

**Charakterisierung und Quantifizierung der Lipide im Stratum  
corneum sowie Penetrationsuntersuchungen zur  
Quantifizierung von Ceramid [NP] aus topischen  
Formulierungen**

Dissertation

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Sophie Cathrin Steinbach

geb. am 10.06.1989 in Freiberg

Gutachter/in

1. Prof. Dr. Dr. h.c. Reinhard Neubert
2. Prof. Dr. Johannes Wohlrab
3. Prof. Dr. Christel Müller- Goymann

Tag der Verteidigung in Halle (Saale), den 28.09.2017

Meinen Eltern

# 1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	I
2	Einleitung und Zielsetzung.....	1
3	Allgemeiner Teil .....	3
3.1	Allgemeiner Aufbau der Haut.....	3
3.1.1	Stratum corneum .....	4
3.1.1.1	Aufbau und Organisation .....	5
3.1.1.2	Lipidkomposition .....	6
3.1.1.3	Einflussfaktoren auf die Organisation und Lipidkomposition .....	6
3.1.1.4	Lipidsynthese .....	7
3.1.1.5	Veränderungen bei pathologischen Zuständen .....	8
3.1.2	Freie Fettsäuren im Stratum corneum .....	9
3.1.2.1	Fettsäuresynthese .....	10
3.1.2.2	Veränderungen bei pathologischen Zuständen .....	10
3.1.3	Ceramide im Stratum corneum.....	12
3.1.3.1	Ceramidbiosynthese.....	15
3.1.3.2	Veränderungen bei pathologischen Zuständen .....	16
3.1.4	Gewinnung der Lipide .....	16
3.1.4.1	Gewinnung der freien Fettsäuren und Ceramiden aus Humanhaut .....	16
3.1.4.2	Penetrationsstudie zur Untersuchung von Ceramid [NP] .....	17
3.1.4.3	Einfluss des Isosorbids auf das Penetrationsverhalten von Ceramid [NP].....	18
3.1.4.4	Einsatz von Mikroemulsionen zur dermalen Anwendung.....	19
3.1.5	Analytische Methoden .....	21
3.1.5.1	Gaschromatographie .....	21
3.1.5.2	Hochleistungsflüssigchromatographie .....	22
3.1.5.3	Evaporative light scattering detection (ELSD) .....	22
3.1.5.4	Massenspektrometrie .....	23
3.1.5.5	LC- MS Kopplung.....	24
3.1.6	Validierung ausgewählter analytischer Methoden .....	24
4	Material und Methoden .....	26
4.1	Chemikalien .....	26
4.2	Studie an humanem SC zur Untersuchung der freien Fettsäuren und Ceramide von älteren Probanden und Diabetikern .....	27
4.2.1	Aufbau der Studie.....	27
4.2.2	Lipidextraktion – Gewinnung der SC Lipide.....	27
4.2.3	Statistische Auswertung der Studie .....	28
4.3	Gaschromatographie - Methode zur Quantifizierung der freien Fettsäuren.....	30
4.4	HPLC- Methode zur Quantifizierung der amidgebundenen Fettsäure von Ceramid [NP] ....	32

4.4.1	HPLC- ELSD Methode zur Auftrennung der Ceramidklassen.....	33
4.4.2	HPLC-APCI- MS Methode zur Auftrennung und Quantifizierung der amidgebundenen Fettsäuren von Cer [NP] .....	34
4.5	Penetrationsstudie an humaner Haut von Ceramid [NP] aus verschiedenen topischen Formulierungen .....	35
4.5.1	Aufbau der Studie.....	35
4.5.2	Probenvorbereitung .....	36
4.5.3	HPLC- MS Methode für die Quantifizierung von Cer [NP] 18/18 D3.....	37
4.5.4	Herstellung und Charakterisierung der eingesetzten Mikroemulsionen .....	38
5	Ergebnisse und Diskussion .....	42
5.1	Quantifizierung der freien Fettsäuren.....	42
5.1.1	Vergleich der Studiengruppe Alt gegen Jung (Gruppe 1 gegen 2) .....	42
5.1.2	Vergleich der Studiengruppe Gesund gegen Diabetiker (Gruppe 2 gegen 3) .....	45
5.2	Quantifizierung der amidgebundenen Fettsäuren in Ceramid [NP] .....	47
5.2.1	Vergleich der Studiengruppe Alt gegen Jung (Gruppe 1 gegen 2) .....	49
5.2.2	Vergleich der Studiengruppe Gesund gegen Diabetiker (Gruppe 2 gegen 3) .....	51
5.3	Quantifizierung von deuteriertem Ceramid [NP] nach Penetrationsversuch.....	52
6	Zusammenfassung .....	58
7	Literaturverzeichnis .....	60
8	Anhang .....	69

## Abkürzungsverzeichnis

AD	Atopische Dermatitis
AQP	Aquaporin
APCI	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck
AUC	Area under the curve
C15:0	Pentadecansäure
C16:0	Hexadecansäure
C17:0	Heptadecansäure
C18:0	Octadecansäure
C18:1	9-Octadecensäure
C18:2	9,12-Octadecadiensäure
C19:0	Nonadecansäure
C21:0	Heneicosansäure
C23:0	Tricosansäure
C24:0	Tetracosansäure
C25:0	Pentacosansäure
C26:0	Hexacosansäure
Cer	Ceramid
DAC	Deutscher Arzneimittelcodex
DLS	Dynamische Lichtstreuung
ELSD	Evaporative light scattering detection
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
EOS	Omega- Hydroxyfettsäure verbunden mit Sphingosin
ESI	Elektronenspray- Ionisation
F	Fuß
FAME	Fatty acids methyl esters
FFS	Freie Fettsäuren
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
HPLC	High performance light scattering

LC	liquid chromatography
LoD	Limit of Detection/ Nachweisgrenze
LoQ	Limit of Quantification/ Bestimmungsgrenze
ME	Mikroemulsion
MS	Massenspektrometrie
NP	Non- Hydroxyfettsäure verbunden mit Phytosphingosin
NP- LC	Normalphasen- Flüssigchromatographie
O/W	Öl-in-Wasser
PHS	Phytosphingosin
RP-LC	Umkehrphasen- Flüssigchromatographie
SC	Stratum corneum
SG	Stratum granulosum
TEWL	Transepidermaler Wasserverlust
TJ	Tight Junctions
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
UA	Unterarm
USP	United States Pharmacopeia
W/O	Wasser-in- Öl

## 2 Einleitung und Zielsetzung

Die äußerste Hautschicht des menschlichen Körpers, das *Stratum corneum* (SC), stellt eine einzigartige Barriere sowohl gegen äußere Einflüsse als auch einen Schutz vor Verdunstung dar. Sie ist in Form einer hochkomplexen Matrix organisiert, deren Struktur mit fortschreitenden Forschungsergebnissen in immer detaillierteren Hypothesen und Modellen veranschaulicht wurde. Als grundlegender Erklärungsansatz steht die Idee, den Aufbau des SC als „Ziegelstein-Mörtel“-Modell zu verstehen. Tote Hornzellen werden dabei als Ziegelsteine, eine Lipidmischung als Mörtel symbolisiert. Dieser „Mörtel“ ist hauptverantwortlich für die Widerstandskraft unserer Haut gegenüber Umweltfaktoren, denn über diese Lipide verläuft die Hauptroute für den dermalen Molekültransport in den Körper. Die Mischung besteht hauptsächlich aus Sphingolipiden, den sogenannten Ceramiden, freien Fettsäuren und Cholesterol. Die Ceramide sind in Ihrer Zusammensetzung einmalig. Aktuell sind mehrere hundert verschiedene Kombinationen ihrer Strukturelemente bekannt. Eine ähnlich große Diversität ist bei den freien Fettsäuren festzustellen.

Die Inhomogenität und Vielfalt der Bestandteile der Lipidschicht des SC führen zu der Erforschung, inwiefern die jeweiligen Komponenten die Barrierefunktion der Haut beeinflussen. Die Klärung dieser Frage könnte zu neuen Therapieansätzen für die Behandlung von dermatologischen Erkrankungen führen. So ist vorstellbar, das weitverbreitete Symptom der trockenen Haut erfolgreich zu kurieren. Therapeutisch sinnvoll hierfür ist die Anwendung topischer Formulierungen, welche reduziert vorkommende oder gänzlich fehlende notwendige Hautlipide enthalten. Weiterhin ist denkbar, Krankheiten wie Diabetes anhand des Hautlipidprofils eines Menschen zu erkennen. Hier könnte auch ein wichtiger Beitrag zur Früherkennung geleistet werden.

Für die vorliegende Arbeit wurden die Probanden in eine Gruppe junger, hautgesunder Personen, in eine zweite Gruppe älterer Probanden und in eine dritte Gruppe an Diabetes erkrankter Personen eingeteilt. Ziel war die Identifizierung von Lipid- Markern im SC, welche typisch für eine jeweilige Gruppe sein sollte. Es wurden dafür Methoden entwickelt, um mittels HPLC-ELSD, HPLC-APCI-MS und GC-FID die erforderlichen Nachweise zu führen. Die gewonnenen Daten sollten weiterhin verwendet werden, um eine topische Formulierung zur Gewährleistung eines gesunden Hautlipid-Levels zu entwickeln.

Zusammengefasst beinhalten die Ziele dieser Arbeit folgende Schritte:

- Entwicklung und Optimierung umfassender Methoden zur Lipidanalytik, sowohl für die freien Fettsäuren als auch für die amidgebundenen Fettsäuren der einzelnen Ceramidklassen.
- Herausarbeitung und Untersuchung der Unterschiede der Fettsäureprofile von freien als auch amidgebundenen Fettsäuren hinsichtlich signifikanter Unterschiede im Alter oder bei Diabetikern im Vergleich mit jungen und gesunden Probanden.

- Feststellung signifikanter Unterschiede bei der Penetration von Ceramid [NP] in Humanhaut aus verschiedenen Formulierungen, um die Hautbarriere im SC durch Supplementierung von Lipiden zu festigen.

Diesem Kapitel ist der allgemeine Teil angeschlossen, welcher die dieser Arbeit zugrunde liegenden Theorien und den Studienaufbau ausführlich beschreibt. Anschließend werden im experimentellen Teil die verwendeten Materialien und Methoden erklärt. Im Anschluss erfolgt ein Kapitel zur Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen. Mit einem Ausblick über weitere mögliche Untersuchungen und Aspekte dieser Forschung wird diese Arbeit in einer Zusammenfassung abgeschlossen.

### 3 Allgemeiner Teil

#### 3.1 Allgemeiner Aufbau der Haut

Die Haut stellt das größte menschliche Organ des Körpers dar. Sie ist von außen nach innen aus Epidermis, Dermis und Subkutis aufgebaut [93]. Die Hautoberfläche über der Epidermis ist mit einer dünnen Emulsionsschicht aus abgestorbenen Hornzellen sowie Absonderungen der Schweiß- und Talgdrüsen benetzt. Diese besitzt jedoch im Gegensatz zur Epidermis keine Barriereeigenschaften [78]. Die äußere Hautschicht dient dem Kontakt zwischen der Umwelt und dem Organismus und zum Schutz gegen exzessiven transepidermalen Wasserverlust [26] [27].

Die **Epidermis** ist ein mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel mit einer Dicke zwischen 30 µm und 1,6 mm. Zu ihr gehören von außen nach innen *Stratum corneum*, das *Stratum granulosum*, das *Stratum spinosum* und das *Stratum basale*. Mit einem Anteil von 90 % der Trockenmasse bilden die kernlosen Hornzellen (Korneozyten) den Hauptanteil der Epidermis. Diese werden durch Zellproliferation im *Stratum basale* gebildet. Durch ständige Zellteilung entstehen immer neue Zellen die in die oberen Zellschichten verschoben werden. Dabei erfahren die Zellen große Veränderungen hinsichtlich ihrer Funktion, Morphologie und Histologie [57]. Im Laufe dieser Differenzierung vergrößert sich ihr Volumen und die Zellen flachen ab (Abbildung 1). Außerdem werden sogenannte odland bodies sichtbar, welche membranumgrenzende Vakuolen und Vorstufen der epidermalen Lipide und hydrolytischen Enzymen darstellen [38] [130]. Die odland bodies geben ihren Inhalt an der Grenze vom *Stratum granulosum* zum SC in den Interzellularraum frei [26] [28].

Beim Übergang vom *Stratum granulosum* zur äußersten Schicht erfolgt die Keratinisierung (Keratohyalingranula in Abbildung 1). Aus den lebenden kernhaltigen Keratinozyten entstehen kernlose, abgestorbene Korneozyten. Unter normalen Bedingungen dauert dieser Prozess 28 bis 30 Tage. Die Epidermis ist somit ein dynamisches Gewebe, das sich durch Zellneubildung, Differenzierung, Keratinisierung und abschließender Abschuppung in andauernder Erneuerung auszeichnet.

Die **Dermis** bildet das darunterliegende Bindegewebe aus Kollagen- und Elastinfasern und ist damit für hohe Zugfestigkeit und Elastizität verantwortlich. Sie ist von Nerven, Lymphbahnen und Blutgefäßen durchzogen, wobei letztgenannte an der Regulation des Wärmehaushalts beteiligt sind. In der Dermis finden sich zusätzlich Hautanhangsgebilde wie Schweiß- und Talgdrüsen, Haare sowie Nägel [93].

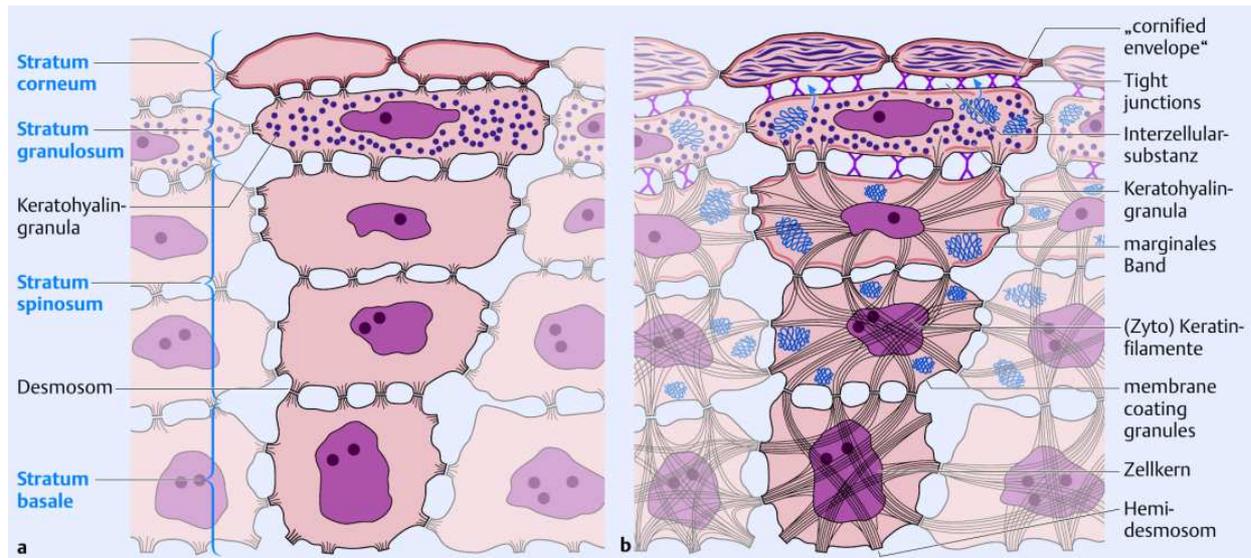


Abbildung 1 Aufbau der einzelnen Hautschichten der Epidermis, vom *Stratum corneum* (SC) als äußerste Hautschicht bestehend aus abgestorbenen Hornzellen (Korneozyten) bis zur innersten Hautschicht, dem *Stratum basale*, wo die Zellproliferation stattfindet. [86]

Die unterste Schicht, die **Subcutis**, besteht aus lockerem Bindegewebe und eingelagerten Fettzellen, die vorrangig der Wärmeisolation und Energiespeicherung dienen, bei gleichzeitigem Schutz vor mechanischen Einwirkungen [137].

### 3.1.1 Stratum corneum

Die äußerste Hautschicht des Menschen besteht, je nach Körperareal, aus 15-20 Zellschichten. Diese sind aus Korneozyten und interzellulären Lipiden aufgebaut. Die Struktur des SC wurde daher anfangs mit einem "Ziegelstein- Mörtel" - Modell (Brick and Mortar) verglichen, wobei die Korneozyten als „Backsteine“ für chemische und mechanische Stabilität fungieren und die Lipidmatrix den umgebenden „Mörtel“ bildet. Außerdem sind die Korneozyten durch Korneodesmosomen, bestehend aus verschiedenen Proteinen, miteinander verknüpft und sorgen zusätzlich für Stabilität (Abbildung 1). Die Aufgaben des SC sind in Tabelle 1 zusammengefasst [25].

Tabelle 1 Protektive Aufgaben und Funktionen des *Stratum corneums* und deren Lokalisation

Funktion	Lokalisation
Permeabilitätsbarriere	Extrazellulär
Antimikrobielle Barriere	Extrazellulär
Mechanische Widerstandskraft	Korneozyten
Selektive chemische Absorption	Extrazellulär
Hydratation	Korneozyten
Thermische Regulierung	Unbekannt

### 3.1.1.1 Aufbau und Organisation

Aktuell gilt das Ziegelstein- Mörtel Modell als unvollständig, weswegen komplexere, theoretische Modelle zur Organisation des SCs etabliert wurden.

Das **Stacked Monolayer Model** ist gekennzeichnet durch das Überlappen der gestreckten Alkylketten von Ceramiden sowie einer statistischen Verteilung der Cholesterol- Moleküle zwischen den einzelnen Lipidschichten. Im Elektronenmikroskop ist eine sichtbare breit-schmal-breit-Abfolge der Lamellen zu erkennen [125].

Beim **Domain Mosaic Model** wird davon ausgegangen, dass die Lipide in einem flüssigkristallinen Zustand vorliegen. Durch die Dominanz von langen Kohlenstoffketten sind sowohl kristalline als auch Gelphasen vorhanden, die nicht die mechanischen Anforderungen an eine Barriere erfüllen. Sie bilden sogenannte Domänen, die von den flüssigkristallinen Bereichen abgegrenzt sind [39].

Das **Sandwich Model** wurde von Bouwstra *et al.* entwickelt. Es geht davon aus, dass die kristallinen und flüssigen Bereiche der Lipide innerhalb einer trilamellaren Struktur vorliegen welche durch polare Kopfgruppen unterbrochen sind. Sie folgen ebenfalls einer Breit- Schmal- Breit- Anordnung. Die breite lamellare Phase wird als long- periodicity phase (LPP) bezeichnet [10].

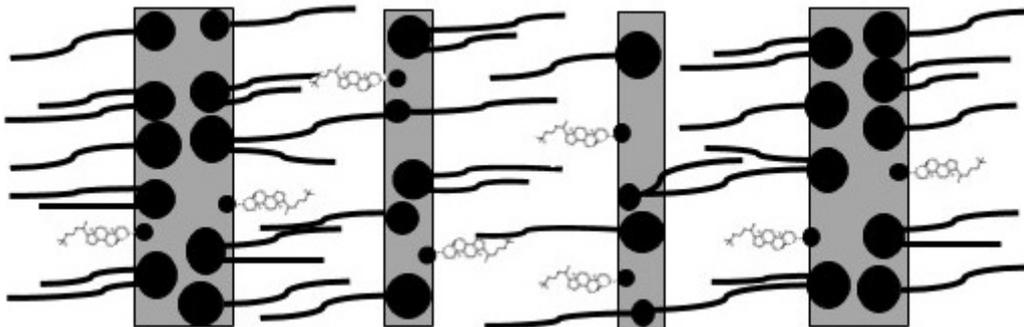


Abbildung 2 Eine mögliche Anordnung der kurz- und langkettigen Ceramide in hairpin-Konformation (Haarnadel- Konformation, d.h. beide Ketten zeigen in die gleiche Richtung) oder full-extended, mit gestreckten Ketten in jeweils unterschiedliche Richtungen. Diese Layerstruktur enthält außerdem Cholesterol. Die grauen Flächen kennzeichnen die hydrophilen Regionen durch die polaren Kopfgruppen der Lipide. Die weißen Bereiche sind die lipophilen Regionen bestehend aus den Kohlenstoffketten der unterschiedlichen Lipide [24].

Das **Single Gel Phase Model** unterscheidet sich grundlegend von den bereits erläuterten Modellen. Die Lipidmatrix wird hier als zusammenhängendes, kohärentes sowie lamellares Gelgerüst beschrieben. Eine Phasenseparation in flüssigkristallin oder kristallin wird nicht vorgenommen. Die geringe Wasserpermeabilität wird mit der geringen Beweglichkeit und dichten Packung erklärt. Während bei den vorherigen Modellen von einer „hairpin“- Konformation der Ceramide ausgegangen wird (beide Alkylketten zeigen in eine Richtung wie eine Haarnadel) bezieht Norlen *et al.* in seine Überlegungen auch die „full-extended“- Konformation mit ein (Alkylketten zeigen in entgegengesetzte Richtung) (Abbildung 2) [11] [97].

Das **Armature Reinforcement Model** bezieht strukturelle Änderungen auf die Organisation der Lipidmatrix mit ein. So liegen die Alkylketten der Ceramide bei geringer intermembranärer Hydratation in der full- extended Konformation vor. Im Wasserüberschuss wurde mittels Neutronenstreuung beobachtet, wie die Ketten in die hairpin Konformation übergehen (chain- flip- transition) und der enge Kontakt zwischen den Lipidketten verlorengeht [66] [67].

### **3.1.1.2 Lipidkomposition**

Obwohl die Lipidmatrix nur 5-15% der Trockenmasse des SC ausmacht, ist es der einzig überwindbare Diffusionsweg für Arznei- und Hilfsstoffe in den Körper und damit die größte Barriere der gesamten Haut. Die multilamellare Mixtur an polaren und unpolaren Lipiden ist bis heute noch nicht vollständig untersucht und bis in alle Einzelheiten aufgeklärt [78] [134].

Die Hauptkomponenten sind Ceramide, Cholesterol und freie Fettsäuren, welche jeweils in folgenden Anteilen auftreten: 40-60 %, 30-40 % und ca. 7-13%. Ebenfalls kommen Cholesterol-3-sulfat und Cholesterolester in geringen Mengen vor [128] [133].

### **3.1.1.3 Einflussfaktoren auf die Organisation und Lipidkomposition**

Es existiert eine vielfältige Anzahl von Faktoren, welche die genannte Lipidzusammensetzung beeinträchtigen können. Externe Faktoren sind z.B. Reinigungs- und Hygieneprodukte des täglichen Bedarfs, welche durch Herauslösen interzellulärer Lipide trockene Haut provozieren können [80].

Zudem sind über 85 000 in der Umwelt vorkommende chemische Verbindungen bekannt, welche die Hautbarriere beeinflussen und darüber hinaus als Reizstoffe und Kontaktallergene in Erscheinung treten können [60].

Klimatische und saisonale Bedingungen sind für die Hautbarriere als externe Einflussfaktoren von Bedeutung. Bei höheren Temperaturen und der dadurch höheren Verdunstung über die Haut (transepidermaler Wasserverlust, TEWL) würde man vermehrt Symptome wie Juckreiz und trockene Haut vermuten. Überraschenderweise zeigen jedoch Personen, die in einem trockenen und heißen Klima leben, einen erhöhten Gehalt an Ceramiden und leiden weniger unter trockener Haut und deren Begleiterscheinungen wie Juckreiz [60] [106] [109]. Inwieweit die Ceramide ausschlaggebend für einen Barrierschutz bei heißerem Klima sind, bleibt in dieser Studie unbeantwortet.

So wurde auch festgestellt, dass sich durch saisonale Veränderungen im Sommer der Gehalt an Palmitinsäure verringert, der Gehalt an Lignocerinsäure jedoch erhöht war. Die Verhältnisse der Lipidklassen, wie Fettsäuren und Ceramide, waren jedoch zueinander unverändert [29].

Zu den internen Einflussfaktoren für die Lipidkomposition zählt unter anderem das Alter. Der Ceramidgehalt sinkt um ca. 10-15 % nach jeweils weiteren 20 Jahren [9] [109]. Ebenso führen Stress und Schlafmangel zu einer geringeren Barrierefunktion. Der Grund hierfür kann in einer stressinduzierten Zytokinausschüttung und der daraus resultierenden größeren Durchlässigkeit der Haut liegen [2]. Auch die Ernährung kann einen Einfluss haben. So müssen z.B. essentielle Fettsäuren wie Linolsäure zugeführt werden, damit diese für eine vollständige Ceramidsynthese z.B. für Ceramid [EOS] eingesetzt werden können. Diese liegt unter anderem als freie Fettsäure im SC vor, wird aber ebenfalls zur Synthese der Ceramide benötigt und unterstützt die Flexibilität und Desquamation der Haut [30] [31] [135].

#### **3.1.1.4 Lipidsynthese**

Während der Migration der Lipide von der Basalschicht zum *Stratum granulosum* erfahren die Lipide eine Veränderung hinsichtlich ihrer Struktur und Komposition. In einem ersten Schritt werden Precursorlipide in den odland bodies gebildet, welche anschließend durch Exozytose in den Interzellularraum des SG abgegeben werden [105]. Diese sind hauptsächlich mit polaren Lipiden wie Glycosphingolipide, freien Sterolen und Phospholipiden gefüllt. Außerdem enthalten sie katabolische Enzyme, die dafür sorgen, dass die Precursorlipide nach der Exozytose in unpolare Komponenten umgewandelt werden: Glycosphingolipide werden zu Ceramiden und Phospholipide zu Glycerol sowie freien Fettsäuren umgewandelt [103].

Zwischen den Korneozyten und der Lipidmatrix befindet sich die vernetzte Proteinmatrix die cornified envelope, welche von einer Lipidschicht kovalent gebunden (cornified lipid envelope) und in der Lipidmatrix verankert ist. Die cornified lipid envelope ist vorrangig aus Omega-Hydroxyceramiden aufgebaut, welche u. a. an das Protein Involucrin gebunden ist. Sie fungiert als Nahtstelle der hydrophilen Korneozyten und der lipophilen multilamellaren Lipidschicht.

Neben der Barrierefunktion dient das SC auch als Reservoir. Generell lässt sich sagen, dass hydrophile Substanzen die Lipidbarriere kaum überwinden können, weil sie weder transzellulär die rigiden keratingefüllten Korneozyten, noch interzellulär die hydrophobe Lipidmatrix überwinden können. Lipophile Moleküle sind über die interzelluläre Route in der Lage, in die Lipidbilayerschicht zu gelangen und sich dort anzureichern, sowie eine Art „Depot“ bilden zu können. Am besten eignen sich amphiphile Substanzen, welche auf der transzellulären Haupttransportroute abwechselnd Lipid- und Wasserschichten durchdringen können [5] [83] [122] [123].

### 3.1.1.5 Veränderungen bei pathologischen Zuständen

Veränderungen der Hautbarriere sind bei verschiedenen Hauterkrankungen wie z.B. der atopischen Dermatitis (AD) allgemein bekannt. Bei jeder Erkrankung ist es wichtig zu unterscheiden, ob es sich um eine Veränderung der physischen Barriere des SC, bestehend aus Lipiden, Lysozymen und Peptiden, oder der Immunbarriere der Haut handelt [54]. In den letzten drei Jahrzehnten wurde festgestellt, dass die Erniedrigung des Lipidgehaltes im SC deutlich durch bestimmte Hauterkrankungen z.B. Psoriasis, Ichthyosis und Xerosis hervorgerufen wird. Diese Zusammenhänge sind in Tabelle 2 zusammengefasst. In den meisten Fällen wird diese Erniedrigung in läsionierten bzw. erkrankten Hautregionen festgestellt [1] [76].

Tabelle 2 Hauterkrankungen und Ihre Auswirkungen auf die SC Lipidkomposition modifiziert nach [112]

Haut- erkrankung	Veränderungen in der Lipidzusammensetzung des Stratum corneums	Effekt auf die Funktionsbarriere der Haut	Pathogenese
Atopische Dermatitis	Gesunkene Konzentrationen an Ceramid [NP], [EOS] und amidgebundenen Fettsäuren (C20:0 bis C26:0)	Signifikanter Anstieg des TEWL, reduzierte Hautfeuchtigkeit (trockene Haut)	Upregulierung versch. Enzyme z.B. Sphingomyelindeacylase und Ceramidase zur Erhöhung der Ceramidkonzentration
Psoriasis	Gesunkenes Ceramidlevel, gleichbleibende Fettsäurekonzentration	Progressiver Anstieg des TEWL	Erniedrigte Expression der Serinpalmitoyltransferase
Typ-2 Gaucher- krankheit	Erhöhte Konzentration an Glucosylceramiden	Verhornungs- störungen, ähnlich einer Ichthyosis	Die Konzentration an Glucosylcerebrosidase ist signifikant erniedrigt, eine Umwandlung zu den korrespondierenden Ceramiden kann nicht stattfinden
Akne vulgaris	Erniedrigte Konzentrationen an Sphingolipiden	Gestörte Funktionsbarriere hinsichtlich des Wasserhaushaltes	Hyperkeratose des Epithels
Essentieller Fettsäuremangel	Reduzierter Anteil an Ceramid [EOS]linolat im Verhältnis mit – oleat	Epidermale Hyperproliferation	Ersatz der amidgebundenen Linolsäure durch Ölsäure

Das Auftreten von atopischen Dermatosen ist durch eine schuppige und trockene Haut der Erkrankten gekennzeichnet. Sie zeigt eine verminderte SC Hydratation sowie einen erhöhten TEWL

als Hinweise auf veränderte physische Barriereigenschaften. In einigen Untersuchungen wurden verringerte Konzentrationen an freien Fettsäuren und unterschiedlichen Ceramidklassen ermittelt [33] [131].

