

**Untersuchungen zum Mechanismus der Penetrationserhöhung
durch Mikroemulsionen und neue Enhancer
bei der dermalen Applikation von Wirkstoffen**

D i s s e r t a t i o n

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

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Dipl. Pharm. Sandra Heuschkel

geboren am 23.05.1976 in Gera

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. h. c. R.H.H. Neubert
2. Prof. Dr. C. Valenta
3. Prof. Dr. H.-H. Borchert

Halle (Saale), 30.10.2009

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGS- UND SYMBOLVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG	1
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	3
2.1 Die Haut als Applikationsort von Arzneimitteln	3
2.1.1 Aufbau und Funktion der Haut	3
2.1.2 Dermale Arzneistoffaufnahme	5
2.1.3 Strategien zur Verbesserung der Penetration	7
2.2 Mikroemulsionen	8
2.2.1 Definition und Eigenschaften	8
2.2.2 Mikroemulsionen zur topischen Applikation	10
3 STRUKTUR- UND PENETRATIONSUNTERSUCHUNGEN AN DER MIKROEMULSION ME-BIP	13
3.1 Motivation und Zielstellung	13
3.2 Entwicklung und Phasendreieck	13
3.3 Physikochemische Charakterisierung der ME-BIP.....	15
3.3.1 Temperaturabhängiges Verhalten	15
3.3.2 Rheologie.....	15
3.3.3 Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie.....	16
3.3.4 Dynamische Lichtstreuung	17
3.3.5 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie.....	18
3.3.6 Elektrische Leitfähigkeit.....	24
3.3.7 pH-Wert.....	24
3.3.8 Dichte	24
3.3.9 Zusammenfassung: Physikochemische Charakterisierung	24
3.4 In-vitro-Untersuchungen zum Diffusions- und Penetrationsverhalten an künstlichen Lipidmembranen und humanem Stratum corneum.....	26
3.4.1 Mehrschichtmembranmodell	26
3.4.2 Untersuchungen an der FTIR-ATR-Diffusionszelle.....	29
3.4.3 Zusammenfassung: In-vitro-Diffusions- und Penetrationsstudien	43
3.5 Ex-vivo-Untersuchungen zur folliculären Penetration	46
3.5.1 Einleitung	46
3.5.2 Ergebnisse	48
3.5.3 Zusammenfassung: Follikuläre Penetration.....	52
3.6 In-vivo-Untersuchungen zur Penetration eines lipophilen Modellarzneistoffes und dessen Lokalisation im Stratum corneum	53
3.6.1 Einleitung	53
3.6.2 Ergebnisse	55
3.6.3 Zusammenfassung: In-vivo-Untersuchungen	59
3.7 Zusammenfassung: Struktur- und Penetrationsuntersuchungen	60
4 MODULATION VON FREISETZUNG UND PENETRATION DES MODELLARZNEISTOFFES DIHYDROAVENANTHRAMID D.....	62
4.1 Motivation und Zielstellung	62
4.2 Der Modellarzneistoff Dihydroavenanthramid D.....	63
4.2.1 Pharmakologie.....	63

4.2.2 Physikochemische Eigenschaften.....	63
4.3 Untersuchungen an halbfesten Formulierungen unter Zusatz von 1,2-Alkandiolen ...	65
4.3.1 In-vitro-Freisetzungsstudien.....	65
4.3.2 Ex-vivo-Penetrationsstudien.....	68
4.3.3 Zusammenfassung: Halbfeste Formulierungen.....	73
4.4 Mikroemulsionen zur dermalen Applikation von Dihydroavenanthramid D.....	73
4.4.1 Motivation und Zielstellung.....	73
4.4.2 Entwicklung und Charakterisierung des isotropen Phasengebietes.....	75
4.4.3 Charakterisierung ausgewählter Mikroemulsionen.....	80
4.4.4 HET-CAM.....	83
4.4.5 Ex-vivo-Untersuchungen zur Penetration.....	84
4.4.6 Zusammenfassung: Mikroemulsionen.....	87
4.5 Vergleich der Penetration aus halbfesten Formulierungen und Mikroemulsionen	87
4.6 Zusammenfassung	89
5 ZUSAMMENFASSUNG	91
6 EXPERIMENTELLER TEIL	94
6.1 Verwendete Substanzen und halbfeste Formulierungen.....	94
6.2 Physikochemische Charakterisierung der Modellarzneistoffe	95
6.2.1 Sättigungslöslichkeiten.....	95
6.2.2 Verteilungskoeffizienten.....	96
6.3 Physikochemische Charakterisierung der Mikroemulsionen.....	96
6.3.1 Phasendreieck.....	96
6.3.2 Polarisationsmikroskopie.....	96
6.3.3 Elektrische Leitfähigkeit.....	96
6.3.4 Differential Scanning Calorimetry.....	97
6.3.5 Dynamische Viskosität.....	97
6.3.6 pH-Wert.....	97
6.3.7 Dichte.....	97
6.3.8 Gefrierbruch-Transmissionselektronenmikroskopie.....	97
6.3.9 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie.....	97
6.3.10Dynamische Lichtstreuung.....	98
6.3.11Temperaturabhängiges Verhalten.....	98
6.4 Untersuchungen am Mehrschichtmembranmodell	98
6.5 FTIR-ATR Spektroskopie.....	100
6.6 Untersuchungen zu Penetration und Permeation an FRANZ-Diffusionszellen.....	103
6.6.1 Untersuchungen zur folliculären Penetration.....	103
6.6.2 Penetrationsstudien zu DHA _v D.....	105
6.7 In-vivo-Untersuchungen.....	107
6.8 HET-CAM Modell	108
6.9 Analytik der Substanzen	109
6.9.1 HPLC-Methoden.....	109
6.9.2 UV-Vis Spektroskopische Bestimmung.....	110
6.10 Statistische Auswertung	110
7 LITERATUR.....	111

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

ABC	Fläche zwischen den Kurven (engl. <i>area between the curves</i>)
a_N	Hyperfeinaufspaltungskonstante
AUC	Fläche unter der Kurve (engl. <i>area under the curve</i>)
B_0	magnetische Induktion
BC ^[Curc]	curcuminhaltige Basiscreme DAC
BIP	eutektisches Gemisch aus Butyl- und Isopropylphthalimid
BIP-DD	5 % (m/m) Mischung von BIP mit Dodecanol/Octanol
BP	Butylphthalimid
BuG	1,2-Butylenglycol
BuG-WHS	1,2-Butylenglycol-haltige Wasserhaltige Hydrophile Salbe
BuG/PeG	1:1 (m/m) Mischung von 1,2-Butylenglycol und 1,2-Pentylenglycol
BuG/PeG-WHS	die Glycolmischung enthaltende Wasserhaltige Hydrophile Salbe
BuG/PeG-WWAS	die Glycolmischung enthaltende Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe
c_s	Sättigungskonzentration
c_{ss}	<i>Steady-state</i> -Konzentration
Curc	Curcumin
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAC	Deutscher Arzneimittelcodex
DCM	Dodecanol-Collodium-Membran
DD	Dodecanol/Octanol 90/10 (m/m)
DDw	wassergesättigtes Dodecanol/Octanol 90/10 (m/m)
DHA _v D	Dihydroavenanthramid D
DLS	Dynamische Lichtstreuung (engl. <i>dynamic light scattering</i>)
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie (engl. <i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
ESR	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie
FF-TEM	Gefrierbruch-Transmissionselektronenmikroskop(ie) (engl. <i>freeze fracture transmission electron microscopy</i>)
FTIR-ATR	Fourier-Transformations Infrarot - Abgeschwächte Totalreflexion (engl. <i>Fourier-transform infrared attenuated total reflectance</i>)
FV	Follikelverschluss
HDG	Hydrodispersionsgel
HET-CAM	<i>hen's egg test - chorioallantoic membrane</i>
HLB	Hydrophilie-Lipophilie-Balance
HMLO	2'-Hydroxy-5'-methyl-laurophenoxim
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
IP	Isopropylphthalimid
LDF	Laser Doppler Fluxmetrie
LOD	Nachweisgrenze (engl. <i>limit of detection</i>)

LOQ	Bestimmungsgrenze (engl. <i>limit of quantification</i>)
LSM	Laser Scanning Mikroskop(ie)
M	Molare Masse
$m(t_{50\%})$	Anstieg im Wendepunkt
ME	Mikroemulsion
ME-BIP	BIP-haltige Mikroemulsion
ME-BIP ^[Curc]	curcuminhaltige ME-BIP
ME-BIP ^[HMLO]	HMLO-haltige ME-BIP
ME-BIP ^[Metro]	metronidazolhaltige ME-BIP
Metro	Metronidazol
Miz	mizellare Lösung
MSMM	Mehrschichtmembranmodell
MW	arithmetischer Mittelwert
n	Anzahl der Versuche
norm	normiert
oFV	ohne Follikelverschluss
O/W	Öl-in-Wasser
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PeG	1,2-Pentylenglycol
PeG-WHS	1,2-Pentylenglycol-haltige Wasserhaltige Hydrophile Salbe
PrG	1,2-Propylenglycol
PrG-DD	50 % (m/m) Mischung von PrG mit Dodecanol/Octanol
PrG-WHS	1,2-Propylenglycol-haltige Wasserhaltige Hydrophile Salbe
q	quantitativ
R ²	Bestimmtheitsmaß
R _{corr}	korrigiertes Massenverhältnis
R _h	hydrodynamischer Radius
SC	Stratum corneum
SD	absolute Standardabweichung
$t_{50\%}$	Wendepunkt einer Kurve
TEM	Transmissionselektronenmikroskop(ie)
WHS	Wasserhaltige Hydrophile Salbe
W/O	Wasser-in-Öl
WWAS	Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe
η	dynamische Viskosität
τ	Rotationskorrelationszeit
λ	Wellenlänge

1 Einleitung und Zielstellung

Die dermale Applikation von Arzneistoffen ist heute gängige Praxis und beschränkt sich nicht nur auf die Behandlung oberflächlicher Hautdefekte. Vielmehr kann sie auch dem Erzielen einer Tiefenwirksamkeit bis hin zu systemischen Effekten dienen. Um in den entsprechenden Hautschichten bzw. im Blutkreislauf therapeutische Konzentrationen erreichen zu können, muss zunächst die Hauptpenetrationsbarriere, das Stratum corneum, überwunden werden. Hierbei spielt neben den physikalisch-chemischen Eigenschaften des Wirkstoffes die galenische Formulierung eine maßgebliche Rolle.

Mikroemulsionen sind moderne kolloidale Arzneistoffträger, deren penetrationsförderndes Potenzial weithin bekannt und akzeptiert ist. Sie zeichnen sich durch ein gutes Solubilisierungsvermögen, auch für schwer lösliche Arzneistoffe, aus, sind auf einfache Weise herzustellen und thermodynamisch stabil. Trotz zahlreicher Studien, die es zur dermalen und transdermalen Anwendung von Mikroemulsionen gibt, besteht ein Informationsdefizit bezüglich des Mechanismus, welcher den exzellenten Penetrationseigenschaften zugrunde liegt. Ein komplexes Zusammenspiel von Faktoren, abhängig von der Zusammensetzung und der daraus resultierenden dynamischen Mikrostruktur, wird diskutiert. Um hier konkretere Einblicke zu erhalten, bestand die Aufgabenstellung des ersten Teiles dieser Arbeit (Kapitel 3) darin, die transepidermalen Penetrationsprozesse am Beispiel einer zuvor ausführlich physikochemisch charakterisierten Mikroemulsion detailliert zu studieren. Darüber hinaus sollte der Beitrag der follikulären Route untersucht werden. Diesem Weg wird in jüngster Zeit wieder mehr Beachtung geschenkt, und er erscheint für Mikroemulsionen aufgrund ihrer geringen Grenzflächenspannung und guten Spreitfähigkeit durchaus relevant. Schließlich sollte die Durchführung einer In-vivo-Studie, in der die Stratum-corneum-Penetration sowie die Beteiligung der Hautanhangsgebilde vergleichend zwischen der Mikroemulsion und einer halbfesten Zubereitung charakterisiert werden, die Ergebnisse abrunden.

Der zweite Teil der Arbeit (Kapitel 4) befasst sich unter Zuhilfenahme eines Modellarzneistoffes mit den Möglichkeiten, dessen Anreicherung in verschiedenen Kompartimenten der Haut bzw. in der systemischen Zirkulation durch die Auswahl geeigneter Formulierungen gezielt zu beeinflussen. Dabei wurde von konventionellen, halbfesten Zubereitungen ausgegangen, deren Effektivität im dermalen und besonders im transdermalen Wirkungsbereich jedoch häufig limitiert ist. Eine einfache Maßnahme zur Erhöhung ihres Penetrationsvermögens stellt der Zusatz von Enhancern dar. Während für 1,2-Propylenglycol widersprüchliche Aussagen zu einem Enhancereffekt existieren, stehen inzwischen 1,2-Alkandiole steigender Kettenlängen (1,2-Butylenglycol und 1,2-Pentylenglycol) für eine dermale

Applikation zur Verfügung. Deren Potenzial in dieser Hinsicht wurde bislang noch nicht untersucht, jedoch könnten sich die gegenüber 1,2-Propylenglycol modifizierten physikochemischen Eigenschaften, zum Beispiel über günstigere Solubilisierungsbedingungen für schwer wasserlösliche Arzneistoffe, als vorteilhaft erweisen. Diesem Ansatz folgend, kamen die genannten 1,2-Alkandiole im Rahmen von In-vitro-Liberations- und Penetrationsstudien zum Einsatz. Um schließlich eine transdermale Wirksamkeit durch galenische Maßnahmen zu erzielen, sollten innovative Mikroemulsionssysteme auf der Basis einer Kombination aus Proteintensid und 1,2-Alkandiolen entwickelt, ausführlich physikochemisch charakterisiert und schließlich auf ihre Penetrations- und Permeationseigenschaften hin getestet werden. Abschließend sollte der Vergleich der Ergebnisse aller Formulierungen die Möglichkeiten eines vehikelgesteuerten (trans-)dermalen *Drug Targeting* aufzeigen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Die Haut als Applikationsort von Arzneimitteln

2.1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut, mit 1,5 bis 2 m² Fläche das größte Organ des Menschen, grenzt den Körper gegenüber seiner Umwelt ab. Ihre Dicke schwankt regional zwischen 1,5 und 4 mm. Sie gewährleistet den Schutz des Organismus gegenüber mechanischen und chemischen Einflüssen, UV-Licht sowie Mikroorganismen, ist an Thermoregulation und Sinneswahrnehmung beteiligt und besitzt als äußerster Vorposten des Abwehrsystems Immunkompetenz [1]. Aufgrund der Präsenz verschiedener Enzymsysteme in der Haut, wie Esterasen, Transferasen oder Isoenzymen der Cytochrom P450-Familie, ist sie in einigem Ausmaß zu metabolischen Aktivitäten fähig [2]. Neben allen physiologischen Funktionen ist die Haut auch als Applikationsort für Arzneistoffe von großem Wert.

Im Wesentlichen wird das Organ von außen nach innen in Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subkutis (Unterhaut) gegliedert (Abbildung 1). Oberflächlich schließt sie mit einem dünnen, leicht antimikrobiell wirksamen Hydrolipidfilm ab. Dieser setzt sich aus Sebum- und Schweißbestandteilen, epidermalen Lipiden und losen Hornhautschuppen zusammen und hat einen pH-Wert von 5 bis 6. Für die Penetration von Arzneistoffen stellt er kein Hindernis dar [3].

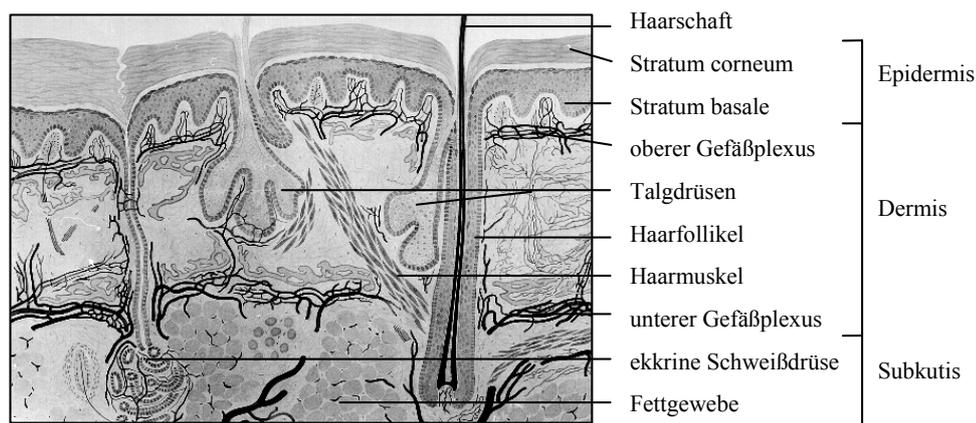


Abbildung 1: Aufbau der menschlichen Haut (modifiziert nach GRÜNEBERG, zitiert nach [4]).

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel. Sie besteht zu ca. 90 % aus Keratinozyten, die dem Stratum basale entstammend auf ihrem Weg durch die epidermalen Schichten streng regulierten Differenzierungs- und Umordnungsvorgängen unterliegen. Die Kaskade endet im Stratum corneum (SC), einer Schicht aus avitalen, kernlosen

Korneozyten, die aus Keratinfilamenten in einer amorphen Proteinmatrix, umhüllt von einer starren Hülle, dem „*cornified envelope*“, bestehen. Je nach Lokalisation umfasst das Stratum corneum ca. 15-20 Zelllagen, wobei die Korneozyten in eine lipidreiche interzelluläre Matrix eingebettet sind [1]. Letztere setzt sich größtenteils aus Ceramiden, Cholesterol, Cholesterolsulfat und freien Fettsäuren zusammen, die sich mit dem in 10 bis 40 %igem Anteil ebenfalls vorhandenen Wasser zu Lipiddoppelschichten (Bilayer) organisieren [5-7]. In den wasserführenden Schichten sind Feuchthaltefaktoren wie Harnstoff, verschiedene Carbonsäuren und Ionen gelöst. Die Struktur des Stratum corneum wurde im „*brick and mortar*“ Modell von ELIAS als heterogenes Zweikompartimentsystem beschrieben [8]. Der Vergleich mit einer Mauer, in der Ziegelsteine von Mörtel umgeben sind, spiegelt neben der Anordnung auch die extreme Rigidität der Schicht wider, die damit die eigentliche Barrierefunktion der Haut innehat. Hakenähnliche Strukturen der Korneozyten sowie die Corneodesmosomen als makromolekulare Zell-Zell-Verbindungsstellen spielen in diesem Zusammenhang eine maßgebliche Rolle [9].

In den tieferen, lebenden Schichten der Epidermis sind Melanozyten und Langerhanszellen als dendritische Zellen lokalisiert. Während die Melanozyten die Pigmentierung der Haut regulieren und vor schädigender UV-Strahlung schützen, besitzen die Langerhanszellen als Teil des Immunsystems Phagozytoseaktivität und sind an epikutanen Sensibilisierungsprozessen beteiligt. Bei den ferner im Stratum basale angesiedelten Merkelzellen handelt es sich um Nervenzellen, die für die Sinneswahrnehmung bedeutsam sind.

Die Dermis (Korium) ist ein Gewebe hoher Reißfestigkeit und Elastizität, welches aus vernetzten Kollagenfaserbündeln und elastischen Fasern besteht. Sie beherbergt das die Haut versorgende mikrovaskuläre Gefäßnetz, wobei der oberflächliche vom tieferen horizontalen Plexus unterschieden wird. Zwischen beiden verlaufen vertikale Verbindungslinien. Daneben finden sich hier Nervenzellen, Fibroblasten sowie die zur Mediatorfreisetzung befähigten Mastzellen.

Als unterste Schicht dient die Subkutis mit ihren traubenförmig angeordneten Fettzellen als Nährstoff- und Wasserspeicher sowie dem Wärme- und mechanischen Schutz. Die gelartige Füllsubstanz von Dermis und Subkutis ist aus Proteoglykanen und Glykosaminglykanen zusammengesetzt.

Haare, Nägel sowie Talg- und Schweißdrüsen sind als Hautanhangsorgane epidermaler Abkunft, jedoch tief in die Dermis eingebettet. Ihr Auftreten unterbricht das durchgehende Stratum corneum, was sie damit als potentielle Penetrationsroute für Arzneistoffe von Interesse sein lässt [10]. Das Haar z.B. steckt in einer Invagination der Epidermis, dem Haarfollikel, und ist folglich mit Epidermiszellen ausgekleidet. Eine voll funktionstüchtige Hornschicht fehlt allerdings. In den oberen, trichterförmig erweiterten Teil des Follikels, das Infundibulum, münden die Talg- und ggf. eine apokrine Drüse. Haarfollikel besitzen einen eigenen Gefäßplexus sowie ein dichtes Nervengeflecht [1, 10]. Follikeldichte, Follikel-

volumen und die damit verbundene Vergrößerung der Hautoberfläche hängen stark von der Körperregion ab [11].

2.1.2 Dermale Arzneistoffaufnahme

Die Aufnahme von Arzneistoffen durch die Haut ist ein komplexes Wechselspiel zwischen den physikalisch-chemischen Eigenschaften von Pharmakon und Vehikel sowie der Barrierefunktion am Applikationsort [4, 12].

Die gelösten Wirkstoffmoleküle diffundieren zunächst in der Formulierung entlang eines Konzentrationsgradienten zur Grenzfläche Vehikel - Haut (Freisetzung), penetrieren in das Stratum corneum und permeieren die vitale Epidermis und Dermis. Über das dort eingebettete mikrovaskuläre Gefäßnetz kann die Absorption, also der Übertritt in die systemische Zirkulation erfolgen. In dieser Abfolge stellt die Wirkstoffdiffusion in das Stratum corneum in der Regel den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar.

Die dermale Arzneistoffaufnahme ist ein passiver Vorgang, der sich trotz komplexer Barrierestrukturen mit Hilfe des 1. FICKSchen Diffusionsgesetzes beschreiben lässt. Hierzu wird das Stratum corneum vereinfacht als isotrope lipophile Verteilungsmembran betrachtet und der permanente Abtransport des Diffusanten zur Einhaltung von *Sink*-Bedingungen vorausgesetzt. Der Substanzfluss des Arzneistoffes, der Flux J , unterliegt demnach folgenden Abhängigkeiten:

$$J = \frac{dQ}{dt \cdot A} = -\frac{D \cdot V k_{SC/V}}{h} \cdot c_v = P \cdot c_v \quad \text{Gleichung 1}$$

Dabei sind

dQ/dt	pro Zeiteinheit aus dem Vehikel diffundierende Arzneistoffmenge,
A	Fläche,
D	Diffusionskoeffizient des Arzneistoffes im Stratum corneum,
$V k_{SC/V}$	Verteilungskoeffizient Stratum corneum/Vehikel,
h	Länge des Diffusionsweges bzw. vereinfacht: Dicke des Stratum corneum,
c_v	Konzentration des freien, gelösten Arzneistoffes im Vehikel und
P	Permeationskoeffizient.

Die Gleichung spiegelt das oben genannte Zusammenspiel von Arzneistoff, Vehikel und Haut wider. Triebkraft der Penetration ist der Konzentrationsunterschied beiderseits des Stratum corneum, der unter *Sink*-Bedingungen zu c_v vereinfacht und durch eine Konzentrationserhöhung des Arzneistoffes bis zum Erreichen der Sättigungslöslichkeit im Vehikel, die der maximalen thermodynamischen Aktivität entspricht, gesteigert werden kann. Einen Sonderfall stellen übersättigte Systeme dar. Im Diffusionskoeffizienten zusammengefasst finden sich Viskosität, Partikelgröße und Temperatur als weitere Einflussgrößen auf den Flux [13]. Neben der Länge des Diffusionsweges, abhängig von Hautareal, Hydratisierungs-

zustand und Diffusionsroute, spielt die Verteilung des Arzneistoffes zwischen Vehikel und Stratum corneum eine große Rolle [4, 13-15].

Der Verteilungskoeffizient V_k (angegeben als $\log P$ bzw. $\log D$) charakterisiert generell das Verteilungsverhalten eines Stoffes zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen entsprechend seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften. Goldstandard zur Bestimmung ist das n-Octanol/Puffer-System [13]. Je höher der Wert für einen Arzneistoff ist, desto größer ist seine Tendenz, sich in einer lipophilen Phase (Membran) anzureichern. Da das Stratum corneum sowohl hydrophile als auch lipophile Bereiche umfasst, ist die Penetration von Stoffen mit einem Verteilungskoeffizienten nahe 1 begünstigt [16].

Die Passage der Hauptpenetrationsbarriere kann generell auf zwei verschiedenen Wegen stattfinden: durch das intakte Stratum corneum (transepidermal) oder über die Hautanhangsgebilde. Abbildung 2 veranschaulicht dies.

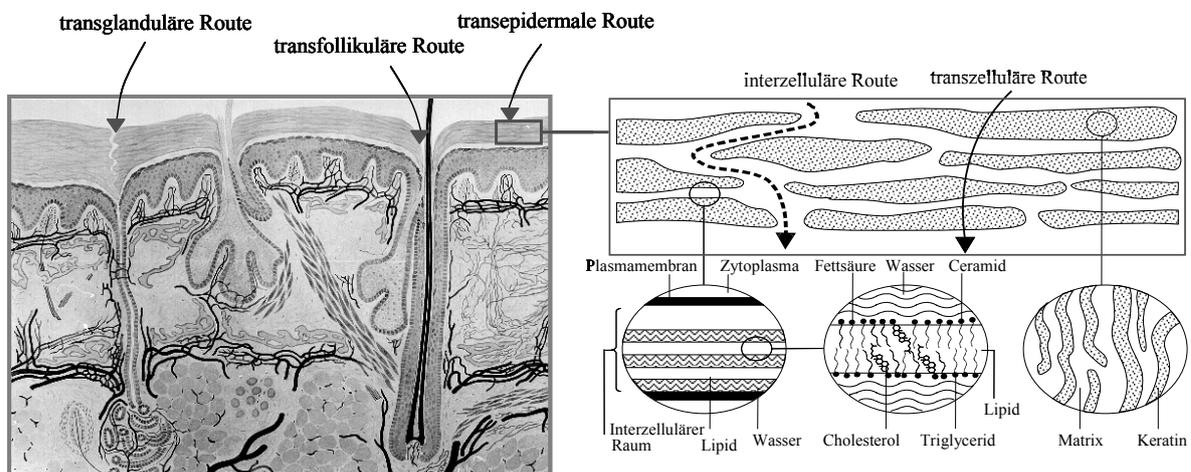


Abbildung 2: Penetrationswege durch das Stratum corneum. Links: zitiert nach [4], rechts: modifiziert nach BARRY [17].

Der transepidermale Weg kann zum einen transzellulär, zum anderen interzellulär erfolgen. Die gewundene Route entlang der Lipidbilayer wird inzwischen nicht nur für lipophile, sondern auch für hydrophile Moleküle als die relevanteste angesehen [14, 18-22]. Während ein lipophiler Stoff bevorzugt entlang der Alkylketten der Lipide diffundiert, nutzen hydrophile Substanzen die Bereiche der polaren Kopfgruppen [17, 23].

Die direkte Passage des intakten Stratum corneum wird bei den sogenannten „Shunt“-Routen umgangen. Dem Transport entlang der Schweißdrüsen (transglandulär) und der Haarfollikel einschließlich der damit assoziierten Talgdrüsen (transfollikulär) wurde lange Zeit wenig Beachtung geschenkt [14]. Die dem zugrunde liegende Annahme, dass die Hautanhangsgebilde nur ca. 0,1 % an der gesamten Körperoberfläche ausmachen, konnte in systematischen Untersuchungen von OTBERG et al. zu Follikelgröße und -verteilung in verschiedenen Körperarealen nur für die Innenseite des Unterarms bestätigt werden. Diese Region wird jedoch am häufigsten für Penetrationsstudien genutzt. Ein potenzielles

follikuläres Reservoir für topisch applizierte Substanzen, welches dem des Stratum corneum vergleichbar ist, ergab sich für die Haut an Stirn und Wade [11, 24]. Generell stehen nur die Follikel als Penetrationsweg zur Verfügung, die Talgproduktion bzw. Haarwachstum aufweisen und nicht mit einem „Deckel“ aus abgestoßenen, mit Talgbestandteilen verbundenen Korneozyten verschlossen sind [25, 26]. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass die Penetration in die Follikel wesentlich schneller erfolgt als die ihr entgegen gerichteten physiologischen Wachstums- und Sekretionsprozesse [27]. Nach ersten Hinweisen auf die Bedeutung der transfollikulären Route in den 60er Jahren von SCHEUPLEIN et al. (z.B. [28]) wurden bis heute zahlreiche Studien durchgeführt, die dies auch für andere als polare Substanzen, Elektrolyte und große Moleküle [3] in mehr oder minder großem Umfang bestätigten. Beispielhaft seien folgende Arbeiten genannt [29-36]. Inzwischen existieren vielversprechende Ansätze für potentielle klinische Anwendungen follikulären Targetings, zum Beispiel in den Bereichen transkutane Vakzination, Immun- und Stammzelltargeting sowie Gentherapie. Eine aktuelle Übersicht wurde kürzlich von KNORR et al. publiziert [37].

2.1.3 Strategien zur Verbesserung der Penetration

Um Arzneistoffe gezielt in bestimmten Hautschichten anzureichern bzw. sie auf transdermale Weg dem Blutkreislauf zuzuführen, können verschiedene Strategien verfolgt werden. Die Grafik stellt in einer Übersicht die bedeutendsten Möglichkeiten dar. Farblich hervorgehoben sind dabei die Maßnahmen, die für die vorliegende Arbeit relevant sind.

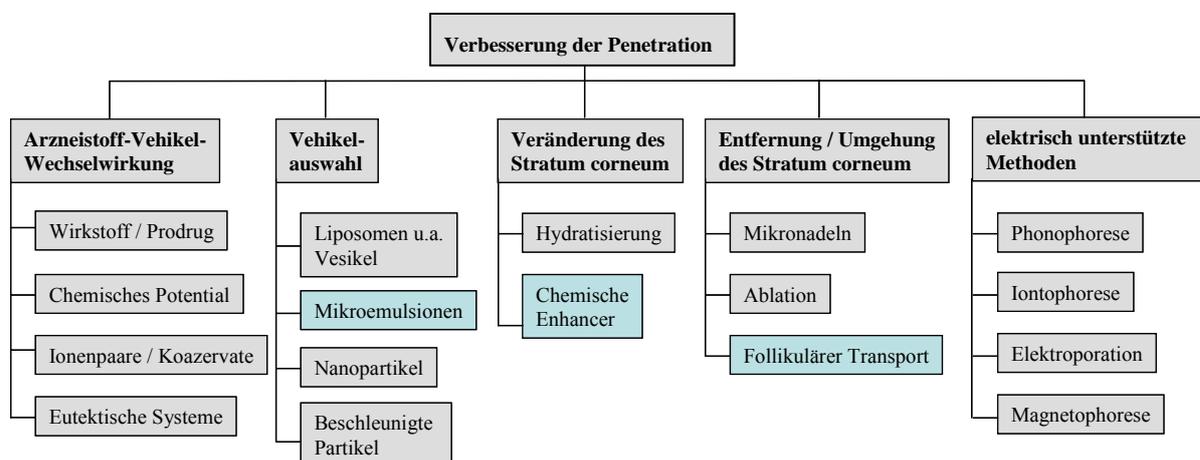


Abbildung 3: Strategien zur Verbesserung der Penetration bei topischer Applikation von Arzneistoffen (modifiziert nach [38], [39]).

Details zur follikulären Penetrationsroute sowie zu Mikroemulsionen als kolloidale Vehikelsysteme sind an anderer Stelle beschrieben (vgl. Kapitel 2.1.2 und 2.2.2). Nachfolgend soll kurz auf die Verwendung von Penetrationenhancern eingegangen werden. Diese Stoffe dringen in die Haut ein und setzen reversibel deren Barrierefunktion herab. Die Wirkmechanismen sind sehr komplex und selten eindeutig aufgeklärt. Im Wesentlichen liegen Veränderungen innerhalb der Stratum-corneum-Lipidbilayer und/oder Proteine sowie eine

Beeinflussung des Verteilungsverhaltens zugrunde. Modifikationen im Arrangement der Lipide durch Wechselwirkungen im Bereich der hydrophilen Kopfgruppen bzw. der Fettsäurereste führen zu einer erhöhten Fluidität und geänderten Polarität. Die Auflockerungen der Lipidstrukturen treten vermutlich nicht gleichmäßig, sondern heterogen auf. Ein solches „pooling“-Phänomen wurde für die mit Propylenglycol synergistisch wirkende Ölsäure und für Azone festgestellt. Es gilt für die meisten Enhancer als wahrscheinlich.

Interaktionen mit dem intrazellulären Keratin reichen von Konformationsänderungen (z.B. durch Dimethylsulfoxid, DMSO) bis zur Denaturierung und verursachen Quellung und eine verstärkte Hydratisierung der Hornschicht. Stärkere, dermatologisch nicht tolerierbare Schäden an der Integrität des Stratum corneum entstehen durch Lösungsmittel in hohen Konzentrationen. Hier werden die für die Kohäsion der Korneozyten verantwortlichen Desmosomen angegriffen.

Durch Enhancer, die in der Regel gute Lösungseigenschaften besitzen, kann das Verteilungsverhalten von Arzneistoffen oder Cosolvenzien in die Haut günstig beeinflusst werden. Dies trifft zum Beispiel für Pyrrolidonderivate wie NMP (N-Methyl-2-Pyrrolidon) zu.

Neben diesen direkten Veränderungen von Struktur und Eigenschaften des Stratum corneum existieren weitere, indirekte Möglichkeiten der Beeinflussung. So kann die thermodynamische Aktivität eines Arzneistoffes in einem ethanolhaltigen Vehikel durch dessen schnelle Penetration bzw. Verdunstung bis zur Einstellung eines übersättigten Zustandes erhöht werden. Außerdem wird eine Schlepperfunktion bestimmter Solvenzien (z.B. Propylenglycol, PrG, vgl. Kapitel 4.3) auf Wirkstoffe diskutiert (*Solvent-drag*-Effekt).

Als typische Bestandteile halbfester Formulierungen können auch Tenside die Penetration fördern. Dabei wird anionischen Vertretern, zumindest bei Langzeitexposition, ein stärkerer Effekt zugesprochen. Nichtionische Emulgatoren gelten allgemein als sicher in der Anwendung und wenig irritativ.

Schließlich soll das sicherste und überaus effektive Enhancermolekül Wasser nicht unerwähnt bleiben. Durch eine verstärkte Hydratisierung infolge Okklusion kann die Aufnahme vieler Arzneistoffe in die Haut gefördert werden [12].

Generell ist die Wirkung von Enhancern meist konzentrationsabhängig und arzneistoffspezifisch. Sie kann bestenfalls für Substanzen mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften vorausgesagt werden, wobei das Ausmaß des Effektes kaum prognostizierbar ist.

Für weitere detaillierte Einblicke in die Thematik der Penetrationenhancer sei auf [40, 41] verwiesen.

2.2 Mikroemulsionen

2.2.1 Definition und Eigenschaften

Mikroemulsionen (ME) zählen zu den modernen kolloidalen Arzneiträgersystemen. Ihre Bildung wurde erstmals 1943 von HOAR und SCHULMAN beschrieben [42]. Sie erfolgt

spontan bei Kombination geeigneter Mengen einer hydrophilen und einer lipophilen Komponente mit einem Tensid sowie einem Cotensid. Die resultierenden Systeme sind einphasig, optisch isotrop, transparent bis leicht opaleszent, thermodynamisch stabil und von niedriger Viskosität [43-45]. Der ohne Energieeintrag ablaufende Bildungsprozess geht mit einer deutlichen Erniedrigung der Grenzflächenspannung einher [46, 47]. Dazu bedarf es des genannten Cotensides, welches in den Grenzflächenfilm eindringt und dessen Krümmung und Fluidität verstärkt [47, 48]. Zum Einsatz kommen in der Regel kurz- bis mittelkettige Alkohole bzw. aus Gründen der Hautverträglichkeit nichtionische Emulgatoren. Insbesondere niedermolekulare Alkohole zeigen auch Bulkeffekte. Das bedeutet, sie verteilen sich zwischen den Mikrokompartimenten einer Mikroemulsion und verändern deren relative Hydro- bzw. Lipophilie [49].

Mikroemulsionen existieren in unterschiedlichen Mikrostrukturen, d.h. submikroskopischen Regionen wässriger oder lipophiler Natur, die durch einen flexiblen Grenzflächenfilm voneinander getrennt sind [50]. Im Wesentlichen werden bikontinuierliche Systeme von tröpfchenartigen abgegrenzt. Letztere können entweder wasser- oder ölkontinuierlich ausgeprägt sein und entsprechen dem Konzept geschwollener Mizellen. Die Größe der kolloidalen Kompartimente bewegt sich dann im Bereich von 10 bis 100 nm. Bikontinuierliche Mikroemulsionen, erstmals beschrieben 1976 [51], zeichnen sich dadurch aus, dass Wasser und Lipid jeweils zusammenhängende Domänen ausbilden, die durch tensidreiche Grenzflächen voneinander separiert sind. Sie entstehen vorrangig, wenn annähernd gleiche Mengen an Öl und Wasser sowie größere Quantitäten an Tensid im System vorliegen. Darüber hinaus erscheint auch die Existenz nicht-sphärischer Assoziate in einer mehr oder weniger kontinuierlichen Umgebung der Komponente mit der höheren Volumenfraktion als Übergangszustand zwischen den genannten Extrema plausibel [52]. Eine klare Abgrenzung der tröpfchenartigen Mikroemulsionen von anderen kolloidalen Strukturen, insbesondere solubilisierten mizellaren Systemen ist problematisch, da ein eindeutig definierter „Umschlagspunkt“ fehlt [48, 53]. Analog ATTWOOD [48] und in Übereinstimmung mit der von DANIELSSON und LINDMAN [43] postulierten Definition schließt der Term „Mikroemulsion“ in der vorliegenden Arbeit die genannten Systeme mit ein.

Gemeinsam ist allen submikroskopischen Ausprägungen ihre hohe Dynamik. Die Assoziate sind ständigem Aufbrechen und spontanen Reorganisationsprozessen unterworfen [50, 54]. Obwohl die Systeme demzufolge keine statischen Phasen entsprechend der GIBBSschen Definition ausbilden, werden die wasser- bzw. ölreichen Domänen in der Literatur häufig als „Phasen“ bezeichnet. Ebenso wird der Term „Mikroemulsion“ selbst, eingeführt 1959 [55], gelegentlich irreführend verwendet. Er impliziert fälschlicherweise emulsionsartige Eigenschaften mit Tropfengrößen im Submikronbereich. Tabelle 1 fasst die wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Technologien zusammen.

Die besonderen Eigenschaften der Mikroemulsionen eröffnen verschiedene Vorteile für ihre pharmazeutische Verwendung. Dazu gehören die einfache Herstellung, Langzeitstabilität,

eine hohe Solubilisierungskapazität für hydrophile und lipophile Arzneistoffe sowie ihr penetrationsförderndes Potenzial. Neben der nachfolgend beschriebenen Applikation auf die Haut finden die Formulierungen u.a. auch im oralen [56-59], parenteralen [60] und ophthalmologischen [61-63] Bereich Anwendung.

Tabelle 1: Unterschiede zwischen Mikroemulsionen und Emulsionen.

Eigenschaft	Mikroemulsion	Emulsion
Aussehen	transparent bis leicht opaleszent	milchig
Stabilität	thermodynamisch stabil	kinetisch stabilisiert
Bildung	spontan	unter Energieaufwand
Grenzflächenspannung	geht gegen $0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$	$\sim 50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$
Mikrostruktur	dynamisch (fluktuierende Grenzflächen)	statisch (bis zur Koaleszenz)
optische Isotropie	ja	nein
Größe der kolloidalen	10-100 nm	> 500 nm
Assoziante bzw. Tröpfchen		(Nanoemulsionen: > 50 nm)

2.2.2 Mikroemulsionen zur topischen Applikation

Die topische Applikation von Mikroemulsionen kann sowohl die Erhöhung der dermalen Verfügbarkeit von Arzneistoffen als auch eine systemische Wirkung unter Umgehung des Gastrointestinaltraktes sowie eines *First-pass*-Effektes zum Ziel haben. Der Status quo wurde kürzlich in eigener Arbeit ausführlich diskutiert [64]. Die nachfolgenden Betrachtungen beschränken sich daher auf Faktoren, die einen Einfluss auf das Penetrationsverhalten ausüben.

Obwohl das Potenzial der Formulierungen, die Arzneistoffpenetration zu fördern, weithin akzeptiert ist, besteht ein Informationsdefizit bezüglich des zugrunde liegenden Mechanismus. Wahrscheinlich kommt es zu einem komplexen Zusammenspiel von Faktoren, abhängig von der Zusammensetzung und der daraus resultierenden Mikrostruktur. Mehrfach wurde der Einfluss der Tensidmenge auf den Arzneistoffflux untersucht mit dem Ergebnis, dass eine Erhöhung dieses Anteils nicht unbedingt eine verbesserte Penetration zur Folge hat [65-72]. Innerhalb formulierungsspezifischer Grenzen trat sogar eine inverse Korrelation auf. Einige Autoren vermuteten, dass die thermodynamische Aktivität der Arzneistoffe durch steigende Tensidmengen geringer wird [71, 72]. Damit kann eine generelle Penetrationssteigerung infolge tensidbedingter Veränderung der Barriereigenschaften des Stratum corneum ausgeschlossen werden.

Als weiterer Faktor wurde ein optimales Tensid/Cotensid-Verhältnis diskutiert. Um ein großes Mikroemulsionsgebiet im Phasendreieck auszubilden, erwies sich bei Kombination nichtionischer Tenside mit Glycolen oder Transcutol als Cotensid ein größeres Verhältnis als vorteilhaft [67, 68, 73]. Ein höherer Arzneistoffflux wurde andererseits durch kleinere Relationen erreicht [68, 74].

Großen Einfluss besitzt die Menge an Wasser in einer Mikroemulsion. OSBORNE et al. fanden in Permeationsuntersuchungen eine Korrelation mit dem Flux ihres Modellwirkstoffes Glucose. Die Anwesenheit freien Wassers erwies sich als essentiell für den Glucosetransport in die Haut. Dienten bei einem niedrigen Wassergehalt hingegen alle Wassermoleküle der Hydratisierung der Tensidkopfgruppen und standen nicht für eine Verteilung in die Haut zur Verfügung, war der Wirkstofftransport erheblich eingeschränkt [75]. Ähnliches berichteten SINTOV und SHAPIRO über den Flux von Lidocain [68] sowie CHANGEZ et al., die lecithinhaltige Mikroemulsionen für die dermale Applikation von Tetracainhydrochlorid nutzten [76].

Die kontinuierlich und spontan fluktuierenden Grenzflächen der kolloidalen Systeme ermöglichen eine hohe Arzneistoffmobilität, was wiederum Diffusionsprozesse der Substanzen unterstützen kann [52]. NMR-Studien von KREILGAARD et al. [66] und HUA et al. [74] zur Dynamik innerhalb der Mikroemulsionen konnten eine These hervorbringen, die alle genannten Einflussfaktoren umfasst. Beide Gruppen fanden eine Korrelation zwischen der Arzneistoffmobilität im Vehikel, die von der ausgebildeten Mikrostruktur abhängig ist, und dem Arzneistoffflux. Von großer Bedeutung ist das optimale Ausmaß der Hydratisierung der Tensidkopfgruppen, bei dem gleichzeitig ausreichend freies Wasser zur Verfügung steht, das eine schnelle Wirkstoffdiffusion ermöglicht. Der notwendige Wasseranteil ist für jedes quaternäre System spezifisch und hängt u.a. von der Art des (Co)Tensides ab, insbesondere von Größe und Wasserbindungsvermögen der polaren Kopfgruppe. Dieses Prinzip scheint nicht nur für hydrophile Wirkstoffe [75] zu gelten. Auch die Permeabilität lipophiler Substanzen korreliert mit dem Diffusionsvermögen des Wassers [74]. In diesem Kontext wurde vermutet, dass die Hydratisierung des Stratum corneum durch die Formulierung eine wichtige Rolle spielt.

Zur Verbesserung der Anwenderfreundlichkeit, aber auch zur chemischen Stabilisierung von Wirkstoffen wurde der Zusatz von Polymeren zur Viskositätserhöhung erprobt. Der Vergleich mit den entsprechenden unmodifizierten Vehikeln ergab interessanterweise keine negativen Auswirkungen auf die Permeationseigenschaften, vielmehr war das Gegenteil der Fall [77, 78]. In diesem Zusammenhang belegten NMR-Untersuchungen an einer gelatinehaltigen W/O-Mikroemulsion, dass die einzelnen Komponenten – Tensid, Öl und Wasser – ihre ursprünglichen Mobilitäten beibehielten, obwohl die Makroviskosität des Vehikels deutlich erhöht war [79, 80].

Aus den genannten Zusammenhängen kann geschlussfolgert werden, dass das volle Diffusionspotenzial eines Wirkstoffes durch Zusammensetzung bzw. Mikrostruktur einer Mikroemulsion eingeschränkt sein kann. Beispiele dafür sind Adsorption der Arzneistoffmoleküle an die Tenside bis hin zu deren „Einkapselung“ oder die ungünstige Verteilung des Arzneistoffes zwischen Formulierung und Haut [74, 75, 81]. Die Wahrscheinlichkeit dafür ist umso größer, wenn amphiphile Wirkstoffe oder große Mengen an Tensid verarbeitet werden. Mikroemulsionen vom wasserkontinuierlichen Typ überzeugten in den meisten

Studien, auch wenn die Penetration hydrophiler Substanzen gefördert werden sollte [64, 82, 83].

Neben Mobilitätsparametern ist die gute Solubilisierungskapazität der kolloidalen Formulierungen für hydrophile und lipophile Wirkstoffe ein wesentlicher Punkt. Schöpft man diese durch Sättigung oder sogar Übersättigung der Mikroemulsionen aus, resultieren eine hohe thermodynamische Aktivität sowie ein hoher Konzentrationsgradient zwischen Vehikel und Haut. Beides sind wichtige Antriebskräfte für den Arzneistofftransport [84-87]. Ebenso könnte sich die Penetration weiterer Mikroemulsionsbestandteile vorteilhaft auf die Löslichkeit eines Arzneistoffes im Stratum corneum auswirken [88]. Möglicherweise steht die erhöhte perkutane Absorption des Modellwirkstoffes Cetylalkohol, die nach Vorbehandlung der Haut mit einer Mikroemulsion von LINN et al. beobachtet wurde, damit in Zusammenhang. Sie trugen die Substanz nach Applikation des kolloidalen „Placebo-vehikels“ mit Hilfe einer Creme sowie einer Lotio auf [89].

Den Penetrationsweg betreffend gilt generell die transepidermale, speziell die interzelluläre Route als bedeutendste sowohl für lipophile als auch für hydrophile Stoffe [14, 21, 22, 90]. Jedoch kann die in jüngster Zeit wieder häufig untersuchte follikuläre Penetration [91] auch für Mikroemulsionen in Betracht gezogen werden. Dies zeigten erste Studien von BIJU et al. [92] sowie CHANGEZ et al. [76]. Ein Grund dafür könnte die sehr geringe Grenzflächen-spannung in den Formulierungen sein, die einen hervorragenden Hautkontakt vermittelt. Neben einer guten Spreitfähigkeit kann sich auch die geringe Viskosität günstig auswirken. Mehr oder weniger erfolgreich ließ sich die Permeation von Stoffen steigern, wenn Mikroemulsionsrezepturen durch Penetrationenhancer ergänzt wurden. Zur Anwendung kamen z.B. Ölsäure, Dimethylsulfoxid, Cholesterol und Terpene [93-96]. Am Beispiel des hydrophilen Diphenhydraminhydrochlorid konnte gezeigt werden, dass ein potentieller Enhancereffekt von der Route des Wirkstoffes durch das Stratum corneum abhängt [94]. Die aufgeführten Faktoren belegen den engen Zusammenhang von Mikrostruktur und Penetrationsvermögen der Mikroemulsionen. Für detailliertere Einblicke in den zugrunde liegenden Mechanismus bedarf es jedoch weiterer systematischer Forschungsansätze.

3 Struktur- und Penetrationsuntersuchungen an der Mikroemulsion ME-BIP

3.1 Motivation und Zielstellung

Obwohl das penetrationsfördernde Potenzial von Mikroemulsionen weithin akzeptiert ist, besteht ein Informationsmangel bezüglich zugrunde liegender Mechanismen. Wie in Kapitel 2.2.2 dargestellt, kann ein Zusammenspiel von Faktoren mit hoher Komplexität angenommen werden. Es basiert auf der Art der Inhaltsstoffe, der Zusammensetzung der kolloidalen Formulierung und letztlich der daraus resultierenden Mikrostruktur.

Die in diesem Kapitel zusammengestellten Untersuchungen dienen der Entwicklung und Etablierung einer auf physiologisch verträglichen Inhaltsstoffen basierenden Mikroemulsion mit gutem Solubilisierungspotenzial für lipophile Wirkstoffe. Nach ausführlicher physikochemischer Charakterisierung, die die Erfassung der Mikrostruktur zum Ziel hat, sollte diese genutzt werden, um über verschiedene In-vitro- und In-vivo-Methoden tiefere Einblicke in die Penetrationswege und -mechanismen der Formulierung zu erhalten.

3.2 Entwicklung und Phasendreieck

Ausgangspunkt der Entwicklung stellte eine bewährte Mikroemulsionsrezeptur dar, die aus der Arbeit von K. JAHN hervorging [97] und auf der Verwendung nichtionischer Tenside basierte. Sie konnte um weitere lipophile Komponenten ergänzt werden:

Tabelle 2: Zusammensetzung der Basismikroemulsionen.

Komponente	% (m/m)
Tagat [®] O2 ¹ /Synperonic [®] PE/L 101 ² (2:3)	20
Lipophile Komponente*	5
Propylenglycol/Wasser (2:1)	75

* BIP (Butyl-/Isopropylphthalimid), Cetiol[®]B (Di-n-butyladipat), Cetiol[®] CC (Di-n-octylcarbonat), Eutanol[®] G16 (2-Hexyl-decanol), IPM (Isopropylmyristat), Myritol[®] 318 (Capryl-/Caprinsäuretriglycerid), Ölsäure

Eine der Modifizierungen gelang bereits in [101] mit der Einarbeitung einer neuartigen lipophilen Komponente, dem BIP. Dabei handelt es sich um das eutektische Gemisch von **Butylphthalimid** (BP, $M = 203,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\log P = 3,15 \pm 0,25$ [102]) und **Isopropylphthalimid**

¹ PEG-glycerolmonooleat, $M \sim 1235 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, HLB 15,0 [98]

² Poloxamer 331, $M \sim 3800 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, HLB 1,0 [99, 100]

(IP, $M = 189,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\log P = 2,44 \pm 0,26$), die im Verhältnis 60-75 % (m/m) zu 25-40 % (m/m) vorliegen (Abbildung 4). Es weist neben guter Hautverträglichkeit [103] hervorragende Lösungseigenschaften für Duftstoffe, Sonnenschutzmittel [104] sowie verschiedene Arzneistoffe auf. Aufgrund seiner chemischen Struktur und der daraus resultierenden Eigenschaften ist BIP einer spektroskopischen Analytik sehr gut zugänglich und wurde im Hinblick auf nachfolgende mechanistische Untersuchungen als lipophile Komponente der Mikroemulsion ausgewählt.



Abbildung 4: Chemische Struktur von Isopropylphthalimid (a) und Butylphthalimid (b).

Die Nutzung aller weiteren, ebenfalls optisch isotropen Modifikationen der Basisrezeptur ist vor allem dann von Interesse, wenn gezielt nach einem Vehikel für einen bestimmten Arzneistoff gesucht wird und dabei Kriterien wie individuelles Solubilisierungs- oder Penetrationsvermögen im Vordergrund stehen.

Sämtliche Formulierungen blieben über einen Zeitraum von mindestens drei Jahren optisch transparent und zeigten keinerlei Trübungserscheinungen. Ihre Lagerung erfolgte vor Licht geschützt bei Raumtemperatur in dicht verschlossenen Gefäßen. Die chemische Stabilität von BIP in der Mikroemulsion konnte zusätzlich über einen Zeitraum von ca. 2,5 Jahren durch regelmäßige Gehaltsbestimmungen bestätigt werden. Der Lipidgehalt betrug nach 118 Wochen $100,66 \% \pm 0,44 \% \text{ (m/m)}$ bezogen auf die Soll-Konzentration von 5,0 % (m/m).

Zur Charakterisierung der pseudoternären Mischungen aus den Grundkomponenten Tagat[®]O2/Synperonic[®]PE/L 101, BIP und Propylenglycol/Wasser wurde ein Phasendreieck erstellt (Abbildung 5). Transparente, niedrigviskose und optisch isotrope Systeme machten mehr als ein Drittel seiner Fläche aus. Markiert ist die Mikroemulsion mit oben tabellierter Zusammensetzung, deren stabile Lage im isotropen Gebiet bei relativ geringer Tensidmenge zu der Entscheidung führte, mit diesem System weitere Experimente durchzuführen. Es wird nachfolgend mit ME-BIP abgekürzt.

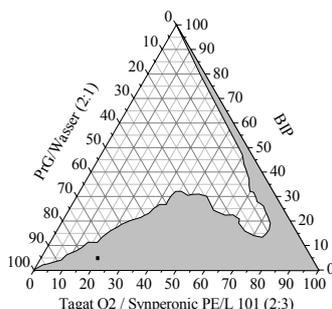


Abbildung 5: Phasendreieck des Systems Tagat[®]O2/Synperonic[®]PE/L 101 (2:3), BIP und Propylenglycol/Wasser (2:1) bei Raumtemperatur. Der optisch isotrope Bereich ist grau markiert. Ebenfalls eingezeichnet ist die Lage der ME-BIP.

3.3 Physikochemische Charakterisierung der ME-BIP

Die physikochemische Charakterisierung von Mikroemulsionen stellt aufgrund des kolloidalen Größenbereiches und der Dynamik der Mikrostruktur eine Herausforderung dar, die den Einsatz verschiedener komplementärer Methoden notwendig macht. Neben einem umfangreichen Informationsgewinn sollen damit Fehlinterpretationen aufgrund möglicher methoden- oder präparationsbedingter Artefaktbildung minimiert werden.

