).

Veränderungen des Stratum corneum mit Einfluss auf das Diffusionsverhalten konnten auch über die relativ langen Versuchszeiträume der Harnstoffdiffusionsexperimente (Tabelle 6) nicht beobachtet werden. Eine deutliche Änderung des Stratum corneum, während eines Experimentes hinsichtlich seiner Permeabilität für Harnstoff, hätte auch einen im Laufe des Experimentes nicht konstanten Diffusionskoeffizienten zur Folge. Dies wäre anhand einer deutlichen Differenz zwischen dem gefitteten Kurvenverlauf und dem Verlauf der experimentell ermittelten Daten des Diffusionsexperimentes sichtbar, da im mathematischen Modell die Berechnung des Diffusionskoeffizienten ausgehend von einem konstanten Diffusionskoeffizienten erfolgt. Scheuplein beschrieb 1965, dass ein ausgedehntes Eintauchen der Haut in Wasser die Hautstruktur messbar beeinflusst (Scheuplein 1965). Jedoch wurden diese schnell eintretenden Änderungen als sehr gering beurteilt. Bei aktuellen Untersuchungen zur Stabilität von isoliertem humanen Stratum corneum, welches über einen zweiwöchigen Zeitraum in Wasser gelagert wurde, stellten auch andere Arbeitsgruppen keine Veränderungen in der

Struktur und Anordnung der Korneozyten fest (Wepf 2003). Elektronenmikroskopische Abbildungen entsprechender Stratum corneum-Stücke sind im Anhang dargestellt (Abb. A 5, Abb. A 6). Diese Ergebnisse gehen mit den Feststellungen von Scheuplein und Ross überein, die erkannten, dass das Stratum corneum auch nach zweiwöchiger Wasserexposition bei 27°C intakt bleibt (Scheuplein und Ross 1970, Idson 1978). In einer weiteren Arbeit zeigten Menon und Elias, dass die Hydratation die Membranstruktur des Stratum corneum nicht zerstört (Menon und Elias 1997). Dementgegen stehen lediglich die Ergebnisse einer Arbeit von Warner et al., die Änderungen in der Lipidlamellenstruktur der Hornschicht nach Hydratation publizierten (Warner et al. 1999).

Die dünnen Stratum corneum-Membranen werden aus humaner Haut präpariert und einer geringen mechanischen Beanspruchung ausgesetzt (siehe 3.3.1).

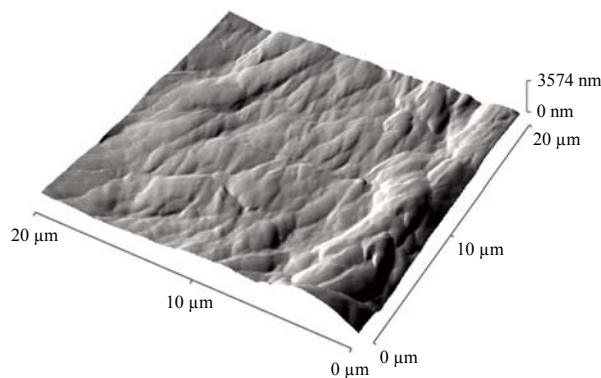


Abb. 45: AFM-spektroskopische Aufnahme der Oberfläche von isoliertem Stratum corneum

Abb. 45 zeigt das Ergebnis der AFM-spektroskopischen Charakterisierung der Oberfläche des isolierten, voll hydratisierten Stratum corneum und beweist ebenso, dass die isolierte Hautschicht keinerlei Defekte aufweist. Weiterhin demonstriert Abb. 45, dass die Stratum corneum-Membran, im Gegensatz zu den Silikon-PEG-Membranen (vergleiche 5.1.4), eine sehr raue Oberfläche mit Höhenunter-

schieden von bis zu ca. 3600 nm besitzt. Dies untermauert ebenfalls, dass sich die durchgeführten Diffusionsstudien an den Stratum corneum-Membranen nur exakt mit der entwickelten ATR-Diffusionszelle und nicht mit der herkömmlichen ATR-Anordnung verwirklichen lassen. Mit letzterer Anordnung lässt sich kein enger optischer Kontakt zwischen ATR-Kristall und der isolierten äußeren Hautschicht bewerkstelligen. Die Stratum corneum-Membranen können mit ihrer Oberfläche nicht vollständig auf dem Kristall aufliegen und die Unebenheiten der Oberfläche sind wesentlich größer als die Eindringtiefe des IR-Strahls (vergleiche Kapitel 2.5). Bei den hier durchgeführten Messungen mit der ATR-Diffusionszelle besitzt dagegen der wässrige Akzeptor einen optimalen, gleichmäßigen Kontakt zum Messkristall und zum Stratum corneum.

