

**Poröses Silica als Wirkstoffträger
in filmbildenden Dermatika
mit retardierter Wirkstoffabgabe
zur Therapie des chronischen Pruritus**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Rouven Emanuel Heck

aus Pforzheim

Tübingen

2017

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	31.08.2017
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Rolf Daniels
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Martin A. Wahl

Teile dieser Arbeit wurden bereits als Publikationen oder Tagungsbeiträge veröffentlicht:

Publikationen:

Rouven Heck, Milica Lukic, Snezana Savic, Rolf Daniels, Dominique J. Lunter (2017):

Ex vivo skin permeation and penetration of nonivamide from and in vivo skin tolerability of film-forming formulations containing porous silica. Eur J Pharm Sci, 2017, 106: 34-40.

Rouven Heck, Sabrina Hermann, Dominique Lunter, Rolf Daniels (2016):

Film-forming formulations containing porous silica for the sustained delivery of actives to the skin, Eur J Pharm Biopharm, 2016, 108: 1-8.

Tagungsvortrag:

Rouven Heck, Dominique Lunter, Rolf Daniels (2015):

Comparison of drug permeation from film-forming formulation and conventional semisolid formulations, 4th Galenus Workshop on "Drug Delivery to Human Skin", DE-Saarbrücken.

Tagungsbeiträge:

Rouven Heck, Milica Lukic, Snezana Savic, Rolf Daniels, Dominique Lunter (2017):

Film-forming formulations with sustained penetration of an antipruritic drug into the skin, Jahrestagung der Gesellschaft für Dermopharmazie (GD), DE-München.

Rouven Heck, Dominique Lunter, Rolf Daniels (2016):

Film-forming formulations with sustained skin penetration of an antipruritic drug, DPHG Annual Meeting, DE-München.

Rouven Heck Dominique Lunter, Tanja Ilic, Ivana Pantelic, Vladimir Dobricic, Snezana Savic, Rolf Daniels (2016):

Ex vivo penetration of nonivamide from film-forming formulations with sustained release into porcine skin, 10th PBP World Meeting, UK-Glasgow.

Rouven Heck, Dominique Lunter, Rolf Daniels (2016):

Ex vivo penetration of nonivamide from film-forming formulations with sustained release into porcine skin, DPHG International PhD Students/Postdocs Meeting, DE-Aachen.

Rouven Heck, Dominique Lunter, Rolf Daniels (2014):

Film-forming systems with sustained release for the treatment of chronic skin diseases, Skin Forum 14th Annual meeting, CZ-Prag.

Rouven Heck, Dominique Lunter, Rolf Daniels (2013):

Penetration of [²H]₃-nonivamide into the skin studied by confocal Raman microscopy, DPHG Annual Meeting, DE-Freiburg.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS..... I

ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... VI

TABELLENVERZEICHNIS XII

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS XIX

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG..... 1

2 ALLGEMEINE GRUNDLAGEN..... 6

**2.1 EMULSIONEN, HALBFESTE ZUBEREITUNGEN UND FILMBILDENDE SYSTEME ZUR
DERMALEN ANWENDUNG 6**

2.1.1 EMULSIONEN..... 6

2.1.2 STABILISIERUNG VON EMULSIONEN OHNE KLASSISCHE EMULGATOREN 9

2.1.3 MESOPORÖSES SILICA ALS TRÄGER VON FLÜSSIGKEITEN ZUR AUSBILDUNG
LIQUISOLIDER SYSTEME 10

2.1.4 ANWENDUNG VON RETARDPOLYMEREN ZUR BEEINFLUSSUNG DER
WIRKSTOFFFREIGABE 11

2.1.5 FILMBILDENDE SYSTEME ZUR DERMALEN ANWENDUNG..... 13

2.1.6 HALBFESTE ZUBEREITUNGEN ZUR DERMALEN ANWENDUNG 15

2.1.7 CAPSAICINOIDE UND NONIVAMID 17

2.2 DIE HAUT ALS APPLIKATIONSORT FÜR ARZNEISTOFFE 19

2.2.1 MORPHOLOGIE DER HAUT 19

2.2.2 SCHÄDIGUNG DER NATÜRLICHEN HAUTBARRIERE 23

2.2.3 ABSORPTION TOPISCH APPLIZIERTER ARZNEISTOFFE 24

2.2.4 EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE PERKUTANE ABSORPTION VON ARZNEISTOFFEN 26

2.2.5 MARKER FÜR DIE BESTIMMUNG DER HAUTVERTRÄGLICHKEIT 29

2.3	IN VITRO FREISETZUNGSUNTERSUCHUNGEN UND EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR PERKUTANEN ARZNEISTOFFABSORPTION	31
2.3.1	IN VITRO MODELLE ZUR UNTERSUCHUNG DER DERMATO-PHARMAKOKINETIK	32
2.3.2	ARZNEISTOFFABGABE AUS DERMALEN ZUBEREITUNGEN	35
2.3.3	IN VITRO FREISETZUNGSUNTERSUCHUNGEN	37
2.3.4	VERGLEICH VON HUMANHAUT UND POSTAURIKULARER SCHWEINEHAUT	38
2.3.5	EX VIVO PERMEATIONS- UND PENETRATIONSUNTERSUCHUNGEN.....	39
2.3.6	KONFOKALE RAMAN-MIKROSKOPIE ZUR UNTERSUCHUNG DER PENETRATION VON ARZNEISTOFFEN.....	41
3	<u>MATERIALIEN UND METHODEN</u>	43
3.1	VERWENDETE MATERIALIEN UND GERÄTE	43
3.1.1	CHEMIKALIEN, HILFSSTOFFE UND VERBRAUCHSMATERIAL.....	43
3.1.2	GERÄTE	47
3.1.3	SOFTWARE	51
3.2	METHODEN	52
3.2.1	BESTIMMUNG DER SÄTTIGUNGSLÖSLICHKEIT VON NONIVAMID IN VERSCHIEDENEN ÖLEN.....	52
3.2.2	DICHTEBESTIMMUNG VERSCHIEDENER ÖLE.....	52
3.2.3	CHARAKTERISIERUNG DER VERWENDETEN SILICA-TYPEN	53
3.2.4	HERSTELLUNG DER NONIVAMID-STAMMLÖSUNG.....	54
3.2.5	HERSTELLUNG DES ÖLBELADENEN PULVERS.....	54
3.2.6	AUSWAHL KOMPATIBLER POLYMERE ZUR VERLÄNGERTEN WIRKSTOFFFREISETZUNG	55
3.2.7	HERSTELLUNG DER FILMBILDENDEN FORMULIERUNGEN	56
3.2.8	HERSTELLUNG FREIER FILME	59
3.2.9	CHARAKTERISIERUNG DER MECHANISCHEN EIGENSCHAFTEN DER FILME.....	60
3.2.10	PRÜFUNG DER LAGERSTABILITÄT	66
3.2.11	HERSTELLUNG DER SCHNELLFREISETZENDEN REFERENZFORMULIERUNGEN	67

3.2.12	HAUTPRÄPARATION	68
3.2.13	AKZEPTORMEDIEN FÜR DIE DURCHFÜHRUNG VON FREISETZUNGS-, PERMEATIONS- UND PENETRATIONSUNTERSUCHUNGEN	70
3.2.14	VORBEREITUNG DER FREISETZUNGS-, PERMEATIONS- UND PENETRATIONSUNTERSUCHUNGEN MIT MODIFIZIERTEN FRANZ-DIFFUSIONSZELLEN	71
3.2.15	IN VITRO FREISETZUNGSSTUDIEN	72
3.2.16	UNTERSUCHUNG DER DERMATO-PHARMAKOKINETIK	74
3.2.17	IN VIVO HAUTVERTRÄGLICHKEITSSTUDIEN	86
3.2.18	DARSTELLUNG VON [D ₁₇]-NONIVAMID	87
3.2.19	EX VIVO PENETRATIONSUNTERSUCHUNGEN MIT [D ₁₇]-NONIVAMID	90
3.2.20	ANALYTISCHE METHODEN	91
3.2.21	ANALYTISCHE METHODEN ZUR [D ₁₇]-NONIVAMID-SYNTHESE	94
3.2.22	HISTOLOGISCHE METHODEN (HÄMATOXYLIN-EOSIN FÄRBUNG)	95
3.2.23	STATISTISCHE METHODEN	96
4	<u>ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</u>	97
4.1	FORMULIERUNGSENTWICKLUNG.....	97
4.1.1	SÄTTIGUNGSLÖSLICHKEIT VON NONIVAMID IN VERSCHIEDENEN ÖLEN	97
4.1.2	CHARAKTERISIERUNG VON KIESELGELEN	98
4.1.3	AUSWAHL KOMPATIBLER POLYMERE ZUR VERLÄNGERTEN WIRKSTOFFFREISETZUNG ..	101
4.2	CHARAKTERISIERUNG DER FILME AUS FILMBILDENDEN FORMULIERUNGEN.....	106
4.2.1	MAKROSKOPISCHE BEURTEILUNG DER FILME	106
4.2.2	MECHANISCHE EIGENSCHAFTEN.....	109
4.2.3	LAGERSTABILITÄT	118
4.3	IN VITRO FREISETZUNGSUNTERSUCHUNGEN	121
4.4	UNTERSUCHUNG DER DERMATO-PHARMAKOKINETIK	125
4.4.1	EX VIVO PERMEATIONSUNTERSUCHUNGEN	126
4.4.2	EX VIVO PENETRATIONSUNTERSUCHUNGEN	142

4.4.3	IN VIVO PENETRATIONSUNTERSUCHUNGEN	164
4.5	IN VIVO HAUTVERTRÄGLICHKEITSTUDIEN	166
4.6	DARSTELLUNG VON [D₁₇]-NONIVAMID.....	168
4.6.1	DARSTELLUNG VON [D ₁₇]-NONANSÄURE.....	168
4.6.2	DARSTELLUNG VON [D ₁₇]-NONIVAMID.....	169
4.7	UNTERSUCHUNG DER ARZNEISTOFFABSORPTION VON [D₁₇]-NONIVAMID	170
4.7.1	VERGLEICH DER EINZELSPEKTREN VON [D ₁₇]-NONIVAMID, [D ₃]-NONIVAMID, NONIVAMID UND DES SPEKTRUMS DER HAUTOBERFLÄCHE VON SCHWEINEHAUT	170
4.7.2	RAMANMIKROSKOPISCHE TIEFENSCANS ZUR UNTERSUCHUNG DER ARZNEISTOFF- ABSORPTION VON [D ₁₇]-NONIVAMID	173
5	<u>ABSCHLUSSDISKUSSION</u>	<u>176</u>
5.1	MESOPORÖSES SILICA ODER RETARDPOLYMER: WAS BEWIRKT DIE KONTROLLIERTE WIRKSTOFFABGABE AUS DER FILMBILDENDEN FORMULIERUNG?.....	178
5.2	BEURTEILUNG DER SUBSTANTIVITÄT FILMBILDENDER FORMULIERUNGEN.....	181
5.3	GEEIGNETES DOSIERUNGSINTERVALL DER FILMBILDENDEN FORMULIERUNG	183
5.4	VERBESSERUNG DER THERAPIETREUE DES PATIENTEN DURCH EINE REDUKTION DER APPLIKATIONSFREQUENZ	186
5.5	EX VIVO/IN VIVO-KORRELATION UND LIMITIERUNG DER AUSSAGEKRAFT VON EX VIVO-PERMEATIONS- UND PENETRATIONSUNTERSUCHUNGEN	187
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	<u>189</u>
7	<u>SUMMARY</u>	<u>194</u>
8	<u>ANHANG.....</u>	<u>197</u>
8.1	DICHTEBESTIMMUNG	197
8.2	VERTEILUNGSKOEFFIZIENT VON NONIVAMID.....	197
8.3	SÄTTIGUNGSLÖSLICHKEIT VON NONIVAMID IN AKZEPTORMEDIEN.....	197
8.4	KALIBRIERUNGSDATEN.....	198

8.4.1	NONIVAMID GELÖST IN METHANOL.....	198
8.4.2	NONIVAMID GELÖST IN PBE	202
8.4.3	NONIVAMID GELÖST IN ACETONITRIL.....	203
8.5	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	206
8.5.1	SÄTTIGUNGSLÖSLICHKEIT VON NONIVAMID IN VERSCHIEDENEN ÖLEN	206
8.5.2	ÖLABSORPTIONSKAPAZITÄT VON KIESELGELEN	207
8.5.3	NOMINELLE BRUCHDEHNUNG	208
8.5.4	ADHÄSIONSKRAFT	209
8.5.5	WASSERFESTIGKEIT	209
8.5.6	IN VITRO FREISETZUNGSUNTERSUCHUNGEN	212
8.5.7	UNTERSUCHUNG DER ARZNEISTOFFABSORPTION	213
8.5.8	IN VIVO HAUTVERTRÄGLICHKEITSSTUDIEN.....	226
8.5.9	DISKUSSION DER KONTROLLIERTEN WIRKSTOFFFREISETZUNG	239
9	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>240</u>

LEBENS LAUFFEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

DANKSAGUNGFEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1-1: Chemische Struktur von Eudragit® RS. Die Anordnung der einzelnen Monomere ist dabei statistisch verteilt ($x=0,1$, $y=2$, $z=1$).....	11
Abbildung 2.1-2: Struktur der amphiphilen Creme und ihr Verhalten nach Zugabe der Öl- oder Wasserphase, modifiziert nach Junginger (1992).	16
Abbildung 2.1-3: Chemische Struktur von Capsaicin (1) und Nonivamid (2).	17
Abbildung 2.2-1: Struktur des Stratum corneum, modifiziert nach Proksch et al. (2008).	21
Abbildung 2.2-2: Schematische Darstellung möglicher Permeationswege durch das Stratum corneum; modifiziert nach Hadgraft & Lane (2011)	24
Abbildung 2.3-1: Aufbau der in dieser Arbeit eingesetzten modifizierten Franz-Diffusionszelle aus Lunter (2012).....	32
Abbildung 3.2-1: Instrumentierung des Labormischer-Behälters.....	55
Abbildung 3.2-2: Schematischer Aufbau des Filmziehergerätes; modifiziert nach Grützmann (2005).....	59
Abbildung 3.2-3: Kraft-Zeitverlauf eines Experiments zur Bestimmung der Adhäsionskraft; $n=5$	63
Abbildung 3.2-4: Syntheschema von [D ₁₇]-Nonivamid.....	87
Abbildung 4.1-1: Sättigungslöslichkeit von Nonivamid in verschiedenen Ölen; $n=1-3$; arithmetischer Mittelwert \pm SD; $p=0,05$	97
Abbildung 4.1-2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Syloid® 244 FP (links) und Syloid® XDP 3050 (rechts).	99
Abbildung 4.1-3: Ölabsorptionskapazität von Syloid® 244 FP für verschiedene Öle, $n=5$, arithmetischer Mittelwert \pm SD, $p=0,05$	100
Abbildung 4.1-4: Licht- und ramanmikroskopische Aufnahmen getrockneter Mischungen aus öbeladenem Silica mit verschiedenen Polymerdispersionen; Farbcode der ramanmikroskopischen Falschfarbenbilder: ■ raffiniertes Rizinusöl, ■ Silica, ■ Retardpolymer	103
Abbildung 4.2-1: Makroskopische Aufnahme eines Films, der aus einer Formulierung gewonnen wurde, die mit Polysorbat 80 stabilisiertes Eudragit® NE als filmbildendes Polymer enthält.	106

Abbildung 4.2-2: Makroskopische Aufnahme verschiedener Filme, die aus Formulierungen mit Eudragit® RS entstanden sind, sich aber in dem verwendeten Kieselgel (FP oder XDP) und der Herstellungsweise (Kugelmühle (KM) oder SpeedMixer™(SM)) unterscheiden (Heck et al., 2016). 107

Abbildung 4.2-3: Knetartige Masse, die bei einem zu hohen Anteil an ölbeladenem Pulver entsteht..... 108

Abbildung 4.2-4: Dehnbarkeit freier Filme aus filmbildenden Formulierungen mit Eudragit® RS als filmbildenden Polymer und Syloid® 244 FP (dunkelgrau) oder Syloid® XDP 3050 (hellgrau) als Trägersubstanz; n=3-5; arithmetischer Mittelwert ± SD; p=0,05, Student-Newman-Keuls-Test. 110

Abbildung 4.2-5: Einfluss der Lagerungsbedingungen von freien Filmen aus filmbildenden Formulierungen auf deren Dehnbarkeit - modifiziert nach Kemmer (2015), n=5; arithmetischer Mittelwert ± SD. 112

Abbildung 4.2-6: Adhäsionskraft von Filmen verschiedener filmbildender Formulierungen; n=5; arithmetischer Mittelwert ± SD; p=0,05; ANOVA. 114

Abbildung 4.2-7: Freigesetzter Anteil an Nonivamid nach 80-minütiger Inkubation in Wasser bei 32 °C; n=3; Arithmetischer Mittelwert ± SD; p=0,05; t-Test..... 115

Abbildung 4.2-8: Freigesetzter Anteil in Bezug auf die im Verteilungsgleichgewicht in die Wasserphase theoretisch maximal übergehende Menge nach 80-minütiger Inkubation in Wasser bei 32 °C; n=3; Arithmetischer Mittelwert ± SD; p=0,05, t-Test. 117

Abbildung 4.2-9: Imagescans getrockneter Filme von filmbildenden Formulierungen, die Syloid® 244 FP enthalten (FF FP KM); links: Film, der direkt nach der Herstellung erstellt wurde; rechts: Film, der nach einer Lagerzeit von 6 Monaten erstellt wurde; Farbcode der ramanmikroskopischen Falschfarbenbilder: ■ raffiniertes Rizinusöl, ■ Silica, ■ Retardpolymer, (Heck et al., 2016). 118

Abbildung 4.2-10: Imagescans getrockneter Filme von filmbildenden Formulierungen, die Syloid® XDP 3050 enthalten (FF XDP SM); links: Film, der direkt nach der Herstellung erstellt wurde; rechts: Film, der nach einer Lagerzeit von 6 Monaten erstellt wurde; Farbcode der ramanmikroskopischen Falschfarbenbilder: ■ raffiniertes Rizinusöl, ■ Silica, ■ Retardpolymer, (Heck et al., 2016). 119

Abbildung 4.3-1: Vergleich der in vitro Freisetzung von Nonivamid aus unterschiedlich konzentrierten filmbildenden Formulierungen (▲ FF 0,9 % und □ FF 0,09 %) aufgetragen gegen die Zeit; n=4-5; Arithmetischer Mittelwert ± SD..... 122

Abbildung 4.3-2: Vergleich der in vitro Freisetzung von Nonivamid aus unterschiedlich konzentrierten filmbildenden Formulierungen (▲ FF 0,9 % und □ FF 0,09 %) aufgetragen gegen die Wurzel der Zeit; n=4-5; Arithmetischer Mittelwert ± SD..... 123

Abbildung 4.4-1: Vergleich der ex vivo Permeation von Nonivamid aus ■ HNC 0,9 %, □ HNC 0,1 % und einer filmbildenden Formulierung mit 0,9 % Nonivamid (▲ FF 0,9 %) aufgetragen gegen die Wurzel der Zeit; Akzeptormedium: 50 VT Phosphatpuffer pH 7,4+ 50 VT Ethanol; n=5; Arithmetischer Mittelwert ± SD. 128

Abbildung 4.4-2: Vergleich der ex vivo Permeation von Nonivamid aus ■ HNC 0,9 %, □ HNC 0,1 % und einer filmbildenden Formulierung mit 0,9 % Nonivamid (▲ FF 0,9 %) aufgetragen gegen die Wurzel der Zeit; Akzeptormedium: 4%ige Lösung von bovinem Serumalbumin in isotonem Phosphatpuffer pH 7,4; n=5; Arithmetischer Mittelwert ± SD; modifiziert nach Heck et al. (2016). 130

Abbildung 4.4-3: Vergleich der ex vivo Permeation von Nonivamid aus ■ HNC 0,05 %, □ HNC 0,025 % und einer filmbildenden Formulierung mit 0,9 % Nonivamid (▲ FF 0,9 %) aufgetragen gegen die Wurzel der Zeit; Akzeptormedium: 4%ige Lösung von bovinem Serumalbumin in isotonem Phosphatpuffer pH 7,4; n=3-5; Arithmetischer Mittelwert ± SD; modifiziert nach Heck et al. (2017). 132

Abbildung 4.4-4: Vergleich der ex vivo Permeation von Nonivamid aus verschiedenen konzentrierten filmbildenden Formulierungen ▲ FF 0,99 %, ▲ FF 0,90 % und Δ FF 0,81 % aufgetragen gegen die Wurzel der Zeit; Akzeptormedium: 4%ige Lösung von bovinem Serumalbumin in isotonem Phosphatpuffer pH 7,4; n=5; Arithmetischer Mittelwert ± SD..... 133

Abbildung 4.4-5: Vergleich der ex vivo Permeation von Nonivamid aus ■ HNC 0,05 %, □ HNC 0,025 % und einer für zwei Monate gelagerten filmbildenden Formulierung mit 0,9 % Nonivamid (▲ FF 0,9 % gel.) aufgetragen gegen die Wurzel der Zeit; Akzeptormedium: 4%ige Lösung von bovinem Serumalbumin in isotonem Phosphatpuffer pH 7,4; n=5; Arithmetischer Mittelwert ± SD; modifiziert nach Heck et al. (2017)..... 135

Abbildung 4.4-6: Äquivalenzprüfung der Permeationsraten von Nonivamid aus verschiedenen konzentrierten HNCs in Bezug auf FF 0,9 %; n=5; Median ± Konfidenzintervall des Medians. 137

Abbildung 4.4-7: Äquivalenzprüfung der Permeationskoeffizienten von Nonivamid aus verschiedenen konzentrierten HNCs in Bezug auf FF 0,9 %; n=5; Median \pm Konfidenzintervall des Medians. 138

Abbildung 4.4-8: Äquivalenzprüfung der Permeationsraten von Nonivamid aus einer frisch hergestellten und einer gelagerten filmbildenden Formulierung in Bezug auf HNC 0,05 %; n=5; Median \pm Konfidenzintervall des Medians. 139

Abbildung 4.4-9: Vergleich der ex vivo Permeation von Nonivamid aus ■ HNC 0,05 %, □ HNC 0,025 % und einer filmbildenden Formulierung mit 0,9 % Nonivamid (▲ FF 0,9 %) aufgetragen gegen die Wurzel der Zeit; finite Dosierung (normiert auf 2 mg/cm²); Akzeptormedium: 4%ige Lösung von bovinem Serumalbumin in isotonem Phosphatpuffer pH 7,4; n=5; Arithmetischer Mittelwert \pm SD. 140

Abbildung 4.4-10: Menge an Nonivamid pro Fläche, die aus verschiedenen Zubereitungen in das SC penetriert ist, gegen die Eindringtiefe in die Haut; ▲ FF 0,90 %, ▲ FF 0,09 %, ■ HNC 0,05 %; n=3; Arithmetischer Mittelwert \pm SD..... 143

Abbildung 4.4-11: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Längsschnitts durch postaurikuläre Schweinehaut (Färbung mit Hämatoxylin-Eosin). 145

Abbildung 4.4-12: Lichtmikroskopische Aufnahmen von longitudinalen Hautschnitten eines Schweineohrs, die histologisch mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt wurden, und welchen Hautschichten sie zugeordnet werden. Die Nummerierung der Schnitte erfolgt aufsteigend beginnend von der Oberseite der Haut. 146

Abbildung 4.4-13: Lichtmikroskopische Aufnahmen eines transversalen Schnitts durch die Haut eines Schweineohrs, bei denen die Zellen unbehandelt und histologisch mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt analysiert werden..... 148

Abbildung 4.4-14: Lichtmikroskopische Aufnahmen von longitudinalen Hautschnitten des Schweineohrs, die histologisch mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt wurden, und welchen Hautschichten sie zugeordnet werden. Die Nummerierung der Schnitte erfolgt aufsteigend beginnend von der Oberseite mit Cyanoacrylat-Klebstoff biopsierter Haut. 149

Abbildung 4.4-15: Penetrierte Menge an Nonivamid in den verschiedenen Hautschichten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit aus einer filmbildenden Formulierung (FF 0,90 %) und HNC 0,05 %; finite Dosierung (normiert auf 2 mg/cm²); n=3; Arithmetischer Mittelwert + SD..... 150

Abbildung 4.4-16: Penetrierte Menge an Nonivamid in den verschiedenen Hautschichten in Abhängigkeit zur Inkubationszeit aus einer filmbildenden Formulierung (FF 0,90 %) und HNC 0,05 %; finite Dosierung (normiert auf 2 mg/cm²); n=3; Arithmetischer Mittelwert + SD..... 152

Abbildung 4.4-17: Vergrößerte Ansicht der penetrierten Menge an Nonivamid in den verschiedenen Hautschichten in Abhängigkeit zur Inkubationszeit aus einer filmbildenden Formulierung (FF 0,90 %) und HNC 0,05 %; finite Dosierung (normiert auf 2 mg/cm²); n=3; Arithmetischer Mittelwert + SD..... 153

Abbildung 4.4-18: Penetrierte Menge an Nonivamid in den verschiedenen Hautschichten in Abhängigkeit zur Inkubationszeit aus einer filmbildenden Formulierung (FF 0,09 %) und HNC 0,05 %; finite Dosierung (normiert auf 2 mg/cm²); n=3; Arithmetischer Mittelwert + SD..... 154

Abbildung 4.4-19: Penetrierte Menge an Nonivamid in den verschiedenen Hautschichten in Abhängigkeit zur Inkubationszeit aus einer filmbildenden Formulierung (FF 0,90 %) und HNC 0,05 %; finite Dosierung (normiert auf 2 mg/cm²); Segmentierung der Hautschichten mittels Kombination aus Klebebandabrisstechnik, Cyanoacrylat-Biopsie und Kryo-Mikrotom; Epidermis und Dermis-Proben wurden aus analytischen Gründen aufkonzentriert; n=3; Arithmetischer Mittelwert + SD..... 157

Abbildung 4.4-20: Vergrößerte Ansicht der penetrierten Menge an Nonivamid in den verschiedenen Hautschichten in Abhängigkeit zur Inkubationszeit aus einer filmbildenden Formulierung (FF 0,90 %) und HNC 0,05 %; finite Dosierung (normiert auf 2 mg/cm²); Segmentierung der Hautschichten mittels Kombination aus Klebebandabrisstechnik, Cyanoacrylat-Biopsie und Kryo-Mikrotom; Epidermis und Dermis-Proben wurden aus analytischen Gründen aufkonzentriert; n=3; Arithmetischer Mittelwert + SD. 158

Abbildung 4.4-21: Penetrierte Menge an Nonivamid in den verschiedenen Hautschichten in Abhängigkeit zur Inkubationszeit aus einer filmbildenden Formulierung (FF 0,09 %) und HNC 0,05 %; finite Dosierung (normiert auf 2 mg/cm²); n=3; Arithmetischer Mittelwert + SD..... 159

Abbildung 4.4-22: Einfluss der verschiedenen Methoden zur Auswertung der Penetrationsuntersuchungen (Abwischen und Kryo-Mikrotom, Abwischen und Biopsie oder Abwischen, Klebebandabrisstechnik und Cyanoacrylatbiopsie) auf die prozentual penetrierte Menge an NVA in Relation zur applizierten Menge und

der Verteilung von Nonivamid in den Hautschichten bezogen auf die insgesamt penetrierte Menge aus einer filmbildenden Zubereitung (FF 0,9 %); n=3; Arithmetischer Mittelwert.....	161
Abbildung 4.4-23: Einfluss der verschiedenen Methoden zur Auswertung der Penetrationsuntersuchungen (Abwischen und Kryo-Mikrotom, Abwischen und Biopsie oder Abwischen, Klebebandabrisstechnik und Cyanoacrylatbiopsie) auf die prozentual penetrierte Menge an NVA in Relation zur applizierten Menge und der Verteilung von Nonivamid in den Hautschichten bezogen auf die insgesamt penetrierte Menge aus einer filmbildenden Zubereitung (HNC 0,05 %); n=3; Arithmetischer Mittelwert.....	162
Abbildung 4.4-24: Menge an Arzneistoff pro Fläche, die aus verschiedenen Zubereitungen in die Haut penetriert und gegen die Eindringtiefe in die Haut aufgetragen ist; ▲ FF 0,09 %, ■ HNC 0,05 %; n=1.....	164
Abbildung 4.5-1: Absolutwerte vor/nach 1 h Inkubation von SCH, EI und TEWL nach einstündiger Inkubation der Haut mit HNC 0,05 %, FF 0,09 %, FF Placebo verglichen mit einer unbehandelten Kontrolle als Marker für die Hautirritation; n=21; Arithmetischer Mittelwert + SD, p=0,05, Student-Newman-Keuls-Test.....	166
Abbildung 4.5-2: Absolute Änderung von SCH, EI und TEWL nach einstündiger Inkubation der Haut mit HNC 0,05 %, FF 0,09 %, FF Placebo verglichen mit einer unbehandelten Kontrolle als Marker für die Hautirritation; Einzelwerte (n=21) und korrespondierender arithmetischer Mittelwert (Heck et al., 2017).....	167
Abbildung 4.7-1: Vergleich der Einzelspektren von [D ₁₇]-Nonivamid und Nonivamid.	170
Abbildung 4.7-2: Vergleich der Einzelspektren von [D ₁₇]-Nonivamid und [D ₃]-Nonivamid. ...	171
Abbildung 4.7-3: Vergleich des Einzelspektrums von [D ₁₇]-Nonivamid mit der Oberfläche porciner Haut.	172
Abbildung 4.7-4: Vergleich des Spektrums der Haut nach zwölfstündiger Inkubation mit einer [D ₁₇]-NVA-Lösung in Ethanol mit dem Einzelspektrum von [D ₁₇]-Nonivamid. In der vergrößerten Aufnahme sind die Summenfilter für die jeweiligen Banden farblich hervorgehoben.	173
Abbildung 4.7-5: Tiefenprofil der Penetration von [D ₁₇]-NVA aus einer ethanolischen Lösung ([D ₁₇]-NVA/EtOH) und einer Hydrophilen Creme (HNC 0,95 % [D ₁₇]-NVA).....	174

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1-1: Zusammensetzung der Basiscreme DAC (NRF, 2010a).....	15
Tabelle 3.1-1: Chemikalien und Hilfsstoffe.....	43
Tabelle 3.1-2: Verbrauchsmaterial.....	45
Tabelle 3.1-3: Geräte.....	47
Tabelle 3.1-4: Software.....	51
Tabelle 3.2-1: Zusammensetzungen der Formulierungen zur Untersuchung der Kompatibilität des ölbeladenen Silicas mit verschiedenen Polymerdispersionen	55
Tabelle 3.2-2: Zusammensetzung der weichgemachten Polymerdispersionen und der entsprechende Anteil an Weichmacher bezogen auf die Lackrockensubstanz.	56
Tabelle 3.2-3: Zusammensetzung der wirkstofffreien filmbildenden Formulierungen (FF), die in der Kugelmühle (KM) hergestellt wurden.....	57
Tabelle 3.2-4: Zusammensetzung der wirkstofffreien filmbildenden Formulierungen (FF), die im SpeedMixer™ (SM) hergestellt wurden	58
Tabelle 3.2-5: Zusammensetzung der wirkstoffhaltigen filmbildenden Formulierungen (FF), die im SpeedMixer™ (SM) hergestellt wurden	58
Tabelle 3.2-6: Programm zur Bestimmung der Adhäsionskraft	62
Tabelle 3.2-7: Zusammensetzung der verschiedenen Hydrophilen Nonivamid Cremes [%]	67
Tabelle 3.2-8: Fließmittelzusammensetzung und Fließmittelgradient.....	94
Tabelle 4.1-1: Literaturdaten (Gupta et al., 2012; W. R. Grace & Co. Corporation, 2014) der verwendeten Silica.....	98
Tabelle 4.1-2: Ölabsorptionskapazität verschiedener Silica für raffiniertes Rizinusöl, n=5, arithmetischer Mittelwert \pm SD.	100
Tabelle 4.3-1: Freisetzungsrates (Q), normierte Freisetzungsrates (Q normalisiert) und lag-Phase der untersuchten Formulierungen; n=4-5; Arithmetischer Mittelwert \pm SD..	124
Tabelle 4.4-1: Vergleich der Permeationsraten und der Permeationskoeffizienten von Nonivamid aus einer filmbildenden Formulierung und aus derer von HNCs mit verschiedenen NVA-Konzentrationen; Akzeptormedium: 50 VT Phosphatpuffer	

pH 7,4+ 50 VT Ethanol; n=5; Arithmetischer Mittelwert \pm SD, p=0,05, Student-Newman-Keuls-Test.	128
Tabelle 4.4-2: Vergleich der Permeationsraten und der Permeationskoeffizienten von Nonivamid aus einer filmbildenden Formulierung und aus derer von HNCs mit verschiedenen NVA-Konzentrationen; Akzeptormedium: 4%ige Lösung von bovinem Serumalbumin in isotonem Phosphatpuffer pH 7,4; n=5; Arithmetischer Mittelwert \pm SD; p=0,05, Student-Newman-Keuls-Test; modifiziert nach Heck et al. (2016).	130
Tabelle 4.4-3: Vergleich der normierten Permeationsraten von Nonivamid für Untersuchungen mit unterschiedlichem Akzeptormedium.	131
Tabelle 4.4-4: Vergleich der Permeationsraten und der Permeationskoeffizienten von Nonivamid aus einer filmbildenden Formulierung und aus derer von HNCs mit verschiedenen NVA-Konzentrationen; Akzeptormedium: 4%ige Lösung von bovinem Serumalbumin in isotonem Phosphatpuffer pH 7,4; n=5; Arithmetischer Mittelwert \pm SD; p=0,05, Student-Newman-Keuls-Test; modifiziert nach Heck et al. (2017).	132
Tabelle 4.4-5: Vergleich der Permeationsraten und der Permeationskoeffizienten von Nonivamid aus verschiedenen konzentrierten filmbildenden Formulierungen; Akzeptormedium: 4%ige Lösung von bovinem Serumalbumin in isotonem Phosphatpuffer pH 7,4; n=5; Arithmetischer Mittelwert \pm SD; p=0,05, Student-Newman-Keuls-Test.	134
Tabelle 4.4-6: Vergleich der Permeationsraten und der Permeationskoeffizienten und der lag-Phase von Nonivamid aus einer filmbildenden Formulierung und aus derer von HNCs mit verschiedenen NVA-Konzentrationen; Akzeptormedium: 4%ige Lösung von bovinem Serumalbumin in isotonem Phosphatpuffer pH 7,4; n=5; Arithmetischer Mittelwert \pm SD; p=0,05, Student-Newman-Keuls-Test; modifiziert nach Heck et al. (2017).	135
Tabelle 4.4-7: Insgesamt in das SC penetrierte Menge/Fläche an Nonivamid aus verschiedenen Zubereitungen; n=3; Arithmetischer Mittelwert \pm SD.	144
Tabelle 4.4-8: Insgesamt in das SC penetrierte Menge/Fläche an Nonivamid aus verschiedenen Zubereitungen; n=1.	165
Tabelle 5.1-1: Freigesetzter Anteil an Nonivamid aus ölbeladenem Pulver bzw. dem Film einer filmbildenden Formulierung nach 80-minütiger Inkubation in Wasser; n=3; Arithmetischer Mittelwert \pm SD.	179

Tabelle 8.1-1: Dichte verschiedener Öle.....	197
Tabelle 8.2-1: Berechnung des Verteilungskoeffizienten von Nonivamid zwischen Rizinusöl und Wasser.	197
Tabelle 8.3-1: Sättigungslöslichkeit von Nonivamid in Akzeptormedien; n=3; Arithmetischer Mittelwert \pm SD.....	197
Tabelle 8.4-1: Daten der Kalibrierung für Nonivamid 0,01-0,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Injektionsvolumen: 120 μL (Peakfläche).....	198
Tabelle 8.4-2: Daten der Kalibrierung für Nonivamid 0,01-0,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Injektionsvolumen: 200 μL (Peakfläche).....	198
Tabelle 8.4-3: Daten der Kalibrierung für Nonivamid 0,1-1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Injektionsvolumen: 120 μL (Peakfläche).....	199
Tabelle 8.4-4: Daten der Kalibrierung für Nonivamid 0,1-1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Injektionsvolumen: 200 μL (Peakfläche).....	199
Tabelle 8.4-5: Daten der Kalibrierung für Nonivamid 0,85-8,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Peakfläche).....	200
Tabelle 8.4-6: Daten der Kalibrierung für Nonivamid 1,0-10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Peakfläche).....	200
Tabelle 8.4-7: Daten der Kalibrierung für Nonivamid 1,0-10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Peakfläche).....	201
Tabelle 8.4-8: Kalibrierung für Nonivamid 10,0-100,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Peakfläche).	201
Tabelle 8.4-9: Kalibrierung für Nonivamid 85,0-850,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Peakfläche).	202
Tabelle 8.4-10: Kalibrierung für Nonivamid 1,0-10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Peakfläche).	202
Tabelle 8.4-11: Kalibrierung für Nonivamid 10,0-100,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Peakfläche).	203
Tabelle 8.4-12: Kalibrierung für Nonivamid 0,04-1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Peakfläche).	203
Tabelle 8.4-13: Kalibrierung für Nonivamid 0,1-1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Peakfläche).	204
Tabelle 8.4-14: Kalibrierung für Nonivamid 1,0-10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Peakfläche).	204
Tabelle 8.4-15: Kalibrierung für Nonivamid 6,0-75,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Peakfläche).	205
Tabelle 8.4-16: Kalibrierung für Nonivamid 10,0-100,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Peakfläche).	205
Tabelle 8.5-1: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Sättigungslöslichkeit).	206
Tabelle 8.5-2: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Ölabsorptionskapazität).	207

Tabelle 8.5-3: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Nominelle Bruchdehnung).....	208
Tabelle 8.5-4: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse (Adhäsionskraft).....	209
Tabelle 8.5-5: Zusammenfassung des t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Wasserfestigkeit, FF22,5).....	209
Tabelle 8.5-6: Zusammenfassung des t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Wasserfestigkeit, FF25,0).....	210
Tabelle 8.5-7: Zusammenfassung des t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Wasserfestigkeit, FF27,5).....	210
Tabelle 8.5-8: Zusammenfassung des t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Wasserfestigkeit, VK, FF22,5).	210
Tabelle 8.5-9: Zusammenfassung des t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Wasserfestigkeit, VK, FF25,0).	211
Tabelle 8.5-10: Zusammenfassung des t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Wasserfestigkeit, VK, FF27,5).	211
Tabelle 8.5-11: Zusammenfassung des t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Freisetzungsraten, FF 0,9 %).	212
Tabelle 8.5-12: Zusammenfassung des t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Freisetzungsraten, FF 0,09 %).....	212
Tabelle 8.5-13: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Permeationsrate HNC 0,9 %, HNC 0,1 %, FF 0,9 %; PBE-Medium).	213
Tabelle 8.5-14: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Permeationskoeffizient HNC 0,9 %, HNC 0,1 %, FF 0,9 %; PBE-Medium).....	214
Tabelle 8.5-15: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Permeationsrate HNC 0,9 %, HNC 0,1 %, FF 0,9 %; BSA/PBS-Medium).	215
Tabelle 8.5-16: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Permeationskoeffizient HNC 0,9 %, HNC 0,1 %, FF 0,9 %; BSA/PBS-Medium).....	216

Tabelle 8.5-17: Zusammenfassung des t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen: Vergleich der Permeation von Nonivamid aus HNC 0,9 % bei Verwendung verschiedener Akzeptormedien.....	217
Tabelle 8.5-18: Zusammenfassung des t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen: Vergleich der Permeation von Nonivamid aus HNC 0,1 % bei Verwendung verschiedener Akzeptormedien.....	217
Tabelle 8.5-19: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse (Permeationsrate HNC 0,05 %; FF 0,9 %; HNC 0,025 %; BSA/PBS-Medium).....	218
Tabelle 8.5-20: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Permeationskoeffizient HNC 0,05 %, FF 0,9 %, HNC 0,025 %; BSA/PBS-Medium).....	219
Tabelle 8.5-21: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Permeationsrate FF 0,81 %; FF 0,9 %; FF 0,91 %; BSA/PBS-Medium).	220
Tabelle 8.5-22: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Permeationskoeffizient FF 0,81 %, FF 0,90 %, FF 0,99 %; BSA/PBS-Medium).....	221
Tabelle 8.5-23: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Permeationsrate HNC 0,05 %; FF 0,9 % gel.; HNC 0,025 %; BSA/PBS-Medium).....	222
Tabelle 8.5-24: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Permeationskoeffizient HNC 0,05 %; FF 0,9 % gel.; HNC 0,025 %; BSA/PBS-Medium).....	223
Tabelle 8.5-25: Äquivalenzprüfung der Permeationsraten (Referenz: FF 0,9 %) in Anlehnung an die SUPAC-SS (FDA, 2004).....	224
Tabelle 8.5-26: Äquivalenzprüfung der Permeationskoeffizienten (Referenz: FF 0,9 %) in Anlehnung an die SUPAC-SS (FDA, 2004).....	224
Tabelle 8.5-27: Äquivalenzprüfung der Permeationsraten (Referenz: HNC 0,05 %) in Anlehnung an die SUPAC-SS (FDA, 2004).....	224
Tabelle 8.5-28: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests.	225

Tabelle 8.5-29: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung der SCH zu Beginn der Studie und nach einstündiger Applikation von HNC 0,05 %.....	226
Tabelle 8.5-30: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung der SCH zu Beginn der Studie und nach einstündiger Applikation von FF 0,09 %.....	226
Tabelle 8.5-31: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung der SCH zu Beginn der Studie und nach einstündiger Applikation von FF Placebo.	227
Tabelle 8.5-32: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung der SCH (Kontrolle).....	227
Tabelle 8.5-33: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der SCH (Basalwerte).	228
Tabelle 8.5-34: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests der SCH (Werte nach einstündiger Inkubation).	229
Tabelle 8.5-35: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests der SCH (Absolute Änderung im Vergleich zu den Basalwerten).....	230
Tabelle 8.5-36: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung des EI zu Beginn der Studie und nach einstündiger Applikation von HNC 0,05 %.....	231
Tabelle 8.5-37: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung des EI zu Beginn der Studie und nach einstündiger Applikation von FF 0,09 %.....	231
Tabelle 8.5-38: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung des EI zu Beginn der Studie und nach einstündiger Applikation von FF Placebo.	232
Tabelle 8.5-39: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung des EI (Kontrolle).....	232
Tabelle 8.5-40: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse des EI (Basalwerte).	233

Tabelle 8.5-41: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse des EI (Werte nach einständiger Inkubation).....233

Tabelle 8.5-42: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse des EI (Absolute Änderung im Vergleich zu den Basalwerten).234

Tabelle 8.5-43: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung des TEWL zu Beginn der Studie und nach einständiger Applikation von HNC 0,05 %.....235

Tabelle 8.5-44: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung des TEWL zu Beginn der Studie und nach einständiger Applikation von FF 0,09 %.....235

Tabelle 8.5-45: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung des TEWL zu Beginn der Studie und nach einständiger Applikation von FF Placebo.236

Tabelle 8.5-46: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung des TEWL zu Beginn der Studie (Kontrolle).236

Tabelle 8.5-47: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse des TEWL (Basalwerte).237

Tabelle 8.5-48: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse des TEWL (Werte nach einständiger Inkubation).....237

Tabelle 8.5-49: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse des TEWL (Absolute Änderung im Vergleich zu den Basalwerten).....238

Tabelle 8.5-50: Auswertung des t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen..239

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	KM	Kugelmühle
A	Fläche	Kp	Permeationskoeffizient
AT-IR	Abgeschwächte Totalreflexion-IR	kV	Kilovolt
BSA	Bovines Serumalbumin	L	Liter
ca.	circa	LC	Flüssigchromatographie
CDCl ₃	Deuteriertes Chloroform	m	Multiplett (NMR)
CLSM	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	mA	Milliampere
cm	Zentimeter	max.	maximal
d	Ablesegenauigkeit	MHz	Megahertz
d	Duplett (NMR)	min	Minute
D ₂ O	Deuteriumoxid	mL	Milliliter
DAAD	Deutscher Akademischer Austauschdienst	mm	Millimeter
DAD	Diodenarray	mmol	Millimol
DC	Dünnschichtchromatographie	mol	Mol
DCMS	Dynamisch-kombinatorische Massenspektrometrie	MS	Massenspektrometrie
dd	Doppelduplett (NMR)	MW	Molekulargewicht
DMSO	Dimethylsulfoxid	N	Newton
DNS	Desoxyribonukleinsäure	n. p.	Nicht penetriert
E	Grenzflächenenergie	n. s.	Nicht signifikant
EI	Erythemindex	Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
eq	Molares Äquivalent	NaOD	Natriumdeuteroxid
ESI	Elektronspray-Ionisation	NaOH	Natriumhydroxid
FF	Filmbildende Formulierung	ng	Nanogramm
gel.	gelagert	nm	Nanometer
h	Stunde	NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
HCl	Salzsäure	NVA	Nonivamid
HLB	Hydrophilic-lipophilic balance	∅	Durchmesser
HNC	Hydrophile Nonivamid Creme	p	Signifikanzwert
HPLC	Hochleistungs- flüssigkeitschromatographie	PBE	Phosphatpuffer/Ethanol-Mischung
Hz	Hertz	PBS	Isotoner Phosphatpuffer pH 7,4
IR	Infrarotspektroskopie	Ph.Eur.	Europäisches Arzneibuch
J	Kopplungskonstante (NMR)	Pt/C	Platin auf Kohlenstoff (Katalysator)
J	Permeationsrate	Q	Freisetzungsrage
k.A.	Keine Angabe	RO	Reverse Osmose
KHSO ₄	Kaliumhydrogensulfat	s	Sekunden
		s	Singulett (NMR)
		SC	Stratum corneum
		SCH	Hydratation des Stratum corneum

Abkürzungsverzeichnis

SD	Standardabweichung	UV	Ultraviolettstrahlung
SM	SpeedMixer™	V	Volt
SRM	Selected Reaction Monitoring	V	Volumen
t	Triplett (NMR)	VIS	Visuelles Spektrum
t	Zeit	VK	Verteilungskoeffizient
TEWL	Transepidermaler Wasserverlust	VT	Volumenteile
TMS	Tetramethylsilan	w	Massenanteil
	Transienter Rezeptor Potential	δ	Chemische Verschiebung (NMR)
TRPV1	Kationenkanal der Unterfamilie V, Subtyp 1	γ	Grenzflächenspannung
		μL	Mikroliter

1 Einleitung und Zielsetzung

Chronischer Juckreiz ist ein weitverbreitetes Symptom verschiedener Hauterkrankungen. Klinisch spricht man von chronischem Pruritus, wenn der Juckreiz länger als sechs Wochen andauert (Ständer et al., 2007). Häufig ist Juckreiz mit Hauterkrankungen wie atopischer Dermatitis oder Psoriasis assoziiert. Tatsächlich leidet laut in Deutschland durchgeführten Studien etwa jeder sechste Mensch an chronischem Juckreiz (Matterne et al., 2011; Ständer et al., 2010). In einer über einen Zeitraum von elf Jahren angelegten Studie konnte gezeigt werden, dass jährlich durchschnittlich ca. 7 Millionen Menschen in den USA wegen Juckreiz ambulante Hilfe aufsuchen, was ungefähr 1 % aller ambulant betreuten Fälle entspricht (Shive et al., 2013). Bedenkt man, dass ein Großteil der an Juckreiz leidenden Patienten trotz der Symptome keinen ärztlichen Rat aufsucht (Matterne et al., 2011; Ständer et al., 2010), liegt die Dunkelziffer der betroffenen Personen vermutlich weit höher. Insgesamt betrachtet kann chronischer Pruritus unabhängig von Alter, Geschlecht, Ethnie und dem medizinischen Allgemeinzustand auftreten (Weisshaar & Dalgard, 2009). Auch aufgrund von Komorbiditäten und der mit dem Alter trockeneren Haut, die Juckreiz hervorrufen und verstärken können, ist die wachsende Gruppe der älteren Menschen häufig von chronischem Pruritus betroffen (Grundmann & Ständer, 2011; Ständer et al., 2010; Yalcin et al., 2006). Chronischer Juckreiz kann die Lebensqualität des Patienten enorm verschlechtern, indem er die Psyche (Stumpf et al., 2015), die Schlafqualität (Lavery et al., 2016), den Alltag und die Sexualfunktion negativ beeinflusst (Yosipovitch et al., 2000). Des Weiteren haftet einer sich ständig kratzenden Person das Stigma von Unreinheit an. Dies führt bei manchen Patienten dazu, dass sie den Kontakt zu anderen Menschen meiden, und kann in sozialer Ausgrenzung resultieren (O'Donnell et al., 1997). Weiterhin kann es durch das ständige Kratzen zu sekundären Läsionen wie Prurigo nodularis oder Lichen simplex kommen, die den Juckreiz zusätzlich verstärken (Zeidler et al., 2016). Die Herausforderung für eine effiziente Juckreiztherapie ist also, den Circulus vitiosus von Juckreiz und Kratzen zu durchbrechen (Ständer et al., 2010; Zeidler et al., 2016) und somit den Leidensdruck der Patienten spürbar zu mindern.

Die Haut, das größte Organ des Menschen, schützt diesen insbesondere durch das Stratum corneum vor Austrocknung und dem Eindringen von Mikroorganismen und Xenobiotika. Sie stellt aufgrund ihrer einzigartigen Struktur eine äußerst effektive Barriere dar (Hwa et al., 2011; Proksch et al., 2008; Rawlings & Harding, 2004). Zudem verfügt sie neben ihrer Schutzfunktion auch über sensorische Neurone, die im Falle des chronischen Pruritus wiederkehrende Reize aussenden und somit den Wunsch oder den Reflex des Kratzens hervorrufen. In den letzten Jahren hat sich das Verständnis von Juckreiz und Kratzen deutlich erweitert. Demnach kommt neben vielen anderen Rezeptoren dem Transienten Rezeptor Potential Kationenkanal der

Unterfamilie V, Subtyp 1 (TRPV1) eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion zu (Bautista et al., 2014).

Konventionell wird der Juckreiz mit Antihistaminika und lokal wirksamen Anästhetika behandelt. Als Mittel der Wahl zur Behandlung der sekundären Läsionen des Pruritus nodularis gelten Corticosteroide und Pimecrolimus (Zeidler & Ständer, 2014). Oftmals sind die First-Line-Therapien des chronischen Juckreizes und des Pruritus nodularis allerdings unzureichend oder erbringen nicht den erwünschten Effekt. In diesen Fällen stellen topisch applizierte Capsaicinoide, die vor allem in der Schmerztherapie eingesetzt werden, eine Alternative dar (Ellis et al., 1993; Ständer et al., 2012; 2001; Staubach & Metz, 2013). Obwohl Capsaicinoide direkt nach der Applikation Schmerzen und Juckreiz auslösen können, bewirkt eine langfristige, topische Administration eine effektive Linderung der Symptome. Für die Wirkung der Capsaicinoide ist vor allem TRPV1 verantwortlich. Dieser nicht-selektive Kationenkanal ist in der Haut an den peripheren Enden der A δ - und C-Nervenfasern der lebenden Schichten der Epidermis lokalisiert (Ikoma et al., 2006). Eine Bindung von Capsaicinoiden an TRPV1 resultiert in der Freisetzung von Substanz P, des Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) und anderen vasodilatativen Substanzen, welche neuronale Entzündungen und Ödeme induzieren können (Fang et al., 1999; 1996; Ständer et al., 2001). Wird die Applikation von Capsaicinoiden in bestimmten Zeitabständen wiederholt und somit kontinuierlich Arzneistoff am Wirkort zur Verfügung gestellt, führt der persistierende Einstrom von Kationen (hauptsächlich Ca²⁺) zu einer intrazellularen Überladung, die in einer Defunktionalisierung der nozizeptiven Neurone resultiert. Dies bewirkt eine langfristig anhaltende Linderung der Schmerzen und des Juckreizes (Anand & Bley, 2011). Indem der Stimulus für das Kratzen eliminiert wird, wird die physiologische Belastung reduziert und den Hautläsionen die Möglichkeit zur Heilung gegeben. Deshalb stellen Capsaicinoide eine geeignete Arzneistoffklasse zur Therapie chronischer Hauterkrankungen, die mit pruriginöser Symptomatik einhergehen, dar. Das synthetische Capsaicin-Analogon Nonivamid ist chemisch definiert und in aufgereinigter Form verfügbar. Für die Entwicklung einer neuen wirkstoffhaltigen Formulierung ist dies ein Vorteil. Auf dieser Grundlage wird Nonivamid als Modellarzneistoff in dieser Arbeit eingesetzt.

Trotz der guten Wirksamkeit von Capsaicinoiden findet sich zurzeit kein Arzneimittel auf dem Markt, das für die Therapie des chronischen Pruritus indiziert ist, obwohl mit einer Nicoboxil/Nonivamid-haltigen Creme (Finalgon® Wärmecreme stark, Boehringer Ingelheim AG & Co. KG, DE-Ingelheim) bereits eine Zubereitung mit Nonivamid für die verstärkte Durchblutung zur Therapie von Muskel- und/oder Gelenkschmerzen zugelassen ist. Der Rückgang der Schmerzintensität acht Stunden nach der ersten Applikation ist dabei

hauptsächlich auf Nonivamid zurückzuführen (Gaubitz et al., 2016). Als weitere Alternative sind halb feste Capsaicinoid-haltige Magistralrezepturen für die Therapie von Schmerzen und Pruritus verfügbar, die individuell hergestellt werden müssen (NRF, 2010b). Um einen unbeabsichtigten Kontakt mit dem reizenden Wirkstoff zu vermeiden, muss die Applikation sehr achtsam erfolgen. Vorteilhaft ist, dass Cremes eine individuelle Applikation auf den betroffenen Stellen ermöglichen. Ein großer Nachteil dieser Zubereitungen ist allerdings die notwendigerweise hohe Applikationsfrequenz, da die Cremes für eine anhaltende Wirkung mehrmals täglich aufgebracht werden müssen. Ein hochfrequentes Dosierungsintervall erfordert vom Patienten eine besonders hohe Therapietreue und stellt ihn im Alltag vor einige Herausforderungen. Eine unzureichende Therapietreue kann nicht nur zu einem Wirkverlust führen, sondern eine vergessene oder zu spät applizierte Dosis kann sogar die Schmerz- und Juckreizsymptome erneut auslösen. Studien, die schnellfreisetzende Capsaicinoid-Zubereitungen untersucht haben, zeigen ein Wiederaufflammen dieser Symptome nach diskontinuierlicher oder nur sporadischer Applikation, die durch eine Reakkumulation der Neuropeptide verursacht wird (Ständer et al., 2001). Der Einsatz schnellfreisetzender Formulierungen wird also sowohl durch eine hohe Applikationsfrequenz, die für eine wirksame Therapie erforderlich ist, als auch durch das Wiederauftreten von Juckreiz und Schmerzen bei einer unzureichenden oder inkorrekten Applikation limitiert. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit der Entwicklung von sicheren und einfach zu handhabenden Formulierungen. Eine Formulierung, die den Wirkstoff langanhaltend, kontinuierlich freisetzt und eine geringere Applikationsfrequenz ermöglicht, könnte für die Patienten eine große Erleichterung in der Handhabung (Convenience) bedeuten und die Therapietreue (Adhärenz) und somit die Wirksamkeit der Therapie deutlich verbessern.

Eine verlängerte Wirkstofffreisetzung kann durch die Verwendung einer adhäsiven Formulierung mit verlängerter Kontaktzeit zur Haut realisiert werden. Die zurzeit verfügbaren Formulierungskonzepte für eine verlängerte Wirkstofffreisetzung mit Capsaicinoiden basieren auf adhäsiven Pflastern (z.B. ABC[®] Wärmepflaster, Beiersdorf AG, DE-Hamburg). Das hochkonzentrierte, achtprozentige Capsaicin-Pflaster Qutenza[®] (Astellas Pharma GmbH, DE-München) wird erfolgreich in der Behandlung neuropathischer Schmerzen eingesetzt. Pflaster erfüllen die Anforderungen an eine verlängerte Kontaktzeit mit der Haut, jedoch limitiert die Größe des Pflasters den Bereich, der behandelt werden kann. Eine individuelle Anpassung der Pflastergröße ist kritisch zu bewerten. Für die heutzutage nur noch selten angewendeten Membranpflaster mit Wirkstoffreservoir kann ein Zerschneiden des Pflasters zu einer ungewollten, schlagartigen Freisetzung des Wirkstoffs führen, weshalb eine Reduktion der Applikationsfläche ausdrücklich zu vermeiden ist (Arvanitis & Satonik, 2002). Auch das Zurechtschneiden der weit verbreiteten Matrixpflaster auf die gewünschte Größe ist

kritisch zu betrachten, da es die Adhäsion oder die Arzneistoffabsorption beeinflussen kann (Durand et al., 2012; Zuppa et al., 2004). Deshalb raten die meisten pharmazeutischen Unternehmer davon ab, Matrixpflaster zu zerschneiden (Durand et al., 2012). In den meisten Fällen sind für die zugelassenen Pflaster keine Studien zur Therapiesicherheit von solch manipulierten Pflastern durchgeführt worden. Neue patch-non-patch™ Systeme lösen das Problem der unzureichenden Adhäsivität von zurechtgeschnittenen Pflastern, indem die Pflaster im trockenen Zustand nicht adhäsiv sind. So können sie vor der Applikation auf die geeignete Größe angepasst werden. Erst durch die Applikation auf angefeuchteter Haut werden diese bioadhäsiv (Padula et al., 2003; Padula et al., 2007). Aufgrund der Wasserlöslichkeit stellt sich jedoch die Frage nach einer ausreichenden Substantivität, um eine lang anhaltende Verfügbarkeit des Wirkstoffs auf der Haut sicherzustellen. Soll statt besonders kleinflächiger Stellen ein großflächiger Bereich behandelt werden, kann eine simultane Applikation mehrerer Pflaster erfolgen (Derry et al., 2013). Pflaster, sind allerdings im Normalfall okklusiv, was bei einem großflächig bedeckten Hautbereich zu einem unangenehmen Hautgefühl, aber auch zu Hautirritationen führen kann (Paudel et al., 2010). Eine weitere Limitierung von Pflastern stellt die Applikation an Stellen der Haut dar, die wiederholt gedehnt werden (z.B. in der Armbeuge). In diesen Fällen würde ein Pflaster nicht auf der Haut verbleiben, eine kontinuierliche Absorption des Arzneistoffs wäre also nicht möglich. Des Weiteren ist bei der Applikation von Pflastern, die hochkonzentriertes Capsaicin enthalten, wie z.B. Qutenza® (Astellas Pharma GmbH, DE-München), eine Vorbehandlung mit Lokalanästhetika unter Durchführung durch medizinisches Fachpersonal erforderlich, um eine unerwünschte Schmerzreaktion bedingt durch eine initiale schnelle Arzneistoffpenetration in die Haut zu vermeiden (Anand & Bley, 2011). Patienten, die an chronischem Pruritus leiden, nennen neben einer gesicherten Diagnose als wichtigste Bedürfnisse eine einfache und wirksame Therapie, mit der sie schnell vertraut sind, sowie eine geringere Abhängigkeit von ärztlicher und klinischer Betreuung (Steinke et al., 2016).

Das Ziel dieser Arbeit besteht deshalb darin, die Vorteile von halbfesten Zubereitungen und topisch angewendeten Pflastern zu vereinen und eine Formulierung mit verlängerter Wirkstofffreisetzung zu entwickeln, die die Behandlung individueller Bereiche der Haut ermöglicht sowie dabei den Kontakt während des gewünschten Applikationszeitraums aufrechterhält.

Bereits in früheren Arbeiten entwickelte filmbildende Emulsionen zur dermalen Anwendung zeigen vorteilhafte mechanische Eigenschaften und eine verlängerte Wirkstoffpermeation. Jedoch benötigen diese Emulsionen aus Gründen der physikalischen Stabilität den Zusatz von Emulgatoren (Lunter, 2012; Lunter & Daniels, 2012, 2013). Da pruriginöse Haut oft besonders

empfindlich und irritiert ist, konzentriert sich diese Arbeit vor allem darauf, möglichst wenige und vor allem hautverträgliche Substanzen einzusetzen. Insbesondere der Einsatz von Emulgatoren, die die Hautbarriere negativ beeinflussen können, soll vermieden werden. Statt einer klassischen Öl-in-Wasser-Emulsion soll ein physikalisch stabiles System zweier nicht miteinander mischbaren Phasen durch die Verwendung von mesoporösem Silica als Träger der Arzneistofflösung erhalten werden. Außer der physikalischen Stabilität soll die entwickelte Zubereitung eine ausreichende Substantivität aufweisen, um eine kontinuierliche Freigabe des Arzneistoffs an die Haut über einen verlängerten Anwendungszeitraum zu ermöglichen. Hierfür sind insbesondere Charakteristika wie die Adhäsion, Dehnbarkeit und Wasserfestigkeit der Formulierung entscheidend. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit soll darauf gelegt werden, die verlängerte Verfügbarkeit des Arzneistoffs an seinem eigentlichen Wirkort, der Epidermis, zu belegen. Hierfür soll die Wirkstoffabsorption experimentell erfasst und mit der Absorption der schnellfreisetzenden Magistralrezepturen (NRF, 2010b) verglichen werden. Zuletzt soll untersucht werden, inwiefern sich der Einsatz der konfokalen Raman-Mikroskopie für den Nachweis der Absorption von Nonivamid in die Haut eignet.

Die entwickelte Formulierung soll letztlich eine wirksame Alternative zu den bisherigen Therapiemöglichkeiten darstellen und sowohl mit einem für den Patienten angenehmeren Dosierungsintervall als auch mit einer guten Hautverträglichkeit dazu beitragen, dass die Wirksamkeit der Therapie des chronischen Pruritus mit Capsaicinoiden verbessert werden kann.

2 Allgemeine Grundlagen

2.1 Emulsionen, halbfeste Zubereitungen und filmbildende Systeme zur dermalen Anwendung

2.1.1 Emulsionen

Emulsionen sind nach der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) als disperse Systeme aus zwei nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten oder Flüssigkristallen definiert, wobei die disperse Phase in der kontinuierlichen Phase als Tröpfchen ($d = 1-100 \mu\text{m}$) verteilt vorliegt. Da sich die beiden Phasen in ihrer Polarität unterscheiden, können sie zudem in eine hydrophile (W) und eine lipophile Phase (O) untergliedert werden. Systeme, bei denen die hydrophile Phase die kontinuierliche Phase bildet, werden als Öl-in-Wasser-Emulsionen (O/W-Emulsionen) bezeichnet. Tritt der gegenteilige Zustand ein, so wird im Allgemeinen von W/O-Emulsionen gesprochen. Auch multiple Emulsionssysteme, wie z.B. O/W/O-Emulsionen oder W/O/W-Emulsionen, sind möglich. Bei diesen Systemen sind innerhalb der dispers verteilten Tropfen nochmals kleinere Tropfen enthalten, die in ihrer Polarität der äußersten, kontinuierlichen Phase entsprechen. Diesen Emulsionstypen ist gemein, dass durch die unterschiedliche Polarität der Phasen und durch die disperse Verteilung eine hohe Grenzflächenenergie herrscht. Sie liegen deshalb in einem thermodynamisch instabilen Zustand vor (IUPAC, 1972). Die Grenzflächenenergie berechnet sich nach Gleichung 2.1-1. Sie ist dabei substanzspezifisch abhängig von den eingesetzten, nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten.

$$\Delta E = \gamma \cdot \Delta A$$

Gleichung 2.1-1: Berechnung der Grenzflächenenergie.

ΔE = Grenzflächenenergie [N·m]

γ = Grenzflächenspannung [N/m]

ΔA = Fläche [m^2]

Instabilitäten von Emulsionen können auftreten, wenn sich die einzelnen Tröpfchen der dispergierten Tropfen zu Agglomeraten vereinen, die Individualität der Tropfen jedoch zunächst erhalten bleibt. Diese Flockung wird als Aufrahmung bezeichnet, wenn die Agglomerate bedingt durch den Dichteunterschied zwischen kontinuierlicher und disperser Phase auf der Oberfläche der Emulsion aufschwimmen. Von Sedimentation wird gesprochen, wenn sich die Aggregate am Boden des Systems bilden. Um die Grenzflächenenergie möglichst gering zu halten, sind die Tropfen der dispergierten Phase bestrebt, die Grenzfläche

zu verringern und zusammenzufließen (Koaleszenz). Eine vorangegangene, reversible Flockung des Systems kann aufgrund des geringeren Abstands eine irreversible Koaleszenz beschleunigen, die im Extremfall zu einer vollständigen Phasentrennung und zum Brechen der Emulsion führen kann.

Um die thermodynamisch bedingten Instabilitätsphänomene wie Flockung und Koaleszenz zu vermeiden, empfiehlt sich der Einsatz von Emulgatoren. Diese lagern sich an der Grenzfläche der beiden nicht miteinander mischbaren Phasen an, senken bereits in niedriger Konzentration die Grenzflächenspannung und reduzieren dadurch die Grenzflächenenergie. Durch die Ausbildung eines Grenzflächenfilms sorgen sie für eine zusätzliche mechanische Barriere. Beide Faktoren verzögern die genannten Instabilitätsphänomene und führen dazu, dass die Emulsionen als metastabil betrachtet werden können. Zu den klassischen Emulgatoren zählen niedermolekulare, amphiphile Stoffe, wie z.B. Macrogol-Fettsäureester oder Polysorbate. Die Anordnung an der Grenzfläche erfolgt dabei entsprechend der Polarität der Molekülteile. Die hydrophilen Molekülteile ragen in die Wasserphase, die lipophilen Molekülteile richten sich in Richtung der Ölphase aus. Ob Emulgatoren nun die Ausbildung einer O/W- oder W/O-Emulsion begünstigen, ist abhängig davon, welcher Teil des Moleküls überwiegt. Ein Maß kann dabei der HLB-Wert (hydrophilic-lipophilic balance) des Emulgators sein, der sich laut Gleichung 2.1-2 berechnet (Griffin, 1949):

$$HLB = 20 \cdot \left(1 - \frac{MW(lipophil)}{MW(gesamt)}\right)$$

Gleichung 2.1-2: Berechnung des HLB-Werts (Griffin, 1949).

HLB = Hydrophilic-lipophilic balance

MW = Molekulargewicht

Ein hoher HLB-Wert beschreibt also die Fähigkeit, die Ausbildung von O/W-Emulsionen zu begünstigen, während Emulgatoren mit niedrigen HLB-Werten zur Stabilisierung von W/O-Emulsionen eingesetzt werden können.

Aufrahmungs- und Sedimentationsprozesse lassen sich durch das Stoke'sche Gesetz (Gleichung 2.1-3) beschreiben, das den Zusammenhang zwischen Dichte, Viskosität, Tropfengröße und Aufrahm- bzw. Sedimentationsgeschwindigkeit aufzeigt.

$$v = \frac{2r^2 g(\rho_d - \rho_k)}{9\eta}$$

Gleichung 2.1-3: Berechnung der Aufrahm-/Sedimentationsgeschwindigkeit nach Stoke.

v = Aufrahm-/Sedimentationsgeschwindigkeit [m/s]

r = Radius der Tropfen [m]

g = Erdbeschleunigung [m/s^2]

ρ_d = Dichte der dispersen Phase [kg/m^3]

ρ_k = Dichte der kontinuierlichen Phase [kg/m^3]

η = Dynamische Viskosität der kontinuierlichen Phase [$kg/(m \cdot s)$]

Daraus lässt sich ableiten, dass eine hohe Viskosität der kontinuierlichen Phase und kleine Tropfengrößen die kinetische Stabilität der Emulsionen deutlich verbessern können, was bei der Herstellung zu berücksichtigen ist. Allerdings weisen kleine Tropfen in ihrer Gesamtheit eine größere Phasengrenzfläche auf. Dies bedingt eine höhere Grenzflächenenergie (Gleichung 2.1-1), weshalb gegebenenfalls größere Emulgatormengen zur Stabilisation notwendig sind. Eine Anpassung des Dichteunterschieds der beiden Phasen durch geeignete Zusätze ist theoretisch möglich, praktisch allerdings nur begrenzt umsetzbar (Kutz et al., 2011).

Neben der kinetischen Stabilisierung von Emulsionen durch Emulgatoren können auch Zusätze notwendig sein, um die mikrobiologische Qualität der Emulsionen über den gewünschten Anwendungszeitraum aufrechtzuerhalten.

2.1.2 Stabilisierung von Emulsionen ohne klassische Emulgatoren

Klassische, amphiphile Emulgatoren zeigen oft eine schlechte physiologische Verträglichkeit (Shukuwa et al., 1997), weshalb die Stabilisierung der thermodynamisch instabilen Emulsionen ohne die Anwendung solcher Emulgatoren häufig notwendig ist, um die Anwendung auf empfindlicher Haut zu ermöglichen.

Eine Möglichkeit stellen makromolekulare Polymere dar, die sich bei ausreichend hoher Grenzflächenaktivität an der Phasengrenzfläche anlagern und einen Grenzflächenfilm bilden. Die Makromoleküle lagern sich anschließend entsprechend des train-loop-tail-Modells so um, dass nur ein Teil des Moleküls tatsächlich an der Grenzfläche liegt (train) und die lipophilen Teile in die Ölphase und die hydrophilen Teile in die wässrige Phase reichen. Je nach Position im Molekül bilden sich dadurch Schlaufen (loops) oder Endgruppen (tails), die in die Phasen hineinragen (Tadros, 2009). Dies führt zu einer sterischen Stabilisierung der Phasengrenze. Neben der Ausbildung eines stabilisierenden Films an der Grenzschicht können manche Polymeremulgatoren zusätzlich die Viskosität der wässrigen Phase im Sinne eines Hydrogelbildners erhöhen und so zusätzlich die Tendenz zur Koaleszenz vermindern. Typische Beispiele für solche stabilisierenden Polymere sind Celluloseether wie Hydroxypropylmethylcellulose (Daniels & Barta, 1994; Schulz & Daniels, 2000; Wollenweber et al., 2000) oder Polyvinylalkohole (Sakai et al., 2005).

Eine weitere Variante stellt die Verwendung von Feststoffen dar, die sich bei ausreichend hoher Feststoffkonzentration an der Phasengrenzfläche anlagern, eine dichtgepackte Schicht um die Tröpfchen bilden und so eine mechanische Barriere der beiden miteinander nicht mischbaren Phasen ermöglichen. Im Gegensatz zu den klassischen Emulgatoren reduzieren die Feststoffpartikel nicht die Grenzflächenspannung. Diese Systeme wurden bereits Anfang des 20. Jahrhunderts durch Pickering (1907) beschrieben und werden dementsprechend seither als Pickering-Emulsionen bezeichnet. Als Stoffe zur Ausbildung solcher Pickering-Emulsionen eignen sich zumeist Nanopartikel ($d < 100 \text{ nm}$) oder Submikronpartikel ($0,1 - 1 \mu\text{m}$). Silica wird häufig als stabilisierendes Agens hinzugesetzt, ist jedoch an seiner Oberfläche sehr hydrophil, weshalb ein hydrophobes Coating notwendig ist, um die partielle Benetzung von Öl und Wasser zu ermöglichen (Chevalier & Bolzinger, 2013). Wie bei klassischen Emulsionssystemen entscheidet auch hier das stabilisierende Agens darüber, welche Phasenlage die Pickering-Emulsionen zeigen. Ist der Benetzungswinkel $< 90^\circ$, werden O/W-Emulsionen erhalten, wohingegen die Bildung von W/O-Emulsionen bei einem Benetzungswinkel $> 90^\circ$ begünstigt ist (Binks, 2002).

2.1.3 Mesoporöses Silica als Träger von Flüssigkeiten zur Ausbildung liquisolider Systeme

Da sehr viele Arzneistoffe eine hohe Lipophilie aufweisen und im Wässrigen schwer löslich sind, ist ihre orale Bioverfügbarkeit oftmals sehr gering. Die Auflösung schwerlöslicher Substanzen kann durch Mikronisierung der Arzneistoffpartikel, verbesserte Benetzung (Blagden et al., 2007) oder auch lipidbasierte Darreichungsformen (Porter et al., 2007) verbessert werden. In den letzten Jahren wurde mesoporöses Silica entwickelt, das als Trägerstoff für lipophile Flüssigkeiten eingesetzt werden kann. Als mesoporöse Silica werden Partikel mit einem Porendurchmesser zwischen 2 - 50 nm bezeichnet, die sich durch ihre hohe Porosität und ihre große Oberfläche hervorragend eignen, um Flüssigkeiten zu absorbieren (Bharti et al., 2015). Mesoporöse Silica, wie z.B. Syloid® XDP 3050 oder Syloid® 244 FP entsprechen den Monographien der gängigen Arzneibücher für Silica collidalis hydrica (Ph. Eur.), Silicon Dioxide (United States Pharmacopoeia – National Formulary) und Hydrated Silicon Dioxide (Japan Pharmacopoeia). Sie zeichnen sich besonders durch ihre Eigenschaft aus, große Mengen an Ölen bezogen auf die eingesetzte Masse an Silica aufzunehmen (Gupta et al., 2012), ohne dabei ihre guten Fließeigenschaften zu verlieren (Choudhari et al., 2014). Dieses Konzept wird als liquisolid System bezeichnet (Spireas & Sadu, 1998). Die Überführung einer wirkstoffhaltigen Flüssigkeit in ein liquisolid System ist gegenüber dem Einsatz von Flüssigkeiten unter anderem im Hinblick auf Stabilität und Dosiergenauigkeit vorteilhaft. Zudem erlauben liquisolide Systeme die Weiterverarbeitung zu festen Arzneiformen wie Tabletten oder Kapseln (Choudhari et al., 2014). Dass mesoporöses Silica sich auch für die kontrollierte Wirkstofffreisetzung eignet, haben Andersson et al. aufgezeigt, indem sie die Pellets verschiedener mesoporöser Silica zunächst mit einem organisch gelösten Arzneistoff beladen, das Lösungsmittel aus dem System entfernt und anschließend die Freisetzung geprüft haben. Das Freisetzungsprofil konnte dabei als diffusionskontrollierter Prozess beschrieben werden. Als entscheidender Faktor für die kontrollierte Freisetzung wird laut dieser Studie die Porengröße des mesoporösen Silicas genannt (Andersson et al., 2004).

Der Fokus dieser Arbeit liegt nun darauf, das Potential der hohen Ölabsorptionskapazität mesoporöser Silica auf dermale Zubereitungen zu übertragen, indem die wirkstoffhaltige Ölphase an das Silica gebunden wird. Auch nach der Inkorporation einer wässrigen Phase soll dadurch ein stabiles System erhalten werden, sodass auf den Einsatz von Emulgatoren verzichtet werden kann.

2.1.4 Anwendung von Retardpolymeren zur Beeinflussung der Wirkstofffreigabe

Retardpolymere sind Polymere, die ursprünglich zur Herstellung retardiert freisetzender oraler Darreichungsformen verwendet wurden. Die Polymere können zum Beispiel als dünne Schicht auf Tabletten oder Pellets aufgetragen werden. Weitere Möglichkeiten sind, dass durch Granulierung und anschließende Tablettierung oder aber durch Extrusion Matrixformulierungen hergestellt werden (Amighi & Moes, 1996; Crowley et al., 2004). Teilweise werden Retardpolymere auch zur Herstellung matrixkontrollierter, wirkstoffhaltiger transdermaler therapeutischer Systeme verwendet. Durch den Einsatz nicht-wasserlöslicher Polymere wird die Diffusion des Arzneistoffs aus der Zubereitung verlangsamt. In diesen Pflastern liegt der Arzneistoff gelöst oder suspendiert in einer Matrix vor (Valenta & Auner, 2004). Kusum Devi et al. (2003) konnten belegen, dass Matrixpflaster, die aus einer Mischungen aus Ammoniummethacrylat-Copolymeren, Hydroxypropylmethylcellulose und Ethylcellulose hergestellt wurden, eine verlängerte Wirkstoffabgabe an die Haut über 24 Stunden ermöglichen. Auch für transdermale Pflaster, die durch Mischung von Ethylcellulose und Polyvinylpyrrolidon oder Ammoniummethacrylat Copolymer Typ A (Eudragit® RL) und Typ B (Eudragit® RS) hergestellt wurden, konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden (Mutalik et al., 2006). Nachfolgend ist das in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Retardpolymer Eudragit® RS im Detail vorgestellt.

Das im Europäischen Arzneibuch als Ammoniummethacrylat Copolymer Typ B monographierte Retardpolymer wird im Folgenden mit seinem Handelsnamen Eudragit® RS bezeichnet. Eudragit® RS ist ein Copolymer aus Trimethylammoniummethacrylat, Methacrylat und Ethylacrylat, das statistisch im Verhältnis 0,1:2:1 zusammengesetzt ist (Abbildung 2.1-1).

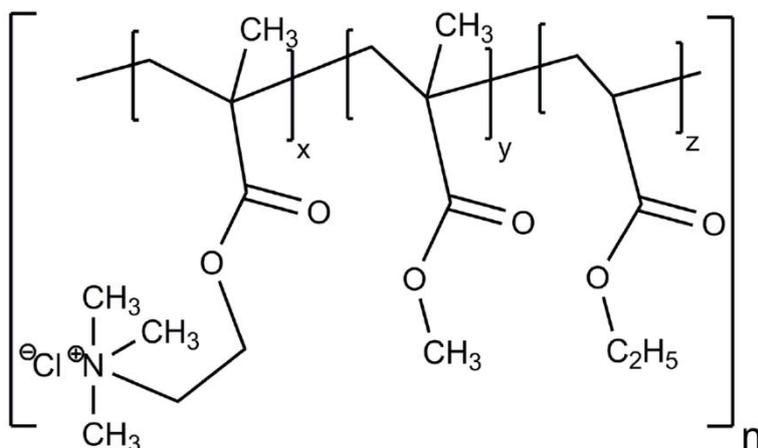


Abbildung 2.1-1: Chemische Struktur von Eudragit® RS. Die Anordnung der einzelnen Monomere ist dabei statistisch verteilt ($x=0,1$, $y=2$, $z=1$).

Die positiv geladenen Ammoniumgruppen bewirken, dass das Makromolekül zwar in Wasser quellbar, aber nicht darin löslich ist. Bei Kontakt mit Wasser wird der Arzneistoff durch die mit Wasser gefüllten Poren freigesetzt. Außerdem ist eine Diffusion des Arzneistoffs durch die Polymerstrukturen möglich. Die diffusionskontrollierte Freisetzung macht es zu einem geeigneten Hilfsstoff zur Herstellung retardierender Filmüberzüge (Gruetzmann & Wagner, 2005; Lippold & Monells Pages, 2001) oder Matrixtabletten mit verlängerter Wirkstofffreisetzung (Ibric et al., 2002). Eudragit® RS wird durch radikalische Lösungspolymerisation hergestellt und anschließend extrudiert, wodurch ein Polymergranulat (Eudragit® RS 100) erhalten wird. Dieses Granulat kann im Anschluss weiterverarbeitet werden, z.B. als organische Lösung (Eudragit® RS 12,5) oder durch Zermahlen als Eudragit® RS PO. Besonders ist, dass es auch in einer wässrigen Latexdispersion (Eudragit® RS 30D) verfügbar ist, was im Hinblick auf die Anwendung in dermalen Zubereitungen höchst interessant ist. Hierzu werden die Polymere in gereinigtem Wasser zu einer Latexdispersion mit einem Anteil von 30 % Retardpolymer dispergiert. Zur mikrobiologischen Stabilisierung ist die Dispersion mit 0,25 % Sorbinsäure konserviert und durch die Zugabe von 0,1 % NaOH auf einen pH-Bereich zwischen 5 und 6 eingestellt (Eisele & Raust, 2015). Aufgrund der hohen Glasübergangstemperatur von 69 °C ist der Zusatz von Weichmachern (10-20 % bezogen auf das trockene Polymer) notwendig, um flexible Filme auch bei niedrigeren Temperaturen, wie z.B. der Hautoberflächentemperatur, zu erhalten (Evonik, 2013).

2.1.5 Filmbildende Systeme zur dermalen Anwendung

Filmbildende Polymerlösungen zur Anwendung auf der Haut sind schon seit einigen Jahren bekannt. Sie werden im OP-Bereich präoperativ als Desinfektionsmittel (Jeng, 2001) oder als Gewebeklebstoff zum Verschließen von Schnittwunden (Donkerwolcke et al., 1998; Ritterband et al., 2005) eingesetzt. Weiterhin sind sie bei der Versorgung kleinerer Schnitt- oder Schürfwunden (Eaglstein et al., 2002) und zum Schutz der Haut bei Stomata (Campbell et al., 2000) verbreitet. Kosmetisch finden Formulierungen mit adhäsiver Wirkung vielfältig Anwendung, z.B. als Mascara und Zubereitungen zum Schutz vor UV-Strahlung. Bei diesen kosmetischen Produkten ist es von großer Wichtigkeit, dass die Formulierung über einen längeren Zeitraum auf der Haut verbleibt. Zur Adhäsion der Mascara an den Wimpern werden häufig Polyvinylpyrrolidon-Copolymere als wasserfeste, filmbildende Polymere eingesetzt. Diese Copolymere finden sich auch oftmals in Sonnenschutzcremes. Bei Dermokosmetika zum Sonnenschutz sind lipophile, organische Filtersubstanzen und/oder Mikropigmente, wie z. B. mikrofeines Titandioxid oder Zinkoxid enthalten, die möglichst lange auf der Oberfläche der Haut verbleiben sollen, um einen langanhaltenden Schutz vor UVA- und UVB-Strahlung zu erhalten (Bielfeldt et al., 2007; Sambandan & Ratner, 2011). Eine Besonderheit stellt eine neuartige adhäsive Sonnenschutz-Formulierung dar, bei der die Lichtschutzfaktoren in bioadhäsive Nanopartikel inkorporiert werden. Aufgrund der anhaltenden Haftung der bioadhäsiven Nanopartikel nach Applikation auf der Haut sorgen sie durch den Einschluss der Lichtschutzfaktoren für einen langanhaltenden Sonnenschutz und verhindern gleichzeitig die unerwünschte Penetration der Lichtschutzfaktoren in tiefere Hautschichten (Deng et al., 2015). All diesen Formulierungen ist jedoch gemein, dass eine Wirkstoffaufnahme aus der Formulierung in die Haut nicht vorgesehen ist. Nur wenige Forscher haben sich bislang mit der Herstellung filmbildender Systeme beschäftigt, die eine Absorption eines Wirkstoffs vorsehen. Misra et al. (1997; 1996) haben eine filmbildende Lösung zur dermalen Applikation von Testosteron entwickelt, dabei jedoch weder verschiedene Polymere noch die mechanischen Eigenschaften des ausgebildeten Films untersucht. Schroeder et al. (Schroeder et al., 2007b) führten erstmals ein Screening für geeignete Polymertypen zur Herstellung filmbildender Systeme durch und testeten die Filme auf mechanische Eigenschaften wie die Dehnbarkeit und den Einfluss auf den transepidermalen Wasserverlust in vivo. In einer weiteren Untersuchung konnten sie in vitro an humaner Epidermis und in vivo an Schweinehaut belegen, dass Ethinylestradiol-haltige, filmbildende Polymerlösungen eine Permeation des Wirkstoffs zeigen, die mit der eines gängigen transdermalen Pflasters in etwa vergleichbar ist (Schroeder et al., 2007a). Eine besonders erfolgreiche Weiterentwicklung einer schnell-freisetzenden Creme hin zu einer filmbildenden Lösung stellt das mittlerweile im Markt verfügbare Lamisil® Once (GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, DE-München) dar, das

eine langfristige Abgabe des Wirkstoffs Terbinafin an die Haut bei einer einmaligen Applikation erlaubt (Kienzler et al., 2007). Neben weiteren filmbildenden Polymerlösungen (Garvie-Cook et al., 2015a; 2015b) wurden auch filmbildende Gele (Maffei et al., 2003) und Cremes (Bryan & Alster, 2002) entwickelt, bei denen jedoch auf eine breitere Testung auf geeignete Filmbildner verzichtet wurde. Die von Bryan & Alster (2002) entwickelte filmbildende Creme enthält eine Mischung aus Lidocain und Tetracain. Sie hat keine verlängerte Wirkstoffabsorption zum Ziel, sondern soll als Anästhetikum zur Vorbehandlung einer kutanen Laserbehandlung dienen. Aus diesem Grund ist nur eine kurze Applikationszeit vorgesehen, nach der die Patienten den ausgebildeten Film leicht entfernen können. Eine kurze Applikationszeit sowie eine geringe Adhäsion des Films auf der Haut ist jedoch für den Einsatz filmbildender Systeme, die eine verlängerte Wirkstoffabsorption über einen längeren Zeitraum zeigen sollen, gänzlich ungeeignet. Lunter & Daniels (Lunter, 2012; Lunter & Daniels, 2012, 2013) beschrieben erstmals die Herstellung filmbildender Emulsionen zur Retardierung der dermalen Wirkstoffabsorption, bei denen sowohl ein breites Screening für geeignete filmbildende Polymere durchgeführt wurde, als auch die mechanischen Eigenschaften der Filme, die Wirkstofffreisetzung aus der Zubereitung und die Wirkstoffabsorption in die Haut untersucht wurden. Diese Arbeit war gleichzeitig Grundlage für die weiterentwickelten und hier präsentierten filmbildenden Systeme, die eine verlängerte Wirkstoffabsorption zur erleichterten Therapie dermalen Hauterkrankungen ermöglichen sollen.

2.1.6 Halbfeste Zubereitungen zur dermalen Anwendung

Halbfeste Zubereitungen unterscheiden sich von den flüssigen Darreichungsformen, wie z.B. Emulsionen, durch ihre Streichfähigkeit im Temperaturbereich zwischen Raum- und Hauttemperatur. Das Europäische Arzneibuch unterscheidet zwischen wasserfreien Systemen – den hydrophoben Salben und den Absorptionsgrundlagen –, einphasigen hydrophilen Salben und den mehrphasigen Systemen, den sogenannten Cremes. Da in dieser Arbeit mehrphasige, halbfeste Zubereitungen angewendet werden, soll im Näheren nur auf diese Systeme eingegangen werden. Wie bei den Emulsionen findet man auch bei Cremes abhängig von ihrer Phasenlage die Unterscheidung zwischen hydrophoben (W/O-Cremes) und hydrophilen Cremes (O/W-Cremes). Vor allem hydrophile Cremes sind aufgrund ihrer guten Verträglichkeit in der Dermatologie und Kosmetik weit verbreitet. Des Weiteren existieren amphiphile Systeme, zu denen die in dermatologischen Rezepturen häufig angewendete Basiscreme DAC (NRF, 2010a) zählt. Solche amphiphile Cremes stellen trikohärente Systeme dar, die durch die Zugabe von Öl bzw. Wasser zu W/O- bzw. O/W-Cremes mutieren. Eine auf Basiscreme DAC beruhende Formulierung wird in dieser Arbeit als Referenz eingesetzt. Daher wird nun genauer auf die Charakteristika der Creme eingegangen. Die Zusammensetzung der Basiscreme DAC ist in Tabelle 2.1-1 angegeben:

Tabelle 2.1-1: Zusammensetzung der Basiscreme DAC (NRF, 2010a).

Substanz	Massenanteil in der Zubereitung
Glycerolmonostearat	4,0 %
Macrogol-20-glycerolmonostearat	7,0 %
Cetylalkohol	6,0 %
Mittelkettige Triglyceride	7,5 %
Propylenglykol	10,0 %
Weißes Vaseline	25,5 %
Aqua purificata	40,0 %

Das trikohärente System der amphiphilen Creme ist in Abbildung 2.1-2 schematisch dargestellt. Der strukturelle Aufbau gliedert sich also in drei Bereiche: durch Wasser teilweise gequollenes Gelgerüst bestehend aus Macrogol-20-glycerolmonostearat und Cetylalkohol (a), durch Wasser maximal gequollenes Gelgerüst aus Glycerolmonostearat und Cetylalkohol (b) und die kohärente lipophile Phase (c). Die Besonderheit der amphiphilen Erscheinungsweise ist auf das begrenzte Quellungsverhalten von Glycerolmonostearat zurückzuführen (Krog & Borup, 1973; Larsson, 1967). Das maximal gequollene Gelgerüst aus Glycerolmonostearat und Cetylalkohol bedingt die Leitfähigkeit der amphiphilen Creme.

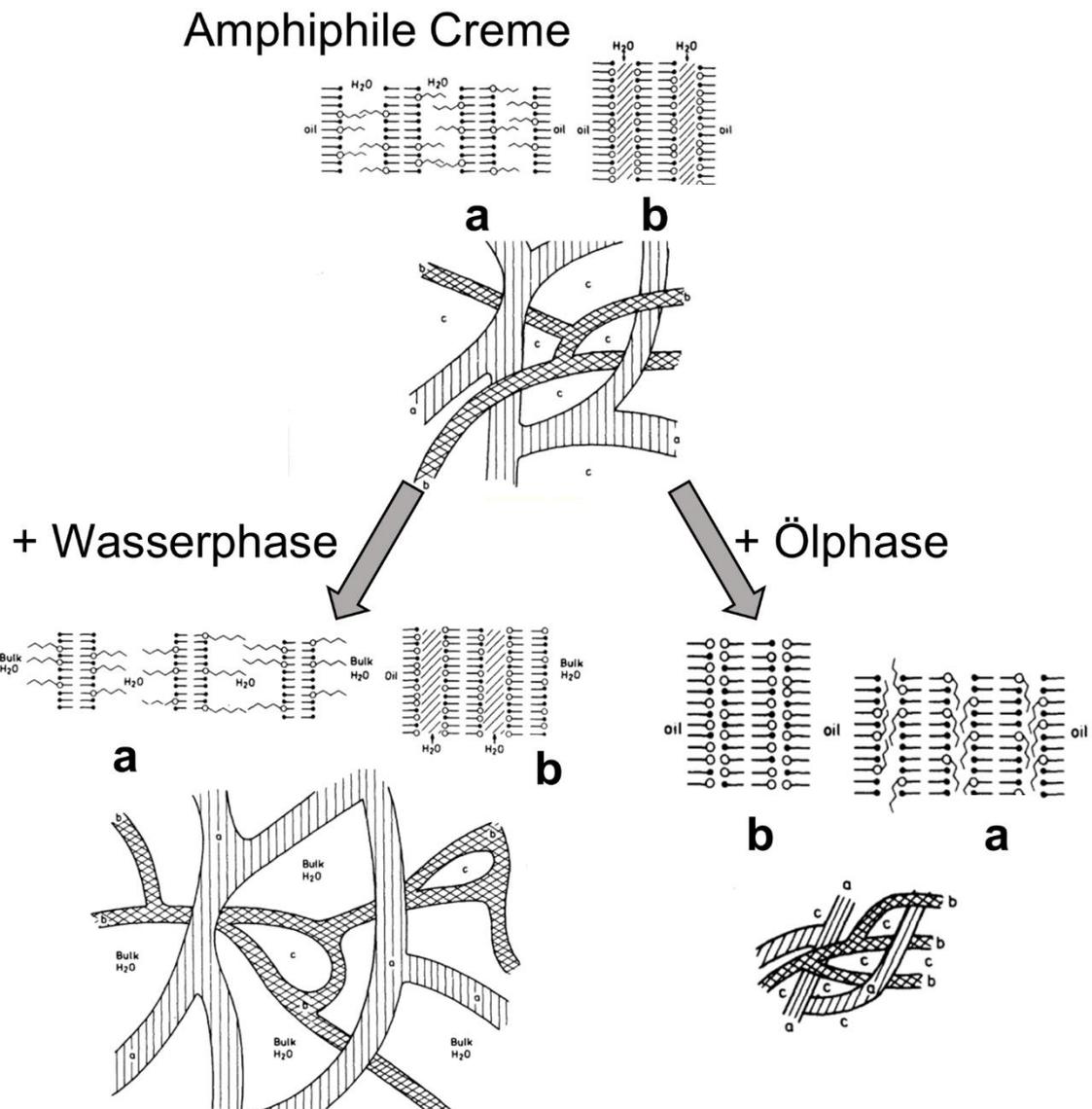


Abbildung 2.1-2: Struktur der amphiphilen Creme und ihr Verhalten nach Zugabe der Öl- oder Wasserphase, modifiziert nach Junginger (1992).

Die Zugabe weiterer Wassermengen zur Basiscreme DAC führt zu einer starken Anschwellung des Gelgerüsts aus Macrogol-20-glycerolmonostearat und Cetylalkohol (a) durch die Inkorporation des Wassers. Gleichzeitig wird das nun vorhandene Bulk-Wasser in der Zubereitung fixiert. Dadurch wird die Leitfähigkeit des Systems deutlich verstärkt. Die zuvor kohärente lipophile Phase wird nun durch das unveränderte Gelgerüst aus Glycerolmonostearat und Cetylalkohol als disperse Phase stabilisiert. Es resultiert eine stabile O/W-Creme, wie sie z.B. bei der Herstellung der Hydrophilen Capsaicinoid Creme NRF 11.125 (NRF, 2010b) entsteht. Wird ausgehend von der amphiphilen Creme hingegen die Ölphase vergrößert, nimmt die begrenzte Quellung des kohärenten Gelgerüsts von Glycerolmonostearat und Cetylalkohol deutlich ab. Dies reduziert die Leitfähigkeit des

Systems und durch das günstige Phasenvolumenverhältnis entsteht eine W/O-Creme (Junginger, 1992).

