

**Nichtinvasive Diffusionsuntersuchungen wässriger
harnstoffhaltiger Systeme an künstlichen und biologischen
Membranen**



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dipl.-Pharm. Marcus Hartmann
geb. am 23.05.1975 in Rodewisch

Gutachter:

1. Prof. Reinhard Neubert
2. Prof. Siegfried Wartewich
3. Prof. Claudia Leopold

Halle (Saale), den 23.06.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009541

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009541>]

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Grundlagen	4
2.1 Die humane Haut.....	4
2.1.1 Allgemeiner anatomischer Aufbau	4
2.1.2 Das Stratum corneum.....	5
2.2 Harnstoff	9
2.3 Künstliche Membranen auf Silikonbasis	12
2.4 Rinderhufmembranen.....	14
2.5 FTIR-ATR-Spektroskopie für Penetrationsexperimente	15
3. Experimenteller Teil	19
3.1 Messmethoden	19
3.1.1 FTIR-ATR-spektroskopische Diffusionsexperimente	19
3.1.2 FTIR-ATR-Diffusionszelle.....	23
3.1.3 Rasterkraftmikroskopieaufnahmen	24
3.2 Verwendete Chemikalien.....	25
3.3 Präparation der Membranen.....	26
3.3.1 Stratum corneum	26
3.3.2 Rinderhufmembranen.....	28
3.3.3 Glycerol-Collodium-Membranen.....	29
3.3.4 Einarbeitung weiterer Füllstoffe in die Collodiummatrix	29
3.3.5 Silikon-Membranen	30
3.3.5.1 Einarbeitung verschiedener Füllstoffe in die Silikon-Membranen	30
3.3.5.2 Silikon-Polyethylenglykol-Membranen (Silikon-PEG-Membranen)	31
3.3.6 Schichtdickenbestimmung	31
3.4 Quantitative Auswertung der Spektren	31
4. Mathematisches Modell	39
5. Entwicklung und Auswahl einer Modellmembran	43
5.1 Wahl einer künstlichen Modellmembran.....	43
5.1.1 Füllstofffreie Polydimethylsiloxanmembran	49
5.1.2 Auswahl einer füllstoffhaltigen Polydimethylsiloxanmembran.....	50
5.1.3 Oberflächencharakterisierung der Silikon-PEG-Membran während der Diffusion einer wässrigen Harnstofflösung	52
5.1.4 AFM-spektroskopische Oberflächencharakterisierung der Silikon-PEG- Membran	57

6. Diffusionsexperimente mit der herkömmlichen FTIR-ATR-Anordnung	61
6.1 Wasserdiffusion durch eine Silikon-PEG-Membran	61
6.2 Deuteriumoxiddiffusion durch eine Silikon-PEG-Membran	65
7. Diffusionsexperimente mit der FTIR-ATR-Diffusionszelle	71
7.1 Entwicklung der FTIR-ATR-Diffusionszelle	71
7.2 Diffusion durch eine Silikon-PEG-Membran	77
7.3 Harnstoffdiffusion durch isoliertes Stratum corneum	81
7.4 Harnstoffdiffusion durch Rinderhufmembranen	89
8. Zusammenfassung und Ausblick	96
9. Literatur	99
10. Anhang	115

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

α_{ATR}	Einfallswinkel des Infrarotstrahls
AB	Absorption
Abb	Abbildung
AFM	Rasterkraftmikroskopie (<u>A</u> tomic <u>f</u> orce <u>m</u> icroscopy)
ATR	Abgeschwächte Totalreflexion (<u>A</u> ttenuated <u>t</u> otal <u>r</u> eflection)
β_A	Optischer Absorptionskoeffizient im Akzeptor
β_M	Optischer Absorptionskoeffizient in der Membran
c_W	Wirkstoffkonzentration
D	Diffusionskoeffizient
DAC	Deutscher Arzneimittel-Codex
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
d_p	Eindringtiefe des Infrarotstrahls (<u>D</u> e <u>p</u> th of <u>p</u> en <u>e</u> tration)
F	Diffusionsfluss an der Membranunterseite
FTIR	Fourier Transformation Infrarot
G	Grenzfläche
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie (<u>H</u> igh <u>p</u> ressure <u>l</u> iquid chromatography)
I	Intensität des Infrarotstrahls
I_0	Intensität des Einfallstrahls
IR	Infrarot
K	Akzeptorhöhe
L	Membrandicke
λ_{IR}	Wellenlänge des Infrarotstrahls
MSMS	Mehrschichtmembranmodellsystem
NBR	Nitrilbutyl-Gummi (<u>N</u> itrilo <u>b</u> utyl <u>r</u> ubber)
η	Brechungsindex
O/W	Öl in Wasser
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylenglykol
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch - European Pharmacopoeia
PPG	Polypropylenglykol
R^2	Korrelationskoeffizient
RMSECV	Wurzel des mittleren Fehlerquadrates der Kreuzvalidierung (<u>R</u> oot <u>m</u> ean <u>s</u> quare <u>e</u> rror of <u>c</u> ross <u>v</u> alidation)
SC	Stratum corneum
t	Zeit
u	Konzentration in der Membran

UV	Ultraviolett
ν	Konzentration im Akzeptor
W/O	Wasser in Öl
X	Wellenzahl
x	Weg

1. Einleitung

Die humane Haut besitzt neben ihrer Funktion als Grenzflächenorgan des menschlichen Organismus auch als Arzneistoffapplikationsort eine große Bedeutung (Barry 1983, Kydonieus et al. 2000, Franz und Lehman 2000). Eine dermale Anwendung eines Arzneistoffes erfolgt unter verschiedenen Intentionen. Der Arzneistoff soll entweder auf der Hautfläche verbleiben (epidermale Zubereitung), in die Haut oder tiefere Gewebe eindringen (endoderme und diaderme Zubereitung) oder mittels einer transdermalen Applikation eine systemische Wirkung entfalten (Lippold 1984). In allen Fällen ist die Kenntnis des Prozesses der Wirkstoffaufnahme durch die oberste Hautschicht entscheidend. Selbst bei epidermalen Zubereitungen ist dies zur Klärung der Fragestellung maßgeblich, ob ein Anteil der Substanz in den Organismus übergeht und unerwünschte Wirkungen verursacht. Arzneistoffe aus endodermen und diadermen Zubereitungen können ebenfalls bis in den systemischen Blutkreislauf gelangen. Hierbei stellt sich insbesondere im Hinblick auf Nebenwirkungen, neben dem Ausmaß der Arzneistoffresorption, die Frage, mit welcher Geschwindigkeit dies vor sich geht. Limitierend für die Aufnahme exogener Substanzen in die Haut ist das Stratum corneum (Winsor und Burch 1944), weshalb die Kenntnis von Diffusionskoeffizienten dermal applizierter Arzneistoffe in dieser Hautschicht enormes Interesse im Hinblick auf die Überwindung dieser Barriere besitzt. Seitens der Industrie ist, angeregt durch den Zuwachs der Bedeutung dermal applizierter Formulierungen, die Entwicklung und Optimierung entsprechender Arzneiformen von großem Interesse. Hierbei ist ein besseres Verständnis der Prozesse der Wirkstoffaufnahme durch die Haut, im speziellen die Kenntnis der Diffusionsgeschwindigkeiten von Arzneistoffen in der äußeren Hautschicht, wichtig. Diesbezügliche Erfahrungen sind zum Teil jedoch noch sehr unzureichend. Dies betrifft überraschender Weise auch das Diffusionsverhalten des topisch äußerst relevanten Arzneistoffes Harnstoff. An dieser Stelle geben Experimente Aufschluss über bisher offene Fragen.

Das Stratum corneum unterliegt hinsichtlich seiner komplexen Zusammensetzung und seiner Eigenschaften großen intra- und interindividuellen Schwankungen. Aus diesem Grund werden vielfach einfach zusammengesetzte künstliche Membranen eingesetzt, um Diffusionsprozesse zu simulieren. Künstliche Membranen eignen sich des Weiteren zur Entwicklung neuer Methodiken, da sie einheitlich aufgebaut sind und somit Permeabilitätsunterschiede, wie sie an der Haut auftreten, entfallen. Diese Membranen müssen nicht eine Kopie biologischer Membranen sein, sondern sollen Prinzipien der Teilprozesse biologischer Membranen, wie eine einfache Stoffdiffusion, widerspiegeln (Richter 1985). Bisher existiert eine Vielzahl künstlicher Akzeptormembranen für Penetrationsstudien lipophiler Substanzen. Gegenteilig verhält es sich mit Membranen zur Charakterisierung hydrophiler Diffusionsprozesse. Eine Akzeptormembran für die

Experimente in dieser Arbeit soll dabei stabil, einfach zusammengesetzt und für die Charakterisierung hydrophiler Diffusionsprozesse mit der ATR-Technik geeignet sein. Die zur Verfügung stehenden Membranmodelle sollen zunächst auf ihre Eignung zur Charakterisierung hydrophiler Diffusionsprozesse mit der ATR-Technik getestet und daraufhin das beste Membranmodell ausgewählt werden. Hierzu zählen die bereits mehrfach angewandte hydrophile Glycerol-Collodiummatrixmembran und das in dieser Arbeit entwickelte Membranmodell der Silikon-Polyethylenglykol (Silikon-PEG)-Membran.

Mit Hilfe eines entsprechenden mathematischen Modells besteht die Möglichkeit, den Diffusionskoeffizienten aus den experimentellen Daten zu berechnen. Der Diffusionskoeffizient ist ein direktes Maß, mit welchem sich die Geschwindigkeit des Arzneistoffdurchganges durch eine Membran quantifizieren lässt. Entsprechend können Diffusionsprozesse bei bekannten Parametern simuliert werden. Mit Hilfe eines mathematischen Modells lässt sich das Verhältnis zwischen lokaler und systemischer Wirkung einer topischen Formulierung abschätzen (Guy und Hadgraft 1984). Bisherige Methoden, wie die Franz-Zelle oder das Mehrschichtmembranmodellsystem (MSMS), lassen die Bestimmung notwendiger Parameter nur mit großem Aufwand zu. Mit diesen Verfahren ist nur eine begrenzte Anzahl an Messpunkten erfassbar, die auch erst nach Bestimmung des Diffusanten im Akzeptor mit Referenzmethoden erhalten werden und ferner ist die Genauigkeit der Methoden für das mathematische Modell unzureichend. Die Forschungstätigkeit in dieser Richtung intendiert dahin, bessere Methodiken zu entwickeln, mit denen sich Kinetiken an biologisch relevanten Membranen genau und einfach bestimmen lassen. Diesbezügliche Arbeiten sind jedoch nur mit modernen analytischen Verfahren zu bewerkstelligen. An dieser Stelle eröffnet die abgeschwächte Totalreflexion (ATR) - Spektroskopie neue Möglichkeiten (Barry et al. 1992). Diese nichtinvasive Methodik wurde bereits in mehreren Penetrationsuntersuchungen genutzt. Nur mit Hilfe der ATR-Spektroskopie kann ein Diffusionsprozess in Realzeit direkt detektiert, eine Vielzahl von Messpunkten in kurzer Zeit erfasst und ein Wirkstoffzuwachs im Akzeptor zeitgleich im Spektrum verfolgt werden. Jedoch weist auch die Franz-Zelle Vorteile gegenüber der Standard ATR-Technik auf. Hierzu zählen unter anderem ein gleichmäßig hydratisierter Zustand der Membran während eines Experimentes, ein konstanter vollständiger Kontakt zwischen dem flüssigen Akzeptorkompartiment und der unteren Membranoberfläche sowie ein gleichmäßiger Diffusionsstrom am unteren Membranrand.

Bei der ATR-Technik existieren ebenfalls mehrere Messanordnungen, einerseits die bisher für Penetrationsuntersuchungen verwendete ATR-Anordnung und andererseits die in dieser Arbeit neu entwickelte Methodik der ATR-Diffusionszelle. Mit beiden ATR-Techniken sollen Diffusionsexperimente durchgeführt, daraus Vor- und Nachteile analysiert und die Vorzüge der Entwicklung der ATR-Diffusionszelle aufgezeigt werden. Die Kombination beider Methoden, sowohl der herkömmlichen ATR-Technik

als auch der Diffusionszelle zu einem neuen Analyseverfahren, erhöht die Potenz der spektroskopischen Methode zur Charakterisierung von Diffusionsprozessen erheblich. Hierbei können auch verbesserte Aussagen zu Diffusionsprozessen in biologischen Membranen getroffen und somit auch pharmakokinetische Kenntnisse von Arzneistoffen erhöht werden.

Es ergeben sich schwerpunktmäßig folgende Aufgaben:

- Entwicklung einer ATR-Methodik für Diffusionsuntersuchungen mit verbesserten Eigenschaften gegenüber der bisherigen ATR-Technik.
- Entwicklung und Auswahl einer einfach zusammengesetzten, künstlichen Modellmembran für Diffusionsuntersuchungen mit der ATR-Technik
- Entwicklung eines mathematischen Modells zur Beschreibung der Wirkstoffdiffusion in Membranen
- Einsatz der Modelle zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten von Harnstoff im humanen Stratum corneum
- Aufzeigen weiterer Einsatzmöglichkeiten der ATR-Methodik anhand von Harnstoffdiffusionsuntersuchungen an biologischen Modellmembranen aus Rinderhuf. Vergleich der Diffusionsgeschwindigkeiten des hydrophilen Arzneistoffes in dieser Nagelmodellmembran und dem Stratum corneum.

2. Grundlagen

In Anbetracht der Zielstellungen und der Aufgaben dieser Arbeit sollen im Folgenden die wesentlich eingesetzten Materialien und Methoden erläutert und deren Relevanz für die durchgeführten Untersuchungen aufgezeigt werden.

2.1 Die humane Haut

Die Haut grenzt als lebenswichtiges Organ den Organismus schützend von seiner Umwelt ab. Mit einer Fläche von 1,5 – 2,0 m² beim Erwachsenen und einer Masse von etwa 7 bis 10 % des Körpergewichtes ist die Haut das größte Organ des Menschen (Franz und Lehman 2000, Odland 1991, Wohlrab 2001). Sie besitzt eine hochspezialisierte Schutzfunktion gegenüber der Außenwelt und prägt das individuelle Erscheinungsbild des Menschen wesentlich mit. Als Barriere steuert sie die Wasserabgabe, verhindert die Austrocknung und das Eindringen von Substanzen. Die Haut schützt den Menschen sowohl vor mechanischen und chemischen Einflüssen als auch vor schädigender UV-Strahlung. Des Weiteren reguliert sie die Wasserabgabe und den Wärmehaushalt. Sie besitzt Absonderungs- und Stoffwechselfunktionen. Die Haut weist eine Vielzahl von Temperatur- und Schmerzrezeptoren auf, über die sie thermische Reize, Berührungen und Schmerzen wahrnimmt. Sie besitzt einen sauren pH-Wert, der im Allgemeinen zwischen pH 5,0 und 6,0 liegt. Durch diesen Säureschutzmantel wirkt sie aktiv gegen das Eindringen fremder Keime (Marchioni und Hausknecht 1938). Diese vielfältigen Funktionen kennzeichnen die große Bedeutung der Haut für den Gesamtorganismus.

2.1.1 Allgemeiner anatomischer Aufbau

Durch einen komplexen, hoch organisierten und stark strukturierten Aufbau kann die Haut ihren vielfältigen Aufgaben Rechnung tragen.

Sie lässt sich histologisch in drei, jeweils weiter differenzierbare, Schichten gliedern (Abb. 1). Den äußeren Teil bildet die mehrschichtige, nicht durchblutete Epidermis (Oberhaut). Ihre Dicke kann zwischen 30 µm an den Augenlidern und 1,6 mm an den Hand- und Fußsohlen variieren. Sie besteht neben der bedeutendsten Zellart der Oberhaut, den Keratinozyten, weiterhin aus den für die Pigmentierung verantwortlichen Melanozyten, den zum Immunsystem gehörenden Langerhans-Zellen und den Merkel Zellen, bei denen eine Funktion als Mechanorezeptoren diskutiert wird (Franz und Lehman 2000, Wohlrab 2001).

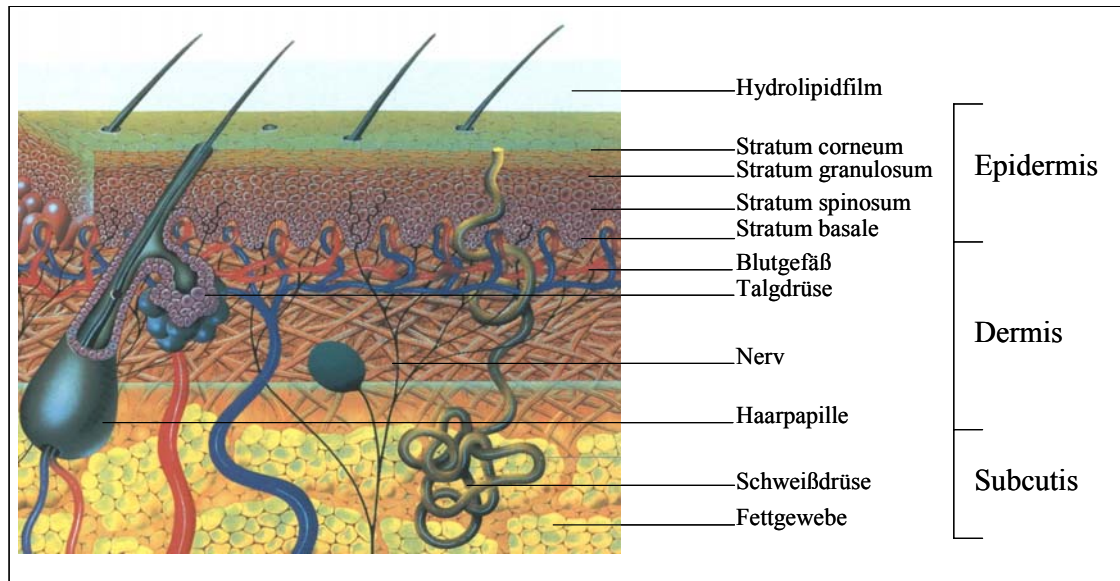


Abb. 1: Die menschliche Haut schematisch (modifiziert nach Hermal 1999)

Die Epidermis wird durch die Basalmembranzzone von der darunter befindlichen Dermis (Lederhaut, Corium) abgetrennt. Die Dermis ist eine bindegewebsreiche Schicht, welche hauptsächlich aus den Fibrinproteinen Kollagen und Elastin aufgebaut ist, die gemeinsam mit zellulären Bestandteilen in eine amorphe Grundsubstanz aus Mucopolysacchariden eingebettet sind. Die Dermis lässt sich in zwei Schichten unterteilen. Während die obere, dünnere Schicht, der Papillarbereich, aus zahlreichen Kapillargefäßen, Lymphräumen und Nervenfasern besteht, enthält die darunterliegende Schicht, das Stratum reticulare, das eigentliche Stütz- und Bindegewebe. Die perkutane Absorptionsrate von Stoffen kann ebenfalls durch die Blutzirkulation in der Haut beeinflusst werden, einerseits wenn die Substanzen gut durch das Stratum corneum permeieren oder andererseits, wenn die Haut verletzt und somit die Barriereeigenschaften vermindert sind (Riviere und Williams 1992). Zu den in der Dermis vorkommenden Zelltypen zählen Fibroblasten, Mastzellen, Histiozyten, Leukozyten und Lymphozyten. Die Subcutis (Unterhaut), welche ein lockeres Bindegewebe darstellt, in das Fettgewebe läppchenförmig eingelagert ist, schließt sich unter der Dermis an. Sie dient sowohl der Nährstoff- und Wasserspeicherung, als auch dem mechanischen- und Wärmeschutz.

2.1.2 Das Stratum corneum

Die größte Barrierefunktion besitzt das äußere Abschlussgewebe der Epidermis, das nichtlebende Stratum corneum (Franz und Lehman 2000). Es ist das Endprodukt des epidermalen Differenzierungsprozesses. Das so genannte „brick and mortar“-Modell dient vielfach der Veranschaulichung der Funktionsstruktur des Stratum corneum. Es

beschreibt die Anordnung der ziegelsteinartig in eine besonders zusammengesetzte Lipidmatrix eingebetteten Keratinozyten (Michaels et al. 1975).

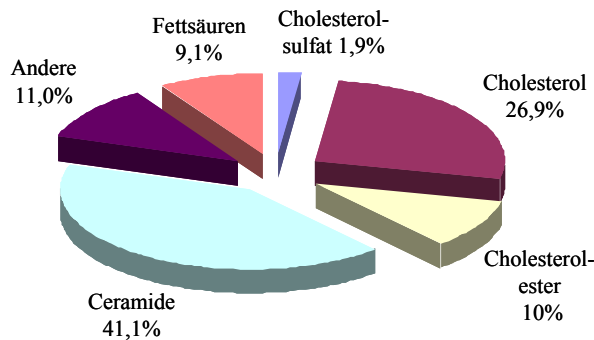


Abb. 2: Zusammensetzung der Lipide des humanen Stratum corneum (Wertz und Downing 1991)

Diese Lipidmatrix (Abb. 2) setzt sich aus Ceramiden, Cholesterol, Cholesterolestern und freien Fettsäuren zusammen (Downing et al. 1983). Besonders auffällig ist, im Unterschied zu anderen Biomembranen, die fast völlige Abwesenheit von Phospholipiden. Eine differenzierte Version des „Ziegelstein-Mörtel-Modells“ wurde 1994 von Forslind unter der

Bezeichnung „domain mosaic model“ vorgestellt, welches davon ausgeht, dass kristalline Domänen über Lipide flüssigkristalliner Phasen verbunden sind (Forslind 1994). Diesem Modell entsprechend erfolgen Diffusionsprozesse entlang fluider Domänen. Zwei weitere Modellvarianten wurden von Norlen bezüglich der Ausformung „membrane folding model“ und der Struktur und Funktion der Hautbarriere „single gel phase model“ vorgeschlagen (Norlen 2001 a,b).

Das Stratum corneum unterliegt einem ständig ablaufenden Erneuerungsprozess. Die Keratinozyten der Epidermis werden im Stratum basale gebildet und durchlaufen einen Differenzierungsprozess, bis sie als Hornzellen an der Hautoberfläche abgestriffen werden. Lateral und apikal sind die basalen Keratinozyten durch zahlreiche Desmosomen mit den Nachbarzellen verknüpft (Chambers und Renyi 1925). Des Weiteren wird der Zusammenhalt der Keratinozyten durch eine gegenseitige hakenartige Verzahnung der Zellen, die als so genannte „hook like structure“ bezeichnet wird, gefestigt (Wepf 2003). Die Zahl der Desmosomen nimmt zu den oberen Zellschichten des Stratum corneum hin ab. Dadurch wird die Festigkeit der Zellverbände geringer und die äußeren Zellen können leicht abgelöst werden. Der Zeitraum, bis eine Zelle vom Stratum granulosum bis an die Oberseite der Hornschicht wandert und abgestriffen wird, beträgt durchschnittlich 14 Tage (Franz und Lehman 2000, Rothberg et al. 1961). Die epidermale Lipidsynthese erfolgt im Stratum spinosum in so genannten „Odland-Körpern“. Diese befinden sich innerhalb der Zellen. Beim Übergang von der lebenden Epidermis zum Stratum corneum erfolgt die exozytotische Ausschleusung der Lipide der Odland-Körper in den Interzellularraum.

Die zwischen den in 15 bis 25 Zellschichten dicht angeordneten, kernlosen Hornzellen (Korneozyten) befindlichen Lipide nehmen nur etwa 15% der Gesamtmasse des Stratum corneum ein (Flynn 1985).

Die Lipidmatrix ist jedoch hauptsächlich für die Barrierefunktion des Stratum corneum, welches eine effektive Begrenzung sowohl für den Wasserverlust als auch für die

Penetration exogener Substanzen darstellt, verantwortlich (Blank 1952, Elias et al. 1982, Forslind et al. 1997, Golden 1987, Grubauer et al. 1992, Potts und Francoeur 1990, Williams und Elias 1987). Für die Barriereigenschaften der Hornschicht ist nicht ein einzelnes Hautlipid verantwortlich, sondern das noch nicht vollständig geklärte Zusammenspiel des vielgestaltigen Lipidsystems (Norlen et al. 1999). Die Lipide des Stratum corneum weisen eine inhomogene, tiefenabhängige Verteilung auf (Bommannan et al. 1990, Lampe et al. 1983).

Auf die Barrierehomöostase des Stratum corneum können zudem sowohl physiologischer als auch psychologischer Stress einen beeinträchtigenden Einfluss ausüben (Denda et al. 1989, 2000).

Die Hornschicht besitzt einen geringen Wassergehalt, welches eine Ursache für die besondere Barrierefunktion gegenüber hydrophilen Substanzen darstellt. Sie ist jedoch imstande, in wässriger Umgebung über 50% an Wasser aufzunehmen (Franz und Lehman 2000, Lippold 1984, Scheuplein und Morgan 1969).

Für die dermale Aufnahme von Arzneistoffen werden der interzelluläre, der transzelluläre und als Route über Hautanhangsgebilde, der transglanduläre und transfollikuläre Transportweg unterschieden. Die beiden letztgenannten Routen spielen aufgrund des geringen betragenden Oberflächenanteils von maximal 1% eine eher untergeordnete Rolle (Franz und Lehman 2000). Wiechers beschrieb den Anteil der Haarfollikel und Drüsen an der Gesamthautoberfläche sogar mit unter 0,1% (Wiechers 1989). Die An- oder Abwesenheit von Haarfollikeln und Drüsen beeinflusst den Angaben dieser Arbeit zufolge den Betrag der perkutanen Absorption nicht signifikant (Wiechers 1989). Seit längerem wurde angenommen, dass die Penetration von Substanzen durch das Stratum corneum hauptsächlich über eine inter- oder transzelluläre Route erfolgt (Michaels et al. 1975). Hydrophile, polare Moleküle diffundieren dieser Theorie zufolge über die transzelluläre Route alternierend durch Korneozyten und extrazelluläre Lipiddoppelschichten. Für Arzneistoffe mit lipophileren Eigenschaften wurde die Diffusion über die lipidreiche interzelluläre Route angenommen. Permeanten wurden in den interzellulären Domänen des Stratum corneum von Nemanic und Elias und Bodde et al. nachgewiesen (Nemanic und Elias 1980, Bodde et al. 1991). Der Diffusionsweg von Wasser durch das Stratum corneum ist um ein Vielfaches größer als die eigentliche Stratum corneum Dicke. Diese Feststellung unterstützt das Vorliegen einer interzellulären Route (Potts und Francoeur 1990, 1991). Demgegenüber stehen Untersuchungen, in denen der Diffusionsweg von 4-Cyanophenol durch das Stratum corneum bestimmt wurde. Die hierbei ermittelten Werte lagen viel näher an der Dicke der Hornschicht und warfen somit erneut die Frage nach der Relevanz einer transzellulären Penetration auf (Pellett et al. 1997). Diese Ergebnisse wurden jedoch später angezweifelt und hingegen dargestellt, dass Pellett et al. anhand ihrer Ergebnisse nicht eindeutig auf den Diffusionsweg im Stratum corneum schließen können (Bunge et al. 1999). Untersuchungen auf die Permeabilität von

Salicylsäure und Wasser durch das Stratum corneum zeigten, dass die Anzahl der Zellschichten nicht allein die Diffusionsgeschwindigkeit beeinflusst, sondern die Lipidzusammensetzung der Hornschicht einen entscheidenden Einfluss auf die Permeabilität besitzt (Elias et al. 1981).

Menon, Elias und Ghadially wiesen darauf hin, dass extrazelluläre dynamische Reservoirs, die als „lacunar domains“ bezeichnet werden, eine wichtige Penetrationsroute für exogene Substanzen darstellen und dass sowohl polare als auch unpolare Substanzen interzellulär durch das Stratum corneum diffundieren (Menon et al. 1994, Menon und Ghadially 1997). Auch weitere Untersuchungen gehen von einem interzellulär lokalisierten polaren Transportweg aus, wonach die polare Route wässrige Regionen enthält, welche von polaren Lipiden umgeben sind, die die Wände so genannter Mikrokanäle bilden (Sznitowska et al. 1998). Die Penetrationsrate polarer Moleküle ist sehr klein. Es wird angenommen, dass die Lipidbarriere des Stratum corneum zwei parallele Penetrationswege enthält, die lipoidale Route und den hydrophilen polaren Weg, welcher über einen noch nicht exakt bekannten Porenmechanismus verläuft (Hatanaka et al. 1994, Manabe et al. 2000, Peck et al. 1995, Sznitowska und Berner 1995, Tezel et al. 2003). Kürzlich postulierte Mitragotri ein Modell, in welchem er vier mögliche Routen des Arzneistofftransportes durch das Stratum corneum vorschlägt, um das Permeationsverhalten sowohl von lipophilen als auch von hydrophilen Stoffen zu beschreiben (Mitragotri 2003). Dabei wird zwischen einer freien Volumendiffusion durch Lipidbilayer, der lateralen Diffusion entlang der Lipidbilayer, einer Diffusion durch wässrige Poren und der Diffusion durch so genannte Shunt's unterschieden. Diese Theorie beinhaltet, dass hydrophile Substanzen durch vereinfacht als Poren beschriebene Fehlstellen in den Lipidbilayern diffundieren. Dies zeigt, dass über den genauen Mechanismus, wie Xenobiotika das Stratum corneum permeieren, vielfältig diskutiert wird. Vorherrschend wird jedoch die Auffassung einer dominierenden interzellulären Route vertreten. Für die topische Anwendung ist vielfach neben dem Ausmaß, die Geschwindigkeit des Arzneistoffes von Interesse, mit der dieser die äußere Hautschicht passiert. Aufgrund der komplexen Hautstruktur und der vielfältigen Diskussion über Diffusionswege für Arzneistoffe durch das Stratum corneum wird selbiges vereinfacht als eine Membran mit dazugehöriger Schichtdicke angesehen. Diese Annahme wurde bereits von Kalia et al. für Diffusionsuntersuchungen getätigt (Kalia et al. 2001). Von Interesse ist hierbei, wie schnell ein dermal applizierter Arzneistoff effektiv von der Oberseite des Stratum corneum zur Unterseite diffundiert. Die Diffusion durch diese Barriere soll mit einer hierfür entsprechend entwickelten spektroskopischen Methode nichtinvasiv in Realzeit charakterisiert werden.

2.2 Harnstoff

Harnstoff (Carbamid, Urea) zählt unter den Naturstoffen, die seit langem sowohl in der externen Therapie von Hauterkrankungen als auch zu kosmetischen Zwecken eingesetzt werden, zu den bekanntesten. Als Bestandteil des Urins ist die Anwendung zur Wundbehandlung seit vorchristlicher Zeit bekannt. Die zahlreichen auf dem Markt befindlichen harnstoffhaltigen Präparate sind ein Indiz für die Zunahme der vielfältigen Anwendung von Harnstoff in den letzten beiden Jahrzehnten. Die Substanz wurde durch die Beschreibung ihrer bakteriziden Wirkung und die Anwendung bei Wunden durch Symers und Kirk 1915 (Symers und Kirk 1915) sowie durch die von Robinson 1936 geschilderten wundreinigenden Effekte populär (Robinson 1936). Die lindernden und heilenden Eigenschaften von harnstoffhaltigen Cremes wurden 1943 von Rattner zur Behandlung des Handekzemes beschrieben (Rattner 1943). Durch die Einführung der Behandlung von Ichthyosis, atopischen Ekzem und Psoriasis mit 10%-igen harnstoffhaltigen Cremes regte 1968 Swanbeck eine breitere Anwendung der Substanz an (Swanbeck 1968). Die siebziger Jahre waren der Beginn einer intensiven Erforschung der Wirkung dermal applizierter harnstoffhaltiger Formulierungen von Wohlrab (Wohlrab und Schiepmann 1976). Für die Etablierung der Harnstoffanwendung in der modernen Dermatologie sind einige Aspekte von besonderer Bedeutung.

Harnstoff ist eine physiologische Substanz, die mit etwa einem Prozent in der menschlichen Haut enthalten ist. Die Herkunft in der Epidermis ist nur zum Teil bekannt. Von dieser Harnstoffgesamtmenge ist mit zwei Fünftel ein erheblicher Anteil im Schweiß enthalten (Fiedler 1977). Für den größten Teil des in der Epidermis enthaltenen Harnstoffes wird der Ursprung aus dem von Verhornungsprozessen begleiteten Eiweißabbau vermutet (Müller und Pflugshaupt 1989). Als Endprodukt des physiologischen Eiweißstoffwechsels unterliegt Harnstoff keiner weiteren Metabolisierung. Toxische Effekte und systemische Nebenwirkungen sind bei der topischen Anwendung von Harnstoff ebenso wie Photosensibilisierungs- bzw. Sensibilisierungsercheinungen nicht bekannt (Wohlrab 1992). In Einzelfällen wurde von einem kurzandauernden Brennen im Falle einer lokalen Applikation bei akutem und subakutem Ekzem, insbesondere bei der Kombination von Harnstoff mit Natriumchlorid, berichtet (Loden et al. 1999, Proksch 2000). Somit erweist sich Harnstoff als dermatologisch bewährtes, häufig angewandtes, atoxisches Pharmakon.

Insgesamt sind bei externer Applikation der Substanz mehrere Effekte bekannt, die die funktionelle und strukturelle Organisation der Haut beeinflussen können. Ein Befeuchtungseffekt der Hornschicht wird den so genannten „natural moisturizing factors“ zugeschrieben, zu denen neben weiteren Grundbestandteilen, wie Aminosäuren, Lactaten, 2-Pyrrolidon-5-carbonsäure und anorganischen Ionen, auch Harnstoff mit ca. 7% (m/m) zählt (Ziegenmeyer 1992). Sein hydrationssteigernder

Einfluss auf die Hornschicht prädestiniert Harnstoff dazu, in zahlreichen kosmetischen Formulierungen und in der Dermatologie therapeutisch zur Behandlung trockener Hautzustände eingesetzt zu werden (Bohnsack et al. 1997, Puschmann und Gogoll 1989, Wohlrab 1988, 1991a, 1992).

Diese Eigenschaft ist maßgeblich dafür verantwortlich, dass Harnstoff als Basistherapeutikum bei Ichthyosen eingesetzt wird (Schnyder 1989). Harnstoff führt in hohen Konzentrationen (20-40 % (m/m)) zur Proteinauflösung und Separierung der Zellen in der Hornschicht (Vanscheidt 1992, Proksch 2000). Aus diesem Grund kann die für solch hohe Konzentrationen nach Wohlrab (Wohlrab 2001) beschriebene keratoplastische Eigenschaft der Substanz beispielsweise zur Auflösung von Nagelplatten angewandt werden. Als Folge seiner keratoplastischen Wirkung wird Harnstoff auch als Arzneistoff bei Psoriasis zur Beeinflussung der Schuppenbildung an der Oberhaut, zur Quellung und Hornauflösung eingesetzt (Rohde 1989).

Eine Dezimierung der DNA-synthetisierenden Epidermiszellen unter Harnstoffeinfluss konnte sowohl im Tiermodell als auch an humaner Haut nachgewiesen werden (Wohlrab und Schiepmann 1976, Wohlrab 1992). Untersuchungen zur Ursache dieser proliferationshemmenden Wirkung ergaben nach lokaler Applikation am Meerschweinchenohr eine Epidermisverdünnung und eine Verminderung des ³H-Thymidinabbaus in die epidermale DNA. In späteren Studien wurde die Reduktion der epidermalen Hyperproliferation bereits bei einer 10%-igen harnstoffhaltigen Salbe bei Psoriasis belegt (Hagemann und Proksch 1996). Nach Zugabe zu Zellkulturen verursachte die antiproliferative Wirkung der Substanz einen verminderten Mitoseindex und infolge dessen ein vermindertes Wachstum der gesamten Zellpopulation (Glinos et al. 1983). Den Einfluss auf die epidermale Proliferation beschreibt Wohlrab zusammenfassend mit einer Epidermisverdünnung um circa 20%, einer Reduktion der DNA-synthetisierenden Zellen im Stratum basale um circa 45%, einer Verlängerung der Generationszeit der postmitotischen Epidermiszellen und einer Änderung im Regulationsmechanismus beim Eintritt in die DNA-Synthese oder deren Ablauf (Wohlrab 1992).