Zusätzlich wurde die Stabilität der wässrigen Harnstofflösung durch ATR-Messungen überprüft. Eine Veränderung in der Konzentration der Komponenten oder das Entstehen von eventuellen Zersetzungsprodukten hätte spektrale Veränderungen zur Ursache. Diese direkte Kontrolle von Stoffen auf Veränderungen ist ein weiterer Vorteil der ATR-Technik. Abb. 46 demonstriert, dass auch nach einer Lagerung bei 24°C über einen Zeitraum von zehn Wochen, der weit über die Dauer eines

Diffusionsexperimentes hinausgeht, keine detektierbare Änderung in der Zusammensetzung der wässrigen Harnstofflösung stattfand.

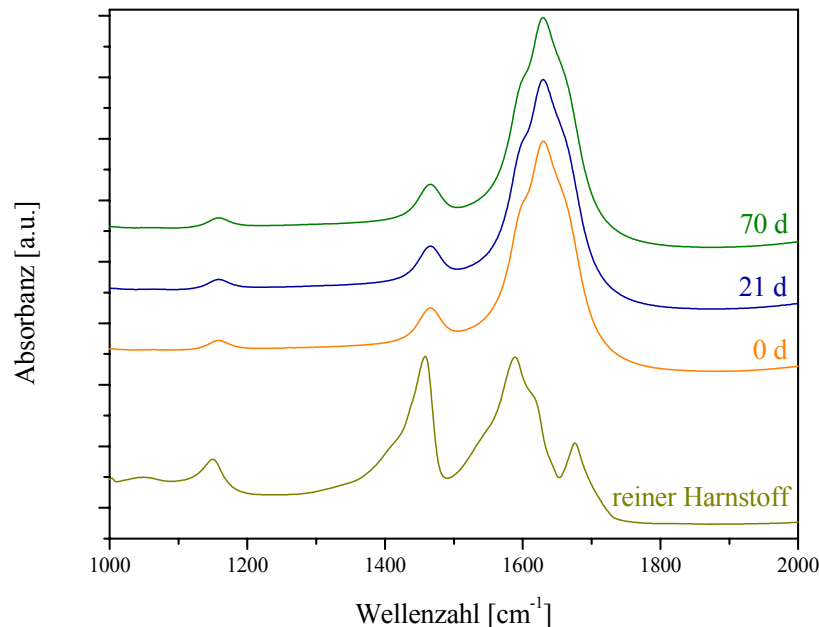


Abb. 46: ATR-Spektren einer 10%-igen wässrigen Harnstofflösung, frisch hergestellt (0 d) und nach verschiedenen Lagerzeiten. Zum Vergleich ist das Spektrum von reinem Harnstoff angegeben.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass mit der ATR-Diffusionszelle eine neue Methodik entwickelt wurde, mit der die Diffusion eines Arzneistoffes durch das Stratum corneum in Realzeit detektiert werden kann. Die bisher offene Fragestellung, wie schnell Harnstoff durch die äußere Hautschicht diffundiert, konnte mit Hilfe der ATR-Diffusionszelle durch die Detektion der Diffusion des für die dermale Applikation relevanten Arzneistoffs und die Berechnung des Diffusionskoeffizienten beantwortet werden.