2.1.7 Capsaicinoide und Nonivamid

Capsaicinoide sind eine Gruppe von Molekülen, die die scharf schmeckenden Bestandteile in den Früchten der Gattung *Capsicum* darstellen. Sie sind der Gruppe der Phenylalkylamine, genauer den Benzylaminen, zugeordnet und sind chemisch betrachtet Amide des Vanillylamins, die sich in der Doppelbindung, Verzweigung und Länge der aliphatischen Seitenkette unterscheiden. Das Hauptalkaloid in den Früchten ist Capsaicin (N-(4-Hydroxy-3-methoxybenzyl)-8-methylnon-trans-6-enamid) (Mozsik et al., 2009; Szolcsanyi, 2014). Nonivamid (N-(4-Hydroxy-3-methoxybenzyl)nonanamid; NVA) ist ein synthetisch hergestelltes Struktur analogon von Capsaicin und unterscheidet sich von Capsaicin durch die fehlende Doppelbindung und die fehlende verzweigten Methylgruppe (Abbildung 2.1-3).

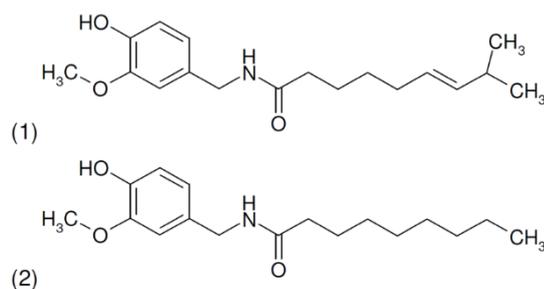


Abbildung 2.1-3: Chemische Struktur von Capsaicin (1) und Nonivamid (2).

Capsaicinoide, wie z.B. Nonivamid, binden an den Transienten Rezeptor Potential Kationenkanal der Unterfamilie V, Subtyp 1 (TRPV1) und agieren an diesem – ebenso wie eine erhöhte Temperatur (Caterina et al., 1997) und der Einfluss von Protonen (Jordt et al., 2000) – agonistisch. Eine Aktivierung von TRPV1 resultiert in einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit des Ionenkanals und dem nachfolgenden Einstrom von Kationen. Als nicht-selektiver Kationenkanal ist er für alle Kationen, die extra- und intrazellulär gefunden werden, durchlässig (Caterina et al., 1997). In den Strukturen der Haut ist TRPV1 auf den primären afferenten, nozizeptiven Neuronen (C- und A δ -Fasern) exprimiert (Ikoma et al., 2006). Eine Aktivierung führt zur Ausschüttung von Substanz P, CGRP und anderer vasodilatativer Neuropeptide, die zum einen die Ausbildung von Ödemen bedingen (Serra et al., 1998). Zum anderen führt die Aktivierung des TRPV1 zur Depolarisation der Nervenfasern und einer Weiterleitung des Reizes über das Rückenmark an das Gehirn. Dies begründet die durch den Kontakt mit Capsaicinoiden wahrgenommenen brennenden, stechenden oder juckenden Gefühle (Anand & Bley, 2011). Aufgrund seiner im Vergleich zu Capsaicin etwas niedrigeren Bindungsaffinität zu TRPV1 (Rohm et al., 2013) erklärt sich, warum Nonivamid mit

9,2 Millionen Scoville einen weniger hohen Schärfegrad als das reine Capsaicin (16,1 Millionen Scoville) aufweist (Todd et al., 1977), aber dennoch um mehr als 100-fach höher als der von üblichen Cayenne-Pfeffern (Al Othman et al., 2011) liegt. In seinen pharmakologischen Eigenschaften ist Nonivamid mit Capsaicin vergleichbar (Chen et al., 1992; Reyes-Escogido et al., 2011). Eine anhaltende Aktivierung von TRPV1, z.B. durch die wiederholte Applikation von Capsaicinoiden, führt zu einem rapiden Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die calciumabhängige Proteasen aktiviert und die Depolymerisation von Mikrotubuli induziert (Anand & Bley, 2011). Dies bedingt eine akute Defunktionalisierung des Rezeptors (Koplas et al., 1997). Wiederholte Applikationen von Capsaicinoiden induzieren also eine Tachyphylaxie (Nagy et al., 2014). Als weiterer Mechanismus wird die Defunktionalisierung sensorischer C-Fasern angesehen (Jancso et al., 2008). Zudem finden sich Hinweise, dass eine wiederholte Applikation von Capsaicinoiden zu einer reversiblen Degeneration epidermaler Nervenfasern führt (Simone et al., 1998), die auf den Überschuss an intrazellulärem Ca^{2+} zurückzuführen ist (Olah et al., 2001) und die langfristige antinozizeptive und antipruritische Wirkung von Capsaicinoiden erklären kann. Die durch die Defunktionalisierung bedingte langfristige Analgesie und Juckreizlinderung kann therapeutisch genutzt werden. Am häufigsten verwendet werden Capsaicinoide in der Schmerztherapie. Dabei können sowohl neuropathische (Anand & Bley, 2011; Derry et al., 2013) als auch osteoarthritische Schmerzen (Laslett & Jones, 2014) behandelt werden. Weitere innovative Anwendungsmöglichkeiten können die intranasale Applikation von Capsaicin zur Therapie der nicht-allergisch bedingten Rhinitis (Singh & Bernstein, 2014) und peroral als gastroprotektiv wirkendes Agens in der Kombination mit nicht-steroidalen antientzündlichen Arzneistoffen sein (Mozsik, 2014). In Laborversuchen ergab die orale Aufnahme von Capsaicinoiden positive Effekte für die Therapie der Adipositas, die in weiterführenden klinischen Versuchen untersucht werden soll (Leung, 2014). Während der Fokus in der dermalen Capsaicinoid-Therapie bislang vor allem auf der Schmerztherapie lag, finden sich mittlerweile auch Zubereitungen zur Therapie des Pruritus (Boyd et al., 2014; Ständer et al., 2012). Das Neue Rezeptur Formularium beschreibt eine Capsaicinoid-haltige Rezeptur, die unter anderem zur Behandlung des chronischen Juckreizes geeignet ist (NRF, 2010b). Jedoch ist bislang kein Fertigarzneimittel für diese Indikation zugelassen.

Der Einsatz zur Therapie chronischer Hauterkrankungen, das mit Capsaicin vergleichbare Permeationsverhalten (Fang et al., 1996) und dass es im Vergleich zu Cayennepfeffer-Extrakten oder Capsaicinoiden chemisch definiert und in hoher Reinheit verfügbar ist, machen Nonivamid zu einem geeigneten Modellarzneistoff. Mit dieser Substanz soll eine filmbildende Formulierung entwickelt werden, die für den Patienten eine leicht anzuwendende, wirksame und gut verträgliche Alternative zu den bisherigen Therapieoptionen darstellt.

2.2 Die Haut als Applikationsort für Arzneistoffe

2.2.1 Morphologie der Haut

Die Haut stellt mit einer Fläche von etwa 2 m² das größte Organ des menschlichen Körpers dar und bildet die letzte und entscheidende Grenze zwischen den Organen des Körpers und der Umwelt (Hadgraft, 2001). Deshalb muss die Haut sowohl über Schutzfunktionen, die ein Eindringen von Xenobiotika verhindern, als auch über Sinnesfunktionen verfügen, um Einflüsse der Umgebung wahrzunehmen und entsprechend darauf reagieren zu können. Weitere Funktionen sind die Regulation der Körpertemperatur, die Produktion von Hormonen sowie die Metabolisierung von Xenobiotika.

Der Aufbau der Haut lässt sich prinzipiell in zwei Teile gliedern: die Cutis und die Subkutis. Die Cutis gliedert sich wiederum in die Epidermis und die darunter liegende Dermis. Daneben sind Hautanhangsgebilde wie Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen zu finden. Die Epidermis stellt den zur Außenseite gerichteten Teil der Haut dar und lässt sich in eine lebende und eine nicht lebende Schicht unterscheiden. Der lebende Teil der Epidermis zeigt ein geordnetes Muster. In der untersten Schicht (Stratum basale) findet eine konstante Zellteilung der Keratinocyten statt. Dieser Schicht aufliegend folgen das Stratum spinosum, das Stratum granulosum und ausschließlich in Bereichen besonders dicker oder haarloser Haut das Stratum lucidum. Die im Stratum basale gebildeten Zellen wandern in Richtung der oberen Schichten und differenzieren sich weiter aus. Im Stratum granulosum findet sich vor allem mit Keratin ein Protein, das der Haut durch die Ausbildung elastischer Bündel Struktur- und Zugfestigkeit verleiht (Hwa et al., 2011). Des Weiteren sind Keratohyalin granula, die vermutlich eine Rolle bei der Keratinisierung und zur Schutzfunktion der Haut spielen, und lipidreiche Granula in den Keratinocyten enthalten (Hwa et al., 2011). Die Anzahl und Größe der Granula steigt im Bereich der oberen Epidermis weiter an und ist abhängig von der Konzentration an Calcium. Insbesondere bei Zellverletzungen kommt es zur Verarmung an Calcium, was in einer erhöhten Bildungsrate an lamellaren Granula und einer Minderung der Differenzierung von Keratinocyten zur Wiederherstellung der Barriere resultiert (Elias et al., 2002; Hwa et al., 2011). Die lipidreichen, lamellaren Granula setzen später durch Verschmelzung mit der Membran Substanzen frei, aus denen die interzelluläre Lipidschicht der äußersten Hautschicht der Epidermis gebildet wird. Dieser nicht lebende, verhornte Teil der Epidermis wird als Stratum corneum bezeichnet. Das Stratum corneum enthält ausschließlich die ausdifferenzierte Form der äußersten Keratinocyten: abgeflachte, kernlose, tote Corneocyten. Neben dem Verlust des Kerns verfügen die Corneocyten nicht mehr über eine klassische Zellmembran. Stattdessen findet sich als Begrenzung der Zellen ein Envelope quervernetzter Proteine, an den ein Lipid-Envelope kovalent gebunden ist (Proksch et al., 2008).

In der Regel weist das Stratum corneum eine Dicke von etwa 20 µm auf (Hadgraft & Lane, 2011), die abhängig vom Hautareal variieren kann. Es ist eine äußerst effektive Barriere der Haut gegenüber Umwelteinflüssen, dem Wachstum und der Invasion von mikrobiellen Pathogenen und kontrolliert den körpereigenen Wasser- und Elektrolytverlust (Elias, 2007; Elias & Wakefield, 2011; Proksch et al., 2008). Jedoch stellt das Stratum corneum auch die bedeutendste Barriere für die Absorption von Arzneistoffen aus dermalen Zubereitungen dar. Diese Barrierefunktion ist durch die hoch-organisierte, dicht gepackte Anordnung der Corneocyten und der aus den lamellaren Granula freigesetzten Lipidmatrix gewährleistet (Hwa et al., 2011). Die von Elias (1983) veröffentlichte Darstellung des Stratum corneum als wie Backsteine aufeinandergestapelte Corneocyten, die von einer hydrophoben Lipidmatrix - gleich einer Mörtelstruktur - als lamellare Doppelschicht angeordnet umgeben werden, kann aufgrund heutiger Erkenntnisse ergänzt werden. Die Corneocyten verfügen über hakenähnliche Strukturen (sog. Hooks), durch die sie ineinander verhakt sind und so erheblich zur mechanischen Stabilität des Stratum corneum beitragen (Pfeiffer et al., 2000). Corneodesmosomen, wie sie in Abbildung 2.2-1 skizziert sind, sind punktförmige Verbindungsstellen zwischen den Zellen und sorgen für den stabilen Zusammenhalt des Stratum corneum und die Zugfestigkeit gegenüber Scherkräften (Cork et al., 2009). Die multilamellare Lipidmatrix besteht chemisch vor allem aus Ceramiden, Cholesterol, Cholesterolestern und freien Fettsäuren und gliedert sich in zwei Phasen: eine kurze und eine lange Phase, die ca. 6 bzw. 13 nm groß sind (Bouwstra et al., 2000). Dabei ist die lange periodische Phase sandwichförmig aus einer schmalen, flüssigen Grundstruktur von ca. 3 nm, die in zwei ca. 5 nm lange kristalline Schichten eingebettet ist, aufgebaut. Lateral betrachtet sind die polaren Kopfgruppen hauptsächlich orthorhombisch oder auch hexagonal angeordnet, was eine dichte Barriere ermöglicht (van Smeden et al., 2014). Die multilamellaren Lipidschichten sind für die Aufrechterhaltung der Hautbarriere von entscheidender Bedeutung und regulieren den transepidermalen Wasserverlust (Cork et al., 2009). Schädigungen in der Zusammensetzung der Lipide oder der lateralen Anordnung führen zu einer gestörten Hautbarriere und werden in einer Vielzahl an atopischen Erkrankungen wiedergefunden (Janssens et al., 2012; van Smeden & Bouwstra, 2016).

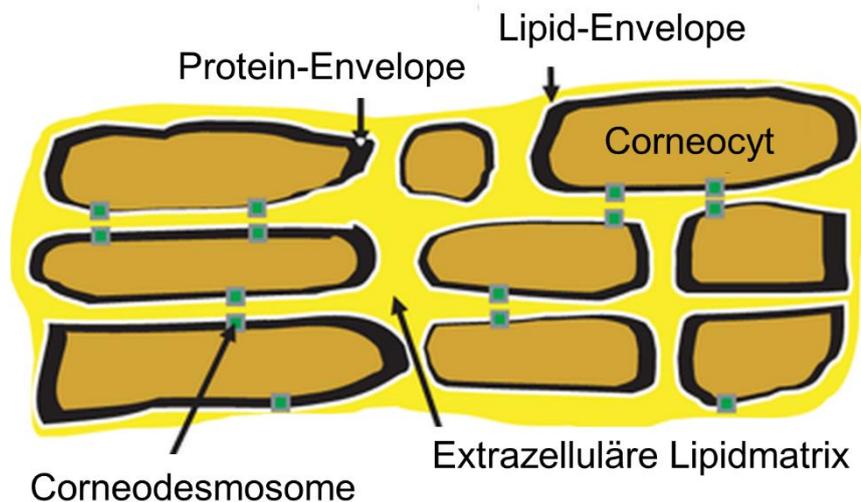


Abbildung 2.2-1: Struktur des Stratum corneum, modifiziert nach Proksch et al. (2008).

Des Weiteren wird aus den lamellaren Granula das Protein Corneodesmosin gebildet, das sich an der extrazellulären Oberfläche der Corneodesmosomen anreichert und ein entscheidender Faktor für die Integrität der epidermalen Barrierefunktion ist (Oji et al., 2010). Ebenso werden aus den lamellaren Granula Proteasen freigesetzt, die den Abbau der Zellverbindungen orchestrieren und damit das Abtragen der obersten Hautschicht erleichtern (Elias & Wakefield, 2011). So kann die äußerste Hautschicht nach und nach abgestoßen werden. Dieser Vorgang wird als Desquamation bezeichnet. Das Zusammenspiel von Auf- und Abbau sorgt somit für die stetige Erneuerung des Stratum corneum. Ausgehend von der Ausbildung des Keratinocyts aus Stammzellen, über die Differenzierung und Migration vom Stratum granulosum bis ins Stratum corneum, der Umbildung zum Corneocyten und der abschließenden Desquamation vergehen etwa 50 Tage (Iizuka, 1994). Dysbalancen zwischen Proliferation der Basal-Zellen und Desquamation der Stratum-corneum-Zellen resultieren in unterschiedlichen Dicken des Stratum corneum und ergeben z.B. das typische Erscheinungsbild einer Psoriasis (Hwa et al., 2011). Störungen in der Reifung und Freisetzung der lamellaren Granula sowie eine gestörte Bildung von Corneodesmosin können daher eine Prädisposition für atopische Erkrankungen darstellen (Cork et al., 2009; Oji et al., 2010).

Unterhalb der epidermalen Basalmembran befindet sich die Dermis. Sie besteht größtenteils aus Kollagen, das in einem amorphen Gemisch aus Mucopolysacchariden eingebettet ist. Zudem sind in der Dermis Fettzellen, Mastzellen und Makrophagen als Teil des Immunsystems, Blutgefäße, Nerven und Lymphgefäße enthalten. Aufgrund der hohen Zahl an Blutgefäßen findet in der Dermis die Thermoregulation des Organismus statt. Die Dermis lässt

sich in zwei Schichten untergliedern: das direkt an die Epidermis angrenzende Stratum papillare und das daran anschließende Stratum reticulare. Diese Schichten unterscheiden sich in der Dichte und Anordnung der Bindegewebsfasern. Das Stratum papillare hat seinen Namen aufgrund der Bindegewebszapfen, die senkrecht in die Epidermis hineinragen und durch die Oberflächenvergrößerung eine bessere Versorgung der epidermalen Zellen erlauben. Das Stratum reticulare ist geprägt von kräftigen Kollagenfaserbündeln, die der Haut ihre charakteristische Reißfestigkeit geben (Jakubovic & Ackerman, 1992).

Den Abschluss des äußeren Integuments bildet die hauptsächlich aus Fett- und Bindegewebe bestehende Unterhaut (Subcutis), in die größere Blutgefäße und Neurone eingelagert sind. Das subkutane Fettgewebe dient zur Wärmeisolation und Druckpolsterung (Jakubovic & Ackerman, 1992).

Ebenso findet man in der Haut morphologisch und funktionell eigenständige Anhangsgebilde (sog. Adnexe), wie z.B. Haare, Nägel und Drüsen, die unterschiedliche Funktionen erfüllen können.

2.2.2 Schädigung der natürlichen Hautbarriere

Die Hautbarriere kann durch Umwelteinflüsse wie Luftfeuchtigkeit und Temperatur, durch Allergenexposition, das Alter aber auch insbesondere durch psychischen Stress oder eine Arzneimitteltherapie geschädigt werden. Messbar sind solche Verletzungen an einem gesteigerten transepidermalen Wasserverlust. Eine Verletzung oder Störung der Hautbarriere führt zu einer gesteigerten Expression von Cytokinen (IL-1, IL-6, TNF). Diese sind zunächst für die Reparatur der Hautbarriere notwendig. Eine chronisch erhöhte Cytokinproduktion kann jedoch zu Entzündungsprozessen und einer übermäßigen epidermalen Zellproliferation führen (Proksch et al., 2008). Durch Kratzen der Haut entsteht ein erneutes Trauma für die Keratinocyten und das Eindringen von Lymphe in das Stratum corneum nivelliert den eigentlichen Calcium-Gradienten. Der dauerhafte Verlust an extrazellulärem Calcium mindert die interzellulären Adhäsionskräfte (Proksch et al., 2008). Eine gestörte Barriere führt zudem zu einem Anstieg des pH-Werts in den obersten Hautschichten und einer nachfolgend erhöhten Aktivität von Proteasen, was zur Aktivierung des Protease-aktivierten Rezeptors 2 (PAR2) führt (Cork et al., 2009). Dieser ist unter anderem in die Signalkaskade der Entstehung des Pruritus involviert (Steinhoff et al., 2003). Synergistisch mit PAR2 agiert TRPV1 (Ikoma et al., 2006), der ebenfalls in den epidermalen Keratinocyten zu finden ist und neben Hitze und Capsaicin durch pH-Änderungen aktiviert wird (Denda et al., 2001). Nicht zuletzt erleichtert eine traumatische Schwächung der Hautbarriere das Eindringen von pathogenen Mikroben, die zu sekundären Infektionen führen können. Um Hauterkrankungen wie Psoriasis oder chronischen Pruritus erfolgreich zu therapieren, ist also eine Unterbrechung des Juck-Kratz-Teufelskreises zur Rekonstitution der Hautbarriere unerlässlich (Ständer et al., 2010; Zeidler et al., 2016).

2.2.3 Absorption topisch applizierter Arzneistoffe

Die topische Applikation von Arzneistoffen kann aus unterschiedlichsten Gründen sinnvoll sein. Zum einen kann es wünschenswert sein, dass der Arzneistoff auf der Hautoberfläche verbleibt (z.B. zur Desinfektion) oder aber endodermal Zielregionen in tiefer gelegenen Hautschichten erreicht (z.B. zur Juckreizlinderung mittels Capsaicinoiden). Eine Absorption des Arzneistoffs in den systemischen Blutkreislauf ist in diesen Fällen nicht erwünscht und kann gegebenenfalls zu unerwünschten Nebenwirkungen führen. Im Gegensatz dazu kann – aufgrund der Möglichkeit, den First-pass-Metabolismus zu umgehen und so das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen zu mindern – die transdermale Administration eines systemisch wirksamen Arzneistoffes erwünscht sein (z.B. Fentanyl-Matrixpflaster), während eine lokale Wirkung ausbleiben soll (Trommer & Neubert, 2006). Allgemein können verschiedene Permeationswege eines Arzneistoffs durch das Stratum corneum postuliert werden (Abbildung 2.2-2).

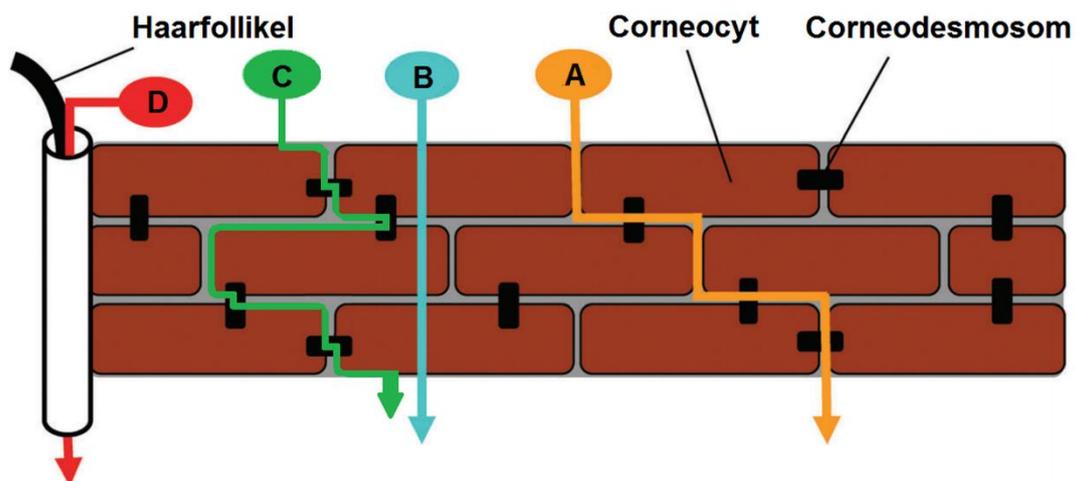


Abbildung 2.2-2: Schematische Darstellung möglicher Permeationswege durch das Stratum corneum; modifiziert nach Hadgraft & Lane (2011) .

Die Permeation ist über die Hautanhangsgebilde oder transepidermal vorstellbar. Die transepidermale Absorption kann dabei in einen interzellulären Weg (A), bei welchem die Arzneistoffe entlang der Lipidmatrix zwischen den einzelnen Corneocyten in die Haut penetriert, oder den direkten transzellulären Weg (B) untergliedert werden (Trommer & Neubert, 2006). Aufgrund des häufigen Wechsels von lipophilen (Lipidschicht) und hydrophilen Schichten (Proteinschicht) erscheint der direkte transzelluläre Weg jedoch sehr unwahrscheinlich und konnte bislang nicht belegt werden. Ein Transport der Arzneistoffe über eine hydrophile Route entlang des Protein-Envelope über die direkten Verbindungsstellen der Corneocyten (C), die sogenannten Corneodesmosome, erscheint für hydrophile Stoffe

wahrscheinlicher (Neubert & Wepf, 2007). Die Permeation eines Arzneistoffs durch das Stratum corneum verläuft sehr langsam. Grund dafür sind beim interzellulären Weg die vielen Windungen und der niedrige Diffusionskoeffizient in der Lipidmatrix. Beim transepidermalen Weg verzögert besonders die Diffusion durch die lipophilen und hydrophilen Schichten die Permeation in tiefere Schichten (Hadgraft, 2001). In der Literatur finden sich zudem Hinweise für einen Transport über die Adnexe (D), wie z.B. über Schweißdrüsen oder entlang der Haarfollikel, als effizienter Penetrationsweg in tiefere Hautschichten (Hadgraft, 2001; Patzelt et al., 2017). Da Haarfollikel über ein dichtes Netzwerk an Blutkapillaren verfügen, ist dieser Weg besonders für die Absorption transdermal wirksamer Arzneistoffe von Relevanz (Knorr et al., 2009). Die Hautanhangsgebilde machen meist weniger als 0,1 % der gesamten Hautoberfläche aus, z.B. auf der inneren Seite des Unterarms (Hadgraft & Lane, 2011). Beachtet man jedoch die gesamte innere Oberfläche, kommt dem transfollikularen Transport vor allem in dichter behaarten Regionen eine weit größere Bedeutung zu als bislang angenommen (Otberg et al., 2004; Schaefer & Lademann, 2001). So können z.B. auch wirkstoffhaltige Nanopartikel, die über den interzellulären Weg nicht absorbiert werden können, über Haarfollikel und Talgdrüsen aufgenommen werden (Patzelt et al., 2017).

Die lebenden Zellen der Epidermis zeichnen sich durch einen höheren Protein- und Wasseranteil aus, was besonders die Diffusion von lipophilen Arzneistoffen erschwert. Da in diesen Bereichen der Haut Proteinbindung, Verteilung, Proteintransporter und Metabolismus einen Einfluss auf die Permeation haben, sind die Permeationswege weitaus komplexer. Dasselbe gilt für den Arzneistofftransport in der Dermis, der zudem durch die unterschiedlich ausgeprägte Vaskularisation des Gewebes und das Lymphsystem beeinflusst wird (Jepps et al., 2013).

2.2.4 Einflussfaktoren auf die perkutane Absorption von Arzneistoffen

Prinzipiell entscheiden die physiochemischen Eigenschaften eines Arzneistoffs darüber, wie gut er in die einzelnen Hautschichten absorbiert werden und diese durchdringen kann. Jedoch werden Arzneistoffe in der Regel in einem Vehikel gelöst oder suspendiert auf die Haut aufgetragen, weshalb auch das Vehikel die Aufnahme des Arzneistoffs direkt beeinflusst oder aber, indem es eine Veränderung der Barrierefunktion der Haut bewirkt, die Penetration und/oder Permeation indirekt reguliert.

Die besondere Struktur und Zusammensetzung des Stratum corneum bedingt die einzigartige Barrierefunktion der Haut, erschwert allerdings die Arzneistoffaufnahme stark. Aus diesen Gründen wird seit vielen Jahren nach Möglichkeiten gesucht, die perkutane Absorption von Arzneistoffen zu verbessern. Die Überwindung des Stratum corneum stellt mit Ausnahme von sehr lipophilen Arzneistoffen den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Verlauf der Arzneistoffabsorption dar. Da es sich beim Stratum corneum um totes Gewebe handelt, kann angenommen werden, dass der Transport von Substanzen durch die Haut vor allem über passive Diffusion verläuft (Jepps et al., 2013). Der Diffusionskoeffizient sinkt mit steigendem Molekulargewicht eines Arzneistoffs, weshalb bereits die molare Masse eines Arzneistoffs dessen Fähigkeit beschränkt, die Hautbarriere zu überwinden. Ein Molekulargewicht von ≥ 500 Dalton limitiert die dermale Verfügbarkeit bestimmter Arzneistoffe, wie z.B. von Peptiden (Bos & Meinardi, 2000). Im Hinblick auf die Arzneistoffkonzentration zeigt sich für besonders hohe gelöste Konzentrationen im Vehikel eine weitaus höhere Permeationsrate, als dies für niedrigere Konzentrationen zu beobachten ist. Dieser Zusammenhang ist anhand des ersten Fickschen Diffusionsgesetzes (Gleichung 2.2-1) zu erklären:

$$J = \frac{A \cdot D \cdot VK \cdot \Delta c}{d}$$

Gleichung 2.2-1: Berechnung der Permeationsrate.

J = Permeationsrate

A = Fläche der Haut, auf die die Zubereitung appliziert wurde

D = Diffusionskoeffizient der Substanz im Stratum corneum

VK = Verteilungskoeffizient der Substanz zwischen der Haut und dem Vehikel

Δc = Konzentrationsgradient zwischen Vehikel und der Haut

h = Dicke des Stratum corneum

Die Arzneistoffkonzentration ist im Vehikel zumeist deutlich höher als innerhalb der Haut. Zudem wird der Arzneistoff über die Blutgefäße stetig abtransportiert (Hadgraft, 2001), sodass man unter perfekten sink-Bedingungen die Gleichung 2.2-1 wie folgt vereinfachen kann:

$$K_p = \frac{D \cdot VK}{h}$$

Gleichung 2.2-2: Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten.

$$J = \frac{A \cdot D \cdot VK \cdot c}{h} = A \cdot K_p \cdot c$$

Gleichung 2.2-3: Vereinfachung der Berechnung der Permeationsrate.

K_p = Permeabilitätskoeffizient

c = Arzneistoffkonzentration im Vehikel

Dies verdeutlicht, dass die Permeationsrate sowohl zur im Vehikel vorhandenen Arzneistoffkonzentration als auch zur Diffusionsfläche proportional ist. Die Gleichung ermöglicht auch Ansatzpunkte, um die Permeation zu verbessern. Um eine möglichst große Diffusionsfläche zu erhalten, sollte das Vehikel über eine gute Spreitbarkeit auf der Haut verfügen. Eine weitere Möglichkeit stellt der Einsatz von Solubilisatoren dar, die die Löslichkeit des Arzneistoffs im Vehikel erhöhen. Der Verteilungskoeffizient der Substanz zwischen der Haut und dem Vehikel kann positiv beeinflusst werden, indem ein Vehikel gewählt wird, das eine Verteilung in die Haut begünstigt. Wird also für einen lipophilen Arzneistoff ein System mit wässriger Außenphase gewählt, hat er eine verstärkte Tendenz, in das lipophile Stratum corneum zu penetrieren. Der Wassergehalt im Stratum corneum schwankt im Normalfall zwischen 5-10 %, kann aber durch Okklusion aufgrund verstärkter Hydratation auf bis zu 50 % erhöht werden (Trommer & Neubert, 2006). Eine verstärkte Hydratation der Haut bewirkt vor allem durch eine Aufweitung der polaren Kopfgruppen und durch eine Reduktion der Packungsdichte eine Fluidisierung in der Lipiddoppelschicht, wodurch die Absorption von polaren und unpolaren Substanzen deutlich gefördert wird (Marjukka Suhonen et al., 1999). Eine verstärkte Hydratation der Haut kann z.B. durch die Anwendung eines teilokklusiv wirkenden Kohlenwasserstoffgels oder aber durch die Verwendung von okklusiven Abdeckfolien bei transdermalen therapeutischen Systemen erzielt werden. Die Beeinflussung des Verteilungs- und Diffusionskoeffizienten und damit des Permeabilitätskoeffizienten kann auch über den Einsatz chemischer Penetrationsbeschleuniger gelingen. Stoffe wie z.B. Fettalkohole, Tenside und Terpene verbessern die Penetration, indem sie durch Interaktionen die Ordnung der Lipidmatrix stören und dadurch für eine gesteigerte Fluidität der Lipide im Stratum corneum sorgen (R. B. Walker & Smith, 1996). Bei der Vielzahl von chemischen Penetrationsförderern wird besonders häufig Propylenglykol angewendet, das sowohl als Co-Solvens fungiert, als auch gut in die Haut penetrieren kann, im Sinne eines Solvent drag den Permeabilitätskoeffizienten beeinflusst und die Penetration lipophiler Arzneistoffe verbessert (Trommer & Neubert, 2006). In der Literatur wird außerdem eine Interaktion mit den polaren

Kopfgruppen der Lipiddoppelschicht durch Propylenglykol postuliert (Williams & Barry, 2004). Das in vielen Formulierungen enthaltene Ethanol ermöglicht zum einen eine Verbesserung der Arzneistofflöslichkeit im Vehikel. Dies kann sogar dazu führen, dass nach der Applikation auf die Haut durch die Verdunstung von Ethanol eine Arzneistoffkonzentration oberhalb der Sättigungskonzentration erreicht wird und somit ein maximaler Konzentrationsgradient aufgebaut wird. Zum anderen penetriert Ethanol gut in das Stratum corneum, wodurch es die Löslichkeit in den lipophilen Bereichen erhöht und zudem dort Lipide und Proteine herauslösen kann (Williams & Barry, 2004). Dies führt zu einem Anstieg der Porosität der Hautbarriere und erleichtert so die Penetration von Arzneistoffen in die Haut. Ein klassischer und häufig genutzter Penetrationsförderer ist Harnstoff. Dies liegt in seinen in niedrigeren Konzentrationen keratoplastischen und in höheren Konzentrationen keratolytischen Eigenschaften und in seinen hydratisierenden Eigenschaften begründet (Trommer & Neubert, 2006; R. B. Walker & Smith, 1996; Williams & Barry, 2004).

Im Besonderen ist zu beachten, dass es nach der Applikation von Cremes und wässrigen Lösungen während des Applikationszeitraums zu einer Metamorphose der Formulierung durch die Verdunstung flüchtiger Komponenten kommen kann. Verdunstet z.B. Wasser aus einer Öl-in-Wasser-Creme, kann das veränderte Phasenvolumenverhältnis die Permeationsrate des Arzneistoffs verändern. Die gelöste Arzneistoffkonzentration steigt rapide bis zu einer gesättigten oder sogar übersättigten Lösung an (Surber & Smith, 2005).

Für bestimmte Arzneistoffe, z.B. Corticosteroide, ist die Bildung eines Arzneistoffreservoirs im Stratum corneum beschrieben, die eine Penetration in darunter liegende Schichten der Haut verzögern kann (Hadgraft, 1979). Die Entstehung einer solchen Aufkonzentrierung ist laut Roberts et al. (2004) abhängig vom Diffusionsvermögen des Arzneistoffs in das Stratum corneum, der penetrierten Menge und dem Abtransport der Substanz aus der Epidermis. Je langsamer die Resorption des Arzneistoffs ist und je kürzer die Applikationszeit der Formulierung, desto schlechter kann ein Reservoir im Stratum corneum aufgebaut werden. Wirkstoffe, die vasokonstriktiv wirken, verzögern den Abtransport des Arzneistoffs und verstärken daher die Reservoirbildung (Hadgraft, 1979).

Sowohl die physikochemischen Eigenschaften des Arzneistoffs, die Beschaffenheit der Haut und die Umweltbedingungen als auch das Vehikel, in dem der Arzneistoff auf die Haut appliziert wird, haben einen Einfluss auf die Absorption eines Arzneistoffs. Durch die Wahl eines geeigneten Vehikels kann also die Arzneistoffabsorption reguliert und damit die gewünschte Wirkung entfaltet werden.

2.2.5 Marker für die Bestimmung der Hautverträglichkeit

Eine Veränderung der Struktur der Haut geschieht natürlicherweise während des gesamten Lebens. So hat zum Beispiel das Alter (Cua et al., 1990; Elsner et al., 1990) aber auch die individuelle Prädisposition (Holst & Moller, 1975) einen Einfluss auf die Empfindlichkeit der Haut. Allerdings können Irritationen auch exogen durch chemische oder physikalische Einflüsse (Reibung, UV-Strahlung, thermische Irritation) verursacht werden. Eine durch Wirk- oder Hilfsstoffe hervorgerufene Irritation der Haut kann den Einsatz von dermalen Zubereitungen limitieren. Dabei können die Irritantien sowohl wasserlöslich (z. B. Laugen und Säuren) als auch nicht-wasserlöslich (z.B. organische Lösungsmittel oder Mineralöle) sein (Loffler et al., 2000). Insbesondere gelten Tenside als potentielle Irritantien für die Haut und können eine irritative Kontaktdermatitis hervorrufen (Wilhelm et al., 1994). Gerade bei häufigen Anwendungen kann durch die tensidbedingte Extraktion der Lipide aus der Haut die Schutzschicht schrittweise gestört werden. Durch den im Alltag üblichen Kontakt mit verschiedensten Irritantien kann auch deren Zusammenspiel zu einer klinischen Schädigung der Haut führen. Eine akute Störung der Hautbarriere induziert eine Cytokinkaskade und löst zudem oxidativen Stress aus, was eine Entzündungsreaktion zur Folge hat (Fluhr et al., 2008). Erfolgen die wiederholten Schädigungen innerhalb so kurzer Zeit, dass die durch die Hautirritation selbstinduzierten Reparaturmechanismen der Haut (Feingold et al., 2007) nicht entsprechend gegenwirken können, kann sich eine chronische Kontaktdermatitis ausbilden (Loffler et al., 2000).

Ein Maß für trockene Haut bzw. eine verminderte Funktion der Wasserpermeabilitätsbarriere der Haut stellt der transepidermale Wasserverlust (TEWL) dar, der über entsprechende Geräte (z.B. Tewameter®) in vivo erfasst werden kann (Kresken et al., 2009). Ein niedrigerer TEWL ist gemeinhin ein charakteristisches Merkmal einer intakten Hautbarriere (Fluhr et al., 2006). Schädigungen der Hautbarriere durch die oben beschriebenen Irritantien führen zu einem Anstieg des TEWL, häufig noch bevor die klinische Symptomatik wahrgenommen werden kann.

Ein weiterer Marker für die Bestimmung der Hautverträglichkeit ist die Hydratation des Stratum corneum. Der Wassergehalt des Stratum corneum beeinflusst die Permeabilität und die Flexibilität der Hautbarriere und reguliert die Aktivität der Enzyme, die in den natürlichen Desquamationsprozess der Corneocyten integriert sind. Die Hydratation des Stratum corneum wird durch endogene Feuchthaltefaktoren, eine Mischung aus Aminosäuren, Salzen und weiteren Stoffen, aufrechterhalten. Induzierte Schädigungen des Stratum corneum führen zu einer Minderung der Hydratation und damit sowohl zu einer weiteren Schwächung der

Hautbarriere als auch zu einer Störung der Desquamation (Fluhr et al., 2008). Die Bestimmung der Hydratation erfolgt gewöhnlich mittels Messung der elektrischen Kapazität. Dabei wird ausgenutzt, dass Wasser eine weitaus höhere Dielektrizitätskonstante im Vergleich zu den Stoffen im Stratum corneum hat. Durch einen erhöhten Wassergehalt im Stratum corneum steigt also ebenfalls die elektrische Kapazität, die einen direkten Hinweis auf die Hydratation des Stratum corneum gibt (Clarys et al., 2012).

Die Rötung der Haut geht typischerweise mit Entzündungsreaktionen der Haut, die z.B. durch Kontakt mit irritativen Substanzen verursacht werden, und der Juckreiz-Kratz-Symptomatik des Pruritus einher. Da die Einschätzung der Rötung der Haut jedoch sehr subjektiv ist und auch abhängig von der Desquamation und der Pigmentation der Haut unterschiedlich ausgeprägt ist, ist der Einsatz von Geräten erforderlich, die zuverlässig quantifizierbare Werte über die Hautrötung liefern (Fullerton et al., 1996). So kann die Messung der Hautrötung mit dem Mexameter[®] beispielsweise dadurch erfolgen, dass das auf die Haut emittierte Licht dreier definierter Wellenlängen von der Haut absorbiert, teilweise reflektiert und über einen Photodetektor detektiert wird. So kann der Erythemindex als Maß für die Hautrötung ermittelt werden (Clarys et al., 2000).

Durch die nicht-invasive Messung des TEWL, der Stratum-corneum-Hydratation und des Erythemindex kann also die irritative Wirkung einer Formulierung und eines Wirkstoffs in vivo quantifiziert werden und somit einen Hinweis auf die Hautverträglichkeit der Zubereitung erhalten werden (Kresken et al., 2015; Rogiers et al., 1999).

2.3 In vitro Freisetzungsuntersuchungen und experimentelle Untersuchungen zur perkutanen Arzneistoffabsorption

Untersuchungen zum Transport eines Arzneistoffs in und durch die Haut werden idealerweise in vivo am Menschen durchgeführt. Gerade im Bereich der Formulierungsentwicklung ist jedoch eine Vielzahl von Untersuchungen notwendig, um die Freisetzungs- und Permeationskinetik der entwickelten Formulierungen zu optimieren. Auch im späteren Verlauf, z.B. in der Qualitätskontrolle, sollten standardisierte Methoden zur Überprüfung der Freisetzung zur Verfügung stehen. Zudem erschweren ethische Bedenken und ein mit hohen Kosten verbundener logistischer Aufwand die Durchführung solcher in vivo Untersuchungen. Aus diesen Gründen haben sich verschiedene Modelle etabliert, mit denen unterschiedliche Phänomene der Arzneistofffreisetzung und -absorption untersucht werden können. In vitro Freisetzungsuntersuchungen klären den Einfluss der Formulierung auf die Wirkstofffreisetzung in ein Akzeptormedium, während mit ex vivo Permeationsuntersuchungen die Menge an Arzneistoff erfasst wird, die durch die komplette Haut permeiert ist und im Akzeptormedium wiedergefunden werden kann. Mittels ex vivo Penetrationsuntersuchungen kann ermittelt werden, in welchen Schichten der Haut sich der Arzneistoff nach dermalen Applikation und bestimmten Applikationszeiten anreichert und verteilt. Experimentelle Untersuchungen zur perkutanen Arzneistoffabsorption ermöglichen somit Rückschlüsse auf die pharmakologisch notwendige Dosierung, bieten zum anderen aber auch die Möglichkeit, lokale bzw. systemische Effekte zu testen oder Vergleiche zwischen unterschiedlichen Formulierungen zu ziehen (Wagner et al., 2001).

2.3.1 In vitro Modelle zur Untersuchung der Dermato-Pharmakokinetik

In der Literatur sind verschiedene Systeme beschrieben, um den Arzneistofftransport durch geeignete Tier- oder Humanhautmodelle oder rekonstruierte Hautäquivalente beobachten zu können. Eines der am häufigsten angewendeten Modelle stellen die von Franz (1975) entwickelten Franz-Diffusionszellen dar. Der Einsatz dieser Zellen entspricht dem aktuellen Stand von Wissenschaft und Technik (EMA, 2014; FDA, 2004; OECD, 2004). Neben der Franz-Diffusionszelle wird auch oftmals das Saarbrücker-Modell verwendet. Bei diesem Modell ist kein Akzeptormedium vorgesehen, sodass ausschließlich die Wirkstoffpenetration in die Haut erfasst wird (Wagner et al., 2000). Vorteilhaft ist, dass eine Hydratation der Haut durch das Rezeptormedium vermieden wird, wie es beim Franz-Diffusionsmodell unter Umständen möglich ist.

Abbildung 2.3-1 stellt den Aufbau der Franz-Diffusionszellen dar, wie sie in dieser Arbeit verwendet werden. Die Diffusionszellen bestehen hauptsächlich aus einem Donor- und einem mit geeignetem Medium befüllten Akzeptorkompartiment, zwischen denen eine Filtermembran oder Haut angebracht wird. Wird Haut verwendet, so ist darauf zu achten, dass die epidermale Seite zum Donorkompartiment ausgerichtet wird. Eine Fixation der Membran erfolgt mittels geeigneter feststellbarer Klammern. Die Formulierung wird in das Donorkompartiment eingebracht.

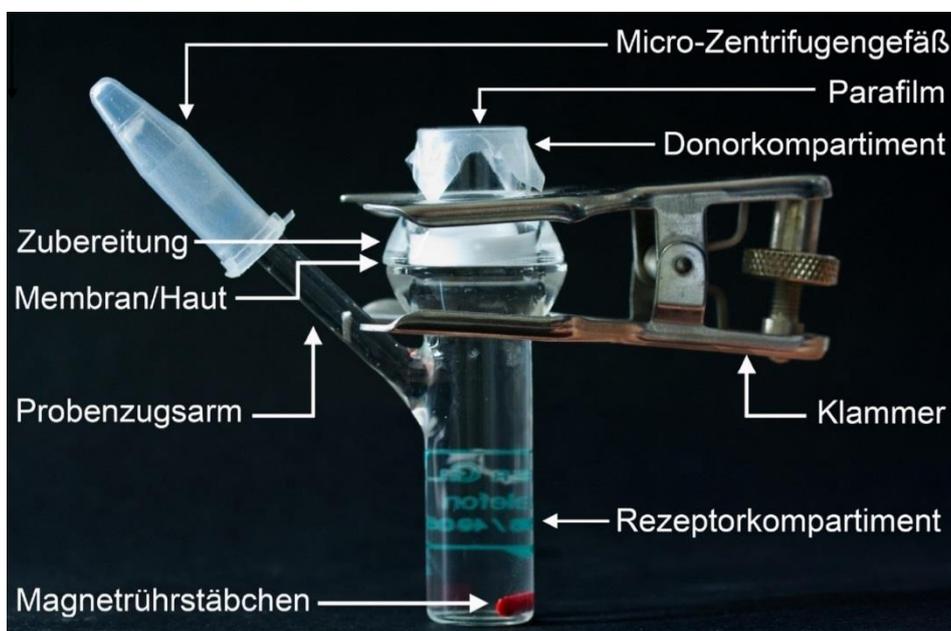


Abbildung 2.3-1: Aufbau der in dieser Arbeit eingesetzten modifizierten Franz-Diffusions-Zelle aus Lunter (2012).

Das Akzeptormedium sollte so gewählt werden, dass es eine möglichst hohe Löslichkeit für den untersuchten Arzneistoff aufweist, sodass während des Beobachtungszeitraums stets sink-Bedingungen (Konzentration des Arzneistoffs im Akzeptorkompartiment ist zu jeder Zeit $< 10\%$ der Sättigungskonzentration) eingehalten werden. Häufig wird isotone Kochsalzlösung oder eine phosphatgepufferte Kochsalzlösung verwendet (Bartosova & Bajgar, 2012). Besonders zur Analytik der Permeation von lipophilen Arzneistoffen kann es unter Umständen erforderlich sein, dem Akzeptormedium Solubilisatoren oder Emulgatoren zuzusetzen. Ein Beispiel ist die Mischung des wässrigen Mediums mit organischen Lösungsmitteln (Bronaugh & Stewart, 1984). Weiterhin finden sich verbesserte Permeationsraten für den Zusatz von Polyethylenglycol-20 und Albumin zum phosphatgepufferten Akzeptormedium (Surber et al., 1991). Der Zusatz von bovinem Serumalbumin kann die Nachweisbarkeit lipophiler Substanzen im Akzeptormedium deutlich verbessern, indem durch Bindung der Arzneistoffe im Akzeptormedium die Sink-Bedingungen aufrechterhalten werden (Cross et al., 2003). Um möglichst gute Vorhersagen über die in vivo Absorption zu erhalten, sollen die Zusätze die Integrität der Membran bzw. die Zusammensetzung und Struktur der Haut während des Beobachtungszeitraums nicht verändern. Zudem sollte das Akzeptormedium einen physiologischen pH-Wert aufweisen (Bartosova & Bajgar, 2012). Besonders geeignet ist daher die Verwendung einer 4%igen bovinen Serumalbuminlösung in Phosphatpuffer. Für ein solches System konnte durch De Lange et al. (1994) belegt werden, dass die Permeationsraten mit denen von Vollblut vergleichbar sind. Bei Langzeit-Untersuchungen zur Arzneistoffabsorption ist es empfehlenswert, dem Akzeptormedium ein geeignetes Konservierungsmittel, z.B. Natriumazid, zuzusetzen (Bode et al., 2007). Zur Durchmischung des Akzeptormediums können Magnetührstäbchen eingesetzt werden. Über den Probenzugsarm können zu den gewünschten Zeitpunkten Proben aus dem Rezeptorkompartiment entnommen werden und so die permeierte Menge an Arzneistoff in Abhängigkeit des Applikationszeitraums ermittelt werden.

Prinzipiell kann in Abhängigkeit der im Donorkompartiment aufgebrauchten Probenmenge zwischen zwei unterschiedlichen Dosierungen unterschieden werden: infinite und finite Dosierung. Bei Experimenten mit infiniter Dosierung wird eine solch große Menge an wirkstoffhaltigem Vehikel auf die Haut aufgebracht, dass die Arzneistoffmenge während des Beobachtungszeitraums nahezu unverändert bleibt. Damit es während dieser Zeit zu keinen unerwünschten Änderungen in der Zusammensetzung des Vehikels kommt, kann es erforderlich sein, das Donorkompartiment nach außen, z.B. durch den Einsatz von Parafilm[®], abzudichten. Obwohl sowohl das Auftragen großer Volumina als auch Okklusionsbedingungen für gewöhnlich keine realistischen Bedingungen widerspiegeln, kann unter diesen Voraussetzungen die Pharmakokinetik der Wirkstoffabsorption aus den untersuchten

Formulierungen mit den charakteristischen Parametern, wie z.B. der Permeationsrate oder des Permeabilitätskoeffizienten, bestimmt und verglichen werden (Bartosova & Bajgar, 2012). Untersuchungen mit finiter Dosis repräsentieren schon eher die Bedingungen einer realistischen Arzneistoffabsorption. Durch die Applikation einer weitaus geringeren Menge, üblicherweise von 1-5 mg/cm² (FDA, 2004), kommt es zu einer sukzessiven Verarmung an Wirkstoff im Donorkompartiment. Bei Untersuchungen mit finiter Dosierung kann daher nicht ein typischer Parameter, wie z.B. die Permeationsrate, angegeben werden, sondern es wird der zeitliche Verlauf der Permeation betrachtet. Bei den geringen Dosierungen ist eine gute Verteilung des Vehikels auf der Haut notwendig, weshalb der Einsatz von Hilfsmitteln zur Applikation und Verteilung des Vehikels sinnvoll ist. In diesen Fällen muss jedoch sichergestellt sein, dass die tatsächlich auf die Haut applizierte Menge erfasst wird (OECD, 2004).

2.3.2 Arzneistoffabgabe aus dermalen Zubereitungen

Die Freigabe eines Arzneistoffs aus einer Formulierung an die Hautoberfläche und sein Transport durch die Haut bis in den systemischen Blutkreislauf ist ein Prozess, der in viele Schritte gegliedert ist. Zu Beginn steht die Auflösung des Stoffes im und seine Freisetzung aus dem Vehikel, an die sich die Passage in die äußerste Hautschicht, das Stratum corneum, anschließt. Der weitere Prozess folgt, wie in 2.2.3 beschrieben, der Diffusion durch das Stratum corneum in die tieferen Hautschichten der lebenden Epidermis bis in die obere Dermis, an die sich letztlich die Aufnahme in die lokalen Blutkapillaren und ein Übergang in den systemischen Blutkreislauf anschließt (Kalia & Guy, 2001).

Da diese Schritte sequenziell ablaufen, ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in diesem Prozess immer der langsamste. Für Arzneistoffe ist meist der Transit durch das Stratum corneum der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Bei besonders lipophilen Arzneistoffen stellt allerdings der Übertritt in die tieferliegenden, polaren Schichten den langsamsten Schritt im Absorptionsprozess dar. Um gerade für transdermal wirksame Substanzen effektive Wirkspiegel zu erhalten, die sich konstant im Rahmen des therapeutischen Fensters bewegen, ist es auch aus Gründen der interindividuellen Variabilität der Haut günstig, wenn die Freisetzung des Arzneistoffs aus der Formulierung durch kontrollierte Freigabe den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt (Kalia & Guy, 2001).

Guy & Hadgraft (1992) haben ein Modell generiert, mit dem überprüft werden kann, ob die Haut einen Einfluss auf den Absorptionsprozess hat, oder die Freisetzung aus der Formulierung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Absorption darstellt. Dazu haben sie die freigesetzte Menge aus einem transdermalen Pflaster, das direkt im Kontakt mit dem Akzeptormedium steht, mit der freigesetzten Menge verglichen, wenn zwischen Pflaster und Medium Haut als Membran angebracht wurde. Das Verhältnis der freigesetzten Mengen mit Membran zu der ohne Membran beschreibt den Einfluss der Haut auf die Wirkstoffaufnahme. Ist dieses Verhältnis < 1 , so stellt die Haut ein regulierendes Element zur Wirkstoffabsorption dar. Wird jedoch ein Verhältnis von 1 erhalten, so stellt die Freisetzung aus dem Vehikel den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Wirkstoffabsorption dar.

Higuchi (1961) hat die Freigabe suspendierter Arzneistoffpartikel aus einer halbfesten Zubereitung untersucht. Das Vorhandensein ungelöster Partikel im Vehikel ist nicht unbedingt gleichbedeutend damit, dass die Freisetzung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Wirkstoffabsorption darstellt. Ein Suspensionssystem ist jedoch ein Hinweis für einen langsamen Diffusionsprozess, der einen beherrschenden Einfluss auf die weitere Absorption darstellt. Unter der Voraussetzung, dass die suspendierten Partikel wesentlich kleiner sind als

die Schichtdicke der Haut, zeigte sich, dass die in das Stratum corneum aufgenommene Menge pro Fläche wie folgt berechnet werden kann:

$$Q = \sqrt{(2 \cdot c_0 - c_s) \cdot D \cdot c_s \cdot t}$$

Gleichung 2.3-1: Berechnung der aus Suspensionszubereitung freigesetzten Wirkstoffmenge pro Fläche.

- Q = Freigesetzte Arzneistoffmenge/Fläche
- c_0 = Ausgangskonzentration in der Formulierung
- c_s = Sättigungskonzentration im Vehikel
- D = Diffusionskoeffizient des Arzneistoffs im Vehikel
- t = Zeit

Da für Suspensionen angenommen werden kann, dass $c_s \ll c_0$, kann Gleichung 2.3-1 vereinfacht werden zu:

$$Q = \sqrt{2 \cdot c_0 \cdot D \cdot c_s \cdot t}$$

Gleichung 2.3-2: Vereinfachte Darstellung der obenstehenden Gleichung.

Aus Gleichung 2.3-2 ist abzulesen, dass die freigesetzte Arzneistoffmenge pro Fläche direkt proportional zur Wurzel der Zeit ist. Dabei bestimmen die physikochemischen Eigenschaften des verwendeten Arzneistoffs durch die während der Freisetzung in der Regel konstant bleibenden Parameter c_0 , c_s und den Diffusionskoeffizienten den exakten Faktor. Dieser Zusammenhang gilt allerdings nur dann, wenn die kumulativ freigesetzte Menge 30 % der aufgetragenen Arzneistoffmenge unterschreitet (Guy & Hadgraft, 1990). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die Abhängigkeit der freigesetzten Menge zur Wurzel der Zeit nicht nur für topisch applizierte Formulierungen gilt, in denen der Wirkstoff suspendiert vorliegt, sondern auch bei Formulierungen mit diffusionskontrollierten Polymermatrices Anwendung findet (Crowley et al., 2004; Paul, 2011).

Selbstverständlich ist zu beachten, dass diese Gleichungen allenfalls Näherungen sein können, da topisch eingesetzte Formulierungen nur selten homogene Systeme darstellen. So können beispielsweise Hilfsstoffe mit dem Wirkstoff interagieren, was die Freisetzung direkt beeinflusst. Zudem kann es nach der Applikation zu einer Metamorphose der aufgetragenen Formulierung kommen, die das Freisetzungsverhalten stark verändern kann.

2.3.3 In vitro Freisetzungsuntersuchungen

In vitro Freisetzungsuntersuchungen werden durchgeführt, um die Freisetzung von Substanzen und die Freisetzungparameter, wie z.B. die Freisetzungsrates, aus Vehikeln unter der Verwendung chemisch definierter Membranen zu bestimmen. Dadurch kann der Einfluss des Vehikels auf die Wirkstofffreisetzung direkt ermittelt werden. Insbesondere Variationen in der Zusammensetzung der Formulierungen oder des Herstellungsprozesses können die Wirkstofffreisetzung beeinflussen, weshalb Freisetzungsuntersuchungen auch ein Mittel in der Formulierungsentwicklung oder zur Überprüfung der gleichbleibenden Qualität dermalen Formulierungen darstellen. Ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Wirkstofffreisetzung stellt dabei die Verwendung von Diffusionszellen nach Franz (1975) dar (Shah et al., 1999; Siewert et al., 2003).

Im Gegensatz zu Untersuchungen mit biologischem Material als Membran, bei denen auch Rückschlüsse auf die physiologische Absorption gezogen werden sollen, sollen bei Freisetzungsuntersuchungen bewusst solche Membranen verwendet werden, die es erlauben, dass nicht die Membran, sondern die Wirkstofffreisetzung aus dem Vehikel zum geschwindigkeitsbestimmenden Prozess wird (Zatz, 1995). Der Einsatz poröser synthetischer Membranen, die zudem weder mit der Formulierung noch mit dem Akzeptormedium interagieren, ist zu empfehlen (Shah et al., 2003).

In vitro Freisetzungsuntersuchungen stellen also ein geeignetes Modell dar, um den Einfluss des Vehikels in einer dermalen Zubereitung zu untersuchen und dadurch gegebenenfalls Optimierungen in der Zusammensetzung vorzunehmen, bevor die Absorption in die Haut analysiert wird. Sie können allerdings keine Aussage über die in vitro/in vivo Korrelation treffen, insofern nicht gesichert ist, dass die Freisetzungsrates aus dem Vehikel langsamer erfolgt als die Absorption in und durch die Haut (Guy & Hadgraft, 1992).

2.3.4 Vergleich von Humanhaut und postaurikularer Schweinehaut

Um möglichst aussagekräftige Ergebnisse zur perkutanen Absorption von Arzneistoffen zu erhalten, sollte die verwendete Haut soweit wie möglich der des Menschen gleichen. Die Verwendung von Humanhaut ist sicherlich als Goldstandard anzusehen, allerdings ist die Verwendung aus ethischen und logistischen Gesichtspunkten häufig eingeschränkt. Humanhaut ist im Vergleich zu tierischer Haut meist dicker und wesentlich geringer behaart. Dies erklärt, weshalb die Arzneistoffpermeation bei der Verwendung von tierischer Haut im Vergleich zur Humanhaut tendenziell höher ist (M. Walker et al., 1983). Da die Morphologie und Histologie der Haut von Tier zu Tier unterschiedlich ist, ist die Wahl des Tiermodells entscheidend. Gerade im Hinblick auf das Verhältnis zwischen Hautfläche und Körpergewicht ist die Haut von Schweinen gegenüber der von kleineren Labortieren überlegen. Das histologische Erscheinungsbild der Haut ist bei Mensch und Schwein ähnlich (Simon & Maibach, 2000). Ein weiterer Vorteil von Schweinehaut ist die mit Humanhaut vergleichbare Dicke der einzelnen Hautschichten, während diese bei den üblicherweise verwendeten Nagetieren, wie z.B. Mäusen, aufgrund der geringeren Körpergröße deutlich dünner ist (Barbero & Frasc, 2009; Jung & Maibach, 2015). Zudem ist Schweinehaut wesentlich geringer behaart als die Haut von beispielweise Nagetieren oder Affen und ähnelt der durchschnittlichen Behaarung von Humanhaut (Capt et al., 2007). Der follikuläre Transport stellt eine nicht zu unterschätzende Möglichkeit zur Arzneistoffabsorption dar, weshalb eine dichtere Behaarung zu vergleichsweise höheren Absorptionsraten führen kann. Dies konnte anhand mehrerer Studien belegt werden (Hadgraft, 2001; Knorr et al., 2009; Schaefer & Lademann, 2001). Während die Absorption von Arzneistoffen bei gewöhnlichen Labortieren wie Ratten, Kaninchen oder Mäusen gemeinhin höher liegt als beim Menschen, kann durch die Verwendung von Schweinehaut eine bessere Vorhersage für die in vivo Absorption in Humanhaut getroffen werden (Barbero & Frasc, 2009; Jung & Maibach, 2015). Aus diesen Gründen stellt Schweinehaut ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung der perkutanen Wirkstoffabsorption dar. Bei der Verwendung von Schweinehaut ist darauf zu achten, dass eine möglichst gering behaarte Stelle (z.B. Haut von der Rückseite der Ohrmuschel) gewählt wird. Weitere Voraussetzungen sind, dass die Haut keine Verletzungen oder Hämatome aufweist, die die Absorption merklich beeinflussen könnten. Selbstverständlich können realistische Werte nur dann erzielt werden, wenn die Haut in ungebrühtem Zustand eingesetzt wird. Ebenfalls zu berücksichtigen ist, dass sich wie beim Menschen eine Variabilität der Hautstruktur in Abhängigkeit des Alters und der Vorerkrankungen des Spendertiers ergibt. Deshalb unterliegen diese Studien zwangsläufig größeren Schwankungen, als dies z.B. bei Freisetzungsuntersuchungen, die mit synthetisch hergestellten Membranen und definierten Porengrößen durchgeführt werden, zu beobachten ist.

2.3.5 Ex vivo Permeations- und Penetrationsuntersuchungen

Franz-Diffusionszellen sind nicht nur geeignet, um die Wirkstofffreisetzung mittels synthetischer Membranen zu ermitteln, sondern auch um die Permeation durch bzw. die Penetration von Substanzen in die Haut zu simulieren. Der Unterschied zu in vitro Freisetzungsuntersuchungen besteht darin, dass statt einer Filtermembran nun Haut als Barriere zum Akzeptormedium verwendet wird, was weitaus realistischere Bedingungen widerspiegelt. Unter anderem aus logistischen Gründen ist es nicht immer möglich, die Haut direkt für Absorptionsuntersuchungen weiter zu verwenden, weshalb ein Einfrieren des Probenmaterials oft unumgänglich ist. Vor dem Einfrieren ist die Entfernung des subkutanen Gewebes empfehlenswert, da es die Handhabung im weiteren Verlauf erleichtert (Bartosova & Bajgar, 2012). Eine Lagerung der Haut über mehrere Monate im gefrorenen Zustand hat keinen Einfluss auf die Permeabilität der Haut nach dem Auftauen (Harrison et al., 1984). Ein erneutes Einfrieren sollte jedoch vermieden werden, da dies die Permeabilität der Haut erhöhen kann (Swarbrick et al., 1982). Eine weitere Herausforderung stellt die Präparation der Hautstücke dar. Im Hinblick auf die permeierten Mengen sind große Unterschiede zu erwarten, wenn entweder Vollhaut oder Spalthaut verwendet wird. Verbleibt z.B. ein Großteil der wasserreichen Dermis als Teil der Membran, wird sich gerade für lipophile Arzneistoffe eine Diffusionsbarriere ausbilden, die zu einer unrealistisch niedrigen Permeation führt. Dies ist insbesondere darauf zurückzuführen, dass der Blutfluss innerhalb der Dermis und damit ein möglicher Abtransport bei ex vivo Untersuchungen nicht aufrechterhalten werden kann (Barbero & Frasch, 2009). Für lipophile Arzneistoffe und Versuche mit Schweinehaut eignet sich daher die Anwendung von Spalthaut, die mittels eines Dermatoms auf die gewünschte Dicke getrimmt werden kann. Eine gleichmäßige Dicke der exzidierten Haut ist dabei nicht nur abhängig von den Einstellungen am Dermatome, sondern auch von der Handhabung des Anwenders. Unterschiedliche Anpresskräfte und Arbeitswinkel beeinflussen die Dicke der Membran, was zu hohen intralaboratorischen Variationen bei der Wirkstoffpermeation führen kann (Barbero & Frasch, 2009). In einer groß angelegten Studie, bei der die Permeation von drei verschiedenen Arzneistoffen an Humanhaut untersucht wurde, kam es zu intralaboratorischen Abweichungen von 6 % bis 111 % (van de Sandt et al., 2004). Für eine bessere Vergleichbarkeit der Werte untereinander soll daher idealerweise die Haut desselben Schweins für alle zu vergleichenden Formulierungen oder Wirkstoffe verwendet werden und die Präparation möglichst durch denselben Präparator erfolgen.

Während man mit Penetration das Eindringen einer Substanz in die Strukturen der Haut bezeichnet, wird unter Permeation die Passage eines Arzneistoffs von einer Hautschicht in eine strukturell anders aufgebaute Schicht verstanden. Abhängig von den physikochemischen

Eigenschaften der Substanz permeiert der Arzneistoff in tiefere Hautschichten. Erreicht er die dort befindlichen Blut- oder Lymphgefäße und gelangt so in den systemischen Blutkreislauf, wird von einer Absorption des Arzneistoffs gesprochen (Hwa et al., 2011).

Bei ex vivo Untersuchungen an exzidierte Haut spricht man stattdessen von einer Permeation des Arzneistoffs, wenn dieser den gesamten Querschnitt der Haut durchquert hat und im Akzeptormedium nachweisbar wird (Lunter, 2012). Hier werden abhängig vom Ziel der Studien entweder Untersuchungen mit infiniten Dosierung zur Bestimmung der Permeationsparameter oder anwendungsorientierte Untersuchungen mit finiter Dosierung durchgeführt. Um den zeitlichen Verlauf der Permeation eines Arzneistoffs durch die Haut darzustellen, werden zu mehreren Zeitpunkten innerhalb des Beobachtungszeitpunkts Proben aus dem Akzeptormedium entnommen und auf ihren Gehalt an Arzneistoff untersucht.

Im Gegensatz zu Permeationsuntersuchungen wird bei Penetrationsuntersuchungen der Gehalt in den einzelnen Hautschichten analysiert. Die Inkubation kann dabei erneut in Franz-Diffusionszellen erfolgen, wobei in diesem Fall der Fokus auf dem Arzneistoffgehalt innerhalb der Haut und nicht im Akzeptormedium liegt. Als Alternative zu den Franz-Diffusionszellen kann beispielsweise das Saarbrückener Penetrationsmodell verwendet werden, bei dem kein flüssiges Akzeptormedium benötigt wird, wodurch eine nichtphysiologische Hydratation der Haut vermieden werden soll (Wagner et al., 2000). Beiden Modellen ist gemeinsam, dass die Zubereitung für eine bestimmte Zeit auf die Haut aufgetragen wird. Nach erfolgter Inkubation wird die Haut der Diffusionszelle entnommen und segmentiert. Es können prinzipiell zwei Methoden zur Segmentierung der Haut unterschieden werden: Einerseits kann das Stratum corneum mit einem einseitig haftenden Klebeband Schicht für Schicht abgenommen werden (Klebebandabriss-Technik), andererseits können durch exakte Gefrierschnitte mit einem Kryo-Mikrotom einzelne Hautschichten segmentiert und gesammelt werden. Auch eine Kombination der beiden Techniken ist denkbar. So kann zunächst das Stratum corneum mittels des Klebebands abgetragen und anschließend die tieferen Hautschichten mit einem Kryo-Mikrotom segmentiert werden (Wagner et al., 2000). Eine weitere Möglichkeit stellt die Entfernung des Stratum corneum mittels einer Cyanoacrylatbiopsie dar, die mit den bereits genannten Methoden kombiniert werden kann (Lademann et al., 2009; Ossadnik et al., 2007; Teichmann et al., 2005). Die Auswertung erfolgt in der Regel durch Extraktion des Arzneistoffs aus der Haut und anschließender Gehaltsbestimmung. Penetrationsuntersuchungen sind vor allem dahingehend interessant, dass mit ihnen Profile erstellt werden können, die den Wirkstoffgehalt in charakteristischen Hautschichten beschreiben.

2.3.6 Konfokale Raman-Mikroskopie zur Untersuchung der Penetration von Arzneistoffen

Die Untersuchung der Wirkstoffpenetration in die Haut kann häufig nur ex vivo/in vitro durchgeführt werden. Auch wenn manche Untersuchungen, wie z.B. die Klebebandabriss-Technik, auch in vivo durchgeführt werden können, so ist allen Methoden gemeinsam, dass sie mehr oder weniger invasiv sind. Penetrationsuntersuchungen mit optischen Methoden, wie z.B. der abgeschwächte Totalreflexion-Infrarotspektroskopie (ATR-IR) oder der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM), werden bereits erfolgreich durchgeführt. Allerdings zeigen sie entweder ein niedriges räumliches Auflösungsvermögen (ATR-IR) oder können nur für fluoreszenzaktive Substanzen (CLSM) eingesetzt werden (Alvarez-Roman et al., 2004; Gotter et al., 2008; Mendelsohn et al., 2006). Eine nicht-invasive Methode zur Untersuchung der Wirkstoffpenetration, die zudem in vivo angewendet werden kann und ein gutes Auflösungsvermögen zeigt, ist die konfokale Raman-Mikroskopie (Caspers et al., 2001). Das Raman-Mikroskop kombiniert die optische Mikroskopie mit der konfokalen Raman-Spektroskopie.

Die konfokale Raman-Spektroskopie ist ähnlich der IR-Spektroskopie eine Schwingungsspektroskopie, die jedoch auf einer unelastischen Lichtstreuung beruht. Wird die zu untersuchende Probe mit monochromatischem Laserlicht bestrahlt, so treten Wechselwirkungen zwischen den einfallenden Photonen und den Molekülen der Probe auf, was zu einer Streuung des Lichts führt. Dabei wird ein definierter Energiegehalt des Photons auf das Molekül übertragen und eine Schwingung angeregt. Daraus folgt wiederum, dass ein Teil der Lichtstreuung bei einer höheren Wellenlänge als der des einfallenden Lichts detektiert wird. Die übertragene Energie hängt dabei von den Massen der Atome ab, die an der Schwingung beteiligt sind. Dieser Teil wird als Stokes- (höheres Energieniveau als der Grundzustand) bzw. Anti-Stokes-Streuung (niedrigeres Energieniveau als der Grundzustand) bezeichnet. Beide beschreiben den sogenannten Raman-Effekt. Ein bedeutend größerer Teil erfährt keine Änderung, dieser wird als Rayleigh-Streuung bezeichnet. Die konfokale Raman-Mikroskopie wurde bereits vielfältig eingesetzt, um die Zusammensetzung und Struktur der Haut (Gniadecka et al., 1998; Wartewig et al., 1998), den Wassergehalt in der Haut (Caspers et al., 2001) und die Penetrationstiefe oder Verteilung von Arzneistoffen (Franzen et al., 2013; Mateus et al., 2013) zu bestimmen. In den meisten Fällen wurden jedoch entweder gesättigte Lösungen der Modellarzneistoffe oder aber pharmakologisch nicht einsetzbare aber im Raman-Mikroskop gut detektierbare Substanzen eingesetzt. In einer weiteren Studie wurde die ex vivo Penetration und die Verteilung von Procain-HCl in die Haut aus einer halbfesten Zubereitung dargestellt und sowohl mit einer üblichen Permeationsmethode als auch einer

invasiven Methode zur Untersuchung der Arzneistoffpenetration verglichen (Lunter & Daniels, 2014). Bei den meisten Untersuchungen zur Detektion der Wirkstoffabsorption mittels konfokaler Raman-Mikroskopie finden sich allerdings keine Hinweise darauf, inwiefern und wie effektiv die Formulierung nach der Inkubation von der Haut abgetragen wurde. Dass eine rückstandlose Entfernung der Formulierung vor der Analyse im Raman-Mikroskop für aussagekräftige Ergebnisse wesentlich ist, hat Lunter (2016) gezeigt.

Wird Haut unter dem konfokalen Raman-Mikroskop betrachtet, so ist vor allem eine scharfe Bande im Bereich zwischen 2800 und 3000 cm^{-1} zu erkennen. Diese wird typischerweise der C-H-Streckschwingung zugeordnet, die aufgrund des hohen Gehalts an lipophilen Bestandteilen der Lipidmatrix in der Haut, wie z.B. Ceramiden, Cholesterol und freien Fettsäuren, und teilweise auch durch Keratin bedingt, besonders stark ausgeprägt ist. Um einen Arzneistoff mittels Raman-Spektroskopie in der Haut nachweisen zu können, ist es daher nicht empfehlenswert, den Bereich der C-H-Streckschwingung zur Detektion heranzuziehen. Durch den Austausch der Wasserstoffatome durch Deuterium entstehen in einem organischen Molekül C-D-Bindungen, die hervorragend im Raman-Spektrum zu detektieren sind. Xiao et al. (2005) haben dies bereits genutzt, um die Permeation deuterierter Phospholipide in die Haut zu untersuchen. Jedoch wurde erst für wenige deuterierte Arznei- bzw. Hilfsstoffe ein Penetrationsprofil mittels konfokaler Raman-Mikroskopie erstellt. Zudem wurde in diesen Fällen eine hochkonzentrierte Lösung eines deuterierten Modellarzneistoffs (90 % der Sättigungslöslichkeit) verwendet (Saar et al., 2011). In einer dieser Dissertation vorangegangenen Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass durch Deuterierung der Methoxygruppe des Modellarzneistoffs Nonivamid ein Nachweis der Penetration von $[D_3]$ -Nonivamid in die Haut aus einer 10%igen ethanolischen Lösung möglich ist (Heck, 2012). Es wird vermutet, dass eine Deuterierung der Amid-Seitenkette des Moleküls die Detektion aus niedriger konzentrierten Lösungen oder sogar die Detektion aus einer therapeutisch anwendbaren halbfesten Formulierung ermöglicht.

3 Materialien und Methoden

3.1 Verwendete Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien, Hilfsstoffe und Verbrauchsmaterial

3.1.1.1 Chemikalien und Hilfsstoffe

Tabelle 3.1-1: Chemikalien und Hilfsstoffe.

Artikel	Hersteller
Acetonitril	Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE-Karlsruhe
Ammoniak (25 %)	Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis
C12-15 Alkylbenzoat	Stéarinerie Dubois, FR-Boulogne Billancourt
Celite®	Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis
Cetylalkohol	Henkel AG & Co. KG aA, DE-Düsseldorf
Chloroform, deuteriert	Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis
Davisil® LC60A 20-45 µm	W. R. Grace & Co. Corporation, US-Columbia
DePeX mounting medium	VWR International, US-Radnor
Deuteroxid	Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis
Dichlormethan	Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham
Dimethylformamid, Extradry, AcroSeal™	Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham
Dinatriummonohydrogenphosphat-Dihydrat	Caesar & Loretz GmbH, DE-Hilden
Dinatriummonohydrogenphosphat-Dodecahydrat	Caesar & Loretz GmbH, DE-Hilden
Dioxan	CVU, DE-Tübingen
Eosin-G-Lösung 0,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE-Karlsruhe
Ethanol 90 % (V/V)	CVU, DE-Tübingen
Ethanol HPLC gradient grade	Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis
Ethylacetat	CVU, DE-Tübingen
Eudragit® FS 30D	Evonik Industries AG, DE-Essen
Eudragit® NE 30D	Evonik Industries AG, DE-Essen
Eudragit® RL 30D	Evonik Industries AG, DE-Essen
Eudragit® RS 30D	Evonik Industries AG, DE-Essen
Geduran® Si60 63-200	Merck KGaA, DE-Darmstadt
Glycerolmonostearat (Cutina GMS®)	Cognis BASF SE, DE-Ludwigshafen a. Rhein
Hämatoxylin-Lösung nach Harris	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE-Karlsruhe
Isopropylmyristat (Crodamol™ IPM)	Croda Iberica SA, ES-Barcelona
Kaliumchlorid	Caesar & Loretz GmbH, DE-Hilden

Kaliumdihydrogenphosphat	Caesar & Loretz GmbH, DE-Hilden
Kaliumhydrogensulfat	Caesar & Loretz GmbH, DE-Hilden
Kollicoat SR® 30D	BASF SE, DE-Ludwigshafen a. Rhein
Macrogol-20-glycerolmonostearat (Tagat S2®)	Evonik Industries AG, DE-Essen
Mandelöl, raffiniertes	Caesar & Loretz GmbH, DE-Hilden
Methanol	CVU, DE-Tübingen
Methanol HPLC gradient grade	Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis
Mittelkettige Triglyceride (Myritol® 318)	BASF SE, DE-Ludwigshafen a. Rhein
Natrium	Riedel-de-Haën AG, DE-Selze
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis
Natriumhydroxid	CVU, DE-Tübingen
Natriumnitrit	Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis
Natriumsulfat	CVU, DE-Tübingen
NEG 50™	Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham
Nonivamid	Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis
Paraffinum liquidum (Ph. Eur.)	Hansen & Rosenthal KG, DE-Hamburg
Petrolether	CVU, DE-Tübingen
Phosphorsäure 85 %	Caesar & Loretz GmbH, DE-Hilden
Polysorbat 80	Croda Iberica SA, ES-Barcelona
Rizinusöl, raffiniertes	Caesar & Loretz GmbH, DE-Hilden
Salzsäure	CVU, DE-Tübingen
Silica, mesoporös (Syloid® 244 FP)	W. R. Grace & Co. Corporation, US-Columbia
Silica, mesoporös (Syloid® XDP 3050)	W. R. Grace & Co. Corporation, US-Columbia
Thionylchlorid	Honeywell Specialty Chemicals GmbH, DE-Seelze
Triethylcitrat	Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis
Vanillylamin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis
Weißes Vaseline (Ph. Eur.)	Hansen & Rosenthal KG, DE-Hamburg

3.1.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 3.1-2: Verbrauchsmaterial.

Klassierung	Bezeichnung	Hersteller
Cyanoacrylat-Klebstoff	UHU Sekundenkleber (1645570)	UHU GmbH & Co. KG, DE-Bühl/Baden
DC-Kieselgelplatten	60 F ₂₅₄	Merck KGaA, DE-Darmstadt
Gefäß	PP 50 Becher transparent,	Hauschild GmbH & Co. KG, DE-Hamm
Filter	Membranfilter aus PTFE Porenweite 5 µm, Ø=25 mm	Sartorius AG, DE-Göttingen
Filter	MS Nylon Syringe Filter Porenweite: 0,22 µm	Membrane solutions, US-Bellevue
Folie	Aluminiumfolie	Cofresco Frischhalteprodukte GmbH & Co. KG, DE-Minden
Folie	D-squame® tapes.	CuDerm, US-Dallas
Folie	Doppelseitiges Klebeband	Tesa SE, DE-Norderstedt
Folie	Parafilm®	Bermis Company Inc., US-Oshkosh
Folie	tesafilm®	Tesa SE, DE-Norderstedt
HPLC-Analytik	Aluminium crimp cap	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren
HPLC-Analytik	Crip neck vials	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren
HPLC-Analytik	Inserts (0,2 mL) for vials with wide opening	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren
HPLC-Analytik	PP screw cap	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren
HPLC-Analytik	Säule EC 125/4 Nucleosil 100-5 C8	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren
HPLC-Analytik	Säule Luna 150-4,6 C8, 5 µm	Phenomenex Inc., US-Torrance
HPLC-Analytik	Screw neck vials	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren
HPLC-Analytik	Vorsäule EC 4/3 Universal RP	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren
Kanülen	Sterican® 0,80 x 120 mm	B. Braun Melsungen AG, DE-Melsungen

Kanülen	Sterican® 0,90 x 40 mm	B. Braun Melsungen AG, DE-Melsungen
Klingen	Dermatomklingen BD228R	Aesculap AG, DE-Tuttlingen
Klingen	Skalpellklingen Nr. 22	B. Braun Melsungen AG, DE-Melsungen
Klingen	MX Premier+ Microtome Blade	Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham
LC-MS/MS-Analytik	Säule Zorbax Eclipse XDB-C8“ 150/4,6, Partikelgröße 3,5 µm	Agilent Technologies Inc., US-Santa Clara
Mikroreaktionsgefäß	Super Clear™ 2,0 mL	VWR International, US-Radnor
Objektträger	Microscope Slides	VWR-International, US-Radnor
Objektträger	Menzel Gläser Superfrost® Plus	Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham
Papiertücher	Papiertücher	Wepa Apothekenbedarf GmbH & Co. KG, DE-Hillscheid
Polystyrol-Platten	Styrodur	Saint-Gobain Isover G+H AG, DE-Ludwigshafen a. Rhein
Schliff fett	Laborfett glisseal HV	Borer Chemie AG CH-Zuchwil
Schlinggazetupfer	Schlinggazetupfer unsteril, Gr. 5	Fuhrmann GmbH, DE-Much
Spritzen	Injekt® Solo 2 mL	B. Braun Melsungen AG, DE-Melsungen
Spritzen	Injekt®-F 1 mL	B. Braun Melsungen AG, DE-Melsungen
Spritzen	Omnifix® Solo 10 mL	B. Braun Melsungen AG, DE-Melsungen
Spritzen	Omnifix® Solo 20 mL	B. Braun Melsungen AG, DE-Melsungen
Spritzen	Omnifix® Solo 5 mL	B. Braun Melsungen AG, DE-Melsungen
Spritzen	Original-Perfusor®-Spritze 50 mL	B. Braun Melsungen AG, DE-Melsungen
Transdermales Pflaster	Placebo-Formulierung	UCB, BE-Anderlecht

3.1.2 Geräte

Tabelle 3.1-3: Geräte.

Klassierung	Bezeichnung	Hersteller
Aluminiumbehältnisse zum Einfrieren der Hautproben	Eigenanfertigung	Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts, DE-Tübingen
Applikationshilfe aus Plexiglas	Eigenanfertigung	Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts, DE-Tübingen
DCMS		Advion Inc., US-Ithaca
Dermatom	GA 630	Aesculap AG, DE-Tuttlingen
Dichtemessgerät	DMA 4500	Anton Paar GmbH, AT-Graz
Edelstahlzylinder mit zugehörigen Pins	Eigenanfertigung	Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts, DE-Tübingen
Edelstahlreaktor, teflonbeschichtet	Eigenanfertigung	Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts Tübingen, DE-Tübingen
Filmziehgerät	Eigenanfertigung	Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts Tübingen, DE-Tübingen
Flash-Chromatographiesystem	puriFlash® 430	Interchim SA, FR-Montluçon
Franz-Diffusionszellen, modifiziert	Franz-Diffusionszellen, modifiziert	Gauer Glas, DE-Püttlingen
Freisetzungsapparatur	AT 7	Sotax AG, CH-Aesch
Gefriertrockner	Lyovac GT2	Amsco Finn-Aqua, DE-Hürth
Gestell (Fixierung der Franz-Zellen)	Eigenanfertigung	Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts, DE-Tübingen

Haarschneider	Philips QC5115/15 Series 3000	Philips Consumer Lifestyle BV, NL-Amsterdam
HPLC-Analytik (Mechanische Eigenschaften, Freisetzung, Arzneistoffabsorption)	<i>LC-20-A prominence</i> Autosampler SIL-20A Detektor SPC 20A Entgaser DGK-20A5 Kommunikationsmodul CBM-20A Ofen CTO-10ASVP Pumpe LC-20AT	Shimadzu Corporation, JP-Kyoto
HPLC-Analytik (Synthese)	<i>HP 1090 Series II LC</i>	HP Inc., US-Palo Alto
Kugelmühle	Horizontalkugelmühle mit Porzellankugeln	Horvath GmbH, DE-Heidelberg
Kryo-Mikrotom	Microm HM 560	Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham
Labormischer	P22-L05 L01	Somakon Verfahrenstechnik OG, DE- Lünen
Labormischer	SpeedMixer™ DAC 150.1 FVZ	Hauschild GmbH & Co. KG, DE-Hamm
LC-MS/MS	Chromatograph: ACELLA chromatograph Massenspektrometer: TSQ Quantum Access MAX	Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham
Lichtmikroskop	Axio Imager Z.1	Carl Zeiss Jena GmbH, DE-Jena
Locheisen	Henkellocheisen Turnus Werkzeugfabrik 15 mm	Eduard Gottfried Ferne GmbH, DE-Remscheid
Locheisen	Henkellocheisen Turnus Werkzeugfabrik 25 mm	Eduard Gottfried Ferne GmbH, DE-Remscheid
Locheisen	Henkellocheisen Turnus Werkzeugfabrik 30 mm	Eduard Gottfried Ferne GmbH, DE-Remscheid
Magnetrührer	Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph Instruments GmbH, DE-Schwabach

Magnetrührer	Variomag Poly 15	Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham
Materialprüfer	DO-FB0.5TS	Zwick GmbH & Co. KG, DE-Ulm
NMR-Spektrometer	Avance 200 MHz	Bruker Corporation, US-Billerica
NMR-Spektrometer	Avance 400 MHz	Bruker Corporation, US-Billerica
pH-Meter	S20 – SevenEasy™ pH	Mettler Toledo, US-Columbus
Messung der Hautverträglichkeit	<i>Erythemindex</i> Mexameter® MX 18 <i>Hydratation des Stratum corneum</i> Cutometer® MPA 580 <i>Transepidermaler Wasserverlust</i> Tewameter® TM 210	Courage+Khazaka electronic GmbH, DE-Köln
Pipette	Eppendorf Research® plus, 20- 200 µL	Eppendorf AG, DE-Hamburg
Pipette	Eppendorf Research® plus, 100- 1000 µL	Eppendorf AG, DE-Hamburg
Pipette	Transferpipette® 500-5000 µL	BRAND GmbH & Co. KG DE-Wertheim
Raman-Mikroskop	<i>alpha 500</i> Spektrometer UHTS 300 CCD-Kamera DV401—BV	WITech GmbH, DE-Ulm
Rasterelektronenmikroskop	DM S940 A	Carl Zeiss Jena GmbH, DE-Jena
Rotationsverdampfer	Rotavapor	Büchi Laboratoriums- Technik AG, CH-Flawil
RO-Wasser-Anlage	ELGA Purelab Option-Q ELGA Reservoir 25 L	ELGA Labwater GmbH, DE-Celle
Sputtercoater	E 5100	Bio-Rad GmbH, DE-München
Teflon-Apparatur zur Fixierung von Hautproben	Eigenanfertigung	Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts, DE-Tübingen

Materialien und Methoden

Thermostat (Absorptionsuntersuchungen)	Alpha A	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, DE-Lauda-Königshofen
Thermostat (Gefriertrockner)	FP 50/MH	Julabo GmbH, DE-Seelbach
Trockenschrank	Heraeus T5042	Heraeus Holding GmbH, DE-Hanau
Vortex Mixer	SA8	Techne Inc., US-Burlington
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 510/H	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, DE-Berlin
Ultraschallbad	Sonorex RK102H	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, DE-Berlin
UV-Lampe	254 nm/356 nm	Desaga GmbH, DE-Wiesloch
Vakuumpumpe (Gefriertrockner)	Drehschieber-Vakuumpumpe Trivac B	Leybold GmbH, DE-Köln
Vakuumpumpe (Synthese)	P 30 DF Drehschieber- Vakuumpumpe,	Ilmvac GmbH, DE-Ilmenau
Waage	AE 200-S (d=0,0001 g)	Mettler Toledo, US-Columbus
Waage	Excellence E 5500 S (d=0,01 g)	Sartorius AG, DE-Göttingen
Waage	Extend ED224S (d=0,0001 g)	Sartorius AG, DE-Göttingen
Waage	Extend ED4202S-CW (d=0,01 g)	Sartorius AG, DE-Göttingen
Waage	XP 205 DR	Mettler Toledo, US-Columbus
Wasserbad	T020	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, DE-Lauda-Königshofen
Zentrifuge	Centric 90	BU Laboratory Systems, SL-Zelezniki
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Heraeus Holding GmbH, DE-Hanau
Zentrifuge	Minispin®	Eppendorf AG, DE-Hamburg

Zentrifugengläser	Duran®	Duran Group GmbH, DE-Wertheim
-------------------	--------	----------------------------------

3.1.3 Software

Tabelle 3.1-4: Software.

Art	Software	Hersteller
DCMS	Mass Express	Advion Inc., US-Ithaca
Flash-Chromatographie	Interchim Software 5.1	Interchim SA, FR-Montluçon
HPLC (Mechanische Eigenschaften, Freisetzung, Arzneistoffabsorption)	Shimadzu LC-Solution 1.21 SP1	Shimadzu Corporation, JP-Kyoto
HPLC (Synthese)	HP ChemStation	HP Inc., US-Palo Alto
Lichtmikroskop	AxioVision Rel. 4.6.3	Carl Zeiss Jena GmbH, DE-Jena
Materialprüfer	testXpert XLine	Zwick GmbH & Co. KG, DE-Ulm
NMR	Bruker TopSpin 3.5	Bruker Corporation, US-Billerica
Raman-Mikroskop	WITech Control/Project	WITech GmbH, DE-Ulm
Rasterelektronenmikroskop	Orion 5.25	E.L.I. microscopy, BE-Charleroi
Tabellenkalkulation	Microsoft Excel 365	Microsoft Corporation, DE-Redmond
Textverarbeitung	Microsoft Word 365	Microsoft Corporation, DE-Redmond

3.2 Methoden

3.2.1 Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von Nonivamid in verschiedenen Ölen

Es werden folgende Öle verwendet, die sich in ihrer Polarität unterscheiden und für den Einsatz in Dermatika geeignet sind: Raffiniertes Rizinusöl (Caesar & Loretz GmbH, DE-Hilden), C12-15 Alkylbenzoate (Stéarinerie Dubois, FR Boulogne Billancourt), mittelkettige Triglyceride (Myritol® 318, BASF SE, DE-Ludwigshafen a. Rhein), Isopropylmyristat (Crodamol™ IPM, Croda Iberica SA, ES-Barcelona), Mandelöl (Caesar & Loretz GmbH, DE-Hilden) und Paraffinum liquidum (Hansen & Rosenthal KG, DE-Hamburg). In einem Mikroreaktionsgefäß (Super Clear™ 2,0 mL, VWR International, US-Radnor) wird ein deutlicher Überschuss an Nonivamid (Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis) vorgelegt (XP 205 DR, Mettler Toledo Inc., US-Columbus). Darauf wird 1,0 mL des zu untersuchenden Öls zugesetzt, ca. 30 Sekunden mit einem Spatel manuell vermischt und bei 2000 UpM (VXR basic Vibrax, IKA-Werke GmbH & Co. KG, DE-Staufen) und Raumtemperatur inkubiert. Die Probenentnahme erfolgt nach 24, 48, 72 und 96 h. Hierzu wird die entstandene Suspension zunächst bei 13400 UpM für 30 Minuten zentrifugiert (Minispin®, Eppendorf AG, DE-Hamburg), sodass sich ein klarer Überstand bildet. Aufgrund der hohen Viskosität von Rizinusöl wird in diesem Fall der Zentrifugierprozess auf insgesamt 45 Minuten verlängert. Zur Probenentnahme werden 100 µL klarer Überstand in einen 10 mL Messkolben überführt und mit Methanol auf 10,0 mL aufgefüllt. Aus dieser Lösung wird im nächsten Schritt erneut 1,0 mL entnommen und mit Methanol (HPLC gradient grade, Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis) auf 10,0 mL aufgefüllt. Dies entspricht somit einem Verdünnungsfaktor von 1:1000. Für die nicht mit Methanol mischbaren Öle Mandelöl und Paraffinum liquidum werden 100 µL der Ölphase insgesamt zehnmal mit je 1,0 mL Methanol im Vortex Mixer (VXR basic Vibrax, IKA-Werke GmbH & Co. KG, DE-Staufen) bei 2500 UpM ausgeschüttelt, anschließend für 30 s bei 13400 UpM zentrifugiert, der Überstand abgenommen und dann gesammelt. Die gesammelte Lösung wird wie bei den anderen Ölen verdünnt (1:10), um letztlich einen Verdünnungsfaktor von 1:1000 zu erhalten. Die gelöste Menge an Nonivamid wird mittels HPLC-UV-Analytik ermittelt (s. Kapitel 3.2.20.4.1).

3.2.2 Dichtebestimmung verschiedener Öle

Die Dichte von potentiellen Ölen, in denen der Arzneistoff gelöst werden soll, wird mittels des Biegeschwinger-Dichtemessgeräts DMA 4500 Density Meter (Anton Paar GmbH, AT-Graz) bei 22 °C bestimmt. Es erfolgt eine Dreifachbestimmung.

3.2.3 Charakterisierung der verwendeten Silica-Typen

Die als Arzneistoffträger eingesetzten Kieselgele sollen eine hohe Porosität und eine akzeptable Porenweite aufweisen, damit größere Mengen der öligen Arzneistofflösung absorbiert werden können. Um die Eignung der Silica-Typen abzuschätzen, wird zunächst eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (3.2.20.2) des jeweiligen Kieselgels erstellt. Im Anschluss daran erfolgt die Bestimmung der Ölabsorptionskapazität, um ein geeignetes Kieselgel auszuwählen.

3.2.3.1 Bestimmung der Ölabsorptionskapazität von Silica für bestimmte Öle

Die Bestimmung der Ölabsorptionskapazität erfolgt in Anlehnung an den Standard der ASTM International D281-95 „Standard Test Method for Oil Absorption of Pigments by Spatula Rub-Out“ (1995). Das zu untersuchende Silica wird zunächst im Heißluftschrank (Heraeus T5042, Heraeus Holding GmbH, DE-Hanau) bei 110 °C für 30 min getrocknet. Anschließend werden 250 mg der getrockneten Substanz abgewogen (XP 205 DR, Mettler Toledo, US-Columbus) und auf einer Glasplatte (20 x 20 cm) vorgelegt. Das jeweilige Öl wird über eine Bürette tropfenweise zugegeben und nach jedem Tropfen mittels zweier Spatel (12,5 x 2 cm) energisch in das Silica eingearbeitet. Dies wird solange wiederholt, bis sich eine zähe Paste bildet, die weder bricht noch sich von der Platte absondert. Die Auswertung erfolgt über das bis zum Endpunkt entnommene Volumen an Öl. Dieses Volumen wird nach vorheriger Dichtebestimmung (3.2.2) in Masse umgerechnet und letztlich als Ölabsorptionskapazität in Gramm Öl pro 100 g Silica angegeben (Gleichung 3.2-1).

$$w \left[\frac{g}{100 g} \right] = \frac{\Delta V(\text{Öl}) \cdot \rho(\text{Öl})}{m(\text{Silica})} \cdot 100$$

Gleichung 3.2-1: Berechnung der Ölabsorptionskapazität.

w = Ölabsorptionskapazität des verwendeten Silicas [g/100 g]

ΔV = bis zum Endpunkt benötigtes Volumen an Öl [mL]

ρ = Dichte [g/mL]

m = Masse [g]

3.2.4 Herstellung der Nonivamid-Stammlösung

Um eine 6%ige (m/m) Stammlösung von Nonivamid in Rizinusöl zu erhalten, werden 2,40 g Nonivamid (Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis) in einem mit einem Rührfisch versehenen Becherglas vorgelegt. Rizinusöl (Caesar & Loretz GmbH, DE-Hilden) wird bis zu einer Gesamtmasse von 40 g hinzugefügt. Durch Reduktion der Wirkstoffmasse um den Faktor 10 wird bei gleichbleibender Herstellungsweise eine weitere, niedriger konzentrierte 0,6%ige Stammlösung erhalten. Die Komponenten werden für 10 min auf 50 °C erhitzt, danach auf Raumtemperatur abgekühlt und während des gesamten Lösungsprozesses stetig bei 250 UpM gerührt (Magnetrührer MR 3001 K, Heidolph Instruments GmbH, DE-Schwabach), bis eine klare, gelbliche Lösung entsteht.