Für die Optimierung der therapeutischen Effektivität verschiedener Arzneistoffe gewinnt die penetrationsfördernde Eigenschaft von Harnstoff in Kombinationspräparaten zunehmend an Bedeutung. Diese Eigenschaft kann zum einem genutzt werden, um bei gleich bleibender Konzentration einer aktiven Substanz deren therapeutische Aktivität zu verbessern oder zum anderen, um eine gleiche therapeutische Effektivität bei deutlich geringerer Konzentration zu erreichen (Wohlrab 1984, Wohlrab 1991b). Als Ursachen für die penetrationssteigernde Wirkung von Harnstoff werden die durch Harnstoff verursachte Hydratationssteigerung der Hornschicht und seine keratoplastischen Eigenschaften diskutiert (Müller und Pflugshaupt 1989, Proksch 2000, Vanscheidt 1992, Wohlrab 1992). Folge dieser Eigenschaften sind Änderungen im strukturfunktionellen Zustand der Haut,

insbesondere der Hornschicht, die zu einer Verbesserung der Penetrationsbedingungen für viele Arzneistoffe führen. Für glucocorticoid- oder dithranolhaltige Dermatika konnte weiterhin auch eine Liberationssteigerung der Wirkstoffe aus der Grundlage durch Harnstoffzusatz nachgewiesen werden (Horsch et al. 1984, Wohlrab 1986, Wohlrab 1992).

Auf die antimikrobielle, vor allem antimykotische Aktivität von Harnstoff, die gegenüber anderen Antibiotika allerdings gering ausgeprägt ist, wurde ebenfalls wiederholt verwiesen (Necas und Svoboda 1973, Müller und Pflugshaupt 1989). Nolting empfahl Harnstoff als vielfach vernachlässigten Wirkstoff auf dem Gebiet der Mykologie für eine bessere und aussichtsreiche Therapie von Mykosen (Nolting 1989). Harnstoff besitzt juckreizlindernde Eigenschaften (Puschmann 1992, Swanbeck und Rajka 1970). Diese Wirkung ist ursächlich für den Erfolg der Neurodermitisbehandlung mit dieser Substanz (Swanbeck 1989).

Das unterschiedliche Verhalten der Substanz hinsichtlich der Anreicherung und des hydratationsfördernden Effektes im Stratum corneum wurde von Wohlrab bei der Applikation einer harnstoffhaltigen O/W- und einer W/O-Emulsion festgestellt (Wohlrab 1991). In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass diese Differenzen auch zwischen der Verabreichung einer wässrigen Lösung und einer O/W-Emulsion auftreten (Wohlrab und Hassler 1981). Die bisher durchgeführten Studien, bei denen zu wenigen Zeiten nach Applikation der Harnstoffgehalt in verschiedenen Hauttiefen bestimmt wurde, dienen dem vergleichenden Zweck verschiedener Formulierungen (Knorst 1997, Wohlrab 1984b, 1991b, 1992, Wohlrab und Hassler 1981).

Trotz der reichlichen Untersuchungen weist die Kenntnis über Harnstoff dennoch Lücken auf. Die Diffusion dieses relevanten, topischen Arzneistoffs durch humanes Stratum corneum ist bisher unbekannt.

In diesem Zusammenhang soll geklärt werden:

- wie schnell Harnstoff durch das Stratum corneum diffundiert,
- ob es demnach realisierbar ist, die pharmakokinetischen Kenntnisse der Substanz durch die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten zu verbessern, denn dieser Parameter kann als Anhaltspunkt für die Optimierung von topischen Formulierungen Anwendung finden,
- ist die Kinetik, im Gegensatz zu Experimenten mit der destruktiven tape-stripping Technik, durch Realzeitmessung detektierbar,
- und des Weiteren ob Harnstoff schnell oder langsam die Hornschicht permeiert.

Über Untersuchungen mit einer Permeationszelle über das Permeationsverhalten von Harnstoff an isolierter Maushaut unter Angabe eines Permeationskoeffizienten wird in der Literatur nur an einer Stelle berichtet (Ackermann et al. 1985). In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass im Falle der Maushaut nach Applikation einer wässrigen Harnstofflösung ca. 100 Stunden bis zum Erreichen eines Gleichgewichtes zwischen wässrigem Akzeptor und der Haut vergehen. Die Diffusion von Harnstoff am

humanen Stratum corneum wurde nach bisheriger Kenntnis nicht charakterisiert. Neben weiteren Untersuchungen, wie beispielsweise zum Wirkmechanismus der Substanz, kann somit ein Weg für weitere und verbesserte Einsatzmöglichkeiten des Harnstoffs eröffnet werden.

2.3 Künstliche Membranen auf Silikonbasis

Experimente mit Modellmembranen können keine vollkommene Imitation natürlicher, am Stratum corneum ablaufender Diffusionsvorgänge sein, sondern sollen dazu dienen, entsprechende Teilvorgänge in überschaubarer und reproduzierbarer Form darzustellen (Richter 1985).

Silikonmembranen werden bevorzugt in Modellen für die Arzneistoffpermeation eingesetzt, da sie sich gleichmäßig, reproduzierbar und kostengünstig herstellen lassen und ausreichend verfügbar sind. Sie sind chemisch und physikalisch definiert aufgebaut. Modellmembranen besitzen einen begrenzten Einsatzbereich, welcher hauptsächlich von der Lipophilie und der Molekülgröße der Diffusanten abhängt. Diese jeweils limitierten Anwendungsgebiete bedingen die Vielzahl von Membranmodellen für unterschiedliche Fragestellungen. Es sind mehrere einfach zusammengesetzte Modellmembranen für die Simulierung von Diffusionsprozessen lipophiler Arzneistoffe beschrieben. Weitaus weniger Membranmodelle existieren dagegen für die Anwendung hydrophiler Arzneistoffe.

Der Einsatz von Silikonmembranen ist für Arzneistoffpermeationsstudien weit verbreitet (Buraphacheep et al. 1994, Chow et al. 1984, Cross et al. 2001, Dias et al. 2001, Dias et al. 2004, Farinas et al. 1994, Gelotte et al. 1990, Hagen und Flynn 1987, Hatanaka et al. 1990, Horsch et al. 1981, Hou und Flynn 1997, Iervolino et al. 2000, Jetzer et al. 1986, Liang et al. 1985, Lippold et al. 1984, Maitani et al. 1996, McCarley und Bunge 2003, Moser et al. 2001, Patel et al. 1984, Pellett et al. 1997a, Raghavan et al. 2000, Reppel et al. 1978, Richter 1992, Richter und Nuhn 1989, Schwarb et al. 1999, Touitou und Lisette 1985, Walkow et al. 1987a und 1987b, Watkinson et al. 1995). Neben der häufigen Anwendung von Silikonmembranen wird in der Literatur der Einsatz weiterer Membranmodelle für Permeationsstudien beschrieben. Polydimethylsiloxan-Polycarbonat-Block-Copolymermembranen wurden für Permeationsuntersuchungen von verschiedenen lipophilen Arzneistoffen von Feldstein et al. eingesetzt (Feldstein et al. 1998). Hierbei konnten, im Gegensatz zu vielen anderen Studien, Ähnlichkeiten im Permeationsverhalten verschiedener Arzneistoffe zwischen der Membran und der humanen Haut festgestellt werden. Mit einem lipophilen Füllstoff beladene Collodiummatrixmembranen wurden ebenfalls für Arzneistoffpermeations- und -penetrationsuntersuchungen eingesetzt (Bendas 1993, Bendas et al. 1995, Fürst et al. 1980, Neubert und Wohlrab 1990, Neubert et al. 1991,

Neubert et al. 1995, Ritter et al. 1990). Für biopharmazeutische in vitro Untersuchungen kamen weiterhin Membranen aus Polyamid (Agren et al. 1974, Chattaraj et al. 1995, Phares et al. 1995, Walkow et al. 1987a), Polyhydroxyethylmethacrylat (p-HEMA) (Liang et al. 1985) sowie Methacrylatcopolymeren (Zentner et al. 1978), Polyethylen (Cross et al. 2001, Jiang et al. 1998, Lippold et al. 1984, Walkow et al. 1987) und Polyvinylpyrrolidon-Polyethylenglykol (Iordanski et al. 2000) zur Anwendung.

Cellulosen dienten ebenfalls bei Permeationsstudien als Matrices für Membranen (Fang et al. 1999, Fang et al. 2002, Liaw und Lin 2000, Julian und Zentner 1986, Shaker et al. 2000, Touitou und Lisette 1985, Walkow et al. 1987a, 1987b). Celluloseacetat wurde vielfach als hydrophile Membran (Barry und El Eini 1976, Barry und Brace 1977, Chattaraj et al. 1995, Chowdary et al. 1993, Dias et al. 1999, Farinha et al 2003, Müller und Kreuter 1999, Wang et al. 2002) verwendet. Diese hydrophilen Folien sind in der Regel porös und müssen vielfach mit Wasser vorbehandelt werden. Bei der Verwendung solcher Folien wurde von Horsch et al. geschildert, dass neben dem diffusiven Stoffübergang auch ein konvektiver Transport möglich ist (Horsch et al. 1981). Polymermembranen aus Polydimethylsiloxan-Hydroxyethylmethacrylat, die sowohl hydrophile als auch lipophile Domänen in ihrem Netzwerk enthielten, kamen ebenfalls für Arzneistoffpermeationsstudien zum Einsatz (Yamaguchi et al. 1997). Die mit den verschiedenen Membranmodellen durchgeführten Permeationsstudien erfolgten meist mit Hilfe von Diffusionszellen. Hierbei wird die Membranoberfläche vollständig durch die Flüssigkeit der Donatorkammer bedeckt. Im Falle der Durchführung von Diffusionsuntersuchungen mit der herkömmlichen ATR-Spektroskopie liegt dagegen die Membran auf einem plan polierten ATR-Kristall auf. Für die Auswahl einer Membran für Permeationsstudien mit der Standard ATR-Spektroskopie muss demzufolge auch berücksichtigt werden, dass diese Membranen eine glatte Oberfläche aufweisen und sich in guten Kontakt zum ATR-Kristall bringen lassen. Silikonmembranen haben sich hierfür bereits als geeignet erwiesen und wurden für Penetrationsuntersuchungen mithilfe der ATR-Technik eingesetzt (Dias et al. 2001, 2004, McCarley und Bunge 2003, Moser et al. 2001, Pellet et al. 1997a).

Der Stoffdurchgang durch Silikonpolymere wurde von Horsch et al. als ausschließlicher Diffusionsprozess beschrieben (Horsch et al. 1981). Für die Verwendung von Silikonem als Membranmaterial sprechen auch deren hervorragende physikalische und chemische Eigenschaften, wie ihre chemische Resistenz und ihre gute Temperaturbeständigkeit (Bien 1975, Noll 1968, Richter 1985). Die nachgewiesene physiologische Unbedenklichkeit führte bereits zu einem breiten Einsatz dieser Substanzen auf pharmazeutischem und medizinischem Gebiet.

Die Anwendung von Silikonmembranen zur Verfolgung der Arzneistoffpermeation geht auf Garret und Chemburkar zurück (Garret und Chemburkar 1968, 1968a, 1968b). Diese bis zu 250 μm dicken Membranen wurden durch Heißvulkanisation gefertigt. Sie enthielten bis zu 30% Siliziumdioxid zur Erhöhung der mechanischen Stabilität. Neben

der hohen Dicke wirkte sich jedoch auch der Füllstoffanteil aufgrund seiner adsorptiven Eigenschaften nachteilig auf die Permeationsmessungen aus (Flynn und Rosemann 1971, Nakano et al. 1979). Die in dieser Arbeit verwendeten Silikon-Membranen wurden nach dem Prinzip der Kaltvulkanisation hergestellt, welches eine unkomplizierte Anfertigung der Membranen ermöglicht. Dieses Verfahren wurde von Richter und Reppel zur Herstellung stabiler Silikon-Membranen für Permeationsstudien beschrieben (Reppel et al. 1978, Richter 1985, Richter et al. 1978). Die Membranen enthalten als Matrix einen Polydimethylsiloxankautschuk, der bereits bei Raumtemperatur durch einen geeigneten Vernetzer in Elastomere überführt wird. Da sich das System während der Vernetzung im gelösten Zustand befindet, sind eine einfache, gleichmäßige Verteilung der Komponenten und eine genaue Dosierung erreichbar. Auf dieser Grundlage erfolgte bereits in das sich ausbildende Netzwerk die Einarbeitung von Füllstoffen, wie Phospholipiden, Laurylalkohol, Linolsäure und Arachidonsäure (Richter 1985).

2.4 Rinderhufmembranen

Neben der Haut stellen ebenfalls Nägel, wenn auch mit deutlich geringerer Oberfläche, einen topischen Anwendungsort für Arzneistoffe dar. Vielfach werden Arzneistoffe zur lokalen Therapie von Mykosen auf diesem Weg appliziert (Franz 1992, Haria und Bryson 1995, Nolting und Seebacher 1993, Polak und Zaug 1990, Quadripur et al. 1981). Die Durchführung von Diffusionsstudien an Rinderhufmembranen wurde durch mehrere Gesichtspunkte angeregt. Zum einen sind humane Nägel meist nicht ausreichend erhältlich. Gesunde menschliche Nägel stehen nicht auf die gleiche Art und Weise zur Verfügung, wie die verwendeten Hautproben, die aus ohnehin durchgeführten Reduktionsplastiken stammten (siehe 3.1). Rinderhufe lassen sich indessen in größerer Anzahl erwerben. Es handelt sich dabei um Material, welches nach Schlachtungen überdies meist verworfen wird. Zum anderen stehen bei Rinderhufen im Vergleich zu humanen Nägeln größere Mengen Hornmaterial zur Verfügung. Die Nagelplatte besitzt hinsichtlich ihrer Diffusibilität einen vielmehr hydrophilen und weniger lipophilen Membrancharakter (Mertin und Lippold 1997a, 1997b, Walters et al 1983, 1985). Rinderhufmembranen sowie humane Nagelplatten verhalten sich wie hydrophile Gelmembranen (Walters et al. 1985). Während im Falle einer lipophilen Verteilungsmembran der maximale Flux von der Wirkstofflöslichkeit im Vehikel und dem Verteilungskoeffizienten abhängig ist, nimmt er im Falle einer hydrophilen Gelmembran mit steigender Wasserlöslichkeit zu (Mertin und Lippold 1997a). Somit stellte sich die Frage, ob die Rinderhufmembranen als natürliche, hydrophile Membranen für Diffusionsstudien mit der ATR-Zelle verwendbar sind. Die Versuchsanordnung der Diffusionsexperimente an den Rinderhufmembranen erfolgte in

Analogie zu den Stratum corneum Experimenten (siehe auch Kapitel 7.3). Als Membran fungierte hier lediglich eine voll hydratisierte Rinderhufmembran.

2.5 FTIR-ATR-Spektroskopie für Penetrationsexperimente

Bei diesem speziellen Messverfahren der Infrarotspektroskopie wird das Phänomen der Totalreflexion genutzt, um IR-Spektren aus dem Oberflächenbereich einer Probe aufzunehmen. Totalreflexion tritt auf, wenn der IR-Strahl in einem Medium mit hohem Brechungsindex n_1 schräg auf die Grenzfläche zu einem optisch dünneren Medium n_2 trifft und dabei der Einfallswinkel α_{ATR} den Grenzwinkel der Totalreflexion θ_G , definiert durch $\sin \theta_G = n_2/n_1$, übersteigt (Mirabella et al. 1985). Jedoch dringt ein Teil der Strahlung in das optisch dünnere Medium ein und wird geringfügig versetzt. Es ergeben sich ähnliche spektrale Abhängigkeiten wie bei Transmissionsspektren, wenn die ins optisch dünnere Medium eingedrungene Strahlung absorbiert wird. Diese Spektren werden als ATR-Spektren bezeichnet. Das optisch dichtere Medium ist ein entsprechend geschliffener ATR-Kristall, während es sich bei dem optisch dünneren Medium um die zu untersuchende Probe handelt (Abb. 3).

Die Eindringtiefe in die Probe variiert im Bereich von 1,4 bis 2,8 μm in Abhängigkeit von der Wellenlänge, dem Einfallswinkel des total reflektierten Strahles und von dem Brechungsindex sowohl des Kristalls als auch der Probe (Günzler und Heise 1996, Lu et al. 1998).

Die Abhängigkeit der Eindringtiefe d_p lässt sich durch folgende Gleichung darstellen:

$$d_p = \frac{\lambda_{IR}}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2 \alpha_{ATR} - (n_2/n_1)^2}} \quad 2.4.1$$

Dabei ist λ_{IR} die Wellenlänge des IR-Strahles, α_{ATR} der Einfallswinkel, n_1 , n_2 sind die Brechungsindices der beiden Medien und d_p ist die Eindringtiefe (Abb. 3).

In vielen ATR-Messeinheiten wird ein Kristall aus Zinkselenid (ZnSe) mit einem Einfallswinkel von 45° oder 60° verwendet. ZnSe ist relativ kostengünstig, hat einen hohen Brechungsindex ($n=2,4$) und besitzt im Spektralbereich zwischen 650 cm^{-1} und 4000 cm^{-1} keine Eigenabsorption. Dieser Spektralbereich ist für die meisten Stoffe und für biologische Systeme besonders relevant. Aufgrund dieser Eigenschaften besitzt ZnSe ein breites Anwendungsspektrum und ist besonders gut für Untersuchungen an biologischen Systemen geeignet. Neben ZnSe werden als gebräuchliche Materialien für ATR-Kristalle Germanium, Diamant, Silikon und Thallium Bromid-Jodid (KRS-5) verwendet (Wilks 1993).

Für die meisten biologischen Systeme ist die Eindringtiefe des IR-Strahls im mittleren Infrarotbereich kleiner als 1,5 μm (van Lucassen et al. 1998).

Die ATR-Technik wurde mit der „tape stripping“ Methode kombiniert, um Konzentrationsprofile im SC zu analysieren (Bodde et al. 1996, Higo et al. 1993, Stinchcomb et al. 1999). Mit dieser Methodik wurden Hautveränderungen nach Chemikalienkontakt analysiert (Mak et al. 1990).

In mehreren Untersuchungen diente die ATR-Technik zur Untersuchung der Hydratation von Hautoberflächen (Branagan et al. 2000, Brancaleon et al. 2000, Brancaleon et al. 2001, van Lucassen et al. 1998, Potts et al. 1985).

Da aufgrund der geringen Eindringtiefe des Infrarotstrahles in die Probe Spektren aus dem Oberflächenbereich einer Probe detektiert werden, ist ein enger optischer Kontakt zwischen Kristall und Probe erforderlich. Vielfach ist der Kontakt zwischen ATR-Kristall und Probe schwierig zu kontrollieren. Dies ist der Fall, wenn es sich bei der Probe nicht um flüssige oder halb feste Medien, sondern um Membranen oder andere feste Proben handelt. Geringe Änderungen während des Experimentes im Probe/Kristall-Kontakt können durch Normierung auf eine unbeeinflusste Membranbande korrigiert werden. Diese Membranbande dient somit als interner Standard (Mirabella et al. 1985, Farinas et al. 1994).

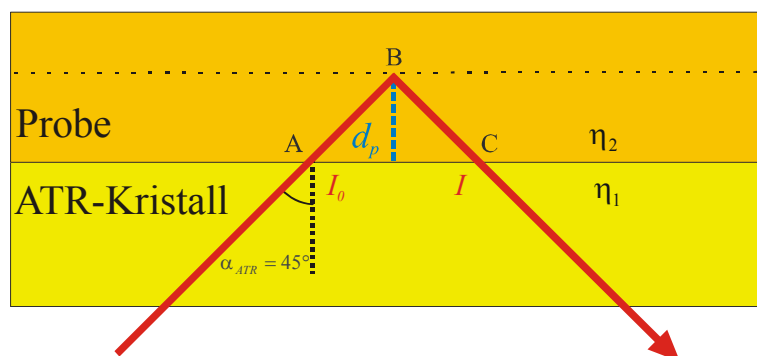


Abb. 3: Prinzip der ATR-Messtechnik

Der Weg d_{ATR} , den die Strahlung in der Probe bei einem Einfallswinkel von 45° zurücklegt, wird aus der Eindringtiefe d_p berechnet:

$$d_{ATR} = AB + BC = 2\sqrt{2d_p} \quad 2.4.2$$

Für eine quantitative Auswertung der Spektraldaten wird das Lambert-Beersche Gesetz angewandt (Schmidt 1994).

Für einen wirkstoffhaltigen Akzeptor gilt:

$$I = I_0 \quad \text{für } x = 0,$$

$$\frac{\partial I}{\partial x} = -\beta_A I \quad \text{für } 0 < x < d_{ATR}.$$

Dabei ist I die Intensität des IR-Strahles im Akzeptor und I_0 die Intensität des Einfallstrahls. Der optische Absorptionskoeffizient des wirkstoffhaltigen Akzeptors wird durch β_A beschrieben. Dieser ist wiederum von der Wirkstoffkonzentration c_W abhängig.

$$\beta_A = \beta_M + \varepsilon_W c_W,$$

hierin ist β_M der Absorptionskoeffizient des wirkstofffreien Akzeptors und ε_W der Extinktionskoeffizient des Diffusanten im Akzeptor. Wenn in einem Bereich das Akzeptormedium keine IR-Absorption besitzt, d.h. $\beta_M = 0$ ist, ist der Absorptionskoeffizient des Akzeptors β_A direkt proportional zur Wirkstoffkonzentration c_W .

Bei der Entwicklung topischer Arzneiformen ist ein wesentlicher Schritt, das Penetrations- bzw. Permeationsverhalten der wirksamen Bestandteile zu charakterisieren. Viele angewandte Methoden besitzen den Nachteil, die Wirkstoffkonzentration in einem Akzeptor nicht in Realzeit, sondern erst nach Beendigung des Experimentes zu bestimmen. Die Donatorformulierung wird vom Akzeptor entfernt und der Wirkstoff aus dem Akzeptor extrahiert. Des Weiteren erfolgt die Bestimmung der Akzeptorkonzentration nicht direkt, sondern mit Alternativmethoden, wie HPLC, GC oder HPLC-MS (Chattaraj et al 1995, Fürst et al. 1987, Reifenrath et al. 1994). Infolge einer verbleibenden Restmenge Donator und dem zusätzlichen Extraktionsschritt ist ein systematischer Messfehler kaum vermeidbar. Vielfach ist die Menge des Diffusanten im Donator und Akzeptor gering. Dies erschwert zusätzlich die Bestimmung des Gehaltes mit den genannten Methoden. In einigen Fällen kamen radioaktiv markierte Substanzen zum Einsatz (Cornwell und Barry 1994, Schaefer et al. 1978). Die Anwendung dieser Methode wird jedoch durch die Anzahl verfügbarer radioaktiv markierter Arzneistoffe auf wenige Substanzen begrenzt.

Mit den meisten Methoden ist keine durchgängige Realzeitmessung möglich. Die Erstellung eines Konzentrations-Zeit-Profiles ist aufwendig, da für jeden Messzeitpunkt ein Experiment notwendig ist. Im Gegensatz dazu können mit den nichtinvasiven Messmethoden, wie der ATR-Technologie, die zeitabhängigen Wirkstoffkonzentrationszunahmen während eines Penetrations- oder Diffusionsexperimentes relativ einfach in Realzeit detektiert werden.

Die Extinktion einer Diffusantenbande kann als normierte Konzentration aufgetragen werden, unter der Voraussetzung, dass die Fremdmolekülenkonzentration während des

gesamten Messzeitraumes im Detektionsbereich der Grenzflächenwelle viel kleiner ist, als die Konzentration der Gastmoleküle (Akzeptormoleküle). Unter dieser Bedingung müssen die Konzentrationen nicht mit Alternativmethoden bestimmt werden (Brandt 1985, Brandt und Hemmelmann 1986).

Aus diesem Grunde kamen spektroskopische Methoden, wie die ATR-Spektroskopie, immer häufiger bei Penetrationsuntersuchungen an künstlichen Membranen zum Einsatz (Cantor 1999, Dias et al. 2001, 2004, Farinas et al. 1994, Harrison et al. 1996, Nardviriyakul et al. 1996, Pellett et al. 1997a, Sammon et al. 2000, Wurster et al. 1993). Die ATR-Spektroskopie wurde auch genutzt, um Wechselwirkungen zwischen Wasser und Polymer während der Wasserdiffusion in Polypropylenfilme zu charakterisieren (Shen und Wu 2003). Des Weiteren wurden auch Penetrationsstudien am Stratum corneum mit Hilfe der ATR-Spektroskopie durchgeführt (Grewal et al. 1998, Harrison et al. 1996, Pellett et al. 1997b). Bei diesem Verfahren erübrigen sich Schritte zur Trennung des Donators und des Akzeptors sowie Maßnahmen zur Wirkstoffextraktion aus dem Akzeptor während des Experimentes. Dadurch wird der systematische Fehler verringert.

IR-Spektren sind substanzspezifisch. Sie weisen typische Absorptionsbanden auf und können somit als Fingerabdruck eines Stoffes angesehen werden. Aus diesem Grund ist es mit der FTIR-ATR-Spektroskopie möglich, neben der Detektion eines Diffusanten, zeitgleich weitere Veränderungen über einen breiten spektralen Bereich zu verfolgen (Günzler und Heise 2002).

Da zwischen Veränderungen in der Lage und der Intensität von Absorptionsbanden und strukturellen Modifikationen im Akzeptor ein enger Zusammenhang besteht, kann in einigen Fällen die Strukturänderung im Akzeptor während eines Diffusionsexperimentes verfolgt werden (Margarida et al. 1995). Die Änderung der SC-Struktur aufgrund eines Enhancereinflusses wurde in mehreren Untersuchungen mit Hilfe der FTIR-ATR-Spektroskopie charakterisiert (Clancy et al. 1994, Dias et al. 2001, Mak et al. 1990, Takeuchi et al. 1993, Yokomizo 1996, Yokomizo 1997).

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 Probenscans	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.

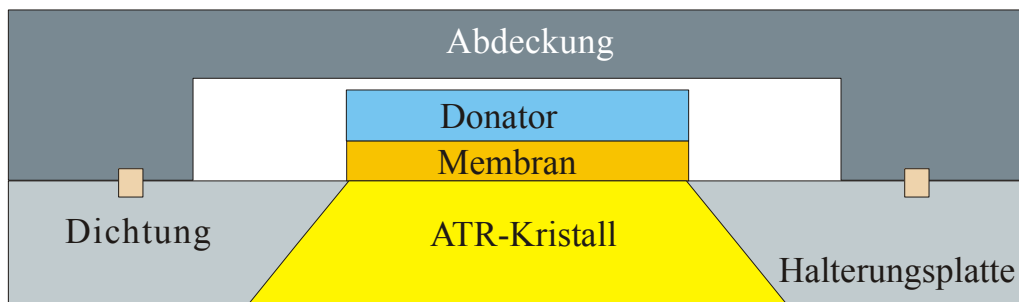


Abb. 4: Aufbau der horizontalen Standard-ATR-Einheit

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).

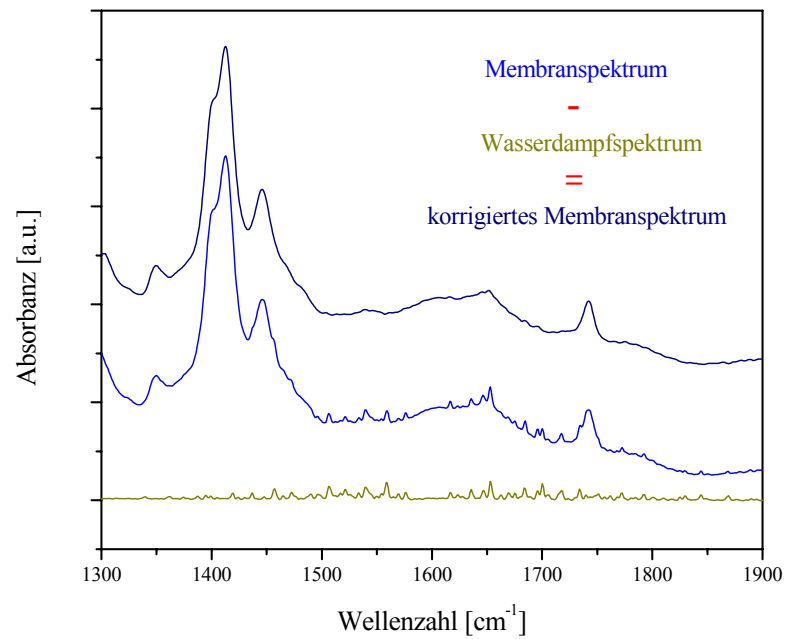


Abb. 5: Entfernung der durch Wasserdampf verursachten Störungen im Diffusionsexperiment von Wasser aus einer wässrigen Harnstofflösung durch eine Silicon-PEG-Membran

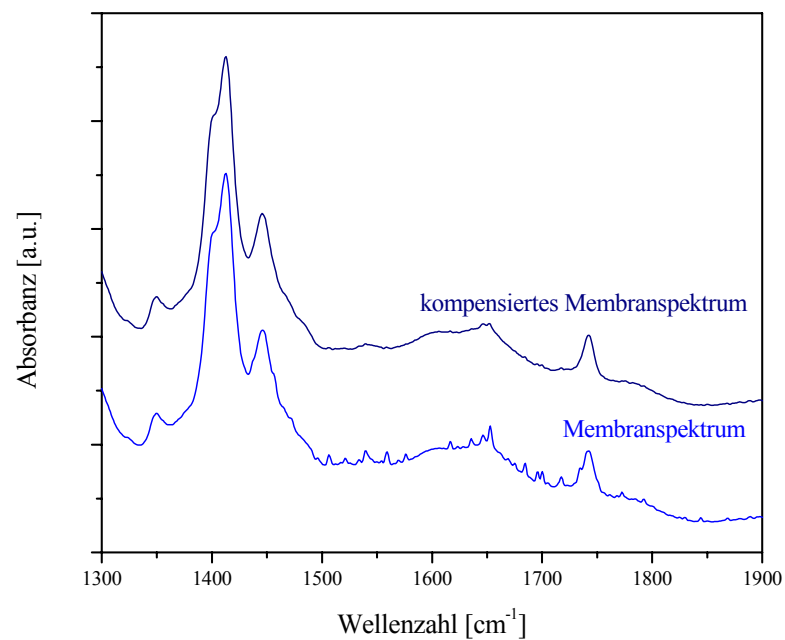


Abb. 6: Entfernung der durch Wasserdampf verursachten Störungen im Diffusionsexperiment von Wasser aus einer wässrigen Harnstofflösung durch eine Silicon-PEG-Membran mit dem ab Mitte 2003 zur Verfügung stehenden Algorithmus der atmosphärischen Kompensation der OPUS Software

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.

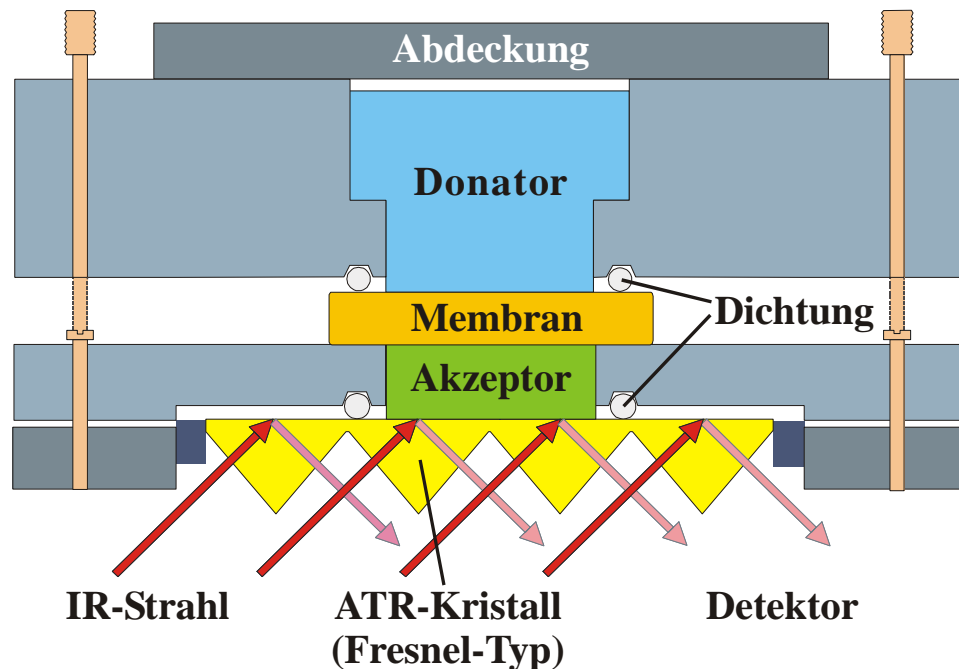


Abb. 7: Aufbau der ATR-Diffusionszelle

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 Donatorkammer 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	Teilen	Trennung von	Teilen	Trennung von	Teilen
	Fett und Dermis mittels mechanischer Präparation		Fett und Dermis mittels mechanischer Präparation		Fett und Dermis mittels mechanischer 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- rurgie (Mamma- reduktion)	Chi- rurgie (Mamma- reduktion)	Plastische Chi- rurgie (Mamma- reduktion)	Chi- rurgie (Mamma- reduktion)	Plastische Chi- rurgie (Mamma- reduktion)	Chi- 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).

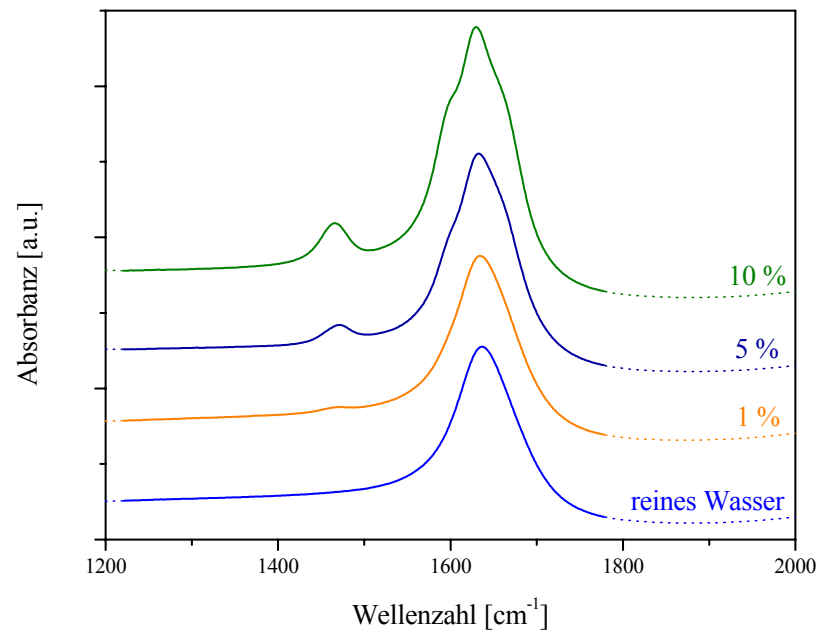


Abb. 8: Spektralbereich zur Kalibrierung bei den Diffusionsexperimenten (durchgehende Linie) von Harnstoff durch Stratum corneum und durch Rinderhufmembranen mit der ATR-Diffusionszelle. Von den Kalibrationspektren sind auszugsweise reines Wasser und wässrige Lösungen mit 1%, 5% und 10% Harnstoff abgebildet.