7.4 Harnstoffdiffusion durch Rinderhufmembranen

Das Diffusionsverhalten von Harnstoff durch Rinderhufmembranen wurde ebenfalls mit Hilfe der ATR-Diffusionszelle charakterisiert. Rinderhufmembranen besitzen ähnliches Diffusionsverhalten wie humane Nagelplatten und dienen vielfach als Modell für diese (Mertin und Lippold 1997a, 1997b). Es stellte sich die Frage, inwieweit sich die Diffusionsgeschwindigkeiten eines hydrophilen Arzneistoffs in der Rinderhufmembran und im Stratum corneum unterscheiden. Bei den Rinderhufmembranexperimenten diente eine zehnprozentige Harnstofflösung als Donator. Die Verwendung der identischen Donator- und Akzeptorzusammensetzung für die Stratum corneum- und die

Rinderhufmembran-Experimente (siehe 7.3) erlaubt den direkten Vergleich zwischen der Diffusionsgeschwindigkeit dieses Arzneistoffmoleküls in beiden Geweben. Die Höhe der Diffusionsgeschwindigkeit für das Harnstoffmolekül ist ein direktes Indiz für die Barriereigenschaften der jeweiligen Membranen gegenüber diesem hydrophilen Arzneistoff.

Die Diffusion des Harnstoffs ist, wie auch bei den Stratum corneum-Experimenten (siehe 7.3), im Spektrum anhand des zeitlichen Zuwachses der C-N-Streckschwingung bei 1463 cm^{-1} sichtbar (Abb. 47).

Die Quantifizierung des Harnstoffgehaltes im wässrigen Akzeptor erfolgte mittels einer spektralen Kalibration (siehe 3.4). Jedem einzelnen Messpunkt ist der genaue Harnstoffgehalt zugeordnet. Abb. 48 demonstriert den zeitlichen Konzentrationsverlauf von den experimentell ermittelten und den Kurvenverlauf der durch die Anpassungsrechnung auf der Basis von Gleichung 4.2 (Kapitel 4) an diese Werte berechneten Daten.

Anhand des kongruenten Verlaufes zwischen den experimentell ermittelten und den berechneten Daten in Abb. 48 ist ersichtlich, dass die Diffusion des Harnstoffs durch die Rinderhufmembran mit der ATR-Diffusionszelle und dem mathematischen Modell treffend charakterisiert wird. Dies ist auch an den sehr geringen relativen Vertrauensintervallen der berechneten Diffusionskoeffizienten ersichtlich (Tabelle 8). Wie bereits bei den Stratum corneum-Membranen können gleichermaßen bei den Rinderhufmembranen Quellungseffekte und dadurch bedingte Schichtdickenänderungen ausgeschlossen werden, da die Gewebe bereits im vollhydratisierten Zustand eingesetzt wurden.

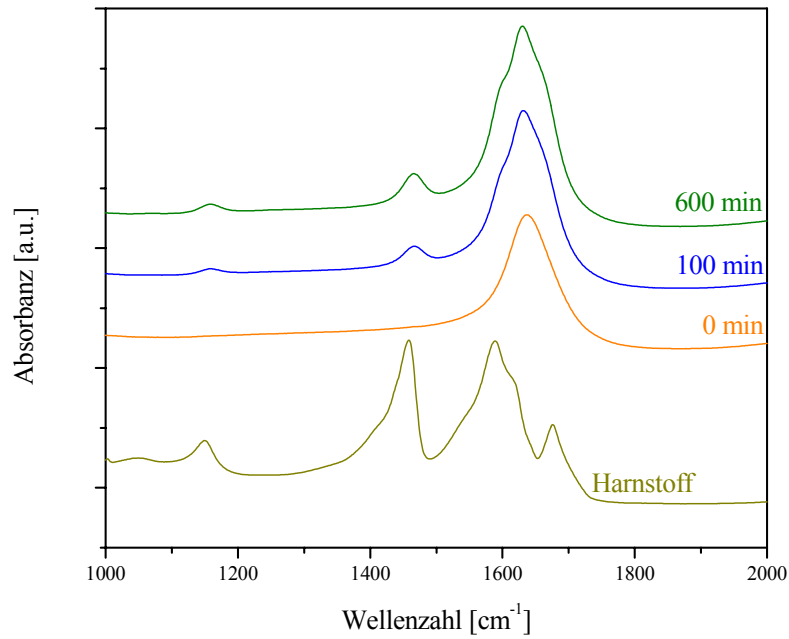


Abb. 47: ATR-Spektren des Systems Harnstoff/Rinderhufmembran/Wasser zu verschiedenen Zeiten des Diffusionsexperimentes. Zum Vergleich ist das Spektrum von reinem Harnstoff angegeben.