3.3.1 Temperaturabhängiges Verhalten

Größe und Lage des Mikroemulsionsgebietes im Phasendreieck sind temperaturabhängig [53]. Um sicherzustellen, dass die ausgewählte ME-BIP bei dermalen Applikation und anderer thermischer Belastung ihren Status behält, wurde sie auf organoleptischem Niveau nach Erwärmung sowie Lagerung im Kühlschrank beurteilt. Das System verblieb bis einschließlich 60 °C im initialen einphasigen, transparenten Zustand. Ab 70 °C traten Anzeichen einer Phasentrennung auf, die jedoch beim Abkühlen reversibel waren. Die Aufbewahrung bei 6 °C führte zu keinerlei sichtbaren Veränderungen. Daraus lässt sich die Stabilität der ME-BIP unter diversen Herstellungs- und Lagerungsbedingungen folgern. Außerdem ist, was Temperatureffekte anbelangt, keine spontane Phasentrennung bei der Auftragung auf die Haut zu erwarten.

3.3.2 Rheologie

Die Bestimmung des Fließverhaltens, das von der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung des kolloidalen Systems sowie der daraus resultierenden Mikrostruktur beeinflusst wird, ist eine unkomplizierte Methode zur Erfassung makroskopischer Eigenschaften, die auch erste Strukturhinweise geben kann. ALANY et al. nutzen die dynamische Viskosität als Parameter, um in einem pseudoternären Phasendreieck zunächst zwischen flüssigkristallinen Phasen und isotropen Systemen zu unterscheiden [105]. Weiterhin kann der Übergang von tröpfchenartigen Mikroemulsionen hin zu bikontinuierlichen verfolgt werden, der mit einem Viskositätsmaximum einhergeht [80, 105, 106]. In der Regel weisen tröpfchenartige Mikroemulsionen ein idealviskoses Fließverhalten auf, für bikontinuierliche Systeme wird teilweise von nicht-NEWTONSchem Fließen berichtet [44, 80, 107].

Die dynamische Viskosität der ME-BIP wurde sowohl bei Raum- als auch bei Hauttemperatur bestimmt. Sie zeigte in beiden Fällen NEWTONSches Fließverhalten (siehe Abbildung 6). Bei 25 °C betrug die Viskosität 103,5 mPa·s. Sie nahm bei Temperaturerhöhung auf 32 °C deutlich auf einen Wert von 77,4 mPa·s ab, was mit der steigenden kinetischen Energie der Moleküle begründet werden kann, die zu einem erleichterten Aneinandervorbeigleiten bei Scherung führt [108]. Die Ergebnisse passen in ihrer Größenordnung zu den von JAHN entwickelten Systemen, die anstelle von BIP 2-Octyl-dodecan-1-ol, Isopropylpalmitat bzw. Miglyol®812 als pharmazeutische Öle enthielten [97]. Das idealviskose Fließverhalten wurde dort als Hinweis auf das Vorliegen sphärischer Aggregate gewertet. In

Übereinstimmung damit finden sich in der Literatur Werte für die dynamische Viskosität annähernd vergleichbar zusammengesetzter O/W-Mikroemulsionen im Bereich von 20-120 mPa·s, z.B. [66, 71, 109, 110].

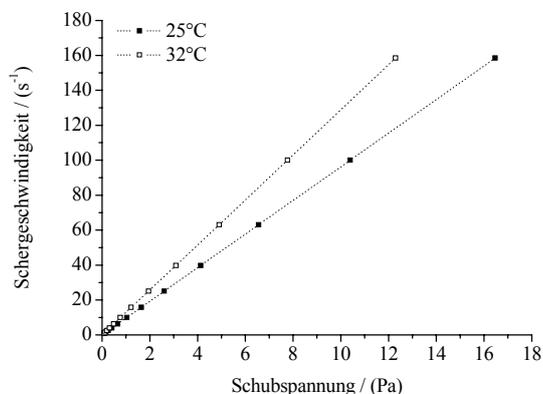


Abbildung 6: Rheogramm von ME-BIP bei 25 °C und 32 °C.

Für die Auftragung auf die Haut ist die Fließfähigkeit einer Formulierung auch von praktischer Relevanz, insbesondere wenn Sprühsysteme zur Applikation in Betracht gezogen werden [80]. Eine apothekenübliche Sprayflasche erwies sich als geeignetes Primärpackmittel für ME-BIP. Es gewährleistet eine gleichmäßige Verteilung des Vehikels auf der Haut.

3.3.3 Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie

Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen können strukturelle Unterschiede zwischen tröpfchenartigen und bikontinuierlichen Mikroemulsionen sowie anderen kolloidalen Zuständen (z.B. Liposomen und lamellare Phasen) visualisiert werden [105, 111, 112]. Bereits SCHULMAN et al. nutzten diese Art der Darstellung, aus der auch der Term „*micro emulsion*“ hervorging [55]. Bei der für Mikroemulsionen häufig angewandten Methode der Gefrierbruch-Transmissionselektronenmikroskopie (FF-TEM) wird nicht die Probe selbst, sondern ein Oberflächenabdruck ihrer frischen, unveränderten Bruchflächen im TEM abgebildet [113, 114]. Zur korrekten Interpretation der Bilder sind Ergebnisse anderer Charakterisierungsmethoden von großem Vorteil, da insbesondere beim Einfrieren der Proben eine Artefaktbildung stattfinden kann.

Für ME-BIP ergab sich aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine homogene Mikrostruktur (Abbildung 7). Aus den Erhöhungen und Vertiefungen, die aus den Hell-Dunkel-Kontrasten hervorgehen, ließ sich eine globuläre Charakteristik ableiten. Die Durchmesser der sphärischen Aggregate konnten mit 15-20 nm abgeschätzt werden. Im Vergleich zu der in [97] dargestellten analog zusammengesetzten, jedoch lipidfreien mizellaren Lösung, die ebenfalls ein relativ einheitliches Bild mit einer Vielzahl sehr kleiner Partikel lieferte, deuten die vergrößerten Aggregate der Mikroemulsion auf die Solubilisierung des BIP innerhalb der mizellenartigen Strukturen hin.

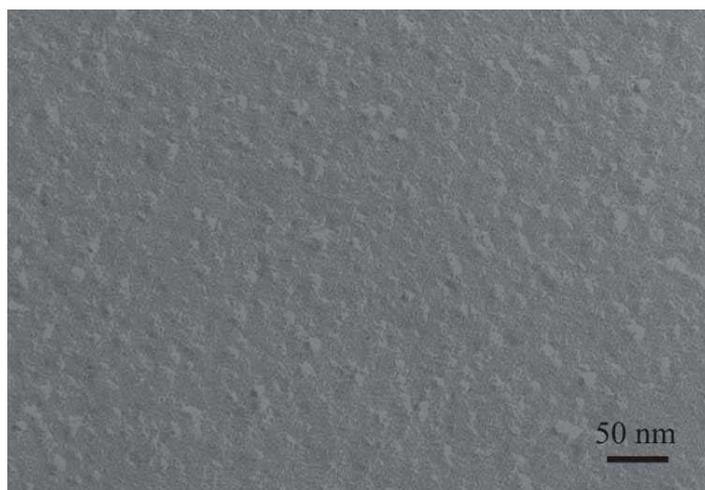


Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Aufnahme der ME-BIP.

3.3.4 Dynamische Lichtstreuung

Auch durch Streuverfahren können Informationen über die Größe kolloidaler Strukturen erhalten werden [44, 115]. Insbesondere Methoden der Lichtstreuung wurden bereits vielfach zur Charakterisierung von Mikroemulsionen genutzt [116-120]. In dieser Arbeit kam die Dynamische Lichtstreuung (DLS) zur Anwendung. Sie detektiert zeitabhängige Intensitätsfluktuationen von Laserlicht, das an Teilchen bzw. Aggregaten einer Probe gestreut wird, die der Brownschen Molekularbewegung unterliegen. Die Auswertung erfolgt über eine Autokorrelationsfunktion, aus der der Diffusionskoeffizient der Teilchen D ermittelt wird [121]. Da es sich bei Mikroemulsionen um interpartikulär wechselwirkende Systeme handelt, ergibt sich zunächst ein scheinbarer Wert, der unter Annahme harter, kugelförmiger Teilchen korrigiert wird [122]. Der resultierende wechselwirkungsfreie Diffusionskoeffizient D_0 ist schließlich über die STOKES-EINSTEIN-Gleichung invers mit dem hydrodynamischen Radius R_h verknüpft. Die zum Ausschluss von Interaktionen sonst übliche Verdünnung der Proben ist bei Mikroemulsionen nicht anwendbar, da sie zu einer Veränderung der Mikrostruktur führt.

ME-BIP lieferte einen hydrodynamischen Radius von $12,0 \pm 0,5$ nm. Die gegenüber der lipidfreien mizellaren Lösung ($R_h = 6,4 \pm 0,2$ nm) festzustellende Vergrößerung des Wertes weist auf die Solubilisierung von BIP innerhalb der Tensidmizellen hin. Gleiches wurde von JAHN und SHUKLA bei der Vermessung korrespondierender Systeme mit anderen pharmazeutischen Ölen festgestellt [97, 122]. Gemäß dem von den Autoren verwendeten und durch Neutronenstreudaten untermauerten Strukturmodell beinhaltet der hydrodynamische Radius neben dem reinen „Ölkern“ eine stärker gebundene Schicht von Tensidmolekülen. Die Schlussfolgerung, dass die Art der lipophilen Komponente geringen Einfluss auf dessen Größe besitzt, findet durch ME-BIP weitere Bestätigung.

Alle bis hierher erzielten Ergebnisse weisen darauf hin, dass sphärische Aggregate im unteren Nanometerbereich die submikroskopische Struktur der Mikroemulsion ausmachen.

3.3.5 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR), auch *electron paramagnetic resonance* (EPR) genannt, ist eine nicht-invasive Methode, die die Absorption elektromagnetischer Strahlung im Mikrowellenbereich durch paramagnetische Moleküle oder Ionen (Spinquantenzahl $S \neq 0$) in einem magnetischen Feld nutzt, um Erkenntnisse zu Struktur und Dynamik komplexer Systeme zu gewinnen. Während Elektronenspins ohne die Einwirkung eines Magnetfeldes statistisch über alle Raumrichtungen verteilt vorliegen, kommt es durch das Anlegen eines externen homogenen Feldes der magnetischen Induktion B_0 zu deren Ausrichtung (Abbildung 8a). Es resultieren zwei Zustände, die zwei Energieniveaus entsprechen: der parallel zum Magnetfeld ausgerichtete Grundzustand mit einer Magnetquantenzahl von $m_s = -1/2$ und der antiparallel ausgerichtete angeregte Zustand mit $m_s = +1/2$. Wird elektromagnetische Energie eingestrahlt, die der Energiedifferenz zwischen beiden Zuständen äquivalent ist (Resonanzbedingung), werden Übergänge zwischen den Spinzuständen induziert (Abbildung 8b). Die dabei absorbierte Strahlung wird in Form ihrer ersten Ableitung als ESR-Signal aufgezeichnet [123-125].

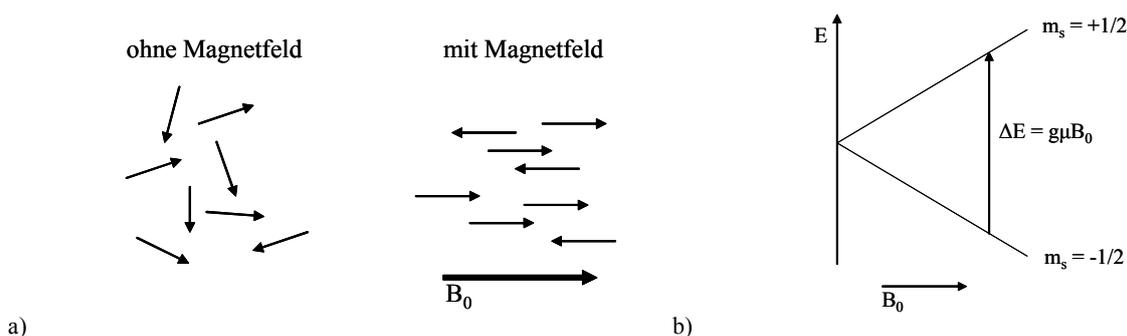


Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung der Ausrichtung der Elektronenspins durch das Anlegen eines Magnetfeldes (a) sowie die resultierende Aufspaltung der Energieniveaus (b).

Pharmazeutische Darreichungsformen sind meist „ESR-stumm“, da sie in der Regel keine paramagnetischen Substanzen (z.B. NO, O₂ oder Ionen von Übergangsmetallen) enthalten. Durch die Einarbeitung stabiler paramagnetischer Reporter-moleküle, sogenannter Spinsonden, sind sie den Messungen dennoch zugänglich. Häufig kommen zu diesem Zweck Nitroxylradikale zum Einsatz, die in einer Vielzahl von Derivaten zur Verfügung stehen [123]. Abbildung 9a und b zeigt die chemischen Strukturen der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen.

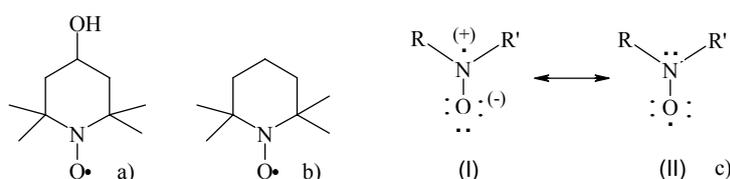


Abbildung 9: Chemische Struktur der Spinsonden TEMPOL (a) und TEMPO (b) sowie mesomere Grenzstrukturen der radikalischen Nitroxylgruppe (c).

Ihre ESR-Spektren sind durch die Aufspaltung in ein Linientriplett gekennzeichnet (Abbildung 10, rechts), die durch die Wechselwirkung des Elektronenspins mit dem Kernspin des ^{14}N zustande kommt (Hyperfeinaufspaltung). Letzterer ist ebenfalls gequantelt (Kernspinquantenzahl $I = 1$). Er kann die Energieniveaus (bzw. Magnetquantenzahlen) m_I von +1, 0 und -1 einnehmen. Da ein Elektronenspin-Flip nur ohne Änderung des Kernspins erlaubt ist, resultieren drei Übergänge (Abbildung 10, links), die den drei Linien entsprechen.

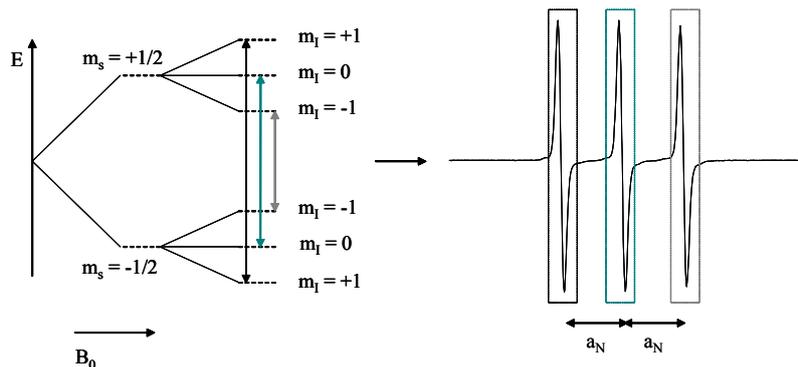


Abbildung 10: Aufspaltung der Energieniveaus bei Nitroxylradikalen (links) und die resultierende Aufspaltung des ESR-Signals (rechts) [nach 126].

In Abhängigkeit ihrer physikochemischen Eigenschaften verteilen sich die Nitroxylradikale in strukturierten Arzneitragern in unterschiedliche Kompartimente hinein. Aus den ESR-Spektren können nun Informationen über ihre jeweilige Mikroumgebung abgeleitet werden, von denen Mikropolarität und -viskosität in dieser Arbeit von Relevanz sind.

Der Linienabstand, genauer die Hyperfeinkopplungskonstante a_N , gibt Hinweise auf die **Polarität** der direkten Umgebung der Sonde, da sie der Aufenthaltswahrscheinlichkeit des ungepaarten Elektrons am Stickstoffkern direkt proportional ist (siehe Abbildung 9c). In polarer Umgebung tritt bevorzugt die zwitterionische Grenzform (I) auf, was sich – verglichen mit einer die Grenzform (II) begünstigenden apolaren Umgebung – in einer höheren Kopplungskonstante niederschlägt.

Aus den Linienbreiten und Signalamplituden gehen Informationen zur **Viskosität** der Mikroumgebung der Spinsonde hervor. Der zur Interpretation herangezogene Parameter, die Rotationskorrelationszeit τ , ist die durchschnittliche Zeit, in der sich die Sonde um ein rad dreht. In niedrigviskosen Medien findet eine schnelle Molekülbewegung in alle Raumrichtungen statt, durch die die Anisotropie der Hyperfeinwechselwirkungen ausgemittelt wird. Es resultiert ein isotropes ESR-Spektrum mit drei Linien gleicher Amplitude. Mit zunehmender Viskosität bewegt sich die Sonde langsamer. Dies äußert sich in einer Linienverbreiterung, einhergehend mit einer abnehmenden Signalamplitude, die im X-Band am stärksten in der dritten Linie ausgeprägt ist [123]. Die Auswertungen der vorliegenden Arbeit berücksichtigten nur isotrope Umorientierungen.

Die genannten Informationen können auf nicht-invasivem Weg auch aus nichttransparenten Proben aller Aggregatzustände gewonnen werden. Dabei zeichnet sich die ESR-Spektroskopie durch hohe Selektivität und Empfindlichkeit aus [127]. Ihre Eignung zur Charakterisierung mikrodynamischer Prozesse in Mikroemulsionen ist dem Zeitbereich zu verdanken, der (im X-Band mit Frequenzen um 10 GHz) Prozesse bis in den Pikosekundenbereich hinein erfassbar macht [128]. So wurden ESR-Untersuchungen durchgeführt, um Informationen zur Mikrostruktur der ME-BIP zu gewinnen. Neben der Mikroemulsion fungierten ihre Komponenten BIP, Propylenglycol, Wasser sowie binäre PrG/Wasser-Mischungen, das Tensidsystem Tagat[®] O2/Synperonic[®] PE/L 101 und die BIP-freie mizellare Tensidlösung (Miz) als Untersuchungsmedien.

TEMPOL

Die Spinsonde TEMPOL ($M = 172,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, Abbildung 9a) ist ein hydrophiles Molekül mit einem Verteilungskoeffizienten von 3,7 [127]. Aufgrund des -I-Effektes der paraständigen Hydroxylgruppe besitzt es verglichen mit dem nachfolgend beschriebenen p-unsubstituierten TEMPO eine geringere Elektronendichte am Stickstoffatom, so dass die Wechselwirkungen des Elektronenspins mit dem Kernspin eingeschränkt sind. Die Kopplungskonstanten sind demnach kleiner als die mit TEMPO erhaltenen. Darüber hinaus ist das Molekül zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen befähigt, was zu Einschränkungen in der Beweglichkeit führen kann.

Die Simulation der ESR-Spektren ergab, dass sich TEMPOL auch in den komplexen Proben nicht in mehrere Kompartimente hinein verteilte, sondern einen (polaren) Verteilungsraum bevorzugte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

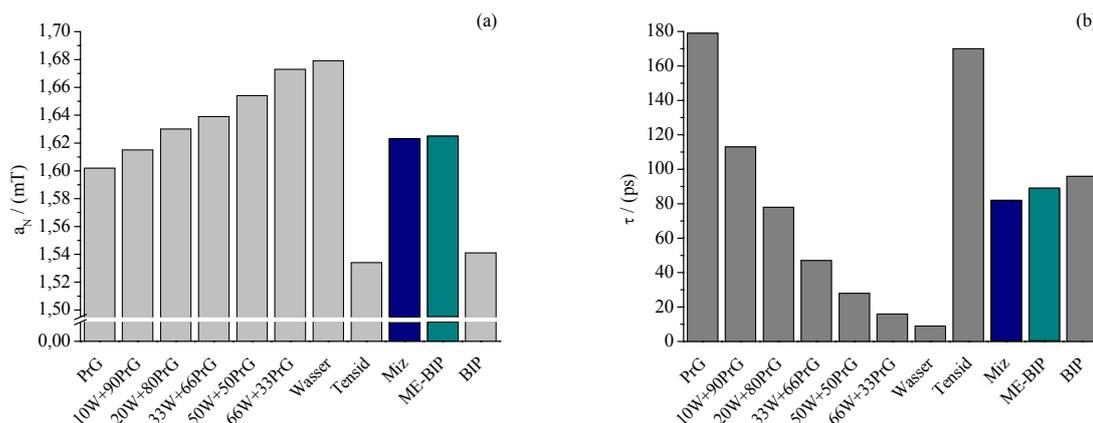


Abbildung 11: Hyperfeinkopplungskonstanten a_N (a) und Rotationskorrelationszeiten τ (b) der Spinsonde TEMPOL in verschiedenen Medien. Farblich hervorgehoben sind die mizellare Lösung (blau) und ME-BIP (cyan).

Aufgrund seines niedrigen Verteilungskoeffizienten reichert sich TEMPOL in komplexen Vehikeln eher in einer hydrophilen, polaren Umgebung an. Die unhydratisierte Tensid-

Mischung ist vergleichsweise unpolar und schränkt die Beweglichkeit der Spinsonde stark ein. Durch die Zugabe von PrG/Wasser (2:1) zum Tensid, die zur Entstehung der mizellaren Lösung führte, stieg die Mikropolarität deutlich an und die Rotationskorrelationszeiten wurden geringer. ME-BIP, die sich quantitativ durch die Addition von 5 % (m/m) BIP von der mizellaren Lösung unterscheidet, zeigte keine weitere Veränderung der Kopplungskonstante, und auch die Beweglichkeit war nur marginal erhöht. Der fehlende Einfluss des unpolaren BIP könnte zum einen an dessen geringer Konzentration in der Mikroemulsion liegen, wahrscheinlicher ist jedoch, dass ein BIP-reiches Kompartiment keine bevorzugte Umgebung für TEMPOL darstellt und sich die Sonde bevorzugt in einer PrG/Wasser-reichen Umgebung aufhält. Über die mathematischen Zusammenhänge, die zwischen dem Wassergehalt in den PrG/Wasser-Mischungen und den Kopplungskonstanten bzw. den Rotationskorrelationszeiten bestehen (Abbildung 12), konnte die Zusammensetzung der Spinsondenumgebung in der mizellaren Lösung sowie der ME-BIP berechnet werden. Aus beiden Parametern resultierte jeweils ein Verhältnis von ca. 82 % (m/m) PrG zu 18 % (m/m) Wasser. Die Veränderung des Verhältnisses von PrG zu Wasser gegenüber dem formal in der Rezeptur vorhandenen von 66,6 : 33,4 kann als Hinweis auf die Strukturierung der Systeme gewertet werden. Wahrscheinlich ist mehr Wasser in die Hydratisierung der Tenside eingegangen als PrG-Moleküle Cotensidfunktion übernommen haben und dazu in die Tensidschichten integriert sind. Dass TEMPOL nicht direkt in eine solche (wenn auch flexible) Grenzfläche eingelagert ist, lässt dessen doppelt so hohe Beweglichkeit gegenüber dem reinen Tensid vermuten, die wie erwähnt der einer binären PrG/Wasser-Mischung entspricht.

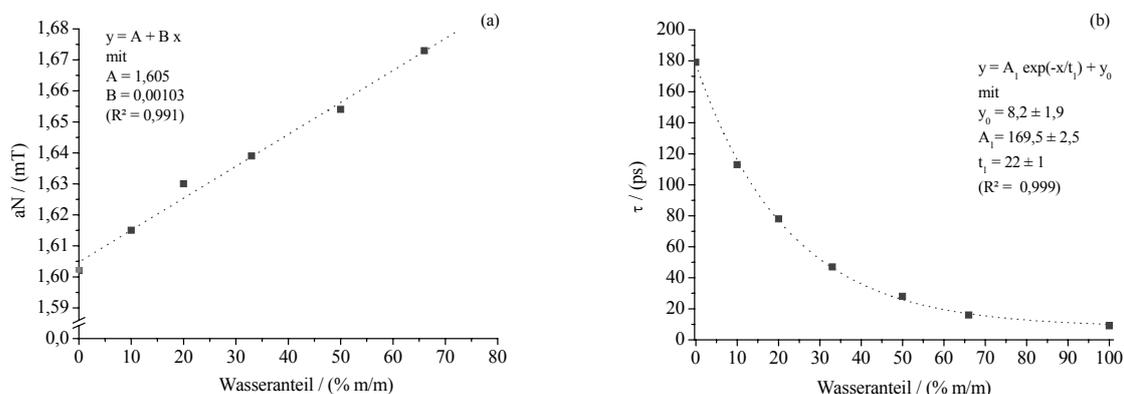


Abbildung 12: Zusammenhang zwischen den Hyperfeinkopplungskonstanten a_N (a) bzw. Rotationskorrelationszeiten τ (b) von TEMPOL und dem Wasseranteil der PrG/Wasser-Mischungen. Die gepunkteten Linien stellen den gefitteten Verlauf dar.

Ein zusätzliches Indiz für das Vorhandensein einer Mikrostruktur in den komplexen Systemen liefert der Vergleich der Mikro- und Makroviskositäten. Der lineare Zusammenhang, der zwischen diesen Parametern bei PrG, Wasser und deren binären Mischungen existiert, lässt sich nicht auf die mizellare Lösung und ME-BIP ausweiten (vgl. Abbildung 13). Vielmehr verdoppelt sich hier die dynamische (Makro-)Viskosität von 46,1 mPas bei

der mizellaren Lösung auf 103,5 mPas bei ME-BIP, während die Rotationskorrelationszeiten von TEMPOL, die die Mikroviskosität der Sondenumgebung charakterisieren, nahezu identisch sind (82 ps bei Miz und 89 ps bei ME-BIP).

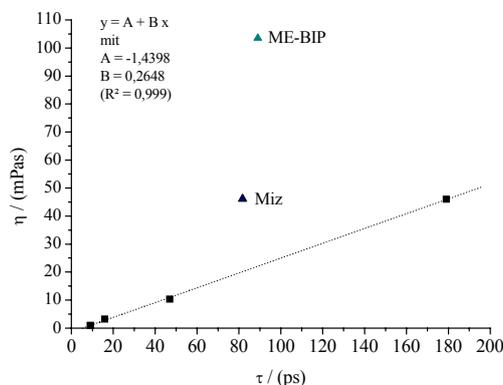


Abbildung 13: Linearer Zusammenhang zwischen den Rotationskorrelationszeiten τ von TEMPOL in Wasser, PrG/Wasser 1:2 sowie 2:1 und PrG und den dynamischen Viskositäten η (25°C) der Medien. Zusätzlich eingefügt sind die Werte für die komplexen Systeme ME-BIP (cyan) und die mizellare Lösung (blau).

TEMPO

Die Spinsonde TEMPO ($M = 156,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, Abbildung 9b) weist eine höhere Lipophilie als das hydroxylierte Derivat TEMPOL auf und besitzt einen Verteilungskoeffizienten von 63 [127].

Abbildung 14 zeigt die sich aus den Simulationen der ESR-Spektren ergebenden Hyperfeinkopplungskonstanten und Rotationskorrelationszeiten von TEMPO. Von den untersuchten PrG/Wasser-Mischungen, bei denen sich analog zum TEMPOL ein linearer Zusammenhang zwischen Mikropolarität und Wassergehalt sowie ein exponentieller Zusammenhang zwischen Mikroviskosität und Wassergehalt ergaben, wurden zwei Systeme exemplarisch dargestellt. Die Daten lieferten aufgrund des Verteilungsverhaltens keine weiteren Hinweise zur Interpretation der Sondenumgebung in den komplexen Vehikeln.

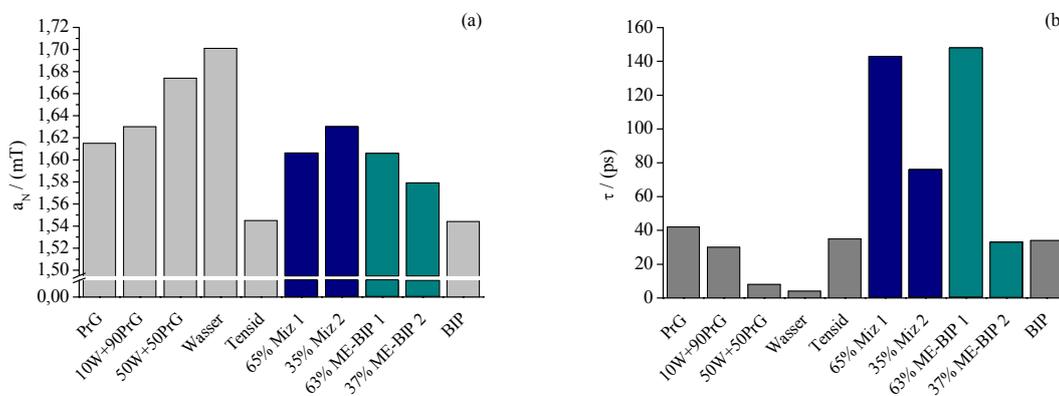


Abbildung 14: Hyperfeinkopplungskonstanten a_N (a) und Rotationskorrelationszeiten τ (b) der Spinsonde TEMPO in verschiedenen Medien. Hervorgehoben sind die mizellare Lösung (blau) und ME-BIP (cyan).

Anders als in den Einzelkomponenten lag TEMPO in der mizellaren Lösung sowie der ME-BIP jeweils in zwei unterschiedliche Umgebungen verteilt vor. Die ESR-Spektren entsprachen der Überlagerung von polaren und apolaren TEMPO-Spektren, erkennbar an der Asymmetrie der dritten Linie (nicht gezeigt). Der in einem Verteilungsraum befindliche Anteil der Spinsonde wird jeweils als Spezies bezeichnet. Zwischen beiden Vehikeln ließen sich Gemeinsamkeiten und Unterschiede ausmachen. Vergleichbar war die Mikroumgebung, die in beiden Fällen ca. zwei Drittel des TEMPO enthielt und durch die stark eingeschränkte Beweglichkeit der Spinsonde auffiel, die diejenige in den Einzelkomponenten weit übertraf und auf eine Strukturierung hinweist (Spezies 1). Diese kann durch das Tensidarrangement erreicht worden sein, in welchem sich der Mikropolarität nach ($a_N = 1,606$ mT) ein hoher Propylenglycol-Anteil in seiner Funktion als Cotensid befand. Bei beiden Vehikeln von sphärischen Aggregaten ausgehend, hält sich Spezies 1 jeweils eher in deren Inneren im Bereich der lipophilen Tensidreste auf.

Deutliche Unterschiede bestehen in der Polarität des zweiten, weniger die Beweglichkeit der Spinsonde einschränkenden Mikrokompartimentes. Im Fall der mizellaren Lösung deutet die Hyperfeinaufspaltung auf eine Umgebung aus einem hohen PrG-Anteil und etwas Wasser hin, wobei die gegenüber binären PrG/Wasser-Mischungen höhere Mikroviskosität eine gewisse (tensidbedingte) Ordnung vermuten lässt. Wahrscheinlich befand sich Spezies 2 in einer äußeren, locker gebundenen Solvenschicht der Mizellen.

Bei ME-BIP hingegen war ein Drittel der Spinsonde in einen deutlich weniger polaren Raum geringer Mikroviskosität hinein verteilt, der durch die Zugabe von BIP zur mizellaren Lösung entstand. Die Kopplungskonstante zusammen mit der Rotationskorrelationszeit lässt darauf schließen, dass dieser Raum das lipophile BIP gemeinsam mit einem PrG-Anteil in freier Beweglichkeit enthält. Diese Moleküle sind folglich nicht nur zwischen den Tensidresten mizellar gelöst, sondern bilden eine so genannte „Pseudophase“ [54]. Die mit der Zugabe von BIP zur mizellaren Lösung einhergehende Vergrößerung der Assoziate wurde bereits mit Hilfe von DLS und TEM festgestellt. Nicht ungewöhnlich ist die Beteiligung von PrG. Für niedermolekulare Alkohole ist bekannt, dass sie neben ihrer Grenzflächenwirkung auch Bulkeffekte ausüben und damit die relative Hydro-/Lipophilie der Kompartimente beeinflussen [49, 128]. Das sehr ähnliche Verhalten von TEMPO in reinem Tensid und BIP steht nicht im Widerspruch zu dieser Interpretation, da die Tenside in den komplexen Systemen nicht im unhydratisierten Zustand vorkommen, sondern entsprechend ihrer amphiphilen Eigenschaften einen energetisch günstigen Ordnungszustand einnehmen, der mit einer geringeren Beweglichkeit von Reportermolekülen einhergehen sollte.

Zusammenfassung: ESR

In der ESR-Studie, die mit Hilfe zweier Reportermoleküle unterschiedlichen Verteilungsverhaltens durchgeführt wurde, konnte eindeutig eine Kompartimentierung der ME-BIP nachgewiesen werden. Es existieren demnach 1. eine äußere, freie Solvenschicht, die von Propylenglycol/Wasser im Verhältnis 80/20 ausgemacht wird, 2. eine durch Tensidlayer

strukturierte, ebenfalls propylenglycolhaltige Schicht sowie 3. ein vergleichsweise apolares Kompartiment, welches ungehindert bewegliche BIP- und Propylenglycolmoleküle enthält. Insgesamt favorisieren die Ergebnisse die Strukturvorstellung der ME-BIP als geschwollene Mizellen [54].

3.3.6 Elektrische Leitfähigkeit

Die elektrische Leitfähigkeit kann zur Verfolgung struktureller Veränderungen in Mikroemulsionen herangezogen werden wie in Kapitel 4.4.2 näher beschrieben ist. Im Fall der ME-BIP wurde sie als Parameter für den „äußeren“ Charakter des Systems genutzt. Auf die teilweise übliche Addition von Elektrolyten als Ladungsträger wurde verzichtet, um dadurch bedingte Strukturmodifikationen auszuschließen [106]. Trotz des Überschusses polarer Substanzen betrug die Leitfähigkeit durch das Fehlen ionischer Bestandteile nur $5,06 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$. Das ist nicht ungewöhnlich und entspricht Ergebnissen, die PODLOGAR et al. an nichtionischen O/W-Mikroemulsionen erzielten [106]. Die von den Autoren zum Vergleich bestimmte Leitfähigkeit der Tensidmischung lag um Faktor zehn niedriger.

Für ME-BIP bestätigte sich damit der äußere hydrophile Charakter.

3.3.7 pH-Wert

Der pH-Wert hat Einfluss auf die Größe und Lage des isotropen Gebietes eines pseudoternären Systems sowie auf die Stabilität von Mikroemulsionen, insbesondere bei Nutzung ionischer Tenside [129]. Des Weiteren spielt er eine Rolle für die Wirksamkeit und Stabilität mancher Arzneistoffe [71, 129, 130]. Für ME-BIP stand die Hautverträglichkeit im Vordergrund. Ihr pH-Wert betrug 4,9 und ist damit als hautfreundlich zu klassifizieren [131].

3.3.8 Dichte

Die Dichte der ME-BIP betrug $1,053 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$.

3.3.9 Zusammenfassung: Physikochemische Charakterisierung

Die gemeinsame Bewertung aller Charakterisierungsergebnisse belegt, dass es sich bei ME-BIP um eine optisch isotrope und thermodynamisch stabile, wasserkontinuierliche Mikroemulsion geringer Viskosität handelt. Sie besitzt eine kompartimentierte Mikrostruktur, die der Theorie geschwollener Mizellen entspricht. Propylenglycol zeigt neben seiner Cotensidfunktion auch Bulkeffekte. Mit dem Vorhandensein freien Wassers ist eine der Voraussetzungen für das Erreichen eines hohen Penetrationsvermögens realisiert (vgl. Kapitel 2.2.2).

Die Ergebnisse der Charakterisierung sind in Tabellenform zusammengefasst (Tabelle 3).

Tabelle 3: Ergebnisse der physikochemischen Charakterisierung von ME-BIP.

Parameter	Ergebnis
Dynamische Viskosität	103,5 mPa·s (T = 25 °C) 77,4 mPa·s (T = 32 °C)
Dichte	1,053 g·cm ⁻³
Elektrische Leitfähigkeit	5,06 μS·cm ⁻¹ (T = 22 °C)
pH-Wert	4,9
Temperaturbereich der Stabilität des optisch isotropen Zustandes	6-60 °C
Hydrodynamischer Radius (DLS)	12,0 ± 0,5 nm
Abgeschätzter Durchmesser der Assoziate (TEM)	15-20 nm
ESR-Spektroskopie	Kompartimentierung (geschwollene Mizellen)

Abbildung 15 zeigt vereinfacht die resultierende Strukturvorstellung. Sie entspricht im Wesentlichen dem bereits in Streuexperimenten von JAHN und SHUKLA etablierten Kern-Schale-Modell [122].

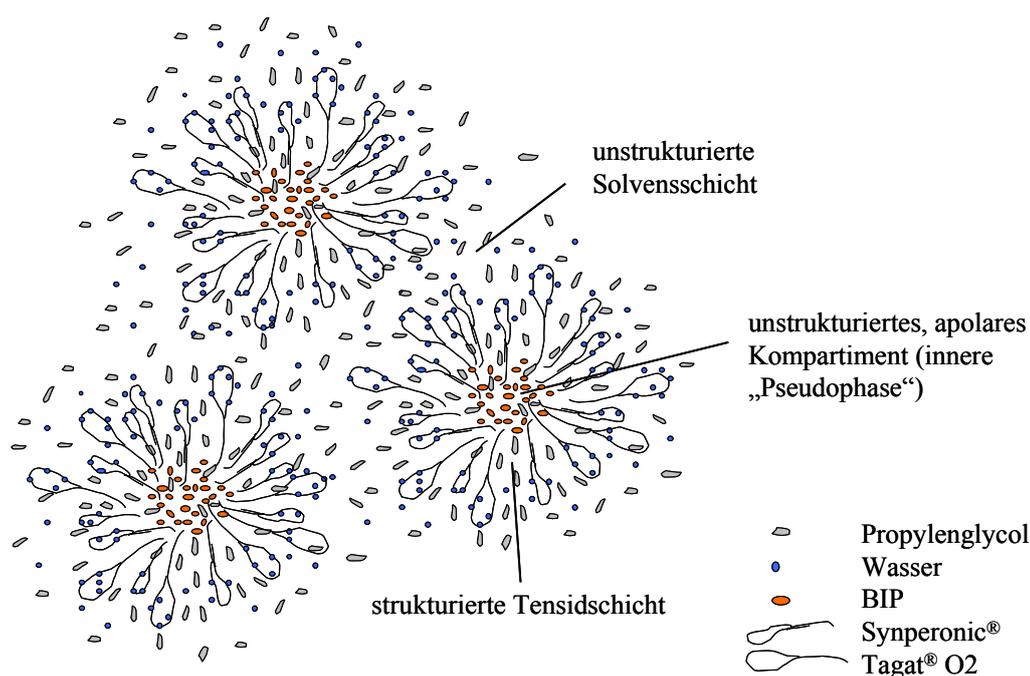


Abbildung 15: Aus der physikochemischen Charakterisierung hervorgehende vereinfachte Strukturvorstellung der ME-BIP.

3.4 In-vitro-Untersuchungen zum Diffusions- und Penetrationsverhalten an künstlichen Lipidmembranen und humanem Stratum corneum

Ziel der in den folgenden Kapiteln beschriebenen Untersuchungen war es, Einblicke in den Mechanismus der Penetration von Mikroemulsionen zu erhalten. Die Verfolgung von Diffusions- bzw. Penetrationsvorgängen mehrerer Formulierungsbestandteile, die unterschiedlichen Kompartimenten zugeordnet werden können, stellte den Ansatzpunkt hierfür dar. Beginnend mit der Verwendung eines klassischen Membranmodells sollten verschiedene In-vitro-Systeme bezüglich ihrer Eignung und Aussagekraft geprüft werden. Das Bestreben lag darin, ein In-vitro-Penetrationsmodell zu etablieren, welches nicht nur mit künstlichen Membranen, sondern auch mit humanem Stratum corneum betrieben werden kann und das den Anforderungen, die sich aus der Komplexität der kolloidalen Systeme ergeben, standhält.

3.4.1 Mehrschichtmembranmodell

Einleitung

Mit Hilfe des Mehrschichtmembranmodells (MSMM) kann die matrixkontrollierte Wirkstofffreisetzung aus topischen Darreichungsformen im Rahmen der galenischen Optimierung simuliert werden [132, 133]. Dies dient in der Regel der Abschätzung von Wechselwirkungen zwischen Arzneistoff und Grundlage und letztlich der Absicherung, dass die Freisetzung nicht zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für die sich anschließende Penetration wird [129, 134, 135]. Überdies lässt sich das MSMM auch zu mechanistischen Untersuchungen nutzen [136].

An dieser Versuchsanordnung, für die langjährige Erfahrung besteht, wurden die ersten Arbeiten mit ME-BIP durchgeführt. Dabei stellte sich die grundsätzliche Frage, ob für Mikroemulsionen von einer Freisetzung im klassischen Sinne, d.h. von einer matrixkontrollierten Diffusion des Wirkstoffes an die Grenzfläche Vehikel/Akzeptor, zu sprechen ist und welche Aussagen die erzielten Werte für kolloidale Systeme treffen können. Dazu sollten nicht nur ein Arzneistoff, sondern weitere Komponenten der Mikroemulsion bezüglich ihrer zeitabhängigen Konzentrationszunahme im Akzeptor verfolgt werden.

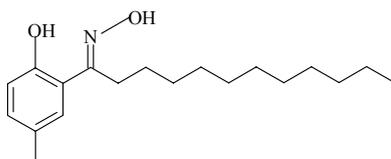


Abbildung 16: Chemische Struktur von HMLO.

Als lipophiler Modellarzneistoff wurde 2'-Hydroxy-5'-methyl-laurophenoxim (HMLO, $M = 305,46 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\log P > 6,2$ [137]) in die ME-BIP eingearbeitet. Das System wird als

ME-BIP^[HMLO] bezeichnet. Die chemische Struktur von HMLO ist in Abbildung 16 dargestellt. Informationen zur Löslichkeit in Bestandteilen der Mikroemulsion, der Mizellaren Lösung sowie in ME-BIP selbst finden sich in Tabelle 4. Daraus geht das im Vergleich zu hydrophilen Solvenzien hervorragende Lösungsvermögen von BIP hervor. Die Solubilisierung, die durch Mizellare Strukturen erreicht wurde, erfuhr durch den Zusatz von BIP und damit der Ausbildung der Mikroemulsion eine weitere, signifikante Steigerung ($p < 0,01$).

Tabelle 4: Löslichkeit von HMLO in verschiedenen Medien ($MW \pm SD$, $n = 3$).

Medium	$c_s / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$
BIP *	$73,08 \pm 1,33$
Propylenglycol *	$2,83 \pm 0,08$
Propylenglycol/Wasser (2:1) *	$0,02 \pm 0,003$
Wasser #	0,0056
Mizellare Lösung (ME ohne BIP)	$16,37 \pm 0,34$
ME-BIP *	$21,83 \pm 0,90$

* aus [101], # aus [138]

Neben den Lösungseigenschaften von HMLO, die eine Verteilung in die inneren, lipophilen Kompartimente der Mikroemulsion vermuten lassen, bot sich die Substanz auch wegen ihrer einfachen Quantifizierbarkeit mittels HPLC-UV als Modellwirkstoff an. Nachfolgend wurde sie in 1,5 %iger (m/m) Konzentration verwendet.

Entsprechend der Eigenschaften von HMLO kamen im MSMM lipophile Dodecanol-Collodium-Membranen (DCM) zum Einsatz. Sie stellen einfach strukturierte isotrope Verteilungsbarrieren dar. Ihre Anzahl (drei) richtete sich danach, *Sink*-Bedingungen für HMLO einzustellen, die über die Löslichkeit der Substanz in Dodecanol ($107 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach [133]), die Lipidmenge in der Applikationsfläche sowie die aufgetragene Substanzmenge berechnet wurden. Die Applikation von ME-BIP^[HMLO] erfolgte im *Finite-dose*-Modus, d.h. es wurden therapierelevante Mengen von ca. $5 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ aufgetragen [139].

Bei dem MSMM handelt es sich um eine invasive Methode. Die Membranen werden nach einer definierten Inkubationszeit separiert, extrahiert, und der Extrakt wird anschließend einer geeigneten Analytik zugeführt. In der Natur des MSMM liegt es, dass für jeden Messpunkt ein separates Experiment erforderlich ist.

Ergebnisse

Neben HMLO konnte auch BIP, getrennt nach den Einzelbestandteilen IP und BP, mit Hilfe einer HPLC-UV-Methode (siehe Kapitel 6.9.1) in den Membranen des Modells quantifiziert werden. Abbildung 17 belegt, dass ME-BIP^[HMLO] kein klassisches Freisetzungsverhalten zeigt, wie es von halbfesten Formulierungen, insbesondere Suspensionssalben, bekannt ist. Die Beteiligung komplexerer Mechanismen durch sich gegenseitig beeinflussende Diffusionsvorgänge von Vehikelbestandteilen und Wirkstoff deuten sich bereits durch die in

erheblichem Ausmaß in den Akzeptormembranen detektierten Komponenten IP und BP an. Zwischen beiden Substanzen ergaben sich trotz abweichender Verteilungskoeffizienten (siehe Kapitel 3.2) sowie der sich initial unterscheidenden Konzentrationsgefälle (BIP besteht aus 75,6 % BP und 24,4 % IP) keine Differenzen in den relativ zur applizierten Dosis dargestellten Daten. Das in der Mikroemulsion bestehende Verhältnis blieb beim Übergang in den Akzeptor erhalten. HMLO zeigte einen ähnlichen Kurvenverlauf, jedoch auf einem gegenüber BIP um den relativen Anteil von ca. 25 % nach unten versetzten Niveau. Denkbar wäre eine Codiffusion des im kolloidalen Kompartiment der Mikroemulsion (repräsentiert durch BIP) solubilisierten Anteils des Modellwirkstoffes.

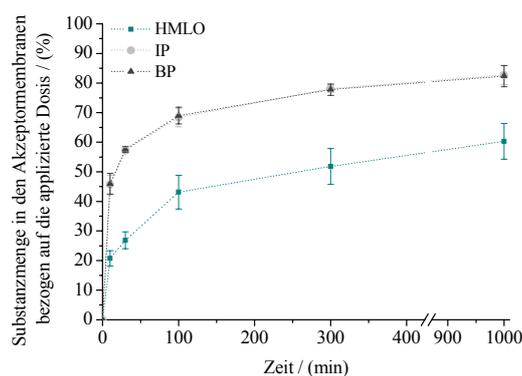


Abbildung 17: Zeitabhängige Zunahme von HMLO ($n = 10$), IP und BP ($n = 5$) in den Membranen des MSMM nach Applikation von ME-BIP^[HMLO] bezogen auf die applizierte Dosis ($MW \pm SD$).

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass auch weitere Mikroemulsionsbestandteile die DCM erreichen, die jedoch nicht durch eine einfache analytische Bestimmung aus den Membranextrakten zugänglich sind. Propylenglycol zum Beispiel könnte mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) erfasst werden. Nach Vorversuchen wurde wegen des hohen messtechnischen Aufwandes und der geringen Reproduzierbarkeit darauf verzichtet und nach einem anderen Detektions- bzw. Versuchsansatz gesucht.

Tabelle 5 stellt abschließend in einer Übersicht den Aussagewert des MSMM für ME-BIP^[HMLO] sowie die Vor- und Nachteile des Systems dar.

Tabelle 5: Einschätzung des MSMM zur Anwendbarkeit für ME-BIP^[HMLO].

Informationen	<ul style="list-style-type: none"> - Verteilungsverhalten einiger Mikroemulsionskomponenten in eine lipophile Membran - Gemeinsame Diffusion von IP und BP - Erster Hinweis auf Codiffusion von HMLO und BIP
Vorteile	<ul style="list-style-type: none"> - Einfache Quantifizierung von drei Komponenten (HMLO, BIP getrennt in IP und BP) - Gute Reproduzierbarkeit - Großer Erfahrungswert (mit halbfesten Vehikeln)
Nachteile	<ul style="list-style-type: none"> - Invasiv, hoher Aufwand für wenige Messpunkte - Quantifizierung von PrG, Wasser und Tensiden sehr aufwändig - Nur für künstliche Membranen (z.B. DCM) geeignet, nicht für Stratum corneum bzw. Vollhaut (Größe, Dehydratisierung) → Modellierung von Teilprozessen möglich

3.4.2 Untersuchungen an der FTIR-ATR-Diffusionszelle

Einleitung

Die abgeschwächte Totalreflexion (ATR) ist eine Sonderform der Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie. In der biopharmazeutischen Forschung wird sie seit den 90er Jahren zur Untersuchung der Penetration in künstliche und biologische Membranen sowie zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten eingesetzt. Auch Kombinationen von *Tape Stripping* und nachfolgender ATR-spektroskopischer Analytik der Abrisse sowie direkte In-vivo-Anwendungen sind beschrieben. Eine Übersicht zum aktuellen Kenntnisstand findet sich in [140].

Das Messprinzip der ATR-Spektroskopie beruht auf dem physikalischen Phänomen der Totalreflexion. Diese tritt auf, wenn Strahlung aus einem Medium mit hohem Brechungsindex n (hier der ATR-Kristall aus Zinkselenid, $n = 2,4$) auf die Grenzfläche zu einem optisch dünneren Medium (die Probe) auftrifft und der Einfallswinkel θ dabei den Grenzwinkel der Totalreflexion übersteigt. Ein Teil der elektromagnetischen Energie kann, entgegen der Bezeichnung „total“, in die Probe eindringen und wird von den Molekülen dort absorbiert, die ihrerseits zu charakteristischen Schwingungen angeregt werden. Das resultierende ATR-Spektrum stellt die Absorbanz in Abhängigkeit von der Wellenzahl dar. Charakteristisch für die ATR-Spektroskopie ist die wellenlängenabhängige Eindringtiefe des IR-Strahls. Sie liegt im Bereich von 0,7 bis 2,8 μm und macht den bestmöglichen optischen Kontakt zwischen Probe und ATR-Kristall unerlässlich [141].

Für die Untersuchung des Penetrationsverhaltens von Mikroemulsionen weist die ATR-Technik als nicht-invasives Verfahren einige interessante Aspekte auf. Mit Hilfe der während eines Prozesses kontinuierlich aufgenommenen Akzeptorspektren im mittleren Infrarotbereich kann unter bestimmten Bedingungen die Penetration mehrerer Komponenten simultan beobachtet werden. Gegenüber dem MSMM bedeutet das einen geringeren Präparations- und Materialaufwand bei höherer Qualität und Quantität der Daten. Darüber hinaus kann sowohl mit künstlichen als auch mit nativen Membranen (z.B. Stratum corneum) gearbeitet werden. Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Methode auf ME-BIP ist, dass die Einzelkomponenten der Mikroemulsion quantifizierbare IR-Banden in einem Gesamtspektrum aus Matrix und Diffusanten aufweisen. Appliziert wurden bisher u.a. aus diesem Grund nur einfach zusammengesetzte Vehikel wie wässrige bzw. organische Lösungen eines Analyten [142-146] und Suspensionsalben [147-151].

Versuchsanordnung und Vorüberlegungen

Zunächst wurde in Anlehnung an das MSMM auf die einfachste Messanordnung zurückgegriffen: Eine DCM wurde auf dem ATR-Kristall platziert und darauf ME-BIP^[HMLO] appliziert. Neben dem Fehlen verwertbarer IR-Banden für HMLO ging im Laufe der Messzeit vor allem eine Grundbedingung für die Auswertbarkeit der Experimente verloren: der

optische Kontakt zwischen Membran und ATR-Kristall. Es bildete sich ein Film aus permeierten Vehikelkomponenten unterhalb der Membran. Ähnliches wird in der Literatur bei der Verwendung wässriger Donatoren berichtet [152, 153]. Ein Lösungsvorschlag wäre die Normierung der Spektren auf eine isolierte Membranbande [153]. Sie sollte jedoch nur bei geringfügigen Änderungen angewendet werden. Wird Stratum corneum als Membran genutzt, bestehen aufgrund der rauen Oberfläche von vornherein Kontaktprobleme. Aus diesen Gründen wurden alle weiteren Experimente mit der in [154] beschriebenen ATR-Diffusionszelle durchgeführt. Sie ist in Abbildung 18 schematisch dargestellt.

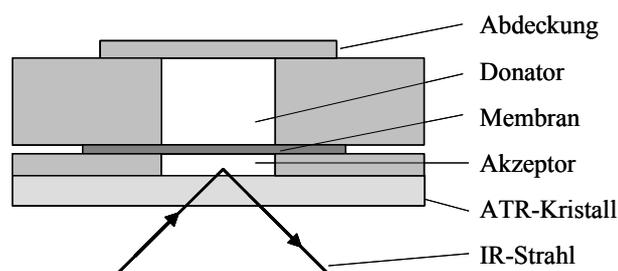


Abbildung 18: ATR-Diffusionszelle nach HARTMANN et al. (modifiziert nach [154]).

Zwischen Membran und Kristall befindet sich ein geringvolumiger Akzeptor (ca. 90 μL), dessen Funktion die Gewährleistung des optischen Kontaktes ist. Konstruktionsbedingt sind im Akzeptor keine *Sink*-Bedingungen realisierbar. Um diese zu schaffen, wäre ein größeres Volumen und damit ein Rührvorgang oder aber die Entwicklung einer Durchflussapparatur notwendig. Beides stößt derzeit an methodische und technische Grenzen. Damit die Verhältnisse in der Diffusionszelle einseitig konstant gehalten werden können, wurde der Donator im Überschuss aufgetragen. Die Diffusionsprozesse enden folglich in einem sättigungsbedingten Gleichgewichtszustand.

Von besonderer Bedeutung ist daher die Auswahl des Akzeptormediums. Um die reine Membranpenetration in eine DCM bzw. in Stratum corneum zu erfassen, sollte durch die Art des gewählten Mediums nach Möglichkeit kein zusätzlicher Verteilungsschritt (außer dem zwischen Vehikel und Membran) eingeführt werden. Ebenso ist eine Extraktion von Membranbestandteilen zu verhindern. Letztlich spielen spektrale Eigenschaften eine wichtige Rolle und schränken die Auswahl möglicher Akzeptorkandidaten ein.