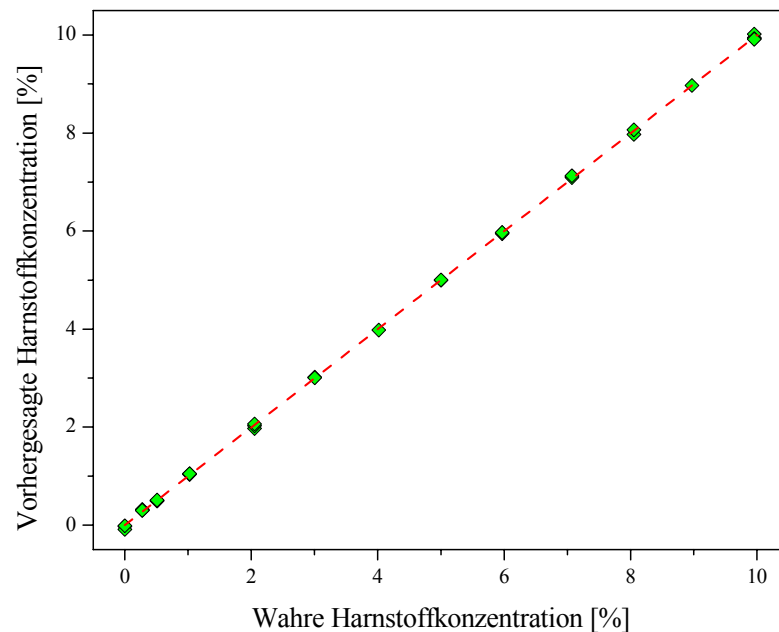


Abb. 9: Validierungstest für die Kalibrierung der Diffusionsexperimente von Harnstoff durch Stratum corneum- und Rinderhufmembranen. Gegenüberstellung der vorhergesagten und der wahren Harnstoffkonzentration in % (m/m) aus einer Mischung aus Harnstoff und Wasser; RMSECV = 0,0347, Rang 4, $R^2=99,99$

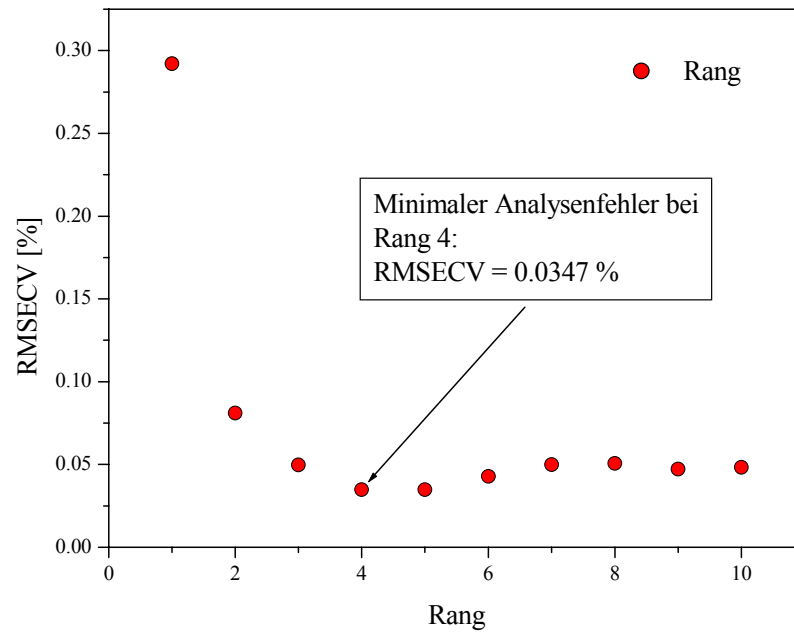


Abb. 10: Mittlerer Vorhersagefehler der Harnstoffkonzentration in Abhängigkeit des Ranges für die verwendete chemometrische Methode.

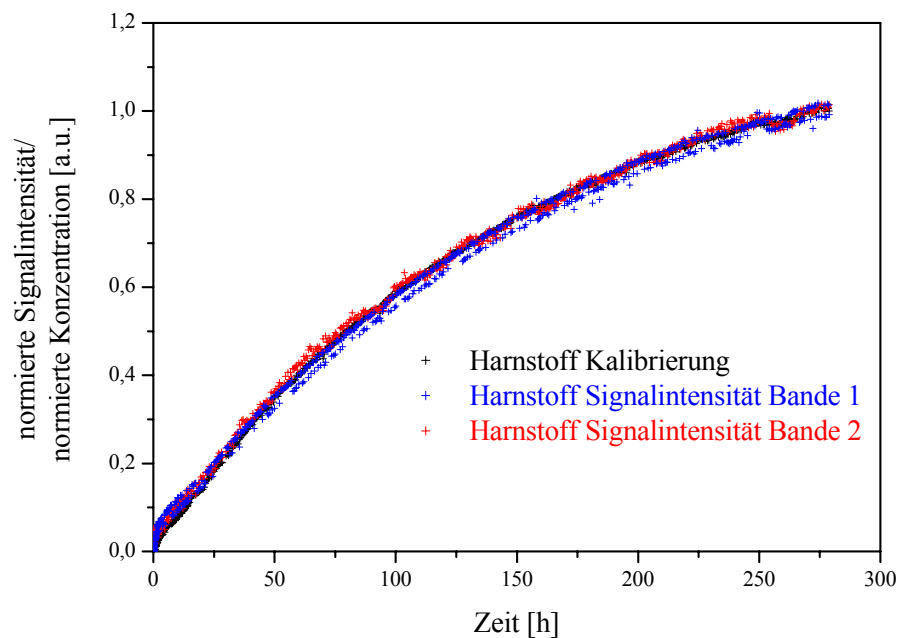


Abb. 11: Zunahme der mittels spektraler Kalibration ermittelten normierten Konzentration von Harnstoff und der normierten Signalintensität der Harnstoffbanden im Bereich von $1391\text{-}1504\text{ cm}^{-1}$ (Bande 1) und $1102\text{-}1193\text{ cm}^{-1}$ (Bande 2) im Akzeptor während der Diffusion von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

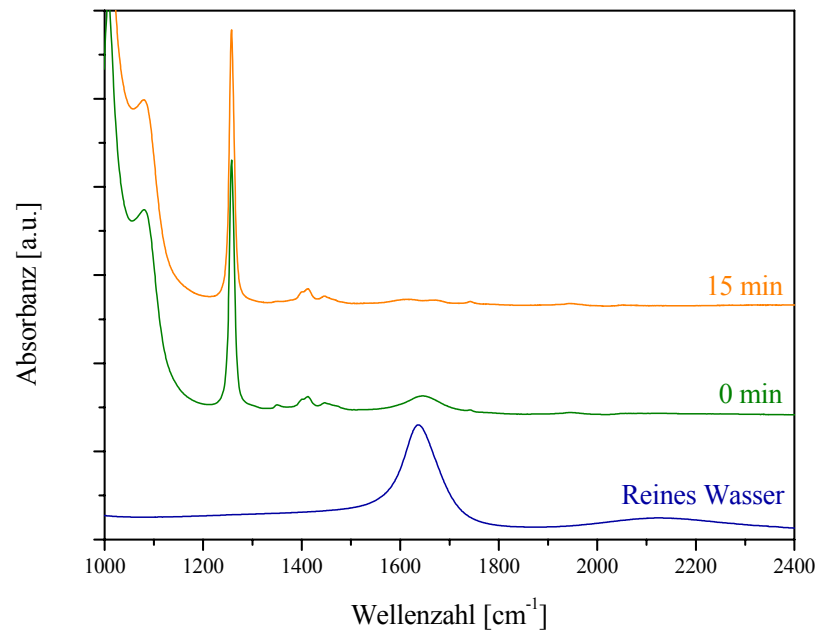


Abb. 12: ATR-Spektren des Systems wässrige Harnstofflösung/Silikon-PEG-Membran unmittelbar nach Abschluss des Diffusionsexperimentes und der Silikon-PEG-Membran; 15 min, nachdem der Donator entfernt und die Membran an Luft aufbewahrt wurde. Zum Vergleich ist das ATR-Spektrum von reinem Wasser angegeben.

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).

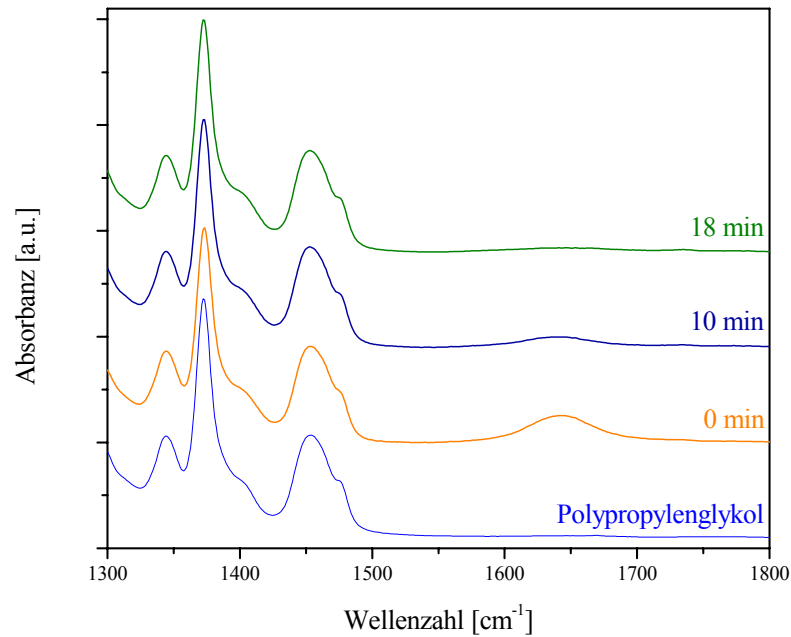


Abb. 13: ATR-Spektren des Systems Polypropylenglykol / Wasser zu verschiedenen Zeiten. Zum Vergleich ist das Spektrum von reinem Polypropylenglykol angegeben.

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.

4. Mathematisches Modell

Bisher existieren mehrere analytische Modelle zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten mittels ATR-Spektroskopie (Brandt 1985, Hemmelmann und Brandt 1986, Margarida et al. 1995, Nardviriyakul et al. 1997, Wurster et al. 1995), die vielfach auf den von Crank beschriebenen Lösungen basieren (Crank 1975). Dabei befindet sich die Membran direkt auf dem Kristall und an der Membranunterseite wird die Nullstrombedingung angesetzt. Diese Modelle gehen davon aus, dass der Diffusant nicht aus der Membran weiter in den Kristall eindringt. Für die Berechnung der Diffusionskoeffizienten in dieser Arbeit ist es jedoch erforderlich, dass zusätzlich zu den bisherigen Modellen ein Akzeptor zwischen dem Kristall und der Membran berücksichtigt werden kann. Dadurch ist es realisierbar, Diffusionskoeffizienten in Membranen anhand der mit der entwickelten ATR-Diffusionszelle ermittelten experimentellen Daten zu berechnen.

Für die mathematische Modellierung des Stofftransportes durch die Membran wird eine lineare Diffusionsgleichung mit konstantem Diffusionskoeffizienten D zugrunde gelegt. Die effektive Stoffkonzentration u in der Membran zum Zeitpunkt t im Abstand x vom Donator wird als $u(t, x)$ definiert. Vereinfachend wird zugrunde gelegt, dass die Konzentrationsänderung im Donator im Verlaufe des Experiments so gering ist, dass sie vernachlässigt werden kann, d.h. an der oberen Membranseite gilt die Randbedingung (4.1). Hierbei ist es nicht notwendig, dass der Wirkstoffgehalt in der Membran die gleiche Konzentration des Donators erreichen kann. Wichtig ist lediglich eine konstante Konzentration des Diffusanten an der Membranoberfläche. Diese Annahme wird durch den Einsatz von einem 40fachen Volumenüberschuss gegenüber dem Akzeptor bei den Harnstoffdiffusionsexperimenten gerechtfertigt.

Für eine vollständige Beschreibung des Systems ist eine zusätzliche Bedingung für den unteren Rand der Membran erforderlich. Bei der Akzeptorkonzentration ($v(t)$) wird (4.2) angenommen. Diese Bedingung setzt einen sehr flachen Akzeptor voraus, bei dem davon ausgegangen werden kann, dass sich der Diffusant sehr schnell gleichmäßig, ähnlich einer Franz'schen Diffusionszelle, bei der der Akzeptor gerührt wird, verteilt. Bei der experimentellen Anordnung ist dies mit einer Akzeptorhöhe von nur 1,3 mm gegeben. Ein Modell, bei dem eine dynamische Randbedingung an der Membranunterseite zugrunde gelegt wird, wurde nach bisheriger Kenntnis nicht beschrieben. Mit der Annahme einer dynamischen Randbedingung kann jedoch ein Akzeptor zwischen dem Kristall und der Membran bei der mathematischen Modellierung zur Ermittlung eines Diffusionskoeffizienten berücksichtigt werden.

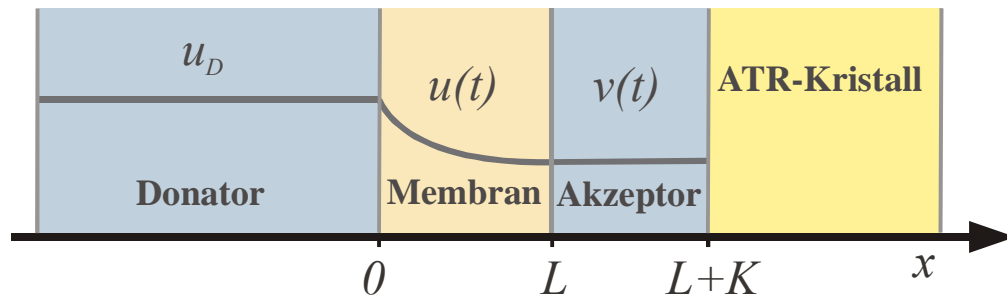


Abb. 14: Skizze und Annahmen beim mathematischen Modell (vereinfachte Momentaufnahme im Verlauf des Diffusionsprozesses). Dabei sind L die Membrandicke, K die Akzeptorhöhe, $v(t)$ die Stoffkonzentration im Akzeptor zum Zeitpunkt t , $u(t)$ die Stoffkonzentration in der Membran zum Zeitpunkt t und u_D die Stoffkonzentration im Donator

Randbedingungen:

$$u(t, x = 0) = u_D = \text{const.} \quad 4.1$$

$$u(t, L) = v(t) \quad 4.2$$

Im Inneren der Membran gilt das zweite Fick'sche Diffusionsgesetz.

$$\frac{\partial u}{\partial t} = D \frac{\partial^2 u}{\partial x^2}, \quad 0 \leq x \leq L, \quad t \geq 0 \quad 4.3$$

Die Anfangsbedingungen werden wie folgt definiert: Zu Beginn der Messung für $t = 0$ ist die Konzentration des Diffusanten in der Membran null. Dies wird mit der homogenen Anfangsbedingung (4.4) modelliert. Des Weiteren erfolgt die Annahme, dass beim Start der Messung ($t = 0$) kein Wirkstoff im Akzeptor vorhanden ist (4.5).

Anfangsbedingungen :

$$u(t = 0, x) = 0 \quad 4.4$$

$$v(t = 0) = 0 \quad 4.5$$

Die Akzeptorkonzentration $v(t)$ erhöht sich proportional zum Diffusionsfluss an der Membranunterseite, der nach dem ersten Fick'schen Diffusionsgesetz beschrieben werden kann und umgekehrt proportional zur Höhe K des Akzeptors ist (4.6).

$$v'(t) = -\frac{D}{K} \frac{\partial u}{\partial x}(t, L) \quad 4.6$$

Die Akzeptorhöhe wird aufgrund ihres Einflusses auf das Akzeptorvolumen berücksichtigt, da sich die Akzeptorkonzentration bei gleicher durch die Membran tretender Stoffmenge volumenabhängig ändert. Dabei wird angenommen, dass keine räumlichen Konzentrationsunterschiede im Akzeptor vorliegen. Aus diesem Grund wurde die Akzeptorhöhe niedrig gewählt. Die Tatsache, dass die Diffusion in der

Membran um Größenordnungen langsamer ist als die Diffusion im Akzeptor ($D_{Akzeptor} \gg D_{Membran}$), rechtfertigt diese Vereinfachung (siehe Kapitel 7.2).

Die Randbedingung an der Membranunterseite für $x = L$ wird auch als dynamische Randbedingung bezeichnet, weil an dieser Stelle eine zeitliche Änderung der Konzentration erfolgt. Da es sich um ein lineares Differentialgleichungssystem handelt, kann mit Hilfe eines Separationsansatzes eine Lösung in Form einer Fourierreihe hergeleitet werden. Details hierzu sind im Report bei Wensch et al. beschrieben (Wensch et al. 2003). Dokumentiert wird das Ergebnis durch:

$$u(t, x) = u_D \left(1 - \sum_{n=0}^{\infty} c_n \exp(-\lambda_n^2 D t / L^2) \sin(\lambda_n x / L) \right), \quad 4.7$$

mit implizit definierten Eigenwerten $n\pi \leq \lambda_n \leq (n+1/2)\pi$, die die Gleichung

$$\lambda_n K / L \sin \lambda_n - \cos \lambda_n = 0, \quad 4.7$$

erfüllen, wobei

$$c_n = 2 / (\lambda_n (1 + K / L \sin^2 \lambda_n)) \quad 4.8$$

ist.

Die Lösung setzt sich dementsprechend als unendliche Reihe von Eigenfunktionen $\sin(\lambda_n x / L)$ additiv zusammen. Sie konvergiert, bedingt durch exponentiellen Abfall in den Vorfaktoren $\exp(-\lambda_n^2 D t / L^2)$, sehr schnell. Bereits nach kurzer Zeit wird die Dynamik des Systems ausschließlich durch die erste Eigenfunktion $\sin(\lambda_0 x / L)$ bestimmt, wobei λ_0 dem kleinsten Eigenwert entspricht. Eine sehr gute Näherung für den Diffusionskoeffizienten wird erhalten, wenn die Messdaten nach einem einfachen exponentiellen Modell $y(t) = u_d (1 - \exp(-\alpha \cdot t))$ angepasst werden und anschließend der Exponent entsprechend Gleichung 4.7 nach D umgestellt wird. Hieraus ergibt sich $D \approx \alpha \cdot L^2 / \lambda_0^2$.

Der Parameter α beschreibt die wesentliche Dynamik des Systems bereits vollständig. Aus diesem Grund ist aus α der Diffusionskoeffizient sehr genau bestimmbar, völlig unabhängig davon, ob die Diffusionsgeschwindigkeit im Akzeptor vernachlässigt wird oder nicht. Falls rückblickend die (als gegeben vorauszusetzende) Diffusionsgeschwindigkeit im Akzeptor berücksichtigt werden soll, so ist das prinzipiell durch eine Korrekturrechnung möglich. Diese Korrektur erfordert keine neue Kurvenanpassung mit den Originaldaten, sondern nur eine Bearbeitung der hier bestimmten Diffusionskoeffizienten. Die Herleitung dieser Korrekturformeln, die

allerdings mathematisch sehr anspruchsvoll ist und den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätte, wird derzeit am Institut für Numerische Mathematik verfolgt.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Diffusionskoeffizienten wurden direkt mit 20 Reihengliedern, entsprechend der analytischen Lösung in Gleichung 4.7, mit Hilfe des Programmpakets MATHEMATICA (Wolfram Research, Champaign, IL, USA) bestimmt.

Somit sind die Erfordernisse für die Parameterschätzaufgabe gegeben, die wie folgt formuliert werden kann:

Eine Messreihe, welche der zeitlichen Konzentrationsänderung im Akzeptor $u(t, L)$ entspricht, sowie die Parameter L und K sind gegeben. Gesucht ist eine Schätzung für die Diffusionskoeffizienten D und die Konzentration in der obersten Haut- bzw. Membranschicht.

Die Anpassung der Messdatenreihen erfolgte mit einem nichtlinearen kleinst-Quadrat-Ansatz und dem Marquardt-Levenberg-Algorithmus. Da gute Startwerte für D und u_D bestimmt werden können, konvergiert die nichtlineare Marquardt-Levenberg-Iteration im zweidimensionalen Parameterraum schon nach wenigen Schritten.

Bei der Entwicklung des mathematischen Modells wurde die Möglichkeit, einen zusätzlichen Akzeptor zwischen Membran und ATR-Kristall einzubeziehen, wie es bei der Diffusionszelle der Fall ist, berücksichtigt. Mit dem im Ergebnis erhaltenen analytischen Modell wurden die experimentell ermittelten zeitlichen Kurvenverläufe der Messpunkte nach einer exakten Lösung gefittet.

Als direktes quantitatives Maß für die Güte jedes berechneten Diffusionskoeffizienten in dieser Arbeit ist das relative Vertrauensintervall für die Diffusionskoeffizienten angegeben. Diese Vertrauensintervalle wurden im Rahmen der Anpassungsrechnung auf der Basis des mathematischen Modells an die experimentellen Daten von MATHEMATICA mit berechnet. Neben dem Vertrauensintervall ist auch die Qualität der berechneten Diffusionskoeffizienten anhand der Übereinstimmung zwischen experimentell bestimmten Daten und der nach Gleichung 4.7 gefitteten Kurve erkennbar.

5. Entwicklung und Auswahl einer Modellmembran

Bei der Entwicklung von Methoden, in denen im Ergebnis Aussagen zur Charakterisierung der Diffusionsprozesse stehen, ist es nahezu unerlässlich, eine Modellmembran zu besitzen. Diese Membran sollte stabil und in ihrem Aufbau nicht zu kompliziert sein, um eine Zuordnung von Prozessen zu ihren Ursachen zu ermöglichen. Hautproben zur Isolierung von Stratum corneum Membranen sind nur begrenzt erhältlich, wesentlich komplexer aufgebaut und komplizierter zu handhaben als definiert zusammengesetzte Modellmembranen. Daher musste eine geeignete, stabile Modellmembran entwickelt werden. Diese Membran sollte demnach gegenüber den einfach zusammengesetzten harnstoffhaltigen hydrophilen Systemen eine ausreichende Stabilität aufweisen. Eine 20%-ige wässrige Harnstofflösung wurde als äußerst hydrophile Standardformulierung für Diffusionsstudien mit den künstlichen Membranen eingesetzt. Anhand dieses, aus zwei Komponenten bestehenden Systems ist es möglich, spektrale Veränderungen den jeweiligen Ursachen sicher zuzuordnen. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass bei einem Diffusionsexperiment durch Membranen mit der herkömmlichen ATR-Anordnung im Spektrum bereits eine Vielzahl an Banden durch die Membrankomponenten vorliegen. Je komplizierter ein neues System zusammengesetzt ist, desto anfälliger wird eine exakte Zuordnung von spektralen Veränderungen zu den Ursachen. FTIR-ATR-spektroskopische Untersuchungen erfordern einen engen optischen Kontakt zwischen Probe und Messkristall. Dieser Aspekt fand ebenfalls in der Membranentwicklung Berücksichtigung, da sich mit Membranen, die eine glatte Oberfläche besitzen, ein besserer Kontakt zum ATR-Kristall bewerkstelligen lässt als mit solchen, deren Außenseite deutliche Unebenheiten aufweist. Für die Diffusionsstudien sollte eine gegenüber der wässrigen harnstoffhaltigen Formulierung weitgehend stabile Membran verwendet werden, die sich zusätzlich leicht in engen optischen Kontakt zum Zinkselenidkristall bringen lässt und somit für die Methodik der ATR-Spektroskopie einfach handhabbar ist.

5.1 Wahl einer künstlichen Modellmembran

In der Literatur werden bei Untersuchungen am Mehrschichtmembransystem nach FÜRST UND NEUBERT (Fürst et al. 1987, Neubert et al. 1991) vielfach Dodecanol-Collodium-Membranen angeführt (Bendas 1993, Bendas et al. 1995, Neubert und Wohlrab 1990, Neubert et al. 1995, Ritter et al. 1990). Dodecanol dient hierbei, eingebettet in eine Collodiummatrix, als Akzeptor für lipophile Substanzen. Für Arzneimittelpermeationsstudien sind ebenfalls weitere Lipid-Collodiummembranen beschrieben (Fürst et al. 1980). Bei Penetrationsstudien mit hydrophilen Substanzen wurden mehrfach Collodiummatrixmembranen, in denen Glycerol als Akzeptorsubstanz

eingearbeitet wurde, verwendet (Alkrad et al. 2003, Knorst et al. 1997, Knorst 1997, Schmalfuß 1997). Diese Membranen wurden bereits für Untersuchungen zur Harnstoffpenetration aus halbfesten Formulierungen eingesetzt (Knorst et al. 1997, Knorst 1997). Bei der Wahl der Akzeptormembran wurde insofern zunächst auf die hydrophile Glycerol-Collodium-Matrixmembran zurückgegriffen. Dies geschah ebenfalls unter dem Aspekt, dass Collodium-Matrixmembranen bereits für FTIR-ATR-spektroskopische Penetrationsstudien verwendet wurden (Hanh 2001). Diese Membranen waren allerdings meist mit Dodecanol befüllt und dienten somit als Akzeptormembranen für lipophile Systeme.

Zunächst erfolgten FTIR-ATR-Penetrationsexperimente mit einer 35 µm dicken Glycerol-Collodium-Membran, die in direktem Kontakt zum Messkristall aufgebracht wurde. Überraschender Weise bildete sich bereits wenige Sekunden nach Aufgabe einer 20%-igen wässrigen Harnstofflösung ein Flüssigkeitsfilm zwischen Membran und Kristall aus (Abb. 15). Um die bereits sehr schnell auftretenden Änderungen im System zu detektieren, erfolgte in diesem Experiment die Reduktion der Scanzahl auf nur zwei Scans. Somit konnte bereits nach neun Sekunden experimenteller Dauer das erste Spektrum erhalten werden. Die Signalintensität der Collodiumbande bei ca. 1280 cm⁻¹ nahm bereits innerhalb von neun Sekunden um ca. 98 % ab. Dem entgegen wuchsen die Intensitäten der Banden von Wasser und Harnstoff, die sich im Bereich von ca. 3000 cm⁻¹ bis 3700 cm⁻¹ noch mit einer Glycerolbande überlagerten, innerhalb von 0,5 min auf ca. 97% ihres Gleichgewichtswertes an. Dieser Wellenzahlbereich diente anstelle des Wellenzahlbereiches von 1500 cm⁻¹ bis 1800 cm⁻¹, an der die Deformationsschwingung des Wassers auftritt, zur Auswertung. Im letztgenannten Bereich überlagerten sich die anwachsenden Banden von Wasser und Harnstoff mit einer abnehmenden Collodiumbande und behinderten dadurch die Auswertung (Abb. 15, Abb. 16). Diese äußerst schnelle Ausbildung des Flüssigkeitsfilmes unter der Membran ist ein Anhaltspunkt für einen konvektiven Transport des Wassers durch selbige. Die Spektren in Abb. 15 demonstrieren, dass Glycerolbanden nach 10 Sekunden, wenn auch schwächer ausgeprägt als im Anfangsspektrum, aber dennoch klar sichtbar waren, jedoch im Verlauf des Experimentes weiter abnahmen. Dieses Verhalten deutet darauf hin, dass Glycerol nicht stabil in die Collodiummatrix inkorporiert ist, sondern aus ihr ausgeschwemmt wird und in den Akzeptor diffundiert. Aufgrund des großen Volumenüberschusses des wässrigen Donators, im Vergleich zu dem in der Membran inkorporierten Glycerolanteil, kommt es zu einer starken Verdünnung des Glycerols. Im stationären Zustand sind demzufolge die Glycerolbanden nicht mehr deutlich sichtbar. Abb. 16 zeigt die ATR-Spektren der Einzelsubstanzen, die zum übersichtlichen Vergleich mit den Spektren aus Abb. 15 im übereinstimmenden Wellenzahlbereich abgebildet sind.

Zur exakten Erklärung der Ursachen für das beschriebene Verhalten bei der Glycerol-Collodium-Membran folgten Experimente mit wasserhaltiger hydrophiler Salbe (DAC)

als einfache, halbfeste Arzneibuchformulierung mit äußerer wässriger Phase. Mit dieser halbfesten, hydrophilen Emulsion konnte das Verhalten der Akzeptormembran in zwei sich komplettierenden Experimenten charakterisiert werden.

In einem Versuch wurde eine ca. 40 μm hohe Salbenschicht auf eine gleichdicke, direkt auf dem ATR-Kristall aufgebraute Glycerol-Collodium-Membran aufgetragen. Die Scanzahl wurde in diesem Experiment zur schnelleren Detektion auf zwei Scans reduziert. Abb. 17 demonstriert die sehr schnelle Abnahme der Intensitäten von Collodiumbanden, besonders im Bereich von 1220-1350 cm^{-1} , die einer O-NO₂ Streckschwingung des Collodiums zugeordnet wird (Roeges 1994). Im spektralen Bereich zwischen 1600 cm^{-1} und 1750 cm^{-1} treten Schwingungen sowohl des Collodiums als auch des Glycerols und der wasserhaltigen hydrophilen Salbe auf (Abb. 17). Aufgrund dieser Überlagerung von allen drei Komponenten im System wird dieser Bereich nicht zur Auswertung herangezogen. Die Änderungen der sich verbreiternden OH-Bande werden hauptsächlich von zwei sich überlagernden Prozessen verursacht, einerseits von der Ausbildung eines Wasserfilmes unter der Membran und andererseits durch eine Glyceroldiffusion in den Akzeptor. Die ausgeprägte Abnahme der Collodiumbande und das Spektrum im stationären Zustand, welches hauptsächlich dem Wasserspektrum entspricht (siehe Abb. 16), begründen die Filmbildung zwischen Kristall und Membran. Dies ist ebenfalls ein Indiz dafür, dass die Aufgabe eines wässrigen Donators zu deutlichen Änderungen der Membraneigenschaften führt. Die Ergebnisse sind ein Anzeichen für ein Durchfließen des Wassers durch die Membran infolge des Ausschwemmens des Glycerols aus der Membranmatrix. Aufgrund des geringeren in eine Salbengrundlage eingearbeiteten Wasseranteils erfolgen die Prozesse etwas langsamer, aber dennoch gleichartig, wie bei der wässrigen Lösung beschrieben.

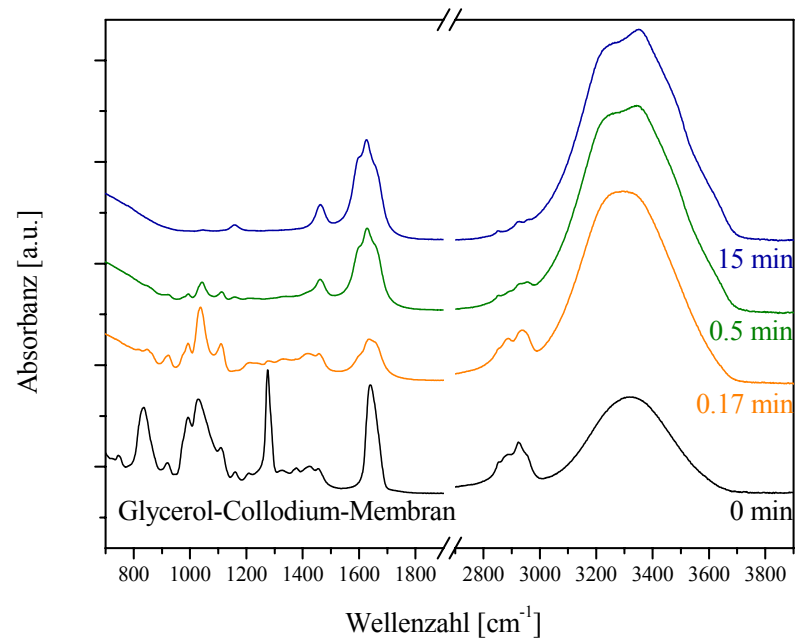


Abb. 15: ATR-Spektren zu verschiedenen Zeitpunkten des Experimentes nach Aufbringen einer 20%-igen wässrigen Harnstofflösung auf eine Glycerol-Collodium-Membran.

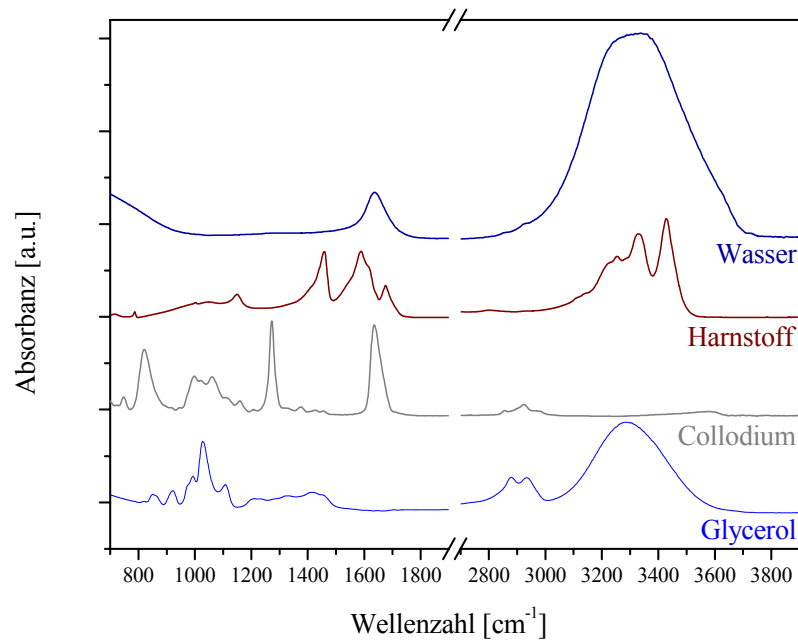


Abb. 16: ATR-Spektren von Glycerol, Collodium, Wasser und Harnstoff. Die Spektren der Komponenten aus Abb. 15 sind zum besseren Vergleich im übereinstimmenden Wellenzahlbereich mit der vorgenannten Abbildung dargestellt.

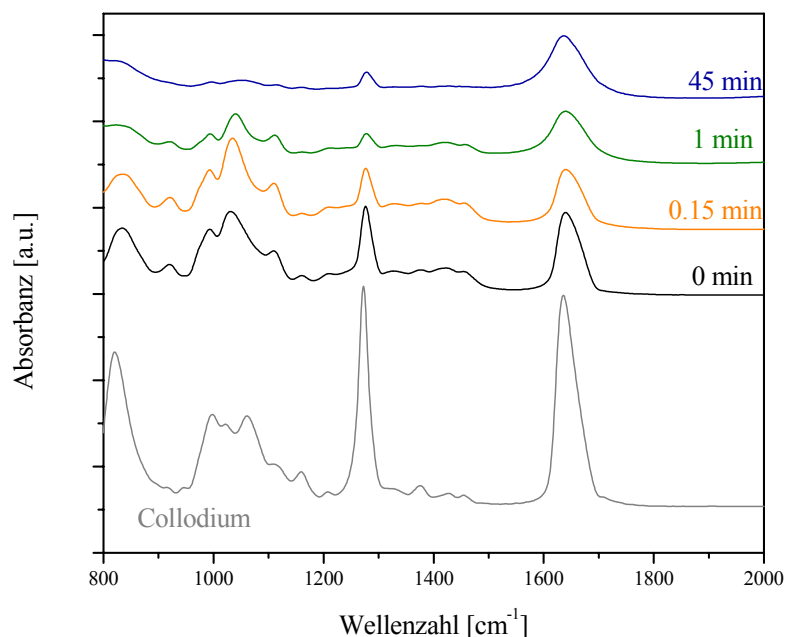


Abb. 17 : ATR-Spektren des Penetrationsexperimentes von wasserhaltiger hydrophiler Salbe (DAB) auf einer Glycerol-Collodium-Membran.

Die Membranen wiesen vor Beginn des Experimentes keinerlei Löcher oder Risse auf. Dies wurde durch Rasterkraftmikroskopieaufnahmen bestätigt (Abb. 18). Maximale Vertiefungen betragen lediglich 403 nm. In einem weiteren Experiment erfolgte die Untersuchung der angenommenen Absonderung des Glycerols aus dem mehrfach angewandten Membranmodell.

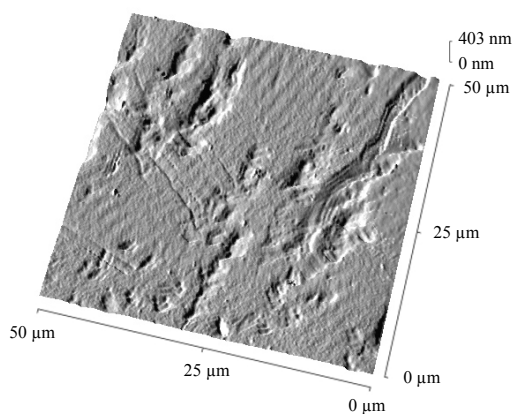


Abb. 18: Rasterkraftmikroskopieaufnahme der Oberfläche einer Glycerol-Collodium-Membran

Hierfür wurde die wasserhaltige hydrophile Salbe (DAC) in einer 300 µm dünnen Schicht auf den ATR-Kristall aufgetragen. Der Einsatz dieser, zum ersten Experiment vergleichsweise größeren Schichtdicke, erfolgte, um sicherzustellen, dass sich im Laufe des Experimentes kein direkter Kontakt zwischen der Membran und dem ATR-Kristall ausbildet. Die Salbe fungierte als Akzeptor für eine aufgelegte Glycerol-Collodium-Membran gleicher Schichtdicke. In diesem Experiment konnte die vermutete Penetration von Glycerol aus der Membranmatrix in die halb feste, wasserhaltige Formulierung bestätigt werden (Abb. 19).