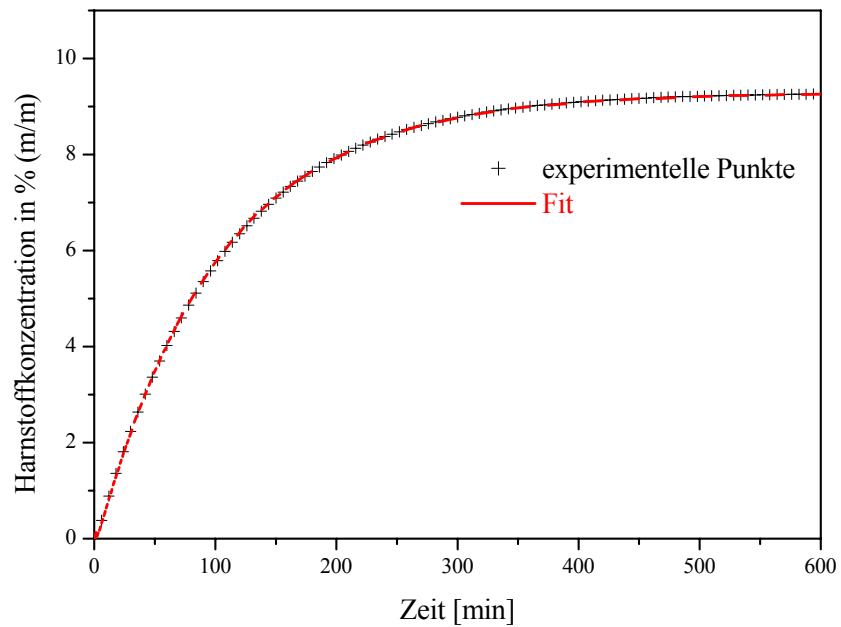


Abb. 48: Zunahme der Harnstoffkonzentration im Akzeptor während des Diffusionsexperimentes von Harnstoff durch eine Rinderhufmembran.

Die durch Anpassungsrechnung auf der Basis des mathematischen Modells (Kapitel 4) an den experimentellen Daten errechneten Diffusionskoeffizienten sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Werte der Rinderhufmembrandicke (vollhydratisiert), der ausgewerteten Messzeit und des Diffusionskoeffizienten für die Experimente der Harnstoffdiffusion durch Rinderhufmembranen mit der ATR-Diffusionszelle

Rinderhufmembran	Dicke (μm)	Messzeit (min)	$D_{\text{Harnstoff}}$ ($10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$)	relatives Vertrauensintervall in %
1	137 ± 9 (N=10)	600	$2,98 \pm 0,02$	0,67
2	139 ± 5 (N=10)	600	$2,95 \pm 0,02$	0,68
3	110 ± 4 (N=10)	600	$3,43 \pm 0,02$	0,58

Die Rinderhufe besitzen eine ausreichende Größe, sodass die verwendeten Rinderhufmembranen (Kapitel 3.3.2) aus einer Körperstelle des gleichen Individuums gewonnen werden konnten (siehe 3.3.2). Intra- und interindividuelle Schwankungen in den Gewebeeigenschaften entfallen folglich. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Membranen in Zusammensetzung und Aufbau und somit in ihren Barrieremerkmale einheitliche Eigenschaften besitzen. Hieraus resultieren die vergleichbaren Diffusionskoeffizienten der einzelnen Messungen. Aufgrund des nahezu übereinstimmenden Diffusionsverhaltens wurden auch die gleichen Messzeiten ausgewertet.

Die Geschwindigkeit der Harnstoffdiffusion ist in der Rinderhufmembran ca. 10^3 mal schneller als im humanen Stratum corneum (vergleiche 7.3). Vordergründig stand die Charakterisierung der Harnstoffdiffusion unter Einsatz der wässrigen Harnstofflösung in der Rinderhufmembran basierend auf der entwickelten ATR-Diffusionszelle. Nichtsdestoweniger sollen mögliche Erklärungen für die schnelle Diffusion der Substanz in der Rinderhufmembran im Vergleich zum Stratum corneum gegeben werden.