3.2.5 Herstellung des ölbeladenen Pulvers

Es werden mit Syloid® 244 FP und Syloid® XDP 3050 (beide W. R. Grace & Co. Corporation, US-Columbia) zwei verschiedene Silica-Typen, die sich in Porengröße und Porosität unterscheiden und eine gute Ölabsorptionskapazität für das Arzneistofflösungsmittel zeigen, als Träger für die Arzneistofflösung in Betracht gezogen. In eine mit Combi-Stopper-Verschlusskonus (B. Braun Melsungen AG, DE-Melsungen) versehene und tarierte Original-Perfusor®-Spritze 50 mL (B. Braun Melsungen AG, DE-Melsungen) werden ca. 50 mL Rizinusöl (Caesar & Loretz GmbH, DE-Hilden) bzw. Nonivamid-Stammlösung (3.2.4) vorgelegt und die in der Spritze enthaltene Menge gravimetrisch erfasst. Im nächsten Schritt wird die berechnete Menge an zuvor getrocknetem (3.2.3.1) Kieselgel (exakt 2/3 der Menge, die an flüssiger Komponente in die Spritze eingewogen wurde) in dem wie in Abbildung 3.2-1 instrumentierten 2,5 L-Behälter eines auf 20 °C temperierten Labormischers (P22-L05 L01, Somakon Verfahrenstechnik OG, DE-Lünen) vorgelegt. Die Spritze wird auf die vorgesehene Öffnung aufgesetzt, während das ölbeladene Silica bereits bei 250 UpM vorgemischt wird. Dies soll eine frühzeitige Verklumpung verhindern, falls beim Aufsetzen der Spritze geringe Mengen der flüssigen Komponente auf das Silica treffen. Nachdem die Spritze dicht aufgesetzt ist, wird die Geschwindigkeit unter stetigem Abstreifen auf 1500 UpM erhöht und eine Tropfrate von ca. 5 mL/min eingestellt. Ist die Zugabe der flüssigen Komponente abgeschlossen, wird für weitere 5 min bei 1500 UpM gemischt. Es resultiert ein ölbeladenes Silica im Verhältnis von 60 Teilen Öl zu 40 Teilen Kieselgel. Dies entspricht ca. 60 % der Ölabsorptionskapazität der beiden verwendeten Kieselgele und soll sicherstellen, dass (wirkstoffhaltiges) Öl praktisch vollständig im Innern der Kieselgel-Partikel und nicht an der äußeren Oberfläche gebunden wird.

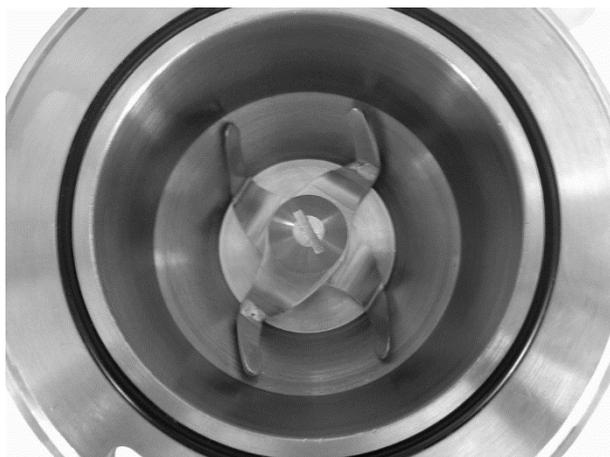


Abbildung 3.2-1: Instrumentierung des Labormischer-Behälters.

3.2.6 Auswahl kompatibler Polymere zur verlängerten Wirkstofffreisetzung

Als Polymere werden solche ausgewählt, die wasserunlöslich sind, eine verlängerte Wirkstofffreisetzung ermöglichen und in 30%iger wässriger Dispersion verfügbar sind: Ammoniummethacrylat-Copolymer Typ A (Eudragit[®] RL 30D, Evonik Industries AG, DE-Essen), Ammoniummethacrylat-Copolymer Typ B (Eudragit[®] RS 30D, Evonik Industries AG, DE-Essen), Methacrylat-Copolymer (Eudragit[®] NE 30D, Evonik Industries AG, DE-Essen), Methylacrylat-Methylmethacrylat-Methacrylsäure-Copolymer (Eudragit[®] FS 30D, Evonik Industries AG, DE-Essen) und Polyvinylacetat (Kollicoat[®] SR 30D, BASF-SE, DE-Ludwigshafen a. Rhein). Zur Untersuchung der Kompatibilität wird das ölbeladene Silica in einer Fantaschale vorgelegt. Die jeweilige Polymerdispersion wird im Folgenden zu drei gleichen Anteilen zugesetzt und mittels Pistill eingearbeitet. Die Zusammensetzungen der erhaltenen Formulierungen sind in Tabelle 3.2-1 aufgeführt.

Tabelle 3.2-1: Zusammensetzungen der Formulierungen zur Untersuchung der Kompatibilität des ölbeladenen Silicas mit verschiedenen Polymerdispersionen

Syloid [®] 244 FP	Rizinusöl, raffiniertes	Polymerdispersion
10 %	15 %	75 %

50 µL der hergestellten Formulierungen werden auf einen Objektträger aufgetragen und auf einer Fläche von 0,5 x 0,5 cm verteilt, mit einem Deckglas abgedeckt, die Filmbildung bei Raumtemperatur abgewartet und abschließend mittels Lichtmikroskopie (3.2.20.1) und konfokaler Raman-Mikroskopie (3.2.20.3) analysiert. Für die Analyse der getrockneten Filme mittels konfokaler Raman-Mikroskopie wird ein Image Scan durchgeführt, in dem die drei untersuchten Substanzgruppen (Silica, Öl und Polymerdispersion) farblich hervorgehoben werden (3.2.20.3.1).

3.2.7 Herstellung der filmbildenden Formulierungen

Die Herstellung der filmbildenden Formulierungen erfolgt in mehreren Schritten. Als erstes wird der Polymerdispersion ein Weichmacher zugesetzt. In einem weiteren Herstellungsschritt wird anschließend das ölbeladene Silica in die weichgemachte Polymerdispersion eingearbeitet.

3.2.7.1 Weichmachen der Polymerdispersionen

Aufgrund der Erkenntnisse aus der Dissertation von Lunter (2012) benötigen die verwendeten Ammoniummethacrylat-Copolymere den Zusatz von Weichmachern, die die Glasübergangstemperatur so weit absenken, dass eine Filmbildung auf der Haut bei den dort üblichen Bedingungen (32 °C) möglich ist. Zu 1000 g Polymerdispersion wird entsprechend der Eudragit® Application Guidelines (Evonik, 2013) unter Rühren bei 350 UpM (Rührwerk RZR 2102 control, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, D-Schwabach) die für eine Filmbildung bei humaner Hauttemperatur gewünschte Menge an Weichmacher langsam mit einer Pipette zugegeben. Um eine vollständige Verteilung des Weichmachers in der Polymerdispersion zu gewährleisten, wird für weitere 30 min gerührt. Als Weichmacher für die Ammoniummethacrylat-Copolymerdispersionen Eudragit® RS 30D und Eudragit® RL 30D (beide Evonik Industries AG, DE-Essen) wird Triethylcitrat (Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis) verwendet. Entsprechend den Erkenntnissen von Lunter (2012) ist für Eudragit® RS ein Zusatz von mindestens 25 %, für Eudragit® RL jedoch mindestens 30 % bezogen auf die Lackrockensubstanz notwendig. Die Zusammensetzung der hergestellten, weichgemachten Polymerdispersionen und der entsprechende Weichmacheranteil bezogen auf die Lackrockensubstanz sind in Tabelle 3.2-2 aufgeführt.

Tabelle 3.2-2: Zusammensetzung der weichgemachten Polymerdispersionen und der entsprechende Anteil an Weichmacher bezogen auf die Lackrockensubstanz.

Verwendetes Polymer	Polymerdispersion [%]	Triethylcitrat [%]	Triethylcitrat (bezogen auf Lackrockensubstanz) [%]
Eudragit® RS	92,50	7,50	27
Eudragit® RL	91,75	8,25	30

3.2.7.2 Einarbeitung des ölbeladenen Silicas in die weichgemachte Polymerdispersion

Für die Herstellung der filmbildenden Formulierungen wird das ölbeladene Silica (s. 0) mit der weichgemachten Polymerdispersion (s. 3.2.7.1) vereint. Da es sich bei ersterem um freifließendes Pulver handelt, das in einer Polymerdispersion verteilt werden soll, benötigt es entsprechende Kräfte, um eine homogene Verteilung der ölbeladenen Silica-Partikel sicherzustellen. Hierfür werden zwei verschiedene Geräte eingesetzt: eine horizontale Kugelmühle (Hormuth GmbH, DE-Heidelberg), bei welcher der Homogenisierungsprozess durch Keramikugeln erfolgt, oder der SpeedMixer™ DAC 150.1 FVZ (Hauschild GmbH & Co. KG, DE-Hamm), dessen Mischprinzip auf einer doppelten Rotation des Mischbechers beruht. Das Grundprinzip der Homogenisierung im SpeedMixer™ ist dabei ein Zentrifugierprozess, bei dem sich zusätzlich das Probenbehältnis um seine eigene Achse dreht. Dies resultiert in zwei sich überlagernden Bewegungen des Probenmaterials, die für eine gute Durchmischung sorgen (Massing et al., 2008). Aufgrund der starken Scherkräfte im Probenbehältnis wird auf den Einsatz von Mischwerkzeugen verzichtet.

3.2.7.2.1 Herstellung der filmbildenden Formulierungen in der Kugelmühle

Das ölbeladene Silica wird in der Kugelmühle (Hormuth GmbH, DE-Heidelberg) vorgelegt. Die Polymerdispersion wird in zwei gleich großen Anteilen hinzugefügt. Nach jeder Zugabe wird für 5 Minuten bei Stufe 10 homogenisiert. Die Zusammensetzung der in der Kugelmühle hergestellten filmbildenden Formulierungen ist in Tabelle 3.2-3 dargestellt.

Tabelle 3.2-3: Zusammensetzung der wirkstofffreien filmbildenden Formulierungen (FF), die in der Kugelmühle (KM) hergestellt wurden

Bezeichnung	Rizinusöl, raffiniertes [%]	Syloid® 244 FP (FP) bzw. XDP 3050 (XDP) [%]	Eudragit® RS 30D [%]	Triethylcitrat [%]
FF 22,5 FP KM	13,2	8,8	71,7	5,8
FF 25,0 FP KM	15,0	10,0	69,4	5,6
FF 27,5 FP KM	16,2	12,8	67,1	5,4
FF 25,0 XDP KM	15,0	10,0	69,4	5,6

3.2.7.2.2 Herstellung der filmbildenden Formulierungen im SpeedMixer™

Zunächst wird die Menge an ölbeladenem Silica in einem für den Einsatz im SpeedMixer™ DAC 150.1 FVZ (Hauschild GmbH & Co. KG, DE-Hamm) geeigneten Behältnis vorgelegt. Die Polymerdispersion wird in zwei gleich großen Anteilen hinzugefügt. Nach jeder Zugabe wird der Becher verschlossen und der Verschluss mit Parafilm® (Bemis Company Inc., US-Oshkosh) abgedichtet, um ein Austreten der Formulierung während der Homogenisierung zu verhindern. Anschließend wird für 2 min bei 2000 UpM im SpeedMixer™ gemixt. Tabelle 3.2-4 und Tabelle 3.2-5 listen die im SpeedMixer™ hergestellten Formulierungen auf.

Tabelle 3.2-4: Zusammensetzung der wirkstofffreien filmbildenden Formulierungen (FF), die im SpeedMixer™ (SM) hergestellt wurden

Bezeichnung	Rizinusöl, raffiniertes [%]	Syloid® 244 FP (FP) bzw. XDP 3050 (XDP) [%]	Eudragit® RS 30D [%]	Triethylcitrat [%]
FF 25,0 FP SM	15,0	10,0	69,4	5,6
FF 22,5 XDP SM	13,5	9,0	71,7	5,8
FF 25,0 XDP SM	15,0	10,0	69,4	5,6
FF 27,5 XDP SM	16,5	11,0	67,1	5,4

Tabelle 3.2-5: Zusammensetzung der wirkstoffhaltigen filmbildenden Formulierungen (FF), die im SpeedMixer™ (SM) hergestellt wurden

Bezeichnung	Nonivamid [%]	Rizinusöl, raffiniertes [%]	Syloid®. XDP 3050 [%]	Eudragit® RS 30D [%]	Triethylcitrat [%]
FF 0,09 %	0,09	1,41	1,0	90,2	7,3
FF 0,81 %	0,81	12,69	9,0	71,7	5,8
FF 0,90 %	0,90	14,10	10,0	69,4	5,6
FF 0,99 %	0,99	15,51	11,0	67,1	5,4
FF Placebo	0,00	1,50	1,0	90,2	7,3

3.2.8 Herstellung freier Filme

Zur Herstellung freier Filme wird das von Grützmann (2005) entwickelte Filmziehgerät (Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts, DE-Tübingen) verwendet. Die filmbildende Formulierung wird in ein Reservoir mit definierter Öffnung (0,4 mm), welches auf einer teflonbeschichteten Glasplatte aufliegt, gegeben. Die Glasplatte kann von der Unterseite temperiert werden. Nach der Befüllung wird das Reservoir mittels einer beweglichen Führung mit konstanter Geschwindigkeit über die auf 32 °C temperierte Glasplatte bewegt. Dies bewirkt, dass die Formulierung in definierter Schichtdicke durch den Spalt aus dem Reservoir ausläuft. Dieser Vorgang ist in Abbildung 3.2-2 schematisch dargestellt. Die nun mit Formulierung überzogenen Glasplatten werden auf dem Gerät belassen, bis der Großteil des Wassers verdunstet ist, was makroskopisch gut anhand einer verminderten Lichtspiegelung zu erkennen ist. Anschließend werden die Filme in den Trockenschrank (Heraeus Holding GmbH, DE-Hanau) verbracht und 24 h bei 32 °C getrocknet. Diese Trocknungsphase ist notwendig, um eine vollständige Filmbildung aus den Polymerdispersionen zu erhalten (Glaessl et al., 2010; Gruetzmann & Wagner, 2005; Obara & McGinity, 1994).

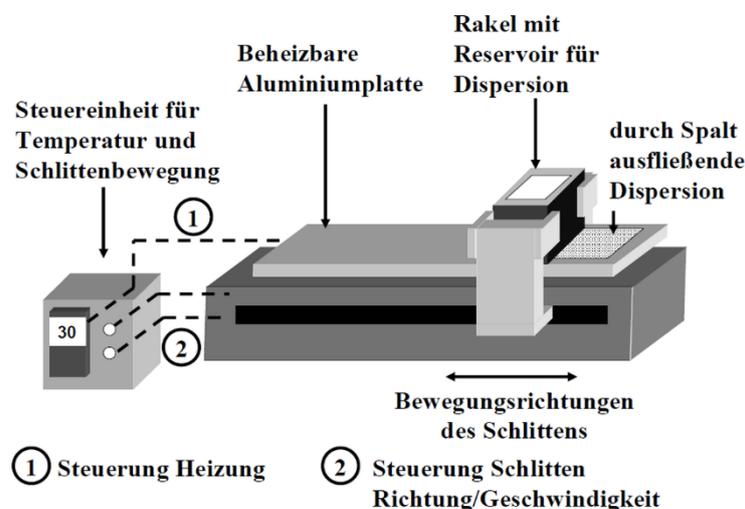


Abbildung 3.2-2: Schematischer Aufbau des Filmziehgerätes; modifiziert nach Grützmann (2005).

3.2.9 Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften der Filme

Die aus filmbildenden Formulierungen erhaltenen Filme sollen gewisse mechanische Eigenschaften aufweisen, um eine langanhaltende Wirkstofffreisetzung auf der Haut zu ermöglichen. Aus diesem Grund wird die Dehnbarkeit der Filme (3.2.9.1) bestimmt, ihre Adhäsionskraft auf der Haut mit entsprechenden Referenzformulierungen verglichen (3.2.9.2) und ihre Resistenz gegenüber Wasser (3.2.9.3) analysiert.

3.2.9.1 Bestimmung der nominellen Bruchdehnung der freien Filme

Zur Bestimmung der nominellen Bruchdehnung der freien Filme wurde eine von Lunter (2012) entwickelte Methode modifiziert. Die nach 3.2.8 hergestellten Filme werden mit einem Skalpell in rechteckige Stücke (1,5 x 10 cm) geschnitten. Die beiden Backen des Materialprüfers (DO-FB0.5TS, Zwick GmbH & Co. KG, DE-Ulm) werden in einem Werkzeugabstand von 50 mm positioniert und das zu untersuchende Filmstück lotrecht eingespannt. Die Backen werden nachfolgend mit konstanter Geschwindigkeit von 10 mm/min auseinandergefahren. Währenddessen werden sowohl Kraft als auch Wegstrecke mittels der Software testXpert XLine (Zwick GmbH & Co KG, DE-Ulm) aufgezeichnet. Die Messung wird gestoppt, nachdem das maximale Kraftereignis erfasst wurde, das nötig war, um die Filmstücke mittig zu brechen. Filmstücke, die nicht mittig oder an der Ansatzstelle der Backen des Materialprüfers brechen, werden aus der Auswertung exkludiert. Für den Film einer jeden zu untersuchenden Formulierung wird eine Fünffachbestimmung durchgeführt. Die nominelle Bruchdehnung ergibt sich gemäß Gleichung 3.2-2 aus dem prozentualen Anteil der gedehnten Wegstrecke in Bezug auf die Ausgangswegstrecke.

$$\varepsilon_{nom} [\%] = \left(\frac{l_{max}}{l_0} - 1 \right) \cdot 100$$

Gleichung 3.2-2: Berechnung der nominellen Bruchdehnung.

ε_{nom} = nominelle Bruchdehnung [%]

l_{max} = Einspannlänge bei Bruch [mm]

l_0 = Einspannlänge vor Messbeginn [mm]

3.2.9.2 Bestimmung der Adhäsionskraft freier Filme auf porciner Haut

Die Bestimmung der Adhäsionskraft basiert auf einer von Repka und McGinity (2001) entwickelten Methode, die auf porcine Haut als Testmaterial übertragen und wie nachfolgend beschrieben weiterentwickelt wurde. Zunächst wird gefrorene Vollhaut (3.2.12.1) 30 min bei Raumtemperatur auf einem mit Kochsalzlösung getränkten Papiertuch (Wepa Apothekenbedarf GmbH & Co. KG, DE-Hillscheid) aufgetaut. Die Haut wird auf einen

geeigneten Polystyrolblock (Styrodur, Saint-Gobain Isover G+H AG, DE-Ludwigshafen a. Rhein) mit handelsüblichen Stecknadeln aufgespannt und die Haare auf < 5 mm getrimmt (Haarschneider Philips QC5115/15 Series 3000, Philips Consumer Lifestyle BV, NL-Amsterdam). Anschließend werden einzelne Hautstanzen mit einem Durchmesser von 30 mm mittels eines Henkellocheisens (Eduard Gottfried Ferne GmbH, DE-Remscheid) angefertigt. Am Materialprüfer (DO-FB0.5TS, Zwick GmbH & Co. KG, DE-Ulm) werden zwei Edelstahlzylinder ($\varnothing=15$ mm; Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts, DE-Tübingen) fixiert, die in einem Werkzeugabstand von 20 mm zueinander positioniert sind. Der obere Zylinder ist dabei dynamisch, während der untere im Verlauf der Messung in seiner Position unverändert bleibt. Die Haut wird mit entsprechenden Edelstahlpins (Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts, DE-Tübingen) am unteren Edelstahlzylinder fixiert. Vor der Applikation wird die fixierte Vollhaut mit einem in 70%igem Isopropanol getränkten Papiertuch gereinigt, um durch Entfernung von Fett und anderen Substanzen von der Hautoberfläche für gleiche Ausgangsbedingungen zu sorgen.

Es wird die Adhäsionskraft von filmbildenden Formulierungen mit der Adhäsionskraft der weichgemachten Polymerdispersion sowie mit der Adhäsionskraft eines wirkstofffreien transdermalen Pflasters (UCB, BE-Anderlecht) verglichen. Für das Auftragen der filmbildenden Formulierungen und der weichgemachten Polymerdispersion wird mit einer 1 mL Spritze (Injekt[®]-F 1 mL, B. Braun Melsungen AG, DE-Melsungen) ein Probenvolumen von 30 μ L auf die Oberseite der fixierten Hautstelle appliziert.

Im Gegensatz dazu wird aus dem transdermalen Pflaster zunächst eine kreisförmige Fläche mit einem Durchmesser von 15 mm ausgestanzt (Eduard Gottfried Ferne GmbH, DE-Remscheid). Am oberen Zylinder wird ein ebenso ausgestanztes doppelseitiges Klebeband (tesa[®] Doppelseitiges Klebeband universal, tesa SE, DE-Norderstedt) angebracht, um darauf das transdermale Pflasterstück anzubringen. Zuletzt wird die Schutzfolie des transdermalen Pflasters mit einer Pinzette entfernt, um die Haftsicht nicht zu beschädigen.

Das Messprinzip beruht darauf, dass der obere Zylinder mit einer definierten Geschwindigkeit auf die Haut fährt, beim transdermalen Pflaster zusätzlich das Andrücken des Pflasters auf der Haut bewirkt und anschließend den Kontakt mit der Haut über eine Zeit von 30 min bei einem Kraftaufwand von 10 N aufrechterhält. Diese Kontaktzeit ist notwendig, um eine vollständige Filmbildung zu garantieren. Anschließend wird der obere Zylinder mit einer konstanten Geschwindigkeit von 2 mm/min bis zu einem Werkzeugabstand von 2 mm nach oben gefahren.

Die Messung wird durch das in der Software testXpert XLine (Zwick GmbH & Co KG, DE-Ulm) hinterlegte Programm gesteuert. Da eine kraftgeregelte Positionssteuerung des oberen Zylinders nicht möglich ist, die Haut jedoch bei konstanter Positionierung des oberen Zylinders mit der Zeit dem Druck nachgibt und sich somit der Anpressdruck verändert, wird eine lagegesteuerte Positionierung durchgeführt (Tabelle 3.2-6). Dies ermöglicht die Aufrechterhaltung eines konstanten Anpressdrucks. Während der gesamten Messung wird ein Kraft/Zeit-Diagramm durch die Software aufgenommen. Anhand dieses Diagramms kann die Adhäsionskraft der zu untersuchenden Testsubstanz beim Abheben des oberen Zylinders als maximaler negativer Ausschlag im Kraft/Zeit-Diagramm erfasst werden.

Tabelle 3.2-6: Programm zur Bestimmung der Adhäsionskraft

Anfahren der Ausgangssituation (lagegesteuert)	Werkzeugabstand	Geschwindigkeit
	2 mm	300 mm/min
Anpressung (kraftgesteuert)	Kraft	Geschwindigkeit
1	200 N	20 mm/min
2	5 N	1 mm/min
Aufrechterhaltung des Kontakts (10 N, lagegesteuert)	Standardweg	Geschwindigkeit
1	30,0 µm	5,00 µm/min
2	8,5 µm	4,25 µm/min
3	7,0 µm	3,50 µm/min
4	11,0 µm	3,00 µm/min
5	15,6 µm	2,20 µm/min
6	4,6 µm	1,80 µm/min
7	12,0 µm	1,50 µm/min
Messung der Adhäsionskraft (lagegesteuert)	Werkzeugabstand	Geschwindigkeit
	2 mm	2 mm/min
Zurückführung in Ausgangsposition (lagegesteuert)	Werkzeugabstand	Geschwindigkeit
	20 mm	100 mm/min

Abbildung 3.2-3 beschreibt den Kraft-Zeit-Verlauf eines solchen Messvorgangs. Die Adhäsionskraft ist im Diagramm als maximaler negativer Kraftausschlag des Testzylinders abzulesen. Die geringen zeitlichen Unterschiede sind durch die initiale kraftgeregelte Ansteuerung der Anpresskraft von 5 N bedingt. Je nach Beschaffenheit des Hautstücks wird eine gewisse Zeit benötigt, bis der gewünschte Anpressdruck erreicht ist. Durch die nachfolgende, lagegesteuerte Regelung der Anpresskraft kann während der Filmbildungszeit ein stetiger Druck von ca. 10 N realisiert werden. Nach abgeschlossener Filmbildungs- und Druckhaltezeit setzt der Film abhängig von seiner Adhäsion dem lagegesteuerten Abheben des Testzylinders von der Filmoberfläche eine Kraft entgegen. Diese Adhäsionskraft kann als negativer Ausschlag im Kraft-Zeit-Diagramm visualisiert werden. Für jede untersuchte Zubereitung wird eine Fünffachbestimmung durchgeführt.

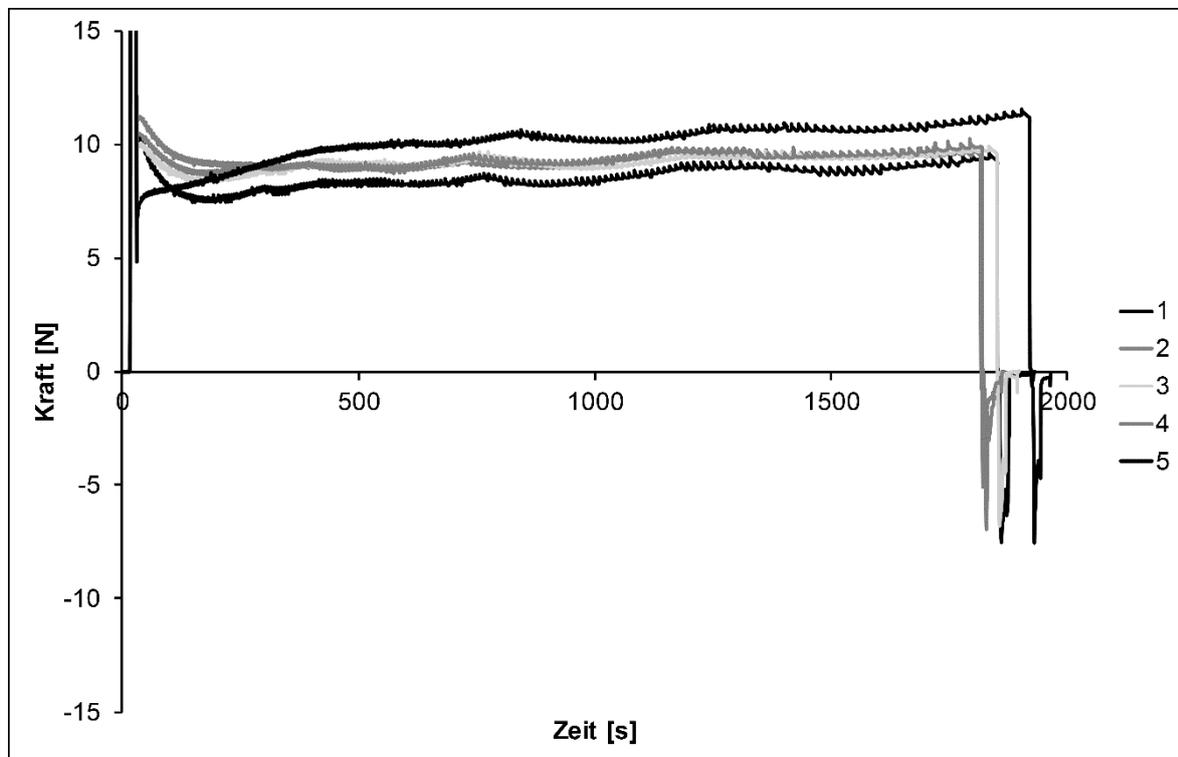


Abbildung 3.2-3: Kraft-Zeitverlauf eines Experiments zur Bestimmung der Adhäsionskraft; n=5.

3.2.9.3 Bestimmung der Wasserfestigkeit

Die aus wirkstoffhaltigen filmbildenden Formulierungen (3.2.7) nach 3.2.8 erhaltenen Filme werden mit einem Skalpell in mindestens vier rechteckige Stücke von 5 x 5 cm geschnitten und gewogen (XP 205 DR, Mettler Toledo, US-Columbus). Drei (n=3) der vier Filmstücke werden mit einem Drahtgeflecht beschwert und jeweils in einen mit 100,0 mL RO-Wasser (ELGA Purelab Option-Q, ELGA Labwater GmbH, DE-Celle) befüllten Behälter, der in ein auf 32 °C temperiertes Gerät zur Untersuchung der Freisetzung (AT 7, Sotax AG, CH-Aesch) integriert ist, gelegt. Die mit einer Blattrührer-Apparatur ausgestattete Freisetzungsapparatur wird anschließend für 80 min bei 50 UpM betrieben. Nach der Inkubation werden die Filme entnommen und 100 µL Wasserphase entnommen. Die entnommene Menge wird mit 900 µL Methanol (HPLC gradient grade, Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis) versetzt, für 15 s bei 2500 UpM (Vortex Mixer SA 8, Techne Inc., US-Burlington) gemischt und der Gehalt an Nonivamid (Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis) mittels HPLC-Analytik nach 3.2.20.4.2 ermittelt. Das noch nicht inkubierte Filmstück dient als Referenz und wird in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen (Falcon®, VWR-International, US-Radnor) überführt. Der Film wird in 40,0 mL Acetonitril HPLC gradient grade (Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) bei 2500 UpM (Vortex Mixer SA 8, Techne Inc., US-Burlington) aufgelöst, wobei das in Acetonitril unlösliche Kieselgel als dispergierter Anteil verbleibt. Die erhaltene Suspension wird deshalb bei 6000 UpM und 20 °C für 15 min zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus Holding GmbH, DE-Hanau). Im Anschluss werden 20 µL des klaren Überstands entnommen, mit 980 µL Acetonitril verdünnt und der Gehalt an Nonivamid per HPLC entsprechend 3.2.20.4.2 analysiert. Die analytisch erfassten Mengen an Nonivamid werden auf das Gewicht der Filmstücke normiert. Die Daten werden als prozentual freigesetzte Menge an Nonivamid in Bezug auf die zu Beginn im Film enthaltene Ausgangsmenge präsentiert (Gleichung 3.2-3).

$$w_{frei}[\%] = \frac{m_{NVA \text{ in } H_2O}}{m_0} \cdot 100$$

Gleichung 3.2-3: Berechnung des prozentual in Wasser freigesetzten Anteils an Nonivamid.

w_{frei} = prozentual freigesetzte Menge an Nonivamid [%]

$m_{NVA \text{ in } H_2O}$ = In der Wasserphase nach 80 min freigesetzte, normierte Masse an Nonivamid

m_0 = Normierte Ausgangsmasse in einem Filmstück

Da sich zwischen dem in Rizinusöl (Caesar & Loretz GmbH, DE-Hilden) gelösten und dem in die Wasserphase übergetretenen Nonivamid ein Verteilungsgleichgewicht einstellt, wird der Verteilungskoeffizient für Nonivamid zwischen Rizinusöl und Wasser experimentell ermittelt. Hierzu wird eine solche Menge Nonivamid nach 0 in 20 mL Rizinusöl gelöst, dass eine Ausgangskonzentration von ca. 9 mg/mL entsteht. Diese wirkstoffhaltige Lösung wird in einem

Scheidetrichter vorgelegt, mit 20 mL Wasser versetzt und für 1 min kräftig geschüttelt. Nachdem eine klare Phasentrennung erfolgt ist (nach etwa 72 h), wird aus jeder Phase ca. 1 mL entnommen und in ein Mikroreaktionsgefäß (Super Clear™ 2,0 mL, VWR International, US-Radnor) überführt. Die Proben werden bei 13400 UpM für 10 min zentrifugiert (Minispin®, Eppendorf AG, DE-Hamburg), um sicherzustellen, dass es darauffolgend nicht zu einer verunreinigten Probenentnahme kommt. Es werden jeweils 100 µL aus der jeweiligen Phase entnommen, mit Methanol (HPLC gradient grade, Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis) verdünnt (Verdünnungsfaktor 1:20) und der Gehalt an Nonivamid mittels HPLC analysiert (3.2.20.4.2). Der Verteilungskoeffizient von Nonivamid zwischen Rizinusöl und Wasser berechnet sich nach Gleichung 3.2-4.

$$VK = \frac{c(\text{Rizinusöl})}{c(\text{Wasser})}$$

Gleichung 3.2-4: Berechnung des Verteilungskoeffizienten von Nonivamid zwischen Rizinusöl und Wasser.

VK = Verteilungskoeffizient von Nonivamid zwischen Rizinusöl und Wasser
c(Rizinusöl) = Konzentration an Nonivamid in Rizinusöl nach Einstellung des Gleichgewichts
c(Wasser) = Konzentration an Nonivamid in Wasser nach Einstellung des Gleichgewichts

Mit Hilfe des Verteilungskoeffizienten kann nun bei bekannter Konzentration des Arzneistoffs im Öl die theoretisch maximal mögliche Menge an Nonivamid, die in die Wasserphase übergehen kann, berechnet werden. Diese theoretische Maximalmenge wird als Bezugspunkt zu der tatsächlich freigesetzten Menge an Nonivamid gesetzt. Die Gleichung 3.2-3 verändert sich somit zu:

$$w_{\text{frei}}[\%] = \frac{m_{\text{NVA in H}_2\text{O}}}{m_{\text{max in H}_2\text{O}}} \cdot 100$$

Gleichung 3.2-5: Berechnung der prozentual in Wasser freigesetzten Menge an Nonivamid unter Berücksichtigung des Verteilungskoeffizienten.

w_{frei} = Prozentual freigesetzte Menge an Nonivamid
m_{NVA in H₂O} = In der Wasserphase nach 80 min freigesetzte Masse an Nonivamid
m_{max in H₂O} = Max. freisetzbare Menge Nonivamid in Wasser bei Berücksichtigung des VK

Um die Aussagekraft der Messungen zu überprüfen, wird die Wiederfindungsrate von Nonivamid nach Ablauf der Inkubation in Wasser bestimmt. Hierzu wird das inkubierte Filmstück zunächst getrocknet und dann nach dem gleichen Vorgehen wie bei den Referenzfilmstücken mit Acetonitril aufgelöst, aufgearbeitet und in der HPLC auf den Gehalt an Nonivamid geprüft. Die Wiederfindungsrate berechnet sich nach Gleichung 3.2-6.

$$WFR[\%] = \frac{m_{NVA \text{ in } H_2O} + m_{\text{nicht-freigesetztes NVA}}}{m_0} \cdot 100$$

Gleichung 3.2-6: Berechnung der Wiederfindungsrate.

WFR = Wiederfindungsrate [%]

$m_{NVA \text{ in } H_2O}$ = In der Wasserphase nach 80 min freigesetzte, normierte Masse an Nonivamid

$m_{\text{nicht-freig. NVA}}$ = Nach 80 min Inkubation im Film verbliebene, normierte Masse an Nonivamid

m_0 = Normierte Ausgangsmasse in einem Filmstück

3.2.10 Prüfung der Lagerstabilität

Um die mikroskopischen Änderungen der filmbildenden Formulierung in Struktur und Verteilung während der Lagerung zu untersuchen, werden freie Filme von gelagerten filmbildenden Formulierungen mittels konfokaler Raman-Mikroskopie analysiert. Dazu wird nach einer Lagerzeit von 6 Monaten die filmbildende Formulierung mittels einer Pipette in ein von einem doppelseitigen Klebeband umgebenes Areal von ca. 0,5 x 0,5 cm auf einen Objektträger gegeben und die Formulierung mit einem Deckglas abgedeckt. Die Filmbildung wird abgewartet und anschließend ein Image-Scan mit dem Raman-Mikroskop (alpha 500, WITech GmbH, DE-Ulm) erstellt (3.2.20.3.1). Es werden die Filme solcher Formulierungen untersucht, die direkt nach der Herstellung makroskopisch homogene Filme ergeben haben.

3.2.11 Herstellung der schnellfreisetzenden Referenzformulierungen

Als Referenzformulierungen werden schnellfreisetzende Formulierungen basierend auf der „Hydrophilen Capsaicinoid Creme 0,1 %/0,05 %/0,025 % NRF 11.125“ (NRF, 2010b) hergestellt. Nonivamid (Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis) wird wie bei den filmbildenden Formulierungen als Modellarzneistoff verwendet, weshalb die Formulierungen fortwährend als Hydrophile Nonivamid Creme (HNC) bezeichnet werden. Es werden insgesamt eine wirkstofffreie (HNC Placebo) und vier wirkstoffhaltige Formulierungen (HNC 0,9 %, HNC 0,1 %, HNC 0,05 % und HNC 0,025 %) hergestellt. Die Zusammensetzung der Formulierungen ist Tabelle 3.2-7 zu entnehmen.

Zur Herstellung der wirkstoffhaltigen Formulierungen wird anfangs eine entsprechende Menge Nonivamid in Ethanol 90 % (V/V) gelöst, um eine 10%ige (für die Herstellung von HNC 0,9 %) bzw. eine 1%ige ethanolische Stammlösung (für die Herstellung der geringer konzentrierten Formulierungen) zu erhalten. Abweichend zur Monographie „Hydrophile Capsaicinoid Creme NRF 11.125“ wird diese ethanolische Stammlösung nicht mit Propylenglykol und Wasser gemischt und dann die Mischung in die Basiscreme DAC eingearbeitet, da dies zur Ausfällung des Nonivamids führt (Lunter, 2012). Stattdessen werden in 25 g Basiscreme DAC eine Mischung aus 5 g Propylenglykol (BASF SE, DE-Ludwigshafen a. Rhein) und RO-Wasser (ELGA Purelab Option-Q, ELGA Labwater GmbH, DE-Celle) über ein Spritze-zu-Spritze-Verfahren eingearbeitet. Die notwendige Menge an RO-Wasser unterscheidet sich dabei je nach Nonivamid-Konzentration (Tabelle 3.2-7). Die gewünschte Menge an Nonivamid-Stammlösung wird dann mittels einer dritten Spritze über einen Luer/Lock-Adapter weiblich/weiblich (Combifix® Adapter w/w, B. Braun Melsungen AG, DE-Melsungen) der Grundlage zugegeben und homogenisiert.

Tabelle 3.2-7: Zusammensetzung der verschiedenen Hydrophilen Nonivamid Cremes [%]

	HNC 0,9 %	HNC 0,1 %	HNC 0,05 %	HNC 0,025 %	HNC Placebo
Nonivamid	0,9	0,1	0,05	0,025	0,0
Ethanol 90 % (V/V)	8,1	9,9	4,95	2,475	5,0
Basiscreme DAC	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
Propylenglykol	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Wasser	31,0	30,0	35,0	37,5	35,0

3.2.12 Hautpräparation

Sowohl für die Adhäsionskraftmessungen als auch für die ex vivo Penetrations- und Permeationsuntersuchungen wird porcine Haut verwendet, die von Schweineohren - wie untenstehend beschrieben - erhalten wird. Die Schweineohren werden sowohl von der Abteilung für experimentelle Medizin des Universitätsklinikums Tübingen als auch von der Bio-Metzgerei Grießhaber (DE-Mössingen-Öschingen) gestellt. Nach Erhalt der Ohren werden das Todesdatum, die Ohrmarkennummer des Schweins sowie etwaige Besonderheiten hinsichtlich Tätowierung, Verletzungen oder Behaarung dokumentiert. Die Ohren werden unverzüglich weiterverarbeitet. Die Präparation von Voll- und Spalthaut erfolgt anhand einer von Lunter (2012) entwickelten Methode.

3.2.12.1 Präparation von Vollhaut

Die Ohren werden in isotoner Kochsalzlösung gewaschen, um anhaftenden Schmutz und Blut zu entfernen. Im Anschluss daran werden sie mit Schlinggazetupfern (unsteril Gr. 5; Fuhrmann GmbH, DE-Much) getrocknet. Mit einem Skalpell wird die Haut von der Rückseite des Ohres vorsichtig separiert und auf einem mit isotoner Kochsalzlösung getränkten Papiertuch (Wepa Apothekenbedarf GmbH & Co. KG, DE-Hillscheid) zwischengelagert. Letztlich werden die Hautstücke nochmals mit Schlinggazetupfern trockengetupft, in Aluminiumfolie (Cofresco Frischhalteprodukte GmbH & Co. KG, DE-Minden) verpackt und bis zur weiteren Verwendung bei -30 °C (Kühl- und Gefrierkombination Premium, Liebherr-International AG, CH-Bulle) gelagert.

3.2.12.2 Präparation von Spalthaut

Die nach 3.2.12.1 präparierte Schweinehaut wird zunächst bei Raumtemperatur auf einem mit isotoner Kochsalzlösung getränkten Papiertuch (Wepa Apothekenbedarf GmbH & Co. KG, DE-Hillscheid) innerhalb von 30 min aufgetaut. Anschließend wird die Haut mit einem Skalpell in ca. 3,5 cm breite Streifen geschnitten und mit handelsüblichen Stecknadeln auf einem mit Aluminiumfolie (Cofresco Frischhalteprodukte GmbH & Co. KG, DE-Minden) umhüllten und ca. 3 cm breiten und 3 cm hohen Block aus extrudiertem Polystyrol (Styrodur, Saint-Gobain Isover G+H AG, DE-Ludwigshafen a. Rhein) befestigt. Die auf der Haut befindlichen Haare werden mit einem Haarschneider (Philips QC 5115/15 Series 3000, Philips Consumer Lifestyle BV, NL-Amsterdam) vorsichtig auf < 5 mm getrimmt. Anschließend wird die Haut erneut mit isotoner Kochsalzlösung gereinigt und abgetrocknet (Schlinggazetupfer unsteril Gr. 5; Fuhrmann GmbH, DE-Much). Mit dem Dermatome GA 630 (Aesculap AG, DE-Tuttlingen) wird Haut von 1 mm Dicke in Wuchsrichtung der Haare geschnitten. Die Hautstreifen werden auf einem mit isotoner Kochsalzlösung getränkten Papiertuch zwischengelagert, bis die benötigte Menge an Haut präpariert ist. Nachfolgend werden aus den Hautstreifen Stenzen von 25 mm Durchmesser mit einem Henkellocheisen (Eduard Gottfried Ferne GmbH, DE-Remscheid) erstellt. Die runden Hautstücke werden erneut auf dem mit Kochsalzlösung getränkten Papiertuch gelagert, bis alle Hautstanzen angefertigt sind. Das weitere Vorgehen ist in 3.2.9.2 und 3.2.14 beschrieben.

3.2.13 Akzeptormedien für die Durchführung von Freisetzungs-, Permeations- und Penetrationsuntersuchungen

Als Akzeptormedium für die Freisetzungs- und Permeationsuntersuchungen wird eine aus gleichen Volumenanteilen bestehende Mischung aus Phosphatpuffer pH 7,4 und Ethanol (HPLC gradient grade, Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis) verwendet. Hierzu werden 6,00 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat (Caesar & Loretz GmbH, DE-Hilden) und 0,19 g Kaliumdihydrogenphosphat (Caesar & Loretz GmbH, DE-Hilden) in 1,0 L RO-Wasser (ELGA Purelab Option-Q, ELGA Labwater GmbH, DE-Celle) gelöst. Der pH-Wert wird kontrolliert (S20-SevenEasy™ pH, Mettler Toledo, US-Columbus) und gegebenenfalls mit verdünnter Phosphorsäure (Caesar & Loretz GmbH, DE-Hilden) auf einen exakten Wert von pH 7,4 eingestellt. Ethanolischer Phosphatpuffer wird erhalten, indem 500 mL Ethanol (HPLC gradient grade, Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis) mit 500 mL des hergestellten Phosphatpuffers gemischt werden.

Für die Durchführung von Permeations- und Penetrationsstudien wird zudem eine 4%ige Lösung von bovinem Serumalbumin in isotonem Phosphatpuffer pH 7,4 verwendet. Zur Herstellung des isotonen Phosphatpuffers werden 8,00 g Natriumchlorid (Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis), 0,20 g Kaliumchlorid (Caesar & Loretz GmbH, DE-Hilden), 1,78 g Dinatriummonohydrogenphosphat-Dihydrat (Caesar & Loretz GmbH, DE-Hilden) und 0,27 g Kaliumdihydrogenphosphat in 1,0 L RO-Wasser (ELGA Purelab Option-Q, ELGA Labwater GmbH, DE-Celle) gelöst und gegebenenfalls mittels verdünnter Phosphorsäure auf pH 7,4 eingestellt. In 479,9 g des isotonischen Phosphatpuffers pH 7,4 werden 20,0 g bovines Serumalbumin Fraktion V (Albumin Fraktion V, Carl Roth GmbH & Co. KG, DE-Karlsruhe) und 0,1 g Natriumnitrit (Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis) zur Konservierung gelöst.

Beide Puffermischungen werden vor ihrem Einsatz im Ultraschallbad (Sonorex RK102H, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, DE-Berlin) entgast.

3.2.14 Vorbereitung der Freisetzungs-, Permeations- und Penetrationsuntersuchungen mit modifizierten Franz-Diffusionszellen

Für die Untersuchung der Freisetzung, Permeation und Penetration von Nonivamid aus bestimmten Formulierungen werden modifizierte Franz-Diffusionszellen (Gauer Glas, DE-Püttlingen) verwendet, die aus einem Donorkompartiment und einem über einen Probeentnahmearm verfügendes Akzeptorkompartiment bestehen. Die Vorbereitung der Versuche erfolgt nach einer von Lunter (2012) und Rottke (2012) entwickelten Methode. Das Polycarbonat-Wasserbad (T020, Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, DE-Lauda-Königshofen) wird mit Aqua purificata befüllt und auf 32 °C temperiert (Thermostat Alpha A, Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, DE-Lauda-Königshofen), da dies der Temperatur der Humanhaut in vivo entspricht. Der Mehrstellenmagnetprüher (Variomag Poly 15 Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) wird unterhalb des Wasserbads angebracht und auf 500 UpM eingestellt. Der Schliff der einzelnen Kompartimente wird mit einem geeigneten Schliff fett (Laborfett glisseal HV, Borer Chemie AG, CH-Zuchwil) eingefettet. In jedes Akzeptorkompartiment wird ein Magnetprührstbchen (Stirring Bars Micro 10 x 0,3 mm, VWR International, US-Radnor) gelegt und dann mit dem entsprechenden Akzeptormedium nahezu randvoll befüllt. Je nach Experiment wird entweder eine Filtermembran oder exzidierte Schweinehaut (3.2.12.2) an der unteren Seite des Donorkompartiments angebracht und mit dem Akzeptorkompartiment verbunden. Die Fixierung erfolgt durch Metallklammern (Gauer Glas, DE-Püttlingen). Über den Probeentnahmearm wird das Akzeptorkompartiment mit entgastem und auf 32 °C temperiertem Akzeptormedium bis zum Kalibrierstrich aufgefüllt, wobei die Franz-Diffusionszelle leicht schräg zu halten ist, um ein luftblasenfreies Akzeptorkompartiment zu gewährleisten. Danach werden die einzelnen modifizierten Franz-Diffusionszellen in einem entsprechenden Gestell (Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts, DE-Tübingen) in das temperierte Wasserbad überführt und so positioniert, dass alle Magnetprührstbchen im Akzeptorkompartiment röhren. Die so vorbereiteten Zellen werden für 30 min an die Umgebungsbedingungen angepasst (Äquibrierung). Vor der eigentlichen Probenaufgabe wird abschließend das Volumen an Akzeptormedium im Akzeptorkompartiment geprüft und gegebenenfalls exakt auf den Kalibrierstrich eingestellt. Zum Schutz vor Verdunstung während der Untersuchung wird der Probenentnahmearm durch den Aufsatz eines Mikroreaktionsgefßes (Super Clear™ 2,0 mL, VWR International, US-Radnor) abgedeckt.

3.2.15 In vitro Freisetzungsstudien

Die modifizierten Franz-Diffusionszellen (Gauer-Glas, DE-Püttlingen) werden wie in 3.2.14 beschrieben vorbereitet. Die Filtermembranen (PTFE Filter, Porenweite 5 µm, Ø=25 mm; Sartorius AG, DE-Göttingen) werden an der mit Laborfett glisseal HV (Borer Chemie AG, CH-Zuchwil) gefetteten Unterseite der Donorkompartimente befestigt. Im Akzeptorkompartiment wird ethanolischer Phosphatpuffer (3.2.13) vorgelegt. Nach erfolgter Äquilibrierung werden 200 µL filmbildende Formulierung pro modifizierte Franz-Diffusionszelle mittels einer Spritze (Injekt®-F 1 mL, B. Braun Melsungen AG, DE-Melsungen) in das Donorkompartiment eingefüllt und gleichmäßig auf der Filtermembran verteilt. Die Probenentnahme erfolgt nach 3, 5, 7, 22 und 24 h bzw. nach 16, 18, 20, 22, 24 und 42 h. Vor jeder Probenentnahme wird mit einer 1 mL-Spritze (Injekt®-F 1 mL, B. Braun Melsungen AG, DE-Melsungen), an die eine entsprechend lange Kanüle (Sterican® 0,80 x 120 mm, B. Braun Melsungen AG, DE-Melsungen) angebracht ist, das Akzeptormedium durchmischt. Anschließend wird ein Probenvolumen von 1 mL entnommen und in HPLC Vials (Crimp neck vials, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren) überführt. Sogleich werden die HPLC Vials verschlossen (Aluminium crimp cap, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren) und das entnommene Probenvolumen wird mit frischem, auf 32 °C temperiertem Akzeptormedium luftblasenfrei aufgefüllt. Die entnommenen Proben werden mittels HPLC (LC-20-A prominence, Shimadzu Corporation, JP-Kyoto) auf ihren Gehalt an Nonivamid geprüft (3.2.20.4.1). Die freigesetzte Menge an Nonivamid pro Inkubationsfläche wird dargestellt als eine Funktion gegen die Wurzel der Inkubationszeit. Hierzu wird zunächst für jeden Zeitpunkt die mit der Probenentnahme entnommene Menge an Nonivamid berechnet (Gleichung 3.2-7). Danach kann anhand Gleichung 3.2-8 berechnet werden, welche Masse Nonivamid pro Inkubationsfläche zu einem bestimmten Zeitpunkt freigesetzt wurde. Die Berechnung der Freisetzungsrates erfolgt mittels linearer Regression als Steigung der resultierenden Gerade.

$$m(NVA)_{\text{entnommen}, t=x \text{ h}} = c(NVA)_{t=x \text{ h}} \cdot V(\text{Probenvolumen})$$

Gleichung 3.2-7: Berechnung der dem Akzeptorkompartiment zum Zeitpunkt x [h] entnommenen Masse an Nonivamid [µg].

$m(NVA)_{\text{entnommen}, t=x \text{ h}}$ = Dem Akzeptorkompartiment entnommene Masse NVA bei t = x h [µg]

$c(NVA)_{t=x \text{ h}}$ = Analysierter Gehalt an NVA bei t = x h [µg/mL]

$V(\text{Probenvolumen})$ = Dem Akzeptorkompartiment entnommenes Probenvolumen [mL]

$$m(NVA)_{t=x\ h} \left[\frac{\mu g}{cm^2} \right] = \frac{[c(NVA)_{t=x\ h} \cdot V(Akzeptor)] + \sum m(NVA)_{zuvor\ entnommen}}{A(Haut)}$$

Gleichung 3.2-8: Berechnung der permeierten Masse Nonivamid pro Inkubationsfläche [$\mu g/cm^2$].

$m(NVA)_{t=x\ h}$ = Permeierte Masse NVA pro Inkubationsfläche bei $t = x\ h$ [$\mu g/cm^2$]

$c(NVA)_{t=x\ h}$ = Analysierter Gehalt an NVA bei $t = x\ h$ [$\mu g/mL$]

$V(Akzeptor)$ = Volumen des Akzeptorkompartiments [mL]

$m(NVA)_{entnommen, t=x\ h}$ = Dem Akzeptorkompartiment zuvor entnommene Masse NVA [μg]

$A(Haut)$ = Inkubationsfläche der Haut [cm^2]

3.2.16 Untersuchung der Dermato-Pharmakokinetik

Zur Untersuchung der Dermato-Pharmakokinetik werden ex vivo Permeationsstudien sowohl mit infiniten Dosierung als auch mit finiter Dosierung durchgeführt. Bei einer infiniten Dosierung wird die applizierte Menge so hoch gewählt, dass das Vehikel während des gesamten Versuchszeitraums nicht an Arzneistoff verarmt. Bei finiter Dosierung wird eine definierte Menge von 2 mg/cm² appliziert. Die Penetrationsstudien werden mit finiter Dosis durchgeführt.

3.2.16.1 Ex vivo Permeationsstudien – infinite Dosierung

Nachdem die modifizierten-Franz-Diffusionszellen (Gauer-Glas, DE-Püttlingen) vorbereitet (3.2.14), mit Spalthaut bestückt (3.2.12.2) sind und je nach Versuchsaufbau entweder das ethanolische Akzeptormedium oder die 4%ige BSA-Lösung in isotonem Phosphatpuffer pH 7,4 (3.2.13) in das Akzeptorkompartiment gefüllt ist, werden die Zellen für 30 min äquilibriert. Anschließend werden 200 µL der zu untersuchenden Formulierung pro modifizierter Franz-Diffusionszelle mit einer Spritze (Injekt[®]-F 1 mL, B. Braun Melsungen AG, DE-Melsungen) auf die Haut im Donorkompartiment aufgetragen und gleichmäßig verteilt. Wird Hydrophile Nonivamid Creme (3.2.11) appliziert, so werden die Donorkompartimente mit Parafilm[®] (Bermis Company Inc., US-Oshkosh) verschlossen. Dies vermindert die Verdunstung von Wasser aus der Formulierung, die ansonsten zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen würde. Bei der Applikation von filmbildender Formulierung (3.2.7) wird auf den Verschluss der Donorkompartimente bewusst verzichtet, da hier die Trocknung der Formulierung zur Ausbildung des Films ausdrücklich erwünscht ist. In einem Zeitraum von 20 bis 48 h werden zu fünf definierten Zeitpunkten Proben mit einer Spritze (Injekt[®]-F 1 mL, B. Braun Melsungen AG, DE-Melsungen) und einer entsprechend langen Kanüle (0,8 x 120 mm, B. Braun Melsungen AG, DE-Melsungen) entnommen. Auf eine Durchmischung durch Auf- und Abwärtsbewegung des Spritzenkolbens vor der Probenentnahme ist zu achten. Nach der Probenentnahme wird das Akzeptorkompartiment mit dem auf 32 °C vorgewärmten Akzeptormedium bis zum Kalibrierstrich aufgefüllt.

Bei der Verwendung des ethanolischen Phosphatpuffers pH 7,4 als Akzeptormedium beträgt das Probenvolumen 500 µL. Dieses wird in HPLC-Vials (Crimp neck vials, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren) überführt. Eine direkte Analyse der Probe in der HPLC ist möglich (3.2.20.4.2).

Für die Proben, bei denen das Akzeptormedium aus der 4%igen Lösung von BSA in isotonem Phosphatpuffer pH 7,4 besteht, erfolgt eine Probenaufarbeitung. Das Probenvolumen von 400 µL wird zunächst in ein Mikroreaktionsgefäß (Super Clear[™] 2,0 mL, VWR International,

US-Radnor) aufgenommen. Mit einer Pipette (Eppendorf Research® plus, 100-1000 µL, Eppendorf AG, DE-Hamburg) werden davon 200 µL in ein weiteres Mikroreaktionsgefäß überführt, mit 700 µL Acetonitril versetzt und für 10 s bei 2500 UpM (Vortex Mixer SA 8, Techne Inc., US-Burlington) gemischt, was zur Ausfällung des Albumins führt. Anschließend wird die Dispersion für 15 min bei 13400 UpM zentrifugiert (Minispin®, Eppendorf AG, DE-Hamburg). Der klare Überstand wird in HPLC Vials überführt und der Gehalt an Nonivamid mittels HPLC (LC-20-A prominence, Shimadzu Corporation, JP-Kyoto) analysiert (3.2.20.4.2). Für jede Formulierung wird eine Dreifach- bzw. Fünffachbestimmung durchgeführt.

Die Berechnung der permeierten Menge an Nonivamid pro Inkubationsfläche erfolgt analog zur Berechnung der freigesetzten Menge (Gleichung 3.2-7 und Gleichung 3.2-8). Die Berechnung der Permeationsrate erfolgt mittels linearer Regression als Steigung der resultierenden Gerade. Zur Berechnung des Permeationskoeffizienten (K_p) werden die Permeationsrate und die Ausgangskonzentration des Arzneistoffs in der Formulierung ins Verhältnis gesetzt (Gleichung 3.2-9).

$$K_p \left[\frac{mL \cdot h^{0,5}}{cm^2} \right] = \frac{J}{c_0}$$

Gleichung 3.2-9: Berechnung des Permeationskoeffizienten [$mL \cdot h^{0,5}/cm^2$].

K_p = Permeationskoeffizient [$mL \cdot h^{0,5}/cm^2$]

J = Permeationsrate [$\mu g \cdot h^{0,5}/cm^2$]

c_0 = Ausgangskonzentration des Arzneistoffs im Donor [$\mu g/mL$]

3.2.16.2 Ex vivo Permeationsstudien – finite Dosierung

Die modifizierten-Franz-Diffusionszellen (Gauer-Glas, DE-Püttlingen) werden für die Untersuchungen vorbereitet (3.2.14), mit Spalthaut (1 mm) bestückt (3.2.12.2) und das ethanolische Akzeptormedium (3.2.13) in das Akzeptorkompartiment gefüllt. Nach abgeschlossener Äquilibrierzeit von 30 min wird eine finite Dosis von ca. 2 mg/cm² auf die Haut aufgetragen. Dies gelingt über eine Differenzwägung: Auf eine tarierte, zylindrische Applikationshilfe aus Plexiglas (Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts, DE-Tübingen), die den gleichen Durchmesser wie der Innendurchmesser des Donorkompartiments hat, werden mit einem Spatel etwa 8 mg Formulierung aufgebracht und exakt gewogen (XP 205 DR, Mettler Toledo Inc., US-Columbus). Anschließend setzt man die Applikationshilfe über das Donorkompartiment mit wenig Druck auf die Haut auf und verteilt die Formulierung mittels einer Drehbewegung gleichmäßig darauf. Anschließend wird die Applikationshilfe erneut gewogen. Die Massendifferenz vor und nach der Applikation entspricht dabei der auf die Haut

aufgebrachten Menge. Im Gegensatz zu den Versuchen mit infiniten Dosierung wird unabhängig von der verwendeten Formulierung das Donorkompartiment nicht mit Parafilm® (Bermis Company Inc., US-Oshkosh) bedeckt. Dies ermöglicht eine Betrachtung der Permeation unter realistischen Bedingungen. Es ist darauf zu achten, die modifizierten Franz-Zellen direkt nach der Beladung mit Formulierung wieder in das temperierte Wasserbad zu stellen. Die weitere Prozedur entspricht der von ex vivo Permeationsuntersuchungen, die mit infiniten Dosierung im Donorkompartiment und ethanolischem Phosphatpuffer pH 7,4 im Akzeptorkompartiment durchgeführt werden (3.2.16.1). Für jede zu untersuchende Formulierung wird eine Fünffachbestimmung durchgeführt.

3.2.16.3 Untersuchung der ex vivo Penetration von Nonivamid in das Stratum corneum mittels einer Klebebandabriss-Technik

Eine von Pantelić et al. (2014) entwickelte Methode wird hier modifiziert. Die Studie wird im Rahmen eines bilateralen DAAD-Forschungsprojekts an der Universität Belgrad durchgeführt. Für diese Versuche wird die Haut nicht wie in 3.2.12 beschrieben präpariert, sondern das komplette Ohr nach der Reinigung in Aluminiumfolie eingefroren. Vor dem Start der Untersuchung wird das Ohr auf Raumtemperatur aufgetaut und die Applikationsstellen auf der Haut markiert. Die auf der Haut befindlichen Haare werden mit einem Haarschneider (Philips QC 5115/15 Series 3000, Philips Consumer Lifestyle BV, NL-Amsterdam) vorsichtig auf < 5 mm getrimmt. Es werden 25 mg der zu untersuchenden Formulierungen auf die zuvor gekennzeichneten Stellen aufgetragen, indem die Formulierung zunächst auf ein Stück Parafilm® (Bermis Company Inc., US-Oshkosh) aufgebracht und exakt gewogen wird (Extend ED224S, Sartorius AG, DE-Göttingen). Danach wird die Formulierung gleichmäßig auf der Applikationsstelle verteilt und das Parafilm®-Stück erneut gewogen. Über die Bildung der Differenz vor und nach der Applikation wird die exakt applizierte Menge erfasst. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wird die Formulierung mit isotoner Kochsalzlösung und Schlinggazetupfern (unsteril Gr. 5; Fuhrmann GmbH, DE-Much) entfernt. Es werden zwölf aufeinander folgende Klebebandabriss- (D-squame® tapes, CuDerm, US-Dallas) für jede Applikationsstelle durchgeführt, indem das Klebebandstück zunächst exakt gewogen (Extend ED224S, Sartorius AG, DE-Göttingen) und dann mit einem gleichmäßigen Druck von (140 g/cm²) über 10 s auf die Haut gepresst wird. Danach wird das Klebebandstück mit einer Pinzette in einer zügigen Bewegung abgezogen. Die Richtung, aus der das Klebeband entfernt wird, wird nach jedem Abriss-Vorgang um jeweils 90° in gleichbleibende Richtung gedreht. Jedes Klebebandstück wird nach dem Abriss-Vorgang erneut gewogen, um über eine Differenzbildung die Masse an entferntem Stratum corneum zu erfassen. Für den Transport der Klebebandstücke werden zwei Pinzetten verwendet, um auszuschließen, dass es zur

Kontamination durch die Corneocyten des Präparators kommt. Nachdem das Gewicht notiert ist, wird jedes Klebeband einzeln in ein Glaszentrifugenröhrchen (Duran Group GmbH, DE-Wertheim) gegeben und mit 5 mL Ethanol (HPLC gradient grade, Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis) extrahiert. Dazu werden die Zentrifugenröhrchen für 15 min in das Ultraschallbad (Sonorex RK102H, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, DE-Berlin) gegeben und darauffolgend bei 4000 UpM für 5 min zentrifugiert (Centric 90, BU Laboratory Systems, SL-Zelezniki). Der klare Überstand wird filtriert (MS Nylon Syringe Filter, Porenweite 0,22 µm; Membrane solutions, US-Bellevue) und auf den Gehalt an Nonivamid mittels LC-MS/MS (ACELLA chromatograph & TSQ Quantum Access MAX, Thermo Fisher Scientific, US-Waltham) geprüft (3.2.20.5).

Über das ermittelte Gewicht des Stratum corneum für jedes einzelne Klebeband kann die Dicke der entfernten Stratum-corneum-Schicht mit Gleichung 3.2-10 ermittelt werden. Trägt man die Schichtdicken kumulativ auf, so kann die Menge an penetrierter Masse pro Fläche als Funktion gegen die Hauttiefe ermittelt werden. Für jede zu untersuchende Formulierung wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

$$D[\mu\text{m}] = \frac{m}{A \cdot \rho}$$

Gleichung 3.2-10: Berechnung der Dicke des Stratum corneum.

D = Dicke des Stratum corneum [µm]

m = Masse des mit einem Klebestreifen entfernten Stratum corneum [µg]

A = Fläche der Haut, auf der die Klebebandabriss-Technik angewandt wird [µm²]

ρ = Dichte des Stratum corneum, ρ = 10⁻⁶ µg/µm³ (Dragicevic-Curic et al., 2009)

3.2.16.4 Methodenentwicklung zur Separation einzelner Hautschichten

Um die Arzneistoffmenge in mehreren Hautschichten (Stratum corneum, lebende Schichten der Epidermis und Dermis) zu bestimmen, werden verschiedene Methoden verwendet, gegenübergestellt und bewertet. Die Methodenentwicklung der einzelnen Optionen ist untenstehend aufgeführt.

3.2.16.4.1 Hautschnitte im Kryo-Mikrotom

Es wird Spalthaut gemäß 3.2.12.2 vorbereitet und mittels eines Henkellocheisens (Eduard Gottfried Ferne GmbH, DE-Remscheid) zu einer kreisförmigen Fläche (Ø=1,5 cm) ausgestanzt. Diese wird dann in entsprechend vorbereitete Aluminiumbehälter (Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts, DE-Tübingen) verbracht und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Dieses Behältnis sorgt dafür, dass die Haut flach eingefroren wird und ermöglicht somit

bessere Gefrierschnitte. Die Haut wird in gefrorenem Zustand mit der Oberseite nach unten in einen zylindrisch geformten Becher aus Aluminiumfolie ($\varnothing \approx 1,6$ cm, Cofresco Frischhalteprodukte GmbH & Co. KG, DE-Minden) gelegt und mit Einbettmedium (NEG 50™, Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) überschichtet. Der Becher wird auf eine auf -60 °C temperierte Stellplatte im Kryo-Mikrotom (Microm HM 560 Cryo-Star, Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) gegeben und vollständig eingefroren. Danach wird die Aluminiumfolie entfernt und das eingebettete Hautstück auf dem Objektträger des Kryo-Mikrotoms fixiert. Der Objektträger wird dann in der Objekthalterung des Kryo-Mikrotoms so justiert, dass die Haut parallel zum Messer ausgerichtet ist. Die Objekttemperatur wird auf -30 °C und die Temperatur der Klinge (MX Premier+ Microtome Blade, Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) auf -32 °C eingestellt. Es werden Hautschnitte mit einer Schnittdicke von 16 μm angefertigt. Um beurteilen zu können, welcher der drei Hautschichten jeder einzelne Schnitt zuzuordnen ist, wird eine histologische Färbung der Hautschnitte vorgenommen. Jeder einzelne Schnitt wird auf speziellen Objektträgern (Menzel Gläser Superfrost® Plus, Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) gesammelt und mit Hämatoxylin nach Harris (Carl Roth GmbH & Co. KG, DE-Karlsruhe) und Eosin-G Lösung 0,5 % (Carl Roth GmbH & Co. KG, DE-Karlsruhe) gemäß 3.2.22 angefärbt. Die angefärbten Hautschnitte werden mikroskopisch (3.2.20.1) betrachtet und den jeweiligen Schichten zugeordnet.

3.2.16.4.2 Hautbiopsie

Es wird ein Tropfen eines Cyanoacrylat-Klebstoffs (UHU Sekundenkleber (1645570), UHU GmbH & Co. KG, DE-Bühl/Baden) auf einen Objektträger gegeben und Spalthaut (3.2.12.2), die zuvor mit einem Henkellocheisen (15 mm, Eduard Gottfried Ferne GmbH, DE-Remscheid) zu einer kreisförmigen Fläche ausgestanzt wird, mit der Oberseite nach unten auf die Klebefläche aufgebracht. Dabei ist zu beachten, dass die Haut mit gleichmäßigem Druck auf der Klebefläche platziert wird und Luftpinschlüsse vermieden werden. Nach einer Inkubationszeit von 10 min, die eine vollständige Polymerisation des Klebstoffs erlaubt, wird die Haut mit einer Pinzette vorsichtig entfernt. Dabei verbleibt ein Teil des Stratum corneum auf dem Objektträger zurück. Für ein zweites Hautstück wird diese Biopsie zwei Mal hintereinander durchgeführt. Die so behandelten Hautstücke werden anschließend gemäß 3.2.16.4.1 für das Anfertigen von Querschnitten im Kryo-Mikrotom (Microm HM 560 Cryo-Star, Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) vorbereitet, entsprechend bearbeitet (3.2.16.4.1) und mit Hämatoxylin und Eosin eingefärbt (3.2.22). Die erhaltenen eingefärbten Hautschnitte werden lichtmikroskopisch (3.2.20.1) hinsichtlich einer vollständigen Entfernung des Stratum corneum beurteilt.

3.2.16.5 Ex vivo Penetrationsstudien

Die Grundlagen zur Durchführung von ex vivo Penetrationsstudien wurden bereits im Rahmen der Diplomarbeit (Heck, 2012) entwickelt und nun wie nachfolgend beschrieben optimiert. Zunächst wird Spalthaut (3.2.12.2) analog zum Vorgehen bei ex vivo Permeationsuntersuchungen mit finiter Dosis mit der gewünschten Zubereitung inkubiert (3.2.16.2). Nach zuvor festgelegten Zeitintervallen (1, 4, 12 und gegebenenfalls 24 h) werden die inkubierten Hautstücke aus den modifizierten Franz-Zellen (Gauer-Glas, DE-Püttlingen) entnommen.

3.2.16.5.1 Auswertung der Penetrationsuntersuchungen mittels Hautschnitten im Kryomikrotom

Die Auswertung von Penetrationsuntersuchungen mittels Kryomikrotom (Microm HM 560 Cryo-Star, Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) folgt weitgehend der in der Diplomarbeit (Heck, 2012) beschriebenen Methode. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Haut aus den modifizierten Franz-Diffusionszellen (Gauer Glas, DE-Püttlingen) entnommen. Es werden 250 µL isotone Kochsalzlösung auf die Haut aufgebracht und die restliche Formulierung mittels zweier nacheinander applizierten Schlinggazetupfern (unsteril Gr. 5; Fuhrmann GmbH, DE-Much) abgetragen. Mit einem Henkellocheisen (15 mm, Eduard Gottfried Ferne GmbH, DE-Remscheid) wird genau der Teil der Haut ausgestanzt, der dem Akzeptormedium und der Formulierung ausgesetzt war. Die ausgestanzte Haut wird in eine Metallvorrichtung (Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts, DE-Tübingen) eingebracht und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Dies soll eine weitere Penetration des Arzneistoffs in tiefere Hautschichten nach Ende der Inkubation verhindern. Die Haut wird in gefrorenem Zustand mit der Oberseite nach unten in einen zylindrisch geformten Becher aus Aluminiumfolie (Cofresco Frischhalteprodukte GmbH & Co. KG, DE-Minden) gelegt und mit einem Einbettmedium (NEG 50™, Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) überschichtet. Der Becher wird auf eine auf -60 °C temperierte Stellplatte im Kryomikrotom (Microm HM 560 Cryo-Star, Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) gegeben und vollständig eingefroren. Danach wird die Aluminiumfolie entfernt und das eingebettete Hautstück auf dem Objekteller des Kryomikrotoms fixiert. Der Objekteller wird dann in der Objekthalterung des Kryomikrotoms so justiert, dass die Haut parallel zum Messer ausgerichtet ist. Die Objekttemperatur wird auf -30 °C und die Temperatur der Klinge (MX Premier+ Microtome Blade, Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) auf -32 °C eingestellt. Es werden Hautschnitte mit einer Schnittdicke von 16 µm segmentiert und die Schnitte in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen (Falcon®, VWR-International, US-Radnor) überführt. Nach den Erkenntnissen aus 3.2.16.4.1 werden die ersten vierzehn Schnitte dem Stratum corneum zugeordnet. Die darauffolgenden

vierzehn Schnitte sind Teil der lebenden Schichten der Epidermis und werden in einem weiteren Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die letzten 44 Schnitte sind Hautschnitte, die der Dermis zuzuordnen sind, und werden in einem dritten Zentrifugenröhrchen gesammelt. Anschließend werden in jedes Zentrifugenröhrchen 2 mL Methanol (HPLC gradient grade, Sigma- Aldrich Corporation, US-St. Louis) gegeben. Die Röhrchen werden verschlossen und der Verschluss mit Parafilm® (Bermis Company Inc., US-Oshkosh) abgedichtet. Wie bei den vorangegangenen Proben werden die Proben auch hier zunächst für 30 s bei 2500 UpM gemischt (Vortex Mixer SA 8, Techne Inc., US-Burlington), dann für 15 min im Ultraschallbad (Sonorex Super RK 510/H, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, DE-Berlin) behandelt und anschließend für weitere 16 h bei Raumtemperatur gelagert. Nach Ablauf der Extraktionszeit wird die Lösung in ein 2 mL Mikroreaktionsgefäß (Super Clear™ 2,0 mL, VWR International, US-Radnor) überführt. Dieses wird anschließend für 1 min in flüssigen Stickstoff gegeben, um eventuell zuvor gelöste Proteine auszufällen. Daraufhin wird bei 13400 UpM und 4 °C für 1,5 min zentrifugiert (Centrifuge 5430 R, Eppendorf AG, DE-Hamburg). Es wird ca. 1 mL des Überstands entnommen, in HPLC-Vials (Crimp neck vials, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren) überführt, vercrimpt (PP screw cap, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren) und der Gehalt an Nonivamid entsprechend 3.2.20.4.2 analysiert.

Die in die einzelnen Hautschichten (Stratum corneum, lebende Schichten der Epidermis und Dermis) penetrierte Masse pro Inkubationsfläche wird gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die detektierte Menge wird auf eine konstante Einwaage von 4 mg Formulierung und ein Gewicht der Hautstücke von 175 mg normiert. Die Berechnung der penetrierten Masse Nonivamid pro Inkubationsfläche berechnet sich nach Gleichung 3.2-11.

$$m(NVA) \left[\frac{ng}{cm^2} \right] = \frac{c(NVA) \cdot V(Extraktionsmittel) \cdot 4 \cdot 175}{m(Formulierung) \cdot m(Haut) \cdot A(Haut)}$$

Gleichung 3.2-11: Berechnung der penetrierten Masse Nonivamid pro Inkubationsfläche.

m(NVA) = Penetrierte Masse Nonivamid pro Inkubationsfläche [ng/cm²]

c(NVA) = detektierte Konzentration an Nonivamid [ng/mL]

V(Extraktionsmittel) = Volumen des Extraktionsmittels [mL]

m(Formulierung) = applizierte Menge an Formulierung [mg]

m(Haut) = Gewicht des Hautstücks (Ø=1,5 cm) [mg]

A(Haut) = Inkubationsfläche des Hautstücks (Ø=1,5 cm)

3.2.16.5.2 Auswertung der Penetrationsuntersuchungen mittels einer Kombination aus einer Hautbiopsie und Hautschnitten im Kryo-Mikrotom

Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Haut aus den modifizierten Franz-Diffusionszellen (Gauer Glas, DE-Püttlingen) entnommen. Es werden 250 µL isotone Kochsalzlösung auf die Haut aufgebracht und die restliche Formulierung mittels zweier nacheinander applizierten Schlinggazetupfern (unsteril Gr. 5; Fuhrmann GmbH, DE-Much) abgetragen. Die runde Inkubationsfläche (Ø=1,5 cm) wird mit einem Henkellocheisen (15 mm, Eduard Gottfried Ferne GmbH, DE-Remscheid) ausgestanzt.

Anschließend wird ein Tropfen eines Cyanoacrylat-Klebstoffs (UHU Sekundenkleber (1645570), UHU GmbH & Co. KG, DE-Bühl/Baden) auf einen Objektträger aufgebracht und die Haut mit der Oberseite nach unten auf die Klebefläche aufgebracht. Dabei ist zu beachten, dass die Haut mit gleichmäßigem Druck auf der Klebefläche platziert wird und Lufteinschlüsse vermieden werden. Nach einer Inkubationszeit von 10 min, die eine vollständige Polymerisation des Klebstoffs erlaubt, wird die Haut mit einer Pinzette vorsichtig entfernt. Dabei verbleibt ein Teil des Stratum corneum auf dem Objektträger zurück. Zur vollständigen Entfernung des Stratum corneum wird die Hautbiopsie ein zweites Mal nach gleichem Muster durchgeführt. Das verbliebene Hautstück wird wie in 3.2.16.4.1 beschrieben in ein Aluminiumbehältnis (Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts, DE-Tübingen) verbracht und bis zur weiteren Bearbeitung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der mit den Stratum-corneum-Proben besetzte Objektträger wird in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 2 mL Methanol (HPLC gradient grade, Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis) versetzt (Transferpette® 500-5000 µL, BRAND GmbH & Co. KG, DE-Wertheim). Die Ansatzstellen des Verschlusses werden mit Parafilm® (Bermis Company Inc., US-Oshkosh) abgedichtet. Die Zentrifugenröhrchen werden für 30 s bei 2500 UpM gemischt (Vortex Mixer SA 8, Techne Inc., US-Burlington), um den Objektträger mit Methanol zu benetzen. Nach einer Inkubationszeit von zwei weiteren Stunden können die Biopsien vom Objektträger gelöst werden und vollständig in das organische Lösungsmittel zur Extraktion gelegt werden. Erneut wird die Probe für 30 s bei 2500 UpM gemischt (Vortex Mixer SA 8, Techne Inc., US-Burlington), für 15 min im Ultraschallbad (Sonorex Super RK 510/H, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, DE-Berlin) behandelt und anschließend für weitere 16 h bei Raumtemperatur gelagert.

Die in flüssigem Stickstoff zwischengelagerte Haut wird in gefrorenem Zustand mit der Oberseite nach unten in einen zylindrisch geformten Becher aus Aluminiumfolie (Cofresco Frischhalteprodukte GmbH & Co. KG, DE-Minden) gelegt und mit einem Einbettmedium (NEG 50™, Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) überschichtet. Der Becher wird auf

eine auf -60 °C temperierte Stellplatte im Kryo-Mikrotom (Microm HM 560 Cryo-Star, Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) gegeben und vollständig eingefroren. Danach wird die Aluminiumfolie entfernt und das eingebettete Hautstück auf dem Objektträger des Kryo-Mikrotoms fixiert. Der Objektträger wird dann in der Objekthalterung des Kryo-Mikrotoms so justiert, dass die Haut parallel zum Messer ausgerichtet ist. Die Objekttemperatur wird auf -30 °C und die Temperatur der Klinge (MX Premier+ Microtome Blade, Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) auf -32 °C eingestellt. Es werden Hautschnitte mit einer Schnittdicke von 16 µm segmentiert und die Schnitte in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen (Falcon®, VWR-International, US-Radnor) überführt. Dabei erfolgt die Zuordnung zu den beiden zu untersuchenden Hautschichten (lebende Schichten der Epidermis und Dermis) nach der in 3.2.16.4.1 dargelegten Methode. Da das Stratum corneum bereits mittels einer Hautbiopsie entfernt wurde, werden die ersten vierzehn Schnitte den lebenden Schichten der Epidermis zugeordnet und im ersten Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die verbleibenden Schnitte werden der Dermis zugeordnet und in einem weiteren Zentrifugenröhrchen vereint. Anschließend wird in jedes Zentrifugenröhrchen 2 mL Methanol HPLC verbracht. Die Röhrchen werden verschlossen und die Konnektionsstellen mit Parafilm® abgedichtet. Wie bei den vorangegangenen Proben werden die Proben auch hier zunächst für 30 s bei 2500 UpM gemixt, für 15 min im Ultraschallbad (Sonorex Super RK 510/H, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, DE-Berlin) behandelt und anschließend für weitere 16 h bei Raumtemperatur gelagert.

Nach der Extraktionszeit werden alle Zentrifugenröhrchen für 1 min in flüssigen Stickstoff gegeben, um gegebenenfalls gelöste Proteine auszufällen. Danach wird 15 min bei 4 °C und 6000 UpM (Megafuge 1.0 R, Heraeus Holding GmbH, DE-Hanau) zentrifugiert.

Bei Proben, die aus der restlichen Formulierung und dem Stratum corneum gewonnen wurden, wird der klare Überstand direkt in HPLC Vials (Crimp neck vials, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren) überführt und sofort vercrimpt (Aluminium crimp cap, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren).

Aufgrund der niedrigen Wirkstoffkonzentration ist für die Proben, die aus tieferen Hautschichten erhalten wurden, eine Aufkonzentrierung notwendig. Zunächst wird 1 mL des klaren Überstands mittels einer Pipette (Eppendorf Research® plus, 100-1000 µL, Eppendorf AG, DE-Hamburg) aus dem Zentrifugenröhrchen in ein mit Schraubgewinde versehenes HPLC Vial (Screw neck vials, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren) überführt. Sobald alle Proben entsprechend vorbereitet wurden, werden die unverschlossenen Vials unter dem Abzug gelagert, bis das organische Lösungsmittel vollständig verdunstet ist (ca. 72 h). Im

Anschluss daran werden die Proben mit 150 μL (Eppendorf Research[®] plus, 20-200 μL , Eppendorf AG, DE-Hamburg) Methanol HPLC gradient grade (Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis) versetzt und mit Schraubdeckeln (PP screw cap, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren) verschlossen, für 15 min bei 2000 UpM (VXR basic Vibrax, IKA-Werke GmbH & Co. KG, DE-Staufen) gemischt und anschließend für 15 min im Ultraschallbad (Sonorex Super RK 510/H, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, DE-Berlin) resolvatisiert. Zuletzt werden die nun gelösten Proben möglichst vollständig in einen kleinen Einsatz (0,2 mL Inserts for vials with wide opening, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren) überführt. Dieser wird in das HPLC Vial eingesetzt. Das Vial wird verschlossen (PP screw cap, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren) und ist nun bereit zur Analyse in der HPLC (3.2.20.4.2). Das Injektionsvolumen beträgt bei den Proben, die aus dem Stratum corneum erhalten wurden, 200 μL und für die aufkonzentrierten Proben aus den tieferen Hautschichten 120 μL . Für jede untersuchte Formulierung wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Um vergleichende Aussagen über die verschiedenen Formulierungen treffen zu können, muss bei jedem Experiment für die untersuchten Formulierungen die Haut desselben Individuums verwendet werden.

3.2.16.5.3 Auswertung der Penetrationsuntersuchungen mittels einer Kombination aus einer Klebebandabriss-Technik, einer Hautbiopsie und Hautschnitten im Kryo-Mikrotom

Nach erfolgter Inkubation werden 250 µL isotone Kochsalzlösung auf die Haut aufgebracht und die restliche Formulierung mittels zweier nacheinander applizierten Schlinggazetupfern (unsteril Gr. 5; Fuhrmann GmbH, DE-Much) abgetragen. Für eine vollständige Entfernung der restlichen Formulierung wird ein Klebebandabriss-Vorgang durchgeführt. Das Hautstück wird auf einen mit Alufolie umhüllten Block aus Polystyrol (Styrodur, Saint-Gobain Isover G+H AG, DE-Ludwigshafen a. Rhein) aufgespannt und ein Klebebandstück (tesafilm®, tesa SE, DE-Norderstedt), das die volle Inkubationsfläche überspannt, fest auf die Haut aufgedrückt. Das Klebebandstück wird anschließend mit einer Pinzette in einer zügigen Bewegung von der Haut abgezogen. Dieser Vorgang wird ein weiteres Mal wiederholt, wobei das zweite Klebebandstück im Vergleich zum ersten Klebebandstück um 90° versetzt angebracht wird. Die nun mit Formulierung und isotoner Kochsalzlösung getränkten Schlinggazetupfer sowie die zwei Klebebandstücke werden gemeinsam in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen (Falcon®, VWR-International, US-Radnor) gesammelt und mit 3750 µL Acetonitril (Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) versetzt, um später die Wiederfindungsrate zu kalkulieren. Die weitere Probenaufbereitung (Mischen, Extraktion und Lagerung) erfolgt analog zu 3.2.16.5.1. Die Penetrationsfläche ($\varnothing=1,5$ cm) des nun gewaschenen Hautstücks wird ausgestanzt (Locheisen 15 mm, Eduard Gottfried Ferne GmbH, DE-Remscheid). Anschließend wird eine Cyanoacrylat-Biopsie der oberen Hautschicht wie in 3.2.16.5.2 beschrieben durchgeführt. Nach derselben Methode erfolgt die Probenaufarbeitung der Biopsien. Die nach der Biopsie verbliebene Haut wird in ein Aluminiumbehältnis (Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts, DE-Tübingen) verbracht und in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Dewar-Gefäß zwischengelagert. Die darauffolgende Segmentierung der tieferen Hautschichten im Kryo-Mikrotom und deren Probenaufarbeitung wurde bereits in 3.2.16.5.2 detailliert beschrieben.

Alle Proben werden entsprechend 3.2.20.4.2 mittels HPLC auf den Gehalt an Nonivamid analysiert. Abweichend davon beträgt das Injektionsvolumen bei acetonitrilhaltigen Proben (Analyse der nach der Inkubation auf der Haut verbliebenden Formulierung) 50 µL, bei den Proben, die aus dem Stratum corneum erhalten wurden, 200 µL und für die aufkonzentrierten Proben aus den tieferen Hautschichten 120 µL.

Für jede zu untersuchende Formulierung wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Es ist darauf zu achten, dass für ein vergleichendes Experiment mit verschiedenen Formulierungen alle Hautproben von demselben Individuum stammen müssen. Die Berechnung der in die verschiedenen Hautschichten penetrierten Arzneistoffmenge erfolgt nach Gleichung 3.2-11.

3.2.16.6 In vivo Penetrationsstudien

Die Penetration von Nonivamid wird in vivo an Humanhaut untersucht und mittels einer Klebebandabriss-Technik analysiert. Die Studie wird im Rahmen eines bilateralen DAAD-Forschungsprojekts an der Universität Belgrad durchgeführt. Die Durchführung erfolgt in Übereinstimmung mit dem Ethik-Komitee für Forschung am Menschen (Ethical Committee on Human Research, Universität Belgrad, Pharmazeutische Fakultät, RS-Belgrad) und der Helsinki Deklaration (WMA, 2013). Das Vorgehen entspricht dabei weitgehend dem Vorgehen bei der Klebebandabriss-Technik, wie sie für die ex vivo Experimente durchgeführt wird (3.2.16.3). Abweichend davon wird vor Beginn der Messung der initiale transepidermale Wasserverlust (TEWL) der Haut bestimmt (Tewameter® TM 210, Courage+Khazaka electronic GmbH, DE-Köln). Diese Messung wird für jede Applikationsstelle nach vier aufeinander folgenden Klebebandabriss-Vorgängen wiederholt. Ein stetiger Anstieg des TEWL bestätigt die Schädigung der Hautbarriere und damit die Funktion der Klebebandabriss-Technik. Für aussagekräftige Messwerte ist während des Versuchs auf eine konstante Umgebungstemperatur zu achten (23 ± 1 °C, relative Luftfeuchtigkeit 40 ± 5 %).

3.2.17 In vivo Hautverträglichkeitsstudien

Um die Hautverträglichkeit der entwickelten Formulierungen an Humanhaut zu testen, wird eine Methode von Todosijević et al. (2015) und Isailović et al. (2016) modifiziert. Die Studie wird im Rahmen eines bilateralen DAAD-Forschungsprojekts an der Universität Belgrad durchgeführt. Die Methodenentwicklung und ein erster Vorversuch finden dort in Zusammenarbeit mit Milica Lukic statt, während die eigentliche Studie in einem weiteren Aufenthalt durch Dominique Lunter und Milica Lukic wie nachfolgend beschrieben durchgeführt wird. An der freiwilligen Studie nehmen 21 gesunde Frauen im Alter zwischen 23 und 37 Jahren teil, die weder an Hautkrankheiten oder -verletzungen leiden, noch über allergische Reaktionen in der Vergangenheit berichten. Alle Studienteilnehmer werden vor Beginn über das Protokoll aufgeklärt und bestätigen schriftlich ihre freiwillige Bereitschaft zur Teilnahme an der Studie. Die Zustimmung der Studienteilnehmer erfolgt in Übereinstimmung mit dem lokalen Ethikkomitee für Forschung am Menschen (Ethical Committee on Human Research, Universität Belgrad, Pharmazeutische Fakultät, RS-Belgrad) und der Deklaration von Helsinki (WMA, 2013). Ab dem Zeitraum von 24 h vor Start bis zum Beginn des Experiments ist es den Studienteilnehmern nicht erlaubt, topisch angewandte Produkte auf der Unterseite des Vorderarms aufzutragen. Des Weiteren ist der Konsum von koffeinhaltigen Lebensmitteln (z.B. Kaffee, Tee) innerhalb des genannten Zeitraums untersagt. Ebenso wie bei den Klebebandabriss-Experimenten beträgt die Inkubationszeit der Formulierungen auch hier 1 h. Neben der Untersuchung der Hautverträglichkeit der wirkstoffhaltigen filmbildenden Formulierung (FF 0,09 %) werden sowohl eine filmbildende Placebo-Formulierung (FF Placebo) als auch die bereits therapeutisch eingesetzte Hydrophile Nonivamid Creme 0,05 % (HNC 0,05 %) als Referenz untersucht. Dies erlaubt die Beurteilung, ob eine eventuell beobachtete Hautreaktion durch die Formulierungsgrundlage oder durch den Arzneistoff selbst verursacht wird und ob die Reaktion im Vergleich zu der therapeutisch eingesetzten Formulierung ähnlich ist.

Die Hautverträglichkeit der Formulierungen wird anhand dreier Parameter bestimmt: der Hydratation des Stratum corneum (SCH), des transepidermalen Wasserverlusts (TEWL) und der Hautrötung (Erythemindex, EI). Vor Beginn des eigentlichen Experiments warten die Studienteilnehmer 30 min, um die Haut an die Raumbedingungen (23 ± 1 °C, relative Luftfeuchtigkeit 40 ± 5 %) anzupassen. Nach erfolgter Akklimatisierung werden die Initialwerte der Hydratation des Stratum corneum (Cutometer[®] MPA 580, Courage+Khazaka electronic GmbH, DE-Köln), des Erythemindex (Mexameter[®] MX 18, Courage+Khazaka electronic GmbH, DE-Köln) und des transepidermalen Wasserverlusts (Tewameter[®] TM 210, Courage+Khazaka electronic GmbH, DE-Köln) an allen zuvor festgelegten vier

Applikationsstellen (3,8 cm²) auf der Unterseite des Vorderarms erfasst. Während an drei Stellen 34 ± 5 mg die jeweilige Formulierung aufgetragen wird, wird die vierte Applikationsstelle nicht genutzt und dient als Blindwert. Nach einer Inkubationszeit von 1 h werden die Filme der filmbildenden Formulierung mit SENSIFIX® tapes (Galenika a.d., RS-Belgrad) entfernt, während die halbfeste Formulierung mit Schlinggazetupfern (unsteril Gr. 5; Fuhrmann GmbH, DE-Much) entfernt werden kann. Vor der erneuten Messung aller Testparameter wird 5 min gewartet, um eine durch die mechanische Entfernung der Formulierung bedingte Verfälschung der Messwerte zu vermeiden.

Die Ergebnisse, die sich aus der Differenz der gemessenen Werten vor und nach der einstündigen Inkubation ergeben, werden getrennt nach den untersuchten Hautparametern als Einzelmesswerte mit dem korrespondierenden, arithmetischen Mittelwert dargestellt.

3.2.18 Darstellung von [D₁₇]-Nonivamid

Die Herstellung von [D₁₇]-Nonivamid erfolgt in einer Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Stefan Laufer der Pharmazeutischen und Medizinischen Chemie der Universität Tübingen. Die Synthese erfolgt nach dem in Abbildung 3.2-1 dargestellten Syntheschema.

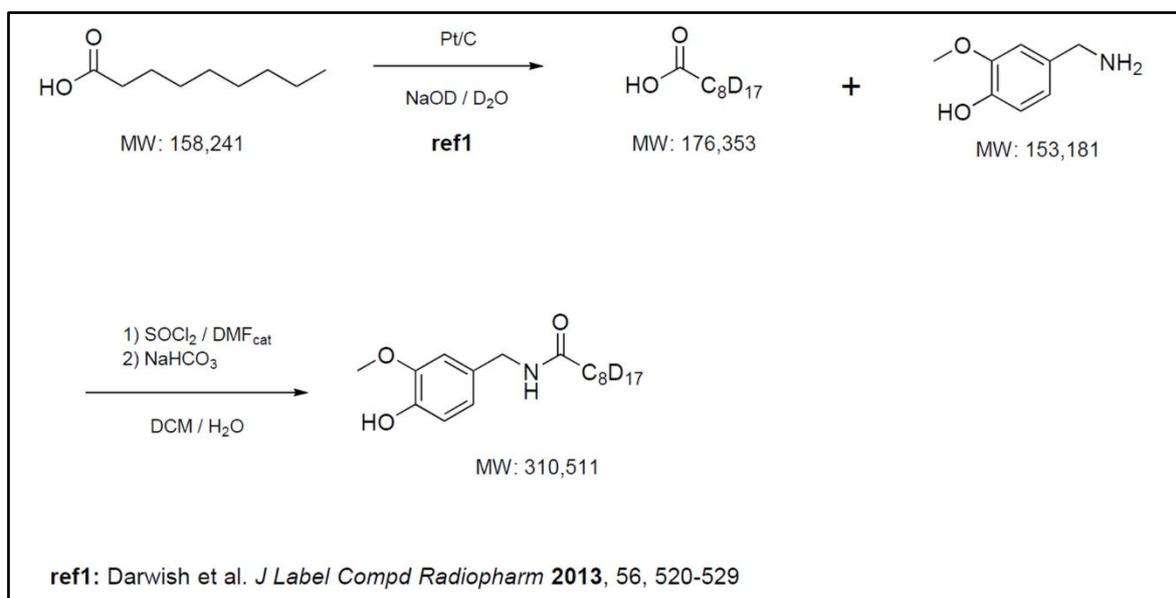


Abbildung 3.2-4: Syntheschema von [D₁₇]-Nonivamid.

3.2.18.1 Darstellung von [D₁₇]-Nonansäure

Die Synthese von [D₁₇]-Nonansäure wird ausgehend von einer durch Darwish et al. (2013) beschriebenen Methode in leicht modifizierter Form durchgeführt.