HARTMANN et al. nutzten Wasser als Akzeptor in ihren Diffusionsuntersuchungen an wässrigen Harnstofflösungen [152]. Hintergrund dessen war neben der Gewährleistung der Hydratisierung des Stratum corneum, dass die Diffusion des hydrophilen Wirkstoffes in Wasser wesentlich schneller abläuft als der Membrandurchtritt und somit nicht geschwindigkeitsbestimmend wird. Außerdem bevorzugt Harnstoff die polare Route durch das Stratum corneum, so dass mit einem wässrigen Akzeptor weitere Verteilungsschritte ausgeschlossen werden konnten. Der wesentlich komplexere Donator ME-BIP stellt andere Anforderungen. Aufgrund der unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften der Einzelkomponenten

kann nicht von einer einheitlichen (polaren) Route ausgegangen werden, so dass mit einem wässrigen Akzeptor nur ein Teilaspekt der Stratum-corneum-Passage beleuchtet würde. Vorteilhaft wäre ein Akzeptormedium mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften wie die Hautbarriere. Einen Hinweis auf das Hydrophilie-Lipophilie-Gesamtverhalten liefert der Verteilungskoeffizient $\log P[\text{SC}/\text{Wasser}]$. Er ging als Parameter in die Wahl des Akzeptors ein, um einen zusätzlichen Verteilungsschritt zwischen Membran und Akzeptor weitgehend ausschließen zu können. Den Anforderungen kommt die zur Herstellung der DCM verwendete Mischung von Dodecanol/Octanol 90/10 (V/V, abgekürzt als DD) entgegen. Deren IR-Banden ließen sich von denen der Mikroemulsionskomponenten deutlich abgrenzen und blieben während der gesamten Versuchsdauer unverändert. Aus Studien von SURBER et al. ist eine gute Korrelation zwischen $\log P[\text{SC}/\text{Wasser}]$ und $\log P[\text{Octanol}/\text{Wasser}]$ bekannt [155]. Bei dem dort ebenfalls aufgeführten Isopropylmyristat treten massive Bandenüberlagerungen mit den Bestandteilen der ME-BIP auf. Für Dodecanol spricht, dass höhere Alkohole interzelluläre Lipide des Stratum corneum nicht extrahieren [156]. Darüber hinaus existieren für die Mischung DD vielfältige praktische Erfahrungen als Akzeptormedium. Auf der Suche nach einem geeigneten Modellarzneistoff, der eindeutige, möglichst isolierte IR-Banden im Gesamtspektrum aufweist, wurde eine Vielzahl von Substanzen getestet. Resultierend kam Metronidazol ($M = 171,15 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\log P = 0,24$ [157]) zur Anwendung. Seine chemische Struktur ist in Abbildung 19 dargestellt. Die topische Applikation metronidazolhaltiger Zubereitungen besitzt in der Behandlung der Rosacea einen hohen Stellenwert [1]. Die in den nachfolgenden Experimenten eingesetzte Mikroemulsion wird mit ME-BIP^[Metro] abgekürzt.

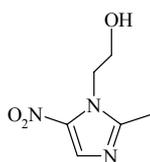


Abbildung 19: Chemische Struktur von Metronidazol.

Zunächst wurde die Löslichkeit von Metronidazol in verschiedenen Medien bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6: Löslichkeit von Metronidazol in verschiedenen Medien ($MW \pm SD$, $n = 2-6$).

Medium	$c_s / (\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$
BIP	$5,4 \pm 0,2$
Propylenglycol	$20,5 \pm 1,1$
Wasser	$8,6 \pm 1,3$
Mizellare Lösung (ME ohne BIP)	$24,3 \pm 0,9$
ME-BIP	$29,9 \pm 2,2$
DD	$2,3 \pm 0,2$
DDw	$1,4 \pm 0,2$

ME-BIP sowie die mizellare Lösung als komplexe Vehikel zeigten gegenüber allen Rein-
 substanzen eine signifikant erhöhte Aufnahmekapazität ($p < 0,01$). Bemerkenswert ist der
 ebenfalls signifikante Anstieg der Löslichkeit nach Zusatz von BIP zur mizellaren Lösung,
 der weit über einen anteiligen Beitrag des Lipids hinausgeht ($p < 0,01$). Unter den Einzel-
 komponenten trat PrG als bestes Lösungsmittel für Metronidazol hervor, wohingegen die
 Akzeptormedien der nachfolgenden Experimente, (wassergesättigtes) Dodecanol/Octanol
 (DD bzw. DDw), die schlechtesten Ergebnisse aufwiesen.

Im Rahmen der Diffusions- bzw. Penetrationsstudien kamen in den ersten beiden Versuchs-
 reihen die standardisierten DCM zum Einsatz. Bei der Kombination von immobilisiertem
 (Membran) mit flüssigem DD (Akzeptor) kann vereinfacht von einem Kompartiment ausge-
 gangen werden. Die Konzentration von Metronidazol in ME-BIP betrug 1,0 % (m/m). Sie
 wurde bei der Arbeit an humanem Stratum corneum (Versuchsreihe 3) aus analytischen
 Gründen auf 1,5 % (m/m) erhöht.

Auswertung der Experimente

Typische ATR-Spektren des DD-haltigen Akzeptors, aufgenommen zu verschiedenen Zeit-
 punkten während der Penetration der ME-BIP^[Metro], sind in Abbildung 20 dargestellt. Mit
 Hilfe der ebenfalls abgebildeten Spektren der Einzelkomponenten konnten folgende Banden
 zugeordnet und für die quantitative Auswertung herangezogen werden: PrG bei 838 cm^{-1} (γ
 opp C-O-H [158]), Metronidazol bei 1535 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}\text{ NO}_2$ [158]), Wasser bei 1650 cm^{-1} (δ
 O-H) und BIP bei 1773 cm^{-1} . Mit der letztgenannten Bande werden die Phthalimide des BIP
 gemeinsam über die C=O Streckschwingung detektiert. Die quantitativen Untersuchungen
 des vorangegangenen Kapitels zeigten, dass sich IP und BP in ihrem Penetrationsverhalten
 entsprechen. Somit kann die Summe beider Stoffe als BIP erfasst werden. Einzig die Tenside
 konnten nicht detektiert werden, da sie keine eindeutigen Banden zeigten.

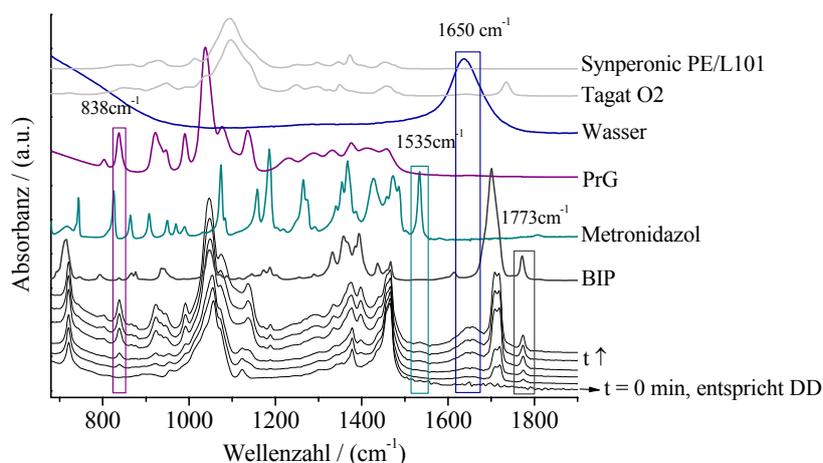


Abbildung 20: FTIR-ATR Spektren des Akzeptors zu verschiedenen Zeiten innerhalb von 48 h während der Penetration von ME-BIP^[Metro] in DCM mit DD als Akzeptor sowie Spektren der Einzelkomponenten der Mikroemulsion. Hervorgehoben sind die zur Auswertung herangezogenen Banden.

Die quantitative Auswertung der Experimente erfolgte mit Hilfe einer multivariaten Analyse, deren Parameter in Kapitel 6.5, Tabelle 25 zusammengefasst sind. Als Ausdruck für Ausmaß und Geschwindigkeit der Vorgänge wurden die Flächen unter den resultierenden Konzentrations-Zeit-Kurven (AUC) berechnet. Die Fläche zwischen einer solchen Kurve und deren 100 % Asymptote (ABC) diente der Bestimmung der nicht penetrierten Substanzanteile. Darüber hinaus ließen sich aus den gefitteten sigmoidalen Verläufen (vgl. Kapitel 6.5; R^2 jeweils $> 0,998$) weitere objektive Kenngrößen ableiten, die allerdings von den üblicherweise verwendeten Parametern aufgrund der komplexen Randbedingungen im Versuchsaufbau (*infinite dose* und *Non-sink-Akzeptor*) abweichen. Dazu gehören die *Steady-state*-Konzentration c_{ss} , der Wendepunkt, an dem 50 % der *Steady-state*-Konzentration einer Substanz den Akzeptor erreicht haben ($t_{50\%}$) sowie der Anstieg der Kurve zu diesem Zeitpunkt ($m(t_{50\%})$). Abhängig davon, ob absolute Aussagen zum Ausmaß der Diffusion bzw. Penetration getroffen werden sollten oder der Vergleich von Komponenten untereinander im Vordergrund stand, wurden die Größen aus den quantitativen oder den normierten Verläufen ($c_{ss} \equiv 1$) ermittelt. In Abbildung 21 sind alle Parameter zusammenfassend visualisiert.

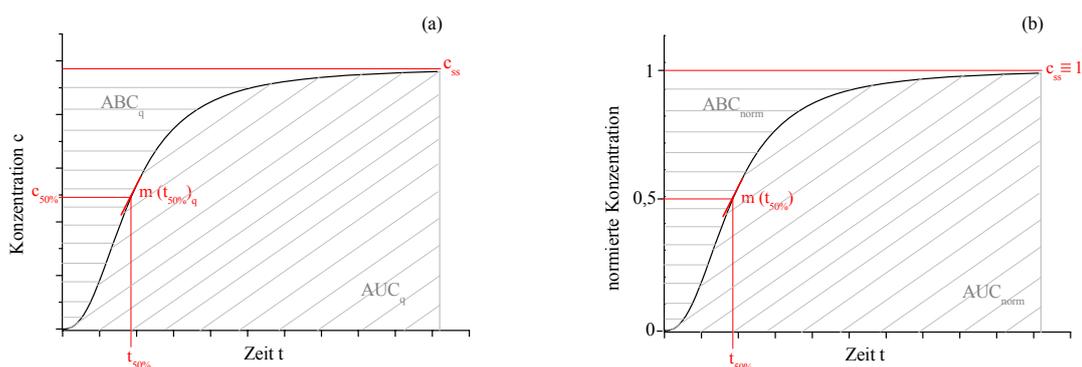


Abbildung 21: Parameter, die die quantitativen (a) bzw. normierten (b) Konzentrations-Zeit-Verläufe charakterisieren.

Ergebnisse

Versuchsordnung 1: Diffusion der Einzelkomponenten der Mikroemulsion in DCM mit DD bzw. DDw als Akzeptor

In der ersten Versuchsreihe wurden die Einzelkomponenten BIP und PrG separat als Donatoren appliziert, um deren von Vehikeffekten unbeeinflusste passive Diffusion zu studieren. Diese soll anschließend den Konzentrations-Zeit-Verläufen gegenüber gestellt werden, die sich für die Substanzen bei Applikation der ME-BIP^[Metro] ergeben. Beide Stoffe sind mit dem Akzeptorlipid DD mischbar. Um die Vergleichbarkeit der initialen Konzentrationsgradienten der Einzelkomponenten mit denen in der Mikroemulsion zu gewährleisten, wurden die Substanzen als Mischung mit DD appliziert: 5 % (m/m) BIP (entspricht 4,3 % (m/V), bezeichnet als BIP-DD) bzw. 50 % (m/m) PrG (entspricht 45,8 % (m/V), bezeichnet als PrG-DD).

Abbildung 22 zeigt die resultierenden Konzentrations-Zeit-Profile und Tabelle 7 die daraus ermittelten Parameter. Die Diffusionsexperimente sind durch das Streben der Substanzen nach einem Konzentrationsausgleich zwischen Donator und Akzeptor gekennzeichnet. Entsprechend fand sich im Gleichgewichtszustand (c_{ss}) das 10:1 Verhältnis der applizierten Konzentrationen von PrG und BIP. Das gilt auch für die AUCs, die aus Gründen der Vergleichbarkeit für die längste, allen Versuchsreihen gemeinsame, Messzeit von $t = 580$ min berechnet wurden. Die Wendepunkte $t_{50\%}$ zeigen, dass die Diffusion von BIP etwas schneller als die von PrG verlief. Dafür spricht auch der gegenüber BIP nur ca. 8,5fach steilere Anstieg von PrG zu dieser Zeit ($m(t_{50\%})_q$). Als Ursachen sind vor allem die unterschiedlichen Konzentrationsgradienten und Diffusionskoeffizienten der beiden Stoffe in DD zu nennen. Letztere sind nach STOKES-EINSTEIN mit der Viskosität des umgebenden Mediums verknüpft. Diese verändert sich im Versuchsverlauf kontinuierlich durch die zunehmende Konzentration der Diffusanten im Akzeptor.

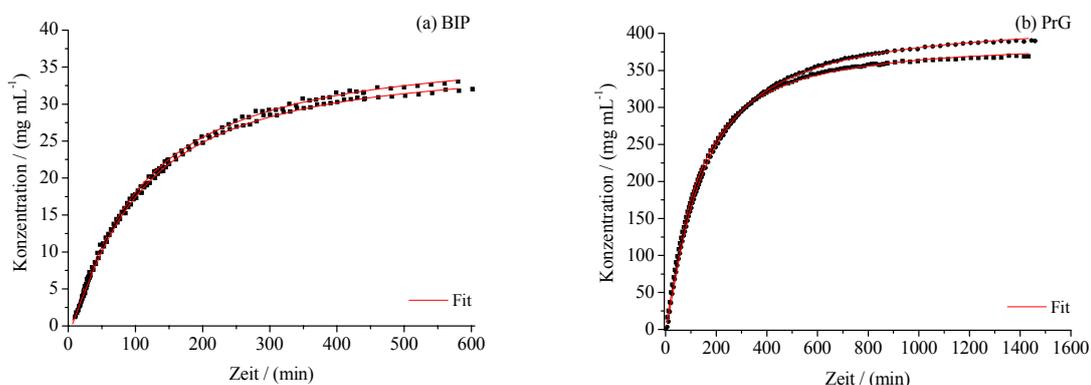


Abbildung 22: Diffusion von BIP (a) und PrG (b) aus BIP-DD bzw. PrG-DD in DCM mit DD als Akzeptor. Messdaten und gefitteter Verlauf (jeweils $n = 2$, $R^2 > 0,999$).

Neben DD wurde auch mit DDw als Akzeptormedium gearbeitet, da eine Sättigung des Akzeptors mit Wasser, wie nachfolgend erläutert, bei den Stratum-corneum-Experimenten notwendig wurde. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse für DD und DDw einander gegenübergestellt. Weder für BIP noch für PrG traten statistisch signifikante Unterschiede auf.

Tabelle 7: Ergebnisse der Diffusionsexperimente von PrG-DD bzw. BIP-DD in DCM mit DD bzw. DDw als Akzeptor ($MW \pm SD$). Die AUC wurde für den Zeitraum bis $t = 580$ min bestimmt.

AK	Donator	$t_{50\%} /$ (h)	$c_{ss} /$ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$m(t_{50\%})_q /$ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	$AUC_q /$ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$)
DD	PrG-DD ($n = 2$)	$2,21 \pm 0,26$	$404,0 \pm 20,4$	$0,930 \pm 0,073$	2461 ± 17
	BIP-DD ($n = 2$)	$1,72 \pm 0,05$	$36,6 \pm 1,2$	$0,110 \pm 0,003$	243 ± 5
DDw	PrG-DD ($n = 3$)	$2,72 \pm 0,38$	$396,3 \pm 10,2$	$0,727 \pm 0,126$	2260 ± 106
	BIP-DD ($n = 2$)	$1,43 \pm 0,24$	$36,7 \pm 1,2$	$0,141 \pm 0,027$	262 ± 6

AK = Akzeptormedium

Aufgrund der geringen Löslichkeit von Metronidazol in DD (vgl. Tabelle 6) sowie der analytischen Grenzen (vgl. Tabelle 25) ließen sich diese Diffusionsexperimente für den Modellarzneistoff nicht durchführen.

Versuchsordnung 2a: Penetration von ME-BIP^[Metro] in DCM mit DD als Akzeptor

In dieser Versuchsreihe wurde ME-BIP^[Metro] als Donator auf eine DCM aufgetragen. DD fungierte als Akzeptor. Neben BIP und PrG konnten auch Metronidazol und Wasser analysiert werden. Abbildung 23 zeigt die Konzentrations-Zeit-Kurven für jede der detektierten Komponenten in Form der Messdaten sowie als gefitteten Verlauf. Aus Gründen der Übersichtlichkeit beschränkt sich die Darstellung beispielhaft auf ein Experiment.

PrG, Metronidazol und Wasser zeigten einen Verlauf, der gut über das logistische Modell beschrieben werden konnte. Das Konzentrations-Zeit-Profil von BIP entsprach hingegen der Summe zweier logistischer Funktionen. Die sich überlagernden Einzelprozesse konnten mit Hilfe des entsprechenden Fitmodells separiert werden (vgl. Kapitel 6.5). Aus dem Verhältnis der AUC des ersten Teilprozesses zur Gesamt-AUC ergab sich dessen Anteil von ca. 90 %. Die Ursachen hierfür, vermutlich Wechselwirkungen mit anderen Komponenten im Akzeptor, werden später diskutiert.

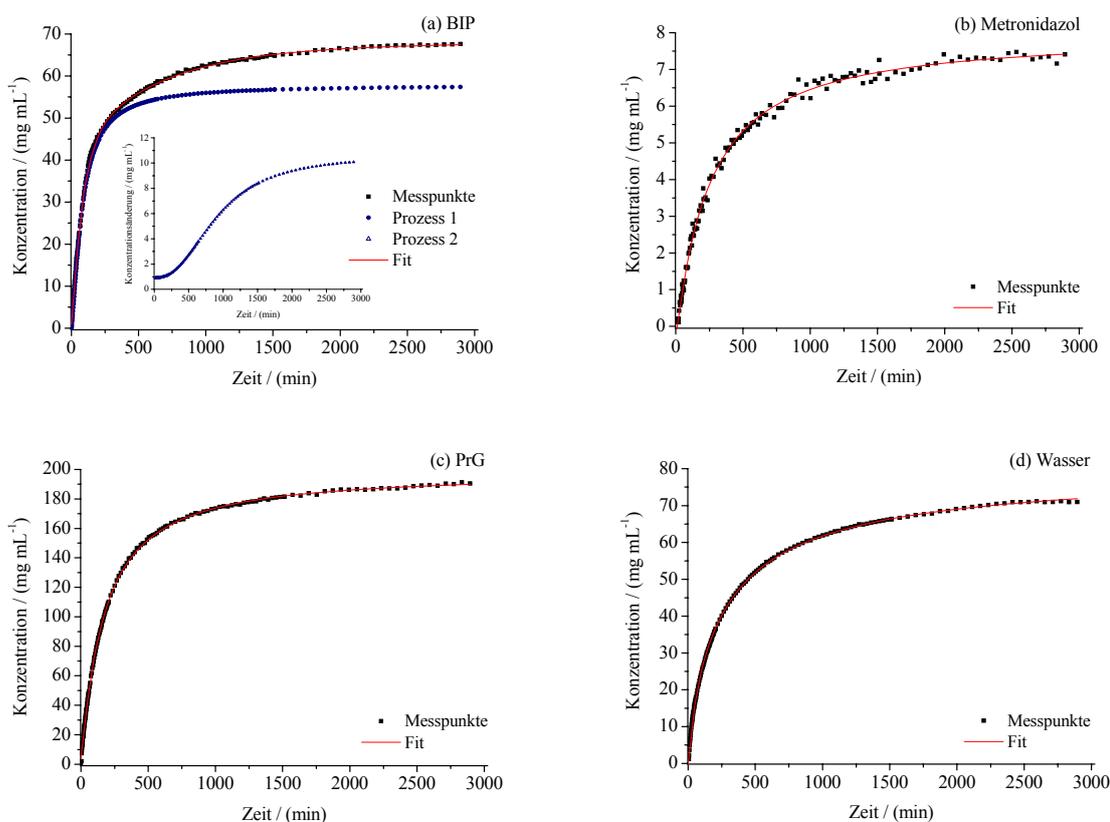


Abbildung 23: Penetration von BIP (a, $R^2 = 0,999$), Metronidazol (b, $R^2 = 0,997$), PrG (c, $R^2 = 0,999$) und Wasser (d, $R^2 = 0,999$) aus ME-BIP^[Metro] in DCM mit DD als Akzeptor. Messdaten eines Experimentes und gefitteter Verlauf. In (a) sind zusätzlich die sich im Gesamtverlauf überlagernden Einzelprozesse dargestellt.

Tabelle 8 gibt die numerischen Parameter der Penetrationsprofile wieder. Abbildung 24 zeigt die normierten Konzentrations-Zeit-Kurven der vier Komponenten, die einen Vergleich relativ zueinander erlauben. BIP hebt sich dabei am stärksten ab und weist die schnellste Penetration auf. Nach ca. 1,4 h ist die Hälfte des im dominierenden ersten Teilprozess diffundierenden Anteils im Akzeptor angelangt ($t_{50\%}$). Darüber hinaus fällt der hohe (relative) Anstieg ($m(t_{50\%})$) zu diesem Zeitpunkt auf. BIP besitzt die größte AUC_{norm} und die geringste ABC_{norm} von allen Komponenten. Letztere steht auch für die mittlere Verweilzeit der penetrierten Moleküle im Donator. Auf BIP folgen – annähernd vergleichbar – PrG, Metronidazol und Wasser mit verzögerten Wendepunkten sowie deutlich flacheren Anstiegen. Aus der Betrachtung von Abbildung 24 geht ein nahezu paralleler Verlauf der Profile von PrG und Metronidazol hervor. Ähnliches fanden MØLLGAARD und HOELGAARD bei Permeationsstudien an Humanhaut [159]. Sie hatten den Arzneistoff als Lösung in PrG appliziert und vermuteten einen *Solvent-drag*-Effekt bei der Überwindung des Stratum corneum. Die geringsten Unterschiede in den ermittelten Parametern bestehen zwischen Metronidazol und Wasser, deren anfängliche Differenzen ab ca. 200 min vernachlässigbar wurden.

Tabelle 8: Ergebnisse der Penetration von ME-BIP^[Metro] in DCM mit DD als Akzeptor ($MW \pm SD$, $n = 3$). Sofern nicht anders ausgewiesen, wurden AUC und ABC bis $t = 48$ h bestimmt.

	$t_{50\%} /$ (h)	$c_{ss} /$ (mg·mL ⁻¹)	$m(t_{50\%})_q /$ (mg·mL ⁻¹ · min ⁻¹)	$m(t_{50\%}) /$ (10 ⁻³ min ⁻¹)	$AUC_{norm} /$ (h) $ABC_{norm} /$ (h)	$AUC_q /$ (mg·mL ⁻¹ ·h)
Metro	4,58 ± 0,33 ^a	8,2 ± 0,3	0,008 ± 0,001	4,0 ± 0,4 ^{a,b}	37,65 ± 0,72 10,58 ± 0,72 ^a	305 ± 3
BIP						
gesamt		64,4 ± 3,2 ¹			42,71 ± 0,19 5,53 ± 0,19	411 ± 21 ^{*1} 2767 ± 159
P1 (~90%)	1,41 ± 0,08 ²	(56,4 ± 2,0 ¹)	0,215 ± 0,022 ¹	15,3 ± 1,5		
P2	16,46 ± 1,07 ¹		0,005 ± 0,001 ¹	2,5 ± 0,3		
PrG	3,26 ± 0,34 ²	204,4 ± 8,3 ¹	0,278 ± 0,030 ¹	5,5 ± 0,8 ^{b,c}	39,72 ± 0,86 8,51 ± 0,86	1090 ± 39 ^{*1} 8176 ± 278
W	4,34 ± 0,29 ^a	78,4 ± 2,7	0,065 ± 0,007	3,2 ± 0,3 ^{a,c}	35,87 ± 0,70 12,26 ± 0,70 ^a	2819 ± 100

* $t = 580$ min; Metro = Metronidazol, W = Wasser, P = Prozess

- Versuchsanordnung 1 vs. 2a (PrG aus ME vs. PrG-DD; BIP aus ME vs. BIP-DD) für $t_{50\%}$, c_{ss} , $m(t_{50\%})_q$, AUC_q :
¹ $p < 0,01$, ² $p < 0,05$.

- Komponenten in Versuchsanordnung 2a untereinander für $t_{50\%}$, $m(t_{50\%})$, AUC_{norm} , ABC_{norm} : Zwischen identisch indextierten Parametern besteht keine statistische Signifikanz (^{a, b, c} $p > 0,05$).

Steady-state-Konzentrationen (c_{ss}) sowie die AUC_q drücken die quantitativen Aspekte der Penetration aus. Dabei ist zu bedenken, dass der Gleichgewichtszustand durch die maximale Aufnahmekapazität des Akzeptors determiniert wird. Es ergab sich die Reihenfolge PrG >

Wasser > BIP > Metronidazol. Sie stimmt grundsätzlich mit den Relationen in ME-BIP^[Metro] überein. Bemerkenswert ist, dass c_{ss} von Metronidazol die Löslichkeit der Substanz in reinem DD um mehr als das Dreifache übersteigt (vgl. Tabelle 6). Darin drückt sich der Solubilisierungseffekt aller beteiligten Komponenten aus.

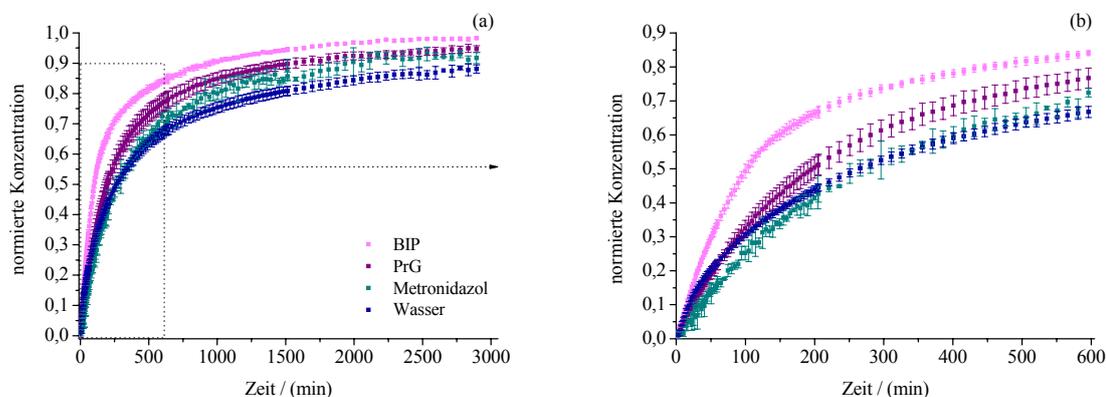


Abbildung 24: (a) Normierte Darstellung der Konzentrations-Zeit-Verläufe aller Komponenten aus ME-BIP^[Metro] in DCM mit DD als Akzeptor ($MW \pm SD$, $n=3$); (b) vergrößerter Ausschnitt der ersten 600 min.

Um die Effizienz der Penetration besser einschätzen zu können, wurden die Konzentrations-Zeit-Profile auf die Konzentrationsverhältnisse im Donator bezogen (Abbildung 25). Es zeigte sich, dass BIP nicht nur schneller, sondern auch in höherem Ausmaß als alle anderen Komponenten, über einen Konzentrationsausgleich mit dem Donator hinausgehend, penetrierte. Dem folgte das in der geringsten Ausgangskonzentration eingesetzte Metronidazol. Die Aufnahme von Wasser in den lipophilen Akzeptor war erwartungsgemäß sehr begrenzt.

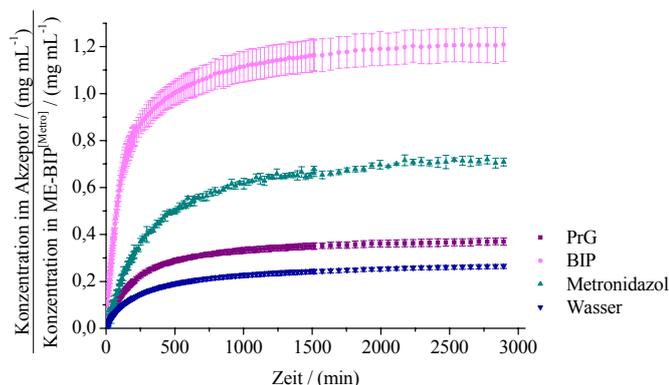


Abbildung 25: Konzentrations-Zeit-Verlauf von BIP, Metronidazol, PrG und Wasser bezogen auf deren Ausgangskonzentrationen im Donator ME-BIP^[Metro] ($MW \pm SD$, $n = 3$).

Aus dem Vergleich der Diffusion von PrG bzw. BIP als Einzelkomponenten mit deren Penetration aus ME-BIP^[Metro] gehen weitere interessante, statistisch signifikante Differenzen

hervor (Abbildung 26). Für BIP verdoppelte sich die *Steady-state*-Konzentration bei Applikation der Mikroemulsion nahezu. Ähnliches ergab die Betrachtung der AUC_q ($t = 580$ min). Sie betrug für BIP-DD ca. $250 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$ und für BIP aus ME-BIP^[Metro] ca. $410 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$. Weniger gravierende Unterschiede bestanden in den Wendepunkten der Kurven ($t_{50\%}$), wobei im Fall der ME-BIP nur der dominierende erste Teilprozess (P1) relevant ist. In der Summe zeigt sich, dass die Penetration von BIP aus der Mikroemulsion, in der es kolloidal verteilt vorliegt, einen hochgradig effektiveren Vorgang als die reine passive Diffusion darstellt. Zu vermuten ist eine gegenüber BIP-DD erhöhte thermodynamische Aktivität von BIP in dem komplexen Vehikel, die den Prozess antreibt. Dies korrespondiert mit der Tatsache, dass die Mikrostrukturen in Mikroemulsionen fluktuieren und keine starren Formationen ausbilden, in denen BIP analog klassischen Emulsionen als echte innere Phase „eingemauert“ wäre und sich erst langsam in eine mit der Membran in Kontakt stehende äußere Phase umverteilen müsste.

PrG lieferte konträre Ergebnisse (Abbildung 26b). Der Wendepunkt der Kurven ($t_{50\%}$) lag mit der Mikroemulsion als Donator bei einem etwas späteren Zeitpunkt als bei Auftragung von PrG-DD. Gleichzeitig war die Endkonzentration nur halb so groß und der Anstieg im Wendepunkt ($m(t_{50\%})_q$) betrug ca. ein Drittel dessen aus dem Diffusionsexperiment. Die Gegenüberstellung der AUC_q ($t = 580$ min) ergab ca. $2460 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$ für PrG-DD und ca. $1100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$ für PrG, das über ME-BIP^[Metro] appliziert wurde. PrG scheint eine höhere Affinität zum Vehikel als zum Akzeptorkompartiment zu besitzen, obwohl es mit DD mischbar ist. Die passive Diffusion war für die Substanz deutlich effektiver. Dem könnte zugrunde liegen, dass der Teil der PrG-Moleküle, der sich in der Mikroemulsion als Cotensid in den Tensidschichten befindet und demzufolge in der Beweglichkeit eingeschränkt ist, kaum zur Diffusion zur Verfügung steht und damit der effektive Konzentrationsgradient gegenüber dem nominalen vermindert ist (vgl. Kapitel 3.3.9).

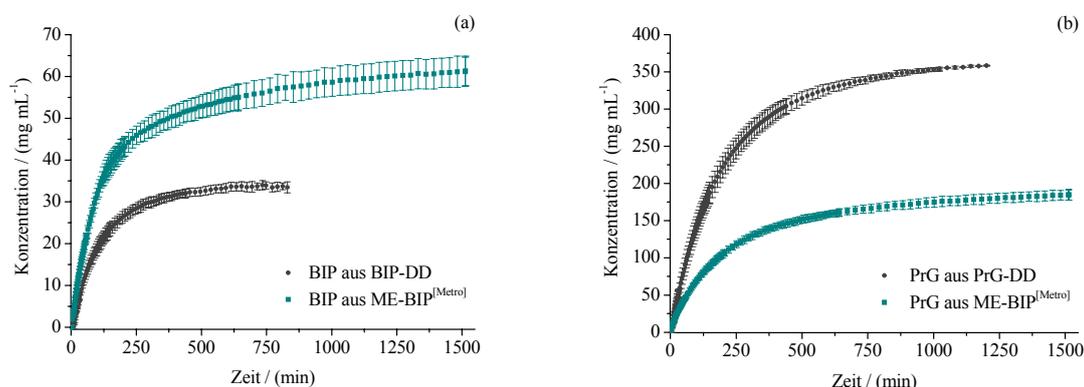


Abbildung 26: Vergleich der Konzentrations-Zeit-Verläufe von BIP aus ME-BIP^[Metro] vs. BIP-DD (a) sowie von PrG aus ME-BIP^[Metro] vs. PrG-DD (b) ($MW \pm SD$, $n = 2-3$).

Die Auswertungen belegen signifikante Veränderungen der Zusammensetzung des Akzeptors mit der Zeit durch die Diffusion aller detektierten Mikroemulsionsbestandteile.

Mit dem Erreichen des Gleichgewichtszustandes belief sich deren Anteil am Akzeptor auf ca. 36 %. Deutlich erkennbar war der Einfluss des Vehikels Mikroemulsion auf die Konzentrations-Zeit-Verläufe sowie die Solubilisierungsbedingungen im Akzeptor.

Versuchsordnung 2b: Penetration von ME-BIP^[Metro] in DCM mit DDw als Akzeptor

Für nachfolgende Penetrationsexperimente an humanem Stratum corneum musste der Akzeptor mit Wasser gesättigt werden, da DD eine geringe Menge Wasser aufnehmen kann und damit die Dehydratation des Stratum corneum verursacht. Wenngleich keine Unterschiede aus den Diffusionsversuchen mit BIP und PrG zwischen wassergesättigtem und -freiem DD hervorgingen (Versuchsordnung 1), sollte dies auch für ME-BIP^[Metro] überprüft werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Ergebnisse der Penetration von ME-BIP^[Metro] in DCM mit DDw als Akzeptor (MW \pm SD, n = 3). AUC und ABC wurden bis t = 48 h bestimmt.

	$t_{50\%}$ / (h)	c_{ss} / (mg·mL ⁻¹)	$m(t_{50\%})_q$ / (mg·mL ⁻¹ · min ⁻¹)	$m(t_{50\%})$ / (10 ⁻³ min ⁻¹)	AUC _{norm} / (h) ABC _{norm} / (h)	AUC _q / (mg·mL ⁻¹ · h)
Metro	5,57 \pm 0,68 ^b	9,1 \pm 1,2	0,0066 \pm 0,0006 ²	2,9 \pm 0,5 ^{2,c}	35,42 \pm 1,44 ^{b,c} 12,81 \pm 1,44 ^{b,c}	318 \pm 32
BIP						
gesamt		68,6 \pm 3,1			39,42 \pm 1,30 ^{2,d,e} 8,81 \pm 1,30 ^{2,d,e}	2759 \pm 59
P1 (~78%)	1,23 \pm 0,01 ²	(44,9 \pm 1,3 ¹)	0,250 \pm 0,007	22,3 \pm 1,2 ¹		
P2	17,70 \pm 3,15		0,011 \pm 0,002 ¹	1,8 \pm 0,4		
PrG	3,77 \pm 0,30 ^a	221,5 \pm 8,0	0,235 \pm 0,029	4,2 \pm 0,6 ^{a,c}	37,94 \pm 1,15 ^{a,c,d} 10,30 \pm 1,15 ^{a,c,d}	8329 \pm 179
W						
gesamt		81,7 \pm 4,7			36,18 \pm 1,51 ^{a,b,e} 12,05 \pm 1,51 ^{a,b,e}	2986 \pm 108
P1	4,63 \pm 0,39 ^{a,b}	(36,0 \pm 4,1 ¹)	0,049 \pm 0,001 ²	5,5 \pm 0,7 ^{2,a}		
P2	32,86 \pm 1,41 ¹		0,005 \pm 0,001 ¹	1,0 \pm 0,3 ²		

Metro = Metronidazol, W = Wasser, P = Prozess

- Versuchsordnung 2a vs. 2b (Parameter gegenüber Analogem aus Tabelle 8 mit DD als Akzeptor): ¹p < 0,01, ²p < 0,05.

- Komponenten dieser Versuchsordnung untereinander für $t_{50\%}$, $m(t_{50\%})$, AUC_{norm}, ABC_{norm}: Zwischen identisch indexierten Parametern besteht keine statistische Signifikanz (^{a, b, c, d, e}p > 0,05).

Vorweg gestellt sei, dass die *Steady-state*-Konzentrationen aller Substanzen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Akzeptoren DD und DDw aufwiesen. Unabhängig von der Modifikation des Systems zu Beginn stellte sich der gleiche, auf Solubilisierungseffekten beruhende Endzustand ein. Während PrG und Metronidazol (nahezu) unbeeinflusst blieben, zeigte Wasser einige Besonderheiten im Konzentrations-Zeit-Profil (Abbildung 27b). Zunächst kam es innerhalb von ca. 13 min zu einer Konzentrationsabnahme vom

anfänglich gesättigten Zustand, der bei ca. $36 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ lag, auf ca. $24 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. In diesem Zeitraum war der Prozess vermutlich thermodynamisch kontrolliert, da sowohl die Membran als auch der Donator (ME-BIP) im Gegensatz zum Akzeptor eine gewisse Aufnahmekapazität für Wasser besaßen (vgl. Abbildung 5). Parallel zur Rückdiffusion von Wasser penetrierten die anderen Komponenten der Mikroemulsion in den Akzeptor mit der Konsequenz, dass sich dort die Gegebenheiten zugunsten einer Wasseraufnahme änderten. Einem vier- bis fünfminütigen Plateau schloss sich der Konzentrationsanstieg an, der eine Überlagerung zweier Prozesse darstellte. Nach ca. 250 min entsprach der Verlauf annähernd dem aus Versuchsanordnung 2a. Wie in Abbildung 27b gut zu erkennen ist, lag das *Steady-state*-Niveau von Wasser, aufgrund der erwähnten komplexen Solubilisierungseffekte, mehr als doppelt so hoch wie der ursprünglich in reinem DD vorhandene Sättigungszustand. Bei BIP trat im Fall des Akzeptormediums DDw die Beteiligung zweier übereinander liegender Prozesse deutlicher hervor (Abbildung 27a). Der erste Teilprozess gelangte schneller zum Wendepunkt und endete auf einem geringeren fiktiven Niveau ($c_{ss} \text{ P1}$). Das spiegelte auch der Anteil von ca. 78 % wider, den dieser Teilprozess am Gesamtverlauf einnahm. Offensichtlich behindern sich Wasser und BIP ab einer bestimmten Konzentration gegenseitig. Das kritische Verhältnis der beiden Komponenten wurde bei der Verwendung von DDw früher erreicht und determinierte den Verlauf des zweiten, langsameren Teilprozesses.

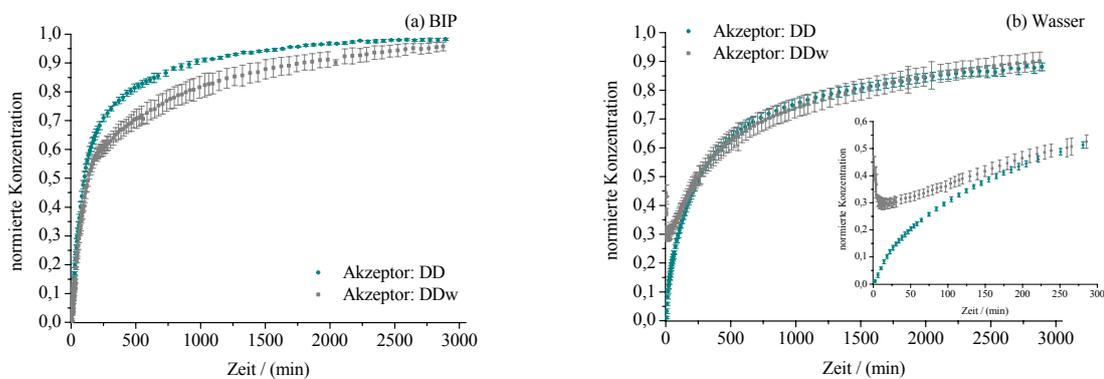


Abbildung 27: Vergleich der normierten Konzentrations-Zeit-Profile von BIP (a) und Wasser (b, Inset: vergrößerte Darstellung der ersten 300 min) nach Applikation der $\text{ME-BIP}^{\text{Metro}}$ bei Verwendung von DD bzw. DDw als Akzeptormedium ($MW \pm SD$, $n = 3$).

Mehrfach fielen in den beschriebenen Untersuchungen die Solubilisierungseffekte auf, die durch die Penetration aller detektierten Mikroemulsionskomponenten in den Lipidmembranen zum Tragen kamen. Daraus folgt, dass Veränderungen im Verteilungsverhalten zwischen Vehikel und Membran einen wesentlichen Faktor bezüglich der penetrationsfördernden Eigenschaften von Mikroemulsionen darstellen. Einen solchen Einfluss vermuteten bereits WIEDERSBERG et al. beim Vergleich der Stratum-corneum-Verteilung von Betamethason-17-valerat, das über eine ölige Lösung sowie eine Mikroemulsion appliziert wurde [88].

Versuchsordnung 3: Penetration von ME-BIP^[Metro] in humanes Stratum corneum mit DDw als Akzeptor

In der dritten Versuchsreihe wurde isoliertes humanes Stratum corneum als Membran eingesetzt. Um dessen Dehydratisierung zu verhindern, wurde der Akzeptor zuvor mit Wasser gesättigt (DDw). Die Penetrationsvorgänge sollten soweit wie möglich bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes aller Komponenten verfolgt werden, um ihren Verlauf quantitativ beschreiben und eine Normierung zum relativen Vergleich untereinander durchführen zu können. Daraus ergaben sich durch die Rigidität des Stratum corneum und die aus den zuvor beschriebenen Versuchen bekannten Solubilisierungsvorgänge ausgesprochen lange Messzeiten von bis zu 45 Tagen. Vor und nach jedem Experiment wurden Integrität und Spreitverhalten des Stratum corneum überprüft.

Die Profile aller Komponenten ließen sich über das einfache logistische Modell beschreiben. Das kritische Verhältnis zwischen BIP und Wasser wurde, vermutlich aufgrund der komplexeren Penetrationswege im Stratum corneum, nicht erreicht. Die Ergebnisse der einzelnen Experimente sind in Tabelle 10 aufgeführt. Auf die Berechnung der Mittelwerte sowie eine statistische Auswertung wurde verzichtet, da das Hauptaugenmerk auf dem Vergleich der Komponenten innerhalb eines Versuches lag. Abbildung 28 zeigt die normierten Kurven aller drei Experimente, wobei das dritte aus Zeitgründen auf 27 Tage begrenzt war.

Tabelle 10: Ergebnisse der einzelnen Penetrationsexperimente von ME-BIP^[Metro] in humanes Stratum corneum mit DDw als Akzeptor. AUC und ABC wurden bei den Messungen 1 und 2 bis $t = 45$ d bestimmt, bei Messung 3 bis $t = 27$ d.

	$t_{50\%} /$ (d)	$c_{ss} /$ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	$m(t_{50\%})_q /$ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)	$m(t_{50\%}) /$ (d^{-1})	$\text{AUC}_{\text{norm}} /$ (d)	$\text{ABC}_{\text{norm}} /$ (d)	$\text{AUC}_q /$ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{d}$)
1 Metro	16,71	14,6	0,033	0,096	29,7	15,3	370
BIP	15,77	88,0	0,224	0,107	30,1	14,8	2283
PrG	8,87	211,0	0,776	0,167	34,8	10,2	6914
Wasser	10,29	59,2	0,188	0,178	36,3	8,7	2064
2 Metro	19,01	11,4	0,031	0,111	26,6	18,5	267
BIP	20,59	78,8	0,199	0,105	26,9	18,1	1781
PrG	12,41	211,1	0,674	0,131	31,5	13,5	6005
Wasser	12,37	49,2	0,168	0,173	34,0	11,1	1607
3 Metro	10,35	12,1	0,046	0,150	14,0	12,8	169
BIP	11,72	94,2	0,263	0,114	13,2	13,5	1246
PrG	5,68	209,0	1,089	0,221	18,1	8,7	3796
Wasser	7,14	62,3	0,249	0,218	19,5	7,3	1214

Sowohl aus dem Wendepunkt und den semiquantitativen Daten (farbige Boxen in Tabelle 10) als auch aus den normierten Penetrationsprofilen in Abbildung 28 geht eine Gruppierung hervor: BIP und Metronidazol sowie PrG und der ansteigende Teil des Wasserprofils zeigten

jeweils einen gemeinsamen Verlauf, wobei die hydrophilen Komponenten – relativ betrachtet – eine höhere Geschwindigkeit ($m(t_{50\%})$) aufwiesen, schneller den Wendepunkt erreichten ($t_{50\%}$), eine höhere AUC_{norm} und eine geringere Verweilzeit der penetrierten Moleküle im Donator (ABC_{norm}) besaßen. Diese Tendenzen bestanden bereits in einem Bereich der Kurven, der noch nicht von Sättigungseffekten determiniert war. Die thermodynamisch kontrollierte Rückdiffusion von Wasser zu Beginn, die sich in der Konzentrationsabnahme äußert, ist bereits aus Versuchsanordnung 2b bekannt. Im Anschluss an eine Plateauphase nahm der Wasseranteil im Akzeptor nach ca. 1,5 Tagen wieder zu. Den normierten Verläufen folgend kann darauf geschlossen werden, dass das bereits penetrierte PrG die Polarität des Stratum corneum und auch des Akzeptors zugunsten des Wassers erhöht und selbiges möglicherweise „mitzieht“. Die polare Route kann als gemeinsamer Diffusionsweg angenommen werden.

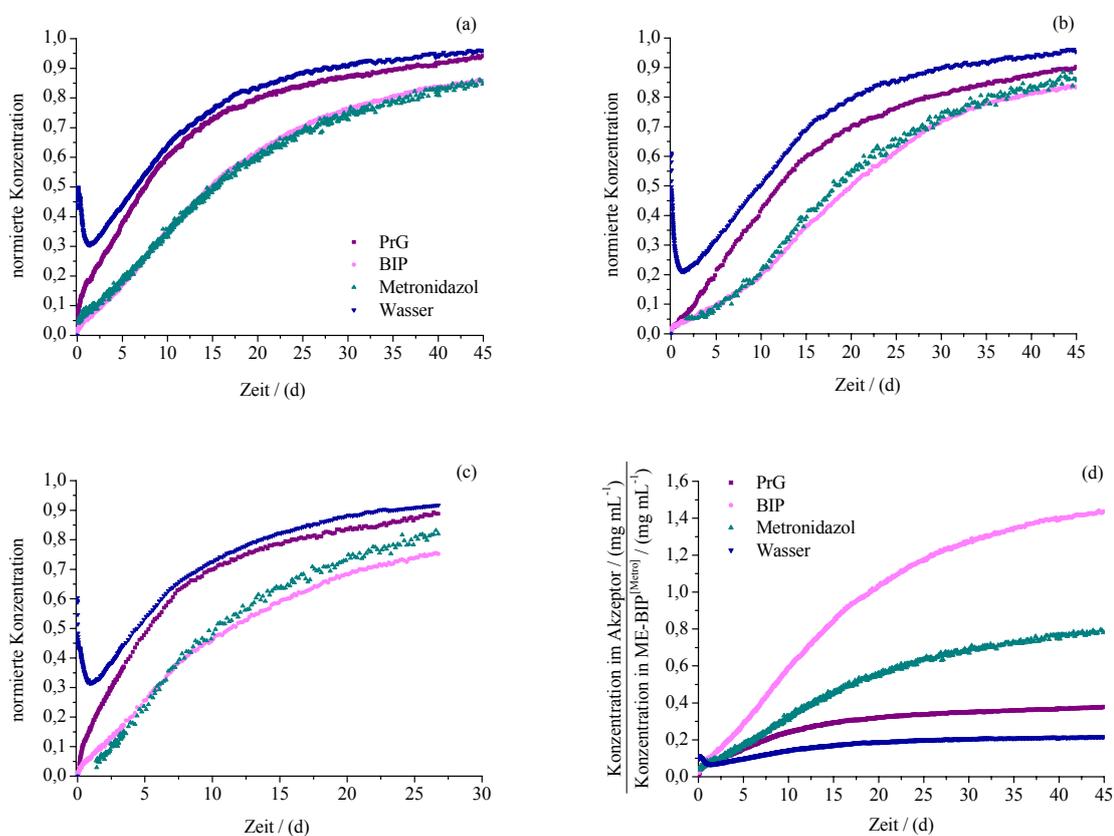


Abbildung 28: Normierte Darstellung der Konzentrations-Zeit-Verläufe von BIP, Metronidazol, PrG und Wasser nach Auftragung von ME-BIP^[Metro] auf humanes Stratum corneum mit DDw als Akzeptor, (a - c: Messungen 1 bis 3). (d) Konzentrations-Zeit-Verläufe bezogen auf die Ausgangskonzentrationen der Komponenten im Donator (ME-BIP^[Metro]) am Beispiel von Messung 1.

Das von den polaren Komponenten abweichende Penetrationsprofil von BIP, vermutlich die apolare Route nutzend, ist aufgrund dessen physikochemischer Eigenschaften den Erwartungen entsprechend. Interessant ist jedoch, dass Metronidazol als weniger lipophiles Molekül einen analogen Verlauf nahm. Einen Ansatz zur Interpretation bietet die Betrachtung der Konzentrationszunahme der Substanzen relativ zur eingesetzten

Konzentration im Donator, beispielhaft dargestellt in Abbildung 28d. Sie belegt, dass BIP eine wesentlich effektivere Penetration aufwies (Faktor 4 nach 45 Tagen), obwohl ein zehnfach geringerer initialer Konzentrationsgradient als bei PrG vorlag. Ähnliches gilt für Metronidazol. Dessen Lösungsverhalten betreffend, zeigte sich in Tabelle 6 eine überproportionale Verbesserung von der BIP-freien mizellaren Lösung hin zur 5 % BIP enthaltenden ME-BIP, obwohl die lipophile Komponente allein eher ungünstige Solubilisierungsbedingungen aufwies. Die Summe aus der effektiveren Penetration des kolloidal verteilten BIP zusammen mit dem darin solubilisierten Anteil an Metronidazol sowie dem wesentlich schneller abflachenden und quantitativ eingeschränkten Verlauf von PrG lässt einen Cotransport von BIP und Metronidazol realistisch erscheinen. Die dynamische Struktur der lipophilen „Pseudophase“ ist offenbar maßgeblich in der Lage, die Penetration des Modellwirkstoffes zu unterstützen. Für den in PrG-reichen Regionen der Mikroemulsion lokalisierten Anteil an Metronidazol erhöht sich möglicherweise die Affinität zum Donator, so dass er dort verbleibt. Nicht auszuschließen ist, dass ein geringer Teil des PrG begünstigend für BIP und Metronidazol an der unpolaren Route beteiligt ist (vgl. Kapitel 4.3.2). Der Hauptanteil an PrG jedoch, der das Penetrationsprofil bestimmt, diffundiert gemeinsam mit Wasser. Eine weitere Hypothese wäre, dass sich die Menge an Metronidazol, die gemeinsam mit PrG das Stratum corneum erreicht, sich in diesem anreichert und kaum in den Akzeptor gelangt. Möglichkeiten zu molekularen Wechselwirkungen des Wirkstoffes über Wasserstoffbrücken existieren entlang der polaren Route in größerem Ausmaß als in den apolaren Bereichen des Stratum corneum. Dies sollte mit Hilfe eines geeigneten analytischen Verfahrens nach Extraktion der Membran überprüft werden.

3.4.3 Zusammenfassung: In-vitro-Diffusions- und Penetrationsstudien

Das Ziel der in diesem Abschnitt beschriebenen Untersuchungen bestand darin, mit Hilfe von In-vitro-Versuchen Informationen zum Penetrationsverhalten der zuvor ausführlich charakterisierten Mikroemulsion ME-BIP zu erhalten, die Erklärungsansätze für das allgemein anerkannte hervorragende Penetrationsvermögen der kolloidalen Formulierungen liefern können. Dies sollte über die simultane Verfolgung der Penetrationsprozesse mehrerer Mikroemulsionsbestandteile realisiert werden. Bei der Verwendung von Stratum corneum lag der Fokus auf der transepidermalen Route. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. ME-BIP zeigt kein klassisches Freisetzungverhalten wie es von halbfesten Formulierungen, insbesondere Suspensionssalben, bekannt ist. Vielmehr spielen Solubilisierungseffekte eine wesentliche Rolle. Hochkomplexe Mechanismen führen zu einer sich gegenseitig beeinflussenden Penetration von Vehikelbestandteilen und Wirkstoff.
2. Eine Diffusionszelle mit FTIR-ATR-spektroskopischer Detektion erwies sich als geeignetes In-vitro-Modell, um die Diffusions- bzw. Penetrationsvorgänge von allen

Mikroemulsionskomponenten, ausgenommen der Tenside, nicht-invasiv und online sowohl qualitativ als auch quantitativ zu verfolgen.

3. Als Herausforderungen stellten sich dar:
 - die spektroskopischen Anforderungen an die zu detektierenden Komponenten und den Akzeptor,
 - ähnliche physikochemische Eigenschaften von Membran und Akzeptor, um keine zusätzlichen Verteilungsschritte außer dem zwischen Vehikel und Membran einzuführen (sonst wird keine Penetration, sondern eine Permeation bestimmt),
 - die Komplexität des Vehikels an sich, welches aus Inhaltsstoffen unterschiedlicher physikochemischer Eigenschaften besteht,
 - die konstruktions- und analytisch bedingten Grenzen der Versuchsanordnung sowie die daraus resultierenden Sättigungseffekte, die das Ende der Prozesse determinieren. Demzufolge mussten *Infinite-dose*-Applikation und *Non-sink*-Akzeptor als Randbedingungen in die Auswertungen einbezogen werden.
4. Jede der Substanzen (BIP, PrG, Metronidazol und Wasser) penetrierte sowohl in die künstliche Lipidmembran DCM als auch in humanes Stratum corneum, wobei sich ein deutlicher Einfluss des Vehikels auf die qualitativen und quantitativen Konzentrations-Zeit-Verläufe zeigte.
5. Die kolloidale „Pseudophase“ der wasserkontinuierlichen ME-BIP, repräsentiert durch BIP, penetrierte in signifikant erhöhtem Ausmaß als die Substanz bei separater Applikation mit identischem Konzentrationsgradienten passiv diffundierte. Dies steht vermutlich mit der dynamischen Mikrostruktur im Zusammenhang.
6. Hingegen verlief bei PrG die passive Diffusion wesentlich effektiver als die Penetration aus der Mikroemulsion. Als Ursache wurde die Beteiligung am Aufbau der Grenzflächen (Cotensidfunktion) diskutiert, die die Mobilität eines Teiles der PrG-Moleküle einschränkt.
7. Es findet eine gemeinsame Penetration von PrG und Wasser ins Stratum corneum statt, vermutlich entlang der polaren Route.
8. Das kolloidal verteilte BIP penetriert gemeinsam mit Metronidazol, vermutlich entlang der unpolaren Route. Die Prozesse dieser beiden Stoffe verlaufen relativ betrachtet ($c_{ss} \equiv 1$) langsamer als diejenigen von PrG und Wasser, jedoch bezogen auf die Ausgangskonzentration in ME-BIP effektiver. Die dynamische Struktur der kolloidalen „Pseudophase“ ist offenbar maßgeblich in der Lage, die Penetration des Wirkstoffes zu unterstützen.
9. Die Penetration polarer und unpolarer Mikroemulsionskomponenten verursacht mit der Zeit eine Veränderung der Verteilungseigenschaften zwischen Vehikel und Stratum corneum, die sich im weiteren Verlauf penetrationsfördernd auswirkt.