Rinderhufmembranen und humane Nägel verhalten sich wie hydrophile Gelmembranen, durch die ein Arzneistoff umso schneller diffundiert, je besser seine Wasserlöslichkeit ist (Mertin und Lippold 1997a, 1997b, Walters et al. 1983, 1985). Dies spricht für die schnelle Diffusion des Harnstoffs, der sich zu 52% (m/m) bei 32°C in Wasser löst (Scatchard et al. 1938). In einem zusätzlichen Experiment konnte mit der entwickelten ATR-Diffusionszelle am Beispiel des Amorolfinghydrochlorids gezeigt werden, dass ein wesentlich schlechter wasserlöslicher Arzneistoff als Harnstoff auch deutlich langsamer als dieser durch die Rinderhufmembran diffundiert. Amorolfinghydrochlorid ist nach Mertin und Lippold nur zu 0,995 % (m/m) bei 32°C in Wasser löslich (Mertin und Lippold 1997c). Hierbei handelt es sich um ein erstes durchgeführtes Experiment mit

diesem Arzneistoff, dessen Untersuchung nicht Gegenstand dieser Arbeit war. Eine erforderliche Bestätigung dieses ersten Ergebnisses war im Rahmen der durchgeführten Forschungen nicht realisierbar. Daher ist dieses Ergebnis im Anhang abgebildet. Frühere Arbeiten zeigen, dass sich Rinderhufmembranen als geeignetes *in vitro* Modell stellvertretend für humane Nagelplatten eignen (Mertin und Lippold 1997a, 1997b). Da die Permeabilitätscharakteristiken von beiden Barrieren ähnlich sind, wurden meist Untersuchungen mit Rinderhufmembranen durchgeführt (Mertin und Lippold 1997b). Diese sind vorteilhafter Weise im vollhydratisierten Zustand plan und lassen sich zudem in ausreichender Größe präparieren, um mit ihnen Diffusionsexperimente mit der entwickelten ATR-Diffusionszelle durchzuführen. Die Diffusionsgeschwindigkeiten von Arzneistoffen sind in den Rinderhufmembranen nochmals mindestens um den Faktor zehn gegenüber den humanen Nagelplatten erhöht (Mertin und Lippold 1997b). Hierfür werden die Ursachen in einem dichteren Netzwerk der Nagelkeratinmatrix und einem somit längeren Diffusionsweg der Stoffe gesehen (Mertin und Lippold 1997c). Die Struktur der Rinderhufmembran wird vereinfacht mit einem „Ziegelsteinwand“-Modell dargestellt (Mülling et al. 1999). Es beschreibt die ziegelsteinartige Anordnung der Hornzellen. Diese sind durch einen aus Lipiden und Glykoproteinen bestehenden so genannten Interzellularkitt, vergleichbar einer Art Mörtel in einer Mauer, verbunden (Mülling und Budras 1998). Rinderhufmembranen weisen, gleichartig wie humane Nägel, gemäß den Angaben von Mertin und Lippold, eine gegenüber dem Stratum corneum erhöhte Permeabilität für hydrophile Substanzen auf (Mertin und Lippold 1997a, c). Die in dieser Arbeit ermittelten deutlich höheren Diffusionsgeschwindigkeiten des Harnstoffs in der Rinderhufmembran im Vergleich zu denen im Stratum corneum (Kapitel 7.3) decken sich mit diesen Literaturaussagen. Der Wassergehalt vollhydratisierter Rinderhufmembranen ist mit 36% (m/m) nur wenig höher als der korrespondierende Wert in humanen Nägeln (27% (m/m)), (Mertin 1995, Mertin und Lippold 1997), jedoch geringer als vergleichbare Werte im humanen Stratum corneum, das über 50% (m/m) an Wasser aufnehmen kann (siehe 2.1.2). Für die deutlich erhöhte Permeabilität von Rinderhufmembranen gegenüber hydrophilen Stoffen, wie dem Harnstoffmolekül im Vergleich zum Stratum corneum, kann den Abweichungen in der Lipidzusammensetzung der Gewebe eine größere Bedeutung beigemessen werden als den Unterschieden im Wassergehalt (Helmdach et al. 2000). Die Lipidbiochemie humaner Nägel ist bisher im Gegensatz zur Haut nur gering, aber im Vergleich zu Rinderhufmembranen dennoch wesentlich besser untersucht. Mertin und Lippold zeigten ferner, dass sich humane Nägel und Rinderhufmembranen in ihrem Permeabilitätsverhalten und in ihrem Aufbau ähnlich verhalten (Mertin und Lippold 1997a, 1997b). Daher sollen entsprechende Literaturangaben von Nagelplatten zur Diskussion herangezogen werden. Die Lipide sind hauptsächlich für die Barrierefunktion sowohl von Haut als auch von Nägeln verantwortlich (siehe 1.2.1) (Gniedeck et al. 1998). Eine Delipidisierung der Nagelplatte führt zu einer Steigerung