Bei anderen Hauterkrankungen kann ein Defekt oder Mangel an Linolsäure-metabolisierenden Enzymen (z.B. 6-Desaturase) vorliegen, was in einer unvollständigen Formierung der Bilayerstrukturen infolge der Substitution von Linolsäure durch Ölsäure resultiert [131]. Zu berücksichtigen ist auch, dass mit zunehmendem Alter, das hautrelevante Gesamtlipidlevel um bis zu 30 % verringert sein kann. Mögliche Ursachen hierfür sind ein verlangsamter Keratinozytmetabolismus in Verbindung mit deren verringerten Biosynthesekapazität [45].

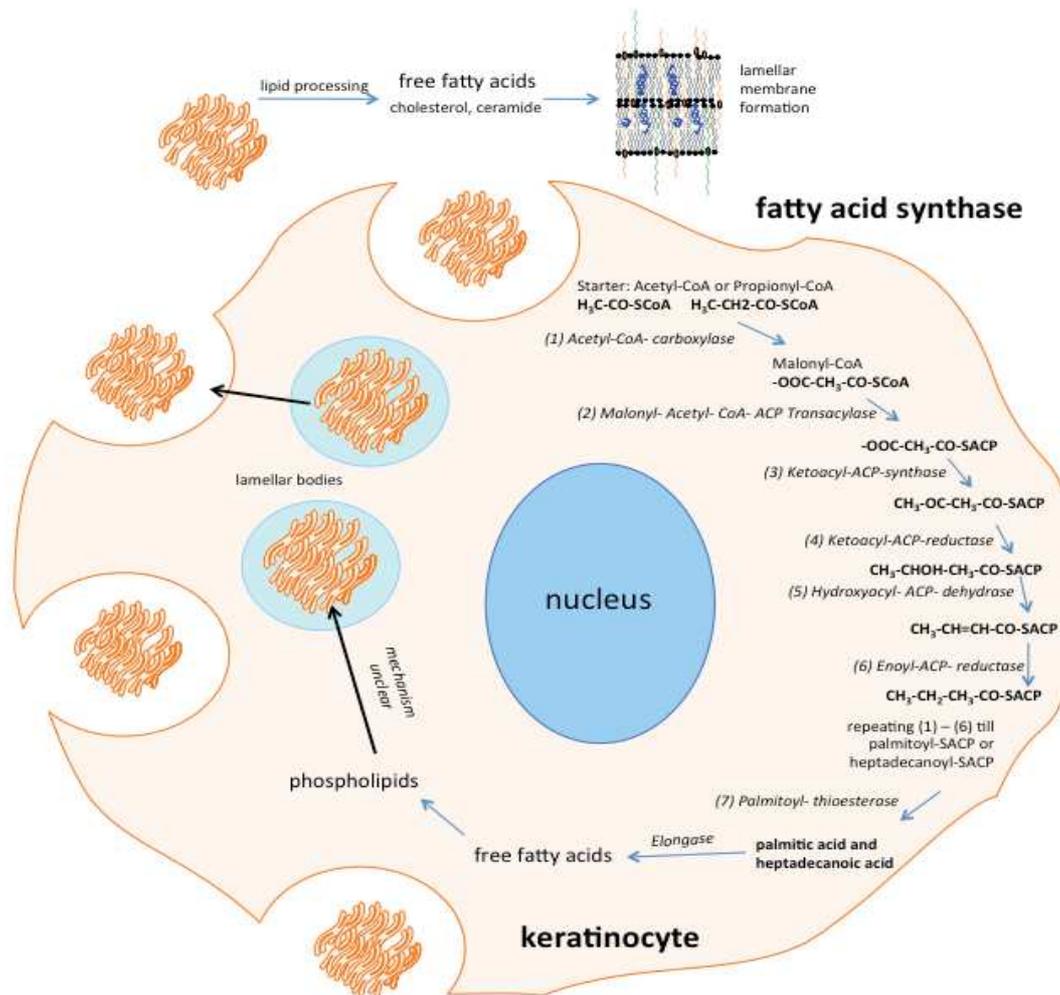
### 3.1.2 Freie Fettsäuren im Stratum corneum

Das SC enthält überwiegend gesättigte Fettsäuren mit einer Kettenlänge zwischen C16:0 und C26:0. Im weiteren Verlauf wird die Kennzeichnung der Fettsäuren so erfolgen, dass die erste Zahl die Anzahl der Kohlenstoffatome in der Fettsäurekette angibt und die zweite Zahl hinter dem Doppelpunkt die Anzahl der Doppelbindungen beschreibt. Die Hauptfettsäuren sind Palmitinsäure (C16:0), Stearinsäure (C18:0), Behensäure (C22:0), Lignocerinsäure (C24:0) und die Hexacosansäure (C26:0), welche sich folgendermaßen in Bezug auf den Gesamtfettsäuregehalt verteilen: 10, 10, 15, 25 und 10 % (m/m) [61]. Zusätzlich zu den oben aufgeführten enthält das SC ungesättigte Fettsäuren. Hiervon sind Ölsäure (C18:1) und Linolsäure (18:2) die häufigsten Vertreter. Außerdem wurde die Entstehung und Existenz von Fettsäuren mit ungeradzahlgiger Kettenlänge nachgewiesen [47] [52] [65] [98].

**Tabelle 3 Lipidzusammensetzung im Stratum corneum nach Ponc (Mengenanteile der Interzellularmatrix an Cholesterol 25,0 %, Ceramiden 40,0 % und freien Fettsäuren 25,0 %) [102]**

Fettsäure	Anteil [% m/m]	Ceramid	Anteil [% m/m]
Myristinsäure (C14:0)	3,8	Cer [EOS]	8,3
Palmitinsäure (C16:0)	10,0	Cer [NS]	20,5
Stearinsäure (C18:0)	7,0	Cer [NP]	18,0
Ölsäure (C18:1)	10,0	Cer [EOH]	5,0
Linolsäure (18:2)	6,0	Cer [AS]	10,1
Behensäure (C22:0)	10,0	Cer [AP]	8,6
Lignocerinsäure (C24:0)	30,0	Cer [AH]	12,9
		Cer [NH]	10,3

### 3.1.2.1 Fettsäuresynthese



**Abbildung 3 Fettsäuresynthese im Stratum corneum.** Je nach Starter Molekül mit zwei oder drei Kohlenstoffatomen werden geradzahlige oder ungeradzahlige Fettsäuren durch den Fettsäuresynthasekomplex gebildet und anschließend elongiert.

Die Fettsäuresynthese der Haut startet im Zytosol der Keratinozyten. Die Startermoleküle sind Acetyl-CoA für Fettsäuren geradzahliger Kettenlänge und Propionyl-CoA für ungeradzahlige Fettsäuren. Bis zu einer Kettenlänge von C16:0 und C17:0, je nach Startermolekül, werden die Fettsäuren durch einen Synthasekomplex gebildet und durch Elongasen zu Fettsäuren mit einer Kettenlänge mit mehr als 17 Kohlenstoffatomen verlängert. Letztendlich werden die FFS als Phospholipide zusammen mit Enzymen (u.a. Lipasen) aus den Lamellar Bodies freigesetzt, wo sie in der Interzellularmatrix akkumulieren (Abbildung 3) [35] [46] [58] [73].

### 3.1.2.2 Veränderungen bei pathologischen Zuständen

Inter-individuelle Unterschiede in den Fettsäurekonzentrationen können aus verschiedenen Gründen (z.B. klimatische Bedingungen, Benutzung von Reinigungsprodukten und Alter) über 100 % betragen

beziehungsweise durch Verunreinigungen mit Oberflächenlipiden (Sebum) hervorgerufen werden. Entfernt man Sebumlipide durch Waschen mit z.B. Cyclohexan und analysiert anschließend das SC, können fast gleichgroße Konzentrationen an C24:0 und C26:0 gewonnen werden, wodurch vermutet wird, dass vor allem die langkettigen Fettsäuren endogenen Ursprungs sind und die kurzkettigen vorrangig in den Sebumlipiden zu finden sind [99].

Eine Abnahme des gesamten Lipidlevels im Alter, inklusive der Fettsäuren, wurde durch Rogers *et al.* bereits nachgewiesen. Doch der komplexe Prozess der Hautalterung und der damit einhergehenden Probleme, z.B. trockene Haut konnte bezogen auf die Fettsäuren noch nicht vollständig geklärt werden [109].

Im Alter verringert sich die Proliferationsrate der Keratinozyten. Zusätzlich sinkt die Wasserbindungskapazität der Haut, durch die Abnahme an natürlichen Wasserbindemitteln (Natural Moisturizing Factor) [42]. Noch herrscht Uneinigkeit, ob ein möglicher sinkender Fettsäuregehalt im Alter mit einem langsameren Metabolismus im Zusammenhang stehen könnte [109]. Daher war es wichtig einen möglichen Zusammenhang zwischen der Fettsäurezusammensetzung im Alter und einer beeinträchtigten Hautbarriere zu untersuchen. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf den ungeradzahligen Fettsäuren, da bereits Hinder *et al.* Abweichungen bei den ungeradzahligen amidgebunden Fettsäuren im Cer [NP] und [EOS] bei Schizophreniepatienten quantifiziert hatte [52].

Neben dem Alterungsprozess verändern sich auch bei verschiedenen Hauterkrankungen die Fettsäurekonzentration und -zusammensetzung im SC. Bei atopischer Dermatitis konnte eine Verkürzung der freien und amidgebundenen Fettsäureketten nachgewiesen werden. Eine dadurch gestörte Hautbarrierefunktion führt zum Eindringen von Keimen und Allergenen in die Haut, was Entzündungsreaktionen hervorrufen kann [36] [119].

Zusätzlich zum Alter und Hautkrankheiten wurde in dieser Hautstudie der Einfluss von Diabetes auf die Fettsäurezusammensetzung des SC untersucht. Bei bis zu 70% der Patienten treten pathologische Hautveränderungen im Laufe ihrer Erkrankung auf. Zwar gibt es keine direkten diabetesspezifischen Hautveränderungen, jedoch werden einige mit Diabetes assoziiert. Zum einen können durch biochemische Prozesse, wie erhöhter Lipidperoxidation, Angiopathien auftreten. Zum anderen können Zellen durch eine vermehrte Glykierung der Proteine geschädigt werden. Proinflammatorische Prozesse und eine gestörte Immunantwort können ebenso Einfluss auf Hautveränderungen bei Diabetes haben. Weitere Erkrankungen der Haut welche mit Diabetes korrelieren, sind Candidosen, bakterielle Infektionen, das diabetische Fußsyndrom sowie Vitiligo.

Ca. 40% der Diabetespatienten beklagen eine trockene Haut (Xerosis) mit Juckreiz (Pruritus). Dies steht auch im Zusammenhang mit einer erhöhten Infektanfälligkeit und einer verminderten

Schweißsekretion. Der osmotisch bedingte Wasserverlust durch lange hyperglykämische Phasen sorgt ebenfalls häufig für eine trockene, ekzemische Haut [20] [59].

In einem Tierversuch mit Mäusen, bei denen Diabetes mit Streptozotocin oder Alloxan erzeugt wurde, war keine Veränderung des transepidermalen Wasserverlustes feststellbar. Während sich der Triglyceridgehalt erniedrigte, stieg der Anteil an Ceramiden, freien Fettsäuren und Cholesterol. Somit ist ein Zusammenhang zwischen der FFS Konzentration im SC wahrscheinlich, wurde bis dato aber noch nicht in einer Studie an Humanhaut nachgewiesen [74] [77] [108].

### 3.1.3 Ceramide im Stratum corneum

Nach aktuellem Stand der Forschung bilden Sphingolipide den Hauptteil der extrazellulären Lipidmatrix. Neuere Studien an gesunder Humanhaut zeigen, dass der Anteil an Ceramiden je nach verwendeter analytischer Methode von 34 bis 76 % schwanken kann [21] [87] [132].

Mittlerweile wurden 19 verschiedene Ceramidklassen mit insgesamt 342 unterschiedlichen Ceramiden beschrieben (Abbildung 4) [80]. Diese hohe Anzahl ist durch die Diversität der amidgebundenen Fettsäureketten begründet sowie durch die verschiedenen N-acetylierten Sphingoidbasen, welche beliebig mit den Fettsäuren kombiniert werden können. Von Motta *et al.* wurde dafür eine ausgeklügelte Nomenklatur entwickelt und durch Robson *et al.*, t' Kindt *et al.* und Rabionet *et al.* vervollständigt [65] [88] [104] [107].

Dieses System beruht auf einem Zweibuchstabencode, wobei der erste Buchstabe für die Art der Fettsäure steht.

<b>A</b>	Alpha- Hydroxyfettsäuren
<b>N</b>	Non- Hydroxyfettsäuren
<b>E</b>	Esterified (veresterte) Fettsäuren
<b>O</b>	Omega- Hydroxyfettsäure

Der zweite Buchstabe beschreibt die korrespondierende Sphingoidbase.

<b>P</b>	Phytosphingosin
<b>S</b>	Sphingosin
<b>DS</b>	Dihydrosphingosin
<b>H</b>	6- Hydroxysphingosin
<b>T</b>	Dihydroxy- Dihydrosphingosin

Weiterhin wird eine Unterteilung der Ceramidklassen in freie und gebundene Spezies vorgenommen. Letztere sind über Omega- Fettsäuren mit der Proteinstruktur, der sogenannten cornified envelope verknüpft. In der Nomenklatur wird ihnen der Buchstabe „O“ an der Stelle nach dem ersten Buchstaben zugeteilt, z.B. Ceramid [EOS].

Das in dieser Arbeit untersuchte Ceramid [NP] ist mit einem Anteil von 22,1 % nach Breiden und Sandhoff *et al.*, die größte vertretene Ceramidklasse [13]. Die Eigenschaft der Kopfgruppenpolarität scheint eine wichtige Determinante für die Ausbildung der Hautbarrierefunktion zu sein, denn dadurch können sie sich in ausgestreckter Form (full extended) oder in einer Art „Haarnadel“-Konformation (hairpin) anordnen (Abbildung 2) [93].

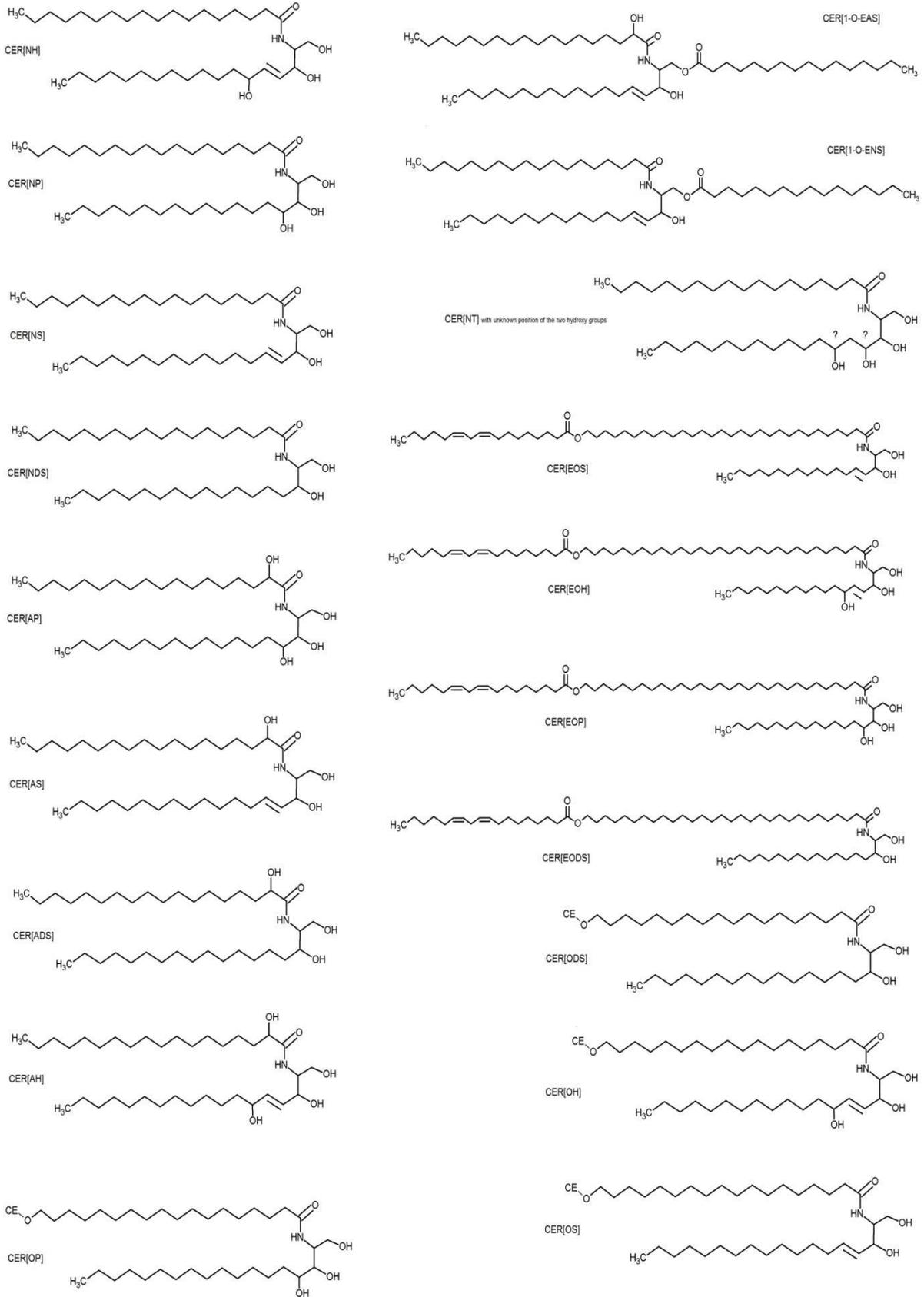


Abbildung 4 Übersicht über alle bis dato identifizierten 19 Ceramidklassen [24]. Die Nomenklatur ist in Kapitel 3.1.3 erläutert

### 3.1.3.1 Ceramidbiosynthese

Ceramide werden *de novo* aus der Aminosäure L- Serin und PalmitoylCoA, einer Coenzym- A aktivierten Fettsäure (Palmitoyl- CoenzymA), zu Ketosphinganin kondensiert [54]. Dieses wird zu Sphinganin reduziert. Sphinganin wird daraufhin zu Dihydroceramid acyliert, welches wiederum abschließend zu einem Ceramid dehydriert wird (Abbildung 5).

Am Ende des Prozesses werden die einzelnen Ceramidklassen an ihrer 1-Hydroxy- Position modifiziert, entweder durch die Glucosylceramidsynthase zu Glykosphingolipiden oder zu Sphingomyelin [1] [53] [128].

Neben der direkten Synthese entstehen die Ceramide auch durch Abspaltung aus Sphingomyelin durch das Enzym Sphingomyelinase. Uchida *et al.* fand Hinweise, dass Sphingomyelin hauptsächlich in Cer [AS] und Cer [NS] hydrolysiert wird [128]. Dabei wird Sphingomyelin in die odland bodies im *Stratum spinosum* eingelagert. Diese geben ihren Inhalt an Lipidvorstufen im *Stratum corneum* zusammen mit zahlreichen Enzymen frei, wo sich die Lipidbarriere aus freien Fettsäuren, Ceramiden und Cholesterol ausbilden kann.

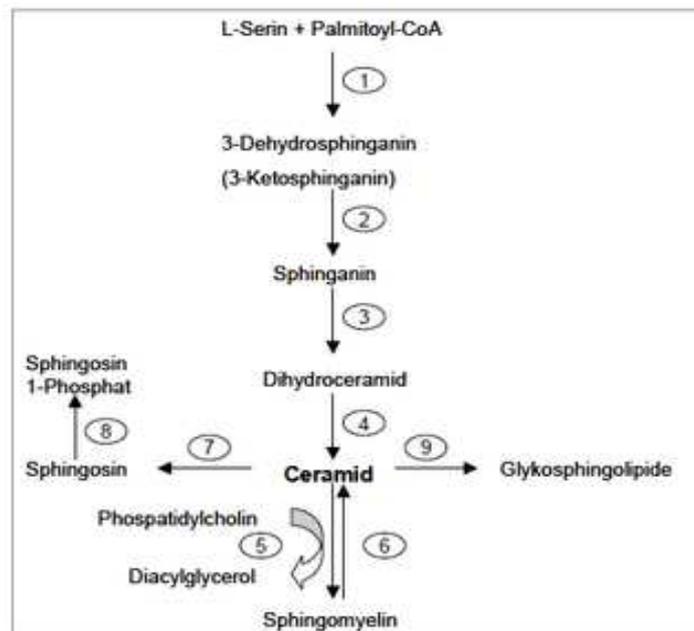


Abbildung 5 Die Biosynthese der Sphingolipide. Diese findet bis zum Ceramid im Endoplasmatischen Retikulum statt. Alle weiteren Schritte erfolgen im Golgi-Apparat. Die Enzyme sind: 1: Serin-Palmitoyltransferase; 2: 3-Dehydrosphinganin-Reduktase; 3: Sphinganin-N-Acyltransferase; 4: Dihydroceramid-Desaturase; 5: Sphingomyelin-Synthase; 6: Sphingomyelinase; 7: Ceramidase; 8: Sphingosin-Kinase; 9: Glykosylceramid-Transferasen [79]

### **3.1.3.2 Veränderungen bei pathologischen Zuständen**

Hauterkrankungen können regelmäßig mit einer gestörten Barrierefunktion und gleichzeitiger Erniedrigung des Ceramidgehaltes in Verbindung gebracht werden [12]. In Studien konnte gezeigt werden, dass u.a. der Anteil ceramidgebundener Linolsäure in Ceramid [EOS] in gealterter Haut verringert ist. Eventuell auftretende Symptome sind eine verringerte Flexibilität und verlangsamte Desquamation. In einer Untersuchung an nicht erkrankten Hautarealen von Patienten mit atopischer Dermatitis konnten jedoch keine signifikanten Ceramid- Defizite im Vergleich mit gesunder Haut ermittelt werden [33].

Aufgrund dieser vielfältigen Datenlage wurden diese Studien und auch die vorliegende Arbeit dazu verwendet, einen diagnostischen Anhaltspunkt zu finden, der helfen könnte, Krankheiten anhand bestimmter Ceramidzusammensetzungen zu erkennen. Aussagen zu erkrankter Haut von Psoriasis und der atopischen Dermatitis können bereits getroffen werden. Sind Hautareale direkt in das Krankheitsgeschehen involviert, sinken die Ceramidkonzentrationen an [EOS], [NP] und [AP] [88][89].

Ein weiteres aus klinischer Sicht bedeutsames Funktionsdefizit ist das Symptom der trockenen Haut. Dieses wird mit der unter Kapitel 4.2 beschriebenen Studie sowohl in der Zusammensetzung der freien Fettsäuren und der amidgebundenen Fettsäuren des Ceramides [NP] in dieser Arbeit genauer untersucht. Der pathologische Zustand kann wie bereits erwähnt, durch strukturelle und funktionelle Veränderungen des SC hervorgerufen oder im Zusammenhang mit Diabetes mellitus oder gealterter Haut beobachtet werden. Aus den oben genannten und sehr vielfältigen Gründen fehlt es jedoch an einheitlichen Ergebnissen und Aussagen zu einzelnen Ceramidklassen und deren Zu- oder Abnahme bei pathologischen Zuständen [109].

Ceramide sind äußerst vielfältig und komplex aufgebaut. Bis zu 19 Klassen lassen sich jeweils mit diversen Fettsäuren und deren verschiedenen Kettenlängen synthetisieren. Diese Komponenten zu separieren, bietet zusätzlich einen hohen analytischen Anspruch u.a. in Sensitivität und Selektivität der Methoden.

### **3.1.4 Gewinnung der Lipide**

#### **3.1.4.1 Gewinnung der freien Fettsäuren und Ceramiden aus Humanhaut**

Es handelt sich hierbei um eine prospektive, monozentrische und diagnostische Studie. Sie dient zur Determinierung der Zusammensetzung einzelner Bestandteile in der Lipidmatrix des SC. Außerdem sollen Veränderungen mit zunehmendem Alter und bei Diabetikern im Vergleich zu jungen Probanden analysiert werden. Diese Studie ist in drei Studiengruppen unterteilt:

Alle Personen sind kaukasischer Abstammung, Nichtraucher und haben keine erosiven, ulzerösen oder stark entzündlichen Läsionen im Bereich der Messareale.

- Gruppe 1- gesund, > 60 Jahre, Testareal: volarer Unterarm
- Gruppe 2- gesund, 18-40 Jahre, Testareal: volarer Unterarm und Bereich des medialen Fersenbeins
- Gruppe 3- insulinabhängiger Diabetes seit mindestens fünf Jahren, 18- 40 Jahre, Testareal: volarer Unterarm und Bereich des medialen Fersenbeins

Die Lipidextraktion sowohl der Fettsäuren als auch der Ceramide erfolgte mit einem Gemisch aus Hexan/ Ethanol 2:1 (V/V). Bei der Auswahl des Lösungsmittels stand neben der Extraktionseffektivität die einfache Handhabung im Vordergrund. Ein aggressives, nekrotisierendes Lösungsmittel wie Chloroform wurde vermieden und durch das relativ verträgliche Hexan ersetzt. Mehrfach wurden bereits Mischungen mit Hexan als Extraktionsmittel für Hautlipide eingesetzt [7] [8] [22] [98]. Nach eigenen Untersuchungen ist Methanol aufgrund der unzureichenden Mischbarkeit mit Hexan nicht geeignet. Außerdem ist es weniger hautverträglich als Ethanol [33].

### **3.1.4.2 Penetrationsstudie zur Untersuchung von Ceramid [NP]**

Zur Untersuchung der Penetration von Ceramid [NP] aus verschiedenen Formulierungen wurde die Franz'sche Diffusionszelle verwendet. Diese basiert auf der Annahme, dass die Barriereigenschaften der verwendeten *ex-vivo* Haut mit lebenden Zellen identisch sind. Dadurch, dass das SC kein vitales Gewebe ist, behält es auch nach der Exzision seine Penetrationsbarriere für Substanzen bei [15]. Somit stellt die „Franz- Zelle“ durch ihre gute Übertragbarkeit der Ergebnisse auf *in- vivo* Bedingungen den Standard in der Durchführung von perkutanen Absorptionen dar [37].

Auf einer doppelwandigen, temperierbaren Glaskammer für das Akzeptormedium wird das vom subkutanen Fett befreite Hautstück gelegt und mit einem Ring fixiert. Die äußere Seite des Hautstückes wird dann mit dem Donormedium, in der Regel die topische Formulierung, in Kontakt gebracht. Als Diffusionsbarriere können neben Humanhaut, welche *post- mortem* oder von chirurgischen Eingriffen gewonnen wird, auch Tierhäute oder synthetische Materialien eingesetzt werden. Auf die epidermale Seite wird eine Abdeckung aufgesetzt, welche für eine kontrollierte, hydratisierte Umgebung sorgt (Abbildung 6) [126].

Nach dem Auftragen einer Formulierung auf das Hautstück, diffundieren die Bestandteile entsprechend den Fick'schen Diffusionsgesetzen durch die einzelnen Schichten der Epidermis und Dermis und können je nach Lipophilie auch im Akzeptormedium nachgewiesen werden.

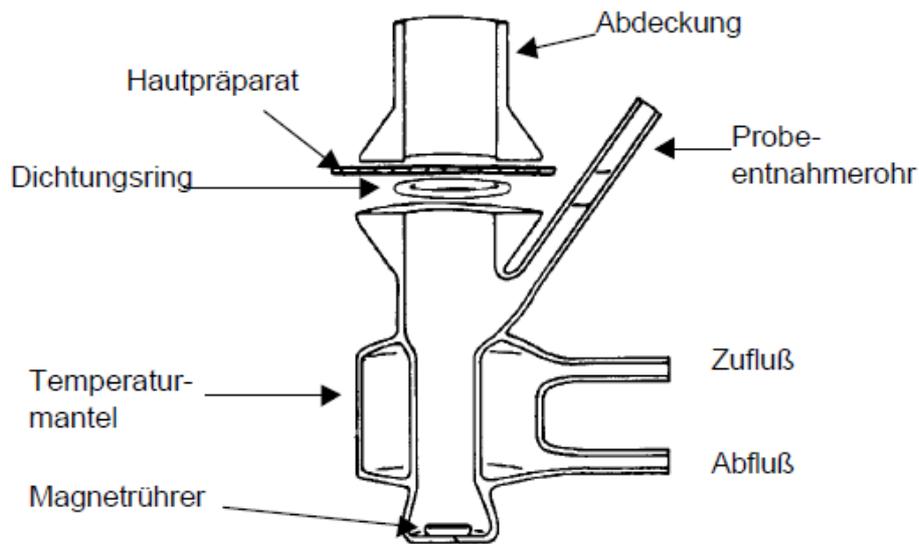


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Diffusionszelle nach Franz [37]

Üblich ist die Applikation einer *finite dose*, der klinisch relevanten Dosis. Dabei wird, nicht wie bei der überschüssigen Dosis (*infinite dose*), die Hautbarriere oder die Transportrate nur unwesentlich beeinflusst und klinisch relevante Bedingungen besser simuliert. [14] [37] [49] [84].

### 3.1.4.3 Einfluss des Isosorbids auf das Penetrationsverhalten von Ceramid [NP]

Isosorbid wird als Hilfsstoff (Abbildung 7) in dermatologischen und kosmetischen Zubereitungen eingesetzt um den Feuchtigkeitsgehalt der Haut zu erhöhen und somit als Anti-Aging-Produkt zur Verringerung von Falten durch Aufpolsterung beizutragen. Es ist ein Stärkederivat und einfach herzustellen. Ca. 650 000 Tonnen werden jährlich weltweit aus einer Reduktion von Hexosen wie D-Glucose hergestellt [19].