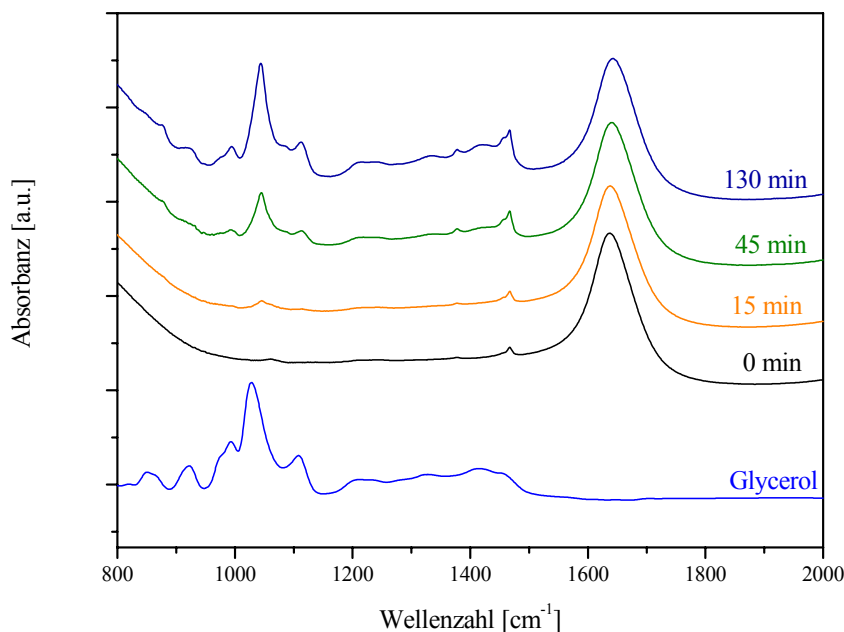


Abb. 19: ATR-Spektren des Penetrationsexperimentes von Glycerol aus einer Glycerol-Collodiummembran in wasserhaltige hydrophile Salbe zu verschiedenen Zeitpunkten. Zum Vergleich ist das Spektrum von reinem Glycerol angegeben.

Auch im Fall der Substitution des Glycerols in der Collodiummatrix durch andere amphiphile Füllstoffe, wie z.B. Tri-, Tetra- und flüssige Polyethylenglykole wurde ein Ausschwemmen der Füllstoffe beim Versetzen mit wässrigen Lösungen festgestellt. Füllstofffreie Collodiummembranen sind wiederum sehr spröde. Ein ausreichender Kontakt zum ATR-Kristall lässt sich nur durch dauerhaftes Aufpressen erzielen. Die Möglichkeit des Ausschwemmens von beachtlichen Mengen an Füllstoffen aus Collodiummatrixmembranen wurde bereits für die Verwendung von Lecithin und Hexadecan als Membranfüllstoffe in der Literatur erwähnt (Fürst et al. 1980). Margerida et al. untersuchten mit Hilfe der ATR-Spektroskopie ein ähnliches Verhalten am Beispiel eines Glycerolgelatinefilms, auf den deuteriertes Ethanol aufgegeben wurde (Margarida et al. 1995). In diesem Fall wurde eine Rückdiffusion von Glycerol in den deuterierten Alkohol registriert. Aufgrund der festgestellten Erkenntnisse muss bei Glycerol-Collodiummembranen, die mit wasserhaltigen Systemen in Kontakt kommen, mit erheblichen Änderungen der Membraneigenschaften im Verlauf der Experimente gerechnet werden. Da die Untersuchung der Kinetiken dieser Rückdiffusionsprozesse von Membranfüllstoffen in Formulierungen nicht Ziel dieser Arbeit war, sondern vielmehr die Anwendung einer bisher nicht verfügbaren, geeigneten künstlichen Membran zur Charakterisierung von hydrophilen Diffusionsprozessen, wurde das Interesse auf die Entwicklung eines alternativen Membranmodells gelegt. Hierfür wurden Experimente zur Herstellung einer, gegenüber Formulierungen wie der

hydrophilen wässrigen Harnstofflösung, stabilen Membran für Diffusionsstudien durchgeführt.

5.1.1 Füllstofffreie Polydimethylsiloxanmembran

Silikonmembranen fanden bereits vielfach für Penetrationsuntersuchungen lipophiler Arzneistoffe Verwendung (siehe 2.3). Aufgrund der beschriebenen Vorzüge von Silikonmembranen wurde dieses Membranmaterial für die Entwicklung eines Membranmodells für ATR-spektroskopische Diffusionsstudien ausgewählt. Zunächst erfolgten Diffusionsuntersuchungen an füllstofffreien Polydimethylsiloxanmembranen. Die entsprechend des bereits erläuterten Verfahrens hergestellten Silikonmembranen (siehe 3.3.5) besitzen vorteilhafter Weise eine hohe Affinität zum Zinkselenidkristall. Dies kennzeichnet sich darin, dass sie sich sehr leicht, ohne große mechanische Beanspruchung durch einfaches Auflegen, luftblasenfrei auf den Kristall aufbringen lassen (Kapitel 3.1.1). Mittels ATR-Technik sollten Untersuchungen zur Eignung der Silikon-Membranen für Diffusionsstudien folgen. Dabei war zu klären, ob sich mit diesen Membranen eine Wasser- und evtl. auch eine Harnstoffdiffusion detektieren lassen und inwieweit sich diese Membranen für eine Modellentwicklung eignen. Eine 20%-ige wässrige Harnstofflösung wurde auf die ca. 80 µm dicke Silikon-Membran aufgegeben. In Abb. 20 sind Spektren dieses Experimentes über einen Zeitraum von 16 Stunden dargestellt.

Bei dem Wassermolekül handelt es sich um einen sehr stark IR-aktiven Stoff. Auffällig ist in Abb. 20, dass bei der reinen Silikon-Membran keine Wasserdiffusion erfolgte. Im Falle einer Wasserdiffusion müssten die intensiven Schwingungen des Moleküls, die oberhalb 3000 cm⁻¹ aus der Valenzschwingung und bei ca. 1640 cm⁻¹ von der Deformationsschwingung des Wassers resultieren (Banwell und McCash 1999, Smith 1999, Wartewig 2003), sichtbar sein. Da sich die sehr gut auf den ATR-Kristall aufbringen lassende reine Silikon-Membran zwar stabil gegenüber der eingesetzten Formulierung zeigte, jedoch keine Wasserdiffusion stattfand, sollte die Silikon-Membran mit einem geeigneten Füllstoff versetzt werden.

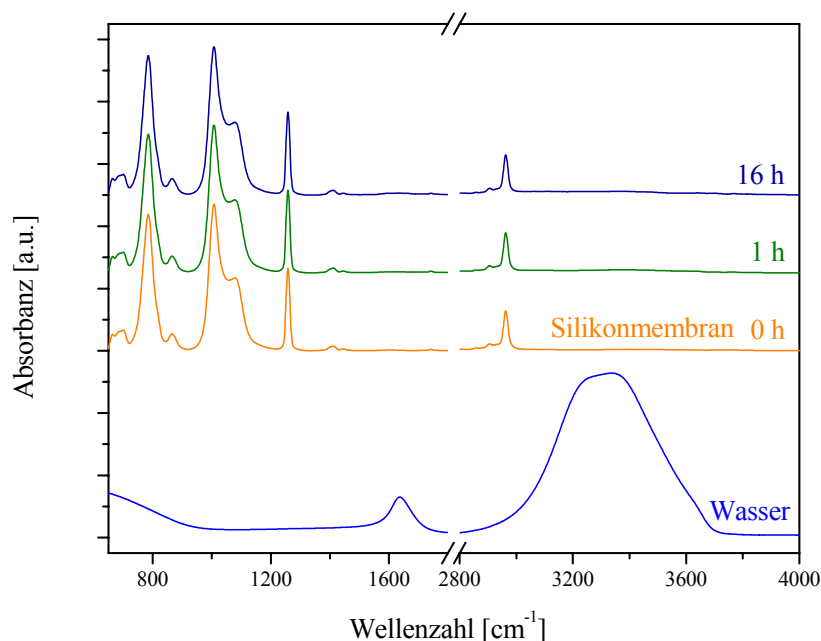


Abb. 20: ATR-Spektren des Diffusionsexperimentes von einer wässrigen Harnstofflösung durch eine reine Silikonmembran zu verschiedenen Zeitpunkten. Zum Vergleich ist das Spektrum von Wasser angegeben.

5.1.2 Auswahl einer füllstoffhaltigen Polydimethylsiloxanmembran

Aufgrund der eingangs geschilderten positiven Eigenschaften von Silikon-Membranen (Kapitel 2.3 und 5.1.1) wurde die vorliegende Polydimethylsiloxanmembran weiterentwickelt. Besonders vorteilhaft erschien die gute Affinität des Silikons zum ATR-Kristall. Somit wurden auch Chancen gesehen, anhand von Silikonmembranen, die mit einem geeigneten Füllstoff versetzt sind, Diffusionsprozesse charakterisieren zu können. Für die Herstellung füllstoffhaltiger Silikonkautschukmembranen wurden verschiedene Substanzen auf ihre mögliche Einarbeitung in die lipophile Silikonmatrix getestet. Glycerol ließ sich nicht in diese Matrix inkorporieren, sondern wurde abgeschieden. Dies zeigte sich bereits an einer entstehenden Trübung beim Versetzen der klaren Ausgangsstammlösungen von Silikonkautschuk und Füllstoff im Herstellungsprozess. Während der weiteren Fertigung bildeten sich keine durchgängigen Membranen aus. In den Membranformen verblieben nach vollständigem Abdampfen des Lösungsmittels getrennte Bereiche von vernetztem PDMS und Stellen mit flüssigem Glycerol. Die Auswahl geeigneter Füllstoffe verläuft weitestgehend empirisch. Daher wurden verschiedene Substanzen getestet, die als Auswahlkriterium sowohl lipophile Strukturen in ihrem Molekülteil aufweisen, um sie entsprechend im Silikongerüst verankern zu können, als auch hydrophile Strukturen, um

Diffusionsuntersuchungen am hydrophilen System durchzuführen. Auf ihre Eignung als entsprechende Füllstoffe wurden zunächst 1-Butanol, 1-Pentanol, 1-Hexanol, 1,2-Octandiol, Triethylenglykol, Tween 80 und Tetraethylenglykol untersucht. Membranen, bei denen getestet wurde, diese Substanzen in 25%-iger Konzentration in die Silikonmatrix einzuarbeiten, wiesen deutliche Inhomogenitäten und Löcher auf.



1 cm

Abb. 21: Fotografie einer Silikonmembran, die bei der Herstellung mit 25% Triethylenglykol versetzt wurde

Da diese Membranen keine weitere Verwendung für diese Arbeit fanden, sei hier lediglich zum Vergleich zu Abb. 22 exemplarisch für die restlichen untersuchten Substanzen das Ergebnis des Experimentes dargestellt, Triethylenglykol in die Silikonmatrix zu inkorporieren. Auch beim Versuch, PEG-400 in die Silikonmatrix in 25%-iger Konzentration einzuarbeiten, wurde festgestellt, dass sich dies nicht vollständig einarbeiten ließ. Dies war an einem Abscheiden des Polyethylenglykols an der Membran erkennbar. Allerdings waren die aufgetretenen Fehlstellen geringer ausgeprägt als bei den restlichen geprüften Substanzen, welches sich mit der Struktur der

Substanz und den sehr guten Lösungseigenschaften begründen lässt.

Silikon-Polyethylenglykol Membran (Silikon-PEG-Membran)

Mit dem Ziel stabile, homogene, füllstoffhaltige Membranen herzustellen, folgten Untersuchungen zur Membranherstellung mit reduziertem Füllstoffanteil. Viele positive Eigenschaften von PEG 400 befürworteten die Verwendung dieser Substanz als Akzeptorflüssigkeit für hydrophile Stoffe. Polyethylenglykol findet bereits vielfache pharmazeutische Anwendung (Ph. Eur. 4). Es weist sehr gute Lösungseigenschaften auf, ist imstande aufgrund der Etherstruktur und der endständigen Hydroxylgruppen Wasserstoffbrücken auszubilden, ist zusätzlich gegen mikrobiellen Befall resistent und unempfindlich gegenüber Elektrolyten (Voigt 2000).

Zunächst erfolgten Experimente, um die bestmögliche Konzentration von PEG 400 für die Membranherstellung zu ermitteln. Hierfür wurde getestet, Konzentrationen von 20%, 15% und 10% PEG in die Silikonmatrix einzuarbeiten. Die erhaltenen Membranen mit 10% Füllstoffanteil waren homogen und fehlerfrei, während bei den Membranen mit dem höheren PEG-Anteil ein Absondern des PEGs aus der Matrix erkennbar war. Weitere Herstellungsversuche beschränkten sich auf den Konzentrationsbereich zwischen 10% und 15% PEG-Anteil in der Silikonmatrix.

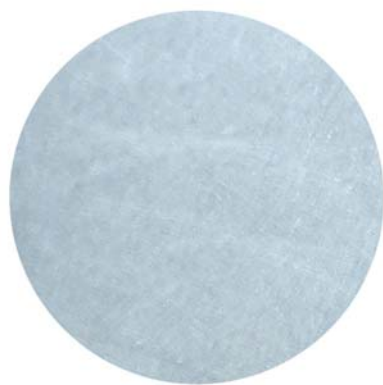


Abb. 22: Fotografie der Oberfläche einer Silikonmembran mit 12,5% eingearbeitetem PEG 400

Es gelang, fehlerstellenfreie, einheitliche Membranen mit einem Anteil von 12,5% (m/m) PEG-400 herzustellen (Abb. 22). In der Literatur ist die Einarbeitung von 5% und 10% Eilecithin sowie von 5% Hydrolecithin in diese Silikonmatrix beschrieben (Richter 1985). Somit konnte im Fall des amphiphilen PEGs dessen Anteil in der Silikonmatrix im Vergleich zu den beschriebenen Lecithinen noch erhöht werden. Hier sollte die Eignung dieser Membranen untersucht werden, Diffusionsvorgänge mit Hilfe der ATR-Technik zu charakterisieren. Die

Einarbeitung des Füllstoffes hat zum Ziel, die Membranen im Gegensatz zur füllstofffreien Silikonmembran für das wässrige, hydrophile System permeabler zu gestalten. Beachtet man die bereits erwähnten sehr guten Lösungseigenschaften des PEGs und seine Fähigkeit, Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen, ist davon auszugehen, dass sich diese Membranen für Wasser und eventuell Harnstoff permeabler erweisen. Weiterhin muss in diesem Zusammenhang geklärt werden, ob PEG ausreichend stabil in der Matrix inkorporiert ist. Bei der Glycerol-Collodium-Membran wurde das Auswaschen des Glycerols bei Verwendung einer wässrigen Harnstofflösung nachgewiesen (siehe 5.1). Hier stellte sich die Frage, ob bei der Silikon-PEG-Membran das Auswaschen des PEGs aus der Membranmatrix unterbleibt. Die Verwendung des gleichen Systems für Diffusionsstudien an der Silikon-PEG-Membran kann hierfür eine Antwort geben und ermöglicht diesbezüglich zusätzlich einen direkten Vergleich zur Glycerol-Collodiummembran.

5.1.3 Oberflächencharakterisierung der Silikon-PEG-Membran während der Diffusion einer wässrigen Harnstofflösung

Vergleichbar mit den füllstofffreien Silikonmembranen (siehe 5.1.1) zeichnen sich auch die Silikon-PEG-Membranen darin aus, dass sie sich durch einfaches Auflegen ohne zusätzlichen Druck, luftblasenfrei auf den ATR-Kristall aufbringen lassen. Dies ermöglicht einen engen Kontakt zwischen dem System Silikon-PEG-Membran und dem ZnSe-Kristall. Durch diese, für die ATR-Technik hervorragende Eigenschaft, lässt sich mit Hilfe dieser Membran das Verhalten an der Grenzfläche Membran/ATR-Kristall sehr gut beurteilen.

Um Diffusionsprozesse mit der herkömmlichen ATR-Anordnung zu charakterisieren, bedarf es der genauen Kenntnis der Ursachen entsprechender zeitabhängiger Veränderungen im Spektrum. Von Interesse sind deshalb die Vorgänge an der Membranseite, welche sich in Kontakt zum ATR-Kristall befindet und an der die Diffusantendetektion erfolgt. Hier ist es das Ziel, die ablaufenden Vorgänge in der Membran bzw. an dieser Membranoberfläche zu charakterisieren, so dass die entsprechenden Bandenveränderungen im Spektrum ihren Ursachen zugeordnet werden können. Dies ermöglicht im weiteren Schritt die Auswertung von Diffusionsprozessen, die Erstellung eines Modells und verhindert Fehlinterpretationen von Bandenveränderungen. Nach Aufgabe der 20%-igen wässrigen Harnstofflösung auf die Silikon-PEG-Membran kommt es zu zeitabhängigen spektralen Veränderungen. Hier ist in diesem Zusammenhang zu klären, ob die Zunahme von Bandenflächen bei der normalen ATR-Anordnung in jedem Fall den Schwingungen eines Diffusanten aufgrund seines Konzentrationsanstieges (Wasser oder Harnstoff) zugeordnet werden kann. Deutlich sichtbar war im Verlauf der Experimente die Zunahme der Intensität der Wasserbanden (Abb. 23).

Dies zeigt, dass es gelang, durch die Einarbeitung der Akzeptorflüssigkeit in die Silikonmatrix, deren Permeabilität für das untersuchte wässrige System so zu verbessern, dass eine Wasserdiffusion deutlich detektierbar ist. Gleichzeitig konnte eine Filmbildung, wie im Falle der Glycerol beladenen Collodiummatrixmembran, die auch an der drastischen Abnahme von Membranbanden erkennbar war (siehe Kapitel 5.1), nicht festgestellt werden.

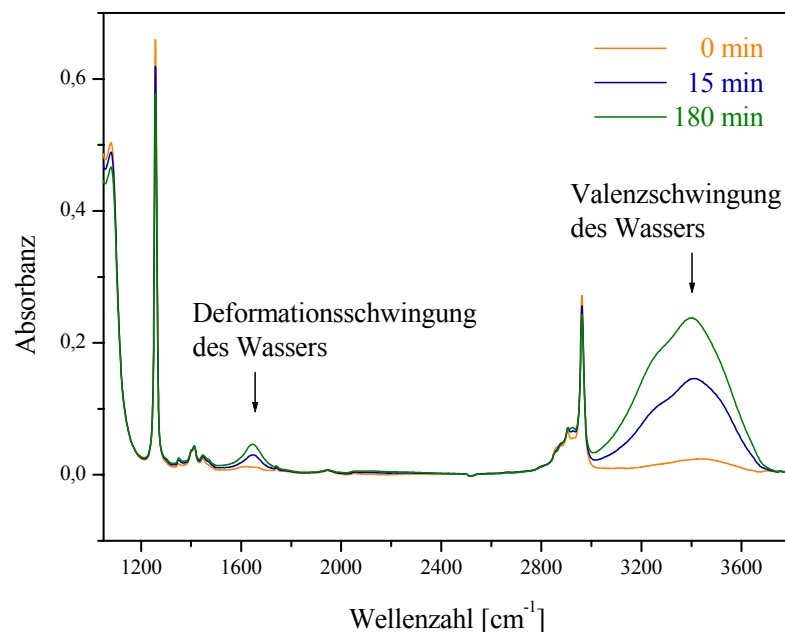


Abb. 23: ATR-Spektren des Diffusionsexperimentes einer wässrigen Harnstofflösung durch eine Silikon-PEG-Membran zu verschiedenen Zeitpunkten.

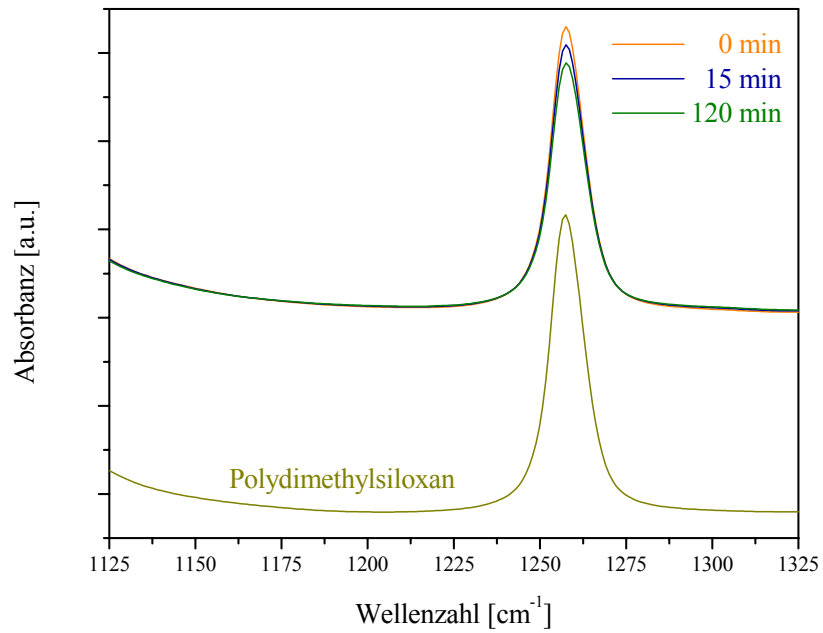


Abb. 24: ATR-Spektren zu verschiedenen Zeiten während des Diffusionsexperimentes einer wässrigen Harnstofflösung durch eine Silikon-PEG-Membran. Dargestellt ist die Änderung einer Silikonbande. Zum Vergleich ist das Spektrum von reinem Polydimethylsiloxan angegeben.

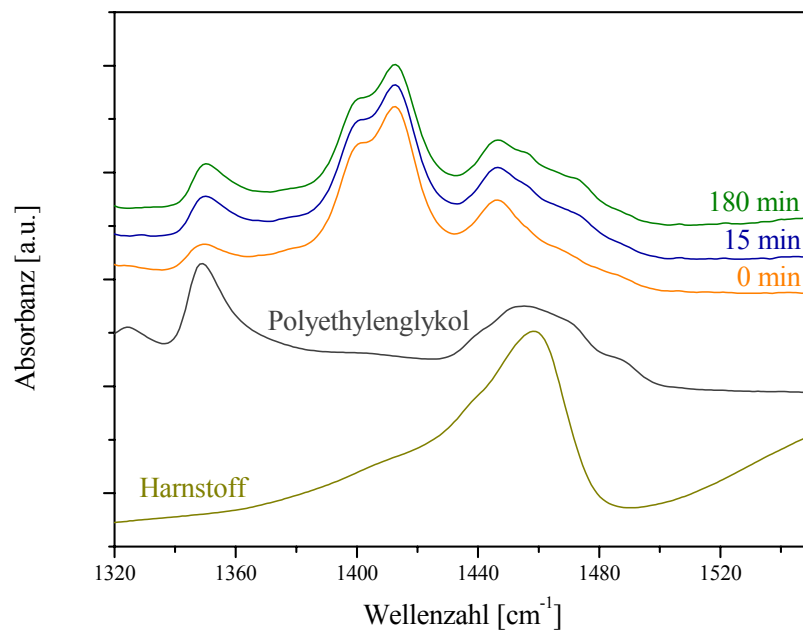


Abb. 25: ATR-Spektren zu verschiedenen Zeiten während des Diffusionsexperimentes einer wässrigen Harnstofflösung durch eine Silikon-PEG-Membran. Zum Vergleich sind die Spektren von reinem PEG 400 und reinem Harnstoff angegeben.

Während der Diffusionsexperimente verringerten sich die Intensitäten der Silikonbanden lediglich leicht (Abb. 24). Eine Ursache für diese Veränderungen ist eine minimale Anreicherung des PEGs an der Membranoberfläche, erkennbar an einer geringen Zunahme von einer isolierten PEG-Bande bei ca. 1350 cm^{-1} (Abb. 25). Hierdurch vergrößert sich die detektierte PEG-Fläche. Die Substanz verbleibt jedoch in der Silikonmatrix und wird nicht aus der Membran ausgewaschen. Eine Diffusion des PEGs aus der Membran in den Donator hätte eine Konzentrationsabnahme der Substanz in der Membran zur Folge und demnach wiederum eine Abnahme der Signalintensität (vergleiche 5.1). Die detektierte Gesamtfläche ist durch den Durchmesser des ATR-Kristalls, der mit dem Membransystem vollständig bedeckt ist, festgelegt und somit konstant. Die Vergrößerung des PEG-Kontaktes zum Kristall ist folglich eine Ursache für die Abnahme des Silikonkontaktes. Allerdings ist dieser Anreicherungsprozess minimal ausgeprägt und etwas schneller abgeschlossen als die geringfügige Abnahme der Silikonbanden. Während des Diffusionsvorganges nimmt die Anzahl der an der Membranunterseite detektierten Wassermoleküle zu (Abb. 27). Dies ist eine weitere Ursache für die Abnahme der Silikonbanden, da durch die Zunahme der Wassermoleküle die Konzentration des Silikons im detektierten Bereich gering abnimmt. Mit Abschluss des Diffusionsprozesses, der an einer zeitabhängigen Konstanz des Wassersignals erkennbar ist, sind auch keine Änderungen in den Silikonbanden feststellbar. Kontaktprobleme mit der herkömmlichen ATR-Technik bei Diffusionsexperimenten mit wässrigen Lösungen, selbst bei der Verwendung von Silikonmembranen, wurden bereits in der Literatur erwähnt (Farinas et al. 1994).

Auffällig ist in Abb. 25 bei einer Wellenzahl von ca. 1462 cm^{-1} der zeitabhängige Anstieg einer Schulter. Diese Veränderung könnte auf den ersten Blick der asymmetrischen CN-Streckschwingung des Harnstoffs (ca. 1464 cm^{-1}) zugeordnet werden (Kutzelnigg und Mecke 1961, Steward 1957, Vijay und Sathyanarayana 1993). Sie wird allerdings ebenfalls durch PEG verursacht. Dies wird dadurch bestätigt, dass die zeitliche Intensitätszunahme dieser Bande mit dem Anstieg der deutlich ausgeprägten, nicht überlagerten PEG-Bande bei ca. 1350 cm^{-1} korreliert (Abb. 26). Harnstoff besitzt keine isolierte Bande in Wellenzahlbereichen, bei denen nicht auch Schwingungen von den restlichen Substanzen in der Membran auftreten. Die in den ATR-Spektren aufgetretenen Bandenänderungen wurden ihren Ursachen zugeordnet. Eine Harnstoffdiffusion wurde neben der Wasserdiffusion nicht festgestellt. Die Wasserdiffusion durch die Silikon-PEG-Membran lässt sich basierend auf der ATR-Spektroskopie charakterisieren.

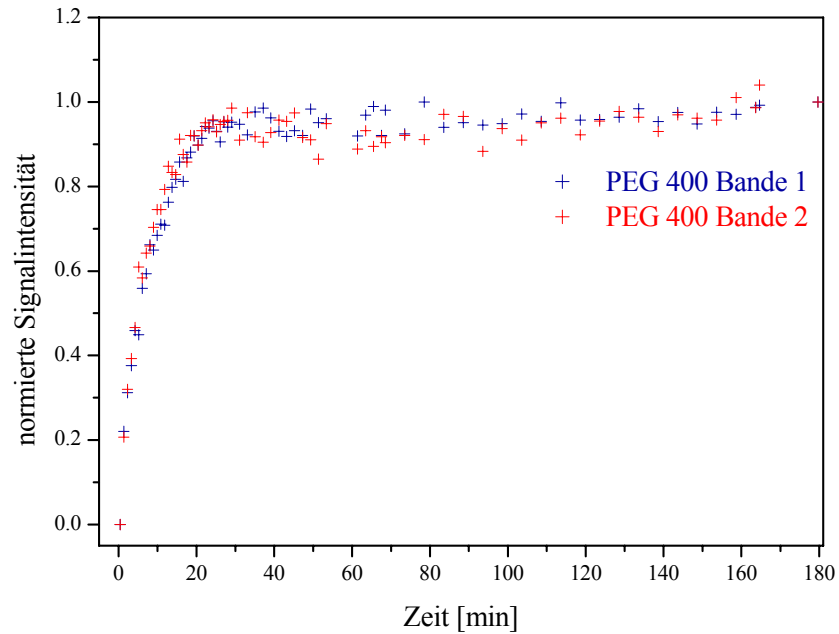


Abb. 26: Zunahme der normierten Signalintensitäten von PEG 400 während des Diffusionsexperimentes einer wässrigen Harnstofflösung durch eine Silikon-PEG-Membran. Bande 1 charakterisiert die Intensitätszunahme des Signals bei einer Wellenzahl von 1350 cm^{-1} . Bande 2 charakterisiert die Intensitätszunahme des Signals bei einer Wellenzahl von 1456 cm^{-1} .

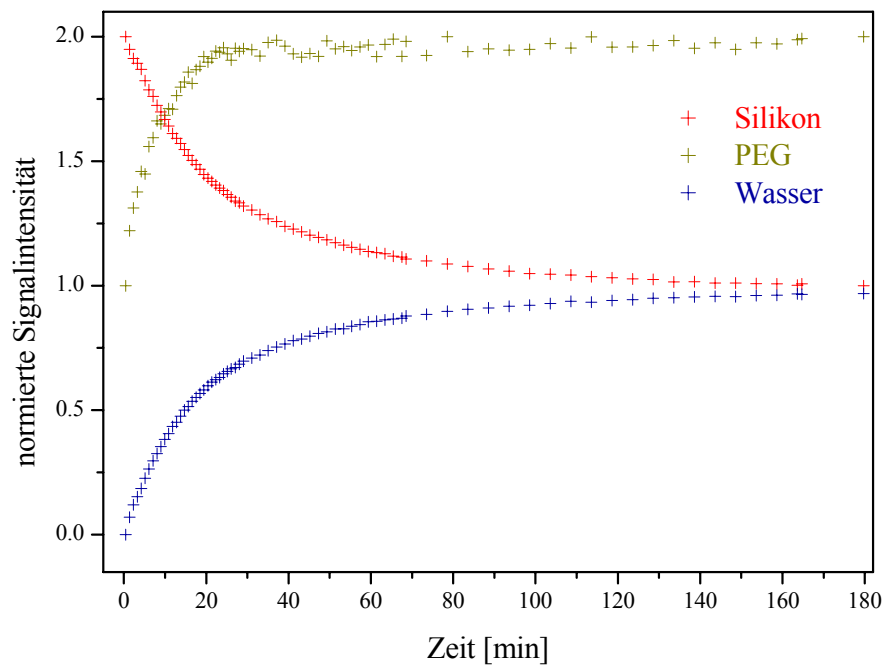


Abb. 27: Änderungen der normierten Signalintensitäten von Silikon, PEG und Wasser nach Aufbringen einer wässrigen Harnstofflösung auf eine Silikon-PEG-Membran.

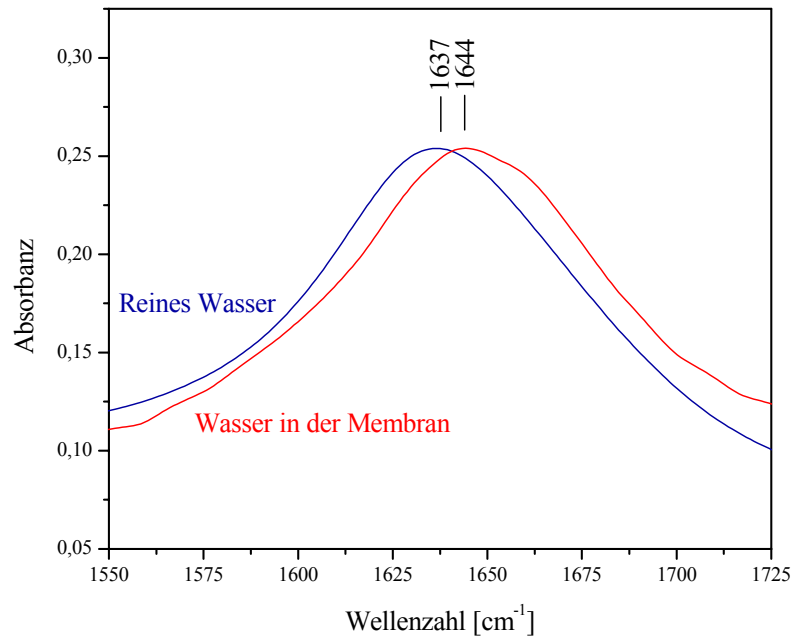


Abb. 28: Bandenmaxima von reinem Wasser und Wasser in einer Silikon-PEG-Membran

AFM-spektroskopische Untersuchungen zur Charakterisierung der Membranoberfläche bestätigen die spektroskopischen Befunde (Kapitel 5.1.4).

Im Falle der Silikon-PEG-Membran befindet sich das detektierte Wasser in der Membran. Dies wird zusätzlich durch einen Vergleich der Intensitätsmaxima der Banden von Wasser, welches einerseits direkt auf den ATR-Kristall aufgegeben wurde und welches sich andererseits in der Membran befindet, bestätigt. Bei 25°C liegen die Bandenmaxima von reinem Wasser liegen bei einer Wellenzahl von 1637 cm⁻¹, die des Wassers in der Membran bei einer Wellenzahl von 1644 cm⁻¹ (Abb. 28). Diese, bei jeder Wasserdiffusion durch die Membran festgestellte Verschiebung des Wasserbandenmaximums um sieben Wellenzahlen ist ein Anzeichen für die Wechselwirkungen des Stoffes mit der Membran (Günzler und Heise 1997). Da PEG nicht durch Wasser aus der Membran ausgewaschen wird, untermauern diese Ergebnisse, dass das in den Diffusionsexperimenten detektierte Wasser in der Membran gebunden vorliegt.

5.1.4 AFM-spektroskopische Oberflächencharakterisierung der Silikon-PEG-Membran

Die Membranoberfläche wurde mittels Atomkraftmikroskopie charakterisiert. Dadurch konnte ein dreidimensionales Oberflächenprofil der Silikon-PEG-Membran erstellt werden. Ein dreidimensionales Profil gibt Auskunft über die Gestalt der Membranaußenseite. Die Schichtdicke der Membran besitzt einen großen Einfluss auf

den Wert des Diffusionskoeffizienten. Aus diesem Grund wurde sichergestellt, dass die Membran keine Risse, Defekte oder drastische Ungleichmäßigkeiten aufweist, welche lichtmikroskopisch nicht erkennbar und mit dem normalen Schichtdickenmessgerät (Kapitel 3.3.6) nicht erfassbar sind. Weiterhin stellte sich die Frage, ob die spektroskopischen Befunde, die auf eine Kontaktzunahme zwischen dem ATR-Kristall und dem PEG im Laufe des Diffusionsexperimentes und auf eine Anreicherung des PEGs an der Oberfläche hindeuten, mit dieser Referenzmethode bestätigt werden können. In diesem Fall müssten Veränderungen im Vergleich der Membranoberflächen vor und nach dem Experiment erkennbar sein. Zunächst wurde die Membranoberfläche einer Silikon-PEG-Membran vor einem Diffusionsexperiment untersucht (Abb. 29). Die Membran weist an ihrer Oberfläche eine Struktur mit zahlreichen kreisförmigen Ausformungen von maximal nur 360 nm Tiefe auf (Abb. 30). Diese größten Vertiefungen, der in Abb. 29 repräsentativ für die Gesamtmembran (siehe 3.1.3) abgebildeten Probe, sind in Abb. 30 dargestellt.

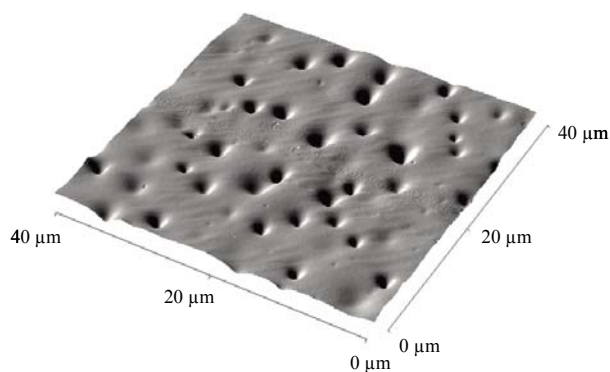


Abb. 29: AFM-Aufnahme der Oberfläche einer Silikon-PEG-Membran

Mit Ausnahme dieser Vertiefungen besitzt die restliche Membranoberfläche eine relativ ebene Struktur. Der Vergleich mit dem dreidimensionalen Oberflächenprofil der Glycerol-Collodium-Membran (Abb. 18) zeigt, dass Silikon-PEG-Membranen eine insgesamt ebenere Oberfläche besitzen. Diese Eigenschaft ist für einen guten Kontakt zum Messkristall vorteilhaft.

Die Behandlung der Membran erfolgte konform den ATR-Diffusionsexperimenten (siehe 3.1.1). Auf die Membranoberfläche wurde eine wässrige Harnstofflösung gegeben und nach ca. drei Stunden wieder entfernt.