Eine ca. 1,3 M Lösung von NaOD in D₂O (Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis) wird durch portionsweise Zugabe von 656 mg Natrium (28,5 mmol, Riedel-de-Haën AG, DE-Seelze) zu 22 mL D₂O unter Eiskühlung hergestellt. In einem teflonbeschichteten Edelstahlreaktor (Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts Tübingen, DE-Tübingen) werden 1,0 g Nonansäure (6,3 mmol) in 9 mL 1,3 M NaOD gelöst und 75 mg Pt/C (10 % (m/m) Pt) hinzugefügt. Der Reaktor wird dicht verschlossen, in einem Sandbad auf 220 °C erhitzt und bei dieser Temperatur für fünf Tage gerührt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird der Katalysator über Celite® (Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis) abfiltriert und mit 0,5 M NaOH gewaschen. Das Filtrat wird mit 2 M HCl angesäuert und dann mit Essigsäureethylester (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden über Na₂SO₄ (CVU, DE-Tübingen) getrocknet und die Lösungsmittel unter reduziertem Druck (Rotavapor, Büchi Laboratoriums-Technik AG, CH-Flawil) entfernt. Die resultierende Flüssigkeit wird zusätzlich für drei Stunden unter Hochvakuum (P 30 DF Drehschieber-Vakuumpumpe, Ilmvac GmbH, DE-Ilmenau) getrocknet. Die Ausbeute wird gravimetrisch ermittelt und der Deuterierungsgrad mittels ¹H-NMR-Analytik über die restlichen Alkyl-¹H-Peaks bestimmt, wobei das COOH-Proton als interner Standard dient.

Nach der gleichen Methode wird ein weiteres Gramm [D₁₇]-Nonansäure hergestellt. Anschließend werden beide Chargen vereint und die bereits beschriebene Prozedur wird wiederholt, um den Deuterierungsgrad zu verbessern. Dabei werden 16 mL frisch hergestellte 1,3 M NaOD-Lösung verwendet. Die abschließende Bestimmung des Deuterierungsgrads erfolgt erneut durch ¹H-NMR-Analytik (3.2.21).

3.2.18.2 Darstellung von [D₁₇]-Nonivamid

Die Synthese von [D₁₇]-Nonivamid erfolgt gemäß der Schotten-Baumann-Methode durch Umsetzung von Vanillylamin mit Nonansäure nach Aktivierung mit Thionylchlorid.

Zu einer Lösung von 1,75 g [D₁₇]-Nonansäure (10 mmol, 1,0 eq) in 10 mL trockenem Dichlormethan (Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) werden ein Tropfen Dimethylformamid (Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) und 1,09 mL Thionylchlorid (15 mmol, 1,5 eq, Honeywell Specialty Chemicals GmbH, DE-Seelze) zugesetzt. Diese Lösung wird unter Rückflusskühlung für 90 min zum Sieden erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt.

In einem 100 mL Rundkolben werden 1,99 g Vanillylamin-Hydrochlorid (10,5 mmol, 1,05 eq, Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis) und 3,36 g Natriumbicarbonat (40 mmol, 4,0 eq, Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis) in 20 mL Dichlormethan und 20 mL Wasser gelöst. Die zweiphasige Mischung wird energisch gerührt und in einem Eisbad auf 0-5 °C herabgekühlt. Die Lösung des Säurechlorids wird tropfenweise mit einer Spritze zugegeben. Nach beendeter Zugabe wird zunächst für 30 min unter Kühlung und dann für weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Zu diesem Zeitpunkt wird eine Reaktionskontrolle zur Prüfung der vollständigen Umsetzung mittels HPLC-Analytik (3.2.21) durchgeführt. Bei vollständiger Umsetzung wird das Gemisch mit Dichlormethan verdünnt und in einen mit 50 mL gesättigter Kochsalzlösung gefüllten Scheidetrichter überführt. Die beiden Phasen werden getrennt und die wässrige Phase mit weiteren 20 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 50 mL 2 M KHSO₄-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ (CVU, DE-Tübingen) getrocknet. Anschließend wird das organische Lösungsmittel langsam unter vermindertem Druck im Rotationsverdampfer (Rotavapor, Büchi Laboratoriums-Technik AG, CH-Flawil) abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird mittels Flash-Chromatographie (puriFlash® 430, Interchim SA, FR-Montluçon; Gradient: Petroether/Ethylacetat + 5 % Methanol (10 bis 80 %)) aufgereinigt (3.2.21). Zur Aufreinigung wird die präparative Säulenchromatographie mit den Kieselgelen Davisil® LC60A 20-45 µm (W. R. Grace & Co. Corporation, US-Columbia) oder Geduran® Si60 63-200 (Merck KGaA, DE-Darmstadt) in einem automatisierten Flash-Chromatographiesystem (puriFlash® 430, Interchim SA, FR-Montluçon) verwendet. Das erhaltene farblose Öl wird in 30 mL Dioxan (CVU, DE-Tübingen) gelöst und unter Rühren langsam mit 15 mL Wasser versetzt. Diese Lösung wird in einem 24-stündigen Gefriertrocknungsprozess getrocknet. Man erhält das Produkt als amorphen weißen Feststoff, der abschließend noch im Hochvakuum nachgetrocknet wird. Die Bestimmung des Deuterierungsgrads erfolgt durch ¹H-NMR-Analytik (3.2.21).

3.2.19 Ex vivo Penetrationsuntersuchungen mit [D₁₇]-Nonivamid

Es werden ex vivo Penetrationsuntersuchungen mit einer 10,6%igen ethanolischen Stammlösung von [D₁₇]-Nonivamid und einer schnell freisetzenden Formulierung (HNC 0,95 % [D₁₇]-NVA) durchgeführt. Die ethanolische Stammlösung des deuterierten Wirkstoffs wird gemäß 3.2.11 hergestellt und dient zugleich als Bestandteil der Hydrophilen Nonivamid Creme. Die Herstellung der Formulierungen erfolgt dabei identisch zu den Formulierungen mit nicht-deuteriertem Wirkstoff (3.2.11). Die verwendete Konzentration an deuteriertem Arzneistoff entspricht der Molarität von nicht-deuteriertem Nonivamid in der Hydrophilen Nonivamid Creme 0,9 % (HNC 0,9 %). Die modifizierten Franz-Diffusionszellen (Gauer Glas, DE-Püttlingen) werden mit porciner Spalthaut von der Ohrrückseite (3.2.12.2) entsprechend 3.2.14 vorbereitet. Als Akzeptormedium wird eine 4%ige Lösung von bovinem Serumalbumin (Albumin Faktor V, Carl Roth GmbH, DE-Karlsruhe) in isotonem Phosphatpuffer pH 7,4 (3.2.13) verwendet. Im Gegensatz zu den Penetrationsuntersuchungen mit der nicht-deuterierten Substanz wird aufgrund der unbekanntenen Detektionsgrenze für den deuterierten Wirkstoff eine infinite (200 µL) statt einer finiten Dosierung auf die Haut aufgetragen. Das Donorkompartiment wird bei den Zellen, die die schnell freisetzende Formulierung enthalten, mit Parafilm® (Bermis Company Inc., US-Oshkosh) abgedichtet, um die Verarmung an Wasser und Ethanol im Vehikel während der Inkubation zu vermindern. Die Inkubationszeit beträgt 12 h. Danach werden die Proben umgehend für die Analyse im Raman-Mikroskop (alpha 500, WITech GmbH, DE-Ulm) vorbereitet.

Nach erfolgter Inkubation wird der auf der Haut ausgebildete Film bzw. die verbliebene Formulierung entsprechend 3.2.16.5.3 von der Haut entfernt. Die weitere Vorbereitung der Proben für die Analytik im Raman-Mikroskop erfolgt gemäß Lunter (2016). Die Penetrationsfläche der Hautstücke wird zunächst mit einem 15 mm Henkellocheisen (Eduard Gottfried Ferne GmbH, DE-Remscheid) ausgestanzt. Darauf wird jedes Hautstück separat in einer dreiteiligen Apparatur aus Teflon (Werkstatt des Pharmazeutischen Instituts, DE-Tübingen) mit Hilfe eines Deckglases fixiert. Die Haut wird dabei so eingelegt, dass die Oberseite der Haut für den Laser des Raman-Mikroskops direkt zugänglich ist. Der Aufbau der Apparatur ist in Lunter (2016) detailliert beschrieben. Die so vorbereiteten Proben werden mittels konfokaler Raman-Mikroskopie entsprechend 3.2.20.3.2 auf den Gehalt an Nonivamid in Abhängigkeit der Hauttiefe untersucht. Die Penetrationsuntersuchen werden für jede Formulierung mit jeweils drei Hautstücken durchgeführt. Für jedes inkubierte Hautstück werden die Spektren von drei bis vier zufällig gewählten Stellen generiert. Dies ergibt schließlich neun bis zwölf Stichproben.

3.2.20 Analytische Methoden

3.2.20.1 Lichtmikroskopische Charakterisierung

Die mikroskopische Untersuchung der Formulierungen wird mit dem Axio Imager Z.1 (Carl Zeiss Jena GmbH, D-Jena) durchgeführt. Hierzu wird ein Tropfen der Formulierung auf einem Objektträger verteilt. Es werden Bilder mit einem Objektiv (EC Plan-NEOFLUAR, 40x Vergrößerung, numerische Apertur 0,75) auf homogene Verteilung analysiert. Die genaue Analyse der Verteilung der einzelnen Bestandteile erfolgt mittels konfokaler Raman-Mikroskopie.

3.2.20.2 Rasterelektronenmikroskopische Charakterisierung

Das Präparat wird mit doppelseitigem, leitendem Klebeband auf Aluminium-Probeträgern fixiert und vorsichtig abgeblasen, um anhaftenden Staub zu entfernen. Die Präparate werden viermal für je 60 s bei 2,1 kV und ca. 20 mA gesputtert (Sputtercoater E 5100, Bio-Rad GmbH, DE-München). Zwischen den einzelnen Sputtergängen werden die Proben für 3-5 min gekühlt. Die gesputterten Präparate werden bei einer Beschleunigungsspannung von 5 kV am Rasterelektronenmikroskop (DM S940 A und Frame Grabber, Carl Zeiss Jena GmbH, DE-Oberkochen) untersucht und mit der Software Orion 5.25 (E.L.I: Microscopy, BE-Charleroi) ausgewertet.

3.2.20.3 Konfokale ramanmikroskopische Charakterisierung

Die Bestrahlung eines Stoffes mit monochromatischem Licht führt dazu, dass ein Großteil der Photonen elastisch gestreut wird. Dies bedeutet, dass Licht der gleichen Wellenlänge zurückgeworfen wird. Ein sehr kleiner Teil der Photonen wird jedoch unelastisch gestreut (Raman-Effekt), wodurch die Energie der unelastisch gestreuten Photonen verschieden ist von der Energie der eingestrahnten Photonen. Die unelastische Streuung kommt zustande, indem ein Photon mit dem Stoff interagiert und ihn zu Schwingungen anregt. Die dadurch entstehende Energieverschiebung der unelastisch gestreuten Photonen ist charakteristisch für die zu untersuchende Substanz. Es wird ein substanzspezifisches Streuungsmuster (Spektrum) erstellt, das zur Identifizierung von Substanzen oder zur Untersuchung der Verteilung von Substanzmischungen herangezogen werden kann. Das konfokale Raman-Mikroskop alpha 500, ausgestattet mit dem Spektrometer UHTS 300 und der CCD-Kamera DV401 -BV (alle WITech GmbH, DE-Ulm), wird mit einer Anregungswellenlänge von 523 nm verwendet.

3.2.20.3.1 Erstellung von Image-Scans

Zur Untersuchung der Lokalisation und Verteilung einzelner Bestandteile in getrockneten Filmen können ramanmikroskopische Aufnahmen erstellt werden. Für die Untersuchungen von Filmen, die ca. 3-5 μm Syloid[®] 244 FP-Partikel (W. R. Grace & Co. Corporation, US Columbia) enthalten, wird die Aufnahme mit Hilfe eines Ölimmersionsobjektiv (100x Vergrößerung; numerische Apertur: 1,25) erstellt, während bei Filmen von Formulierungen, die mit Syloid[®] XDP 3050 erhalten werden, ein 10x Objektiv (numerische Apertur: 0,25) verwendet wird, da Syloid[®] XDP eine Partikelgröße von ca. 50 μm aufweist. Eine Fläche von 150 x 150 Pixeln (22500 Pixel), was 35 x 35 μm (1225 μm^2 ; FP) bzw. 150 x 150 μm (22500 μm^2 ; XDP) entspricht, wird abgebildet. Dabei enthält jedes Pixel ein komplettes Raman-Spektrum, welches ein Mischspektrum aus den verschiedenen vorliegenden Substanzen an diesem Punkt darstellt. Zunächst werden durch evtl. vorhandene kosmische Strahlung verfälschte Mischspektren bearbeitet und eine Basislinienkorrektur durchgeführt. Durch die vorherige Bestimmung der Einzelspektren der jeweiligen Ausgangssubstanzen (Silica, Öl und Polymerdispersion) kann nun der Beitrag der Spektren, die durch die Ausgangssubstanzen verursacht werden, im Mischspektrum anhand einer Regressionsanalyse (Least squares analysis, WITech user manual, WITech GmbH, DE-Ulm) berechnet werden. Dies wird für jedes Spektrum und jede Substanz durchgeführt. So kann die relative Verteilung der Substanzen im untersuchten Bereich errechnet werden. Im letzten Schritt wird jeder Ausgangssubstanz eine Farbe zugeordnet, sodass die Verteilung der Substanzen im gewählten Areal in einem Falschfarbenbild illustriert werden kann. Die Intensität der einzelnen Farben im Bild korreliert dabei mit dem Verhältnis der Substanzen in der Mischung am jeweiligen Punkt der Aufnahme.

3.2.20.3.2 Erstellung von Tiefenscans

Um deuteriertes Nonivamid innerhalb der Haut zu detektieren, werden die für deuteriertes Nonivamid charakteristische Kohlenstoff-Deuterium-Bande bei 2135 cm^{-1} und die für Lipide (CH_2 -, CH_3 -Schwingung) charakteristische Bande bei 1460 cm^{-1} im Spektrum der Haut genauer betrachtet. Zunächst wird die oberste Schicht der Haut lichtmikroskopisch fokussiert. Die eigentlichen Tiefenscans werden 20 μm oberhalb der lichtmikroskopisch bestimmten Position der Hautoberfläche gestartet und in Richtung tieferer Hautschichten aufgenommen. Dabei wird ein Spektrum pro Mikrometer mit einer Integrationszeit von 2 Sekunden und einer Laserintensität von 39 mW erstellt. Es wird ein Gitter von 1800 g/mm, ein Objektiv (Vergrößerung: 40x; numerische Apertur: 0,6) und ein 25 μm Pinhole (Blende; optische Faser) verwendet. Dieses erlaubt eine hohe spektrale Auflösung von 1 cm^{-1} . Die Hautoberfläche ist erreicht, wenn das Spektrum die halbmaximale Intensität des Lipid-Signals erreicht. Dieses

und die darauffolgenden 19 Spektren werden hinsichtlich der Intensität der betreffenden Banden untersucht. Hierzu wird die Fläche unter der jeweiligen Raman-Bande bestimmt und die Flächen der Nonivamid-Bande ins Verhältnis zur Fläche der Lipidbande gesetzt. Dadurch kann der Effekt der tiefenabhängigen Abschwächung des Raman-Signals aufgehoben werden (Franzen & Windbergs, 2014; Lunter, 2016). Anschließend werden die normierten Flächen der Nonivamid-Banden gegen die Tiefe in der Haut aufgetragen, um ein Konzentrations-Tiefen-Profil zu erstellen.

3.2.20.4 HPLC-UV-Analytik zur Bestimmung des Nonivamidgehalts

Die Analytik wird mittels des „LC-20-A prominence“ HPLC Systems (Shimadzu, JP-Kyoto) durchgeführt. Es werden HPLC-Säulen vom Typ „EC 125/4 Nucleosil 100-5 C8“ (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren) in Kombination mit HPLC-Vorsäulen vom Typ „EC 4/3 Universal RP“ (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, DE-Düren) verwendet.

3.2.20.4.1 Methode zur Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von Nonivamid und zur Analyse der Freisetzungsuntersuchungen

Für die Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von Nonivamid wird die Temperatur des Säulen-Ofens auf 50 °C festgelegt. Als Eluent wird eine Mischung aus 59,5 % (V/V) Methanol (HPLC gradient grade, Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis) und 40,5 % (V/V) Phosphorsäure pH 3,0 verwendet. Die Flussrate beträgt 1,15 mL/min. Bei den Proben zur Bestimmung der Sättigungslöslichkeit wird ein Injektionsvolumen von 1 µL gewählt, während bei der Analyse der Freisetzungsuntersuchungen 20 µL injiziert werden. Nonivamid wird bei einer Wellenlänge von 230 nm und nach ca. 4 min detektiert.

3.2.20.4.2 Methode zur Bestimmung des Nonivamidgehalts bei Wasserfestigkeits-, Permeations- und Penetrationsuntersuchungen

Die Säulentemperatur wird auf 50 °C festgelegt. Die Fließmittelzusammensetzung besteht aus 50 % (V/V) Methanol (HPLC gradient grade, Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis) und 50 % (V/V) Phosphorsäure pH 3,0, die Flussrate wird auf 1,15 mL/min festgelegt. Es werden 200 µL Probenvolumen injiziert. Nonivamid wird bei einer Wellenlänge von 230 nm und nach ca. 9 min detektiert.

3.2.20.5 LC-MS/MS-Analytik zur Bestimmung des Nonivamidgehalts

Eine LC-MS/MS-Methode wird mit einem ACELLA Chromatograph (Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) durchgeführt, der an ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer TSQ Quantum Access MAX (Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) mit Elektronenspray-Ionisations-Quelle (ESI) gekoppelt ist. Ein SRM (Selected Reaction Monitoring) von m/z 294 auf 137 mit positiver Ionisierung für die LC-MS/MS-Methode wird verwendet. Als Säule wird eine „Zorbax Eclipse XDB-C8“ (150 x 4,6 mm, 3,5 μ m Partikelgröße, Agilent Technologies Inc., US-Santa Clara) bei einer Ofentemperatur von 40 °C genutzt. Die mobile Phase setzt sich aus einer Mischung aus Methanol (HPLC gradient grade, Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis) mit einer 20mM Ammoniumacetat-Lösung (Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis) 88:12 (V/V) zusammen. Die Flussrate beträgt 0,6 mL/min. Das Injektionsvolumen beträgt 10 μ L.

3.2.21 Analytische Methoden zur [D₁₇]-Nonivamid-Synthese

Als Reaktionskontrolle wird eine DC mit Merck DC-Kieselgelplatten (60 F₂₅₄, Merck KGaA, DE-Darmstadt) durchgeführt und unter UV-Licht (Desaga GmbH, DE-Wiesloch) bei 254 nm und 365 nm ausgewertet. Die HPLC-Analytik erfolgt mit einem HP 1090 Series II Liquid Chromatographen (HP Inc., US-Palo Alto). Als Säule wird eine Phenomenex® Luna C8-Säule (150 x 4,6 mm, 5 μ m, Phenomenex Inc., US-Torrance) verwendet, die Detektion erfolgt mittels eines UV-Diodenarray-Detektors bei den Wellenlängen von 254 nm und 230 nm. Die Fließmittelzusammensetzung und der Fließmittelgradient sind in Tabelle 3.2-8 aufgelistet. Die Flussrate wird auf 1,5 mL/min festgesetzt.

Tabelle 3.2-8: Fließmittelzusammensetzung und Fließmittelgradient.

	Zeit	Eluent A	Eluent B
Fließmittelkomponenten		0,01 M KH ₂ PO ₄ , pH 2,30	Methanol HPLC gradient grade
Fließmittelgradient	0-8 min	60 % auf 15 %	40 % auf 85 %
	8-13 min	15 %	85 %
	13-14 min	15 % auf 60 %	85 % auf 40 %
	14-16 min	60 %	40 %

NMR-Spektren werden mit den NMR-Spektrometern Avance 200 MHz oder Avance 400 MHz, (beide Bruker Corporation, US-Billerica) aufgenommen. Chemische Verschiebungen werden in ppm in Bezug auf Tetramethylsilan angegeben und die Spektren werden gegen den verbleibenden Protonenpeak des verwendeten deuterierten Lösungsmittels kalibriert.

Massenspektren werden als ESI-MS (positiver und/oder negativer Modus) mittels einer DCMS (Advion Inc., US-Ithaca) gemessen. Die Einstellungen werden wie folgt gewählt: ESI-Spannung 3,50 kV, Spannung der Kapillare 187 V, Quellen Spannung 44 V, Temperatur der Kapillare 250 °C, Desolvatisierungs-Gastemperatur 250 °C, Gas-Flussrate: 5,1 L/min.

3.2.22 Histologische Methoden (Hämatoxylin-Eosin Färbung)

Die Färbung der einzelnen Hautschnitte erfolgt nach Steudel (2016). Während mit Hämatoxylin basophile Strukturen, wie z.B. der Zellkern mit DNS und das raue endoplasmatische Retikulum, angefärbt werden, bewirkt die Färbung mit Eosin eine Rotfärbung acidophiler Strukturen der Zelle. Dies betrifft Zellplasmaproteine und Mitochondrien. Die zellkernlosen Strukturen des Stratum corneum können dadurch sehr gut von den zellkernreichen Strukturen der lebenden Schichten der Epidermis und den an Zellkernen ärmeren Strukturen der darunterliegenden Dermis unterschieden werden. Alle Schritte werden, sofern nicht anders angegeben, mit Hilfe von Glasfärbekammern durchgeführt.

Zu Beginn werden die auf den Objektträgern (Menzel Gläser Superfrost® Plus, Thermo Fisher Scientific Inc., US-Waltham) fixierten Hautschnitte mit einem Ethanolgradienten (50 %, 70 %, 90 %, 100 %, 90 %, 70 % und 50 % (V/V)) vorbehandelt. Dabei werden diese für jeweils 2 min in der entsprechenden Lösung inkubiert. Anschließend folgen drei Waschschrte mit RO-Wasser (ELGA Purelab Option-Q, ELGA Labwater GmbH, DE-Celle). Im nächsten Schritt erfolgt die eigentliche Färbung der Zellen. Hierzu werden die Objektträger in Hämatoxylin-Lösung nach Harris (Carl Roth GmbH & Co. KG, DE-Karlsruhe) für 5 s inkubiert. Es schließen sich zwei weitere Waschschrte mit Trinkwasser an. Zur Vertiefung der Farbe werden die Objektträger für 30 s in 0,1%ige Ammoniak-Lösung getaucht. Erneut folgt ein 5-minütiger Waschvorgang in Trinkwasser, bevor die Objektträger für 10 min in Eosin-G-Lösung 0,5 % (Carl Roth GmbH & Co. KG, DE-Karlsruhe) inkubiert werden. Anschließend an fünf weitere Waschgänge mit Trinkwasser wird die Färbung mit Ethanol 80 % für 2 min differenziert. Es folgen weitere Inkubationen, bei denen die Hautschnitte durch Inkubation in 100%igem Ethanol für 3 min und in Toluol für 5 min dehydriert werden. Zuletzt werden die Objektträger mit einem Deckglas (60 mm) in DePeX mounting medium (VWR International, US-Radnor) eingebettet und zur Aushärtung für 24 h bei 4 °C gelagert (Kühl- und Gefrierkombination Premium, Liebherr-International AG, CH-Bulle).

3.2.23 Statistische Methoden

3.2.23.1 Prüfung auf signifikante Unterschiede

Dort, wo eine statistische Auswertung sinnvoll ist, werden aus den Wiederholungsmessungen gewonnene Daten mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und einem darauffolgenden Posttest nach Newman Keuls auf statistische Signifikanz geprüft. Die Werte gelten als statistisch signifikant, wenn p-Werte < 0,05 erhalten werden. In den Diagrammen werden die Werte, die sich statistisch signifikant unterscheiden, mit * gekennzeichnet. Die detaillierten Daten zur statistischen Auswertung sind unter 8.5 aufgeführt.

3.2.23.2 Äquivalenzentscheidung bei Permeationsuntersuchungen

Um die Äquivalenz der Permeationsraten mehrerer Formulierungen, die mit Haut von verschiedenen Schweinen durchgeführt wurden, zu untersuchen, wird die Äquivalenzprüfung der SUPAC-SS, eine Richtlinie der amerikanischen Zulassungsbehörde zur Prüfung nicht steriler halbfester Produkte (FDA, 2004), abgewandelt. Voraussetzung für die Anwendung ist, dass in jedem Experiment die gleiche Referenzformulierung (Hydrophile Nonivamid Creme 0,05 %) untersucht wird. Die Anzahl der Testformulierungen kann dabei variieren. Die Permeationsraten der jeweiligen Formulierungen werden aus bis zu fünf Wiederholungsmessungen gebildet (n=3-5). Anschließend werden die Quotienten aus den einzelnen Permeationsraten der Testformulierung und der Referenzformulierung berechnet. Aus dieser Werteschar werden sowohl der Median als auch das Konfidenzintervall des Medians (Gleichung 3.2-12 und Gleichung 3.2-13) berechnet. Liegt das Konfidenzintervall innerhalb der Grenzen von 0,75 und 1,33, können die verglichenen Formulierungen als äquivalent angesehen werden.

$$h = \frac{(n - 1 - z \cdot \sqrt{n})}{2}$$

Gleichung 3.2-12

$$x(h) < \tilde{x} < x(n - h + 1)$$

Gleichung 3.2-13

n = Anzahl der Quotienten (abhängig von Wiederholungsmessungen)

z = 1,64 für 90 % Konfidenzintervall

\tilde{x} = Median

$x(h)$ = unteres Konfidenzintervall

$x(n - h + 1)$ = oberes Konfidenzintervall

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Formulierungsentwicklung

4.1.1 Sättigungslöslichkeit von Nonivamid in verschiedenen Ölen

Das Ziel der Arbeit besteht in der Entwicklung einer topisch applizierten filmbildenden Formulierung, die möglichst wenige Inhaltsstoffe enthält und bei der vor allem auf den Zusatz von Substanzen, die potentiell Hautirritationen hervorrufen können, verzichtet werden soll. Der gelöste Arzneistoff soll dabei an einen mesoporösen Träger aus Kieselgel gebunden werden. Aus diesem Grund soll bereits das Lösungsmittel eine ausreichend hohe Löslichkeit für den Modellarzneistoff aufzeigen. Hierzu wird die Sättigungslöslichkeit von Nonivamid entsprechend der in 3.2.1 beschriebenen Methode für Öle, die in dermatologischen Produkten Anwendung finden und sich vor allem in ihrer Polarität unterscheiden, bestimmt. Es wird die Löslichkeit von Nonivamid in raffiniertem Rizinusöl, C12-15-Alkylbenzoaten, mittelkettigen Triglyceriden, Isopropylmyristat, Mandelöl und Paraffinum liquidum untersucht.

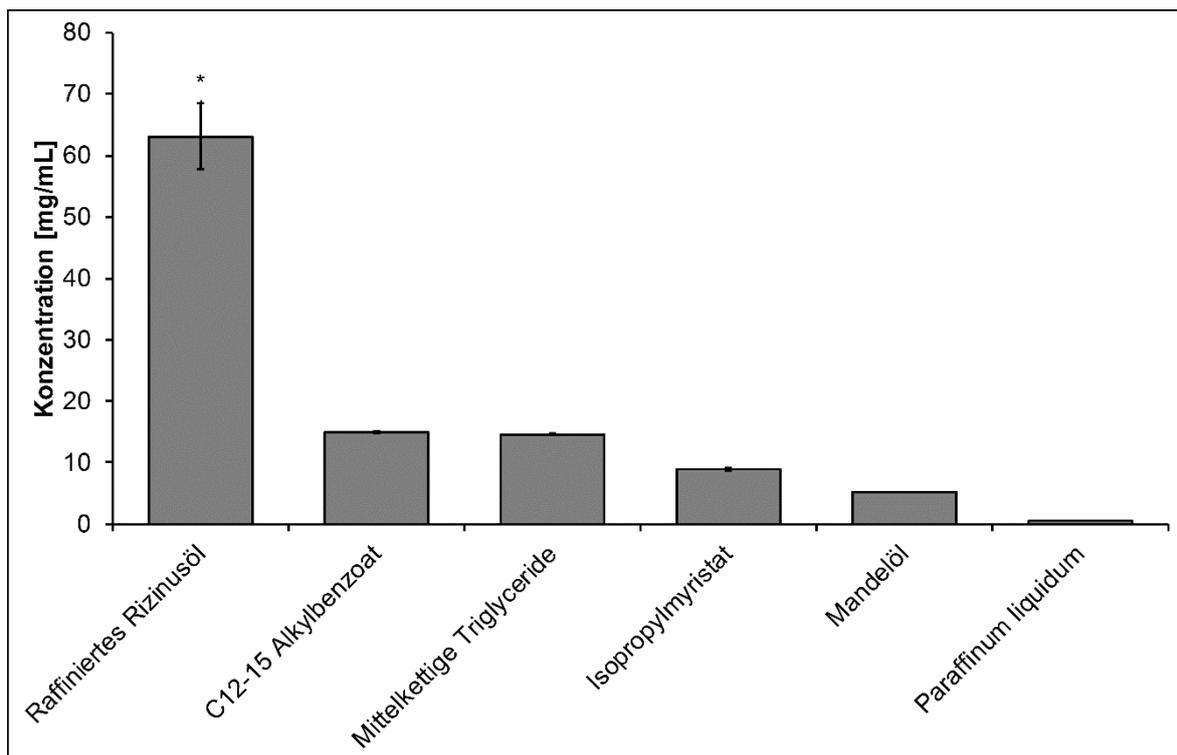


Abbildung 4.1-1: Sättigungslöslichkeit von Nonivamid in verschiedenen Ölen; n=1-3; arithmetischer Mittelwert \pm SD; p=0,05

Abbildung 4.1-1 zeigt, dass Rizinusöl eine herausragende Sättigungslöslichkeit für Nonivamid aufweist. Diese ist gegenüber den anderen untersuchten Lösungen um mehr als das Dreifache erhöht. Die statistisch signifikant höhere Löslichkeit (ANOVA; Newman-Keuls-Test; $p=2,3 \cdot 10^{-8}$)

ist wahrscheinlich auf die im Rizinusöl enthaltene veresterte Rizinusölsäure, die an Position C12 eine Hydroxygruppe trägt, zurückzuführen. Die mittelkettigen Ester in C12-15 Alkylbenzoat und die mittelkettigen Triglyceride zeigen ein mittleres Lösungsverhalten, das aber bei weitem nicht an die Löslichkeit von Nonivamid in Rizinusöl heranreicht. Mandelöl, das ein Gemisch aus langkettigen, teils mehrfachgesättigten Triglyceriden darstellt, zeigt für Nonivamid eine äußerst geringe Löslichkeit. Insgesamt betrachtet ist raffiniertes Rizinusöl aufgrund des außerordentlich guten und gegenüber den anderen Ölen bedeutend besseren Lösungsvermögens für Nonivamid das geeignete Lösungsmittel. Raffiniertes Rizinusöl ermöglicht, Formulierungen mit ausreichend hohen Wirkstoffkonzentrationen herzustellen und dabei geringe Mengen an Solvens zu verwenden. Durch die Reduktion der Lösungsmittelvolumina ist die Beladung der Silica-Partikel deutlich effektiver zu bewerkstelligen.

4.1.2 Charakterisierung von Kieselgelen

Kieselgel wird als Trägerstoff für die Arzneistofflösung eingesetzt. Dabei soll der Einsatz so gering wie möglich gehalten werden, um möglichen Instabilitäten oder Irritationen vorzubeugen. Als geeignet erweisen sich insbesondere solche Kieselgele, die aufgrund ihrer hohen inneren Porosität große Mengen an Arzneistofflösung absorbieren können, ohne ihre gute Pulverfließfähigkeit zu verlieren. Die Größe der Partikel kann dabei unter Umständen einen Einfluss auf die kosmetischen Eigenschaften und die Freisetzung des Wirkstoffs aus der Formulierung haben. Zur Untersuchung der Partikelgröße mesoporöser Silica werden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen erstellt (3.2.20.2) sowie deren Ölabsorptionskapazität bestimmt. Diese werden mit den Literaturdaten (Tabelle 4.1-1) verglichen.

Tabelle 4.1-1: Literaturdaten (Gupta et al., 2012; W. R. Grace & Co. Corporation, 2014) der verwendeten Silica

	Syloid® 244 FP	Syloid® XDP 3050
Durchschnittliche Partikelgröße	2,5-3,7 µm	ca. 50 µm
Porengröße	16 nm	25 nm
Ölabsorptionskapazität für Leinöl	334 g/100 g	294 g/100 g

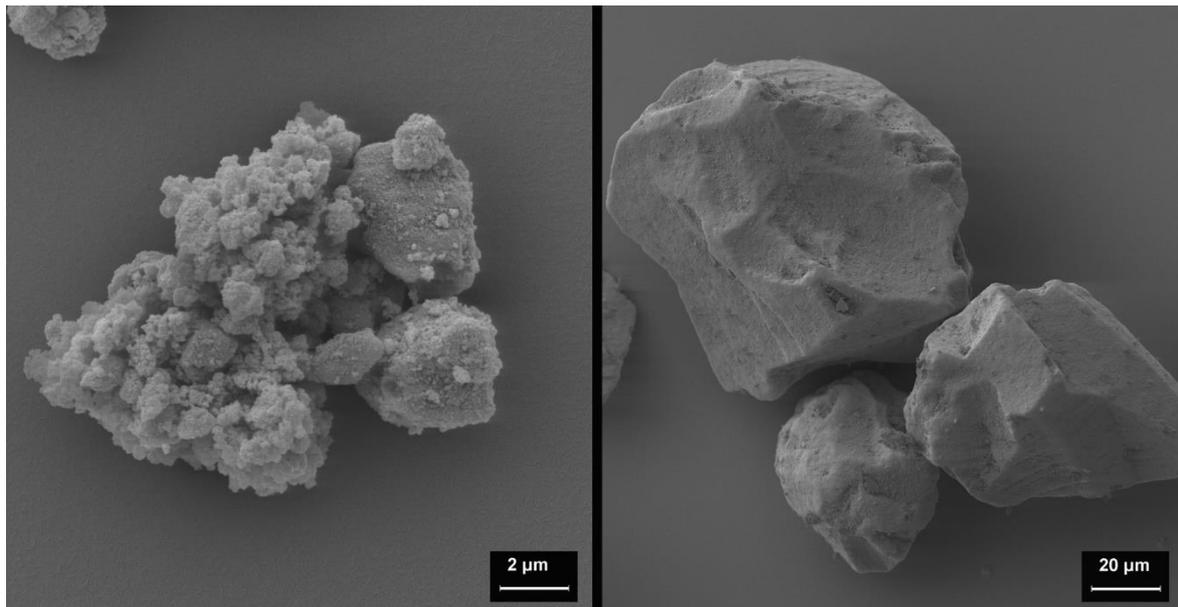


Abbildung 4.1-2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Syloid® 244 FP (links) und Syloid® XDP 3050 (rechts).

Die beiden mesoporösen Silica Syloid® 244 FP und Syloid® XDP 3050 (beide W. R. Grace & Co. Corporation, US-Columbia) zeigen laut Literaturdaten (Tabelle 4.1-1) ein sehr gutes Aufnahmevermögen für Öle, obwohl sie sich offensichtlich deutlich in ihrer Partikelgröße unterscheiden (Abbildung 4.1-2). Die Literaturangaben zur Größe können anhand der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigt werden. Für Syloid® 244 FP finden sich selten einzelne Partikel, sondern zumeist Agglomerate. Ein Maß für das Absorptionsvermögen stellt die Ölabsorptionskapazität dar, die entsprechend 3.2.3.1 untersucht wird. Es wird die Ölabsorptionskapazität für die gleichen Öle bestimmt, die auch zur Untersuchung der Sättigungslöslichkeit von Nonivamid verwendet werden (4.1.1).

Abbildung 4.1-3 zeigt, dass Syloid® 244 FP für alle eingesetzten Öle ein sehr hohes Absorptionsvermögen besitzt. Für die mittelkettigen Triglyceride und C12-15 Alkylbenzoat werden mit nahezu 300 g Öl/100 g Silica signifikant höhere Werte (ANOVA; Newman-Keuls-Test; $p=2,2 \cdot 10^{-8}$) im Vergleich zu den anderen Ölen erzielt. Aber auch für die restlichen untersuchten Öle wird eine hohe Kapazität erhalten. Die festgestellten Unterschiede in der Ölabsorptionskapazität korrelieren nicht mit der Dichte der verwendeten Öle. Zwar kann vergleichsweise geringfügig weniger Rizinusöl absorbiert werden, aber aufgrund der überlegenen Sättigungslöslichkeit für Nonivamid ist raffiniertes Rizinusöl insgesamt betrachtet das am besten geeignete Lösungsmittel, um große Mengen Arzneistoff in die Formulierung zu bringen und dabei den Einsatz an Trägersubstanz gering zu halten.

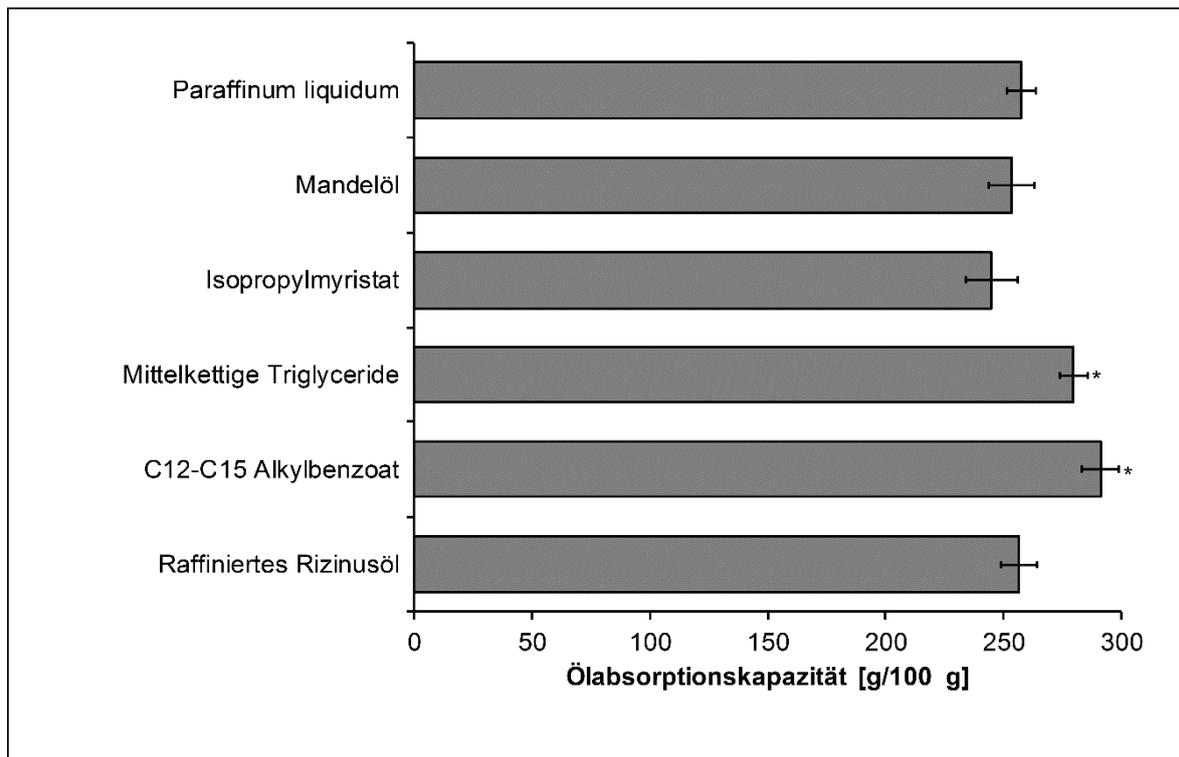


Abbildung 4.1-3: Ölabsorptionskapazität von Syloid® 244 FP für verschiedene Öle, n=5, arithmetischer Mittelwert \pm SD, p=0,05.

Anschließend wurde auch die Ölabsorptionskapazität von Syloid® XDP 3050 bestimmt. Hierbei wurde nur raffiniertes Rizinusöl verwendet, da die vorangegangenen Untersuchungen dieses als am besten geeignetes Lösungsmittel für Nonivamid bestätigt haben. Auch Syloid® XDP 3050 weist für raffiniertes Rizinusöl eine sehr hohe Ölabsorptionskapazität auf. Die Unterschiede zwischen den beiden Silica-Typen sind dabei marginal und statistisch nicht signifikant, wie Tabelle 4.1-2 verdeutlicht. Dies bedeutet, dass sich die unterschiedliche Partikelgröße offensichtlich nicht auf die Ölabsorptionskapazität auswirkt.

Tabelle 4.1-2: Ölabsorptionskapazität verschiedener Silica für raffiniertes Rizinusöl, n=5, arithmetischer Mittelwert \pm SD.

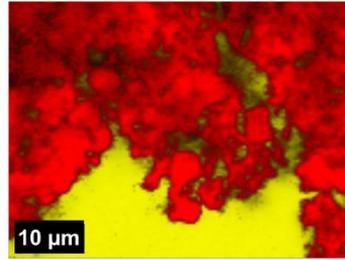
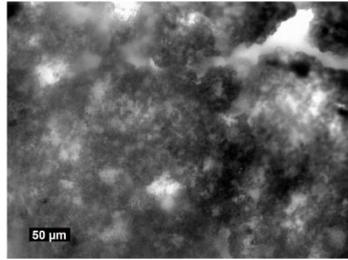
	Syloid® 244 FP	Syloid® XDP 3050
Ölabsorptionskapazität für raffiniertes Rizinusöl	293,1 \pm 12,57 g/100 g	285,8 \pm 13,83 g/100 g

4.1.3 Auswahl kompatibler Polymere zur verlängerten Wirkstofffreisetzung

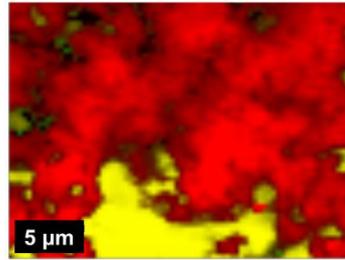
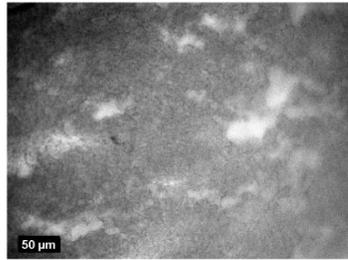
Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer Formulierung, die auf der Haut einen Film ausbildet. In diesem Film sind die ölbeladenen, wirkstoffhaltigen Silica-Partikel dispergiert. Die Auswahl eines Retardpolymers soll zum einen dafür sorgen, dass der Arzneistoff über eine längere Zeit freigegeben wird, und zum anderen die notwendige Substantivität des Films sicherstellen, damit der Arzneistoff über einen langfristigen Zeitraum von 12-24 Stunden auf der Haut zur Penetration/Permeation zur Verfügung steht. Als solche Retardpolymere werden Eudragit® FS, Eudragit® RL, Eudragit® RS, Eudragit® NE und Kollicoat® SR als 30%ige wässrige Dispersion eingesetzt. Eudragit® FS ist kein klassisches Retardpolymer, da es sich pH-abhängig bei einem pH > 7 löst. Bei dermalen Applikation werden solche pH-Werte jedoch nicht erreicht, weshalb Eudragit® FS 30D zur verlängerten Wirkstofffreisetzung auf der Haut geeignet sein könnte. Aufgrund der Anwendung der Formulierung auf pruritischer und besonders empfindlicher Haut soll die Zubereitung möglichst wenige Hilfsstoffe enthalten und dabei dennoch eine ausreichende Stabilität aufweisen. Insbesondere soll der Zusatz von potentiell irritativ wirkenden Substanzen, wie z.B. Emulgatoren, vermieden werden. Diese könnten durch eine Solubilisierung der hauteigenen Lipide eine weitere Störung der Barrierefunktion bewirken und durch deren Auswaschung die Symptomatik verschlimmern. Die Polymere sollen idealerweise als wässrige Dispersionen eingesetzt werden, um den Einsatz organischer Lösungsmittel zu vermeiden. Des Weiteren sollen die Polymere eine Filmbildung bei der Hautoberflächentemperatur von 32 °C ermöglichen. Daher ist unter Umständen der Zusatz geeigneter Weichmacher zur Senkung der Glasübergangstemperatur notwendig (Lunter, 2012). Die Kompatibilität der Retardpolymere mit dem ölbeladenen Silica wird anhand von Filmen, die aus Mischungen dieser Komponenten gebildet wurden, entsprechend 3.2.6 licht- und ramanmikroskopisch untersucht. Die Bereiche mit hohem Anteil an mit Rizinusöl beladenen Silica-Partikeln erscheinen als gelbgrüne Farbpunkte. Das umgebende Retardpolymer wird rot dargestellt.

In Abbildung 4.1-4 fallen direkt die großflächigen Ölflecke auf, die sich in den Filmen bilden, die die Polymere Eudragit® FS 30D, Eudragit® NE 30D und Kollicoat® SR 30D enthalten. Mikroskopisch kann man zudem die Koagulation der Polymere erkennen. Eudragit® NE 30D und Kollicoat® SR 30D weisen zum Beispiel zwischen pH 4 und pH 12 leicht negative Zetapotentiale von $\zeta = -13$ mV bzw. -8 mV auf (Ellermann, 2015). Dispersionen sind allerdings nur stabil, wenn ihre elektrostatische Abstoßung ausreichend hoch ist. Hierfür sollte das Zetapotential $\zeta \geq +30$ mV oder $\zeta \leq -30$ mV betragen (Everett, 1988). Um dennoch eine stabile Polymerdispersion zu erhalten, werden ihr Tenside zugesetzt, die die Dispersion entweder elektrostatisch oder sterisch stabilisieren können. Die gleichzeitige Anwendung von Kieselgel und Tensiden kann durch Sorption zu Flockungsprozessen führen. Insbesondere nicht-ionische Tenside, wie sie z.B. mit Nonoxynol-100 in Eudragit® NE 30D enthalten sind, zeigen eine starke Sorption an Kieselgel (Rupprecht & Liebl, 1972). Dies ist bedingt durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Silanolgruppen des Kieselgels und den Ethergruppen des nicht-ionischen Tensids (Rupprecht & Liebl, 1970).

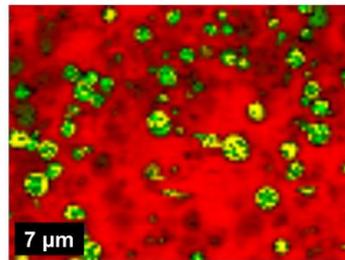
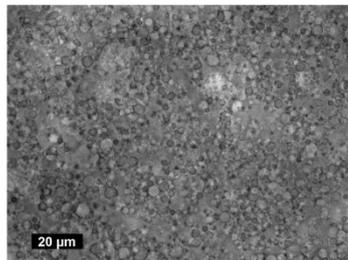
Eudragit® FS 30D



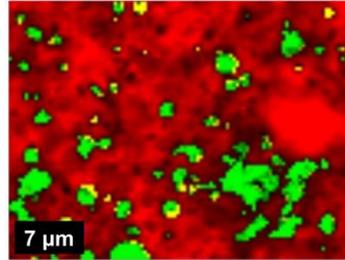
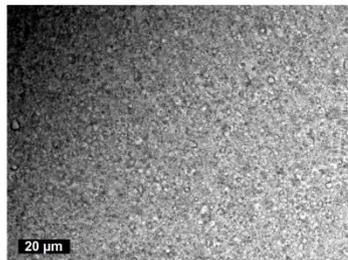
Eudragit® NE 30D



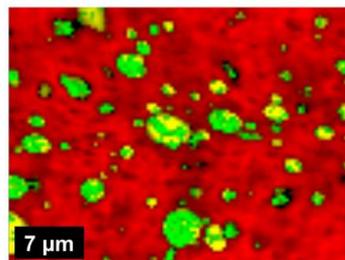
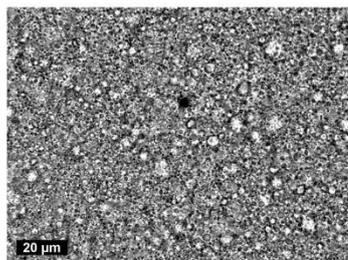
Eudragit® NE 30D
+ Polysorbat 80



Eudragit® RL 30D



Eudragit® RS 30D



Kollocoat® SR 30D

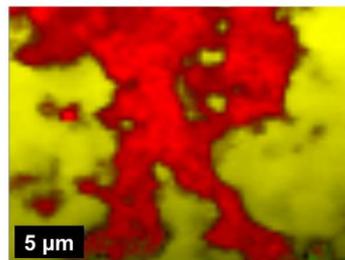
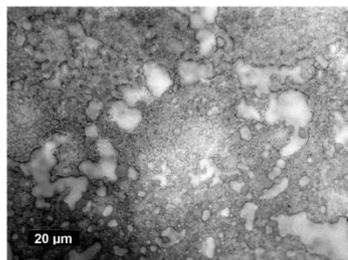


Abbildung 4.1-4: Licht- und ramanmikroskopische Aufnahmen getrockneter Mischungen aus ölbeladenem Silica mit verschiedenen Polymerdispersionen; Farbcode der ramanmikroskopischen Falschfarbenbilder: ■ raffiniertes Rizinusöl, ■ Silica, ■ Retardpolymer

Für die Adsorption des in Kollicoat® SR 30D enthaltenen Stabilisators Polyvinylpyrrolidon sind ebenso die Wasserstoffbrückenbindungen mit den Silanolgruppen des Kieselgels verantwortlich (Spruijt et al., 2015). Durch die Sorption des Tensids an die Silanolgruppen wird der sterische Stabilisator der Polymerdispersion entzogen. Die Polymerdispersion wird dadurch instabil, was das mikroskopisch zu beobachtende Phänomen der Flockung erklären kann. Durch den Zusatz eines anionischen Tensids, das praktisch keine Wechselwirkung mit Silica eingeht (Ettliger et al., 1987) und damit das Zetapotential weiter erniedrigt, kann ein solches System elektrostatisch stabilisiert werden. Weiterhin ist es vorstellbar, ein nicht-ionogenes Tensid (z.B. Polysorbat 80) in größeren Mengen zuzugeben, um das System trotz Sorption stabil zu halten. Dies bestätigt die homogene Verteilung der ölbeladenen Silica-Partikel in Filmen, die Eudragit® NE 30D, welchem zuvor 3 % Polysorbat 80 zugesetzt wurde, enthalten. Für die Filme, die aus den beiden Ammoniummethacrylat-Copolymerdispersionen Eudragit® RL 30D und Eudragit® RS 30D erhalten wurden, sind weder licht- noch ramanmikroskopisch Inkompatibilitäten nachzuweisen. Im Gegensatz zu Eudragit® NE 30D weisen die Polymerdispersionen von Eudragit® RL und Eudragit® RS strukturell bedingt ein positives Zetapotential zwischen +40 bis +50 mV auf. Aufgrund der durch die positive Ladung bedingte elektrostatische Abstoßung benötigen Eudragit® RL 30D und Eudragit® RS 30D keinen Zusatz an Emulgatoren oder Stabilisatoren. Für mesoporöses Silica werden im pH-Bereich zwischen pH 4 bis pH 8 leicht negative Zetapotentiale erhalten (Jesionowski et al., 2004). Entsprechend Abbildung 4.1-4 kann man jedoch keinen negativen Effekt auf die Stabilität der Zubereitung erkennen, sobald der Polymerdispersion das ölbeladene Silica zugesetzt wird. Man erkennt an den Aufnahmen, die mit konfokaler Raman-Mikroskopie erstellt wurden, dass das raffinierte Rizinusöl (gelb) weiterhin im grün dargestellten Silica gebunden vorliegt und das ölbeladene Silica homogen in das jeweilige Polymer (rot) eingebettet ist. Möglich erscheint, dass die vergleichsweise wesentlich voluminöseren Silica-Partikel aufgrund ihrer leicht negativen Ladung die positiv geladenen Polymerteilchen an ihrer Außenseite sorbieren. Dies würde zu einer positiv geladenen Oberfläche des Silicas führen, wodurch die Wechselwirkung mit Nachbarpartikeln unterbunden wird (Rupprecht & Liebl, 1972) und das System in sich stabil bleibt. Dies kann die Stabilität der Zubereitungen mit Eudragit® RS/RL 30 D erklären. Als prinzipiell kompatible Polymere sind daher die Ammoniummethacrylat-Copolymerdispersionen Eudragit® RL 30D und Eudragit® RS 30D sowie das durch den Zusatz von Polysorbat 80 stabilisierte Eudragit® NE 30D geeignet, Formulierungen mit ölbeladenem Syloid® XDP zu stabilisieren.

Für die Filmbildung bei einer Hautoberflächentemperatur von 32 °C ist für die Ammoniummethacrylat-Copolymere Eudragit® RL und Eudragit® RS ein Weichmacherzusatz, z.B. die Zugabe von Triethylcitrat, vonnöten. Aufgrund seiner niedrigen

Glasübergangstemperatur kann stattdessen bei Eudragit® NE auf einen Weichmacherzusatz verzichtet werden kann. Für Eudragit® RS genügt ein Zusatz von mindestens 25 % (m/m) Triethylcitrat bezogen auf die Lackrockensubstanz. Dahingegen sind für Eudragit® RL 30 % (m/m) Triethylcitrat-Zugabe bezogen auf die Lackrockensubstanz notwendig, um die Filmbildung bei der gewünschten Temperatur zu erreichen (Lunter, 2012). Die Weichmacherzugabe zur Polymerdispersion erfolgt nach 3.2.7.1. Der Zusatz der entsprechenden Menge an Triethylcitrat führt bei Eudragit® RS 30D zu einer dünnflüssigen, weißen Dispersion, während sich für das weichgemachte Eudragit® RL 30D ein hochviskoses Gel ausbildet, das für den weiteren Einsatz absolut ungeeignet ist. Deshalb erweisen sich ausschließlich die Polymerdispersionen von Eudragit® RS – mit entsprechendem Weichmacherzusatz – und Eudragit® NE, welches zuvor mittels Tensidzugabe sterisch stabilisiert wird, für den weiteren Einsatz als kompatibel.

4.2 Charakterisierung der Filme aus filmbildenden Formulierungen

Die entwickelten Formulierungen sollen nach dermalen Applikation einen zusammenhängenden Film bilden, in dem die wirkstoffhaltigen öbeladenen Kieselgelpartikel in einer Polymermatrix eingeschlossen sind. Das soll eine weitaus längere Wirkstofffreisetzung ermöglichen, als es bei der Anwendung einer Creme möglich wäre. Damit dies gelingt, ist es erforderlich, dass die später auf der Haut applizierte Formulierung gleichmäßige Filme ausbildet, die eine ausreichend hohe Substantivität zeigen und über einen längeren Zeitraum auf der Haut verbleiben.

4.2.1 Makroskopische Beurteilung der Filme

Die Formulierungen werden entweder mittels einer Kugelmühle (KM, Hormuth GmbH, DE-Heidelberg; 3.2.7.2.1) oder mit dem SpeedMixer™ DAC 150.1 FVZ (SM, Hauschild GmbH & Co. KG, DE-Hamm; 3.2.7.2.2) hergestellt. Während die Komponenten bei der Zubereitung in der Kugelmühle direkten Kontakt mit den Kugeln der Mühle haben, kann aufgrund des Mischprinzips im SpeedMixer™ auf solche Einsätze im Mischbehältnis verzichtet werden. Aus den so hergestellten Formulierungen werden Filme mit dem Filmziehgerät nach Grützmann (3.2.8) hergestellt und makroskopisch beurteilt.



Abbildung 4.2-1: Makroskopische Aufnahme eines Films, der aus einer Formulierung gewonnen wurde, die mit Polysorbat 80 stabilisiertes Eudragit® NE als filmbildendes Polymer enthält.

Bei Filmen, die aus Formulierungen mit Eudragit® NE als filmbildendem Polymer erhalten wurden, sind makroskopisch durchgehende, kleine Risse im Film zu erkennen (Abbildung 4.2-1). Durch diese Risse ist die Gefahr des Abriebs während des Applikationszeitraums gegeben, wodurch eine konstante Freisetzung nicht gesichert ist.

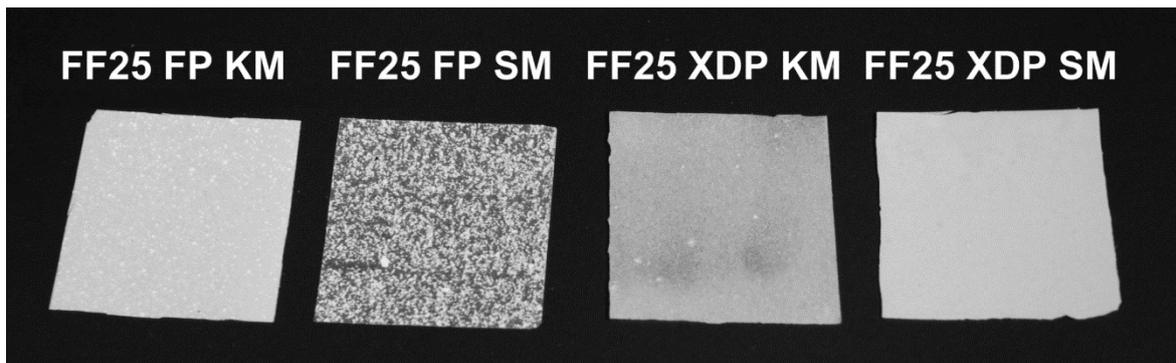


Abbildung 4.2-2: Makroskopische Aufnahme verschiedener Filme, die aus Formulierungen mit Eudragit® RS entstanden sind, sich aber in dem verwendeten Kieselgel (FP oder XDP) und der Herstellungsweise (Kugelmühle (KM) oder SpeedMixer™ (SM)) unterscheiden (Heck et al., 2016).

Wie in Abbildung 4.2-2 ersichtlich, werden von Formulierungen, die mit dem Ammoniummethacrylat-Copolymer Eudragit® RS hergestellt wurden, durchgehend zusammenhängende Filme erhalten. Diese unterscheiden sich in ihrem Erscheinungsbild jedoch einerseits, wenn Syloid® 244 FP oder Syloid® XDP 3050 (beide W. R. Grace & Co. Corporation, US-Columbia) als Trägersubstanz eingesetzt wird und andererseits, wenn die Herstellung der Formulierung in der Kugelmühle oder dem SpeedMixer™ erfolgt ist. Ein homogener, opaker Film wird erhalten, wenn die Formulierung Syloid® XDP enthält und im SpeedMixer™ hergestellt wird, während bei der Herstellung in der Kugelmühle vereinzelt Pulvernester erkennbar sind. Besonders auffällig sind die zahlreichen Pulvernester des Films aus einer Formulierung, die Syloid® FP enthält und im SpeedMixer™ hergestellt wird. Hier werden durch Verwendung der Kugelmühle deutlich bessere Filme erhalten. Dies kann durch die Agglomerations-tendenz der ölbeladenen Silica-Partikel und die ausgeübten Kräfte der beiden Mischapparaturen erklärt werden. Die ölbeladenen Syloid® 244 FP Partikel zeigen eine höhere Tendenz zu agglomerieren als die Partikel des ölbeladenen Syloid® XDP. Die Kugelmühle ist im Vergleich zum SpeedMixer™ deutlich effizienter in der Desagglomeration der ölbeladenen Partikel, während der SpeedMixer™ effizienter für eine homogene Verteilung der dispergierten Partikel oder Agglomerate sorgt. Aufgrund der hohen Tendenz zu agglomerieren ist es notwendig, die Formulierungen, die Syloid® 244 FP enthalten, in der Kugelmühle herzustellen. Stellt man diese Formulierung jedoch im SpeedMixer™ her, so werden die Agglomerate zwar homogen verteilt, jedoch nicht desagglomeriert, was schlussendlich in zahlreichen Pulvernestern im Film resultiert. Da ölbeladenes Syloid® XDP eine solche Agglomeration nicht zeigt, ist es nicht notwendig, in der Kugelmühle zu desagglomerieren. Stattdessen sorgt die effiziente Mischung im SpeedMixer™ für eine homogene Verteilung der Partikel und erlaubt die Ausbildung eines optisch ansprechenden Films (Heck et al., 2016).

Es ist also festzustellen, dass die Filme, die aus Formulierungen mit Eudragit® NE erhalten werden, durchgehende Risse zeigen und sind daher für die Weiterverwendung ungeeignet sind. Des Weiteren hat es für die Formulierungen mit Eudragit® RS einen entscheidenden Einfluss auf das Erscheinungsbild der Filme, welches Kieselgel und welche Herstellungsweise verwendet werden. Deshalb werden nur die beiden filmbildenden Formulierungen FF XDP SM und FF FP KM, die jeweils Eudragit® RS als filmbildendes Polymer enthalten und homogene Filme ergeben, für weiterführende Untersuchungen verwendet. Der Anteil des ölbeladenen Silicas ist dabei variabel bis zu maximal 27,5 % (m/m). Erhöht man den Anteil an ölbeladenem Silica weiter, entsteht eine knetartige Masse, die zwar gut formbar, aber nicht mehr streichfähig ist. Dies ist ein Indiz für intensive Wechselwirkungen zwischen Silica und Polymer.



Abbildung 4.2-3: Knetartige Masse, die bei einem zu hohen Anteil an ölbeladenem Pulver entsteht.

4.2.2 Mechanische Eigenschaften

Damit eine langfristige Wirkstoffpenetration in die Haut möglich ist, muss der Film längere Zeit auf der Haut verbleiben. Zum einen sollten die Filme ausreichend elastisch sein, um sich bei normaler Körperbewegung anzupassen. Dies verhindert ein Reißen und damit unter Umständen eine verfrühte Wirkstofffreisetzung. Eine niedrige Elastizität kann zudem zu einem für den Patienten als unangenehm empfundenen Spannungsgefühl führen. Von besonderer Wichtigkeit ist vor allem eine ausreichend lange Haftung des Films auf der Haut, damit über die gesamte Applikationszeit ein vollständiger Kontakt mit der Haut garantiert ist. Ist die Adhäsionskraft der Filme zu niedrig, können die Filmstücke durch alltagsübliche Bewegungen und Reibungen von der Haut abgetragen werden. Bei ausbleibender Versorgung des Wirkorts mit dem Arzneistoff kann dies zu einer Abschwächung der Wirkung oder gar zu einem Wirkverlust führen. Eine Nachdosierung der Formulierung wäre erforderlich. Dies würde jedoch den Vorteil gegenüber den bereits auf dem Markt verfügbaren Cremes wieder aufheben. Da manche Hautpartien im Alltag ebenfalls Feuchtigkeit und dem längeren Kontakt mit Wasser ausgesetzt sind, sollten die Filme ebenso über eine ausreichende Resistenz gegenüber Wasserkontakt verfügen. Dies verhindert einerseits, dass der Arzneistoff durch den Übergang in die Wasserphase der Formulierung entzogen wird. Andererseits wird so gewährleistet, dass sich der Arzneistoff nicht über die Verteilung in die Wasserphase auf andere Personen oder Gegenstände überträgt.

4.2.2.1 Nominelle Bruchdehnung

Zur Untersuchung der Elastizität der Filme werden zunächst freie Filme aus den filmbildenden Formulierungen hergestellt (3.2.8) und dann mit einem Materialprüfer (DO-FB0.5TS, Zwick GmbH & Co. KG, DE-Ulm) entsprechend 3.2.9.1 auf ihre nominelle Bruchfestigkeit geprüft.

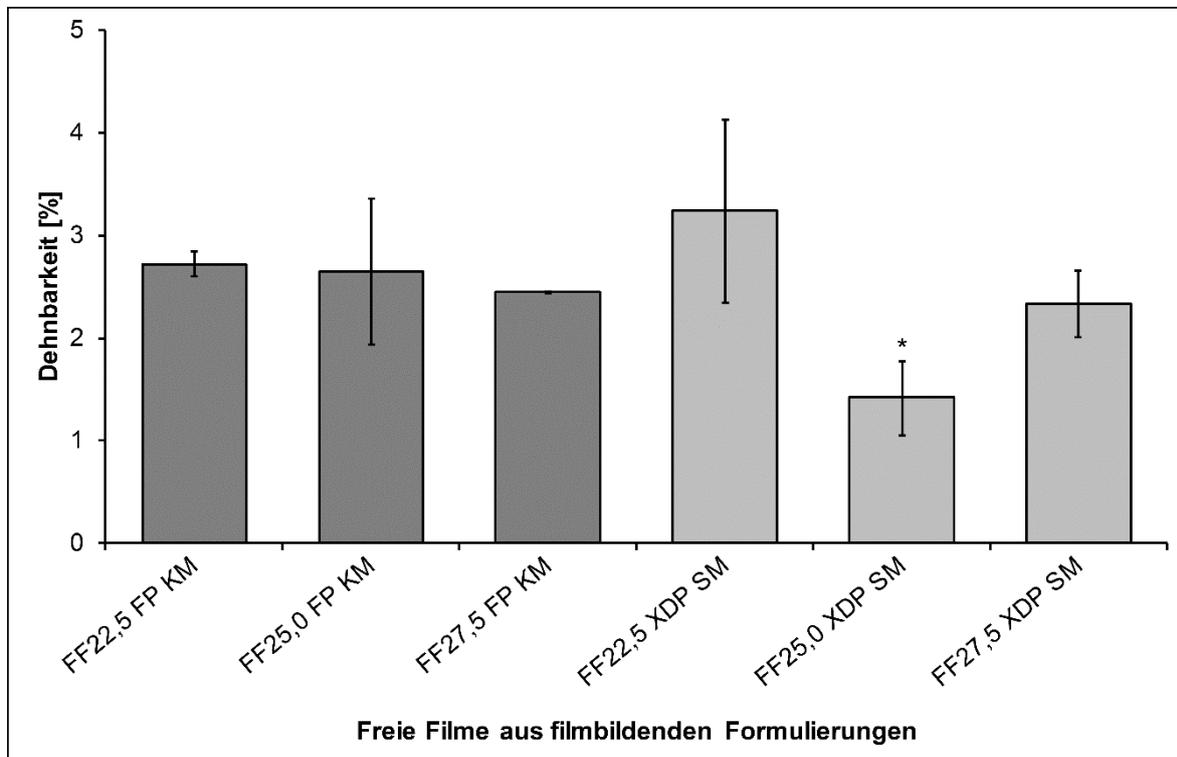


Abbildung 4.2-4: Dehnbarkeit freier Filme aus filmbildenden Formulierungen mit Eudragit® RS als filmbildendem Polymer und Syloid® 244 FP (dunkelgrau) oder Syloid® XDP 3050 (hellgrau) als Trägersubstanz; n=3-5; arithmetischer Mittelwert \pm SD; p=0,05, Student-Newman-Keuls-Test.

Abbildung 4.2-4 zeigt die Dehnbarkeit freier Filme, die Eudragit® RS als filmbildendes Polymer und entweder Syloid® 244 FP oder Syloid® XDP 3050 als Trägersubstanz enthalten. Des Weiteren variiert der Anteil an ölbeladenem Silica zwischen 22,5 und 27,5 %. Es ist erkennbar, dass durch die Einarbeitung der ölbeladenen Silica-Partikel die Dehnbarkeit der Filme deutlich vermindert ist. Die Dehnbarkeit der Filme liegt bei etwa 3 % und damit weit unterhalb der Dehnbarkeit menschlicher Haut. Durch den Zusatz des dispergierten ölbeladenen Silicas war zu erwarten, dass das Kieselgel den Zusammenhalt der Filme stört und dadurch die Dehnbarkeit der Filme im Vergleich zu der weichgemachten Polymerdispersion deutlich geringer ist. Eine Variation des Anteils an ölbeladenem Silica sollte erwartungsgemäß die Dehnbarkeit der Filme beeinflussen. Formulierungen, die einen geringeren Anteil an ölbeladenem Silica aufweisen, sollten Filme mit verbesserter Dehnbarkeit ergeben, da eine geringere Anzahl an Silica-Partikeln den Filmzusammenhalt erleichtern sollte. Dieser Effekt fällt jedoch marginal aus und ist allenfalls als Trend zu erkennen.

Die menschliche Haut zeigt eine erstaunliche Elastizität. So beschreiben Sumino et al. (2009), dass sich die Haut vom Unterarm postmenopausaler Frauen um ca. 55 % dehnen lässt. Filme, die aus reinem Eudragit® NE 30D (Evonik Industries AG, DE-Essen) oder mit weichgemachtem Eudragit® RS 30D (beide Evonik Industries AG, DE-Essen) hergestellt werden, weisen ohne weitere Zusätze eine Dehnbarkeit auf, die die Dehnbarkeit der Haut weit übersteigt. Dabei sind Filme, die aus Eudragit® NE gebildet werden, deutlich dehnbare als solche, die mit weichgemachtem Eudragit® RS erstellt werden (Sunghonjeen et al., 2008). Krögel und Bodmeier (1999) konnten zeigen, dass Filme aus Eudragit® NE eine maximale Dehnung von 153 % erreichen, während sich aus Eudragit® RS – weichgemacht mit 20 % Triethylcitrat (m/m) bezogen auf die Lackrockensubstanz – Filme mit einer Dehnbarkeit von ca. 65 % realisieren lassen. Aufgrund der bereits makroskopisch erkennbaren Risse ist eine valide Aussage zur Dehnbarkeit der Filme, die aus filmbildenden Formulierungen mit Eudragit® NE hergestellt werden, nicht möglich. Deshalb wurde nur die Dehnbarkeit der Filme analysiert, die mit Triethylcitrat weichgemachtes Eudragit® RS als filmbildendes Polymer enthalten. Die erhaltenen Messwerte liegen zwar deutlich unterhalb der Dehnbarkeit der Haut und auch unterhalb der 20 % Dehnbarkeit, die Lunter (2012) in ihrer Arbeit für filmbildende Emulsionen, welche ebenfalls Eudragit® RS als filmbildendes Polymer enthalten, bestimmt hat. Da deren Formulierungen sich von den hier untersuchten vor allem darin unterscheiden, dass sie Polymeremulgatoren statt Kieselgel-Partikel als Stabilisator der Ölphase in der wässrigen Polymerdispersion enthalten, ist der Effekt mit Sicherheit auf die enthaltenen Silica-Partikel zurückzuführen. Es macht dabei keinen Unterschied, welches der beiden Kieselgele verwendet wird.

Im Gegensatz zur Filmbildung auf der Haut werden die Filme in diesem Fall für eine definierte Zeit von 24 h bei 32 °C getrocknet. Während der Messung ist der Film jedoch den Umgebungsbedingungen des Messlabors ausgesetzt, anstatt dass er wie bei dermalen in vivo Applikation auf der Haut haftet. Unter realistischen Anwendungsbedingungen würden die Filme durch den transepidermalen Wasserverlust der Haut während der Lagerung befeuchtet werden. Der Einfluss unterschiedlicher Lagerbedingungen der Filme aus filmbildenden Formulierungen hinsichtlich der Luftfeuchtigkeit wurde von Kemmer (2015) in einer Projektarbeit untersucht. Hierbei wurden neben den ohne weitere Vorkehrungen bei 32 °C im Trockenschrank (relative Feuchtigkeit < 20 %) gelagerten Filmstücken auch solche untersucht, die im Trockenschrank bei 32 °C unter definierten Luftfeuchtigkeitsbedingungen von 50 % bzw. 75 % relativer Feuchte gelagert wurden.

Wie aus Abbildung 4.2-5 ersichtlich, bewirkt eine Änderung der Lagerungsbedingungen jedoch nur zum Teil eine Verbesserung der Dehnbarkeit. Weder bei einer Lagerung der Filme bei

50 % noch bei 75 % relativer Feuchte kann die Dehnbarkeit in dem Sinne verbessert werden, dass sich eine Annäherung an die Elastizität der menschlichen Haut abzeichnet.

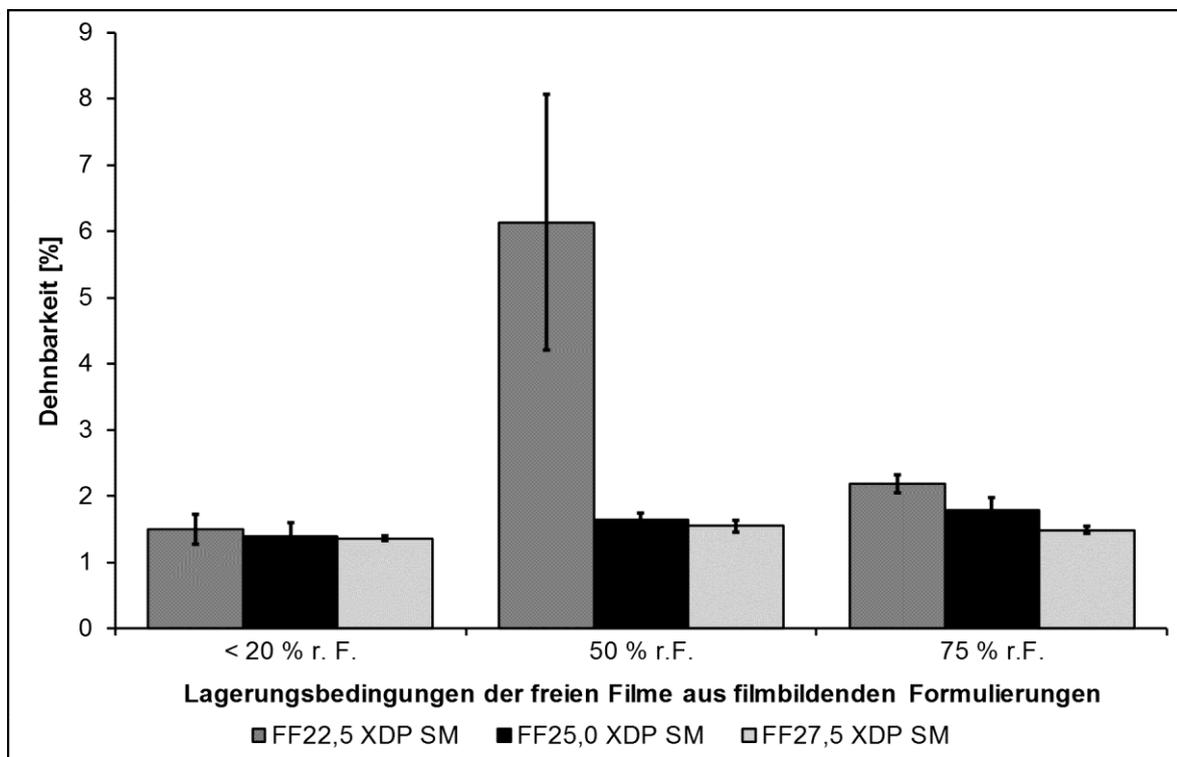


Abbildung 4.2-5: Einfluss der Lagerungsbedingungen von freien Filmen aus filmbildenden Formulierungen auf deren Dehnbarkeit - modifiziert nach Kemmer (2015), n=5; arithmetischer Mittelwert \pm SD.

Problematisch dabei ist, dass die Messung der Dehnbarkeit am Materialprüfer nicht unter den definierten Luftfeuchtigkeitsbedingungen erfolgen kann. Um möglichst realistische Werte zur Elastizität der Filme auf der Haut zu erhalten, sollte die Messung der Dehnbarkeit nach abgeschlossener Filmbildung direkt auf der Haut erfolgen. Dies ist jedoch mit den bisherigen Apparaturen so nicht durchführbar. Deshalb kann eine realistische Vorhersage der Dehnbarkeit auf der Haut mit dem Materialprüfer nicht getroffen werden und die Werte sind vor allem vergleichend zu betrachten. Da jedoch kein Unterschied in der Dehnbarkeit in Abhängigkeit des gewählten Silicas und des Anteils an ölbeladenem Silica festzustellen ist, ist keine der untersuchten Formulierungen in ihrer Dehnbarkeit überlegen. Umso wichtiger erscheint daher eine feste Haftung der freien Filme, die im Folgenden direkt auf der Haut untersucht wurde.

4.2.2.2 Adhäsionskraft

Eine genügende Haftung der freien Filme ist unerlässlich, damit der Arzneistoff über einen längeren Zeitraum am Applikationsort zur Verfügung stehen kann. Daher wurde die Adhäsionskraft von auf der Haut getrockneten filmbildenden Formulierungen bestimmt.

Die Adhäsionsmessungen werden mit dem Materialprüfer DO FB0.5TS durchgeführt, der auch für die Messung der nominellen Bruchfestigkeit verwendet wird. Da die Zubereitungen später auf menschlicher Haut haften sollen, wird als Modell Vollhaut von Schweinen gewählt. Die Messung beruht darauf, dass die filmbildende Formulierung mit definierter Kraft auf die Haut gepresst und der Anpressdruck für eine Zeitdauer von 30 min aufrechterhalten wird. Während dieser Zeit bildet sich ein vollständiger Film zwischen der Haut und dem Prüfwerkzeug aus. Anschließend wird die Kraft beim Entfernen des Films gemessen. Die Instrumentierung und der Ablauf der Messung ist in 3.2.9.2 detailliert beschrieben.

Die Adhäsionskraft freier Filme, die aus filmbildenden Formulierungen mit mesoporösem Kieselgel gebildet wurden, wird mit der Adhäsionskraft eines freien Films, der aus der weichgemachten filmbildenden Polymerdispersion Eudragit® RS 30D (Evonik Industries AG, DE-Essen) hergestellt wurde, verglichen. Diese weichgemachte Polymerdispersion dient gleichzeitig auch als filmbildende Komponente in den untersuchten filmbildenden Formulierungen. Als Referenz wird die Adhäsionskraft eines wirkstofffreien, transdermalen therapeutischen Systems (UCB, BE-Anderlecht) analysiert.

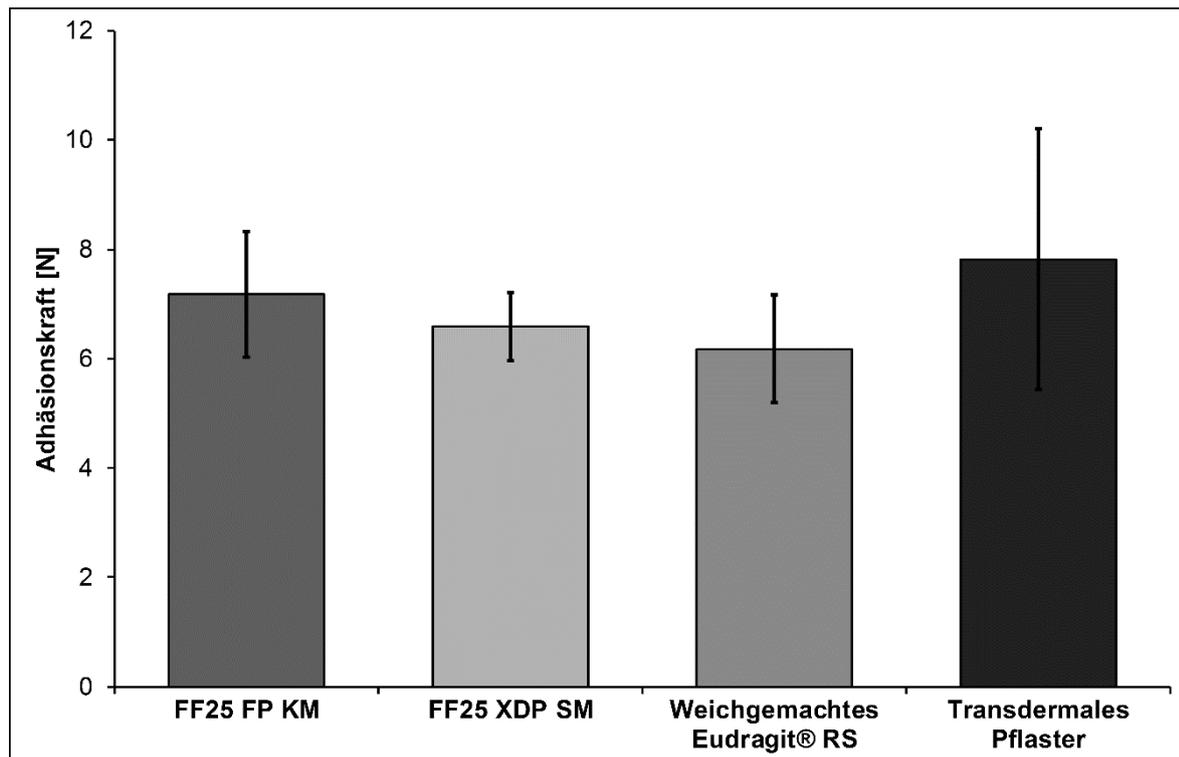


Abbildung 4.2-6: Adhäsionskraft von Filmen verschiedener filmbildender Formulierungen; n=5; arithmetischer Mittelwert \pm SD; p=0,05; ANOVA.

Abbildung 4.2-6 zeigt die Adhäsionskraft der Filme der beiden filmbildenden Formulierungen im Vergleich zu der weichgemachten Polymerdispersion und dem transdermalen Pflaster. Die Filme, die aus der filmbildenden Formulierung entstanden sind, zeigen beide eine Adhäsionskraft von etwa 7 N und unterscheiden sich nicht. Ebenso kann kein Unterschied im Vergleich zu der filmbildenden Grundlage der Formulierungen, dem mit Triethylcitrat weichgemachten Eudragit® RS, festgestellt werden. Offensichtlich scheint das ölbeladene Silica zwar die Dehnbarkeit des ausgebildeten Films deutlich zu vermindern, hat jedoch keinerlei Einfluss auf die Adhäsionskraft des ausgebildeten Films. Aufgrund der therapeutisch bewährten Adhäsionskraft handelsüblicher transdermaler Pflaster ist es vorteilhaft, wenn die Filme filmbildender Formulierungen ähnliche Adhäsionskräfte aufweisen. Wie in Abbildung 4.2-6 ersichtlich, ist die Adhäsionskraft dieser Filme ähnlich derer von transdermalen Pflastern. Es wurde kein statistisch signifikanter Unterschied (ANOVA; p=0,34) festgestellt. Das bedeutet, dass die Adhäsionskraft von Filmen, die von filmbildenden Formulierungen gebildet werden, auf der Haut ausreichend hoch ist, um eine zuverlässige und längerfristige Abgabe des Arzneistoffs an den Wirkort sicherzustellen (Heck et al., 2016).

4.2.2.3 Wasserfestigkeit

Für eine retardierte Wirkstofffreisetzung auf der Haut des Patienten ist eine ausreichende Substantivität der Filme filmbildender Formulierungen erforderlich. Neben einer guten Haftung auf der Haut ist es entscheidend, dass die Filme durch Wasserkontakt keine größeren Mengen an Arzneistoff freisetzen. Eine unerwünschte Freisetzung des Arzneistoffs in die Wasserphase entzieht dem Film einerseits den für eine langfristig andauernde Wirkung nötigen Wirkstoff, andererseits können daraus unerwünschte Nebenwirkungen auftreten. Nicht zuletzt kann durch eine Freisetzung in die Wasserphase der Wirkstoff leicht auf andere Personen oder Gegenstände übertragen werden. Dies gefährdet sowohl die Wirksamkeit der Therapie als auch die Therapiesicherheit.

Zur Untersuchung der Wasserfestigkeit der Filme werden Filmstücke freier Filme (3.2.8) aus wirkstoffhaltigen filmbildenden Formulierungen hergestellt, in auf 32 °C temperiertes Wasser eingebracht und die nach 80 min freigesetzte Nonivamid-Menge geprüft (3.2.9.3). Erneut werden filmbildende Formulierungen verwendet, die sich im Anteil an ölbeladenem Silica (22,5 % bis 27,5 %) sowie hinsichtlich des Silica-Typs und der Herstellungsmethode (FF FP KM oder FF XDP SM) unterscheiden.

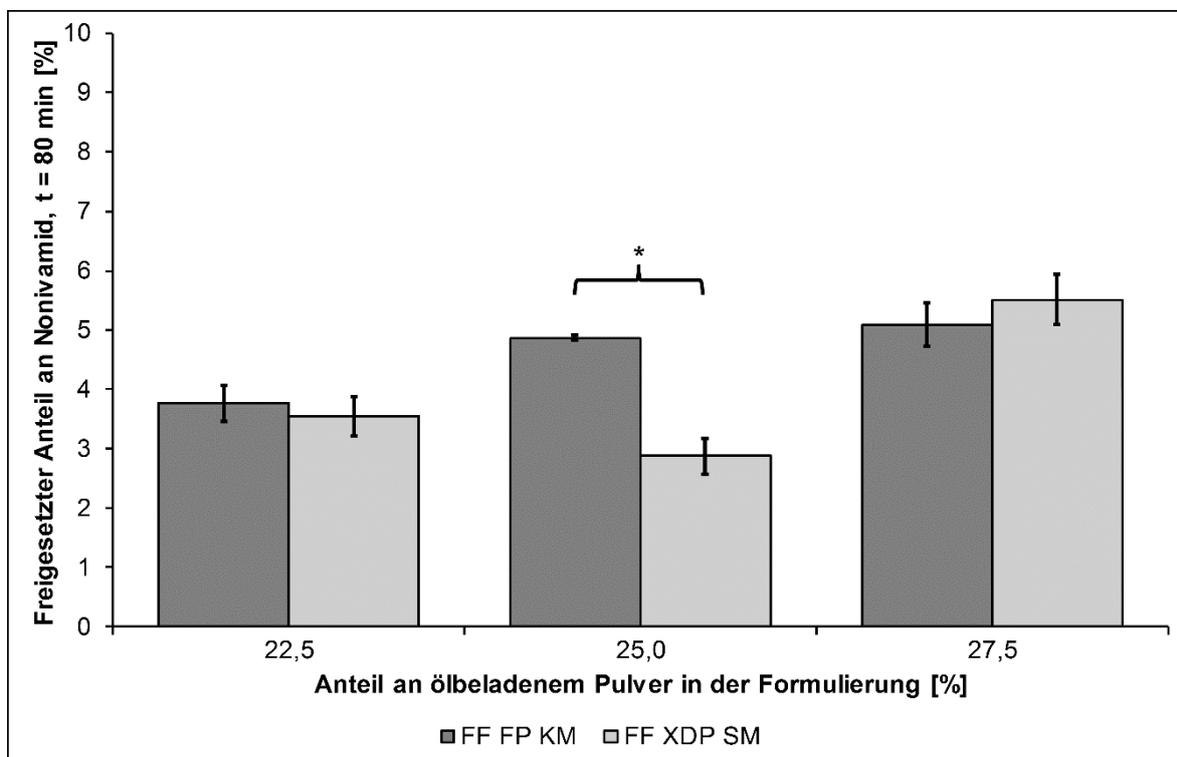


Abbildung 4.2-7: Freigesetzter Anteil an Nonivamid nach 80-minütiger Inkubation in Wasser bei 32 °C; n=3; Arithmetischer Mittelwert ± SD; p=0,05; t-Test.

Die Ergebnisse der Prüfung sind in Abbildung 4.2-7 zusammengefasst. Erfreulicherweise setzen sowohl die Filme aus Formulierungen, die Syloid® 244 FP enthalten, als auch diejenigen, die Syloid® XDP 3050 enthalten, einen sehr geringen Anteil (max. 6 %) an Wirkstoff nach 80-minütiger Inkubation im temperierten Wasserbad frei. Dies liegt vor allem daran, dass die wirkstoffhaltigen ölbeladenen Silica-Partikel von den Retardpolymeren umschlossen sind, welche zum einen ein Auflösen des Films verhindern und zum anderen die Freigabe des Wirkstoffs aus dem Öl verzögern. Zudem ist ein Trend erkennbar, dass mit steigendem Anteil an ölbeladenem Silica die Resistenz gegenüber Wasserkontakt vermindert wird. Ursache hierfür könnte sein, dass sich mit steigendem Anteil an ölbeladenem Silica ebenso die Chance erhöht, dass sich vereinzelt ölbeladene Silica-Partikel an der Oberfläche des Films befinden. Dies könnte eine erleichterte Auswaschung der Arzneistofflösung aus den Silica-Partikeln ermöglichen, wodurch sich innerhalb der gleichen Zeit ein größerer Anteil an Nonivamid in die Wasserphase umverteilen könnte. Beim paarweisen Vergleich der Werte fällt bei den Zubereitungen mit 25 % wirkstoffhaltigem ölbeladenem Silica auf, dass aus den Zubereitungen, die mit Syloid® XDP 3050 hergestellt wurden, signifikant weniger Arzneistoff freigesetzt wurde ($p=0,004$, t-Test). Für die anderen Zubereitungen ist dieser Effekt allerdings nicht zu erkennen.

Eine vollständige Freisetzung in Abbildung 4.2-7 bezieht sich auf die im Referenzfilmstück enthaltene und auf das Gewicht des Filmstücks normierte Menge an Nonivamid. Da sich jedoch aufgrund des Verteilungskoeffizienten zwischen der Öl- und der Wasserphase im Endeffekt ein Verteilungsgleichgewicht zwischen beiden Phasen einstellen sollte, kann die maximal freigesetzte Menge nie die im Film enthaltene Menge an Arzneistoff erreichen und der freigesetzte Anteil liegt somit niedriger. Zudem berücksichtigt der Einbezug des Verteilungskoeffizienten das durch den unterschiedlichen Anteil an ölbeladenem Silica unterschiedlich hohe Volumen an öliger Phase in den Filmen. Der Verteilungskoeffizient zwischen den beiden Phasen wird in einem Vorversuch mit $VK=1985$ bestimmt (8.2).

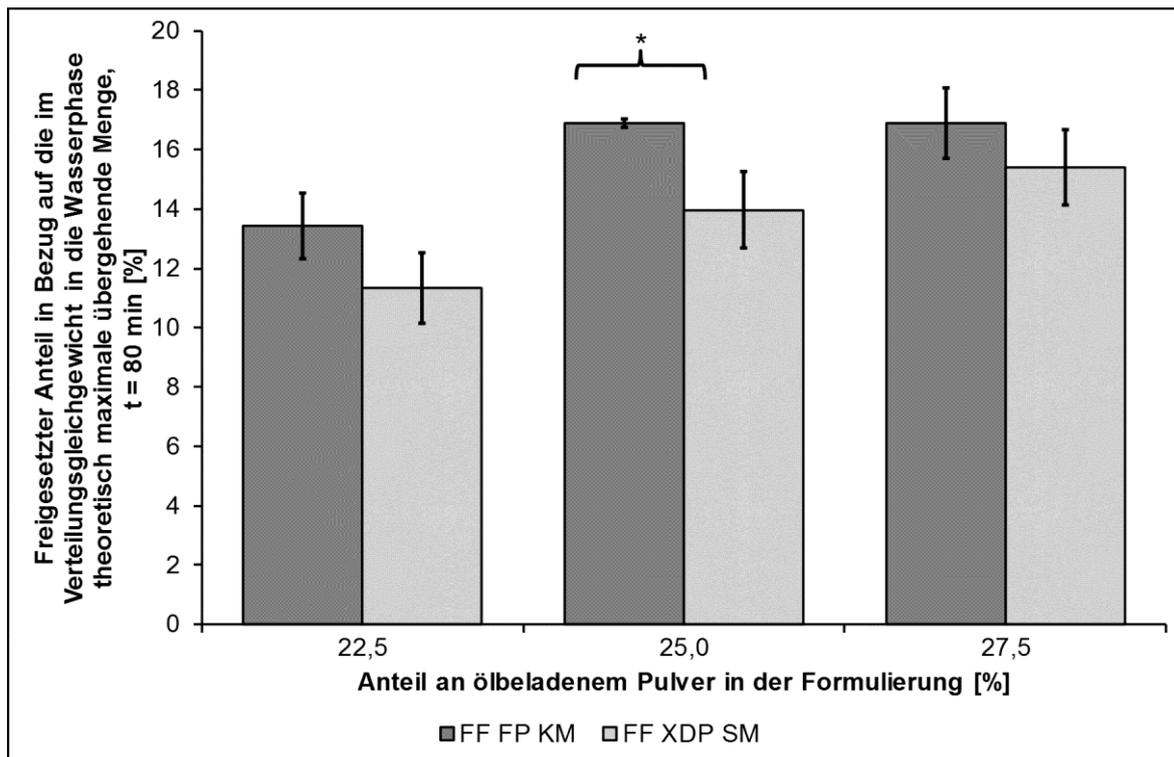


Abbildung 4.2-8: Freigesetzter Anteil in Bezug auf die im Verteilungsgleichgewicht in die Wasserphase theoretisch maximal übergehende Menge nach 80-minütiger Inkubation in Wasser bei 32 °C; n=3; Arithmetischer Mittelwert \pm SD; $p=0,05$, t-Test.

Bezieht man den Verteilungskoeffizienten zwischen Rizinusöl und Wasser in die Berechnung mit ein, so erhöht sich der freigesetzte Anteil in Bezug auf die im Verteilungsgleichgewicht in die Wasserphase theoretisch maximal übergehende Menge. Alle Messwerte liegen jedoch deutlich unterhalb von 20 % (Abbildung 4.2-8). Alle Filme sorgen also für eine deutliche Reduktion der Freigabe von Nonivamid in die Wasserphase. Die Tendenz zu einer höheren Freisetzungsrates mit steigendem Anteil an ölbeladenem Silica ist auch in diesem Fall erkennbar. Abgesehen davon, dass eine Verwendung eines höheren Anteils von über 27,5 % an ölbeladenem Silica zu instabilen bzw. nicht mehr streichfähigen Formulierungen führt, könnte eine solche Erhöhung ebenso eine ungewollt schnelle Freisetzung bei Wasserkontakt bewirken und somit die oben beschriebenen unerwünschten Nebenwirkungen verursachen oder die Therapiesicherheit gefährden. Tendenziell scheinen die Filme von Formulierungen, die mit Syloid® XDP 3050 im SpeedMixer™ (Hauschild GmbH & Co. KG, DE-Hamm) hergestellt wurden, geringeres Leaching bei Wasserkontakt zu zeigen. Für alle untersuchten Zubereitungen konnte eine vollständige Wiederfindung erreicht werden, was die Aussagekraft der Methode für die Bestimmung der Wasserfestigkeit von Filmen bestätigt. Ebenso kann mit dieser Prüfung bestätigt werden, dass die Filme aller untersuchten Formulierungen eine hohe Substantivität aufweisen und damit die Voraussetzungen für eine kontrollierte, verlängerte Wirkstofffreisetzung am Applikationsort erfüllen.