10. Die Mikroemulsion verliert demzufolge ihre ursprüngliche Zusammensetzung beim Eindringen in die Membran. Darüber hinaus sprechen die unterschiedlichen Penetrationsrouten für ein Aufbrechen der Mikrostruktur des Vehikels.
11. Künstliche isotrope Lipidmembranen wie die verwendeten DCM sind zu wenig komplex, um die Barriere Stratum corneum nachbilden zu können. Ihr Wert liegt darin, passive Diffusionsvorgänge und Solubilisierungseffekte zu charakterisieren.
12. Für weitere Untersuchungen wäre die Entwicklung einer Durchflussapparatur mit ATR-Detektion von Nutzen. Ein solches System könnte über die Arbeit mit Stratum corneum hinaus mit Epidermis bzw. Vollhaut zu Permeationszwecken etabliert werden. So können Sättigungseffekte umgangen und In-vivo-Bedingungen besser nachgebildet werden.

3.5 Ex-vivo-Untersuchungen zur folliculären Penetration

3.5.1 Einleitung

Die Passage des Stratum corneum kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen, von denen der interzelluläre die größte Relevanz besitzt. In jüngster Zeit rückte jedoch die Penetration über die so genannten „Shunt“-Routen, insbesondere die folliculäre Route in den Blickpunkt des Interesses (vgl. Kapitel 2.1.2). Deren Bedeutung bei der topischen Applikation von Mikroemulsionen ist bislang wenig untersucht, wenngleich das erleichterte Eindringen in schmale Kanäle aufgrund der geringen Grenzflächenspannung und Viskosität plausibel erscheint. Erste Hinweise fanden BIJU et al., die dazu an perfundiertem Kuheuter arbeiteten [92]. Sie bestimmten die folliculäre Konzentration von Teebaumöl, welches neben Mikroemulsionen u.a. über eine liposomale Zubereitung sowie eine multiple Emulsion aufgetragen wurde. Gegenüber letzterer zeigten die beiden kolloidalen Formulierungen einen etwa doppelt so hohen transfolliculär penetrierten Anteil. Ein potentieller Nutzen ließe sich daraus für die topische Aknetherapie ableiten. Visuelle Anhaltspunkte ergaben Studien von CHANGEZ et al. am konfokalen Laser Scanning Mikroskop [160]. Sie detektierten erhöhte Intensitäten eines Fluoreszenzfarbstoffes in Haarfollikeln und Schweißdrüsen von haarlosen Mäusen, wenn dieser anstelle einer wässrigen Lösung über eine O/W-Mikroemulsion appliziert wurde.

TEICHMANN et al. entwickelten eine Präparationsmethode zur selektiven Blockade von Haarfollikeln mit Hilfe eines Lackes oder Wachses, die sowohl in vitro als auch in vivo anwendbar ist [35, 161]. Durch den Vergleich mit unbehandelter Haut können formulierungsspezifisch Kenntnisse zum Anteil der folliculären Route an der Penetration gewonnen werden. Ein wichtiger Aspekt zur Interpretation in vitro generierter Daten wurde kürzlich mit der Erkenntnis geliefert, dass das folliculäre Reservoir in diesem Fall nur ca. 10 % von dem in vivo gefundenen ausmacht und damit die In-vivo-Situation wahrscheinlich stark unterschätzt wird [162]. Grund ist die Zertrennung elastischer Fasern beim Exzidieren der Haut, die zur Kontraktion der Follikelöffnungen führt. Auch andere Faktoren, wie eine verringerte Feuchtigkeit oder der fehlende Blutfluss in exzidierte Haut, wurden diskutiert.

Vor diesem Hintergrund sollen vergleichende Studien an Haut mit offenen und gemäß [161] geschlossenen Follikeln im Modell der FRANZ-Diffusionszelle erste Hinweise darauf geben, ob und inwieweit die folliculäre Route Bedeutung für die Penetration der ME-BIP^[HMLO] besitzt. HMLO bot sich als lipophiler Modellarzneistoff aufgrund der bereits gewonnenen Kenntnisse zur Verteilung innerhalb der Mikroemulsion, zum Diffusionsverhalten in künstliche Lipidmembranen (vgl. Kapitel 3.4.1) sowie durch seine analytische Zugänglichkeit an. Aus Gründen der Vergleichbarkeit mit den In-vivo-Untersuchungen in Kapitel 3.6 wurde HMLO in 0,5 %iger Konzentration eingesetzt. Gleichzeitig sollten IP und BP

quantifiziert werden, um einer eventuellen gemeinsamen Penetration des Wirkstoffes im lipophilen Kompartiment nachzugehen.

Die FRANZ-Zelle, vor mehr als 30 Jahren entwickelt [163], ist heute ein international anerkanntes und standardisiertes Modell zur Untersuchung perkutaner Penetrations- und Absorptionsprozesse [164, 165]. Als Membran fungiert im Idealfall die oft nur limitiert erhältliche, frisch exzidierte Humanhaut. Aber auch diejenige anderer Spezies kann genutzt werden. So wurde in mehreren Studien die Eignung der Haut von Schweineohren als Modell für Humanhaut belegt [166-168]. Sie kam in dieser Arbeit zur Anwendung.

Hinsichtlich der Wahl des Akzeptormediums wurden verschiedene Möglichkeiten erwogen und getestet. Generell können *Sink*-Bedingungen, die in vivo über das dermale Gefäßnetz realisiert sind, in der FRANZ-Zelle nicht komplett nachempfunden werden [164]. Die fehlende Mikrozirkulation hat zur Folge, dass tiefere Dermisbereiche Arzneistoff enthalten, der in vivo Teil der absorbierten Fraktion wäre [164, 169]. Durch das mit der dermalen Seite der Haut in Kontakt stehende Akzeptormedium wird u.a. dieser Begrenzung des Modelles begegnet. Nur wenn isotonische Lösungen mit physiologischen pH-Werten keine geeigneten Solubilisierungsbedingungen für den zu untersuchenden Arzneistoff bieten, sollten unter der Prämisse, dass die Integrität der Barrierefunktion erhalten bleibt, lösungsvermittelnde Zusätze erwogen werden [169]. Ziel ist, dass die Löslichkeit im Akzeptor nicht zum limitierenden Schritt wird. Jedoch muss eine kritische Abwägung eventueller Zusätze erfolgen. Abhängig von deren Art und Menge kann es zur Extraktion von Hautbestandteilen, der Schaffung eines künstlichen Soges in den Akzeptor oder auch zu analytischen Komplikationen kommen [97]. Einer Studie von SURBER et al. mit dem lipophilen Acitretin zufolge führen Lösungsvermittler zwar zu erhöhten Permeationsraten, jedoch bleiben Wirkstoffkonzentrationen in Epidermis und Dermis unbeeinflusst [170].

Nachdem durch den Zusatz des Tensides Volpo[®]N20 sowie bovinen Serumalbumins keine nennenswerte Besserung der sehr geringen Wasserlöslichkeit des lipophilen HMLO erzielt werden konnte, fiel die Entscheidung auf PBS pH 7,4. Gegen die Verwendung von Ethanol 50 % (V/V) [164] sprach ein Überwiegen der oben genannten Nachteile (v.a. die Extraktion von Hautbestandteilen) gegenüber der nur geringfügigen Löslichkeitsverbesserung.

Die Untersuchungen zur folliculären Beteiligung an Penetration bzw. Permeation wurden in zwei verschiedenen Modi durchgeführt, aus denen charakteristische Informationen und Parameter hervorgingen. Bei der *Finite-dose*-Technik sind die Konditionen soweit als möglich an reale Gegebenheiten angepasst. ME-BIP^[HMLO] wurde in praxisrelevantem Maßstab von ca. 5 mg·cm⁻² Haut aufgetragen. Durch das limitierte Stoffangebot im Donator erreicht der Flux kein *Steady-state*-Niveau, sondern nimmt nach Durchlaufen eines Maximums ab. Nach Inkubationszeiten von 30, 300 und 1000 min wurde die Menge von HMLO, IP und BP in Epidermis (einschließlich Stratum corneum), Dermis (einschließlich Anteile der Subcutis) und Akzeptor, absolut bzw. bezogen auf die applizierte Dosis, bestimmt [139].

Im *Infinite-dose*-Modus wurde ME-BIP^[HMLO] im Überschuss ($\sim 200 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}$) aufgetragen. Im Laufe der 30 h betragenden Versuchszeit stellten sich *Steady-state*-Bedingungen ein, so dass aus den kumulativen Konzentrations-Zeit-Profilen der im Akzeptor detektierten Substanzen neben der *lag time* der *Steady-state*-Flux sowie der Permeationskoeffizient berechnet werden konnten (siehe Kapitel 2.1.2). Durch das „unendliche“ Formulierungsangebot im Donator wird allerdings ein okklusionsähnlicher Zustand eingestellt, der zu einer verstärkten Hydratisierung der Haut und damit zu einer erhöhten Permeabilität führen kann.

3.5.2 Ergebnisse

Finite-dose-Studie

Die Applikation von ME-BIP^[HMLO] im *Finite-dose*-Modus auf Haut mit offenen (oFV) und geschlossenen Follikeln (FV) erbrachte die in Abbildung 29 dargestellten Ergebnisse.

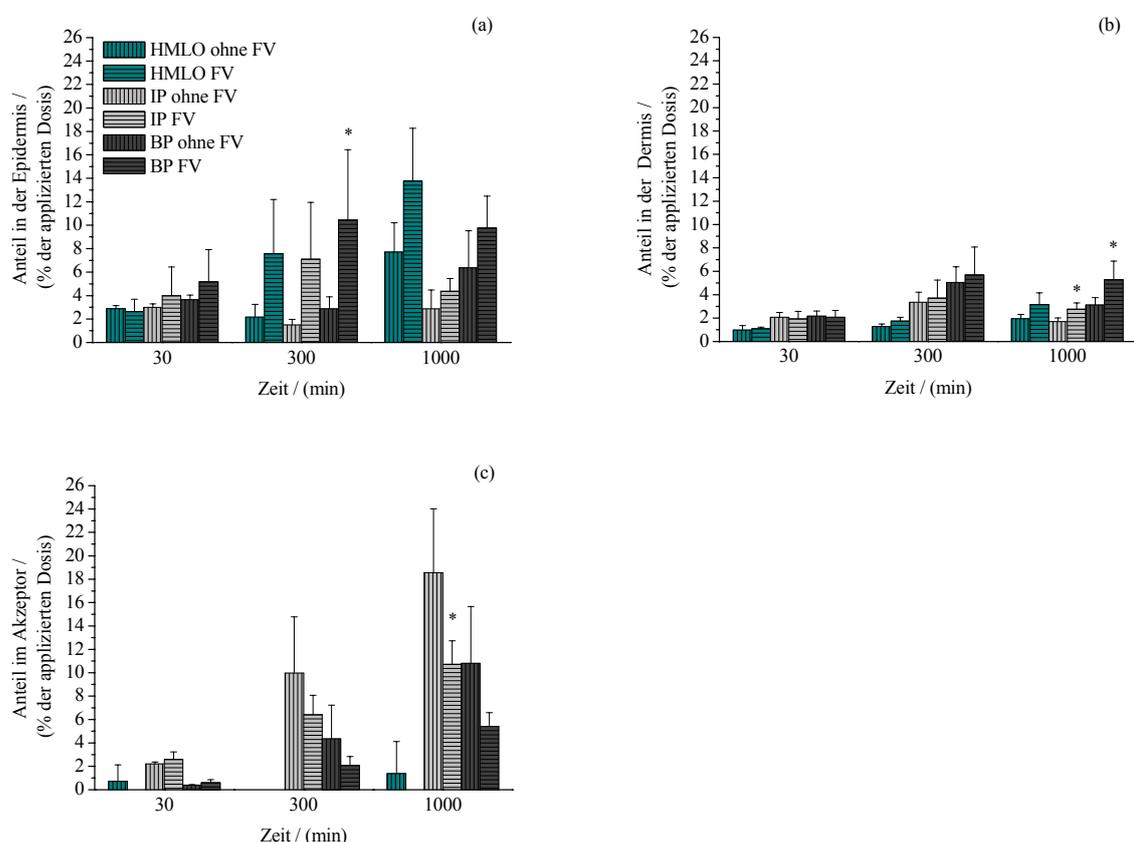


Abbildung 29: Anteile der applizierten Dosis von HMLO, IP und BP in Epidermis (a), Dermis (b) und Akzeptor (c) nach Auftragung von ME-BIP^[HMLO] im *Finite-dose*-Modus auf die Haut von Schweineohren mit (FV) und ohne Follikelverschluss (ohne FV) in Abhängigkeit von der Zeit (MW \pm SD, n = 4; * p < 0,05 gegenüber ohne FV).

Während nach 30-minütiger Applikationszeit in keinem Kompartiment Unterschiede abhängig vom Ort der Lackauftragung zu verzeichnen waren, gab es bei 300 min in der Epidermis eine Verschiebung um Faktor 3,5 bis 4 hin zu höheren Anteilen an HMLO sowie IP und BP bei Follikelblock. Sie war für BP signifikant. Nach 1000 min glichen sich die

Werte wieder etwas an. In der darunter befindlichen Dermis wurden für alle drei Stoffe generell niedrigere Anteile an der applizierten Dosis detektiert. Unterschiede traten erst bei der Langzeitinkubation von 1000 min zugunsten einer Anreicherung bei Follikelverschluss auf. Sie waren für IP und BP signifikant. Ein anderes Bild ergab sich beim Akzeptor. Hier war der Wirkstoff HMLO kaum nachweisbar. Dessen physikochemische Eigenschaften stießen vermutlich an die Grenzen des In-vitro-Systems. Wie bereits erwähnt, war die Lösungsvermittlung über Variationen des Akzeptormediums nicht erfolgreich. Jedoch ließen die beachtlichen Permeationsraten, die von JAHN für den Problemarzneistoff Ciclosporin A, inkorporiert in ähnliche zusammengesetzte Mikroemulsionen, erreicht wurden, ein anderes Ergebnis erwarten [97]. Die lipophilen Komponenten IP und BP hingegen gelangten in den Akzeptor. Bei verschlossenen Follikeln war deren permeierter Anteil deutlich geringer als bei offenen. Lediglich im Kurzzeitversuch traten keine Unterschiede auf. Generell waren für alle drei Analyten zu jeder Zeit vergleichbare Tendenzen zu erkennen.

Durch die Auftragung der Lacktropfen zum Verschluss der Follikel kommt es zu einer Verkleinerung der zur Verfügung stehenden Hautfläche. Um deren Einfluss zu umgehen, wurde im Fall der offenen Follikel ein Lacktropfen neben jedem Follikel platziert (Abbildung 53, [161]). Damit beschränkte sich der Flächenunterschied auf den Anteil, den die Follikelöffnungen an der Gesamtfläche ausmachen. Er wurde über die Follikelanzahl und deren oberflächlichen Durchmesser ($\approx 200 \mu\text{m}$ nach [171]) grob auf 1-2 % abgeschätzt. Die fehlenden Unterschiede zwischen beiden Modi im 30 min-Versuch weisen darauf hin, dass die offenen Follikel (oFV) das gegenüber Follikelverschluss bestehende Flächendefizit ausgeglichen haben, die follikuläre Route an sich aber noch relativ gering ausgeprägt war.

Die Momentaufnahme nach 300 min hingegen erbrachte deutlichere Tendenzen zugunsten eines follikulären Beitrages, die vor allem an den Konzentrationsdifferenzen im Akzeptor, aber auch in den Hautschichten erkennbar sind. Während die Anteile der Substanzen in der Epidermis bei offenen Follikeln deutlich geringer waren als bei geschlossenen, zeigte sich in der Dermis kaum ein Unterschied. Dieser wäre aber analog den epidermalen Verhältnissen zu erwarten, wenn die Dermis nur über die darüber liegende Schicht „gespeist“ würde, zumal der Konzentrationsgradient zwischen beiden Schichten bei geschlossenen Follikeln höher war. Der Ausgleich der erwarteten Differenz muss demzufolge über den Inhalt der, nach Hitzeseparation in der Dermis befindlichen [172], Follikel stattgefunden haben. Die Epidermis selbst ist im Wesentlichen über den transepidermalen Weg für die Stoffe erreichbar. Die höheren Anteile dort bei Follikelverschluss könnten auf die etwas größere Fläche intakten Stratum corneums zurückzuführen sein. Außerdem wäre es möglich, dass die Hautfurchen die Mikroemulsion den Follikeln zuleiten, aber der „Abfluss“ in die Öffnungen durch den Lack versperrt ist, was die transepidermale Aufnahme wiederum begünstigt.

Im Langzeitversuch glichen sich die Konzentrationsunterschiede in der Epidermis ein wenig an – vermutlich ein Zeiteffekt, mit dem eine Aufsättigung einherging. Da die Follikel bereits bei 300 min gefüllt waren und nun keinen weiteren Beitrag zur Dermiskonzentration leisten

konnten, bestimmte der bei offenen Follikeln geringere Epidermis/Dermis-Konzentrationsgradient das für IP und BP signifikante Ergebnis. Schließlich zeigt sich an den hohen nominalen und für IP signifikanten Differenzen im Akzeptor der Einfluss der follikulären Route auf die beiden Substanzen.

Die vergleichende Betrachtung der drei Komponenten kann Hinweise auf einen eventuellen gemeinsamen Transport geben. Ein bedeutsamer Fakt ist, dass die Stoffe zu jeder Zeit sehr ähnliche Verhältnisse in ihrer Verteilung bei offenen bzw. verschlossenen Follikeln zeigten. Überdies wiesen die relativ zur applizierten Dosis detektierten Anteile im Kurzzeitversuch keine Unterschiede innerhalb der einzelnen Kompartimente auf. Das spricht für die gemeinsame Penetration des Modellwirkstoffes mit der lipophilen Komponente der Mikroemulsion, in der er sich anreichert und welches an sich ein gutes Lösungsmittel für den Stoff ist (vgl. Kapitel 3.4, Tabelle 4). Später gewann das Verteilungsverhalten der Substanzen selbst größeren Einfluss, woran auch die In-vitro-Bedingungen Anteil haben. Die Abstufungen bei 1000 min in der Epidermis sowie bei 300 und 1000 min im Akzeptor korrelieren eindeutig mit den Verteilungskoeffizienten der Stoffe. Je höher die Lipophilie (logP), desto höher waren die prozentualen Anteile in der Epidermis (die das Stratum corneum einschließt) und desto geringer waren sie im Akzeptor. Letzterer wirkte sich insbesondere negativ auf den Übertritt von HMLO aus den Follikeln aus. Gleichzeitig könnte die intensive Permeation von IP und BP zu einer Aufkonzentrierung von HMLO im Donator geführt haben, was dessen thermodynamische Aktivität zugunsten eines Übertrittes in die Epidermis erhöhte (erkennbar im 1000 min-Versuch).

Generell lässt sich aus den Resultaten von Dermis und Akzeptor schlussfolgern, dass die Follikel für Mikroemulsionen keine Reservoirfunktion besitzen, wie es zum Beispiel für nanopartikuläre Systeme und Liposomen bekannt ist [173-175]. Bei diesen Vehikeln kommt es zu einer Anreicherung in den Follikeln, was im verwendeten Versuchsmodus in erhöhten dermalen Konzentrationen erkennbar wäre. Im Fall der ME-BIP^[HMLO] stellt die follikuläre Route vielmehr eine Abkürzung in Richtung Akzeptor mit geringerem Diffusionswiderstand dar. Von solchen Effekten berichteten bereits TUR et al. [176], die für den Eintritt der pharmakologischen Wirkung von Methylnicotinat einen Zusammenhang mit der Dichte der Hautanhangsgebilde am Applikationsareal feststellten. Dem voraus ging die Überlegung, dass die pharmakologische Antwort auf den Arzneistoff wesentlich schneller erkennbar ist als die in vitro über Permeationsstudien ermittelte *lag time* [177].

Infinite-dose-Studie

In dieser Versuchsreihe wurde ME-BIP^[HMLO] im Überschuss aufgetragen und in definierten Zeitabständen die Konzentration an HMLO, IP und BP im Akzeptor bestimmt. Analog der vorangegangenen Studie kam es auch hier zu keiner messbaren Permeation von HMLO. Abbildung 30 beschränkt sich daher auf die Permeationsprofile von IP und BP.

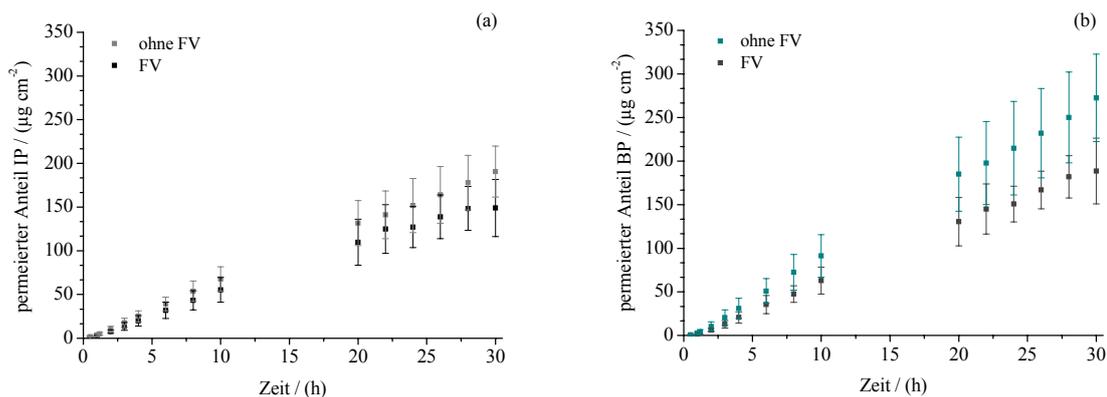


Abbildung 30: Permeation von IP (a) und BP (b) nach Infinite-dose-Applikation von ME-BIP^[HMLO] auf die Haut von Schweineohren mit (FV) und ohne Follikelverschluss (ohne FV) in Abhängigkeit von der Zeit (MW ± SD, n = 4).

Bereits nach kurzer Zeit wird die Tendenz hin zu höheren Akzeptorkonzentrationen bei offenen Follikeln an beiden Stoffen erkennbar, was den Ergebnissen der *Finite-dose*-Studie entspricht. Die aus den Graphen ermittelten Parameter Flux, Permeationskoeffizient und *lag time* sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Wenngleich ohne statistische Signifikanz, so zeigt sich doch ein deutlicher Trend in allen Kenngrößen, der für eine Beteiligung der folliculären Route an der Permeation von IP und BP spricht. HUEBER et al. schätzen die transfollikuläre Absorption von Steroidhormonen, die vergleichend an gesunder und anhangsgebildedefreier vernarbter Haut getestet wurde, über die Gleichung [(gesunde Haut - Narbenhaut) / gesunde Haut · 100] ab [178]. Übertragen auf den hier verwendeten Versuchsmodus ergibt sich für IP im linearen Bereich (4 bis 30 h) ein Wert von ca. 15 % und für BP im selben Zeitraum ca. 27 % für die transfollikuläre Absorption. Diese Größen liegen im unteren Bereich der in der genannten Studie erzielten Ergebnisse für die Steroide, die eine ähnliche Lipophilie wie IP und BP aufwiesen. Wird die eingangs erwähnte Unterschätzung der In-vitro-Ergebnisse gegenüber der In-vivo-Situation in Betracht gezogen [162], kann sogar mit einem deutlich höheren Einfluss der „Shunt“-Route gerechnet werden. Allerdings ist zu bedenken, dass Follikelgröße und -verteilung beim Menschen regional stark variieren. Im Gegensatz zu Stirn und Wade wäre zum Beispiel am Unterarm kaum mit einer Beeinflussung des Penetrationsausmaßes zu rechnen [11].

Tabelle 11: Parameter der Permeationsstudie für IP und BP (MW ± SD, n=4).

Parameter	IP		BP	
	FV	ohne FV	FV	ohne FV
Flux / (µg·cm ⁻² ·h ⁻¹)	5,56 ± 1,13	6,50 ± 1,15	6,82 ± 1,09	9,34 ± 1,95
Permeationskoeffizient / (10 ⁻⁴ cm·h ⁻¹)	4,0 ± 0,8	4,7 ± 0,8	1,7 ± 0,3	2,3 ± 0,5
lag time / (h)	0,50 ± 0,19	0,27 ± 0,14	1,09 ± 0,32	0,85 ± 0,23

3.5.3 Zusammenfassung: Follikuläre Penetration

Die Ergebnisse weisen für die untersuchte Mikroemulsion auf eine Beteiligung der follikulären Route an der Passage der Haut hin. Im Gegensatz zu nanopartikulären Arzneiformen oder Liposomen dienen die Follikel im Fall der ME-BIP nicht als Reservoir, sondern kürzen die Permeationsroute ab. Für die In-vivo-Applikation von Wirkstoffen über Mikroemulsionen allgemein ist (abhängig von der Follikeldichte am Applikationsareal) neben einem beschleunigten Wirkungseintritt auch eine erhöhte transdermale Absorption über den follikulären Gefäßplexus denkbar. Die Schlussfolgerungen basieren auf den Ergebnissen der lipophilen, kolloidalen „Pseudophase“, bestehend aus IP und BP. Der Modellwirkstoff HMLO selbst erreichte den Akzeptor unter den In-vitro-Bedingungen nicht, was mit seinen anspruchsvollen physikochemischen Eigenschaften ($\log P > 6,2$) in Zusammenhang steht. An dieser Stelle kann eine In-vivo-Studie Aufklärung bringen. Während es in der Anfangsphase der Penetration Hinweise auf die gemeinsame Diffusion des Modellwirkstoffes mit der lipophilen Komponente der Mikroemulsion gab, gewannen die physikochemischen Parameter ($\log P$) im Zusammenspiel mit den Eigenschaften der Hautschichten zunehmend größeren Einfluss. Das widerspricht, analog den Ergebnissen in Kapitel 3.4.2, der Hypothese der Penetration der intakten Mikroemulsion, zeigt aber durchaus einen Zusammenhang im Diffusionsverhalten der Komponenten, der für die Enhancerwirkung des Vehikels mitverantwortlich sein kann. Gleichzeitig muss die Absorption pharmakologisch unwirksamer Hilfsstoffe in Betracht gezogen werden.

3.6 In-vivo-Untersuchungen zur Penetration eines lipophilen Modellarzneistoffes und dessen Lokalisation im Stratum corneum

3.6.1 Einleitung

Basierend auf den viel versprechenden Ergebnissen der In-vitro-Untersuchungen war es beginnend mit einem Diplomprojekt möglich, in Zusammenarbeit mit dem CCP der Charité Berlin eine In-vivo-Penetrationsstudie an elf Freiwilligen durchzuführen [179]. Der Schwerpunkt lag auf dem Vergleich der ME-BIP mit einem halbfesten Standardvehikel (Basiscreme DAC) hinsichtlich der Beeinflussung von Ausmaß und Verteilung eines lipophilen Modellarzneistoffes im Stratum corneum und den Hautanhangsgebilden. Methodisch wurde auf das *Tape Stripping* sowie die Visualisierung mit Hilfe eines Laser Scanning Mikroskops (LSM) zurückgegriffen.

Tape Stripping ist eine einfache und robuste Methode zur Untersuchung der Penetration von Arzneistoffen. Durch sukzessives Entfernen von Teilen des Stratum corneum oder seiner Gesamtheit nach Applikation einer Formulierung können Aussagen zur Tiefenprofilierung, zur Homogenität der Verteilung oder auch zu dermato-pharmakokinetischen Prozessen des Wirkstoffes in der Hornschicht erhalten werden. *Tape Stripping* kann sowohl in vitro als auch in vivo an humaner und tierischer Haut durchgeführt werden. In [180] sind die Anwendungsmöglichkeiten der minimal invasiven Technik ausführlich dargelegt. Um die erhaltenen Rohdaten sinnvoll interpretieren und vergleichen zu können, sind einige kritische Punkte in der Durchführung zu beachten. Dazu gehören unter anderem die Wahl des Hautareals, die Art des Tapes, dessen Applikation, der dabei aufgewendete Druck und die Geschwindigkeit beim Abreißen. Da die Abrissnummer nicht mit der Tiefe der Hornschicht korreliert, ist die Erfassung der an den Tapes haftenden Menge an Stratum corneum bzw. Korneozyten von größter Bedeutung. Sie hängt vor allem von der Beschaffenheit der Haut, Formulierungseffekten und Klebeeigenschaften des Tapes ab. Eine Quantifizierung kann zum Beispiel über Differenzwägung des Tapes vor und nach dem Abriss, die Bestimmung des Proteingehaltes bzw. der Pseudoabsorption der Korneozyten erfolgen. Letzteres kam in dieser Arbeit zur Anwendung. Alle Parameter und Methoden sind in [181] detailliert zusammengestellt und diskutiert.

Mit Hilfe eines Cyanoacrylatabrisses lassen sich neben dem Stratum corneum auch Haarfollikel entfernen. Dazu wird Sekundenkleber auf der Hautoberfläche verteilt und nach erfolgter Polymerisierung wieder entfernt [182, 183]. Zur Visualisierung der Lokalisation des Modellarzneistoffes, die Hinweise auf die Penetrationsroute geben sollte, wurden beide Arten von Abrissen mittels Laser Scanning Mikroskopie untersucht. An den Modellwirkstoff waren somit mehrere Bedingungen gestellt. Er musste untoxisch, lipophil und fluoreszierend sein. Zum Einsatz kam Curcumin, dessen Verteilung im Stratum corneum bereits nach

topischer Applikation anderer Formulierungen ermittelt wurde [184]. Außerdem wurde er zur Untersuchung der Reservoirfunktion der obersten Hautschicht genutzt [185].

Curcumin ist ein gelb bis orangefarbener Lebensmittelfarbstoff, der durch Extraktion von *Curcuma longa*, der Gelbwurz, und anschließende Aufreinigung gewonnen wird. Als ein Produkt natürlichen Ursprungs handelt es sich nicht um eine Reinsubstanz, sondern um die Mischung von Curcumin ($M = 368,39 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), das i.d.R. den Hauptanteil mit ca. 77 % darstellt [186], mit dem Desmethoxy- ($M = 338,35 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) sowie Bis-Desmethoxy-Derivat ($M = 308,33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Die chemischen Strukturen sind in Abbildung 31 dargestellt. Mit den berechneten pK_s -Werten von 8,1, 8,3 bzw. 8,44 [102] lagen die Moleküle unter den studienrelevanten Bedingungen (ME-BIP: pH 4,9, Basiscreme pH 5-6 [187], Stratum corneum pH 5,5-7,4 [188]) hauptsächlich im ungeladenen, schwer wasserlöslichen Zustand vor. Die Verteilungskoeffizienten wurden im relevanten pH-Bereich mit $\log D \geq 2,9$ berechnet [102, 189]. Aufgrund der nahen strukturellen Verwandtschaft der Curcuminoide konnte die spektrophotometrische Quantifizierung als Gesamtcurcumin erfolgen [190].

Im *GRAS Notification Program* der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) wird Curcumin als „*generally recognized as safe*“ geführt [191], was die Nutzung in einer In-vivo-Studie ermöglicht.



Abbildung 31: Chemische Strukturen von (1) Curcumin, (2) Desmethoxycurcumin und (3) Bisdesmethoxycurcumin.

Um einen Hinweis auf die Verteilung des Curcumins innerhalb der ME-BIP zu erhalten, wurden die Löslichkeiten in mehreren Mikroemulsionen variierenden BIP-Gehaltes (0 bis 5 %) sowie in deren Komponenten bestimmt. Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 12: Löslichkeit von Curcumin in verschiedenen Medien ($MW \pm SD$, $n = 3$).

Medium	$c_s / (\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	
Wasser	$0,0003 \pm 0,0001$	
Propylenglycol	$2,61 \pm 0,05$	
Propylenglycol/Wasser (2:1)	$0,07 \pm 0,003$	
BIP	$26,28 \pm 0,43$	
Modifizierte ME-BIP mit variierenden Konzentrationen an BIP	0 % (mizellare Lösung)	$4,84 \pm 0,15$
	1 %	$5,44 \pm 0,24$
	2 %	$5,95 \pm 0,12$
	3 %	$7,10 \pm 0,55$
	4 %	$7,72 \pm 0,09$
	5 %	$10,46 \pm 0,18$

In ihrer Tendenz sind die Werte mit denen von HMLO vergleichbar. Bereits die BIP-freie Mizellare Lösung konnte eine signifikante Lösungsvermittlung für Curcumin gegenüber Propylenglycol und Wasser hervorbringen ($p < 0,01$). Darüber hinaus ließ sich das Solubilisierungsvermögen der kolloidalen Vehikel deutlich durch den Zusatz von BIP in steigenden Konzentrationen erhöhen. Einschließlich der guten Lösungseigenschaften von reinem BIP weisen die Ergebnisse auf eine Verteilung des Farbstoffes innerhalb der kolloidalen Kompartimente der ME-BIP. Nachfolgend wird die 0,5 %ige (m/m) curcuminhaltige Mikroemulsion als ME-BIP^[Curc] bezeichnet, die ebenso konzentrierte Basiscreme als BC^[Curc].

3.6.2 Ergebnisse

Penetrationsprofile

Dem ersten Probanden wurde eine Stunde nach Applikation der Formulierungen ($2 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}$) die Hornschicht vollständig mit 80 *Tape Strips* entfernt. Abbildung 32 zeigt die resultierenden Tiefenprofile des transepidermal penetrierten Curcumins. Als Bezugsgrößen dienen dabei zum einen die fortlaufende Nummer der Abrisse sowie die über die Pseudoabsorption der anhaftenden Korneozyten bestimmte relative Dicke des Stratum corneum. Bei Applikation der Basiscreme (b) befand sich der größte Anteil des Curcumins auf der vom ersten Abriss repräsentierten Hautoberfläche, die auch die nicht-penetrierten Vehikelrückstände umfasste. Mit der Tiefe wurde der Farbstoff in deutlich abnehmenden Konzentrationen bis hin zum letzten Abriss detektiert. Im Gegensatz dazu hinterließ die Auftragung der ME-BIP^[Curc] geringere Curcuminmengen auf der Oberfläche (a). Bis zu einer relativen Stratum-corneum-Tiefe von ca. 80 % konnte die Modellsubstanz in sinkenden Quantitäten nachgewiesen werden. Danach kam es zur Unterschreitung der Bestimmungsgrenze von $0,02 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.

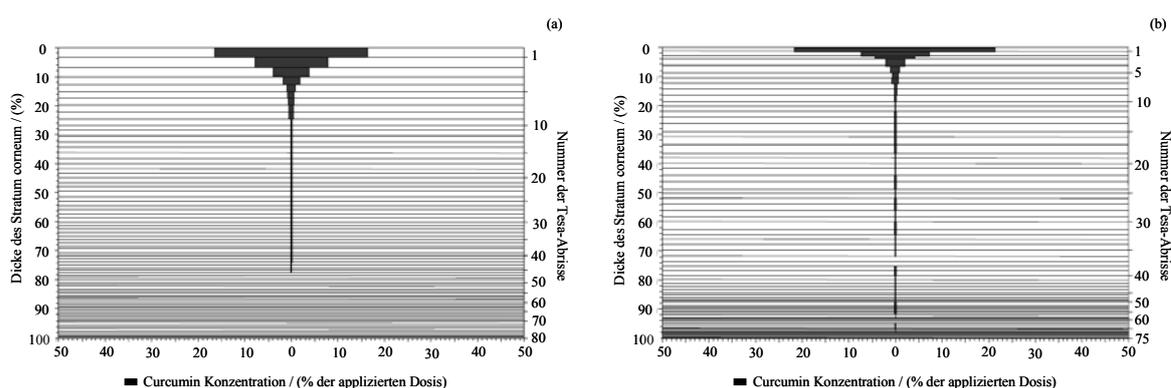


Abbildung 32: Penetrationsprofil von Curcumin appliziert über ME-BIP^[Curc] (a) und BC^[Curc] (b) durch das gesamte Stratum corneum nach Abnahme von 80 Abrissen 1 h nach Auftragung (Proband 1, nach [192]).

In den nachfolgenden Experimenten beschränkte sich die Abnahme des Stratum corneum auf 20 Abrisse, da sie bei Proband 1 den Hauptanteil des Curcumins enthielten. Es resultierte bei allen Probanden ein ähnliches Verteilungsmuster: deutlich höhere Curcuminmengen bezogen auf die applizierte Dosis befanden sich auf dem ersten Tape bei Applikation der Basiscreme

verglichen mit Mikroemulsion. Gleichzeitig haftete signifikant mehr Stratum corneum an diesem Abriss, wenn ME-BIP^[Curc] aufgetragen wurde. Dies ging aus der Pseudoabsorption der Korneozyten hervor, mit der auch festgestellt werden konnte, dass durch die 20 Abrisse im Fall der Basiscreme insgesamt weniger Stratum corneum entfernt wurde als bei Auftragung der Mikroemulsion. Die genannten Parameter sind in Tabelle 13 zusammengestellt. Sie sprechen für ein generell schnelleres Eindringen der Mikroemulsion in die Haut verglichen mit dem Standardvehikel, da Formulierungsrückstände auf der Oberfläche zu einer geringeren Adhäsivität des Tesa[®]-Films führen, und im Speziellen für eine deutlich effektivere Penetration des Curcumins aus ME-BIP^[Curc].

Tabelle 13: Parameter zum Vergleich der Penetration von Curcumin in Stratum corneum in vivo (MW ± SD, n = 6).

Parameter	ME-BIP ^[Curc]	BC ^[Curc]
Curcumin auf dem ersten Abriss / (% der applizierten Dosis)	26,5 ± 3,9	36,5 ± 11,1
Pseudoabsorption der Korneozyten auf dem ersten Abriss	0,080 ± 0,029*	0,040 ± 0,012
Anteil des mit 20 Abrissen abgenommenen Stratum corneum bezogen auf dessen gesamte Tiefe / (%)	57,2 ± 10,1*	38,2 ± 9,6

* p < 0,05 gegenüber BC^[Curc]

Neben dem Penetrationsverhalten von Curcumin ist vergleichend auch das der lipophilen Mikroemulsionskomponente BIP von Interesse. Bei sechs Probanden wurden deshalb ebenfalls eine Stunde nach Applikation der ME-BIP^[Curc] jeweils zehn Tesa[®]-Abrisse abgenommen, in denen die Quantifizierung beider Bestandteile erfolgte. Im Vordergrund stand der Vergleich innerhalb einzelner Abrisse, so dass die an ihnen haftenden Stratum-corneum-Anteile vernachlässigt wurden. Weiterhin wird nicht zwischen IP und BP unterschieden, sondern von deren Summe (ausgedrückt als BIP) gesprochen, da sich das Verhältnis von BP zu IP in den Abrissen gegenüber dem in reinem BIP kaum änderte. Abbildung 33a zeigt die Verhältnisse der Konzentrationen von BIP zu Curcumin für jeden Abriss. Sie nahmen zunächst deutlich ab, insbesondere von Tape 1 zu Tape 2, und variierten ab Tape 4 meist nur noch geringfügig. Das ursprünglich in ME-BIP^[Curc] bestehende Konzentrationsverhältnis von 10:1, im Diagramm als gestrichelte Linie angedeutet, war kaum zu finden. Abriss Nr. 1, der auch die nicht penetrierten Anteile beinhaltet, zeigt durch seinen hohen Wert an, dass relativ mehr Curcumin in tiefere Hornhautschichten eingedrungen ist als BIP. Dies verdeutlicht auch Abbildung 33b. Ca. 60 % des aufgetragenen BIP und nur ca. 25 % des Curcumins befanden sich in oberflächlichen Schichten des Stratum corneum bzw. gänzlich außerhalb. In der Summe der nachfolgenden Abrisse (2-10) wurden hingegen gleiche Anteile der applizierten Dosen von beiden Komponenten festgestellt. Das entspricht den Ergebnissen der In-vitro-Studie. Im Kurzzeitversuch bei 30 min waren dort ebenfalls keine Unterschiede zwischen den relativen Mengen von Modellwirkstoff und BIP in der (jedoch vollständigen)

Epidermis auszumachen. Aufgeschlüsselt in die einzelnen Tapes zeigt sich allerdings, dass es mit der Tiefe Verschiebungen hin zu geringeren BIP/Curcumin-Verhältnissen gab.

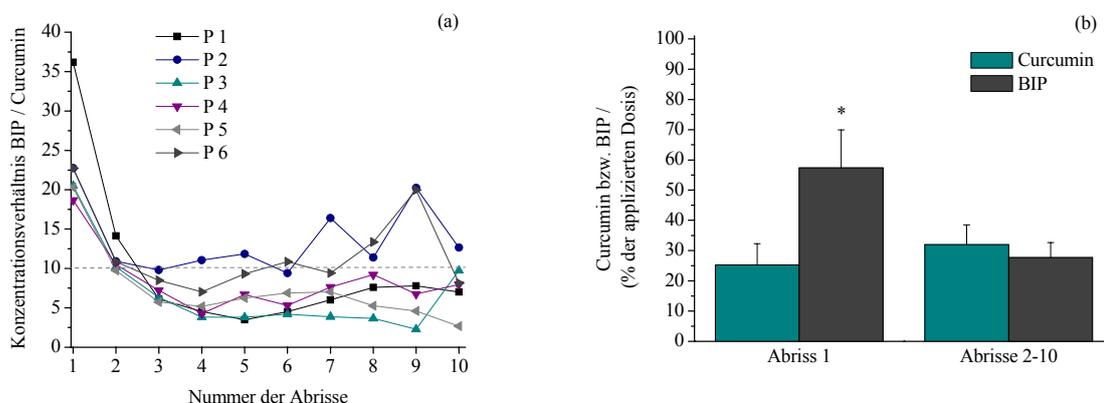


Abbildung 33: (a) Konzentrationsverhältnis von BIP zu Curcumin in den ersten zehn Abrissen von sechs Probanden P (Nr. 6-11) abgenommen 1 h nach Applikation von ME-BIP^[Curc]. Die gestrichelte Linie zeigt das in ME-BIP vorliegende Konzentrationsverhältnis von 10:1 an. (b) Anteil von Curcumin und BIP an der applizierten Dosis in Abriss 1 sowie den Abrissen 2-10 (MW ± SD, n = 6, * p < 0,01 gegenüber Curcumin).

Die Ergebnisse schließen eine gemeinsame Penetration von Curcumin und BIP in das Stratum corneum nicht aus, jedoch bleibt das ursprüngliche Verhältnis nicht bestehen, sondern es erreichen unterschiedliche Anteile der Komponenten die Haut. Da sich die Applikationsflächen in der Unterarmregion der Probanden befanden, ist eine folliculäre Beteiligung hier von untergeordneter Bedeutung [11].

Verteilung von Curcumin in Stratum corneum und Haarfollikeln

Das zur Applikation eines Wirkstoffes gewählte Vehikel kann die Penetrationsroute beeinflussen [184]. Hinweise über die des Curcumins kann die Visualisierung seiner Verteilung in der Hornschicht sowie in Haarfollikeln mit Hilfe von LSM-Aufnahmen verschiedenartiger Abrisse geben. Abbildung 34 zeigt Bilder der jeweils ersten Tesa[®]-Abrisse nach Applikation der curcuminhaltigen Vehikel. Bei Auftragung von ME-BIP^[Curc] war der Farbstoff eher um die Korneozyten herum lokalisiert (a), während das Fluoreszenzsignal bei Basiscreme im Wesentlichen gleichmäßig über das gesamte zelluläre Gebiet verteilt auftrat (b). Im Fall der ME-BIP^[Curc] sprechen die Beobachtungen für eine Verteilung und Akkumulation der Modellsubstanz in den Lipidschichten des Stratum corneum, ähnlich wie bei Auftragung von curcuminhaltigem Paraffin [184]. Die interzelluläre Route, die allgemein als Hauptpenetrationsweg für topisch applizierte Substanzen angesehen wird [14], ging auch speziell für Curcumin als dominierend aus der zitierten Untersuchung hervor, was sich hier bestätigte. Gleichwohl zeigte sich in [184] bei Applikation der Substanz in einer herkömmlichen O/W-Emulsion ebenso wie bei BC^[Curc] eher eine Assoziation von Curcumin mit den Korneozyten als eine Anreicherung in den Lipidschichten.

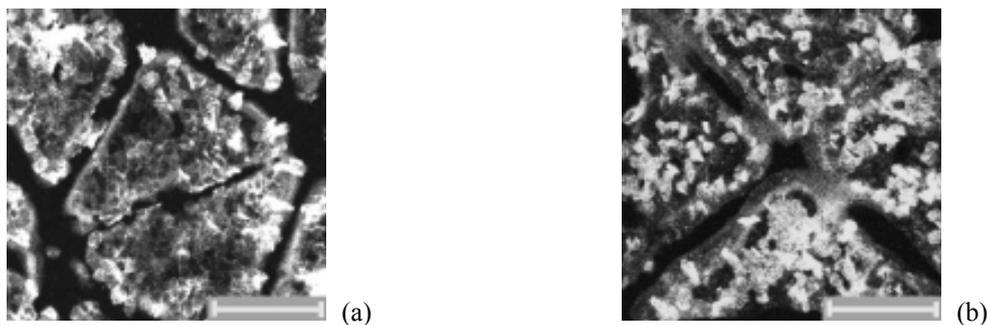


Abbildung 34: LSM-Bilder der ersten Abrisse nach Applikation von ME-BIP^[Curc] (a) bzw. BC^[Curc] (b) bei Proband 1 (Balken entspricht 40 µm) [192].

Cyanoacrylatabrisse geben einen Abdruck der Hautoberfläche wieder. Neben dem Stratum corneum wird auch der Inhalt der Haartrichter samt dem Haar selbst entfernt [24, 183]. Auf diese Weise kann für Curcumin eine folliculäre Beteiligung an der Penetration sichtbar gemacht werden. Abbildung 35 zeigt die Ergebnisse für beide Formulierungen. Nach Auftragung der ME-BIP^[Curc] befand sich der Farbstoff sowohl in den Furchen der Haut als auch im kompletten folliculären Trichter (a, b). Die Furchen können dem flüssigen Vehikel dabei als Kanälchen dienen, die zu den Follikelöffnungen hin führen. Mit Hilfe der Basiscreme appliziert, wurde Curcumin zwar auch in den Furchen, weiterhin jedoch nur in den oberen Follikelöffnungen und nicht in tieferen Arealen detektiert (c, d).

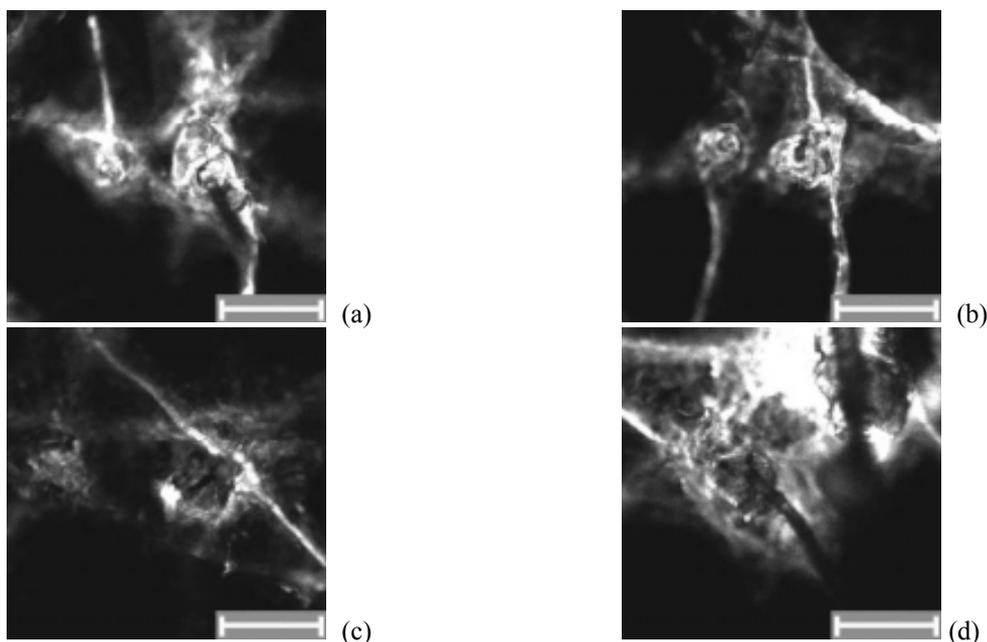


Abbildung 35: LSM-Bilder von Cyanoacrylatabrissen nach Applikation von ME-BIP^[Curc] (a, b) und BC^[Curc] (c, d) bei Proband 3 (Balken entspricht 100 µm) [192].

Im Gegensatz zur Basiscreme weisen die Ergebnisse der Mikroemulsion auf eine Beteiligung der Follikel an der Penetration hin. Dies entspricht den Befunden der In-vitro-Versuche in Kapitel 3.5, für die zumindest im Fall von IP und BP die folliculäre Route belegt werden konnte. Außerdem wird die These von JACOBI et al. bestätigt, dass die Art der Formulierung die Penetrationswege eines Wirkstoffes beeinflusst [184].

3.6.3 Zusammenfassung: In-vivo-Untersuchungen

Aus der In-vivo-Studie ging eine deutlich effektivere Penetration des Modellwirkstoffes Curcumin bei Applikation der Mikroemulsion ME-BIP als der Basiscreme hervor. Dies zeigte vor allem der Vergleich der Anteile an Curcumin in den oberflächlichen Schichten des Stratum corneum. Gleichzeitig war bei Verwendung der ME-BIP^[Curc] ein tieferer Anteil der Hornhaut über die abgenommenen 20 Abrisse zugänglich. Die lipophile Komponente der Mikroemulsion, BIP, penetrierte ebenfalls, auf die applizierte Dosis bezogen jedoch in geringerem Ausmaß als Curcumin. Dies bestätigt, dass sich die Formulierung bereits auf der Hautoberfläche in ihrer Zusammensetzung verändert. Gleichwohl können die Komponenten gegenseitig positiven Einfluss auf ihre Penetration nehmen. LSM-Aufnahmen zeigten, dass Curcumin die interzelluläre Route zur Passage des intakten Stratum corneum nutzt. Im Fall der Mikroemulsion spielt überdies die Beteiligung der Follikel eine Rolle. Im Gegensatz zur Basiscreme konnte Curcumin, appliziert über ME-BIP^[Curc], nicht nur in deren Öffnungen, sondern auch im Inneren nachgewiesen werden. Weitere Hinweise könnten In-vivo-Untersuchungen mit Hilfe des *Differential Stripping* ergeben, einer Methode, die von TEICHMANN et al. etabliert wurde [171]. Indem zunächst die Hornschicht via *Tape Stripping* und anschließend die Follikelinhalte durch einen Cyanoacrylatabriss abgenommen werden, kann quantitativ zwischen transepidermalem und transfollikulärem Penetrationsweg unterschieden werden. Ausgehend davon, dass die Follikel im Fall der Mikroemulsion kein Depot, sondern vielmehr eine abgekürzte Route durch Epidermis und Dermis darstellen, erscheint parallel die Bestimmung von Plasmaspiegeln sinnvoll, idealerweise im Vergleich zu einer Formulierung mit ähnlichen Inhaltsstoffen.

3.7 Zusammenfassung: Struktur- und Penetrationsuntersuchungen

Das zurückliegende Kapitel befasste sich zunächst ausführlich mit der Charakterisierung der makroskopischen und (sub-)mikroskopischen Eigenschaften der zur dermalen Anwendung vorgesehenen Mikroemulsion ME-BIP. Mit Hilfe verschiedener Verfahren konnte das System für optisch isotrop, niedrigviskos, strukturiert und wasserkontinuierlich befunden werden. Das Vorliegen sphärischer Assoziate im kolloidalen Größenbereich (15-20 nm im Durchmesser) mit einer lipophilen „Pseudophase“, repräsentiert durch BIP, legt geschwollene Mizellen als submikroskopische Struktur nahe. Am Aufbau aller Kompartimente ist Propylenglycol beteiligt. Es fungiert als Cotensid und besitzt darüber hinaus Bulkeffekte. Gemeinsam mit den nicht an der Hydratisierung der Tensidkopfgruppen beteiligten Wassermolekülen liegt es in freibeweglicher Form in den kontinuierlichen Bereichen des Systems vor. Das Vorhandensein freien Wassers erfüllt gleichzeitig eine Voraussetzung für gute Penetrationseigenschaften des Vehikels.

Beginnend mit künstlichen Lipidmembranen über isoliertes humanes Stratum corneum, Haut vom Schweineohr und schließlich in vivo an Probanden wurden der transepidermale sowie der follikuläre Weg mehrerer Mikroemulsionskomponenten studiert, um Hinweise auf Faktoren zu erhalten, die das Potenzial der kolloidalen Vehikel bei topischer Applikation ausmachen.

Die Untersuchungen an Stratum corneum, durchgeführt an einer Diffusionszelle mit FTIR-ATR-spektroskopischer Detektion, belegten die Penetration von BIP, Propylenglycol, Wasser und dem Modellwirkstoff Metronidazol. Damit konnten, bis auf die Tenside, alle Bestandteile des Vehikels nicht-invasiv erfasst werden, und es zeigte sich ein deutlicher Einfluss der Formulierung auf die qualitativen und quantitativen Konzentrations-Zeit-Verläufe. Verglichen mit der vehikelunabhängigen passiven Diffusion verlief die Penetration des BIP, als kolloidal verteilte „Pseudophase“ der Mikroemulsion vorliegend, in signifikant erhöhtem Ausmaß. Darüber hinaus nahm der Modellwirkstoff einen dem BIP identischen Verlauf. Aufgrund der dynamischen Mikrostruktur ist die kolloidale „Pseudophase“ offenbar in der Lage, selbst effektiv (entlang der unpolaren Route) zu penetrieren und gleichzeitig die Penetration des Wirkstoffes maßgeblich zu beeinflussen. Propylenglycol zeigte bei Applikation über die Mikroemulsion gegenüber der einfachen passiven Diffusion Einschränkungen in der Penetrationseffizienz, die mit seiner Beteiligung am Aufbau der Grenzflächen und der damit verbundenen, verminderten Mobilität einhergehen könnten. Es penetrierte gemeinsam mit Wasser, vermutlich entlang der polaren Route. Das Eindringen aller Mikroemulsionskomponenten in das Stratum corneum verursacht mit der Zeit eine Veränderung der Barriere hinsichtlich Verteilungseigenschaften und Aufnahmekapazität, die sich im weiteren Verlauf ebenfalls penetrationsfördernd auswirkt.