der Penetrationsraten von Wasser und von verschiedenen kurzkettigen Alkoholen (Walters et al. 1985). Der Gesamtlipidgehalt humaner Nagelplatten wird in der Literatur mit etwa 1% angegeben (Mertin und Lippold 1997a, Walters und Flynn 1983) und ist somit deutlich geringer als der Lipidanteil im humanen Stratum corneum (15% (m/m)) (Kapitel 2.1.2). Andere Angaben erwähnen den Lipidgehalt der Nagelplatte beim Erwachsenen mit etwa 1-5% (Helmdach et al. 2000). Die Zusammensetzung der Nagellipide unterscheidet sich von den Lipiden der Hornschicht (vergleiche Kapitel 2.1.2) in ihrem verminderten Gehalt an Ceramiden (25%) und Cholesterol (14%) sowie in einem erhöhten Anteil an freien Fettsäuren (40%) (Helmdach et al. 2000). Diese Angaben von Helmdach et al. betreffen die Lipide von 11 bis 44-jährigen Erwachsenen. Bei Nägeln treten ebenfalls geringe Variationen im Gesamtgehalt und in der Zusammensetzung der Lipide in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht auf (Helmdach et al. 2000). Den Ceramiden, dem Cholesterol und den freien Fettsäuren wird eine entscheidende Bedeutung für die Permeabilitätsbarriere beigemessen (Elias 1996). Die exakte Rolle jeder einzelnen Klasse der gesamten Lipidmatrix an der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion ist dagegen ungeklärt (Helmdach et al. 2000). Helmdach et al. vermuteten jedoch bereits, dass die Permeabilitätseigenschaften der Nagelplatten nicht allein von der quantitativen Zusammensetzung der Lipidklassen abhängen (Helmdach et al. 2000). Demnach wird, wie auch beim Stratum corneum (siehe 1.2.1), dem Gesamtlipidgehalt eine größere Bedeutung für die Barriereeigenschaften zugeschrieben. Die niedrigen Barriereeigenschaften von Nagelplatten werden ebenfalls durch einen bis zu 1000fach schnelleren transcornealen Wasserverlust durch selbige im Vergleich zur äußeren Hautschicht bekräftigt (Helmdach et al. 2000, Walters et al. 1983). Die in dieser Arbeit mittels der entwickelten ATR-Diffusionszelle erhaltenen Ergebnisse für die Diffusionsgeschwindigkeit des hydrophilen Harnstoffmoleküls gehen mit diesen in der Literatur bereits für Wasser beschriebenen deutlichen Unterschieden in der Diffusionsgeschwindigkeit zwischen dem Stratum corneum und der Keratinmembran überein. Die für Harnstoff ermittelten Diffusionskoeffizienten liegen in der Rinderhufmembran etwa 1000fach höher als im Stratum corneum. Der Interzellularkitt in der Epidermis der Rinderklaue weist einen hohen Glykoproteingehalt auf (Mülling und Budras 1996). Die polare Natur der Glykoproteine lässt sich als weiterer begünstigender Faktor für die schnelle Passage des Harnstoffs ansehen. Mülling und Budras vermuteten bereits, dass die Glykolipide den Wasserdurchgang durch das Horn fördern.