4.2.3 Lagerstabilität

Zur Prüfung der physikalischen Lagerstabilität werden die gemäß 3.2.7 hergestellten Formulierungen untersucht, die entweder Syloid® 244 FP enthalten und in der Kugelmühle (Hormuth GmbH, DE-Heidelberg) hergestellt werden (FF FP KM), oder diejenigen, die Syloid® XDP 3050 als Trägerstoff enthalten und im SpeedMixer™ (Hauschild GmbH & Co. KG, DE-Hamm) hergestellt werden (FF XDP SM). Diese beiden Formulierungen sind nach der Herstellung makroskopisch stabil und ergeben homogene Filme. Sie werden über einen Zeitraum von 6 Monaten in einem dicht verschlossenen Kunststoffgefäß (PP 50 Becher transparent, Hauschild GmbH & Co. KG, DE-Hamm) gelagert. Wie in 3.2.10 beschrieben, werden aus diesen Formulierungen direkt nach der Herstellung und nach der Lagerzeit von 6 Monaten Filme gebildet, die mittels konfokaler Raman-Mikroskopie (3.2.20.3.1) auf Lagerstabilität geprüft werden. Dabei erlaubt die Konfokalität des Raman-Mikroskops, dass bereits mikroskopische Änderungen in der Struktur und der räumlichen Verteilung der Komponenten während der Lagerung erkannt werden.

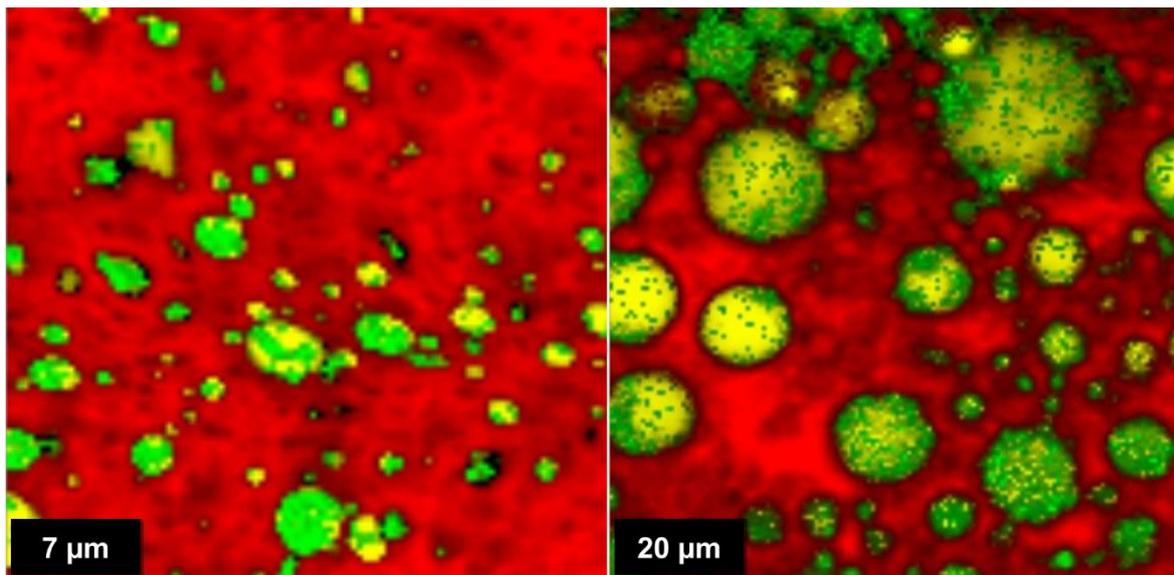


Abbildung 4.2-9: Imagescans getrockneter Filme von filmbildenden Formulierungen, die Syloid® 244 FP enthalten (FF FP KM); links: Film, der direkt nach der Herstellung erstellt wurde; rechts: Film, der nach einer Lagerzeit von 6 Monaten erstellt wurde; Farbcode der ramanmikroskopischen Falschfarbenbilder: ■ raffiniertes Rizinusöl, ■ Silica, ■ Retardpolymer, (Heck et al., 2016).

Abbildung 4.2-9 zeigt die Verteilung von raffiniertem Rizinusöl, Syloid® 244 FP und dem Retardpolymer Eudragit® RS (Evonik Industries AG, DE-Essen) in den getrockneten Filmen. Die Bereiche, in denen ölbeladenes Silica wiedergefunden werden kann, erscheinen als gelbgrüne Farbpunkte. Die farbkodierten Aufnahmen des Films zeigen, dass die Bereiche, in denen ölbeladenes Silica nachgewiesen werden kann, direkt nach der Herstellung einen Durchmesser von ca. 3-5 µm haben. Dies korreliert mit der durchschnittlichen Partikelgröße

des Syloid® 244 FP von 3,5 µm (W. R. Grace & Co. Corporation, 2014). Die ölbeladenen Silica-Partikel sind in die Polymermatrix (rot) eingebettet. Für die 6 Monate gelagerten Proben zeigt sich jedoch ein komplett anderes Bild: Die Bereiche, die dem raffinierten Rizinusöl zugeordnet werden können, haben sich deutlich vergrößert. Die für das Kieselgel erhaltenen Signale werden teilweise von denen des Rizinusöls überlagert. In vielen Bereichen ist an Stellen, an denen Rizinusöl detektiert wird, kein Kieselgel nachzuweisen. Dies ist ein klarer Hinweis darauf, dass es während der Lagerung sowohl zur Desorption des Öls aus dem Kieselgel als auch zur Agglomeration der ölbeladenen Silica-Partikel gekommen ist. Da dieses Phänomen die kontrollierte Freisetzung und verlängerte Penetration/Permeation von Nonivamid aus den wirkstoffhaltigen Formulierungen negativ beeinflussen kann, werden die Formulierungen, die Syloid® 244 FP als Trägerstoff enthalten, von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

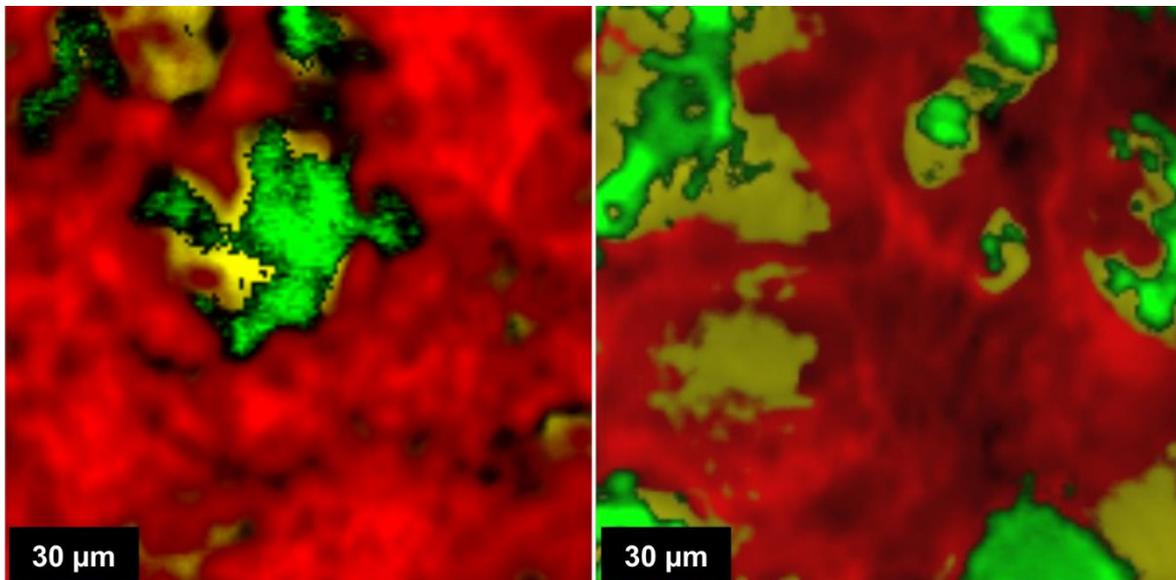


Abbildung 4.2-10: Imagescans getrockneter Filme von filmbildenden Formulierungen, die Syloid® XDP 3050 enthalten (FF XDP SM); links: Film, der direkt nach der Herstellung erstellt wurde; rechts: Film, der nach einer Lagerzeit von 6 Monaten erstellt wurde; Farbcode der ramanmikroskopischen Falschfarbenbilder: ■ raffiniertes Rizinusöl, ■ Silica, ■ Retardpolymer, (Heck et al., 2016).

In Abbildung 4.2-10 sind die ramanmikroskopischen Aufnahmen von getrockneten Filmen dargestellt, die aus filmbildenden Formulierungen mit Syloid® XDP 3050 hergestellt wurden. Die Aufnahmen derselben Formulierung wurden direkt nach der Herstellung und nach einer Lagerzeit von 6 Monaten erstellt. Im getrockneten Film der frisch hergestellten Formulierung erkennt man die gelbgrün kodierte Bereiche, die gut mit der Partikelgröße der ca. 50 µm großen Syloid® XDP-Partikeln korrespondieren. Sie zeigen, dass das Öl direkt nach der Herstellung an das mesoporöse Silica gebunden ist. Im Gegensatz zu der Formulierung, die Syloid® 244 FP enthält, erkennt man auch nach einer sechsmonatigen Lagerzeit etwa 50 µm

große Bereiche, in denen sowohl Kieselgel als auch Rizinusöl detektiert werden kann. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die physikalische Stabilität der Formulierungen mit Syloid® XDP 3050 über einen Zeitraum von 6 Monaten gesichert ist und somit auch nach einer entsprechenden Lagerzeit eine kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffs möglich sein sollte (Heck et al., 2016). Aufgrund der Ergebnisse der Lagerstabilität werden im Folgenden die Freisetzung, Permeation und Penetration der Formulierungen untersucht, die Syloid® XDP 3050 als Träger für die Arzneistofflösung enthalten.

4.3 In vitro Freisetzungsuntersuchungen

Bisher sind topische, capsaicinoidhaltige Zubereitungen zur Therapie des chronischen Pruritus nur als Magistralrezepturen unter dem Namen „Hydrophile Capsaicinoid Creme 0,025 %/0,05 %/0,1 % NRF 11.125“ gelistet. Die Cremes müssen unabhängig von der Wirkstoffkonzentration vier bis sechsmal täglich über mehrere Tage hinweg angewendet werden, um den antipruritischen Effekt zu erhalten (NRF, 2010b). Ein solch hochfrequentes Dosierungsintervall über einen längeren Zeitraum stellt den Patienten vor große Herausforderungen und kann die Therapietreue verringern (Anand & Bley, 2011). Die filmbildenden Formulierungen sollen daher eine kontrollierte und verlängerte Freisetzung des Wirkstoffs ermöglichen und somit seine Verweildauer am Applikationsort verlängern. Dies soll in einer erleichterten und reduzierten Applikationsfrequenz (ein bis zwei Applikationen pro Tag) für den Patienten resultieren. Zunächst wird mit Freisetzungsuntersuchungen die Kinetik der Freisetzung aus den filmbildenden Formulierungen analysiert, ehe mittels Permeations- und Penetrationsuntersuchungen die Arzneistoffabsorption geprüft und mit den therapeutisch angewendeten Formulierungen verglichen wird.

Die Freisetzungsuntersuchung von Nonivamid erfolgt mittels einer Filtermembran (PTFE Filter, Porenweite 5 µm, Ø=25 mm; Sartorius AG, DE-Göttingen) in modifizierten Franz-Diffusionszellen (Gauer-Glas, DE-Püttlingen) durch Applikation von filmbildenden Formulierungen, die in infiniten Dosis auf die Membran aufgetragen und getrocknet werden. Da die Formulierungen einen Film ausbilden sollen, wird auf eine Okklusion des Donorkompartiments bewusst verzichtet, um die Trocknung der Formulierung und somit die Filmbildung zu ermöglichen. Details zur Durchführung werden in 3.2.15 beschrieben.

Aufgrund der Erkenntnisse von Lunter (2012), die die Freisetzung von Nonivamid aus einer 1%igen Hydrophilen Nonivamid Creme (HNC) mit der Freisetzung aus einer 1%igen filmbildenden Emulsion verglichen hat, werden ähnliche Wirkstoffkonzentrationen eingesetzt. Zum einen wird eine Formulierung untersucht, die zu 25 % aus wirkstoffhaltigem ölbeladenem Silica zusammengesetzt ist und somit eine Wirkstoffkonzentration von 0,9 % Nonivamid aufweist (FF 0,9 %). Des Weiteren wird die Freisetzung mit einer zehnfach niedriger konzentrierten Formulierung verglichen (FF 0,09 %). Dies gelingt durch die Reduktion des Anteils an wirkstoffhaltigem Silica auf 2,5 % in der filmbildenden Formulierung. Um Erkenntnisse über die Freisetzungskinetik der filmbildenden Formulierungen zu erlangen, wird ein möglichst breiter Zeitraum abgedeckt. In einem ersten Versuch wird die Freisetzung des Arzneistoffs innerhalb von 3 - 24 Stunden untersucht, während in einem zweiten Experiment vor allem die langfristige Wirkstofffreisetzung zwischen 16 - 44 Stunden analysiert wird.

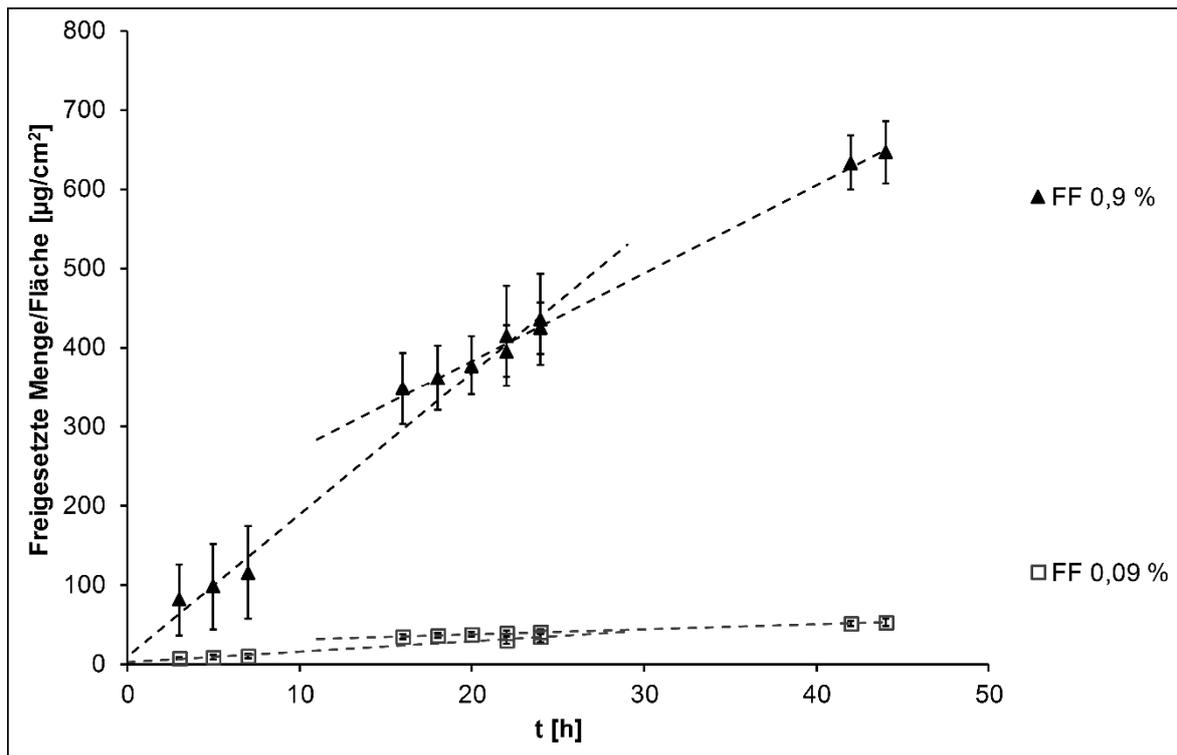


Abbildung 4.3-1: Vergleich der in vitro Freisetzung von Nonivamid aus unterschiedlich konzentrierten filmbildenden Formulierungen (\blacktriangle FF 0,9 % und \square FF 0,09 %) aufgetragen gegen die Zeit; n=4-5; Arithmetischer Mittelwert \pm SD.

Abbildung 4.3-1 zeigt die freigesetzte Menge an Nonivamid aus den beiden unterschiedlich konzentrierten filmbildenden Formulierungen bezogen auf die Freisetzungsfläche und dargestellt als Funktion gegenüber der Zeit. Es ist deutlich zu erkennen, dass die nach 44 Stunden freigesetzte Menge an Nonivamid in etwa zehnmal größer ist, wenn eine zehnfach konzentriertere Formulierung eingesetzt wird. Die Freisetzung von Nonivamid aus den filmbildenden Formulierungen verläuft zudem nicht linear zu der Zeit. Betrachtet man die mittels linearer Regression eingezeichneten Geraden, ist eine Abnahme der Freisetzung mit steigender Inkubationszeit zu beobachten. Dies war so zu erwarten, da das die ölbelaenen Silica-Partikel umgebende Retardpolymer die Wirkstofffreisetzung über die Polymermatrix kontrolliert. Bevor der Wirkstoff also an den Applikationsort gelangt, muss er zunächst durch die Polymermatrix diffundieren. Mit zunehmender Inkubationszeit nimmt die Diffusionsstrecke durch das Retardpolymer zu und damit wird die Freisetzungsgeschwindigkeit reduziert. Eine lineare Freisetzungskinetik gegen die Wurzel der Zeit für Suspensionsformulierungen wurde bereits durch Higuchi (1961) beschrieben. Weitere Experimente bestätigten diese Freisetzungskinetik auch für Formulierungen mit Polymermatrices (Crowley et al., 2004; Paul, 2011). Nimmt man eine solche Higuchi-Kinetik auch für die filmbildenden Formulierungen an, sollte sich eine Linearisierung ergeben, wenn die Werte gegen die Wurzel der Zeit präsentiert werden.

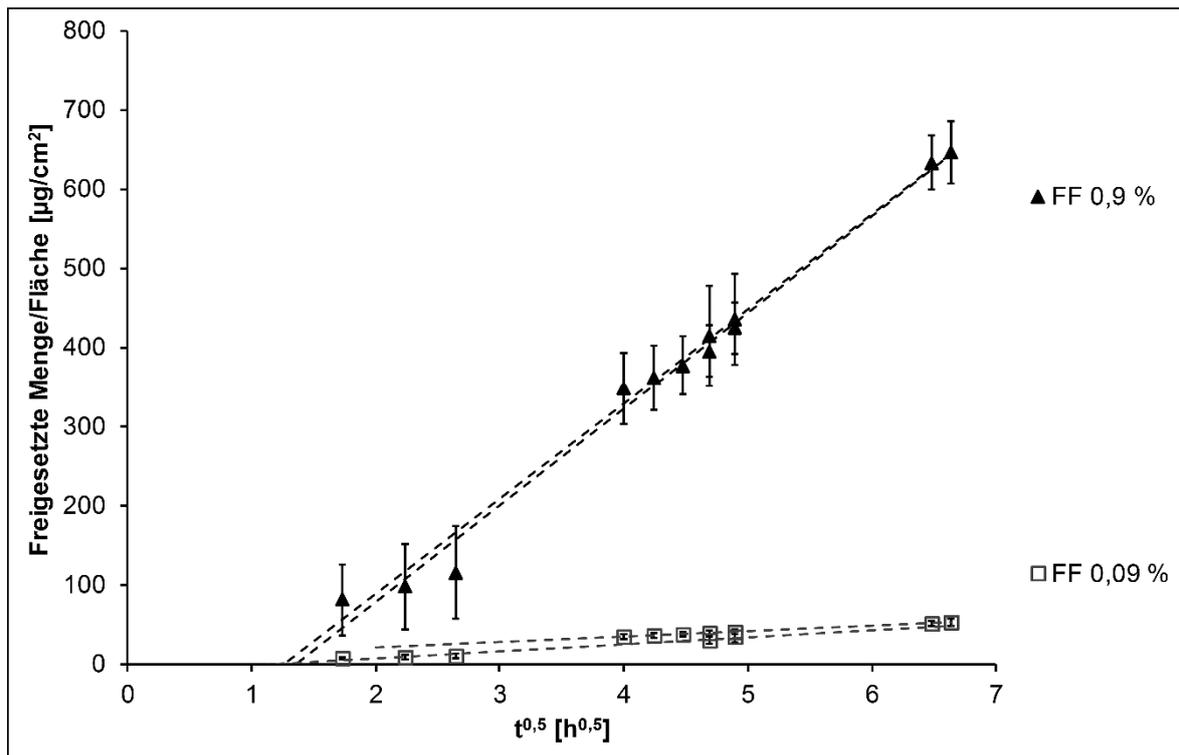


Abbildung 4.3-2: Vergleich der in vitro Freisetzung von Nonivamid aus unterschiedlich konzentrierten filmbildenden Formulierungen (▲ FF 0,9 % und □ FF 0,09 %) aufgetragen gegen die Wurzel der Zeit; n=4-5; Arithmetischer Mittelwert ± SD.

In Abbildung 4.3-2 sind die Ergebnisse der Freisetzungsuntersuchungen als Funktion gegen die Wurzel der Zeit aufgetragen. Die zuvor sich deutlich überschneidenden Geraden der Experimente, bei denen die Proben nach kurzer Inkubationszeit (3 bis 24 Stunden) bzw. nach einer Inkubationszeit zwischen 16 und 44 Stunden entnommen wurden, sind nun nahezu deckungsgleich. Dies belegt die Vermutung einer Higuchi-Kinetik.

Mit Hilfe dieser Linearisierung lässt sich zudem die Freisetzungsrates (Q) und die lag-Phase der beiden Formulierungen ermitteln (Tabelle 4.3-1). Dabei werden für die jeweils mit derselben Formulierung durchgeführten Experimente Freisetzungsrates erhalten, die sich statistisch nicht unterscheiden (t-Test; $p=0,94$ bzw. $p=0,09$). Durch Normierung der Freisetzungsrates auf die in der Formulierung jeweils enthaltene Wirkstoffkonzentration kann die Freisetzung aus den beiden Formulierungen unabhängig von der Konzentration verglichen werden. Da alle Formulierungen dasselbe System aufweisen, ist zu erwarten, dass durch Normierung auf die Ausgangskonzentration vergleichbare Werte erhalten werden. Diese Vermutung bestätigt sich, da nun für alle untersuchten Formulierungen ähnliche normierte Freisetzungsrates bestimmt werden. Die lag-Phase der Nonivamid-Freisetzung aus den Formulierungen berechnet sich aus dem Schnittpunkt der Gerade mit der x-Achse. Alle Formulierungen weisen – wie es beim Einsatz von Retardpolymeren zu erwarten ist – eine lag-

Phase auf. Diese schwankt je nach Formulierung zwischen 50 min und 1 h 50 min. Die Schwankungen sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die lag-Phase davon abhängig ist, wie schnell der Arzneistoff aus dem Film diffundiert. Da der Arzneistoff in den ölbeladenen Silica-Partikeln gebunden ist und diese innerhalb der Polymermatrix verteilt sind, variiert die Diffusionsstrecke in Abhängigkeit der Position der Silica-Partikel im Film. Unterschiedliche Diffusionsstrecken beeinflussen direkt die Freisetzung des Arzneistoffs und damit letzten Endes auch die lag-Time. Eine Beeinflussung der Arzneistoffdiffusion durch die Filtermembran soll möglichst unterbunden werden, damit die Membran nicht zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Freisetzung wird. Die Verwendung von möglichst mit der Formulierung inerten, synthetischen Membranen mit hoher Porosität ist empfehlenswert (Shah et al., 2003; Zatz, 1995). Deshalb wurde eine Filtermembran aus inertem PTFE mit einer relativ hohen Porengröße von 5,0 µm gewählt. Prinzipiell ist eine geringfügige Diffusionsbehinderung nie vollends auszuschließen, trotzdem sollte aufgrund der entsprechenden Materialauswahl die Filtermembran keinen bedeutenden Einfluss auf die lag-Phase und Freisetzungsrates der untersuchten Zubereitungen haben.

Tabelle 4.3-1: Freisetzungsrates (Q), normierte Freisetzungsrates (Q normalisiert) und lag-Phase der untersuchten Formulierungen; n=4-5; Arithmetischer Mittelwert ± SD.

	Formulierung			
	FF 0,90 % (3-24 h)	FF 0,90 % (16-44 h)	FF 0,09 % (3-24 h)	FF 0,09 % (16-44 h)
Q	121,97	120,47	8,75	6,96
[µg/cm ² *h ^{0,5}]	(± 34,956)	(± 30,112)	(± 1,780)	(± 0,378)
Q normiert	13,55·10 ⁻³	13,35·10 ⁻³	9,72·10 ⁻³	7,73·10 ⁻³
[mL/cm ² *h ^{0,5}]	(± 3,884·10 ⁻³)	(± 3,346·10 ⁻³)	(± 1,977·10 ⁻³)	(± 0,420·10 ⁻³)
Lag-Phase [h]	1,87	1,62	1,43	0,77

Mit den Freisetzungsforschungen konnte gezeigt werden, dass die filmbildenden Formulierungen eine anhaltende Freisetzung über einen Zeitraum von bis zu 44 Stunden zeigen. Die Freisetzungsrates kann dabei über eine Reduktion des wirkstoffhaltigen ölbeladenen Silicas, also eine indirekte Änderung der Wirkstoffkonzentration, variiert werden. Inwiefern diese verlängerte Freisetzung auch nach dermalen Applikation erfolgt, soll im Folgenden anhand von Permeationsforschungen genauer analysiert werden.

4.4 Untersuchung der Dermato-Pharmakokinetik

Um die Absorption eines topisch applizierten Arzneistoffs zu untersuchen, sind Permeations- und Penetrationsuntersuchungen geeignete Methoden. Im Vergleich zu den Freisetzunguntersuchungen wird Haut als Membran verwendet, sodass wesentlich realistischere Vorhersagen bezüglich der Arzneistoffpermeation bzw. -penetration in vivo an Humanhaut getroffen werden können. Während bei Permeationsuntersuchungen der Arzneistoff analysiert wird, der über die Haut oder durch isolierte Hautschichten in das Akzeptorkompartiment permeiert ist, wird bei Penetrationsuntersuchungen der Arzneistoffgehalt in den jeweiligen Hautschichten bestimmt. Permeationsuntersuchungen simulieren also die systemische Absorption des Wirkstoffs während Penetrationsuntersuchungen die Absorption in die Haut selbst simulieren. Die Untersuchung der Arzneistoffabsorption erfolgt hauptsächlich ex vivo an der Haut von Schweineohren. Die Rückseite der Haut von Schweineohren eignet sich besonders, da ihre Beschaffenheit und Eigenschaften derer von Humanhaut sehr nahekommen (Jacobi et al., 2007). Eine kleine Pilotstudie wurde auch in vivo am Menschen im Rahmen eines DAAD-Forschungsprojekts vorgenommen.

4.4.1 Ex vivo Permeationsuntersuchungen

Permeationsuntersuchungen werden mit porciner Haut als Membran zwischen dem Donor- und Akzeptorkompartiment in modifizierten Franz-Zellen (Gauer Glas, DE-Püttlingen) durchgeführt. Die Haut wird entsprechend 3.2.12.2 präpariert, das jeweilige Akzeptormedium wird hergestellt (3.2.13) und die Versuche werden gemäß 3.2.14 vorbereitet. Je nach Versuchsplanung werden Formulierungen in infiniten Dosis oder finiten Dosis auf die Haut im Donorkompartiment aufgetragen. Permeationsuntersuchungen mit infiniten Dosis werden durchgeführt, um die Permeationsrate aus einer Zubereitung zu bestimmen und gegebenenfalls mit anderen Zubereitungen zu vergleichen. Dazu wird eine solch große Menge an Formulierung auf die Haut aufgetragen, dass das Arzneistoffreservoir im Donorkompartiment während des gesamten Beobachtungszeitraums nicht erschöpft werden kann. Dies bewirkt, dass die Arzneistoffkonzentration in der Formulierung im Donorkompartiment annähernd konstant bleibt und somit die Permeationsrate während des Beobachtungszeitraums nicht beeinflusst. Um zudem ein Verdunsten flüchtiger Bestandteile aus dem Donorkompartiment zu verhindern, werden die Untersuchungen mit infiniten Dosierung üblicherweise unter Okklusionsbedingungen durchgeführt. Aufgrund der zur kontrollierten Freisetzung nötigen und ausdrücklich gewünschten Filmbildung ist dies bei filmbildenden Formulierungen nicht sinnvoll und auch nicht erwünscht. Die Applikation einer infiniten Dosis übersteigt jedoch meist die therapeutisch zu applizierende Menge um ein Vielfaches. Dies führt genauso wie die unter in vivo Bedingungen unüblichen Okklusionsbedingungen dazu, dass Permeationsuntersuchungen mit infiniten Dosis keine realistischen in vivo Bedingungen widerspiegeln können.

Beide Faktoren berücksichtigen Untersuchungen mit finiten Dosis. Hier wird eine geringe Menge an Zubereitung auf die Haut im Donorkompartiment appliziert (2 mg/cm^2). Diese entspricht einer Menge, die in vivo verwendet werden kann. Auf Okklusion wird bewusst verzichtet, um realistische Bedingungen zu simulieren. Dies hat zur Folge, dass sich die Zusammensetzung und auch der Aufbau der Zubereitung während des Beobachtungszeitraums verändern und damit die Permeationsrate beeinflussen kann. Die Ergebnisse, die mit finiten Dosierung erhalten werden, weichen daher meist deutlich von denen mit infiniten Dosierung ab. Sie ermöglichen bessere Vorhersagen für eine in vivo Arzneistoffpermeation, lassen allerdings oftmals keine Berechnung einer Permeationsrate zu, da durch die Verarmung des Donorkompartiments an Vehikel der Permeationsprozess mit steigender Inkubationszeit verlangsamt wird und somit keine Gerade erhalten wird.

4.4.1.1 Ex vivo Permeationsuntersuchungen mit infiniten Dosis

Ex vivo Permeationsuntersuchungen mit infiniten Dosis werden durchgeführt, um die Permeation von Nonivamid aus filmbildenden Formulierungen mit der aus Hydrophiler Nonivamid Creme zu vergleichen. Der Arzneistoffgehalt in der Hydrophilen Nonivamid Creme variiert dabei: Es werden sowohl therapeutisch angewendete Konzentrationen untersucht, als auch Formulierungen mit demselben Arzneistoffanteil, wie er in der filmbildenden Formulierung angewendet wird. Des Weiteren wird analysiert, inwiefern sich eine Änderung des Anteils an wirkstoffhaltigem ölbeladenem Silica in der filmbildenden Formulierung auf die Permeation des Arzneistoffs auswirkt und ob eine Lagerung der filmbildenden Formulierung zu einer veränderten Wirkstoffpermeation führt. Die Durchführung der Permeationsuntersuchungen mit infiniten Dosierung erfolgt wie in 3.2.16.1 beschrieben. Als infinite Dosis werden 200 µL der zu untersuchenden Formulierung auf die Haut appliziert.

4.4.1.1.1 Vergleich mit Hydrophiler Nonivamid Creme

Die Permeation von Nonivamid aus einer filmbildenden Formulierung wird mit der Permeation aus der Hydrophilen Nonivamid Creme (HNC) verglichen. Dabei wird zunächst HNC 0,9 % als Vergleichsformulierung gewählt, da sie dieselbe Nonivamid-Konzentration enthält wie die filmbildende Formulierung (FF 0,9 %). So kann überprüft werden, ob die Arzneistoffpermeation aus der filmbildenden Formulierung kontrolliert erfolgt, während dies bei der schnelfreisetzenden Creme nicht zu erwarten ist. Die niedriger konzentrierten und therapeutisch verwendeten HNC 0,1 %, 0,05 % und 0,025 % dienen dazu herauszufinden, ob sowohl die permeierte Menge als auch die Permeationsrate von Nonivamid aus der filmbildenden Formulierung in einem therapeutisch nutzbaren Bereich liegen. Dies ist insbesondere deshalb von Relevanz, da eine zu schnelle oder erhöhte Permeation des Wirkstoffs unter Umständen zu unerwünschten Nebenwirkungen, wie z.B. einem Brennen auf der Haut, führen kann. Eine zu langsame Permeation hingegen kann jedoch zu einem Ausbleiben des gewünschten Effekts führen und somit die Therapie unwirksam machen.

Als Akzeptormedium wird eine aus gleichen Volumenanteilen bestehende Mischung aus Phosphatpuffer pH 7,4 (Herstellung gemäß 3.2.13) mit Ethanol verwendet, die bereits zur Untersuchung der Permeation nonivamidhaltiger Öl-in-Öl-Emulsionen etabliert wurde (Rottke et al., 2014). Bedingt durch die Erkenntnisse der Freisetzungsuntersuchungen (4.3) wird die permeierte Menge Nonivamid pro Inkubationsfläche gegen die Wurzel der Zeit aufgetragen. Mittels linearer Regression lässt sich die Permeationsrate (J) ermitteln, aus der durch Normierung auf die vorhandene Nonivamid-Konzentration der Permeationskoeffizient (K_p) errechnet wird. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.4-1 und Tabelle 4.4-1 dargestellt.

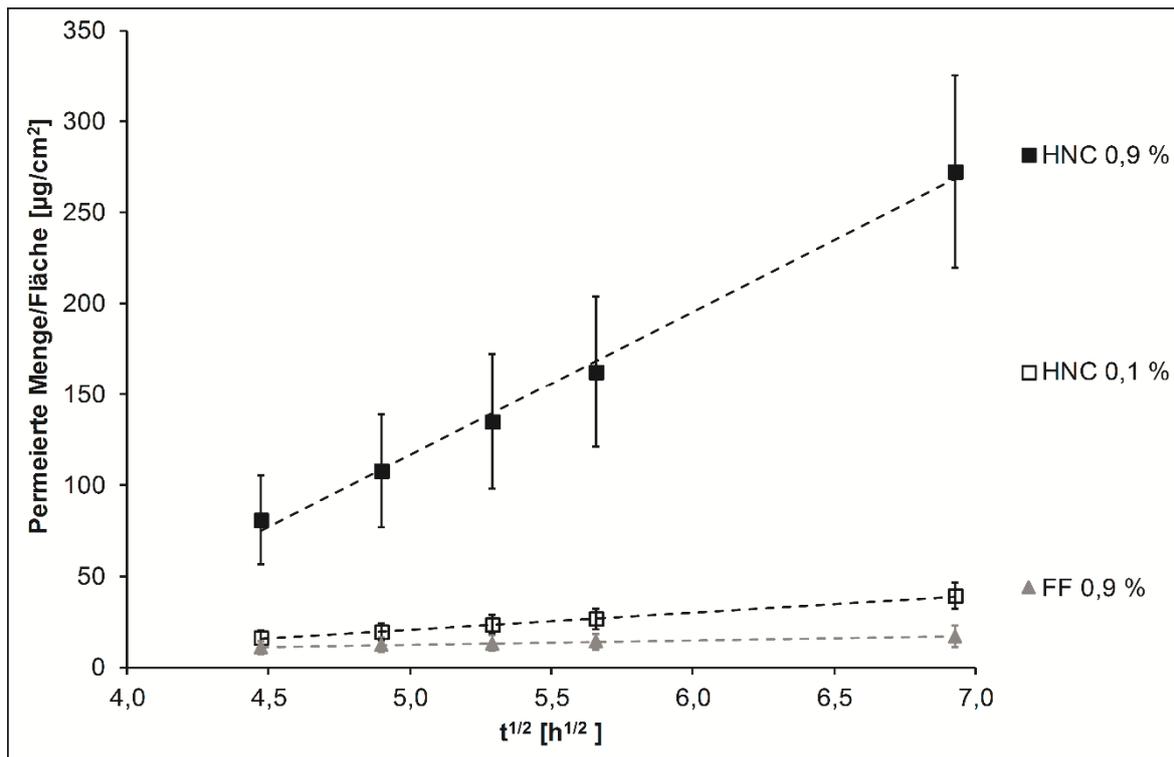


Abbildung 4.4-1: Vergleich der ex vivo Permeation von Nonivamid aus ■ HNC 0,9 %, □ HNC 0,1 % und einer filmbildenden Formulierung mit 0,9 % Nonivamid (▲ FF 0,9 %) aufgetragen gegen die Wurzel der Zeit; Akzeptormedium: 50 VT Phosphatpuffer pH 7,4+ 50 VT Ethanol; n=5; Arithmetischer Mittelwert ± SD.

Tabelle 4.4-1: Vergleich der Permeationsraten und der Permeationskoeffizienten von Nonivamid aus einer filmbildenden Formulierung und aus derer von HNCs mit verschiedenen NVA-Konzentrationen; Akzeptormedium: 50 VT Phosphatpuffer pH 7,4+ 50 VT Ethanol; n=5; Arithmetischer Mittelwert ± SD, p=0,05, Student-Newman-Keuls-Test.

Formulierung	J	Kp
	[µg/cm ² *h ^{0,5}]	[mL/cm ² *h ^{0,5}]
HNC 0,9 %	78,84 (± 12,032)*	8,76·10 ⁻³ (± 1,337·10 ⁻³)
HNC 0,1 %	9,46 (± 1,256)	9,46·10 ⁻³ (± 1,256·10 ⁻³)
FF 0,9 %	2,44 (± 1,067)	2,71·10 ⁻⁴ (± 1,185·10 ⁻⁴)*

Wie erwartet permeiert mit ansteigender Inkubationsdauer mehr Arzneistoff durch die Haut. Die höchste permeierte Menge Nonivamid pro Inkubationsfläche wird erhalten, wenn HNC 0,9 % appliziert wird. Deutlich niedrigere Mengen sind sowohl aus der filmbildenden Formulierung, die den gleichen Wirkstoffgehalt (FF 0,9 %) wie die HNC 0,09 % aufweist, als auch aus der therapeutisch angewendeten HNC 0,1 % permeiert. Dies bestätigt die Vermutung der Freisetzungsuntersuchungen, dass der ausgebildete Film zu einer kontrollierten Wirkstofffreisetzung und somit niedrigeren freigesetzten bzw. permeierten Mengen führt als eine entsprechende schnell-freisetzende Formulierung in infiniten Dosierung

unter Okklusion. Die permeierte Menge an Nonivamid aus der filmbildenden Formulierung liegt zudem unterhalb der aus der therapeutisch angewendeten HNC, die die maximal übliche Konzentration von 0,1 % Nonivamid enthält.

Die Permeationsrate von Nonivamid nimmt mit steigender Konzentration der Hydrophilen Nonivamid Cremes deutlich zu, während der Permeationskoeffizient konstant bleibt. Das verdeutlicht, dass die Beschleunigung der Wirkstoffpermeation allein auf die Erhöhung der Aktivität in der Zubereitung zurückzuführen ist, und deckt sich mit den Erkenntnissen von Lunter & Daniels (2013) für die Permeation von Nonivamid aus Hydrophilen Nonivamid Cremes. Für die filmbildende Formulierung liegt sowohl die Permeationsrate als auch der Permeationskoeffizient von Nonivamid deutlich unterhalb der Werte für die untersuchten Cremes. Dies bestätigt, dass die Diffusion des Arzneistoffs durch die Polymermatrix, welche die wirkstoffhaltigen öbeladenen Silica-Partikel umgibt, die Geschwindigkeit der Permeation bestimmt wird.

Das ethanolhaltige Akzeptormedium ermöglicht es durch die Löslichkeitsverbesserung des Nonivamids im Akzeptorkompartiment sink-Bedingungen leicht einzuhalten. Der hohe Anteil an Ethanol bewirkt jedoch, dass Lipide der Haut entzogen werden können (Williams & Barry, 2004) und somit die Zusammensetzung der Hautlipide während des Experiments variiert. Die ausschließliche Verwendung von isotonem Phosphatpuffer pH 7,4 als Akzeptormedium würde eine Extraktion der Lipide zwar verhindern, jedoch aufgrund des geringen Lösungsvermögens für Nonivamid keine sink-Bedingungen während des Beobachtungszeitraums gewährleisten und somit die Permeationsrate verfälschen. Als geeigneter Zusatz könnte sich daher eine 4%ige Lösung von bovinem Serumalbumin (Albumin Faktor V, Carl Roth GmbH, DE-Karlsruhe) in isotonem Phosphatpuffer pH 7,4 anbieten.

Die Verwendung dieser Lösung führt – verglichen mit isotonem Phosphatpuffer pH 7,4 – zu einer mehr als dreifach höheren Löslichkeit des Arzneistoffs im Akzeptorkompartiment (8.3), ohne dabei die Barrierefunktion der Haut zu schwächen (Sartorelli et al., 2000). Zum Vergleich der Permeationsdaten werden dieselben Formulierungen erneut untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.4-2 und Tabelle 4.4-2 dargestellt.

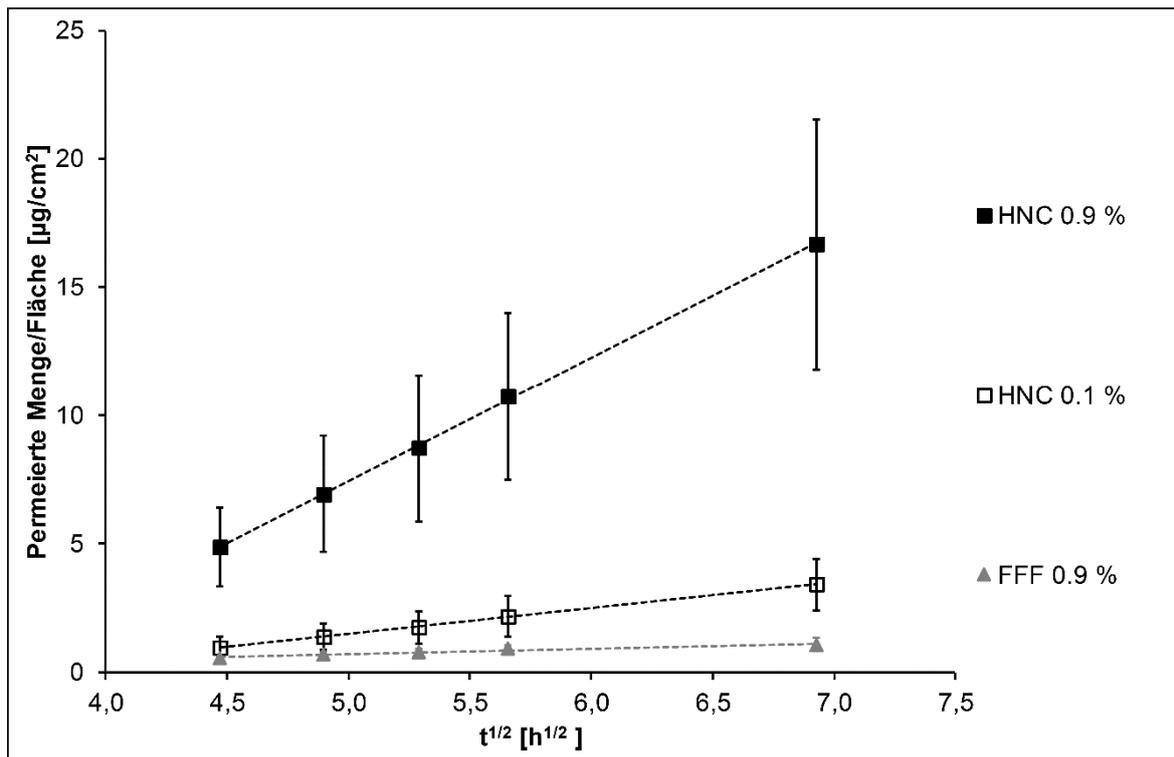


Abbildung 4.4-2: Vergleich der ex vivo Permeation von Nonivamid aus ■ HNC 0,9 %, □ HNC 0,1 % und einer filmbildenden Formulierung mit 0,9 % Nonivamid (▲ FF 0,9 %) aufgetragen gegen die Wurzel der Zeit; Akzeptormedium: 4%ige Lösung von bovinem Serumalbumin in isotonem Phosphatpuffer pH 7,4; n=5; Arithmetischer Mittelwert ± SD; modifiziert nach Heck et al. (2016).

Tabelle 4.4-2: Vergleich der Permeationsraten und der Permeationskoeffizienten von Nonivamid aus einer filmbildenden Formulierung und aus derer von HNCs mit verschiedenen NVA-Konzentrationen; Akzeptormedium: 4%ige Lösung von bovinem Serumalbumin in isotonem Phosphatpuffer pH 7,4; n=5; Arithmetischer Mittelwert ± SD; p=0,05, Student-Newman-Keuls-Test; modifiziert nach Heck et al. (2016).

Formulierung	J	Kp
	[µg/cm ² *h ^{0,5}]	[mL/cm ² *h ^{0,5}]
HNC 0,9 %	4,82 (± 1,333)*	5,36·10 ⁻⁴ (± 1,482·10 ⁻⁴)*
HNC 0,1 %	1,00 (± 0,241)	10,07·10 ⁻⁴ (± 2,407·10 ⁻⁴)*
FF 0,9 %	0,22 (± 0,078)	0,25·10 ⁻⁴ (± 0,086·10 ⁻⁴)*

Es zeigt sich ein vergleichbares Bild wie bei den Permeationsuntersuchungen, die mit dem ethanolhaltigen Akzeptorkompartiment durchgeführt wurden. Die Permeation von Nonivamid erfolgt auch weiterhin dann am schnellsten, wenn HNC 0,9 % auf die Haut appliziert wird. Ebenso sind im Vergleich zur HNC 0,1 % die permeierte Menge und die Permeationsrate signifikant niedriger, wenn Nonivamid aus der filmbildenden Formulierung permeiert (Heck et al., 2016). Es ist zu erwarten, dass durch den Wechsel des Akzeptormediums auf ein ethanolfreies Medium zudem eine Reduktion der absolut permeierten Mengen und der Permeationsraten erhalten wird, weil der permeationsfördernde Effekt des Ethanols ausbleibt.

Dies ist bei allen Formulierungen deutlich erkennbar. Die Permeationsrate wird in etwa um den Faktor 10 reduziert. Normiert man die Permeationsraten der beiden Experimente auf die Permeationsrate von FF 0,9 %, wird ein direkter Vergleich des Verhältnisses der Permeationsraten möglich (Tabelle 4.4-3). Mit Ausnahme der Permeationsrate der HNC 0,9 %, für welche sich eine geringfügige Abnahme abzeichnet (t-Test, $p=0,02$), ändert sich durch den Wechsel des Akzeptormediums die normierten Permeationsraten nicht signifikant (t-Test, $p=0,25$). Dies bedeutet, dass mit dem albuminhaltigen Akzeptormedium zwar insgesamt weniger Nonivamid permeiert, die Werte jedoch untereinander vergleichbar sind. Die Abweichungen bei der HNC 0,9 % könnten auf den beschriebenen Effekt der ethanolbedingten Lipidextraktion aus der Haut und damit auf eine Störung der Hautbarriere zurückzuführen sein. Aufgrund dessen werden die nachfolgenden Versuche mit dem albuminhaltigen isotonen Medium durchgeführt.

Tabelle 4.4-3: Vergleich der normierten Permeationsraten von Nonivamid für Untersuchungen mit unterschiedlichem Akzeptormedium.

Formulierung	J_{normiert}	J_{normiert}
	(ethanolhaltiges Medium)	(albuminhaltiges Medium)
HNC 0,9 %	32,3 ($\pm 4,94$)	21,9 ($\pm 6,05$)
HNC 0,1 %	3,9 ($\pm 0,52$)	4,55 ($\pm 1,092$)
FF 0,9 %	1,0	1,0

Um die therapeutische Sicherheit der filmbildenden Formulierung besser einschätzen zu können, wird im folgenden Experiment die Permeation von Nonivamid aus der filmbildenden Formulierung (FF 0,9 %) mit der aus den therapeutisch eingesetzten und niedriger konzentrierten HNC 0,05 % und HNC 0,025 % verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.4-3 und Tabelle 4.4-4 aufgeführt. Bei allen Formulierungen ist Nonivamid innerhalb des Beobachtungszeitraums zwischen 20 und 48 Stunden durch die Haut permeiert. Sowohl die permeierte Menge Nonivamid als auch die Permeationsrate aus der filmbildenden Formulierung ist mit der der therapeutisch verwendeten HNC 0,025 % und 0,05 % vergleichbar. Unterschiede zwischen den Permeationsraten der einzelnen Formulierungen sind statistisch nicht signifikant (ANOVA; $p=0,15$). Die Permeationskoeffizienten der beiden HNCs unterscheiden sich statistisch nicht, während der Permeationskoeffizient der deutlich höher konzentrierten filmbildenden Formulierung (FF 0,9 %) signifikant niedriger ist (ANOVA; $p=1,7 \cdot 10^{-3}$).

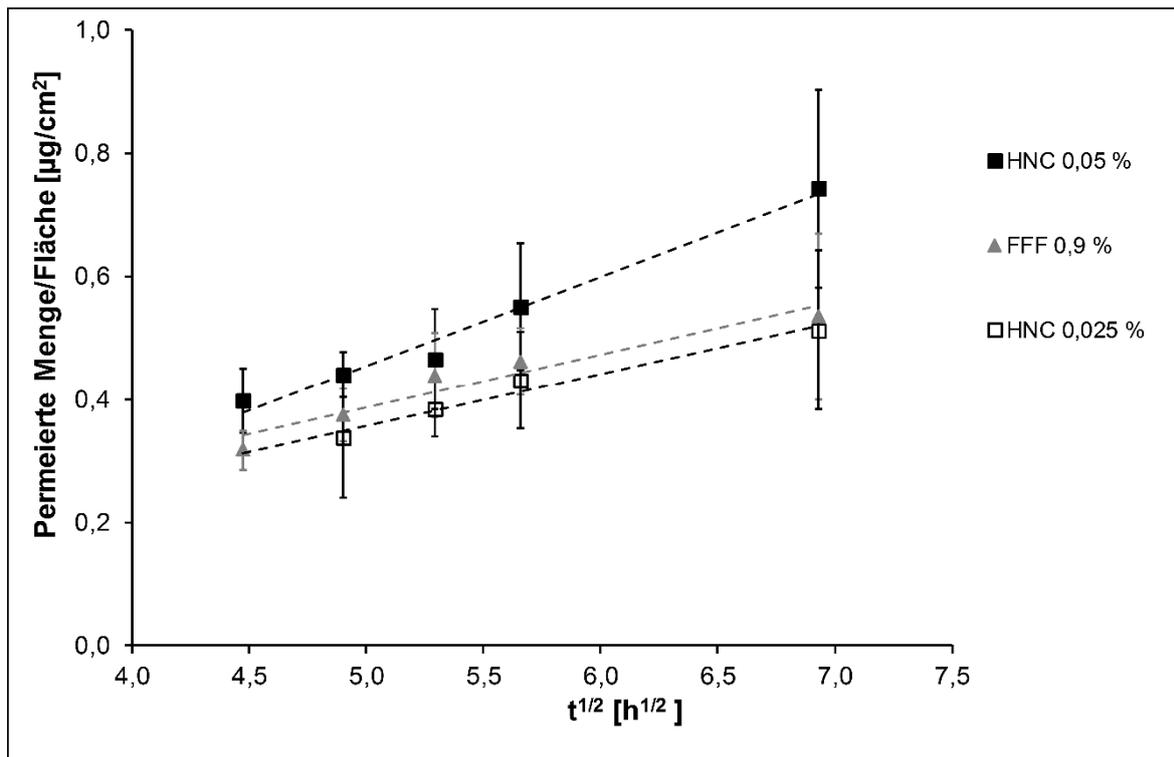


Abbildung 4.4-3: Vergleich der ex vivo Permeation von Nonivamid aus ■ HNC 0,05 %, □ HNC 0,025 % und einer filmbildenden Formulierung mit 0,9 % Nonivamid (▲ FF 0,9 %) aufgetragen gegen die Wurzel der Zeit; Akzeptormedium: 4%ige Lösung von bovinem Serumalbumin in isotonem Phosphatpuffer pH 7,4; n=3-5; Arithmetischer Mittelwert ± SD; modifiziert nach Heck et al. (2017).

Tabelle 4.4-4: Vergleich der Permeationsraten und der Permeationskoeffizienten von Nonivamid aus einer filmbildenden Formulierung und aus derer von HNCs mit verschiedenen NVA-Konzentrationen; Akzeptormedium: 4%ige Lösung von bovinem Serumalbumin in isotonem Phosphatpuffer pH 7,4; n=5; Arithmetischer Mittelwert ± SD; p=0,05, Student-Newman-Keuls-Test; modifiziert nach Heck et al. (2017).

Formulierung	J [µg/cm ² ·h ^{0,5}]	Kp [mL/cm ² ·h ^{0,5}]
HNC 0,05 %	0,15 (± 0,059)	2,99·10 ⁻⁴ (± 1,184·10 ⁻⁴)
FF 0,9 %	0,09 (± 0,067)	0,10·10 ⁻⁴ (± 0,074·10 ⁻⁴)*
HNC 0,025 %	0,08 (± 0,041)	3,31·10 ⁻⁴ (± 1,655·10 ⁻⁴)

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass in der filmbildenden Formulierung die nahezu zwanzigfache Konzentration an Arzneistoff vorhanden ist, verdeutlicht dieses Ergebnis erneut die kontrollierte Permeation von Nonivamid aus filmbildenden Formulierungen. Des Weiteren zeigt diese Untersuchung, dass das Permeationsprofil für die filmbildende Formulierung mit 0,9 % Nonivamid-Gehalt innerhalb des therapeutisch üblichen Rahmens liegt. Daraus kann geschlossen werden, dass die filmbildende Formulierung Nonivamid in einer Geschwindigkeit und Menge an die Haut abgibt, die zu therapeutisch sicheren und effizienten Wirkspiegeln führt (Heck et al., 2017).

4.4.1.1.2 Einfluss des Anteils an wirkstoffhaltigem ölbeladenem Silica

Die Variation des Anteils an wirkstoffhaltigem ölbeladenem Silica in der filmbildenden Formulierung hat direkten Einfluss auf die Wirkstoffkonzentration. Um zu untersuchen, inwiefern sich eine Änderung der Wirkstoffkonzentration auf die Permeation des Arzneistoffs aus den filmbildenden Formulierungen auswirkt, werden drei verschiedenen konzentrierte filmbildende Formulierungen untersucht. Die Einstellung der Wirkstoffkonzentration erfolgt durch die Variation des Anteils an wirkstoffhaltigem ölbeladenem Silica zwischen 22,5 % und 27,5 %.

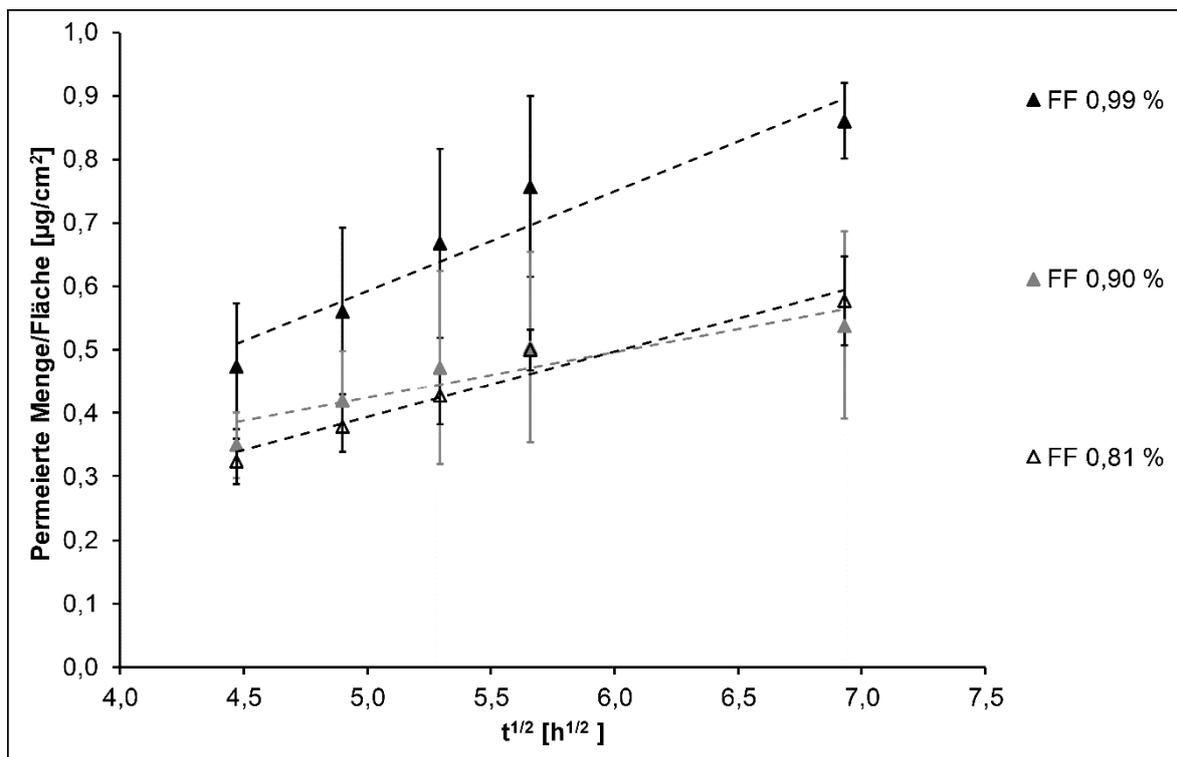


Abbildung 4.4-4: Vergleich der ex vivo Permeation von Nonivamid aus verschiedenen konzentrierten filmbildenden Formulierungen ▲ FF 0,99 %, ▲ FF 0,90 % und Δ FF 0,81 % aufgetragen gegen die Wurzel der Zeit; Akzeptormedium: 4%ige Lösung von bovinem Serumalbumin in isotonem Phosphatpuffer pH 7,4; n=5; Arithmetischer Mittelwert ± SD.

Anhand von Abbildung 4.4-4 ist ersichtlich, dass eine Erhöhung des Anteils an wirkstoffhaltigem ölbeladenem Silica nicht nur zu einer erhöhten Wirkstoffkonzentration führt, sondern auch größere Mengen des Arzneistoffs durch die Haut dringen. Dieser Effekt wird dabei aber durch die hohe Variabilität der Werte überlagert, weshalb nur ein Trend ableitbar ist. Am Ende des Beobachtungszeitraums nach 48 Stunden kann jedoch deutlich abgelesen werden, dass im Vergleich zu den anderen Formulierungen die größte Menge Nonivamid aus der am höchsten konzentrierten filmbildenden Formulierung durch die Haut permeiert ist. Tabelle 4.4-5 belegt, dass auch die Permeationsraten (J), Permeationskoeffizienten (Kp) und

lag-Phasen von Nonivamid für die untersuchten Zubereitungen in vergleichbaren Größenbereichen liegen.

Tabelle 4.4-5: Vergleich der Permeationsraten und der Permeationskoeffizienten von Nonivamid aus verschiedenen konzentrierten filmbildenden Formulierungen; Akzeptormedium: 4%ige Lösung von bovinem Serumalbumin in isotonem Phosphatpuffer pH 7,4; n=5; Arithmetischer Mittelwert \pm SD; p=0,05, Student-Newman-Keuls-Test.

Formulierung	J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{0,5}$]	Kp [$\text{mL}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{0,5}$]
FF 0,81 %	0,10 (\pm 0,014)	$1,29 \cdot 10^{-5}$ (\pm $1,773 \cdot 10^{-6}$)
FF 0,90 %	0,07 (\pm 0,039)	$0,81 \cdot 10^{-5}$ (\pm $4,367 \cdot 10^{-6}$)*
FF 0,99 %	0,16 (\pm 0,031)*	$1,59 \cdot 10^{-5}$ (\pm $3,108 \cdot 10^{-6}$)

Wie erwartet wird die signifikant höchste Permeationsrate erhalten, wenn Nonivamid aus der am höchsten konzentrierten Formulierung FF 0,99 % auf der Haut freigesetzt wird (ANOVA; p= $2,6 \cdot 10^{-3}$). Für die drei Permeationskoeffizienten sind durch die Normierung auf die Ausgangskonzentration statistisch nicht unterschiedliche Werte erwartet worden, hier weicht jedoch der Permeationskoeffizient von Nonivamid für FF 0,90 % geringfügig ab (ANOVA; p= $8,4 \cdot 10^{-3}$).

4.4.1.1.3 Einfluss der Lagerungszeit

Mit den Untersuchungen zur Lagerstabilität konnte bereits gezeigt werden, dass die Struktur der filmbildenden Formulierungen, die mit Eudragit® RS 30D als filmbildendem Polymer und Syloid® XDP 3050 als Arzneistoffträger hergestellt werden, während der Lagerung unverändert bleibt (4.2.3). Welchen Einfluss die Lagerung der Formulierung auf die Permeation des Wirkstoffs hat, wird in einem Experiment ermittelt, bei dem die Permeation von Nonivamid aus einer für zwei Monate gelagerten filmbildenden Formulierung (FF 0,9 % gel.) mit der aus den bereits etablierten und therapeutisch verwendeten HNC 0,025 % und HNC 0,05 % vergleichend untersucht wird. Ein unverändertes Permeationsprofil im Vergleich zu den Permeationsuntersuchungen, die mit der frisch hergestellten filmbildenden Formulierung durchgeführt wurden (4.4.1.1.1), würde eine zuverlässige Abgabe des Arzneistoffs in einem therapeutisch sicheren Rahmen auch nach einer zweimonatigen Lagerung belegen, während lagerungsbedingte Änderungen im Permeationsprofil die Therapiesicherheit der Zubereitung in Frage stellen würden.

Abbildung 4.4-5 und Tabelle 4.4-6 vergleichen die Permeation von Nonivamid aus einer für zwei Monate gelagerten filmbildenden Formulierung (FF 0,9 % gel.) mit der aus HNC 0,025 % und HNC 0,05 %.

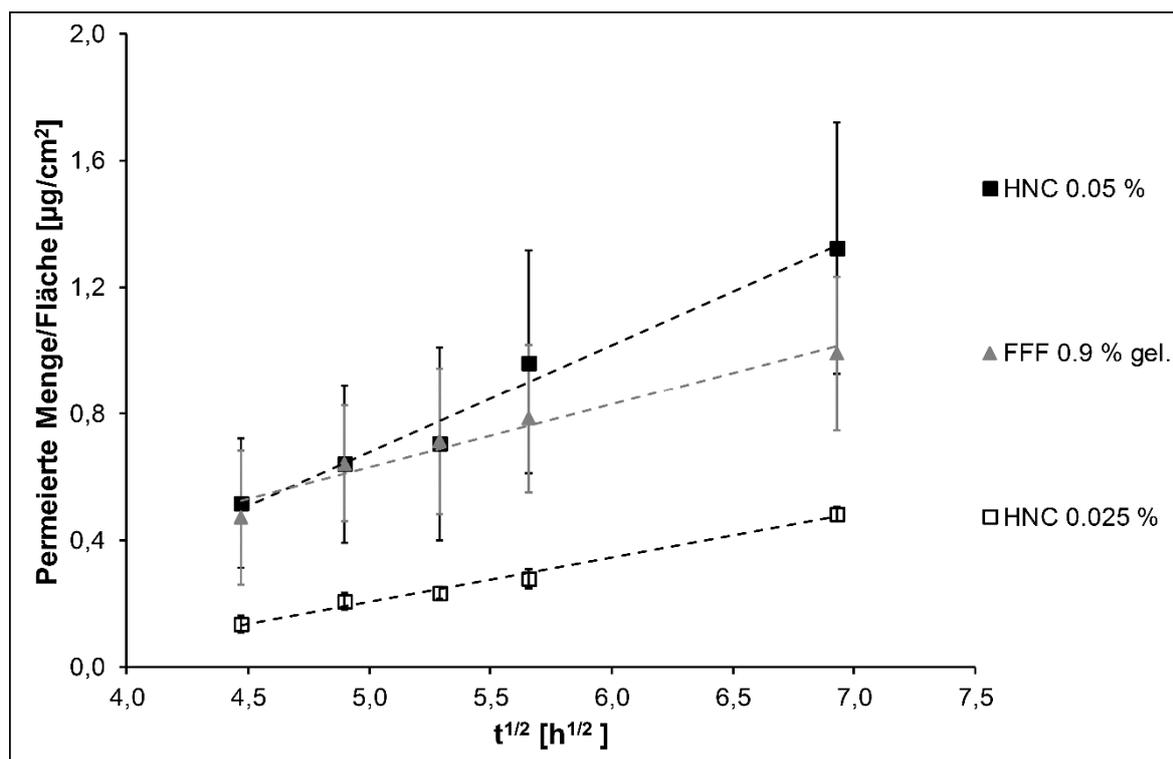


Abbildung 4.4-5: Vergleich der ex vivo Permeation von Nonivamid aus ■ HNC 0,05 %, □ HNC 0,025 % und einer für zwei Monate gelagerten filmbildenden Formulierung mit 0,9 % Nonivamid (▲ FF 0,9 % gel.) aufgetragen gegen die Wurzel der Zeit; Akzeptormedium: 4%ige Lösung von bovinem Serumalbumin in isotonomem Phosphatpuffer pH 7,4; n=5; Arithmetischer Mittelwert ± SD; modifiziert nach Heck et al. (2017).

Tabelle 4.4-6: Vergleich der Permeationsraten und der Permeationskoeffizienten und der lag-Phase von Nonivamid aus einer filmbildenden Formulierung und aus derer von HNCs mit verschiedenen NVA-Konzentrationen; Akzeptormedium: 4%ige Lösung von bovinem Serumalbumin in isotonomem Phosphatpuffer pH 7,4; n=5; Arithmetischer Mittelwert ± SD; p=0,05, Student-Newman-Keuls-Test; modifiziert nach Heck et al. (2017).

Formulierung	J [µg/cm ² *h ^{0,5}]	Kp [mL/cm ² *h ^{0,5}]
HNC 0,05 %	0,34 (± 0,080)*	6,77·10 ⁻⁴ (± 1,602·10 ⁻⁴)
FF 0,9 % gel.	0,20 (± 0,034)	0,22·10 ⁻⁴ (± 0,034·10 ⁻⁴)*
HNC 0,025 %	0,14 (± 0,002)	5,57·10 ⁻⁴ (± 0,097·10 ⁻⁴)

Wie bei den Ergebnissen für die Untersuchung mit der frisch hergestellten filmbildenden Formulierung liegen die permeierten Arzneistoffmengen auch für die gelagerte filmbildende Formulierung (FF 0,9 % gel.) zwischen den Werten der beiden Hydrophilen Nonivamid Cremes. Die HNC 0,05 % weist die höchste Permeationsrate der untersuchten Formulierungen auf. Die Permeationsrate der filmbildenden Formulierung ist vergleichbar mit der Permeationsrate der HNC 0,025 %, während die permeierte Arzneistoffmenge allerdings zu Beginn des Beobachtungszeitraums mit der permeierten Arzneistoffmenge der

HNC 0,05 % übereinstimmt. Vergleicht man die Permeationskoeffizienten der Formulierungen, so zeigt sich auch hier ein ähnliches Bild wie bei den vorangegangenen Untersuchungen. Die Permeationskoeffizienten der beiden Cremes unterscheiden sich statistisch nicht, während der Permeationskoeffizient der deutlich höher konzentrierten filmbildenden Formulierung (FF 0,9 % gel.) signifikant niedriger ist. Mit dieser Untersuchung kann belegt werden, dass eine Lagerung der filmbildenden Formulierungen für zwei Monate keinen Einfluss auf die Permeation des Arzneistoffs hat. Damit stellt die filmbildende Formulierung mit Eudragit® RS als filmbildendes Polymer und Syloid® XDP 3050 als Träger der Arzneistofflösung auch nach Lagerung eine sichere und therapeutisch anwendbare Formulierung dar (Heck et al., 2017).

4.4.1.1.4 Zusammenfassung der Untersuchungen mit infiniten Dosis

Der Vergleich aller Permeationsuntersuchungen untereinander ist aufgrund der Verwendung von Haut unterschiedlicher Spenderschweine nicht ohne weitere Berechnungen möglich. Da bei allen Zubereitungen jedoch die filmbildende Formulierung mit 0,9 % Nonivamid als Standardrezeptur verwendet wurde, ist ein Vergleich der Permeationsraten aller untersuchten Zubereitungen möglich. Die Berechnung erfolgt nach 3.2.23.2 und greift eine Richtlinie der amerikanischen Zulassungsbehörde zur Prüfung nicht steriler halbfester Produkte, die sogenannte SUPAC-SS (FDA, 2004), auf. Die Äquivalenz der Permeationsrate einer Zubereitung mit der Permeationsrate der Referenzzubereitung (FF 0,9 %) gilt dann als gegeben, wenn das Konfidenzintervall des Medians der Quotienten der Permeationsrate von Test- und Referenzzubereitung innerhalb der Grenzen von 0,75 und 1,33 liegt.

Abbildung 4.4-6 zeigt, dass die Permeationsraten von Nonivamid für HNC 0,025 % im gleichen Bereich wie für FF 0,9 % liegen (Median der Quotienten liegt bei ca. 1). Gemäß FDA ist allerdings aufgrund der großen Breite des Konfidenzintervalls keine Äquivalenz für diese Zubereitungen anzunehmen. Die restlichen Hydrophilen Nonivamid Cremes weisen leicht (HNC 0,05 %) bis deutlich höhere Werte (HNC 0,1 %, HNC 0,9 %) für die Permeationsraten auf. Da die HNC 0,025 % monografiert und damit als therapeutisch wirksam und sicher angesehen werden kann, ist dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass auch die entwickelte filmbildende Formulierung eine wirksame Therapieoption darstellen kann.

Beim Vergleich der jeweiligen unterschiedlich konzentrierten Hydrophilen Nonivamid Cremes untereinander wird zudem deutlich, dass der Wechsel des Akzeptormediums vom ethanolhaltigen (PBE) auf das albuminhaltige Medium (BSA) zu vergleichbaren Ergebnissen führt. Dasselbe gilt auch für die beiden Versuche mit den niedriger konzentrierten HNC 0,05 % und HNC 0,025 %. Dies unterstreicht, dass die Permeationsuntersuchungen trotz der

Tatsache, dass Haut verschiedener Spendertiere verwendet wird, zuverlässige Ergebnisse erbringen.

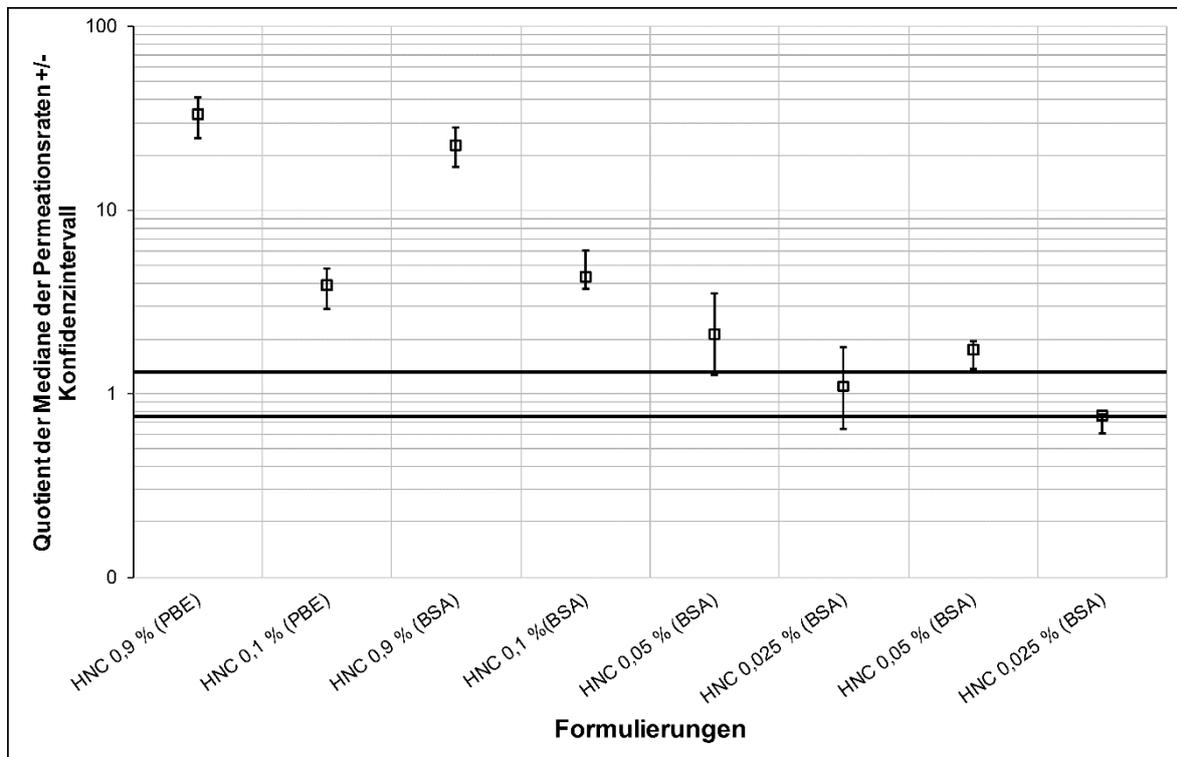


Abbildung 4.4-6: Äquivalenzprüfung der Permeationsraten von Nonivamid aus verschiedenen konzentrierten HNCs in Bezug auf FF 0,9 %; n=5; Median \pm Konfidenzintervall des Medians.

Führt man diese Prüfung für die Permeationskoeffizienten der jeweiligen Formulierungen durch (Abbildung 4.4-7), ergibt sich wie erwartet ein anderes Bild. Da die filmbildende Formulierung mit ihrer vergleichsweise hohen Wirkstoffkonzentration eine durch das Polymer kontrollierte Freisetzung ermöglicht, die in einer niedrigen Permeationsrate resultiert, ist der Permeationskoeffizient dementsprechend deutlich niedriger als bei den schnellfreisetzenden Hydrophilen Nonivamid Cremes. Eine Äquivalenz mit der filmbildenden Formulierung war dementsprechend nicht zu erwarten. Der unterschiedlich hohe Wirkstoffanteil in den schnell freisetzenden Hydrophilen Nonivamid Cremes wird bei der Berechnung des Permeationskoeffizienten durch die Normierung der Permeationsrate auf die Ausgangskonzentration nivelliert, wodurch sich bei gleicher Cremegrundlage theoretisch gleiche Werte ergeben sollten. Wie aus Abbildung 4.4-7 ersichtlich, werden für alle Hydrophilen Nonivamid Cremes vergleichbare Quotienten des Permeationskoeffizienten erhalten. Dies war zu erwarten, da alle schnellfreisetzenden Cremes auf der gleichen Cremegrundlage beruhen und sich hauptsächlich in ihrem Wirkstoffgehalt unterscheiden. Um abschließend zu beurteilen, ob auch eine Äquivalenz der verschiedenen konzentrierten Cremes untereinander gegeben ist, hätte bei allen Untersuchungen eine HNC mit der gleichen

Konzentration verwendet werden müssen. Da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit jedoch nicht darin begründet ist, die Äquivalenz der Permeationskoeffizienten verschiedener Hydrophiler Nonivamid Cremes zu belegen, genügt es zu wissen, dass bei allen Experimenten für die schnelfreisetzenden Cremes vergleichbare Permeationskoeffizienten erhalten werden.

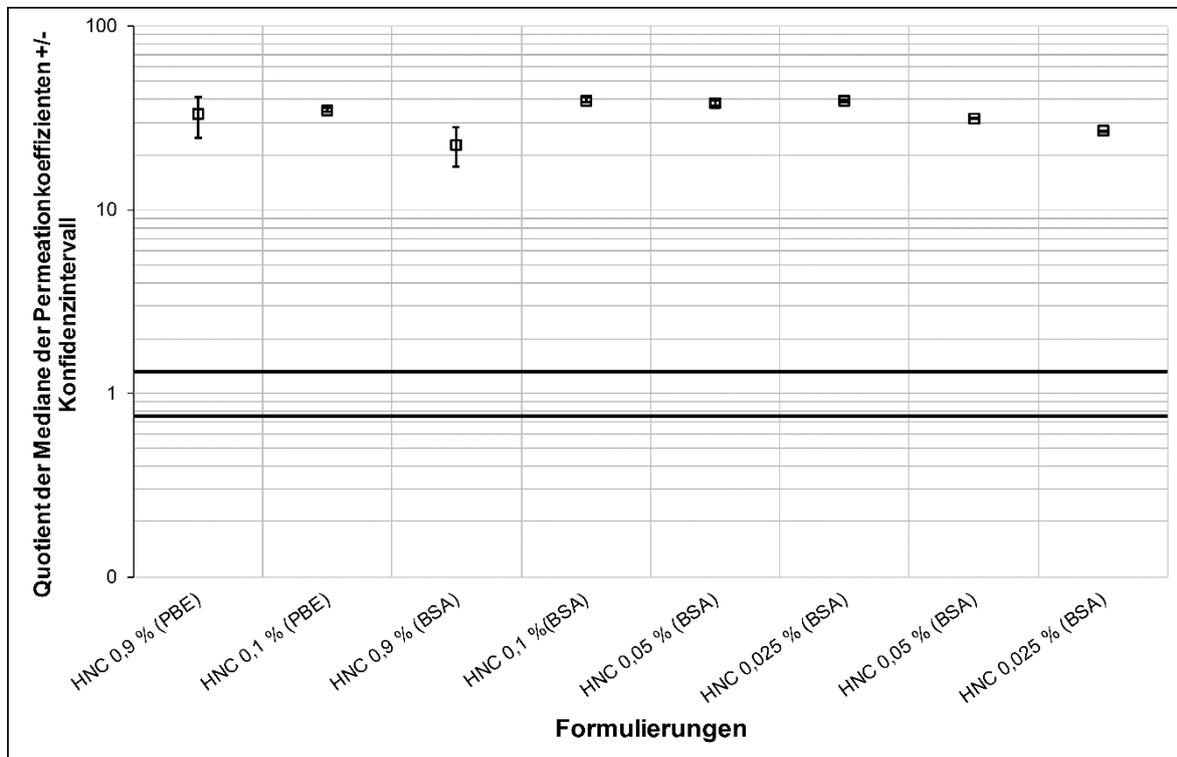


Abbildung 4.4-7: Äquivalenzprüfung der Permeationskoeffizienten von Nonivamid aus verschieden konzentrierten HNCs in Bezug auf FF 0,9 %; n=5; Median ± Konfidenzintervall des Medians.

Bei den Permeationsuntersuchungen mit infiniten Dosis wurde neben der frisch hergestellten filmbildenden Formulierung in einem weiteren Experiment auch eine für zwei Monate gelagerte filmbildende Formulierung der selben Wirkstoffkonzentration untersucht.

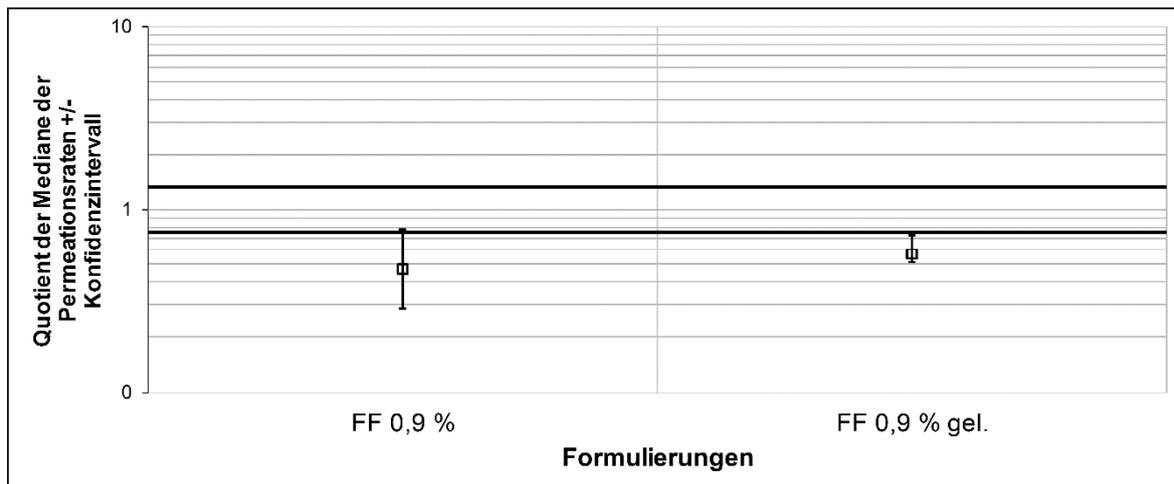


Abbildung 4.4-8: Äquivalenzprüfung der Permeationsraten von Nonivamid aus einer frisch hergestellten und einer gelagerten filmbildenden Formulierung in Bezug auf HNC 0,05 %; n=5; Median \pm Konfidenzintervall des Medians.

Um die Permeationsraten dieser beiden Formulierungen zu vergleichen, wird die bei beiden Experimenten verwendete HNC 0,05 % als Referenzformulierung herangezogen und so der Quotient der Mediane der Permeationsraten errechnet. Abbildung 4.4-8 veranschaulicht, dass die Permeationsrate von Nonivamid aus den beiden filmbildenden Formulierungen zwar nicht äquivalent zu der aus HNC 0,05 % ist, jedoch die beiden Formulierungen untereinander vergleichbare Permeationsraten aufweisen. Dies bestätigt, dass die Lagerung der filmbildenden Formulierungen keinen Einfluss auf die Permeationsrate hat.

4.4.1.2 Ex vivo Permeationsuntersuchungen mit finiter Dosis

Für die Untersuchung der Permeation von Nonivamid unter finiter Dosierung (2 mg/cm^2) werden die filmbildende Formulierung FF 0,9 % und die als Referenzformulierung dienenden Hydrophilen Nonivamid Cremes (HNC 0,025 % und HNC 0,05 %) verwendet, da diese bei den Untersuchungen mit infiniten Dosis vergleichbare Permeationsraten gezeigt haben. Die Applikation dieser geringen Menge erfolgt mittels Differenzwägung (3.2.16.2). Die finite Dosis entspricht einer Applikationsmenge, die auch bei der Untersuchung von Sonnencremes eingesetzt wird, und spiegelt realistische Bedingungen wider. Deshalb wird die Untersuchung für alle Formulierungen auch unter nicht okklusiven Bedingungen durchgeführt. Aufgrund der zu erwartenden deutlich niedrigeren Werte wird das ethanolische Akzeptormedium (3.2.13) verwendet, um eine quantitative Bestimmung des Arzneistoffs im Akzeptorkompartiment zu ermöglichen. Das Permeationsverhalten von Nonivamid aus der filmbildenden Formulierung und den beiden Referenzzubereitungen ist in Abbildung 4.4-9 dargestellt.

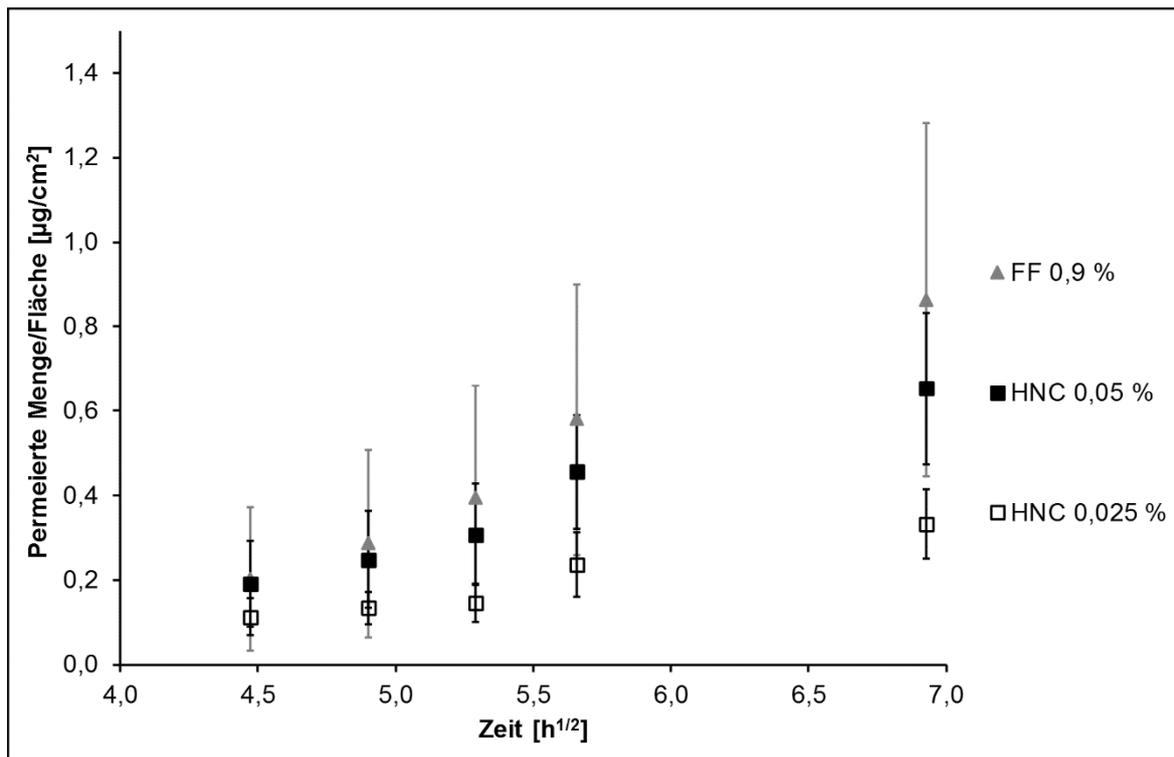


Abbildung 4.4-9: Vergleich der ex vivo Permeation von Nonivamid aus ■ HNC 0,05 %, □ HNC 0,025 % und einer filmbildenden Formulierung mit 0,9 % Nonivamid (▲ FF 0,9 %) aufgetragen gegen die Wurzel der Zeit; finite Dosierung (normiert auf $2 \text{ mg}/\text{cm}^2$); Akzeptormedium: 4%ige Lösung von bovinem Serumalbumin in isotonem Phosphatpuffer pH 7,4; n=5; Arithmetischer Mittelwert \pm SD.

Erneut liegt die innerhalb des Beobachtungszeitraums permeierte Nonivamid-Menge aus allen drei Formulierungen in einem ähnlichen Bereich. Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit infiniten Dosis zeigt sich jedoch, dass die permeierten Mengen an Nonivamid für die filmbildende Formulierung näher an den Werten, die für die HNC 0,05 % erhalten werden, liegen. Mit fortschreitendem Beobachtungszeitraum werden sogar Werte oberhalb derer aus der HNC 0,05 % erhalten. Insgesamt ist die Variabilität der Permeation von Nonivamid unter finiter Dosierung deutlich höher, was sich mit den Erkenntnissen der Permeationsuntersuchungen von Lunter & Daniels (2013) deckt. Dies ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, dass eine sehr geringe Applikationsmenge nicht in gleichem Maße homogen verteilt werden kann, wie das bei einer infiniten Dosierung der Fall ist, bei der die komplette Hautstelle mit Formulierung im Überschuss bedeckt ist. Dadurch kann es sein, dass unterschiedlich große Bereiche der Haut mit der Formulierung bedeckt sind, was zu Schwankungen im Permeationsverlauf der Formulierung führt. Dies betrifft die Anwendung beim Patienten nicht in gleichem Maße, da hier auf größere Areale Formulierung aufgebracht wird als bei den ex vivo Untersuchungen (2 cm^2) und zudem die Formulierung auf der Haut besser verteilt werden kann, als dies im Donorkompartiment der modifizierten Franz-Zelle möglich ist.

Für die untersuchten Formulierungen nimmt die permeierte Menge an Nonivamid über den gesamten Beobachtungszeitraum stetig zu. Betrachtet man den prozentualen Anteil an Nonivamid, der nach 48 Stunden durch die Haut permeiert ist, so zeigt sich, dass aus der HNC 0,05 % bereits 32,3 % ($\pm 8,87$ %) bzw. aus der HNC 0,025 % vergleichbare 32,9 % ($\pm 8,22$ %) durch die Haut permeiert sind, während es bei der filmbildenden Formulierung nur 2,4 % ($\pm 1,15$ %) sind. Bei den Referenzzubereitungen ist also bereits ein großer Teil an Arzneistoff durch die Haut permeiert. Bei gegebener Substantivität wäre es denkbar, dass auch über einen längeren Zeitraum hinweg Arzneistoff aus den Referenzzubereitungen in die Haut permeieren könnte. Durch den unter realistischen Bedingungen stattfindenden Haut-zu-Haut-Kontakt bzw. Haut-zu-Kleidung-Kontakt, der in diesem Experiment nicht simuliert wurde, würden jedoch die Referenzformulierungen mehr und mehr abgetragen werden. Im Film der filmbildenden Formulierung ist auch nach längerer Inkubationszeit noch eine beachtliche Menge an Nonivamid vorhanden. Aufgrund der guten Substantivität der filmbildenden Zubereitung (Herrmann et al., 2016) sollte vergleichsweise eine wesentlich längere Aufrechterhaltung des Konzentrationsgradienten und somit eine längerfristige, konstante Permeationsrate möglich sein.

4.4.2 Ex vivo Penetrationsuntersuchungen

Während es durch ex vivo Permeationsuntersuchungen möglich ist, eine Aussage über die Menge an Arzneistoff zu treffen, die die Haut permeiert hat, kann mit diesen Untersuchungen keine Information über den zeitlichen Verlauf der Arzneistoffverteilung in der Haut selbst erhalten werden. Aussagen darüber ermöglichen ex vivo Penetrationsuntersuchungen, bei denen die Menge an Arzneistoff in den verschiedenen Hautschichten analysiert wird. Da der Wirkort von Nonivamid nicht im systemischen Kreislauf liegt, sondern die TRPV1-Rezeptoren der schmerzleitenden A δ - und C-Fasern innerhalb der Epidermis die Zielregion darstellen, können mit Penetrationsuntersuchungen zudem wesentlich bessere Rückschlüsse auf die therapeutische Wirksamkeit der Zubereitungen erhalten werden. Für alle Penetrationsuntersuchungen wird eine finite Dosierung der Zubereitung unter nicht okklusiven Bedingungen auf die Haut aufgebracht (3.2.16.2). Dabei wird die Penetration von Nonivamid aus filmbildenden Formulierungen der Penetration aus der Referenzzubereitung HNC 0,05 % gegenübergestellt, da für diese Creme vergleichbare Permeationsdaten erhalten wurden. Nach zuvor festgelegten Zeitintervallen wird die Inkubation beendet und der Arzneistoff in den verschiedenen Hautschichten analysiert.

4.4.2.1 Ergebnisse der Penetrationsuntersuchungen bei Segmentierung des Stratum corneums mittels einer Klebebandabriss-Technik

Die Arzneistoffabsorption aus einer dermalen Zubereitung in die oberste Schicht der Haut, das Stratum corneum (SC), ist über eine Klebebandabriss-Technik ermittelbar (3.2.16.3). Hierbei wird im Anschluss an eine einstündige Inkubation der Haut mit der wirkstoffhaltigen Zubereitung das Stratum corneum mit mehreren Klebestreifen schichtweise von der Haut abgetragen, der Arzneistoff aus dem Probenmaterial extrahiert und mittels LC-MS/MS auf den Gehalt an Nonivamid analysiert (3.2.20.5). Abbildung 4.4-10 stellt die penetrierte Menge an Nonivamid gegenüber der Eindringtiefe des Arzneistoffs in die Haut dar.

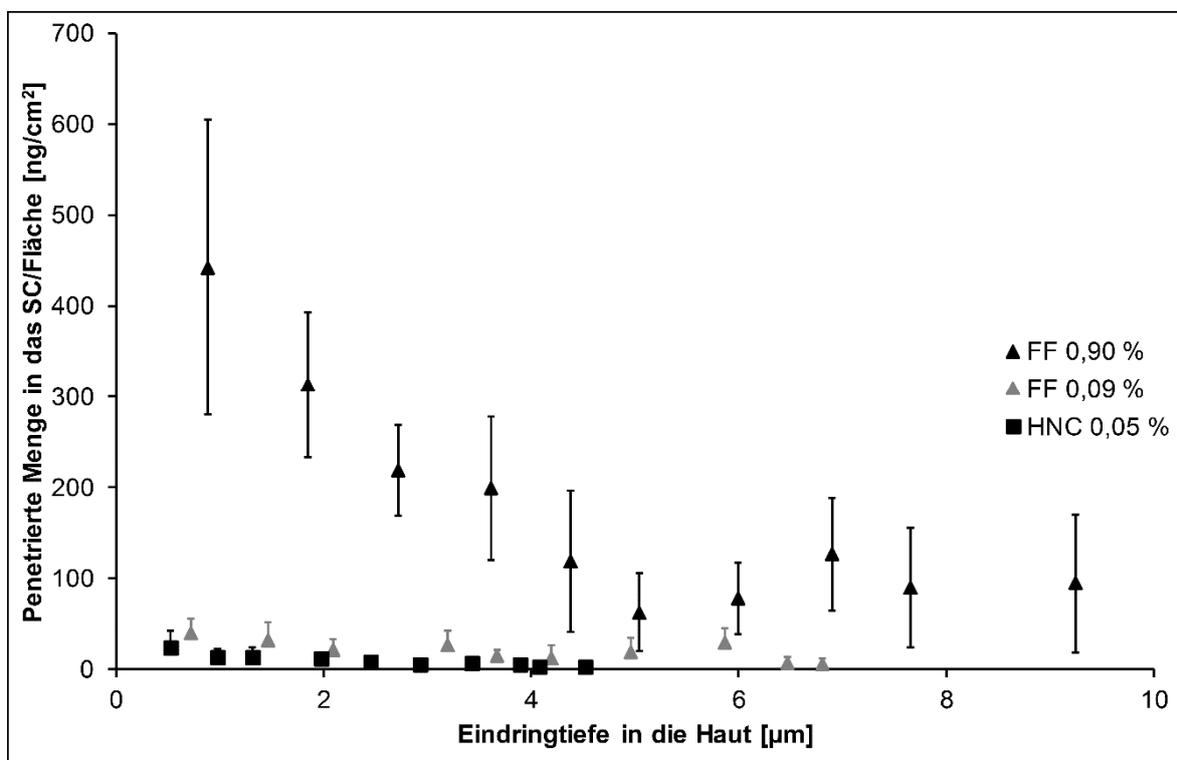


Abbildung 4.4-10: Menge an Nonivamid pro Fläche, die aus verschiedenen Zubereitungen in das SC penetriert ist, gegen die Eindringtiefe in die Haut; ▲ FF 0,90 %, ▲ FF 0,09 %, ■ HNC 0,05 %; n=3; Arithmetischer Mittelwert \pm SD.