Generell gilt, dass die Mikroemulsion an sich ihre ursprüngliche quantitative Zusammensetzung beim Eindringen in das Stratum corneum verändert. Auch die unterschiedlichen Penetrationsrouten der Komponenten sprechen für ein Aufbrechen der Mikrostruktur. Beim Übergang in tiefere Hautschichten gewinnen, neben den mikrostrukturell bedingten und solubilisierungsfördernden Faktoren, physikochemische Parameter der einzelnen Substanzen größeren Einfluss.

Abgesehen von den Details zum transepidermalen Weg konnte auch die follikuläre Beteiligung an der (trans-)dermalen Penetration im Sinne einer abgekürzten Route gezeigt werden. Deren Ausmaß ist durch die Follikeldichte am Applikationsareal limitiert, kann jedoch einen wichtigen Beitrag zu einem schnellen Wirkungseintritt sowie zur transdermalen Absorption leisten.

In-vivo-Untersuchungen bestätigten schließlich durch einen Vergleich der Mikroemulsion mit einer halbfesten Creme die Effizienz der Penetration durch das kolloidale Vehikel. Außerdem konnten die Stratum-corneum-Passage über die interzelluläre Route sowie die Beteiligung der Follikel visualisiert werden.

Insgesamt ist es gelungen, mit den erzielten Ergebnissen den in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Kenntnisstand zum Penetrationsverhalten von Mikroemulsionen zu konkretisieren und zu erweitern.

4 Modulation von Freisetzung und Penetration des Modellarzneistoffes Dihydroavenanthramid D

4.1 Motivation und Zielstellung

Die Auswahl einer geeigneten Formulierung für die dermale Applikation eines Arzneistoffes hängt von verschiedenen Faktoren ab. Physikochemische Eigenschaften des Wirkstoffes selbst, Lokalisation der pharmakologischen Targetstrukturen in der Haut bzw. im systemischen Kreislauf, bekannte Enhancerwirkung bestimmter Vehikel oder einzelner Inhaltsstoffe sowie das Hautareal und der Hautzustand spielen dabei eine Rolle.

Im Folgenden wurde untersucht, wie die Anreicherung einer Substanz in verschiedenen Hautschichten durch die Auswahl von Vehikel und Hilfsstoffen beeinflusst werden kann.

Mit Wasserhaltiger Hydrophiler Salbe (WHS) und Wasserhaltiger Wollwachsalkoholsalbe (WWAS) kamen zunächst konventionelle Vehikel des DAB zum Einsatz [193]. Es ist bekannt, dass deren Effektivität im dermalen und besonders im transdermalen Wirkungsbereich häufig begrenzt ist [97, 129]. Um das Penetrationsvermögen einer Formulierung zu erhöhen, können Enhancer zugefügt werden. In der Praxis sind das oft Alkohole bzw. Glycole, von denen Propylenglycol der am häufigsten verwendete Vertreter ist. Für einige Wirkstoffe dient es gleichzeitig als Cosolvens [136, 194]. Daneben stehen für eine dermale Anwendung weitere vicinale Dirole zur Verfügung, die aufgrund ihrer höheren Amphiphilie die Solubilisierung von schwer wasserlöslichen Substanzen stärker vermitteln und damit deren Penetrationsvermögen verbessern könnten. Überdies werden höheren 1,2-Alkandiolen weitere technologisch wertvolle Eigenschaften zugeschrieben. So kann z.B. 1,2-Pentylenglycol als Moisturizer eingesetzt werden und besitzt antimikrobielle Aktivität [195]. Nachfolgend wurde den genannten Grundlagen neben Propylenglycol 1,2-Butylenglycol (BuG), 1,2-Pentylenglycol (PeG) bzw. eine 1:1 Mischung der beiden letztgenannten Glycole (BuG/PeG) zugesetzt, um deren Einfluss auf Freisetzung und Penetration eines Modellwirkstoffes zu untersuchen (Kapitel 4.3). In den Vergleich wurde ein modernes glycolhaltiges Hydrodispersionsgel (HDG) einbezogen [196].

Darüber hinaus wurden Mikroemulsionen mit den verschiedenen Glycolen als innovative kolloidale Arzneiformen entwickelt, physikochemisch charakterisiert und bezüglich ihrer Penetrationswirkung getestet (Kapitel 4.4).

4.2 Der Modellarzneistoff Dihydroavenanthramid D

4.2.1 Pharmakologie

Dihydroavenanthramid D (DHA_vD, 2-[[3-(4-Hydroxyphenyl)-1-oxopropyl]amino]benzoesäure, Abbildung 36) ist ein stabiles synthetisches Analogon zu den in Hafer vorkommenden phenolischen Anthranilsäureamiden, den Avenanthramiden. Strukturell besteht große Ähnlichkeit zu Tranilast (2-[[3-(3,4-Dimethoxyphenyl)prop-2-enoyl]amino]benzoesäure). Tranilast ist ein Arzneistoff mit antiallergischen, antiphlogistischen und analgetischen Eigenschaften, der neben oraler Applikation bei Asthma und Arthritis [197] auch in der topischen Behandlung von Hauterkrankungen wie Keloiden [198] sowie am Auge bei Hornhauttrübungen [199] wirksam ist. DHA_vD selbst ist in der Lage, Histamin-vermittelte Hauterscheinungen wie Juckreiz, Rötung und Quaddelbildung positiv zu beeinflussen [200, 201] und wird als „*active ingredient*“ in kosmetischen Produkten eingesetzt. Auch andere Anthranilsäurederivate werden pharmazeutisch genutzt, so zum Beispiel die auch bei topischer Applikation antiphlogistisch und analgetisch wirksame Flufenaminsäure [202].

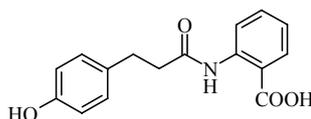


Abbildung 36: Chemische Struktur von Dihydroavenanthramid D.

4.2.2 Physikochemische Eigenschaften

DHA_vD ($M = 285,3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) besitzt zwei pK_a -Werte. Der von der Carboxylgruppe stammende pK_{a1} liegt bei ca. 3,5 [102]. Die phenolische OH-Gruppe ist für pK_{a2} von ca. 10 verantwortlich. LogP wurde mit $3,34 \pm 0,27$ berechnet [102].

Zur physikochemischen Charakterisierung von DHA_vD erfolgte die Bestimmung der Sättigungslöslichkeiten in verschiedenen Medien (Tabelle 14) sowie der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten bei verschiedenen pH-Werten (Tabelle 15) entsprechend der Bedingungen in den später eingesetzten Formulierungen.

Aus Tabelle 14 geht eine deutliche pH-Abhängigkeit der Löslichkeit in Wasser hervor, die mit dem Grad der (De-)Protonierung der Carbonsäuregruppe in Zusammenhang steht. Neben dem physiologischen pH von 7,4 wurde pH 6,1 gewählt, da dieser die Makroumgebung des Modellwirkstoffes in einer der nachfolgend verwendeten Formulierungen (HDG) repräsentiert. Es findet sich eine Verminderung der Löslichkeit um Faktor 10. Erniedrigt man den pH-Wert weiter auf 4,5, wird DHA_vD praktisch wasserunlöslich ($< 10^{-4} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Glycole werden häufig als Cosolvenzien in pharmazeutischen Zubereitungen eingesetzt, so dass die Aufnahmekapazität für DHA_vD auch in PrG, PeG, BuG sowie der 1:1 Mischung von 1,2-Butylen- und 1,2-Pentylenglycol getestet wurde. DHA_vD ist in den lipophileren Glycolderivaten etwa 1,5fach so gut löslich wie in PrG. Interessanterweise bestand kein

Unterschied zwischen PeG und BuG, wohl aber löste sich signifikant mehr DHA_vD in der Mischung der beiden Substanzen ($p < 0,01$). Dies könnte auf ein optimiertes Arrangement infolge der unterschiedlichen Kettenlängen der Glycolmoleküle, die DHA_vD solubilisieren, zurückzuführen sein.

Um die Verteilung von DHA_vD in den verwendeten halbfesten Formulierungen WHS und WWAS abzuschätzen, war dessen Löslichkeit auch in der lipophilen Komponente beider Cremes, dem Vaseline, von Interesse. Aufgrund der hohen Viskosität von Vaseline wurde jedoch dünnflüssiges Paraffin eingesetzt, welches sich durch die gleiche Polarität bei geringerer Viskosität auszeichnet. Hierin war DHA_vD nicht zu detektieren, was einer sehr schlechten Löslichkeit von $< 0,007 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ entspricht.

Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass sich die gelöste Fraktion des Modellwirkstoffes hauptsächlich in die wässrigen Phasen der Cremes hinein verteilt. Selbiges kann, den Ergebnissen von SCHNITTGER folgend, auch für die Glycole angenommen werden [203]. Diese können somit als Lösungsvermittler fungieren, was insbesondere bei ungünstigen pH-Werten von Vorteil ist.

Tabelle 14: Löslichkeit von DHA_vD in verschiedenen Medien (MW ± SD, n = 3).

Medium	$c_s / (\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$
Puffer pH 4,5	< LOQ (0,0001)
Puffer pH 6,1	1,40 ± 0,03
Puffer pH 7,4	12,46 ± 0,29
PrG	28,86 ± 0,69
BuG	45,99 ± 1,07
PeG	45,79 ± 0,67
BuG/PeG 1:1 (m/m)	53,73 ± 1,08
BIP	15,04 ± 0,41
Dodecanol/Octanol 90/10	11,37 ± 0,11
Dünnflüssiges Paraffin	< LOQ (0,007)

SURBER et al. stellten eine Korrelation von Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten mit denen von menschlichem Stratum corneum und Wasser fest [155]. Der pH-Gradient in Humanhaut verläuft von ca. 5,5 an der Oberfläche des Stratum corneum nach 7,4 in epidermalen Regionen [188]. Unter diesen Bedingungen wurden Verteilungskoeffizienten von DHA_vD bestimmt, ebenso bei pH-Werten, die für die O/W-Cremes WHS (3,1) und HDG (6,1) ermittelt wurden. Letztere sollten einen Hinweis auf die Affinität von DHA_vD bezüglich der Überwindung der Grenzfläche zwischen Formulierung und einer lipophilen Barriere geben. Diese Barriere sind die künstlichen Membranen des MSMM bzw. das Stratum corneum in den Penetrationsversuchen.

Bei pH 7,4 liegen im Gegensatz zu pH 5,5 mehr geladene als ungeladene DHA_vD-Moleküle vor, was die Verteilung des bereits penetrierten Anteils in die hydrophileren Schichten der

Haut fördern könnte. Vehikeffekte vernachlässigend, lässt der reine Vergleich der Verteilungskoeffizienten bei pH 3,1 und 6,1 vermuten, dass die pH-Bedingungen in WHS für eine passive Diffusion von DHA_vD günstiger sind als in HDG.

Tabelle 15: Octanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten von DHA_vD ($MW \pm SD$, $n = 3$).

pH	log D
3,1	2,98 ± 0,03
5,5	1,24 ± 0,00
6,1	0,72 ± 0,01
7,4	-0,24 ± 0,01
7,9	-0,37 ± 0,01

4.3 Untersuchungen an halbfesten Formulierungen unter Zusatz von 1,2-Alkandiolen

Als halbfeste Formulierungen kamen die O/W-Creme Wasserhaltige Hydrophile Salbe sowie die W/O-Creme Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe zum Einsatz [193]. In die Formulierungen wurde für die Liberationsstudien jeweils 0,1 % DHA_vD eingearbeitet. Außerdem erfolgten Modifizierungen durch den Zusatz der Glycole in 2 %iger Konzentration. Die Art der Glycole spiegelt sich in der Bezeichnung der Cremes wider, z.B. PrG-WHS oder BuG/PeG-WWAS.

Das aus technologischer und kosmetischer Sicht optimierte Hydrodispersionsgel (HDG) wurde als Referenzvehikel in die Untersuchungen einbezogen. Die Stabilisierung der emulsionsartigen Struktur erfolgt hier hauptsächlich über ein oberflächenmodifiziertes, quervernetztes Polymer. Bei Kontakt mit dem elektrolythaltigen Milieu der Hautoberfläche kommt es zu einer Phasentrennung [196, 204]. Diese könnte neben einem Kühleffekt auch eine schnelle Wirkstofffreigabe zur Folge haben. HDG enthält die 1:1 Mischung aus BuG und PeG in Form des Produktes SymCalmin[®], in welchem 5 % DHA_vD gelöst sind.

4.3.1 In-vitro-Freisetzungsstudien

Mit Hilfe des MSMM lässt sich für halbfeste Formulierungen der erste Teilprozess der Arzneistoffaufnahme über die Haut, die Liberation, simulieren [132]. Nur der zuvor freigesetzte Anteil steht für die nachfolgende Penetration zur Verfügung. Es lassen sich Einflüsse von Modifizierungen der aufgetragenen Zubereitungen erkennen, was die Auswahl geeigneter Grundlagen für Penetrationsversuche erleichtert.

Zunächst sollte überprüft werden, ob der Zusatz von Glycolen generell einen Einfluss auf die Liberation von DHA_vD aus halbfesten Vehikeln ausübt und welche Rolle dabei der Emulsionstyp spielt. Dazu wurden Versuche mit WHS und WWAS durchgeführt. Die Mischung BuG/PeG wurde als Glycolzusatz gewählt, da sie die beste Löslichkeit für den Modellarzneistoff zeigte (Tabelle 14). Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 grafisch

dargestellt. Obwohl WHS und WWAS ein entgegengesetztes Phasenverhalten aufweisen, ähneln sich ihre Freisetzungsprofile. Der Zusatz von BuG/PeG führte zu einer signifikanten Steigerung der liberierten Menge um das Zwei- bis Vierfache für beide Formulierungen, wobei der Glycolinfluss bei BuG/PeG-WWAS deutlicher ausgeprägt war als bei BuG/PeG-WHS. Mit der erstgenannten Zubereitung wurden bereits nach 10 min ca. 80 % der applizierten DHAvD-Menge in den Akzeptormembranen wieder gefunden. Der Vorteil dieses Vehikels gegenüber der BuG/PeG-haltigen WHS war bei beiden Kurzzeitexperimenten (10 und 30 min) signifikant ($p < 0,01$).

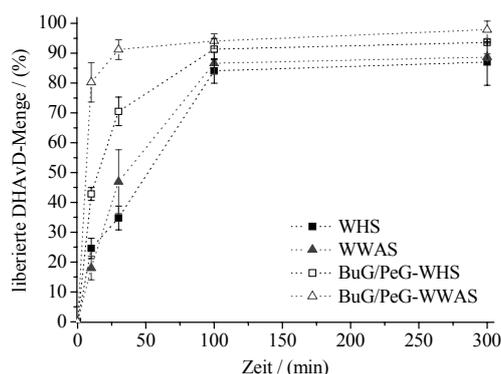


Abbildung 37: Vergleich der zeitabhängigen Liberation von DHAvD aus WHS und WWAS mit den entsprechenden BuG/PeG-haltigen Formulierungen ($MW \pm SD$, $n = 3$).

Als ein weiteres die Glycol-Mischung enthaltendes Vehikel wurde das Hydrodispersionsgel auf die Freisetzung von DHAvD hin getestet. Es zeigte ebenfalls gute, wenngleich auch nicht so hohe Liberationsraten wie BuG/PeG-WWAS. Mit 63 % nach 10 min und 83 % nach 30 min lag es zwischen den Ergebnissen der glycolhaltigen Cremes. Zur Verdeutlichung sind die Resultate der Kurzzeitversuche noch einmal in Tabelle 16 aufgelistet. Der höhere pH-Wert im HDG als in WHS, der zu einem für passive Diffusion ungünstigeren Verhältnis zwischen geladenen und ungeladenen DHAvD-Molekülen führte, schien für den Freisetzungsvorgang nicht entscheidend zu sein. Möglicherweise spielt hier die Phasentrennung, die für Hydrodispersionsgele u.a. bei Hauttemperatur beschrieben wird [196], eine Rolle. Nach 100 min war die Liberation für alle Formulierungen im Wesentlichen beendet und konnte als ausreichend eingeschätzt werden.

Tabelle 16: Liberation von DHAvD aus WHS, WWAS und den entsprechenden BuG/PeG-haltigen Formulierungen sowie aus HDG zu 10 und 30 min ($MW \pm SD$, $n = 3$).

	Liberierte Menge DHAvD / (%)				
	WWAS	BuG/PeG-WWAS	WHS	BuG/PeG-WHS	HDG
10 min	17,99 ± 3,95 ^a	80,26 ± 6,59	24,58 ± 3,39 ^a	42,82 ± 2,16	63,19 ± 5,22
30 min	46,92 ± 10,72 ^a	91,19 ± 3,31 ^b	34,76 ± 4,00 ^a	70,48 ± 4,81 ^c	82,95 ± 6,24 ^{b,c}

Statistische Signifikanz gegenüber allen Formulierungen innerhalb einer Versuchszeit ($p < 0,05$), außer bei identischer Indizierung.

Im Folgenden sollte evaluiert werden, ob Glycole unterschiedlicher Kettenlänge die Liberation von DHA_vD in unterschiedlichem Ausmaß fördern. Um den eventuellen Unterschieden größeren Spielraum zu geben, wurde hierfür nicht die am besten freisetzende Creme aus der vorangegangenen Versuchsreihe, sondern WHS ausgewählt. Neben 0,1 % des Modellwirkstoffes wurden entweder 2 % PrG (C₃, PrG-WHS), BuG (C₄, BuG-WHS) bzw. PeG (C₅, PeG-WHS) eingearbeitet. Jede Modifikation führte zu einer signifikanten Steigerung der in den Akzeptormembranen detektierten Mengen an DHA_vD gegenüber der glycolfreien Referenz WHS ($p < 0,05$). Nach 100 min waren die Raten für alle Zubereitungen größer als 94 %. Deshalb sind in Abbildung 38 nur die Ergebnisse der Kurzzeitversuche dargestellt.

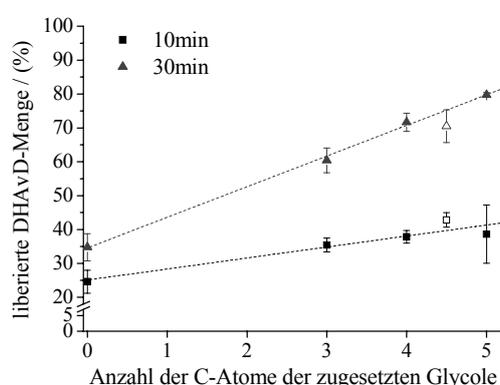


Abbildung 38: Liberation von DHA_vD aus WHS, PrG-WHS, PeG-WHS, BuG-WHS (geschlossene Symbole) sowie BuG/PeG-WHS (offene Symbole) in Abhängigkeit von der Kettenlänge der zugesetzten Glycole zu 10 und 30 min ($MW \pm SD$, $n = 3$). --- lineare Regression der Ergebnisse von WHS, PrG-WHS, PeG-WHS und BuG-WHS (10min: $y = 25,10 + 3,24 x$, $R^2 = 0,991$ und 30 min: $y = 34,57 + 9,04 x$, $R^2 = 0,999$).

Mit zunehmender Kettenlänge der Glycole stieg der liberierte DHA_vD-Anteil linear. Verglichen mit dem 10 min-Versuch ist der Anstieg der ermittelten Regressionsgerade bei 30-minütiger Inkubation etwas steiler. Die Unterschiede zwischen den Glycolzusätzen sind hier statistisch signifikant ($p < 0,05$). BuG/PeG-WHS ist bei einer formalen Anzahl an Kohlenstoffatomen der Glycolmischung von 4,5 ebenfalls in den Graphen eingefügt. Im Gegensatz zu der 30-minütigen Inkubationszeit zeigte sie nach 10 min eine leicht höhere Freisetzungsrates als von der Kettenlänge her zu erwarten gewesen wäre. Unter Einbeziehung der Standardabweichungen gliedern sich die Ergebnisse jedoch in die allgemeine Tendenz ein.

Aus Kapitel 4.2.2 ging eine Verbesserung der Löslichkeiten von DHA_vD durch Glycole hervor, so dass auch ein *Cosolvens*-Effekt in den verwendeten Cremes zu vermuten ist. Trotzdem zeigte die steigende Aufnahmekapazität der reinen Glycole nicht den gleichen linearen Verlauf wie die Liberationsraten. Eine mögliche Ursache sind die komplexeren Verhältnisse in den mehrphasigen Zubereitungen. Semiquantitative lichtmikroskopische Untersuchungen ergaben für WHS einen teilweise suspendierten Zustand von DHA_vD. Der Anteil der ungelösten Fraktion nahm mit zunehmender Kettenlänge der zugesetzten Glycole

ab. In BuG-WHS, PeG-WHS und BuG/PeG-WHS wurden keine DHA_vD-Kristalle mehr gefunden, so dass eine komplette Solubilisierung angenommen werden kann. Demzufolge steigt in der Reihenfolge WHS – PrG-WHS – BuG-WHS der Konzentrationsgradient für die solubilisierete DHA_vD-Fraktion zwischen Vehikel und Akzeptor, wodurch sich die treibende Kraft für die Diffusion erhöht. Dies erklärt allerdings nicht den Unterschied zwischen BuG-WHS und PeG-WHS bezüglich der Liberationsraten, so dass ein weiterer Mechanismus involviert sein muss. PrG ist nachweislich in der Lage, in Dodecanol-Membranen zu diffundieren (vgl. Kapitel 3.4.2, [136]). Aufgrund ihrer Mischbarkeit mit Dodecanol kann das auch für die homologen Glycole angenommen werden, was spektroskopische Untersuchungen bestätigten (nicht gezeigt). Die Affinität zu Dodecanol könnte mit zunehmender Kettenlänge infolge steigender Lipophilie zunehmen, was zu einem stärkeren *Solvent-drag*-Effekt des entsprechenden Glycols führen würde. Eine korrespondierende Verbesserung des Lösungsvermögens von Dodecanol für DHA_vD und ein damit von der Akzeptorseite her ansteigender Konzentrationsgradient spielen keine Rolle, da in jedem Fall *Sink*-Bedingungen eingehalten wurden. Obwohl die Löslichkeit von DHA_vD in BuG/PeG gegenüber den Einzelkomponenten signifikant erhöht war, konnte der Zusatz der Mischung zu WHS die Liberation nicht weiter steigern. Wahrscheinlich spiegeln sich in komplexen Vehikeln die Solubilisierungseffekte einzelner Komponenten nicht in gleichem Maße wider, so dass auch der *Solvent-drag*-Effekt begrenzt ist.

4.3.2 Ex-vivo-Penetrationstudien

Die Penetration von DHA_vD wurde mit Hilfe von FRANZ-Diffusionszellen getestet. Aufgrund limitierter Verfügbarkeit von Humanhaut wurden drei Formulierungen ausgewählt. Mit HDG, WHS und BuG/PeG-WHS konnte zum einen der Einfluss der Glycole auf das Penetrationsverhalten von DHA_vD durch einen Vergleich von WHS mit BuG/PeG-WHS untersucht werden. Zum anderen war durch Gegenüberstellung von BuG/PeG-WHS und HDG der Effekt des Stabilisierungsprinzips der beiden glycolhaltigen O/W-Vehikel erfassbar. Auch für eine kosmetische Anwendung von DHA_vD sind O/W-Formulierungen relevanter, da der bei Applikation auftretende Kühleffekt die juckreizlindernde Wirkung der Substanz unterstützen kann.

Aus analytischen Gründen wurden für die *Finite-dose*-Studien 0,2 % DHA_vD sowie 4 % der Glycolmischung in die Vehikel eingearbeitet. Durch die ausreichende Löslichkeit in Puffer pH 7,4 (siehe Tabelle 14) konnten formal *Sink*-Bedingungen im Akzeptor eingehalten werden. Die DHA_vD-Mengen in den verschiedenen Hautschichten (Stratum corneum, lebende Epidermis und Dermis) sowie im Akzeptor wurden nach Inkubationszeiten von 30, 300 und 1000 min bestimmt.

WHS und BuG/PeG-WHS

In Abbildung 39 sind die penetrierten und permeierten Anteile an DHA_vD nach Applikation von WHS und BuG/PeG-WHS bezogen auf die applizierte Dosis grafisch dargestellt. Bereits mit reiner WHS ließen sich mehr als 12 % DHA_vD in den lebenden Schichten von Epidermis und Dermis nach 300 min erzielen. Jedoch ist die Steigerung dieser Menge erstrebenswert, insbesondere da eine signifikante Penetrationszunahme innerhalb der relevanten Hautschichten erst bei der Langzeitinkubation von 1000 min auftrat ($p < 0,01$).

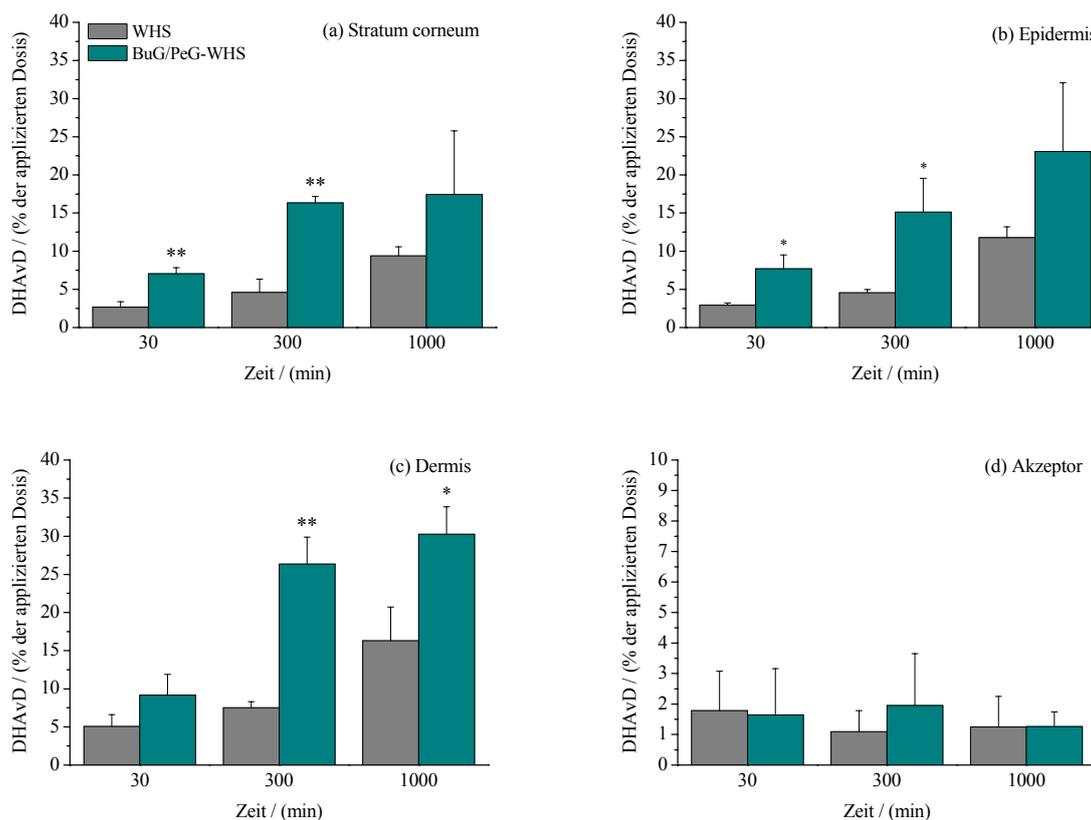


Abbildung 39: Vergleich der Penetration von DHA_vD in exzidierte Humanhaut (a: Stratum corneum, b: lebende Epidermis und c: Dermis) sowie der Permeation in den Akzeptor (d) zu verschiedenen Zeiten nach Applikation von WHS und BuG/PeG-WHS (MW ± SD, n = 3; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ gegenüber WHS).

Vergleicht man beide Formulierungen, lässt sich eine zwei- bis dreifache Erhöhung der DHA_vD-Anteile in allen Hautschichten und zu jeder Zeit konstatieren, wenn BuG/PeG-WHS aufgetragen wurde. Dies bestätigte die Voraussagen, die mit dem In-vitro-Modell getroffen wurden (Kap. 4.3.1). Von besonderer Bedeutung sind lebende Epidermis und Dermis. Hier sind die Targetstrukturen des DHA_vD lokalisiert. Der größte Unterschied zwischen WHS und BuG/PeG-WHS zugunsten Letzterer trat hier nach 300-minütiger Inkubation auf. Nur 4,5 % DHA_vD wurden in der lebenden Epidermis nach Auftragung von WHS detektiert verglichen mit 15 % unter der glycolhaltigen Creme. In gleichem Verhältnis verbesserte sich die Penetration in die Dermis. 7,5 % DHA_vD unter WHS standen 26 % unter BuG/PeG-WHS gegenüber.

Zur Verbesserung der Penetration von Arzneistoffen tragen komplexe wechselseitige Beeinflussungen struktureller und thermodynamischer Effekte bei. Zu den letztgenannten Faktoren zählen im Fall von DHA_vD dessen komplett gelöster Zustand in der glycolhaltigen WHS und der damit verbundene steilere Konzentrationsgradient. Ebenfalls penetrierende Glycolmoleküle könnten die Löslichkeit von DHA_vD in den Hautschichten verbessern, was die treibende Kraft der Diffusion durch eine erhöhte Affinität zum Akzeptor verstärken würde. Darüber hinaus kann ein *Solvent-drag*-Effekt in Betracht gezogen werden. Polyvalente Alkohole wie PrG sind in der Lage, die Mikrostruktur des Stratum corneum zu beeinflussen. Dies geschieht z.B. durch Solvatisierung von α -Keratin sowie Adsorption an hydrophile Gruppen über Wasserstoffbrücken, was die Arzneistoff/Gewebe-Bindung beeinträchtigt [17]. Auch wird eine Modifikation der unpolaren Route für die Stratum-corneum-Passage diskutiert [205]. BRINKMANN und MÜLLER-GOYMANN nahmen ihren Studien zufolge eine Anreicherung von PrG in hydrophilen Regionen der Stratum-corneum-Bilayer sowie eine Integration in lateraler Richtung zwischen den Kopfgruppen der Lipide an [206]. Diese Mechanismen könnten auch für die Penetrationsverbesserung durch höhere 1,2-Alkandiole eine Rolle spielen.

Trotz allem wurde bislang wenig zum Vergleich glycolhaltiger und -freier Vehikel hinsichtlich der Arzneistoffaufnahme in die Haut publiziert. Meist bezogen sich die Arbeiten auf den Zusatz von (größeren Mengen) PrG. Die Ergebnisse sind kontrovers und oft beschränkt auf Permeationsvorgänge. Einen Überblick gibt Tabelle 17. Lediglich DIEZ-SALEZ et al. berichteten von einem positiven Einfluss bereits nach geringgradigem Glycolzusatz. Vehikel mit 10 % PrG verbesserten die Permeation von Aciclovir um das 1,5fache gegenüber den Referenzformulierungen [207]. Die Permeationsraten für DHA_vD waren jedoch unabhängig von der WHS-Modifikation mit unter 2 % sehr gering. Die deutliche Zunahme des penetrierten Anteils bei Applikation der BuG/PeG-WHS spricht allerdings für einen starken Enhancereffekt auf den Modellwirkstoff.

Es ist zu vermuten, dass PrG weniger gut geeignet ist, den Einfluss höherer Alkandiole auf die Penetration vorauszusagen. Dies entspricht auch der Tendenz der Liberation von DHA_vD aus den glycolhaltigen Cremes (Abbildung 38). Günstigere Verteilungsverhältnisse in die Haut infolge besserer Löslichkeit in den Cremes sowie in der Haut durch Zusatz von BuG und PeG, möglicherweise auch durch deren eigene verbesserte Penetration aufgrund der höheren Lipophilie, könnten dabei von Bedeutung sein. Das würde auch erklären, warum die von MURAKAMI et al. beschriebene Zugabe von 10 % PrG zu einer ethanolischen Lösung des DHA_vD-Analogons Tranilast dessen Konzentration in Mikrodialysat gegenüber der PrG-freien Lösung nach topischer Applikation auf Rattenhaut in vivo nicht erhöhte [208]. Die Autoren konnten allerdings den in der Literatur häufig beschriebenen Enhancereffekt durch Kombination von PrG und Ölsäure beobachten.

Tabelle 17: Übersicht über In-vitro-Studien zum Einfluss eines Glycolzusatzes auf die Penetration bzw. Permeation von Arzneistoffen (EtG Ethylenglycol, k.A. keine Angabe).

Vehikel	Wirkstoff	Art und Menge des Glycols	Effekt auf Penetration bzw. Permeation gegenüber (glycol-freier) Referenzformulierung	Haut	[Lit.]
Lösung	Metronidazol	0-100 % PrG bzw. EtG	Flux ↑ mit PrG ↑ Flux ↑ mit EtG ↑	Human	[209] [159]
Lösung	Naloxon	0-100 % PrG	Flux: Maximum bei 50 bzw. 66 % PrG	Ratte	[210]
Lösung	Tamoxifen	50 % PrG	Flux unbeeinflusst	Schwein	[211]
Lösung	Tetracain	0-70 % PrG	Keine Korrelation zwischen Glycolgehalt und Flux	Maus	[212]
Lösung, Hydrogel	Aciclovir	0-70 % PrG	Permeationskoeffizient ↑ bis 50 % PrG beim Hydrogel bzw. bis 70 % PrG bei der Lösung (obwohl Löslichkeit im Vehikel ↑)	Human	[207]
Hydrogel	Betamethason-17-valerat	20-60 % PrG	mit 40 % PrG maximale Penetration in Stratum corneum und lebende Epidermis; Permeation in Dermis: unbeeinflusst	Human	[136]
Hydrogel	Diclofenac Natrium	0-60 % PrG	Flux ↓ mit PrG-Gehalt (Affinität zum Vehikel ↑)	Ratte	[213]
Hydrogel	Flufenaminsäure	25 % PrG	Penetration ↓	Human	[202]
Hydrogel	Flurbiprofen	20 % PrG	Flux unbeeinflusst, aber Arzneistoffmenge in der Haut ↓	Maus	[214]
Hydrogel	Hydrocortison	20-60 % PrG	Penetration in Stratum corneum und vitale Epidermis ↑ mit PrG-Gehalt; Permeation in Dermis: unbeeinflusst	Human	[136]
Creme	Hydrocortison	25 % PrG bzw. 1,5-Pentandiol	Penetration: mit 1,5-Pentandiol > PrG, diolfreie Referenz: k.A.; Permeation: mit PrG > PeG > diolfreie Referenz	Human	[215]
Lösung	Pyridostigminbromid	5 % BuG	Permeationskoeffizient unbeeinflusst	Human	[216]

BuG/PeG-WHS und HDG

Die Resultate des Vergleiches der BuG/PeG-haltigen Formulierungen BuG/PeG-WHS und HDG sind in Abbildung 40 dargestellt. Während sich die im Stratum corneum erzielten Konzentrationen an DHA_vD zwischen beiden Formulierungen nicht unterschieden, ergaben sich in tieferen Hautschichten zum Teil signifikante Differenzen. In diesen Bereichen war

das HDG der BuG/PeG-WHS zu jeder Inkubationszeit deutlich überlegen. Aus dem detaillierten Tiefenprofil in Abbildung 41 geht hervor, dass sich die penetrierte Menge bei HDG im Langzeitversuch (1000 min) nicht weiter erhöhte. Da sich mit BuG/PeG-WHS auch nach 1000 min nicht das Niveau des modernen Creme-Gels erreichen ließ, bleibt die Darstellung in Abbildung 40 auf die relevanten Zeiten von 30 min (a) und 300 min (b) beschränkt. Der permeierte Anteil belief sich unter Verwendung von HDG auf ähnlich niedrige Werte wie unter den klassischen Vehikeln. Er lag zwischen 2 und 3,5 % der applizierten Dosis.

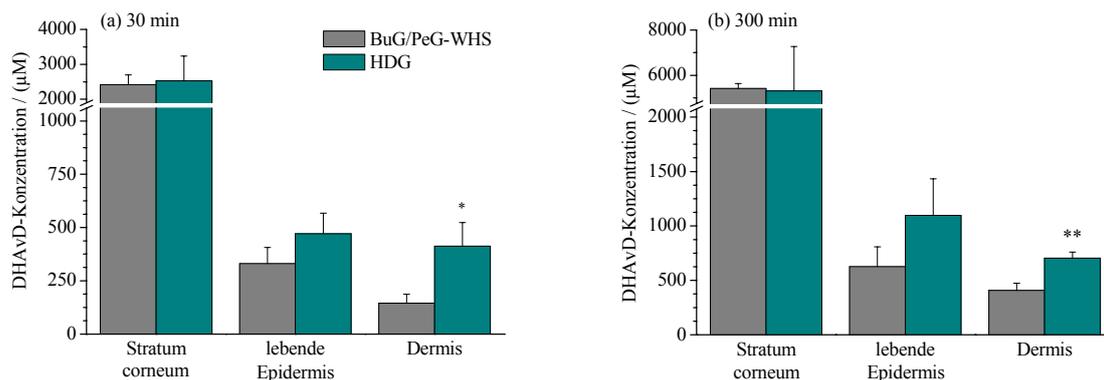


Abbildung 40: Vergleich der DHA vD-Konzentrationen in Stratum corneum, lebender Epidermis und Dermis nach Applikation von BuG/PeG-WHS und HDG nach 30 min (a) und 300 min (b) ($MW \pm SD$, $n = 3$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ gegenüber BuG/PeG-WHS).

Trotz Unterschieden in Zusammensetzung sowie submikroskopischer Struktur der Formulierungen ist in beiden Fällen eine hohe (epi-)dermale Verfügbarkeit von DHA vD zu konstatieren. Die Überlegenheit des HDG, die bereits in den Liberationsstudien auftrat, könnte auf den Zusammenbruch der Gelstruktur nach Kontakt mit elektrolythaltiger Hautoberfläche zurückzuführen sein [196]. Dieser bringt eine schnelle Freisetzung von DHA vD und möglicherweise auch der Glycole mit sich.

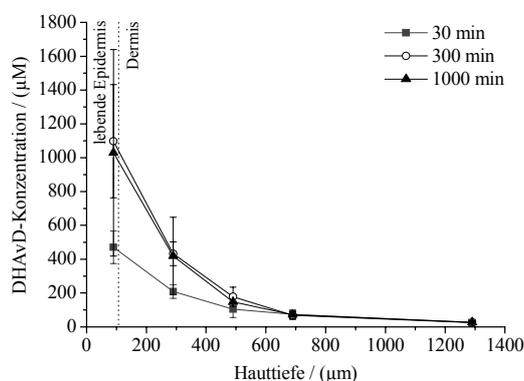


Abbildung 41: Tiefenprofil von DHA vD in den lebenden Hautschichten (lebende Epidermis und Dermis) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von HDG ($MW \pm SD$, $n = 3$).

4.3.3 Zusammenfassung: Halbfeste Formulierungen

Die Versuche zur Freisetzung von DHA_vD ergaben für alle halbfesten Vehikel, dass dieser Teilprozess die nachfolgende Penetration in die Haut nicht limitiert. Darüber hinaus ließ sich sowohl für eine klassische O/W- als auch für eine W/O-Creme eine signifikante Steigerung der Freisetzung durch Zusatz geringer Mengen 1,2-Alkandiole erreichen. Am Beispiel der WHS konnte eine Korrelation zwischen der Freisetzung des DHA_vD und der Kettenlänge der Glycole konstatiert werden. Die Beobachtungen setzten sich in den Penetrationsstudien fort. Die Zugabe einer Glycolmischung zu WHS erhöhte die Penetration von DHA_vD in alle Hautschichten deutlich. Die Ausbildung eines Depots im Stratum corneum gewährleistet dabei den Erhalt hoher (epi-)dermaler Konzentrationen für längere Zeit. Deren weitere signifikante Steigerung, bereits nach 30-minütiger Einwirkdauer, ist durch Applikation des HDG möglich. Das Ausmaß der Permeation ist bei Verwendung der halbfesten Formulierungen allerdings vernachlässigbar gering.

4.4 Mikroemulsionen zur dermalen Applikation von Dihydroavenanthramid D

4.4.1 Motivation und Zielstellung

Das Ziel der in diesem Kapitel beschriebenen Arbeiten war die Entwicklung moderner Mikroemulsionen, die dermal applizierbar sind und die Verfügbarkeit von Wirkstoffen in der Haut bzw. in der systemischen Zirkulation, untersucht am Beispiel von DHA_vD, erhöhen können.

Neben klassischen Emulgatoren wie (PEGylierten) Fettalkoholen oder Polysorbaten fanden inzwischen auch Tenside aus nachwachsenden Rohstoffen Eingang in die Entwicklung kolloidaler Arzneiträger. In den 90er Jahren wurden die umwelt- und gleichzeitig hautverträglichen Alkylpolyglycoside auf der Basis von Stärke und natürlichen Fetten eingeführt [64]. In der vorliegenden Arbeit kam nun erstmals ein pflanzliches Proteinhydrolysat-Fettsäurekondensat zur Bildung von Mikroemulsionen zum Einsatz. Es gehört zu einer Klasse milder, biologisch leicht abbaubarer, anionischer Tenside, die bereits in kosmetischen Produkten Verwendung finden und üblicherweise in Form von 30-35 %igen wässrigen Lösungen vertrieben werden.

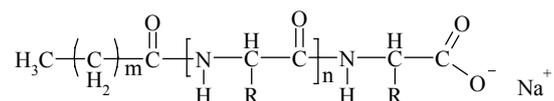


Abbildung 42: Vereinfachte chemische Struktur eines Proteinhydrolysat-Fettsäurekondensates (R = Aminosäureseitenkette).

Abbildung 42 gibt die vereinfachte chemische Struktur wieder. Sie deutet an, dass der hydrophile Molekülteil nicht eindeutig definiert ist, sondern nur eine peptidische Grundstruktur feststeht. Deren Zusammensetzung, die Aminosäuresequenz, und die resultierende

Polarität werden primär von der Art des verwendeten Proteinrohstoffes und der durch die Hydrolysebedingungen im Herstellungsprozess gesteuerten Molekülgröße bestimmt. Im finalen Kondensationsprodukt können je nach sterischer Verfügbarkeit neben dem N-terminalen Stickstoff auch nucleophile Gruppen in den Peptidseitenketten acyliert sein [217]. In dieser komplexen Struktur liegt die Hauptursache dafür, dass es kaum systematische Untersuchungen zu physikochemischen Eigenschaften solcher Tenside gibt. Sofern vorhanden, beschränken sie sich auf Aminosäurederivate [218, 219].

Das in dieser Arbeit verwendete Fabrikat (Gluadin[®] WK) ist das Acylierungsprodukt eines Weizenproteinhydrolysates mit Fettsäuren aus Kokosfett (M ca. $3000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [220]). Eine vergleichende Studie zum okulären und dermalen Irritationspotenzial bescheinigte die exzellente physiologische Verträglichkeit [221]. Literaturangaben zufolge führte der Zusatz einer geringen Menge acylierter Proteinhydrolysate zu Formulierungen, die stärker irritative Emulgatoren enthielten, zu einer überproportional verbesserten Hautverträglichkeit. Erklärt wurde dieser Effekt mit dem amphoterem Verhalten der Proteintenside, die über eine Wechselwirkung mit dem Kollagen der Haut eine Art Schutzschicht ausbilden [217]. Trotz allem liegen auch vereinzelte Berichte über allergische Reaktionen vor, die bei dem vorliegenden Tensid auf das hydrolysierte Weizenprotein zurückzuführen sind [222].

Niedermolekulare Alkohole, wie sie erfolgreich im vorangegangenen Kapitel als Penetrationsenhancer eingesetzt wurden, können in Mikroemulsionen als Cotenside fungieren. Neben ihrem Einfluss auf Krümmung, Packung und Fluidität des Grenzflächenfilmes zeigen insbesondere die kurzkettigen Alkohole auch Bulkeffekte. Das bedeutet, sie verteilen sich zwischen den Mikrokompartimenten einer Mikroemulsion und verändern somit deren relative Hydro- bzw. Lipophilie [49]. Da 1,2-Alkandiole weniger toxisch als die korrespondierenden einwertigen Alkohole sind, wurden sie von KAHLWEIT et al. für die Verwendung in Mikroemulsionen vorgeschlagen [223, 224]. Aus einer Studie ging PeG, verglichen mit PrG, als effektiveres Cosolvens hervor [224]. In Wasser bildet es selbst keine mizellaren Strukturen aus, lediglich hydrophobe Wechselwirkungen wurden nachgewiesen [225]. ALANY et al. untersuchten den Einfluss kurzkettiger Alkohole und 1,2-Diole auf das Phasenverhalten quaternärer Systeme [107]. Im Gegensatz zur Einarbeitung von 1,2-Propylenglycol, das zur Bildung eines größeren flüssigkristallinen Phasenbereiches führte, kam es bei Verwendung von 1,2-Pentylenglycol und 1,2-Hexylenglycol zu einer Störung der Packungsanordnung der Tenside, was ein größeres Mikroemulsionsgebiet zur Folge hatte.

Das nachfolgende Kapitel beschreibt die Entwicklung moderner Mikroemulsionssysteme, die auf der Verwendung von Weizenproteinhydrolysat-Fettsäurekondensat kombiniert mit verschiedenen 1,2-Alkandiolen basieren. Von Interesse war der Einfluss der Kettenlänge der Diole auf das Phasenverhalten der pseudoternären Mischungen. Ein ausgewähltes Phasengebiet wurde näher physikochemisch charakterisiert. Für eine potentielle Anwendung auf der Haut erfolgte die Auswahl zweier Rezepturen mit unterschiedlichen 1,2-Alkandiolen. Deren

Penetrationsverhalten wurde in vitro getestet und mit dem der zuvor untersuchten halbfesten Formulierungen verglichen.

4.4.2 Entwicklung und Charakterisierung des isotropen Phasengebietes

Entwicklung der Mikroemulsionen und Phasendreiecke

Zunächst wurden Mischungen von Gluadin[®] WK mit BIP als lipophiler Komponente und Wasser hergestellt. Der geringe Anteil an Aktivsubstanz im verwendeten Fertigprodukt des Tensides von 30,9 % (nach [226]) limitierte jedoch den Spielraum. Durch den Zusatz von Synperonic[®] PE/L 121, einem Poloxamer ($M \sim 4400 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, HLB 0,5 [99]), konnten die Systeme stabilisiert werden. Das Massenverhältnis von 5:1 zwischen Proteintensid und Poloxamer stellte sich dabei als günstig heraus, um isotrope Mischungen zu erhalten. Dies entsprach dem um den Wasseranteil im Gluadin[®] WK korrigierten Verhältnis der Komponenten (R_{corr}) von 1,545:1 und damit einem molaren Verhältnis von 2,3:1. Da der Zusatz eines Cotensides die Bildung von Mikroemulsionen begünstigt bzw. deren Phasengebiet vergrößern kann, wurden verschiedene 1,2-Alkandiole (PrG, BuG bzw. PeG) zugesetzt. Letztlich resultierte das Verhältnis $R_{\text{corr}} = 1,545:1:1,875$ Gluadin[®] WK : Poloxamer : Glycol, mit dem im Folgenden weiter gearbeitet wurde.

Um den Einfluss von PrG, BuG und PeG auf Lage und Größe des einphasigen, isotropen Gebietes zu untersuchen, wurden pseudoternäre Phasendiagramme erstellt (Abbildung 43). Mischungen im rechten Teil der Phasendreiecke konnten aufgrund des Wasseranteils im Gluadin[®] WK nicht getestet werden, so dass sich dieser Bereich der Auswertung entzog.

Für jedes der als Cotensid eingesetzten Glycole ergaben sich Phasengebiete mit klaren, niedrigviskosen und optisch isotropen Systemen, deren Größe sich jedoch unterschied. Wird das zur Verfügung stehende Areal des Phasendreiecks zu 100 % gesetzt, so belief sich die isotrope Region für die PrG-haltigen Systeme auf 8,8 % (Abbildung 39a), für die BuG-haltigen auf 11,4 % (Abbildung 39b) und für die PeG-haltigen auf 16,2 % (Abbildung 39c). Die Vergrößerung der Phasengebiete mit steigender Kettenlänge der Glycole bestätigt Ergebnisse von ALANY et al., die Wasser, Ethyloleat und eine nichtionische Tensidmischung mit verschiedenen Alkandiolen kombinierten [107]. Ein Grund dafür kann in der Verstärkung der oben genannten Grenzflächen- und/oder Bulkeffekte der Cotenside liegen. Flüssigkristalline Phasen wurden nicht beobachtet. Möglicherweise fehlen in den Systemen geeignete Tenside, die in der Lage sind, Fernordnungen auszubilden.

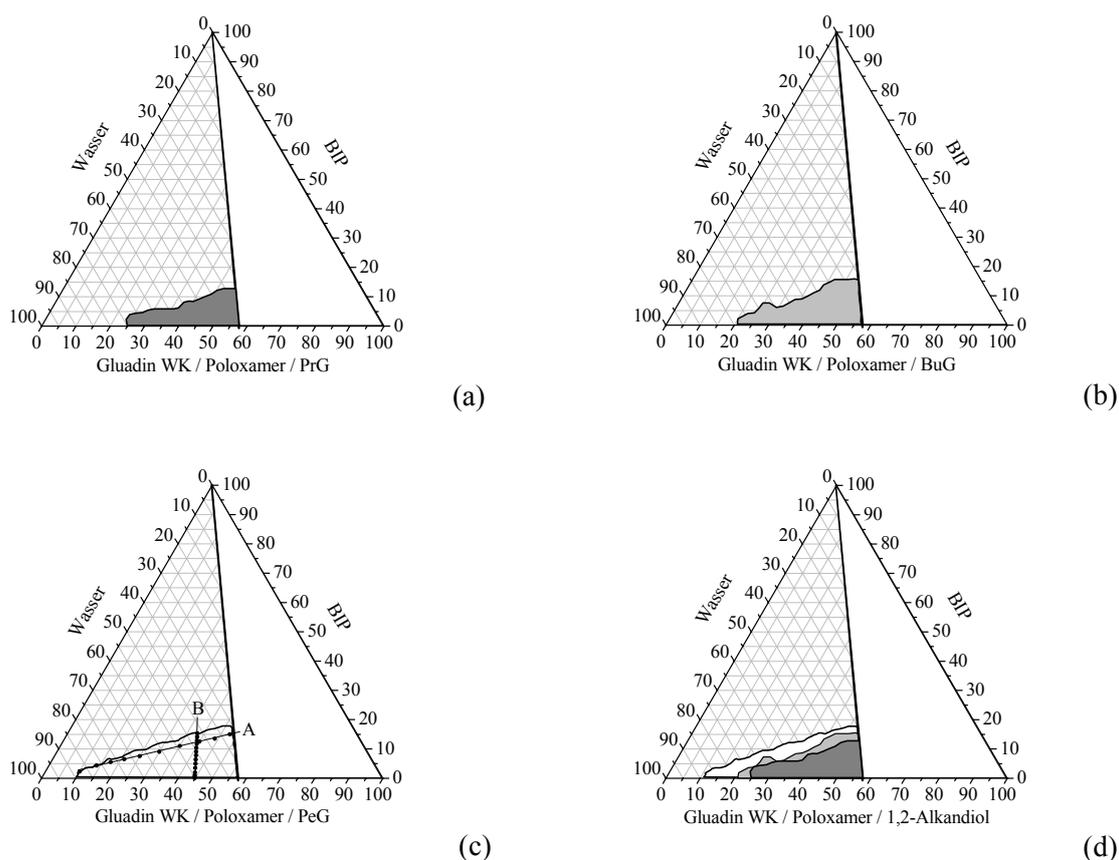


Abbildung 43: Phasendreiecke pseudoternärer Systeme, die mit unterschiedlichen Glycolen als Cotenside erstellt wurden. Die optisch isotrope Region ist farbig markiert (a) PrG (dunkelgrau), (b) BuG (hellgrau), (c) PeG (transparent/weiß) und (d) gemeinsame Darstellung. Die Linien in (c) sind Verdünnungsreihen, entlang derer eine physikochemische Charakterisierung vorgenommen wurde.

Physikochemische Charakterisierung des PeG-haltigen Phasengebietes

Das pseudoternäre System, welches die größte isotrope Region bildete, wurde zur näheren Charakterisierung ausgewählt, da es das breiteste Spektrum an stabilen kolloidalen Formulierungen lieferte.

Zunächst wurden verschiedene Systeme konstanter Tensid/BIP-Massenanteile (76,6 : 23,4) und steigenden Wassergehaltes entlang Linie A in Abbildung 43c hergestellt. Die zweite Verdünnungsreihe (Linie B) begann mit einer definierten Menge an Tensid (45 % (m/m)) und Wasser (55 % (m/m)), dem bis zum Erreichen der Phasengrenze kontinuierlich BIP zugegeben wurde. Beide Reihen wurden bezüglich der elektrischen Leitfähigkeit, Linie A darüber hinaus mittels *Differential Scanning Calorimetry* untersucht. Die genaue Zusammensetzung der Systeme ist in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Zusammensetzung der untersuchten Systeme entlang der Linien A und B im PeG-haltigen pseudo-ternären Phasendiagramm (vgl. Abbildung 43c). W – Wasser, T – Tensidmischung (Gluadin® WK: Poloxamer: PeG mit $R_{corr} = 1,545:1:1,875$), O – lipophile Komponente (BIP), der Index kennzeichnet die Linien A bzw. B.

Anteil der Komponenten / (% m/m)														
W _A	87,25	81,7	77,0	72,5	67,5	61,0	54,0	47,5	42,5	37,3				
T _A	10,00	14,0	17,5	21,0	25,0	30,0	35,0	40,0	44,0	47,7				
O _A	2,75	4,3	5,5	6,5	7,5	9,0	11,0	12,5	13,5	15,0				
W _B	55,1	54,6	54,0	53,2	52,4	51,6	50,9	50,1	49,4	48,7	48,0	47,4	46,7	46,1
T _B	44,9	44,4	44,0	43,3	42,7	42,0	41,3	40,8	40,2	39,6	39,1	38,5	38,0	37,5
O _B	0	1,0	2,0	3,5	4,9	6,4	7,8	9,1	10,4	11,7	12,9	14,1	15,3	16,4

Elektrische Leitfähigkeit

Die Bestimmung der Elektrischen Leitfähigkeit kann genutzt werden, um strukturelle Änderungen innerhalb einer Mikroemulsionsreihe zu verfolgen [105, 106, 227, 228]. So kann z.B. die beginnende Quervernetzung bereits existierender isolierter Wassertropfen bei Erhöhung der Wasserfraktion detektiert werden. An der so genannten Perkolationschwelle (ϕ_p) kommt es dabei zur Bildung stromleitender Bahnen, die in der Regel zu einem starken Anstieg der Leitfähigkeit führt [105]. Um solche Änderungen zu detektieren, müssen ausreichend Ladungsträger im System vorhanden sein, so dass häufig mit Elektrolytzugabe gearbeitet wird [106, 229]. Da das hier verwendete Proteintensid anionischen Charakter hat, ist eine ausreichende Leitfähigkeit gegeben. Allerdings geht eine Veränderung der Zusammensetzung der Systeme mit variierenden Tensidfraktionen und damit mit einer Änderung der Anzahl an Ladungsträgern einher. Um dies auszugleichen, wurden die Rohdaten korrigiert, indem der Quotient aus elektrischer Leitfähigkeit κ und Tensidfraktion (ϕ_s) gebildet wurde. Der resultierende Parameter wurde mit κ' bezeichnet.