Isosorbid ist in topischen Formulierungen nicht hautirritierend, gibt ein geschmeidiges Hautgefühl und hat eine hohe Sicherheit, da es bereits oral als Diuretikum bei der Meniér'schen Krankheit angewendet wird.

Der Wirkmechanismus ist noch nicht vollends aufgeklärt. Es wird vermutet, dass Isosorbid die Expression der Aquaporinkanäle 3 (AQP 3) in den Keratinozyten stimuliert, welche die Wasserbindungskapazität der Haut regulieren. Ein funktionierender Wasserhaushalt steht eng im Zusammenhang mit einer funktionierenden Hautbarriere. Es ist auch bewiesen, dass das AQP 3 Niveau mit zunehmendem Alter und durch Einfluss intensiver Sonnenstrahlung abnimmt. Eine Aktivierung bzw. Vermehrung der zuständigen Gene und Kanäle würde eine Wasserbindung begünstigen [19] [85].

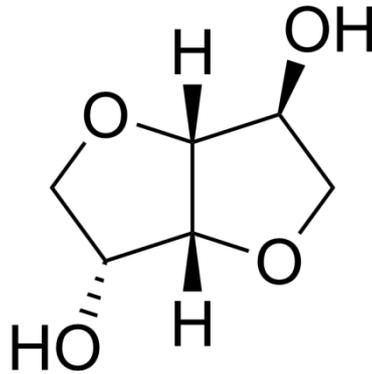


Abbildung 7 Aufbau des Isosorbid Moleküls [85]

Desweiteren übernehmen tight junctions (TJ) u.a. den parazellulären Wassertransport von hydrophilen Molekülen und sind an der Ausbildung einer Barriere durch die Hydratation des SC beteiligt (Abbildung 1) [121]. Ihr Einfluss auf die Hautbarriere erfährt aktuell wachsendes Interesse seitens diverser Forschungsgruppen. Sie haben eine komplexe Struktur und bestehen aus Transmembran-, Plaque- und Scaffoldproteinen, welche die Korneozyten wie „Schlussleisten“ miteinander verbinden [48] [114] [139].

Die weiterführende Frage in dieser Arbeit war, ob Isosorbid auch als Retarder bzw. Penetrationsreducer eingesetzt werden kann, um topische Formulierungen mit Wirkstoffen, die explizit im SC wirken sollen, am Eindringen in tiefere Hautschichten zu hindern. So würde u.a. die vergrößerte Hydratation im SC eine weitere Diffusion in tiefere Hautschichten verhindern.

Retarder bzw. Reducer können ebenfalls verwendet werden, wenn bei einem Einsatz von Xenobiotika das Eindringen in die systemische Zirkulation verhindert werden soll. Mit dem Wissen über die Mechanismen von Penetrationsförderern/ Enhancern (speziell der Erhöhung der Fluidität der SC- Lipide) kann rückwirkend auf die Wirkweise der Retarder geschlossen werden. Inwieweit Penetrationsparameter beeinflusst werden, hängt außerdem stark vom Vehikel und der Applikationsart ab. [93].

#### 3.1.4.4 Einsatz von Mikroemulsionen zur dermalen Anwendung

Mikroemulsionen (ME) sind moderne Drug Delivery Systeme, bestehend aus einer wässrigen und öligen Phase, welche durch Tenside stabilisiert werden. Charakteristisch sind im Gegensatz zu normalen Emulsionen ihre spontane Entstehung, die keinen Energieaufwand erfordert und ihre Transparenz. Der Einsatz eines zweiten Emulgators (Co- Tensid) z.B. kurzkettigen Alkohol sorgt für eine verringerte Grenzflächenspannung durch Einlagerung in die amphiphilen Grenzschichten und begünstigt dadurch die spontane Bildung [3][40]. Die Mikrostruktur der klaren und optisch isotropen ME- Systeme kann unterschiedlich ausgeprägt sein. Wässrige und ölige Bereiche werden von einer

Grenzflächenschicht der Emulgatorphase getrennt. Auch bikontinuierliche Strukturen sind bei gleichen Anteilen von Wasser und Öl möglich. Alle Regionen einer ME sind dynamisch, sie unterliegen einem permanenten Auf- und Abbau.

Aufgrund ihrer speziellen Eigenschaften sind ME für den galenischen Einsatz von dermalen Anwendungen besonders geeignet. Sie sind einfach herzustellen und weisen hohe Lagerstabilität auf. Schlecht wasserlösliche Stoffe sind in ihnen häufig gut solubilisierbar. Nachteilig kann sich der hohe Emulgatoranteil auswirken. In der Regel sind Konzentrationen von ca. 40 % nötig, um für Anwendungen relevante ME zu erzeugen. Diese Menge an Emulgatoren kann zu Hautunverträglichkeiten führen. Es sollte daher auf milde Substanzen wie z.B. Saccharoseester oder Lecithine zurückgegriffen werden [18] [95] [118].

Der genaue Mechanismus der Penetrationsförderung kolloidaler Carrier- Systeme ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Sowohl die Zusammensetzung der Emulgatorphase als auch ihre Konzentration innerhalb des SC sind mit großer Wahrscheinlichkeit ausschlaggebend. Die Anwesenheit von freiem Wasser kann den Wirkstofftransport in die Haut weiter erhöhen. Die dynamische Struktur der ME und die somit große Beweglichkeit des Wirkstoffes innerhalb deren Strukturen können den Diffusionsprozess positiv beeinflussen. Die Applizierung von gesättigten oder übersättigten Systemen begünstigt zusätzlich einen hohen Konzentrationsgradient zwischen SC und Formulierung, was sich positiv auf die Penetration auswirkt [63] [64] [101]. Als Hauptpenetrationsweg wird für alle Wirkstoffe der transzelluläre Weg angenommen. Durch die gute Spreitung und geringe Grenzflächenspannung ist dieser Weg auch für ME am wahrscheinlichsten [4] [18] [127].

Ceramide penetrieren aufgrund ihrer geringen Löslichkeit nur bedingt in das SC und tiefere Hautschichten, können jedoch zur Reparatur der Hautbarriere eingesetzt werden. Umso interessanter ist dadurch die Entwicklung von topischen Formulierungen, die ausreichend Ceramide solubilisieren können. Durch kontinuierliche und spontane Fluktuationen der verschiedenen Domänen innerhalb der ME, wird eine hohe Beweglichkeit des Wirkstoffes ermöglicht, wodurch auch die Diffusion erhöht wird. Durch das klare Aussehen von Mikroemulsionen ist es möglich, die Konzentration des gelösten Ceramides visuell zu verfolgen. Zur Stabilisierung der entwickelten ME wurde ein weiteres Ceramid eingearbeitet. Die Wahl Cer [AP] zusätzlich in die ME einzuarbeiten, lag darin begründet, dass bereits Schröter *et al.* dokumentierte, dass dieses eher kurzkettige Ceramid stabile Lamellen ausbildet. Dadurch kann es stabilisierend auf das dynamische System der ME einwirken. Außerdem wurde ein antiproliferativer und proapoptotischer Effekt in verschiedenen Tumorzellen gezeigt, was den Einsatz als Therapeutikum in topischen Formulierungen umso interessanter macht [115].

### 3.1.5 Analytische Methoden

#### 3.1.5.1 Gaschromatographie

In der Gaschromatographie (GC) arbeitet man mit gasförmigen mobilen Phasen, die als Trägergas bezeichnet werden und überwiegend mit Kapillarsäulen als stationären Phasen. Wichtig für die chromatographische Trennung ist, dass die Analyten während der Probeninjektion unzerstört verdampft werden können. Während der Trennung im Säulenofen muss der Analyt nicht gasförmig vorliegen. Es reicht oft auch ein genügend hoher Dampfdruck, damit sich ein bestimmter Anteil der Moleküle in der Gasphase befindet. Fettsäuren sind schwerflüchtige Substanzen. Sie werden daher in leichter flüchtige Substanzen derivatisiert [56].

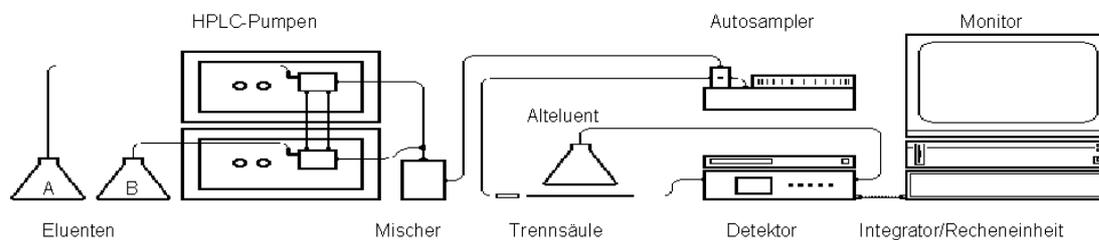
In der angewendeten Methode kam Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) zum Einsatz. TMSH ist ein einfach zu handhabendes Reagenz, welches bei Raumtemperatur eine vollständige Derivatisierung der Fettsäuren zu leichtflüchtigen Fettsäuremethylestern erzielt. Der Überschuss wird im Injektor bei 250 °C zu Methanol und Dimethylsulfid pyrolysiert. Diese Komponenten stören die Detektion der FFS nicht [68] [91].

Es besteht auch die Möglichkeit stationäre Phasen mit leicht polaren Eigenschaften einzusetzen, wobei die Polarität neben der Siedetemperatur ebenfalls auf die Trennung einwirkt. Bei der hier verwendeten Säule mit einem Polyethylenglykol-2-nitroterephthalat Film sind die polaren Eigenschaften ebenfalls ausgeprägt. Neben vielfältigen Angeboten zu Kapillarsäulen existiert in der GC auch eine große Auswahl an Detektoren, welche sich in Selektivität, Empfindlichkeit, Linearbereich und Preis unterscheiden. Beim verwendeten massenflussabhängigen Detektor, dem Flammenionisationsdetektor (FID), werden kohlenstoffhaltige Verbindungen zu  $\text{CHO}^+$  Ionen umgesetzt und als Signal detektiert. Der (FID) benötigt Wasserstoffgas und Druckluft für den Betrieb. Beide Gase sollten sehr rein und vor allem kohlenstofffrei sein, um ein niedriges Grundrauschen zu realisieren. Von der Säule abgehende Substanzen werden in einer Wasserstoff – Luft Flamme verbrannt. Im wasserstoffreichen Teil der Flamme (reduzierende Bedingungen) werden kohlenstoffhaltige Verbindungen zu Methan umgesetzt, welche im sauerstoffreichen Teil der Flamme (oxidierende Bedingungen) über Radikalreaktionen verbrannt werden. Oberhalb der Flamme ist der Kollektor angebracht, an dem ein negatives elektrisches Potenzial angelegt ist. Die entstandenen Ionen werden vom Kollektor angezogen und es fließt ein zur Ionenzahl proportionaler Strom, der das Detektorsignal darstellt.

Für an Kohlenstoffatome gebundene Heteroatome ist die Umsetzung zu Methan erschwert, weshalb die Analyse von z.B. Ameisensäure, Formaldehyd und u.a. Fettsäuren ohne Derivatisierung nicht möglich ist [50] [56].

### 3.1.5.2 Hochleistungsflüssigchromatographie

Die chromatographische Auftrennung zwischen einer mobilen Phase (flüssig) und einer stationären Phase (fest) kann durch unterschiedliche Mechanismen erfolgen (Affinität, Ionenausschluss, Adsorption etc.). Je höher die Verweildauer auf der Hochleistungsflüssigchromatographie- (HPLC) Säule, desto stärker ist die Affinität zur stationären Phase, was sich in unterschiedlichen Retentionszeiten äußert. Ein Detektor kann die Signale auf unterschiedliche Weise erfassen (UV-Signal, Leitfähigkeit, Massenspektrometrie, Molekülmasse) und diese können anhand ihrer Peakflächen qualitativ und quantitativ ausgewertet werden. Generell besteht eine HPLC- Anlage aus einem Pumpensystem für das Laufmittel, einem Probeneinlasssystem, einer Trennsäule (optional mit Säulenofen) und einem Detektor zur Analyse (Abbildung 8) [41] [96] [110].



**Abbildung 8 Allgemeiner Aufbau einer HPLC- Anlage [100]**

Meist werden für unpolare Substanzgemische Säulen mit Umkehrphase (Reversed Phase – RP) als stationäre Phase verwendet. Hierbei werden die freien Silanolgruppen des Kieselgels chemisch modifiziert und mit Alkylketten, Phenylresten oder Cyclohexylresten besetzt. Dadurch zeigt das sonst hydrophile Kieselgel unpolare Eigenschaften und sorgt für eine bessere Auftrennung z.B. von Ceramiden. Die Trennleistung kann durch Variationen in der Fließmittelzusammensetzung, Flussrate oder Säulenofentemperatur beeinflusst werden. Bei RP- Säulen nimmt die Elutionskraft mit steigendem Anteil an unpolaren Lösungsmitteln zu [41] [110].

### 3.1.5.3 Evaporative light scattering detection (ELSD)

Bei der Lichtstreuungsdetektion (ELSD) wird der Analyt mit Hilfe von Stickstoff vaporisiert. Durch die Intensität des gestreuten Lichtes sind Rückschlüsse auf die Menge der Analyten möglich [23]. Dabei wird das Aerosol durch ein Verdampfungsrohr geleitet, wodurch weitere Lösungsmittelmoleküle verdampfen und nur die Aggregate des Analyten in die Detektionskammer gelangen. Dort wird das durch eine Laserlichtquelle gestreute Licht von einem Photomultiplier aufgenommen und einer Auswerteeinheit zugeführt. Der Vorteil einer Kopplung der ELSD mit der Flüssigchromatographie (LC) liegt in deren Kompatibilität mit vielen Lösungsmitteln. Das System ist somit geeignet für die Lipidanalytik, wo teilweise das aggressive Chloroform für eine optimierte Auflösung eingesetzt wird. Um die Vorteile aller Lösungsmittel nutzen zu können, sowie eine Geruchsbelastung durch das

Verbrennen von Lösungsmitteln bei hohen Temperaturen zu vermeiden, wird die ELSD der APCI zur Auftrennung der Ceramidklassen vorgezogen [24] [138].

#### 3.1.5.4 Massenspektrometrie

Das Prinzip der Massenspektrometrie (MS) besteht darin, geladene Teilchen im Vakuum nach ihren Masse/ Ladungs- Verhältnissen ( $m/z$ ) aufzutrennen [23]. Der prinzipielle Aufbau eines Massenspektrometers besteht aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator, einem Detektor sowie Einheiten zur Ionenquelle. Die Auftrennung nach dem Masse/ Ladungsverhältnis erfolgt im Massenanalysator, die relative Häufigkeit der Ionen wird von der Registriervorrichtung aufgezeichnet und die Ionenoptikeinheiten dienen zur Fokussierung der Ionen.

Im Folgenden wird auf die beiden Ionisationsverfahren eingegangen, welche bei der Analyse der Hautstudien verwendet wurden – Die ESI und die APCI.

Bei der Elektrospray- Ionisation (ESI) wird die Analytlösung mit Hilfe von Hochspannung (meist 1-5 kV) versprüht. Es entstehen kleine geladene Tröpfchen, welche im Flug verdampfen, wobei sich die übriggebliebenen Teilchen durch Abstoßungskräfte in freie Ionen umwandeln. Der genaue Vorgang der Ionenbildung wird kontrovers diskutiert [62], abschließend entstehen Quasimolekülonen. Ausgehend davon werden durch die Polarität der Spannung positive  $[M+H]^+$  oder durch Protonenabspaltung negative Pseudomolekülonen  $[M-H]^-$  gebildet. Für die ESI ist die Bildung von Anlagerungsprodukten (Addukten) mit Chlorid- oder Natriumionen typisch. Diese zeigen oft höhere Intensitäten als die Protonenaddukte [16].

Bei der chemischen Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI) wird die Analytlösung am Auslass der Kapillare mit Hilfe des Sprühgases zerstäubt und bei 400-500 °C im verdampft. Zwischen einer nadelartigen Elektrode (Coronanadel) und einer Gegenelektrode wird eine Spannung von 1-5 kV angelegt. Diese wird über Stickstoffmoleküle auf Wassercluster und abschließend auf die Analytmoleküle übertragen [16] [17] [55]. Hier handelt es sich um eine indirekte Ionisation, an deren Ende ebenso wie bei der ESI die Entstehung von Pseudomolekülonen steht, welche im Hochvakuum zum Detektor transportiert werden.

Bei der APCI sind, im Gegensatz zur ESI, die Verdampfung des Lösungsmittels und Ionisation zwei separate Schritte und erlauben den Einsatz von lipophilen Lösungsmitteln wie Chloroform, welche in der Normalphasentrennung (NP) Anwendung findet. Die APCI zeigt im Falle einer LC/MS- Kopplung eine optimale Auftrennung auch bei hohen Flussraten (1 ml/min), wohingegen bei ESI besser mit niedrigen Flussraten gearbeitet werden sollte. Beide Verfahren können als komplementär betrachtet werden und ergänzen sich in der Lipidanalytik optimal [75].

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Detektor beinhaltet einen Sekundärelektronenvervielfacher (SEV). Hierbei treffen die aus dem Analysator austretenden Pseudomolekülonen auf eine Dynode und schlagen Elektronen aus ihr heraus. Diese prallen auf die mit hoher Spannung versehenen Dynoden und erzeugen ein Messsignal, welches proportional zu dem aus dem Analysator austretenden Ionenstrom ist.

### **3.1.5.5 LC- MS Kopplung**

Lipidextrakte sind meist komplexe Mischungen aus den unterschiedlichsten Stoffklassen. Eine direkte massenspektrometrische Analyse ist somit ausgeschlossen, da sich die unterschiedlichsten Fragmente überlagern und in ihrer Vielfalt nicht zuzuordnen wären. Eine vorherige flüssigchromatographische Trennung z.B. durch HPLC, ist somit erforderlich.

Ein grundlegender Aspekt der Forschung im Rahmen dieser Arbeit bestand darin, mittels HPLC/MS die Ceramide von gesunden, jungen und älteren Probanden sowie von Diabetikern zu untersuchen. Ziel war es, vorhandene spezifische Unterschiede in der molekularen Zusammensetzung von einzelnen Ceramidklassen für diagnostische Zwecke und nähere Charakterisierung zu untersuchen. Unter chromatographischen Aspekten betrachtet, ist eine RP- Auftrennung nicht zweckmäßig. Die Ceramide würden hierbei nach der Lipophilie der Kettenlänge von Sphingoidbasen bzw. Fettsäuren aufgetrennt werden, jedoch nicht nach den verschiedenen Ceramidspezies und damit nach der Polarität der Kopfgruppen.

Eine etablierte Methode zur Auftrennung der Ceramide stellt die High performance thin layer chromatography, (HPTLC) dar. Sie ist robust gegenüber Lipid- und Matrixbestandteilen. Die Kombination mit universellen Detektionsmethoden ist ebenfalls möglich. Eine weitere Auftrennung der einzelnen Ceramidklassen in Abhängigkeit der Verteilung ihrer Fettsäurekettenlängen sowie deren Quantifizierung sind jedoch hier nur mit Hilfe des „Abkratzens“ der Platten mit anschließender aufwändiger Extraktion sowie massenspektrometrischer (MS) Analyse möglich [136].

Zielführender war es daher, im Rahmen der Analysen zuerst eine Trennung der Ceramidklassen mittels HPLC- ELSD zu erreichen. Anschließend konnte dann über RP- Phase HPLC-APCI-MS die unterschiedliche Lipophilie der Fettsäurekettenlänge ausgenutzt werden, um diese zu quantifizieren.

### **3.1.6 Validierung ausgewählter analytischer Methoden**

Diese Übersicht liefert keinen Anspruch auf Vollständigkeit, sie soll lediglich die Möglichkeiten zur Überprüfungen einer neu entwickelten Analysenmethode aufzeigen. Somit kann ein Hinweis darauf gewonnen werden, ob mit ihr verlässliche Daten erarbeitet werden können. Neben den aufgeführten

Prüfpunkten wurden auch die Nachweis- und Bestimmungsgrenze (Limit of Detektion LoD und Limit of Quantification, LoQ) untersucht, um die kleinste mit ausreichender Richtigkeit und Präzision bestimmbare Konzentration zu erfassen.

In der Chromatographie sollten die Peaks der Analyten deutlich von der Basislinie differenzierbar sein. Zur Bestimmung wird ein minimales Signal- Rausch Verhältnis von 3:1 für die Nachweisgrenze (LoD) und 10:1 für die Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification, LoQ) laut der EMA Richtlinie für bioanalytische Methoden angenommen [82].

Richtigkeit und Präzision beschreiben zusammen die Genauigkeit einer Methode. Die Richtigkeit wird als ein Maß der Übereinstimmung zwischen dem ermittelten Wert und dem als richtig angesehenen Wert definiert. Als quantitatives Maß gilt die systematische Ergebnisabweichung.

Als ein Maß für die Reproduzierbarkeit der Methode erfolgte die Bestimmung der Präzision, somit können Streuungen durch das Analysengerät erkannt werden. Dafür werden die Messungen der Kontrollstandards an einem Tag (in der Serie) unter identischen Bedingungen sowie an verschiedenen Tagen (zwischen den Serien) durchgeführt.

Die EMA- Richtlinie für bioanalytische Methoden schreibt bei Präzision sowie bei der Richtigkeit max. 15 % Abweichung zum Nennwert vor. An der LoQ sollte die maximale Abweichung 20 % betragen [32] [70] [71].

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Basiscreme DAC	Bombastus Werke, Freital, Deutschland
Ceramid [AP]	Evonik- Goldschmidt GmbH, Essen, Deutschland
Carbamazepin	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ceramid [AS]	Evonik- Goldschmidt GmbH, Essen, Deutschland
Ceramid [NP]	Evonik- Goldschmidt GmbH, Essen, Deutschland
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eisessig	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 96%, unvergällt	Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach, Deutschland
Heneicosansäure	Larodan, Malmö, Schweden
Heptadecansäure	Larodan, Malmö, Schweden
Hexacosonsäure	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hexadecansäure	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Polyglycerol – 4 –laurat (Hydriol HPMGO.4)	Hydriol AG, Wettingen Deutschland
Pentylenglycol (Hydrolite 5)	Symrise GmbH & Co KG, Holzminden, Deutschland
Lignocerinsäure	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
n- Hexan	Carl Roth, Karlsruhe , Deutschland
n- Propanol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Nonadecansäure	Larodan, Malmö, Schweden
Octadecansäure	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Octadecansäure	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ölsäure	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Pentadecansäure	Larodan, Malmö, Schweden
Polysorb P	Roquette, Lestrem, Frankreich
Polyglycerol – 4 – oleat (TCPL4)	Evonik- Goldschmidt GmbH, Essen, Deutschland
Tetracosan-9,9,10,10-d <sub>4</sub> -säure	CNP Isotopes, Pointe- Claire, Quebec, Kanada
Tricosansäure	Larodan, Malmö, Schweden
Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH)	Marcherey-Nagel, Düren, Deutschland

Das Ceramid [NP] D3 wurde durch die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dobner am Institut für Pharmazie, Martin- Luther Universität Halle- Wittenberg synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

## **4.2 Studie an humanem SC zur Untersuchung der freien Fettsäuren und Ceramide von älteren Probanden und Diabetikern**

### **4.2.1 Aufbau der Studie**

Die Probanden wurden in drei Studiengruppen eingeteilt - Gruppe 1 mit älteren Teilnehmern über 60 Jahren; Gruppe 2 mit jungen Probanden zwischen 18 und 40 Jahren und Gruppe 3, diese bestand aus Diabetikern zwischen 18 bis 40 Jahren. Keiner der Probanden litt zum Zeitpunkt der Teilnahme an Hauterkrankungen.

Ziel der Untersuchung war es, Unterschiede in Fettsäure- und Ceramidkonzentrationen bzw. – profile innerhalb der Studiengruppen zu identifizieren. Die Proben wurden, wie in Kapitel 3.1.4.1 skizziert, gewonnen. Dabei dienten die Extrakte der zweiten Gruppe („Gruppe jung“) als Referenz. Im Vergleich zu diesen konnte ermittelt werden, welche Änderungen im SC-Lipid-Gehalt mit Alter (Gruppe 1/ „Gruppe alt“) bzw. durch Erkrankung an Diabetes mellitus Typ 1 (Gruppe 3/ „Gruppe Diabetes“) korrelieren (Abbildung 9). Die Probandenzahl der letzten Gruppe war mit 38 Probanden geringer, als die der beiden anderen Gruppen (jeweils 110 Probanden).

### **4.2.2 Lipidextraktion – Gewinnung der SC Lipide**

Die Gewinnung der SC Lipide wurde durch ein schonendes Extraktionsverfahren erreicht [33] [34]. Dabei wurde ein runder Glaszylinder mit einer Querschnittsfläche von ca. 6 cm<sup>2</sup> mit 5 ml Hexan/ Ethanol (2:1) V/V gefüllt und auf die Oberfläche des betreffenden Testareals der Probanden aufgesetzt. Nach 5 min unter leichter Bewegung wurde der Inhalt des Zylinders mit einer Pipette entnommen und zweimal 2 ml in verschließbare Glasvials abgefüllt. Dabei diente eine Probe zur Fettsäureanalytik, die andere zur Untersuchung der Ceramidklassen und deren amidgebundener Fettsäuren. Die Extrakte wurden bei 50 °C unter Stickstoffatmosphäre vaporisiert und anschließend trocken bei -18 °C bis zur Messung gelagert.

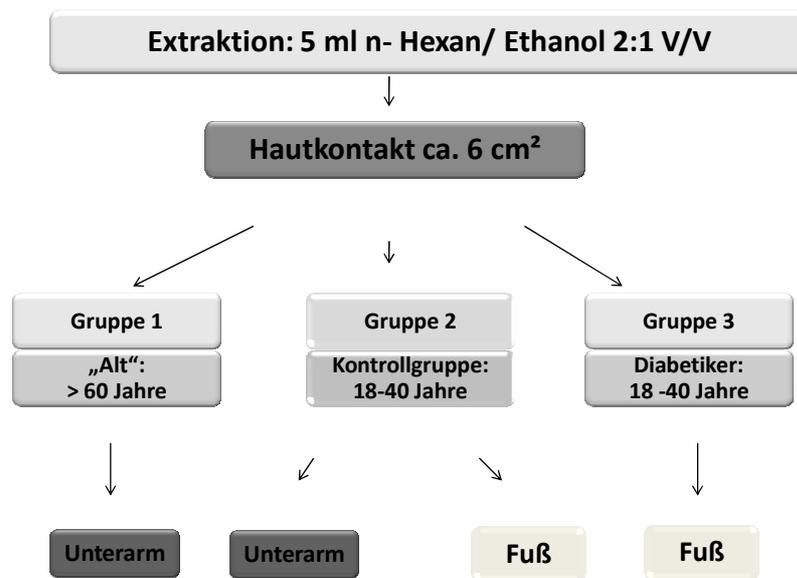


Abbildung 9 Darstellung des Aufbaus der Hautstudie und deren Unterteilung in drei Studiengruppen.

#### 4.2.3 Statistische Auswertung der Studie

Zu Beginn der Auswertung wurde die Verteilung der gemessenen Fettsäurekonzentrationen mittels Shapiro-Wilk-Test untersucht. Durch diesen Signifikanztest konnte belegt werden, dass die Grundgesamtheit der freien Fettsäurekonzentrationen als auch die Konzentrationen von amidgebundenen Fettsäuren nicht normalverteilt ist. Ohne eine vorliegende Normalverteilung, konnte kein t- Test angewendet werden, um statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Studiengruppen zu ermitteln.

Deshalb wurde der Wilcoxon- Mann- Whitney- Test, auch Mann- Whitney- U- Test genannt, als verteilungsunabhängiges und parameterfreies Testverfahren angewendet. Er überprüft die Übereinstimmung von zwei Verteilungen mit einer dazugehörigen Grundgesamtheit. So kann getestet werden, inwiefern z.B. die Fettsäure C18:0 aus Gruppe 1 gleich (oder ungleich) ist mit den Konzentrationen aus Gruppe 2.

Zusätzlich wurden die gesamten Fettsäureprofile mittels eines multivariaten Wilcoxon-Tests verglichen. Dabei werden alle FFS- Konzentrationen eines jeden Probanden in einer Gruppe als Profil definiert und gegen die FFS-Profile einer anderen Gruppe verglichen. Das Ziel dieses Tests war es, einen statistisch signifikanten Unterschied über das gesamte FFS-Profil zwischen den zwei betrachteten Gruppen zu bestimmen.

Um diese Vermutung zu bestätigen oder aber auch zu verwerfen, wurde das folgende Klassifikationsexperiment durchgeführt. Auf der Grundlage eines Gaußschen Mischmodells wurden die Verteilungsparameter und die Mischkomponenten für jede Gruppe gelernt und es wurde versucht, mit Hilfe dieser gelernten Parameter die Probanden in die ihr bekannten Gruppen zu klassifizieren. Dabei wurden drei unterschiedliche Strategien verfolgt. Mit dieser Methode sollte der Einfluss der einzelnen FFS auf die Unterscheidbarkeit der beiden betrachteten Gruppen überprüft werden. Die zweite Strategie betrachtet die Gesamtheit aller FFS einer Gruppe als Profil von FFS und es wurde ein multivariates Mischmodell bestehend aus zwei 12-dimensionalen multivariaten Gaußverteilungen mit diagonaler Kovarianzmatrix pro Gruppe trainiert. Die dritte Strategie betrachtet, wie in Strategie zwei, auch die Gesamtheit aller FFS einer Gruppe als Profil von FFS. Auf der Grundlage dieser Daten wurde hier auch ein multivariates Mischmodell bestehend aus zwei 12-dimensionalen multivariaten Gaußverteilungen mit voller Kovarianzmatrix pro Gruppe trainiert. Hier sollte der Einfluss aller FFS-Konzentrationen betrachtet werden, um die beiden Gruppen voneinander zu unterscheiden.