Es ist ersichtlich, dass mit steigender Eindringtiefe in das Stratum corneum die penetrierte Menge an Nonivamid sinkt. Dies war für eine einstündige Applikationszeit exakt so zu erwarten, da die Penetration in tiefere Hautschichten eine gewisse Zeit erfordert. Die treibende Kraft hierfür ist dabei das Konzentrationsgefälle innerhalb der Haut. Überraschend ist jedoch, dass Nonivamid aus der filmbildenden Formulierung mit 0,90 % Nonivamid (FF 0,90 %) in größeren Mengen in die oberste Hautschicht penetriert, als dies bei der Referenzzubereitung HNC 0,05 % zu beobachten ist, obwohl beide Formulierungen ein ähnliches Permeationsprofil zeigen. Reduziert man den Anteil an Nonivamid in der filmbildenden Formulierung um den

Faktor zehn auf 0,09 % (FF 0,09 %), zeigt sich ein ähnliches Penetrationsprofil. Zudem ist auffällig, dass die mittels Klebebandabriss-Technik entfernte Hautschicht wesentlich dicker ist, wenn die filmbildende Formulierung aufgetragen wird. Bedingt durch die in der Hydrophilen Nonivamid Creme enthaltenen Lipide kann der Halt des adhäsiven Polymers des Klebestreifens auf der Haut beeinträchtigt sein. Dies würde die Effizienz der Klebebandabriss-Technik mindern, wodurch bei gleicher Anzahl an verwendeten Klebestreifen eine geringere Menge an Haut abgetragen werden könnte. Vergleicht man die insgesamt penetrierte Menge an Nonivamid aus den jeweiligen Versuchen (Tabelle 4.4-7), so zeigt sich deutlich, dass aus der 0,90%igen filmbildenden Formulierung nahezu die zehnfache Menge Nonivamid in die Haut penetriert ist, während aus der zehnfach niedriger konzentrierten FF 0,09 % mit HNC 0,05 % vergleichbare Werte erhalten werden.

Tabelle 4.4-7: Insgesamt in das SC penetrierte Menge/Fläche an Nonivamid aus verschiedenen Zubereitungen; n=3; Arithmetischer Mittelwert \pm SD.

Formulierung	Insgesamt in das SC penetrierte Menge/Fläche [ng/cm ²]
FF 0,90 %	1727,3 (\pm 532,96)*
FF 0,09 %	208,9 (\pm 82,71)
HNC 0,05 %	97,0 (\pm 52,63)

4.4.2.2 Methodenentwicklung zur Separierung der Hautschichten

Mittels Klebebandabriss-Technik kann nur der Wirkstoffgehalt in den zellkernlosen, abgeflachten Zellen des Stratum corneum erfasst werden. Die tiefer liegenden Bereiche der aus lebenden Zellen bestehenden Epidermis und der Dermis (Abbildung 4.4-11) können mit dieser Methode nicht untersucht werden, da die Adhäsionskraft des Klebestreifens nicht ausreicht, um solche Hautschichten zu entfernen.

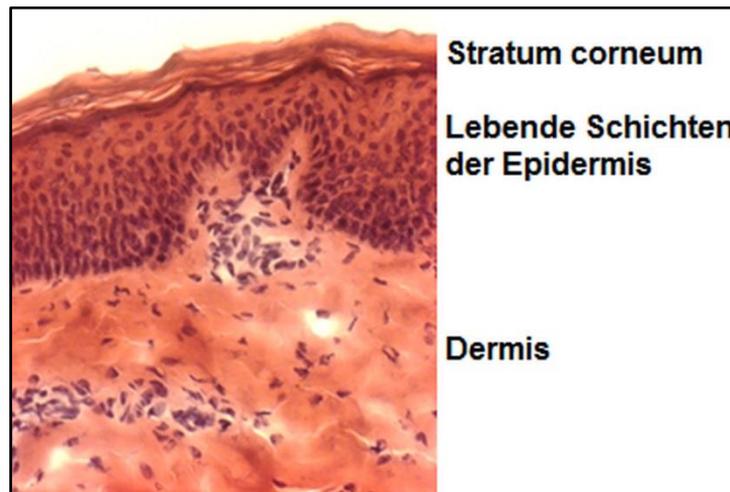


Abbildung 4.4-11: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Längsschnitts durch postaurikuläre Schweinehaut (Färbung mit Hämatoxylin-Eosin).

Um die penetrierte Menge auch in tiefer liegenden Hautschichten zu analysieren, wird die Haut mit einem Kryo-Mikrotom in 16 µm dicke Querschnitte separiert (3.2.16.4.1). Zunächst muss untersucht werden, wie die Schnitte den jeweiligen Hautschichten zuzuordnen sind. Das erfolgt durch histologische Färbung aller angefertigten Schnitte (3.2.22) und anschließender lichtmikroskopischer Analyse (3.2.20.1). Die Ergebnisse dienen als Grundlage für die Zuordnung der Schnitte bei der Auswertung der Penetrationsuntersuchungen. Bei den Untersuchungen sollen die einzelnen Hautschnitte aufgrund der anschließenden Gehaltsbestimmung mittels HPLC nicht angefärbt werden, da dies gegebenenfalls zu Interferenzen bei der Quantifizierung des Arzneistoffs führen könnte.

Abbildung 4.4-12 zeigt die gefärbten Hautschnitte, die aufsteigend nummeriert wurden. Die Zuordnung zu den Hautschichten erfolgt nach einer von Heck (2012) entwickelten Methode. Sind in einem Schnitt mehr als 10 % der Schnittfläche abgeflachte Zellen des Stratum corneum, wird die Probe dem Stratum corneum zugeteilt. Die Hautschnitte werden den lebenden Zellen der Epidermis zugeordnet, wenn mehr als 25 % der Schnittfläche aus den zellkernreichen epidermalen Zellen besteht. Die restlichen Schnitte werden der Dermis zugeteilt.

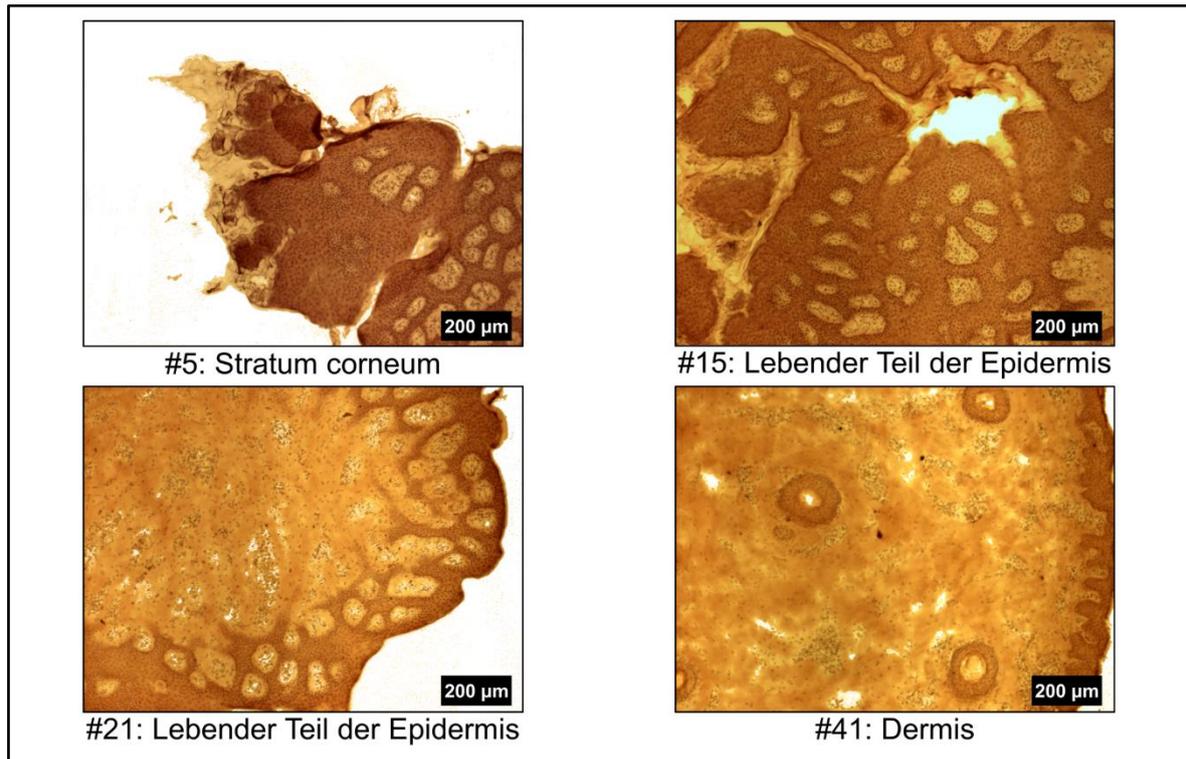


Abbildung 4.4-12: Lichtmikroskopische Aufnahmen von longitudinalen Hautschnitten eines Schweineohrs, die histologisch mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt wurden, und welchen Hautschichten sie zugeordnet werden. Die Nummerierung der Schnitte erfolgt aufsteigend beginnend von der Oberseite der Haut.

Es bestätigen sich die Ergebnisse, die bereits zuvor beschrieben wurden (Heck, 2012): Ausgehend von der Oberseite der porcinen Haut können die ersten vierzehn Hautschnitte dem Stratum corneum zugeordnet werden, die darauf folgenden vierzehn dem lebenden Teil der Epidermis und die restlichen Schnitte der Dermis. Die Erkenntnisse der histologischen Färbung der Hautschnitte kombiniert mit der lichtmikroskopischen Analyse ermöglichen es, dass die aus Penetrationsuntersuchungen gewonnenen Hautschnitte direkt den drei jeweiligen Hautschnitten zugeteilt werden können, ohne dass zuvor eine histologische Färbung erfolgen muss, welche die Wirkstoffanalytik negativ beeinflussen könnte.

Eine weitere Option stellt die initiale Entfernung des Stratum corneum mittels einer Cyanoacrylatbiopsie dar. Hierfür wird Cyanoacrylat-Klebstoff entsprechend 3.2.16.4.2 auf die Haut appliziert und nach abgeschlossener Polymerisation wird das Stratum corneum von der restlichen Haut getrennt. Um zu beurteilen, wie viele Wiederholungen notwendig sind, um eine vollständige Entfernung des Stratum corneum zu gewährleisten, werden transversale Hautschnitte von Hautstücken, die mit Cyanoacrylat behandelt wurden, angefertigt, histologisch gefärbt, lichtmikroskopisch untersucht und mit Aufnahmen von unbehandelter Haut verglichen. Wie aus Abbildung 4.4-13 anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen erkenntlich, ist nach zwei Cyanoacrylatbiopsien das Stratum corneum vollständig entfernt und die restlichen epidermalen Strukturen liegen frei. Die Entfernung des Stratum corneum mittels einer Hautbiopsie bietet gegenüber der Segmentierung im Kryo-Mikrotom den Vorteil, dass die Strukturen deutlich effektiver und zuverlässiger entfernt werden können. Während beim Schneiden der Haut im Kryo-Mikrotom die oft spröden Bruchstücke des Stratum corneum leicht brechen und somit schwer zu sammeln sind, bleiben die Proben bei der Entfernung durch einen adhäsiven Klebstoff fixiert.

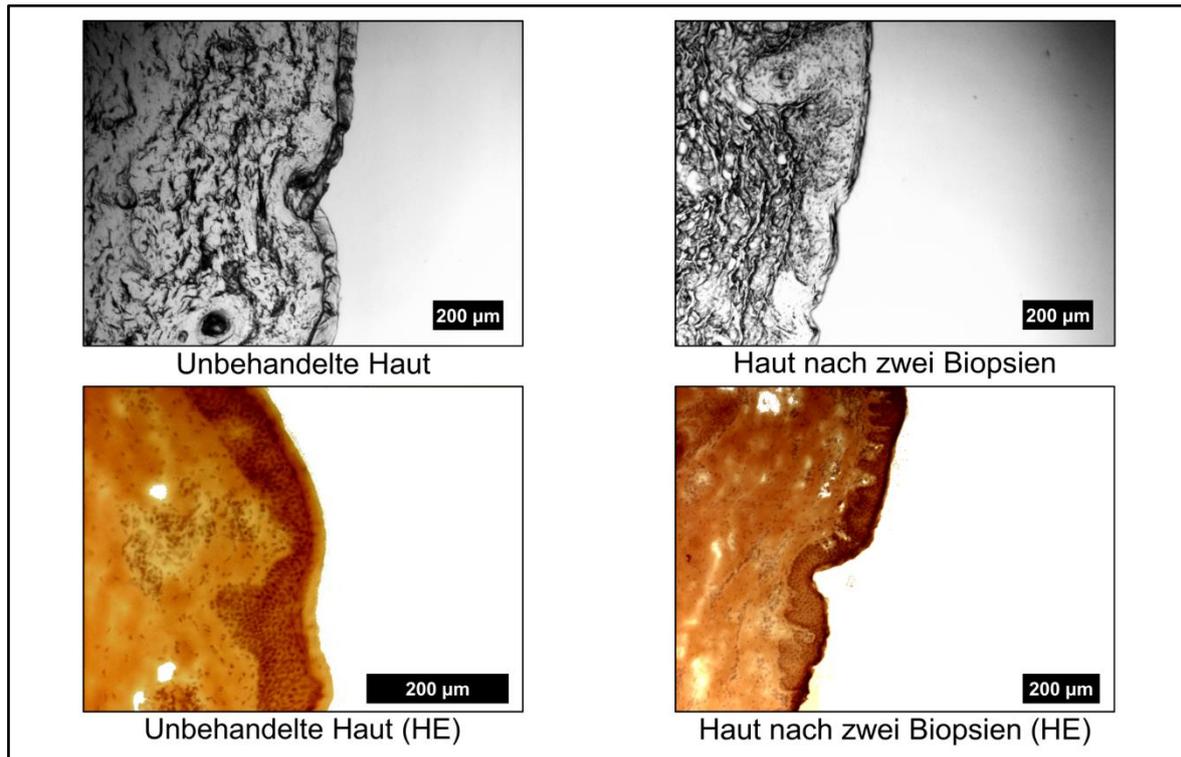


Abbildung 4.4-13: Lichtmikroskopische Aufnahmen eines transversalen Schnitts durch die Haut eines Schweineohrs, bei denen die Zellen unbehandelt und histologisch mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt analysiert werden.

Die weiteren Hautschichten der lebenden Zellen der Epidermis und Dermis werden dann wie zuvor beschrieben mit dem Kryo-Mikrotom entfernt. Da bereits das Stratum corneum mittels Hautbiopsie abgetragen wurde, ist eine erneute histologische Analyse der longitudinalen Hautschnitte notwendig, um zu beurteilen, welche Schnitte den jeweiligen Schichten der Haut zuzuordnen sind. Abbildung 4.4-14 stellt einige der lichtmikroskopischen Aufnahmen dar. Bereits der erste Hautschnitt unterscheidet sich deutlich von denen, die von unbehauelter Haut erhalten wurden. Wie erwartet sind nahezu keine abgeflachten Zellen, die dem Stratum corneum zugeordnet werden können, erkennbar. Im Gegensatz dazu sind überall im Bild die typischen zellkernreichen Strukturen der lebenden Schichten der Epidermis ersichtlich, die jedoch mit steigender Schnitttiefe immer geringer werden. Nach fünfzehn Hautschnitten bedecken epidermale Strukturen bereits weniger als ein Viertel des Präparats, weshalb dieser Hautschnitt der Dermis zuzuordnen ist. Das Gleiche gilt für alle nachfolgenden Schnitte.

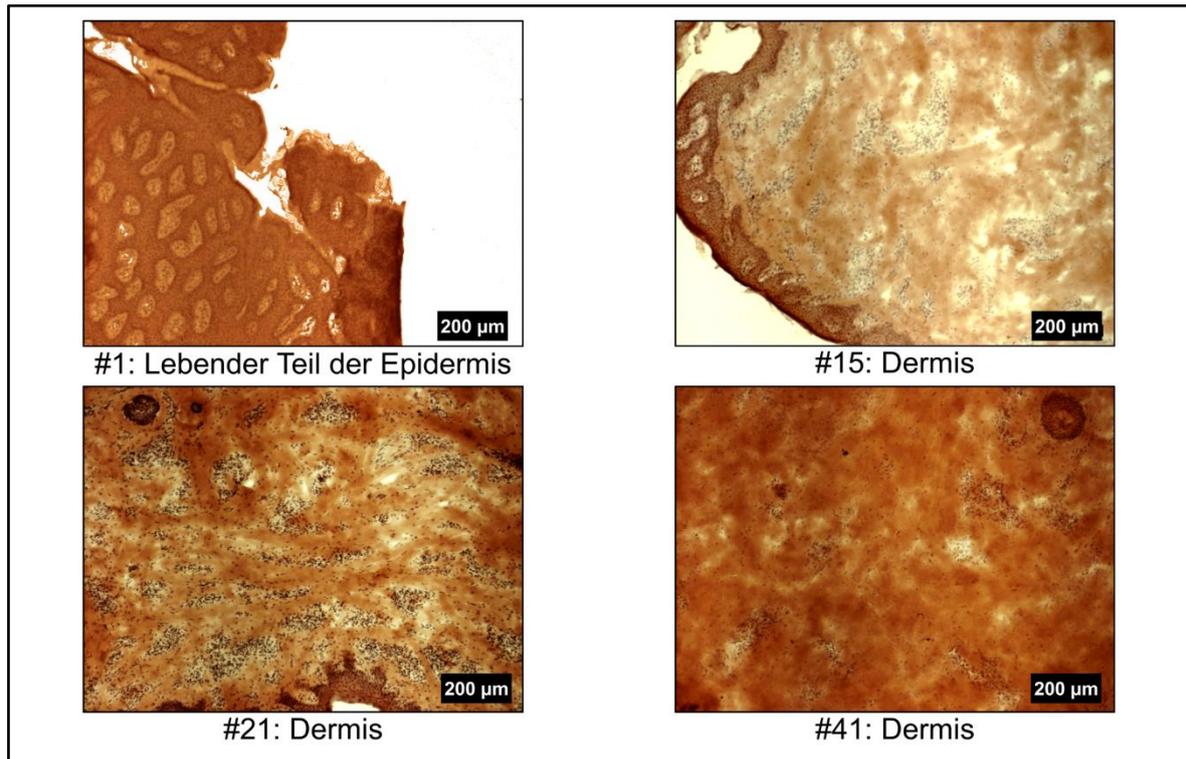


Abbildung 4.4-14: Lichtmikroskopische Aufnahmen von longitudinalen Hautschnitten des Schweineohrs, die histologisch mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt wurden, und welchen Hautschichten sie zugeordnet werden. Die Nummerierung der Schnitte erfolgt aufsteigend beginnend von der Oberseite mit Cyanoacrylat-Klebstoff biopsierter Haut.

Wird das Stratum corneum also mittels einer Hautbiopsie entfernt und die verbliebene Haut anschließend mittels eines Kryo-Mikrotoms segmentiert, so sind die ersten vierzehn Hautschnitte der restlichen Epidermis zuzuordnen, während alle darauffolgenden Schnitte aus Zellen der Dermis bestehen.

4.4.2.3 Ergebnisse der ex vivo Penetrationsuntersuchungen bei Segmentierung der Hautschichten mit Hilfe des Kryo-Mikrotoms

Wie bei den Penetrationsuntersuchungen, die mittels Klebebandabriss-Technik und LC-MS/MS ausgewertet wurden, wird auch hier die Penetration von Nonivamid aus einer filmbildenden Formulierung mit 0,90 % Nonivamid mit der aus HNC 0,05 % verglichen, da diese Formulierung ein vergleichbares Permeationsprofil zeigt. Die Durchführung der Penetrationsuntersuchungen erfolgt mit finiter Dosierung in modifizierten Franz-Diffusionszellen. Es werden Inkubationszeiten von 1, 4 und 12 Stunden gewählt, um den Verlauf der Arzneistoffpenetration darzustellen. Die Aufarbeitung der Proben wird in 3.2.16.5.1 detailliert beschrieben. In Abbildung 4.4-15 ist die penetrierte Menge an Nonivamid in den drei untersuchten Hautschichten normiert auf die Penetrationsfläche in Abhängigkeit von der Inkubationszeit dargestellt.

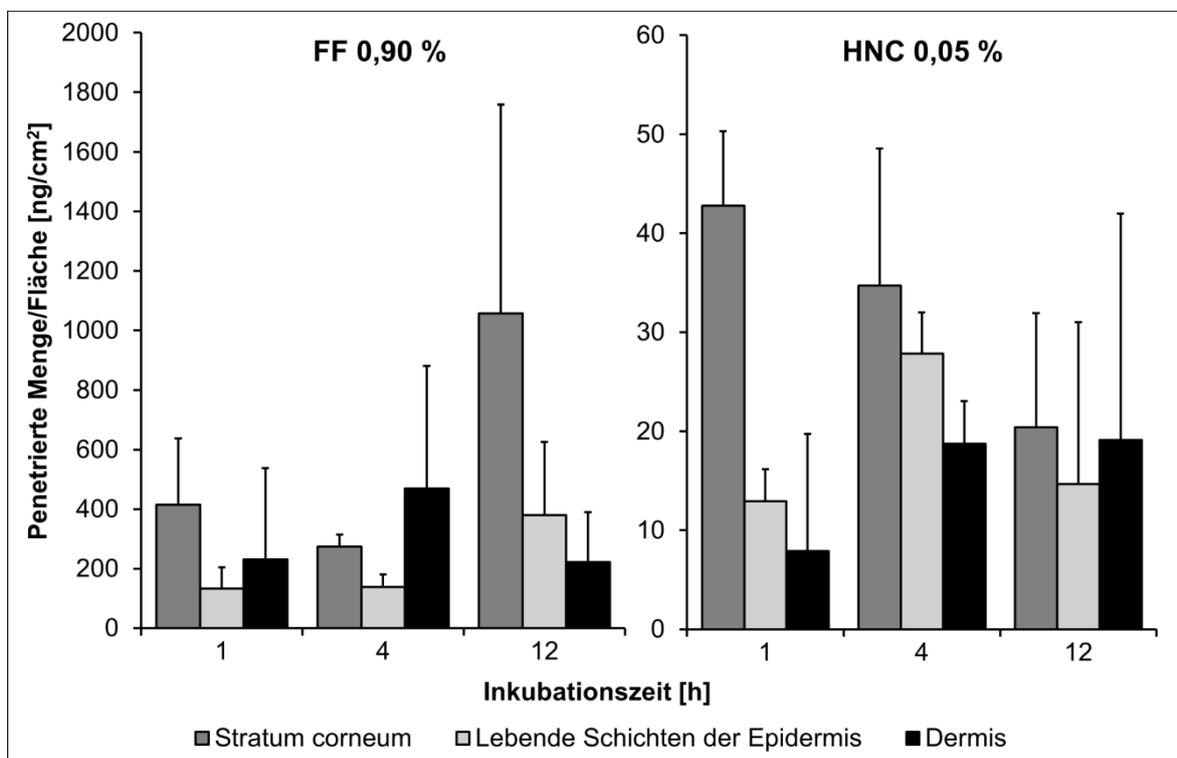


Abbildung 4.4-15: Penetrierte Menge an Nonivamid in den verschiedenen Hautschichten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit aus einer filmbildenden Formulierung (FF 0,90 %) und HNC 0,05 %; finite Dosierung (normiert auf 2 mg/cm²); n=3; Arithmetischer Mittelwert + SD.

Es war zu erwarten, dass sich das lipophile Nonivamid vor allem in den lipidreichen Strukturen des Stratum corneum anreichert. Bis auf die 4 h-Probe bei der filmbildenden Formulierung ist in allen Proben die größte Menge an Arzneistoff im Stratum corneum zu finden. Der Wirkort von Nonivamid befindet sich in den epidermalen A δ - und C-Fasern, weshalb vor allem der Bereich der lebenden Schichten der Epidermis eine Abschätzung über die Wirkung der

Zubereitung treffen lässt. Nachdem die in die lebenden Schichten der Epidermis penetrierte Menge an Nonivamid bei der Applikation von HNC 0,05 % nach vier Stunden ihren Höchststand erreicht hat, sinkt die Menge nach einer Inkubationszeit von zwölf Stunden weiter ab. Dies entspricht den Erwartungen für eine nicht-retardierte dermale Zubereitung, die mehrmals täglich appliziert werden muss. Für die filmbildende Formulierung zeigt sich hingegen die höchste Arzneistoffmenge in den lebenden Schichten der Epidermis nach zwölf Stunden. Dies zeigt, dass die filmbildende Formulierung auch bei finiter Dosierung über einen langen Zeitraum von zwölf Stunden eine anhaltende Versorgung mit Arzneistoff sicherstellt.

Auffällig ist jedoch, dass bei Betrachtung der absoluten Mengen weitaus höhere Werte für die filmbildende Formulierung mit 0,90 % Nonivamid erhalten werden, als dies bei der Applikation von HNC 0,05 % der Fall ist. Wie bereits bei den Klebebandabriss-Experimenten liegt die absolute Menge in etwa zehnfach höher. Da dies auch die lebenden Schichten der Epidermis als eigentlichen Wirkort von Nonivamid betrifft, kann diese erhöhte Konzentration unter Umständen unerwünschte Nebenwirkungen zur Folge haben.

Die beschriebenen Ergebnisse beruhen auf der von Heck (2012) entwickelten Methode. Aufgrund der unebenen Hautoberfläche und der spröden Eigenschaften der aus dem Stratum corneum gewonnenen Hautstücke ist sowohl eine vollständige Entfernung der obersten Hautschicht als auch eine zuverlässige Überführung der Schnitte in die Extraktionsgefäße herausfordernd. Da aber gerade die obere Hautschicht einen Großteil des in die Haut penetrierten Arzneistoffs enthält, kann bereits der Verlust kleiner Bruchstücke bei der Überführung der Hautschnitte zu hohen Variationen und zu fälschlicherweise zu niedrig gemessenen Werten für die penetrierte Menge im Stratum corneum führen. Aufgrund der welligen Struktur der Haut kann eine unzureichende Entfernung des Stratum corneum aber auch dazu führen, dass in den tiefer liegenden Schichten der Haut irrtümlich zu hohe Werte an penetriertem Arzneistoff wiedergefunden werden. Aus diesem Grund wurde die Durchführung wie nachstehend beschrieben optimiert.

4.4.2.4 Ergebnisse der ex vivo Penetrationsuntersuchungen bei Segmentierung der Hautschichten mit Hilfe einer Cyanoacrylatbiopsie und des Kryo-Mikrotoms

Erneut wird die Penetration von Nonivamid aus einer filmbildenden Formulierung (FF 0,90 %) mit der aus HNC 0,05 % verglichen. Der Inkubationszeitraum liegt zwischen 1- 24 Stunden. Nach der Inkubation wird die restliche Formulierung abgenommen und die Entfernung des Stratum corneum erfolgt, wie in 3.2.16.4.2 beschrieben, mittels einer Cyanoacrylatbiopsie. Die so behandelten Hautstücke werden im Kryo-Mikrotom segmentiert, die Schnitte entsprechend den jeweiligen Hautschichten gesammelt, der Arzneistoff extrahiert (3.2.16.5.1) und mittels HPLC (3.2.20.4.2) analysiert. Abbildung 4.4-16 zeigt die penetrierte Menge an Nonivamid pro Fläche gegenüber der Inkubationszeit und stellt die Ergebnisse der beiden Zubereitungen direkt gegenüber.

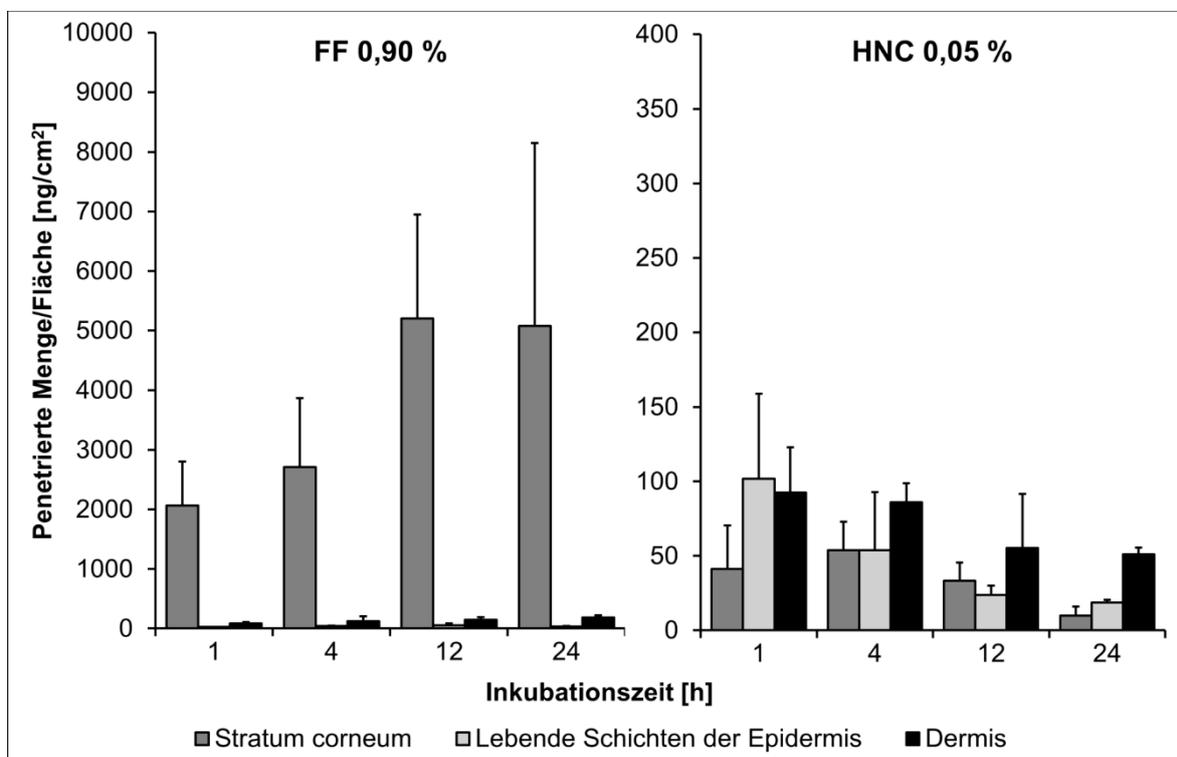


Abbildung 4.4-16: Penetrierte Menge an Nonivamid in den verschiedenen Hautschichten in Abhängigkeit zur Inkubationszeit aus einer filmbildenden Formulierung (FF 0,90 %) und HNC 0,05 %; finite Dosierung (normiert auf 2 mg/cm²); n=3; Arithmetischer Mittelwert + SD.

Betrachtet man die Penetration aus der filmbildenden Formulierung, so fällt auf, dass sich ein Großteil des Arzneistoffs im Stratum corneum anreichert, während in den tieferen Hautschichten weit weniger Nonivamid nachzuweisen ist. Für die HNC 0,05 % ist dies so nicht zu beobachten. Jedoch bestätigt sich auch bei dieser Untersuchung, dass mit steigender Inkubationszeit eine Kumulation des Arzneistoffs in der Haut zu verzeichnen ist, wenn die Penetration aus der filmbildenden Formulierung erfolgt, während die penetrierte

Arzneistoffmenge im gleichen Zeitraum für HNC 0,05 % stetig abnimmt. Im Vergleich zu den Penetrationsuntersuchungen, die ausschließlich mit dem Kryo-Mikrotom ausgewertet wurden, ist besonders auffällig, dass aus der filmbildenden Formulierung mit der abgewandelten Methode deutlich höhere Werte im lipophilen Stratum corneum erhalten werden. Stattdessen sind die Werte in den tieferen Hautschichten wesentlich geringer. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Entfernung des Stratum corneum mittels Cyanoacrylat-Biopsie zuverlässiger und effizienter ist. Die extrem hohen Werte im Stratum corneum könnten allerdings auch auf eine unzureichende Entfernung des nach der Inkubation verbliebenen Films zurückzuführen sein, der aufgrund seiner Adhäsionskraft im Vergleich zur HNC merklich schwieriger von der Haut abzuwischen ist. Es bestätigen sich zudem die Erkenntnisse aus vorangegangenen Penetrationsuntersuchungen, dass die insgesamt penetrierte Menge aus der filmbildenden Formulierung mit 0,90 % Nonivamid auffallend höher liegt, als dies für die HNC 0,05 % der Fall ist. Betrachtet man die tieferen Hautschichten der restlichen Epidermis und der Dermis genauer, wird ein weiterer Aspekt sichtbar (Abbildung 4.4-17): Während die Penetration in das lipophile Stratum corneum aus beiden Formulierungen höchst unterschiedlich ist, werden in den tieferen Hautschichten vor allem bei kurzer Inkubationszeit ähnliche Werte erhalten.

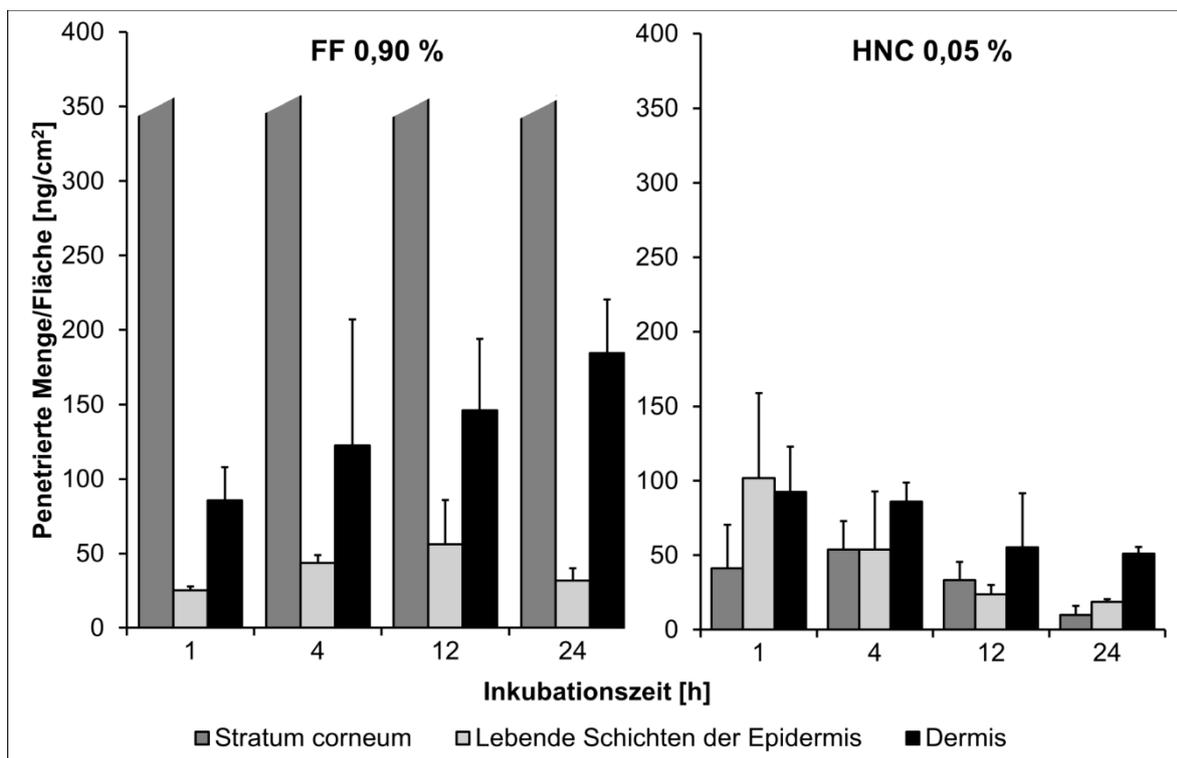


Abbildung 4.4-17: Vergrößerte Ansicht der penetrierten Menge an Nonivamid in den verschiedenen Hautschichten in Abhängigkeit zur Inkubationszeit aus einer filmbildenden Formulierung (FF 0,90 %) und HNC 0,05 %; finite Dosierung (normiert auf 2 mg/cm²); n=3; Arithmetischer Mittelwert + SD.

Mit steigender Inkubationszeit nimmt die penetrierte Menge in der restlichen Epidermis ab, wenn HNC 0,05 % appliziert wird. Im Gegensatz dazu bleibt dieser Wert in etwa konstant, wenn die filmbildende Formulierung auf die Haut aufgetragen wird. Dass bei der Untersuchung, die ausschließlich im Kryo-Mikrotom ausgewertet wurde (4.4.2.3), für die gleiche filmbildende Formulierung vergleichsweise höhere Werte an Nonivamid in den lebenden Schichten der Epidermis wiedergefunden wurden, kann auf eine unzureichende Entfernung des Stratum corneum mit dem Kryo-Mikrotom zurückzuführen sein. Denn daraus würden fälschlicherweise erhöhte Werte in den tiefer liegenden Hautschichten resultieren.

Aufgrund der zehnfach erhöhten Nonivamid-Mengen im Stratum corneum nach Applikation von FF 0.90 % wurde außerdem die Penetration aus einer zehnfach niedriger konzentrierten Zubereitung (FF0.09%) untersucht. Es ergibt sich das in Abbildung 4.4-18 dargestellte Ergebnis.

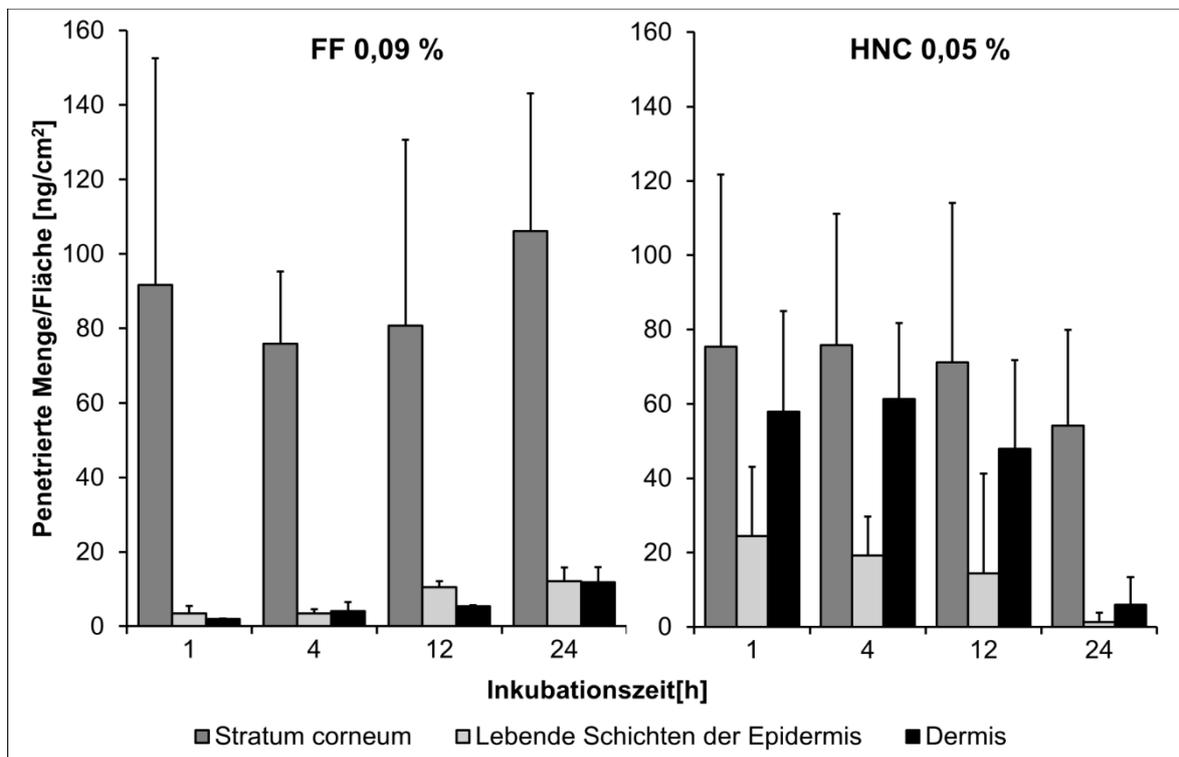


Abbildung 4.4-18: Penetrierte Menge an Nonivamid in den verschiedenen Hautschichten in Abhängigkeit zur Inkubationszeit aus einer filmbildenden Formulierung (FF 0,09 %) und HNC 0,05 %; finite Dosierung (normiert auf 2 mg/cm²); n=3; Arithmetischer Mittelwert + SD.

Wie bei den vorangegangenen Untersuchungen zeigt sich auch hier eine Reservoirbildung von Nonivamid im Stratum corneum nach der Applikation der filmbildenden Formulierung. Die in die tieferen Hautschichten penetrierten Mengen sind deutlich geringer. Bei der HNC 0,05 % sind ähnliche Mengen an Nonivamid in das Stratum corneum penetriert. Es bestätigt sich die

Erkenntnis aus den Penetrationsuntersuchungen mit der Klebebandabriss-Technik (4.4.2.1), dass durch die Reduktion des Wirkstoffanteils in der filmbildenden Formulierung auf 0,09 % für die penetrierte Arzneistoffmenge im Stratum corneum vergleichbare Werte zur therapeutisch angewendeten HNC 0,05 % erzielt werden können. Dieses Ergebnis belegt zudem, dass mit den beiden Methoden zur Entfernung des Stratum corneum (Klebebandabriss-Technik bzw. Cyanoacrylat-Hautbiopsie) vergleichbare Ergebnisse erhalten werden. Betrachtet man die tieferen Hautschichten, so zeigt sich, dass wie bei dem vorherigen Experiment eine stetige Abnahme der in die lebenden Schichten der Epidermis penetrierten Menge festzustellen ist, wenn die HNC appliziert wurde. Die filmbildende Formulierung erlaubt hingegen eine anhaltende Penetration des Arzneistoffs in die Haut, was letztlich in einem erhöhten Wert an penetrierten Arzneistoff nach einer Inkubation von 12 bzw. 24 Stunden resultiert. Im Gegensatz dazu ist der Arzneistoff bei einer einfachen Applikation von HNC 0,05 % in dem für die Wirkung relevanten Bereich der Haut nach 24 Stunden nahezu nicht mehr vorhanden.

4.4.2.5 Ergebnisse der ex vivo Penetrationsuntersuchungen bei Segmentierung der Hautschichten mittels einer Kombination aus einer Klebebandabriss-Technik, einer Cyanoacrylatbiopsie und mit Hilfe des Kryo-Mikrotoms

Die filmbildenden Formulierungen hinterlassen nach der Applikation einen Film auf der Haut. Im Hinblick auf die korrekte Analyse der Hautpenetration ist die vollständige Entfernung des nach der Inkubationszeit verbliebenen Films notwendig, damit der im Film enthaltene Wirkstoff, der nicht in die Haut penetriert ist, nicht fälschlicherweise bei der Hautbiopsie mit dem Cyanoacrylatklebstoff extrahiert wird und so dem Stratum corneum zugeordnet wird. Während die Entfernung der auf der Haut verbliebenen Formulierung bei klassischen Cremes, wie z.B. der HNC, leicht mit Schlinggazetupfern gelingt, ist dies bei den ausgebildeten Filmen deutlich herausfordernder: Der Einsatz organischer Lösungsmittel, um den Film zu lösen und abzuwischen, ist aufgrund deren Extraktionsvermögen von Lipiden aber auch z.B. lipophiler Arzneistoffe aus der Haut ungeeignet. Mit der Verwendung wässriger Medien ist eine vollständige Entfernung der Filmstücke wegen der Unlöslichkeit des Polymers in Wasser nicht ideal. Die Adhäsion des Polymerfilms an der Haut erschwert zudem die physikalische Entfernung des Films. Eine geeignete Methode kann daher sein, den auf der Haut zurückgebliebenen Film durch adhäsive Klebestreifen zu entfernen. Dieser Vorgang wird bewusst nur einmal wiederholt, um sicherzustellen, dass nicht größere Mengen der Hautoberfläche entfernt werden. Im Anschluss an die beiden Klebebandabrissverfahren wird eine Cyanoacrylatbiopsie angefertigt und die Haut im Kryo-Mikrotom segmentiert, um Epidermis und Dermis zu trennen. Das genaue Vorgehen der optimierten Auswertung von Penetrationsuntersuchungen wird in 3.2.16.5.2 beschrieben. Um die Ergebnisse mit denen aus den vorangegangenen Experimenten vergleichen zu können, werden mit den filmbildenden Formulierungen (FF 0,90 % und FF 0,09 %) und der HNC 0,05 % als Referenzzubereitungen die gleichen Formulierungen verwendet. Abbildung 4.4-19 zeigt die Ergebnisse für FF 0,90 % und HNC 0,05 %. Die im Stratum corneum wiedergefundene Menge an Arzneistoff ist nach der Applikation von FF 0,90 % weiterhin weitaus höher als nach der Applikation von HNC 0,05 %. Dies bedeutet, dass die filmbildende Formulierung, die zwar ein ähnliches Permeationsprofil aufweist, eine deutlich höhere Penetration des Arzneistoffs in das Stratum corneum bewirkt. Auffällig ist zudem, dass die detektierte Menge im Stratum corneum für die filmbildende Formulierung bei dieser Untersuchung eindeutig niedriger als beim vorherigen Experiment (4.4.2.4) ist. Der Unterschied liegt in der gründlichen Entfernung der auf der Haut zurückgebliebenen Formulierung mit Klebestreifen, während bei der vorangegangenen Untersuchung der Film ausschließlich mit Schlinggazetupfern und Kochsalzlösung abgetragen wurde. Da auch für die HNC zur Entfernung der restlichen Formulierung zusätzlich adhäsive Klebestreifen angewendet wurden, hier jedoch keine

deutlichen Unterschiede zu erkennen sind, kann daraus geschlossen werden, dass die Abnahme der penetrierten Menge Nonivamid im Stratum corneum auf die effektive Entfernung des Films durch die Klebestreifen zurückzuführen ist und nicht etwa bereits das Stratum corneum selbst entfernt wurde. Verwendet man hingegen ausschließlich Schlinggazetupfer, so verbleiben Reste des Films auf der Haut, die fälschlicherweise als erhöhte Penetrationswerten für den Arzneistoff in der obersten Hautschicht interpretiert werden. Da bei den klassischen Cremes eine Entfernung der nach abgeschlossener Inkubationszeit verbliebenen Formulierung bereits mit Schlinggazetupfern ausreichend ist, ist auch durch die zusätzliche Anwendung von Klebestreifen kein Unterschied zu erkennen.

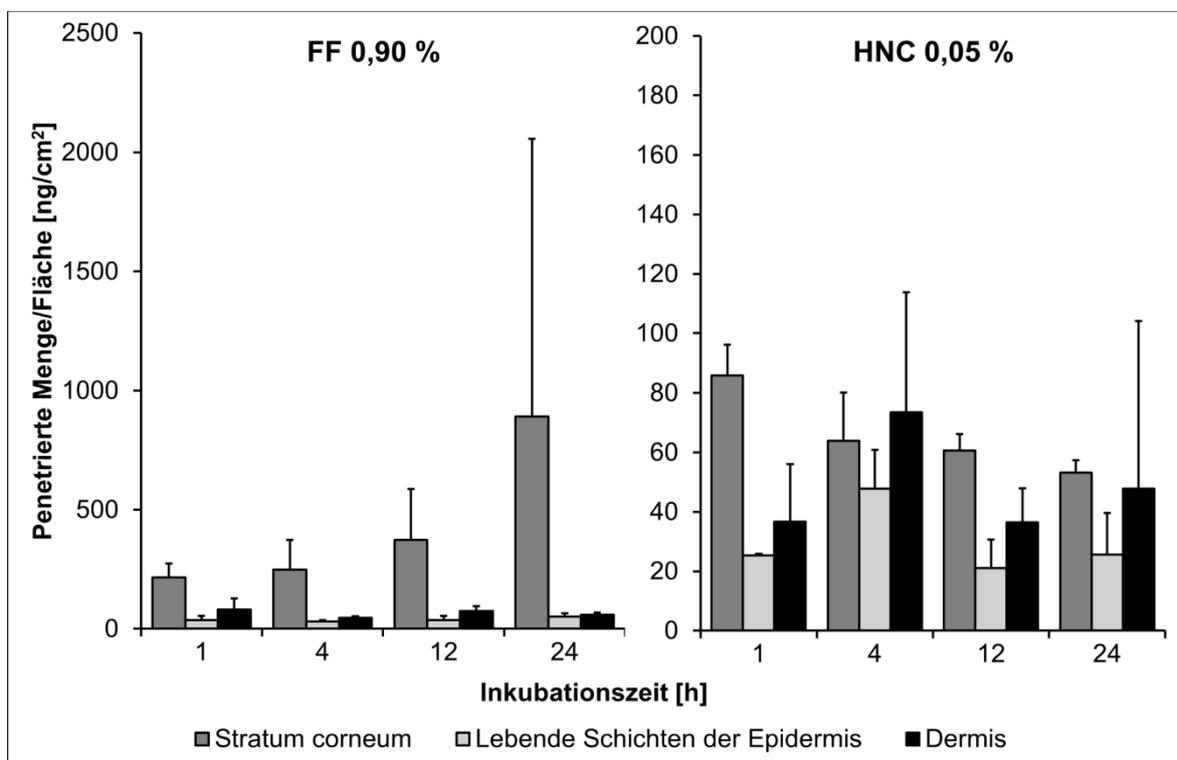


Abbildung 4.4-19: Penetrierte Menge an Nonivamid in den verschiedenen Hautschichten in Abhängigkeit zur Inkubationszeit aus einer filmbildenden Formulierung (FF 0,90 %) und HNC 0,05 %; finite Dosierung (normiert auf 2 mg/cm²); Segmentierung der Hautschichten mittels Kombination aus Klebebandabrisstechnik, Cyanoacrylat-Biopsie und Kryo-Mikrotom; Epidermis und Dermis-Proben wurden aus analytischen Gründen aufkonzentriert; n=3; Arithmetischer Mittelwert + SD.

Abbildung 4.4-20 stellt eine vergrößerte Aufnahme der Ergebnisse von Abbildung 4.4-19 dar, um die Penetration des Arzneistoffs in die lebenden Zellen der Epidermis und der Dermis aus der filmbildenden Formulierung mit der Penetration aus HNC 0,05 % vergleichen zu können. Obwohl für FF 0,90 % im Stratum corneum deutlich höhere Mengen Nonivamid detektiert werden können, sind die in den tieferen Hautschichten wiedergefundenen Mengen gerade für geringe Inkubationszeiten mit denen der HNC 0,05 % vergleichbar. Wie bei den vorangegangenen Experimenten erkennt man auch hier für die filmbildende Formulierung

gleichmäßige Spiegel in der restlichen Epidermis mit steigender Inkubationszeit, während nach einmaliger Applikation von HNC 0,05 % der Maximalwert nach vier Stunden erreicht wird und mit steigender Inkubationszeit die penetrierte Arzneistoffmenge auf niedrigere Werte sinkt.

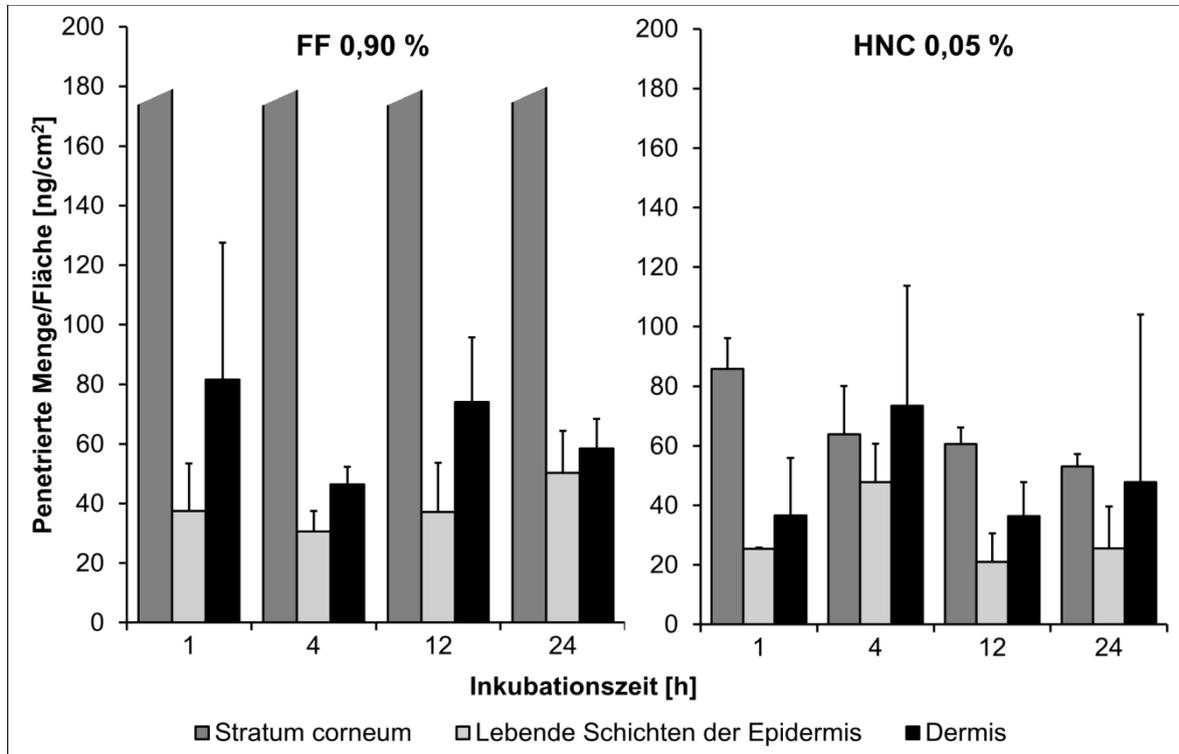


Abbildung 4.4-20: Vergrößerte Ansicht der penetrierten Menge an Nonivamid in den verschiedenen Hautschichten in Abhängigkeit zur Inkubationszeit aus einer filmbildenden Formulierung (FF 0,90 %) und HNC 0,05 %; finite Dosierung (normiert auf 2 mg/cm²); Segmentierung der Hautschichten mittels Kombination aus Klebebandabrisstechnik, Cyanoacrylat-Biopsie und Kryo-Mikrotom; Epidermis und Dermis-Proben wurden aus analytischen Gründen aufkonzentriert; n=3; Arithmetischer Mittelwert + SD.

Welche Auswirkungen eine Reduktion des Wirkstoffanteils in der filmbildenden Formulierung auf 0,09 % (FF 0,09 %) hat, ist in Abbildung 4.4-21 dargestellt. Die in das Stratum corneum penetrierte Menge an Nonivamid reduziert sich deutlich und ist nun mit der Menge der therapeutisch angewendeten HNC 0,05 % vergleichbar, während die Mengen in den tieferen Hautschichten nahezu unverändert bleiben. Dies bedeutet, dass ein höherer Wirkstoffanteil in der filmbildenden Formulierung zwar einen Einfluss auf die Wirkstoffkonzentration im Stratum corneum hat, die Penetration in die tieferliegenden Hautschichten jedoch nicht beeinflusst wird. Das Stratum corneum dient somit als Reservoir für den lipophilen Wirkstoff. Da es sich bei der Absorption eines Arzneistoffs durch die Haut um aufeinanderfolgende Schritte handelt und die Penetration in das Stratum corneum den langsamsten Schritt im Absorptionsprozess darstellt, bestimmt das Reservoir im Stratum corneum die weitere Penetration des Arzneistoffs. Jedoch nimmt die Menge im Stratum corneum bei Penetration aus der HNC mit fortschreitender Inkubationszeit ab: Das Reservoir wird sukzessive aufgebraucht. Im

Gegensatz zur HNC ermöglicht die filmbildende Formulierung über die kontrollierte und verlängerte Wirkstofffreigabe die Aufrechterhaltung des Reservoirs und sorgt damit für eine verlängerte Penetration des Arzneistoffs in die tieferliegenden Hautschichten. Für die Aufrechterhaltung des Wirkstoffreservoirs im Stratum corneum genügt die zehnfach niedriger konzentrierte FF 0,09 %.

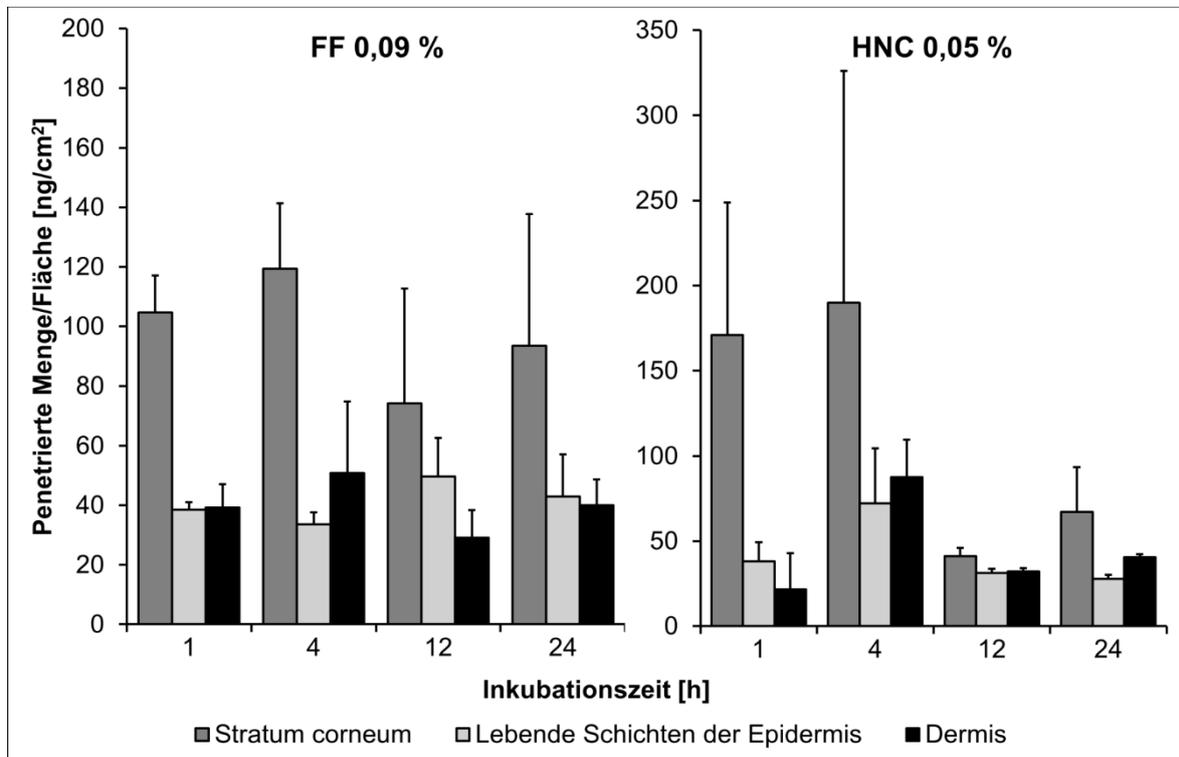


Abbildung 4.4-21: Penetrierte Menge an Nonivamid in den verschiedenen Hautschichten in Abhängigkeit zur Inkubationszeit aus einer filmbildenden Formulierung (FF 0,09 %) und HNC 0,05 %; finite Dosierung (normiert auf 2 mg/cm²); n=3; Arithmetischer Mittelwert + SD.

Ein dem vorherigen Experiment nahezu identisches Bild ergibt sich für den zeitlichen Verlauf der in den lebenden Schichten der Epidermis detektierten Arzneistoffmenge und unterstreicht die Zuverlässigkeit, mit der der Arzneistoff aus der filmbildenden Zubereitung über einen längerfristigen Zeitraum freigesetzt werden und zum Wirkort in die entsprechende Hautschicht penetrieren kann.

4.4.2.6 Zusammenfassung der ex vivo Penetrationsuntersuchungen

Mit ex vivo Penetrationsuntersuchungen lässt sich der zeitliche Verlauf der Arzneistoffpenetration in die Haut darstellen, was gerade für topisch wirksame Arzneistoffe, wie z.B. Nonivamid, ein guter Anhaltspunkt für die Abschätzung der Wirkdauer und des Dosierungsintervalls sein kann. Die Probenaufbereitung hat dabei einen direkten Einfluss auf das Ergebnis und die Aussagekraft von Penetrationsuntersuchungen bzw. Tiefenprofilen der Arzneistoffabsorption (Lunter, 2016). Um realistische Aussagen über die Penetration des Arzneistoffs treffen zu können, ist eine vollständige Entfernung der nach Ablauf der Inkubationszeit auf der Hautoberfläche verbliebenen Formulierungsreste unerlässlich. Bei der Verwendung hydrophiler Cremes kann bereits die Anwendung von mit isotoner Kochsalzlösung benetzten Schlinggazetupfern ausreichend sein, während für adhäsive und weitgehend wasserresistente Filme, wie sie bei den filmbildenden Formulierungen ausgebildet werden, ein höherer Aufwand nötig ist. Die zusätzliche Verwendung von Klebestreifen, stellt dabei eine gute Möglichkeit dar, um die verbliebenen wirkstoffhaltigen Filmreste zu entfernen.

Für die Bestimmung des Arzneistoffgehalts in den einzelnen Schichten der Haut ist eine Segmentierung und anschließende Extraktion des Arzneistoffs aus der Haut notwendig. Die oberste Hautschicht, das Stratum corneum, kann entweder durch ein Klebeband (Klebebandabriss-Technik), mit Cyanoacrylat-Klebstoff oder mit einem Kryo-Mikrotom schrittweise entfernt werden. Während bei den ersten beiden Methoden kaum Verluste beim Abtragen der abgeflachten, spröden Zellen des Stratum corneum erzeugt werden, ist die Segmentierung mit dem Kryo-Mikrotom wesentlich anfälliger: Einerseits können Verluste bei der Überführung der Hautstücke in die Reaktionsgefäße zu irrtümlich zu niedrig gemessenen Werten im Stratum corneum führen, andererseits können durch die unebene Hautoberfläche die Zellen des Stratum corneum nicht vollständig entfernt werden. Dies würde zu fälschlicherweise erhöhten Werten in der restlichen Epidermis und der Dermis führen. Abbildung 4.4-22 vergleicht die prozentual penetrierte Menge an Nonivamid in Relation zur applizierten Menge Nonivamid von Penetrationsuntersuchungen mit FF 0,90 %, bei denen die Proben mit unterschiedlichen Methoden aufgearbeitet worden sind.

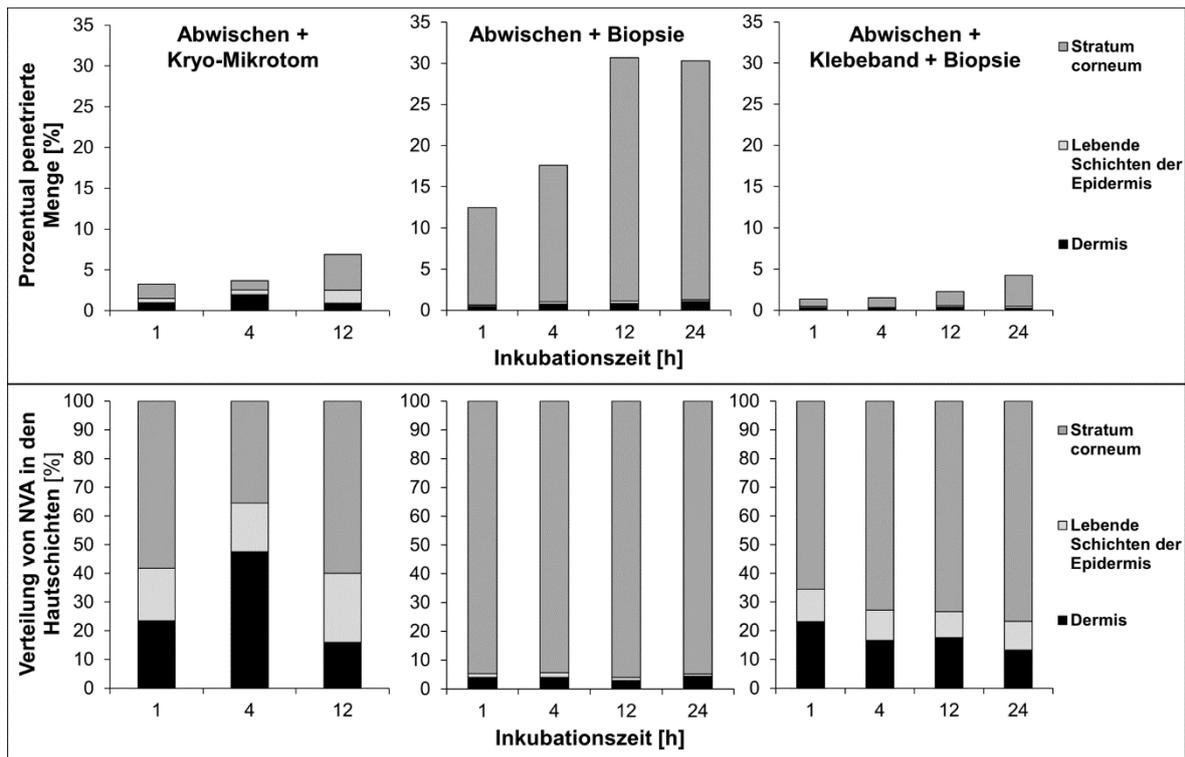


Abbildung 4.4-22: Einfluss der verschiedenen Methoden zur Auswertung der Penetrationsuntersuchungen (Abwischen und Kryo-Mikrotom, Abwischen und Biopsie oder Abwischen, Klebebandabrisstechnik und Cyanoacrylatbiopsie) auf die prozentual penetrierte Menge an NVA in Relation zur applizierten Menge und der Verteilung von Nonivamid in den Hautschichten bezogen auf die insgesamt penetrierte Menge aus einer filmbildenden Zubereitung (FF 0,9 %); n=3; Arithmetischer Mittelwert.

Wird der nach der Inkubation verbliebene Film nur mit angefeuchteten Schlinggazetupfern abgewischt und das Stratum corneum mittels des Kryo-Mikrotoms entfernt, gehen zum einen kleinere Bruchstücke des Stratum corneum bei der Überführung der Proben verloren, was zu verhältnismäßig niedrigen Werten im Stratum corneum führt. Zum anderen führt eine unvollständige Abtrennung der obersten Hautschicht zu verhältnismäßig hohen Werten in den tieferen Hautschichten. Wird statt der Segmentierung im Kryo-Mikrotom eine Hautbiopsie mit einem Cyanoacrylatklebstoff zur Abtrennung des Stratum corneum durchgeführt, können diese Prozesse deutlich verbessert werden. Es wird mehr Nonivamid im Stratum corneum gefunden und weniger in tieferen Hautschichten. Dass das bloße Abwischen der wirkstoffhaltigen Filmreste nach Abschluss der Inkubation nicht ausreichend ist, um den Film vollständig von der Haut zu entfernen, zeigt der Vergleich mit der Untersuchung, bei der die Filmreste zusätzlich mit zwei Klebestreifen abgetragen wurden. Der in die Haut insgesamt penetrierte Anteil fällt nun deutlich geringer aus, wobei vor allem der im Stratum corneum wiedergefundene Anteil stark abnimmt. Dies spricht für eine vollständige Entfernung des Films durch die Klebebänder. Dass die Anwendung der beiden Klebestreifen nicht zu einer Verfälschung der in der Haut wiedergefundenen Arzneistoffmenge führt, kann bestätigt

werden, indem der penetrierte Anteil an Nonivamid für die Hydrophile Nonivamid Creme 0,05 % betrachtet wird (Abbildung 4.4-23).

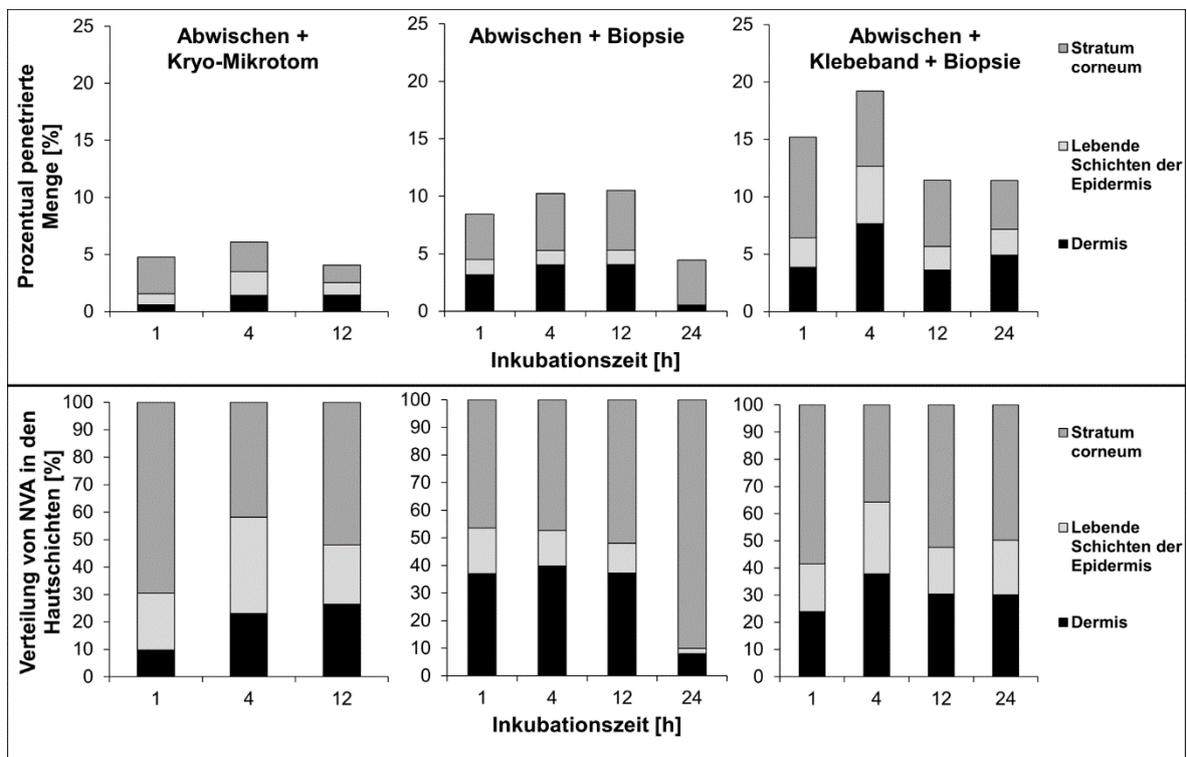


Abbildung 4.4-23: Einfluss der verschiedenen Methoden zur Auswertung der Penetrationsuntersuchungen (Abwischen und Kryo-Mikrotom, Abwischen und Biopsie oder Abwischen, Klebebandabrisstechnik und Cyanoacrylatbiopsie) auf die prozentual penetrierte Menge an NVA in Relation zur applizierten Menge und der Verteilung von Nonivamid in den Hautschichten bezogen auf die insgesamt penetrierte Menge aus einer filmbildenden Zubereitung (HNC 0,05 %); n=3; Arithmetischer Mittelwert.

Bei dieser Creme genügt bereits ein Abwischen mit in isotoner Kochsalzlösung getränkten Schlinggazetupfern, um die verbliebene Zubereitung zu entfernen (Abwischen + Biopsie). Werden nun zusätzlich zwei Klebestreifen nacheinander aufgebracht, bewirkt dies keine weitere Verringerung der prozentual in die Haut penetrierten Arzneistoffmenge (Abwischen + Klebebandabriss + Biopsie). Bei ausschließlicher Segmentierung mit dem Kryo-Mikrotom werden auch hier niedrigere Mengen im Stratum corneum detektiert, was auf die bereits beschriebenen Verluste hinweist. Für aussagekräftige Werte zur Penetration von Arzneistoffen aus dermalen Zubereitungen in das Stratum corneum ist also ein effizientes Abtragen der nach der Inkubation auf der Haut verbliebenen Formulierung unerlässlich. Es ist zu beachten, dass hier aufgrund des begrenzten Probenmaterials Ergebnisse verschiedener Individuen verglichen werden müssen.

Für die Segmentierung der tiefer liegenden Hautschichten, wie z.B. der lebenden Schichten der Epidermis und der Dermis, stellt das Kryo-Mikrotom eine geeignete Methode dar. Diese

Hautschichten sind weniger spröde und lassen sich wesentlich besser in die Probenaufarbeitungsgefäße überführen.

Unabhängig von den untersuchten wirkstoffhaltigen Formulierungen akkumuliert ein Großteil des penetrierten Nonivamids in den lipidreichen Strukturen des Stratum corneum. Die Bildung eines Reservoirs in den lipidreichen Strukturen des Stratum corneum ist für Arzneistoffe, die eine gewisse Lipophilie aufweisen, bereits in der Literatur beschrieben (Seif & Hansen, 2012). Die Applikation der filmbildenden Formulierung mit 0,9 % Nonivamid (FF 0,9 %) bewirkt zwar vergleichsweise ähnliche Permeationsraten wie eine Applikation der therapeutisch angewendeten HNC 0,05, zeigt jedoch gerade für das Stratum corneum ein gänzlich anderes Penetrationsverhalten. Die in das Stratum corneum penetrierte Arzneistoffmenge ist im Vergleich zur HNC 0,05 % ca. zehnfach erhöht. Jedoch ist der aus beiden Formulierungen in tiefere Hautschichten penetrierte Arzneistoffgehalt miteinander vergleichbar. Dies betrifft im Besonderen die lebenden Zellen der restlichen Epidermis, also genau den Bereich der Haut, in dem der für die Wirkung verantwortliche TRPV1 an den schmerzleitenden A δ - und C-Fasern zu finden ist. Daraus ist zu schließen, dass die Applikation der filmbildenden Formulierung in einer 0,9%igen Konzentration einen wirksamen Effekt hat. Im Hinblick auf die zeitabhängige Penetration von Nonivamid zeigt sich, dass die maximale Nonivamidkonzentration in den lebenden Schichten der Epidermis nach einer vierstündigen Inkubationszeit mit HNC 0,05 % erreicht wird. Bei längerer Inkubation nimmt der Arzneistoffgehalt dort deutlich ab. Dies erklärt das bis zu sechsmal tägliche Dosierungsintervall der Hydrophilen Capsaicinoid Cremes (NRF, 2010b). Im Gegensatz dazu resultiert eine Applikation von FF 0,9 % in einem konstanten Gehalt an Nonivamid in den lebenden Schichten der Epidermis während des Beobachtungszeitraums von 24 Stunden. Dies sollte eine reduzierte, einmal tägliche Applikation ermöglichen (Heck et al., 2017).

Eine extrem erhöhte Arzneistoffkonzentration im Stratum corneum kann zu einer unkontrollierten Abgabe an die Umgebung führen. Durch die Ausbildung eines solch hohen Arzneistoffreservoirs im Stratum corneum könnte auch eine Entfernung der Zubereitung als Folge eines eventuellen Auftretens unerwünschter Nebenwirkungen keine Sicherheit geben. Deshalb erscheint eine Reduktion des Arzneistoffgehalts sinnvoll. Eine Reduktion des Wirkstoffanteils um den Faktor 10 in der filmbildenden Formulierung (FF 0,09 %) führt zu deutlich niedrigeren penetrierten Mengen im Stratum corneum, während die Konzentration in den tieferen Hautschichten unverändert bleibt. Dies zeigt, dass neben einem verbesserten Sicherheitsprofil eine verlängerte Wirkstoffpenetration mit verlängerter Verfügbarkeit des Arzneistoffs am Wirkort auch mit einer niedriger konzentrierten filmbildenden Formulierung möglich ist (Heck et al., 2017).

4.4.3 In vivo Penetrationsuntersuchungen

Die Entfernung des Stratum corneum mittels der in 3.2.16.3 beschriebenen Klebebandabriss-Methode ist im Gegensatz zu den anderen Methoden auch in vivo durchführbar. Im Rahmen eines vom DAAD geförderten bilateralen Forschungsprojekts an der Universität Belgrad konnte eine orientierende in vivo Penetrationsstudie für zwei Zubereitungen an einem Probanden durchgeführt werden. Aufgrund der Erkenntnisse der ex vivo Penetrationsuntersuchungen wird die 0,09%ige filmbildende Formulierung (FF 0,09 %) mit der Referenzzubereitung HNC 0,05 % verglichen. Die Inkubationszeit wird auf eine Stunde festgelegt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.4-24 illustriert. Die ex vivo Penetrationsuntersuchungen ergaben für FF 0,09 % und HNC 0,05 vergleichbare Penetrationsprofile (4.4.2.1). Dies lässt sich auch in der in vivo Untersuchung bestätigen. Beachtenswert ist, dass die Eindringtiefe mit den ex vivo Untersuchungen (4.4.2.1) ebenfalls vergleichbar ist, was die Eignung des Schweinehautmodells für ex vivo Experimente unterstreicht.

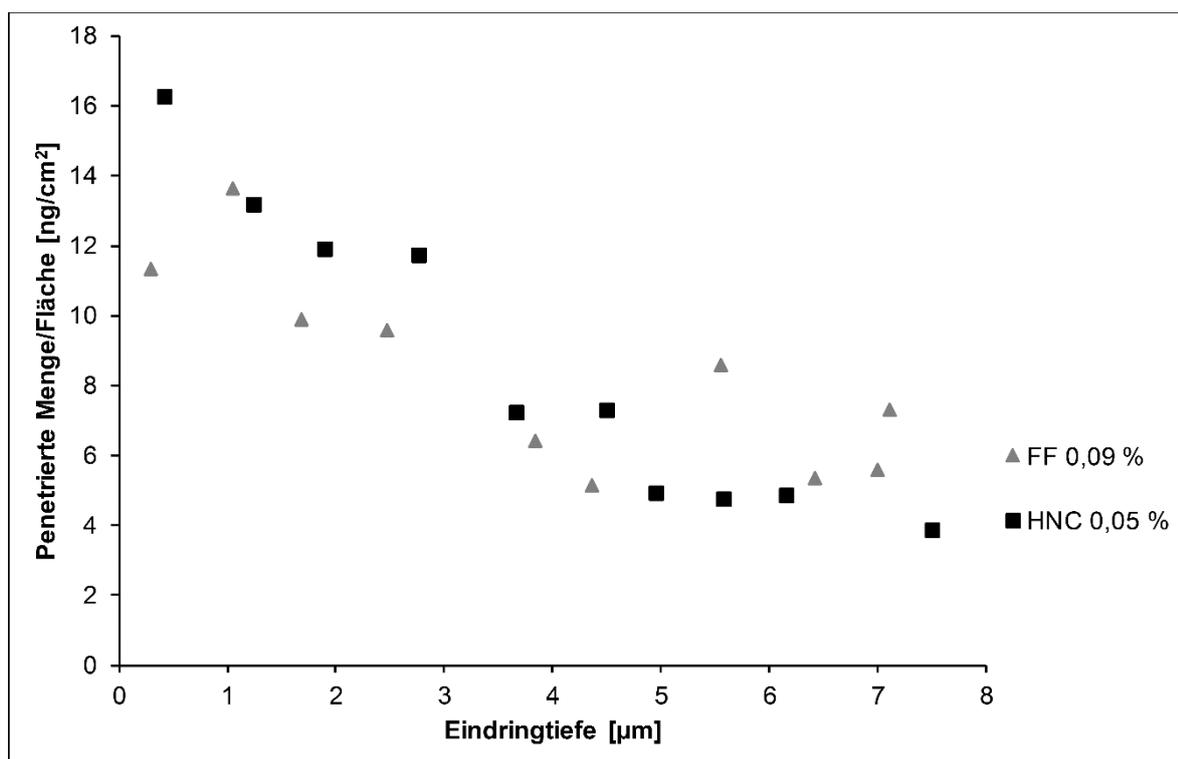


Abbildung 4.4-24: Menge an Arzneistoff pro Fläche, die aus verschiedenen Zubereitungen in die Haut penetriert und gegen die Eindringtiefe in die Haut aufgetragen ist; \blacktriangle FF 0,09 %, \blacksquare HNC 0,05 %; $n=1$.

Die insgesamt penetrierte Menge an Nonivamid pro Inkubationsfläche liegt für beide Formulierungen ebenfalls in vergleichbaren Bereichen (Tabelle 4.4-8).

Tabelle 4.4-8: Insgesamt in das SC penetrierte Menge/Fläche an Nonivamid aus verschiedenen Zubereitungen; n=1.

Formulierung	Insgesamt in die Haut penetrierte Menge/Fläche [ng/cm ²]
FF 0,09 %	82,78
HNC 0,05 %	86,08

Die Erkenntnisse der in vivo Studie geben erste Hinweise auf eine gute in vivo/ex vivo Korrelation der Penetrationsuntersuchungen. Allerdings ist zu beachten, dass zum einen die in vivo Studie aufgrund des zeitlich begrenzten Rahmens des Forschungsprojekts nur in einem Einzelexperiment durchgeführt werden konnte. Zum anderen geben die Ergebnisse aus den Penetrationsuntersuchungen Hinweise darauf, dass nicht ohne Weiteres von der Arzneistoffkonzentration im Stratum corneum auf die Konzentration in den lebenden Schichten der Epidermis, die den für die Wirkung relevanten Bereich der Haut darstellen, geschlossen werden kann. Um valide Aussagen zu treffen, müssten hier Untersuchungen mit verschiedenen und vor allem längeren Inkubationszeiten zwischen ein bis zwölf Stunden durchgeführt werden, damit der zeitliche Verlauf der Arzneistoffkonzentration in der obersten Hautschicht verfolgt werden kann. Würde sich bei diesen Untersuchungen eine Abnahme der penetrierten Menge nach einer Inkubationszeit von vier Stunden für die HNC 0,05 % bei gleichbleibenden Mengen für die FF 0,09 % zeigen, könnte dies ein Hinweis auf eine auch in vivo vorhandene verlängerte Verfügbarkeit des Wirkstoffs in den lebenden Schichten der Epidermis sein.

4.5 In vivo Hautverträglichkeitsstudien

Wenn neue, topisch applizierte Formulierungen angewendet werden sollen, ist die Untersuchung der dermalen Verträglichkeit wichtig. Es soll sichergestellt werden, dass weder der Arzneistoff noch die Formulierung selbst Irritationen oder aber zumindest keine stärkere Hautirritation hervorrufen, als dies bei den bereits therapeutisch angewendeten und zugelassenen Zubereitungen der Fall ist. Deshalb wird in dieser in vivo Studie das Irritationspotential der filmbildenden Formulierung FF 0,09 % mit der Referenzzubereitung HNC 0,05 % und einer wirkstofffreien Formulierung (FF Placebo) an 21 Probanden verglichen. Die Hautverträglichkeit wird anhand von drei Parametern analysiert: der absoluten Änderung der Hydratation des Stratum corneum (SCH), des Erythemindex (EI) und des transepidermalen Wasserverlusts (TEWL). Die Messung des Erythemindex ist dabei ein direkter Marker für die in vivo Irritation der Haut, während Änderungen in der Hydratation des Stratum corneum und der transepidermale Wasserverlust Hinweise auf eine geschädigte Barrierefunktion der Haut geben. Idealerweise sollte eine Formulierung, die für die Therapie chronischer Hauterkrankungen eingesetzt wird, keinerlei Irritationen induzieren. Diese Beurteilung erfolgt im Vergleich zu einem unbehandelten Hautareal, das als Kontrolle dient. Die Studie erfolgt im Rahmen eines durch den DAAD geförderten Forschungsprojekts an der Universität Belgrad. Aufgrund der zeitlich und organisatorisch aufwendigen Untersuchung beschränkt sich das Experiment auf eine Beobachtungszeit von einer Stunde. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 4.5-1 und Abbildung 4.5-2 dargestellt.

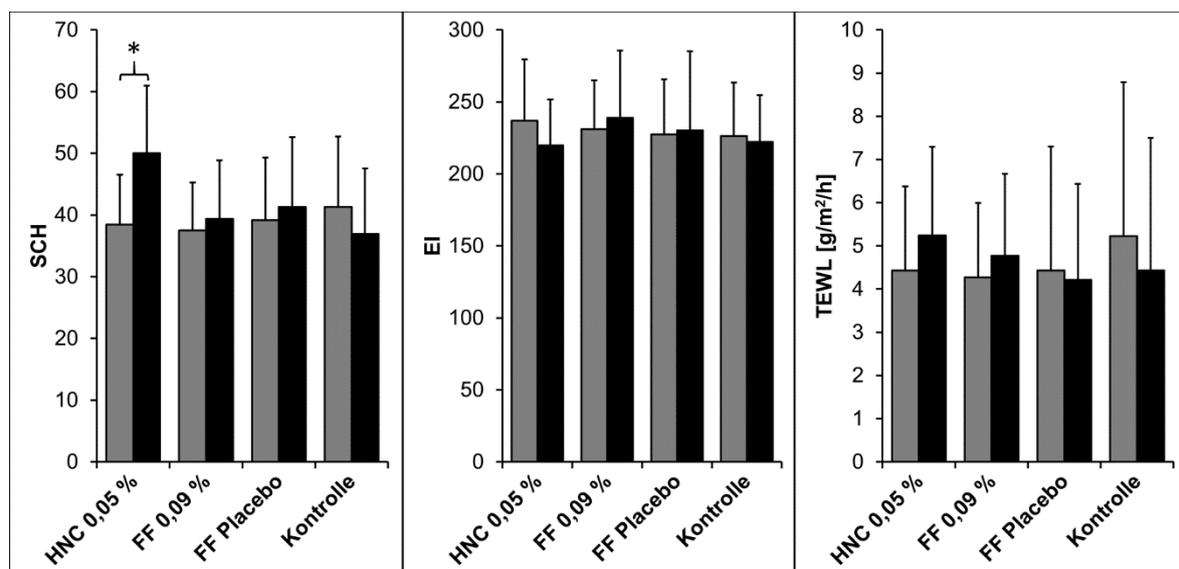


Abbildung 4.5-1: Absolutwerte vor/nach 1 h Inkubation von SCH, EI und TEWL nach einstündiger Inkubation der Haut mit HNC 0,05 %, FF 0,09 %, FF Placebo verglichen mit einer unbehandelten Kontrolle als Marker für die Hautirritation; n=21; Arithmetischer Mittelwert + SD, p=0,05, Student-Newman-Keuls-Test.

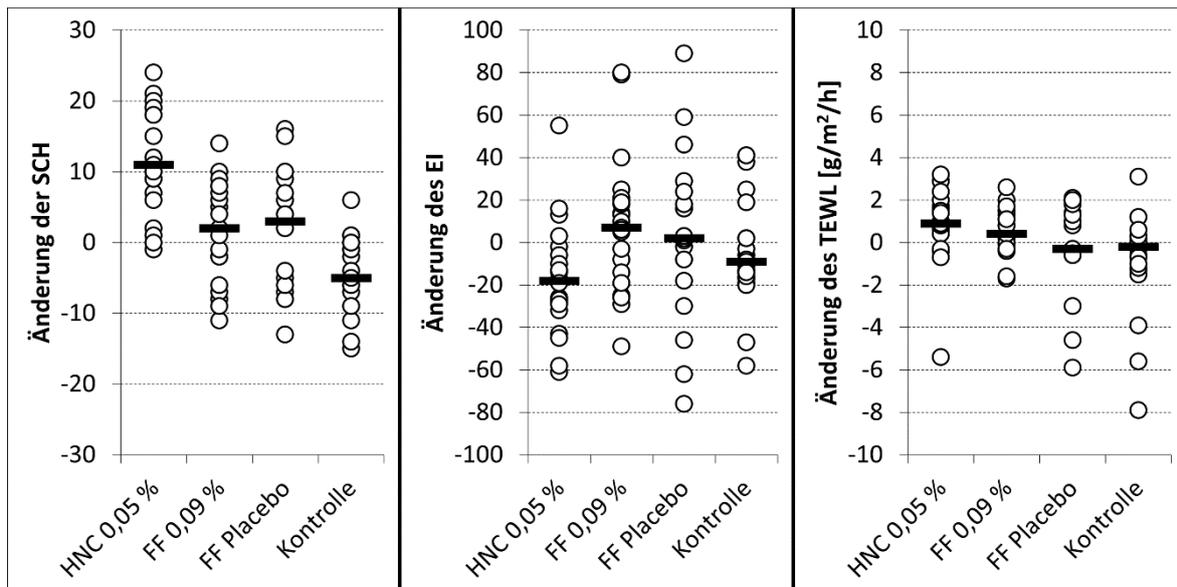


Abbildung 4.5-2: Absolute Änderung von SCH, EI und TEWL nach einstündiger Inkubation der Haut mit HNC 0,05 %, FF 0,09 %, FF Placebo verglichen mit einer unbehandelten Kontrolle als Marker für die Hautirritation; Einzelwerte (n=21) und korrespondierender arithmetischer Mittelwert (Heck et al., 2017).

Nach einer einstündigen Inkubation der Formulierungen auf der Haut ist die Änderung der Hydratation des Stratum corneum, die durch die wirkstoffhaltige und wirkstofffreie filmbildende Formulierung verursacht wurde, vergleichbar mit der unbehandelten Kontrolle. Im Gegensatz dazu führt die Applikation von HNC 0,05 % zu einem signifikanten Anstieg der Hydratation im Stratum corneum (ANOVA; $p=3,7 \cdot 10^{-4}$). Dieser Anstieg ist durch den in der HNC enthaltenen Zusatz an Propylenglykol zu erklären, welches in der Zubereitung als Feuchthaltemittel agiert, Wasser aus den tieferen Hautschichten mobilisiert und somit die Hydratation des Stratum corneum verstärkt (Loden, 2003). Bemerkenswerterweise ist für alle untersuchten Formulierungen keine signifikante Änderung des Erythemindex zu beobachten (ANOVA; $p>0,05$). Das ist unerwartet, da der Arzneistoff selbst aufgrund seiner hyperämisierenden Wirkung durchaus eine Rötung der Haut verursachen kann. Vergleichbare Werte werden ebenso für den transepidermalen Wasserverlust (ANOVA; $p>0,05$) erhalten. Daraus kann abgeleitet werden, dass die filmbildende Formulierung mit 0,09%iger Konzentration an Nonivamid nicht nur eine verlängerte Verfügbarkeit des Wirkstoffs in der Haut ermöglicht, sondern auch eine gute Verträglichkeit auf der Haut zeigt, da sie kein Erythem induziert und die Barrierefunktion der Haut aufrechterhält (Heck et al., 2017). Dies gilt ebenso für die wirkstofffreie filmbildende Formulierung, die somit prinzipiell auch für die Einarbeitung anderer dermal angewandeter Arzneistoffe geeignet ist, wenn für diese eine verlängerte Wirkstofffreisetzung erwünscht sein sollte. Auch für die bereits therapeutisch angewendete HNC 0,05 % bestätigt sich die gute Hautverträglichkeit.

4.6 Darstellung von [D₁₇]-Nonivamid

Deuterierte Substanzen sind aufgrund der charakteristischen C-D-Streckschwingung innerhalb der lipidreichen Strukturen der Haut mittels konfokaler Raman-Spektroskopie gut zu detektieren. Aus diesem Grund wird der Modellarzneistoff Nonivamid durch eine Deuterierung chemisch so verändert, dass seine Penetration in die Haut aus einer Zubereitung mit konfokaler Raman-Spektroskopie erfasst werden kann.

4.6.1 Darstellung von [D₁₇]-Nonansäure

Die Synthese von [D₁₇]-Nonansäure dient als Vorstufe für die Darstellung von [D₁₇]-Nonivamid und wird entsprechend 3.2.18.1 ausgehend vom Edukt Nonansäure durchgeführt. Mit der ersten Charge werden ausgehend von 1,0 g Nonansäure letztlich 0,94 g Rohprodukt erhalten. Die ¹H-NMR-Analytik ergibt einen Deuterierungsgrad von 80 %. Ein zweiter Ansatz mit 1,0 g Nonansäure liefert weitere 0,99 g Rohprodukt mit einem Deuterierungsgrad von 83 %. Beide Chargen werden vereinigt und unter den gleichen Bedingungen, wie in 3.2.18.1 beschrieben, erneut mit NaOD und Pt/C versetzt. Es werden insgesamt 1,75 g [D₁₇]-Nonansäure als farbloses Öl erhalten, was einer Ausbeute von 79 % entspricht. Der final erreichte Deuterierungsgrad beträgt 94 %.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, Integral der restlichen C-H Protonen): δ 11,95 (br s, 1H), 2,40 – 2,23 (m, 0,05H), 1,72 – 1,51 (m, 0,20H), 1,43 – 1,11 (m, 0,61H), 0,91 - 0,74 (m, 0,09H).

4.6.2 Darstellung von [D₁₇]-Nonivamid

Ausgehend von 1,75 g (1,0 eq) [D₁₇]-Nonansäure und 1,99 g (1,05 eq) Vanillylamin-Hydrochlorid wird über die Schotten-Baumann-Methode [D₁₇]-Nonivamid hergestellt. Die detaillierte Vorgehensweise ist in 3.2.18.2 beschrieben. Als Reaktionskontrolle wird eine HPLC-Analytik des Reaktionsgemischs ($t_{\text{ret}}([\text{D}_{17}\text{-Nonivamid}] = 8,100 \text{ min})$) vorgenommen und die Reaktion nach vollständiger Umsetzung beendet. Nachdem das Reaktionsgemisch ausgewaschen und das Lösemittel abgezogen wurde, wird das Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie aufgereinigt. Zunächst wird ein farbloses Öl erhalten, das mittels Gefriertrocknung in einen weißen Feststoff überführt werden kann. Es werden 2,18 g [D₁₇]-Nonivamid (DC-MS (ESI) m/z : 333,5 [M+Na]⁺ und 309,3 [M]⁻) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 70 % mit einem Deuterierungsgrad von 96 % basierend auf den restlichen Integralen der Protonen im ¹H-NMR-Spektrum relativ zum COOH-Proton.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO, Integral der restlichen C-H Protonen): δ 8.81 (bs, 1H), 8,16 (t, $J = 5,9 \text{ Hz}$, 1H), 6,79 (d, $J = 1,7 \text{ Hz}$, 1H), 6,69 (d, $J = 8,0 \text{ Hz}$, 1H), 6,62 (dd, $J = 8,0, 1,7 \text{ Hz}$, 1H), 4,14 (d, $J = 5,9 \text{ Hz}$, 2H), 3,73 (s, 3H), 2,06 (s, 0,04H), 1,51 - 1,42 (m, 0,13H), 1,26 - 1,12 (m, 0,46H), 0,83 - 0,75 (m, 0,07H).