Entlang Linie A beliefen sich die unkorrigierten Werte der Leitfähigkeit auf 1-8 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. Die Auftragung von κ' gegen die Wasserfraktion ϕ_w , dargestellt in Abbildung 44a, ergab einen exponentiellen Anstieg, jedoch keinen die Perkolationschwelle repräsentierenden Wendepunkt. Ein etwas empfindlicherer Ansatz ist die Darstellung der 1. Ableitung von κ' ($d \log \kappa' / d\phi_w$) gegen die Wasserfraktion [230]. Hier zeigt das Auftreten eines Maximums die beginnende Quervernetzung an. Eine solche Tendenz ist im Inset der Abbildung 44a zu erkennen, jedoch konnte sie nicht verifiziert werden, da sich aufgrund des Wasseranteils in Gluadin® WK keine Systeme mit einer Wasserfraktion $< 0,373$ herstellen ließen (siehe Abbildung 43).

Die Leitfähigkeitsmessungen wurden nach zweimonatiger Lagerung bei Raumtemperatur mit den gleichen Ergebnissen wiederholt. Dies wurde als ein Hinweis auf die Stabilität der Systeme gewertet. Auch organoleptisch waren keine Veränderungen erkennbar.

Innerhalb der Verdünnungsreihe B sank die elektrische Leitfähigkeit von 10,2 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ auf 6,7 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. Die Korrektur bezüglich der Anzahl der Ladungsträger resultierte in einer

geringfügigen Abnahme von κ' von 2,28 auf 1,81 (Abbildung 44b), was auf die Erhöhung der lipophilen Fraktion zurückzuführen sein kann. Erwartungsgemäß trat keine grundlegende Änderung des submikroskopischen Aufbaus ein.

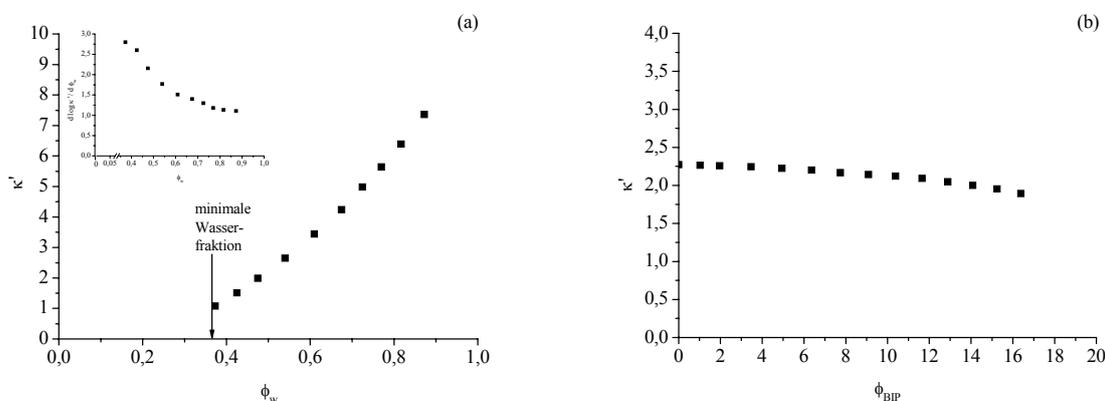


Abbildung 44: Korrigierte elektrische Leitfähigkeit κ' als Funktion der Wasserfraktion ϕ_w in den isotropen Systemen entlang Linie A, Inset: $d \log \kappa' / d \phi_w$ gegen ϕ_w . (a) sowie als Funktion der BIP-Fraktion ϕ_{BIP} entlang Linie B (b) (vgl. Abbildung 43c, Tabelle 18).

Anhand der hohen Leitfähigkeitswerte im $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ -Bereich und unter Berücksichtigung der Anteile an hydrophilen Komponenten können wasserkontinuierliche Strukturen im Sinne von Mizellen bzw. O/W-Mikroemulsionen für das gesamte isotrope Gebiet geschlussfolgert werden.

Differential Scanning Calorimetry

Differential Scanning Calorimetry (DSC) ist ein Verfahren zur Untersuchung temperatur-induzierter Zustandsänderungen [108]. GARTI et al. nutzen die *low-temperature-DSC* erstmals zur Charakterisierung des Zustandes von Wasser in nichtionischen Mikroemulsionen [231]. In DSC-Kühlkurven kann von der Größe und Position des exothermen Wasserpeaks auf dessen physikalischen Status innerhalb des Systems geschlossen werden. Das Erstarren von Wasser, welches starke Wechselwirkungen mit Tensiden unterhält, findet bei niedrigeren Temperaturen statt als das von schwach interagierendem. Darüber hinaus treten Unterschiede in der Umwandlungsenthalpie, d.h. der integrierten Fläche des Umwandlungspeaks, auf [232].

Analog PODLOGAR et al. [106, 232] wurden Kühl- und Heizkurven der pseudoternären Systeme entlang Linie A im Phasendreieck (Abbildung 43c, Tabelle 18) sowie von reinem BIP, Wasser und von Tensidmischungen aufgenommen. Da die Heizkurven keine zusätzlichen Informationen boten, sind in Abbildung 45 nur die Kühlkurven dargestellt.

Die Thermogramme aller untersuchten pseudoternären Systeme zeigten einen exothermen Peak. Dieser verschob sich mit zunehmendem Wassergehalt bis zu einem Anteil von 77 % (m/m) zu höheren Temperaturen, die Peakflächen nahmen linear zu (nicht dargestellt). Aus den Änderungen, die dem Verhalten reinen Wassers (Kristallisationspeak bei ca. $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$)

zustreben, kann geschlussfolgert werden, dass das exotherme Geschehen dem Erstarren unterkühlten Wassers entspricht [106, 233].

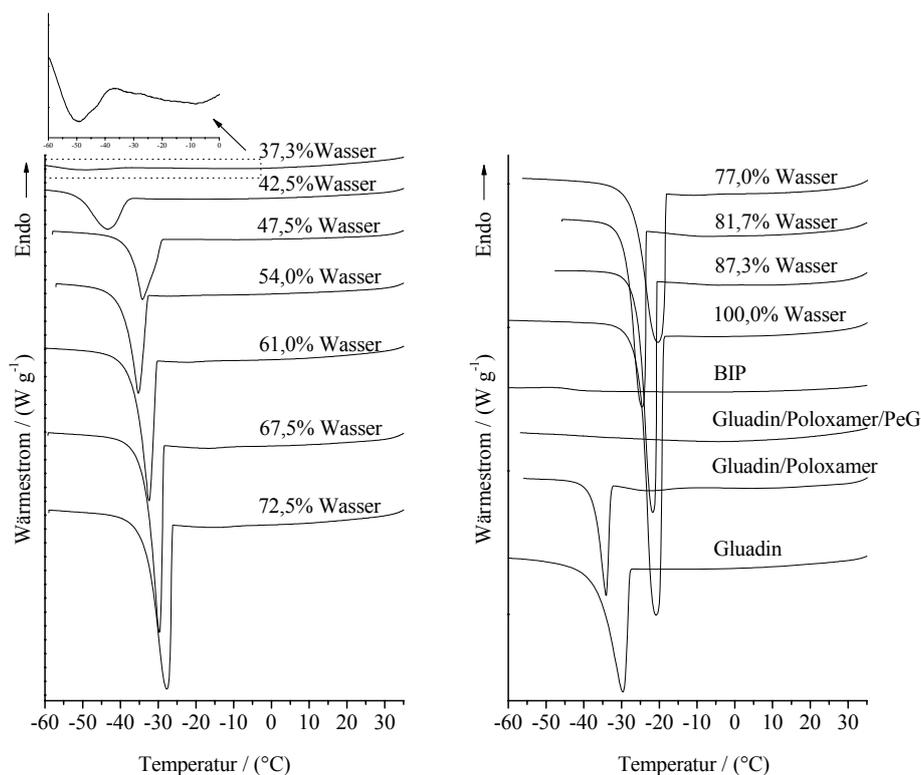


Abbildung 45: DSC-Kühlkurven von isotropen Systemen entlang Linie A (vgl. Abbildung 43c, Tabelle 18) sowie von reinem BIP, Wasser, Gluadin[®]WK:Poloxamer:PeG ($R_{corr}=1,545:1:1,875$), Gluadin[®]WK:Poloxamer ($R_{corr}=1,545:1$) und Gluadin[®]WK.

Entlang Linie A geht mit der zunehmenden Wasserfraktion eine Abnahme der Tensidmenge einher. Damit verringert sich der Anteil stärker gebundener, die polaren Kopfgruppen der Tenside hydratisierender Wassermoleküle – eine Ursache für die Peakverschiebung. Auch die Lage der exothermen Umwandlung in den Proben der Gluadin[®]WK/Poloxamer-Mischung sowie des reinen Gluadin[®]WK kann damit erklärt werden. Jene befindet sich im Thermogramm des reinen Proteintensids aufgrund geringerer Interaktionen mit Wasser zwischen der der Gluadin[®]WK/Poloxamer-Mischung und des Wassers. Darüber hinaus spielt das Vorhandensein von PeG eine Rolle. Mit Wasser mischbare Polyole fungieren als Gefrierschutz [234-236]. Sehr deutlich ist dies im Thermogramm der kompletten Tensidmischung zu erkennen. Trotz eines Wassergehaltes von ca. 44 % trat hier kein Erstarrungsereignis auf. Innerhalb der Systeme entlang Linie A nahm der cryoprotektive Effekt auf die Phasenumwandlung mit zunehmender Wasserkonzentration ab. Bei einem Anteil von über 80 % (m/m) dominierte schließlich das freie Wasser, so dass die Kristallisationstemperaturen der der Referenz vergleichbar waren.

PODLOGAR et al. interpretierten Wasserpeaks, die sich von dem des reinen Wassers unterschieden, aber immer noch eine scharfe Form zeigten, als wenig interagierendes Wasser.

Andererseits wurden kleine Peaks, die bei niedrigen Temperaturen (unterhalb $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$) auftraten, als internes Wasser bzw. als solches, das stark mit Tensiden wechselwirkt, bezeichnet [106, 232]. Letzteres könnte auf die untersuchten Systeme mit weniger als 47,5 % Wasser zutreffen, da deren Umwandlungspeaks keine scharfe Form aufwiesen. Es deuten sich hier beginnende strukturelle Veränderungen in Richtung bikontinuierlicher Mikroemulsionen an. Ähnliche Tendenzen gingen aus den Leitfähigkeitsuntersuchungen hervor. Um endgültige Aussagen zu treffen, ist jedoch der Einsatz zusätzlicher nicht-invasiver Techniken wie der *pulsed field gradient spin-echo nuclear magnetic resonance spectroscopy* (PGSE-NMR), mit der sich Eigendiffusionskoeffizienten bestimmen lassen, erforderlich [66, 237]. Im Wesentlichen sprechen die Ergebnisse beider Methoden für das Vorhandensein wasserkontinuierlicher Strukturen.

Die reine lipophile Komponente BIP zeigt zwischen 40 und $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ keine Erstarrung, was durch das eutektische Verhalten der Alkylphthalimidmischung bedingt sein kann. Die Methode ist demnach nicht geeignet, den Zustand von BIP in den Mikroemulsionen zu charakterisieren. Hier könnten ESR-Studien von Nutzen sein (vgl. Kapitel 3.3.5).

Abschließend sei darauf hingewiesen, dass DSC-Ergebnisse generell vorsichtig interpretiert werden sollten, da es sich um eine invasive Methode handelt. Die detektierten Phasenübergänge könnten auch von einer durch das Temperaturregime veränderten Probe stammen.

4.4.3 Charakterisierung ausgewählter Mikroemulsionen

Wasserkontinuierliche Mikroemulsionen stellen für ein breites Spektrum an Arzneistoffen geeignete Formulierungen mit penetrations- bzw. permeationsfördernden Eigenschaften dar. Sie sind anwenderfreundlicher als ölkontinuierliche Systeme und scheinen keinen Langzeiteffekt auf den Hydratisierungszustand der Haut auszuüben [238]. Für die nachfolgende Studie wurden eine 1,2-Pentylenglycol-haltige sowie eine propylenglycolhaltige Mikroemulsion ausgewählt (PeG-ME und PrG-ME), deren Zusammensetzung in Tabelle 19 aufgeführt ist. Mit einem Anteil von weniger als 25 % Gluadin[®] WK und Poloxamer sollte der dermalen Verträglichkeit der Vehikel Rechnung getragen werden. Aus Gründen der Stabilität enthielt PrG-ME geringfügig mehr Tensid, jedoch wird die Differenz von 1,7 % bezüglich der Vergleichbarkeit der Systeme als vernachlässigbar angesehen.

Tabelle 19: Zusammensetzung von PrG-ME und PeG-ME (% m/m).

	PrG-ME	PeG-ME
Gluadin [®] WK _{corr}	13,39	12,36
Poloxamer 401	8,67	8,00
BIP	7,50	7,50
Glycol	15,00 (PrG)	15,00 (PeG)
Wasser	55,44	57,14

Im Vorfeld der Penetrationsuntersuchungen fand eine physikochemische Charakterisierung beider Mikroemulsionen statt (vgl. Kapitel 3.3). Dabei bestätigten **polarisationsmikroskopische Betrachtungen** die optische Isotropie, es trat keine Doppellichtbrechung auf.

Das **temperaturabhängige Verhalten** von Formulierungen bestimmt deren Gebrauchseigenschaften. Deshalb wurden die Systeme stufenweise erwärmt sowie im Kühlschrank aufbewahrt. PrG-ME veränderte zwischen 40 und 50 °C ihre zuvor klare, transparente Erscheinung von opaleszent nach trüb. Bei 60 °C kam es zur Phasentrennung. Diese trat bei PeG-ME ebenfalls bei dieser Temperatur auf, die vorangehende Opaleszenz wurde jedoch erst bei 50 °C beobachtet. Alle Veränderungen waren reversibel und das initial klare Erscheinungsbild stellte sich sehr schnell nach Abkühlung und Schütteln wieder ein. Die Lagerung bei 6 °C führte zu keinerlei sichtbaren Veränderungen. Die Ergebnisse belegen die Stabilität beider Mikroemulsionen unter diversen Herstellungs- und Lagerungsbedingungen einschließlich der dermalen Applikation, sofern es sich dort um Temperatureffekte handelt. Die etwas geringere Temperaturempfindlichkeit der PeG-ME ist auf deren zentralere Lage im isotropen Phasengebiet im Vergleich zur PrG-ME zurückzuführen.

Die **dynamische Viskosität** der Mikroemulsionen wurde mit steigenden Scherraten sowohl bei 25 °C als auch bei 32 °C, der Temperatur der Haut, bestimmt. Die Rheogramme sind in Abbildung 46 dargestellt. Beide Systeme zeigten NEWTONSches Fließverhalten, Schubspannung und Scherrate verliefen proportional. Dies ist typisch für tropfenartige Mikroemulsionen [44, 105]. Wie zu erwarten, nahm die Viskosität mit steigender Temperatur ab (Tabelle 20). Die Unterschiede betragen 2-4 mPa·s. PeG-ME zeigte jeweils höhere Werte als PrG-ME, was bei der sonst vergleichbaren Zusammensetzung vor allem in den Viskositätsunterschieden zwischen PeG (68-78 mPa·s [239]) und PrG (55-60 mPa·s [240]) begründet liegt.

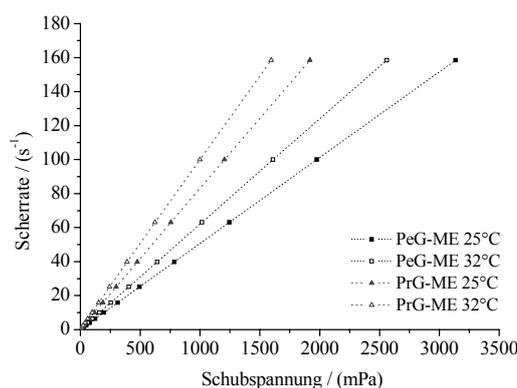


Abbildung 46: Rheogramme von PeG-ME und PrG-ME bei 25 °C und 32 °C.

Die in Tabelle 20 aufgeführte **elektrische Leitfähigkeit** lag für beide Mikroemulsionen auf ähnlichem Niveau. Der etwas höhere Wert von PrG-ME liegt an dessen leicht erhöhtem Anteil an anionischem Proteintensid. Da die Ergebnisse in ihrer Größenordnung den aus-

fürlich charakterisierten Systemen entsprachen (Kapitel 4.4.2), wurden sie als Hinweis auf das Vorhandensein von wasserkontinuierlichen Mikroemulsionen gewertet.

Der **pH-Wert** von ca. 8, der für PrG-ME und PeG-ME ermittelt wurde, rührt im Wesentlichen vom alkalischen Proteintensid her.

Tabelle 20: Ergebnisse der physikochemischen Charakterisierung von PrG-ME und PeG-ME.

	Dynamische Viskosität / (mPa·s)		Elektrische Leit- fähigkeit / (mS·cm ⁻¹)	pH Wert	abgeschätzter Durchmesser der sphärischen Aggregate / (nm)
	25 °C	32 °C			
PrG-ME	11,9	9,7	11,52	8,2	12-16
PeG-ME	19,7	16,1	11,23	8,0	12-16

Analog Kapitel 3.3 wurden die Formulierungen mittels **FF-TEM** untersucht. Beide Mikroemulsionen zeigten eine homogene Mikrostruktur mit Vertiefungen und Erhebungen, die das Vorhandensein sphärischer Aggregate nahe legen (Abbildung 47). Der Durchmesser der globulären Strukturen kann mit 12-16 nm abgeschätzt werden. Im Vergleich zu PeG-ME war das Erscheinungsbild von PrG-ME etwas rauer, die vorhandenen Strukturen erschienen gehäuft. Eine Ätzung der Oberfläche, um die Konturen stärker hervortreten zu lassen, war – vermutlich aufgrund der hohen Konzentration an nicht-wässrigen Inhaltsstoffen sowie der hohen Dispersität der lipophilen Komponente – nicht möglich.

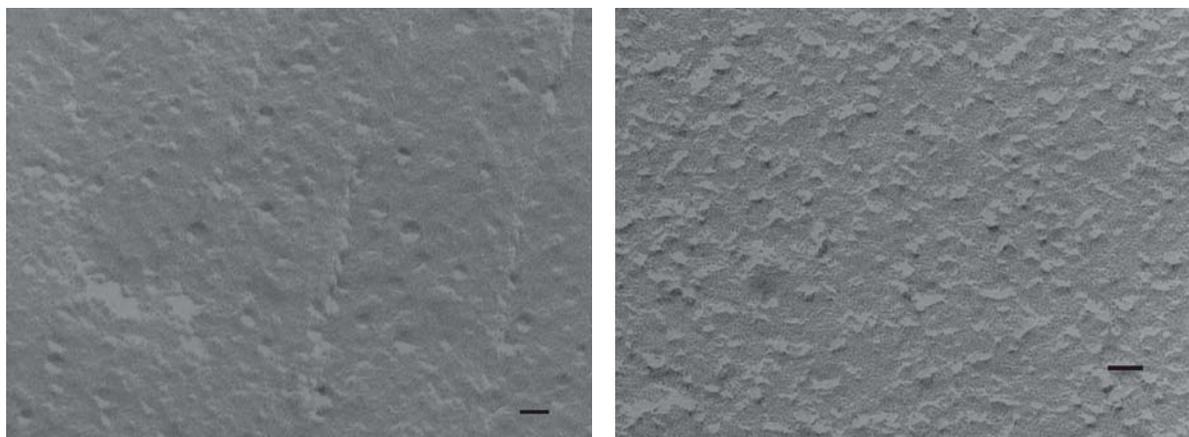


Abbildung 47: Elektronenmikroskopische Aufnahme von PeG-ME (links) und PrG-ME (rechts) nach Gefrierbruch, Balken entspricht 26 nm.

Aus der Summe der Charakterisierungsverfahren geht hervor, dass es sich bei den entwickelten Formulierungen um optisch isotrope, thermodynamisch stabile, niedrigviskose Systeme von idealviskosem Fließverhalten handelt. Aus den Untersuchungen zur Leitfähigkeit sowie den Thermogrammen ist eine Wasserkontinuität abzuleiten. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten darüber hinaus eine Kompartimentierung in Form dispers verteilter sphärischer Aggregate, die lipidreichen, mizellaren Strukturen zugeordnet

werden können. Die Formulierungen können demnach als wasserkontinuierliche Mikroemulsionen klassifiziert werden.

4.4.4 HET-CAM

Das international anerkannte HET-CAM Modell (*hen's egg test - chorioallantoic membrane*) kann Hinweise auf ein toxisches Potenzial von Substanzen bzw. auf Irritationen infolge deren ophthalmologischer, aber auch dermalen Applikation geben [241]. Bei der CAM handelt es sich um die stark vaskularisierte Membran befruchteter, inkubierter Hühnereier. Sie reagiert auf den Kontakt mit irritierenden Stoffen mit Veränderungen an Gefäßsystem und Durchblutung wie Hyperämie, Hämorrhagie oder Koagulation. WOHLRAB fand eine Korrelation zwischen den genannten halbquantitativen Parametern und der vaskulären Perfusion, die mittels Laser-Doppler-Fluxmetrie erfasst werden kann [242]. Diese Methode wurde bereits zur In-vivo-Testung der dermalen Verträglichkeit von Mikroemulsionen an Probanden angewandt [65]. Im Fall von Irritationserscheinungen im HET-CAM Modell steigen Perfusion und damit der Laser-Doppler-Flux (LDF). Vasokonstriktion als ein pharmakologischer Effekt hat ähnlichen Einfluss auf den LDF. Vasodilatation bzw. der Tod des Embryos resultieren in einem erniedrigten bzw. erloschenen Flux. Von ethischer Seite her bestehen bei einer bis zu zehntägigen Inkubation nach Befruchtung der Eier keine Einwände, da die CAM in diesem frühen Entwicklungsstadium ohne Nervenfasern und das System damit schmerzfrei ist [243].

Gluadin[®] WK, eine Mischung aus PeG und Wasser (PeG/W) sowie PrG-ME und PeG-ME wurden auf potentielle irritierende Effekte hin mittels HET-CAM untersucht.

Eine visuelle Betrachtung der CAM nach einer Expositionszeit von 5 min erbrachte für Gluadin[®] WK sowie PrG-ME ein etwas deutlicher hervortretendes Gefäßnetz. Auffälliger war die auftretende Hyperämie bei der Applikation der PeG-haltigen Systeme (PeG/W und PeG-ME). Vereinzelt deuteten sich hier hämorrhagische Veränderungen an.

Die LDF-Indizes sind in Abbildung 48 in Abhängigkeit von der Applikationszeit dargestellt. Der vor Auftragung der Substanzen ermittelte Referenzwert ist bei $t = 0$ min eingetragen.

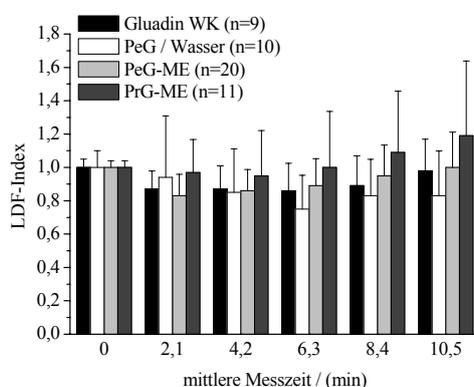


Abbildung 48: Laser-Doppler-Flux (LDF-Index) nach Applikation von PrG-ME, PeG-ME sowie den Referenzen Gluadin[®] WK und PeG/W auf die CAM (MW \pm SD).

Der LDF-Index als Maß für die Durchblutung der CAM unterscheidet sich bei allen getesteten Präparationen zu keiner Messzeit signifikant von der unbehandelten Kontrolle, so dass sich insgesamt betrachtet kein Anhalt für ein relevantes irritatives Potenzial ergab. Es trat auch keine höhere Embryonensterblichkeit auf.

Für Gluadin[®] WK mit 3 % aktivem Tensid wurde nach HET-CAM bereits eine Einstufung in die Kategorie mit dem geringsten Irritationspotenzial vorgenommen [221]. Ein ähnliches Verhalten zeigte sich nun auch für die zehnfach höhere Konzentration.

KAHLWEIT et al. beschrieben die Bildung nicht-toxischer Mikroemulsionen unter der Verwendung von Alkandiolen [223, 224]. Im Gegensatz dazu ergaben HET-CAM-Untersuchungen von ALANY et al., dass 1,2-Alkandiole mit Kettenlängen zwischen C₅ und C₈ unverdünnt aufgetragen starke Reizungen verursachen [62]. Dies kann die erfassten Veränderungen am vaskulären System bei Applikation von PeG/W und PeG-ME erklären, wobei das Ausmaß der Irritationen offensichtlich konzentrationsabhängig ist. In Analogie wird in der Literatur von einer Mikroemulsion auf Sucroseester-Basis berichtet, die 30 % PrG enthielt und im HET-CAM für nicht irritierend befunden wurde [244], obwohl reines PrG als leicht irritierend gilt [62].

Als nächster Schritt zur Abklärung der physiologischen Verträglichkeit, insbesondere bei Langzeitexposition, sollte die Auftragung auf gesunde Haut von Probanden im Rahmen eines klinischen Versuches erfolgen.

4.4.5 Ex-vivo-Untersuchungen zur Penetration

Der Einfluss von PrG-ME und PeG-ME auf die Penetration von DHA_vD wurde mit Hilfe von FRANZ-Diffusionszellen getestet. Von Interesse waren das Verhältnis von dermalen zu transdermalen Verfügbarkeit, welches durch die kolloidalen Vehikel zu erreichen ist, sowie die (unterschiedliche) Potenz der beiden Glycole.

Zunächst wurde die maximale Aufnahmekapazität der Mikroemulsionen für DHA_vD bestimmt (siehe Tabelle 21). Der höhere Wert der PeG-ME kann der besseren Solubilisierungskapazität von PeG verglichen mit PrG zugeschrieben werden (vgl. Tabelle 14). Bei Überschreiten der Sättigungslöslichkeit kam es bei beiden Systemen neben dem Auftreten von Bodensatz zu einer Phasentrennung. Dies lässt eine gewisse Grenzflächenaktivität von DHA_vD vermuten.

Tabelle 21: Löslichkeit von DHA_vD in PrG-ME und PeG-ME (MW ± SD, n=3).

Mikroemulsion	c _s / (mg·mL ⁻¹)
PrG-ME	30,4 ± 1,1
PeG-ME	36,8 ± 1,2

Um die Penetration aus den kolloidalen Vehikeln später mit denen der halbfesten Zubereitungen vergleichen zu können, wurde die Aufnahmekapazität der Systeme nicht ausgeschöpft. Die Konzentration von DHA_vD betrug 0,2 % (m/m). Nach der 30 bzw.

300-minütigen Inkubation erfolgte die Quantifizierung des Modellarzneistoffes in den Hautschichten sowie im Akzeptor. Die Ergebnisse sind in Abbildung 49 dargestellt.

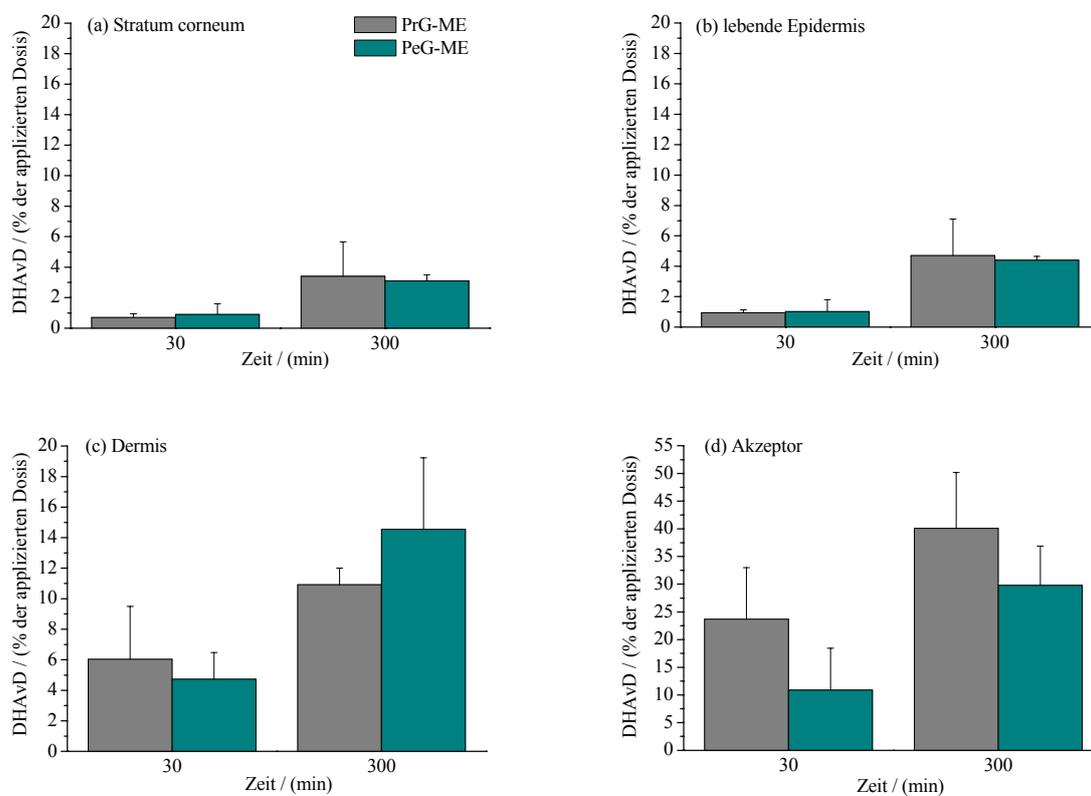


Abbildung 49: Vergleich der Penetration von DHA vD in exzidierte Humanhaut (a) Stratum corneum, (b) lebende Epidermis und (c) Dermis sowie der Permeation in den Akzeptor (d) zu verschiedenen Zeiten nach Applikation von PrG-ME und PeG-ME (MW \pm SD, n = 3).

Die Applikation der Mikroemulsionen führte zu einer vergleichbaren Verteilung von DHA vD, vor allem innerhalb der Hautschichten. Die Anteile in Stratum corneum und lebender Epidermis waren mit ca. 1 % der applizierten Dosis im Kurzzeitversuch sehr gering und nahmen bei 300-minütiger Inkubation auf etwa das Vierfache zu. In der Dermis konnten von Beginn an höhere Werte detektiert werden. Im Untersuchungszeitraum ließ sich bei Behandlung mit PrG-ME ein Zuwachs von ca. 6 % auf 11 % und mit PeG-ME sogar von 4,7 % auf 14,6 % verzeichnen. Besonders auffallend war die hohe Permeation, bei der sich größere, wenngleich nicht signifikante Unterschiede zwischen beiden Formulierungen offenbarten. Im Fall der PrG-ME erreichten nach 30 min ca. 24 % der Dosis den Akzeptor, bei PeG-ME waren es ca. 11 %. Die Werte verdoppelten (PrG-ME) bzw. verdreifachten (PeG-ME) sich bei der längeren Versuchszeit und sprechen für eine transdermale Verfügbarkeit von DHA vD.

Während die Art des als Cotensid und Cosolvens verwendeten Glycols kaum Einfluss auf die Penetration von DHA vD ausübt, sind deutliche Tendenzen zugunsten von PrG bezüglich einer Permeationsverbesserung zu verzeichnen. Da dem transdermalen Stofftransport von Mikroemulsionen komplexe Interaktionen thermodynamischer und struktureller Gegeben-

heiten zugrunde liegen, können für die aufgetretenen Beobachtungen mehrere Ursachen diskutiert werden. Die Art des Glycols beeinflusst die Lage der Mikroemulsion im isotropen Phasengebiet (Abbildung 43). So befindet sich PeG-ME inmitten dieses Bereiches, während PrG-ME näher an der Phasengrenze lokalisiert ist. Letztere hat damit nahezu die maximale Aufnahmekapazität für lipophile Komponenten erreicht, mit der möglicherweise auch eine hohe thermodynamische Aktivität einhergeht. Darüber hinaus können Verteilungsprozesse innerhalb der Formulierung sowie zwischen dieser und der Haut, die relative thermodynamische Aktivität und Mobilität von DHAvD innerhalb der Mikrokompartimente sowie Diffusionsvorgänge anderer Inhaltsstoffe eine Rolle spielen (vgl. Kapitel 3.4.2). Um weitere Einblicke zu gewinnen, wurden die Konzentrationen der beiden lipophilen Komponenten der Mikroemulsionen, Isopropylphthalimid (IP) und Butylphthalimid (BP), ermittelt. Abbildung 50 verdeutlicht, dass sich diese Stoffe ähnlich dem DHAvD verhielten – geringe und nahezu identische Anteile der Dosis in Stratum corneum und Epidermis sowie ein Mehrfaches davon in der Dermis, außerdem die vehikelabhängige Abstufung der permeierten Menge zugunsten der PrG-ME. Analog den Ergebnissen der ME-BIP (Kapitel 3.5.2, Abbildung 29) gelangte, relativ betrachtet, weniger BP als IP in den Akzeptor. Dies verdeutlicht den Einfluss der physikochemischen Eigenschaften auf die Permeation. Bis auf IP aus PrG-ME befanden sich die permeierten Anteile beider Stoffe nach 30 min nicht über dem Niveau der Dermis.

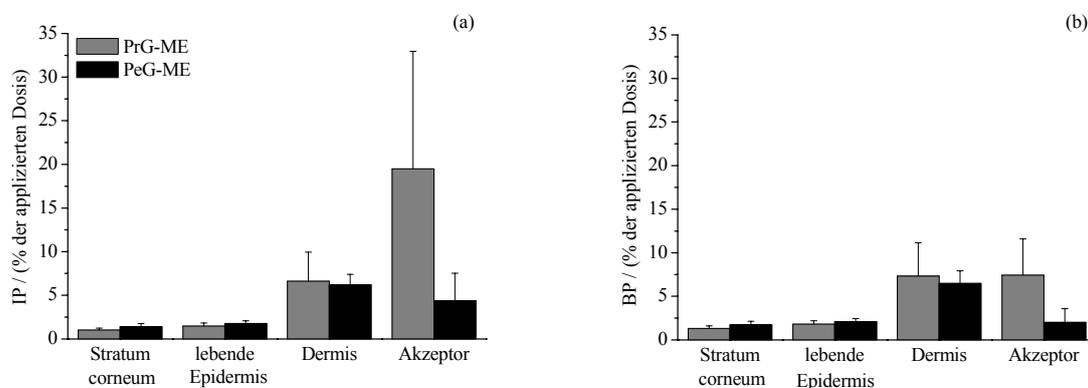


Abbildung 50: Penetration und Permeation von IP (a) und BP (b) aus PrG-ME und PeG-ME in exzidierte Humanhaut nach einer Applikationszeit von 30 min ($MW \pm SD$, $n = 3$).

Um das Penetrationsverhalten aller drei Stoffe vergleichen zu können, wurde das Resultat von PrG-ME zur Versuchsdauer von 300 min ausgewählt und in Abbildung 51 dargestellt. Es ist repräsentativ für beide Vehikel und Inkubationszeiten und zeigt, dass es innerhalb der Hautschichten keine gravierenden Unterschiede in den penetrierten Anteilen gab. Jedoch weist die Permeation eine deutliche Graduierung auf. Sie korreliert mit den Verteilungskoeffizienten ($\log D$) der Stoffe bei pH 7,4, die für DHAvD -0,24 (vgl. Kapitel 4.2.2), für IP $\sim 2,4$ und für BP $\sim 3,2$ (berechnet nach [102]) betragen. Ein inverser Zusammenhang besteht zu den applizierten Dosen der Substanzen. Die Mikroemulsionen enthielten 0,2 % DHAvD,

1,83 % IP und 5,67 % BP, wobei wie oben erwähnt die Menge an DHA_vD deutlich weiter von der Aufnahmekapazität der Vehikel entfernt war (Tabelle 21) als die der beiden anderen Stoffe (Abbildung 43). Eine eintretende Sättigung des Akzeptors als Ursache für einen künstlichen Stopp der Permeation konnte ausgeschlossen werden, da für alle Substanzen *Sink*-Bedingungen herrschten.

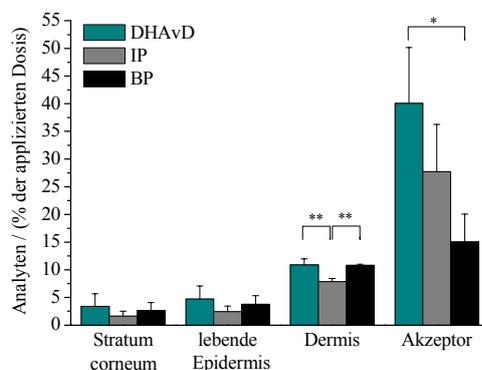


Abbildung 51: Penetration und Permeation von DHA_vD, IP und BP aus PrG-ME in exzidierte Humanhaut nach einer Applikationszeit von 300 min (MW ± SD, n = 3, * p < 0,05, ** p < 0,01).

4.4.6 Zusammenfassung: Mikroemulsionen

Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse belegen die erfolgreiche Entwicklung moderner, hautverträglicher, wasserkontinuierlicher Mikroemulsionen auf der Basis eines Weizenproteinhydrolysat-Fettsäurekondensates. Der Zusatz von 1,2-Alkandiolen als Cotenside und Cosolvenzien beeinflusst Lage und Grenzen des isotropen Phasengebietes, die Solubilisierungskapazität der Systeme für Arzneistoffe sowie das Penetrationsvermögen.

Dabei ist den beiden getesteten Mikroemulsionen PrG-ME und PeG-ME eine gegenüber der Penetration deutlich erhöhte Permeation des Modellwirkstoffes DHA_vD und mit ihr der Hinweis auf transdermale Verfügbarkeit gemein. Die Art der Glycole beeinflusste die DHA_vD-Menge in den Hautschichten nicht, jedoch führte die Applikation der PrG-ME zu jeder Versuchszeit zu höheren Akzeptorkonzentrationen als die der PeG-ME. Ein dem Modellarzneistoff vergleichbarer Effekt der Vehikel war auf deren lipophile Komponenten, IP und BP, zu verzeichnen.

4.5 Vergleich der Penetration aus halbfesten Formulierungen und Mikroemulsionen

Zum abschließenden Vergleich sind die Ergebnisse der halbfesten Formulierungen WHS und BuG/PeG-WHS sowie die der ebenfalls 1,2-Pentylenglycol enthaltenden Mikroemulsion PeG-ME in Abbildung 52 dargestellt. Vitale Epidermis und Dermis sind dabei als lebende Hautschichten zusammengefasst.

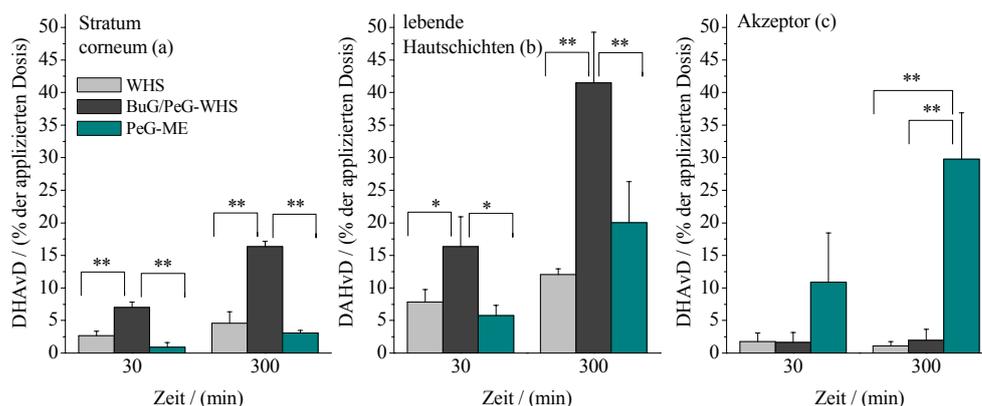


Abbildung 52: Vergleich der Penetration von DHA vD in Stratum corneum (a) und lebende Hautschichten (b) sowie der Permeation in den Akzeptor (c) nach Applikation von WHS, BuG/PeG-WHS und PeG-ME (MW \pm SD, n = 3, * p < 0,05 bzw. ** p < 0,01).

Durch die Auswahl des Vehikels und den Glycolzusatz können sowohl das Ausmaß der Penetration und Permeation des Modellwirkstoffes als auch dessen Verteilung innerhalb der Kompartimente beeinflusst werden. Die klassische O/W-Creme WHS schneidet insgesamt am schlechtesten ab. Durch BuG/PeG-WHS wurde eine Anreicherung sowohl im Stratum corneum als auch in den lebenden Hautschichten erreicht, wobei sich vom Kurzzeitversuch hin zur 300 min-Applikation nochmals eine Verdopplung der penetrierten Anteile feststellen ließ. Das Depot in der Hornschicht führt dazu, dass auch zu späteren Zeitpunkten DHA vD in tiefere Hautschichten nachgeliefert wird, so dass die Wirkdauer prolongiert ist. Die topische Applikation von Arzneistoffen zielt häufig auf eine Interaktion mit Targetstrukturen in Epidermis und Dermis. Als kosmetischer Wirkstoff betrachtet, trifft dies auch für DHA vD mit dessen Eingriff in histaminvermittelte Prozesse zu. Hohe Konzentrationen in den entsprechenden Hautschichten sind demzufolge das Ziel, welches mit BuG/PeG-WHS erreicht werden kann.

Die permeierte Fraktion steht ebenfalls für die Wirkstoffdiffusion in tiefere Kompartimente der Haut, darüber hinaus deutet sie die Potenz des Vehikels bezüglich einer transdermalen Aktivität an. Wenngleich ein Rückschluss auf Konzentrationen im Blutkreislauf nicht möglich ist, so lässt die signifikant höhere Permeation von DHA vD aus der Mikroemulsion eine systemische Bioverfügbarkeit erwarten. Bereits nach 30 min wurden im Akzeptor vergleichsweise hohe Anteile der applizierten Dosis detektiert. Diese hatten die lebenden Hautschichten bereits passiert, so dass bei dieser Formulierung mit einem schnellen Eintritt der lokalen Wirkung gerechnet werden kann. Bemerkenswert ist, dass penetrierte und permeierte Fraktionen bei der Auftragung von BuG/PeG-WHS und PeG-ME trotz ihrer konträren Verteilungsmuster in der Summe sehr ähnlich waren.

4.6 Zusammenfassung

Mit der topischen Applikation von Arzneistoffen werden, abhängig vom Krankheitsbild, unterschiedliche Wirkorte innerhalb der Haut bzw. der Übergang in die systemische Zirkulation angestrebt. Durch die Auswahl geeigneter Vehikelsysteme kann darauf gezielt Einfluss genommen werden.

Für den Modellwirkstoff DHA_vD wiesen bereits In-vitro-Freisetzungsexperimente auf die Enhancerwirkung des Zusatzes geringer Mengen 1,2-Alkandiole zu konventionellen halbfesten Zubereitungen hin. Diese war umso stärker ausgeprägt, je lipophiler das Glycol war. Penetrationsstudien an Humanhaut bestätigten die Beobachtungen. Die um 4 % mit der Glycolmischung BuG/PeG angereicherte O/W-Creme (BuG/PeG-WHS) zeigte gegenüber der unmodifizierten Creme signifikant höhere DHA_vD-Anteile in allen Hautschichten. Aus dem sich ausbildenden Depot im Stratum corneum kann für längere Zeit Wirkstoff nachgeliefert und damit der Erhalt hoher (epi-)dermaler Konzentrationen gesichert werden. Eine noch darüber hinaus gehende Verbesserung der Penetration bereits nach 30-minütiger Einwirkdauer ließ sich durch das moderne Hydrodispersionsgel erzielen. Die Ergebnisse machen die halbfesten, glycolhaltigen Formulierungen für die Anwendung in der lokalen Therapie von Dermatosen interessant. Eine systemische Verfügbarkeit lässt sich mit ihnen wahrscheinlich nicht erreichen. Darauf weisen die vernachlässigbar geringen Permeationsraten hin.

Kolloidale Vehikel wurden als innovativer Ansatz hinsichtlich eines transdermalen Wirkstofftransportes ausgewählt. Es gelang die Entwicklung hautverträglicher, wasserkontinuierlicher Mikroemulsionen auf der Basis eines Weizenproteinhydrolysat-Fettsäurekondensates. Aufgrund der zuvor gewonnenen Erkenntnisse wurden den Systemen 1,2-Alkandiole als Cotenside zugegeben. Sie führten zu einer Stabilisierung und der Ausbildung isotroper Phasengebiete, deren Größe mit steigender Kettenlänge der Glycole zunahm. Außerdem üben sie eine Cosolvensfunktion aus. Mit zwei ausführlich charakterisierten Mikroemulsionen wurden Penetrationsstudien durchgeführt, bei denen insbesondere die hohen Permeationsraten auffielen. Sie lassen auf die Eignung der kolloidalen Systeme für die transdermale Applikation von Wirkstoffen schließen. Während die Art der Glycole die Menge des Modellarzneistoffes in den Hautschichten nicht beeinflusste, zeigte sich die PrG-ME zu beiden Versuchszeiten der PeG-ME hinsichtlich der permeierten Anteile überlegen. Ein dem DHA_vD vergleichbarer Vehikeleffekt war auf die lipophilen Komponenten IP und BP zu verzeichnen.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse vermuten, dass Arzneistoffe, die mit Hilfe der Mikroemulsionen appliziert werden, eine schnell eintretende und kurz andauernde lokale Wirkung sowie einen systemischen Effekt entfalten können. Bei Verwendung der glycolhaltigen halbfesten Formulierungen BuG/PeG-WHS und HDG ist ein leicht verzögerter Wirkungseintritt bei verlängerter Wirkdauer zu erwarten.

Diese vielversprechenden Erkenntnisse aus den Ex-vivo-Versuchen liefern die Basis für eine klinische Pilotstudie, die abklären kann, ob das erkannte Potenzial auch auf die In-vivo-Situation übertragbar ist.

5 Zusammenfassung

Die Ziele dieser Arbeit bestanden darin, zum einen detaillierte Informationen zur trans-epidermalen und transfollikulären Penetration einer Mikroemulsion zu gewinnen und zum anderen Möglichkeiten aufzuzeigen, die Anreicherung eines Modellarzneistoffes in bestimmten Hautschichten bzw. die Permeation in die systemische Zirkulation über galenische Maßnahmen gezielt zu beeinflussen.

Struktur- und Penetrationsuntersuchungen an einer Mikroemulsion

Durch Kombination verschiedener Methoden, wie Polarisationsmikroskopie, Rheologie, elektrische Leitfähigkeit, Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie, Dynamische Lichtstreuung und Elektronenspinresonanz-Spektroskopie, konnte die entwickelte ME-BIP umfassend physikochemisch charakterisiert werden. Es handelt sich um ein optisch isotropes, niedrigviskoses, strukturiertes und wasserkontinuierliches Mikroemulsionssystem mit einer lipophilen, kolloidalen „Pseudophase“ im Größenbereich von 15-20 nm. Das enthaltene Propylenglycol beteiligt sich als Cotensid sowie über Bulkeffekte wesentlich am mikrostrukturellen Aufbau. Wasser ist neben der Hydratisierung der Tensidkopfgruppen auch frei vorliegend. Die Ergebnisse lassen sich insgesamt unter dem Konzept der geschwollenen Mizellen zusammenfassen.

Bei Untersuchungen an einer FTIR-ATR-Diffusionszelle konnten bis auf die Tenside alle Bestandteile (BIP als lipophile Komponente, Metronidazol als Modellwirkstoff, Propylenglycol und Wasser) online und nicht-invasiv während ihrer Penetration in eine künstliche Lipidmembran sowie über den transepidermalen Weg in humanes Stratum corneum beobachtet werden. Dabei zeigten sich deutlich vehikelabhängige Einflüsse. Während die dynamische Mikrostruktur der Mikroemulsion die Penetration der kolloidalen „Pseudophase“ (BIP) wesentlich effektiver als die reine passive Diffusion der Substanz machte, war für das am Grenzflächenaufbau beteiligte Propylenglycol die Penetration aus der Mikroemulsion gegenüber der passiven Diffusion deutlich eingeschränkt. Das kolloidale BIP förderte auch maßgeblich die Konzentrationszunahme des Modellwirkstoffes Metronidazol im Akzeptor. Die beiden Komponenten zeigten identische Penetrationsprofile. Ebenso verliefen die Vorgänge der beiden polaren Stoffe Propylenglycol und Wasser vergleichbar. Mit dem Eindringen aller Mikroemulsionskomponenten in das Stratum corneum geht eine zunehmende Veränderung der Barriere hinsichtlich ihrer Verteilungseigenschaften und Aufnahmekapazität einher. Sie wirkt sich im weiteren Verlauf ebenfalls penetrationsfördernd aus.

Mehrfach wurde deutlich, dass die Mikroemulsion ihre ursprüngliche quantitative Zusammensetzung beim Eindringen in das Stratum corneum verliert und Mikrostrukturen

aufbrechen. Beim Übergang in tiefere Hautschichten gewinnen neben den mikrostrukturell bedingten und solubilisierungsfördernden Faktoren physikochemische Parameter der einzelnen Substanzen größeren Einfluss.

Eine weitere In-vitro-Studie erbrachte Hinweise auf eine Beteiligung der Hautanhangsorgane an der Penetration der Mikroemulsion. Sie bieten keinen Depoteffekt, sondern stellen eine Art Abkürzung in tiefere Hautschichten dar und können somit einen wichtigen Beitrag zu einem schnellen Wirkungseintritt sowie zur transdermalen Absorption leisten. Das Ausmaß der follikulären Route wird jedoch von der Follikeldichte am Applikationsareal bestimmt. Darüber hinaus bleibt in einer Probandenstudie zu klären, inwieweit diese Route auch von Arzneistoffen mit einem sehr hohen Verteilungskoeffizienten genutzt wird.

In-vivo-Untersuchungen bestätigten schließlich durch einen Vergleich der Mikroemulsion mit einer halbfesten Creme die Effizienz der Penetration durch das kolloidale Vehikel. Außerdem konnten die Stratum-corneum-Passage über die interzelluläre Route sowie die Beteiligung der Follikel mit Hilfe von LSM-Aufnahmen visualisiert werden.

Insgesamt ist es gelungen, mit den erzielten Ergebnissen den Kenntnisstand zum Penetrationsverhalten von Mikroemulsionen zu konkretisieren und zu ergänzen.

Modulation der Liberation und Penetration von Dihydroavenanthramid D

In diesem Teil der Arbeit konnte demonstriert werden, wie einfache galenische Maßnahmen, das heißt die Auswahl des Vehikels und der Zusatz von Enhancermolekülen, dazu beitragen können, die Anreicherung eines Wirkstoffes abhängig vom therapeutischen Ziel zu beeinflussen. Bereits aus den Studien zum Freisetzungverhalten aus halbfesten Zubereitungen gingen höhere 1,2-Alkandiole als vielversprechende Enhancer hervor. Ihr Effekt war mit steigender Kettenlänge stärker ausgeprägt. Penetrationsstudien an Humanhaut bestätigten die Beobachtungen. Die um 4 % mit der Glycolmischung BuG/PeG angereicherte Wasserhaltige Hydrophile Salbe zeigte gegenüber der unmodifizierten Creme signifikant höhere DHA_vD-Anteile in allen Hautschichten. Das sich ausbildende Depot im Stratum corneum sicherte den Erhalt hoher (epi-)dermaler Konzentrationen für längere Zeit. Eine noch darüber hinaus gehende Verbesserung der Penetration bei Kurzzeitexposition resultierte bei Applikation eines modernen Hydrodispersionsgels. Aus den vernachlässigbar geringen Permeationsraten ging jedoch hervor, dass eine systemische Bioverfügbarkeit mit diesen Vehikeln vermutlich nicht zu erreichen ist. Insgesamt lassen die Ergebnisse die halbfesten, glycolhaltigen Formulierungen als geeignete Arzneiträger im Bereich der Kosmetik und der topischen Therapie von Dermatosen erscheinen.

Um nun einen effektiven transdermalen Wirkstofftransport zu ermöglichen, wurden hautverträgliche, wasserkontinuierliche Mikroemulsionen auf der Basis eines Weizenproteinhydrolysat-Fettsäurekondensates als Tensid entwickelt und physikochemisch charakterisiert. Der Zusatz von 1,2-Alkandiolen als Cosolvenzien und Cotenside führte dabei zu einer Stabilisierung der Systeme und zur Ausbildung isotroper Phasengebiete, deren Größe mit steigender Kettenlänge der Diole zunahm. Mit zwei ausführlich charakterisierten

Mikroemulsionen wurden Penetrationsstudien an Humanhaut durchgeführt, bei denen die hohen permeierten Anteile an der applizierten Dosis auf die Eignung der kolloidalen Vehikel für die transdermale Applikation von Wirkstoffen schließen ließen. Während die Art der Glycole die Menge des Modellarzneistoffes in den Hautschichten nicht beeinflusste, zeigte sich die propylenglycolhaltige Mikroemulsion der 1,2-Pentylenglycol-haltigen hinsichtlich der permeierten Anteile überlegen. Ein dem Wirkstoff vergleichbarer Effekt des Vehikels war auf die lipophilen Komponenten IP und BP zu verzeichnen.