Die Durchführung der Klassifikation und somit auch die Bestimmung der Klassifikationsgüte basiert auf einer 5-fachen Kreuzvalidierung. Dabei wird der gesamte Datensatz in annähernd 5 gleich große Teildatensätze zerlegt. Für das Training des Modells (dem Lernen der Parameter) wird dann in jeder der fünf Runden der Kreuzvalidierung ein Teildatensatz aus der Menge an Datensätzen entfernt und es wird auf der Basis der übrigen vier Teildatensätze ein sogenannter Trainingsdatensatz erstellt. Dieser Trainingsdatensatz wird genutzt um das oben spezifizierte Modell zu trainieren, d.h. die Parameter wie Mittelwert, Varianz und Kovarianz zu lernen.

Das Testen dieses so trainierten Modells wird mit Hilfe des noch nicht betrachteten fünften Teildatensatzes, welcher nicht für das Training verwendet wurde, durchgeführt. Da es sich um fünf Teildatensätze handelt, wird diese Prozedur unabhängig fünfmal durchgeführt und somit das Modell fünfmal trainiert und getestet. In jedem dieser fünf Durchläufe wurde die Klassifikationsgüte mittels Receiver-Operating-Characteristic-Kurve (ROC-Kurve) bestimmt. Nach der Durchführung der fünffachen Kreuzvalidierung wurden diese fünf ROC-Kurven zusammengefasst und als Gütemaß für die Klassifikation die Fläche unter dieser Kurve (AUC-Wert) bestimmt.

### 4.3 Gaschromatographie - Methode zur Quantifizierung der freien Fettsäuren

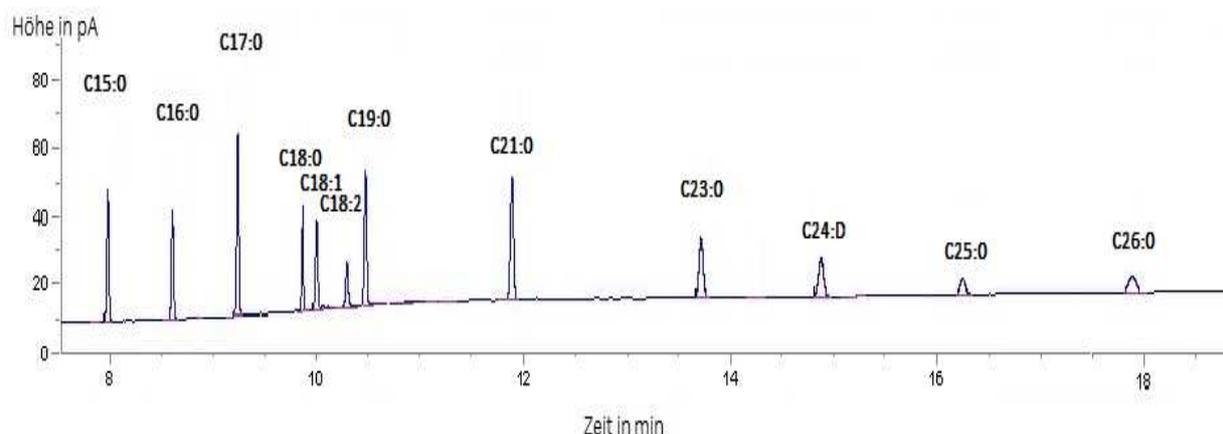
Die mengenmäßige Bestimmung ausgewählter freier Fettsäuren erfolgte mittels einer Agilent 7890A GC-System, Waldbronn, Deutschland bestehend aus einem Autosampler Agilent 7693 und einem Flammenionisationsdetektor mit folgenden Parametern:

Säule:	Optima FFAP Plus -0,25 mm, 30mx 0,25mm ID Macherey Nagel, Düren, Germany
Temperatur:	80 °C (0-1min) 160 °C (1-3,2 min) 250°C (3,2-6 min) 160 °C (6-12,5 min)
Detektor:	Flammenionisationsdetektor
Detektortemperatur:	300 °C
Modus:	Splitless Mode
Injektions- Volumen:	1 µl
Stammlösung:	1000 µg/ml pro Fettsäure mit jeweils 2 µg/ml Internem Standard (Tetracosan-9,9,10,10-d <sub>4</sub> -säure)
Kalibrierbereich:	0,2 µg/ml – 2,5 µg/ml

Um die freien Fettsäuren des SC zu detektieren, wurden kommerzielle Reinsubstanzen in Hexan/ Ethanol gelöst und mit TMSH versetzt. Die daraus entstehenden Fettsäuremethylester sind für die Gaschromatografie leicht flüchtig und quantifizierbar.

Um Fehler durch Schwankungen des Messgerätes oder uneinheitliche Messbedingungen bei der quantitativen Analyse zu vermeiden, wurde Tetracosan-9,9,10,10-d<sub>4</sub>-säure als interner Standard eingesetzt.

Auch wurden ungesättigte Fettsäuren aus dem SC untersucht, hierfür wurden die entsprechenden Standards zur Methodvalidierung eingesetzt. Um die verwendete Linol- und Ölsäure vor Oxidationsprozessen zu schützen und somit für eine Quantifizierung verwenden zu können, wurde ein Antioxidationsmittel hinzugefügt. Butylhydroxytoluol (BHT) mit einer Konzentration von 0,05 % erwies sich bereits bei Untersuchungen von Goebel *et al.* als vorteilhaft. Der Gehalt an Linolsäure blieb dadurch nachweislich über 36 Wochen konstant. [43]. Die Ergebnisse zur Richtigkeit und Präzision sind in **Anhang A** aufgeführt, so dass die Genauigkeit des Systems umfassend beschrieben werden kann.



**Abbildung 10** Chromatogramm der eingesetzten Fettsäurestandards. Es wurde auf eine ausreichende Selektivität der Peaks geachtet.

Die verwendete Agilent- Software bestimmt das Signal- Rausch Verhältnis zur Berechnung der Bestimmungsgrenze (LoQ) - und Nachweisgrenze (LoD) selbstständig anhand der Höhe des Rauschens über die zehnfache Breite des jeweils untersuchten Analytpeaks. Anschließend wurden so verschiedene Konzentrationen zu jeder Fettsäure vermessen und das jeweilige Signal- Rausch Verhältnis bestimmt. Daraus lässt sich eine lineare Regressionsgerade ableiten, bei deren Interpolierung die Werte 3 und 10 für das Signal- Rausch Verhältnis eingesetzt wurden. Somit erhielt man eine Konzentration bei der die tatsächliche LoQ und LoD vermutet wird [32]. Diese sind für alle quantifizierten Fettsäuren in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4** Ergebnisse der Testung zur Bestimmungsgrenze (LoQ) und Nachweisgrenze (LoD)

	<b>C15:0</b>	<b>C16:0</b>	<b>C17:0</b>	<b>C18:0</b>	<b>C18:2</b>	<b>C18:4</b>
<b>LoQ (µg/ml)</b>	0,25	0,15	0,17	0,21	0,30	0,18
<b>LoD (µg/ml)</b>	0,10	0,07	0,05	0,09	0,11	0,12
	<b>C19:0</b>	<b>C21:0</b>	<b>C23:0</b>	<b>C24:0</b>	<b>C25:0</b>	<b>C26:0</b>
<b>LoQ (µg/ml)</b>	0,25	0,21	0,22	0,32	0,27	0,43
<b>LoD (µg/ml)</b>	0,15	0,08	0,05	0,05	0,12	0,08

Nach Vermessen einer hohen Konzentration (2,0 µg/ml) traten im darauffolgenden Lauf von Lösungsmittel mit TMSH keine relevanten Peaks im Bereich der Fettsäuren auf. Somit ist davon auszugehen, dass alle Analyten vollständig verdampft werden und keine „Verschleppung“ eines Analyten in den nächsten Durchlauf zu beobachten ist.

#### 4.4 HPLC- Methode zur Quantifizierung der amidgebundenen Fettsäure von Ceramid [NP]

Das Glasgefäß der Hautstudie jedes Probanden wurde in 250 µl Chloroform/ Methanol 9:1 (V/V) gelöst und für 5 min im Vortexer (neolab- Reagenzglasmixer Vortex 7-2020, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland) geschüttelt. Nach dem Lösen wurden die Proben direkt zur Ceramidklassenauftrennung eingespritzt (Kapitel 4.4.1). Eine Proteinfällung nach Signorelli und Hahn mit Methanol und Chloroform wurde untersucht und brachte keine Vorteile bezüglich der Peakauftrennung oder Sensitivität der Methode [117].

Eine massenspektrometrische Analyse einer Hautprobe mit allen darin enthaltenen Ceramidklassen ist nicht möglich gewesen. Zu viele Fragmente würden entstehen, wodurch eine Zuordnung der amidgebundenen Fettsäuren zu den einzelnen Ceramidklassen nahezu unmöglich wäre. Deshalb bestand die Idee darin, die mengenmäßig am häufigsten vertretene Ceramidklasse erst von den anderen abzutrennen, um sich dann der Fettsäureanalyse widmen zu können.

Farwanah *et al.* entwickelte dafür bereits eine Methode zur Auftrennung von Ceramidklassen, allerdings ergab sich ein Problem durch den Einsatz des APCI- Ofens. Es wurden aggressive Lösungsmittel, u.a. Chloroform und Eisessig bei 400 °C verdampft, wodurch eine unangenehme Geruchsbelastung entstand und Rückstände dieser Lösungsmittel im APCI- Ofen verblieben.

Die optimale Lösung bot zuerst die Auftrennung der Ceramidklassen mit einer HPLC und anschließender ELSD Detektion. Somit konnte anhand von verschiedenen Ceramidstandards herausgefunden werden, zu welchem Zeitpunkt die verschiedenen Klassen eluieren. Bis zu 4 Standards wurden in ausreichender Konzentration gelöst (Cer [NP], [EOS], [AS] und [AP]) und deren Retentionszeit bestimmt. Die Methode wurde so eingestellt, dass ungefähr alle zwei Minuten eine andere Ceramidklasse eluiert. In diesem Zeitraum wurde dann jeweils das Eluat in einem Reagenzglas aufgefangen. Die Methodenentwicklung ist unter **Anhang B** näher erläutert.

Während der Auftrennung wurden pro Lauf fünf verschiedene Fraktionen gesammelt. Alle 2 min wurde der Auslauf der HPLC in einem neuen Reagenzglas aufgefangen und analysiert. Alle erhaltenen Fraktionen wurden unter Stickstoffstrom eingedampft und bis zur weiteren Verwendung bei -18 °C gelagert.

Fraktion 1	0-2 min
Fraktion 2	2-4 min
Fraktion 3	4-6 min (enthält das zu untersuchende Ceramid [NP])
Fraktion 4	6-8 min
Fraktion 5	8-10 min

Vor der Messung der Fettsäuren wurde die Fraktion 3 der Hautproben in 100 µl Chloroform/ Methanol 1:1 (V/V) aufgenommen. Dieser Lösung ist der interne Standard Cer [NP] 18/18 D3 in einer Konzentration von 10 µg/ml zugesetzt worden. Anschließend wurden die Proben mittels Methode in Kapitel 4.4.2 vermessen und quantifiziert. Die Fraktion 3 wurde ausgewählt, um das darin befindliche Ceramid [NP] zu vermessen.

#### 4.4.1 HPLC- ELSD Methode zur Auftrennung der Ceramidklassen

Die Quantifizierung erfolgte mittels einer HPLC Agilent Technologies 1220 Infinity LC System. Der an das System angeschlossene ELSD Detektor war ein Detektor des Typs Sedex 55 (Sedere, Alfortville, Frankreich).

Säule:	Nucleodur 125x 2 mm i.d.		
Mobile Phase:	A: Chloroform und B: Chloroform/n-Propanol/ Eisessig 80/20/2		
Gradient:	0-11,25 min	0% B auf 75 %	bei 1,0 ml/min
	11,25-12,00min	75 % B auf 100 % B	bei 1,0 ml/min
	12,00-15,00	100 % B auf 0 % B	bei 1,5 ml/min
	15,00-17,00	0 % B	bei 1,0 ml/min
Flussrate:	1,0 ml/min		
Säulentemperatur:	30 °C		
Injektions- Volumen:	je 40 µl (bei 3 Durchläufen der Methode pro Hautprobe ergibt es Gesamtinjektionsvolumen von 120 µl)		
Druck:	80 bar		
Lösungsmittel:	Chloroform/ Methanol 9:1 (V/V)		
Detektion:	ELSD		
	Tube Temp: 50 °C		
	Gas Flow: 1,5 l/min		
	Gain (Verstärker): 8		
	Impactor: off		

#### 4.4.2 HPLC-APCI- MS Methode zur Auftrennung und Quantifizierung der amidgebundenen Fettsäuren von Cer [NP]

Die Quantifizierung der enthaltenden Ceramidklasse erfolgte anschließend mittels einer HPLC Agilent Technologies 1220 Infinity LC System und einem gekoppelten Massenspektrometer. Dieses Messgerät ist mit einem APCI Kopf ausgestattetes Ionenfallen-Massenspektrometer LCQ Classic der Firma Thermo Electron, San Jose, USA.

Sahle *et al.* arbeitete mit einer Methode zur Quantifizierung des gesamten Ceramid [NP] Anteils im SC [111]. Ausgehend von dieser Grundlage wurde die Methode verbessert, um die amidgebunden Fettsäuren dieser Ceramidklasse ausreichend auftrennen zu können. Dabei wurde die Laufmittelzusammensetzung geändert und bei der neuen Methode auf das aggressive Tetrahydrofuran und die Essigsäure verzichtet. Auch wurde die Ionisationsart mit der besseren Intensität ausgewählt und ein interner Standard zur Überprüfung der Messschwankungen hinzugefügt.

Säule:	YMC ODS- AQ (150x3mm i.d; Partikelgröße 5 µm) (YMC Europe, Dinslaken, Germany)	
Mobile Phase:	A: Methanol/ Wasser (93/7) und B Methanol	
Gradient:	0-20 min	50 % B auf 100 % B
	20-26 min	100 % B
Flussrate:	0,4 ml/min	
Säulentemperatur:	40 °C	
Injektions- Volumen:	5 µl	
Druck:	147 bar	
Detektion:	ESI: negativ APCI: positiv	
Retentionszeit:	Cer [NP] 18/18 D3 4,8 min	
Lösungsmittel:	Chloroform/ Methanol 1:1 (V/V)	

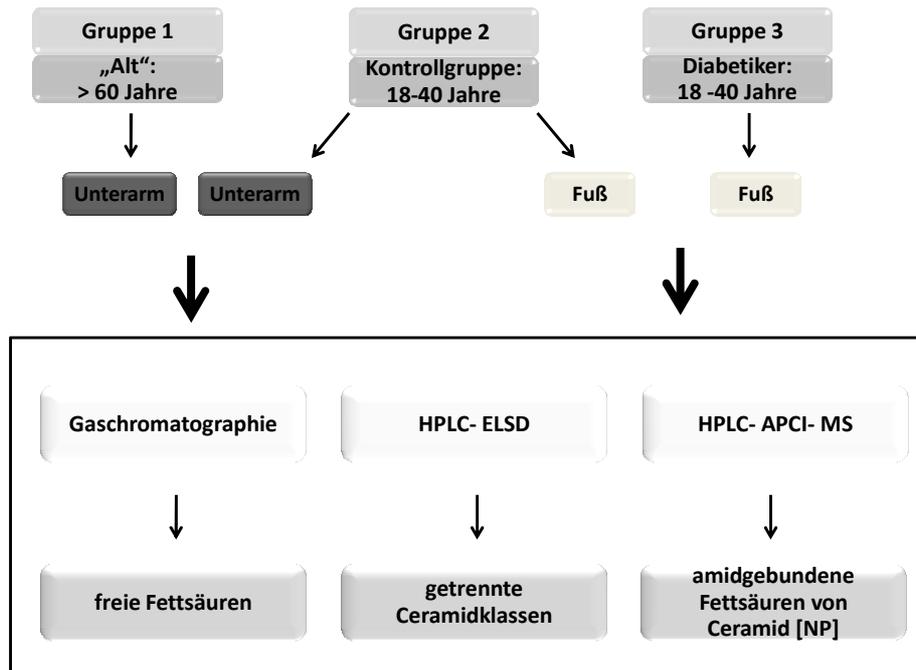


Abbildung 11 Übersicht über die angewandten Methoden zur Quantifizierung von freien und amidgebundenen Fettsäuren aus jeweils allen drei Studiengruppen. Die freien Fettsäuren wurden mittel Gaschromatographie quantifiziert. Für die amidgebundenen Fettsäuren wurde eine Methode zur Ceramidklassenauftrennung vorgeschaltet, um Fettsäuren des Ceramides [NP] bestimmen zu können.

## 4.5 Penetrationsstudie an humaner Haut von Ceramid [NP] aus verschiedenen topischen Formulierungen

### 4.5.1 Aufbau der Studie

Für jede Formulierung wurde exzidierte Humanhaut von drei verschiedenen Probanden untersucht. Zusätzlich stammten diese Hautstücke von unterschiedlichen Körperpartien.

Proband A: Unterarm

Proband B: Schienbein

Proband C: Rücken

Die subkutane Fettschicht wurde entfernt und die Formulierungen für jeweils 30, 100 und 300 min auf der Haut aufgetragen und inkubiert. Der Versuch wurde mit einer in Kapitel 3.1.4.2 beschriebenen Franz'schen Diffusionszelle durchgeführt. Die Größe der verwendeten Hautstücke betrug 3,1 cm<sup>2</sup>. Aus jedem Hautstück wurden nach Ende der Inkubationszeit jeweils drei Proben mit einer Größe von 0,3 cm<sup>2</sup> ausgestantzt und diese in einem Gefriermikrotom nach folgendem Schnittmuster in horizontale Schichten geschnitten (Tabelle 5) und bis zur endgültigen Vermessung bei -18°C in Eppendorff Gefäßen gelagert. Das Hauptaugenmerk der Penetration lag in den obersten Hautschichten, deshalb wurden die unteren Dermischnitte zusammengefasst.

**Tabelle 5 Übersicht über das Schnittmuster der Humanhaut. Die Hautstücke wurden mit einem Gefriermikrotom in Hautschichten folgender Dicken geschnitten.**

<b>Hautschicht</b>	<b>Anzahl und Dicke der geschnittenen Schichten</b>
Stratum Corneum 1	1 Schnitt á 10 µm
Stratum Corneum 2	1 Schnitt á 10 µm
Epidermis 1	1 Schnitt á 20 µm
Epidermis 2	1 Schnitt á 20 µm
Dermis 1	5 Schnitte á 40 µm
Dermis 2	5 Schnitte á 40 µm
Dermis 3	5 Schnitte á 40 µm

Abhängig von der Restdicke der Haut wurde die restliche Dermis zusammengefasst als sogenannter Stumpf analysiert. Außerdem wurden Gaze, Tupfer und Akzeptor der Franz- Zelle zur Kalkulation der Wiederfindungsrate ebenfalls extrahiert und analysiert. Die Wahl des Akzeptormediums fiel trotz der geringen Löslichkeit von Cer [NP] auf eine wässrige Lösung. Die Betrachtung der Cer [NP] Konzentration im Akzeptor dient nur zur Vervollständigung der Ergebnisse, der Fokus liegt hierbei auf den verschiedenen Hautschichten. Zuerst wurde der Einfluss von zwei verschiedenen ME auf das Penetrationsverhalten von Cer [NP] untersucht. Anschließend kam es zum Vergleich der Penetrationsprofile der ME mit dem Standardvehikel Basiscreme DAC. Die penetrierte Menge in die einzelnen Hautschichten konnten hieraus kalkuliert und statistische Signifikanzen ermittelt werden.

#### **4.5.2 Probenvorbereitung**

Die Extraktion der Hautschnitte erfolgte mit 100 µl n-Hexan/ Ethanol 2:1 (V/V) pro Hautschicht und anschließender Behandlung im Ultraschallbad für zwei Stunden bei 50 °C. Die Proben wurden anschließend unter Stickstoffstrom bis zur vollständigen Trockenheit eingedampft. Für die Messung erfolgte die Resolubilisierung mit 100 µl Methanol- Carbamazepin- Gemisch (0,5 µg/ml) als interner Standard.

Für die Extraktion von Gaze, Tupfer und Akzeptor wurden aufgrund der höheren Konzentrationen andere Volumenverhältnisse zur Extraktion benutzt. Im Detail wurden von der Akzeptorflüssigkeit 4 ml abgenommen, unter Stickstoffstrom vollständig eingedampft und mit 400 µl Methanol- Carbamazepin- Lösung wieder aufgenommen sowie 2 min geschüttelt. Die Gaze und der Tupfer wurden jeweils mit 1,5 ml n-Hexane/ Ethanol 2:1 (V/V) für 2 Stunden im Ultraschallbad behandelt.

Die Flüssigkeit wurde bis zur Trockene ebenfalls unter Stickstoffatmosphäre eingedampft und in 5 ml Methanol- Carbamazepin Lösung aufgelöst.

#### 4.5.3 HPLC- MS Methode für die Quantifizierung von Cer [NP] 18/18 D3

Die Quantifizierung des deuterierten Ceramid [NP] erfolgte mittels einer HPLC Agilent Technologies 1220 Infinity LC System und einem gekoppelten Massenspektrometer. Dieses Messgerät ist mit einem APCI- Kopf ausgestattetes Ionenfallen-Massenspektrometer (LCQ Classic) der Firma Thermo Electron, San Jose, USA.

Säule:	YMC ODS- AQ (150x3mm i.d; Partikelgröße 5 µm) (YMC Europe, Dinslaken, Deutschland)
Mobile Phase:	A: Methanol/ Wasser (93/7) und B Methanol
Flussrate:	0,2 ml/min
Säulentemperatur:	30 °C
Injektions- Volumen:	5 µl
Druck:	147 bar
Detektion:	ESI: negativ APCI: positiv
Retentionszeit:	Carbamazepin 2,96 min; Cer [NP] D3 18/18 11,31 min
Lösungsmittel:	Chloroform/ Methanol 1:1 (V/V)

Carbamazepin war die erste Wahl als interner Standard. Es ionisiert bei dieser Methode mit ausreichender Intensität und kommt nicht in Humanhaut vor. Ein Chromatogramm des internen Standards mit deuteriertem Ceramid ist im **Anhang C** abgebildet.

In Versuchen zeigte sich, dass die APCI- eine höhere Sensitivität gegenüber der bei Sahle *et al.* verwendeten ESI-MS Methode aufwies. Gleichzeitig wurden aggressive Lösungsmittel wie Essigsäure und Tetrahydrofuran gegen ein Methanol- Wasser- Gemisch ausgetauscht, somit konnte der Verschleiß der HPLC Anlage verringert werden. Der Einsatz eines internen Standards konnte Messschwankungen ausgleichen. Die LoQ und LoD wurden mit Hilfe des DINTEST ©32645 (Excel Auswerteprogramm der Kalibrationsgeraden nach DIN 32645 Version 2004 DE von Georg Schmitt/ Michael Herbold, Institut für Rechtsmedizin und Verkehrsmedizin, Universität Heidelberg) ausgewertet und liegen oberhalb der von Sahle *et al.* entwickelten Methode [111]. Allerdings ist es durch die aktuelle Weiterentwicklung gelungen, das Fettsäureprofil des Cer [NP] zu quantifizieren. Sie erfasst das zu untersuchende Ceramid in ausreichender Intensität und schont Geräte und Umwelt.

Tabelle 6 LOQ und LOD im Vergleich der beiden Methoden von Sahle et al. sowie der aktuell verwendeten Analysenmethode

	<b>Sahle et al.</b>	<b>aktuell</b>
<b>LoQ</b>	0,01 µg/ml	0,12 µg/ml
<b>LoD</b>	0,003 µg/ml	0,084 µg/ml

Die Ergebnisse der Richtigkeit und der Präzision in der Serie sind im **Anhang D** exemplarisch aufgeführt. Sowohl in den Serien als auch zwischen den Serien werden die Abweichungen von maximal  $\pm 15\%$  und maximal  $\pm 20\%$  an der LoQ von der Soll-Konzentration eingehalten. Bei der Überprüfung des Carry over Effekts wurden in der Blindprobe keine Spuren von den untersuchten Analyten oder dem internen Standard detektiert.

#### 4.5.4 Herstellung und Charakterisierung der eingesetzten Mikroemulsionen

Für die Herstellung der eingesetzten Mikroemulsionen wurden der Wasser- in- Öl (W/O)- Emulgator und die lipophilen Komponenten in ein 2 ml Glasvial eingewogen und auf einem Schüttler (GFL 3006, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland) für 5 min homogenisiert. Analog wurde der Öl-in-Wasser (O/W)- Emulgator mit den hydrophilen Komponenten vermischt.

Tabelle 7 Zusammensetzung Mikroemulsion 1

<b>Handelsname</b>	<b>Anteil [%]</b>	<b>Chemischer Name</b>	<b>Komponente</b>
<b>Tegosoft TN</b>	10%	C <sub>12-15</sub> Alkylbenzoat	Lipophile Phase
<b>Hydriol PGMO.4</b>	20%	Polyglycerol – 4 –laurat	W/O - Emulgator
<b>Tegocare PL4</b>	20%	Polyglycerol – 4 –oleat	O/W - Emulgator
<b>Hydrolite 5/ Wasser 9:1</b>	50%	Pentylenglycol/Wasser	Solubilisator/ Hydrophile Phase
<b>Cer [NP] 18/18 D3</b>	0,3%		Wirkstoff
<b>Cer [AP] 18/22</b>	0,3 %		Wirkstoff

Tabelle 8 Zusammensetzung Mikroemulsion 2

<b>Tegosoft TN</b>	10%	C <sub>12-15</sub> Alkylbenzoat	Lipophile Phase
<b>Hydriol PGMO.4</b>	20%	Polyglycerol – 4 –laurat	W/O - Emulgator
<b>Tegocare PL4</b>	20%	Polyglycerol – 4 –oleat	O/W - Emulgator
<b>Hydrolite 5/ Wasser 9:1</b>	45%	Pentylenglycol/ Wasser	Solubilisator/ Hydrophile Phase
<b>Polysorb P</b>	5%	Isosorbid	Retarder
<b>Cer [NP] 18/18 D3</b>	0,3%		Wirkstoff
<b>Cer [AP] 18/22</b>	0,3 %		Wirkstoff

Die Ceramide [NP] und [AP] wurden der Ölphase hinzugefügt und auf 90°C für 3 h bis zum vollständigen Schmelzen erhitzt. Die lipophile Phase wurde mit der vortemperierten wässrigen Phase (90°C) vermischt und bis zur Abkühlung auf Raumtemperatur manuell geschüttelt.

Die Partikelgröße der kolloidalen Phase wurde mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) gemessen [116]. Diese Methode beruht auf der Detektion von zeitabhängig gestreutem Laserlicht an sphärischen Partikeln, welches aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung unterschiedliche Intensitäten erzeugt. Es wurde ein hydrodynamischer Durchmesser bei Mikroemulsion 1 (ME1) von  $130 \pm 40,82$  nm erhalten. Für ME2 konnte mittels DLS keine Partikelgröße ermittelt werden. Der im Vorfeld zur Berechnung der Teilchengröße benötigte Brechungsindex der äußeren Phase wurde mit einem Abbé-Refraktometer (Abbemat, Dr. Kernchen, Seelze, Deutschland) bestimmt. Die zu untersuchenden Mikroemulsionen wurden im Vorfeld mit einem Spritzenfilter (Porengröße 0,45 µm) (Rotilabo Nylon-Spritzenfilter, Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland) filtriert. Die Durchführung der Messungen erfolgte in Laserstreulichtküvetten (Hellma, Müllheim, Deutschland) bei einer Temperatur von 25 °C. Zur Messung verwendet wurde ein Kompakt-Goniometer ALV/SP 86 (ALV-Laser Vertriebsgesellschaft mbH, Langen, Deutschland) mit einem Nd: YAG-Laser (ADLAS GmbH, Weil im Schönbuch, Deutschland). Es wurde in einem Winkelbereich von 30 ° bis 140 ° gemessen [51]. Im Vergleich mit Goebel *et al.* hergestellten ME handelt es sich um größere Partikel (Goebel *et al.*  $<10,77 \pm 0,06$  nm). Vermutlich kommt dieser Größenunterschied in der Tröpfchengröße durch die unterschiedliche Ölkonzentration zustande [113]. Bei Goebel *et al.* besaßen die ME im Schnitt 2-5 % an lipophiler Phase. Es stand somit weniger ölige Phase zur Solubilisierung der Tenside (inneren Phase) zur Verfügung, wodurch es zu keiner größeren Ausdehnung kommen konnte. Bei ME1 und ME2 lag der Anteil der lipophilen Phase bei 10%. Diese wurden benötigt, um Ceramid [NP] in einer Konzentration von 0,3 % ausreichend solubilisieren zu können.

Im Polarisationsmikroskop wurden keine Anzeichen von Doppelbrechung beobachtet. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich die ME1 isotrop verhält. Die begutachtete Probe blieb unter dem Polarisationsmikroskop (Zeiss Axiolab Pol, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland) dunkel, so dass davon ausgegangen wird, dass es sich um eine isotrope Flüssigkeit handelt, welche die Schwingungsrichtung des polarisierten Lichtes ändern kann.