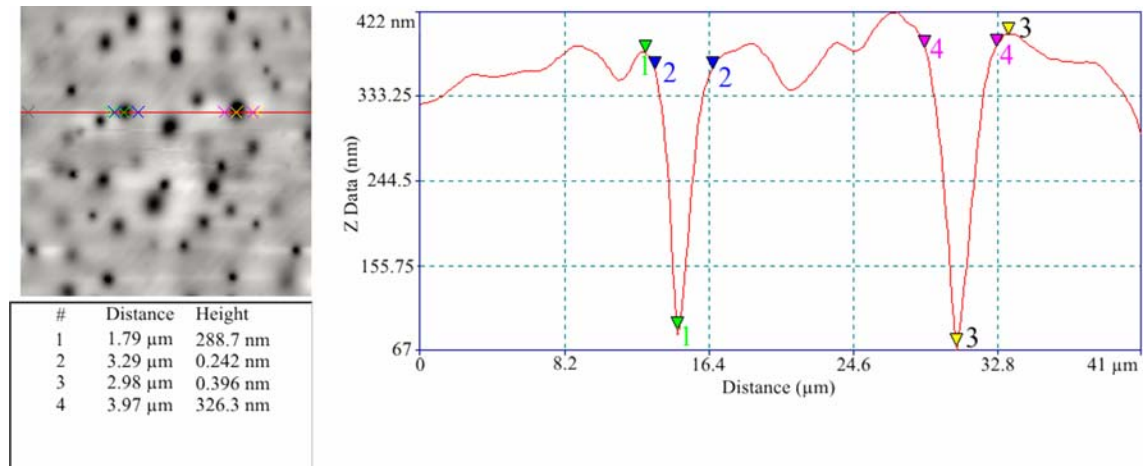


Abb. 30: Oberflächenprofil einer Silikon-PEG-Membran entlang der rot markierten Linie in der zweidimensionalen Aufsicht im linken Bildabschnitt. Die Abbildung entspricht der Probe aus Abb. 29

Anschließend erfolgten AFM-spektroskopische Aufnahmen der auf Glimmerplättchen fixierten Membran (siehe 3.1.2). Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Vertiefungen der Membranen vor dem Experiment, in leichte Erhebungen ändern (Abb. 31). Diese Veränderungen können in einer geringfügigen Anreicherung des PEGs an der Membranoberfläche, verursacht durch die wässrige Formulierung, begründet werden.

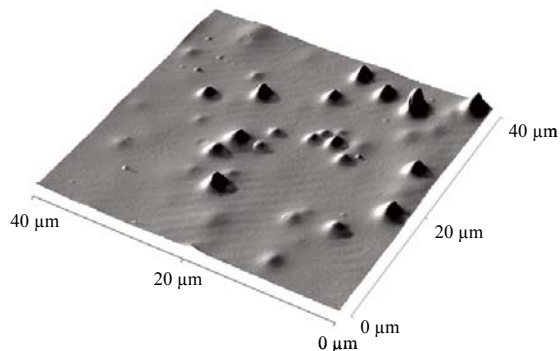


Abb. 31: AFM-Aufnahme einer Silikon-PEG-Membran nach einem Diffusionsexperiment

Membranoberfläche beträgt ca. 0,4 μm (Abb. 32).

Mit Ausnahme dieser Vertiefungen ist die restliche Membranoberfläche, gleichsam der Membran vor dem Experiment, relativ eben. Diese rasterkraftmikroskopischen Erkenntnisse korrespondieren mit den FTIR-ATR-spektroskopischen Ergebnissen einer Kontaktzunahme von PEG und einer Kontaktabnahme des Silikons zum ATR-Kristall (siehe 6.1). Die maximale Höhe der Erhebungen auf der

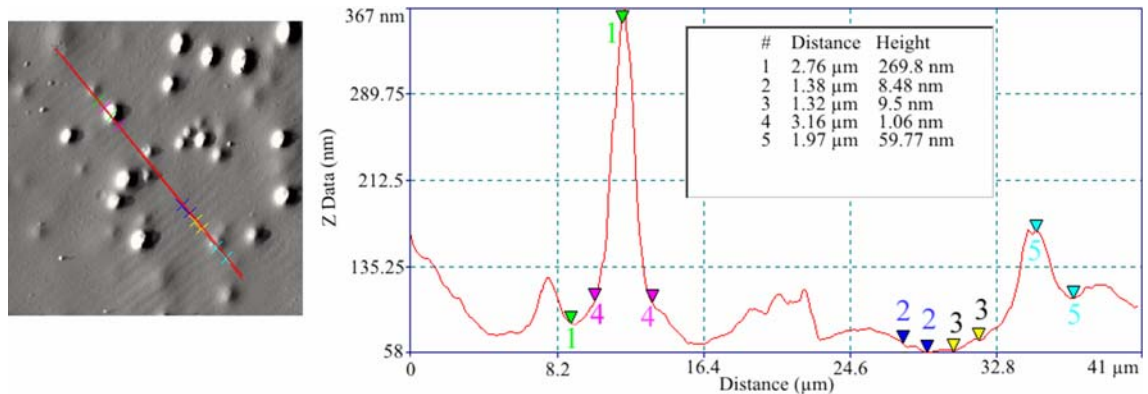


Abb. 32: Oberflächenprofil einer Silikon-PEG-Membran. Die Abbildung entspricht der Probe aus Abb. 31.

Die bei der Membran aufgetretene Höhenänderung ist allerdings im Vergleich zur Gesamtmembrandicke von etwa $80\ \mu\text{m}$ für die Bestimmung der Diffusionskoeffizienten vernachlässigbar.

Dennoch ist eine genaue Kenntnis der Vorgänge an der Membranaußenseite für die Interpretation der ATR-Spektren, aufgrund der geringen Eindringtiefe des IR-Strahles in die Membran, entscheidend (siehe 3.1.1). Bandenänderungen müssen für eine exakte Interpretation der spektralen Ergebnisse ihren Ursachen zugeordnet werden. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen einerseits, dass diese präzise Zuordnung bei Diffusionsexperimenten mit der herkömmlichen ATR-Anordnung aufwendig ist. Andererseits gestaltet sich die Einhaltung konstanter, definierter Randbedingungen mit der normalen ATR-Anordnung schwierig. Im Falle der Silikon-PEG-Membran können indessen Diffusionsstudien mit der ATR-Anordnung, bei der die Akzeptormembran direkt auf den Messkristall aufgebracht wird, durchgeführt werden. Bei der Verwendung von Stratum corneum Membranen und einem wässrigen Donator ist jedoch die Aufrechterhaltung eines konstanten Kontaktes zwischen der natürlichen Membran und dem ATR-Kristall mit der herkömmlichen FTIR-ATR-Anordnung nicht möglich. Ursächlich ist eine einsetzende Filmbildung zwischen der äußeren Hautschicht und dem ATR-Kristall. Das Ziel, die ATR-Anordnung zur Charakterisierung von Diffusionsprozessen universell einsetzen zu können, speziell um Diffusionsstudien an vollhydratisiertem, isoliertem Stratum corneum durchzuführen, forderte eine Weiterentwicklung der ATR-Anordnung mit definierten Randbedingungen.

6. Diffusionsexperimente mit der herkömmlichen FTIR-ATR-Anordnung

6.1 Wasserdiffusion durch eine Silikon-PEG-Membran

Untersuchungen zur Wasserdiffusion durch eine Silikon-PEG-Membran erfolgten zunächst mit der herkömmlichen FTIR-ATR-Anordnung. Im Falle der Silikon-PEG-Membran ist die Wasserdiffusion auch mit dieser ATR-Anordnung auswertbar (vergleiche 5.1.3). Der Prozess lässt sich anhand des Diffusionskoeffizienten charakterisieren.

Für dessen Ermittlung wurde das in Kapitel 4 beschriebene entwickelte mathematische Modell angewandt. Bei den Wasserdiffusionsexperimenten mit der bisher genutzten ATR-Anordnung verbleibt der Diffusant in der Silikon-PEG-Membran und fließt nicht aus ihr heraus. Aus diesem Grund wurde eine zusätzliche Akzeptorhöhe, welche nach Gleichung 4.7 (Kapitel 4) ein weiteres Akzeptorvolumen definiert, als Null angesehen. Die Berechnung des Diffusionskoeffizienten von Wasser in der Membran erfolgte durch eine Anpassungsrechnung auf der Basis von Gleichung 4.7 an die experimentellen Daten (siehe 4).

Je ähnlicher der Kurvenverlauf zwischen der Messkurve und den berechneten Daten ist, desto mehr spiegelt der Verlauf der experimentell ermittelten Daten einen passiven Diffusionsprozess wieder.

Die integrierten Bandenflächen der isolierten Deformationsschwingung des Wassers als eine Funktion der Zeit wurden angewandt, um die Diffusionskoeffizienten von Wasser in der Silikon-PEG-Membran zu berechnen (siehe 3.4).

Mountz et al. und Sammon et al. nutzten dieses etablierte Verfahren bereits, um mit Hilfe der ATR-Technik die Wasserdiffusion in Polymerfilmen zu charakterisieren (Mountz et al. 2001, Sammon et al. 2000). Diese Methode ist an die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes geknüpft. Es wird davon ausgegangen, dass die absorbierte Energie proportional zur Anzahl der Moleküle pro Volumeneinheit der Probe (Konzentration) und zur optischen Weglänge ist.

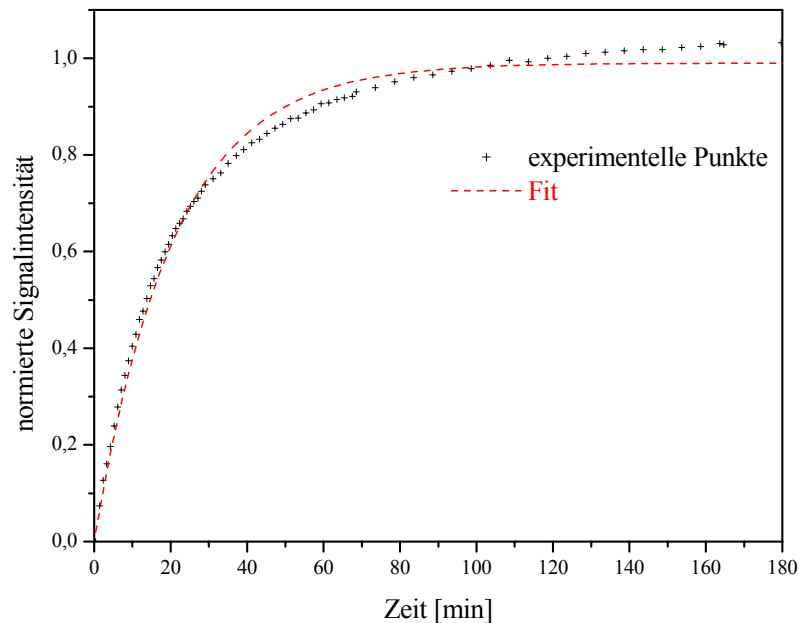


Abb. 33: Zunahme der normierten Signalintensität von Wasser während der Penetration in eine Silikon-PEG-Membran

Die quantitative Auswertung der experimentell ermittelten spektroskopischen Werte geht in diesem Fall von der Einhaltung mehrerer an die Probe gestellter Bedingungen aus.

Dementsprechend werden gleichermaßen ein homogenes zu untersuchendes Medium und eine konstante Eindringtiefe des Strahles in die Probe vorausgesetzt (Coates 2002). Bei Variationen der Eindringtiefe des Messstrahles in das zu untersuchende Medium sind Abweichungen von der Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes beschrieben (Griffiths 2002).

Die geringen Divergenzen der gefitteten Kurve von den experimentellen Daten lassen sich mit den während des Diffusionsvorganges auftretenden Kontaktänderungen zwischen Membran und Kristall begründen (siehe 5.1.3). Als quantitatives Maß für diese Abweichungen sind die relativen Vertrauensintervalle der jeweiligen berechneten Diffusionskoeffizienten angegeben, deren größter Wert lediglich $\pm 7,9\%$ beträgt (Tabelle 2). In Kapitel 5.1.3 konnte gezeigt werden, dass sich die Zusammensetzung im detektierten Bereich des Systems Silikon-PEG-Membran/Wasser minimal ändert. Aus diesen Kontaktänderungen ist zu schlussfolgern, dass die optischen Eigenschaften im detektierten Probenbereich gering variieren. In diesem Fall verändert sich der Brechungsindex und demnach die Eindringtiefe des IR-Strahles in die Probe.

Bei den Diffusionsexperimenten mit der herkömmlichen ATR-Anordnung kann nicht mit Sicherheit von der uneingeschränkten Aufrechterhaltung eines konstanten Kontaktes zwischen Probe und Messkristall sowie gleichbleibenden optischen Eigenschaften im detektierten Bereich ausgegangen werden.

Der wesentliche Prozess, den der Kurvenverlauf der experimentell ermittelten Daten widerspiegelt, ist nichtsdestoweniger der Diffusionsprozess.

Im Gegensatz zu der ATR-Diffusionszelle (siehe Kapitel 7), bei der am unteren Membranrand eine Diffusion des Diffusanten in den Akzeptor und somit ein gleichmäßigerer Diffusionsstrom stattfindet, reichert sich bei der herkömmlichen ATR-Anordnung der Diffusant in der Membran an.

Konträr zu anderen Membranen (vergleiche Kapitel 5.1) sind die Kontaktprobleme bei Diffusionsstudien mit wässrigen Lösungen bei den Silikon-PEG-Membranen jedoch gering ausgeprägt (siehe auch Kapitel 5.1.3). Diese Veränderungen betreffen dabei lediglich die Membranoberfläche (Kapitel 5.1.3 und 5.1.4). Bei der Silikon-PEG-Membran waren dazu mit bloßem Auge keine Veränderungen im Lauf der hier beschriebenen Diffusionsexperimente sichtbar. Die Schichtdickenänderung der gesamten Membran von ca. 1% während der Diffusionsuntersuchung ist vernachlässigbar (Tabelle 3). Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass die Annahme eines konstanten Diffusionsweges für das Wasser durch die Membran im mathematischen Modell gerechtfertigt ist (Kapitel 4).

Unflexible Membranen und jene mit einer unebenen Oberfläche, wie die verwendeten Rinderhufmembranen (siehe 7.3), lassen sich dagegen nicht ohne zusätzliche Krafteinwirkung in einen engen optischen Kontakt mit der herkömmlichen Anordnung bringen. Bei der vorliegenden Silikon-PEG-Membran handelt es sich um das bestmögliche getestete Membranmodell für die ATR-Anordnung (siehe 5.1 - 5.1.2). Die in dieser Arbeit entwickelte Membran eignet sich ebenfalls für Diffusionsstudien mit weiteren Arzneistoffen. Entsprechende Ergebnisse, welche die Permeabilität der Membran für weitere Substanzen nachweisen, sind im Anhang dargestellt (Abb. A 1-Abb. A 4). Der Fokus der Arbeit wurde dahingehend gerichtet, die Methode für die Charakterisierung von Diffusionsvorgängen weiter zu entwickeln. Sie sollte dahingehend verbessert werden, den Einfluss möglicher störender Faktoren auf die experimentell ermittelten Daten, anhand derer die Diffusionskoeffizienten berechnet werden, zu minimieren. Zu diesen nachteiligen Umständen zählen überwiegend Kontaktänderungen zwischen Probe und ATR-Kristall (siehe 5.1.3 und 5.1.4).

Da der Schwerpunkt der Arbeit nicht auf der Durchführung einer Membranstatistik liegt, sondern auf der Entwicklung einer ATR-Methode zur genauen Charakterisierung von Diffusionsprozessen, wurde vielmehr das Interesse auf die sorgfältige Analyse der Einzelmessungen gelegt.

Tabelle 2: Werte der Membrandicke, der ausgewerteten Messzeit und des Diffusionskoeffizienten für die Messungen der Wasserdiffusion durch eine Silikon-PEG-Membran

Ex-periment	Membrandicke (μm)	Messzeit (min)	D_{Wasser} ($10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$)	relatives Vertrauensintervall in %
1	80 ± 3 (N=10)	180	$3,01 \pm 0,22$	$\pm 7,3$
2	82 ± 1 (N=10)	180	$2,77 \pm 0,22$	$\pm 7,9$
3	79 ± 1 (N=10)	180	$2,83 \pm 0,18$	$\pm 6,4$

Es wurde jede separate Messung für sich eingehend ausgewertet. Dabei setzt sich bereits jedes gesonderte Messspektrum eines Diffusionsexperimentes als Mittelwert aus 32 Einzelscans zusammen. In Tabelle 2 sind die entsprechenden Daten der Einzelmessungen aufgelistet. Bei den Silikon-PEG-Membranen handelt es sich um identisch hergestellte Membranen (Kapitel 3.3.5.2). Es kann insofern davon ausgegangen werden, dass die Diffusionseigenschaften der verwendeten künstlichen Membranen weitgehend übereinstimmen. Der Mittelwert der hier ermittelten Diffusionskoeffizienten für Wasser in der Silikon-PEG-Membran (Tabelle 2) beträgt $(2,87 \pm 0,12) \times 10^{-8} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$. Bei der Anfertigung von Membranen mit deutlich veränderter Schichtdicke kann nicht gewährleistet werden, dass diese im Aufbau und somit in ihren Diffusionseigenschaften mit den hier verwendeten Membranen identisch sind. Die Wahl der Membranschichtdicke erfolgte diesbezüglich möglichst einheitlich, um eine eventuelle zusätzliche Fehlerquelle von vornherein auszuschließen. In diesem Zusammenhang wurde desgleichen die Eventualität einer Quellung der Gesamtmembran untersucht.

Tabelle 3: Membrandicken der Silikon-PEG-Membranen vor und nach den durchgeführten Diffusionsexperimenten

Experiment	Membrandicke (μm) vor dem Experiment	Membrandicke (μm) nach dem Experiment
1	80 ± 3 (N=10)	80 ± 1 (N=10)
2	82 ± 1 (N=10)	83 ± 2 (N=10)
3	79 ± 1 (N=10)	79 ± 2 (N=10)

Die in Tabelle 3 dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass die Schichtdickenänderung der Silikon-PEG-Membranen während der durchgeführten Diffusionsexperimente unbedeutend ist. Im mathematischen Modell wird ein, im Verlauf eines Diffusionsexperimentes konstant bleibender Diffusionsweg des Diffusanten in der Membran zugrunde gelegt (Kapitel 4.3). Die Ergebnisse der hier dargestellten Schichtdickenmessungen stehen nicht im Widerspruch zu der festgestellten geringfügigen Anreicherung des PEGs an der Membranoberfläche

(Kapitel 5.1.3 und 5.1.4). Festzuhalten gilt bei diesem Vergleich, dass die Aufnahme der Höhenprofile mittels AFM ohne direkten Membrankontakt erfolgte (siehe 3.1.2), während bei den Schichtdickenmessungen auf die elastische Membran ein geringer Druck durch den direkten Kontakt zum Messgerät ausgeübt wurde. Minimale vorübergehende Deformationen lassen sich bei dieser Messung nicht ausschließen. Die unter Kapitel 5.1.4 dargestellten Ergebnisse sollen vordergründig Fragen zu den Ursachen der spektralen Änderungen im Verlauf der Diffusionsprozesse mit der herkömmlichen ATR-Anordnung beantworten. Aufgrund der geringen Eindringtiefe des IR-Strahles in die Probe verursachen bereits geringe Veränderungen an der Grenzfläche Membran/ATR-Kristall Modifikationen im Spektrum. Die hier erörterten Ergebnisse (siehe auch 7.2) untermauern indessen den Einsatz der Membran für die beschriebenen Diffusionsstudien, da sie dennoch eine weitestgehend konstant bleibende Gesamtbeschaffenheit aufweist.

Die relativen Vertrauensintervalle bei den Diffusionskoeffizienten, die basierend auf den mittels der herkömmlichen ATR-Anordnung gemessenen Daten der Wasserdiffusion berechnet wurden, liegen bei $\pm 7,3\%$, $\pm 7,9\%$ und $\pm 6,4\%$ (Tabelle 2). Jedes Vertrauensintervall ist bei gleich bleibendem Messfehler ein quantitatives Maß für die Qualität der Anpassungsrechnung auf der Basis des mathematischen Modells an die experimentellen Daten. Insofern ist anhand der Vertrauensintervalle, neben dem Vergleich der Kurvenverläufe von den experimentell ermittelten und den berechneten Daten, die Qualität der mit der jeweiligen Methode bestimmten Diffusionskoeffizienten ersichtlich (siehe auch Kapitel 7.2).

Mit der herkömmlichen ATR-Anordnung (siehe 3.1.1) lassen sich die Diffusionskoeffizienten für Wasser in der Silikon-PEG-Membran schätzen. Dies ist auch anhand der geringen relativen prozentualen Vertrauensintervalle der berechneten Diffusionskoeffizienten ersichtlich. Jedoch wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Einschränkungen und Nachteile der herkömmlichen ATR-Anordnung für Diffusionsuntersuchungen aufgezeigt, die durch den Einsatz der entwickelten ATR-Diffusionszelle vielfach annullierbar sind.

6.2 Deuteriumoxiddiffusion durch eine Silikon-PEG-Membran

Deuterium ist ein Isotop des Wasserstoffs. Es ist chemisch identisch zu Wasserstoff, besitzt aber eine Masse von 2. Diese veränderte Masse ist ursächlich für eine Verschiebung der Bandenpositionen der O-D-Streck- und Deformationsschwingungen von Deuteriumoxid gegenüber den O-H-Schwingungen des Wassers (Smith 1999). Aufgrund der reduzierten Masse der chemischen Bindungen treten die O-D-Schwingungen des Deuteriumoxids bei niedrigeren Wellenzahlen als die O-H-Schwingungen des Wassers auf (Abb. 34). Ähnlich wie im Vergleich Deuteriumoxid -

Wasser (Abb. 34) gezeigt, besitzt auch deuterierter Harnstoff gegenüber der undeuterten Verbindung im ATR-Spektrum die Bandenpositionen bei veränderten Wellenzahlen (Abb. 35, Abb. 36). Die Deuteriumoxiddiffusionsexperimente ermöglichen den direkten Vergleich mit den Ergebnissen der Wasserdiffusionsexperimente (Kapitel 6.1).

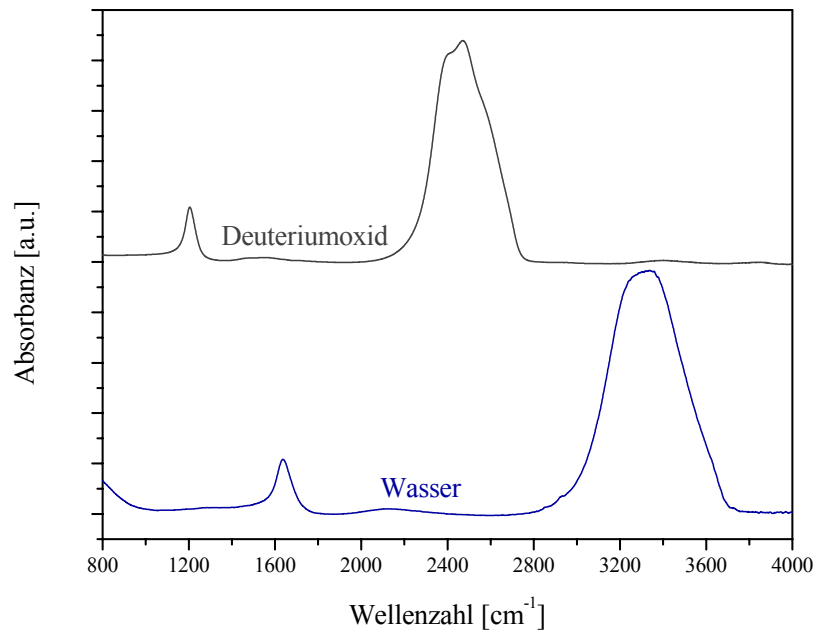


Abb. 34: ATR-Spektren von Wasser und Deuteriumoxid

Deuterierter Harnstoff weist isolierte Banden auf, die sich nicht mit Membran- und Deuteriumoxidbanden überlagern (Abb. 35). Daher stellte sich zusätzlich die Frage, ob eine Diffusion der Substanz in die Membran stattfindet. Die eingesetzte Lösung von 20% deuteriertem Harnstoff (Harnstoff D₄) in Deuteriumoxid entsprach in ihrer prozentualen Zusammensetzung der undeuterten Formulierung, die bei den Wasserdiffusionsexperimenten zum Einsatz kam (Kapitel 6.2). Es wurde deuterierter Harnstoff verwendet, bei dem die H-Atome ausnahmslos durch D-Atome ersetzt sind. In der verwendeten Formulierung kann aufgrund der Substitution sämtlicher H-Atome durch D-Atome kein zusätzlicher Prozess eines Isotopenaustausches stattfinden. Eine genaue Zuordnung der Bandenpositionen von deuteriertem Harnstoff wurde von Hadzi et al. beschrieben und mit den Schwingungen der undeuterten Verbindung verglichen (Hadzi et al. 1976). Sowohl deuterierter Harnstoff als auch deuteriertes Wasser weisen, im Gegensatz zu den undeuterten Verbindungen, charakteristische Bandenpositionen auf, die sich nicht gegenseitig überlagern. Weiterhin befinden sich diese Bandenpositionen in Wellenzahlbereichen, bei denen keine Banden von Membranbestandteilen auftreten (Abb. 35, Abb. 36). Demnach sollten mit dieser deuterierten Formulierung, ergänzend zur normalen wässrigen Harnstofflösung,

gezieltere Aussagen zum Diffusionsverhalten der Substanzen getroffen werden. Obgleich reiner deuterierter Harnstoff Bandenmaxima bei Wellenzahlen aufweist, an denen keine Membranbanden auftreten, konnte keine Diffusion der Substanz detektiert werden. Dieses Verhalten lässt sich darin begründen, dass die Harnstoffkonzentration in der Membran unter der Nachweisgrenze der Methode liegt. Abb. 37 zeigt eine Auswahl der detektierten Spektren des Systems Silikon-PEG-Membran/Deuteriumoxid mit 20% deuteriertem Harnstoff zu Beginn des Experimentes sowie nach 15 und 180 min Diffusionszeit. Hieran ist erkennbar, dass mit zunehmender Diffusionszeit die Bande des deuterierten Wassers (O-D-Deformationsschwingung) anwächst.

Die Diffusionskoeffizienten von Deuteriumoxid in der Membran wurden (siehe Kapitel 6.1) durch eine Anpassungsrechnung auf der Basis des mathematischen Modells aus Gleichung 4.7 (Kapitel 4) an die experimentellen Daten berechnet (Abb. 38). Der Verlauf von den experimentellen Daten und der gefitteten Kurve bei der Deuteriumoxiddiffusion ist erwartungsgemäß vergleichbar dem Verlauf der beiden Kurven bei der Wasserdiffusion (Abb. 33).

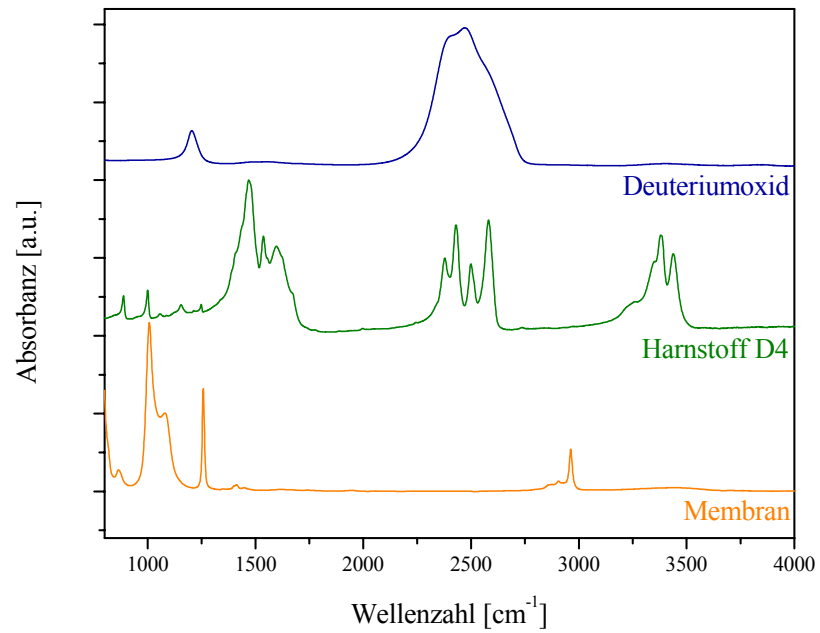


Abb. 35: ATR-Spektren von Deuteriumoxid und deuteriertem Harnstoff. Zum Vergleich ist das Spektrum der Silikon-PEG-Membran angegeben.

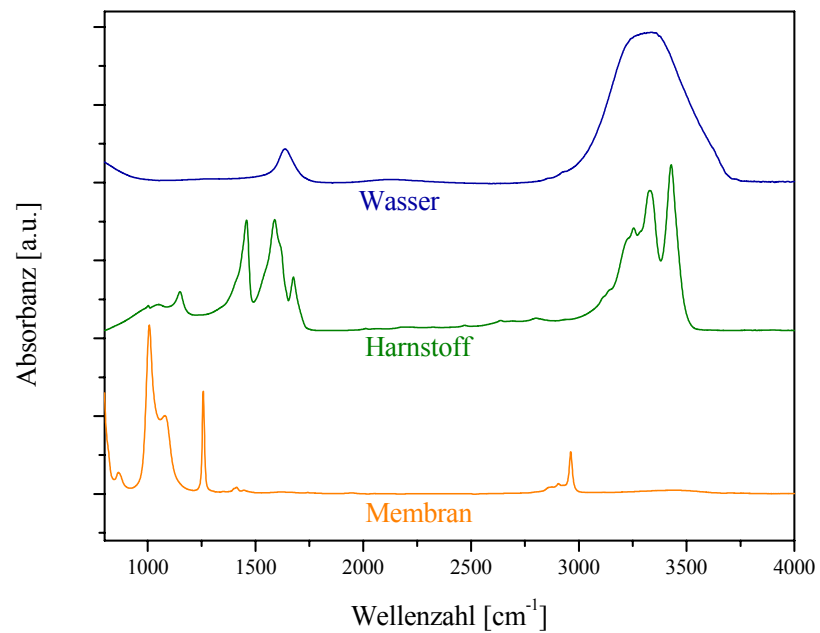


Abb. 36: ATR-Spektren von Harnstoff und Wasser. Zum Vergleich ist das Spektrum der Silikon-PEG-Membran angegeben.

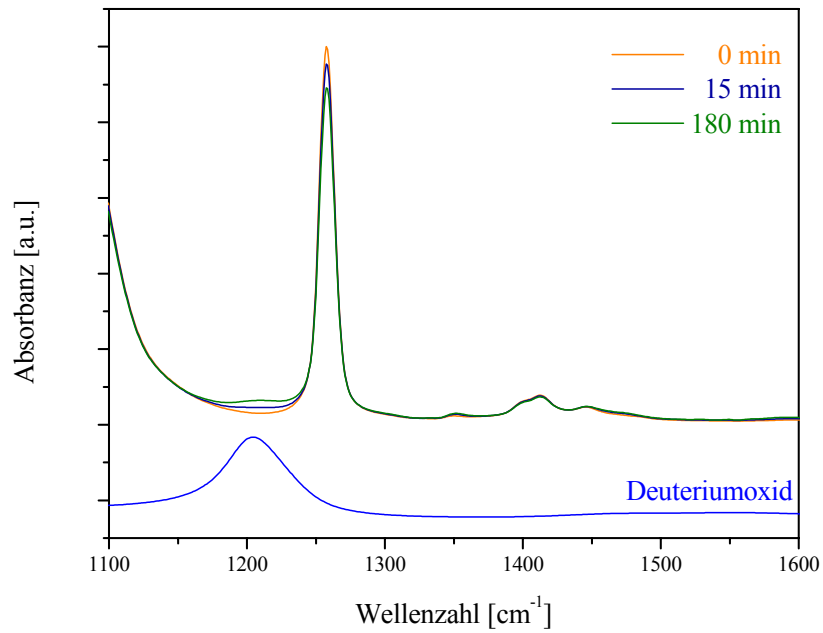


Abb. 37: ATR-Spektren des Diffusionsexperimentes der Deuteriumoxiddiffusion durch eine Silikon-PEG-Membran zu verschiedenen Zeitpunkten.

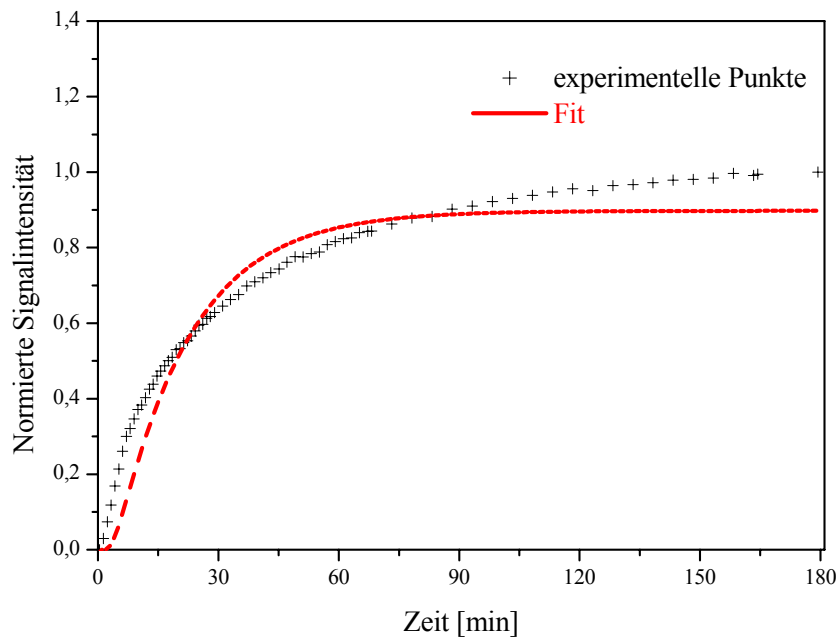


Abb. 38: Zunahme der normierten Signalintensität während des Diffusionsexperimentes von Deuteriumoxid in eine Silikon-PEG-Membran mit der herkömmlichen ATR-Anordnung.

Die Ursachen für die geringen Abweichungen der berechneten Kurve von den experimentellen Daten lassen sich durch die mit der herkömmlichen Anordnung im Verlauf der Diffusionsexperimente nahezu unvermeidbaren störenden Änderungen im Kontakt zwischen Membran und Messkristall begründen. Das Ausmaß dieser geringen Abweichungen wird durch das relative Vertrauensintervall der berechneten Diffusionskoeffizienten quantifiziert (Tabelle 4). Diese Kontaktänderungen wurden bereits bei den Wasserdiffusionsexperimenten beschrieben (siehe 6.1) und wie erwartet auch bei allen Diffusionsvorgängen von Deuteriumoxid festgestellt. Zusätzlich findet beim Versetzen des PEGs mit Deuteriumoxid ein Austausch von Wasserstoffatomen der freien alkoholischen OH-Gruppen gegen Deuteriumatome statt (Hesse et al. 1995, Rücker et al. 1992). Die entsprechenden Werte für die Deuteriumoxid-diffusionsexperimente sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Werte der Membrandicke, der ausgewerteten Messzeit und des Diffusionskoeffizienten für die Messungen der Deuteriumoxiddiffusion durch eine Silikon-PEG-Membran

Ex-periment	Membrandicke (µm)	Messzeit (min)	$D_{\text{Deuteriumoxid}}$ ($10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$)	relatives Vertrauensintervall in %
1	82 ± 2 (N=10)	180	2,62 ± 0,21	± 8,0
2	86 ± 5 (N=10)	180	3,23 ± 0,32	± 9,9
3	83 ± 3 (N=10)	180	2,69 ± 0,22	± 8,2

Die Diffusionskoeffizienten für Deuteriumoxid in der Silikon-PEG-Membran stimmen mit den Diffusionskoeffizienten für Wasser in der Membran überein (siehe 6.1). Der Mittelwert der Diffusionskoeffizienten von Deuteriumoxid in der künstlichen Membran (Tabelle 4) beträgt $(2,85 \pm 0,33) \times 10^{-8} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$. Die relativen Vertrauensintervalle der einzelnen berechneten Kurven liegen ebenfalls im einstelligen Prozentbereich (siehe Tabelle 4).

Das chemische Verhalten einer deuterierten und der gleichen undeuterierten Verbindungen ist kongruent, da sich sowohl die Struktur der Elektronenorbitale als auch die Molekülgröße gleichen. Aus diesem Grund lässt sich von den Erkenntnissen aus den Experimenten mit den deuterierten Verbindungen auf die Experimente mit den undeuterierten Verbindungen schlussfolgern. Mit der Silikon-PEG-Membran kann auch die Deuteriumoxiddiffusion mithilfe der herkömmlichen ATR-Anordnung charakterisiert werden. Die anhand der deuterierten Formulierung gewonnenen Ergebnisse bestätigen die in Kapitel 6.1 gewonnenen Erkenntnisse.

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.