Die Anwendung der Formulierungen in der Praxis betreffend lassen die Ergebnisse vermuten, dass die Applikation der Mikroemulsionen zu einer schnell eintretenden und kurz andauernden lokalen Wirkung des inkorporierten Arzneistoffes führt und darüber hinaus einen systemischen Effekt ermöglicht. Bei Verwendung der glycolhaltigen O/W-Creme bzw. des modernen Hydrodispersionsgels ist mit einem leicht verzögerten Wirkungseintritt und einer verlängerten Wirkdauer zu rechnen. Selbstverständlich sollte zunächst abgesichert werden, dass diese viel versprechenden Ergebnisse auf In-vivo-Gegebenheiten übertragbar sind.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Substanzen und halb feste Formulierungen

1,2-Butylenglycol	Symrise, Holzminden, D
1,2-Pentylenglycol (Hydrolite [®] 5)	Symrise, Holzminden, D
1,2-Propylenglycol	Caelo, Hilden, D
2'-Hydroxy-5'-methyl-laurophenoxim	Merck, Darmstadt, D
Ameisensäure	Merck, Darmstadt, D
Cetiol [®] B, Cetiol [®] CC	Cognis Deutschland, Düsseldorf, D
Collodium 4 % DAC	Caelo, Hilden, D
Curcumin	Merck, Schuchardt, Hohenbrunn, D
Dihydroavenanthramid D	Symrise, Holzminden, D
Dodecan-1-ol	Cognis Oleochemicals, Düsseldorf, D
Ethanol	BfB, Wittenberg, D
Eutanol [®] G16, Gluadin [®] WK, Isopropylmyristat	Cognis Deutschland, Düsseldorf, D
Methanol, HPLC grade	J.T. Baker, Deventer, NL
Metronidazol, mikrofein	Fagron, Barsbüttel, D
Myritol [®] 318	Cognis Deutschland, Düsseldorf, D
N-Butylphthalimid	ABCR, Karlsruhe, D
Nephrophan [®]	VEB Filmfabrik, Wolfen, D
Octan-1-ol	Gruessing, Filsum, D
Ölsäure	Merck KGaA, Darmstadt, D
Paraffin, dünnflüssiges	Hansen & Rosenthal, Hamburg, D
Pelemol [®] BIP	Phoenix Chemical, Somerville, NJ, USA
Puffersubstanzen	Merck, Darmstadt, D
SymCalmin [®] (Lösung von 5 % DHAvD in einer 1:1 (m/m) Mischung von PeG und BuG)	Symrise, Holzminden, D
Synperonic [®] PE/L 101 und 121	Uniqema, Bromborough, GB
Tagat [®] O2	Frankenchemie, Wendelstein, D
TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
TEMPOL (4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Volpo [®] N20	Croda GmbH, Nettetal, D
Wasser, entionisiert	Reinstwasseranlage Maxima, Fa. ELGA, Celle, D

Tabelle 22: Verwendete halb feste Formulierungen.

Wasserhaltige Hydrophile Salbe DAB (WHS; Bombastus-Werke AG, Freital)		Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe DAB (WWAS; Bombastus-Werke AG, Freital)	
Emulgierender Cetylstearylalkohol			
Typ A	9,00 %	Cetylstearylalkohol	0,25 %
Dickflüssiges Paraffin	10,50 %	Wollwachsalkohole	3,00 %
Weißes Vaselin	10,50 %	Weißes Vaselin	46,75 %
gereinigtes Wasser	70,00 %	gereinigtes Wasser	50,00 %
Basiscreme DAC; (Synopharm, Barsbüttel)		Hydrodispersionsgel (HDG; (Symrise GmbH & Co. KG, Holzminden)	
Glycerolmonostearat 60	4,00 %	PEG-9-tridecylether/PEG-5-octanoat	1,00 %
Cetylalkohol	6,00 %	SymCalmin	2,00 %
Mittelkettige Triglyceride	7,50 %	Cetearyloctanoat	3,00 %
Weißes Vaselin	25,50 %	Stearinsäure	2,00 %
PEG-20-Glycerolmonostearat	7,00 %	Acrylat/C ₁₀₋₃₀ Alkylacrylat Cross-	
Propylenglycol	10,00 %	polymer	0,25 %
gereinigtes Wasser	40,00 %	dickflüssiges Paraffin	3,00 %
		Octyldodecanol	4,00 %
		Dimeticon	0,50 %
		Natriumhydroxid	0,50 %
		Gereinigtes Wasser	83,75 %

6.2 Physikochemische Charakterisierung der Modell- arzneistoffe

6.2.1 Sättigungslöslichkeiten

Der zu untersuchende Arzneistoff wurde in der Regel im Überschuss zu 1-2 mL des jeweiligen Mediums gegeben und 24 h mit Hilfe eines Magnetrührers bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zentrifugation (MLW T 52.1, Zentrifugenbau Engelsdorf, D) bzw. Filtration (0,45 µm Membranfilter) gewonnene klare, gesättigte Lösungen wurden in geeigneter Weise verdünnt und der entsprechenden Analytik zugeführt (siehe Kapitel 6.9.1). Aus jedem der drei Parallelansätze wurden zwei Verdünnungen hergestellt.

Im Fall der Sättigungslöslichkeiten von Metronidazol erfolgten die Bestimmungen aufgrund einer fehlenden chromatographischen Methode wie folgt: geringe, genau abgewogene Mengen an Substanz wurden zu einer definierten Masse des entsprechenden Mediums gegeben. Nach jeder Zugabe wurde bis zu 24 h gerührt. Die Substanzmenge, bei der visuell gerade noch kein Bodensatz zu erkennen war, wurde als Sättigungsgrenze gewertet (n = 2-6). Da ein Überschuss von DHAvD zu PrG-ME und PeG-ME zu Phasentrennung führte, mussten die Löslichkeiten ebenfalls auf diesem Weg ermittelt werden (n = 3).

6.2.2 Verteilungskoeffizienten

Gleiche Volumina einer Stammlösung von DHA_vD in Puffer-gesättigtem Octanol (aufgrund der zum Teil sehr geringen Löslichkeit in Puffer) und Octanol-gesättigtem Puffer wurden zusammengefügt und 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt (n = 3). Zur Anwendung kamen Citronensäure-Phosphat-Puffer mit pH-Werten von 3,1, 5,5, 6,1 und 7,4. Nach Auftrennung in die Phasen, die unter Zentrifugation stattfand (MLW T 52.1, Zentrifugenbau Engelsdorf, D), erfolgte die Quantifizierung von DHA_vD mittels HPLC in beiden Phasen. Die Verteilungskoeffizienten log D wurden nach folgender Gleichung berechnet:

$$\log D = \log_{10} \left(\frac{c_{Oct}}{c_w} \right), \quad \text{Gleichung 2}$$

wobei c_{oct} = Konzentration in der Octanolphase und c_w = Konzentration in der Pufferphase bedeutet. Aus dem Vergleich der eingewogenen Menge an DHA_vD mit der Summe der in beiden Phasen jedes Ansatzes detektierten Substanzmengen konnte eine Wiederfindung von $100,25 \% \pm 1,43 \%$ ermittelt werden.

6.3 Physikochemische Charakterisierung der Mikroemulsionen

6.3.1 Phasendreieck

Zur Identifizierung isotroper Gebiete im Phasendiagramm wurden pseudoternäre Systeme durch Schütteln entsprechender Massenverhältnisse der Komponenten in Reagenzgläsern hergestellt. Für eine grobe Orientierung diente die Variation der Verhältnisse in 10 %-Inkrementen. Innerhalb der relevanten Gebiete wurden Veränderungen in 5 %- bzw. 2,5 %-Schritten vorgenommen. Nach 48-stündiger Equilibrierung erfolgte eine visuelle und polarisationsmikroskopische Inspektion (siehe 6.3.2). Nur eindeutig klare, einphasige und optisch isotrope Systeme wurden dem entsprechenden Phasengebiet zugeordnet. Eventuell auftretende anisotrope Phasen wurden nicht näher charakterisiert.

6.3.2 Polarisationsmikroskopie

Für die polarisationsmikroskopischen Untersuchungen stand das Zeiss Axiolab Pol (Carl Zeiss MicroImaging, Jena, D) zur Verfügung. Die Betrachtung der Proben, die zwischen zwei Deckgläschen aufgebracht waren, erfolgte bei Raumtemperatur.

6.3.3 Elektrische Leitfähigkeit

Die elektrische Leitfähigkeit der Gluadin[®] WK-haltigen Mikroemulsionen wurde mit Hilfe des ProfiLab Konduktometers LF 597 ermittelt, welches mit einer Standard-Leitfähigkeitsmesszelle TetraCon[®] 325 (Zellkonstante $0,475 \text{ cm}^{-1} \pm 1,5 \%$) ausgestattet war (WTW, Weilheim i. OB, D). Die Werte wurden bei $22,4 \text{ °C}$ abgelesen, nachdem sie ca. 2 min konstant

blieben. Im Fall der ME-BIP fanden die Messungen am Gerät CyberScan CON 11 (Eutech Instruments, Singapur, SGP; Zellkonstante 1,0) bei 22 °C statt.

6.3.4 Differential Scanning Calorimetry

DSC-Messungen wurden am DSC 200 (Netzsch-Gerätebau, Selb, D) durchgeführt. Genau gewogene Proben (ca. 15 mg) befanden sich in hermetisch abgeschlossenen 40 µL-Aluminiumtiegel, um die Verdunstung von Wasser zu verhindern. Die Aufnahme der Thermogramme erfolgte bei Kühlung von 40 °C auf -60 °C mit einer Rate von 10 K·min⁻¹, Equilibrierung bei -60 °C für 5 min, und anschließendem Aufheizen auf 150 °C um 10 K·min⁻¹. Als Referenz diente ein leerer Aluminiumtiegel gleicher Bauart. Stickstoff fungierte als Spülgas (10 mL·min⁻¹).

6.3.5 Dynamische Viskosität

Die Ermittlung der dynamischen Viskosität der Mikroemulsionen erfolgte nach dem Couette-Prinzip mit einem Rotationsviskosimeter (Fluids Spectrometer RFS II, Rheometrics Scientific, Bensheim, D). Zur Auswertung der unter steigenden Scherraten aufgezeichneten Daten kam die Software RHIOS, Version 4.2 zum Einsatz.

6.3.6 pH-Wert

Die pH-Werte der Formulierungen wurden am pH Meter Typ 1120 (Mettler-Toledo, Giessen, D) erfasst.

6.3.7 Dichte

Die Dichte der Mikroemulsion wurde mit Hilfe eines Pyknometers bei 20°C bestimmt.

6.3.8 Gefrierbruch-Transmissionselektronenmikroskopie

Eine geringe Probenmenge, zwischen zwei Kupferplättchen eingebracht, wurde in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Ethan/Propan-Gemisch (1:1) schockgefroren. Am BAL-TEC BAF 400T (Balzers, FL) erfolgte der Gefrierbruch bei -150 °C und die anschließende Bedampfung mit Platin/Kohlenstoff in einem Winkel von 35° sowie die der mechanischen Stabilisierung des 2 nm dicken Filmes dienende Beschattung mit einer 20-30 nm Kohleschicht. Zur Betrachtung der abgelösten und mit Chloroform/Methanol gereinigten Replika kam das EM902A Elektronenmikroskop (Zeiss, Oberkochen, D) zum Einsatz.

6.3.9 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Definierte Volumina acetonischer Stammlösungen der Spinsonden TEMPO bzw. TEMPOL wurden in Eppendorfgefäße pipettiert. Nach Verdunstung des Lösungsmittels wurde das jeweilige Untersuchungsmedium in der Weise ergänzt, dass die Konzentration der Spinsonden in den Proben 10⁻⁴ mol·l⁻¹ betragen. Auf die zehnmünütige Behandlung im Ultra-

schallbad (Bandelin Sonorex super RK 255H, Schalltec, Mörfelden-Walldorf, D) folgte die Überführung der Proben in Glaskapillaren.

Die Aufnahme der ESR-Spektren fand am X-Band-ESR-Spektrometer Miniscope MS 200 (Magnettech, Berlin, D) mit einer Mikrowellenstrahlung der Frequenz von ca. 9,5 GHz bei Raumtemperatur unter folgenden Bedingungen statt:

B ₀ -field	335,5 mT
Sweep	9,89 mT
Sweeptime	30 s
Number	4
Steps	4096
Modulationsfrequenz	100 kHz
Modulationsamplitude	0,1 mT

Zur Auswertung erfolgte die Simulation der ESR-Spektren mit der Software EPRSIM V4.99 (Biophysical laboratory - EPR centre, Josef Stefan Institute, Ljubljana, SLO).

6.3.10 Dynamische Lichtstreuung

Die Experimente zur Dynamischen Lichtstreuung wurden nach der in [122] beschriebenen Methode von SHUKLA et al. durchgeführt und ausgewertet. Zum Einsatz kam das Kompakt-Goniometer ALV/SP-86 (ALV-Laser Vertriebsgesellschaft, Langen, D). Als Lichtquelle fungierte ein Nd:YAG DPSS-200 Laser (Coherent, Auburn, USA) mit einer Wellenlänge von 532 nm und einer Leistung von 200 mW. Vor der Messung wurden die Proben durch einen Celluloseacetat-Membranfilter der Porengröße 1,2 µm filtriert.

6.3.11 Temperaturabhängiges Verhalten

Die Inkubation der Proben fand bei Temperaturen zwischen 30 und 70 °C, variierend in 10 K-Schritten, für jeweils 6 h im Wasserbad bzw. bei 6 °C im Kühlschrank statt. Auftretende Veränderungen wie Trübungserscheinungen oder Phasentrennung wurden visuell bei der eingestellten Temperatur sowie nach Schütteln und Wiedereinstellung auf Raumtemperatur beurteilt.

6.4 Untersuchungen am Mehrschichtmembranmodell

Das MSMM diente der Untersuchung von ME-BIP^[HML0] sowie der 0,1 % DHAvD-haltigen Formulierungen (WHS, BuG/PeG-WHS, PeG-WHS, BuG-WHS, PrG-WHS, WWAS, BuG/PeG-WWAS und HDG).

Modellaufbau

Das MSMM (mechanische Werkstatt, Institut für Pharmazie, MLU Halle-Wittenberg, D) besteht aus Grund- und Deckplatte, zwischen denen mehrere Einzelzellen für Parallelbestimmungen fixiert sind. Jede dieser Zellen setzt sich aus zwei Polyacrylatscheiben

(Durchmesser 4 cm) zusammen, wobei die obere mit ihrer 4 cm² großen Aussparung als Schablone zur Auftragung der Formulierung auf eine definierte Membranfläche fungiert [132]. Zwischen Grundscheibe und Schablone wurden eine Nephrophan[®]-Membran und darauf drei DCM luftblasenfrei eingesetzt.

Herstellung der Dodecanol-Collodium-Membranen (DCM)

110 ml der Lösung (siehe Tabelle 23) wurden auf die Glasplatte des Filmziehgerätes (mechanische Werkstatt, Institut für Pharmazie, MLU Halle-Wittenberg, D) aufgetragen und mit Hilfe einer in definierter Spaltbreite mitlaufenden Schiene gleichmäßig verteilt. Nach Verdunstung der Lösungsmittel konnte ein ca. 30 cm x 50 cm großer Film abgezogen werden, aus dem mit einer Stanze einzelne Membranen ausgestochen wurden. Deren Lagerung erfolgte in einem klimatisierten Raum zwischen Filterpapier im Exsikkator.

Tabelle 23: Rezeptur zur Herstellung der Dodecanol-Collodium-Membranen.

Komponente	Einwaage / (g)
Dodecanol/Octanol 90/10 (DD)	8,0
Ether/Ethanol 85/15 (V/V)	zu 100,0
Collodium (4 %ig) DAC	zu 200,0

Die DCM, die einen Lipidgehalt von 67 % (m/m) aufwiesen, fanden sowohl im MSMM als auch in der ATR-Diffusionszelle Anwendung.

Versuchsdurchführung

10-15 mg der entsprechenden Formulierung, genau gewogen, wurden gleichmäßig auf die oberste Membran aufgebracht. Über die Löslichkeit der Modellarzneistoffe HMLO und DHAvD in DD sowie deren Konzentration in den applizierten Formulierungen konnten *Sink*-Bedingungen, d.h. Akzeptorauslastungen von maximal 10 bis 15 %, gewährleistet werden. Das zusammengesetzte Modell wurde bei 32 °C im Wasserbad (B6E1, Prüfgerätewerk, Medingen, D) für festgelegte Zeiten inkubiert. Außer bei Zellen, die der Bestimmung der Wiederfindung dienten, wurden die Rückstände der Formulierungen auf den oberen Membranen mit Zellstoff abgenommen. Im Falle der ME-BIP, des HDG sowie der Formulierungen auf WHS-Basis schloss sich eine 30-minütige Extraktion der separierten Membranen mit 2,0 ml Ethanol an (Laborschüttler GFL[®] 3006, Burgwedel, D). Bei WWAS-haltigen Vehikeln ging dem eine Behandlung der mit Lösungsmittel versetzten Membranen im Ultraschallbad (15 min, 60 °C, Bandelin Sonorex super RK 255H, Schalltec, Mörfelden-Walldorf, D) voraus.

Quantifizierung

Die Quantifizierung von HMLO bzw. DHAvD in den, wenn nötig filtrierten (0,45 µm Membranfilter), Proben erfolgte mit Hilfe der in Kapitel 6.9.1 beschriebenen HPLC-

Methoden. Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden ethanolische Standards mit einer DCM ausgeschüttelt (Methodenparameter siehe Tabelle 24).

Tabelle 24: Methodenparameter.

	Linearität / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) und Bestimmtheitsmaß		Präzision / (%)
HMLO	0,3 - 150	0,999	1,62
DHA _v D	0,1 - 10	0,999	2,70
IP	0,37 - 73,2	0,999	4,07
BP	1,13 - 226,8	0,999	1,05

Die Wiederfindungsraten im MSMM betragen $94,43 \% \pm 2,57 \%$ ($n = 20$) für HMLO, $101,4 \% \pm 10,1 \%$ ($n = 36$) für DHA_vD, $99,47 \% \pm 2,87 \%$ ($n = 12$) für IP und $100,50 \% \pm 3,34 \%$ ($n = 12$) für BP. Als Bezugswert diente der unter den gleichen Bedingungen bestimmte Gehalt der Substanzen in den Formulierungen.

6.5 FTIR-ATR Spektroskopie

Spektrometer und Messmodus

Die Diffusionsexperimente wurden am FTIR Spektrometer IFS 28 (Bruker optics, Ettlingen, D) durchgeführt, das mit einem DTGS-Detektor, einer horizontalen ATR-Einheit (Thermo Spectra Tech, Shelton, CT, USA) und einem Fresnel ZnSe Kristall (Einfallswinkel 45° , Durchmesser 20 mm, Thermo-Electron, Madison, WI, USA) ausgestattet war. Die Aufnahme der Spektren erfolgte in definierten Zeitabständen mit folgenden Parametern:

Anzahl Proben- und Hintergrundscans	32
Auflösung	2 cm^{-1}
Akquisitionsmodus	doppelseitig, vorwärts-rückwärts
Phasenauflösung	16
Phasen-Korrelationsmodus	Mertz
Zerofilling Faktor	2
Apodisationsfunktion	Blackman-Harris 3-Term

Zu Beginn jedes Experimentes ($n = 3$) wurde ein Hintergrundspektrum des leeren Kristalls bzw. der Diffusionszelle aufgenommen. Um Störungen durch Wasserdampf und CO_2 weitgehend zu verhindern, fand eine kontinuierliche Spülung der Messkammer mit trockener, CO_2 -armer Luft statt. Vor der Datenanalyse durchliefen die Spektren zusätzlich eine atmosphärische Kompensation von CO_2 und Wasserdampf, deren Algorithmus die Verwendung wasserhaltiger Proben berücksichtigte (OPUS 5.5 Software, Bruker optics, Ettlingen, D).

Versuchsanordnungen

In einem ersten Versuchsansatz lag eine DCM direkt und luftblasenfrei auf dem Kristall. Ca. 10 mg ME-BIP^[HMLO] wurden darauf appliziert. Da bei diesem Aufbau mit der Zeit der

optische Kontakt zwischen Membran und Kristall verloren ging, erfolgten weitere Experimente unter Nutzung der in [152, 154] detailliert beschriebenen ATR-Diffusionszelle (Abbildung 18, mechanische Werkstatt, Institut für Pharmazie, MLU Halle-Wittenberg, D). Deren Akzeptorvolumen betrug ca. 90 μL , die Diffusionsfläche besaß einen Durchmesser von 7 mm. Donatormedien (PrG-DD, BIP-DD sowie ME-BIP^[Metro]) wurden im Überschuss (ca. 500 μL) aufgetragen. Als Membran kamen DCM (Dicke ca. 24 μm) sowie isoliertes humanes Stratum corneum (SC) zum Einsatz. Letzteres entstammte der Mammareduktionsplastik einer Spenderin (Deutsches Institut für Zell- und Gewebeersatz, Berlin, D). Nach mechanischer Abtrennung von Fettgewebe direkt nach der Operation, lagerten die Hautstücke bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Isolierung des SC erfolgte nach KLIGMAN [245] mit 0,01 %iger Lösung von Trypsin in 0,5 %iger NaHCO_3 -Lösung bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf Filterpapier. Das abgelöste SC wurde mit destilliertem Wasser abgespült, mit einer Stanze in Stücke geeigneter Größe geschnitten, zwischen Filterpapierblättchen gefriergetrocknet (Alpha 2-4, Christ, Osterode, D) und bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Vor den Experimenten erfolgte die Rehydratisierung in Wasser für 24-30 h bei Raumtemperatur. In voll hydratisiertem Zustand betrug die SC-Dicke ca. 27 μm . Über das typische Spreitverhalten auf Wasser sowie eine mikroskopische Betrachtung wurde die Unversehrtheit des SC vor und nach jedem Versuch überprüft. Eine Analyse der Lipidzusammensetzung, die Aufschluss über komplexere morphologische Veränderungen geben könnte, war durch die nach Versuchsende anhaftenden Medien (Donator bzw. Akzeptor) nicht möglich. Zur Stabilisierung des SC beim Einbau in die Diffusionszelle war dessen Platzierung auf einem Polycarbonatfilter (Avestin[®] Porengröße 5000 nm, Dicke 11 μm , Avestin Europe, Mannheim, D) erforderlich. Voruntersuchungen ergaben, dass diese Filter keinen Einfluss auf den Diffusionsprozess ausüben. Als Akzeptormedien fungierten DD bzw. DDw.

Kalibrierung

Die Kalibrierung für Metronidazol, BIP, PrG und Wasser erfolgte mit einer separaten Messreihe durch Korrelation der IR-Banden der Stoffe mit deren Konzentrationen im Akzeptormedium (Multivariate Analyse, OPUS 5.5 Software, Bruker optics, Ettlingen, D). Dazu wurden zufällig zusammengesetzte Mischungen einer oder mehrerer Substanzen mit DD bzw. DDw (z.T. unter Zusatz von 5 % Tagat[®]O2/Synperonic[®]PE/L101 (2:3)) in die Diffusionszelle pipettiert und Spektren aufgenommen. Jede Mischung wurde mindestens dreimal aufgetragen. Nach Langzeitexperimenten erfolgte eine Überprüfung der Validität. Die Parameter der Kalibrierung einschließlich der Konzentrationsbereiche für jeden Stoff sind in Tabelle 25 aufgeführt. Vereinzelt überstiegen die in den Experimenten gefundenen Konzentrationen den mit der Kalibrierung abgedeckten Bereich. Dies wird auf die komplexen Solubilisierungseffekte im Akzeptor zurückgeführt, die bei der Herstellung der Kalibratoren nicht komplett simuliert werden konnten. Jedoch waren dadurch bedingte Veränderungen in den Korrelationen nicht zu erwarten. In die Methodenerstellung gingen

immer die Konzentrationen aller in den Kalibrierstandards enthaltenen Bestandteile ein. Während jedoch bei BIP, PrG und Metronidazol die Angabe des spektralen Bereiches der jeweiligen Komponente allein bzw. die Angabe der IR-Banden aller Komponenten in Parametern gleicher Güte resultierte, ergab Letztere für Wasser das einzig befriedigende Ergebnis.

Die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) wurden mittels linearer Regression (wahre vs. gefittete Kalibrierwerte) und Blindwertspektren erstellt. Die Berechnungen basierten auf einem Signal : Rausch-Verhältnis von 3:1 für LOD und 10:1 für LOQ.

Tabelle 25: Parameter der Kalibrierung der FTIR-ATR Penetrationsexperimente.

Komponente [Konzentrationsbereich / (mg·mL ⁻¹)]	Spektraler Bereich / (cm ⁻¹); Datenvorbehandlung	Anzahl Spektren / Anzahl Proben	Rang	R ²	RMSECV*	LOD / LOQ / (mg·mL ⁻¹)
BIP [0-90]	1758-1792; 1. Ableitung	132 / 42	4	99,95	0,0606	0,74 / 2,48
PrG [0-250]	822-858	139 / 42	3	99,95	0,162	3,85 / 12,24
Metronidazol [0-8]	1525-1554; 1. Ableitung	133 / 42	5	98,94	0,0191	0,58 / 1,93
Wasser [0-50]	822-858 (PrG) 1525-1553 (Metro) 1564-1675 (Wasser) 1762-1788 (BIP)	97 / 38	6	99,46	0,114	1,29 / 5,06

* Mittlerer Vorhersagefehler der Kreuzvalidierung (engl. *Root Mean Square Error of Cross Validation*)

Datenanalyse

Die Intensitätszunahme der substanzspezifischen IR-Banden wurde quantifiziert. Außerdem erfolgte eine Normierung der Daten zwischen 0 und 1, wobei jeweils die *Steady-state*-Konzentrationen $\equiv 1$ gesetzt wurden. Die Kurven ließen sich in der Regel als logistische Funktion entsprechend Gleichung 3 beschreiben (R² jeweils > 0,998).

$$c = c_2 + \frac{c_1 - c_2}{1 + \left(\frac{t}{t_{50\%}}\right)^p} \quad \text{Gleichung 3}$$

mit

- c₁ Anfangskonzentration (= 0),
- c₂ Endkonzentration (entspricht c_{ss}),
- t Zeit,
- p Exponent und
- t_{50%} Zeit am Wendepunkt der Kurve ($c_{(t_{50\%})} = \frac{c_1 + c_2}{2}$).

Im Fall von Wechselwirkungen zwischen Komponenten, die die Penetration deutlich beeinflussen, konnte der Gesamtverlauf über eine Fitfunktion, die aus der Summer zweier logistischer Funktionen hervorging, sehr gut beschrieben werden (Gleichung 4). Dabei waren die zugrunde liegenden Einzelprozesse separat darstellbar.

$$y = c_2 + \frac{c_1 - c_2}{1 + \left(\frac{t}{t_{50\%(1)}}\right)^p} + c_3 + \frac{c_4 - c_3}{1 + \left(\frac{t}{t_{50\%(2)}}\right)^q} \quad \text{Gleichung 4}$$

mit

T	Zeit,		
c ₁	Anfangskonzentration,	c ₃	fiktive Anfangskonzentration Teilprozess 2,
c ₂	Endkonzentration Teilprozess 1,	c ₄	fiktive Endkonzentration Teilprozess 2,
t _{50%(1)}	Wendepunkt Teilprozess 1,	t _{50%(2)}	Wendepunkt Teilprozess 2,
p	Exponent Teilprozess 1 und	q	Exponent Teilprozess 2.

Folgende Parameter dienen der Beschreibung der Kurvenverläufe:

Tabelle 26: Parameter zur Beschreibung der Diffusions- bzw. Penetrationsprozesse.

Parameter	Definition
c _{ss}	Konzentration im <i>steady state</i> (entspricht c ₂ in Gl. 3 bzw. (c ₂ -c ₁) + (c ₄ -c ₃) in Gl. 4).
t _{50%}	Zeit bei halbmaximaler Konzentration.
m(t _{50%})	Relativer Anstieg der Kurve bei t _{50%} berechnet über $\frac{p}{t_{50\%}}$ bei Fit nach Gl. 3 bzw. $\frac{p}{t_{50\%(1)}}$ und $\frac{q}{t_{50\%(2)}}$ für die Teilprozesse 1 und 2 bei Fit nach Gl. 4.
m(t _{50%}) _q	Quantitativer Anstieg der Kurve bei t _{50%} , berechnet über $\frac{(c_2 - c_1)}{4} \cdot \frac{p}{t_{50\%}}$ bei Fit nach Gl. 3 bzw. $\frac{(c_2 - c_1)}{4} \cdot \frac{p}{t_{50\%(1)}}$ und $\frac{(c_4 - c_3)}{4} \cdot \frac{q}{t_{50\%(2)}}$ für die Teilprozesse 1 und 2 bei Fit nach Gl. 4.
AUC _q , AUC _{norm}	Fläche unter der quantitativen (q) bzw. normierten (norm) Konzentrations-Zeit-Kurve, berechnet nach der Trapezregel.
ABC _{norm}	Fläche zwischen der normierten Konzentrations-Zeit-Kurve und deren 100 % Asymptote (c _{ss} ≡ 1).

6.6 Untersuchungen zu Penetration und Permeation an FRANZ-Diffusionszellen

6.6.1 Untersuchungen zur folliculären Penetration

Die folliculäre Penetration der 0,5 %igen ME-BIP^[HML0] wurde mit Hilfe von FRANZ-Zellen untersucht (Rettberg, Göttingen, D). Zur Anwendung kam Haut von ungebrühten Schweine-

ohren (Deutsches Hausschwein, 6 Monate alt). Die Präparation der gekühlt transportierten Schweineohren erfolgte am Tag der Schlachtung. Dazu wurden Stücke passender Größe ausgestanzt, die Behaarung mit einer Schere nahe an der Hautoberfläche abgeschnitten und das subkutane Fettgewebe mit einem Skalpell entfernt. Die vorsichtig gesäuberten Stücke lagerten bis zur Verwendung, einzeln in Aluminiumfolie verpackt, bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse innerhalb eines Modus zu gewährleisten, wurde mit der Haut eines Tieres gearbeitet.

Für die Versuche ($n = 4$) wurden die aufgetauten Hautstücke zwischen Donator und den mit ca. 15 mL (genau gewogen) PBS pH 7,4 befüllten, gerührten und auf $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperierten Akzeptor der FRANZ-Zellen eingespannt. Zum selektiven Verschluss der Follikel wurde nach der zehnmütigen Equilibrierung mit Hilfe einer Insulinspritze ein Tropfen Nagellack (Nr. 60, Manhattan, Stuttgart, D) gezielt in jede Follikelöffnung gesetzt. Um zu vermeiden, dass die Ergebnisse von der durch Lackbedeckung verkleinerten Hautfläche beeinflusst werden, wurde für die Referenzversuche ohne Follikelverschluss ein Lacktropfen neben jeden Follikel platziert (Abbildung 53) [161]. Im Durchschnitt befanden sich 35-45 Follikel pro cm^2 Haut. Die bildanalytische Auswertung ergab, dass durchschnittlich $18,6 \pm 3,6\%$ der Hautfläche von Lack bedeckt war (analysis auto, Olympus, Hamburg, D).

Die weitere Durchführung richtete sich nach dem Versuchsmodus.

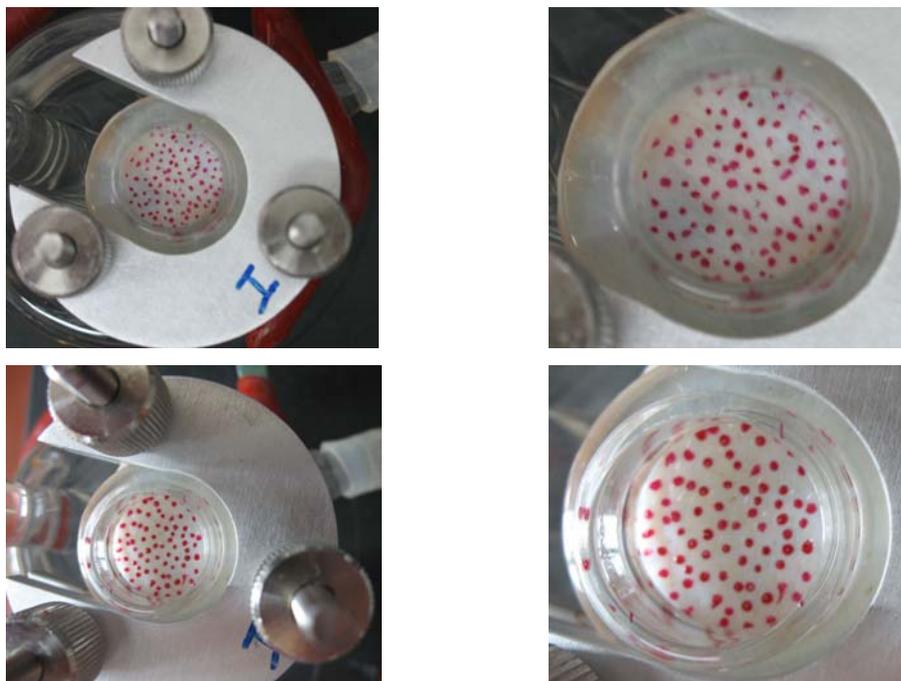


Abbildung 53: Versuchsanordnung mit (oben) und ohne (unten) Follikelverschluss.

Bei *Finite-dose*-Experimenten erfolgte die Auftragung von $5\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ ME-BIP^[HML0] (genau gewogen) auf die zur Verfügung stehende Fläche von 2 cm^2 . Am Ende der Versuchszeit von 30, 300 bzw. 1000 min wurden die nicht penetrierten Rückstände der Mikroemulsion mit Hilfe eines Tupfers abgewischt, die oberste Schicht des Stratum corneum durch einen Tesa[®]-

Abriss entfernt (dies zählt zum nicht penetrierten Rückstand [181]) und eine Hitzeseparation von Epidermis und Dermis (60 °C, 90 s in 2,0 mL PBS) durchgeführt.

Im Gegensatz dazu bedeutete *infinite dose* die Applikation von ca. 400 µL ME-BIP^[HMLO] (genau gewogen), die Entnahme von 1,0 mL Akzeptor in definierten Zeitabständen sowie deren Ersatz durch PBS.

Die Extraktion von HMLO, IP und BP aus den verschiedenen Matrices fand unter den in Tabelle 27 aufgelisteten Bedingungen statt. Akzeptorproben und PBS-Lösung aus der Hitzeseparation wurden der analytischen Bestimmung unverdünnt zugeführt.

Tabelle 27: Probenaufarbeitung bei den Penetrationsuntersuchungen.

Probe	Extraktionsmittel	Volumen	Behandlung der Proben	Dauer
Tupfer	Ethanol	1,0 mL	Schüttler	24 h
Tesa [®] -Abriss	Ethanol	0,5 mL	Schüttler	24 h
Epidermis	Ethanol	1,0 mL	Vortexer	2 h
			Kühlschrank	20,5 h
			Vortexer	1,5 h
Dermis	Ethanol	2,0 mL	Zerkleinerung mittels Skalpelle, Schüttler	24 h

Die Kalibrierung erfolgte mit ethanolhaltigen Standards (Methodenparameter siehe Tabelle 28). Vorversuche ergaben, dass extrahierte Hautbestandteile keinen Einfluss auf das chromatographische Verhalten der Analyten ausüben.

Tabelle 28: Methodenparameter.

	Linearität / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) und Bestimmtheitsmaß	Präzision / (%)
HMLO	0,1 - 10 (bzw. 75)	0,999
IP	0,122 - 24,4	0,999
BP	0,378 - 75,6	0,999

Die Parameter zur Charakterisierung der Permeation wurden aus der Auftragung der kumulativen Mengen der Substanzen im Akzeptor pro cm² Haut gegen die Zeit ermittelt [164]:

Steady-state-Flux als Anstieg des linearen Abschnittes über dessen lineare Regression (min. zehn Messpunkte, $R^2 \geq 0,998$), *lag time* als Schnittpunkt des linearen Abschnittes mit der x-Achse berechnet aus der Regressionsgleichung und Permeationskoeffizient berechnet aus dem Quotienten von Flux und applizierter Konzentration der Substanz.

6.6.2 Penetrationsstudien zu DHA_vD

Die Penetrationsuntersuchungen an den 0,2 % DHA_vD-haltigen Formulierungen fanden an der Universitätshautklinik mit FRANZ-Zellen (Crown Glass Company, Somerville, NJ, USA) bestückt mit humaner Vollhaut statt. Die Haut entstammte Mammareduktionsplastiken dreier Frauen (44, 61, 68 Jahre). Nach Reinigung mit PBS und mechanischer Entfernung des subkutanen Fettgewebes lagerten sie bis zur Verwendung bei -20 °C. Für die Experimente

wurden die aufgetauten Hautstücke mittels einer Gaze auf dem gerührten Akzeptor (20 mL PBS, pH 7,4, 32 °C) platziert. Nach Applikation definierter Mengen der Formulierungen (15 ± 2 mg Creme bzw. 20 µL Mikroemulsion) auf eine Fläche von 3,14 cm² erfolgte die Inkubation für 30, 300 bzw. 1000 min unter semi-okklusiven Bedingungen (n = 3). Der Entfernung der nicht penetrierten Vehikelrückstände mit einem Tupfer schloss sich die Präparation dreier Stanzbiopsien (á 0,2827 cm²) aus jedem Hautstück an, die anschließend mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (Jung, Heidelberg, D) in horizontale Schichten zerlegt wurden. Eine festgelegte Anzahl der aus der jeweiligen Stanze gewonnenen Schnitte wurde mit Methanol versetzt (Tabelle 29). Die Extraktionszeit von 22 h begann mit 1,5 h und endete mit 1 h des Vortexens (Reagenzglasmixer Vortex 7-2020, neoLab, Heidelberg, D). Dazwischen lagerten die Proben im Kühlschrank. Sofern kein klarer Überstand vorhanden war, wurden sie vor der Vermessung für 10 min zentrifugiert. Die Extraktion der Tupfer erfolgte mit 2,0 mL Methanol für 8 h auf einem Laborschüttler (GFL[®] 3006, Burgwedel). In den gewonnenen Proben wurden DHA_vD und ggf. IP und BP mit Hilfe von HPLC-Methoden quantifiziert (Kapitel 6.9.1). Während der Akzeptor nach Applikation der Mikroemulsionen direkt analysiert werden konnte, war im Falle der Cremes eine vorherige Aufkonzentrierung notwendig. Dazu wurden jeweils 2,0 mL des Akzeptors bei 45 °C im Trockenschrank (Typ E28, Binder, Tuttlingen, D) vollständig eingedampft und der Rückstand mit 500 µL Methanol/Wasser 80/20 (V/V) aufgenommen.

Tabelle 29: Aufarbeitung der Hautschnitte nach der Penetration DHA_vD-haltiger Formulierungen.

Hautprobe	Anzahl der Schnitte sowie Schichtdicke	Volumen Methanol zur Extraktion
Stratum corneum (SC)	1 x 10 µm	150 µL
Lebende Epidermis (EP)	4 x 20 µm	150 µL
Dermis 1-3 (DR1-3)	5 x 40 µm	150 µL
Dermis 4 (DR4)	15 x 40 µm	200 µL
Hautstumpf		200 µL

Die Herstellung der Standards für die Kalibriergerade erfolgte aus einer methanolischen Stammlösung unter Verwendung eines methanolischen Hautextraktes (Methodenparameter siehe Tabelle 30).

Tabelle 30: Methodenparameter.

	Linearität / (µg·mL ⁻¹) und Bestimmtheitsmaß		Präzision / (%)
DHA _v D	0,05 - 10	0,999	4,50
IP	0,012 - 12,2	0,999	4,75
BP	0,076 - 18,9	0,999	1,13

Die mittlere Wiederfindung von DHA_vD (berechnet aus Hautbiopsien, Tupfer und Akzeptor, jedoch ohne Gaze) betrug 77,3 ± 7,7 % der applizierten Dosis bei Auftragung der Cremes

und $78,2 \pm 16,0$ % bei Nutzung der Mikroemulsionen. Für IP lag sie in den betrachteten Zeiträumen bei $66,8 \pm 5,0$ % und für BP bei $66,1 \pm 5,8$ %.

6.7 In-vivo-Untersuchungen

Probanden

Die von der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin genehmigte Studie wurde an elf gesunden Freiwilligen (21-31 Jahre) durchgeführt, die zuvor ihr schriftliches Einverständnis gaben.

Applikation der Formulierungen

Die Durchführung erfolgte unter kontrollierten Bedingungen (konstante Temperatur und Luftfeuchtigkeit). Die Innenseiten der Unterarme der Probanden wurden vorsichtig gereinigt, bevor zwei Areale von je 5 cm x 6 cm markiert und mit einer Silikonbarriere zur Verhinderung der lateralen Ausbreitung der Formulierungen versehen wurden [246]. Mit einem vehikelgesättigten Fingerling wurden $2 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ 0,5 %ige ME-BIP^[Curc] bzw. BC^[Curc] gleichmäßig aufgetragen [247]. Während der Einwirkzeit blieb die Applikationsstelle unbedeckt.

Tape Stripping

Das *Tape Stripping* begann eine Stunde nach der Applikation. Ein Stück Tesa[®] Film Nr. 5529 (Beiersdorf, Hamburg, D) wurde auf die Hautstelle aufgelegt und mit einem Roller, der die Haut dehnte, um Furchen und Fältchen auszugleichen, angepresst. Jedes Tape wurde mit einer schnellen Bewegung abgezogen und auf einem Rahmen fixiert. Bei Proband Nr. 1 erfolgte die komplette Entfernung des Stratum corneum mit 80 Abrissen [248]. Da für beide Formulierungen in tieferen Zellschichten nur sehr wenig Curcumin zu detektieren war, beschränkte sich die Abnahme für die nachfolgenden Probanden auf 20 bzw. zehn Abrisse. Die Entfernung von zehn Tapes an einem unbehandelten Areal neben der Applikationsfläche ging in die Berechnung der Penetrationsprofile ein.

Analytik der Abrisse

Für die UV/VIS spektroskopischen Messungen kam das Zweistrahlenspektrometer Lambda 20 (Perkin-Elmer, Überlingen, D) mit einem quadratischen Strahl (10 mm x 10 mm) zum Einsatz. Die Pseudoabsorption der Korneozyten, die mit deren Menge korreliert, wurde selektiv bei 800 nm bestimmt. Danach wurden die Abrisse in 1,5 cm x 2,9 cm große Stücke geschnitten, mit 4,35 mL Ethanol für 10 min im Ultraschallbad (Sonorex Super RK102H, Bandelin Electronic, Berlin, D) extrahiert und zentrifugiert (4000 rpm, 10 min, MR1812, Jouan, Unterhaching, D). Im klaren Überstand wurde die Curcuminkonzentration bei 430 nm spektroskopisch ermittelt. Die Erstellung der Kalibriergerade erfolgte unter gleichen Bedingungen, wobei der Extrakt eines formulierungsfreien Abrisses als Referenz diente.

BIP wurde mit Hilfe der in Kapitel 6.9.1 beschriebenen HPLC-Methode als Summe von IP und BP quantifiziert. Die Kalibrierlösungen, hergestellt mit ethanolschen Extrakten von Tesa[®]-Abrissen, deckten den Konzentrationsbereich von 0,1 bis 50 µg·mL⁻¹ linear ab ($R^2 = 0,998$, Präzision: 2,53 %). Die mittlere Wiederfindung von BIP aus den Abrissen wurde anhand von Kontrollproben überprüft, die 0,5, 6,25 bzw. 25,0 µg BIP pro Tape, appliziert über ME-BIP^[Curc], enthielten. Sie lag zwischen 95,04 % und 100,84 % [249].

Erstellung der Penetrationsprofile

Die mittels Pseudoabsorption bestimmte Menge der an den Abrissen haftenden Korneozyten diente der Erstellung des SC-Profiles des Probanden 1. Die Summe der Absorptionen der 80 Tapes ergab 100 % Hornschichtdicke, die Pseudoabsorption jedes einzelnen Abrisses wurde dazu ins Verhältnis gesetzt. Bei den Probanden 2 bis 6 ging die Erstellung von dem in [250] publizierten Zusammenhang aus, dass mit zehn Abrissen an un behandelter Haut 38 % des gesamten SC abgenommen werden. Die Curcumin-Konzentrationen in den Tapes wurden an deren jeweiligen Positionen in das Hornschichtprofil eingefügt.

Cyanoacrylatabriss

Bei den Probanden 3-6 wurde nach Abnahme von 20 Tesa[®]-Abrissen eine kleine Menge an Sekundenkleber (UHU[®], Brühl, D) gleichmäßig auf dem behandelten Hautareal verteilt. Mit Hilfe eines Rollers wurde ein darauf gelegtes Stück Tesa[®] Film angepresst und nach ca. 3 min mit einer schnellen Bewegung abgerissen. An diesem Abriss hafteten Follikelinhalte sowie Korneozyten von tieferen SC-Schichten.

Laser Scanning Mikroskopie

Die Visualisierung der Verteilung des Curcumins auf den von Proband 1 abgenommenen Tesa[®]- sowie Cyanoacrylatabrissen erfolgte am LSM 2000 (Carl Zeiss, Jena, D) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Detektionswellenlänge von 590 nm. Es ergab sich kein Fluoreszenzsignal bei Abrissen un behandelter Haut.

Statistik

Der Kolmogorov-Smirnov Test belegte, dass die Daten der Probanden normalverteilt waren ($p < 0,05$, Software SPSS[®]). Daraufhin konnten Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet werden. Weitere statistische Auswertungen erfolgten entsprechend Kapitel 6.10.

6.8 HET-CAM Modell

Natürlich befruchtete Hühnereier der Rasse "New Hampshire" (Nutztierwissenschaftliches Zentrum Merbitz der MLU Halle-Wittenberg, Nauendorf, D) wurden sieben Tage bei 37,0 °C und 55 % Luftfeuchte bebrütet (Vitromat mytron, sbs-11, Heiligenstadt, D) und dabei bis auf die letzten 24 h aller 12 h gewendet. Am Ende der Brutzeit wurde die Eischale

am schwächer konvexen Pol vorsichtig eröffnet und die CAM mittels mikrochirurgischen Besteckes freigelegt. Zur Anwendung kamen nur Eier mit vitalem Embryo, intakter CAM und gut ausgebildetem Gefäßnetz. 100 µl der Testmedien wurden vorsichtig auf die CAM von jeweils zwölf Eiern appliziert. Zur Einschätzung der Perfusion der CAM erfolgte die Bestimmung des Laser-Doppler-Flux' (LDF) unter Nutzung einer speziellen, gefensterten Sonde mit einem Helium-Neon-Laser (632,8 nm, moor LDI Laser Doppler Imager, Moor Instruments, Devon, GB) vor und in definierten Zeitabständen nach der Auftragung. Aufgrund von Unterschieden in Zahl und Durchmesser der Blutgefäße sowie im Blutdruck kommt es zu individuellen Perfusionsdifferenzen. Durch die Berechnung des LDF-Index' wurden die Rohdaten für jedes Ei normiert und damit eine bessere Vergleichbarkeit gewährleistet:

$$LDF - Index = \frac{LDF_x}{LDF_0} \quad \text{Gleichung 5}$$

Dabei steht LDF_0 für den gemittelten LDF aus der zehnminütigen Messzeit vor Applikation der Testpräparation und LDF_x für den unter der Behandlung bestimmten LDF. Am Ende der Versuchszeit von 30 min wurden die Embryonen visuell auf Vitalparameter (Herzschlag) überprüft. Nach den Versuchen wurden alle Eier über 48 h bei -20 °C im Tiefkühlschrank gelagert, um die Abtötung der Embryonen sicherzustellen. Die abschließende hygienische Entsorgung fand über den Krankenhausmüll statt.

Die statistische Bewertung, in die nur die Ergebnisse der Kurzzeitexposition von 10 min eingingen, erfolgte durch einfaktorische Varianzanalyse (one-way ANOVA) und Dunnett's Test als Post-Hoc Analyse (inerSTAT-a V1.3) auf einem Signifikanzniveau von 99 %.

6.9 Analytik der Substanzen

6.9.1 HPLC-Methoden

Die Messungen wurden an der HPLC-Anlage HP 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, D), bestehend aus Vakuumentgaser, Autosampler, binärer Pumpe, Diodenarray-Detektor und Säulenofen, mit den nachfolgend aufgelisteten Parametern durchgeführt.

Tabelle 31: Parameter der HPLC-Analytik für die Quantifizierung von HMLO, IP, BP und DHAvD.

	HMLO	IP und BP	DHAvD
Stationäre Phase	CC 125/2 Nucleosil 120-3 C18 (Macherey-Nagel, Düren, D)	125x2 mm Nucleodur 100-5 C18 ec (Macherey-Nagel, Düren, D)	YMC-Pack ODS-AQ 150 x 4,0 i.d.; S-5 µm; 200 Å (YMC Europe, Dinslaken, D)
Mobile Phase:	90/10/0,1 (V/V)	60/40/0,1 (V/V)	60/40/0,1 (V/V)
MeOH/H ₂ O/HCOOH			
Flow / (mL·min ⁻¹)	0,4	0,3	0,8

Temperatur / (°C)	25	25	30
Injektionsvolumen / (µL)	5	5	6 (MSMM) bzw. 10 (FRANZ-Zelle)
UV-Detektion: λ / (nm)	313	298	224

Das Verhältnis von BP zu IP in der verwendeten Charge BIP wurde einmalig mit 75,6 % zu 24,4 % durch Kalibrierung mit reinem N-Butylphthalimid bestimmt. Es korrelierte mit dem Verhältnis der Peakflächen im Chromatogramm und wurde späteren Messungen, bei denen die Standards zur Kalibrierung mit BIP hergestellt wurden, zugrunde gelegt.

Methodenparameter

Die bei den verschiedenen Versuchen angegebenen Parameter wurden wie folgt definiert:

Linearität: Regressionsanalyse der Werte aus Dreifach-Injektionen mit mindestens fünf Konzentrationen im erwarteten Konzentrationsbereich der Proben.

Präzision: Die Wiederholpräzision wurde als Mittelwert der relativen Standardabweichung von Dreifachinjektionen dreier Konzentrationen bestimmt.

6.9.2 UV-Vis Spektroskopische Bestimmung

Die Quantifizierung von Curcumin zur Ermittlung der Sättigungslöslichkeiten erfolgte nach Verdünnung mit Ethanol am Spectronic 601 (Milton Roy Company, USA) bei einer Wellenlänge von 425 nm. Kalibriert wurde im Konzentrationsbereich $0,5\text{-}5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ mit ethanolischen Lösungen ($R^2 = 0,998$).

6.10 Statistische Auswertung

Soweit nicht anders angegeben erfolgte die Prüfung auf statistische Signifikanz mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (one-way ANOVA) gefolgt von *Tukey's multiple comparison* als post-hoc Analyse (inerSTAT-a V1.3). Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant gewertet. Regressionsanalysen wurden mit der Software Microsoft Excel 2002 durchgeführt.

7 Literatur

- [1] P. Fritsch, *Dermatologie und Venerologie: Grundlagen. Klinik. Atlas*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2004.
- [2] S.J. Bashir, H. Maibach, in: R. L. Bronaugh and H. Maibach (Eds.), *Percutaneous Absorption. Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*, Taylor & Francis, Boca Raton, 2005.
- [3] R.J. Scheuplein, I.H. Blank, Permeability of Skin. *Physiol Rev* 51(4) (1971) 702-747.
- [4] R.H.H. Neubert, W. Wohlrab, W.C. Marsch, *Dermatopharmazie. Vehikel-Wirkstoffe-Pharmakologie*, WVG, Stuttgart, 2001.
- [5] M.A. Lampe, M.L. Williams, P.M. Elias, Human epidermal lipids: characterization and modulations during differentiation. *J Lipid Res* 24(2) (1983) 131-140.
- [6] P.W. Wertz, The nature of the epidermal barrier: Biochemical aspects. *Adv Drug Deliver Rev* 18(3) (1996) 283-294.
- [7] R.R. Warner, M.C. Myers, D.A. Taylor, Electron probe analysis of human skin: determination of the water concentration profile. *J Invest Dermatol* 90(2) (1988) 218-224.
- [8] P.M. Elias, Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* 80 Suppl (1983) 44s-49s.
- [9] R. Wepf, R.H.H. Neubert, Stratum corneum - Struktur und Morphologie einer hoch effizienten Barriere. *Pharm Ztg* 152(17) (2007) 1506-1513.
- [10] Y.Y. Grams, J. Bouwstra, in: R. L. Bronaugh and H. Maibach (Eds.), *Percutaneous Absorption. Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*, Taylor & Francis, Boca Raton, 2005, pp. 177-191.
- [11] N. Otberg, H. Richter, H. Schaefer, U. Blume-Peytavi, W. Sterry, J. Lademann, Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. *J Invest Dermatol* 122(1) (2004) 14-19.
- [12] S. Pfeifer, P. Pfliegel, H.H. Borchert, *Biopharmazie: Pharmakokinetik, Bioverfügbarkeit, Biotransformation*, Ullstein Mosby GmbH, Berlin, Wiesbaden, 1995.
- [13] P. Langguth, G. Fricker, H. Wunderli-Allenspach, *Biopharmazie*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2004.
- [14] J. Hadgraft, Skin, the final frontier. *Int J Pharm* 224(1-2) (2001) 1-18.
- [15] B.C. Lippold, Kutane Resorption – Möglichkeiten, Modelle, Beeinflussung. *Acta Pharm Technol* 27(1) (1981) 1-9.
- [16] L. Landmann, The skin permeability barrier. *Pharm i u Zt* 20(4) (1991) 155-163.

- [17] B.W. Barry, Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J Control Release* 6 (1987) 85-97.
- [18] M.E. Meuwissen, J. Janssen, C. Cullander, H.E. Junginger, J.A. Bouwstra, A cross-section device to improve visualization of fluorescent probe penetration into the skin by confocal laser scanning microscopy. *Pharm Res* 15(2) (1998) 352-356.
- [19] O. Simonetti, A.J. Hoogstraate, W. Bialik, J.A. Kempenaar, A.H. Schrijvers, H.E. Bodde, M. Ponc, Visualization of diffusion pathways across the stratum corneum of native and in-vitro-reconstructed epidermis by confocal laser scanning microscopy. *Arch Dermatol Res* 287(5) (1995) 465-473.
- [20] R.O. Potts, R.H. Guy, Predicting skin permeability. *Pharm Res* 9(5) (1992) 663-669.
- [21] H.E. Bodde, I. Vandenbrink, H.K. Koerten, F.H.N. Dehaan, Visualization of in vitro percutaneous penetration of mercuric chloride: transport through intercellular space versus cellular uptake through desmosomes. *J Control Release* 15(3) (1991) 227-236.
- [22] A.J. Hoogstraate, J. Verhoef, J. Brussee, A.P. Ijzerman, F. Spies, H.E. Bodde, Kinetics, Ultrastructural aspects and molecular modeling of transdermal peptide flux enhancement by N-alkylazacycloheptanones. *Int J Pharm* 76(1-2) (1991) 37-47.
- [23] R. Neubert, U. Schmalfluss, W. Wohlrab, C. Huschka, Wirkstoffpenetration in die Haut und deren Modulation. *Pharm Ztg* 141(17) (1996) 1483-1493.
- [24] J. Lademann, N. Otberg, H. Richter, U. Jacobi, H. Schaefer, U. Blume-Peytavi, W. Sterry, Follicular penetration. An important pathway for topically applied substances. *Der Hautarzt* 54(4) (2003) 321-323.
- [25] J. Lademann, N. Otberg, H. Richter, H.J. Weigmann, U. Lindemann, H. Schaefer, W. Sterry, Investigation of follicular penetration of topically applied substances. *Skin Pharmacol Appl* 14 Suppl 1 (2001) 17-22.
- [26] J. Lademann, H. Weigmann, C. Rickmeyer, H. Barthelmes, H. Schaefer, G. Mueller, W. Sterry, Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. *Skin Pharmacol Appl* 12(5) (1999) 247-256.
- [27] J. Lademann, H. Richter, N. Otberg, F. Lawrenz, U. Blume-Peytavi, W. Sterry, Application of a dermatological laser scanning confocal microscope for investigation in skin physiology. *Laser Phys* 13(5) (2003) 756-760.
- [28] R.J. Scheuplein, Mechanism of percutaneous absorption. II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration. *J Invest Dermatol* 48(1) (1967) 79-88.
- [29] F. Hueber, J. Wepierre, H. Schaefer, Role of transepidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of hydrocortisone and testosterone – in vivo study in the hairless rat. *Skin Pharmacol* 5(2) (1992) 99-107.
- [30] H. Schaefer, J. Lademann, The role of follicular penetration. A differential view. *Skin Pharmacol Appl* 14 Suppl 1 (2001) 23-27.