Desweiteren wurde die dynamische Viskosität mit einem Rotationsviskosimeter (Fluids Spectrometer RFS II, Rheometrics Scientific, Bensheim, Deutschland) sowie einer Zylindermesszelle und Doppelspalt (MCR 501, Anton Paar, Graz, Österreich) bei 16 verschiedenen Scherraten bestimmt ( $0,1-1000$  s<sup>-1</sup>). Die Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Die beiden ME weisen eine niedrige Viskosität und ein idealviskoses Newtonsches Fließverhalten auf. Sollte sich neben einer O/W Mikroemulsion eine bikontinuierliche Phase ausgebildet haben, könnte diese u.a. anhand eines

Nicht- Newtonschen Fließverhaltens identifiziert werden [44] [90]. Zwar zeigt sich, dass die gemessene Viskosität in allen Fällen unabhängig von der Scherrate ist, dennoch liegt die Viskosität höher als bei Goebel *et al.* gemessen Proben von  $<10\text{mPa}\cdot\text{s}$ , was letztendlich durch den höheren Emulgatoranteil der hierverwendeten Mikroemulsionen zustande kommen könnte. Bei Goebel *et al.* wurden Konzentrationen von bis zu 30 % Emulgatoren eingesetzt. ME 1 und ME 2 bestehen zu jeweils 40 % aus Emulgatorphase. Dies könnte zu einem gesteigerten Wasserbindungsanteil im Emulgatorfilm führen, wodurch weniger freies Wasser in der kontinuierlichen Phase frei verfügbar wäre und damit zu einer geringen Viskosität beitragen könnte.

Tabelle 9 Messung der dynamischen Viskosität von ME1 und ME 2

Scherrate e [1/s]	Stress [Pa]	Viskosität[Pa*s]	
		ME 1	ME2
1	0,135	0,13	0,17
1,58	0,214	0,13	0,17
2,51	0,339	0,13	0,17
3,98	0,538	0,13	0,17
6,31	0,85	0,13	0,17
10	1,35	0,13	0,17
15,8	2,13	0,13	0,17
25,1	3,38	0,13	0,17
39,8	5,36	0,13	0,17
63,1	8,48	0,13	0,17
100	13,4	0,13	0,17
158	21,1	0,13	0,17
251	33,2	0,13	0,17
398	51,7	0,13	0,17
631	80,4	0,13	0,17
1000	125	0,13	0,17

Für die Vergleichscreme (Basiscreme DAC) wurden die Rezeptur und Herstellungsanweisung aus dem DAC übernommen.

**Tabelle 10 Zusammensetzung der Basiscreme DAC**

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge [in g]</b>
Glycerolmonostearat	4,0
Cetylalkohol	6,0
Mittelkettige Triglyceride	7,5
Weißes Vaseline	25,5
Macrogol-20-glycerolmonostearat	7,0
Propylenglycol	10,0
Gereinigtes Wasser	ad 100,0

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Quantifizierung der freien Fettsäuren

#### 5.1.1 Vergleich der Studiengruppe Alt gegen Jung (Gruppe 1 gegen 2)

Zur Ermittlung der Fettsäurekonzentrationen wurden Proben von je 110 Probanden der zwei Versuchsgruppen analysiert. Gruppe 1 besteht aus älteren, gesunden Probanden über 60 Jahren und Gruppe 2 aus jungen, gesunden Probanden zwischen 18 und 40 Jahren. Um statistisch signifikante Unterschiede zu berechnen, wurde der Mann-Whitney-U Test angewendet.

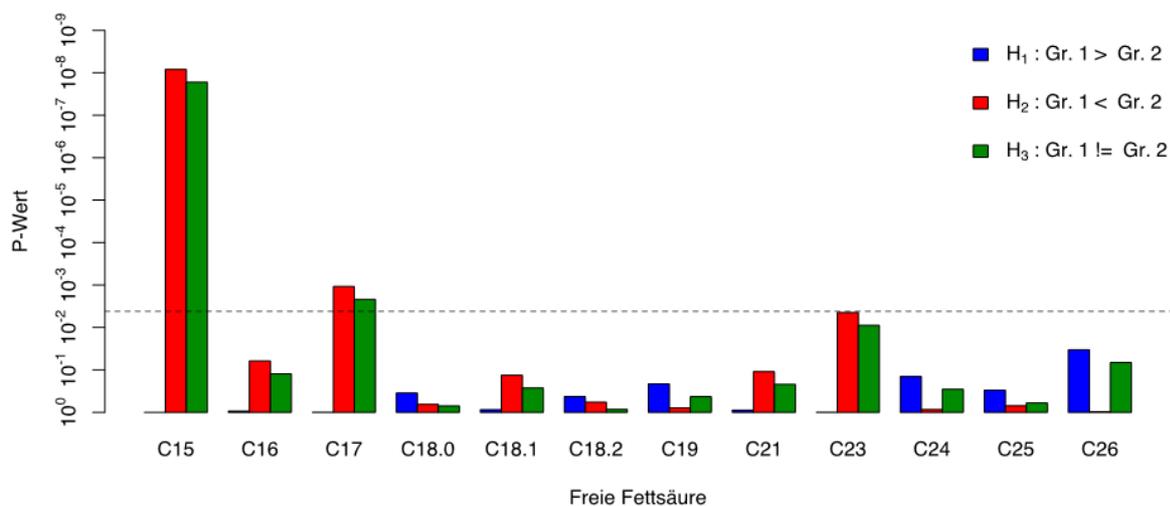


Abbildung 12 - Whitney U- Test zwischen alten, gesunden (Gruppe 1) und jungen, gesunden Probanden (Gruppe 2). Fettsäuren wurden am Unterarm gemessen. Ein korrigiertes Signifikanzniveau von 0,0142 (0,05/12 Fettsäuren) liegt vor. H<sub>0</sub> (Nullhypothese) nimmt an, dass die Verteilung der Konzentrationen zwischen Gruppe 1 und 2 gleich sind. H<sub>1</sub> bis H<sub>3</sub> sind Alternativhypothesen. Diese werden angenommen sobald die korrigierten p-Werte kleiner als das korrigierte Signifikanzniveau sind, d.h. über der gestrichelten Linie liegen. Zur besseren Darstellung wurde die x-Achse gedreht, so dass kleine Werte oben liegen und im Nullpunkt mit den größten Werten begonnen wurden. H<sub>1</sub> (blau) bedeutet die Fettsäurekonzentrationen in Gruppe 1 sind größer als in Gruppe 2 und bei H<sub>2</sub> (rot) umgekehrt.

Die gestrichelte Linie der Abbildung 12 zeigt das korrigierte Signifikanzniveau an. Dieses berechnet sich aus der Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 1. Art (Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$ ), dividiert durch die Anzahl an durchgeführten Tests, was in diesem Fall der Anzahl an untersuchten Fettsäuren ( $\alpha' = \alpha/12$ ) entspricht. Damit müssen die P-Werte der durchgeführten Tests unter einem Signifikanzniveau von 0,0142 (0,05/12) liegen, um als statistisch signifikant bewertet zu werden, d.h. alle Balken die über der gestrichelten Linie liegen, zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2.

Die verschiedenfarbigen Balken stellen verschiedene Alternativhypothesen (H<sub>1</sub>-H<sub>3</sub>) des Mann-Whitney- U Tests zur Nullhypothese dar: Die Nullhypothese (H<sub>0</sub>) besagt, dass die Verteilung der Konzentrationen in Gruppe 1 und in Gruppe 2 gleich sind. Wenn der korrigierte P- Wert kleiner als

das korrigierte Signifikanzniveau ist, d.h. der Balken über der gestrichelten Linie liegt, wird die Nullhypothese abgelehnt werden und eine der Alternativhypothesen (H1 bis H3) angenommen.

Den Hypothesen H1 und H2 liegen einseitige statistische Tests zugrunde. Dabei wurde überprüft, ob die FFS Konzentration in Gruppe 1 größer (H1= blau) als in Gruppe 2 war und umgekehrt (H2= rot). H3 ergibt sich aus dem zweiseitigen MWU Test und besagt, dass die FFS – Konzentrationen in Gruppe 1 verschieden ist zur Gruppe 2.

**Tabelle 11** Korrigierte p-Werte zeigen die Unterschiede zwischen Gruppe 1 und 2. Alle Werte unter  $p=0,05/12$  (korrigiertes Signifikanzniveau) sind mit einem \* markiert und stellen einen statistischen Unterschied dar.

	<b>C15:0</b>	<b>C16:0</b>	<b>C17:0</b>	<b>C18:0</b>	<b>C18:1</b>	<b>C18:2</b>
<b>H<sub>1</sub>: Gruppe 1 &gt; 2</b>	12,000	11,262	11,987	4,226	10,406	5,105
<b>H<sub>2</sub>: Gruppe 1 &lt; 2</b>	0,000*	0,741	0,013*	7,783	1,600	6,905
<b>H<sub>3</sub>: Gruppe 1 ≠ 2</b>	0,000*	1,482	0,026*	8,453	3,200	10,210
	<b>C19:0</b>	<b>C21:0</b>	<b>C23:0</b>	<b>C24:0</b>	<b>C25:0</b>	<b>C26:0</b>
<b>H<sub>1</sub>: Gruppe 1 &gt; 2</b>	2,566	10,685	11,947	1,716	3,604	0,402
<b>H<sub>2</sub>: Gruppe 1 &lt; 2</b>	9,441	1,319	0,053	10,290	8,405	11,600
<b>H<sub>3</sub>: Gruppe 1 ≠ 2</b>	5,132	2,639	0,107	3,432	7,207	0,804

In Abbildung 12 und Tabelle 11 ist der Vergleich der Fettsäuren von Gruppe alt und Gruppe jung dargestellt. Signifikante Unterschiede konnten für Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C15:0 und C17:0 ermittelt werden. Ihre Konzentration war bei Gruppe 1 (alt) im Vergleich zu Gruppe 2 (jung) reduziert. In weiteren Studien könnte somit ein Vorteil dieser beiden FFS in topischen Formulierungen untersucht werden. Nicollier *et al.* bestimmte ebenfalls ungeradzahlige Fettsäuren mittels Gaschromatographie [94].

Bei allen anderen Fettsäuren ergibt sich ein inhomogenes Bild. Eine Korrelation zwischen Alter und Fettsäurekonzentrationen konnte nicht ermittelt werden. Es nehmen z.B. Fettsäuren wie C24:0, C25:0 und C26:0 mit dem Älterwerden zu. Die Komponenten des SC sind äußerst vielfältig und unterliegen im Laufe ihres Lebens mannigfaltigen Einflüssen, so dass nicht prinzipiell davon ausgegangen werden kann, dass im Alter die freien Fettsäuren im SC abnehmen.

Das Auftreten des Symptoms der trockenen Haut bei älteren Probanden ließ vermuten, dass ebenso wie bei trockener Haut im Zusammenhang von atopischer Dermatitis vermehrt kurzkettige Fettsäuren zu bestimmen sind. Diese Vermutung hat sich nicht bestätigt. Es dominieren neben C16:0 und C28:0 auch längerkettige Fettsäuren bei älteren Probanden z.B. C24:0 und C26:0 (Tabelle 12).

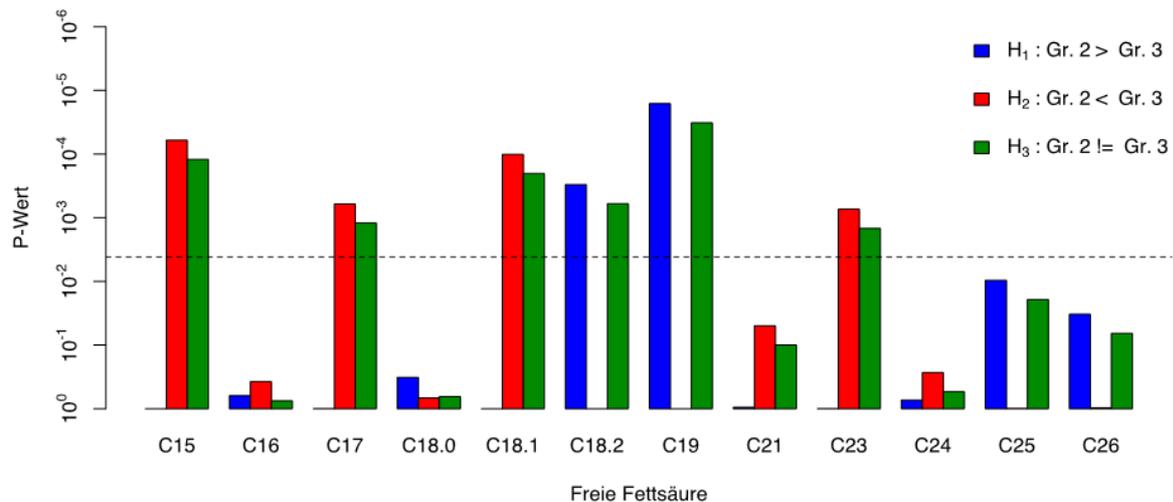
Auffallend ist der Anteil der ungeradzahligten Fettsäuren. In Gruppe 1 liegt der Anteil bei 20,7 % und bei Gruppe 2 bei 22,6 % (Arm) und bei 22,8 % (Fuß) (Tabelle 12). Die Konzentration der Diabetiker liegt mit 23,6 % leicht darüber. Der Grund für ein Absinken der Fettsäuren C15:0 und C17:0 im Alter, könnte u.a. mit Ihrer Entstehung zusammenhängen. Neueste Untersuchungen zeigen, dass Phytosphingosin (PHS) neben dem Fettsäuresynthasekomplex eine weitere Quelle für die Synthese ist. Es konnte gezeigt werden, dass PHS in verschiedenen Schritten erst zu 2-Hydroxypalmitinsäure und dann mittels alpha-Oxidation zu C15:0 konvertiert wird. Anschließend kann C17:0 aus C15:0 durch die Fettsäuresynthase elongiert werden. Doch auch hier sind weitere Studien notwendig, um den Einfluss von PHS auf die Fettsäurekonzentrationen im Alter zu bestätigen. Auch die Enzymaktivität sowohl der Fettsäuresynthasekomplexes als auch die Entstehung von Fettsäuren aus PHS, könnte einen Einfluss auf das Absinken der Konzentrationen von C15:0 und C17:0 besitzen und sollte in weiteren Studien untersucht werden [69].

**Tabelle 12 Fettsäurekonzentrationen in Massenprozent  $\pm$  die jeweilige Standardabweichung eingeteilt nach verschiedenen Studiengruppen und untersuchten Hautarealen. Dabei wurden Proben vom Unterarm zwischen Gruppe 1 (alt) und Gruppe 2 (jung) verglichen sowie Proben vom Fuß für den Vergleich von Gruppe 2 (jung) mit Gruppe 3 (Diabetiker)**

	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 2</b>	<b>Gruppe 2</b>	<b>Gruppe 3</b>	<b>Nicollier <i>et al.</i></b>
	<b>n = 110</b>	<b>n = 110</b>	<b>n = 110</b>	<b>n = 38</b>	<b>n = 14</b>
	Unterarm	Unterarm	Fuß	Fuß	
<b>C15:0</b>	2,7 $\pm$ 2,3	4,5 $\pm$ 2,3	2,8 $\pm$ 1,7	4,1 $\pm$ 1,7	1,0
<b>C16:0</b>	19,6 $\pm$ 9,9	22,0 $\pm$ 8,1	17,8 $\pm$ 7,5	16,6 $\pm$ 6,8	11,7
<b>C17:0</b>	1,1 $\pm$ 2,2	1,3 $\pm$ 1,1	0,9 $\pm$ 0,8	1,4 $\pm$ 0,7	2,1
<b>C18:0</b>	13,0 $\pm$ 12,8	11,6 $\pm$ 10,9	13,3 $\pm$ 8,6	11,0 $\pm$ 7,1	15,1
<b>C18:1</b>	11,6 $\pm$ 8,0	12,8 $\pm$ 7,9	14,1 $\pm$ 6,3	20,4 $\pm$ 7,5	12,2
<b>C18:2</b>	11,2 $\pm$ 4,9	10,7 $\pm$ 5,4	10,2 $\pm$ 4,3	6,3 $\pm$ 3,6	9,2
<b>C19:0</b>	5,4 $\pm$ 4,1	4,3 $\pm$ 2,9	5,1 $\pm$ 2,7	2,6 $\pm$ 1,8	1,9
<b>C21:0</b>	2,7 $\pm$ 2,7	2,6 $\pm$ 2,1	3,4 $\pm$ 3,1	4,3 $\pm$ 3,7	3,3
<b>C23:0</b>	2,9 $\pm$ 2,6	4,2 $\pm$ 5,7	4,9 $\pm$ 5,4	7,4 $\pm$ 5,0	9,0
<b>C24:0</b>	12,9 $\pm$ 8,2	11,0 $\pm$ 6,0	13,0 $\pm$ 6,1	15,5 $\pm$ 12,6	22,9
<b>C25:0</b>	5,9 $\pm$ 4,5	5,7 $\pm$ 5,8	5,7 $\pm$ 5,0	3,8 $\pm$ 1,4	5,3
<b>C26:0</b>	11,2 $\pm$ 5,8	9,5 $\pm$ 4,2	8,7 $\pm$ 4,1	6,6 $\pm$ 2,2	5,7

### 5.1.2 Vergleich der Studiengruppe Gesund gegen Diabetiker (Gruppe 2 gegen 3)

Bei der Betrachtung von jungen, gesunden Probanden und jungen Diabetikern (Abbildung 13) fällt auf, dass insgesamt mehr signifikante Unterschiede bei den Fettsäurekonzentrationen auftreten als im Vergleich zwischen jüngeren und älteren Probanden. Bei insgesamt sechs Fettsäuren verändern sich die Konzentrationen mit Diabetes signifikant. Bei C15:0, C17:0, C18:1 und C23:0 nehmen die Konzentrationen in Gruppe 3 (mit Diabetes) zu.

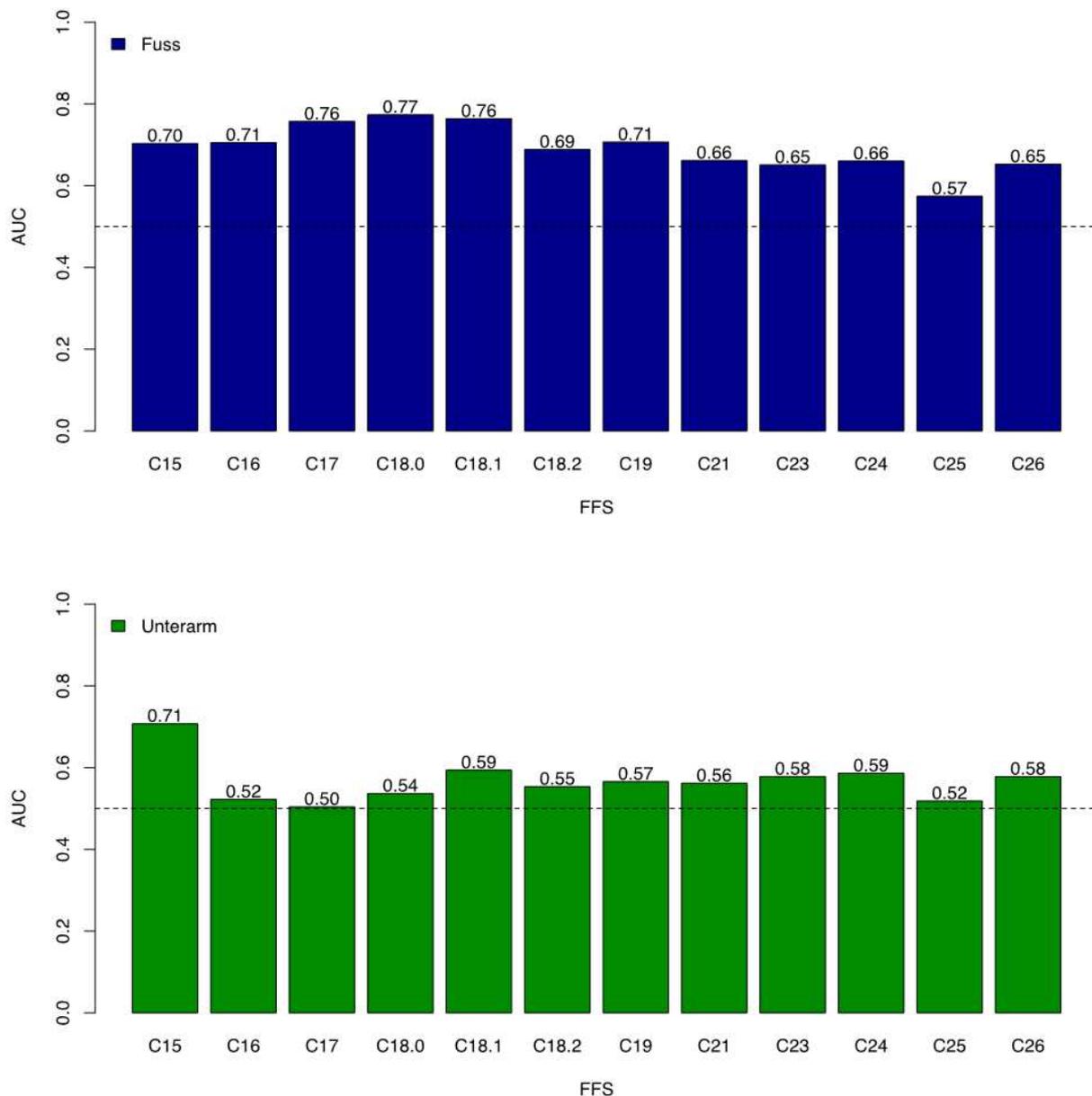


**Abbildung 13 Mann-Whitney- U Test zwischen gesunden (Gruppe 2) und an Diabetes erkrankten Probanden (Gruppe 3). Fettsäuren werden am Fuß gemessen.**

Eine topische Formulierung mit Linolsäure (C18:2) und C19:0 sollte in weiteren Studien untersucht werden, da diese beiden Fettsäuren bei Diabetikern signifikant erniedrigt sind. Eine Korrelation zwischen Diabetes und sinkender Fettsäuren kann nicht generell hergestellt werden, denn u.a. ist Ölsäure (C18:1) bei Diabetikern erhöht. Dadurch kann kein Rückschluss auf eine ungenügende Biosynthese der Fettsäuren bei Diabetikern gezogen werden. Für weitere Aussagen zum Fettsäurespektrum wurden ebenfalls amidgebundene Fettsäuren des Ceramid [NP] der Diabetiker (Kapitel 5.2) untersucht.

Zusätzlich zu den Null- und Alternativhypothesen wurden die gesamten Fettsäureprofile mittels eines multivariaten Wilcoxon-Test (Kapitel 4.2.3) verglichen. Multivariat bedeutet dabei, dass alle FFS-Konzentrationen eines jeden Probanden in einer Gruppe als Profil definiert und gegen die FFS-Profile einer anderen Gruppe verglichen werden. Aus diesem Test wurden sogenannte AUC-Werte (Area under the curve) erhalten. Dieser AUC-Wert kann einen Wert von 0,5 bis 1,0 annehmen. Dabei spiegelt ein AUC-Wert von 0,5 das schlechteste Ergebnis wider, der besagt, dass die Klassifikation einer Stichprobe in eine Gruppe in 50% aller Fälle korrekt erfolgt. Im Gegensatz dazu ist ein AUC-

Wert von 1,0 der bestmögliche Wert, der bedeutet, dass der trainierte Klassifikator in 100% aller Fälle die Stichprobe in die korrekte Gruppe einsortieren konnte.



**Abbildung 14** AUC- Werte des Klassifikationsexperimentes. Die blauen Balken zeigen die Klassifikationsergebnisse von gesunden, jungen Probanden (Gr. 2) und Diabetikern (Gr. 3), deren FFS Konzentrationen am Fuss gemessen wurden. Die grünen Balken zeigen die AUC- Werte der Klassifikation von alten Probanden (Gr. 1) und jungen Probanden (Gr. 2), gemessen am Unterarm. Die gestrichelte, horizontale Linie dient der Trennung zwischen univariaten und multivariaten Modellen.

An den AUC- Werten (Abbildung 14) ist zu erkennen, dass sie sich näher am Wert 0,5 als an der 1,0 orientieren und somit ein beliebiger Proband durch eine Klassifikation nicht einer Studiengruppen mit Sicherheit zugeordnet werden kann. Die Werte der Fußregion weisen höhere Werte als die Werte von den Unterarmen auf, jedoch werden Werte von mindestens größer 0,9 nicht erreicht.

Dadurch ist es nicht möglich, von einem beliebig ausgewählten Probanden, Rückschlüsse auf seinen Gesundheitszustand zu ziehen, d.h. ob dieser Proband an Diabetes erkrankt ist oder nicht.

Verschiedene Hauterkrankungen sind durch diabetische Komplikationen oder in Assoziation mit Diabetes bekannt: Zum einen kann die Schweiß- und Talgproduktion nachlassen und damit das Symptom der trockenen Haut hervorrufen. Auch durch eine fortschreitende Niereninsuffizienz kann Juckreiz und Trockenheit ausgelöst werden (urämischer Pruritus).

Zum anderen können Pigmentier- und Differenzierungsstörungen in der Haut ausgelöst werden. So sind die diabetische Dermopathie oder Acanthosis nigrans Marker für weitere diabetische Folgeerkrankungen. Durch die entstehende Insulinresistenz kommt es bei Acanthosis nigrans zu einer vermehrten Insulinrezeptorbildung die mit einer hyperkeratotischen Entwicklung einhergeht (vermehrtes Wachstum der Hautzellen). Dies würde auch erklären, warum einige Fettsäuren bei Diabetikern erhöht sein können, denn vermehrte Hautzellen beinhalten auch eine größere Menge an Lipiden.

Durch die Erkrankung laufen vermehrt auch proinflammatorische Prozesse ab, welche funktionelle Defizite an der Lipidmatrix auslösen können. Es ist möglich, dass eine verringerte Hautbarriere den äußeren Einflüssen nicht standhalten kann und ein „Auswaschen“ der Lipide möglich ist. Dadurch könnte sich das heterogene Bild erklären, dass nur vereinzelte Fettsäuren erniedrigt sind.

## **5.2 Quantifizierung der amidgebundenen Fettsäuren in Ceramid [NP]**

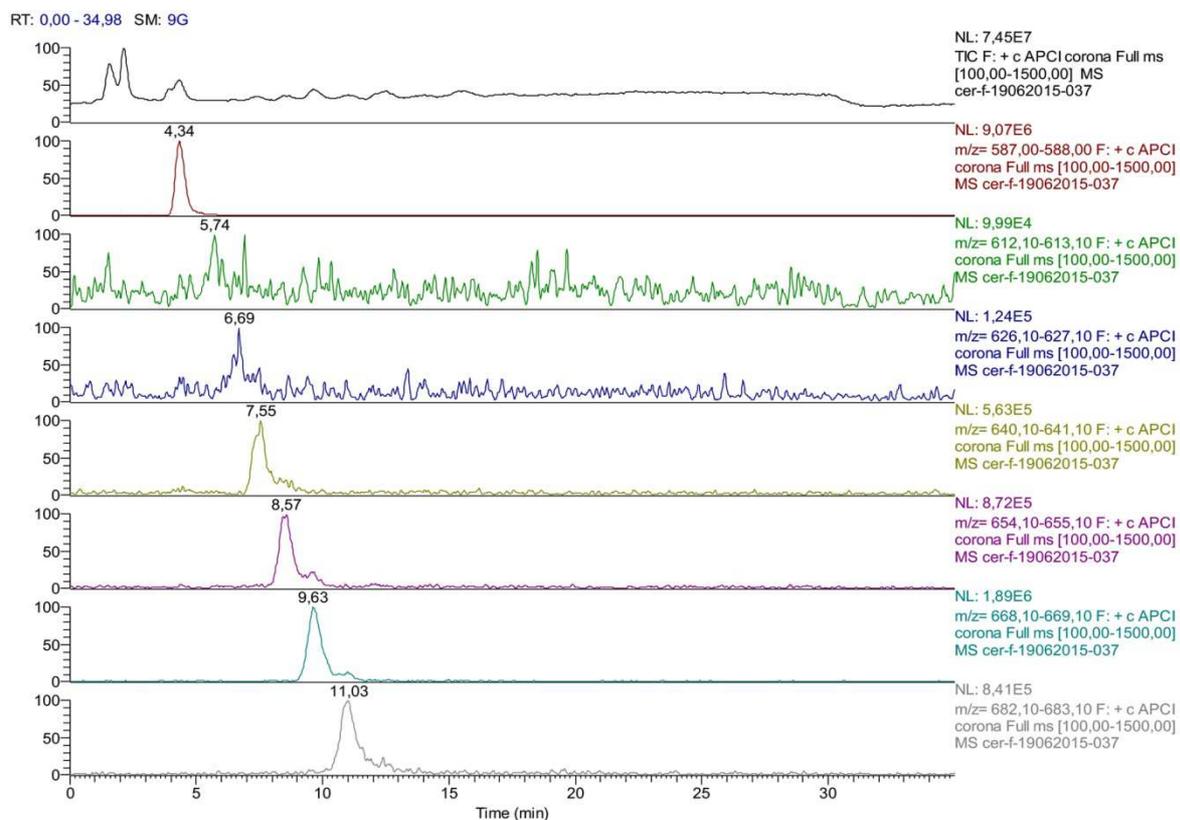
Grund dieser Untersuchung war, dass Hinder *et al.* zeigte, dass signifikant erhöhte Konzentrationen an ungeradzahligen amidgebundenen Fettsäuren bei Ceramid [NP] und [EOS] zwischen gesunden und schizophrenen Patienten aufgetreten waren. Daher wurde bei der Auswertung dieser Studie besonderes Augenmerk auf die Auswertung dieser Fettsäuren gelegt, da hier die Konzentrationsunterschiede wahrscheinlich am höchsten sind. Sie können dadurch als Marker für Unterschiede zwischen älteren und jüngeren Probanden oder gesunden Probanden und Diabetikern dienen.

Ziel war es im Detail, das Ceramid [NP] im ersten Schritt von den übrigen Ceramidklassen zu separieren, damit eine anschließende Untersuchung der amidgebundenen Fettsäuren stattfinden kann. Dafür wurden Vorversuche mit verschiedenen Ceramidstandards durchgeführt. Anhand dieser konnten Zeiträume definiert werden, zu welchen Zeiten die einzelnen Ceramide eluieren. Im Zeitraum von 4-6 min eluierte das gewünschte Cer [NP]. Wie unter Kapitel 4.4.1 und 4.4.2 beschrieben, wurden aus jeder Studiengruppe jeweils 11 Hautproben analysiert.