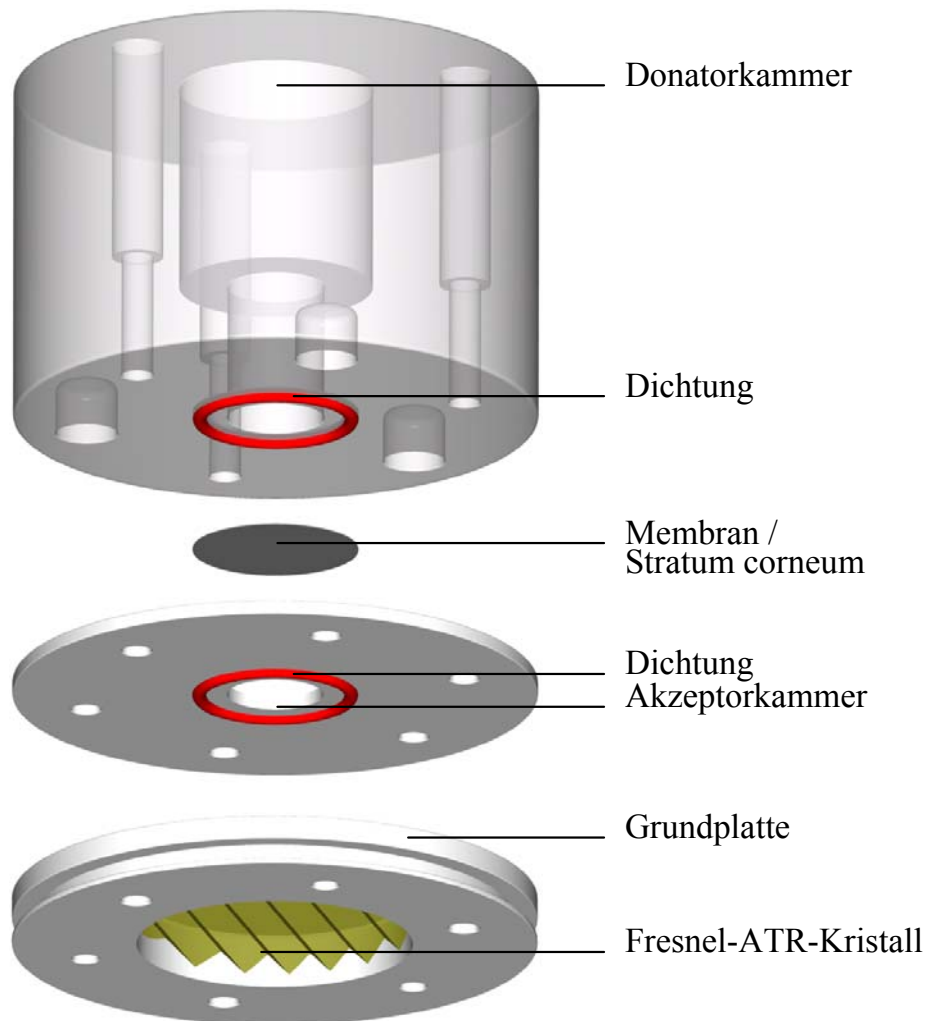


Abb. 39: Abbildung der entwickelten FTIR-ATR-Diffusionszelle

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.

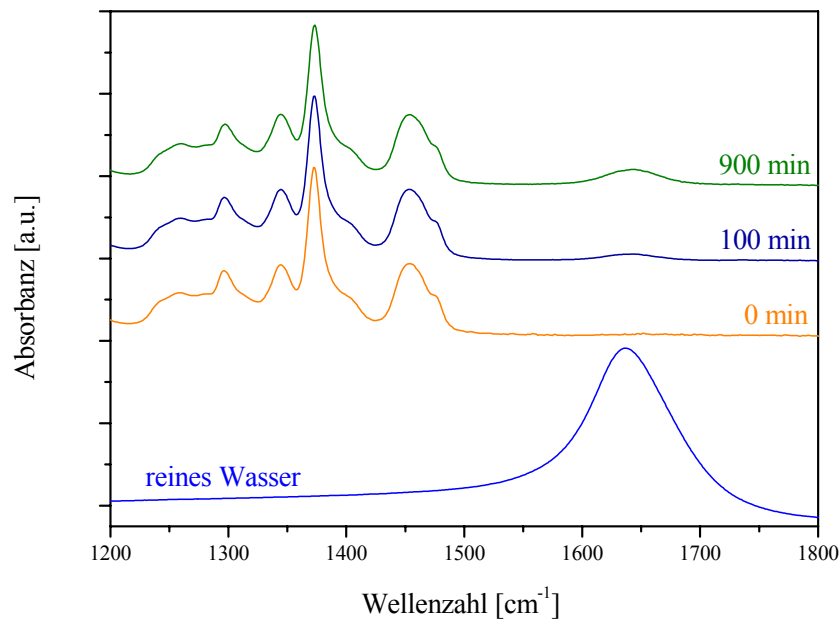


Abb. 40: ATR-Spektren des Systems Wasser/Silikon-PEG-Membran/Polypropylenglykol zu verschiedenen Zeiten. Das Spektrum zum Zeitpunkt 0 min entspricht reinem Polypropylenglykol. Zum Vergleich ist das Spektrum von reinem Wasser abgebildet.

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.

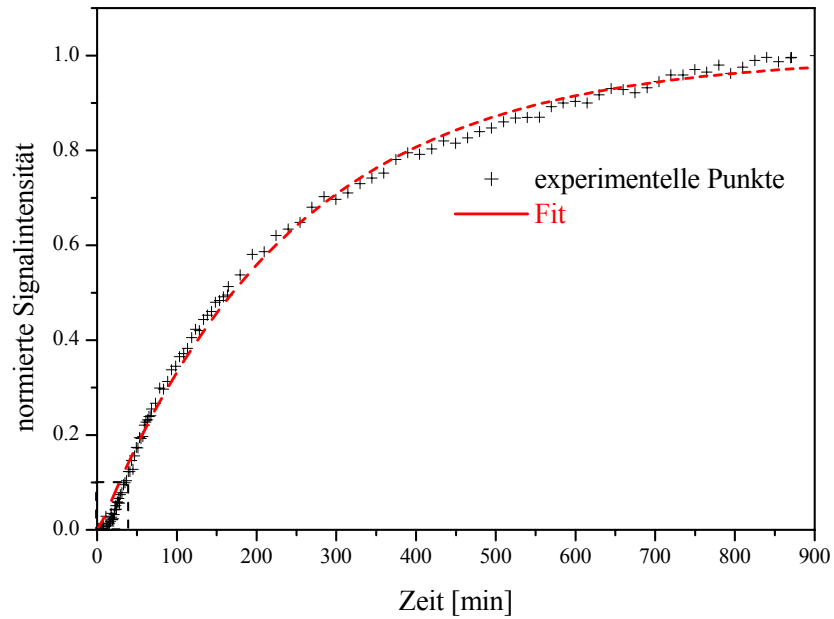


Abb. 41: Zunahme der normierten Signalintensität von Wasser während der Diffusion von Wasser aus einer als Donator fungierenden 20%-igen wässrigen Harnstofflösung durch eine Silicon-PEG-Membran. Die Akzeptorlösung bestand aus PPG 2000.

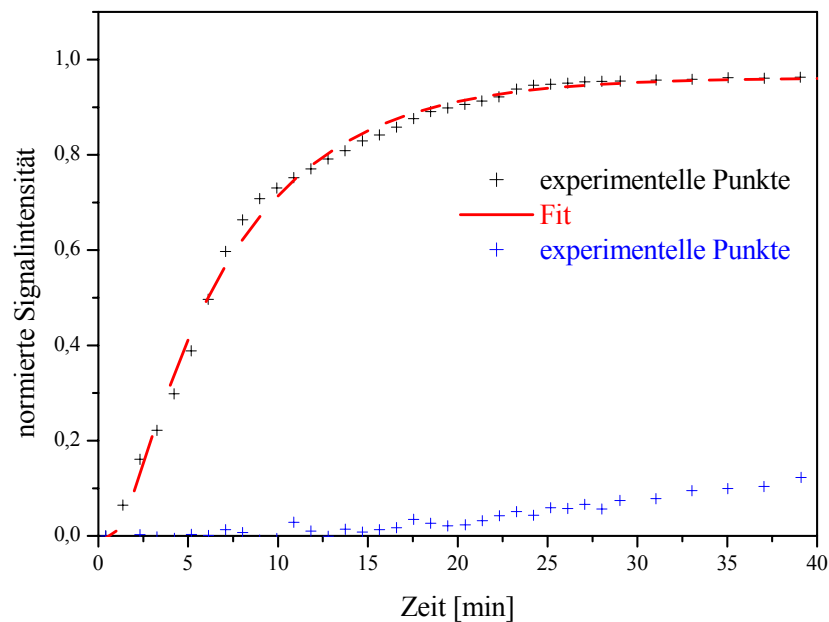


Abb. 42: Zunahme der normierten Signalintensität von Wasser während der Wasserdiffusion ohne Membran direkt in PPG 2000 (schwarze Punkte). Als Donator diente Wasser und als Akzeptor PPG 2000. Zum Vergleich ist die Zunahme der normierten Signalintensität von Wasser zu Beginn des Wasserdiffusionsexperimentes (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_{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.

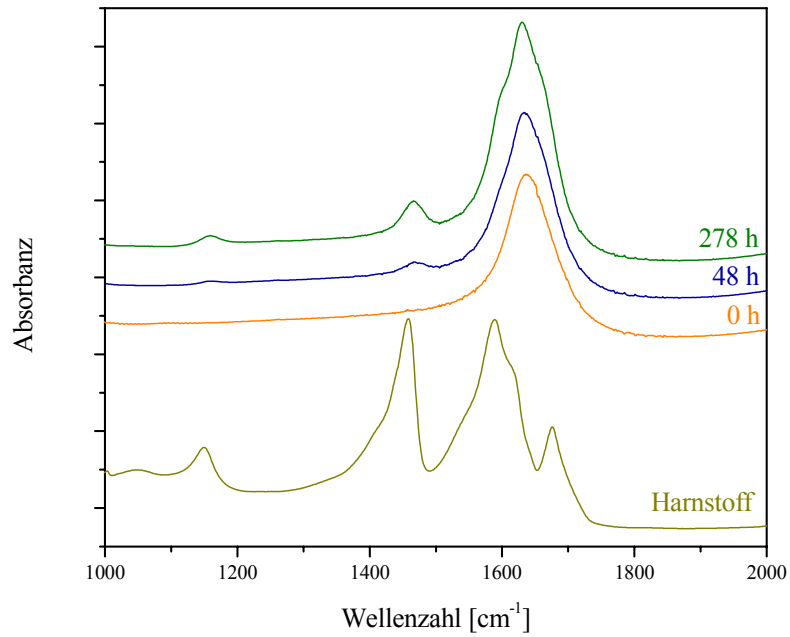


Abb. 43: ATR-Spektren des Systems Harnstoff/Stratum corneum/Wasser zu verschiedenen Zeiten des Diffusionsexperimentes. Zum Vergleich ist das Spektrum von reinem Harnstoff angegeben.

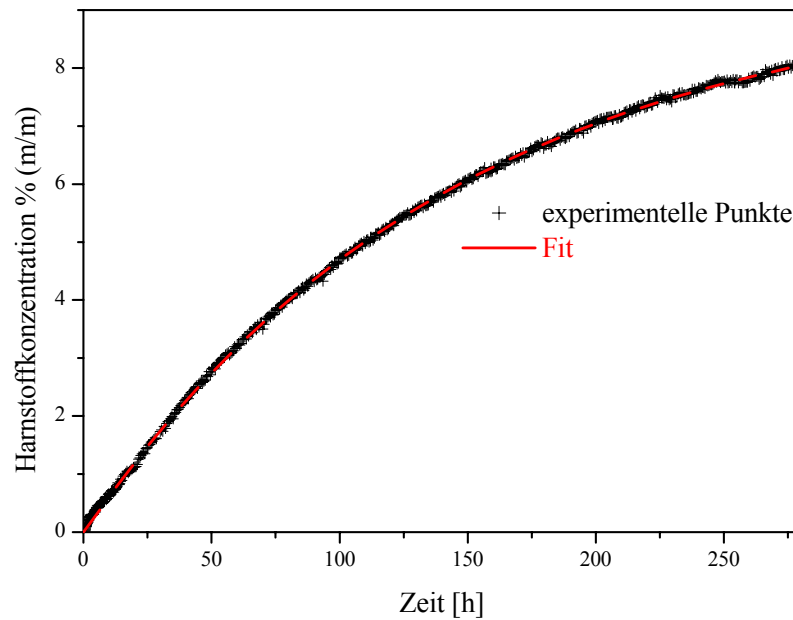


Abb. 44: Zunahme der Harnstoffkonzentration im Akzeptor während der Diffusion von Harnstoff durch Stratum corneum

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).

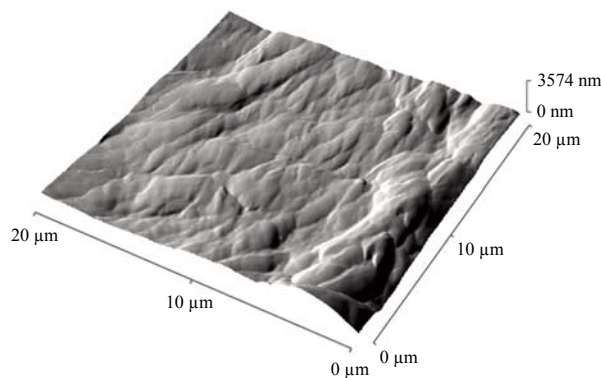


Abb. 45: AFM-spektroskopische Aufnahme der Oberfläche von isoliertem Stratum corneum

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.

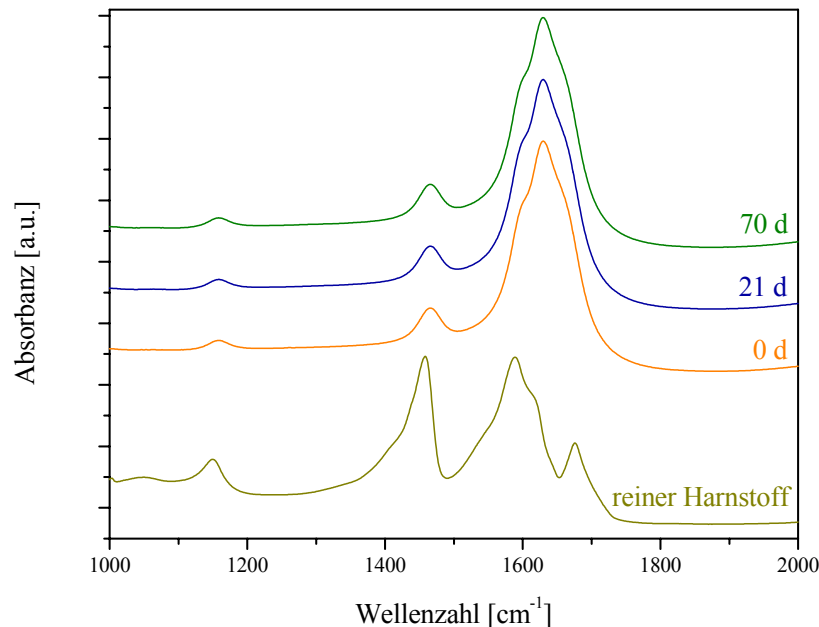


Abb. 46: ATR-Spektren einer 10%-igen wässrigen Harnstofflösung, frisch hergestellt (0 d) und nach verschiedenen Lagerzeiten. Zum Vergleich ist das Spektrum von reinem Harnstoff angegeben.

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.

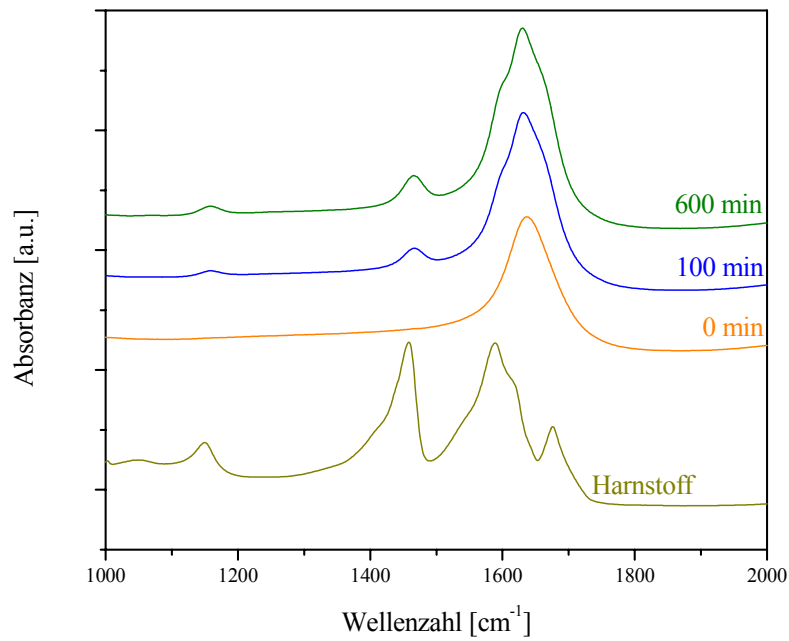


Abb. 47: ATR-Spektren des Systems Harnstoff/Rinderhufmembran/Wasser zu verschiedenen Zeiten des Diffusionsexperimentes. Zum Vergleich ist das Spektrum von reinem Harnstoff angegeben.

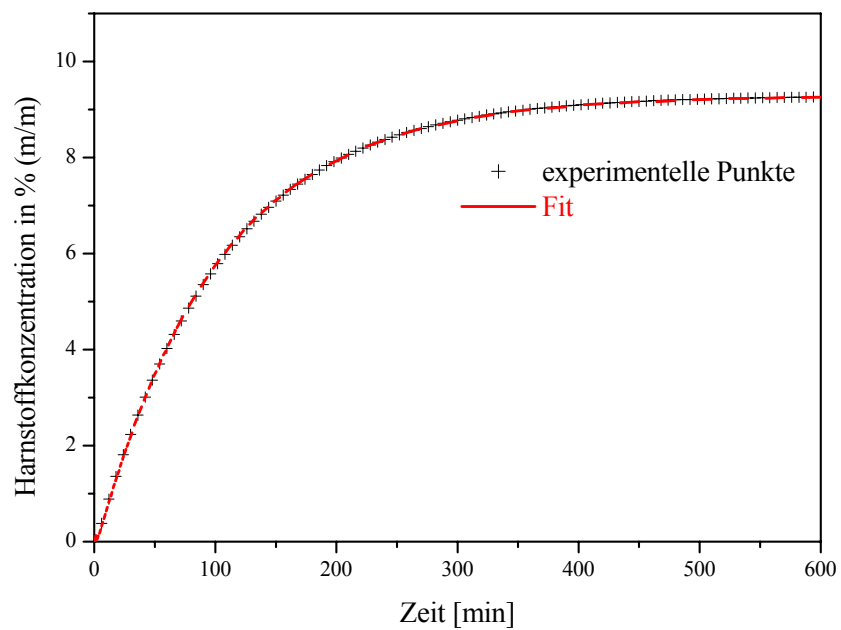


Abb. 48: Zunahme der Harnstoffkonzentration im Akzeptor während des Diffusionsexperimentes von Harnstoff durch eine Rinderhufmembran.

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.

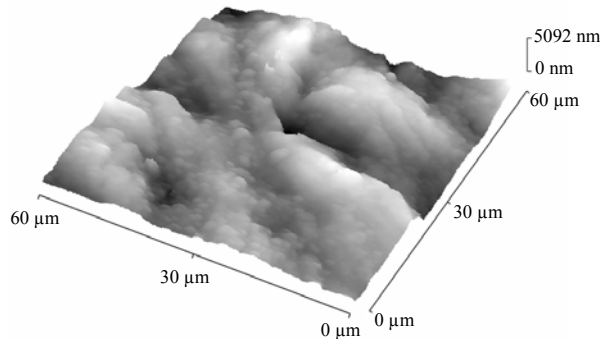


Abb. 49: AFM-spektroskopische Aufnahme der Oberfläche einer Rinderhufmembran

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.

8. Zusammenfassung und Ausblick

Die Methode der ATR-Technik für Penetrationsexperimente ermöglicht die nichtinvasive Realzeitdetektion von Wirkstoffpenetrationen mit einer geringen Probenvorbereitung. Der Einsatzbereich der bisherigen ATR-Anordnung für Diffusionsstudien ist jedoch begrenzt, da vielfach ein notwendiger enger, gleichmäßiger optischer Kontakt zwischen einer Probe und dem ATR-Kristall im Verlauf eines Experimentes nicht einzuhalten ist. Zielstellung dieser Arbeit war es, hydrophile Diffusionsprozesse mit Hilfe einer wässrigen Harnstofflösung durch Modellmembranen und durch isoliertes humanes Stratum corneum nichtinvasiv mit der ATR-Technik zu charakterisieren. Die Ergebnisse sind im Folgenden zusammengefasst.

1. Da die humane Haut in ihren Diffusionseigenschaften großen intra- und interindividuellen Schwankungen unterliegt und sich am isolierten humanen Stratum corneum mit der bisherigen ATR-Anordnung keine Diffusionsstudien mit der wässrigen Harnstofflösung aufgrund einsetzender Filmbildung im Detektierbereich durchführen ließen, musste eine Modellmembran ausgewählt werden. Hierbei konnte in Diffusionsexperimenten mit der Glycerol beladenen Collodiummatrixmembran nachgewiesen werden, dass diese vielfach verwendete Membran für Diffusionsstudien mit wässrigen Formulierungen nicht eingesetzt werden sollte. In diesen Fällen findet ein ausgeprägtes Auswaschen des Glycerols aus der Collodiummatrix statt. Aufgrund der mit dieser Membran erhaltenen Ergebnisse wurde ein neues Membranmodell entwickelt.

2. Es gelang, mit der Silikon-PEG-Membran eine künstliche Modellmembran herzustellen, welche gegenüber der verwendeten wässrigen Formulierung hinsichtlich ihrer Schichtdicke und der Inkorporierung des Polyethylenglykols in der Matrix stabil ist. Sie eignet sich aufgrund ihrer beschriebenen Eigenschaften, im Gegensatz zu den anderen getesteten Membranmodellen, neben dem Einsatz mit der entwickelten Diffusionszelle, auch für Diffusionsstudien mit einer wässrigen Harnstofflösung und der herkömmlichen ATR-Anordnung. Beide ATR-Anordnungen konnten am Beispiel der Wasserdiffusionsexperimente verglichen werden.

3. Anhand der Diffusionsstudien mit der herkömmlichen ATR-Technik wurden die Nachteile dieser Technik aufgezeigt. Sie resultieren hauptsächlich in einem während der Experimente mit wässrigen Formulierungen nicht konstant bleibendem Kontakt zwischen einer Membran und dem ATR-Kristall. Dies ist aufgrund der geringen Eindringtiefe des IR-Strahles in die Probe besonders kritisch zu betrachten. Bei den durchgeführten ATR-spektroskopischen Experimenten wurden die aufgetretenen

spektralen Veränderungen erklärt. Durch Rasterkraftmikroskopieexperimente ließen sich die bei der Silikon-PEG-Membran aus den spektroskopischen Ergebnissen festgestellte minimale Anreicherung des PEGs an der Membranoberfläche bestätigen. Diese Anreicherung verursacht geringfügige spektrale Veränderungen, die in diesem Fall nicht Diffusionsprozessen durch die Membran entsprechen. Der Füllstoff verbleibt jedoch in der Membranmatrix. Die Diffusionsexperimente mit einer Lösung von deuteriertem Harnstoff in Deuteriumoxid weichen nicht von den Ergebnissen, die mit undeuterten Verbindungen erzielt wurden, ab.

4. Mit der Entwicklung der ATR-Diffusionszelle gelang es, die Vorzüge sowohl der ATR-Technik als auch der Franz'schen Diffusionszelle in einer neuen Methodik zu kombinieren. Die Messbedingungen sind bei der ATR-Diffusionszelle im Gegensatz zur herkömmlichen ATR-Anordnung sicher und genau definiert. Kontaktprobleme, wie sie bei der bisherigen ATR-Anordnung zwischen Probe und ATR-Kristall auftreten können, kommen bei dieser neuen Methodik aufgrund einer optimalen Verbindung des flüssigen Akzeptors zum Messkristall nicht vor. Die gleichmäßige Hydratation biologischer Membranen während eines Diffusionsexperimentes wird in der ATR-Diffusionszelle durch deren beidseitige vollständige Benetzung mit Wasser gewährleistet.

5. Das entwickelte mathematische Modell ermöglichte es, bei den Diffusionsexperimenten die jeweiligen Diffusionskoeffizienten in den Membranen zu berechnen. Hiermit kann auch ein zusätzlicher Akzeptor zwischen Membran und Kristall in die Berechnung der Diffusionskoeffizienten einbezogen werden, in dem an der Membranunterseite eine dynamische Randbedingung berücksichtigt wird. Mit Hilfe dieses Modells gelang es, die Diffusionskoeffizienten in Membranen anhand der experimentellen Daten, die sowohl mit der herkömmlichen ATR-Anordnung als auch mit der entwickelten ATR-Diffusionszelle ermittelt wurden, zu berechnen.

6. Der Diffusionskoeffizient für Harnstoff, ein für die dermale Applikation relevanter Arzneistoff, konnte erstmals im humanen Stratum corneum bestimmt werden. Dies ließ sich durch in vitro Experimente nichtinvasiv durch Realzeitmessung mit Hilfe der entwickelten ATR-Diffusionszelle realisieren. Diffusionsgeschwindigkeiten von topisch relevanten Arzneistoffen in der äußeren Hautschicht können als Anhaltspunkt für die Entwicklung und Verbesserung von dermalen Arzneiformungen dienen.

7. Es konnte gezeigt werden, dass sich die ATR-Diffusionszelle auch für den Einsatz mit weiteren Membranen eignet. Sie ließ sich für zusätzliche Harnstoffdiffusionsexperimente an den biologischen Rinderhufmembranen einsetzen. Diffusionskoeffizienten in diesen Membranen, die auch als Modell für Nagelplatten

dienen, wurden durch nichtinvasive Realzeitmessungen bestimmt. Die Diffusionsgeschwindigkeit des Harnstoffs ist in der Rinderhufmembran *in vitro* etwa 1000fach schneller als im isolierten Stratum corneum. Die hohe Permeabilität der Rinderhufmembranen für gut wasserlösliche Arzneistoffe konnte am Beispiel des Harnstoffs mit der ATR-Diffusionszelle bestätigt werden.

Die Untersuchungen lieferten eine Vielzahl von Ergebnissen und warfen gleichzeitig neue Fragen auf, deren Beantwortung den Rahmen der vorliegenden Arbeit deutlich überschritten hätte und von denen nur einige repräsentative Punkte erwähnt seien. Dabei wäre von Interesse zu analysieren, inwieweit die Barriere Stratum corneum für hydrophile Stoffe über den Weg der Nagelplatte umgangen werden kann. Des Weiteren könnten in nachfolgenden Arbeiten Diffusionsprozesse in Membranen, die sich in ihren Eigenschaften, wie z.B. in ihrer Schichtdicke, im Verlauf des Experimentes verändern, untersucht werden. Dies erfordert jedoch die Entwicklung eines anderen mathematischen Modells, welches von einem veränderlichen Diffusionskoeffizienten ausgeht. Hierfür müssten ebenfalls weitere Größen, wie die zeitabhängige Quellung der Membran, detektiert werden. Die Rinderhufmembranen sollten auf ihre Eignung als universelle biologische hydrophile Modellmembranen weiteren Untersuchungen unterzogen werden. Ferner könnte auch neben reinen Arzneistoffen die Charakterisierung zusätzlicher Stoffe, denen die Haut ausgesetzt ist, wie dermal applizierte Formulierungen und deren Einzelbestandteile, Kosmetika und Umweltsubstanzen, auf ihr Diffusionsverhalten durch die äußere Hautschicht von Bedeutung sein. Die in den umfangreichen Untersuchungen gelieferten Ergebnisse zeigen, dass die entwickelte Methodik der ATR-Diffusionszelle weitere vielfältige neue Möglichkeiten eröffnet, die lohnenswert erscheinen, Gegenstand weiterer Forschungen zu sein.

9. Literatur

1. C. Ackermann, G.L. Flynn, C.J. van Wyk: *Percutaneous absorption of urea*; Int. J. Cosm. Sci. 7 (1985); 251-64
2. A. Agren, B. Nilsson, R. Sjobqvist, A. Brodin: *Penetration of organic compounds and ion pairs through nylon membranes*; Acta Pharm. Suec. 11 (1974); 523-32
3. I. Alberti, Y.N. Kalia, A. Naik, J.-D. Bonny, R.H. Guy: *In vivo assessment of enhanced topical delivery of terbinafine to human stratum corneum*; J. Control. Release 71 (2001); 319-27
4. J.A. Alkrad, Y. Mrestani, R.H.H. Neubert: *The release profiles of intact and enzymatically digested hyaluronic acid from semisolid formulations using multi-layer membrane system*; Eur. J. Pharm. Biopharm. 56 (2003); 37-41
5. C.N. Banwell, E.M. McCash: *Molekülspektroskopie*; München: R. Oldenbourg Verlag, 1999
6. B.W. Barry: *Structure, function, diseases, and topical treatment of human skin*; In: B.W. Barry: *Dermatological Formulations*; New York, Basel: Marcel Dekker, 1983, 1-48
7. B.W. Barry, A.R. Brace: *Permeation of oestrone, oestradiol, oestriol and dexamethasone across cellulose acetate membrane*, J Pharm. Pharmacol. 29 (1977); 397-400
8. B.W. Barry, H.G.M. Edwards, A.C. Williams: *Fourier transform Raman and Infrared vibrational study of human skin: assignment of spectral bands*; J. Raman Spectrosc. 23 (1992); 641-645
9. B.W. Barry, D.I. El Eini: *Influence of non-ionic surfactants on permeation of hydrocortisone, dexamethasone, testosterone and progesterone across cellulose acetate membrane*; J Pharm. Pharmacol. 28 (1976); 219-27
10. B. Bendas: *Untersuchungen zum Mechanismus der in vitro- Penetration lipophiler Arzneistoffe aus binären und ternären Vehikelsystemen in künstliche und natürliche Akzeptoren*; Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1993)
11. B. Bendas, U. Schmalfuß, R. Neubert: *Influence of propylene glycol as a cosolvent on mechanisms of drug transport from hydrogels*; Int. J. Pharm. 116 (1995); 19-30
12. E. Bien: *Biological effect and importance of inorganic and organic silicia compounds*; Pharmazie 26 (1971); 577-85
13. I.H. Blank: *Factors which influence the water content of the stratum corneum*; J. Invest. Dermatol. 18 (1952); 433-440
14. H.E. Bodde, I. van den Brink, H.K. Koerten, F.H.N. de Haan: *Visualization of in vitro percutaneous penetration mercuric chloride; transport through intercellular space versus cellular uptake through desmosomes*; J. Contr. Rel. 15 (1991); 227-236
15. H.E. Bodde, L.A.R.M. Pechthold, M.T.A. Subnel, F.H.N. de Haan: *Monitoring in vivo skin hydration by liposomes using infrared spectroscopy in conjunction with tape stripping*; Skin-Pharmacol. 9 (1996); 69-7

16. K. Bohnsack, I. Tausch, J. Gaßmüller, F. Rippke: *Wirksamkeit auf das Symptom „trockene Haut“ und Langverträglichkeit von Lazeran Lotion 10% Urea bei Patienten mit atopischem Ekzem*; Z. Hautkrankh. 72 (1997); 34-9
17. D. Bommannan, R.O. Potts, R.H. Guy: *Examination of stratum corneum barrier function in vivo by infrared spectroscopy*; J. Invest. Dermatol. 95 (1990); 403-408
18. M. Branagan, D.H. Chenery, S. Nicholson: *Use of Infrared Attenuated Total Reflectance Spectroscopy for the in vivo measurement of hydration level and silicone distribution in the stratum corneum following skin coverage by polymeric dressing*; Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol. 13 (2000); 157-64
19. L. Brancalion, M.P. Bamberg, N. Kollias: *Spectral differences between stratum corneum and sebaceous molecular components in the Mid-IR*; Appl. Spec. 54 (2000); 1175-1182
20. L. Brancalion, M.P. Bamberg, T. Sakamaki, N. Kollias: *Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a possible method to investigate biophysical parameters of stratum corneum in vivo*; J. Invest. Dermatol. 116 (2001); 380-386
21. H. Brandt: *Bestimmung diffusionsspezifischer Parameter mit Hilfe der IR-ATR Spektroskopie*; Experimentelle Technik der Physik 33 (1985); 423-31
22. H. Brandt, K. Hemmelmann: *Zum Nachweis nichtlinearer Sorption an der Grenzfläche Polyethylen/ATR-Element bei der Diffusion von Ethylacetat in Polyethylenfilmen*; Experimentelle Technik der Physik 35 (1987); 349-58
23. P. Buchwald, N. Bodor: *A simple, predictive, structure-based skin permeability model*; J. Pharm. Pharmacol. 53 (2001); 1087-98
24. V. Buraphacheep, D.E. Wurster: *The use of Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy to determine the diffusion coefficients of alcohols in polydimethylsiloxane*; Pharm. Res. 11 (1994); 561-565
25. A.S. Cantor: *Drug and excipient diffusion and solubility in acrylate adhesives measured by infrared-attenuated total reflectance (IR-ATR) spectroscopy*; J. Contr. Rel. 61 (1999); 219-31
26. R. Chambers, G.S. Reniy: *The structure of the cells in tissues as revealed by microdissection. I. The physical relationships of the cells in epithelia*; Am. J. Anat. 35 (1925); 385-402
27. S.C. Chattaraj, J. Swarbrick, I. Kanfer: *A simple diffusion cell to monitor drug release from semi-solid dosage forms*; Int. J. Pharm. 120 (1995); 119-24
28. D.S.L. Chow, I. Kaka, T.I. Wang: *Concentration-dependent enhancement of 1 dodecylazacycloheptan-2-one on the percutaneous penetration kinetics of triamcinolone acetonide*; J. Pharm. Sci. 73 (1984); 1794-1799
29. K.P. Chowdary, R.A. Naidu: *Transdermal diffusion of diclofenac sodium through CA membrane and abdominal skin*; Eastern Pharmacist 36 (1993); 137-40
30. M.J. Clancy, J. Corish, O.I. Corrigan: *A comparison of the effects of electrical current and penetration enhancers on the properties of human skin using FTIR and calorimetric DSC methods*; Int. J. Pharm. 105 (1994); 47-56

31. J. Coates: *Classical methods of quantitative analysis*; In: J.M. Chalmers, P.R. Griffiths: *Handbook of vibrational spectroscopy. Volume 3. Sample characterization and spectral data processing*; Chichester: Wiley, 2002, 2235-2257
32. J.P. Conzen: *Multivariate Kalibration-Ein praktischer Leitfaden zur Methodenentwicklung in der quantitativen Analytik*; Leipzig: Bruker Optik GmbH, 2001
33. J. Crank: *The mathematics of diffusion*; Oxford: Clarendon Press, 1994
34. E. Cronin, R.B. Stoughton: *Percutaneous absorption: regional variations and the effect of hydration and epidermal stripping*; Br. J. Dermatol. 74 (1962); 265-72
35. S.E. Cross, W.J. Pugh, J. Hadgraft, M.S. Roberts: *Probing the effect of vehicles on topical delivery: understanding the basic relationship between solvent and solute penetration using silicone membranes*; Pharm. Res. 18 (2001); 999-1005
36. M. Denda: *Influence of dry environment on epidermal function*; J. Dermatol. Sci. 24, Suppl. 1 (2000); 22-28
37. M. Denda, T. Tsuchiya, P.M. Elias, K.R. Feingold: *Stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis*; Am. J. Physiol. 278 (2000); 367-72
38. M. Denda, T. Tsuchiya, J. Hosoi, J. Koyama: *Immobilisation-induced and crowded environment-induced stress delay barrier recovery in murine skin*; Br. J. Dermatol. 90 (1989); 777-82
39. M. Dias, A. Farinha, E. Faustino, J. Hadgraft, J. Pais, C. Toscano: *Topical delivery of caffeine from some commercial formulations*; Int. J. Pharm. 182 (1999); 41-47
40. M. Dias, J. Hadgraft, S.L. Raghavan, J. Tetteh: *The effect of solvent on permeant diffusion through membranes studied using ATR-FTIR and chemometric data analysis*; J. Pharm. Sci 93 (2004); 186-96
41. M. Dias, S.L. Raghavan, J. Hadgraft: *ATR-FTIR spectroscopic investigations on the effect of solvents on the permeation of benzoic acid and salicylic acid through silicone membranes*; Int. J. Pharm. 216 (2001); 51-59
42. D.T. Downing, M.E. Stewart, P.W. Wertz, S.W. Colton 6TH, J.S. Strauss: *Skin lipids*; Comp. Biochem. Physiol. B 76 (1983); 673-678
43. P.M. Elias: *The stratum corneum revisited*; J. Dermatol. 23 (1993); 756-58
44. P.M. Elias, E.R. Cooper, A. Korc, B.E. Brown: *Percutaneous transport in relation to stratum corneum structure and lipid composition*; J. Invest. Dermatol. 76 (1981); 297-301
45. Europäisches Arzneibuch, 4. Auflage 2004: Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart
46. J.Y. Fang, K.C. Sung, K.H. Lin, C.L. Fang: *Transdermal iontophoretic delivery of diclofenac sodium from various polymer formulations: in vitro and in vivo studies*; Int. J. Pharm. 178 (1999); 83-92
47. J.Y. Fang, K.C. Sung, J.J. Wang, C.C. Chu, T.K. Chen: *The effects of iontophoresis and electroporation on transdermal delivery of buprenorphine from solutions and hydrogels*; J. Pharm. Pharmacol. 54 (2002); 1329-37