4.7 Untersuchung der Arzneistoffabsorption von [D₁₇]-Nonivamid

Aufgrund der charakteristischen C-D-Streckschwingungen von [D₁₇]-Nonivamid sollte die Penetration des Arzneistoffs in die Haut mittels konfokaler Raman-Mikroskopie zu erfassen sein. Grundlage hierfür sind die Erkenntnisse von Heck (2012), bei der bereits die Penetration von [D₃]-Nonivamid ramanmikroskopisch ausgewertet wurde. In dieser Arbeit sind die Wasserstoffatome der Methoxygruppe gegen Deuterium ausgetauscht worden. Während die C-D-Bande in den Einzelspektren der Reinsubstanz oder aber auch in den Formulierungen deutlich sichtbar war, gelang eine Detektion des Wirkstoffs in der Haut nicht, wenn die halb feste Zubereitung appliziert wurde. Durch die Deuterierung der Seitenkette des Moleküls soll nun insgesamt ein stärkeres Signal erhalten werden, was die Detektion des Moleküls in der Haut nach der Penetration aus einer entsprechenden Formulierung ermöglichen soll.

4.7.1 Vergleich der Einzelspektren von [D₁₇]-Nonivamid, [D₃]-Nonivamid, Nonivamid und des Spektrums der Hautoberfläche von Schweinehaut

Zunächst werden Einzelspektren des wie in 3.2.18 beschrieben hergestellten [D₁₇]-Nonivamids mit Hilfe des Raman-Mikroskops aufgenommen und mit dem des nicht deuterierten Nonivamids (Sigma-Aldrich Corporation, US-St. Louis) verglichen (Abbildung 4.7-1).

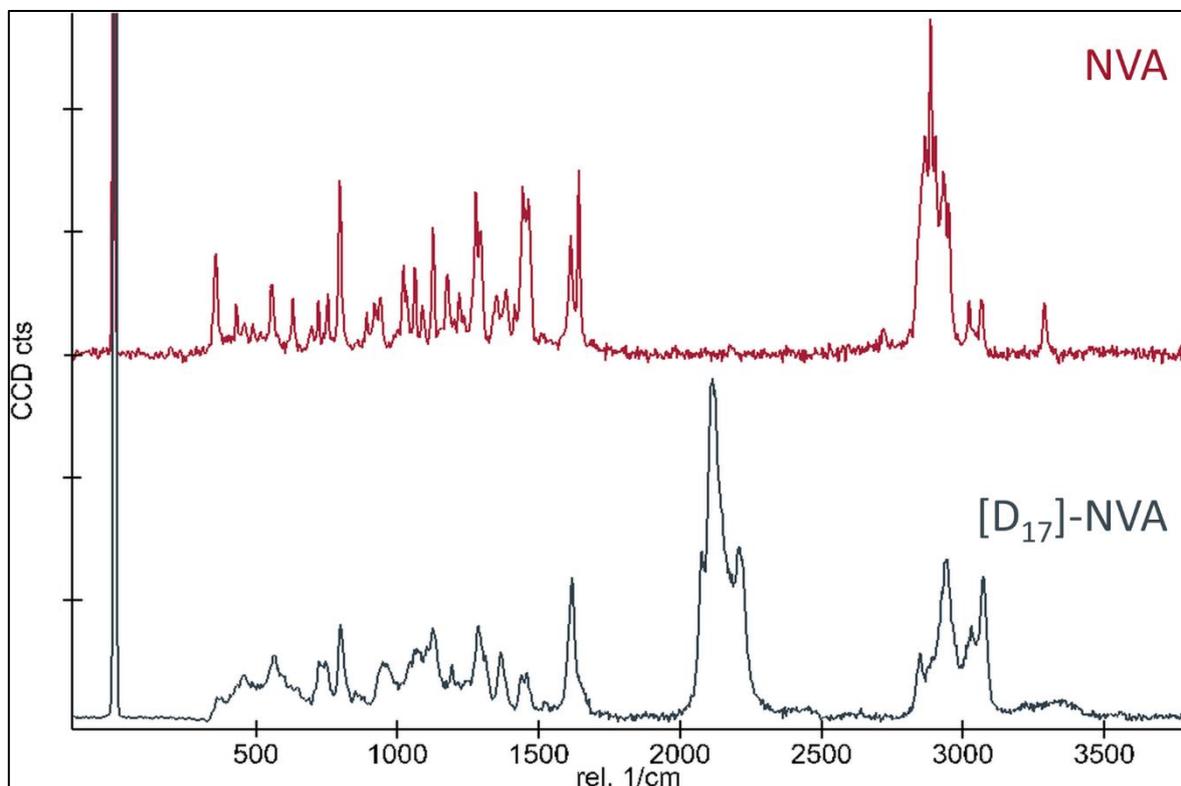


Abbildung 4.7-1: Vergleich der Einzelspektren von [D₁₇]-Nonivamid und Nonivamid.

Aufgrund der langen Alkyl-Seitenkette ist die C-H-Streckschwingung ($2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$) beim undeuterten Wirkstoff stark ausgeprägt, während das Signal bei $[D_{17}]$ -Nonivamid durch die Deuterierung deutlich abgeschwächt ist. Stattdessen sind im Bereich zwischen $2000\text{-}2100\text{ cm}^{-1}$ für $[D_{17}]$ -Nonivamid charakteristische Banden zu erkennen. Diese Banden sind typischerweise den C-D-Streckschwingungen zuzuordnen und erklären, warum beim nicht deuterierten Molekül solche Banden nicht zu finden sind.

In einer vorangegangenen Arbeit war bereits $[D_3]$ -Nonivamid synthetisiert und die Penetration des Modellarzneistoffs in die Haut untersucht worden (Heck, 2012). Diese Arbeit war gleichzeitig die Grundlage für die Untersuchungen mit dem nun hergestellten $[D_{17}]$ -Nonivamid. Abbildung 4.7-2 stellt den Vergleich der Einzelspektren der beiden deuterierten Moleküle dar.

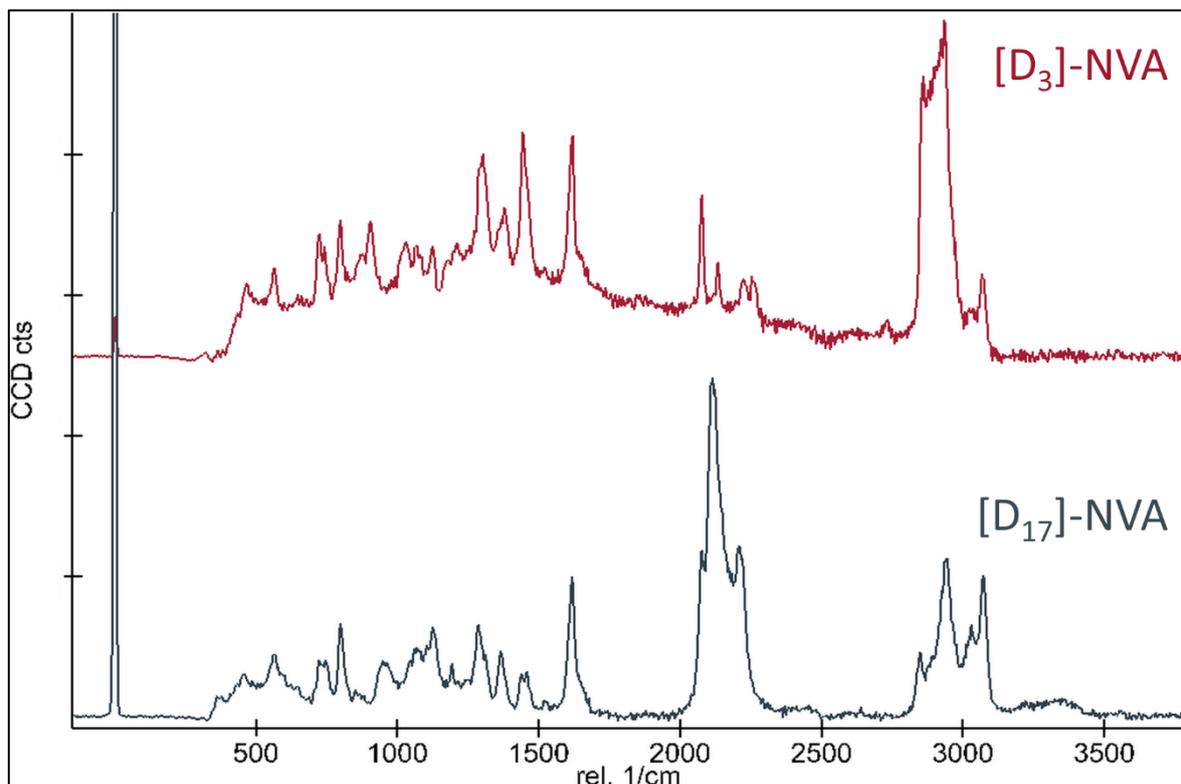


Abbildung 4.7-2: Vergleich der Einzelspektren von $[D_{17}]$ -Nonivamid und $[D_3]$ -Nonivamid.

Durch die Deuterierung der Seitenkette erscheint die Bande der C-D-Streckschwingung in einer deutlich höheren Intensität, während die Bande der C-H-Streckschwingungen, wie erwartet, geringer sichtbar ist. Dies könnte eine Detektion des Modellarzneistoffs mittels dieser markanten Bande auch innerhalb der Haut erleichtern.

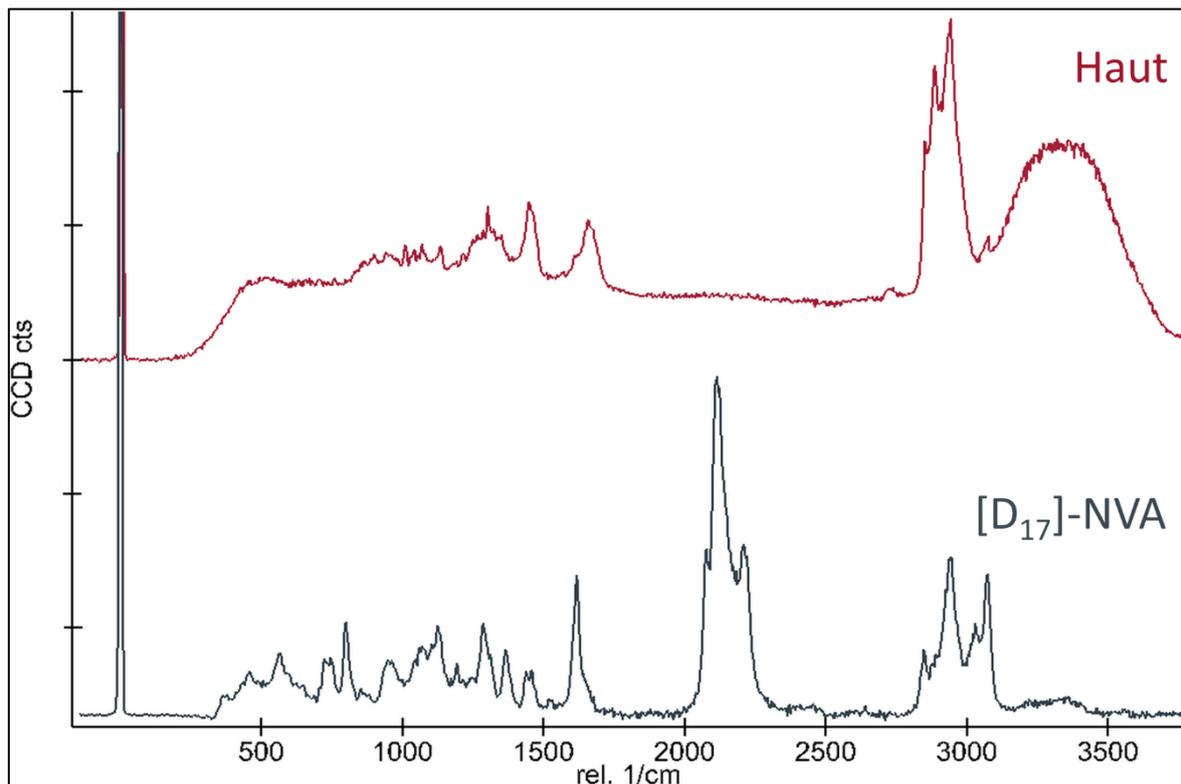


Abbildung 4.7-3: Vergleich des Einzelspektrums von [D₁₇]-Nonivamid mit der Oberfläche porciner Haut. Abbildung 4.7-3 vergleicht das Einzelspektrum von [D₁₇]-Nonivamid mit dem Spektrum der Oberfläche von Schweinehaut. Auffällig ist, dass die Haut ebenfalls einen ausgeprägten Peak im Bereich zwischen 2800- 3000 cm^{-1} aufweist, der auf die im Stratum corneum befindlichen Lipide und Proteine, die einen hohen C-H-Anteil aufweisen, zurückzuführen ist. Aus diesen Gründen ist eine Detektion des nicht-deutერიerten Nonivamids innerhalb der Strukturen der Haut mittels konfokaler Raman-Mikroskopie nicht möglich. [D₁₇]-Nonivamid besitzt jedoch genau in dem Bereich charakteristische Banden, in der das Spektrum der Haut keine eigenen Banden aufweist, und eignet sich daher sehr gut für die Detektion von Nonivamid in der Haut.

4.7.2 Ramanmikroskopische Tiefenscans zur Untersuchung der Arzneistoffabsorption von [D₁₇]-Nonivamid

Es werden Penetrationsuntersuchungen mit 10,6%iger ethanolischer Lösung von [D₁₇]-Nonivamid und der daraus hergestellten Hydrophilen [D₁₇]-Nonivamid Creme 0,95 % in infiniten Dosierung unter okklusiven Bedingungen durchgeführt. Die Inkubationszeit wird auf zwölf Stunden festgelegt. Die weitere Probenaufbereitung ist in 3.2.19 detailliert beschrieben. Nachdem die restliche Formulierung vollständig von der Hautoberfläche entfernt wurde, wird ein Tiefenscan beginnend von der Hautoberseite in Richtung tiefer liegender Hautschichten (3.2.20.3) durchgeführt.

Vergleicht man die Spektren der Haut im Tiefenscan nach der Applikation der ethanolischen [D₁₇]-Nonivamidlösung mit dem Einzelspektrum von [D₁₇]-Nonivamid (Abbildung 4.7-4), so werden die charakteristischen C-D-Streckschwingungen im Spektrum der Haut ersichtlich. In der vergrößerten Aufnahme sind die charakteristischen Bereiche der CH- und CD-Schwingungen farblich hervorgehoben. Die Hautoberfläche ist erreicht, wenn die Hautlipidbande die halbmaximale Höhe erreicht hat. Davon ausgehend werden weitere 19 Aufnahmen (eine Aufnahme/μm) in Richtung der tiefer liegenden Hautschichten erstellt. Die Erstellung eines Tiefenprofils ist in 3.2.20.3.2 im Detail beschrieben.

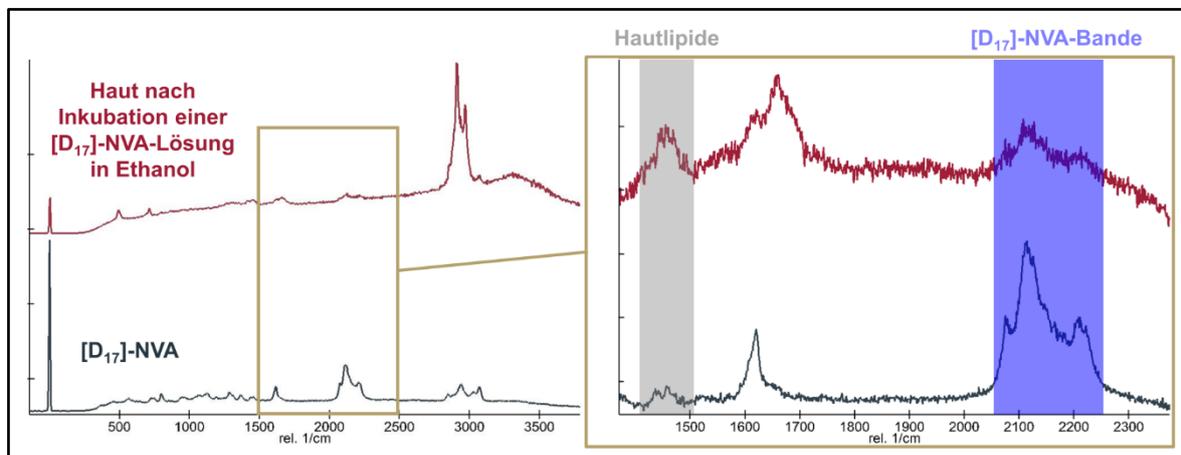


Abbildung 4.7-4: Vergleich des Spektrums der Haut nach zwölfstündiger Inkubation mit einer [D₁₇]-NVA-Lösung in Ethanol mit dem Einzelspektrum von [D₁₇]-Nonivamid. In der vergrößerten Aufnahme sind die Summenfilter für die jeweiligen Banden farblich hervorgehoben.

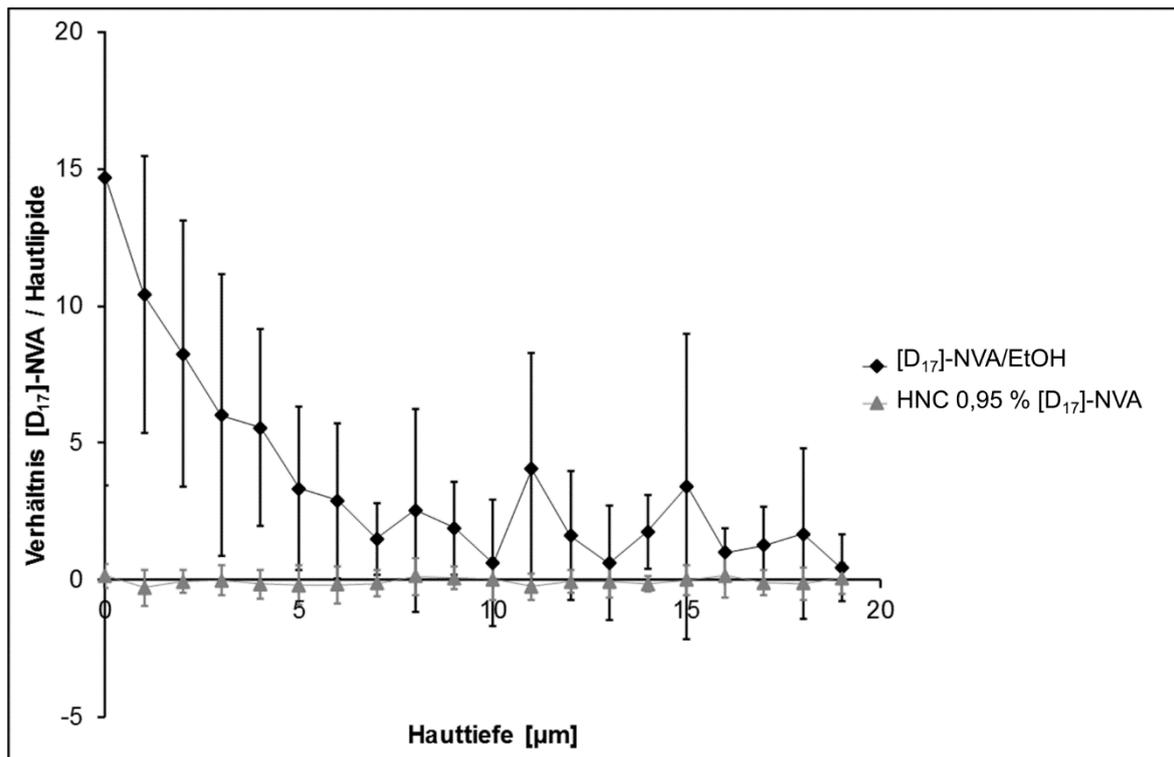


Abbildung 4.7-5: Tiefenprofil der Penetration von [D₁₇]-NVA aus einer ethanolischen Lösung ([D₁₇]-NVA/EtOH) und einer Hydrophilen Creme (HNC 0,95 % [D₁₇]-NVA).

Abbildung 4.7-5 zeigt das Penetrationsprofil von [D₁₇]-Nonivamid ([D₁₇]-NVA/EtOH) aus der ethanolischen Lösung und aus HNC 0,95 % [D₁₇]-NVA. Penetriert der Modellarzneistoff aus der ethanolischen Lösung in die Haut, kann [D₁₇]-Nonivamid bis zu ca. 6 µm innerhalb der Haut detektiert werden. Wie erwartet findet sich vor allem in den obersten Schichten der Haut die größte Menge an [D₁₇]-Nonivamid. Dies spricht für eine Ansammlung des Wirkstoffs im Stratum corneum, wie es auch schon in den per HPLC ausgewerteten Penetrationsuntersuchungen (4.4.2) für das nicht deuterierte Molekül beschrieben wurde.

Nach Penetration des Modellarzneistoffs aus einer halbfesten Zubereitung, wie z.B. der HNC 0,95 % [D₁₇]-NVA, kann [D₁₇]-Nonivamid mittels konfokaler Raman-Mikroskopie nicht detektiert werden. Da sowohl die ex vivo als auch die in vivo Penetrationsstudien mit der nicht deuterierten Substanz eindeutig eine Penetration des Arzneistoffs in die Haut aus teilweise sogar deutlich niedriger konzentrierten Zubereitungen belegen, ist die ausbleibende Detektion mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Unterschreitung der Nachweisgrenze zurückzuführen. Eine Detektion des Wirkstoffs in der Haut bei Penetration aus der 10%igen ethanolischen Lösung war zum einen aufgrund der höheren Wirkstoffkonzentration zu erwarten. Zum anderen wurden durch die Abdichtung des Donorkompartiments mit Parafilm™ okklusive Bedingungen gewählt, sodass die Verdunstung des organischen Lösungsmittels unterbunden

wurde. Dies erleichtert die Extraktion von Lipiden aus dem Stratum corneum und kann dadurch die Penetration der Wirkstoffe von Arzneistoffen beschleunigen (Williams & Barry, 2004).

Obwohl der Anteil an Deuterium-Atomen in Bezug auf die ursprüngliche Anzahl an Wasserstoff-Atomen im Modellarzneistoff von knapp über 10 % für [D₃]-Nonivamid auf über 60 % für [D₁₇]-Nonivamid erhöht wurde, ist eine Detektion des Arzneistoffs in der Haut nach der Inkubation mit einer halbfesten Zubereitung nicht möglich. Da die Hydrophile [D₁₇]-Nonivamid Creme 0,95 % molar der HNC 0,9 % entspricht, welche die mit Abstand höchste Permeationsrate aller untersuchten Zubereitungen gezeigt hat, ist eine Detektion des Modellarzneistoffs aus den entwickelten filmbildenden Formulierungen ebenso nicht möglich. Während die Erstellung von Tiefenscans mit Hilfe des konfokalen Raman-Mikroskops also eine geeignete Methode darstellt, um die Penetration von Arzneistoffen, die charakteristische Banden im Bereich der Fingerprint-Region zeigen, wie z.B. für Procain-HCl (Lunter, 2016), scheint Nonivamid in nicht deuterierter und deuterierter Form für die Detektion von Arzneistoffen aus halbfesten Zubereitungen in der Haut wenig geeignet zu sein. Erst die Applikation einer ausreichend hohen Konzentration des deuterierten Nonivamids ermöglicht die Bestimmung im Ramanmikroskop. Dass ein Nachweis deuterierter Substanzen in der Haut prinzipiell möglich ist, konnten Matthäus et al. (2010) bereits durch den Nachweis von deuterierten [D₇₀]-Liposomen und [D₃₁]-Ceramid in der Haut zeigen. Die verwendeten Liposomen und Ceramide enthielten dabei wesentlich mehr Deuterium-Atome als dies für das Molekül Nonivamid aufgrund seiner chemischen Struktur überhaupt realisierbar ist.

5 Abschlussdiskussion

Die vorliegende Dissertation präsentiert die Entwicklung filmbildender Dermatika, die eine verlängerte Wirkstoffpermeation ermöglichen. Häufige Applikationsfrequenzen, wie sie für die bislang ausschließlich als Rezepturarzneimittel verfügbaren Capsaicinoid-Cremes zur Therapie des chronischen Pruritus notwendig sind, verringern oftmals die Therapietreue der Patienten. Diese ist gerade für die Therapie mit Capsaicinoiden besonders kritisch, da nicht nur ein Wirkverlust entstehen kann. Bedingt durch eine Resensitivierung der Rezeptoren kann zudem aufgrund der agonistischen Wirkung der Capsaicinoide ein Wiederaufflammen und eine Verstärkung der Symptomatik nach diskontinuierlicher oder sporadischer Applikation erfolgen (Ständer et al., 2001). Das verdeutlicht, warum vor allem für diese Arzneistoffe ein Bedarf an einfach zu handhabenden Formulierungssystemen mit geringeren Applikationsfrequenzen besteht. Filmbildende Systeme mit verlängerter Wirkstoffpermeation können hier einen Beitrag zum Therapieerfolg leisten.

Die filmbildende Formulierung ist aus drei Hauptkomponenten zusammengesetzt: Der erste Bestandteil ist eine ölige Arzneistofflösung. Diese wird an mesoporöses Silica gebunden, was in einem freifließenden, öbeladenen Pulver resultiert. Durch den Zusatz einer dritten Komponente – einer weichgemachten, wässrigen Retardpolymerdispersion – entsteht die filmbildende Formulierung. Durch die besondere Formulierungstechnik kann auf den Zusatz der wegen ihres irritativen Potentials häufig als kritisch betrachteten, klassischen Emulgatoren verzichtet werden. Dies soll eine gute Verträglichkeit nach topischer Applikation gewährleisten.

Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung solcher filmbildenden Formulierungen. Die Struktur und Porosität der Silica-Partikel ist ein entscheidender Faktor für die Absorption des Öls und zudem auch für die Freisetzung des Wirkstoffs, da dieser zunächst aus dem Silica freigesetzt werden muss, bevor er durch die Polymermatrix diffundieren und in die Haut penetrieren kann. Da das Silica nicht nur das wirkstoffhaltige Öl absorbieren kann, sondern auch andere Substanzen wie Polymere oder Stabilisatoren an das Silica gebunden werden und so zu einer Destabilisierung des Systems führen können, ist die Wahl geeigneter mesoporöser Silica und Polymere eine besondere Herausforderung. Außerdem eignen sich nur solche Polymere, die auf der Haut eine Filmbildung erlauben und dem auf der Haut ausgebildeten Film die mechanischen Eigenschaften bringen, die eine Wirkstoffabgabe an die Haut über einen längerfristigen Zeitraum ermöglichen.

Der zweite Teil der Arbeit behandelt die Charakterisierung der Arzneistofffreisetzung, -permeation und -penetration. Bei diesen Untersuchungen nimmt der

Versuchsaufbau entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis (Barbero & Frasch, 2009; van de Sandt et al., 2004; Zatz, 1995). Bereits zu Beginn muss beachtet werden, inwiefern die gewählte Methode das Ergebnis verfälschen könnte. Bei Untersuchungen zur Wirkstofffreisetzung und zur Wirkstoffabsorption kann bereits eine Änderung der Temperatur des Akzeptormediums oder gar das Akzeptormedium selbst zu deutlichen Änderungen führen, indem der Diffusionskoeffizient und/oder der Verteilungskoeffizient der Substanz beeinflusst wird. Besteht durch Lufteinschlüsse im Akzeptorkompartiment kein vollständiger Kontakt zwischen der Membran und dem Akzeptormedium, führt dies zu fälschlicherweise zu niedrigen permeierten Mengen und kann ganze Messreihen verfälschen. In dieser Arbeit wurde ein besonderer Fokus auf die Optimierung der Methoden zur Untersuchung der Arzneistoffpenetration gelegt (4.4.2.6). Da bereits geringfügige Abweichungen oder Änderungen im Ablauf der Methode zu großen Unterschieden führen können und die Aussagekraft der Ergebnisse beeinflussen können, kommt einer durchdachten Methodenentwicklung eine große Bedeutung zu.

Im Folgenden sollen sowohl die Funktion der in den filmbildenden Formulierungen verwendeten Substanzen als auch die Substantivität der sich ausbildenden Filme unter alltäglichen Bedingungen sowie die Chancen und Grenzen der Modelle zur Wirkstoffabsorption diskutiert werden.

5.1 Mesoporöses Silica oder Retardpolymer: Was bewirkt die kontrollierte Wirkstoffabgabe aus der filmbildenden Formulierung?

Bei der Herstellung der filmbildenden Formulierungen wird die Arzneistofflösung zunächst an mesoporöses Silica gebunden, bildet also ein ölbeladenes Pulver. Dieses wird anschließend in die weichgemachte Polymerdispersion eingebracht und homogen verteilt. Es entsteht die applizierbare filmbildende Formulierung. Bei der Applikation verdunstet das in der Formulierung enthaltene Wasser und gleichzeitig formt sich ein geschlossener Film, in den die ölbeladenen Pulverpartikel integriert sind. Damit der Arzneistoff an die Haut abgegeben werden kann, muss er also zunächst vom Silica freigesetzt werden und anschließend durch die Polymermatrix diffundieren. Während der Arzneistoff bei der Freigabe aus den Poren des Silicas mit zunehmender Dauer eine verlängerte Wegstrecke zurücklegen muss, bleibt die Diffusion durch die Polymermatrix des Eudragit® RS während der Anwendung konstant. Durch dieses System wird kontinuierlich Wirkstoff freigesetzt, wodurch eine Wirkstoffpermeation über einen längeren Zeitraum hinweg möglich ist (4.4.1.1.4).

Es erklärt sich allerdings aus den Experimenten nicht, welcher der beiden sequenziell ablaufenden Schritte (Freisetzung aus dem Silica, Diffusion durch das Polymer) nun den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Wirkstoffabgabe darstellt. Um dies zu überprüfen, wird ein Experiment zur Wirkstofffreisetzung durchgeführt, bei dem die Freisetzung aus dem reinen ölbeladenen Pulver mit der aus dem Film einer filmbildenden Formulierung verglichen wird. Die Durchführung orientiert sich im Allgemeinen an 3.2.9.3. Zur besseren Vergleichbarkeit wird die Menge an ölbeladenem Pulver so gewählt, dass sie der Menge des im Filmstück inkorporierten ölbeladenen Pulvers entspricht. Zudem wird das ölbeladene Pulver in eine aus klassischem Cellulose-Filterpapier bestehende Tasche gefüllt, damit es – ähnlich wie in der Polymermatrix des Films – während des Versuchs fixiert ist. Für ölbeladenes mesoporöses Silica ist bekannt, dass es bei Kontakt mit Wasser schnell zu einer Desorption des Öls kommt (Choudhari et al., 2014), wobei die Geschwindigkeit vom Porendurchmesser, der Länge der Porenkanäle (Horcajada et al., 2004; Kutza et al., 2013) und den funktionellen Gruppen (Xu et al., 2009) an der Oberfläche des Silicas abhängig ist. Je kleiner der Porendurchmesser, je länger der Porenkanal und je stärker die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Öl und Silica sind, desto langsamer sollte das Öl aus dem Silica freigesetzt werden. Vitamin E-haltiges Syloid® XDP zeigte beispielsweise nach 45 min in einer 1%igen wässrigen Natriumlaurylsulfatlösung eine vollständige Wirkstofffreisetzung (Choudhari et al., 2014). Theoretisch sollte also eine schnellere

Wirkstofffreisetzung aus dem ölbeladenen Pulver im Vergleich zum Film der filmbildenden Formulierung zu erwarten sein.

Tabelle 5.1-1: Freigesetzter Anteil an Nonivamid aus ölbeladenem Pulver bzw. dem Film einer filmbildenden Formulierung nach 80-minütiger Inkubation in Wasser; n=3; Arithmetischer Mittelwert \pm SD.

	Freigesetzter Anteil an Nonivamid, t = 80 min [%]
Ölbeladenes Pulver	5,10 \pm 1,113
Film	4,52 \pm 0,156

Wie in Tabelle 5.1-1 aufgezeigt, konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. So zeigt sich für das ölbeladene Pulver eine geringfügig höhere Wirkstofffreisetzung, die jedoch statistisch nicht signifikant ist (t-Test, $p=0,46$). Dies legt die Vermutung nahe, dass nicht das Retardpolymer, sondern die Freisetzung aus dem Silica den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Wirkstoffabgabe an die Haut darstellt. Eine mögliche Begründung kann sein, dass das Rizinusöl aufgrund seiner hohen Viskosität nur langsam durch das eindringende Wasser verdrängt werden kann. Denkbar ist aber auch, dass das Rizinusöl zwar durch das über die Poren eindringende Wasser verdrängt und aus dem Silica freigesetzt werden kann, Nonivamid jedoch länger an das Silica adsorbiert. Da Nonivamid strukturell nicht wesentlich polarer als das Triglyceridgemisch aus hauptsächlich Ricinol-, Palmitin- und Stearinsäure ist, erscheint diese Begründung allerdings eher wenig plausibel. Auffällig ist zudem, dass die Standardabweichung für die Wirkstofffreisetzung aus dem ölbeladenen Pulver deutlich höher liegt als bei der Freisetzung aus dem Film. Dies kann unter Umständen darauf zurückzuführen sein, dass das ölbeladene Pulver in den Taschen mehr oder weniger stark ausgeprägte Agglomerate bilden kann, durch die die Wirkstofffreisetzung behindert werden könnte. Eine solche Agglomeratbildung wird bei der filmbildenden Formulierung durch die homogene Verteilung vermieden. Da diese Agglomeratbildung bei allen Proben des ölbeladenen Pulvers prinzipiell möglich ist, könnte der freigesetzte Anteil bei einer ausbleibenden Agglomeratbildung höher liegen. Eine weitere Überlegung ist, dass die Benetzung des ölbeladenen Pulvers durch das Filterpapier ebenfalls eingeschränkt ist. Auch dies könnte dazu beitragen, dass unter theoretisch, idealen Versuchsbedingungen, bei denen das Pulver weder Agglomerate bildet noch durch Filtertaschen in der Benetzung eingeschränkt ist, die Freisetzung aus dem ölbeladenen Pulver noch deutlich höher liegen würde. Dies würde bedeuten, dass auch das filmbildende Polymer einen Beitrag zur kontrollierten Wirkstoffabgabe leistet.

Obwohl die Öle, wie von Choudhari (2014) beschrieben, schnell vom Silica desorbieren sollen, ist zudem auffällig, dass dieser Effekt in den filmbildenden Formulierungen selbst nach einer

Lagerung von sechs Monaten nicht zu beobachten ist (4.2.3). Vermutlich scheint hier zum einen die hohe Viskosität des Rizinusöls als auch zum anderen das verwendete Retardpolymer Eudragit® RS eine Stabilisierung des Systems zu bewirken. Dies ist vermutlich durch die elektrostatische Adsorption der Latexpartikel an das Silica bedingt, die im Detail bereits unter 4.1.3 beschrieben wurde.

Es scheint daher sehr wahrscheinlich, dass die Wirkstofffreisetzung der beiden sequenziell nacheinander ablaufenden Prozesse der Freisetzung aus den Silicaporen und der Diffusion durch die Polymermatrix durch das verwendete Polymer gesteuert wird.

5.2 Beurteilung der Substantivität filmbildender Formulierungen

Formulierungen mit verlängerter Wirkstoffabgabe an die Haut müssen über eine ausreichende Substantivität verfügen, damit der Wirkstoff über einen längeren Zeitraum hinweg in die Haut penetrieren kann. Wird die Formulierung stattdessen durch Kontakt mit Wasser, Kleidung, Reibung und Hautkontakt leicht abgetragen, nützt auch ein innovatives Formulierungsprinzip zur retardierten Wirkstofffreigabe nichts. In der Literatur ist bislang nichts zur Substantivität von Polymethacrylaten als Filmbildner auf der Haut beschrieben. Deshalb wurden die entwickelten filmbildenden Systeme in dieser Arbeit nicht nur auf ihre Wirkstofffreisetzung sowie die Wirkstoffpenetration und -permeation untersucht, sondern es wurden auch die mechanischen Eigenschaften der ausgebildeten Filme, wie Dehnbarkeit, Wasserfestigkeit und Adhäsivität auf der Haut analysiert und die Formulierung entsprechend optimiert. Die Zugfestigkeit der Filme ist geringer (4.2.2.1) als die der Filme aus filmbildenden Emulsionen, die von Lunter (2012) entwickelt wurden. Der Grund dafür sind vermutlich die Silica-Partikel, die bei den filmbildenden Emulsionen nicht vorhanden sind. Sie sind nicht im filmbildenden Polymer löslich und können so als störendes Element das Bersten der Filmstücke begünstigen. Außerdem ist es mit den bisherigen Testmethoden nicht möglich, die Dehnbarkeit der Filme direkt auf der Haut zu erfassen. Umso wichtiger ist es daher, dass die Filme eine sehr gute Adhäsion auf der Haut zeigen, die mit denen eines typischen transdermalen Pflasters vergleichbar sind (4.2.2.2). Dadurch könnte erreicht werden, dass selbst bei kleinen Rissen im Film eine ausreichende Haftung auf der Haut gegeben ist und damit die Wirkstoffabgabe an die Haut nicht beeinflusst wird. Interessant ist es auch zu wissen, inwiefern alltägliche Situationen die Haftung des Films auf der Haut beeinträchtigen könnten. Um diese Frage zu klären, haben Herrmann et al. (2016) eine Methode entwickelt, mit der ex vivo ein wiederholter Hautkontakt oder durch Kleidungsstücke verursachte Reibung simuliert werden kann. Hierbei wurde die Substantivität von drei verschiedenen Zubereitungen verglichen: eine konventionelle Creme, eine von Rottke (2012) entwickelte Öl-in-Silikonöl-Emulsion und die in dieser Arbeit vorgestellte filmbildende Formulierung. Diese Zubereitungen unterscheiden sich in ihrem Aufbau und ihren rheologischen Eigenschaften deutlich, weisen aber alle die gleiche Wirkstoffkonzentration auf. Während durch einmaligen Haut-zu-Haut-Kontakt bei der konventionellen Creme und der O/O-Emulsion zwischen 35 und 50 % des Wirkstoffs von der eigentlichen Applikationsstelle abgetragen wurden, war bei der filmbildenden Formulierung noch immer 97 % der Formulierung am gewünschten Ort vorhanden. Für den Kleidung-zu-Haut-Kontakt fällt dieses Ergebnis noch deutlicher aus: Hier wurden bei der konventionellen Creme 56 % bzw. 92 % bei der O/O-Emulsion abgetragen. Für die filmbildende Formulierung, die auf der Haut einen wasserfesten Film ausbildet, konnte hingegen nach dem Kleidungskontakt kein Arzneistoff in den Kleidungsstücken nachgewiesen

werden, was auf eine ausgezeichnete Substantivität zurückzuführen ist. Filmbildende Formulierungen ermöglichen aufgrund ihrer hervorragenden Substantivität also nicht nur eine verlängerte Wirkstoffpermeation. Sie verbessern zusätzlich die Therapiesicherheit, indem quasi kein Wirkstoff im Vergleich zu den anderen Formulierungen an die Umgebung abgegeben wird. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die irritative Wirkung der Capsaicinoide von besonderer Relevanz, um eine Kontamination unbeteiligter Personen oder der Umgebung zu vermeiden.

5.3 Geeignetes Dosierungsintervall der filmbildenden Formulierung

Die entwickelte filmbildende Formulierung soll eine geringere Applikationsfrequenz ermöglichen und eine Alternative zu den vier- bis sechsmal täglich anzuwendenden Hydrophilen Capsaicinoid Cremes darstellen. Bei systemisch wirksamen Arzneistoffen können pharmakokinetische Größen, wie z.B. die Plasmaspiegelkonzentration und die Eliminationshalbwertszeit, wertvolle Hinweise zur Festlegung des Dosierungsintervalls liefern. Bei topisch wirksamen Dermatika ist die Suche nach dem geeigneten Dosierungsintervall etwas komplexer. Die Dosisfindung ergibt sich vor allem aufgrund der klinischen Wirksamkeit. Hierfür sind klinische in vivo Studien notwendig. Mit ex vivo Untersuchungen können jedoch erste Hinweise für die Dosisfindung im Rahmen der frühen Formulierungsentwicklung erhalten werden und damit die später notwendigen klinischen Studien effizienter durchgeführt werden. Der Wirkort der Capsaicinoide sind die epidermalen Nervenfasern, an denen TRPV1 exprimiert ist und Capsaicinoide als Agonist binden (Caterina et al., 1997; Ikoma et al., 2006). Daher kommt der Arzneistoffkonzentration in den Schichten der lebenden Epidermis besondere Beachtung zu. Um zu bestimmen, welche Arzneistoffmenge nach der Applikation und einer gewissen Inkubationszeit in die Schichten der lebenden Epidermis penetriert ist, empfiehlt es sich, die Ergebnisse der Penetrationsuntersuchungen ausführlicher zu analysieren.

Ein guter Anhaltspunkt für effektive Wirkstoffkonzentrationen in den lebenden Schichten der Epidermis stellt dabei die Penetration aus der bereits therapeutisch erfolgreich angewendeten Referenzformulierung HNC 0,05 %, die vier- bis sechsmal täglich aufgetragen werden muss (NRF, 2010b), dar. Daraus lässt sich schließen, dass eine einmalige Applikation der HNC 0,05 % einen effektiven Wirkspiegel für vier Stunden aufrechterhalten sollte. Betrachtet man also die in das Stratum corneum penetrierte Menge an Nonivamid nach vier Stunden, kann dies einen guten Hinweis liefern, welche Wirkstoffmengen in den lebenden Schichten der Epidermis für eine effektive Wirkung erforderlich sind. Wie anhand von Abbildung 4.4-20 und Abbildung 4.4-21 zu erkennen ist, werden vier Stunden nach der Applikation der HNC 0,05 % die höchsten Wirkstoffmengen in den lebenden Schichten der Epidermis erfasst, während anschließend der Wirkstoffgehalt absinkt. Dies bestätigt zum einen die in der NRF-Monographie festgelegten Dosierungsintervalle und ist zum anderen ein Anhaltspunkt dafür, welche Wirkstoffkonzentration auch aus anderen Formulierungen, wie z.B. der filmbildenden Formulierung, in die lebenden Schichten der Epidermis penetrieren sollten, um eine wirksame Therapie sicherzustellen. So sollten filmbildende Formulierungen mit verlängerter Wirkstofffreisetzung möglichst ähnliche Wirkstoffkonzentrationen aufweisen – dies jedoch

über einen längeren Zeitraum als es bei der Applikation der Hydrophilen Nonivamid Cremes der Fall ist.

Capsaicinoide sowie auch das strukturell ähnliche Nonivamid sind aufgrund ihrer ausgeprägten Lipophilie prinzipiell in der Lage, ein Arzneistoffdepot im Stratum corneum aufzubauen (Roberts et al., 2004). Es wäre daher eigentlich zu erwarten gewesen, dass ein solches Depot auch bei der Applikation einer dermalen Zubereitung wie der Hydrophilen Capsaicinoid Creme zu erkennen ist. Aus diesem Wirkstoffdepot hätte auch über einen längeren Zeitraum hinweg Arzneistoff in die darunter befindlichen epidermalen Strukturen der Haut nachdiffundieren können. Anhand von Abbildung 4.4-20 und Abbildung 4.4-21 wird aber ersichtlich, dass mit ansteigender Inkubationsdauer nicht nur der Wirkstoffgehalt im Bereich der lebenden Schichten der Epidermis, sondern auch die Konzentration im Stratum corneum rückläufig ist. Eine Begründung für das Ausbleiben einer Depotbildung im Stratum corneum könnte die zu niedrige Wirkstoffkonzentration in der aufgetragenen Formulierung sein. Welchen Effekt eine Erhöhung des Wirkstoffgehalts in der Formulierung haben kann, ist im Vergleich der Penetration von Nonivamid aus den verschiedenen konzentrierten filmbildenden Formulierungen zu erkennen: Während der in den tieferen Hautschichten gefundene Arzneistoffgehalt nahezu unverändert bleibt, erhöht sich die penetrierte Menge im Stratum corneum mit steigender Konzentration massiv. Es stellt sich die Frage, warum eine Erhöhung der Wirkstoffkonzentration nur zu einem Anstieg des Arzneistoffgehalts im Stratum corneum nicht aber in den anderen Schichten führt. Für die Absorption des Wirkstoffs Nonivamid ist anzunehmen, dass die Penetration durch das Stratum corneum den langsamsten Schritt darstellt. Durch die kontinuierliche Wirkstofffreigabe aus der filmbildenden Formulierung wird mit hoher Wahrscheinlichkeit mehr Arzneistoff in das Stratum corneum penetrieren als es aus diesem in tiefere Hautschichten permeiert. Dies begründet, warum eine Erhöhung der Wirkstoffkonzentration zu einem deutlich größeren Reservoir im Stratum corneum führt. Für die Wirkung, die entscheidend für die Festlegung eines geeigneten Dosierungsintervalls ist, ist jedoch nicht die Konzentration an Nonivamid im Stratum corneum, sondern die Wirkstoffkonzentration in den lebenden Schichten der Epidermis entscheidend. Dort werden unabhängig von der Ausgangskonzentration in der filmbildenden Formulierung vergleichbare Werte erhalten.

Bei der Hydrophilen Capsaicinoid Creme fehlt die kontinuierliche Freigabe des Wirkstoffs über einen langanhaltenden Zeitraum. Dies bedingt, dass eine wiederholte Applikation der Creme notwendig ist, um eine langanhaltende Wirkung zu erreichen. Eine Ausbildung eines anhaltenden Wirkstoffreservoirs ist aufgrund der für die HNC 0,05 % erhaltenen Ergebnisse nicht zu erkennen. Es ist vorstellbar, dass eine Erhöhung der Wirkstoffkonzentration also auch

zu unterschiedlich hohen Wirkstoffkonzentrationen in den lebenden Schichten der Epidermis führen kann. Das Dosierungsintervall der Cremes ist jedoch unabhängig von der Wirkstoffkonzentration festgelegt. Dies überrascht, denn man könnte annehmen, dass bei einer höheren Ausgangskonzentration des Arzneistoffs in der Hydrophilen Capsaicinoid Creme eine geringere Applikationsfrequenz möglich sein sollte. Im Gegensatz zu der filmbildenden Formulierung enthält die Hydrophile Capsaicinoid Creme Propylenglykol als Hilfsstoff zur erleichterten Wirkstoffpenetration. Allerdings permeiert Propylenglykol aufgrund seiner höheren Polarität auch deutlich schneller als Nonivamid in die tieferen Hautregionen. Dies bedeutet, dass mit zunehmender Inkubationszeit die penetrationsverbessernde Wirkung des Propylenglykols abnimmt und somit die Penetration des Arzneistoffs zusätzlich erschwert wird. Zudem weist die Creme eine unzureichende Substantivität auf. Daraus folgt, dass die Zubereitung nach der Applikation leicht durch Kontakt mit der Umgebung von der Haut abgetragen werden kann (Herrmann et al., 2016). All dies kann dazu führen, dass der Arzneistoff mit steigender Inkubationsdauer nur noch geringfügig bzw. nicht mehr in die Haut abgegeben werden kann. Dabei ist es prinzipiell unerheblich, welche Arzneistoffkonzentration mit der Zubereitung auf die Haut aufgetragen wurde.

Die entwickelte filmbildende Formulierung begünstigt durch die Adhäsivität des auf der Haut ausgebildeten Films und seiner Wasserfestigkeit eine hohe Substantivität nach der Applikation. Wie anhand der Ergebnisse der Permeations- und Penetrationsuntersuchungen zu erkennen ist, ermöglichen sie zudem eine verlängerte Wirkstoffabgabe an die Haut. Dies resultiert bereits bei einer einmaligen Applikation in einer verlängerten Verfügbarkeit des Wirkstoffs am Wirkort über 24 Stunden. Eine Erhöhung der Wirkstoffkonzentration macht anhand dieser Untersuchungen wenig Sinn, da dadurch offensichtlich nur das Depot im Stratum corneum erhöht wird. Zwar kann dies eine verlängerte Diffusion des Arzneistoffs in die tieferen Hautschichten auch nach Entfernung des Films bewirken, jedoch ist dieser Depoteffekt abhängig vom Zustand der Haut und des Individuums und somit schwer kontrollierbar. Aus Gründen der Arzneimitteltherapiesicherheit empfiehlt sich entsprechend der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse daher eine niedrig-konzentrierte Formulierung, z.B. FF 0,09 % bei einer einmal täglichen Applikation. Die hier präsentierten Ergebnisse liefern also erste Erkenntnisse für das geeignete Dosierungsintervall der filmbildenden Formulierungen und können die Grundlage für klinische in vivo Studien liefern.

5.4 Verbesserung der Therapietreue des Patienten durch eine Reduktion der Applikationsfrequenz

Ein neu entwickelter Arzneistoff oder eine innovative Formulierung ist letzten Endes nur dann erfolgsversprechend, wenn der Patient das Therapieschema einhält und es für den Patienten praktikabel ist (Jin et al., 2008). Eine Besonderheit kommt dabei der Therapie von Hauterkrankungen zu, da sie leicht sichtbar für Angehörige sind und somit oftmals einen stigmatisierenden Effekt auf das soziale Leben des Patienten haben können (O'Donnell et al., 1997; Taube, 2016). Trotz des offensichtlich hohen Leidensdrucks ergaben Studien, in der die Therapietreue von Psoriasis-Patienten analysiert wurde, dass ca. 40-50 % der Studienteilnehmer zugaben, sich nicht oder nur teilweise an die Verordnung zu halten (Hodari et al., 2006; Richards et al., 1999). Die Dunkelziffer liegt vermutlich weit höher. Deshalb ist es einerseits von großer Bedeutung zu wissen, welche Faktoren die Einhaltung einer dermalen Therapie erschweren und welche Anforderungen Patienten an dermale Zubereitungen stellen. Andererseits soll diskutiert werden, ob eine Reduktion der Applikationsfrequenz, z.B. durch die Anwendung filmbildender Systeme, dazu beitragen kann, die Therapietreue der Patienten zu verbessern. Patienten, die an chronischem Pruritus leiden, nennen neben einer gesicherten Diagnose als wichtigste Bedürfnisse eine einfache und wirksame Therapie, mit der sie schnell vertraut sind, sowie eine geringere Abhängigkeit von ärztlicher und klinischer Betreuung (Steinke et al., 2016). Kritisch wird bei einer topischen Behandlung der hohe Zeitaufwand beurteilt (Richards et al., 1999). Die Anzahl der täglich notwendigen Applikationen verhält sich dabei invers zur Adhärenz (Feldman & Housman, 2003). Insbesondere für ältere Patienten stellt eine mehr als zweimal tägliche Dosierung eine große Herausforderung dar. Aus diesen Gründen sind gerade für diese Patientengruppe Darreichungsformen mit verlängerter Wirkstofffreisetzung vorteilhaft (Cramer, 1998). Ein psychologischer Faktor, der insbesondere bei Capsaicinoiden zu beachten ist, ist die mögliche Erfahrung des Wiederaufflammens der Symptomatik durch eine fehlerhafte Anwendung. Der Eindruck der Unwirksamkeit der Therapie kann zu einer starken Beeinträchtigung der Adhärenz führen (Hodari et al., 2006).

Komfortablere Therapieschemata, die eine Reduktion der Applikationsfrequenz durch eine verlängerte Wirkstofffreisetzung ermöglichen, können eine Verbesserung der Therapietreue des Patienten bewirken. So war die Therapietreue von Psoriasis-Patienten, die nur einmal täglich Medikamente einnehmen oder auftragen mussten, doppelt so hoch, wie bei dem Patientenkollektiv, das eine zweimal tägliche Administration durchführen musste (Zaghloul & Goodfield, 2004). Dies verdeutlicht, weshalb die entwickelten filmbildenden Dermatika zur Therapie chronischer Hauterkrankungen aufgrund einer geringeren Applikationsfrequenz eine große Erleichterung für den Patienten darstellen könnten.

5.5 Ex vivo/In vivo-Korrelation und Limitierung der Aussagekraft von ex vivo-Permeations- und Penetrationsuntersuchungen

Dermato-pharmakokinetische Untersuchungen im Rahmen der frühen Formulierungsentwicklung können aufgrund der hohen ethischen, rechtlichen, finanziellen und logistischen Hürden nur selten an Probanden durchgeführt werden. Ex vivo Permeations- und Penetrationsuntersuchungen sind daher Surrogate, um die Wirkstoffaufnahme in und durch die Haut möglichst realitätsnah zu simulieren. Damit möglichst aussagekräftige Resultate erzielt werden, müssen die physiologischen Bedingungen so gut wie möglich simuliert werden. Dies beginnt bereits bei der Auswahl des Hautspenders. Als geeignetes Modell erweist sich aufgrund der Struktur, Dicke und Behaarung vor allem Schweinehaut (Barbero & Frasch, 2009; Capt et al., 2007; Jung & Maibach, 2015; Simon & Maibach, 2000). Ebenso muss die Wahl des Akzeptormediums wohl überlegt sein, da einerseits idealerweise physiologische Bedingungen widergespiegelt werden sollten, z.B. durch den Einsatz eines phosphatgepufferten Mediums, und andererseits die Zusammensetzung und Struktur der Haut nicht verändert werden sollte. Des Weiteren muss das Akzeptormedium aber auch eine ausreichend hohe Löslichkeit für den Arzneistoff aufweisen, um während des gesamten Beobachtungszeitraums sink-Bedingungen aufrecht zu erhalten. Die Einhaltung von sink-Bedingungen ist notwendig, um mit fortschreitender Zeit keine konzentrationsbedingte Minderung der Permeationsrate zu erhalten. Auch in vivo wird durch die Blutzirkulation im Körper ständig Arzneistoff abtransportiert. Mit Hilfe von bovinem Serumalbumin als Zusatz zum Akzeptormedium konnte bei den in 4.4 dargestellten Permeations- und Penetrationsuntersuchungen die Löslichkeit des Arzneistoffs erhöht werden, wobei sich weder die Tonizität des Mediums ändert, noch die Struktur der Haut negativ beeinflusst wird. So trägt bereits die Auswahl des Akzeptormediums einen Beitrag zur ex vivo/in vivo-Korrelation bei. Ist die Löslichkeit besonders schwerlöslicher Arzneistoffe trotz solcher Zusätze im Akzeptormedium so gering, dass keine sink-Bedingungen eingehalten werden können, empfiehlt sich statt der statischen Franz-Zellen die Verwendung von Durchflusszellen. Bei diesen wird stetig frisches Medium zugeführt, wodurch die physiologischen Bedingungen noch besser simuliert werden können (Bronaugh & Stewart, 1985). Eine Temperierung der Zellen sollte in jedem Fall bei der physiologischen Temperatur der Haut von 32 °C erfolgen. Die Umgebungstemperatur beeinflusst laut Tominaga & Tojo (2010) zwar kaum den Diffusionskoeffizienten im Stratum corneum, jedoch wird bei ansteigender Temperatur die Löslichkeit des Arzneistoffs im Stratum corneum deutlich erhöht und somit die Permeationsrate beeinflusst. Aus diesem Grund ist die Durchführung des Experiments bei einer Temperatur, die so nah wie möglich an den physiologischen Bedingungen liegt,

notwendig, um aussagekräftige Werte für eine Korrelation der ex vivo erhaltenen Daten auf in vivo Prozesse zu erhalten. Trotz aller Vorkehrungen können ex vivo Experimente nur ein möglichst gutes Surrogat für in vivo Untersuchungen an Humanhaut sein. Manche Prozesse, wie z.B. der Einfluss der Biotransformation von Arzneistoffen in der Haut, sind bei der Verwendung von totem biologischem Material kaum vorhersehbar. Die Haut bildet nämlich nicht nur eine Barriere gegen das Eindringen von Xenobiotika, sondern hat wie andere Organe auch metabolische Funktionen, die bei einer dermalen Applikation berücksichtigt werden sollten (Svensson, 2009). Für das mit dem Modellarzneistoff Nonivamid strukturell eng verwandte Capsaicin wurde in ex vivo Studien gezeigt, dass es nach oraler Aufnahme durch Amidasen und durch hepatische Cytochrom P450 Enzyme schnell metabolisiert wird. Die Verwendung von kultivierten humanen Epidermis-Äquivalenten kann einen geeigneten Weg darstellen, um metabolische Prozesse in der Haut zu beobachten. Diese Modelle sind wegen ihrer gering ausgeprägten Hautbarriere allerdings wenig geeignet, um die Wirkstoffabsorption zu simulieren (Godin & Touitou, 2007). Zudem verläuft die Biotransformation von Capsaicin in Humanhaut sehr langsam. Capsaicin kann über CYP1A1, 1A2, 3A4, 2B6, 2C9, 2C19 und 2E1 metabolisiert werden (Chanda et al., 2008), die vor allem in der Epidermis, den Talgdrüsen und Haarfollikeln vorhanden sind (Oesch et al., 2007). Es konnten mit Vanillylamin, das wahrscheinlich durch Hydrolyse der Amidbindung gebildet wird, und der durch weitere oxidative Desaminierung des Vanillylamins gebildeten Vanillinsäure zwei Metabolite detektiert werden. Der mit Abstand größte Anteil an appliziertem Capsaicin wurde jedoch in unveränderter Form wiedergefunden. Während also Capsaicin bei oraler Aufnahme schnell metabolisiert wird, eignet sich die dermale Applikation gerade aufgrund der sehr langsam ablaufenden Biotransformation in der Haut (Chanda et al., 2008). Ähnliches gilt für die Applikation des in dieser Arbeit verwendeten Capsaicin-Analogons Nonivamid.

Zusammenfassend sind ex vivo Permeations- bzw. Penetrationsuntersuchungen mit tierischer Haut als Surrogat für Humanhaut trotz all ihrer Limitierungen wichtige Instrumente für die Entwicklung dermalen und transdermalen Formulierungen und die Abschätzung der perkutanen Absorption ausgewählter Arzneistoffe. So können basierend auf den ex vivo Ergebnissen die besten Formulierungen bzw. Wirkstoffkandidaten für weiterführende in vivo Studien am Menschen ausgewählt werden (Godin & Touitou, 2007). Mit den in dieser Arbeit präsentierten Daten zur ex vivo Wirkstoffpermeation und -penetration von Nonivamid aus filmbildenden Formulierungen (4.4) konnte bereits ein optimiertes und vielversprechendes System entwickelt werden, das die Grundlage für die Durchführung von in vivo Untersuchungen darstellt. Eine ebenfalls in dieser Arbeit durchgeführte in vivo Penetrationsstudie (4.4.3) gibt erste Hinweise auf eine ex vivo/in vivo-Korrelation.

6 Zusammenfassung

Die Therapie chronischer Hauterkrankungen, wie z.B. des chronischen Pruritus, erfordert oftmals die mehrfach tägliche Applikation eines Dermatikums. Dies kann in vielen Fällen in einer unzureichenden Therapietreue des Patienten resultieren und im schlimmsten Fall zum Scheitern der Therapie führen. Deshalb besteht ein wachsender Bedarf an topisch anwendbaren Formulierungen, die eine verlängerte Wirkstoffabgabe ermöglichen und damit geringere Applikationsfrequenzen erlauben. Für diese Zwecke sind bislang Pflaster, die jedoch nicht individuell zugeschnitten werden können, und filmbildende Emulsionen entwickelt worden, deren Nachteil aber ist, dass sie den Zusatz von Emulgatoren benötigen. Das Ziel dieser Dissertation war die Entwicklung einer filmbildenden Formulierung mit verlängerter Wirkstoffabgabe zur dermalen Therapie chronischer Hauterkrankungen, die sowohl individuell aufzutragen sein als auch ohne den Zusatz von Emulgatoren zur Stabilisierung der Formulierung auskommen soll.

Im ersten Teil der Dissertation werden filmbildende Formulierungen entwickelt und optimiert. Daran anschließend wird in einem analytischen Teil überprüft, ob die Formulierungen bzw. die resultierenden Filme die gewünschten Charakteristika aufweisen, um eine verlängerte Wirkstoffabgabe an die Haut zu realisieren. Es wurde zunächst nach geeigneten Formulierungskandidaten gesucht. Die hergestellten filmbildenden Formulierungen bzw. die daraus erhaltenen Filme wurden im Folgenden auf ihre mechanischen Eigenschaften und ihre Lagerstabilität in Abhängigkeit der Zusammensetzung untersucht. Mit den vielversprechendsten Systemen wurde die *in vitro* Freisetzung des Modellarzneistoffs Nonivamid untersucht, bevor sich sowohl *ex vivo* Permeationsuntersuchungen mit *infiniter* und *finiter* Dosis als auch *ex vivo* bzw. *in vivo* Studien zur Wirkstoffpenetration in die Haut und zur Hautverträglichkeit der Formulierung angeschlossen haben. Zur Beurteilung wurden die Ergebnisse mit denen einer konventionellen halbfesten Zubereitung, der Hydrophilen Nonivamid Creme (HNC), verglichen.

Aufgrund seiner überlegenen Löslichkeit für Nonivamid eignet sich die Verwendung von raffiniertem Rizinusöl als Lösungsmittel für den Modellarzneistoff. Die mesoporösen Kieselgele Syloid® XDP 3050 und Syloid® 244 FP zeigen für dieses Öl eine beachtliche Ölabsorptionskapazität und können deshalb als Träger für die Arzneistofflösung eingesetzt werden. Von den untersuchten Polymerdispersionen, die eine retardierte Freisetzung auf der Haut ermöglichen sollten (Eudragit® FS 30D, Eudragit® NE 30D, Eudragit® RS 30D, Eudragit® RL 30D und Kollicoat® SR 30D), eignet sich nur Eudragit® RS 30D zur Verwendung in den filmbildenden Formulierungen. Die restlichen Polymerdispersionen sind entweder

inkompatibel mit den übrigen Komponenten der filmbildenden Formulierung (Eudragit® FS, Kollicoat® SR), nach der Weichmacherzugabe für die weitere Verwendung unbrauchbar (Eudragit® RL) oder nur unter der Zugabe von Tensiden, wie z.B. Polysorbat 80, stabil (Eudragit® NE). Die Herstellung der filmbildenden Formulierung hat einen großen Einfluss auf die Homogenität der Formulierung und auf die mechanischen Eigenschaften des daraus gebildeten Films. Als optimal erweist es sich, das mesoporöse Silica zunächst mit Arzneistoff zu beladen, um ein ölbeladenes Pulver zu erhalten. Dieses Pulver wird dann in die weichgemachte Polymerdispersion unter der Verwendung des SpeedMixers™ eingearbeitet, woraus eine homogene Verteilung der ölbeladenen Pulverpartikel in der Polymerdispersion resultiert. Die aus dieser Formulierung gebildeten Filme weisen zwar keine besonders hohe Dehnbarkeit auf, zeigen aber eine außerordentlich gute Adhäsion auf der Haut, die mit der eines typischen transdermalen Pflasters vergleichbar ist. Die Filme halten auch nach 80-minütiger Inkubation in Wasser einen sehr großen Anteil an Arzneistoff im Film zurück, was aus pharmakokinetischen Gesichtspunkten aber auch insbesondere aus Sicherheitsaspekten für retardiert freisetzende dermale Zubereitungen von großer Wichtigkeit ist. Mit Hilfe ramanmikroskopischer Untersuchungen können Instabilitätsphänomene bereits frühzeitig erkannt werden. Während für die Formulierungen mit Syloid® 244 FP ein Austreten des Rizinusöls und die Agglomeration bzw. die Koaleszenz zu größeren Öltröpfchen zu erkennen ist, sind filmbildende Formulierungen mit Syloid® XDP 3050 über den gesamten Beobachtungszeitraum von sechs Monaten stabil. Diese Ergebnisse führten schließlich zu der vielversprechendsten Formulierung, bei der Nonivamid in Rizinusöl gelöst, anschließend an Syloid® XDP 3050 gebunden und abschließend in der weichgemachten Eudragit® RS-Dispersion mit Hilfe des SpeedMixers™ homogenisiert wird.

Die in vitro Freisetzungsbildungen ergaben, dass filmbildende Formulierungen in der Lage sind, einen Arzneistoff über einen Zeitraum von 44 Stunden freizusetzen. Durch Änderungen des Anteils an ölbeladenem Pulver in der Zubereitung kann die Freisetzungsrates individuell angepasst werden. Zur Beurteilung, ob diese Wirkstofffreisetzung auch zu einer verlängerten Wirkstoffpermeation führt, wurden ex vivo Permeationsuntersuchungen an der Haut von Schweineohren durchgeführt. Dabei wurde die Permeation von Nonivamid aus der filmbildenden Formulierung (FF) immer mit der HNC als Referenz verglichen. Diese Referenzformulierung wurde in den Wirkstoffkonzentrationen von 0,025 % bis 0,1 % eingesetzt. In diesem Konzentrationsbereich wird die Creme bereits als Hydrophile Capsaicinoid Creme zur Therapie des chronischen Pruritus angewandt. Permeationsuntersuchungen, bei denen eine infinite Dosierung auf die Haut aufgebracht wurde und sowohl für die filmbildende Formulierung als auch für die Referenzformulierung die gleiche Wirkstoffkonzentration gewählt wurde, zeigten, dass die Wirkstoffpermeation aus der

Hydrophilen Capsaicinoid Creme um ein Vielfaches höher liegt. Der aus der filmbildenden Formulierung entwickelte Film führt stattdessen zu einer stetigen und kontrollierten Permeation des Arzneistoffs. Der Vergleich der Permeation der filmbildenden Formulierung mit den therapeutisch angewendeten Hydrophilen Nonivamid Cremes ergab, dass sowohl das Permeationsprofil als auch die Permeationsrate von Nonivamid aus FF 0,9 % in einem therapeutisch geeigneten Rahmen liegen. Auch die Verwendung einer für 8 Wochen gelagerten Zubereitung änderte nichts an ihrem Permeationsverhalten. Dies gibt Hinweise auf die Lagerstabilität der entwickelten Formulierung. Durch die Verwendung einer finiten Dosierung wurde das Permeationsverhalten unter anwendungsnahen Bedingungen untersucht. Auffällig war dabei, dass unter diesen Bedingungen nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden der permeierte Anteil an Nonivamid bezogen auf die aufgebrachte Menge für die HNC wesentlich höher lag als für die filmbildende Formulierung. Dies bestätigt, dass in der filmbildenden Formulierung auch nach dieser Zeit noch genügend Nonivamid verbleibt, während die Freisetzung aus der HNC mit der Zeit zum Erliegen kommen sollte.

Der Wirkort von Nonivamid liegt jedoch an den epidermalen Nervenfasern, weshalb zur Abschätzung der Wirkung die Wirkstoffpenetration in die einzelnen Hautschichten aussagekräftigere Ergebnisse liefert, als die Permeation in das Akzeptormedium. Daher wurde zunächst eine geeignete Methode entwickelt, die eine zuverlässige Bewertung der Wirkstoffpenetration in das Stratum corneum und in die sowohl tiefer liegenden als auch aus lebenden Zellen bestehenden Schichten der Epidermis und Dermis ermöglicht. Es zeigte sich, dass die vollständige Entfernung der nach der Inkubation auf der Haut verbliebenen Formulierung und die Entfernung des spröden Stratum corneum zur Analyse des Wirkstoffgehalts eine Herausforderung darstellt. Die Entfernung kann prinzipiell mit einer Klebebandabriss-Technik, mittels eines Kryo-Mikrotoms oder durch eine Cyanoacrylat-Biopsie erfolgen. Die effektivste Variante ist, eine Kombination dieser drei Methoden zur Entfernung der verbliebenen Formulierung und zur Segmentierung der einzelnen Hautschichten anzuwenden. Während für FF 0,9 % ein mit der Referenzformulierung HNC 0,05 % vergleichbares Permeationsprofil erhalten wird, penetriert aus der filmbildenden Formulierung eine im Vergleich bedeutend höhere Menge Nonivamid in das Stratum corneum. Die Penetration in die lebenden Schichten der Epidermis, die den Wirkort von Nonivamid darstellen, ist jedoch ähnlich – egal ob der Arzneistoff nun aus der filmbildenden Formulierung oder der Referenzformulierung an die Haut abgegeben wird. Durch die Reduktion des Wirkstoffanteils in der filmbildenden Formulierung zu FF 0,09 % werden in allen drei Hautschichten vergleichbare Mengen wiedergefunden. Betrachtet man jedoch den zeitlichen Verlauf der Penetration, zeigen sich für den Bereich der lebenden Zellschichten der Epidermis deutliche Unterschiede. Wird HNC 0,05 % auf die Haut aufgebracht, sinkt der Wirkstoffgehalt

in dieser Schicht nach einem Maximum bei vier Stunden deutlich ab. Stattdessen bleibt während des Beobachtungszeitraums von 24 Stunden die penetrierte Menge an Nonivamid konstant oder steigt sogar tendenziell, wenn die filmbildende Formulierung appliziert wurde. Es bestätigt sich also, dass filmbildende Formulierungen eine verlängerte Wirkstoffpenetration an den Wirkort über einen Zeitraum von 24 Stunden ermöglichen. Dazu genügt bereits eine einmal tägliche Applikation. Dieser Effekt zeigt sich sowohl für FF 0,9 % als auch für FF 0,09 %. Da aus der niedriger konzentrierten Formulierung jedoch nicht solch hohe Mengen an Nonivamid in das Stratum corneum penetrieren, stellt die Verwendung von FF 0,09 % prinzipiell die sicherere Variante da. Besonders ist, dass die Klebebandabriss-Technik auch in vivo durchgeführt werden kann, wobei allerdings nur der Wirkstoffgehalt im Stratum corneum ermittelt werden kann. So wurde in einer orientierenden Studie die Wirkstoffpenetration in vivo an einem Probanden untersucht. Die Ergebnisse bestätigten die Erkenntnisse der ex vivo Studie und lassen eine gute ex vivo/in vivo Korrelation vermuten. Allerdings ist die Aussagekraft dieser ersten Studie gering, da anhand eines ähnlichen Wirkstoffgehalts im Stratum corneum nicht gleichzeitig auf vergleichbare Wirkstoffkonzentrationen in den tieferliegenden Schichten geschlossen werden kann. Des Weiteren ist die Aussagekraft einer Studie mit einem Probanden zu niedrig, um eindeutige Erkenntnisse zu gewinnen. Hierzu sind Untersuchungen mit einem größeren Probandenkollektiv erforderlich.

Mit einer größeren Anzahl von 21 Probanden konnte jedoch die Hautverträglichkeit der filmbildenden Formulierung in vivo getestet werden. Es wurden die für Hautirritationen typischen Marker des transepidermalen Wasserverlusts, der Hydratisierung des Stratum corneum und des Erythemindex vor der Applikation und nach einer einstündigen Inkubationszeit erfasst. Die Werte der wirkstoffhaltigen filmbildenden Formulierung wurden mit der therapeutisch verwendeten HNC 0,05 %, einer wirkstofffreien filmbildenden Formulierung und einer unbehandelten Kontrolle verglichen. Erfreulicherweise ergaben sich dabei sowohl für die wirkstofffreie als auch für die wirkstoffhaltige filmbildende Formulierung bei allen untersuchten Werten kein erkennbarer Anstieg. Daraus lässt sich eine exzellente Hautverträglichkeit der filmbildenden Formulierungen ableiten.

In einem weiteren Projekt wurde die Eignung der konfokalen Ramanmikroskopie zur Untersuchung der Penetration deuterierter Wirkstoffe in die Haut untersucht. Dabei wird die charakteristische Bande der C-D-Streckschwingung genutzt, die auch innerhalb der Haut gut zu detektieren ist. Aus diesem Grund wurde der Modellarzneistoff Nonivamid chemisch zu [D₁₇]-Nonivamid verändert, indem an der Seitenkette des Moleküls die Kohlenstoff-Atome durch Deuterium ausgetauscht wurden. Mit diesem Arzneistoff wurden zwei Formulierungen hergestellt: eine ca. 10%ige ethanolische Lösung und eine 0,95%ige Hydrophile

[D₁₇]-Nonivamid Creme. Die Penetration des deuterierten Arzneistoffs in die Haut wurde anschließend für beide Formulierungen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Erstellung eines Tiefenprofils möglich ist, wenn der Arzneistoff aus der Lösung penetriert. Wird jedoch die niedriger konzentrierte Creme aufgebracht, so ist der deuterierte Arzneistoff nicht mehr nachweisbar. Dies ist jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Unterschreitung der Nachweisgrenze im Ramanmikroskop zurückzuführen, da die Ergebnisse aus den Penetrationsuntersuchungen des undeuterierten Arzneistoffs eine Penetration in die Haut bereits eindeutig belegen konnten. Mit der Einschränkung, dass die deuterierte Substanz in einer entsprechend hohen Konzentration auf die Haut aufgetragen wird, kann konfokale Ramanmikroskopie eine geeignete Lösung darstellen, um die Penetration deuterierter Substanzen in der Haut zu erfassen.

Die Ergebnisse der Dissertation zeigen also, dass die entwickelten filmbildenden Formulierungen sowohl eine verlängerte Wirkstoffabgabe an die Haut ermöglichen, die in einer verlängerten Verfügbarkeit des Wirkstoffs am Wirkort resultiert, als auch gleichzeitig eine sehr gute Hautverträglichkeit aufweisen. Indem sie eine niedrigere Applikationsfrequenz erlauben, kann dies für den Patienten eine große Erleichterung in seiner Therapie darstellen, was die Therapietreue deutlich verbessern und somit den Therapieerfolg sicherstellen kann.

7 Summary

Chronic pruritus is a common symptom accompanying various chronic skin diseases. Conventionally, it is treated with antihistamines and local anaesthetics. However, these drugs often cannot provide sufficient relief. As an alternative, capsaicinoids can be used. Their long-lasting antipruritic effect is caused by continuous stimulation of TRPV1 at the epidermal pain conducting fibres. To achieve this, currently available formulations need to be applied 4-6 times a day. This is inconvenient and often results in poor patient compliance. Therefore, a sustained permeation of the drug would be advantageous. Moreover, diseased skin is often sensitive to possible irritants, e.g. surfactants. Thus, the aim of this thesis was to develop a film-forming formulation (FF) with sustained release for dermal treatment of chronic skin diseases making it easy to treat individual large areas of affected skin over a long period. Furthermore, it was of special interest to avoid the use of surfactants. The capsaicin analogue Nonivamid was chosen as active.

This thesis is divided into a formulation development part, in which the film-forming formulation is developed and optimized, and an analytical part, in which the desired characteristics of the formulation or the received films are studied. Firstly, suitable formulation candidates had to be found to realize such a formulation. Then, the prepared film-forming formulations and the received films were analyzed for their mechanical properties and the physical stability during storage. The best film-forming formulation system was tested for in vitro drug release as well as ex vivo drug permeation and ex vivo/in vivo drug penetration. Furthermore, the skin tolerability of the formulations was investigated in vivo. Those experiments were carried out to parametrically compare permeation of nonivamide from film-forming formulations to a standard formulation (Hydrophilic Nonivamide Cream; HNC).

The film-forming formulation should consist of few and well-tolerated substances to allow for application onto diseased skin. To this end, an oily API-solution was loaded into porous silica particles and incorporated into a film-forming polymer dispersion. Criteria for selection of the oil were high solubility for the API and high absorption capacity to the silica. Refined castor oil was found to be an ideal solvent for lipophilic drugs and mesoporous silica particles with high porosity such as Syloid[®] 244 FP or Syloid[®] XDP 3050 were shown to absorb large amounts of oil. Plasticized Eudragit[®] RS 30D was found to be an appropriate polymer as it enables film formation at skin surface temperature and is compatible with the used silica. Film-forming formulations were prepared by loading a solution of nonivamide in refined castor oil into mesoporous silica. This was subsequently incorporated into a plasticized film-forming polymer dispersion. Film-forming capacity of the film-forming formulations was investigated by confocal

Raman microscopy. Color coded images show that the oil is bound to the silica and immobilized in a polymeric matrix.

To investigate the suitability, the formulations were characterized with respect to homogeneity, substantivity and storage stability. Investigation of the homogeneity of the film-forming formulations showed that the most homogeneous product (in terms of distribution of the silica) could be achieved using the SpeedMixer™. The film-forming formulations showed a remarkable adhesion to porcine skin which was as good as the adhesion of a transdermal patch. Substantivity was found to be substantially enhanced compared to a conventional semisolid formulation. The storage stability studies using confocal Raman spectral imaging showed that film-forming formulations with Syloid® 244 FP are not physically stable for six months. In contrast, formulations with Syloid® XDP 3050 were proven physically stable over six months.

In vitro release studies showed that film-forming formulations can release nonivamide over a period of at least 44 hours. By changing the amount of oil-loaded powder used in the film-forming formulation, the release rate can be adjusted individually. Ex vivo permeation studies were performed to verify a sustained delivery of the drug from the film-forming formulations to the skin. Evaluation obtained that the permeation rate from a film-forming formulation with 0.9 % nonivamide was comparable to that from the therapeutically used HNC containing 0.05 % nonivamide. Thus, the permeation rate from the film-forming formulation falls into a therapeutically suitable range.

As the site of action of nonivamide is located within the viable epidermis, ex vivo penetration experiments were performed to compare nonivamide penetration from film-forming formulations and HNC into excised skin. It was found that the FF 0,09 % can deliver a similar amount of nonivamide to the skin as the HNC. Nonivamide levels in the viable epidermis decreased rapidly if it was applied in HNC but were kept constant over a period of 24 hours if it penetrated from FF 0,09 %. The capability of film-forming formulations to sustain penetration was thus shown. Moreover, a small in vivo penetration study showed an indication for an ex vivo/in vivo correlation. To achieve meaningful in vivo results another study with a higher number of participants might be done in future.

Furthermore, skin irritation potential of film-forming formulations was tested against the vehicle, the reference formulation HNC and an untreated control in an in vivo experiment in human volunteers. Transepidermal water loss, skin hydration and erythema index were assessed. It

was found that film-forming formulations did not alter any of the measured parameters within the application time. This shows the excellent skin tolerability of the film-forming formulations.

Another project of this thesis was to investigate the suitability of confocal Raman microscopy (CRM) for analyzing penetration of deuterated drugs due to the characteristic C-D-bond in the Raman spectrum. Therefore, [D₁₇]-nonivamide was synthesized. Using this deuterated active, the penetration from an ethanoic solution and from a lower-concentrated Hydrophilic [D₁₇]-Nonivamide Cream was analyzed. It was shown that detection and calculation of a skin depth profile for the [D₁₇]-nonivamide is possible when it penetrated from an ethanoic solution. Unfortunately, there was no way to detect the deuterated molecule within the skin when the cream was applied – probably because the penetrated amount was below the detection limit of the Raman microscope. Thus, CRM might be a promising tool to evaluate drug penetration of deuterated molecules, but it is limited to an appropriate drug concentration within the solution.

This thesis clearly shows that film-forming formulations exhibit the desired sustained penetration profile while being well tolerated. Thus, dosing intervals might be prolonged and patient compliance to the treatment can be improved which can ensure therapeutic success.

8 Anhang

8.1 Dichtebestimmung

Tabelle 8.1-1: Dichte verschiedener Öle.

Absolute Dichte	Raffiniertes Rizinusöl	C12-15 Alkylbenzoat	Myritol® 318	Iso-propyl-myristat	Mandelöl	Paraffinum liquidum
I	0,95629	0,92546	0,94386	0,84988	0,91250	0,84624
II	0,95628	0,92546	0,94385	0,84987	0,91250	0,84623
III	0,95628	0,92546	0,94385	0,84987	0,91251	0,84623
Mittelwert [g/mL]	0,95628	0,92546	0,94385	0,84987	0,91250	0,84623
SD [g/mL]	5,774E-06	1,3560E-16	5,774E-06	5,774E-06	5,774E-06	5,774E-06
rel. SD [%]	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

8.2 Verteilungskoeffizient von Nonivamid

Tabelle 8.2-1: Berechnung des Verteilungskoeffizienten von Nonivamid zwischen Rizinusöl und Wasser.

Konzentration	[µg/mL]
c1(Wasser)	4,531
c1(Rizinusöl)	8994,693
VK(Rizinusöl/Wasser)	1985,059
log(VK)	3,298

8.3 Sättigungslöslichkeit von Nonivamid in Akzeptormedien

Tabelle 8.3-1: Sättigungslöslichkeit von Nonivamid in Akzeptormedien; n=3; Arithmetischer Mittelwert ± SD.

Akzeptormedium	Konzentration [µg/mL]
4%ige BSA/PBS pH7,4-Lösung	477,64 (± 12,998)
PBS pH 7,4	149,18 (± 69,606)

8.4 Kalibrierungsdaten

8.4.1 Nonivamid gelöst in Methanol

Tabelle 8.4-1: Daten der Kalibrierung für Nonivamid 0,01-0,10 µg/mL; Injektionsvolumen: 120 µL (Peakfläche).

Konzentrationsbereich	0,01 -0,10	µg/mL
Verwendet für	Penetrationsuntersuchungen	
Injektionsvolumen	120	µL
Fließmittelzusammensetzung	Methanol/Phosphorsäure pH3,0	50:50
Flussrate	1,15	mL/min
Detektion	273	nm
Ofentemperatur	50	°C
Steigung	66788,79	[FE]·mL/µg
Ordinatenabschnitt	-7,20	[FE]
Korrelationskoeffizient	0,99862	
Bestimmtheitsmaß	0,99725	
Bestimmungsgrenze (Gottwald)	0,007	µg/mL
Nachweisgrenze (Gottwald)	0,002	µg/mL

Tabelle 8.4-2: Daten der Kalibrierung für Nonivamid 0,01-0,10 µg/mL; Injektionsvolumen: 200 µL (Peakfläche).

Konzentrationsbereich	0,01 -0,10	µg/mL
Verwendet für	Penetrationsuntersuchungen	
Injektionsvolumen	200	µL
Fließmittelzusammensetzung	Methanol/Phosphorsäure pH3,0	50:50
Flussrate	1,15	mL/min
Detektion	273	nm
Ofentemperatur	50	°C
Steigung	66784,84	[FE]·mL/µg
Ordinatenabschnitt	-49,62	[FE]
Korrelationskoeffizient	0,99488	
Bestimmtheitsmaß	0,98978	
Bestimmungsgrenze (Gottwald)	0,016	µg/mL
Nachweisgrenze (Gottwald)	0,004	µg/mL

Tabelle 8.4-3: Daten der Kalibrierung für Nonivamid 0,1-1,0 µg/mL; Injektionsvolumen: 120 µL (Peakfläche).

Konzentrationsbereich		0,1 -1,0 µg/mL	
Verwendet für	Penetrationsuntersuchungen		
Injektionsvolumen		120	µL
Fließmittelzusammensetzung	Methanol/Phosphorsäure pH3,0	50:50	
Flussrate		1,15	mL/min
Detektion		273	nm
Ofentemperatur		50	°C
Steigung		60238,03	[FE]·mL/µg
Ordinatenabschnitt		-210,03	[FE]
Korrelationskoeffizient		0,99965	
Bestimmtheitsmaß		0,99929	
Bestimmungsgrenze (Gottwald)		0,040	µg/mL
Nachweisgrenze (Gottwald)		0,011	µg/mL

Tabelle 8.4-4: Daten der Kalibrierung für Nonivamid 0,1-1,0 µg/mL; Injektionsvolumen: 200 µL (Peakfläche).

Konzentrationsbereich		0,1 -1,0 µg/mL	
Verwendet für	Wasserfestigkeit (Proben), Penetrationsuntersuchungen		
Injektionsvolumen		200	µL
Fließmittelzusammensetzung	Methanol/Phosphorsäure pH3,0	50:50	
Flussrate		1,15	mL/min
Detektion		273	nm
Ofentemperatur		50	°C
Steigung		85030,07	[FE]·mL/µg
Ordinatenabschnitt		-449,97	[FE]
Korrelationskoeffizient		0,99894	
Bestimmtheitsmaß		0,99788	
Bestimmungsgrenze (Gottwald)		0,072	µg/mL
Nachweisgrenze (Gottwald)		0,020	µg/mL

Tabelle 8.4-5: Daten der Kalibrierung für Nonivamid 0,85-8,5 µg/mL (Peakfläche).

Konzentrationsbereich	0,85-8,5 µg/mL	
Verwendet für	Wasserfestigkeit (Proben), Verteilungskoeffizient	
Injektionsvolumen	1	µL
Fließmittelzusammensetzung	Methanol/Phosphorsäure pH3,0	59,5:40,5
Flussrate	1,125	mL/min
Detektion	273	nm
Ofentemperatur	40	°C
Steigung	1204,65	[FE]·mL/µg
Ordinatenabschnitt	-103,14	[FE]
Korrelationskoeffizient	0,99967	
Bestimmtheitsmaß	0,99934	
Bestimmungsgrenze (Gottwald)	0,333	µg/mL
Nachweisgrenze (Gottwald)	0,093	µg/mL

Tabelle 8.4-6: Daten der Kalibrierung für Nonivamid 1,0-10,0 µg/mL (Peakfläche).

Konzentrationsbereich	1,0-10,0 µg/mL	
Verwendet für	Freisetzungsuntersuchungen	
Injektionsvolumen	20	µL
Fließmittelzusammensetzung	Methanol/Phosphorsäure pH3,0	59,5:40,5
Flussrate	1,15	mL/min
Detektion	273	nm
Ofentemperatur	50	°C
Steigung	24740,17	[FE]·mL/µg
Ordinatenabschnitt	-684,99	[FE]
Korrelationskoeffizient	0,99933	
Bestimmtheitsmaß	0,99865	
Bestimmungsgrenze (Gottwald)	0,575	µg/mL
Nachweisgrenze (Gottwald)	0,161	µg/mL

Tabelle 8.4-7: Daten der Kalibrierung für Nonivamid 1,0-10,0 µg/mL (Peakfläche).

Konzentrationsbereich	1,0 -10,0	µg/mL
Verwendet für	Penetrationsuntersuchungen	
Injektionsvolumen	200	µL
Fließmittelzusammensetzung	Methanol/Phosphorsäure pH3,0	50:50
Flussrate	1,15	mL/min
Detektion	273	nm
Ofentemperatur	50	°C
Steigung	111809,19	[FE]·mL/µg
Ordinatenabschnitt	14781,02	[FE]
Korrelationskoeffizient	0,99778	
Bestimmtheitsmaß	0,99557	
Bestimmungsgrenze (Gottwald)	0,996	µg/mL
Nachweisgrenze (Gottwald)	0,283	µg/mL

Tabelle 8.4-8: Kalibrierung für Nonivamid 10,0-100,0 µg/mL (Peakfläche).

Konzentrationsbereich	10,0-100,0	µg/mL
Verwendet für	Freisetzungsuntersuchungen	
Injektionsvolumen	20	µL
Fließmittelzusammensetzung	Methanol/Phosphorsäure pH3,0	59,5:40,5
Flussrate	1,15	mL/min
Detektion	273	nm
Ofentemperatur	50	°C
Steigung	24473,63	[FE]·mL/µg
Ordinatenabschnitt	8922,23	[FE]
Korrelationskoeffizient	0,99995	
Bestimmtheitsmaß	0,99990	
Bestimmungsgrenze (Gottwald)	1,622	µg/mL
Nachweisgrenze (Gottwald)	0,450	µg/mL

Tabelle 8.4-9: Kalibrierung für Nonivamid 85,0-850,0 µg/mL (Peakfläche).

Konzentrationsbereich		85,0-850,0	µg/mL
Verwendet für	Verteilungskoeffizient		
Injektionsvolumen		1	µL
Fließmittelzusammensetzung	Methanol/Phosphorsäure pH3,0	59,5:40,5	
Flussrate		1,125	mL/min
Detektion		273	nm
Ofentemperatur		40	°C
Steigung		1232,63	[FE]·mL/µg
Ordinatenabschnitt		-2188,83	[FE]
Korrelationskoeffizient		0,99982	
Bestimmtheitsmaß		0,99965	
Bestimmungsgrenze (Gottwald)		24,225	µg/mL
Nachweisgrenze (Gottwald)		6,741	µg/mL

8.4.2 Nonivamid gelöst in PBE

Tabelle 8.4-10: Kalibrierung für Nonivamid 1,0-10,0 µg/mL (Peakfläche).

Konzentrationsbereich		1,0-10,0	µg/mL
Verwendet für	Permeationsuntersuchungen		
Injektionsvolumen		50	µL
Fließmittelzusammensetzung	Methanol/Phosphorsäure pH3,0	50:50	
Flussrate		1,15	mL/min
Detektion		273	nm
Ofentemperatur		50	°C
Steigung		243576,0806	[FE]·mL/µg
Ordinatenabschnitt		21647,5672	[FE]
Korrelationskoeffizient		0,99987	
Bestimmtheitsmaß		0,99973	
Bestimmungsgrenze (Gottwald)		0,252	µg/mL
Nachweisgrenze (Gottwald)		0,070	µg/mL

Tabelle 8.4-11: Kalibrierung für Nonivamid 10,0-100,0 µg/mL (Peakfläche).

Konzentrationsbereich		10,0-100,0	µg/mL
Verwendet für	Permeationsuntersuchungen		
Injektionsvolumen		50	µL
Fließmittelzusammensetzung	Methanol/Phosphorsäure pH3,0	50:50	
Flussrate		1,15	mL/min
Detektion		273	nm
Ofentemperatur		50	°C
Steigung		234336,1582	[FE]·mL/µg
Ordinatenabschnitt		56762,3957	[FE]
Korrelationskoeffizient		0,99998	
Bestimmtheitsmaß		0,99997	
Bestimmungsgrenze (Gottwald)		0,906	µg/mL
Nachweisgrenze (Gottwald)		0,251	µg/mL

8.4.3 Nonivamid gelöst in Acetonitril

Tabelle 8.4-12: Kalibrierung für Nonivamid 0,04-1,0 µg/mL (Peakfläche).

Konzentrationsbereich		0,04-1,0	µg/mL
Verwendet für	Penetrationsuntersuchungen, Permeationsuntersuchungen		
Injektionsvolumen		50	µL
Fließmittelzusammensetzung	Methanol/Phosphorsäure pH3,0	50:50	
Flussrate		1,15	mL/min
Detektion		273	nm
Ofentemperatur		50	°C
Steigung		31936,3822	[FE]·mL/µg
Ordinatenabschnitt		24,0338	[FE]
Korrelationskoeffizient		0,99996	
Bestimmtheitsmaß		0,99992	
Bestimmungsgrenze (Gottwald)		0,012	µg/mL
Nachweisgrenze (Gottwald)		0,003	µg/mL

Tabelle 8.4-13: Kalibrierung für Nonivamid 0,1-1,0 µg/mL (Peakfläche).

Konzentrationsbereich		0,1-1,0	µg/mL
Verwendet für	Permeationsuntersuchungen		
Injektionsvolumen		50	µL
Fließmittelzusammensetzung	Methanol/Phosphorsäure pH3,0	50:50	
Flussrate		1,15	mL/min
Detektion		273	nm
Ofentemperatur		50	°C
Steigung		41193,9921	[FE] mL/µg
Ordinatenabschnitt		-47,4904	[FE]
Korrelationskoeffizient		0,99958	
Bestimmtheitsmaß		0,99916	
Bestimmungsgrenze (Gottwald)		0,045	µg/mL
Nachweisgrenze (Gottwald)		0,013	µg/mL

Tabelle 8.4-14: Kalibrierung für Nonivamid 1,0-10,0 µg/mL (Peakfläche).

Konzentrationsbereich		1,0-10,0	µg/mL
Verwendet für	Penetrationsuntersuchungen, Permeationsuntersuchungen, Sättigungslöslichkeit Akzeptormedien,		
Injektionsvolumen		50	µL
Fließmittelzusammensetzung	Methanol/Phosphorsäure pH3,0	50:50	
Flussrate		1,15	mL/min
Detektion		273	nm
Ofentemperatur		50	°C
Steigung		40642,6757	[FE]·mL/µg
Ordinatenabschnitt		1616,6846	[FE]
Korrelationskoeffizient		0,99871	
Bestimmtheitsmaß		0,99743	
Bestimmungsgrenze (Gottwald)		0,766	µg/mL
Nachweisgrenze (Gottwald)		0,216	µg/mL

Tabelle 8.4-15: Kalibrierung für Nonivamid 6,0-75,0 µg/mL (Peakfläche).

Konzentrationsbereich		6,0-75,0	µg/mL
Verwendet für	Wasserfestigkeit (Referenzen)		
Injektionsvolumen		1	µL
Fließmittelzusammensetzung	Methanol/Phosphorsäure pH3,0	59,5:40,5	
Flussrate		1,125	mL/min
Detektion		273	nm
Ofentemperatur		40	°C
Steigung		1181,63	[FE]·mL/µg
Ordinatenabschnitt		-190,73	[FE]
Korrelationskoeffizient		0,99982	
Bestimmtheitsmaß		0,99964	
Bestimmungsgrenze (Gottwald)		2,005	µg/mL
Nachweisgrenze (Gottwald)		0,557	µg/mL

Tabelle 8.4-16: Kalibrierung für Nonivamid 10,0-100,0 µg/mL (Peakfläche).