Nach der Selektierung von Ceramid [NP] wurden die einzelnen Fettsäuren massenspektrometrisch analysiert und über Integration der Peakflächen quantifiziert (Methode 4.4.2). Anhand Abbildung 15 ist zu erkennen, dass die einzelnen Fettsäuren aufgrund Ihrer Masse selektiv auswertbar sind.

Durch die Anwendung dieser Methodenkette umgeht man das aufwendige und „blinde“ Abkratzen von HPTLC Platten wie in der Methode von Hinder *et al.* beschrieben [52]. Ebenso erfolgt bei dieser Methode, die Auswertung ohne Probenverlust.

Die erhaltenen Ergebnisse von jeweils 11 untersuchten Probanden pro Studiengruppe geben einen guten Überblick, inwieweit statistische Differenzen für das gesamte Probandenspektrum an Fettsäuren von Cer [NP] zu erwarten sind. In weiterführenden Untersuchungen könnte die Probandenzahl erhöht sowie auch andere Ceramidklassen ergänzend analysiert werden.



**Abbildung 15** Finale Auftrennung der Fettsäuren von Ceramid [NP] Ganz oben der full Scan (schwarz) Anschließend abgebildet m/z = 587, Cer [NP] 18D3, das dreifach deuteriertes Ceramid als interner Standard (rotbraun) sowie die Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C20:0 bis C25:0 (grünes bis graues MS Spektrum) – von schwarz nach grau gesehen. Gut zu erkennen ist die selektive Auftrennung der einzelnen Fettsäuren.

### 5.2.1 Vergleich der Studiengruppe Alt gegen Jung (Gruppe 1 gegen 2)

Die erhaltenen Konzentrationen an amidgebundenen Fettsäuren von Ceramid [NP] wurden mit den statistischen Methoden aus Kapitel 4.2.3 ausgewertet. In Abbildung 16 wird das korrigierte Signifikanzniveau ( $p=0,05/\text{Anzahl der amidgebundenen Fettsäuren}=15$ ) durch die gestrichelte Linie dargestellt. Somit müssen die p-Werte der durchgeführten Tests unter einem Signifikanzniveau von 0,03 ( $p=0,05/15$ ) liegen, um als statistisch signifikant bewertet zu werden. Alle Balken die über der gestrichelten Linie liegen, zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2.

Die verschiedenfarbigen Balken stellen verschiedene Alternativhypothesen (H1- H3) des Mann-Whitney- U Tests zur Nullhypothese dar: Die Nullhypothese (H0) besagt, dass die Verteilung der Konzentrationen in Gruppe 1 und in Gruppe 2 gleich sind. Wenn der korrigierte p- Wert kleiner als das korrigierte Signifikanzniveau ist, d.h. der Balken über der gestrichelten Linie liegt, wird die Nullhypothese abgelehnt und eine der Alternativhypothesen (H1- H3) angenommen.

Den Hypothesen H1 und H2 liegen einseitigen statistischen Tests zugrunde. Dabei wurde überprüft, ob die amidgebundenen Fettsäurekonzentration in Gruppe 1 größer (H1= blau) als in Gruppe 2 sind und umgekehrt (H2= rot). H3 ergibt sich aus dem zweiseitigen MWU Test und besagt, dass die amidgebundenen Fettsäurekonzentrationen in Gruppe 1 unterschiedlich zur Gruppe 2 sind.

Auf der Basis des durchgeführten MWU-Tests sind keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den amidgebundenen Fettsäurekonzentrationen von Ceramid [NP] der älteren und jungen Probanden erkennbar. Die berechneten p-Werte sind größer als das Signifikanzniveau.

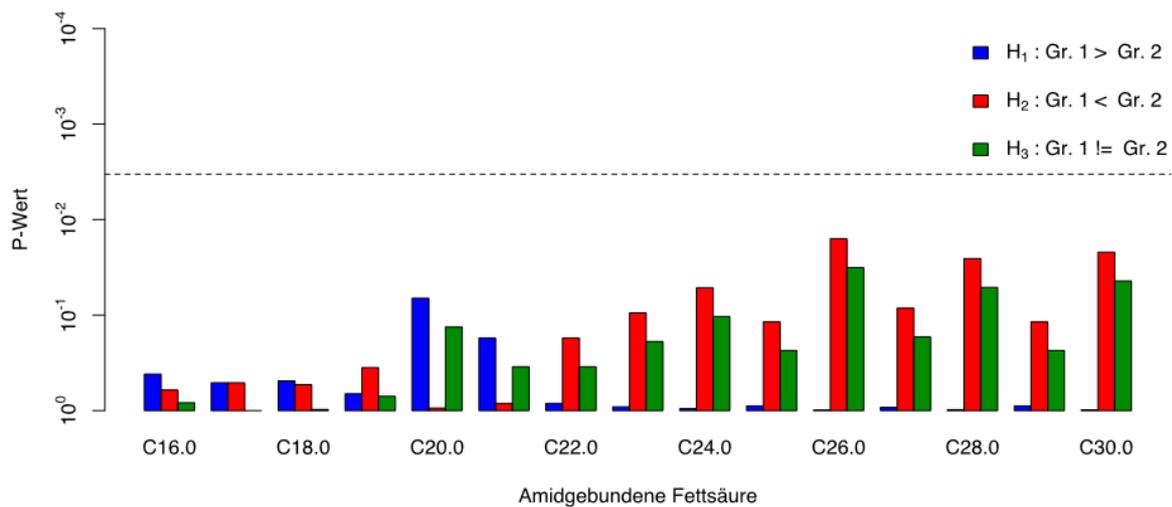


Abbildung 16 Mann-Whitney-U Test zwischen alten, gesunden (Gruppe 1) und jungen, gesunden Probanden (Gruppe 2). Amidgebundene Fettsäuren wurden am Unterarm gemessen.

Die darauffolgende Abbildung 17 lässt anhand der Konzentrationen eine Aussage über die mengenmäßige Verteilung der amidgebundenen Fettsäuren treffen. Insbesondere die längerkettigen Fettsäuren ab C24:0 treten in höheren Konzentrationen auf. Dies stimmt mit den Untersuchungen von Farwanah *et al.* überein, der in seinen massenspektrometrischen Analysen für Ceramid [NP] die höchsten Intensitäten für C26:0 und C28:0 gefunden hat [34].

Langkettige amidgebundene Fettsäuren sind wichtig für eine funktionierende Hautbarriere. Smeden *et al.* zeigte, dass die Haut an atopischer Dermatitis erkrankten Probanden, signifikante Verringerungen in den Kettenlängen der amidgebundenen Fettsäuren von Ceramid [NP] beinhaltet [120]. Für ältere Personen kann diese Aussage nicht getroffen werden, somit ist nicht zwingend die Hautbarriere im Alter gestört, sondern das Symptom der trockenen Haut tritt häufiger auf.

Neueren Studien zufolge korreliert ein geringerer Gehalt an Ceramid [NP] mit einem höheren transepidermalen Wasserverlust (TEWL). Dadurch kann mehr Wasser durch die Haut verdunsten, die Hautbarriere ist geschädigt und das Symptom der trockenen Haut im Alter kann auftreten [92]. In der gleichzeitig zur Lipidanalytik durchgeführten TEWL Messung, konnte eine signifikante Erniedrigung des TEWL der älteren Probanden gegenüber den Jüngeren ebenfalls festgestellt werden [140]. Diese altersbedingte Änderung der Wasserverteilung innerhalb des SC wird in Verbindung mit der Entstehung von trockener Haut und Altersdermatosen gebracht. Jedoch war das amidgebundene Fettsäureprofil von Ceramid [NP] nicht signifikant im Alter erniedrigt. Somit steht dieser Lipidmarker für eine eindeutige Identifizierung von jüngeren oder älteren Probanden nicht zur Verfügung.

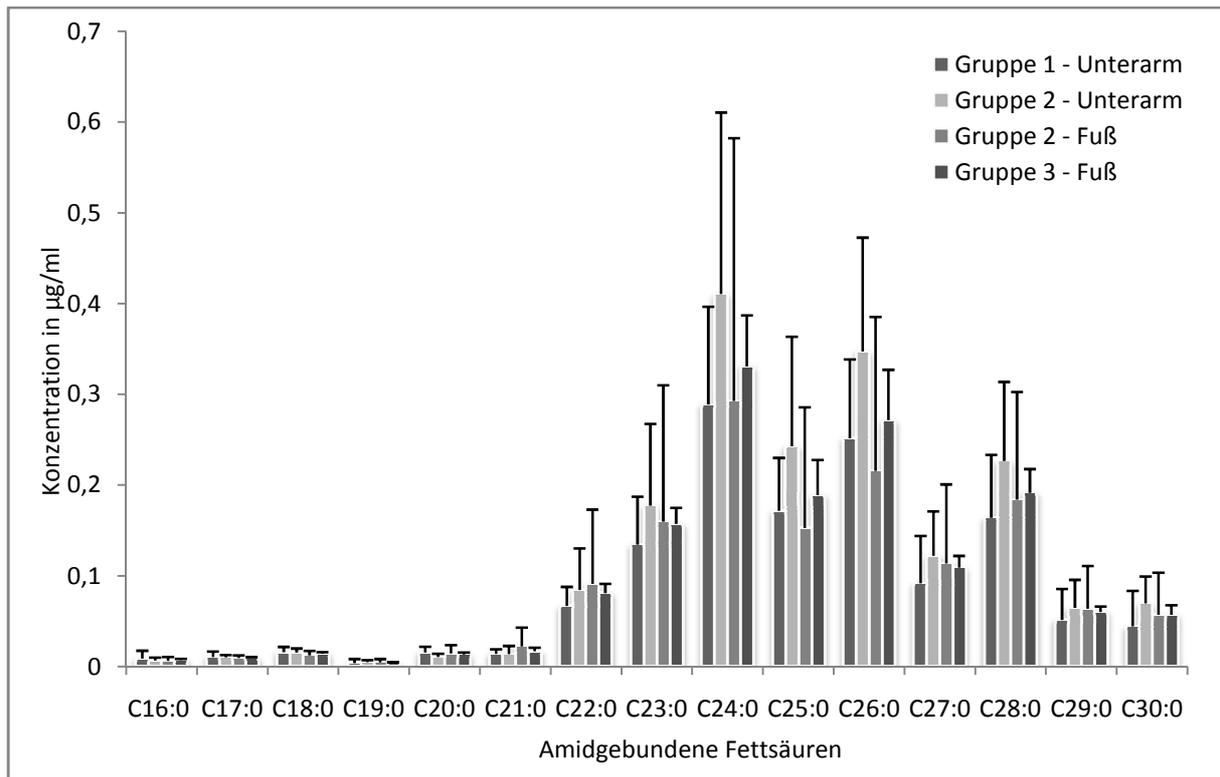


Abbildung 17 Vergleich der Konzentrationen in µg/ml an amidgebundenen Fettsäuren von Ceramid [NP] zwischen den verschiedenen Studiengruppen.

### 5.2.2 Vergleich der Studiengruppe Gesund gegen Diabetiker (Gruppe 2 gegen 3)

Grund dieser Untersuchung war, signifikante Unterschiede an amidgebundenen Fettsäurekonzentrationen in Ceramid [NP] zu quantifizieren um dadurch topische Formulierungen für die Pflege von diabetischer Haut zu optimieren und außerdem einen Probanden anhand seines Fettsäureprofils eindeutig als Diabetiker identifizieren zu können (Kapitel 4.2.3). Bei der Betrachtung zwischen Gesunden und Diabetikern konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Studiengruppen festgestellt werden.

Das vor allem die Gruppe der Diabetiker betreffende Symptom der trockenen Haut konnte nicht anhand der amidgebundenen Fettsäurekonzentration von Ceramid [NP] bestätigt werden.

Es bleibt nur zu vermuten, dass sowohl bei Älteren als auch bei Diabetikern die lebenslange Körperhygiene sowie weitere äußere Einflüsse (Klima, Sonnenexposition) und auch der Unterschied zwischen Männern und Frauen hier die Grenzen zwischen gesund und krank vermischt haben könnte. Lebenslange Gewohnheiten und individuelles Verhalten können schwer als Kriterium in Studien erfasst und dadurch der Einfluss auf diese Hautstudie nicht mit bedacht werden. Trotzdem ist es gelungen eine neue Form der Probenanalyse zu etablieren, die umfangreich in der Probenvorbereitung ist, aber dafür ressourcenschonend und zuverlässig arbeitet.

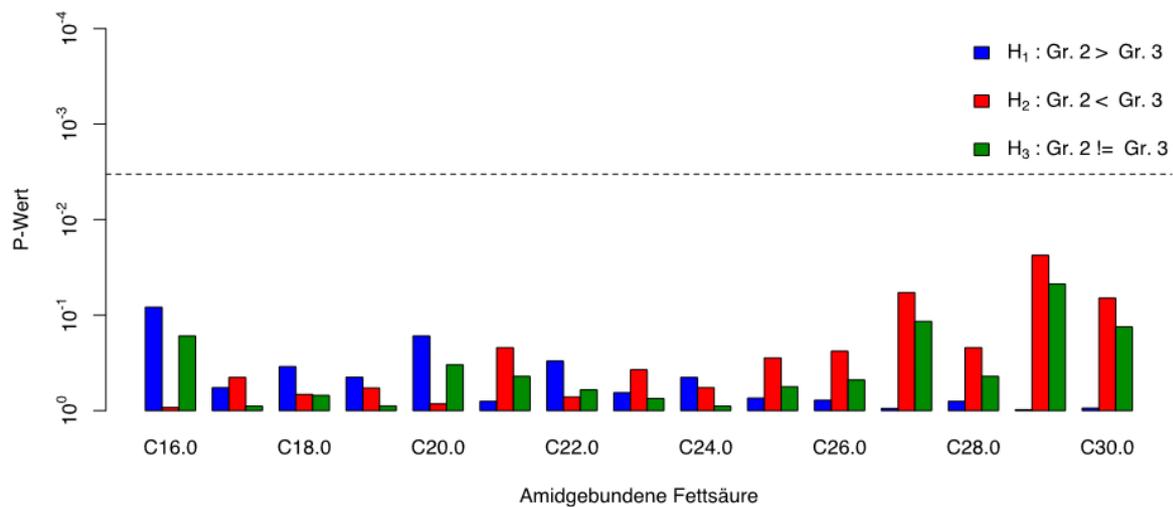
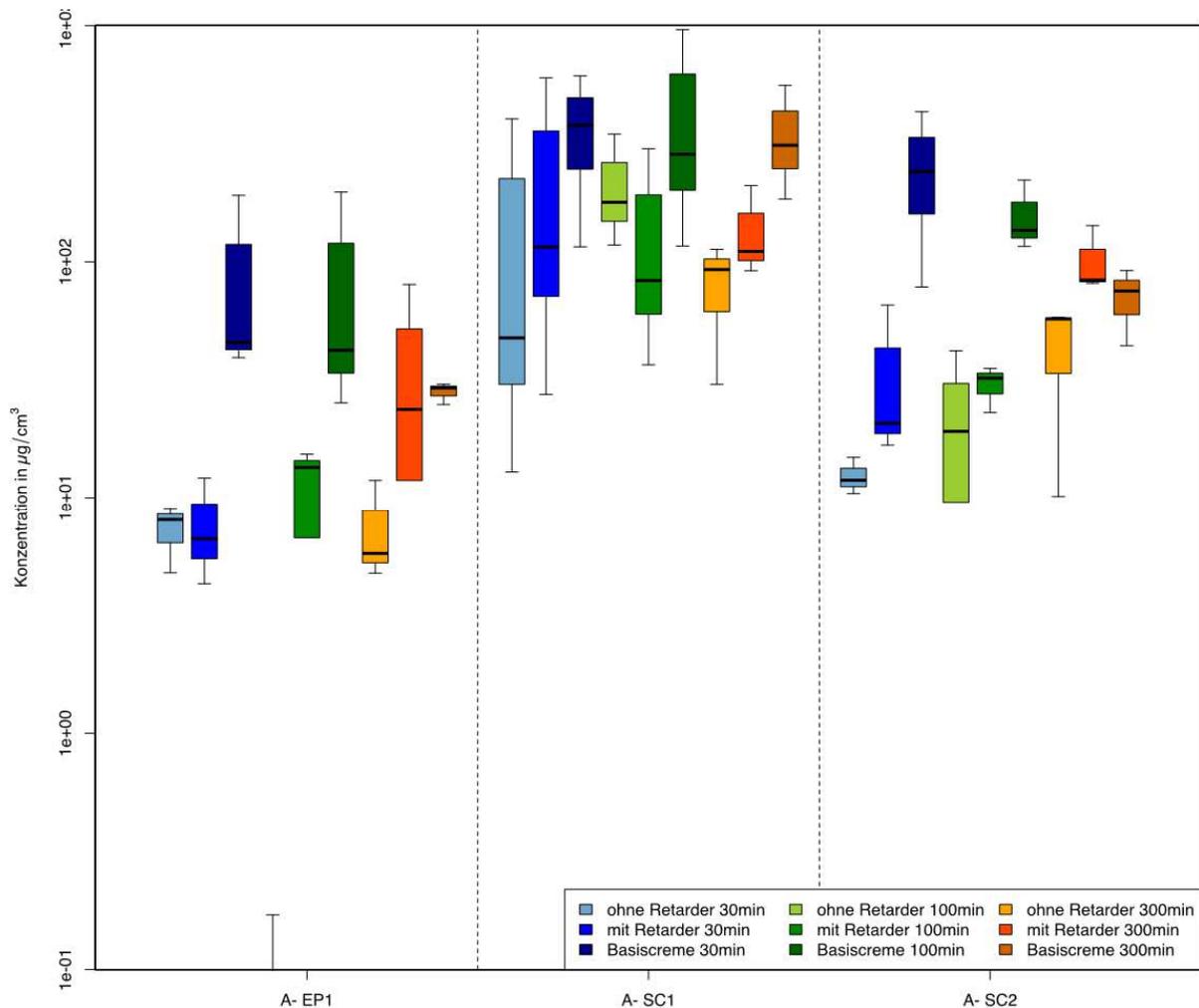


Abbildung 18 Mann-Whitney-U Test zwischen alten, gesunden (Gruppe 2) und jungen Diabetikern (Gruppe 3). Amidgebundene Fettsäuren wurden am Fuß gemessen.

### 5.3 Quantifizierung von deuteriertem Ceramid [NP] nach Penetrationsversuch

Der Vorteil von topischen Formulierungen für bestimmte Krankheitsbilder ist erwiesen, u.a. der Einsatz von Glukokortikoiden für entzündliche Hauterkrankungen. In einigen Fällen ist die Einwirkzeit in einer benötigten Hautschicht jedoch nicht ausreichend. Zum Beispiel permeiert ein lipophiler Wirkstoff durch schnelle Diffusion in tiefere Hautschichten und anschließend in den systemischen Kreislauf.

Isosorbid als Zusatzstoff in topischen Formulierungen, ist ein hygroskopisches Diol, welches die Diffusion von Molekülen durch das *Stratum corneum* verlangsamen soll. Folgerichtig kommt es als sogenannter Retarder in Cremes und Salben zum Einsatz. Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob durch Zusatz von Isosorbid zu einer topischen Formulierung eine verstärkte Anreicherung von Ceramid [NP] im SC erzielt werden kann. Neben einer Mikroemulsion mit sowie ohne Isosorbid wurde der Wirkstoff in die Basiscreme DAC eingearbeitet. Alle drei Formulierungen wurden in einem Penetrationsversuch an Humanhaut getestet.



**Abbildung 19 Vergleich der Mikroemulsion 1 und 2 mit der Basiscreme, unterteilt nach den verschiedenen Hautschichten (SC1- Stratum corneum außen, SC2- Stratum corneum innen, EP1- Epidermis 1 und EP2- Epidermis 2) und den verschiedenen Einwirkzeiten der jeweiligen Formulierung für Haut A**

Diese Boxplot Abbildung 19 zeigt die Haut des Probanden A mit allen 3 Formulierungen: ME1 – Mikroemulsion ohne Retarder, ME2 – Mikroemulsion mit identischer Rezeptur und 5 % Isosorbidzusatz und Basiscreme DAC, sowie allen Einwirkzeiten. Die Hautschichten sind von links nach rechts dargestellt. Die äußerste Hautschicht, das Stratum corneum, ist in zwei Schnitte unterteilt: SC1, dann SC2 und anschließend die darunterliegenden Schichten der Epidermis. Auf die graphische Darstellung tieferer Hautschichten (u.a. Dermis) wurde in dieser Abbildung verzichtet, da die Formulierungen hauptsächlich im SC wirken sollten.

Die Boxplots der Formulierungen mit und ohne Retarder liegen nah beieinander und zeigen keine signifikanten Unterschiede. Verdeutlicht wird das durch die p-Werte des Kruskal- Wallis- Testes zwischen ME1, ME2 und der Basiscreme (Tabelle 13). Keiner dieser Werte liegt unter dem Signifikanzniveau von 0,05. Hätte sich eine der drei Formulierungen zu einer bestimmten Zeit oder in

einer bestimmten Hautschicht als überlegen herausgestellt, wäre das durch einen p- Wert von kleiner als 0,05 erkennbar.

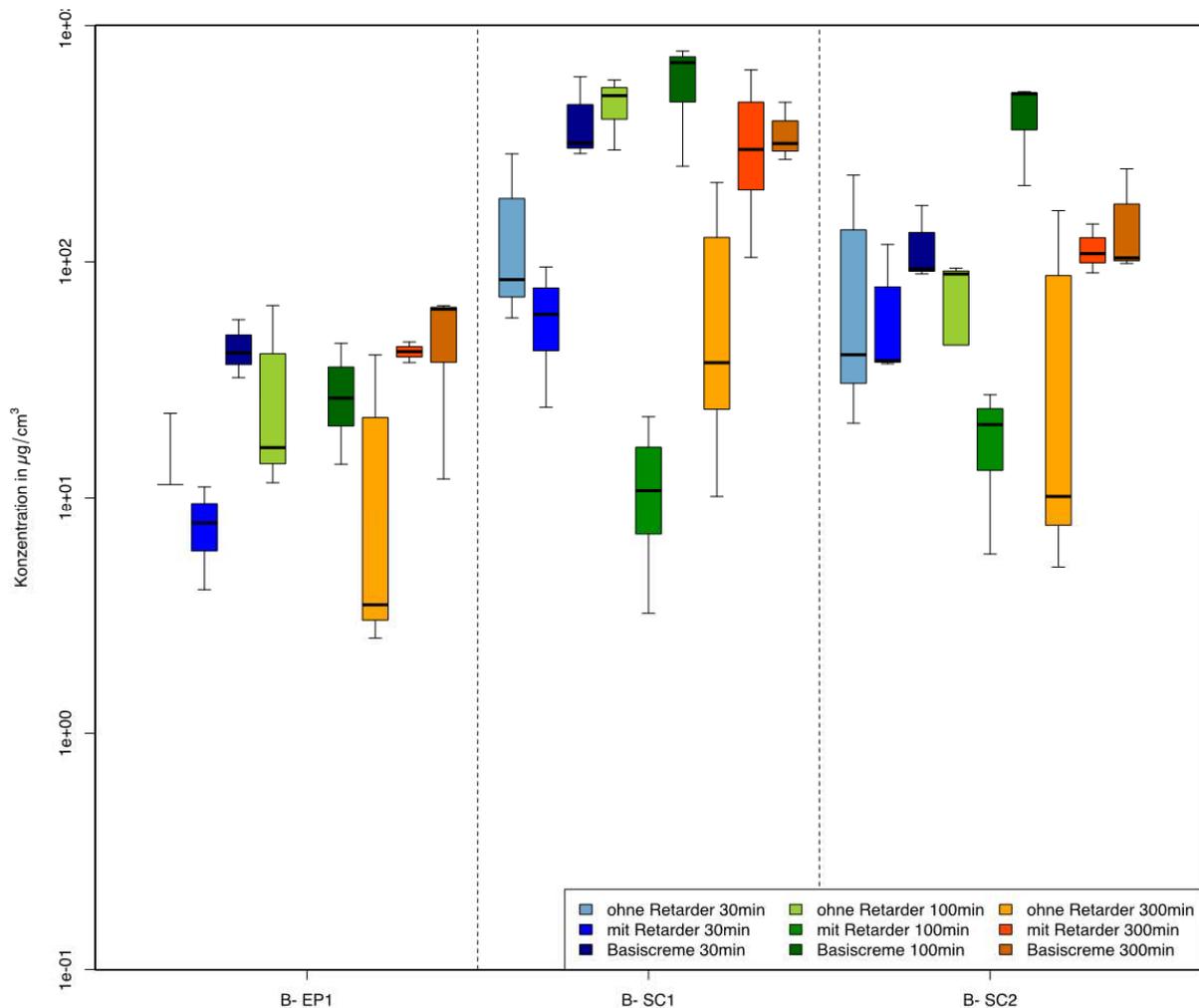
**Tabelle 13 Vergleich der p- Werte von Haut A zu verschiedenen Zeiten, in einer Hautschicht zwischen drei Formulierungen (ME1, ME2 und Basiscreme)**

	30min	100min	300min
<b>A- SC1</b>	0,39	0,43	0,29
<b>A- SC2</b>	0,96	0,88	0,73
<b>A- EP1</b>	0,56	0,87	0,76
<b>A- EP2</b>	0,65	0,67	0,18
<b>A- DR1</b>	0,89	0,39	0,06
<b>A- DR2</b>	0,59	0,41	0,88
<b>A- DR3</b>	0,43	0,67	0,56

Die Auswahl fiel auf den Kruskal- Wallis- Test, weil dieser ein ebenso wie der Mann- Whitney- U- Test ein nicht parametrischer Test ist und für mehr als 2 Gruppenfälle anwendbar war. In diesem Fall sollten drei Formulierungen miteinander verglichen werden und die Daten waren nicht normalverteilt.

**Tabelle 14 Übersicht über mögliche statistische Tests. Parametrische Tests können nur in Falle einer Normalverteilung angewendet werden.**

	Parametrisch	Nicht- parametrisch
<b>2 Gruppen</b>	t- Test	Mann- Whitney- U- Test
<b>&gt; 2 Gruppen</b>	ANOVA	Kruskal- Wallis- Test



**Abbildung 20 Vergleich der Mikroemulsion 1 und 2 mit der Basiscreme, unterteilt nach den verschiedenen Hautschichten (SC1- Stratum corneum außen, SC2- Stratum corneum innen, EP1- Epidermis 1 und EP2- Epidermis 2) und den verschiedenen Einwirkzeiten der jeweiligen Formulierung für Haut B**

Auch für Haut B (Abbildung 20) gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Formulierungen mit und ohne Retarder, sowie im Vergleich zur Basiscreme. Alle drei Formulierungen sind bereits nach 30 min in der Epidermis wieder zu finden. Anhand der dunkelgrünen Boxplots (Basiscreme nach 100 min) ist zu erkennen, dass in fast allen Hautschichten nach 100 min mit dieser Standardformulierung die höchste Konzentration erzielt werden konnte. Bei einer Einwirkzeit von 300 min war der Wert wieder gesunken, was bedeutet, dass der Wirkstoff in tiefere Hautschichten weiter diffundiert ist.