48. K.C. Farinas, L. Doh, S. Venkatraman, R.O. Potts: *Characterisation of solute diffusion in a polymer using ATR-FTIR spectroscopy and bulk transport techniques*; *Macromolecules* 27 (1994); 5220-22
49. A. Farinha, C. Toscano, R. Campos, A. Bica, J. Hadgraft: *Permeation of naproxen from saturated solutions and commercial formulations through synthetic membranes*; *Drug Dev Ind Pharm.* 2003 (29); 489-94
50. R.J. Feldman, H.I. Maibach: *Regional variations in percutaneous penetration of C14 cortisol in man*; *J. Invest. Dermatol.* 48 (1967); 181-95
51. M.M. Feldstein, I.M. Raigorodskii, A.I. Iordanskii, J. Hadgraft: *Modeling of percutaneous drug transport in vitro using skin-imitating carbosil membrane*; *J. Control. Release* 52 (1998); 25-40
52. G.L. Flynn: *Mechanism of percutaneous absorption from physicochemical evidence. In: R.L. Bronaugh, H. I. Maibach: Percutaneous absorption. Mechanisms, methodology, drug delivery*; New York: Marcel Dekker, 1985, 17-42
53. G.L. Flynn, T.J. Roseman: *Membrane diffusion. II. Influence of physical adsorption on molecular flux through heterogeneous dimethylpolysiloxane barriers*; *J Pharm Sci.* 60 (1971); 1788-96
54. B. Forslind: *A domain mosaic model of the skin barrier*; *Acta Derm. Venerol.* 74 (1994); 1-6
55. B. Forslind, S. Engström, J. Engblom, L. Norlen: *A novel approach to the understanding of human skin barrier function*; *J. Dermatol. Sci.* 14 (1997); 115-25
56. T.J. Franz: *Absorption of amorolfine through human nail*; *Dermatology* 184, Suppl. 1 (1992); 18-20
57. T.J. Franz: *Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data*; *J. Invest. Dermatol.* 64 (1975); 190-95
58. T.J. Franz, P.A. Lehman: *The skin as a barrier: structure and Function*; In: A.F. Kydonieus, J.J. Wille: *Biochemical modulation of skin reactions. Transdermals, topicals, cosmetics*; Boca Raton: CRC Press, 2000, 15-33
59. W. Fürst, R. Neubert, H. Richter, L. Reppel: *Arzneimittelpermeation durch künstliche Lipoidmembranen; 11. Mitteilung: Unterschiedliche Membrantypen zur Anwendung in Permeationsmodellen*; *Pharmazie* 35, H.2 (1980); 120-21
60. W. Fürst, R. Neubert, R. Wildner, G. Beyrich, C. Bendas: *Eine neue Versuchsanordnung zur in-vitro-Beurteilung der Wirkstoffresorption aus topischen Arzneiformen*; *Pharmazie* 42 (1987); 659-65
61. S.D. Gagnon: *1,2-Epoxyde polymers, propylene oxide and higher 1,2-epoxyde polymers*; In J.I. Kroschwitz: *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*; New York: Wiley, 273-307
62. E.R. Garrett, P.B. Chemburkar: *Evaluation, control, and prediction of drug diffusion through polymeric membranes. I. Methods and reproducibility of steady-state diffusion studies*; *J. Pharm. Sci.* 57 (1968); 944-8

63. E.R. Garrett, P.B. Chemburkar: *Evaluation, control, and prediction of drug diffusion through polymeric membranes. II. Diffusion of aminophenones through silastic membranes: a test of the pH-partition hypothesis*; J. Pharm. Sci. 57 (1968a); 949-59
64. E.R. Garrett, P.B. Chemburkar: *Evaluation, control, and prediction of drug diffusion through polymeric membranes 3. Diffusion of barbiturates, phenylalkylamines, dextromethorphan, progesterone, and other drugs*; J. Pharm. Sci. 57 (1968b); 1401-9
65. K.M. Gelotte, R.T. Lostritto: *Solvent interaction with polydimethylsiloxane membranes and its effects on benzocaine solubility and diffusion*; Pharm. Res. 7 (1990) 523-529
66. A.D. Glinos, G.N. Bardi, K.C. Dermitzaki, S.A. Perez, M.J. Talieri: *Cytokinetic and cytotoxic effects of urea on Hela cells in suspension cultures*; JNCI 71 (1983); 1211-19
67. M. Gniedocka, O.F. Nielsen, D.H. Christensen, H.C. Wulf: *Structure of water, proteins, and lipids in intact human skin, hair and nail*; J. Invest. Dermatol. 110 (1998); 393-398
68. C.Y. Goates, K. Knutson: *Enhanced permeation of polar compounds through human epidermis. I. Permeability and membrane structural changes in the presence of short chain alcohols*; Biochim. Biophys. Acta 1195 (1994); 169-79
69. G.M. Golden, D.B. Guzek, A.H. Kennedy, J.E. McKie, R.O. Potts: *Stratum corneum lipid phase transitions and water barrier properties*; Biochemistry 27 (1987); 2382-88
70. B. Grewal, A. Naik, J. Irwin: *Drug, vehicle and enhancer interactions in percutaneous transport: simultaneous analysis by ATR-IR spectroscopy*; Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater. 25 (1998); 569-570
71. P. Griffiths: *Beer's law*; In: J.M. Chalmers, P.R. Griffiths: *Handbook of vibrational spectroscopy. Volume 3. Sample characterization and spectral data processing*; Chichester: Wiley, 2002, 2225-34
72. G. Grubauer, K.R. Feingold, P.M. Elias: *Relationship of epidermal lipogenesis to cutaneous barrier function*; J. Lipid Res. 28 (1992); 746-52
73. H. Günzler, H.M. Heise: *IR-Spektroskopie - Eine Einführung*; Weinheim: VCH, 2002
74. D. Hadži, J. Kidrič, Ž.V. Knezevic, B. Barlič: *The normal coordinate analysis of urea, thiourea, selenourea, and their isotropic analogues in the solid phase and in solution*; Spectrochim. Acta 32A (1976); 693-704
75. M. Haftek, M.-H. Teillon, D. Schmitt: *Stratum corneum, corneodesmosomes and ex vivo percutaneous penetration*; Microsc. Res. Tech. 43 (1998); 242-9
76. I. Hagemann, E. Proksch: *Topical treatment by urea reduces epidermal hyperproliferation and induces differentiation in psoriasis*; Acta Derm. Venerol. (Stockh.) 76 (1996); 353-6
77. B.D. Hanh: *Anwendung von nichtinvasiven spektroskopischen Methoden zur Optimierung der Wirkstoffpenetration aus Suspensionen*; Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2001)

78. B.D. Hanh, R.H.H. Neubert, S. Wartewig: *Investigation of drug release from suspension using FTIR-ATR technique: part I. Determination of effective diffusion coefficient of drugs*; Int. J. Pharm. 204 (2000a); 145-50
79. B.D. Hanh, R.H.H. Neubert, S. Wartewig: *Investigation of drug release from suspensions using FTIR-ATR technique: part II. Determination of dissolution coefficient of drugs*; Int. J. Pharm. 204 (2000b), 151-58
80. M. Haria, H.M. Bryson: *Amorolfine - a review of its pharmacological properties and therapeutic potential in the treatment of onychomycosis and other superficial fungal infections*; Drugs 49 (1995); 103-20
81. N.J. Harrick: *Study of physics and chemistry of surfaces from frustrated total internal reflections*; Phys. Rev. Lett. 4 (1960); 224-226
82. S.M. Harrison, B.W. Barry, P.H. Dugard: *The effects of freezing human skin permeability*; J. Pharm. Pharmacol. 36 (1984); 261-62
83. J.E. Harrison, A.C. Watkinson, D.M. Green, J. Hadgraft, K. Brain: *The relative effect of Azone[®] and Transcutol[®] on permeant diffusivity and solubility in human stratum corneum*; Pharm. Res. 13 (1996); 542-46
84. W. Hartmann, Bruker Optik GmbH, Leipzig, persönliche Mitteilung, 22.10.2003
85. T. Hasegawa: *Principal component regression and partial least squares modeling*; In: J.M. Chalmers, P.R. Griffiths: *Handbook of vibrational spectroscopy. Volume 3. Sample characterization and spectral data processing*; Chichester: Wiley, 2002, 2293-2312
86. T. Hatanaka, E. Manabe, K. Sugibayashi, Y. Morimoto: *An application of the hydrodynamic pore theory to percutaneous absorption of drugs*; Pharm. Res. 11 (1994); 654-58
87. T. Hatanaka, M. Shimoyama, K. Sugibayashi, Y. Morimoto: *Effect of vehicle on the skin permeability of drugs: polyethylene glycol 400-water and ethanol-water binary solvents*; J. Control. Release. 23 (1993); 247-60
88. M. Helmdach, A. Thielwitz, Eva-Maria Röpke, H. Gollnick: *Age and sex variation in lipid composition of human fingernail plates*; Skin Pharmacol. Appl. Physiol 13 (2000); 111-19
89. K. Hemmelmann, H. Brandt: *ATR-spektroskopische Untersuchungen des Diffusions- und Sorptionsverhaltens von Polyethylenfilmen für verschiedene Flüssigkeiten*; Experimentelle Technik der Physik 34 (1986); 439-46
90. M. Hesse, H. Meier, B. Zeh: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*; Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1995
91. N. Higo, A. Naik, D.B. Bommannan, R.O. Potts, R.H. Guy: *Validation of reflectance infrared spectroscopy as a quantitative method to measure percutaneous absorption in vivo*; Pharm. Res. 10 (1993); 1500-06
92. W. Horsch, W. Fürst, A. Zerbe, I. Finke, K. Winter, H. Richter: *Beiträge zur Arzneistoffliberation aus Suspensionssalben, 12. Mitteilung: Zur Eignung einiger künstlicher hydrophober Membranen für Liberationsuntersuchungen*; Pharmazie 36 (1981); 24-28

93. S.Y. Hou, G.L. Flynn: *Influences of 1-dodecylazacycloheptan-2-one on permeation of membranes by weak electrolytes: 1. Theoretical analysis of weak electrolyte diffusion through membranes and studies involving silicone rubber membranes*; J. Pharm. Sci 86 (1997); 85-91
94. W. Horsch, B. Wolf, U. Ahnudt: *Einfluß von Harnstoff auf die Freisetzung von Prednisolon aus L/W- und W/L-Emulsionssalben bei reduzierter Arzneistoffkonzentration*; Pharmazie 39 (1984); 431-432
95. B. Idson: *Hydratation and percutaneous absorption*; Curr. Probl. Dermatol. 7 (1978);132-41
96. M. Iervolino, S.L. Raghavan, J. Hadgraft: *Membrane penetration enhancement of ibuprofen using supersaturation*; Int. J. Pharm. 198 (2000), 229-38
97. A.L. Iordanski, M.M. Feldstein, V.S. Markin, J. Hadgraft, N.A. Plate: *Modeling of the drug delivery from a hydrophilic transdermal therapeutic system across polymer membrane*; Eur. J. Pharm. Biopharm. 49 (2000); 287-93
98. W.E. Jetzer, A.S. Huq, N.F. Ho, G.L. Flynn, N. Duraiswamy, L. Condie Jr: *Permeation of mouse skin and silicone rubber membranes by phenols: relationship to in vitro partitioning*; J. Pharm. Sci 75 (1986); 1098-103
99. R. Jiang, H.A. Benson, S.E. Cross, M.S. Roberts: *In vitro human epidermal and polyethylene membrane penetration and retention of the sunscreen benzophenone-3 from a range of solvents*; Pharm. Res. 15 (1998); 1863-1868
100. M.E. Johnson, D. Blankschein, R. Langer: *Evaluation of solute permeation through the stratum corneum: Lateral bilayer diffusion as the primary transport mechanism*; J. Pharm. Sci. 86 (1997); 1162-72
101. T.N. Julian, G.M. Zentner: *Ultrasonically mediated solute permeation through polymer barriers*; J. Pharm. Pharmacol. 38 (1986); 871-877
102. Y.N. Kalia, I. Alberti, N. Sekkat, C. Curdy, A. Naik, R.H. Guy: *Normalization of Stratum Corneum barrier function and transepidermal water loss in vivo*; Pharm. Res. 17 (2000); 1148-1150
103. Y.N. Kalia, F. Pirot, R.H. Guy: *Homogeneous transport in a heterogeneous membrane: water diffusion across stratum corneum in vivo*; Biophys. J 71 (1996); 2692-2700
104. M. Kampp: *The diffusion permeability of some artificial and some capillary membranes related to the free diffusion coefficients of the probe molecules*; Capillary permeability: the transfer of molecules and ions between capillary, Alfred Benzon Symposium, 1970, Copenhagen, Munksgaard
105. M.T. Knorst: *Charakterisierung und Optimierung der Liberation und Penetration des Harnstoffs aus halbfesten Formulierungen*; Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1997)
106. M.T. Knorst, R. Neubert, W. Wohlrab: *Release of urea from semisolid formulations using a multilayer membrane system*; Drug Dev. Ind. Pharm. 23 (1997); 259-63
107. W. Kutzelnigg, R. Mecke: *Die Schwingungsspektren des Harnstoff-Moleküls, des Harnstoff-Kristalls und des Wirtsgitters der Harnstoff-Einschlußverbindungen*; Z. Elektrochem. 65 (1961); 109-119

108. A.F. Kydonieus, J.J. Wille, G.F. Murphy: *Fundamental concepts in transdermal delivery of drugs*; In: A.F. Kydonieus, J.W. Wille: *Biochemical modulation of skin reactions. Transdermals, topicals, cosmetics*; Boca Raton: CRC Press, 2000, 1-14
109. M.A. Lampe, A.L. Burlingame, J. Whitney, M.L. Williams, B.E. Brown, E. Roitman, Elias: *Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations*; J. Lipid Res. 24 (1983); 120-130
110. W.Q. Liang, R. V. Petersen, S. W. Kim: *Drug permeation through polymer-skin membranes*; Acta Pharm. Tech. 31 (1985); 210-14
111. J. Liaw, C.Y. Lin: *Evaluation of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) gels as a release vehicle for percutaneous fentanyl*; J. Contr. Rel. 68 (2000); 273-282
112. B.C. Lippold: *Biopharmazie*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, 1984
113. B.C. Lippold, H. Baerbel, F.J. Lichey: *Drug transport through lipophilic polymer membranes. I Membrane permeabilities*; Acta Pharm. Technol. 30 (1984); 56-67
114. M. Loden, A.C. Andersson, M. Lindberg: *The effect of two urea-containing creams on dry, eczematous skin in atopic patients. II. Adverse effects*; J. Dermatol. Treatment 10 (1999); 171-5
115. L.G. Longsworth: *Temperature dependence of diffusion in aqueous solution*; J. Phys. Chem. 58 (1954); 770- 73
116. Y.Q. Lu, M.R. Yalamnchili, J.D. Miller: *FT-IR internal reflection spectroscopy using regular polygonal internal reflection elements*; Appl. Spectrosc. 52 (1998); 851-854
117. G.W. van Lucassen, G.N.A. Veen, J.A.J. Jansen: *Band analysis of hydrated human skin stratum corneum attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectra in vivo*; J. Biomed. Opt. 3 (1998); 267-280
118. Y. Maitani, K. Shimada, T. Nagali: *l-Menthol, oleic acid and lauricidin in absorption enhancement of free and sodium salt of diclofenac using ethanol treated silicone membrane as model for skin*, Chem. Pharm. Bull. 44 (1996); 403-8
119. V.H. Mak, R.O. Potts, R.H. Guy: *Oleic Acid concentration and effect in human stratum corneum: non-invasive determination by Attenuated Total Reflectance Infrared Spectroscopy in vivo*; J. Control. Release 12 (1990); 67-75
120. V.H. Mak, R.O. Potts, R.H. Guy: *Percutaneous penetration enhancement in vivo measured by attenuated total reflectance infrared spectroscopy*; Pharm. Res. 7 (1990); 835-41
121. E.M. Manabe, S. Numajiri, K. Sugibayashi, Y. Morimoto: *Analysis of skin permeation-enhancing mechanism of iontophoresis using hydrodynamic pore theory*, J. Control. Release 66 (2000)149-158
122. A. Marchionini, W. Hausknecht: *Säuremantel der Haut und Bakterienabwehr*; Klin. Wochenschr. 17 (1938); 663-66

123. A. Margarida, L. Tralhão, A.C. Watkinson, K.R. Brain, J. Hadgraft, N.A. Armstrong: *Use of ATR-FTIR spectroscopy to study the diffusion of ethanol through glycerogelatin films*; Pharm. Res. 12 (1995), 572-73
124. H. Mark: *Quantitative spectroscopic calibration*; In: J.M. Chalmers, P.R. Griffiths: *Handbook of vibrational spectroscopy. Volume 3. Sample characterization and spectral data processing*; Chichester: Wiley, 2002, 2258-2275
125. G.K. Menon, P.M. Elias: *Morphologic basis for a pore-pathway in mammalian stratum corneum*; Skin Pharmacol. 10 (1997); 235-46
126. G. Menon, R. Ghadially: *Morphology of lipid alteration in the epidermis: a review*; Microsc. Res. Tech. 37 (1997); 180-92
127. D. Mertin, B. Lippold: *In-vitro permeability of the human nail and of a keratin membrane from bovine hooves: influence of the partition coefficient octanol/water and the water solubility of drugs on their permeability and maximum flux*; J. Pharm. Pharmacol. 49 (1997a); 30-34
128. D. Mertin, B. Lippold: *In-vitro permeability of the human nail and of a keratin membrane from bovine hooves: penetration of chloramphenicol from lipophilic vehicles and a nail lacquer*; J. Pharm. Pharmacol. 49 (1997b); 241-45
129. D. Mertin, B. Lippold: *In-vitro permeability of the human nail and of a keratin membrane from bovine hooves: prediction of the penetration rate of antimycotics through the nail plate and their efficiency*; J. Pharm. Pharmacol. 49 (1997c); 866-72
130. K.D. McCarley, A.L. Bunge: *Absorption into silicone rubber membranes from powders and aqueous solutions*; Int. J. Pharm. 250 (2003); 169-80
131. E. van der Merwe, C. Ackermann: *Physical changes in hydrated skin*; Int. J. Cosm. Sci. 9 (1987); 237-47
132. A.S. Michaels, S.K. Chandrasekaran, J.E. Shaw: *Drug permeation through human skin: theory and in vitro experimental measurement*; Am. Inst. Chem. Eng. J. 21 (1975); 985-996
133. S. Mitragotri: *Modeling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways*; J. Contr. Rel. 86 (2003); 69-92
134. K. Moser, K. Kriwet, C. Froehlich, A. Naik, Y.N. Kalia, R.H. Guy: *Permeation enhancement of a highly lipophilic drug using supersaturated systems*; J. Pharm. Sci. 90 (2001); 607-16
135. D.A. Mountz, R.F. Storey, K.A. Mauritz : *Measurement of diffusion coefficient for water transport through poly(styrene-b-isobutylene-b-styrene)ionomers by ATR-IR-spectroscopy*; Am. Chem. Soc. Polym. Prepr. 42 (2001); 77-78
136. K.H. Müller, J. Kreuter: *Enhanced transport of nanoparticle associated drugs through natural and artificial membranes-a general phenomenon?*; Int. J. Pharm. 178 (1999); 23-32
137. K.H. Müller, C. Pflugshaupt: *Harnstoff in der Dermatologie*; Hautarzt 40, Suppl. IX (1989); 1-19

138. C.K. Mülling, H.H. Bragula, S. Reese, K.D. Budras, W. Steinberg: *How structure in bovine hoof epidermis are influenced by nutritional factors*; Anat. Histol. Embryol. 28 (1999); 103-108
139. N. Nardviriyakul, D.E. Wurster, M.D. Donovan: *Determination of diffusion coefficients of sodium p-Aminosalicylate in sheep nasal mucosae and dialysis membranes by Fourier Transform Infrared Horizontal Attenuated Total Reflectance Spectroscopy*; J. Pharm. Sci 86 (1997); 19-25
140. M. Nakano, N. Kohri, Y. Arakawa, T. Arita: *The permeation of benzodiazepines through synthetic membranes*; Chem. Pharm. Bull. 27 (1979); 573-7
141. O. Necas, A. Svoboda: *Effect of urea on the plasma membrane particles in yeast cells and protoplasts*; Protoplasma 77 (1973); 453-466
142. M.K. Nemanic, P.M. Elias: *In situ precipitation: a novel cytochemical technique for visualization of permeability pathways in mammalian stratum corneum*; J. Histochem. Cytochem. 28 (1980); 573-578
143. R. Neubert, C. Bendas, W. Wohlrab, B. Gienau, W. Fürst: *A multilayer membrane system for modelling drug penetration into skin*; Int. J. Pharm. 75 (1991); 89-94
144. R. Neubert, W. Wohlrab: *In vitro methods for the biopharmaceutical evaluation of topical formulations*; Acta Pharm. Technol. 36 (1990); 197-206
145. R. Neubert, W. Wohlrab, C. Bendas: *Modelling of drug penetration into human skin using a multilayer membrane system*; Skin Pharmacol. 8 (1995), 119-29
146. W. Noll: *Chemie und Technologie der Silikone*; Verlag Chemie, Weinheim (1968)
147. S. Nolting: *Harnstofftherapie bei Mykosen*; Hautarzt, Suppl. IX (1989), 76-77
148. S. Nolting, C. Seebacher: *Ciclopiroxolamin – Wegweiser topischer Mykose-Therapie*; Jena: Universitätsverlag, 1993, 46-68
149. L. Norlén: *Skin barrier formation: The membrane folding model*; J. Invest. Dermatol. 117 (2001); 823-829
150. L. Norlén: *Skin barrier structure and function: The single gel phase model*; J. Invest. Dermatol. 117 (2001); 830-836
151. L. Norlén, I. Nicander, B.L. Rozell, S. Ollmar, B. Forslind: *Inter- and intra-individual differences in human stratum corneum lipid content related to physical parameters of skin barrier function in vivo*; J. Invest. Dermatol. 112 (1999); 72-77
152. G.F. Odland: *Structure of the skin*; In: L.A. Goldsmith (Ed.): *Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin*; Oxford: Oxford University Press, 2.Ed., 1991, 205-235
153. D.C. Patel, J.L. Fox, W.I. Higuchi: *Physical model approach in the study of the transport of alkylamines across a silicone rubber membrane in a 2 chamber diffusion cell*; J. Pharm. Sci 73 (1984); 1028-34
154. K.D. Peck, A.H. Ghanem, W.I. Higuchi: *The effect of temperature upon the permeation of polar and ionic solutes through human epidermal membrane*; J. Pharm. Sci. 84 (1995); 975-82

155. M.A. Pellett, A.C. Watkinson, J. Hadgraft, K.R. Brain: *Comparison of permeability data from traditional diffusion cells and ATR-FTIR spectroscopy. Part I. synthetic membranes*; Int. J. Pharm. 154 (1997a); 205-15
156. M.A. Pellett, A.C. Watkinson, J. Hadgraft, K.R. Brain: *Comparison of permeability data from traditional diffusion cells and ATR-FTIR spectroscopy. Part II determination of diffusional pathlengths in synthetic membranes and human stratum corneum*; Int. J. Pharm. 154 (1997b); 217-27
157. K. Phares, M. Cho, K. Johnson, J. Swarbrick: *Drug transport across nylon 610 films: influence of synthesis variables*; Pharm. Res. 12 (1995); 248-56
158. H. Podhaisky; Fachbereich Mathematik und Informatik, persönliche Mitteilung, 16.08.2004
159. A. Polak, M. Zaugg: *Amorolfine*; In: J. F. Ryley (ed.): *Chemotherapy of fungal disease (handbook of experimental pharmacology, Vol. 96)*; Berlin: Springer-Verlag, 1990, 505-521
160. R.O. Potts, M.L. Francoeur: *Lipid biophysics of water loss through the skin*; Proc. Natl. Acad. Sci. 87 (1990); 3871-73
161. R.O. Potts, M.L. Francoeur: *The influence of stratum corneum morphology on water permeability*; J. Invest. Dermatol. 96 (1991); 495-499
162. R.O. Potts, R.H. Guy: *Predicting skin permeability*; Pharm. Res. 9 (1992); 663- 669
163. R.O. Potts, D.B. Guzek, R.R. Harris, J.E. McKie: *A noninvasive in vivo technique to quantitatively measure water concentration of the stratum corneum using attenuated total reflectance infrared spectroscopy*; Arch. Dermatol. Res. 277 (1985); 489-495
164. E. Proksch: *Harnstoff in der Dermatologie*; MMP 4 (2000);110-115
165. M. Puschmann: *Experimentelle Untersuchungsergebnisse zur Juckreizlinderung, zur Hautfettung und zur Hautverträglichkeit einer harnstoff- und polidocanolhaltigen Zubereitung*; Akt. Dermatol. 18 (1992); 224-8
166. W.J. Pugh, M. Roberts, J. Hadgraft: *Epidermal permeability - penetrant structure relationships. Part 3. Effect of hydrogen bonding interactions and molecular size on diffusion across the stratum corneum*; Int. J. Pharm. 138 (1996); 149-165
167. W.J. Pugh, I.T. Degim, J. Hadgraft: *Epidermal permeability – penetrant structure relationships: 4. QSAR of permeant diffusion across human stratum corneum in terms of molecular weight, H-bonding and electronic charge*; Int. J. Pharm. 197 (2000); 203 - 211
168. M. Puschmann, K. Gogoll: *Verbesserung der Hautfeuchte und des Hautreliefs unter Harnstofftherapie*; Hautarzt 40, Suppl. IX (1989), 67-70
169. S.A. Quadripur, G. Horn, T. Höhler: *Zur Lokalwirksamkeit von Ciclopiroxolamin bei Nagelmykosen*; Arzneim. Forsch. 31 (1981); 1369-1372
170. S.L. Raghavan, A. Trividic, A.F. Davis, J. Hadgraft: *Effect of cellulose polymers on supersaturation and in vitro membrane transport of hydrocortisone acetate*; Int. J. Pharm. 193 (2000); 231-7

171. S.K. Rastogi, J. Singh: *Lipid extraction and transport of hydrophilic solutes through porcine epidermis*; Int. J. Pharm. 225 (2001); 75-82
172. H. Rattner: *Use of urea in handcreams*; Arch. Derm. Syph. 48 (1943); 47
173. W.G. Reifenrath, B. Lee, D.R. Wilson, T.S. Spencer: *A comparison of in vitro skin-penetration cells*; J. Pharm. Sci. 83 (1994); 1229-1233
174. L. Reppel, H. Richter, S. Schellin, K. Winter: *Neuartige Silikonkautschukmembranen für den Einsatz in der pharmazeutischen Forschung*; Plaste und Kautschuk 11 (1978); 668
175. H. Richter: *Modelluntersuchungen zum Stofftransport an Polydimethylsiloxan-kautschukmembranen*; Habilitationsarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1985)
176. H. Richter: *Der Transport von Calciumionen am Membranmodell*; Pharmazie 47 (1992); 947-8
177. H. Richter: persönliche Mitteilung, 08.02.2002
178. H. Richter, P. Nuhn: *Untersuchung quartärer Ammoniumbasen als mögliche Chloridionophore am Membranmodell*; Pharmazie 44 (1989); 724-5
179. H. Richter, B. Morbitzer, R. Fink, K. Winter, W. Fürst: *Zur Bestimmung der Schichtdicke von künstlichen Membranen*; Pharmazie 33 (1978); 523-256
180. A. Ritter, R. Neubert, W. Fuerst: *Prednisolone preparations with zinc oxide-free and zinc oxide-containing bases*; Pharmazie 45 (1990); 798-9
181. J.E. Riviere, P.L. Williams: *Pharmacokinetic implication of changing blood flow in skin*; J. Pharm. Sci. 81, 601 (1992)
182. W. Robinson: *Use of urea to stimulate healing in chronic purulent wound*; AM. J. Surg. 33 (1936); 192
183. N.P.G. Roeges: *A guide to the complete interpretation of infrared spectra of organic structures*; Chichester: Wiley, 1994
184. B.Th. Rohde: *Harnstoff und Harnstoffkombination bei Psoriasis*; Hautarzt, Suppl. IX (1989); 74-75
185. C. Rosado, S.E. Cross, W.J. Pugh, M.S. Roberts, J. Hadgraft: *Effect of vehicle pretreatment on the flux, retention, and diffusion of topically applied penetrants in vitro*; Pharm. Res. 20 (2003); 1503 – 1507
186. S. Rothberg, R.G. Crouse, J.L. Lee: *Glycine- C^{14} incorporation into the proteins of normal stratum corneum and the abnormal stratum corneum of psoriasis*; J. Invest. Dermatol. 37 (1961), 497-505
187. G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems: *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*; Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1992
188. C. Sammon, J. Yarwood, N. Everall: *A FTIR-ATR study of liquid diffusion processes in PET films: comparison of water simple alcohols*; Polymer 41 (2000); 2521-34
189. J. Sangster: *Octanol-water partition coefficients: fundamentals and physical chemistry*; Cinchester: Weinheim, 1997

190. G. Scatchard, W.J. Hamer, S.E. Wood: *Isotonic solutions. I. The chemical potential of water in aqueous solutions of sodium chloride, potassium chloride, sulfuric acid, sucrose, urea and glycerol at 25°*, J. Am. Chem. Soc. 60 (1938); 3061-3070
191. H. Schaefer, A. Zesch, G. Stüttgen: *Skin permeability*; Berlin: Springer Verlag, 1982
192. H. Schaefer, G. Stüttgen, A. Zesch, W. Shalla, J. Gazith: *Quantitative determination of percutaneous absorption of radiolabelled drugs in vitro and in vivo by human skin*; Curr. Probl. Dermatol. 7 (1978); 80-94
193. R.J. Scheuplein: *Mechanism of percutaneous absorption: I. Routes of penetration and the influence of solubility*; J. Invest. Dermatol. 45 (1965); 334-346
194. R.J. Scheuplein, L. Morgan: „Bound-water“ in keratin membranes measured by a microbalance technique; Nature 214 (1969); 456-8
195. R.J. Scheuplein, I.H. Blank, G.J. Brauner, D.J. MacFarlane: *Percutaneous absorption of steroids*; J. Invest. Dermatol. 153 (1969); 63-70
196. R.J. Scheuplein, L. Ross: *Effects of surfactants and solvents on the permeability of epidermis*; J. Soc. Cosm. Chem. 21 (1970); 853-73
197. U. Schmalfuß: *Untersuchungen zur Modulation der Penetration eines hydrophilen Arzneistoffs aus Mikroemulsionssystemen in humane Haut unter ex vivo-Bedingungen*; Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1993)
198. U.W. Schnyder: *Harnstoff- und Harnstoffkombinationen bei Ichthyosen*; Hautarzt, Suppl. IX (1989), 51-57
199. F.P. Schwarb, G. Imanidis, E.W. Smith, J.M. Haigh, C. Surber: *Effect of concentration and degree of saturation of topical fluocinonide formulations on in vitro membrane transport and in vivo availability on human skin*; Pharm. Res. 16 (1999); 909-915
200. U.W. Schnyder: *Harnstoff und Harnstoffkombinationen bei Ichthyosen*; Hautarzt, Suppl. IX (1989), 51-57
201. Y. Shen, P. Wu: *Two-dimensional ATR-FTIR spectroscopic investigation on water diffusion in polypropylene film: water bending vibration*; J. Phys. Chem. B 107 (2003), 4224-26
202. B. Smith: *Infrared spectral interpretation-a systematic approach*; New York: CRC-Press, 1999
203. L.S. Sorell, A.S. Myerson: *Diffusivity of urea in concentrated, saturated and supersaturated solutions*; AIChE Journal 28 (1982); 772-79
204. J.E. Steward : *Infrared Absorption Spectra of urea, thiourea, and some thiourea-halide complexes*; J. Chem. Phys. 26 (1957); 248-254
205. W.S. Symers, T.S. Kirk: *Urea as bactericide and its application in the treatment of wounds*; Lancet 2 (1915); 1237
206. W. Schmidt: *Optische Spektroskopie*; VCH, Weinheim, 1994

207. D.S. Shaker, A.H. Ghanem, S.K. Li, K.S. Warner, F.M. Hashem, W.I. Higuchi: *Mechanistic studies of the effect of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on in vitro transdermal permeation of corticosterone through hairless mouse skin*; Int. J. Pharm. 253 (2003); 1-11
208. J.E. Steward: *Infrared Absorption Spectra of urea, thiourea, and some thiourea-halide complexes*; J. Chem. Phys. 26 (1957); 248-254
209. G. Swanbeck: *A new treatment of ichthyosis and other hyperkeratotic conditions*; Acta Derm. Venerol. (Stockh) 48 (1968); 123
210. G. Swanbeck: *Harnstoff als Monotherapie bei trockener Haut*; Hautarzt, Suppl. IX (1989); 42-43
211. G. Swanbeck, G. Rajka: *Antipruritic effect of urea solutions*; Acta Derm. Venerol. (Stockh) 50 (1970); 225-30
212. J. Swarbrick, G. Lee, J. Brom: *Drug permeation through human skin: I. Effect of storage conditions of skin*; J. Invest. Dermatol. 89 (1); 1982
213. M. Sznitowska, S. Janicki, A.C. Williams: *Intracellular or intercellular localization of the polar pathway of penetration across stratum corneum*; J. Pharm. Sci. 87 (1998); 1109-1114
214. Y. Takeuchi, H. Yasukawa, Y. Yamaoka, N. Takahashi, C. Tamura, Y. Morimoto, S. Fukushima, R.C. Vasavada: *Effects of oleic acid/propylene glycol on rat abdominal stratum corneum: lipid extraction and appearance of propylene glycol in the dermis measured by Fourier transform infrared/attenuated total reflectance (FT-IR/ATR) spectroscopy*; Chem. Pharm. Bull. 41 (1993); 1434-1437
215. A. Tezel, A. Sens, S. Mitragotri: *Description of transdermal transport of hydrophilic solutes during low-frequency sonophoresis based on a modified porous pathway model*; Pharm. Sci. 92 (2003); 381-93
216. E. Touitou, A. Lisette: *The permeation behavior of several membranes with potential use in the design of transdermal devices*; Pharmaceutica Acta Helveticae 60 (1985); 193-8
217. E. Touitou, V.M. Meidan, E. Horwitz: *Methods for quantitative determination of drug localized in the skin*; J. Contr. Rel. 56 (1998); 7-21
218. W. Vanscheidt: *Keratolytika und Keratoplastika. In: R. Niedner, J. Ziegenmeyer: Dermatika: Therapeutischer Einsatz, Pharmakologie und Pharmazie*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, 1992, 129-133
219. A. Vijay, D.N. Sathyanarayana: *Ab initio study of the force field, geometry and vibrational assignment of urea*; J. Mol. Struct. 295 (1993); 245-258
220. R. Voigt: *Pharmazeutische Technologie*; Stuttgart: deutscher Apothekerverlag, 2000
221. J.C. Walkow, J.W. McGinity: *The Effect of physicochemical properties on the in-vitro diffusion of drug through synthetic membranes and pigskin I. Methyl salicylate*; Int. J. Pharm. 35 (1987a); 91-102
222. J.C. Walkow, J.W. McGinity: *The Effect of physicochemical properties on the in-vitro diffusion of drug through synthetic membranes and pigskin II. Salicylic acid*; Int. J. Pharm 35 (1987b) 103-110