- [31] T. Ogiso, T. Shiraki, K. Okajima, T. Tanino, M. Iwaki, T. Wada, Transfollicular drug delivery: Penetration of drugs through human scalp skin and comparison of penetration between scalp and abdominal skins in vitro. *J Drug Target* 10(5) (2002) 369-378.
- [32] Y.Y. Grams, S. Alaruikka, L. Lashley, J. Caussin, L. Whitehead, J.A. Bouwstra, Permeant lipophilicity and vehicle composition influence accumulation of dyes in hair follicles of human skin. *Eur J Pharm Sci* 18(5) (2003) 329-336.
- [33] R. Toll, U. Jacobi, H. Richter, J. Lademann, H. Schaefer, U. Blume-Peytavi, Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. *J Invest Dermatol* 123(1) (2004) 168-176.
- [34] N. Otberg, A. Teichmann, U. Rasuljev, R. Sinkgraven, W. Sterry, J. Lademann, Follicular penetration of topically applied caffeine via a shampoo formulation. *Skin Pharmacol Physiol* 20(4) (2007) 195-198.
- [35] N. Otberg, A. Patzelt, U. Rasulev, T. Hagemeister, M. Linscheid, R. Sinkgraven, W. Sterry, J. Lademann, The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine. *Brit J Clin Pharmacol* 65(4) (2008) 488-492.
- [36] Y. Frum, M.C. Bonner, G.M. Eccleston, V.M. Meidan, The influence of drug partition coefficient on follicular penetration: in vitro human skin studies. *Eur J Pharm Sci* 30(3-4) (2007) 280-287.
- [37] F. Knorr, J. Lademann, A. Patzelt, W. Sterry, U. Blume-Peytavi, A. Vogt, Follicular transport route – research progress and future perspectives. *Eur J Pharm Biopharm* 71(2) (2009) 173-180.
- [38] B.W. Barry, Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci* 14(2) (2001) 101-114.
- [39] R. Daniels, Strategien zur Verbesserung der Hautpenetration. *Skin Care Forum* 37 (2004).
- [40] H. Trommer, R.H. Neubert, Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacol Physiol* 19(2) (2006) 106-121.
- [41] A.C. Williams, B.W. Barry, Penetration enhancers. *Adv Drug Deliver Rev* 56(5) (2004) 603-618.
- [42] T.P. Hoar, J.H. Schulman, Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydro-micelle. *Nature* 152 (1943) 102-103.
- [43] I. Danielsson, B. Lindman, The definition of microemulsion. *Colloid Surface* 3(4) (1981) 391-392.
- [44] S.P. Moulik, B.K. Paul, Structure, dynamics and transport properties of microemulsions. *Adv Colloid Interfac* 78(2) (1998) 99-195.
- [45] G.M. Eccleston, in: J. Swarbrick and J. C. Boylan (Eds.), *Encyclopedia of pharmaceutical technology*, Vol. 9, Marcel Dekker, New York, 1994.

- [46] M.J. Lawrence, G.D. Rees, Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliver Rev* 45(1) (2000) 89-121.
- [47] P.G. De Gennes, C. Taupin, Microemulsions and the flexibility of oil/water interfaces. *J Phys Chem-US* 86(13) (1982) 2294-2304.
- [48] D. Attwood, in: J. Kreuter (Ed.), *Colloidal Drug Carrier Systems*, Vol. 66, Marcel Dekker, New York, 1994.
- [49] R. Cavalli, E. Marengo, O. Caputo, E. Ugazio, R. Gasco Maria, The effect of alcohols with different structures on the formation of warm o/w microemulsions. *J Disper Sci Technol* 17(7) (1996) 717-734.
- [50] A.C. Lam, R.S. Schechter, The theory of diffusion in microemulsion. *J Colloid Interf Sci* 120(1) (1987) 56-63.
- [51] L.E. Scriven, Equilibrium bicontinuous structure. *Nature* 263(5573) (1976) 123-125.
- [52] M. Kreilgaard, Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Adv Drug Deliver Rev* 54 Suppl 1 (2002) S77-98.
- [53] B.W. Mueller, P. Kleinebudde, So-called microemulsion systems. Part 1. Drug-free systems. *Pharm Ind* 50(3) (1988) 370-375.
- [54] S. Keipert, I. Siebenbrodt, F. Lueders, M. Bornschein, Mikroemulsionen und ihre potentielle pharmazeutische Nutzung. *Pharmazie* 44(7) (1989) 433-444.
- [55] J.H. Schulman, W. Stoeckenius, L.M. Price, Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy. *J Phys Chem-US* 63 (1959) 1677-1680.
- [56] J.M. Kovarik, E.A. Mueller, J.B. Vanbree, W. Tetzloff, K. Kutz, Reduced interindividual and intraindividual variability in cyclosporine pharmacokinetics from a microemulsion formulation. *J Pharm Sci* 83(3) (1994) 444-446.
- [57] E.A. Mueller, J.M. Kovarik, J.B. Vanbree, W. Tetzloff, J. Grevel, K. Kutz, Improved dose linearity of cyclosporine pharmacokinetics from a microemulsion formulation. *Pharm Res* 11(2) (1994) 301-304.
- [58] J.M. Sarciaux, L. Acar, P.A. Sado, Using microemulsion formulations for oral drug delivery of therapeutic peptides. *Int J Pharm* 120(2) (1995) 127-136.
- [59] S.A. Veltkamp, B. Thijssen, J.S. Garrigue, G. Lambert, F. Lallemand, F. Binlich, A.D.R. Huitema, B. Nuijen, A. Nol, J.H. Beijnen, J.H.M. Schellens, A novel self-microemulsifying formulation of paclitaxel for oral administration to patients with advanced cancer. *Brit J Cancer* 95(6) (2006) 729-734.
- [60] A.A. Date, M.S. Nagarsenker, Parenteral microemulsions: An overview. *Int J Pharm* 355(1-2) (2008) 19-30.
- [61] T.F. Vandamme, Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. *Prog Retin Eye Res* 21(1) (2002) 15-34.
- [62] R.G. Alany, T. Rades, J. Nicoll, I.G. Tucker, N.M. Davies, W/O microemulsions for ocular delivery: evaluation of ocular irritation and precorneal retention. *J Control Release* 111(1-2) (2006) 145-152.

- [63] Y. Baspinar, E. Bertelmann, U. Pleyer, G. Buech, I. Siebenbrodt, H.H. Borchert, Corneal permeation studies of everolimus microemulsion. *J Ocul Pharmacol Th* 24(4) (2008) 399-402.
- [64] S. Heuschkel, A. Goebel, R.H.H. Neubert, Microemulsions - Modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery. *J Pharm Sci* 97(2) (2008) 603-631.
- [65] M.B. Delgado-Charro, G. Iglesias-Vilas, J. Blanco-Mendez, M.A. Lopez-Quintela, J.P. Marty, R.H. Guy, Delivery of a hydrophilic solute through the skin from novel microemulsion systems. *Eur J Pharm Biopharm* 43(1) (1997) 37-42.
- [66] M. Kreilgaard, E.J. Pedersen, J.W. Jaroszewski, NMR characterisation and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems. *J Control Release* 69(3) (2000) 421-433.
- [67] L. Hua, P. Weisan, L. Jiayu, L. Hongfei, Preparation and evaluation of microemulsion of vinpocetine for transdermal delivery. *Pharmazie* 59(4) (2004) 274-278.
- [68] A.C. Sintov, L. Shapiro, New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. *J Control Release* 95(2) (2004) 173-183.
- [69] Y.S. Rhee, J.G. Choi, E.S. Park, S.C. Chi, Transdermal delivery of ketoprofen using microemulsions. *Int J Pharm* 228(1-2) (2001) 161-170.
- [70] G. Ktistis, I. Niopas, A study on the in-vitro percutaneous absorption of propranolol from disperse systems. *J Pharm Pharmacol* 50(4) (1998) 413-418.
- [71] H. Chen, X. Chang, T. Weng, X. Zhao, Z. Gao, Y. Yang, H. Xu, X. Yang, A study of microemulsion systems for transdermal delivery of triptolide. *J Control Release* 98(3) (2004) 427-436.
- [72] Y. Yuan, S.-M. Li, F.-K. Mo, D.-F. Zhong, Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of meloxicam. *Int J Pharm* 321(1-2) (2006) 117-123.
- [73] H. Chen, X. Chang, D. Du, J. Li, H. Xu, X. Yang, Microemulsion-based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery. *Int J Pharm* 315(1-2) (2006) 52-58.
- [74] L. Hua, P. Weisan, L. Jiayu, Z. Ying, Preparation, Evaluation, and NMR Characterization of vinpocetine microemulsion for transdermal delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 30(6) (2004) 657-666.
- [75] D.W. Osborne, A.J. Ward, K.J. O'Neill, Microemulsions as topical drug delivery vehicles: in-vitro transdermal studies of a model hydrophilic drug. *J Pharm Pharmacol* 43(6) (1991) 450-454.
- [76] M. Changez, M. Varshney, J. Chander, A.K. Dinda, Effect of the composition of lecithin/n-propanol/isopropyl myristate/water microemulsions on barrier properties of mice skin for transdermal permeation of tetracaine hydrochloride: In vitro. *Colloid Surface B* 50(1) (2006) 18-25.

- [77] B. Biruss, C. Valenta, The advantage of polymer addition to a non-ionic oil in water microemulsion for the dermal delivery of progesterone. *Int J Pharm* 349(1-2) (2008) 269-273.
- [78] C. Valenta, K. Schultz, Influence of carrageenan on the rheology and skin permeation of microemulsion formulations. *J Control Release* 95(2) (2004) 257-265.
- [79] D. Capitani, A.L. Segre, G. Haering, P.L. Luisi, Mobility Measurements in Microemulsion Gels. *J Phys Chem-US* 92(12) (1988) 3500-3504.
- [80] M. Gradzielski, H. Hoffmann, in: P. Kumar and K. L. Mittal (Eds.), *Handbook of Microemulsion Science and Technology*, Marcel Dekker, New York, 1999, pp. 357-386.
- [81] K. Kriwet, C.C. Mueller-Goymann, Diclofenac release from phospholipid drug systems and permeation through excised human stratum corneum. *Int J Pharm* 125(2) (1995) 231-242.
- [82] M.A. Bolzinger, S. Briancon, J. Pelletier, H. Fessi, Y. Chevalier, Percutaneous release of caffeine from microemulsion, emulsion and gel dosage forms. *Eur J Pharm Biopharm* 68(2) (2008) 446-451.
- [83] P.J. Lee, R. Langer, V.P. Shastri, Novel microemulsion enhancer formulation for simultaneous transdermal delivery of hydrophilic and hydrophobic drugs. *Pharm Res* 20(2) (2003) 264-269.
- [84] S. Peltola, P. Saarinen-Savolainen, J. Kiesvaara, T.M. Suhonen, A. Urtili, Microemulsions for topical delivery of estradiol. *Int J Pharm* 254(2) (2003) 99-107.
- [85] J. Kemken, A. Ziegler, B.W. Muller, Investigations into the pharmacodynamic effects of dermally administered microemulsions containing beta-blockers. *J Pharm Pharmacol* 43(10) (1991) 679-684.
- [86] J. Kemken, A. Ziegler, B.W. Mueller, Influence of supersaturation on the pharmacodynamic effect of bupranolol after dermal administration using microemulsions as vehicle. *Pharm Res* 9(4) (1992) 554-558.
- [87] M. Trotta, S. Morel, M.R. Gasco, Effect of oil phase composition on the skin permeation of felodipine from o/w microemulsions. *Pharmazie* 52(1) (1997) 50-53.
- [88] S. Wiedersberg, C.S. Leopold, R.H. Guy, Dermatopharmacokinetics of betamethasone 17-valerate: Influence of formulation viscosity and skin surface cleaning procedure. *Eur J Pharm Biopharm* 71 (2009) 362-366.
- [89] E.E. Linn, R.C. Pohland, T.K. Byrd, Microemulsion for intradermal delivery of cetyl alcohol and octyl dimethyl PABA. *Drug Dev Ind Pharm* 16(6) (1990) 899-920.
- [90] O. Simonetti, A.J. Hoogstraate, W. Bialik, J.A. Kempenaar, A.H.G.J. Schrijvers, H.E. Bodde, M. Ponc, Visualization of diffusion pathways across the stratum corneum of native and in-vitro-reconstructed epidermis by confocal laser-scanning microscopy. *Arch Dermatol Res* 287(5) (1995) 465-473.

- [91] J. Lademann, F. Knorr, H. Richter, U. Blume-Peytavi, A. Vogt, C. Antoniou, W. Sterry, A. Patzelt, Hair follicles – an efficient storage and penetration pathway for topically applied substances. Summary of recent results obtained at the Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology, Charite - Universitätsmedizin Berlin, Germany. *Skin Pharmacol Physiol* 21(3) (2008) 150-155.
- [92] S.S. Biju, A. Ahuja, R.K. Khar, Tea tree oil concentration in follicular casts after topical delivery: determination by high-performance thin layer chromatography using a perfused bovine udder model. *J Pharm Sci* 94(2) (2005) 240-245.
- [93] D. Paolino, C.A. Ventura, S. Nistico, G. Puglisi, M. Fresta, Lecithin microemulsions for the topical administration of ketoprofen: percutaneous adsorption through human skin and in vivo human skin tolerability. *Int J Pharm* 244(1-2) (2002) 21-31.
- [94] U. Schmalfuss, R. Neubert, W. Wohlrab, Modification of drug penetration into human skin using microemulsions. *J Control Release* 46(3) (1997) 279-285.
- [95] M.R. Gasco, M. Gallarate, F. Pattarino, In vitro permeation of azelaic acid from viscosized microemulsions. *Int J Pharm* 69(3) (1991) 193-196.
- [96] F. Pattarino, M.E. Carlotti, M.R. Gasco, Topical delivery systems for azelaic acid: effect of the suspended drug in microemulsion. *Pharmazie* 49(1) (1994) 72-73.
- [97] K. Jahn, Moderne galenische Zubereitungen zur dermalen Anwendung von Ciclosporin A und Mycophenolatmofetil. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2002.
- [98] H.P. Fiedler, Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete, Editio Cantor Verlag, Aulendorf, Germany, 2002.
- [99] Synperonic PE-Spezifikationen, C.H. Erbslöh, Krefeld.
- [100] Europäisches Arzneibuch, Amtliche Deutsche Ausgabe, 6. Ausgabe, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, Govi-Verlag, Eschborn, 2008.
- [101] S. Heuschkel, Mikroemulsionen zur dermalen Anwendung des 5-Lipoxygenaseinhibitors 2'-Hydroxy-5'-methyl-laurophenoxim. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2002.
- [102] SciFinderScholar TM2006. Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V8.14 for Solaris, 2006.
- [103] RIPT study, Final Report, Phoenix Chemical Inc., Somerville, NJ, USA, 2000.
- [104] Phenomenon, Phoenix Chemical Inc, Somerville, NJ, USA, 2000.
- [105] R.G. Alany, I.G. Tucker, N.M. Davies, T. Rades, Characterizing colloidal structures of pseudoternary phase diagrams formed by oil/water/amphiphile systems. *Drug Dev Ind Pharm* 27(1) (2001) 31-38.
- [106] F. Podlogar, M. Gasperlin, M. Tomsic, A. Jamnik, M.B. Rogac, Structural characterisation of water-Tween 40/Imwitor 308-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods. *Int J Pharm* 276(1-2) (2004) 115-128.

- [107] R.G. Alany, T. Rades, S. Agatonovic-Kustrin, N.M. Davies, I.G. Tucker, Effects of alcohols and diols on the phase behaviour of quaternary systems. *Int J Pharm* 196(2) (2000) 141-145.
- [108] A.N. Martin, *Physikalische Pharmazie: pharmazeutisch angewandte physikalisch-chemische Grundlagen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2002.
- [109] L. Djordjevic, M. Primorac, M. Stupar, D. Krajisnik, Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. *Int J Pharm* 271(1-2) (2004) 11-19.
- [110] K. Vorkel, *Entwicklung und Charakterisierung eines kolloidalen Vehikels für die dermale Applikation von Vitaminen sowie deren Quantifizierung mittels HPLC*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2005.
- [111] J.R. Bellare, M.M. Haridas, X.J. Li, in: P. Kumar and K. L. Mittal (Eds.), *Handbook of Microemulsion Science and Technology*, Marcel Dekker, New York, 1999, pp. 411-436.
- [112] W. Jahn, R. Strey, Microstructure of microemulsions by freeze fracture electron microscopy. *J Phys Chem-US* 92(8) (1988) 2294-2301.
- [113] D.G. Robinson, U. Ehlers, R. Herken, B. Herrmann, F. Mayer, S. F.W., in: D. G. Robinson, U. Ehlers, R. Herken, B. Herrmann, F. Mayer and S. F.W. (Eds.), *Präparationsmethodik in der Elektronenmikroskopie*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio, 1985, pp. 23-102.
- [114] H. Junginger, W. Heering, Darstellung kolloidaler Strukturen von Salben, Cremes, Emulsionen und Mikroemulsionen mittels Gefrierbruch-Ätztechnik und TEM. *Acta Pharm Technol* 29(2) (1983) 85-96.
- [115] D. Langevin, J. Rouch, in: P. Kumar and K. L. Mittal (Eds.), *Handbook of Microemulsion Science and Technology*, Marcel Dekker, New York, 1999, pp. 387-410.
- [116] H. Saint Ruth, D. Attwood, G. Ktistis, C.J. Taylor, Phase studies and particle size analysis of oil-in-water phospholipid microemulsions. *Int J Pharm* 116(2) (1995) 253-261.
- [117] D. Attwood, G. Ktistis, A light scattering study on oil-in-water microemulsions. *Int J Pharm* 52(2) (1989) 165-171.
- [118] E. Sjoblom, S. Friberg, Light-scattering and electron microscopy determinations of associated structure in W/O microemulsions. *J Colloid Interf Sci* 67(1) (1978) 16-30.
- [119] A. Shukla, A. Krause, R.H.H. Neubert, Microemulsions as colloidal vehicle systems for dermal drug delivery. Part IV: Investigation of microemulsion systems based on a eutectic mixture of lidocaine and prilocaine as the colloidal phase by dynamic light scattering. *J Pharm Pharmacol* 55(6) (2003) 741-748.

- [120] A. Shukla, M. Janich, K. Jahn, R.H.H. Neubert, Microemulsions for dermal drug delivery studied by dynamic light scattering: Effect of interparticle interactions in oil-in-water microemulsions. *J Pharm Sci* 92(4) (2003) 730-738.
- [121] R.H. Müller, R. Schuhmann, Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1996.
- [122] A. Shukla, M. Janich, K. Jahn, A. Krause, M.A. Kiselev, R.H.H. Neubert, Investigation of pharmaceutical oil/water microemulsions by small-angle scattering. *Pharm Res* 19(6) (2002) 881-886.
- [123] K. Maeder, Pharmazeutische Anwendungen der Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR). *PZ Prisma* 5(3) (1998) 202-212.
- [124] G. Jeschke, Einführung in die ESR-Spektroskopie. Skript. Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz, 1998.
- [125] D.J. Lurie, K. Maeder, Monitoring drug delivery processes by EPR and related techniques-principles and applications. *Adv Drug Deliver Rev* 57(8) (2005) 1171-1190.
- [126] A. Rube, Development and physico-chemical characterization of nanocapsules. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2006.
- [127] C. Kroll, Analytik, Stabilität und Biotransformation von Spinsonden sowie deren Einsatz im Rahmen pharmazeutisch-technologischer und biopharmazeutischer Untersuchungen. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, 1999.
- [128] K. Maeder, ESR-Untersuchungen an Mikroemulsionen und pharmazeutisch relevanten Polymeren. Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin, 1990.
- [129] A. Krause, Entwicklung und Charakterisierung von Mikroemulsionen zur dermalen Applikation von Arzneistoffen. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2001.
- [130] G. Häckh, E. Schwarzmüller, in: R. Niedner and J. Ziegenmeyer (Eds.), *Dermatika*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1992, pp. 309-473.
- [131] R. Rincker, in: R. Niedner and J. Ziegenmeyer (Eds.), *Dermatika*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1992, pp. 517-633.
- [132] 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.
- [133] C. Bendas, Entwicklung eines in-vitro-Membranmodells zur Beurteilung der Arzneistoffverfügbarkeit aus topischen Arzneiformen. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1991.
- [134] K. Jahn, A. Fischer, R.H.H. Neubert, J. Wohlrab, Investigation of the penetration behavior of mycophenolate mofetil from a semisolid formulation into human skin ex vivo. *J Pharm Pharmacol* 53(12) (2001) 1581-1587.

- [135] D.L. da Silva, S.B. Thiago, F.A. Pessoa, Y. Mrestani, H.H. Ruettinger, J. Wohlrab, R.H. Neubert, Penetration profile of taurine in the human skin and its distribution in skin layers. *Pharm Res* 25(8) (2008) 1846-1850.
- [136] B. Bendas, U. Schmalfuss, R. Neubert, Influence of propylene glycol as cosolvent on mechanisms of drug transport from hydrogels. *Int J Pharm* 116(1) (1995) 19-30.
- [137] Sicherheitsdatenblatt RonaCare™ LPO, Merck, Darmstadt, 2001.
- [138] C. Tscheuschner, Verbesserung der Absorption des Wirkstoffes 2'-Hydroxy-5'-Methyl-Laurophenonoxim (F5) durch Herstellung von Prodrugs und Zubereitungen. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1996.
- [139] T.J. Franz, The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption in man. *Curr Probl Dermatol* 7 (1978) 58-68.
- [140] S. Wartewig, R.H. Neubert, Pharmaceutical applications of mid-IR and raman spectroscopy. *Adv Drug Deliver Rev* 57(8) (2005) 1144-1170.
- [141] H. Günzler, H.-U. Gremlich, IR-Spektroskopie - Eine Einführung, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003.
- [142] A.L. Stinchcomb, F. Pirot, G.D. Touraille, A.L. Bunge, R.H. Guy, Chemical uptake into human stratum corneum in vivo from volatile and non-volatile solvents. *Pharm Res* 16(8) (1999) 1288-1293.
- [143] M.A. Pellett, A.C. Watkinson, J. Hadgraft, K.R. Brain, Comparison of permeability data from traditional diffusion cells and ATR-FTIR spectroscopy. 1. Synthetic membranes. *Int J Pharm* 154(2) (1997) 205-215.
- [144] M.A. Pellett, A.C. Watkinson, J. Hadgraft, K.R. Brain, Comparison of permeability data from traditional diffusion cells and ATR-FTIR spectroscopy. 2. Determination of diffusional pathlengths in synthetic membranes and human stratum corneum. *Int J Pharm* 154(2) (1997) 217-227.
- [145] 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(10) (1993) 1500-1506.
- [146] 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(1) (2004) 186-196.
- [147] J. Bodzenta, A. Kazmierczak, B.D. Hanh, R.H.H. Neubert, S. Wartewig, Investigation of drugs diffusion into collodion membranes using FTIR-ATR and step-scan FTIR-PAS techniques. *Instrum Sci Technol* 34(1-2) (2006) 107-117.
- [148] 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(1-2) (2000) 145-150.

- [149] B.D. Hanh, R.H. Neubert, S. Wartewig, Investigation of drug release from suspension using FTIR-ATR technique: part II. Determination of dissolution coefficient of drugs. *Int J Pharm* 204(1-2) (2000) 151-158.
- [150] A. Schendzielorz, B.D. Hanh, R.H.H. Neubert, S. Wartewig, Penetration studies of clotrimazole from semisolid formulation using step-scan FT-IR photoacoustic spectroscopy. *Pharm Res* 16(1) (1999) 42-45.
- [151] U. Guenther, I. Smirnova, R.H. Neubert, Hydrophilic silica aerogels as dermal drug delivery systems – dithranol as a model drug. *Eur J Pharm Biopharm* 69(3) (2008) 935-942.
- [152] M. Hartmann, Nichtinvasive Diffusionsuntersuchungen wässriger harnstoffhaltiger Systeme an künstlichen und biologischen Membranen. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2005.
- [153] K.C. Farinas, L. Doh, S. Venkatraman, R.O. Potts, Characterization of Solute Diffusion in a Polymer Using ATR-FTIR spectroscopy and bulk transport techniques. *Macromolecules* 27(18) (1994) 5220-5222.
- [154] 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(10) (2004) 902-905.
- [155] C. Surber, K.P. Wilhelm, M. Hori, H.I. Maibach, R.H. Guy, Optimization of topical therapy: partitioning of drugs into stratum corneum. *Pharm Res* 7(12) (1990) 1320-1324.
- [156] J. Hadgraft, Modulation of the barrier function of the skin. *Skin Pharmacol Appl* 14(Suppl 1) (2001) 72-81.
- [157] M. Buggert, Modellierung von Verteilungskoeffizienten pharmazeutischer Wirkstoffe in kolloidalen Systemen. Dissertation, TU Berlin, 2008.
- [158] U. Günther, Dissertation in Vorbereitung, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2009.
- [159] B. Mollgaard, A. Hoelgaard, Vehicle effect on topical drug delivery. II. Concurrent skin transport of drugs and vehicle components. *Acta Pharm Suec* 20(6) (1983) 443-450.
- [160] M. Changez, J. Chander, A.K. Dinda, Transdermal permeation of tetracaine hydrochloride by lecithin microemulsion: In vivo. *Colloid Surface B* 48(1) (2006) 58-66.
- [161] A. Teichmann, N. Otberg, U. Jacobi, W. Sterry, J. Lademann, Follicular penetration: development of a method to block the follicles selectively against the penetration of topically applied substances. *Skin Pharmacol Physiol* 19(4) (2006) 216-223.
- [162] A. Patzelt, H. Richter, R. Buettemeyer, H.J. Huber, U. Blume-Peytavi, W. Sterry, J. Lademann, Differential stripping demonstrates a significant reduction of the hair

- follicle reservoir in vitro compared to in vivo. *Eur J Pharm Biopharm* 70(1) (2008) 234-238.
- [163] T.J. Franz, Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol* 64(3) (1975) 190-195.
- [164] OECD, Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No.28, OECD Document ENV/JM/MONO(2004)2, Paris, 2004.
- [165] SCCNFP, Basic criteria for the in vitro Assessment of Dermal Absorption of Cosmetic Ingredients. The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers, SCCNFP/0750/03, 2003.
- [166] N. Sekkat, Y.N. Kalia, R.H. Guy, Biophysical study of porcine ear skin in vitro and its comparison to human skin in vivo. *J Pharm Sci* 91(11) (2002) 2376-2381.
- [167] U. Jacobi, M. Kaiser, R. Toll, S. Mangelsdorf, H. Audring, N. Otberg, W. Sterry, J. Lademann, Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Skin Res Technol* 13(1) (2007) 19-24.
- [168] N. Sekkat, R.H. Guy, Biological models to study skin permeation. *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research: Biological, Physicochemical, and Computational Strategies*, LogP2000, 2nd Lipophilicity Symposium, Lausanne 2000 (2001) 155-172.
- [169] R.L. Bronaugh, R.F. Stewart, Methods for in vitro percutaneous absorption studies III: hydrophobic compounds. *J Pharm Sci* 73(9) (1984) 1255-1258.
- [170] C. Surber, K.P. Wilhelm, H.I. Maibach, In-vitro skin pharmacokinetics of acitretin: percutaneous absorption studies in intact and modified skin from three different species using different receptor solutions. *J Pharm Pharmacol* 43(12) (1991) 836-840.
- [171] A. Teichmann, U. Jacobi, M. Ossadnik, H. Richter, S. Koch, W. Sterry, J. Lademann, Differential stripping: Determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. *J Invest Dermatol* 125(2) (2005) 264-269.
- [172] R.L. Bronaugh, S.W. Collier, in: F. N. Marzulli and H. Maibach (Eds.), *Dermatotoxicology*, Taylor & Francis, New York, 1991, pp. 61-74.
- [173] J. Lademann, H. Richter, A. Teichmann, N. Otberg, U. Blume-Peytavi, J. Luengo, B. Weiss, U.F. Schaefer, C.M. Lehr, R. Wepf, W. Sterry, Nanoparticles - An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *Eur J Pharm Biopharm* 66(2) (2007) 159-164.
- [174] J. Lademann, H. Richter, U.F. Schaefer, U. Blume-Peytavi, A. Teichmann, N. Otberg, W. Sterry, Hair follicles - a long-term reservoir for drug delivery. *Skin Pharmacol Physiol* 19(4) (2006) 232-236.
- [175] L.N. Li, R.M. Hoffman, Topical liposome delivery of molecules to hair follicles in mice. *J Dermatol Sci* 14(2) (1997) 101-108.

- [176] E. Tur, H.I. Maibach, R.H. Guy, Percutaneous penetration of methyl nicotinate at three anatomic sites: evidence for an appendageal contribution to transport? *Skin Pharmacol* 4(4) (1991) 230-234.
- [177] R.H. Guy, R.C. Wester, E. Tur, H.I. Maibach, Non-invasive assessments of the percutaneous absorption of methyl nicotinate in humans. *J Pharm Sci* 72(9) (1983) 1077-1079.
- [178] F. Hueber, H. Schaefer, J. Wepierre, Role of transepidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of steroids: in vitro studies on human skin. *Skin Pharmacol* 7(5) (1994) 237-244.
- [179] G. Presse, Study of the Penetration of Microemulsions into the Horny Layer by Applying the Tape Stripping Method. Diplomarbeit, Department of Dermatology, Charité - Universitätsmedizin Berlin; Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, 2004.
- [180] J.J. Escobar-Chavez, V. Merino-Sanjuan, M. Lopez-Cervantes, Z. Urban-Morlan, E. Pinon-Segundo, D. Quintanar-Guerrero, A. Ganem-Quintanar, The tape-stripping technique as a method for drug quantification in skin. *J Pharm Pharm Sci* 11(1) (2008) 104-130.
- [181] J. Lademann, U. Jacobi, C. Surber, H.J. Weigmann, J. Fluhr, The tape stripping procedure – evaluation of some critical parameters. *Eur J Pharm Biopharm* 72(2) (2009) 317-323.
- [182] R. Marks, R.P.R. Dawber, Skin surface biopsy – improved technique for examination of horny layer. *Brit J Dermatol* 84(2) (1971) 117-123.
- [183] A.Y. Finlay, R. Marks, Determination of corticoid concentration profiles in the stratum corneum using the skin surface biopsy technique. *Brit J Dermatol* 107, Suppl 22 (1982) 33.
- [184] U. Jacobi, T. Tassopoulos, C. Surber, J. Lademann, Cutaneous distribution and localization of dyes affected by vehicles all with different lipophilicity. *Arch Dermatol Res* 297(7) (2006) 303-310.
- [185] U. Jacobi, E. Waibler, W. Sterry, J. Lademann, In vivo determination of the long-term reservoir of the horny layer using laser scanning microscopy. *Laser Phys* 15(4) (2005) 565-569.
- [186] H. Ahsan, N. Parveen, N.U. Khan, S.M. Hadi, Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Chem-Biol Interact* 121(2) (1999) 161-175.
- [187] DAC/NRF, Govi Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn, DAV Stuttgart, 2006.
- [188] H. Öhman, A. Vahlquist, In vivo studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis. *Acta Derm-Venereol* 74(5) (1994) 375-379.
- [189] Sicherheitsdatenblatt Curcumin, Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, 2007.

- [190] G.K. Jayaprakasha, L.J.M. Rao, K.K. Sakariah, Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin. *J Agric Food Chem* 50(13) (2002) 3668-3672.
- [191] GRAS Notification Program. Title 21: Food and Drugs. Part 182 - Substances Generally Recognized as Safe. U.S. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2008.
- [192] A. Teichmann, S. Heuschkel, U. Jacobi, G. Presse, R.H. Neubert, W. Sterry, J. Lademann, Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. *Eur J Pharm Biopharm* 67(3) (2007) 699-706.
- [193] Deutsches Arzneibuch, DAV Stuttgart, Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn, 2006.
- [194] B. Bendas, R. Neubert, W. Wohlrab, in: E. W. Smith and H. Maibach (Eds.), *Percutaneous Penetration Enhancers*, CRC Press, Boca Raton, 1995, pp. 61-77.
- [195] R. Pillai, G. Schmaus, S. Lange, J. Roeding, 1,2-Pentanediol – a multifunctional ingredient for personal care applications. *SOFW Journal* 131(6) (2005) 13-17, 20-22.
- [196] R. Daniels, *Pharmaceutical technology: Gele für die dermale Applikation*. *Pharm Ztg* 147(43) (2002) 16-20.
- [197] J.J. Inglis, G. Criado, M. Andrews, M. Feldmann, R.O. Williams, M.L. Selley, The anti-allergic drug, N-(3',4'-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid, exhibits potent anti-inflammatory and analgesic properties in arthritis. *Rheumatology* 46(9) (2007) 1428-1432.
- [198] N. Hori, M. Fujii, K. Ikegami, D.-I. Momose, N. Saito, M. Matsumoto, Effect of tranilast oily gel on carrageenin-induced granulation in rats. *Biol Pharm Bull* 23(1) (2000) 80-83.
- [199] J.-S. Song, R. Jung Hai, H.-M. Kim, Effects of topical tranilast on corneal haze after photorefractive keratectomy. *J Cataract Refr Surg* 31(5) (2005) 1065-1073.
- [200] J. Vollhardt, D.A. Fielder, M. Redmond, Identification and cosmetic application of powerful anti-irritant constituents of oat grain. 21st IFSCC International Congress, Berlin, 2000, p. 395.
- [201] G. Schmaus, M. Herrmann, H. Joppe, S. Lange, O. Koch, R. Pillai, J. Röding, Dihydroavenanthramide D, a new highly efficient skin soothing agent with potent itch-relieving and redness-reducing properties. 24th IFSCC International Congress, Osaka, 2006, p. 36.
- [202] H. Wagner, K.H. Kostka, W. Adelhardt, U.F. Schaefer, Effects of various vehicles on the penetration of flufenamic acid into human skin. *Eur J Pharm Biopharm* 58(1) (2004) 121-129.

- [203] S. Schnittger, G. Schmaus, R. Pillai, J. Roeding, Use of 1,2-alkanediols in personal care formulations - closer look at antimicrobial activity. SSC Conference, New York, 2006.
- [204] G. Vielhaber, G. Schmaus, K. Jacobs, H. Franke, S. Lange, M. Herrmann, H. Joppe, O. Koch, 4-(1-Phenylethyl)1,3-Benzenediol: A new, highly efficient lightening agent. *IFSCC Magazine* 9(3) (2006) 227-234.
- [205] B.W. Barry, S.L. Bennett, Effect of penetration enhancers on the permeation of mannitol, hydrocortisone and progesterone through human skin. *J Pharm Pharmacol* 39(7) (1987) 535-546.
- [206] I. Brinkmann, C.C. Muller-Goymann, An attempt to clarify the influence of glycerol, propylene glycol, isopropyl myristate and a combination of propylene glycol and isopropyl myristate on human stratum corneum. *Pharmazie* 60(3) (2005) 215-220.
- [207] O. Diez-Sales, T.M. Garrigues, I. Herraiez, R. Belda, A. Martin-Villodre, M. Herraiez, In vitro percutaneous penetration of acyclovir from solvent systems and carbopol 971-P hydrogels: Influence of propylene glycol. *J Pharm Sci* 94(5) (2005) 1039-1047.
- [208] T. Murakami, M. Yoshioka, R. Yumoto, Y. Higashi, S. Shigeki, Y. Ikuta, N. Yata, Topical delivery of keloid therapeutic drug, tranilast, by combined use of oleic acid and propylene glycol as a penetration enhancer: evaluation by skin microdialysis in rats. *J Pharm Pharmacol* 50(1) (1998) 49-54.
- [209] B. Mollgaard, A. Hoelgaard, Vehicle effect on topical drug delivery. I. Influence of glycols and drug concentration on skin transport. *Acta Pharm Suec* 20(6) (1983) 433-442.
- [210] R. Panchagnula, P.S. Salve, N.S. Thomas, A.K. Jain, P. Ramarao, Transdermal delivery of naloxone: effect of water, propylene glycol, ethanol and their binary combinations on permeation through rat skin. *Int J Pharm* 219(1-2) (2001) 95-105.
- [211] K. Zhao, J. Singh, Mechanism(s) of in vitro percutaneous absorption enhancement of tamoxifen by enhancers. *J Pharm Sci* 89(6) (2000) 771-780.
- [212] K.J. Miller, Y.K. Rao, S.R. Goodwin, G.B. Westermannclark, D.O. Shah, Solubility and in Vitro Percutaneous Absorption of Tetracaine from Solvents of Propylene Glycol and Saline. *Int J Pharm* 98(1-3) (1993) 101-111.
- [213] A. Arellano, S. Santoyo, C. Martín, P. Ygartua, Influence of propylene glycol and isopropyl myristate on the in vitro percutaneous penetration of diclofenac sodium from carbopol gels. *Eur J Pharm Sci* 7(2) (1998) 129-135.
- [214] J.Y. Fang, T.L. Hwang, Y.L. Leu, Effect of enhancers and retarders on percutaneous absorption of flurbiprofen from hydrogels. *Int J Pharm* 250(2) (2003) 313-325.
- [215] J. Faergemann, B. Wahlstrand, T. Hedner, J. Johnsson, R.H.H. Neubert, L. Nystrom, H. Maibach, Pentane-1,5-diol as a percutaneous absorption enhancer. *Arch Dermatol Res* 297(6) (2005) 261-265.

- [216] A.K. Mitra, D.J. Wirtanen, The effect of skin penetration enhancers on the transdermal delivery of pyridostigmine bromide. *Drug Dev Ind Pharm* 15(11) (1989) 1855-1863.
- [217] A. Sander, E. Eilers, A. Heilemann, E. von Kries, Production and application of acylated protein hydrolysates. *Fett-Lipid* 99(4) (1997) 115-120.
- [218] J.D. Xia, Y.M. Xia, I.A. Nnanna, Structure-function relationship of acyl amino acid surfactants – surface activity and antimicrobial properties. *J Agric Food Chem* 43(4) (1995) 867-871.
- [219] J.D. Xia, J.H. Qian, I.A. Nnanna, Synthesis and surface properties of amino acid surfactants from industrial waste proteins. *J Agric Food Chem* 44(4) (1996) 975-979.
- [220] Data Profile: Gluadin WK. Revision 1-01.1998, Cognis Deutschland GmbH & Co. KG. Care Chemicals, Düsseldorf, 1998.
- [221] A. Mehling, M. Kleber, H. Hensen, Comparative studies on the ocular and dermal irritation potential of surfactants. *Food Chem Toxicol* 45(5) (2007) 747-758.
- [222] E. Varjonen, L. Petman, S. Makinen-Kiljunen, Immediate contact allergy from hydrolyzed wheat in a cosmetic cream. *Allergy* 55(3) (2000) 294-296.
- [223] M. Kahlweit, G. Busse, B. Faulhaber, Preparing nontoxic microemulsions with alkyl monoglucosides and the role of alkanediols as cosolvents. *Langmuir* 12(4) (1996) 861-862.
- [224] M. Kahlweit, G. Busse, B. Faulhaber, H. Eibl, Preparing nontoxic microemulsions. *Langmuir* 11(11) (1995) 4185-4187.
- [225] M.S. Hajji, Heat capacity studies of formation of micelle-like structure in aqueous solutions of some alkane polyols. *J Colloid Interf Sci* 257(2) (2003) 364-370.
- [226] Qualitätsprüfzeugnis (nach EN 10204) Gluadin WK, Cognis Deutschland GmbH & Co KG, Düsseldorf, 2006.
- [227] M. Kahlweit, R. Strey, D. Haase, H. Kunieda, T. Schmeling, B. Faulhaber, M. Borkovec, H.F. Eicke, G. Busse, e. al., How to study microemulsions. *J Colloid Interf Sci* 118(2) (1987) 436-453.
- [228] P. Boonme, K. Krauel, A. Graf, T. Rades, V.B. Junyaprasert, Characterisation of microstructures formed in isopropyl palmitate/water/Aerosol OT:1-butanol (2:1) system. *Pharmazie* 61(11) (2006) 927-932.
- [229] S. Weigert, H.F. Eicke, W. Meier, Electric conductivity near the percolation transition of a nonionic water-in-oil microemulsion. *Physica A* 242 (1997) 95-103.
- [230] S.K. Mehta, K. Bala, Volumetric and transport properties in microemulsions and the point-of-view of percolation theory. *Phys Rev E* 51(6) (1995) 5732-5737.
- [231] N. Garti, A. Aserin, S. Ezrahi, I. Tiunova, G. Berkovic, Water behavior in nonionic surfactant systems. 1. Subzero temperature behavior of water in nonionic microemulsions studied by DSC. *J Colloid Interf Sci* 178(1) (1996) 60-68.

- [232] F. Podlogar, M. Bester Rogac, M. Gasperlin, The effect of internal structure of selected water-Tween 40-Imwitor 308-IPM microemulsions on ketoprofene release. *Int J Pharm* 302(1-2) (2005) 68-77.
- [233] F. Broto, D. Clause, Study of Freezing of Supercooled Water Dispersed within Emulsions by Differential Scanning Calorimetry. *J Phys C Solid State* 9(23) (1976) 4251-4257.
- [234] P. Boutron, A. Kaufmann, Stability of the amorphous state in the system water - 1,2-propanediol. *Cryobiology* 16(6) (1979) 557-568.
- [235] H. Tanojo, J.A. Bouwstra, H.E. Junginger, H.E. Bodde, Thermal analysis studies on human skin and skin barrier modulation by fatty acids and propylene glycol. *J Therm Anal Calorim* 57(1) (1999) 313-322.
- [236] P. Boutron, P. Mehl, A. Kaufmann, P. Angibaud, Glass forming tendency and stability of the amorphous state in the aqueous solutions of linear polyalcohols with four carbons. 1. Binary systems water-polyalcohol. *Cryobiology* 23(5) (1986) 453-469.
- [237] B. Lindman, U. Olsson, O. Söderman, in: P. Kumar and K. L. Mittal (Eds.), *Handbook of Microemulsion Science and Technology*, Marcel Dekker, New York, 1999, pp. 309-356.
- [238] S. Wiedersberg, C.S. Leopold, R.H. Guy, Effects of various vehicles on skin hydration in vivo. *Skin Pharmacol Physiol* 22(3) (2009) 128-130.
- [239] Spezifikation Pentylenglycol, FAGRON GmbH & Co. KG, Barsbüttel, 2006.
- [240] Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch, Walter de Gruyter GmbH & Co KG, Berlin, 2004.
- [241] W. Steiling, M. Bracher, P. Courtellemont, O. de Silva, The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. *Toxicol In Vitro* 13(2) (1999) 375-384.
- [242] J. Wohlrab, *Der Einfluss von L-Arginin auf die Regulation der epidermalen Arginase*. Habilitationsschrift, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2001.
- [243] D. Köszegi, B. Nothhelfer, R. Leimbeck, Der HET-CAM-Test (Hühner-Ei-Test-Chorioallantoismembran). *Euro Cosmetics* 6 (1999) 29-33.
- [244] L. Lehmann, S. Keipert, M. Gloor, Effects of microemulsions on the stratum corneum and hydrocortisone penetration. *Eur J Pharm Biopharm* 52(2) (2001) 129-136.
- [245] A.M. Kligman, E. Christophers, Preparation of isolated sheets of human stratum corneum. *Arch Dermatol* 88 (1963) 702-705.
- [246] U. Lindemann, K. Wilken, H.J. Weigmann, H. Schaefer, W. Sterry, J. Lademann, Quantification of the horny layer using tape stripping and microscopic techniques. *J Biomed Opt* 8(4) (2003) 601-607.

- [247] H.J. Weigmann, U. Lindemann, C. Antoniou, G.N. Tsikrikas, A.I. Stratigos, A. Katsambas, W. Sterry, J. Lademann, UV/VIS absorbance allows rapid, accurate, and reproducible mass determination of corneocytes removed by tape stripping. *Skin Pharmacol Appl* 16(4) (2003) 217-227.
- [248] H. Weigmann, J. Lademann, H. Meffert, H. Schaefer, W. Sterry, Determination of the horny layer profile by tape stripping in combination with optical spectroscopy in the visible range as a prerequisite to quantify percutaneous absorption. *Skin Pharmacol Appl* 12(1-2) (1999) 34-45.
- [249] S. Heuschkel, G. Presse, U. Jacobi, A. Teichmann, J. Lademann, R. Neubert, Development and application of an HPLC method for the quantification of Pelemol[®] BIP deriving from o/w-microemulsions in human stratum corneum. 5th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Genf, 2006.
- [250] U. Jacobi, H.J. Weigmann, J. Ulrich, W. Sterry, J. Lademann, Estimation of the relative stratum corneum amount removed by tape stripping. *Skin Res Technol* 11(2) (2005) 91-96.

Publikationen

Originalarbeiten

Teichmann Alexa, Heuschkel Sandra, Jacobi Ute, Presse Gaëlle, Neubert Reinhard H.H., Sterry Wolfram, Lademann Jürgen (2007) Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. *Eur J Pharm Biopharm* 67(3): 699-706.

Heuschkel Sandra, Wohlrab Johannes, Schmaus Gerhard, Neubert Reinhard H.H. (2008) Modulation of Dihydroavenanthramide D Release and Skin Penetration by 1,2-alkanediols. *Eur J Pharm Biopharm* 70(1): 239-247.

Heuschkel Sandra, Wohlrab Johannes, Neubert Reinhard H.H. (2009) Dermal and transdermal targeting of dihydroavenanthramide D using enhancer molecules and novel microemulsions. *Eur J Pharm Biopharm* 72(3): 552-560.

Heuschkel Sandra, Guenther Ulrike, Neubert Reinhard H.H. (2009) Contribution to the penetration mechanism of microemulsions using an FTIR-ATR diffusion cell. Eingereicht.

Übersichtsartikel

Heuschkel Sandra, Shukla Anuj, Neubert Reinhard H.H. (2005) Use of Microemulsions for Topical Drug Delivery. In: Bronaugh R.L., Maibach H.I. (Eds.) Percutaneous Absorption: Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology. Taylor & Francis, Boca Raton, pp. 701-718

Heuschkel Sandra, Goebel Alexandra, Neubert Reinhard H.H. (2008) Microemulsions - Modern Colloidal Carrier for Dermal and Transdermal Drug Delivery. *J Pharm Sci* 97(2): 603-631.

Weitere Veröffentlichungen

Heuschkel Sandra (2002) Mikroemulsionen zur dermalen Anwendung des 5 Lipoxygenase-inhibitors 2'-Hydroxy-5'-methyl-laurophenoxim. *Diplomarbeit*, MLU Halle-Wittenberg.

Heuschkel Sandra, Neubert Reinhard H.H. (2005) Mikroemulsionen zur dermalen Applikation von Arzneistoffen. *CIT* 77(3), 239-243.

Tagungsbeiträge

Heuschkel Sandra, Bui Duc Hanh, Wartewig Siegfried, Neubert Reinhard H.H. (2003) Penetration of Oil-in-Water Microemulsions into Artificial Membranes. *DPhG Jahrestagung*, Würzburg (Poster).

Heuschkel Sandra, Wohlrab Wolfgang, Neubert Reinhard H.H. (2004) An O/W Microemulsion for Dermal Application of the 5-Lipoxygenase Inhibitor 2-Hydroxy-5-methyl-laurophenone Oxime. *8. Jahrestagung der Gesellschaft der Dermopharmazie*, Halle (Poster).

Heuschkel Sandra, Neubert Reinhard H.H. (2004) Mikroemulsionen - Kolloidale Vehikelsysteme für die dermale Anwendung. *Interne Arbeitssitzung des GVC/DECHEMA-Fachausschusses „Grenzflächenbestimmte Systeme und Prozesse“*, Golm (Vortrag).

Heuschkel Sandra, Presse Gäëlle, Jacobi Ute, Teichmann Alexa, Lademann Jürgen, Neubert Reinhard H.H. (2006) Development and Application of an HPLC Method for the Quantification of Pelemol[®] BIP Deriving from O/W-Microemulsions in Human Stratum Corneum. *5th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics, and Pharmaceutical Technology*, Genf, Schweiz (Poster).

Heuschkel Sandra, Teichmann Alexa, Lademann Jürgen, Neubert Reinhard H.H. (2006) An in-vivo Penetration Study of an O/W-Microemulsion into Human Stratum Corneum. *Perspectives in Percutaneous Penetration*, La Grand Motte, Frankreich (Poster).

Heuschkel Sandra, Wohlrab Johannes, Neubert Reinhard H.H. (2007) Drug deposition in the skin - effect of enhancers and vehicles. *Gordon Research Conference (Barrier Function of Mammalian Skin)*, Newport, RI, USA (Poster).

Heuschkel Sandra, Wohlrab Johannes, Neubert Reinhard H.H. (2007) Influence of enhancer molecules and colloidal carrier systems on drug penetration. *DPhG Jahrestagung*, Erlangen (Poster).

Wohlrab Johannes, Heuschkel Sandra, Goebel Alexandra S.B., Schmaus Gerhard, Neubert Reinhard H.H. (2008) Penetration Profile and Distribution of 4-(1-Phenylethyl)1,3-benzenediol (Bio 377) in Human Skin. *6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics, and Pharmaceutical Technology*, Barcelona, Spanien (Poster).

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Neubert. Ihm verdanke ich die Möglichkeit, einer interessanten, vielseitigen und herausfordernden Aufgabenstellung mit großer Freiheit nachzugehen. Dabei begleiteten mich seine beständige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft. Große Teile der Arbeit entstanden in enger Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern. Ihnen allen gilt mein herzlicher Dank:

Herr Prof. Dr. J. Wohlrab (Hautklinik der MLU) ermöglichte die Durchführung der Penetrationsversuche zum DHA_vD, die gewissenhaft von Frau Schramm bearbeitet wurden, sowie die HET-CAM-Tests (Danke der AG Experimentelle Dermatologie!). Darüber hinaus leistete er wertvolle Beiträge zur Interpretation der Ergebnisse.

Eine besondere Kooperation bestand mit dem CCP der dermatologischen Klinik der Charité Berlin unter Herrn Prof. Dr. Lademann. Insbesondere Frau Presse bin ich für die Durchführung der In-vivo-Studie zu Dank verpflichtet. Frau Dr. Patzelt hat mich in die Technik des Follikelblockierens eingewiesen sowie für die Bereitstellung der Schweineohren gesorgt.

Eine motivierende und produktive Zusammenarbeit bestand ebenfalls mit der Firma Symrise, insbesondere Herrn Dr. Schmaus, im Rahmen des DHA_vD-Projektes.

Für ihre Beiträge zur Charakterisierung der Mikroemulsionen bedanke ich mich bei Herrn Dr. Richter (Institut für Ultrastrukturforschung der FSU Jena), Herrn Dr. Schröter und Frau Herfurt (Institut für Physik), Herrn Dr. Shukla (Institut für Physik) und Frau Schwarz. Herr Dr. Metz stand mir mit Diskussionsbereitschaft und hilfreichen Anregungen bei der Auswertung der ESR- und ATR-Experimente zur Seite.

Unverzichtbar waren die gewissenhaften und treuen Dienste von Frau Lackner bei allen Labortätigkeiten. Ihre fürsorgliche und freundschaftliche Art hat den Alltag wesentlich geprägt.

Frau Woigk danke ich für ihre kompetente Unterstützung in analytischen Fragen sowie beim Troubleshooting an der HPLC, Herrn Reese und Mitarbeitern für erstklassige feinmechanische Beiträge und der Glasbläserei, speziell Herrn Nietzschmann, für die Anfertigung von Franz-Zellen.

Ulrike Günther und Dr. Iris Hinneburg trugen durch wertvolle Diskussionen und Anregungen zum Gelingen der Arbeit bei. Auch Dr. Bui Duc Hanh, Alexandra Göbel und Dr. Sandra Wiedersberg verdanke ich hilfreichen fachlichen Austausch.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie, vor allem Annett Schröter, Dr. Christian Schmelzer, Dr. Petra und Andreas Hünerbein, ebenso wie meinen Diplomanden, insbesondere Katja Vorkel und Dr. Andrea Heinz, danke ich sehr herzlich für eine schöne und bereichernde, gemeinsam verbrachte Zeit. Damit verbunden sind auch die mit Franziska Simmel vom Arbeitskreis Klinische Pharmazie im Roten Horizont ausklingenden Labortage. Franziskas Herzlichkeit und Hilfsbereitschaft schätze ich sehr.

Judith und Christina hatten zu jeder Zeit ein offenes Ohr für mich. Ihnen gilt ein großes Dankeschön für ihre Freundschaft.

Ganz besonders wertvoll sind mir die beständige Unterstützung meiner Eltern und ihr immerwährendes Vertrauen in mich.

Lebenslauf

Name Sandra Heuschkel

Geburtsdatum: 23.05.1976

Geburtsort: Gera

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1982-1991 Polytechnische Oberschule Pölzig/Thüringen

1991-1994 Gymnasium VI Gera, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung:

08/94-02/97 Ausbildung zur Pharmazeutisch-technischen Assistentin an der Berufsbildenden Schule V, Gesundheit, Körperpflege und Sozialpädagogik, Halle/Saale und in der Schwanen Apotheke, Ronneburg

Studium:

10/97-09/01 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

08/99 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

09/01 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

10/01-04/02 Pharmaziepraktikum: Anfertigung einer Diplomarbeit im Fachbereich Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluss: Diplompharmazeutin

05/02-10/02 Pharmaziepraktikum: Phoenix Apotheke Silberhöhe, Halle/Saale

11/02 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Approbation als Apothekerin

Berufstätigkeit:

02/97-09/97 Pharmazeutisch-technische Assistentin in der Schwanen Apotheke, Ronneburg

11/02-01/03 Apothekerin in der Phoenix Apotheke Silberhöhe, Halle/Saale

02/03-03/07 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

seit 04/07 Apothekerin in der Phoenix Apotheke Silberhöhe, Halle/Saale

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß §5 Absatz 2b der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die vorgelegte Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Sandra Heuschkel

Halle (Saale), 08.07.2009