Die Ergebnisse könnten unter anderem an dem Umstand liegen, dass die Creme nur einmalig aufgetragen worden ist. In einer Untersuchung von Miura *et al.* stellte sich in einer Studie mit haarlosen Mäusen ein faltenreduzierender Effekt nach fünf Wochen ein, hier war eine 1%ige isosorbidhaltige Formulierung täglich auf ein Hautstück mit 2,5 cm Durchmesser aufgetragen worden. Im Vergleich mit einer isosorbidfreien Formulierung nahm die Faltentiefe sowie die Epidermisdicke ab. Ersteres wurde visuell über einen Falten score nach Bissett *et al.* beurteilt, bei

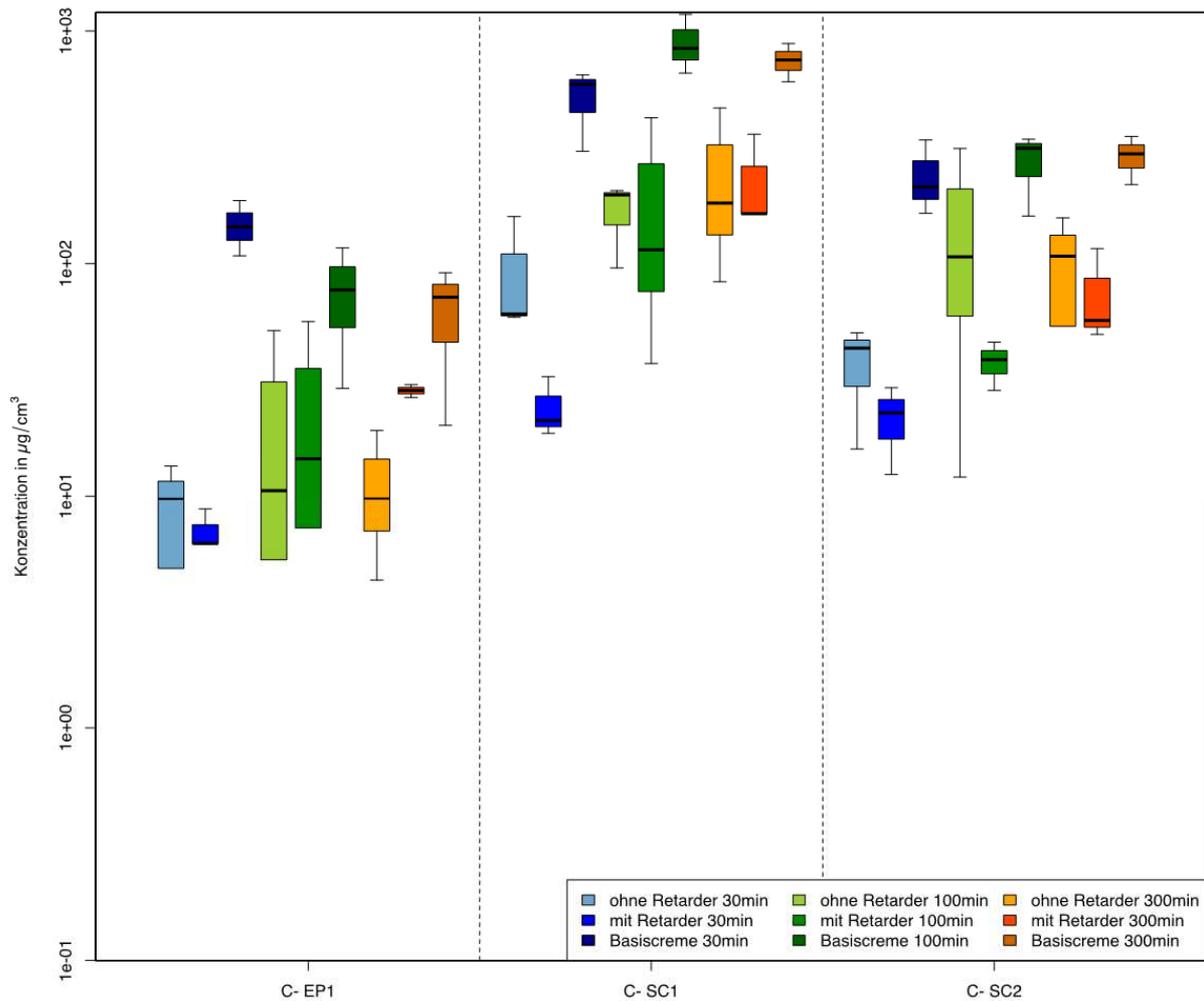
Zweiterem handelt es sich um einen positiven Effekt auf UV- geschädigter Haut, da die Mäuse zuvor 5 – 8 Wochen mit UVA und UVB Licht bestrahlt worden sind [6] [85]. Somit könnte man davon ausgehen, dass der Effekt der Supplementierung von Ceramid [NP] erst über einen Zeitraum von mehreren Wochen detektiert werden kann. Daher sollte ein längerer Untersuchungszeitraum in weiterführenden Studien beachtet werden.

Bei einer zweiten Studie an Augenfalten von 5 Personen zwischen 40 und 58 Jahren, sollten die Probanden eine Creme mit Isosorbid zwei Monate täglich auftragen. Die Auswertung erfolgte danach über eine Befragung der Patienten, dabei gaben 4 von 5 Personen an, einen positiven Effekt auf das Hautgefühl. Außerdem fühlte sich ihre Haut zarter und elastischer anfühle [85]. Ein Zusammenhang zwischen dem veränderten Hautgefühl und einem Retardereffekt wäre somit wahrscheinlich über eine längere Anwendungsdauer nachvollziehbar.

Um auch den Einfluss verschiedener Hautstellen und unterschiedlichen Hauttypen mit einzubeziehen, wurden mehrere Hautstellen von jeweils verschiedenen Probanden untersucht. Haut B stammte vom Schienbein und könnte durch eine dünnere Epidermis größere Unterschiede zwischen den drei Formulierungen zeigen. Jedoch zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Für Haut C (Rückenhaut) ergab sich eine identische Aussage (Abbildung 21).

Außerdem ist die isosorbidhaltige Formulierung (ME2) der ohne Isosorbid (ME1) nicht überlegen. Eventuell hätte die Wasserkonzentration im Verhältnis zur Tensidkonzentration erhöht werden müssen, um den Einfluss von freien Wassermolekülen auf den Wirkstofftransport erhöhen zu können. Bei 40 % Emulgatorphase könnte es sein, dass alle Wassermoleküle die Kopfgruppen der Tenside hydratisieren und keine freien Moleküle für den Wirkstofftransport zur Verfügung stehen. Untersuchungen ergaben, dass in Gegenwart von freiem Wasser die penetrationsfördernden Eigenschaften von ME erhöht werden konnten [129].

Außerdem konnte häufig beobachtet werden, dass mit steigender Emulgatorkonzentration sich nicht zwangsläufig der Flux des Wirkstoffes erhöht. Vermutlich kommt es zum Absinken der thermodynamischen Aktivität des Wirkstoffes im System, woraus eine schlechtere Liberationsrate resultieren könnte [113].



**Abbildung 21** Vergleich der Mikroemulsion 1 und 2 mit der Basiscreme, unterteilt nach den verschiedenen Hautschichten (SC1- Stratum corneum außen, SC2- Stratum corneum innen, EP1- Epidermis 1 und EP2- Epidermis 2) und den verschiedenen Einwirkzeiten der jeweiligen Formulierung für Haut C

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die ME hinsichtlich ihres Penetrationsverhaltens der Basiscreme nicht überlegen sind und dass auch das Isosorbid keinen signifikanten Einfluss auf eine vermehrte Penetration von Ceramid [NP] in unterschiedliche Hautschichten aufweist. Es ist jedoch gelungen eine zuverlässige und sensible Analysenmethode für Konzentrationen an Ceramid [NP] in humaner Haut zu entwickeln. Außerdem konnte das schwerlösliche Ceramid [NP] in einer topischen Formulierung solubilisiert werden. Von konventionellen topischen Formulierungen, wie der Basiscreme ist bekannt, dass Ceramide aus diesen nicht in die Hautschichten des SC und des SG permeieren können [72] [124].

## 6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich zum einen mit der Fragestellung, inwieweit *Stratum corneum* Fettsäure- sowie Ceramidprofile von älteren Probanden und Diabetikern signifikante Unterschiede gegenüber gesunder, junger Haut aufweisen. Die Erkenntnisse könnten dazu genutzt werden, um charakteristische und diagnostische Merkmale für die jeweiligen Studiengruppen zu definieren.

Für die Realisierung dieser Untersuchung wurden zunächst die analytischen Voraussetzungen geschaffen. Neben der Methode zur Quantifizierung der freien Fettsäuren wurde eine Methodenkette zur Untersuchung der amidgebundenen Fettsäuren von Ceramid [NP] entwickelt.

Bei der im Rahmen dieser Arbeit angewandten Analysen handelt es sich um eine gaschromatographische Methode für die freien Fettsäuren und einer erstmalig in dieser Anordnung angewandten HPLC-APCI-ELSD mit anschließender HPLC-MS Methode für das selektive Quantifizieren der amidgebundenen Fettsäuren von Ceramid [NP].

Die Evaluation der Probanden ergab, dass die Konzentrationen der Fettsäuren C15:0 und C17:0 mit steigendem Alter signifikant verringert waren. Demzufolge könnte eine Linderung der alterstypischen Symptome wie trockener Haut mit einer topischen Formulierung, die diese Fettsäuren enthält, erreicht werden.

Von Diabetikern ist bekannt, dass sie aufgrund ihres veränderten Stoffwechsels und verringerter Durchblutung häufig unter trockener, strapazierter Haut der Füße leiden. Wider Erwarten konnte dieses Ergebnis in der aktuellen Untersuchung nicht bestätigt werden. 50 % der untersuchten Fettsäuren waren gegenüber der gesunden Kontrollgruppe erhöht. Die Erklärung des Umstandes konnte in der Tatsache gefunden werden, dass Diabetiker häufig sensibilisiert sind für die krankheitsbedingten Bedürfnisse ihrer Haut und diese intensiv pflegen.

Der Vergleich der Gesunden mit den Diabetikern ergab keine eindeutige Aussage, obwohl bewiesen wurde, dass Diabetiker durch ihren veränderten Stoffwechsel und die verringerte Durchblutung an den Füßen unter trockener, strapazierter Haut leiden. Bei sechs von 12 untersuchten freien Fettsäuren wurden signifikante Unterschiede gefunden, jedoch lag die Konzentration zum Teil über den der von gesunden Probanden. Somit können die freien Fettsäuren anhand dieser Studie nicht als Supplementierung in topischen Formulierungen bei Diabetikern eingesetzt werden. Auch eine Unterscheidung zwischen männlichen und weiblichen Probanden zeigte keine signifikanten Konzentrationsunterschiede.

Und zum anderen können verschiedene Hauterkrankungen heute mit einem reduzierten Gehalt an Ceramiden in Verbindungen gebracht werden. Die statistische Auswertung des Profiles der amidgebundenen Fettsäuren des Ceramid [NP] zeigte wider Erwarten keine signifikanten Unterschiede der Kontrollgruppe zu Älteren oder Diabetikern. Die Erwartungen, signifikante

Differenzen in anderen Ceramiden, wie [EOS] oder [AP] zu finden, sind gering. Dies könnte aber in anschließenden Untersuchungen aufgrund der noch vorhandenen Proben untersucht werden.

Die Ergebnisse zur Untersuchung der verschiedenen Lipidbestandteile im *Stratum corneum* haben gezeigt, dass die Möglichkeit eine eindeutige Zuordnung zu einzelnen Personengruppen (alt oder krank) anhand deren Konzentration beschränkt ist. Eventuell sollte in weiterführenden Arbeiten die Untersuchungen an weiteren Lipidbestandteilen z.B. weiteren Ceramidklassen und Cholesterol ausgebaut werden. Durch diese Studie wurden jedoch schon viele Erkenntnisse über die Zusammensetzung der verschiedenen Fettsäuren gewonnen. Bis dato gab es im Hinblick auf die ungeradzahligen freien Fettsäuren eine geringe Studienlage zu den Ausprägungen.

Die epidermale Barrierefunktion ist bis heute ein breites Forschungsgebiet mit vielen Möglichkeiten, wovon in dieser Arbeit speziell das Thema Lipide ausführlich untersucht werden konnte. Weitere Einflüsse durch Tight junctions, Korneodesmosomen, die cornified envelope und verschiedene Enzyme auf die Alterung der Haut oder Veränderungen während einer Diabeteserkrankung könnten ebenfalls eingehend untersucht werden, um die Komplexität der Barrierefunktion beschreiben zu können. So führt das fehlende Enzym Glucocerebrosidase bei der Gaucher-Krankheit zu einer Dysfunktion der epidermalen Barriere, in dessen Folge vermehrt Hautblutungen auftreten.

Wie bereits erwähnt sind u.a. bei der Psoriasis nachweislich Ceramidkonzentrationen verringert, deshalb wurde in einem zweiten Abschnitt dieser Arbeit der Fragestellung nachgegangen, inwieweit eine topische Formulierung ein reduziertes Ceramid aus dem *Stratum corneum* supplementieren kann.

Durch Kombination eines Ceramides mit einem Retarders sollte eine möglichst hohe Konzentration und lange Verweildauer der Formulierung in der benötigten Hautschicht erzeugt werden.

Zur Inkorporierung der höher molekularen und lipophilen Ceramide wurde eine Mikroemulsion entwickelt. Ihr Einsatz sollte eine verbesserte lokale Bioverfügbarkeit des ersetzten Ceramid [NP] erzielen.

Der Vergleich der Konzentrationen von Ceramid [NP] von Mikroemulsionen mit und ohne Retarder sowie Basiscreme haben gezeigt, dass die Mikroemulsionen der Basiscreme nicht überlegen sind.

Diese Arbeit liefert durch den dazu begleitend notwendigen großen Analyse- und Studienumfang einen Beitrag zur Bestimmung der vielfältigen und komplexen Zusammensetzung des *Stratum corneum* sowie durch den großen Studienumfang Erkenntnisse über deren Zusammensetzung im Alter und bei Diabetikern. Ergänzend könnten weitere Untersuchungen zur Funktionsweise der einzelnen Hautbestandteile unternommen werden, um die Hautbarriere besser beeinflussen zu können. Dies bleibt daher ein attraktiver und zugleich interessanter Forschungsbereich.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Alessandrini F, Stachowitz S, Ring J *et al.* (2001) The level of prosaposin is decreased in the skin of patients with psoriasis vulgaris *J Invest Dermatol* 116: 394–400
2. Altemus M, Rao B, Dhabhar FS *et al.* (2001) Stress-induced changes in skin barrier function in healthy women *J Invest Dermatol* 117: 309–317
3. Attwood D Microemulsions. In: Kreuter J, ed. Colloidal Drug Carrier Systems. Vol. 66 New York: Marcel Dekker, 1994
4. Barry BW (2001) Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery *Eur J Pharm Sci* 14: 101-114
5. Behne M, Uchida Y, Seki T *et al.* (2000) Omegahydroxyceramides are required for corneocyte lipid envelope (CLE) formation and normal epidermal permeability barrier function *J Invest Dermatol* 114: 185-192
6. Bissett D, Hannonand D, Orr T *et al.* (1987) An animal model of solar-aged skin: Histological, physical and visile changes in UV- irradiated hairless mouse skin *Photochem Photobiol* 46: 367-378
7. Bleck O, Abeck D, Ring J *et al.* (1999) Two ceramide subfractions detectable in Cer(AS) position by HPTLC in skin surface lipids of nonlesional skin of atopic eczema *J Invest Dermatol* 113: 894-900
8. Bonté F, Pinguet P, Chevalier JM *et al.* (1995) Analysis of all stratum corneum lipids by automated multiple development high-performance thin-layer chromatography *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 664: 311-316
9. Both DM, Goodtzova K, Yarosh DB *et al.* (2002) Liposome-encapsulated ursolic acid increases ceramides and collagen in human skin cells *Arch Dermatol Res* 293: 569–575
10. Bouwstra Ja, Dubbelaar FE, Gooris GS (2000) The lipid organization in the skin barrier *Acta Derm Venereol Suppl* 208: 23-30
11. Bouwstra JA, Gooris GS, Dubbelaar FE *et al.* (2002) Phase behavior of stratum corneum lipid mixtures based in human ceramides: The role of natural and synthetic ceramide 1 *J Invest Dermatol* 118: 606-617
12. Bouwstra JA, Ponec M (2006) The skin barrier in healthy and disease state *Biochim Biophys Acta* 1758: 2080-2095
13. Breiden B, Sandhoff K (2014) The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation *Biochem Biophys Acta* 1841: 441-452
14. Bronaugh RL, Stewart RF, Simon M *et al.* (1986) Methods for Invitro Percutaneous-Absorption Studies. Use of Excised Human-Skin *J Pharm Sci* 75: 1094-1097
15. Bronaugh RI, Maibach HI (Hrsg) (1992) In vitro percutaneous absorption: principles, fundamentals and applications, 1. Auflage, *CRC Press Florida* 67-84

16. Byrdwell WC (2001) Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids *Lipids* 36: 327-346
17. Carroll DI, Dzidic I, Stillwell RN *et al.* (1975) Atmospheric pressure ionization mass spectrometry: corona discharge ion source for use in liquid chromatography-mass spectrometer-computer analytical system *Anal Chem* 47: 2369–2373
18. Changez M, Varshney M, Chander J *et al.* (2006) 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 Coll Surf B-Bioint* 50: 18-25
19. Chaudhuri (Date of Patent: Jul 30, 2013) United States Patent: Composition and methods for improving skin appearance, Patent No.: US 8496917 B2
20. Czaika VA (2013) Von Xerosis bis Vitiligo. Hautzeichen der Zuckerkrankheit *Hautnah Dermatologie* 29: 348-352
21. Deffond D, Saint Leger D, Leveque JL *et al.* (1986) In vivo measurement of epidermal lipids in man *Bioengin Skin* 2: 71-85
22. Deschamps FS, Baillet A, Chaminade P *et al.* (2002) Mechanisms of response enhancement in evaporative light scattering detection with the addition of triethylamine and formic acid *Analyst* 127: 35-41
23. Eckerskorn C (1998) Massenspektrometrie In: Lottspeich F, Zorbas H (Hrsg) Bioanalytik, 1. Auflage *Spektrum Akademischer Verlag* 323-368
24. Eichner, Adina (2015) Impact of long- chain omega-acyl ceramide [EOS] to the nanostructure of Stratum corneum model membranes applying specifically deuterated ceramide subspecies, Diplomarbeit, Martin- Luther- Universität Halle- Wittenberg
25. Elias PM (2005) Stratum Corneum Defensive Functions- A Great Irfanview *J Invest Dermatol* 125: 183 –200
26. Elias PM, Friend DS (1975) The permeability barrier in mammalian epidermis *J Cell Biol* 65: 180-191
27. Elias PM, Goerke J, Friend DS *et al.* (1977) Mammalian epidermal barrier layer lipids: composition and influence on structure *J Invest Dermatol* 69: 535-546
28. Elias PM (1983) Epidermal lipids, barrier function and desquamation *J Invest Dermatol* 80: 44-49
29. Elias PM, Brown BE, Ziboh VA *et al.* (1980) The permeability barrier in essential fatty acid deficiency: evidence for a direct role for linoleic acid in barrier function *J Invest Dermatol* 74: 230-233
30. Elias PM, Brown BE (1978) The mammalian cutaneous permeability barrier: defective barrier function in essential fatty acid deficiency correlates with abnormal intercellular lipid deposition *Lab Invest* 39: 574-583

31. Elias PM, Brown BE, Ziboh VA *et al.* (1980) The permeability barrier in essential fatty acid deficiency: evidence for a direct role for linoleic acid in barrier function  
*J Invest Dermatol* 74: 230-233
32. EMA European Medicines Agency, Guideline on bioanalytical method validation, 21 July 2011, EMEA/CHMP/EWP/ 192217/2009 Rev. 1 Corr. 2, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)
33. Farwanah H, Raith K, Neubert RHH *et al.* (2005) Ceramide profiles of the uninvolved skin in atopic dermatitis and psoriasis are comparable to those of healthy skin  
*Arch Dermatol Res* 296: 514-521
34. Farwanah H, Nuhn P, Neubert RHH *et al.* (2003) Normal phase LC separation of stratum corneum ceramides with detection by evaporative light scattering and APCI mass spectrometry *Anal Chim Acta* 492: 233-239
35. Feingold KR (2012) Lamellar Bodies: The Key to Cutaneous Barrier Function  
*J Invest Dermatol* 132: 1951-1953
36. Feingold KR (2007) Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis *J Lipid Res* 48: 2531-2546
37. Franz TJ (1975) Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data  
*J Invest Dermatol* 64: 190-195
38. Freinkel RK, Traczyk TN (1985) Lipid composition and acid hydrolase content of lamellar granules of fetal rat epidermis *J Invest Dermatol* 85: 295-298
39. Forslind B (1994) A domain mosaic model of the skin barrier  
*Acta Dem Venereol* 74: 1-6
40. De Gennes PG, Taupin C (1982) Microemulsions and the flexibility of oil/water interfaces *J Phys Chem* 86: 2294-3204
41. Gey M (2008) Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, 2. Auflage, Springer-Verlag 151-170
42. Ghadially R, Brown BE, Sequeira-Martin SM *et al.* (1995) The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model *Journal Clin Invest* 95: 2281-2290
43. Goebel ASB, Knie U, Abels C *et al.* (2010) Dermal targeting using colloidal carrier systems with linoleic acid *Eur J Pharm Biopharm* 75: 162-170
44. Gradzielski M, Hoffman H (1999) Rheological Properties of Microemulsions. In: Kumar P, Mittal K(Hrsg) Handbook of Microemulsion Science and Technology, 1. Auflage Marcel Dekker Inc 357-380
45. Grove GL, Klingman AM (1983) Age- associated change in human epidermal cell renewal  
*J Gerontol* 38: 137-142
46. Grubauer G, Feingold KR, Elias PM (1987) Relationship of Epidermal Lipogenesis to Cutaneous Barrier Function *J Lipid Res* 28: 746-752

47. Gurr MI, Harwood JL (1991) Lipid Biochemistry – An introduction, 4. Auflage  
*Capman & Hall* 89-110
48. Hara M, Ma T, Verkman AS *et al.* (2002) Selectively reduced glycerol in skin of aquaporin-3-deficient mice may account for impaired skin barrier recovery *J Biol Chem* 277: 46616-46621
49. Harrison SM, Barry BW, Dugard PH *et al.* (1984) Effects of Freezing on Human-Skin Permeability *J Pharm Pharmacol* 36: 261-262
50. Heuschkel S, Goebel ASB, Neubert RHH *et al.* (2007) Microemulsions – modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery *J Pharm Sci* 97: 603-631
51. Heuschkel S, Wohlrab J, Neubert RHH (2009) Dermal and transdermal targeting of dihydroavenanthramide D using enhancer molecules and novel microemulsions  
*Eur J Pharm Biopharm* 72: 552-560
52. Hinder A, Schmelzer CEH, Rawlings AV *et al.* (2011) Investigation of the molecular structure of the human stratum corneum ceramides [NP] and [EOS] by mass spectrometry  
*Skin Pharmacol Physiol* 24: 127–135
53. Holleran WM, Ginns EI, Menon GK *et al.* (1994) Consequences of  $\beta$ -glucocerebrosidase deficiency in epidermis: ultrastructure and permeability barrier alterations in Gaucher disease *J Clin Invest* 93: 1756–1764
54. Hong KK, Cho HR, Ju WC *et al.* (2007) A study on altered expression of serine palmitoyltransferase and ceramidase in psoriatic skin lesion *J Korean Med Sci* 22: 862–867
55. Horning EC, Horning MG, Carroll DI *et al.* (1973) New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure *Anal Chem* 45: 936–943
56. Hübschmann HJ (2009) Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications, 2. Auflage  
*Wiley- VCH Verlag* 166-183
57. Imokawa G, Hattori M (1985) A possible function of structural lipid in the water holding properties of the stratum corneum *J Invest Dermatol* 84: 282-284
58. Jakobsson A, Westerberg R, Jacobsson A *et al.* (2006) Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism *Prog Lipid Res* 45: 237-249
59. Jecht M (2009) Hautveränderungen bei Diabetes mellitus *Der Diabetologe* 5: 43-56
60. Jenerowicz D, Silny W, Danczak-Pazdrowska A *et al.* (2012) Environmental factors and allergic diseases *Ann Agric Environ Med* 19: 475–48.
61. Kang L, Ho PC, Chan SY *et al.* (2006) Interactions between a skin penetration enhancer and the main components of human stratum corneum lipids isothermal titration calorimetry study *J Therm Anal Calorim* 83: 27–30
62. Kebarle P (2000) A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry *J Mass Spectrom* 35: 804–817

63. Kemken J, Ziegler A, Muller BW *et al.* (1991) Investigations into the Pharmacodynamic Effects of Dermally Administered Microemulsions Containing Beta-Blockers *J Pharm Pharmacol* 43: 679-684
64. Kemken J, Ziegler A, Muller BW *et al.* (1992) Influence of Supersaturation on the Pharmacodynamic Effect of Bupranolol after Dermal Administration Using Microemulsions as Vehicle *Pharm Res* 9: 554-558
65. t'Kindt R, Jorge L, Dumont E *et al.* (2012) Profiling and characterizing skin ceramides using reversed phase liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry *Anal Chem* 84: 403-411
66. Kiselev MA, Ryabova NY, Neubert RHH (2005) New insights into structure and hydration of SC lipid model membranes by neutron diffraction *European Biophysical Journal* 34: 1030-1040
67. Kiselev MA (2007) Conformation of ceramide 6 molecules and chain- flip transitions in lipid matrix of the outermost layer of skin- stratum corneum *Crystallography* 52: 572-576
68. Kolb B (2003) Gaschromatographie in Bildern: Eine Einführung, 2. Auflage *Wiley- VCH Verlag* 1-13
69. Kondo N, Ohno Y, Yamagata M *et al.* (2014) Identification of the phytosphingosine metabolic pathway leading to odd- numbered fatty acids *Nat comun* 5: 5338
70. Kromidas S (2008) Chromatogramme richtig integrieren und bewerten – Ein Praxishandbuch für die HPLC und GC, 2. Auflage *Wiley- VCH* 193-224
71. Kromidas S, Morkowski J (2000) Grundsätze in der Validierung in der Analytik und im Prüfwesen. In: Kromidas S (Hrsg) Handbuch Validierung in der Analytik 1. Auflage *Springer- Verlag* 85-112
72. Lambers JW , Verweij JL (Date of Patent: Apr 11, 1996 Netherlands Patent: Ceramide 3 derivatives based on monounsaturated fatty acids, Patent No.: WO1996010557 A1
73. Laposata M (1995) Fatty-Acids - Biochemistry to Clinical-Significance *Am J Clin Pathol* 104: 172-179
74. Lehmann PA, Franz TJ (2014) Effect of induced acute diabetes and insulin therapy on stratum corneum barrier function in rat skin *Skin Pharmacol Physiol* 27: 249-253
75. Lemiére F (2001) Interfaces for LC-MS, Guide to LC-MS *LCGC Europe* 19: 29-35
76. Lew BL, Cho Y, Kim J *et al.* (2006) Ceramides and cell signaling molecules in psoriatic epidermis: reduced levels of ceramides, PKC- $\alpha$ , and JNK *J Korean Med Sci* 221: 95-99
77. Liang Y, Tian W, Ma X *et al.* (2013) Inhibitory effects of grape skin extract and resveratrol on fatty acid synthase *Bio Med Central* 13: 361
78. Madison KC (2003) Barrier Function of the Skin: "La Raison d'Être" of the Epidermis *J Invest Dermatol* 121: 231-241

79. Mandon E, Ehses I, Rother J *et al.* (1992) Subcellular Localization and Membrane Topology of Serine Palmitoyltransferase, 3- Dehydrosphinganine Reductase and Sphinganine N-Acetyltransferase in Mouse Liver *J Biol Chem* 16: 11144- 11148
80. Masukawa Y, Narita H, Kitahara T *et al.* (2008) Characterization of overall ceramide species in human Stratum corneum *J Lipid Res* 49: 1466-1476
81. Masukawa Y, Narita H, Sato H *et al.* (2009) Comprehensive quantification of ceramide species in human stratum corneum *J Lipid Res* 50: 1708-1719
82. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM *et al.* (2003) Strategies for Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS *Anal Chem* 75: 3019-3030
83. Meguro S, Arai Y, Masukawa Y, *et al.* (2000) Relationship between covalently bound ceramides and transepidermal water loss (TEWL) *Arch Dermatol Res* 292: 463-468
84. Minghetti P, Casiraghi A, Cilurzo F *et al.* (1999) Comparison of different membranes with cultures of keratinocytes from man for percutaneous absorption of nitroglycerine *J Pharm Pharmacol* 51: 673-678
85. Miura K, Haratake A (Date of Patent: Nov 27, 2008) United States Patent: Skincosmetic and wrinkle- reducing agent, Patent No.: US20080293807 A1
86. Moll I (Hrsg) (2016): Duale Reihe Dermatologie. 8. Auflage 2016 *Thieme Verlag* 15-27
87. Motta S, Sesana S, Monti M *et al.* (1994) Interlamellar lipid differences between normal and psoriatic stratum corneum *Acta Derm Suppl* 186: 131-132
88. Motta S, Monti M, Sesana S *et al.* (1993) Ceramide composition of the psoriatic scale *Biochem Biophys Acta* 1182: 147-151
89. Motta S, Monti M, Sesana S *et al.* (1994) Abnormality of water barrier function in psoriasis. Role of ceramide fractions *Arch Dermatol* 130: 452–456
90. Moulik SP, Paul BK (1998) Structure, dynamics and transport properties of microemulsions *Adv Coll Inter Science* 78: 99-195
91. Müller KD, Husmann H, Nalik HP *et al.* (1990) Trans- Esterification of fatty acids from microorganisms and human blood serum by trimethylsulfonium hydroxide (TMSH) for GC analysis *Chromatographia* 30: 245-248
92. Di Nardo A, Wertz P, Giannetti A *et al.* (1998) Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis *Acta Derm Venereol* 78: 27-30
93. Neubert A, Wohlrab W, Marsch W (2001) Dermatopharmazie: Vehikel – Wirkstoffe - Pharmakologie *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft* 25-46
94. Nicollier M, Massengo T, Remy-Martin JP *et al.* (1986) Free Fatty Acids and Fatty Acids of Triacylglycerols in Normal and Hyperkeratotic Human Stratum Corneum *J Invest Dermatol* 87: 68-71

95. Niedner R (1992) Erythemat-squamöse Hauterkrankungen In: Niedner R, Ziegenmeyer J (Hrsg) *Dermatika- Therapeutischer Einsatz, Pharmakologie und Pharmazie Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft* 199-200
96. Niessen W Tinke A (1995) Liquid chromatography-mass spectrometry general principles and instrumentation *J Chromatogr A* 703: 37-57
97. Norlen L (2001) Skin barrier structure and function: The single gel phase model *J Invest Dermatol* 117: 830-836
98. Norlen L, Nicander I, Rozell BL *et al.* (1999) Inter- and intra-individual differences in human stratum corneum lipid content related to physical parameters of skin barrier function in vivo *J Invest Dermatol* 112: 72-77
99. Norlen L, Nicander I, Lundsjo A *et al.* (1998) A new HPLC-based method for the quantitative analysis of inner stratum corneum lipids with special reference to the free fatty acid fraction *Arch Dermatol Res* 290: 508-516
100. Padberg J (1998) Simultane Bestimmung von Dapson, Monoacetyldapson und Pyrimethamin mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) im Blutplasma HIV-seropositiver Patienten, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Medizinische Fakultät-Universitätsklinikum Charité
101. Peltola S, Saarinen-Savolainen R, Kiesvaara J *et al.* (2003) Microemulsions for topical delivery of estradiol *Int J Pharm* 254: 99-107
102. Ponec M, Weerheim A, Lankhorst P *et al.* (2003) New acylceramide in native and reconstructed epidermis *J Invest Dermatol* 120: 581-588
103. Proksch E, Brander JM, Jensen JM *et al.* (2008) The skin: an indispensable barrier *Exp Dermatol* 17: 1063-1072
104. Rabionet M, Gorgas K, Sandhoff R *et al.* (2014) Ceramide synthesis in the epidermis *Biochem Biophys Acta, Mole Cell Bio Lip* 1841: 422-434
105. Rassner U, Feingold KR, Crumrine DN *et al.* (1999) Coordinate assembly of lipids and enzyme proteins into epidermal lamellar bodies *Tissue & Cell* 31: 489-498
106. Rawlings AV, Matts PJ (2005) Stratum corneum moisturization at the molecular level: an update in relation to the dry skin cycle *J Invest Dermatol* 124: 1099–1110
107. Robson KJ, Stewart M E, Michelsen S *et al.* (1994) 6-hydroxy- 4-sphingenine in human epidermal ceramides *J Lipid Res* 35: 2060-2068
108. Röcken M, Strölin A (2011) Hautkrankheiten und Diabetes mellitus. In: Häring HU (Hrsg) *Diabetologie in Klinik und Praxis*, 6. Auflage *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft* 524-529
109. Rogers J, Harding C, Mayo A, Banks *et al.* (1996) Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons *Arch Dermatol Res* 288: 765–770
110. Rucker G, Neugebauer M, Willems G (2001) Instrumentelle pharmazeutische Analytik. Lehrbuch zu spektrometrischen, chromatographischen und elektrochemischen Analysemethoden *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft* 242-254