223. K.A. Walters, G.L. Flynn: *Permeability characteristics of the human nail plate*; Int. J. Cosmet. Sci. 5 (1983b); 231-46
224. K.A. Walters, G.L. Flynn, J.R. Marvel: *Physicochemical characterization of the human nail: Permeation pattern for water and the homologous alcohols and differences with respect to the stratum corneum*; J. Pharm. Pharmacol. 83 (1983); 28-33
225. K.A. Walters, G.L. Flynn, J.R. Marvel: *Physicochemical characterization of the human nail: Solvent effects on the permeation of homologous alcohols*; J. Pharm. Pharmacol. 37 (1985); 771-75
226. F.J. Wang, Y.Y. Zhang, X.Z. Zhang, X. Zhu, T.S. Chung, S. Moochhala: *Cellulose acetate membranes for transdermal delivery of scopolamine base*; Materials Science and Engineering C, C20 (2002); 93-100
227. R.R. Warner, Y.L. Boissy, N.A. Lilly, M.J. Spears, K. McKillop, J.L. Marshall, K.J. Stone: *Water disrupts stratum corneum lipid lamellae: damage is similar to surfactants*; J. Invest. Dermatol. 113 (1999); 960-66
228. A.C. Watkinson, H. Joubin, D.M. Green, K.R. Brain, J. Hadgraft: *The influence of vehicle on permeation from saturated solutions*; Int. J. Pharm. 121 (1995); 27-36
229. S. Wartewig: *IR and Raman Spectroscopy*; Weinheim: Wiley-VCH, 2003
230. R. Wepf: *Reviewing stratum corneum: corneocytes embrace each other*; FB Pharmazie, Halle/Saale, Vortrag, 03.11.2003
231. P.W. Wertz, D.T. Downing: *Epidermal lipids. In: L.A. Goldsmith (Ed.): Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin*; Oxford: Oxford University Press, 2.Ed., 1991, 205-235
232. J.W. Wiechers: *The barrier function of the skin in relation to percutaneous absorption of drugs*; Pharm. Weekbl. Sci. 11 (1989); 185-198
233. M.L. Williams, P.M. Elias: *The extracellular matrix of the stratum corneum: role of lipids in normal and pathological functions*; CRC Crit. Drug Carrier Syst. 3 (1987); 95-112
234. P. Wilks: *Process monitoring applications of multiple internal reflection spectroscopy. In: F.M Mirabella: Internal reflection spectroscopy, theory and applications*, New York: Dekker, 1993, 97-106
235. T. Winsor, G.E. Burch: *Differential roles of layers of human epigastric skin on diffusion rate of water*; Arch. Int. Med. 74 (1944); 428-436
236. W. Wohlrab, S. Schiepmann: *Untersuchungen zum Mechanismus der Harnstoffwirkung auf die Haut*; Arch. Dermatol. Res. 225 (1976); 23-30
237. W. Wohlrab, N. Hassler: *Penetrationskinetik von Harnstoff in die menschliche Haut*; Dermatol. Monatsschr. 167 (1981); 277-83
238. W. Wohlrab: *The influence of urea on the penetration kinetics of topically applied corticosteroids*; Acta Derm. Venerol. (Stockh) 64 (1984a); 94-98
239. W. Wohlrab: *Vehikelabhängigkeit der Harnstoff-Penetration in die menschliche Haut*; Dermatologica 169 (1984b); 53-59
240. W. Wohlrab: *Wiederfindungsrate von extern angewandten Glukokortikoiden auf der Haut*; Dermatol. Monatsschr. 172 (1986); 615-19

241. W. Wohlrab: *Der Einfluss von Harnstoff auf die Wasserbindungskapazität der menschlichen Hornschicht*; Dermatol. Monatsschr. 174 (1988); 622-627
242. W. Wohlrab: *Einfluss des Harnstoffgehaltes unterschiedlicher Emulsionen auf die Wasserbindungsfähigkeit der menschlichen Hornschicht*; Z. Hautkrankh. 72 (1991a); 34-9
243. W. Wohlrab: *Use and efficiency of urea in dermatological preparations*; J. Appl. Cosmetol. 9 (1991b); 1-7
244. W. Wohlrab: *Harnstoff-ein bewährter Wirkstoff in der Dermatologie und Kosmetik*; PZ 33 (1992); 9-15
245. W. Wohlrab: *Aufbau und Funktion der Haut*. In: R.H.H Neubert, W. Wohlrab, W. Marsch: *Dermatopharmazie. Vehikel-Wirkstoffe-Pharmakologie*; Stuttgart: WVG, 2001, 3-12
246. D.E. Wurster, V. Buraphacheep, J.M. Patel: *The determination of diffusion coefficients in semisolids by fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy*; Pharm. Res. 10 (1993); 616-20
247. Y. Yamaguchi, T. Usami, H. Natsume, A. Takao, Y. Nagase, K. Sugibayashi, Y. Morimoto: *Evaluation of skin permeability of drugs by newly prepared polymer membranes*; Chem. Pharm. Bull. 45 (1997); 537-41
248. F. Yamashita, H. Bando, Y. Koyama, S. Kitagawa, Y. Takakura, M. Hashida: *In vivo and in vitro analysis of skin penetration enhancement based on a two-layer diffusion model with polar and nonpolar routes in the stratum corneum*; Pharm. Res. 11 (1994); 185-82
249. Y. Yokomizo: *Effect of phosphatidylcholine on the percutaneous penetration of drugs through the dorsal skin of guinea pigs in vitro, and analysis of the molecular mechanism, using attenuated total reflectance-fourrier infrared (ATR-FTIR) spectroscopy*; J. Contr. Rel. 42 (1996); 246-262
250. Y. Yokomizo: *Effect of phosphatidylglycerol on the in vitro percutaneous drug penetration through the dorsal skin of guinea pigs, and analysis of the molecular mechanism, using (ATR-FTIR) spectroscopy*; Int. J. Pharm. 147 (1997); 219-231
251. G.M. Zentner, J.R. Cardinal, S.W. Kim: *Progestin permeation through polymer membranes II: diffusion studies on hydrogel membranes*; J. Pharm. Sci. 67 (1978); 1352-5
252. J. Ziegenmeyer: *Biopharmazeutische Aspekte bei der Anwendung von Dermatika*. In: R. Niedner, J. Ziegenmeyer: *Dermatika: Therapeutischer Einsatz, Pharmakologie und Pharmazie*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1992, 243-307

10. Anhang

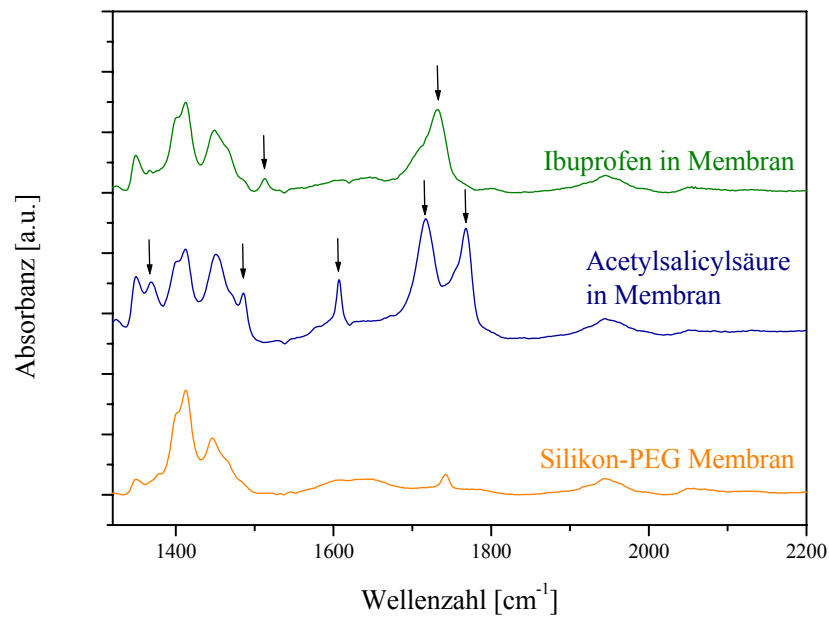


Abb. A 1

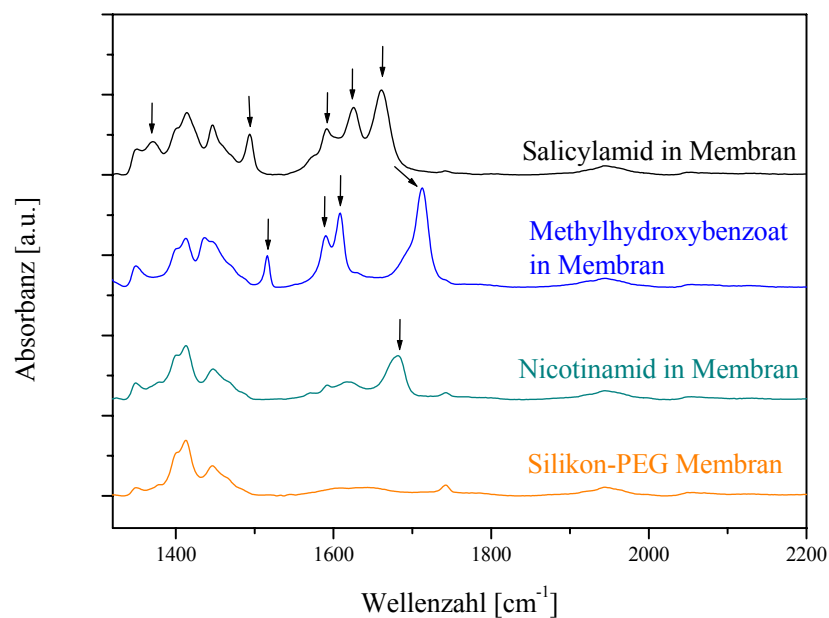


Abb. A 2

Abb. A 1 und Abb. A 2: ATR-Spektren der Membranunterseite 48 Stunden nach der Arzneistoffdiffusion in eine Silikon-PEG-Membran. Es wurden jeweils 300 μl einer gesättigten Lösung des Arzneistoffs in PEG auf die Oberfläche aufgegeben. Aufgetretene Arzneistoffbanden sind durch Pfeile gekennzeichnet. Zum Vergleich ist das Spektrum einer reinen Silikon-PEG-Membran angegeben.

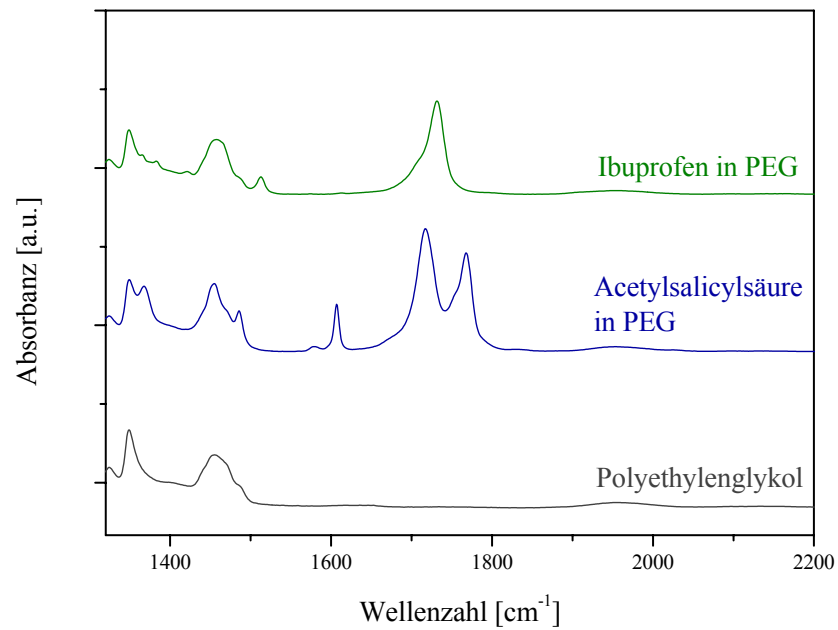


Abb. A 3

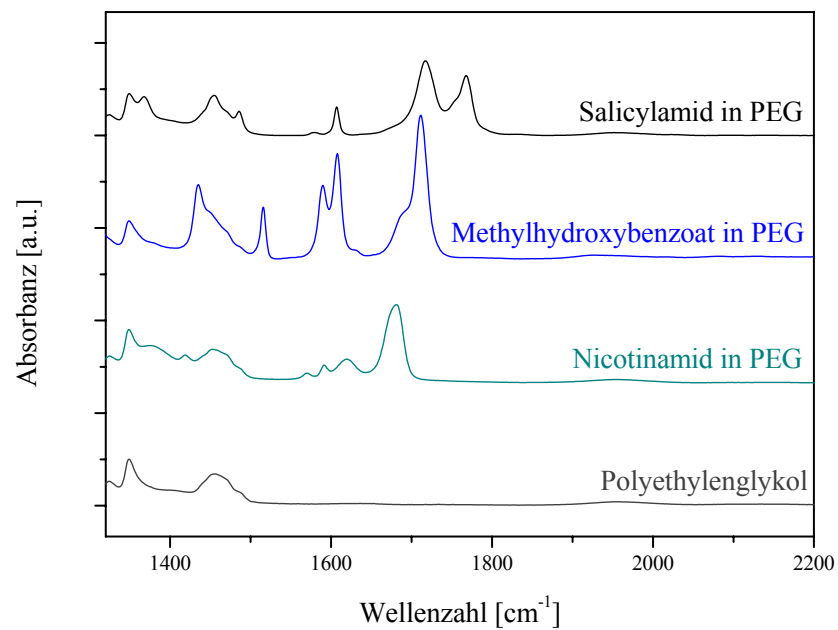


Abb. A 4

Abb. A 3 und Abb. A 4: ATR-Spektren verschiedener Arzneistoffe gesättigt in PEG 400. Zum Vergleich ist das Spektrum von reinem PEG angegeben.

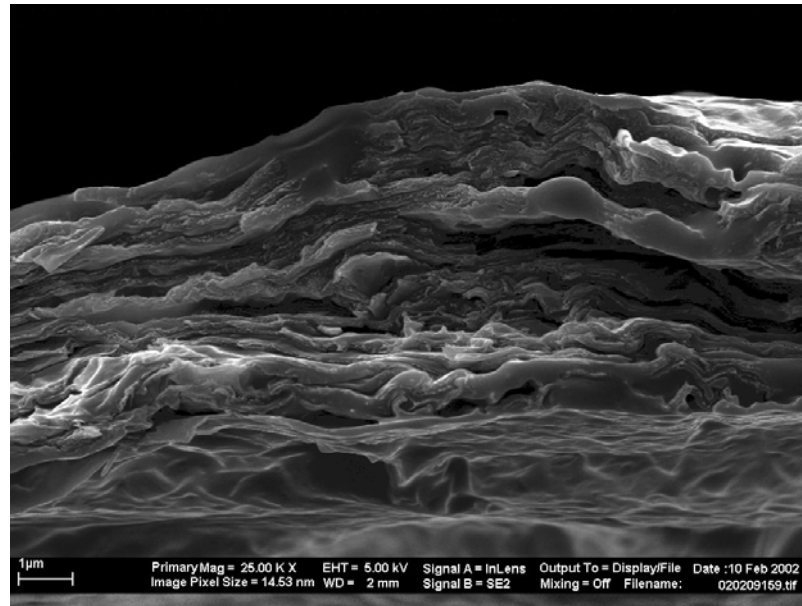


Abb. A 5: elektronenmikroskopische Aufnahme von isoliertem humanen Stratum corneum (nach R. Wepf, 2002)

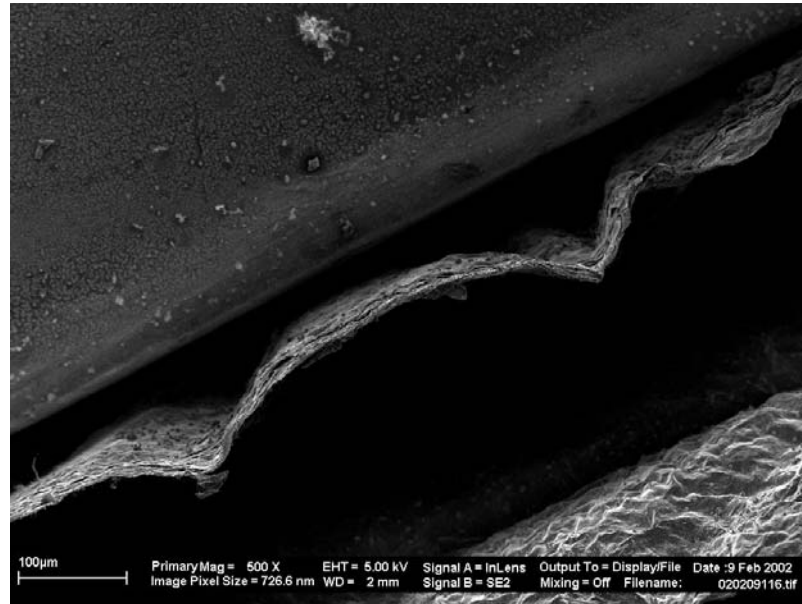


Abb. A 6: elektronenmikroskopische Aufnahme von isoliertem humanen Stratum corneum nach zweiwöchiger Lagerung in destilliertem Wasser (nach R. Wepf, 2002). Die Korneozytenverbände sind erhalten.

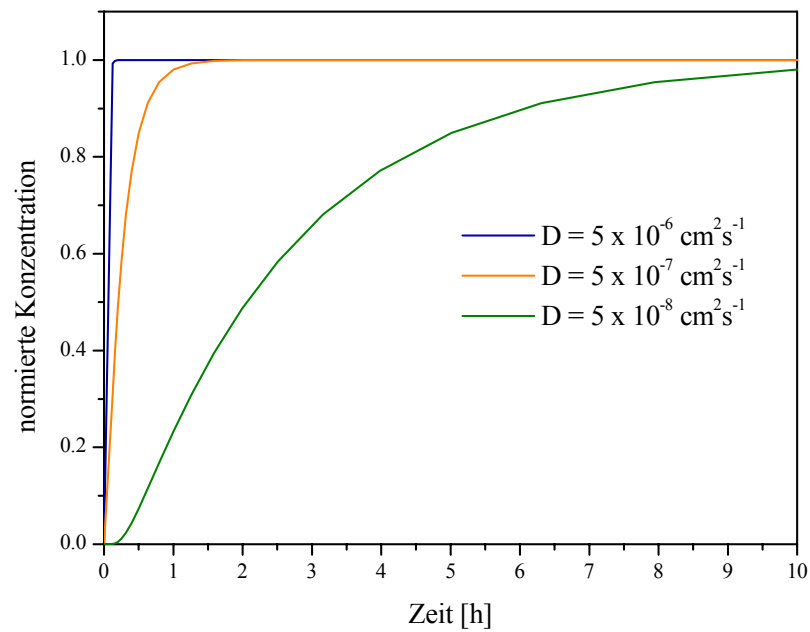


Abb. A 7: mit Hilfe des mathematischen Modells simulierte Kurvenverläufe an der FTIR-ATR Diffusionszelle für die Diffusion einer Substanz durch eine 16 μm dicke Membran mit verschiedenen Diffusionskoeffizienten

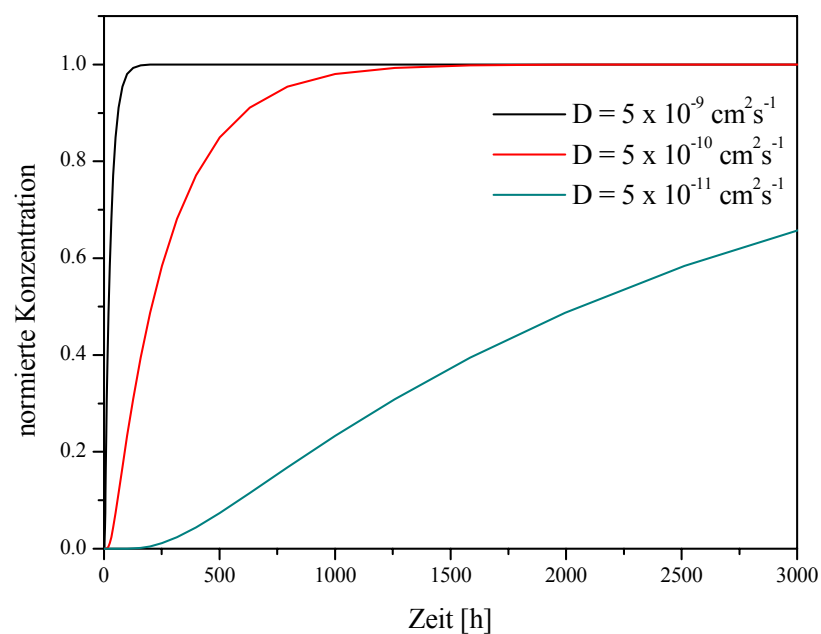


Abb. A 8: mit Hilfe des mathematischen Modells simulierte Kurvenverläufe an der FTIR-ATR Diffusionszelle für die Diffusion einer Substanz durch eine 16 μm dicke Membran mit verschiedenen Diffusionskoeffizienten

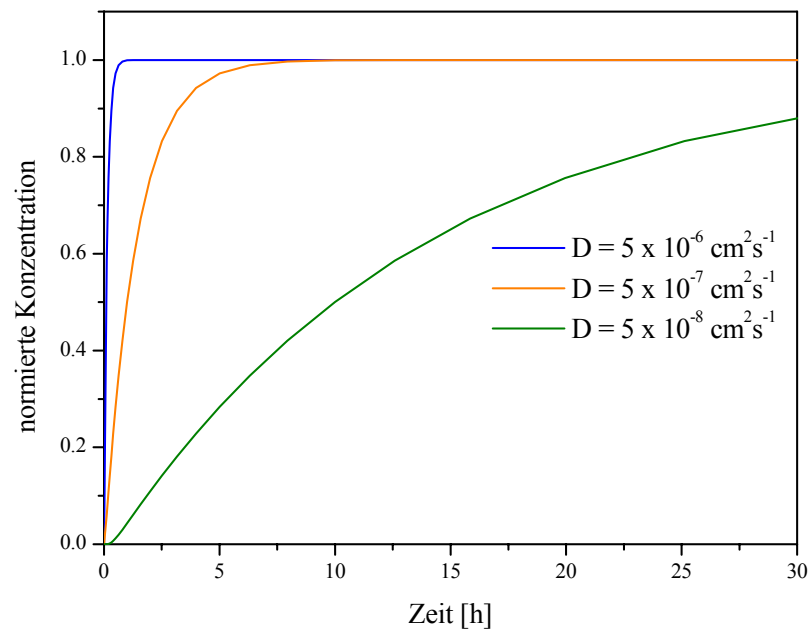


Abb. A 9: mit Hilfe des mathematischen Modells simulierte Kurvenverläufe an der FTIR-ATR Diffusionszelle für die Diffusion einer Substanz durch eine 130 μm dicke Membran mit verschiedenen Diffusionskoeffizienten

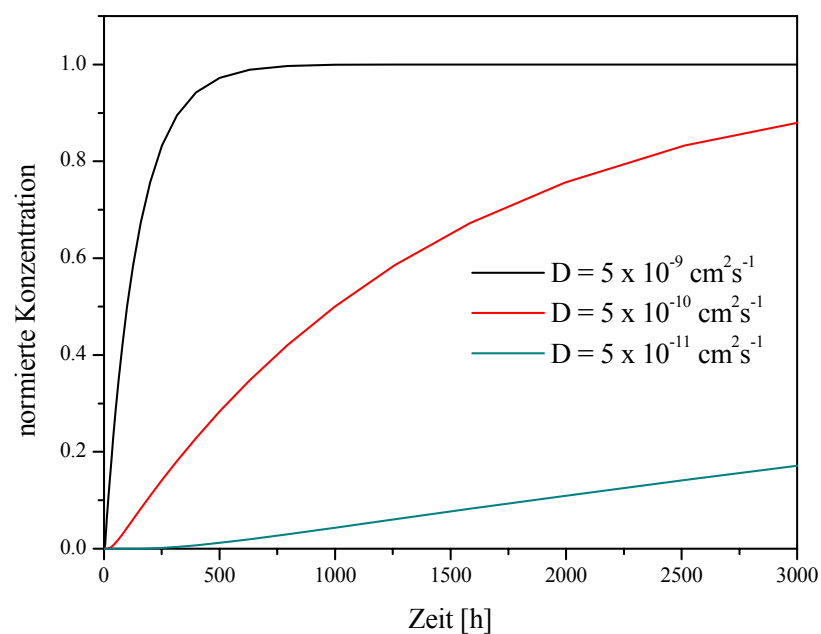


Abb. A 10: mit Hilfe des mathematischen Modells simulierte Kurvenverläufe an der FTIR-ATR Diffusionszelle für die Diffusion einer Substanz durch eine 130 μm dicke Membran mit verschiedenen Diffusionskoeffizienten

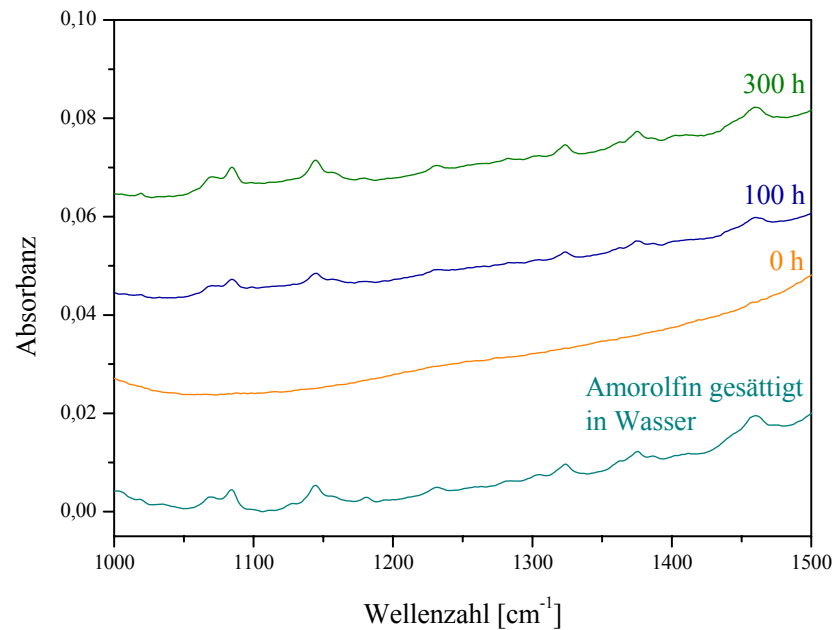


Abb. A 11: ATR-Spektren des Systems gesättigte Amorolfin-Wasser-Lösung/Rinderhufmembran/Wasser zu verschiedenen Zeiten des Diffusionsexperimentes. Die Sättigungslöslichkeit von Amorolfinhydrochlorid in Wasser beträgt 0,995 % (m/m) bei 32 °C (Mertin und Lippold 1997c). Zum Vergleich ist das Spektrum einer gesättigten Amorolfinhydrochlorid/Wasser-Mischung angegeben. Das Spektrum zum Zeitpunkt 0 Stunden entspricht reinem Wasser.

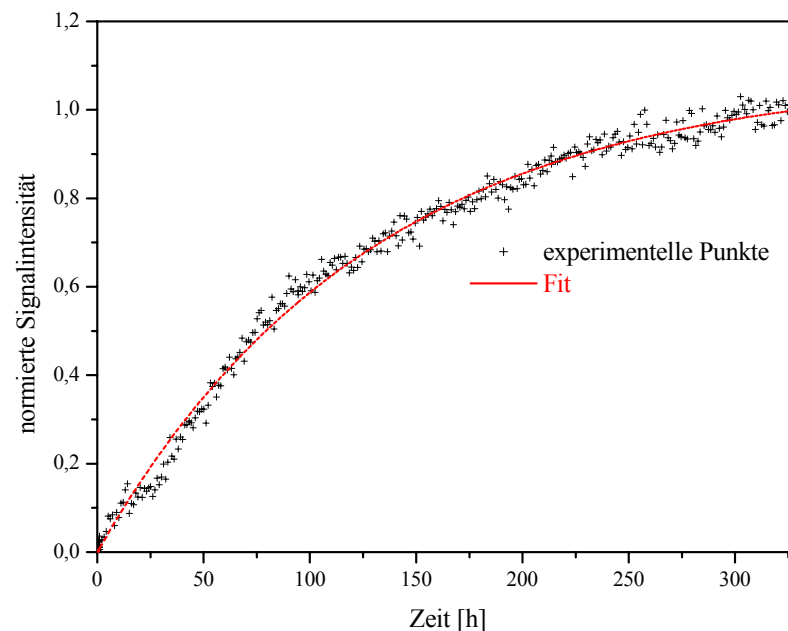


Abb. A 12: Zunahme der Amorolfinhydrochloridkonzentration im wässrigen Akzeptor während des Diffusionsexperimentes von Harnstoff durch eine Rinderhufmembran mit der ATR-Diffusionszelle. Membrandicke $101 \pm 1 \mu\text{m}$ ($N=10$), $D=2,95 \pm 0,05 \times 10^{-9} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$. Ausgewerteter Spektralbereich: $1435\text{-}1472 \text{ cm}^{-1}$.

Verzeichnis der Veröffentlichungen und Vorträge

Publikationen / Kurzpublikationen

M. Hartmann, B.D. Hanh, R.H.H. Neubert, S. Wartewig:

Non-invasive investigations of hydrophilic compound penetration into membranes using ATR-FTIR spectroscopy.

Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 334, Suppl. 2 (2001), 81

S. Wartewig, M. Hartmann, R. Neubert:

Infrarotspektroskopie - Neuere Entwicklungen und deren Anwendungen in der Dermatopharmazie.

PZ Prisma 9 (2001), 5-13

M. Hartmann, S. Wartewig:

FTIR-Abgeschwächte Totalreflexion (FTIR-ATR) zur Messung der Wirkstoffpenetration in Membranen, in R.H.H. Neubert: Dermatopharmazeutisch orientierte Forschungsschwerpunkte der Arbeitsgruppe Biopharmazie am Fachbereich Pharmazie der Martin-Luther Universität.

Swiss Pharma 5a (2002), 18-19

M. Hartmann, A. Hauser, S. Wartewig, R.H.H. Neubert:

Hydrophilic drug transport into a model glycerol-collodium membrane as studied by FTIR-ATR spectroscopy in completion with membrane examinations by AFM. Proc. 4th World Meeting ADRITEL/APGI/APV, Florenz, Italien, (2002), 1215 (akzeptiert)

J. Wensch, H. Podhaisky, M. Hartmann:

Estimation of a diffusion constant in an equation with a dynamic boundary condition using Fourier analysis.

Report No. 3 at the Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Department of Mathematics and Computer Science, 2003, 1-10

M. Hartmann, S. Wartewig, R.H.H. Neubert:

Use of an ATR spectroscopy diffusion cell to study drug diffusion through silicone-PEG membranes in Proceedings der Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft e.V., Würzburg, (2003), 90 (akzeptiert)

M. Hartmann, B.D. Hanh, H. Podhaisky, J. Wensch, J. Bodzenta, S. Wartewig, R.H.H. Neubert:

A new FTIR-ATR cell for drug diffusion studies

Analyst 129 (2004), 129-134

Vorträge und Posterpräsentationen

M. Hartmann:

Nichtinvasive spektroskopische Untersuchungen des Transportes hydrophiler Wirkstoffe in eine Glycerol-Collodium Membran.

Tagung des Graduiertenkollegs der Deutschen Forschungsgesellschaft „Transport von Wirkstoffen in biologischen Systemen“, Halle/Saale, 09.11.2001, Vortrag

M. Hartmann, B.D. Hanh, R.H.H. Neubert, S. Wartewig:

Non-invasive investigations of hydrophilic compound penetration into membranes using ATR-FTIR spectroscopy. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft e.V., Halle/Saale, 10.-13.10.2001, Poster

M. Hartmann, B.D. Hanh, R.H.H. Neubert, S. Wartewig:

Non-invasive spectroscopic investigations compound penetration into artificial membranes simulating stratum corneum.

Gordon research conference: Barrier function of mammalian skin, Bristol, Rhode Island, USA, 5.-10.8.2001, Poster

M. Hartmann:

FTIR-ATR spektroskopische Untersuchungen zur Charakterisierung des Wasser- und Harnstofftransportes in Membranen auf Silikonbasis.

Tagung des Graduiertenkollegs der Deutschen Forschungsgesellschaft „Transport von Wirkstoffen in biologischen Systemen“, Freyburg, 16.11.2002, Vortrag

M. Hartmann, A. Hauser, S. Wartewig, R.H.H. Neubert:

Hydrophilic drug transport into a model glycerol-collodium membrane as studied by FTIR-ATR spectroscopy in completion with membrane examinations by AFM. 4th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics, Pharmaceutical Technology, 08.-11.04.2002, Florenz, Italien, Poster

M. Hartmann, S. Wartewig, R.H.H. Neubert:

Use of an ATR spectroscopy diffusion cell to study drug diffusion through silicone-PEG membranes in Proceedings der Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft e.V., 8.-11.10.2003, Würzburg, Poster

M. Hartmann:

Charakterisierung der Wasserdiffusion durch Silikon-PEG-Membranen mit einer ATR-Diffusionszelle.

Tagung des Graduiertenkollegs der Deutschen Forschungsgesellschaft „Transport von Wirkstoffen in biologischen Systemen“, Friedrichroda, 05.09.2003, Vortrag

M. Hartmann, B. Hanh, H. Podhaisky, S. Heuschkel, S. Wartewig, R. Neubert:

Drug Penetration Studied by FTIR Methods.

82nd International Bunsen Discussion Meeting on “Raman and IR Spectroscopy in Biology and medicine”, Jena, 02.03.2004, Vortrag

Lebenslauf

Name: Marcus Hartmann
Geburtsdatum: 23.05.1975
Geburtsort: Rodewisch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1981 - 1990 Zehnklassige allgemeinbildende polytechnische Oberschule
„Sergeant Pawlow“ in Treuen
1990 - 1993 Gymnasium „Johann Wolfgang Goethe“ in Auerbach
1993 Abitur

Berufsausbildung

1994-1999 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
1996 Abschluss des 1. Abschnitts der Pharmazeutischen Prüfung
1999 Abschluss des 2. Abschnitts der Pharmazeutischen Prüfung
1999 - 2000 Pharmaziepraktikum an der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg, Anfertigung einer Diplomarbeit am Institut für
Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
2000 Pharmaziepraktikum in der Grünen-Apotheke in Halle
2000 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung mit der Note „sehr
gut“
2000 Erteilung der Approbation

Berufstätigkeit

2000-2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazeutische
Technologie und Biopharmazie

Zivildienst

1993 - 1994 Zivildienst im Krankenhaus Rodewisch/Obergöltzsch

Dank

Ich danke meinem Betreuer und wissenschaftlichen Lehrer Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Reinhard Neubert für die interessante Aufgabenstellung, die nützlichen Anregungen, die vielfältige Unterstützung sowie für Betreuung und Beratung während meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. habil. Siegfried Wartewig danke ich für die Betreuung der Arbeit, die Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei der Klärung spektroskopischer und physikalischer Fragestellungen sowie die stets wertvollen Ratschläge. Dadurch hat er den Fortgang der Arbeit entscheidend gefördert.

Herrn Prof. Dr. habil. Heinrich Richter verdanke ich die Bereitstellung des Polydimethylsiloxans sowie förderliche Diskussionen während der Entwicklung der füllstoffhaltigen Silikonmembran.

Für die Einführung in das Forschungsgebiet der ATR-Technik und vielfältige hilfreiche Auskünfte danke ich Herrn Dr. Bui Duc Hanh.

Bei Herrn Dr. Helmut Podhaisky und Herrn Dr. Jörg Wensch vom Institut für Mathematik und Informatik bedanke ich mich für die Unterstützung und die Hilfsbereitschaft bei der Entwicklung des mathematischen Modells.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Anton Hauser, dass er mir ermöglichte die Rasterkraftmikroskopieexperimente durchzuführen.

Für wertvolle Hinweise bei den Hautversuchen bin ich Herrn Prof. Dr. habil. Wolfgang Wohlrab zu Dank verpflichtet.

Für die Anfertigung der Mikrotomschnitte der Rinderhufmembranen danke ich Herrn Dr. Andreas Kiesow (Fraunhofer Institut).

Die praktische Umsetzung der theoretischen Vorlagen bei Konstruktion der ATR-Diffusionszelle verdanke ich Herrn Dieter Reese und den Mitarbeitern der Feinmechanikwerkstatt des Fachbereichs Pharmazie.

Herrn Dipl. Phys. Christian Schmelzer danke ich für die Hilfe bei der Erstellung der Cat-Grafiken.

Den Mitgliedern des Fachbereichs Pharmazie, insbesondere den Arbeitsgruppen Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie bin ich für das angenehme Arbeitsklima zu Dank verpflichtet.

Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß §5 (2) b der Promotionsordnung der Fakultät, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig sowie ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

.....
Marcus Hartmann