Konzentrationsbereich		10,0-100,0	µg/mL
Verwendet für	Penetrationsuntersuchungen, Sättigungslöslichkeit Akzeptormedien, Wasserfestigkeit (Referenzen)		
Injektionsvolumen		50	µL
Fließmittelzusammensetzung	Methanol/Phosphorsäure pH3,0	50:50	
Flussrate		1,15	mL/min
Detektion		273	nm
Ofentemperatur		50	°C
Steigung		45358,3223	[FE]·mL/µg
Ordinatenabschnitt		-4536,4675	[FE]
Korrelationskoeffizient		0,99903	
Bestimmtheitsmaß		0,99806	
Bestimmungsgrenze (Gottwald)		6,674	µg/mL
Nachweisgrenze (Gottwald)		1,879	µg/mL

8.5 Statistische Auswertung

8.5.1 Sättigungslöslichkeit von Nonivamid in verschiedenen Ölen

Tabelle 8.5-1: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Sättigungslöslichkeit).

ZUSAMMENFASSUNG						
Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz		
Rizinusöl	3	189,274	63,091	28,476		
C12-15 Alkylbenzoat	3	44,795	14,932	0,051		
Mittelkettige Triglyceride	3	43,638	14,546	0,003		
Isopropylmyristat	3	26,653	8,884	0,054		
ANOVA						
Streuungsursache	Quadratsummen (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	5762,387	3	1920,796	268,797	2,283E-08	4,066
Innerhalb der Gruppen	57,167	8	7,146			
Gesamt	5819,555	11				
NEWMAN-KEULS						
	Rizinusöl (4)	C12-15 Alkylbenzoat (3)	Mittelkettige Triglyceride (2)	Isopropylmyristat (1)		
Mittelwerte [$\mu\text{g/ml}$]	63,091	14,932	14,546	8,884		
Anzahl Ergebnisse	12					
Gruppen	4					
Wiederholungen	3					
Freiheitsgrade	8					
S_{in}^2	7,146					
Vergleich	Ergebnis	k	q	D	signifikant	
4 minus 3	48,160	2	3,261	1,422	ja	
4 minus 2	48,545	3	4,04	1,762	ja	
4 minus 1	54,207	4	4,53	1,976	ja	
3 minus 2	0,386	2	3,261	1,422	nein	
3 minus 1	6,047	3	4,04	1,762	ja	
2 minus 1	5,661	2	3,261	1,422	ja	

8.5.2 Ölabsorptionskapazität von Kieselgelen

Tabelle 8.5-2: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Ölabsorptionskapazität).

<i>Gruppen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Summe</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Varianz</i>		
Raffiniertes Rizinusöl	5	1282,67	256,53	58,065		
C12-15 Alkylbenzoat	5	1456,48	291,30	62,201		
Mittelkettige Triglyceride	5	1398,84	279,77	35,430		
Isopropylmyristat	5	1224,69	244,94	123,436		
Mandelöl	5	1267,57	253,51	94,425		
Paraffinum liquidum	5	1288,90	257,78	37,976		

ANOVA						
<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadrat summe (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüf-größe (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	7806,96	5,00	1561,39	22,76	2,17E-08	2,62
Innerhalb der Gruppen	1646,13	24,00	68,59			
Gesamt	9453,09	29,00				

NEWMAN-KEULS	6	5	4	3	2	1
	C12-15 Alkylbenzoat	Mittelkettige Triglyceride	Paraffinum liquidum	Raffiniertes Rizinusöl	Mandelöl	Isopropylmyristat
Mittelwerte [$\mu\text{g/ml}$]	291,30	279,77	257,78	256,53	253,51	244,94
Anzahl Ergebnisse	30					
Gruppen	6					
Wiederholungen	5					
Freiheitsgrade	24					
S_{in}^2	68,59					

Vergleich	Ergebnis	k	q	D	Signifikant
6 minus 5	11,53	2	2,919	10,81	ja
6 minus 4	33,52	3	3,53	13,07	ja
6 minus 3	34,76	4	3,9	14,44	ja
6 minus 2	37,78	5	4,17	15,44	ja
6 minus 1	46,36	6	4,37	16,19	ja
5 minus 4	21,99	2	2,919	10,81	ja
5 minus 3	23,23	3	3,53	13,07	ja
5 minus 2	26,25	4	3,9	14,44	ja
5 minus 1	34,83	5	4,17	15,44	ja
4 minus 3	1,25	2	2,919	10,81	nein
4 minus 2	4,27	3	3,53	13,07	nein
4 minus 1	12,84	4	3,9	14,44	nein
3 minus 2	3,02	2	2,919	10,81	nein
3 minus 1	11,60	3	3,53	13,07	nein
2 minus 1	8,57	2	2,919	10,81	nein

8.5.3 Nominelle Bruchdehnung

Tabelle 8.5-3: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Nominelle Bruchdehnung).

ZUSAMMENFASSUNG						
Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz		
FF22,5 FP KM	3	8,16	2,72	1,47E-02		
FF25,0 FP KM	3	7,95	2,65	5,04E-01		
FF27,5 FP KM	3	7,33	2,44	3,33E-05		
FF22,5 XDP SM	5	16,19	3,24	7,89E-01		
FF25,0 XDP SM	5	7,05	1,41	1,35E-01		
FF27,5 XDP SM	5	11,65	2,33	1,05E-01		

ANOVA						
Streuungsursache	Quadratsummen (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	8,9195	5	1,7839	6,2309	0,0016	2,7729
Innerhalb der Gruppen	5,1534	18	0,2863			
Gesamt	14,0729	23				

NEWMAN-KEULS	6	5	4	3	2	1
	FF22,5 XDP SM	FF22,5 FP KM	FF25,0 FP KM	FF27,5 FP KM	FF27,5 XDP SM	FF25,0 XDP SM
Mittelwerte [%]	3,24	2,72	2,65	2,44	2,33	1,41
Anzahl Ergebnisse	24					
Gruppen	6					
Wiederholungen	4					
Freiheitsgrade	18					
Sin ²	0,2863					

Vergleich	Ergebnis	k	q	D	signifikant
6 minus 5	0,52	2	2,97	0,795	nein
6 minus 4	0,59	3	3,61	0,966	nein
6 minus 3	0,79	4	4	1,070	nein
6 minus 2	0,91	5	4,28	1,145	nein
6 minus 1	1,83	6	4,49	1,201	ja
5 minus 4	0,07	2	2,97	0,795	nein
5 minus 3	0,28	3	3,61	0,966	nein
5 minus 2	0,39	4	4	1,070	nein
5 minus 1	1,31	5	4,28	1,145	ja
4 minus 3	0,21	2	2,97	0,795	nein
4 minus 2	0,32	3	3,61	0,966	nein
4 minus 1	1,24	4	4	1,070	ja
3 minus 2	0,11	2	2,97	0,795	nein
3 minus 1	1,03	3	3,61	0,966	ja
2 minus 1	0,92	2	2,97	0,795	ja

8.5.4 Adhäsionskraft

Tabelle 8.5-4: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse (Adhäsionskraft).

ZUSAMMENFASSUNG						
<i>Gruppen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Summe</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Varianz</i>		
FF25 FP BM	5	35,95	7,19	1,307		
FF25 XDP SM	5	32,93	6,59	0,387		
Weichgemachtes Eudragit® RS	5	30,90	6,18	0,981		
Transdermales Pflaster	5	39,10	7,82	5,758		
ANOVA						
<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	7,699	3	2,566	1,217	0,336	3,239
Innerhalb der Gruppen	33,732	16	2,108			
Gesamt	41,431	19				

8.5.5 Wasserfestigkeit

8.5.5.1 Freigesetzter Anteil bezogen auf Referenzfilmstück

Tabelle 8.5-5: Zusammenfassung des t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Wasserfestigkeit, FF22,5).

	FF22,5 FP KM	FF22,5 XDP SM
Mittelwert	3,758	3,542
Varianz	0,096	0,113
Beobachtungen	3	3
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
Freiheitsgrade (df)	4	
t-Statistik	0,815	
P(T<=t) einseitig	0,230	
Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	2,132	
P(T<=t) zweiseitig	0,461	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2,776	

Tabelle 8.5-6: Zusammenfassung des t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Wasserfestigkeit, FF25,0).

	FF25,0 FP KM	FF25,0 XDP SM
Mittelwert	4,869	2,867
Varianz	0,002	0,085
Beobachtungen	3	3
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
Freiheitsgrade (df)	2	
t-Statistik	11,768	
P(T<=t) einseitig	0,004	
Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	2,920	
P(T<=t) zweiseitig	0,007	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	4,303	

Tabelle 8.5-7: Zusammenfassung des t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Wasserfestigkeit, FF27,5).

	FF27,5 FP KM	FF27,5 XDP SM
Mittelwert	5,091	5,516
Varianz	0,130	0,175
Beobachtungen	3	3
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
Freiheitsgrade (df)	4	
t-Statistik	-1,330	
P(T<=t) einseitig	0,127	
Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	2,132	
P(T<=t) zweiseitig	0,254	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2,776	

8.5.5.2 Freigesetzter Anteil unter Berücksichtigung des Verteilungskoeffizienten

Tabelle 8.5-8: Zusammenfassung des t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Wasserfestigkeit, VK, FF22,5).

	FF22,5 FP KM	FF22,5 XDP SM
Mittelwert	13,438	12,595
Varianz	1,233	1,423
Beobachtungen	3	3
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
Freiheitsgrade (df)	4	
t-Statistik	0,895	
P(T<=t) einseitig	0,211	
Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	2,132	
P(T<=t) zweiseitig	0,421	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2,776	

Tabelle 8.5-9: Zusammenfassung des t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Wasserfestigkeit, VK, FF25,0).

	FF25,0 FP KM	FF25,0 XDP SM
Mittelwert	16,895	12,651
Varianz	0,020	1,657
Beobachtungen	3	3
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
Freiheitsgrade (df)	2	
t-Statistik	5,676	
P(T<=t) einseitig	0,015	
Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	2,920	
P(T<=t) zweiseitig	0,030	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	4,303	

Tabelle 8.5-10: Zusammenfassung des t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Wasserfestigkeit, VK, FF27,5).

	FF27,5 FP KM	FF27,5 XDP SM
Mittelwert	16,895	16,703
Varianz	1,433	1,606
Beobachtungen	3	3
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
Freiheitsgrade (df)	4	
t-Statistik	0,191	
P(T<=t) einseitig	0,429	
Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	2,132	
P(T<=t) zweiseitig	0,857	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2,776	

8.5.6 In vitro Freisetzungsuntersuchungen

Tabelle 8.5-11: Zusammenfassung des t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Freisetzungsraten, FF 0,9 %).

	<i>FF 0,9 % (3-24 h)</i>	<i>FF 0,9 % (16-44 h)</i>
Mittelwert	121,973	120,183
Varianz	1221,903	906,758
Beobachtungen	4	5
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
Freiheitsgrade (df)	6	
t-Statistik	0,081	
P(T<=t) einseitig	0,469	
Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	1,943	
P(T<=t) zweiseitig	0,938	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2,447	

Tabelle 8.5-12: Zusammenfassung des t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen (Freisetzungsraten, FF 0,09 %).

	<i>FF 0,09 % (3-24 h)</i>	<i>FF 0,09 % (16-44 h)</i>
Mittelwert	8,748	6,961
Varianz	3,167	0,143
Beobachtungen	5	5
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
Freiheitsgrade (df)	4	
t-Statistik	2,196	
P(T<=t) einseitig	0,047	
Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	2,132	
P(T<=t) zweiseitig	0,093	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2,776	

8.5.7 Untersuchung der Arzneistoffabsorption

8.5.7.1 Ex vivo Permeationsuntersuchungen

8.5.7.1.1 Vergleich HNC 0,9 %, HNC 0,1 %, FF 0,9 % (PBE-Medium)

8.5.7.1.1.1 Permeationsrate

Tabelle 8.5-13: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Permeationsrate HNC 0,9 %, HNC 0,1 %, FF 0,9 %; PBE-Medium).

ZUSAMMENFASSUNG

Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz
HNC 0,9 %	5	394,19	78,84	144,778
HNC 0,1 %	5	47,30	9,46	1,579
FF 0,9 %	5	12,19	2,44	1,138

ANOVA

Streuungsursache	Quadratsummen (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	Kritischer F-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	17832,88	2	8916,44	181,36	1,08E-09	3,89
Innerhalb der Gruppen	589,98	12	49,16			
Gesamt	18422,86	14				

NEWMAN-KEULS

	3	2	1
Formulierung	HNC 0,9 %	HNC 0,1 %	FF 0,9 %
Mittelwerte	78,84	9,46	2,44

Anzahl Ergebnisse	15
Gruppen	3
Wiederholungen	5
Freiheitsgrade	12
S(in) ²	49,16

Vergleich	Ergebnis	k	q	D	signifikant
HNC 0,9/ HNC 0,1	69,38	2	3,08	9,66	ja
HNC 0,9/FF	76,40	3	3,77	11,82	ja
HNC 0,1/FF	7,02	2	3,08	9,66	nein

8.5.7.1.1.2 Permeationskoeffizient

Tabelle 8.5-14: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Permeationskoeffizient HNC 0,9 %, HNC 0,1 %, FF 0,9 %; PBE-Medium).

ZUSAMMENFASSUNG

Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz
HNC 0,9 %	5	4,38E-02	8,76E-03	1,787E-06
HNC 0,1 %	5	4,73E-02	9,46E-03	1,579E-06
FF 0,9 %	5	1,35E-03	2,71E-04	1,405E-08

ANOVA

Streuungsursache	Quadratsummen (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	2,62E-04	2	1,31E-04	116,13	1,41E-08	3,89
Innerhalb der Gruppen	1,35E-05	12	1,13E-06			
Gesamt	2,75E-04	14				

NEWMAN-KEULS

	3	2	1
Formulierung	HNC 0,1 %	HNC 0,9 %	FF 0,9 %
Mittelwerte	9,46E-03	8,76E-03	2,71E-04

Anzahl Ergebnisse	15
Gruppen	3
Wiederholungen	5
Freiheitsgrade	12
S(in) ²	1,13E-06

Vergleich	Ergebnis	k	q	D	signifikant
HNC 0,9/HNC 0,1	7,01E-04	2	3,08	1,46E-03	nein
HNC 0,9/FF	9,19E-03	3	3,77	1,79E-03	ja
HNC 0,1/FF	9,19E-03	2	3,08	1,46E-03	ja

8.5.7.1.2 Vergleich HNC 0,9 %, HNC 0,1 %, FF 0,9 % (BSA/PBS-Medium)

8.5.7.1.2.1 Permeationsrate

Tabelle 8.5-15: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Permeationsrate HNC 0,9 %, HNC 0,1 %, FF 0,9 %; BSA/PBS-Medium).

ZUSAMMENFASSUNG

Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz
HNC 0,9 %	5	24,11	4,82	1,778
HNC 0,1 %	5	5,04	1,01	0,058
FF 0,9 %	5	1,104	0,22	0,006

ANOVA

Streuungsursache	Quadratsummen (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	60,59	2	30,29	49,33	1,62E-06	3,89
Innerhalb der Gruppen	7,37	12	0,61			
Gesamt	67,96	14				

NEWMAN-KEULS

	3	2	1
Formulierung	HNC 0,9 %	HNC 0,1 %	FF 0,9 %
Mittelwerte	4,82	1,01	0,22

Anzahl Ergebnisse	15
Gruppen	3
Wiederholungen	5
Freiheitsgrade	12
S(in) ²	0,61

Vergleich	Ergebnis	k	q	D	signifikant
HNC 0,9/HNC 0,1	3,82	2	3,08	1,08	ja
HNC 0,9/FF	4,60	3	3,77	1,32	ja
HNC 0,1/FF	0,79	2	3,08	1,08	nein

8.5.7.1.2.2 Permeationskoeffizient

Tabelle 8.5-16: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Permeationskoeffizient HNC 0,9 %, HNC 0,1 %, FF 0,9 %; BSA/PBS-Medium).

ZUSAMMENFASSUNG						
Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz		
HNC 0,9 %	5	2,68E-03	5,36E-04	2,195E-08		
HNC 0,1 %	5	5,04E-03	1,01E-03	5,793E-08		
FF 0,9 %	5	1,22E-04	2,45E-05	7,369E-11		

ANOVA						
Streuungsursache	Quadratsummen (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	2,42E-06	2	1,21E-06	45,31	2,56E-06	3,89
Innerhalb der Gruppen	3,20E-07	12	2,66E-08			
Gesamt	2,74E-06	14				

NEWMAN-KEULS			
	3	2	1
Formulierung	HNC 0,1 %	HNC 0,9 %	FF 0,9 %
Mittelwerte	1,01E-03	5,36E-04	2,45E-05

Anzahl Ergebnisse	15
Gruppen	3
Wiederholungen	5
Freiheitsgrade	12
S(in) ²	2,66E-08

Vergleich	Ergebnis	k	q	D	signifikant
HNC 0,1/HNC 0,9	4,71E-04	2	3,08	2,25E-04	ja
HNC 0,1/FF	9,83E-04	3	3,77	2,75E-04	ja
HNC 0,9/FF	5,11E-04	2	3,08	2,25E-04	ja

8.5.7.1.2.3 Vergleich der normierten Permeationsraten

Tabelle 8.5-17: Zusammenfassung des t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen: Vergleich der Permeation von Nonivamid aus HNC 0,9 % bei Verwendung verschiedener Akzeptormedien.

	HNC 0,9 % (PBS)	HNC 0,9 % (PBE)
Mittelwert	21,88	32,34
Varianz	36,62	24,36
Beobachtungen	5	5
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
Freiheitsgrade (df)	8	
t-Statistik	-2,99	
P(T<=t) einseitig	0,01	
Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	1,86	
P(T<=t) zweiseitig	0,02	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2,31	

Tabelle 8.5-18: Zusammenfassung des t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen: Vergleich der Permeation von Nonivamid aus HNC 0,1 % bei Verwendung verschiedener Akzeptormedien.

	HNC 0,1 % (PBS)	HNC 0,1 % (PBE)
Mittelwert	4,57	3,88
Varianz	1,19	0,27
Beobachtungen	5	5
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
Freiheitsgrade (df)	6	
t-Statistik	1,28	
P(T<=t) einseitig	0,12	
Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	1,94	
P(T<=t) zweiseitig	0,25	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2,45	

8.5.7.1.3 Vergleich HNC 0,05 %, FF 0,9 %, HNC 0,025 % (BSA/PBS-Medium)

8.5.7.1.3.1 Permeationsrate

Tabelle 8.5-19: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse (Permeationsrate HNC 0,05 %; FF 0,9 %; HNC 0,025 %; BSA/PBS-Medium).

ZUSAMMENFASSUNG						
<i>Gruppen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Summe</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Varianz</i>		
HNC 0,025 %	5	0,430	0,086	0,0044		
HNC 0,05 %	5	0,747	0,149	0,0035		
FF 0,9 %	5	0,413	0,083	0,0017		

ANOVA						
<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	0,014	2	0,007	2,196	0,154	3,885
Innerhalb der Gruppen	0,039	12	0,003			
Gesamt	0,053	14				

8.5.7.1.3.2 Permeationskoeffizient

Tabelle 8.5-20: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Permeationskoeffizient HNC 0,05 %, FF 0,9 %, HNC 0,025 %; BSA/PBS-Medium).

ZUSAMMENFASSUNG

Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz
HNC 0.025 %	5	1,65E-03	3,31E-04	2,74E-08
HNC 0.05 %	5	1,49E-03	2,99E-04	1,40E-08
FF 0.9 %	5	4,77E-05	9,55E-06	5,48E-11

ANOVA

Streuungsursache	Quadratsummen (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	3,13E-07	2	1,57E-07	11,33	1,72E-03	3,89
Innerhalb der Gruppen	1,66E-07	12	1,38E-08			
Gesamt	4,79E-07	14				

NEWMAN-KEULS

	3	2	1
Formulierung	HNC 0,025 %	HNC 0,05 %	FF 0,9 %
Mittelwerte	3,31E-04	2,99E-04	9,55E-06

Anzahl Ergebnisse	15
Gruppen	3
Wiederholungen	5
Freiheitsgrade	12
S(in) ²	1,38E-08

Vergleich	Ergebnis	k	q	D	signifikant
HNC 0,025/ HNC 0,05	3,20E-05	2	3,08	1,62E-04	nein
HNC 0,025/FF	3,21E-04	3	3,77	1,98E-04	ja
HNC 0,05/FF	2,89E-04	2	3,08	1,62E-04	ja

8.5.7.1.4 Vergleich FF 0,81 %, FF 0,90 %, HNC 0,99 % (BSA/PBS-Medium)

8.5.7.1.4.1 Permeationsrate

Tabelle 8.5-21: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Permeationsrate FF 0,81 %; FF 0,9 %; FF 0,91 %; BSA/PBS-Medium).

ANOVA						
<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	1,82E-02	2	9,12E-03	10,14	2,64E-03	3,89
Innerhalb der Gruppen	1,08E-02	12	8,99E-04			
Gesamt	2,90E-02	14				

NEWMAN-KEULS			
	3	2	1
	FF	FF	FF
Formulierung	0,99 %	0,81 %	0,90 %
Mittelwerte	0,157	0,104	0,073

Anzahl Ergebnisse	15
Gruppen	3
Wiederholungen	5
Freiheitsgrade	12
S(in) ²	8,993E-04

Vergleich	Ergebnis	k	q	D	signifikant
FF 0,99 / FF 0,81	5,29E-02	2	3,08	0,041	ja
FF 0,99 / FF 0,90	8,46E-02	3	3,77	0,051	ja
FF 0,81 / FF 0,90	3,17E-02	2	3,08	0,041	nein

8.5.7.1.4.2 Permeationskoeffizient

Tabelle 8.5-22: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Permeationskoeffizient FF 0,81 %, FF 0,90 %, FF 0,99 %; BSA/PBS-Medium).

ANOVA						
<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	1,55E-10	2	7,76E-11	7,30	8,43E-03	3,89
Innerhalb der Gruppen	1,28E-10	12	1,06E-11			
Gesamt	2,83E-10	14				

NEWMAN-KEULS			
	3	2	1
Formulierung	FF 0,99 %	FF 0,81 %	FF 0,90 %
Mittelwerte	1,59E-05	1,29E-05	8,06E-06

Anzahl Ergebnisse	15
Gruppen	3
Wiederholungen	5
Freiheitsgrade	12
S(in) ²	1,06E-11

Vergleich	Ergebnis	k	q	D	signifikant
FF 0,99 / FF 0,81	3,00E-06	2	3,08	4,49E-06	nein
FF 0,99 / FF 0,90	7,81E-06	3	3,77	5,50E-06	ja
FF 0,81 / FF 0,90	4,81E-06	2	3,08	4,49E-06	ja

8.5.7.1.5 Vergleich HNC 0,05 %, FF 0,9 % gel., HNC 0,025 % (BSA/PBS-Medium)

8.5.7.1.5.1 Permeationsrate

Tabelle 8.5-23: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Permeationsrate HNC 0,05 %; FF 0,9 % gel.; HNC 0,025 %; BSA/PBS-Medium).

ANOVA						
<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	1,05E-01	2	5,23E-02	20,77	1,27E-04	3,89
Innerhalb der Gruppen	3,02E-02	12	2,52E-03			
Gesamt	1,35E-01	14				

NEWMAN-KEULS			
	3	2	1
Formulierung	HNC 0.05 %	FF 0.9 % gel.	HNC 0.025 %
Mittelwerte	3,39E-01	2,00E-01	1,39E-01

Anzahl Ergebnisse	15
Gruppen	3
Wiederholungen	5
Freiheitsgrade	12
S(in) ²	2,52E-03

Vergleich	Ergebnis	k	q	D	signifikant
HNC 0,05/FFF	1,39E-01	2	3,08	6,91E-02	ja
HNC 0,05/ HNC 0,025	1,99E-01	3	3,77	8,46E-02	ja
FFF/HNC 0,025	6,02E-02	2	3,08	6,91E-02	nein

8.5.7.1.5.2 Permeationskoeffizient

Tabelle 8.5-24: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests (Permeationskoeffizient HNC 0,05 %; FF 0,9 % gel.; HNC 0,025 %; BSA/PBS-Medium).

ANOVA

<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	1,22E-06	2	6,08E-07	70,80	2,27E-07	3,89
Innerhalb der Gruppen	1,03E-07	12	8,59E-09			
Gesamt	1,32E-06	14				

NEWMAN-KEULS

	3	2	1
Formulierung	HNC 0.05 %	HNC 0.025 %	FFF 0.9 % gel.
Mittelwerte	6,77E-04	5,57E-04	2,22E-05

Anzahl
 Ergebnisse 15
 Gruppen 3
 Wiederholungen 5
 Freiheitsgrade 12
 S(in)² 8,59E-09

Vergleich	Ergebnis	k	q	D	signifikant
HNC 0,05/ HNC 0,025	1,20E-04	2	3,08	1,28E-04	nein
HNC 0,05/FF	6,55E-04	3	3,77	1,56E-04	ja
HNC 0,025/FF	5,35E-04	2	3,08	1,28E-04	ja

8.5.7.1.6 Äquivalenzprüfung der ex vivo Permeationsuntersuchungen mit infiniten Dosis

Tabelle 8.5-25: Äquivalenzprüfung der Permeationsraten (Referenz: FF 0,9 %) in Anlehnung an die SUPAC-SS (FDA, 2004).

	HNC 0,9 % (PBE)	HNC 0,1 % (PBE)	HNC 0,9 % (BSA)	HNC 0,1 %(BSA)	HNC 0,05 % (BSA)	HNC 0,025 % (BSA)	HNC 0,05 % (BSA)	HNC 0,025 % (BSA)
Median	33,449	3,903	22,547	4,377	2,118	1,093	1,757	0,755
KI oben	41,351	4,857	28,105	6,099	3,512	1,813	1,941	0,773
KI unten	24,833	2,908	17,342	3,725	1,272	0,640	1,368	0,601

Tabelle 8.5-26: Äquivalenzprüfung der Permeationskoeffizienten (Referenz: FF 0,9 %) in Anlehnung an die SUPAC-SS (FDA, 2004).

	HNC 0,9 % (PBE)	HNC 0,1 % (PBE)	HNC 0,9 % (BSA)	HNC 0,1 %(BSA)	HNC 0,05 % (BSA)	HNC 0,025 % (BSA)	HNC 0,05 % (BSA)	HNC 0,025 % (BSA)
Median	33,449	35,131	22,547	39,391	38,115	39,349	31,632	27,177
KI oben	41,351	43,711	28,105	54,895	63,219	65,266	34,937	27,810
KI unten	24,833	26,173	17,342	33,521	22,904	23,057	24,626	21,640

Tabelle 8.5-27: Äquivalenzprüfung der Permeationsraten (Referenz: HNC 0,05 %) in Anlehnung an die SUPAC-SS (FDA, 2004).

	FF 0,9 %	FF 0,9 % gel.
Median	0,472	0,569
KI oben	0,786	0,731
KI unten	0,285	0,515

8.5.7.2 Ergebnisse der Absorption von Nonivamid in die Haut mit Hilfe einer Klebebandabriss-Technik

Tabelle 8.5-28: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests.

ZUSAMMENFASSUNG						
Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz		
FF 0,90 %	5	8636,6	1727,3	284049,5		
FF 0,09 %	5	1044,4	208,9	6840,24		
HNC0,05 %	5	485,1	97,0	2769,96		

ANOVA						
Streuungs- ursache	Quadrat- summen (SS)	Freiheits- grade (df)	Mittlere Quadrat- summe (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	8293603,33	2	4146801,67	42,36	3,6E-06	3,89
Innerhalb der Gruppen	1174639,12	12	97886,5931			
Gesamt	9468242,45	14				

NEWMAN-KEULS			
Formulierung	3	2	1
	FF 0,90 %	FF 0,09 %	HNC 0,05 %
Mittelwerte	1727,34	208,88	97,02
Anzahl Ergebnisse	15		
Gruppen	3		
Wiederholungen	5		
Freiheitsgrade	12		
S(in) ²	97886,59		

Vergleich	Ergebnis	k	q	D	signifikant
FF 0,90 %/FF 0,09 %	1518,46	2	3,08	430,95	ja
FF 0,90 %/HNC 0,05 %	1630,32	3	3,77	527,49	ja
FF 0,09 % /HNC 0.05 %	111,86	2	3,08	430,95	nein

8.5.8 In vivo Hautverträglichkeitsstudien

8.5.8.1 Hydratation des Stratum corneum

8.5.8.1.1 Interner Vergleich

Tabelle 8.5-29: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung der SCH zu Beginn der Studie und nach einstündiger Applikation von HNC 0,05 %.

ZUSAMMENFASSUNG						
<i>Gruppen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Summe</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Varianz</i>		
basal	21	808	38,48	64,56		
1h	21	1050	50,00	119,60		

ANOVA						
<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	1394,38	1	1394,38	15,14	3,68E-04	4,08
Innerhalb der Gruppen	3683,24	40	92,08			
Gesamt	5077,62	41				

Tabelle 8.5-30: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung der SCH zu Beginn der Studie und nach einstündiger Applikation von FF 0,09 %.

ZUSAMMENFASSUNG						
<i>Gruppen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Summe</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Varianz</i>		
basal	21	787	37,48	60,16		
1 h	21	827	39,38	89,95		

ANOVA						
<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	38,10	1	38,10	0,51	0,48	4,08
Innerhalb der Gruppen	3002,19	40	75,05			
Gesamt	3040,29	41				

Tabelle 8.5-31: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung der SCH zu Beginn der Studie und nach einstündiger Applikation von FF Placebo.

ZUSAMMENFASSUNG						
<i>Gruppen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Summe</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Varianz</i>		
basal	21	822	39,14	103,13		
1 h	21	867	41,29	127,41		

ANOVA						
<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	48,21	1	48,21	0,42	0,52	4,08
Innerhalb der Gruppen	4610,86	40	115,27			
Gesamt	4659,07	41				

Tabelle 8.5-32: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung der SCH (Kontrolle).

ZUSAMMENFASSUNG						
<i>Gruppen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Summe</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Varianz</i>		
basal	21	867	41,29	129,81		
1 h	21	776	36,95	111,45		

ANOVA						
<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	197,17	1	197,17	1,63	0,21	4,08
Innerhalb der Gruppen	4825,24	40	120,63			
Gesamt	5022,40	41				

8.5.8.1.2 Externer Vergleich

Tabelle 8.5-33: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse der SCH (Basalwerte).

ZUSAMMENFASSUNG

<i>Gruppen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Summe</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Varianz</i>
HNC 0,05 %	21	808	38,48	64,56
FF 0,09 %	21	787	37,48	60,16
FF Placebo	21	822	39,14	103,13
Kontrolle	21	867	41,29	129,81

ANOVA

<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	163,90	3	54,63	0,61	0,61	2,72
Innerhalb der Gruppen	7153,33	80	89,42			
Gesamt	7317,24	83				

Tabelle 8.5-34: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests der SCH (Werte nach einstündiger Inkubation).

ZUSAMMENFASSUNG

Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz
HNC 0,05 %	21	1050	50,00	119,60
FF 0,09 %	21	827	39,38	89,95
FF Placebo	21	867	41,29	127,41
Kontrolle	21	776	36,95	111,45

ANOVA

Streuungsursache	Quadratsummen (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	2033,05	3	677,68	6,05	9,19E-04	2,72
Innerhalb der Gruppen	8968,19	80	112,10			
Gesamt	11001,24	83				

NEWMAN-KEULS

	4	3	2	1
Formulierung	HNC 0,05 %	FF Placebo	FF 0,09 %	Kontrolle
Mittelwerte	50,00	41,29	39,38	36,95

Anzahl Ergebnisse	84
Gruppen	4
Wiederholungen	21
Freiheitsgrade	80
S(in) ²	112,10

Vergleich	Ergebnis	k	q	D	signifikant
HNC 0,05/FF Placebo	8,71	2	2,83	4,39	ja
HNC 0,05/FF 0,09	10,62	3	3,40	5,27	ja
HNC 0,05/Kontrolle	13,05	4	3,74	5,80	ja
FF Placebo/FF 0,09	1,90	2	2,83	4,39	nein
FF Placebo/Kontrolle	4,33	3	3,40	5,27	nein
FF 0,09/Kontrolle	2,43	2	2,83	4,39	nein

Tabelle 8.5-35: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Student-Newman-Keuls-Tests der SCH (Absolute Änderung im Vergleich zu den Basalwerten).

ZUSAMMENFASSUNG						
Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz		
HNC 0,05 %	21	242	11,52	54,26		
FF 0,09 %	21	40	1,90	55,99		
FF Placebo	21	45	2,14	63,13		
Kontrolle	21	-91	-4,33	28,33		

ANOVA						
Streuungsursache	Quadratsummen (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	2692,67	3	897,56	17,80	6,09E-09	2,72
Innerhalb der Gruppen	4034,29	80	50,43			
Gesamt	6726,95	83				

NEWMAN-KEULS				
	4	3	2	1
Formulierung	HNC 0,05 %	FF Placebo	FF 0,09 %	Kontrolle
Mittelwerte	11,52	2,14	1,90	-4,33
Anzahl Ergebnisse	84			
Gruppen	4			
Wiederholungen	21			
Freiheitsgrade	80			
S(in) ²	50,43			

Vergleich	Ergebnis	k	q	D	signifikant
HNC 0,05/FF Placebo	9,38	2	2,83	4,39	ja
HNC 0,05/FF 0,09	9,62	3	3,40	5,27	ja
HNC 0,05/Kontrolle	15,86	4	3,74	5,80	ja
FF Placebo/FF 0,09	0,24	2	2,83	4,39	nein
FF Placebo/Kontrolle	6,48	3	3,40	5,27	ja
FF 0,09/Kontrolle	6,24	2	2,83	4,39	ja

8.5.8.2 Erythemindex

8.5.8.2.1 Interner Vergleich

Tabelle 8.5-36: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung des EI zu Beginn der Studie und nach einstündiger Applikation von HNC 0,05 %.

ZUSAMMENFASSUNG						
<i>Gruppen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Summe</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Varianz</i>		
basal	21	4976	236,95	1813,05		
1 h	21	4615	219,76	1019,89		

ANOVA						
<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	3102,88	1	3102,88	2,19	0,15	4,08
Innerhalb der Gruppen	56658,76	40	1416,47			
Gesamt	59761,64	41				

Tabelle 8.5-37: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung des EI zu Beginn der Studie und nach einstündiger Applikation von FF 0,09 %.

ZUSAMMENFASSUNG						
<i>Gruppen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Summe</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Varianz</i>		
basal	21	4851	231,00	1156,40		
1 h	21	5015	238,81	2191,16		

ANOVA						
<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	640,38	1	640,38	0,38	0,54	4,08
Innerhalb der Gruppen	66951,24	40	1673,78			
Gesamt	67591,62	41				

Tabelle 8.5-38: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung des EI zu Beginn der Studie und nach einstündiger Applikation von FF Placebo.

ZUSAMMENFASSUNG						
<i>Gruppen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Summe</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Varianz</i>		
basal	21	4774	227,33	1469,13		
1 h	21	4832	230,095	3017,69		

ANOVA						
<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	80,10	1	80,095	0,04	0,85	4,08
Innerhalb der Gruppen	89736,48	40	2243,41			
Gesamt	89816,57	41				

Tabelle 8.5-39: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung des EI (Kontrolle).

ZUSAMMENFASSUNG						
<i>Gruppen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Summe</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Varianz</i>		
basal	21	4752	226,29	1381,11		
1 h	21	4665	222,14	1064,93		

ANOVA						
<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	180,21	1	180,21	0,15	0,70	4,08
Innerhalb der Gruppen	48920,86	40	1223,02			
Gesamt	49101,07	41				

8.5.8.2.2 Externer Vergleich

Tabelle 8.5-40: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse des EI (Basalwerte).

ZUSAMMENFASSUNG				
<i>Gruppen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Summe</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Varianz</i>
HNC 0,05 %	21	4976	236,95	1813,05
FF 0,09 %	21	4851	231,00	1156,40
FF Placebo	21	4774	227,33	1469,13
Kontrolle	21	4752	226,29	1381,11

ANOVA						
<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	1462,13	3	487,38	0,33	0,80	2,72
Innerhalb der Gruppen	116393,90	80	1454,92			
Gesamt	117856,04	83				

Tabelle 8.5-41: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse des EI (Werte nach einstündiger Inkubation).

ZUSAMMENFASSUNG				
<i>Gruppen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Summe</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Varianz</i>
HNC 0,05 %	21	4615	219,76	1019,89
FF 0,09 %	21	5015	238,81	2191,16
FF Placebo	21	4832	230,10	3017,69
Kontrolle	21	4665	222,14	1064,93

ANOVA						
<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	4684,13	3	1561,38	0,86	0,47	2,72
Innerhalb der Gruppen	145873,43	80	1823,42			
Gesamt	150557,56	83				

Tabelle 8.5-42: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse des EI (Absolute Änderung im Vergleich zu den Basalwerten).

ZUSAMMENFASSUNG						
<i>Gruppen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Summe</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Varianz</i>		
HNC 0,05 %	21	-361	-17,19	687,26		
FF 0,09 %	21	164	7,81	1022,96		
FF Placebo	21	58	2,76	1436,49		
Kontrolle	21	-87	-4,14	659,53		

ANOVA						
<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	7399,10	3	2466,37	2,59	0,06	2,72
Innerhalb der Gruppen	76124,86	80	951,56			
Gesamt	83523,95	83				

8.5.8.3 Transepidermaler Wasserverlust

8.5.8.3.1 Interner Vergleich

Tabelle 8.5-43: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung des TEWL zu Beginn der Studie und nach einstündiger Applikation von HNC 0,05 %.

ZUSAMMENFASSUNG						
<i>Gruppen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Summe</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Varianz</i>		
basal	21	93,1	4,43	3,777		
1 h	21	110,1	5,24	4,173		

ANOVA						
<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	6,88	1	6,88	1,73	0,20	4,08
Innerhalb der Gruppen	159,00	40	3,97			
Gesamt	165,88	41				

Tabelle 8.5-44: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung des TEWL zu Beginn der Studie und nach einstündiger Applikation von FF 0,09 %.

ZUSAMMENFASSUNG						
<i>Gruppen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Summe</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Varianz</i>		
basal	21	89,70	4,27	2,95		
1 h	21	100,20	4,77	3,59		

ANOVA						
<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	2,63	1	2,63	0,80	0,38	4,08
Innerhalb der Gruppen	130,87	40	3,27			
Gesamt	133,49	41				

Tabelle 8.5-45: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung des TEWL zu Beginn der Studie und nach einstündiger Applikation von FF Placebo.

ZUSAMMENFASSUNG						
<i>Gruppen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Summe</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Varianz</i>		
basal	21	93,10	4,43	8,19		
1 h	21	88,50	4,21	4,93		

ANOVA						
<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	0,50	1	0,50	0,08	0,78	4,08
Innerhalb der Gruppen	262,51	40	6,56			
Gesamt	263,02	41				

Tabelle 8.5-46: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung der Veränderung des TEWL zu Beginn der Studie (Kontrolle).

ZUSAMMENFASSUNG						
<i>Gruppen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Summe</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Varianz</i>		
basal	21	109,70	5,22	12,71		
1 h	21	93,10	4,43	9,40		

ANOVA						
<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	6,56	1	6,56	0,59	0,45	4,08
Innerhalb der Gruppen	442,16	40	11,05			
Gesamt	448,73	41				

8.5.8.3.2 Externer Vergleich

Tabelle 8.5-47: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse des TEWL (Basalwerte).

ZUSAMMENFASSUNG				
<i>Gruppen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Summe</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Varianz</i>
HNC 0,05 %	21	93,10	4,43	3,78
FF 0,09 %	21	89,70	4,27	2,95
FF Placebo	21	93,10	4,43	8,19
Kontrolle	21	109,70	5,22	12,71

ANOVA						
<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	11,60	3	3,87	0,56	0,64	2,72
Innerhalb der Gruppen	552,59	80	6,91			
Gesamt	564,19	83				

Tabelle 8.5-48: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse des TEWL (Werte nach einstündiger Inkubation).

ZUSAMMENFASSUNG				
<i>Gruppen</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Summe</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Varianz</i>
HNC 0,05 %	21	110,10	5,24	4,17
FF 0,09 %	21	100,20	4,77	3,59
FF Placebo	21	88,50	4,21	4,93
Kontrolle	21	93,10	4,43	9,40

ANOVA						
<i>Streuungsursache</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>P-Wert</i>	<i>kritischer F-Wert</i>
Unterschiede zwischen den Gruppen	12,64	3	4,21	0,76	0,52	2,72
Innerhalb der Gruppen	441,95	80	5,52			
Gesamt	454,59	83				

Tabelle 8.5-49: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse des TEWL (Absolute Änderung im Vergleich zu den Basalwerten).

ZUSAMMENFASSUNG						
Gruppen	Anzahl	Summe	Mittelwert	Varianz		
HNC 0,05 %	21	17,00	0,81	3,01		
FF 0,09 %	21	10,50	0,50	1,23		
FF Placebo	21	-4,60	-0,22	4,39		
Kontrolle	21	-16,60	-0,79	5,83		

ANOVA						
Streuungsursache	Quadratsummen (SS)	Freiheitsgrade (df)	Mittlere Quadratsumme (MS)	Prüfgröße (F)	P-Wert	kritischer F-Wert
Unterschiede zwischen den Gruppen	32,67	3	10,89	3,01	0,03	2,72
Innerhalb der Gruppen	289,11	80	3,61			
Gesamt	321,78	83				

NEWMAN-KEULS				
	4	3	2	1
Formulierung	HNC 0,05 %	FF 0,09 %	FF Placebo	Kontrolle
Mittelwerte	0,81	0,50	-0,22	-0,79
Anzahl Ergebnisse	84			
Gruppen	4			
Wiederholungen	21			
Freiheitsgrade	80			
S(in) ²	3,61			

Vergleich	Ergebnis	k	q	D	signifikant
HNC 0,05/FF 0,09	0,31	2	2,83	1,17	nein
HNC 0,05/FF Placebo	1,03	3	3,40	1,41	nein
HNC 0,05/Kontrolle	1,60	4	3,74	1,55	ja
FF 0,09/FF Placebo	0,72	2	2,83	1,17	nein
FF 0,09/Kontrolle	1,29	3	3,40	1,41	nein
FF Placebo/Kontrolle	0,57	2	2,83	1,17	nein

8.5.9 Diskussion der kontrollierten Wirkstofffreisetzung

Tabelle 8.5-50: Auswertung des t-Tests unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen.

	Film	Öbeladenes Pulver
Mittelwert	4,52	5,10
Varianz	0,024	1,237
Beobachtungen	3	3
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
Freiheitsgrade (df)	2	
t-Statistik	-0,90	
P(T<=t) einseitig	0,23	
Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	2,92	
P(T<=t) zweiseitig	0,46	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	4,30	

9 Literaturverzeichnis

Al Othman, Z. A., Ahmed, Y. B. H., Habila, M. A. & Ghafar, A. A. (2011). Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Capsicum Fruit Samples using High Performance Liquid Chromatography. *Molecules*, 16(10), 8919-8929.

Alvarez-Roman, R., Naik, A., Kalia, Y. N., Fessi, H. & Guy, R. H. (2004). Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58(2), 301-316.

Amighi, K. & Moes, A. (1996). Influence of plasticizer concentration and storage conditions on the drug release rate from Eudragit(R) RS30D film-coated sustained-release theophylline pellets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 42(1), 29-35.

Anand, P. & Bley, K. (2011). Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *British Journal of Anaesthesia*, 107(4), 490-502.

Andersson, J., Rosenholm, J., Areva, S. & Lindén, M. (2004). Influences of material characteristics on ibuprofen drug loading and release profiles from ordered micro-and mesoporous silica matrices. *Chemistry of Materials*, 16(21), 4160-4167.

Arvanitis, M. L. & Satonik, R. C. (2002). Transdermal fentanyl abuse and misuse. *American Journal of Emergency Medicine*, 20(1), 58-59.

ASTM. (1995). Standard Test Method for Oil Absorption of Pigments by Spatula Rub-out D281-95: ASTM International, West Conshohocken, PA.

Barbero, A. M. & Frasch, H. F. (2009). Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. *Toxicology in Vitro*, 23(1), 1-13.

Bartosova, L. & Bajgar, J. (2012). Transdermal drug delivery in vitro using diffusion cells. *Current Medicinal Chemistry*, 19(27), 4671-4677.

Bautista, D. M., Wilson, S. R. & Hoon, M. A. (2014). Why we scratch an itch: the molecules, cells and circuits of itch. *Nature Neuroscience*, 17(2), 175-182.

Bharti, C., Nagaich, U., Pal, A. K. & Gulati, N. (2015). Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: A review. *Int J Pharm Investig*, 5(3), 124-133.

Bielfeldt, S., Hansen, P., Medve-Koenigs, K. & Wigger-Alberti, W. (2007). Leitlinie "Dermokosmetischer Sonnenschutz". *GD Gesellschaft für Dermopharmazie e.V.*

Binks, B. P. (2002). Particles as surfactants - similarities and differences. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(1-2), 21-41.

Blagden, N., de Matas, M., Gavan, P. T. & York, P. (2007). Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. *Adv Drug Deliv Rev*, 59(7), 617-630.

Bode, S., Baert, B., Vangele, M., Lambert, J., Burvenich, C., Slegers, G. & De Spiegeleer, B. (2007). Stability of the OECD model compound benzoic acid in receptor fluids of Franz diffusion cells. *Pharmazie*, 62(6), 470-471.

Bos, J. D. & Meinardi, M. M. (2000). The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Experimental Dermatology*, 9(3), 165-169.

Bouwstra, J. A., Dubbelaar, F. E., Gooris, G. S. & Ponc, M. (2000). The lipid organisation in the skin barrier. *Acta Dermato-Venereologica. Supplementum*, 208, 23-30.

Boyd, K., Shea, S. M. & Patterson, J. W. (2014). The Role of Capsaicin in Dermatology. In O. M. E. Abdel-Salam (Ed.), *Capsaicin as a Therapeutic Molecule* (pp. 293-306). Basel: Springer Basel.

Bronaugh, R. L. & Stewart, R. F. (1984). Methods for in vitro percutaneous absorption studies III: hydrophobic compounds. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(9), 1255-1258.

Bronaugh, R. L. & Stewart, R. F. (1985). Methods for in vitro percutaneous absorption studies IV: The flow-through diffusion cell. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74(1), 64-67.

Bryan, H. A. & Alster, T. S. (2002). The S-Caine peel: a novel topical anesthetic for cutaneous laser surgery. *Dermatologic Surgery*, 28(11), 999-1003; discussion 1003.

Campbell, K., Woodbury, M. G., Whittle, H., Labate, T. & Hoskin, A. (2000). A clinical evaluation of 3M no sting barrier film. *Ostomy/Wound Management*, 46(1), 24-30.

Capt, A., Luzy, A. P., Esdaile, D. & Blanck, O. (2007). Comparison of the human skin grafted onto nude mouse model with in vivo and in vitro models in the prediction of percutaneous penetration of three lipophilic pesticides. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 47(3), 274-287.

Caspers, P. J., Lucassen, G. W., Carter, E. A., Bruining, H. A. & Puppels, G. J. (2001). In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles. *Journal of Investigative Dermatology*, 116(3), 434-442.

Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D. & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653), 816-824.

Chanda, S., Bashir, M., Babbar, S., Koganti, A. & Bley, K. (2008). In vitro hepatic and skin metabolism of capsaicin. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 36(4), 670-675.

Chen, I. J., Yang, J. M., Yeh, J. L., Wu, B. N., Lo, Y. C. & Chen, S. J. (1992). Hypotensive and Antinociceptive Effects of Ether-Linked and Relatively Non-Pungent Analogs of N-Nonanoyl Vanillylamide. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 27(3), 187-192.

Chevalier, Y. & Bolzinger, M. A. (2013). Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 439, 23-34.

Choudhari, Y., Reddy, U., Monsuur, F., Pauly, T., Hofer, H. & McCarthy, W. (2014). Comparative evaluation of porous silica based carriers for lipids and liquid drug formulations. *Mesoporous Biomaterials*, 1(1), 61-74.

Clarys, P., Alewaeters, K., Lambrecht, R. & Barel, A. O. (2000). Skin color measurements: comparison between three instruments: the Chromameter(R), the DermaSpectrometer(R) and the Mexameter(R). *Skin Res Technol*, 6(4), 230-238.

Clarys, P., Clijsen, R., Taeymans, J. & Barel, A. O. (2012). Hydration measurements of the stratum corneum: comparison between the capacitance method (digital version of the Corneometer CM 825(R)) and the impedance method (Skicon-200EX(R)). *Skin Res Technol*, 18(3), 316-323.

Cork, M. J., Danby, S. G., Vasilopoulos, Y., Hadgraft, J., Lane, M. E., Moustafa, M., Guy, R. H., Macgowan, A. L., Tazi-Ahnini, R. & Ward, S. J. (2009). Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(8), 1892-1908.

Cramer, J. A. (1998). Enhancing patient compliance in the elderly. *Drugs and Aging*, 12(1), 7-15.

Cross, S. E., Anissimov, Y. G., Magnusson, B. M. & Roberts, M. S. (2003). Bovine-serum-albumin-containing receptor phase better predicts transdermal absorption parameters for lipophilic compounds. *Journal of Investigative Dermatology*, 120(4), 589-591.

Crowley, M. M., Schroeder, B., Fredersdorf, A., Obara, S., Talarico, M., Kucera, S. & McGinity, J. W. (2004). Physicochemical properties and mechanism of drug release from ethyl cellulose matrix tablets prepared by direct compression and hot-melt extrusion. *International Journal of Pharmaceutics*, 269(2), 509-522.

Cua, A. B., Wilhelm, K. P. & Maibach, H. I. (1990). Cutaneous sodium lauryl sulphate irritation potential: age and regional variability. *British Journal of Dermatology*, 123(5), 607-613.

Daniels, R. & Barta, A. (1994). Pharmacopoeial cellulose ethers as oil-in-water emulsifiers. I: Interfacial properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 40(3), 128-133.

Darwish, T. A., Luks, E., Moraes, G., Yepuri, N. R., Holden, P. J. & James, M. (2013). Synthesis of deuterated [D32] oleic acid and its phospholipid derivative [D64] dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *J Labelled Comp Radiopharm*, 56(9-10), 520-529.

de Lange, J., van Eck, P., Bruijnzeel, P. L. & Elliott, G. R. (1994). The rate of percutaneous permeation of xylene, measured using the "perfused pig ear" model, is dependent on the effective protein concentration in the perfusing medium. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 127(2), 298-305.

Denda, M., Fuziwara, S., Inoue, K., Denda, S., Akamatsu, H., Tomitaka, A. & Matsunaga, K. (2001). Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocyte of human skin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(5), 1250-1252.

Deng, Y., Ediriwickrema, A., Yang, F., Lewis, J., Girardi, M. & Saltzman, W. M. (2015). A sunblock based on bioadhesive nanoparticles. *Nat Mater*, 14(12), 1278-1285.

Derry, S., Sven-Rice, A., Cole, P., Tan, T. & Moore, R. A. (2013). Topical capsaicin (high concentration) for chronic neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev*, 2(2), CD007393.

Donkerwolcke, M., Burny, F. & Muster, D. (1998). Tissues and bone adhesives - historical aspects. *Biomaterials*, 19(16), 1461-1466.

Dragicevic-Curic, N., Winter, S., Stupar, M., Milic, J., Krajisnik, D., Gitter, B. & Fahr, A. (2009). Temoporfin-loaded liposomal gels: viscoelastic properties and in vitro skin penetration. *International Journal of Pharmaceutics*, 373(1-2), 77-84.

Durand, C., Alhammad, A. & Willett, K. C. (2012). Practical considerations for optimal transdermal drug delivery. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 69(2), 116-124.

Eaglstein, W. H., Sullivan, T. P., Giordano, P. A. & Miskin, B. M. (2002). A liquid adhesive bandage for the treatment of minor cuts and abrasions. *Dermatologic Surgery*, 28(3), 263-267.

Eisele, J. & Raust, J.-A. (2015). [[Technical Note: Eudragit RS 30D - Product Regulatory Datasheet; Evonik Nutrition & Care GmbH]].

Elias, P. M. (1983). Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *Journal of Investigative Dermatology*, 80(1 Suppl), 44s-49s.

Elias, P. M. (2007). The skin barrier as an innate immune element. *Seminars in Immunopathology*, 29(1), 3-14.

Elias, P. M., Ahn, S. K., Denda, M., Brown, B. E., Crumrine, D., Kimutai, L. K., Komuves, L., Lee, S. H. & Feingold, K. R. (2002). Modulations in epidermal calcium regulate the expression of differentiation-specific markers. *Journal of Investigative Dermatology*, 119(5), 1128-1136.

Elias, P. M. & Wakefield, J. S. (2011). Therapeutic implications of a barrier-based pathogenesis of atopic dermatitis. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 41(3), 282-295.

Ellermann, A. (2015). Pickering-Emulsionen als Basis lipid-basierter oraler Drug Delivery Systeme mit veränderter Wirkstofffreisetzung. (Dr. rer. nat.), *Eberhard Karls Universität, Tübingen*.

Ellis, C. N., Berberian, B., Sulica, V. I., Dodd, W. A., Jarratt, M. T., Katz, H. I., Prawer, S., Krueger, G., Rex, I. H., Jr. & Wolf, J. E. (1993). A double-blind evaluation of topical capsaicin in pruritic psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 29(3), 438-442.

Elsner, P., Wilhelm, D. & Maibach, H. I. (1990). Irritant Contact Dermatitis Irritant contact dermatitis and aging. *Contact Dermatitis*, 23(4), 275-275.

EMA. (2014). Guideline on Quality of Transdermal Patches; EMA/CHMP/QWP/608924/2014.

Ettliger, M., Ferch, H. & Mathias, J. (1987). Reviews and Trends: Grundlagen und Anwendungen einer durch Flammenhydrolyse gewonnenen Kieselsäure, 25. Mitt. Zur Adsorption an der Oberfläche einer flammenhydrolytisch gewonnenen Kieselsäure. *Archiv der Pharmazie*, 320(1), 1-15.

Everett, D. H. (1988). Basic principles of colloid science: *Royal Society of Chemistry, UK-Cambridge*.

Evonik. (2013). Sustained-release formulations. In B. Skalsky (Ed.), *Eudragit - Application Guidelines* (Vol. 12). D-Darmstadt: Evonik Industries AG.

Fang, J. Y., Kuo, C. T., Huang, Y. B., Wu, P. C. & Tsai, Y. H. (1999). Transdermal delivery of sodium nonivamide acetate from volatile vehicles: effects of polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 176(2), 157-167.

Fang, J. Y., Wu, P. C., Huang, Y. B. & Tsai, Y. H. (1996). Percutaneous absorption of capsaicin, nonivamide and sodium nonivamide acetate from gel and ointment bases: In vitro formulation evaluations in pigs and in vivo bioengineering methods in humans. *International Journal of Pharmaceutics*, 130(1), 121-135.

FDA. (2004). Guidance for Industry - Nonsterile Semisolid Dosage Forms.

Feingold, K. R., Schmuth, M. & Elias, P. M. (2007). The regulation of permeability barrier homeostasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(7), 1574-1576.

Feldman, S. R. & Housman, T. S. (2003). Patients' vehicle preference for corticosteroid treatments of scalp psoriasis. *American Journal of Clinical Dermatology*, 4(4), 221-224.

Fluhr, J. W., Darlenski, R., Angelova-Fischer, I., Tsankov, N. & Basketter, D. (2008). Skin irritation and sensitization: mechanisms and new approaches for risk assessment. 1. Skin irritation. *Skin Pharmacology and Physiology*, 21(3), 124-135.

Fluhr, J. W., Feingold, K. R. & Elias, P. M. (2006). Transepidermal water loss reflects permeability barrier status: validation in human and rodent in vivo and ex vivo models. *Experimental Dermatology*, 15(7), 483-492.

Franz, T. J. (1975). Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *Journal of Investigative Dermatology*, 64(3), 190-195.

Franzen, L., Selzer, D., Fluhr, J. W., Schaefer, U. F. & Windbergs, M. (2013). Towards drug quantification in human skin with confocal Raman microscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84(2), 437-444.

Franzen, L. & Windbergs, M. (2014). Accessing Raman spectral variability in human stratum corneum for quantitative in vitro depth profiling. *Journal of Raman Spectroscopy*, 45(1), 82-88.

Fullerton, A., Fischer, T., Lahti, A., Wilhelm, K. P., Takiwaki, H. & Serup, J. (1996). Guidelines for measurement of skin colour and erythema. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis*, 35(1), 1-10.

Garvie-Cook, H., Frederiksen, K., Petersson, K., Guy, R. H. & Gordeev, S. (2015a). Characterization of topical film-forming systems using atomic force microscopy and Raman microspectroscopy. *Molecular Pharmaceutics*, 12(3), 751-757.

Garvie-Cook, H., Frederiksen, K., Petersson, K., Guy, R. H. & Gordeev, S. N. (2015b). Biophysical elucidation of the mechanism of enhanced drug release and topical delivery from polymeric film-forming systems. *Journal of Controlled Release*, 212, 103-112.

Gaubitz, M., Schiffer, T., Holm, C., Richter, E., Pisternick-Ruf, W. & Weiser, T. (2016). Efficacy and safety of nicoboxil/nonivamide ointment for the treatment of acute pain in the low back - A randomized, controlled trial. *European Journal of Pain (London, England)*, 20(2), 263-273.

Glaessl, B., Siepman, F., Tucker, I., Rades, T. & Siepman, J. (2010). Deeper insight into the drug release mechanisms in Eudragit RL-based delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 389(1-2), 139-146.

Gniadecka, M., Faurskov Nielsen, O., Christensen, D. H. & Wulf, H. C. (1998). Structure of water, proteins, and lipids in intact human skin, hair, and nail. *Journal of Investigative Dermatology*, 110(4), 393-398.

Godin, B. & Touitou, E. (2007). Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(11), 1152-1161.

Gotter, B., Faubel, W. & Neubert, R. H. H. (2008). Optical methods for measurements of skin penetration. *Skin Pharmacology and Physiology*, 21(3), 156-165.

Griffin, W. C. (1949). Classification of surface-active agents by HLB. *J Cosmet Chem*, 1, 311-326.

Gruetzmann, R. (2005). Zum Mechanismus der Anionenwirkung auf die Permeabilität kationischer Polymethacrylatüberzüge. (Dr. rer. nat.), *Eberhard Karls Universität Tübingen*.

Gruetzmann, R. & Wagner, K. G. (2005). Quantification of the leaching of triethyl citrate/polysorbate 80 mixtures from Eudragit RS films by differential scanning calorimetry. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(1), 159-162.

Grundmann, S. & Ständer, S. (2011). Chronic pruritus: clinics and treatment. *Ann Dermatol*, 23(1), 1-11.

Gupta, R., Sundarajan, C., Pauly, T. & Monsuur, F. (2012). Porous silica gel: An ideal solid hydrophilic carrier for oils and other liquids. *Tablets & Capsules*, 10(5), 14-21.

Guy, R. H. & Hadgraft, J. (1990). On the Determination of Drug Release Rates from Topical Dosage Forms. *International Journal of Pharmaceutics*, 60(2), R1-R3.

Guy, R. H. & Hadgraft, J. (1992). Rate Control in Transdermal Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 82(3), R1-R6.

Hadgraft, J. (1979). Epidermal Reservoir - Theoretical Approach. *International Journal of Pharmaceutics*, 2(5-6), 265-274.

Hadgraft, J. (2001). Skin, the final frontier. *International Journal of Pharmaceutics*, 224(1-2), 1-18.

Hadgraft, J. & Lane, M. E. (2011). Skin: the ultimate interface. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(12), 5215-5222.

Harrison, S. M., Barry, B. W. & Dugard, P. H. (1984). Effects of freezing on human skin permeability. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 36(4), 261-262.

Heck, R. (2012). Darstellung von Nonivamid und [2H]3-Nonivamid sowie Untersuchung ihrer Penetration aus halbfesten Arzneiformen in die Haut. (Dipl. pharm.), *Eberhard Karls Universität Tübingen*.

Heck, R., Hermann, S., Lunter, D. J. & Daniels, R. (2016). Film-forming formulations containing porous silica for the sustained delivery of actives to the skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 108, 1-8.

Heck, R., Lukic, M., Savic, S., Daniels, R. & Lunter, D. J. (2017). Ex vivo skin permeation and penetration of nonivamide from and in vivo skin tolerability of film-forming formulations containing porous silica. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, in revision.

Herrmann, S., Daniels, R. & Lunter, D. (2016). Methods for the determination of the substantivity of topical formulations. *Pharmaceutical Development and Technology*, 1-5.

Higuchi, T. (1961). Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50, 874-875.

Hodari, K. T., Nanton, J. R., Carroll, C. L., Feldman, S. R. & Balkrishnan, R. (2006). Adherence in dermatology: a review of the last 20 years. *J Dermatolog Treat*, 17(3), 136-142.

Holst, R. & Moller, H. (1975). One hundred twin pairs patch tested with primary irritants. *British Journal of Dermatology*, 93(2), 145-149.

Horcajada, P., Ramila, A., Perez-Pariente, J. & Vallet-Regi, M. (2004). Influence of pore size of MCM-41 matrices on drug delivery rate. *Microporous and Mesoporous Materials*, 68(1), 105-109.

Hwa, C., Bauer, E. A. & Cohen, D. E. (2011). Skin biology. *Dermatologic Therapy*, 24(5), 464-470.

Ibrić, S., Jovanović, M., Djurić, Z., Parojčić, J. & Solomun, L. (2002). The application of generalized regression neural network in the modeling and optimization of aspirin extended release tablets with Eudragit RS PO as matrix substance. *Journal of Controlled Release*, 82(2-3), 213-222.

Iizuka, H. (1994). Epidermal turnover time. *Journal of Dermatological Science*, 8(3), 215-217.

Ikoma, A., Steinhoff, M., Ständer, S., Yosipovitch, G. & Schmelz, M. (2006). The neurobiology of itch. *Nature Reviews: Neuroscience*, 7(7), 535-547.

Isailović, T., Djordjević, S., Marković, B., Randelović, D., Čekić, N., Lukić, M., Pantelić, I., Daniels, R. & Savić, S. (2016). Biocompatible Nanoemulsions for Improved Aceclofenac Skin Delivery: Formulation Approach Using Combined Mixture-Process Experimental Design. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(1), 308-323.

IUPAC. (1972). Manual of symbols and terminology for physicochemical quantities and units. Appendix II. Definitions, terminology and symbols in colloid and surface chemistry. Applied Chemistry.

Jacobi, U., Kaiser, M., Toll, R., Mangelsdorf, S., Audring, H., Otberg, N., Sterry, W. & Lademann, J. (2007). Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Skin Res Technol*, 13(1), 19-24.

Jakubović, H. R. & Ackerman, A. B. (1992). Structure and function of skin: development, morphology and physiology. In S. L. Moschella & H. J. Hurley (Eds.), *Dermatology* (Vol. 3, pp. 3-87). Philadelphia: WB Saunders.

Jancso, G., Dux, M., Oszlacs, O. & Santha, P. (2008). Activation of the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) channel opens the gate for pain relief. *British Journal of Pharmacology*, 155(8), 1139-1141.

Janssens, M., van Smeden, J., Gooris, G. S., Bras, W., Portale, G., Caspers, P. J., Vreeken, R. J., Hankemeier, T., Kezic, S., Wolterbeek, R., Lavrijsen, A. P. & Bouwstra, J. A. (2012). Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *Journal of Lipid Research*, 53(12), 2755-2766.

Jeng, D. K. (2001). A new, water-resistant, film-forming, 30-second, one-step application iodophor preoperative skin preparation. *American Journal of Infection Control*, 29(6), 370-376.

Jepps, O. G., Dancik, Y., Anissimov, Y. G. & Roberts, M. S. (2013). Modeling the human skin barrier--towards a better understanding of dermal absorption. *Adv Drug Deliv Rev*, 65(2), 152-168.

Jesionowski, T., Pokora, M., Sobaszekiewicz, K. & Pernak, J. (2004). Preparation and characterization of functionalized precipitated silica SYLOID® 244 using ionic liquids as modifiers. *Surface and Interface Analysis*, 36(11), 1491-1496.

Jin, J., Sklar, G. E., Min Sen Oh, V. & Chuen Li, S. (2008). Factors affecting therapeutic compliance: A review from the patient's perspective. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 4(1), 269-286.

Jordt, S. E., Tominaga, M. & Julius, D. (2000). Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14), 8134-8139.

Jung, E. C. & Maibach, H. I. (2015). Animal models for percutaneous absorption. *Journal of Applied Toxicology*, 35(1), 1-10.

Junginger, H. E. (1992). Pharmaceutical Emulsions and Creams. In J. Sjöblom (Ed.), *Emulsions - A Fundamental and Practical Approach* (Vol. 363, pp. 189-205): Springer Netherlands.

Kalia, Y. N. & Guy, R. H. (2001). Modeling transdermal drug release. *Adv Drug Deliv Rev*, 48(2-3), 159-172.

Kemmer, I. (2015). Optimierung der Dehnbarkeit freier Filme aus filmbildenden Formulierungen mit verschiedenen Silica, die sich in Porosität und Partikelgröße unterscheiden. (Wahlpflichtfacharbeit), *Eberhard Karls Universität Tübingen*.

Kienzler, J. L., Queille-Roussel, C., Mugglestone, C., Ortonne, J. P. & Larnier, C. (2007). Stratum corneum pharmacokinetics of the anti-fungal drug, terbinafine, in a novel topical formulation, for single-dose application in dermatophytoses. *Current Medical Research and Opinion*, 23(6), 1293-1302.

Knorr, F., Lademann, J., Patzelt, A., Sterry, W., Blume-Peytavi, U. & Vogt, A. (2009). Follicular transport route--research progress and future perspectives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(2), 173-180.

Koplas, P. A., Rosenberg, R. L. & Oxford, G. S. (1997). The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of Neuroscience*, 17(10), 3525-3537.

Kresken, J., Daniels, R. & Arens-Corell, M. (2009). Leitlinie "Dermokosmetika zur Reinigung und Pflege der trockenen Haut". *GD Gesellschaft für Dermopharmazie e.V.*, 1-12.

Kresken, J., Kindl, U. & Wigger-Alberti, W. (2015). Leitlinie: "Dermokosmetika zur Anwendung bei Rosazea". *GD Gesellschaft für Dermopharmazie e.V.*, 1-10.

Krog, N. & Borup, A. P. (1973). Swelling Behavior of Lamellar Phases of Saturated Monoglycerides in Aqueous Systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24(6), 691-701.

Krogel, I. & Bodmeier, R. (1999). Floating or pulsatile drug delivery systems based on coated effervescent cores. *International Journal of Pharmaceutics*, 187(2), 175-184.

Kusum Devi, V., Saisivam, S., Maria, G. R. & Deepti, P. U. (2003). Design and evaluation of matrix diffusion controlled transdermal patches of verapamil hydrochloride. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 29(5), 495-503.

Kutz, G., Daniels, R. & Trommer, H. (2011). Lagerstabilität von Emulsionen. In G. Kutz, R. Daniels, & H. Trommer (Eds.), *Emulsionen - Entwicklung, Herstellung, Prüfung* (pp. 22-26). DE-Aulendorf: Editio Cantor Verlag.

Kutza, C., Metz, H., Kutza, J., Syrowatka, F. & Mader, K. (2013). Toward a detailed characterization of oil adsorbates as "solid liquids". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84(1), 172-182.

Lademann, J., Patzelt, A., Richter, H., Antoniou, C., Sterry, W. & Knorr, F. (2009). Determination of the cuticula thickness of human and porcine hairs and their potential influence on the penetration of nanoparticles into the hair follicles. *J Biomed Opt*, 14(2), 021014.

Larsson, K. (1967). Structure of Mesomorphic Phases and Micelles in Aqueous Glyceride Systems. *Zeitschrift Fur Physikalische Chemie-Frankfurt*, 56(3-4), 173-&.

Laslett, L. L. & Jones, G. (2014). Capsaicin for osteoarthritis pain. *Progress in Drug Research*, 68, 277-291.

Lavery, M. J., Stull, C., Kinney, M. O. & Yosipovitch, G. (2016). Nocturnal Pruritus: The Battle for a Peaceful Night's Sleep. *Int J Mol Sci*, 17(3), 425.

Leung, F. W. (2014). Capsaicin as an anti-obesity drug. *Progress in Drug Research*, 68, 171-179.

Lippold, B. C. & Monells Pages, R. (2001). Control and stability of drug release from diffusion pellets coated with the aqueous quaternary polymethacrylate dispersion Eudragit RS 30 D. *Pharmazie*, 56(6), 477-483.

Loden, M. (2003). Role of topical emollients and moisturizers in the treatment of dry skin barrier disorders. *American Journal of Clinical Dermatology*, 4(11), 771-788.

Loffler, H., Effendy, I. & Happle, R. (2000). [Irritant contact dermatitis]. *Hautarzt*, 51(3), 203-215.

Lunter, D. J. (2012). Filmbildende Emulsionen zur Retardierung der dermalen Wirkstoffpermeation. (Dr. rer. nat.), *Eberhard Karls Universität Tübingen*.

- Lunter, D. J. (2016).** How Confocal Is Confocal Raman Microspectroscopy on the Skin? Impact of Microscope Configuration and Sample Preparation on Penetration Depth Profiles. *Skin Pharmacology and Physiology*, 29(2), 92-101.
- Lunter, D. J. & Daniels, R. (2012).** New film forming emulsions containing Eudragit(R) NE and/or RS 30D for sustained dermal delivery of nonivamide. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82(2), 291-298.
- Lunter, D. J. & Daniels, R. (2013).** In vitro skin permeation and penetration of nonivamide from novel film-forming emulsions. *Skin Pharmacology and Physiology*, 26(3), 139-146.
- Lunter, D. J. & Daniels, R. (2014).** Confocal Raman microscopic investigation of the effectiveness of penetration enhancers for procaine delivery to the skin. *J Biomed Opt*, 19(12), 126015.
- Maffei, P., Sforzini, A., Borgia, S. L., Ronchi, C., Festo, N. & Ceschel, G. C. (2003).** Design and evaluation of a new transdermal formulation containing Estradiol. *Pharmazeutische Industrie*, 65(12), 1279-1282.
- Marjukka Suhonen, T., Bouwstra, J. A. & Urtti, A. (1999).** Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. *Journal of Controlled Release*, 59(2), 149-161.
- Massing, U., Cicko, S. & Ziroli, V. (2008).** Dual asymmetric centrifugation (DAC)--a new technique for liposome preparation. *Journal of Controlled Release*, 125(1), 16-24.
- Mateus, R., Abdalghafor, H., Oliveira, G., Hadgraft, J. & Lane, M. E. (2013).** A new paradigm in dermatopharmacokinetics - Confocal Raman spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics*, 444(1-2), 106-108.
- Matterne, U., Apfelbacher, C. J., Loerbroks, A., Schwarzer, T., Buttner, M., Ofenloch, R., Diepgen, T. L. & Weisshaar, E. (2011).** Prevalence, correlates and characteristics of chronic pruritus: a population-based cross-sectional study. *Acta Dermato-Venereologica*, 91(6), 674-679.
- Matthaus, C., Chernenko, T., Quintero, L., Miljkovic, M., Milane, L., Kale, A., Amiji, M., Torchilin, V. & Diem, M. (2010).** Raman Micro-spectral Imaging of Cells and Intracellular Drug Delivery Using Nanocarrier Systems. *Confocal Raman Microscopy*, 158, 137-163.
- Mendelsohn, R., Flach, C. R. & Moore, D. J. (2006).** Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1758(7), 923-933.
- Misra, A., Pal, R., Majumdar, S. S., Talwar, G. P. & Singh, O. (1997).** Biphasic testosterone delivery profile observed with two different transdermal formulations. *Pharmaceutical Research*, 14(9), 1264-1268.

Misra, A., Raghuvanshi, R. S., Ganga, S., Diwan, M., Talwar, G. P. & Singh, O. (1996). Formulation of a transdermal system for biphasic delivery of testosterone. *Journal of Controlled Release*, 39(1), 1-7.

Mozsik, G. (2014). Capsaicin as new orally applicable gastroprotective and therapeutic drug alone or in combination with nonsteroidal anti-inflammatory drugs in healthy human subjects and in patients. *Progress in Drug Research*, 68, 209-258.

Mozsik, G., Past, T., Abdel Salam, O. M., Kuzma, M. & Perjesi, P. (2009). Interdisciplinary review for correlation between the plant origin capsaicinoids, non-steroidal antiinflammatory drugs, gastrointestinal mucosal damage and prevention in animals and human beings. *Inflammopharmacology*, 17(3), 113-150.

Mutalik, S., Udupa, N., Kumar, S., Agarwal, S., Subramanian, G. & Ranjith, A. K. (2006). Glipizide matrix transdermal systems for diabetes mellitus: preparation, in vitro and preclinical studies. *Life Sciences*, 79(16), 1568-1577.

Nagy, I., Friston, D., Valente, J. S., Torres Perez, J. V. & Andreou, A. P. (2014). Pharmacology of the capsaicin receptor, transient receptor potential vanilloid type-1 ion channel. *Progress in Drug Research*, 68, 39-76.

Neubert, R. H. & Wepf, R. (2007). Struktur und Morphologie einer Barriere. *Pharmazeutische Zeitung*, 17, 14-21.

NRF. (2010a). Basiscreme DAC. D-Eschborn: Govi Verlag.

NRF. (2010b). Hydrophile Capsaicinoid Creme 0,025 %/0,05 %/0,1% (NRF 11.125). D-Eschborn: Govi Verlag.

O'Donnell, B. F., Lawlor, F., Simpson, J., Morgan, M. & Greaves, M. W. (1997). The impact of chronic urticaria on the quality of life. *British Journal of Dermatology*, 136(2), 197-201.

Obara, S. & McGinity, J. W. (1994). Properties of free films prepared from aqueous polymers by a spraying technique. *Pharmaceutical Research*, 11(11), 1562-1567.

OECD. (2004). Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method: *OECD Publishing*.

Oesch, F., Fabian, E., Oesch-Bartlomowicz, B., Werner, C. & Landsiedel, R. (2007). Drug-metabolizing enzymes in the skin of man, rat, and pig. *Drug Metabolism Reviews*, 39(4), 659-698.

Oji, V., Eckl, K. M., Aufenvenne, K., Natebus, M., Tarinski, T., Ackermann, K., Seller, N., Metze, D., Nurnberg, G., Folster-Holst, R., Schafer-Korting, M., Hausser, I., Traupe, H. & Hennies, H. C. (2010). Loss of corneodesmosin leads to severe skin barrier defect, pruritus, and atopy: unraveling the peeling skin disease. *American Journal of Human Genetics*, 87(2), 274-281.

Olah, Z., Szabo, T., Karai, L., Hough, C., Fields, R. D., Caudle, R. M., Blumberg, P. M. & Iadarola, M. J. (2001). Ligand-induced dynamic membrane changes and cell deletion conferred by vanilloid receptor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 276(14), 11021-11030.

Ossadnik, M., Czaika, V., Teichmann, A., Sterry, W., Tietz, H. J., Lademann, J. & Koch, S. (2007). Differential stripping: introduction of a method to show the penetration of topically applied antifungal substances into the hair follicles. *Mycoses*, 50(6), 457-462.

Otberg, N., Richter, H., Schaefer, H., Blume-Peytavi, U., Sterry, W. & Lademann, J. (2004). Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. *Journal of Investigative Dermatology*, 122(1), 14-19.

Padula, C., Colombo, G., Nicoli, S., Catellani, P. L., Massimo, G. & Santi, P. (2003). Bioadhesive film for the transdermal delivery of lidocaine: in vitro and in vivo behavior. *Journal of Controlled Release*, 88(2), 277-285.

Padula, C., Nicoli, S., Colombo, P. & Santi, P. (2007). Single-layer transdermal film containing lidocaine: modulation of drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 66(3), 422-428.

Pantelic, I., Lukic, M., Markovic, B., Lusiana, Hoffmann, C., Muller-Goymann, C., Milic, J., Daniels, R. & Savic, S. (2014). Development of a prospective isopropyl alcohol-loaded pharmaceutical base using simultaneous in vitro/in vivo characterization methods of skin performance. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 40(7), 960-971.

Patzelt, A., Mak, W. C., Jung, S., Knorr, F., Meinke, M. C., Richter, H., Ruhl, E., Cheung, K. Y., Tran, N. B. N. N. & Lademann, J. (2017). Do nanoparticles have a future in dermal drug delivery? *Journal of Controlled Release*, 246, 174-182.

Paudel, K. S., Milewski, M., Swadley, C. L., Brogden, N. K., Ghosh, P. & Stinchcomb, A. L. (2010). Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery. *Therapeutic Delivery*, 1(1), 109-131.

Paul, D. R. (2011). Elaborations on the Higuchi model for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 418(1), 13-17.

Pfeiffer, S., Vielhaber, G., Vietzke, J. P., Wittern, K. P., Hintze, U. & Wepf, R. (2000). High-pressure freezing provides new information on human epidermis: simultaneous protein antigen and lamellar lipid structure preservation. Study on human epidermis by cryoimmobilization. *Journal of Investigative Dermatology*, 114(5), 1030-1038.

Pickering, S. U. (1907). CXCVI.-Emulsions. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 91(0), 2001-2021.

Porter, C. J., Trevaskis, N. L. & Charman, W. N. (2007). Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 6(3), 231-248.

Proksch, E., Brandner, J. M. & Jensen, J. M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, 17(12), 1063-1072.

- Rawlings, A. V. & Harding, C. R. (2004).** Moisturization and skin barrier function. *Dermatologic Therapy*, 17 Suppl 1, 43-48.
- Repka, M. A. & McGinity, J. W. (2001).** Bioadhesive properties of hydroxypropylcellulose topical films produced by hot-melt extrusion. *Journal of Controlled Release*, 70(3), 341-351.
- Reyes-Escogido, M. D., Gonzalez-Mondragon, E. G. & Vazquez-Tzompantzi, E. (2011).** Chemical and Pharmacological Aspects of Capsaicin. *Molecules*, 16(2), 1253-1270.
- Richards, H. L., Fortune, D. G., O'Sullivan, T. M., Main, C. J. & Griffiths, C. E. (1999).** Patients with psoriasis and their compliance with medication. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 41(4), 581-583.
- Ritterband, D. C., Meskin, S. W., Shapiro, D. E., Kusmierczyk, J., Seedor, J. A. & Koplín, R. S. (2005).** Laboratory model of tissue adhesive (2-octyl cyanoacrylate) in sealing clear corneal cataract wounds. *American Journal of Ophthalmology*, 140(6), 1039-1043.
- Roberts, M. S., Cross, S. E. & Anissimov, Y. G. (2004).** Factors affecting the formation of a skin reservoir for topically applied solutes. *Skin Pharmacology and Physiology*, 17(1), 3-16.
- Rogiers, V., Balls, M., Basketter, D., Berardesca, E., Edwards, C., Elsner, P., Ennen, J., Leveque, J. L., Loden, M., Masson, P., Parra, J., Paye, M., Pierard, G., Rodrigues, L., Schaefer, H., Salter, D. & Zuang, V. (1999).** The Potential Use of Non-invasive Methods in the Safety Assessment of Cosmetic Products. *Altern Lab Anim*, 27(4), 515-537.
- Rohm, B., Holik, A. K., Somoza, M. M., Pignitter, M., Zaunschirm, M., Ley, J. P., Krammer, G. E. & Somoza, V. (2013).** Nonivamide, a capsaicin analog, increases dopamine and serotonin release in SH-SY5Y cells via a TRPV1-independent pathway. *Mol Nutr Food Res*, 57(11), 2008-2018.
- Rottke, M. (2012).** Entwicklung und Charakterisierung nonivamidhaltiger Rizinusöl-in-Silikonöl-Emulsionen zur dermalen Anwendung. (Dr. rer. nat), *Eberhard Karls Universität Tübingen*.
- Rottke, M., Lunter, D. J. & Daniels, R. (2014).** In vitro studies on release and skin permeation of nonivamide from novel oil-in-oil-emulsions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 86(2), 260-266.
- Rupprecht, H. & Liebl, H. (1970).** Grenzflächenreaktionen zwischen kolloidaler Kieselsäure und Polyäthylenglykol sowie Polyäthylenglykolderivaten. *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere*, 239(2), 685-686.
- Rupprecht, H. & Liebl, H. (1972).** Einfluß von Tensiden auf das kolloidchemische Verhalten hochdispenser Kieselsäuren in polaren und unpolaren Lösungsmitteln. *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere*, 250(7), 719-723.
- Saar, B. G., Contreras-Rojas, L. R., Xie, X. S. & Guy, R. H. (2011).** Imaging drug delivery to skin with stimulated Raman scattering microscopy. *Molecular Pharmaceutics*, 8(3), 969-975.

Sakai, Y., Yasueda, S. & Ohtori, A. (2005). Stability of latanoprost in an ophthalmic lipid emulsion using polyvinyl alcohol. *International Journal of Pharmaceutics*, 305(1-2), 176-179.

Sambandan, D. R. & Ratner, D. (2011). Sunscreens: an overview and update. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 64(4), 748-758.

Sartorelli, P., Andersen, H. R., Angerer, J., Corish, J., Drexler, H., Goen, T., Griffin, P., Hotchkiss, S. A., Larese, F., Montomoli, L., Perkins, J., Schmelz, M., van de Sandt, J. & Williams, F. (2000). Percutaneous penetration studies for risk assessment. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 8(2), 133-152.

Schaefer, H. & Lademann, J. (2001). The role of follicular penetration. A differential view. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 14 Suppl 1, 23-27.

Schroeder, I. Z., Franke, P., Schaefer, U. F. & Lehr, C. M. (2007a). Delivery of ethinylestradiol from film forming polymeric solutions across human epidermis in vitro and in vivo in pigs. *Journal of Controlled Release*, 118(2), 196-203.

Schroeder, I. Z., Franke, P., Schaefer, U. F. & Lehr, C. M. (2007b). Development and characterization of film forming polymeric solutions for skin drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65(1), 111-121.

Schulz, M. B. & Daniels, R. (2000). Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) as emulsifier for submicron emulsions: influence of molecular weight and substitution type on the droplet size after high-pressure homogenization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 49(3), 231-236.

Seif, S. & Hansen, S. (2012). Measuring the stratum corneum reservoir: desorption kinetics from keratin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(10), 3718-3728.

Serra, J., Campero, M. & Ochoa, J. (1998). Flare and hyperalgesia after intradermal capsaicin injection in human skin. *Journal of Neurophysiology*, 80(6), 2801-2810.

Shah, V. P., Elkins, J., Shaw, S. & Hanson, R. (2003). In vitro release: comparative evaluation of vertical diffusion cell system and automated procedure. *Pharmaceutical Development and Technology*, 8(1), 97-102.

Shah, V. P., Elkins, J. S. & Williams, R. L. (1999). Evaluation of the test system used for in vitro release of drugs for topical dermatological drug products. *Pharmaceutical Development and Technology*, 4(3), 377-385.

Shive, M., Linos, E., Berger, T., Wehner, M. & Chren, M. M. (2013). Itch as a patient-reported symptom in ambulatory care visits in the United States. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 69(4), 550-556.

Shukuwa, T., Kligman, A. M. & Stoudemayer, T. J. (1997). A new model for assessing the damaging effects of soaps and surfactants on human stratum corneum. *Acta Dermato-Venereologica*, 77(1), 29-34.

Siewert, M., Dressman, J., Brown, C. K., Shah, V. P., Fip & Aaps. (2003). FIP/AAPS guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms. *AAPS PharmSciTech*, 4(1), E7.

Simon, G. A. & Maibach, H. I. (2000). The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations--an overview. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 13(5), 229-234.

Simone, D. A., Nolano, M., Johnson, T., Wendelschafer-Crabb, G. & Kennedy, W. R. (1998). Intradermal injection of capsaicin in humans produces degeneration and subsequent reinnervation of epidermal nerve fibers: correlation with sensory function. *Journal of Neuroscience*, 18(21), 8947-8959.

Singh, U. & Bernstein, J. A. (2014). Intranasal capsaicin in management of nonallergic (vasomotor) rhinitis. *Progress in Drug Research*, 68, 147-170.

Spireas, S. & Sadu, S. (1998). Enhancement of prednisolone dissolution properties using liquisolid compacts. *International Journal of Pharmaceutics*, 166(2), 177-188.

Spruijt, E., Biesheuvel, P. M. & de Vos, W. M. (2015). Adsorption of charged and neutral polymer chains on silica surfaces: the role of electrostatics, volume exclusion, and hydrogen bonding. *Physical Review. E: Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 91(1), 012601.

Ständer, S., Darsow, U., Mettang, T., Gieler, U., Maurer, M., Stander, H., Beuers, U., Niemeier, V., Gollnick, H., Vogelgsang, M. & Weisshaar, E. (2012). [S2k guideline--Chronic Pruritus]. *J Dtsch Dermatol Ges*, 10 Suppl 4, S1-27.

Ständer, S., Luger, T. & Metze, D. (2001). Treatment of prurigo nodularis with topical capsaicin. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 44(3), 471-478.

Ständer, S., Schafer, I., Phan, N. Q., Blome, C., Herberger, K., Heigel, H. & Augustin, M. (2010). Prevalence of chronic pruritus in Germany: results of a cross-sectional study in a sample working population of 11,730. *Dermatology*, 221(3), 229-235.

Ständer, S., Weisshaar, E., Mettang, T., Szepietowski, J. C., Carstens, E., Ikoma, A., Bergasa, N. V., Gieler, U., Misery, L., Wallengren, J., Darsow, U., Streit, M., Metze, D., Luger, T. A., Greaves, M. W., Schmelz, M., Yosipovitch, G. & Bernhard, J. D. (2007). Clinical classification of itch: a position paper of the International Forum for the Study of Itch. *Acta Dermato-Venereologica*, 87(4), 291-294.

Staubach, P. & Metz, M. (2013). Magistral formulations and pruritus therapy - What is established, what is confirmed, what is new? *J Dtsch Dermatol Ges*, 11(11), 1049-1055.

Steinhoff, M., Neisius, U., Ikoma, A., Fartasch, M., Heyer, G., Skov, P. S., Luger, T. A. & Schmelz, M. (2003). Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin. *Journal of Neuroscience*, 23(15), 6176-6180.

Steinke, S., Bruland, P., Blome, C., Osada, N., Dugas, M., Fritz, F., Augustin, M. & Ständer, S. (2016). Chronic Pruritus: Evaluation of Patient Needs and Treatment Goals with

a Special Regard to Differences According to Pruritus Classification and Gender Aspects. *British Journal of Dermatology*.

Studel, F. A. (2016). Die Bedeutung der Ca²⁺-aktivierten Kaliumkanäle vom IK- und BK-Typ für die Entstehung und Therapie von Brustkrebs. (Dr. rer. nat.), *Eberhard Karls Universität Tübingen*.

Stumpf, A., Ständer, S., Warlich, B., Fritz, F., Bruland, P., Pfleiderer, B., Heuft, G. & Schneider, G. (2015). Relations between the characteristics and psychological comorbidities of chronic pruritus differ between men and women: women are more anxious than men. *British Journal of Dermatology*, 172(5), 1323-1328.

Sumino, H., Ichikawa, S., Kasama, S., Takahashi, T., Kumakura, H., Takayama, Y., Kanda, T., Murakami, M. & Kurabayashi, M. (2009). Effects of raloxifene and hormone replacement therapy on forearm skin elasticity in postmenopausal women. *Maturitas*, 62(1), 53-57.

Sungthongjeen, S., Sriamornsak, P. & Puttipipatkachorn, S. (2008). Design and evaluation of floating multi-layer coated tablets based on gas formation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(1), 255-263.

Surber, C. & Smith, E. W. (2005). The mystical effects of dermatological vehicles. *Dermatology*, 210(2), 157-168.

Surber, C., Wilhelm, K. P. & Maibach, H. I. (1991). In-vitro skin pharmacokinetics of acitretin: percutaneous absorption studies in intact and modified skin from three different species using different receptor solutions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 43(12), 836-840.

Svensson, C. K. (2009). Biotransformation of drugs in human skin. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 37(2), 247-253.

Swarbrick, J., Lee, G. & Brom, J. (1982). Drug permeation through human skin: I. Effect of storage conditions of skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 78(1), 63-66.

Szolcsanyi, J. (2014). Capsaicin and sensory neurones: a historical perspective. *Progress in Drug Research*, 68, 1-37.

Tadros, T. (2009). Polymeric surfactants in disperse systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 147-148, 281-299.

Taube, K. M. (2016). Patient-Doctor Relationship in Dermatology: From Compliance to Concordance. *Acta Dermato-Venereologica*, 96(217), 25-29.

Teichmann, A., Jacobi, U., Ossadnik, M., Richter, H., Koch, S., Sterry, W. & Lademann, J. (2005). Differential stripping: determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. *Journal of Investigative Dermatology*, 125(2), 264-269.

Todd, P. H., Bensinger, M. G. & Biftu, T. (1977). Determination of Pungency Due to Capsicum by Gas-Liquid-Chromatography. *Journal of Food Science*, 42(3), 660-&.

Todosijevic, M. N., Savic, M. M., Batinic, B. B., Markovic, B. D., Gasperlin, M., Randelovic, D. V., Lukic, M. Z. & Savic, S. D. (2015). Biocompatible microemulsions of a model NSAID for skin delivery: A decisive role of surfactants in skin penetration/irritation profiles and pharmacokinetic performance. *International Journal of Pharmaceutics*, 496(2), 931-941.

Tominaga, K. & Tojo, K. (2010). Effect of environmental temperature on transdermal drug penetration. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(12), 1983-1987.

Trommer, H. & Neubert, R. H. (2006). Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacology and Physiology*, 19(2), 106-121.

Valenta, C. & Auner, B. G. (2004). The use of polymers for dermal and transdermal delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58(2), 279-289.

van de Sandt, J. J., van Burgsteden, J. A., Cage, S., Carmichael, P. L., Dick, I., Kenyon, S., Korinth, G., Larese, F., Limasset, J. C., Maas, W. J., Montomoli, L., Nielsen, J. B., Payan, J. P., Robinson, E., Sartorelli, P., Schaller, K. H., Wilkinson, S. C. & Williams, F. M. (2004). In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: a multi-centre comparison study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39(3), 271-281.

van Smeden, J. & Bouwstra, J. A. (2016). Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. *Current Problems in Dermatology*, 49, 8-26.

van Smeden, J., Janssens, M., Gooris, G. S. & Bouwstra, J. A. (2014). The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1841(3), 295-313.

W. R. Grace & Co. Corporation, U. C. (2014). [Technical Note Syloid 244 FP and Syloid XDP].

Wagner, H., Kostka, K. H., Lehr, C. M. & Schaefer, U. F. (2000). Drug distribution in human skin using two different in vitro test systems: comparison with in vivo data. *Pharmaceutical Research*, 17(12), 1475-1481.

Wagner, H., Kostka, K. H., Lehr, C. M. & Schaefer, U. F. (2001). Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents. *Journal of Controlled Release*, 75(3), 283-295.

Walker, M., Dugard, P. H. & Scott, R. C. (1983). In vitro Percutaneous-Absorption Studies - a Comparison of Human and Laboratory Species. *Human Toxicology*, 2(3), 561-562.

Walker, R. B. & Smith, E. W. (1996). The role of percutaneous penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 18(3), 295-301.

Wartewig, S., Neubert, R., Rettig, W. & Hesse, K. (1998). Structure of stratum corneum lipids characterized by FT-Raman spectroscopy and DSC. IV. Mixtures of ceramides and oleic acid. *Chemistry and Physics of Lipids*, 91(2), 145-152.

- Weisshaar, E. & Dalgard, F. (2009).** Epidemiology of itch: adding to the burden of skin morbidity. *Acta Dermato-Venereologica*, 89(4), 339-350.
- Wilhelm, K. P., Freitag, G. & Wolff, H. H. (1994).** Surfactant-induced skin irritation and skin repair: evaluation of a cumulative human irritation model by noninvasive techniques. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 31(6), 981-987.
- Williams, A. C. & Barry, B. W. (2004).** Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev*, 56(5), 603-618.
- WMA. (2013).** World medical association declaration of helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 310(20), 2191-2194.
- Wollenweber, C., Makievski, A. V., Miller, R. & Daniels, R. (2000).** Adsorption of hydroxypropyl methylcellulose at the liquid/liquid interface and the effect on emulsion stability. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 172(1-3), 91-101.
- Xiao, C., Moore, D. J., Rerek, M. E., Flach, C. R. & Mendelsohn, R. (2005).** Feasibility of Tracking Phospholipid Permeation into Skin Using Infrared and Raman Microscopic Imaging. *Journal of Investigative Dermatology*, 124(3), 622-632.
- Xu, W., Gao, Q., Xu, Y., Wu, D. & Sun, Y. (2009).** pH-Controlled drug release from mesoporous silica tablets coated with hydroxypropyl methylcellulose phthalate. *Materials Research Bulletin*, 44(3), 606-612.
- Yalcin, B., Tamer, E., Toy, G. G., Oztas, P., Hayran, M. & Alli, N. (2006).** The prevalence of skin diseases in the elderly: analysis of 4099 geriatric patients. *International Journal of Dermatology*, 45(6), 672-676.
- Yosipovitch, G., Goon, A., Wee, J., Chan, Y. H. & Goh, C. L. (2000).** The prevalence and clinical characteristics of pruritus among patients with extensive psoriasis. *British Journal of Dermatology*, 143(5), 969-973.
- Zaghloul, S. S. & Goodfield, M. J. (2004).** Objective assessment of compliance with psoriasis treatment. *Archives of Dermatology*, 140(4), 408-414.
- Zatz, J. L. (1995).** Drug release from semisolids: effect of membrane permeability on sensitivity to product parameters. *Pharmaceutical Research*, 12(5), 787-789.
- Zeidler, C., Pfliegerer, B. & Ständer, S. (2016).** [New treatment options for chronic pruritus]. *Hautarzt*, 67(8), 627-634.
- Zeidler, C. & Ständer, S. (2014).** [Therapy of prurigo nodularis]. *Hautarzt*, 65(8), 709-713.
- Zuppa, A. F., Tejani, S. M., Cullen, E. J., Jr. & Nadkarni, V. M. (2004).** Plasma Concentrations Following Application of Whole versus Cut Transdermal Clonidine Patches To Critically Ill Children. *J Pediatr Pharmacol Ther*, 9(1), 43-48.