111. Sahle FF, Lange S, Dobner B *et al.* (2012) Development and validation of LC/ESI-MS method for the detection and quantification of exogenous ceramide NP in stratum corneum and other layers of the skin *J Pharm Biomed Anal* 60: 7-13
112. Sahle FF, Gebre- Mariam T, Dobner B *et al.* (2015) Skin Diseases Associated with the Depletion of Stratum Corneum Lipids and Stratum Corneum Lipid Substitution Therapy *Skin Pharmacol Physiol* 28: 42-55
113. Saint R, Attwood D, Ktistis G *et al.* (1995) Phase studies and particle size analysis of oil-in-water phospholipid microemulsions *Int J Pharm* 116:253-261
114. Sasaki S, Fushimi K, Saito H *et al.* (1994) Cloning, characterization and chromosomal mapping of human aquaporin of collecting duct *J Clin Invest* 93: 1250-1256
115. Schroeter A, Kessner D, Kiselev MA *et al.* (2009) Basic nanostructure of stratum corneum lipid matrices based on ceramides [EOS] and [AP]: a neutron diffraction study *Biophys J* 97: 1104–14
116. Shukla A, Janich M, Jahn K *et al.* (2002) Investigation of pharmaceutical oil/water microemulsions by small-angle scattering *Pharm Res* 19: 881-6
117. Signorelli P, Hannun YA (2002) Analysis and quantitation of ceramide *Methods Enzymol* 345: 275-294
118. Sintov AC, Shapiro L (2004) New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo *J Control Release* 95: 173-183
119. Smeden J van, Janssens M, Kaye ECJ *et al.* (2014) The importance of free fatty acid chain length for the skin barrier function in atopic eczema patients *Exp Dermatol* 23: 45-52
120. Smeden J van, Hoppel L, Heijden R van der *et al.* (2011) LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery *J Lipid Res* 52: 1206-1211
121. Souza TD, Sherman- Baust CA, Poosala S *et al.* (2009) Age- related changes of claudin expression in mouse liver, kidney and pancreas *J Geront Ser A Biol Sci Med Sci* 11:1146-1153
122. Steinert PM (2000) The complexity and redundancy of epithelial barrier function *J Cell Biol* 151: 5-8
123. Steinert PM, Marekov LN (1999) Initiation of assembly of the cell envelope barrier structure of stratified squamous epithelia *Mol Biol Cell* 10: 4247-4261
124. Stover TC, Sharma A, Robertson GP *et al.* (2005) Systemic delivery of liposomal short-chain ceramide limits solid tumor growth in murine models of breast adenocarcinoma *Clin Cancer Res* 11: 3465–3474
125. Swartzendruber DC, Wert PW, Kitko DJ (1989) Molecular Models of the Intercellular Lipid Lamellae in Mammalian Stratum Corneum *J Invest Dermatol* 92: 251-257
126. Thakker KD (2003) Development and validation of in vitro release test for semisolid dosage forms- case studies *Dissolut Technol* 10: 10-15

127. Teichmann A, Heuschkel S, Jacobi U *et al.* (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: 699-706
128. Uchida Y, Hara M, Nishio H *et al.* (2000) Epidermal sphingomyelins are precursors for selected stratum corneum ceramides *J Lipid Res* 41: 2071–2082
129. Weerheim A, Ponc M (2001) Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography *Arch Dermatol Res* 293: 191-199
130. Wepf R, Neubert R (2007) Stratum corneum - Struktur und Morphologie einer hoch effizienten Barriere *Pharmazeutische Zeitung* 17: 14-21
131. Werner Y, Lindberg M, Forslind B *et al.* (1982) The water binding capacity of stratum corneum in dry non-eczematous skin of atopic eczema *Acta Derm Venereol* 62: 334-337
132. Wertz PW, Bergh B van den (1998) The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers *Chem Phys Lip* 91: 85-96
133. Wertz PW (2000) Lipids and barrier function of the skin. *Acta Derm Venereol Suppl* 208: 7-11
134. Wertz PW, van den Bergh B (1998) The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers *Chem Phys Lipids* 91: 85-96
135. Wertz PW, Cho ES, Downing DT *et al.* (1983) Effect of essential fatty acid deficiency on the epidermal sphingolipids of the rat *Biochim Biophys Acta* 753: 350-355
136. Willoughby R, Sheehan E, Mitrovich S (1998) A Global View of LC/MS *Global View Publications* 2: 315-345
137. Wokalek H (1992) Die Haut. In: Niedner R, Ziegenmeyer J (Hrsg) Dermatika- Therapeutischer Einsatz, Pharmakologie und Pharmazie *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft* 3-28
138. Young CS, Dolan JW (2003) Success with evaporative light-scattering detection *LCGC North America* 21: 120-128
139. Zheng X, Bollag WB (2003) Aquaporin 3 colocalizes with phospholipase D2 in caveolin- rich membrane microdomains and is down- regulated upon keratinocyte differentiation *J Invest Dermatol* 121: 1487-1497
140. Wohlrab J, Neubert RHH, Steinbach SC, Hilbert K (2016) Charakterisierung der Barrierefunktionalität des Stratum corneums im Alter *JDDG Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 14: Poster Nr. 20

## 8 Anhang

### A Richtigkeit und Präzision der GC- Methode (Kapitel 4.3)

	C15:0		C16:0		C17:0	
Standard Konzentration	C (µg/ml)	Wiederfindung (%)	C (µg/ml)	Wiederfindung (%)	C (µg/ml)	Wiederfindung (%)
<b>0,2</b>	0,21	105,28	0,19	94,13	0,22	112,10
<b>0,5</b>	0,43	86,74	0,43	86,30	0,43	86,88
<b>1,0</b>	0,99	98,55	0,91	91,42	1,07	107,33
<b>1,5</b>	1,52	101,63	1,51	100,59	1,62	108,00
<b>2,0</b>	1,82	91,13	1,72	86,03	1,97	98,47
<b>2,5</b>	2,38	95,34	2,32	92,90	2,31	92,31
	C18:0		C18:1		C18:2	
<b>0,2</b>	0,24	122,28	0,18	90,02	0,23	116,32
<b>0,5</b>	0,49	98,04	0,52	104,60	0,51	103,00
<b>1,0</b>	2,28	108,07	1,14	114,07	1,02	101,60
<b>1,5</b>	1,53	102,10	1,67	111,46	1,45	96,72
<b>2,0</b>	1,86	93,24	2,30	115,23	1,80	89,89
<b>2,5</b>	2,56	102,25	2,58	103,04	2,22	88,93
	C19:0		C21:0		C23:0	
<b>0,2</b>	0,22	110,39	0,17	84,76	0,22	111,38
<b>0,5</b>	0,57	114,95	0,49	98,39	0,47	93,64
<b>1,0</b>	0,94	94,24	1,06	106,02	1,05	105,29
<b>1,5</b>	1,42	94,69	1,60	106,77	1,65	109,87
<b>2,0</b>	1,90	94,99	1,97	98,53	1,99	99,50
<b>2,5</b>	2,59	103,77	2,68	107,36	2,66	106,51
	C24:0		C25:0		C26:0	
<b>0,2</b>	0,21	105,45	0,23	113,64	0,23	112,68
<b>0,5</b>	0,43	86,89	0,46	91,31	0,45	89,36
<b>1,0</b>	0,91	90,54	1,10	110,08	1,05	105,37
<b>1,5</b>	1,47	97,69	1,64	109,22	1,62	108,23
<b>2,0</b>	1,80	89,99	2,15	107,51	1,98	98,93
<b>2,5</b>	2,34	93,76	2,79	111,41	2,42	96,65

**Tabelle 1** Richtigkeit der untersuchten freien Fettsäuren

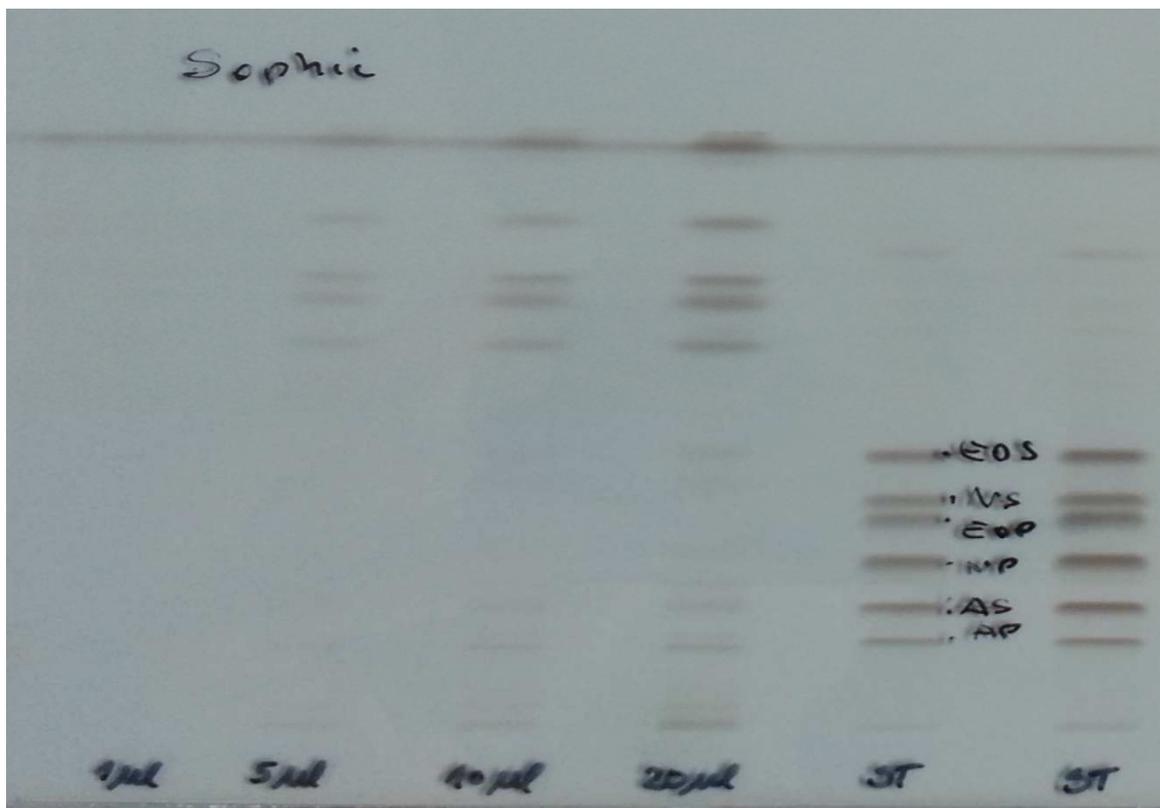
Die EMA- Richtlinie „Guideline on bioanalytical method validation“ schreibt vor, dass Richtigkeit und Präzisionen in der Serie sowie zwischen den Serien mindestens 15 % betragen. An der Quantifizierungsgrenze (Limit of Quantification) ist auch eine Präzision von maximal 20 % akzeptabel [32]. Wie den Tabellen 1 und 2 zu entnehmen ist, liegen Richtigkeit, Präzision in der Serie und zwischen den Serien für fast alle FFS innerhalb dieser Richtwerte. Eine Fettsäure überschreitet den Grenzwert für die Richtigkeit bei einer Konzentration.

Konzentration (µg/ml)	<b>C15:0</b>		<b>C16:0</b>		<b>C17:0</b>	
	in der Serie (%)	zwischen den Serien (%)	in der Serie (%)	zwischen den Serien (%)	in der Serie (%)	zwischen den Serien (%)
<b>0,2</b>	5,04	16,61	1,00	14,11	14,31	17,91
<b>0,5</b>	2,58	12,05	3,38	9,88	2,88	14,17
<b>1,0</b>	3,66	8,97	3,85	8,81	3,12	6,77
<b>1,5</b>	2,60	14,47	3,28	10,36	2,51	12,47
<b>2,0</b>	3,90	11,30	3,53	14,43	2,41	12,43
<b>2,5</b>	3,74	7,73	3,44	12,84	3,92	12,21
	<b>C18:0</b>		<b>C18:1</b>		<b>C18:2</b>	
<b>0,2</b>	5,02	16,04	4,31	17,89	5,25	15,87
<b>0,5</b>	4,31	8,45	4,81	8,72	4,38	9,23
<b>1,0</b>	2,29	8,26	3,11	13,13	4,93	8,99
<b>1,5</b>	2,59	14,33	4,10	7,05	4,09	10,89
<b>2,0</b>	4,22	8,33	3,73	7,55	4,44	11,05
<b>2,5</b>	4,56	13,79	4,81	12,52	3,79	7,04
	<b>C19:0</b>		<b>C21:0</b>		<b>C23:0</b>	
<b>0,2</b>	4,34	13,33	3,69	12,10	3,84	12,92
<b>0,5</b>	3,87	10,55	2,94	8,00	3,43	11,80
<b>1,0</b>	5,92	4,95	4,75	10,60	5,96	13,81
<b>1,5</b>	2,43	8,12	2,62	11,01	2,54	4,79
<b>2,0</b>	5,02	5,69	5,34	6,81	4,99	12,43
<b>2,5</b>	3,74	10,46	3,89	5,92	3,80	12,85
	<b>C24:0</b>		<b>C25:0</b>		<b>C26:0</b>	
<b>0,2</b>	5,70	15,96	4,28	10,55	8,86	15,03
<b>0,5</b>	3,99	4,92	3,42	12,10	5,60	10,87
<b>1,0</b>	5,67	9,49	4,39	7,39	7,94	12,71
<b>1,5</b>	2,64	10,19	2,67	12,99	5,16	9,92
<b>2,0</b>	4,03	8,76	4,25	12,35	5,53	7,06
<b>2,5</b>	3,73	6,63	3,58	6,60	5,90	10,04

**Tabelle 2** Präzision in der Serie und zwischen den Serien der untersuchten freien Fettsäuren

## **B Methodenentwicklung der Ceramidklassenauftrennung (Kapitel 4.4.1)**

Eine Auftrennung der Ceramidklassen mittels HPTLC wäre möglich gewesen, ist allerdings mit einem großen Lösungsmiteleinsetz und einem anschließenden ungenauen „Abkratzen“ der einzelnen Bereiche auf den Silicagelplatten verbunden. Ein anschließendes Herauslösen und filtern der Ceramide aus dem Silicagel könnte ebenfalls zu Verlusten führen. Die Abbildung 1 zeigt den Versuch Ceramide mittels HPTLC aufzutrennen. Auf den beiden Bahnen rechts (ST) sind die Standards klar und deutlich zu erkennen. Die vier linken Bahnen zeigen unterschiedliche Auftragsmengen einer Hautprobe, bei 20 µl erreicht die Silicaplatte ihre Kapazität. Nur schwach sind hier die einzelnen Ceramidspezies zu erkennen. Neben der unzureichenden Sensitivität der Methode muss beachtet werden, dass die Banden in der Abbildung 1 bereits verascht sind. Ein „Abkratzen“ müsste bereits davor geschehen, um das Silicagel für weitere Analysen nutzen zu können. Ohne sichtbare Banden der einzelnen Ceramidklassen ist dieses jedoch nur schwer möglich.



**Abbildung 1** Auftrennung einer Hautprobe mittels AMD- HPTLC Verfahren nach Farwanah *et al.* [33] Von links nach rechts sind jeweils 1, 5, 10 oder 20 µl derselben Hautprobe aufgetragen worden. Die beiden rechten Bahnen beinhalten die beschrifteten Ceramidstandards.

Eine Normalphasen HPLC Methode dagegen ist perfekt geeignet um einzelne Ceramidklassen nach ihrer Polarität zu trennen, jedoch ohne eine anschließende APCI- MS für die Detektion. Das Verdampfen der aggressiven Lösungsmittel Chloroform und Eisessig bei 400 °C in der APCI würde zu

einer intensiven Geruchsbelastung sowie zur Verunreinigung des Ofens durch Rückstände der Lösungsmittel im Ofen führen.

Versuche mit verschiedenen HPLC- Methoden aus der Literatur schlugen wegen unzureichender Sensitivität oder Selektivität fehl. Hier ein Überblick über zwei bisher veröffentlichte und angewendete Methoden zur Ceramidklassenauftrennung.

<b>Masukawa <i>et al.</i> [80] und Masukawa <i>et al.</i> [81]</b>			<b>Smeden <i>et al.</i> [120]</b>		
<b>Säule:</b> Intersil SIL 100 A3 1,5mm i.d. x 150m			<b>Säule:</b> PVA- Sil (PVA- bonded column; 5µm particle size 100 x 2,1 mm i.d.) YMC		
<b>Mobile Phase A:</b> n-Hexan: 2-Propanol: Ameisensäure (95:5:0,1)			<b>Mobile Phase A:</b> Heptan		
<b>Mobile Phase B:</b> n-Hexan: -2-Propanol: 50 mM Ammoniumformiat, wässrige Lösung (25:65:10)			<b>Mobile Phase B:</b> Heptan: Isopropylalkohol: Ethanol (2:1:1)		
<b>Flussrate:</b> 0,1 ml/min			<b>Flussrate:</b> 0,8 ml/min		
<b>Gradient (min):</b>			<b>Gradient (min):</b>		
0-3	A: 100-90 %	B: 0-10 %	0-2,5	A: 93 %	B: 7 %
3-35	A: 90-0 %	B: 10-100 %	2,5- 2,55	A: 90 %	B: 10 %
35-40	A: 0 %	B: 100 %	2,55- 5	A: 90 %	B: 10%
40-50	A: 0-100 %	B: 100- 0 %	5-10	A: 50 %	B: 50%
50-80	A: 100 %	B: 0 %	10- 10,5	A: 93 %	B: 7 %
			10,5- 12	A: 93 %	B: 7 %

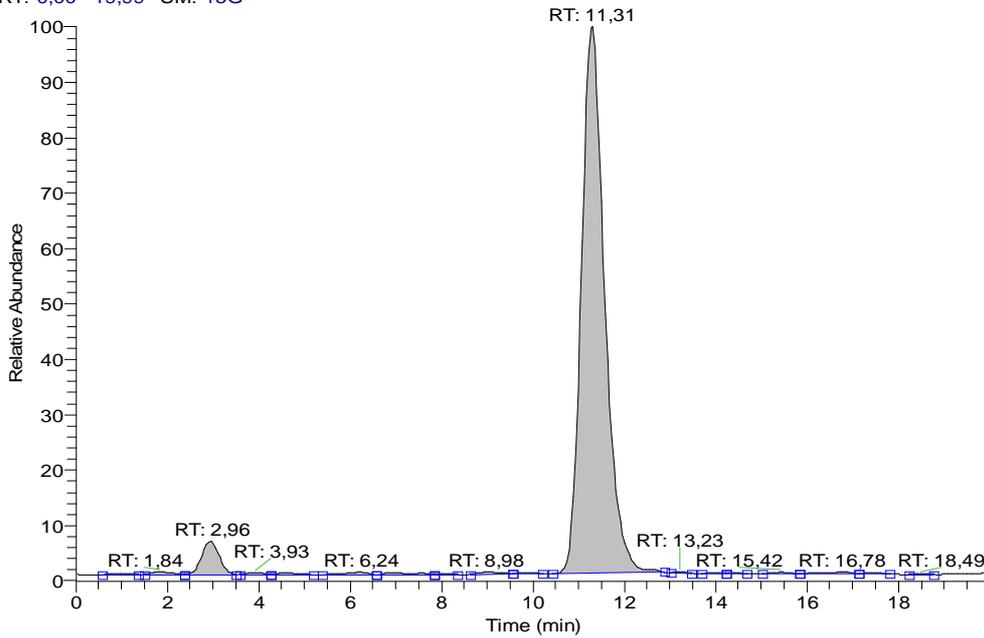
**Tabelle 3** Vergleich der beiden Literaturmethoden zur Trennung der Ceramidklassen

### C Chromatogramm (Kapitel 4.4.1)

C:\Users\...\19.0.2014\cer-np-190214-037  
1,0 ug cer-np c18+0,5 ug IS

20.02.2014 05:04:21

RT: 0,00 - 19,99 SM: 15G



NL: 8,55E6  
m/z= 100,00-1000,00 F: +  
c APCI corona SIM ms  
[236,10-238,10;  
583,60-585,60] MS ICIS  
cer-np-190214-037

Abbildung 2 Chromatogramm des Internen Standards (Carbamazepin) Rt = 2,96 sowie des deuterierten Cer [NP] Rt = 11,31

**D Richtigkeit und Präzision der HPLC- Methode (Kapitel 4.5.3)**

n=5 C <sub>Soll</sub> der [µg/ml]	QC-Proben	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
1,8	Mittelwert	2,1 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,5 ± 0,2
	VK %	19,8	19,8	16,8	0,6	15,6
2,4	Mittelwert	2,3 ± 0,1	2,2 ± 0,2	2,1 ± 0,1	2,3 ± 0,2	2,1 ± 0,1
	VK %	5,8	8,3	11,5	1,8	10,9
3,6	Mittelwert	3,4 ± 0,3	3,2 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,6 ± 0,2	3,2 ± 0,2
	VK %	6,6	11,2	14,9	1,6	12,2
4,4	Mittelwert	4,5 ± 0,3	3,8 ± 0,2	3,7 ± 0,2	4,4 ± 0,3	3,9 ± 0,3
	VK %	2,9	13,3	15	1,1	10,6

**Tabelle 4** Bestimmung der Richtigkeit der amidgebundenen Fettsäuren von Ceramid [NP]

n=5 C <sub>Soll</sub> der [µg/ml]	QC-Proben	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
1,8	Mittelwert	2,2 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,8 ± 0,1
	VK %	4,8	2,7	3,8	13,7	3,5
2,4	Mittelwert	2,3 ± 0,1	3,9 ± 0,2	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,4 ± 0,2
	VK %	5,6	4,8	2,8	6,3	8,9
3,6	MW	3,4 ± 0,3	3,2 ± 0,2	3,0 ± 0,2	3,2 ± 0,2	3,6 ± 0,2
	VK %	7,9	5,3	5,3	5,5	5,7
4,4	Mittelwert	4,5 ± 0,2	3,8 ± 0,2	3,7 ± 0,2	3,9 ± 0,3	4,4 ± 0,3
	VK %	4,6	4,5	5,4	7,8	6,4

**Tabelle 5** Bestimmung der Präzision in der Serie der amidgebundenen Fettsäuren von Ceramid [NP]

## Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die am Entstehen dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Reinhard Neubert ganz herzlich für die exzellente Betreuung, sein großes Interesse an der Arbeit und für die ständige Gesprächsbereitschaft sowie wertvollen Ratschläge.

Herrn Prof. Dr. med. Johannes Wohlrab danke ich für die Beratung und Unterstützung bei der statistischen Auswertung sowie der Durchführung der Extraktions- und Penetrationsstudien an der Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie, der Martin- Luther- Universität Halle-Wittenberg, außerdem für die Übernahme der Begutachtung der Dissertation.

Gedankt sei auch allen Arbeitsgruppen, die zur Charakterisierung der Mikroemulsionen sowie der Durchführung der gaschromatographischen Untersuchungen und der statischen Auswertung der umfangreichen Ergebnisse beigetragen haben - vom Institut für Physik Herrn Dr. Klaus Schröter, vom Institut für Chemie Herrn Dr. Karsten Busse, vom Institut für Pharmazie, Abteilung Aufarbeitung technischer Produkte Herrn Martin Wolfram sowie einen ganz herzlichen Dank an Herrn Alexander Gabel vom Institut für Informatik.

Ein besonderer Dank gilt Ann-Kristin Förster und Rene Heppner, welche mir mit Rat und Tat stets zur Seite standen und denen die aufmunternden und konstruktiven Worte nie ausgingen.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Biopharmazie für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Atmosphäre. Frau Manuela Woigk danke ich für die wunderbare und kompetente Unterstützung bei analytischen Fragestellungen.

Einen besonderen Dank richte ich an meine Familie und Freunde, insbesondere an meine Eltern und Großeltern und an dich, Patrick. Ohne eure Unterstützung, Verständnis und Geduld wäre Vieles nicht möglich gewesen.

## Veröffentlichungen

*Sophie Steinbach, Johannes Wohlrab, Reinhard H.H. Neubert*

Development and optimization of analytical method for quantification of stratum corneum lipids by GC-MS and FID techniques;

*7<sup>th</sup> Polish- German Symposium on Pharmaceutical Sciences "Interdisciplinary Research Pharmacy", Gdańsk, Poland; May 2013 (Poster)*

*Sophie Steinbach, Alexander Gabel, Ivo Grosse, Johannes Wohlrab, Reinhard H.H. Neubert*

Quantification of odd numbered free fatty acids in young and elderly human stratum corneum samples;

*14<sup>th</sup> International Conference on Perspectives in Percutaneous Penetration, La Grande- Motte, France; April 2014 (Poster)*

*Sophie Steinbach, Alexander Gabel, Ivo Grosse, Johannes Wohlrab, Reinhard H.H. Neubert*

Effects of Ageing and Diabetes in the free fatty acid composition of human stratum corneum; *Skin Forum - 14<sup>th</sup> annual meeting – Percutaneous penetration – measurement, modulation and modeling, Prague, Czech Republic; September 2014 (Poster und Vortrag)*

*Sophie Steinbach, Christian Schmelzer, Alexander Gabel, Ivo Grosse, Reinhard H.H. Neubert, Johannes Wohlrab*

Differences in the amid bound fatty acid profiles of ceramide [NP] among young, elderly and diabetic probands; *Gordon Research Conference—Barrier function of Mammalian Skin— measurement, Waterville Valley Resort; USA; August 2015 (Poster)*

*Johannes Wohlrab, Reinhard Neubert, Sophie Steinbach, Konrad Hilpert*

Charakterisierung der Barrierefunktionalität des Stratum corneums im Alter;

*Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 1610-0379/2016/14 (Suppl. 1) 1-22 (Poster)*

*Reinhard H.H. Neubert, Olena Bayrak, Sophie Steinbach, Stefan Sonnenberger, Bodo Dobner (2016)*

Development of Analytical Methods for the Detection and Quantification of a novel Dimeric ceramide in stratum Corneum and other Layers of the Skin

*Chromatographia 79.23-24: 1615-1624; (Artikel erschienen am 04. November 2016)*

*Johannes Wohlrab, Alexander Gabel, Martin Wolfram, Ivo Grosse, Reinhard H.H. Neubert, Ulrich Knie,*

*Sophie C. Steinbach (2016) Age- and diabetes related changes in the free fatty acid composition of the human stratum corneum (Artikel eingereicht bei British Journal of Dermatology)*

*Sophie Steinbach, Rocco Triani, Liv Bennedsen, Alexander Gabel, Olaf Haeusler, Johannes Wohlrab,*

*Reinhard H.H. Neubert (2017) Retarder action of isosorbide in a microemulsion for a targeted delivery of ceramide NP into the stratum corneum (Artikel akzeptiert am 10. März 2017 bei Die Pharmazie)*

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Sophie Cathrin Steinbach  
Geburtsdatum: 10.06.1989  
Geburtsort: Freiberg  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: verheiratet

### Schulische Ausbildung

1999 -2007 Bernhard-von-Cotta Gymnasium, Brand- Erbisdorf

### Berufliche Ausbildung

Okt 2007 -Sept 2011 Studium der Pharmazie, Martin- Luther- Universität Halle- Wittenberg, Halle (Saale)  
Aug 2009 1. Staatsexamen  
Sept 2011 2. Staatsexamen  
Nov 2011 -April 2012 Pharmaziepraktikum bei der Apogepha Arzneimittel GmbH, Abteilung Qualitätssicherung, Dresden  
Mai 2012 -Okt 2012 Pharmaziepraktikum bei der Stadt- Apotheke, Dresden  
Nov 2012 3. Staatsexamen  
Dez 2012 Erteilung der Approbation als Apothekerin  
Dez 2012 -Sept 2015 Apothekerin in der Apotheke im E- Center, Halle (Saale)  
Dez 2012 -Jan 2013 wissenschaftliche Mitarbeiterin der Skinomics GmbH, Halle (Saale)  
Feb 2013 -Sept 2015 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Universität Halle- Wittenberg, Halle (Saale)  
Okt 2015 – Sept 2016 Apothekerin in der Qualitätskontrolle bei Dr. Kade pharmazeutische Fabrik GmbH, Konstanz  
seit Feb 2017 Leiterin der Qualitätskontrolle bei Dr. Kade pharmazeutische Fabrik GmbH, Konstanz

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Die vorliegende Dissertationsschrift habe ich keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und mich zu keinem früheren Zeitpunkt um den Doktorgrad beworben.

Meersburg,

Sophie Cathrin Steinbach