Die dünnen Rinderhufmembranen wurden durch Mikrotomschnitte präpariert und somit einer mechanischen Beanspruchung ausgesetzt. Ergänzend zu den Diffusionsexperimenten sind, wie auch bei den anderen in dieser Arbeit verwendeten Membranen, von den Rinderhufmembranen dreidimensionale Oberflächenprofile mit Hilfe der AFM-Spektroskopie erstellt worden. Aufgrund dieser Ergebnisse kann nachgewiesen werden, dass die Hornmembranen keine Defekte besitzen, die einen

beschleunigten Stoffdurchgang durch diese Membran verursachen könnten (Abb. 49). Allerdings ist ersichtlich, dass die Rinderhufmembran eine sehr unebene, Vertiefungen bis knapp über 5 μm aufweisende Oberfläche besitzt.

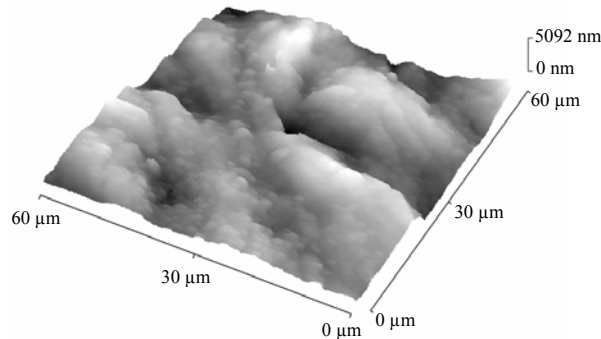


Abb. 49: AFM-spektroskopische Aufnahme der Oberfläche einer Rinderhufmembran

Auch hierin zeigt sich der Vorteil der ATR-Diffusionszelle, da sich mit ihr ebenfalls Diffusionsstudien an derartigen sehr rauen und oberflächlich stark strukturierten Membranen, im Gegensatz zur herkömmlichen ATR-Anordnung, unkompliziert gestalten. Durch den wässrigen Akzeptor besteht ein bestmöglicher Kontakt sowohl zum ATR-Kristall als auch zu der stark gegliederten Membranoberfläche. Mertin

und Lippold untersuchten die Oberfläche von Rinderhufmembranen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und stellten ebenfalls keine durchgängigen Poren fest (Mertin und Lippold 1997a).

Bisher durchgeführte Diffusionsstudien von Substanzen durch Rinderhufmembranen zur Ermittlung von Diffusionskoeffizienten erfolgten mit Hilfe von herkömmlichen Diffusionszellen. Diese Vorgehensweise ist jedoch aufwendiger und ungenauer als die ATR-Diffusionszelle, da in diesen Fällen die Diffusantenkonzentrationen im Akzeptor mit Hilfe von Referenzmethoden bestimmt werden müssen (siehe auch 7.1). Die in der Literatur angegebenen Diffusionskoeffizienten für verschiedene Substanzen in der Rinderhufmembran liegen in der Größenordnung von 10^{-7} bis $10^{-10} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ (Mertin und Lippold 1997a, 1997c). Dabei betreffen die höheren Diffusionsgeschwindigkeiten die besser wasserlöslichen Substanzen, da eine Substanz diesen Angaben zufolge umso schneller durch Rinderhufmembranen diffundiert, je besser seine Wasserlöslichkeit ist. Dies steht in Einklang mit der in dieser Arbeit ermittelten schnellen Diffusion des Harnstoffs (Tabelle 8). Die Ergebnisse zeigen die hervorragende Charakterisierung der Diffusion des hydrophilen Arzneistoffs Harnstoff durch die Rinderhufmembran mittels der entwickelten ATR-Diffusionszelle. Sie führen weiterhin zu dem Schluss, dass bei dem Einsatz von Modellmembranen für Diffusionsstudien hydrophiler Systeme auch die Möglichkeit der Einbeziehung der biologischen Rinderhufmembran nicht ausgeschlossen werden sollte. Da es sich hier, im Gegensatz zu künstlichen, nahezu unbegrenzt identisch herstellbaren Membranen, um eine biologische Membran handelt, müsste in diesem Fall jedoch die eventuelle Streuung der jeweiligen Diffusionskoeffizienten aufgrund interindividueller Unterschiede untersucht werden. An dieser Stelle ist ein Ansatz für weitere Arbeiten.