



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„In vivo und in vitro Untersuchungen zur topischen
Anwendung von neuen Anthrachinonen“

verfasst von

Bianca Krotky

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt.

A 449

Studienblatt:

Studienrichtung lt.

Diplomstudium Pharmazie UniStG

Studienblatt:

Betreut von:

ao.Univ.Prof. Mag.pharm. Dr.rer.nat. Martin Czejka

Danksagung

Die vorliegende Diplomarbeit wurde an der Division für klinische Pharmazie und Diagnostik an der Fakultät für Lebenswissenschaften der Universität Wien verfasst.

Sie ist das Ergebnis der Zusammenarbeit zwischen der Firma SeaLife Pharma® in Tulln und der Universität Wien.

Betreut wurde dieses Projekt von a.o.Univ.Prof. Mag. Dr. Martin Czejka, bei dem ich mich, sowohl für die Ermöglichung der Diplomarbeit, als auch für die tägliche Unterstützung bei Problemen und Fragen recht herzlich bedanken möchte.

Des Weiteren möchte ich auch Mag. Nairi Baroian und Dr. Philipp Buchner meinen Dank aussprechen. Sie waren mir während der gesamten Diplomarbeit eine große Hilfe und standen stets mit Rat und Tat zur Seite.

Eine große Unterstützung waren ebenfalls meine liebsten Kolleginnen, welche während der Zeit an der Universität zu sehr guten Freundinnen geworden sind. Ohne das stetige Miteinander wäre vieles im Studium nur schwer möglich gewesen.

Der größte Dank gilt jedoch meiner Familie und meinem Freund Johannes. Sie haben mich vor allem in den schwierigen Phasen des Studiums immer wieder motiviert und an mich geglaubt.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen nicht benutzt und die den benutzten Quellen entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

.....

Bianca Krotky

Wien, März 2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	11
1.1	Die menschliche Haut	12
1.1.1	Aufbau der menschlichen Haut	12
1.1.2	Unterschiede zur tierischen Haut.....	14
1.1.3	Bakterielle Hauterkrankungen	14
1.2	Wirksamkeit von antibiotischen Salben	14
1.3	Perkutaner Transport von topischen Arzneistoffen	15
1.4	Vorteile und Nachteile topischer Verabreichungen	16
1.5	Grundregeln der antibiotischen Lokalthherapie	17
1.6	Vergleichssubstanzen	17
1.7	Rationale	18
2	Experimenteller Teil	19
2.1	Substanzen und Reagenzien	19
2.2	Geräte und Material	20
2.3	Auswertung.....	21
2.4	HPLC	22
2.5	Allgemein	24
2.5.1	Herstellung von Eluenten	24
2.5.2	Herstellung der Waschflüssigkeit	24
2.5.3	Erstellung der Eichgeraden.....	24
2.5.4	Ermitteln der Nachweisgrenze von SL11.....	25
2.5.5	Coffein Standard	26
2.6	In vitro Modell.....	27
2.6.1	Beschreibung des EpiDerm™ Modells.....	27
2.6.2	Durchführung der Permeabilitätstests	29

2.6.3	Herstellung der Donor – Formulierungen	31
2.6.4	Planung der in vitro Versuchsreihen	35
2.7	In vivo Modell	38
2.7.1	Beschreibung des in vivo Modells	38
2.7.2	Durchführung der Permeabilitätstests.....	38
2.7.3	Planung der in vivo Versuchsreihe	39
3	Ergebnisse und Diskussion	40
3.1	Allgemein	40
3.1.1	Erstellung der Eichgeraden	40
3.1.2	Ermitteln der Nachweisgrenze von SL11	42
3.1.3	Coffein Standard.....	43
3.2	In vitro Versuchsreihen.....	43
3.2.1	Leerwerte	43
3.2.2	Permeation von SL 11.....	44
3.2.3	Permeation von Coffein	47
3.2.4	Permeation von etablierten topischen Arzneispezialitäten	51
3.2.5	Vergleich der Permeation von SL11 und etablierten Arzneistoffen	52
3.2.6	Berechnung des permeierten Arzneistoffanteils	57
3.3	In vivo Versuchsreihen	61
3.3.1	Leerwerte	61
3.3.2	Permeation von SL 11.....	62
4	Zusammenfassung	64
5	Abstract.....	65
6	Conclusio	66
7	Anhang	67

1 Einleitung

Die Diplomarbeit behandelt die Thematik der in vivo und in vitro Untersuchungen zu neuen Anthrachinonen und deren topischen Einsatz in der Pharmazie.

Lokale Antibiotika erfreuen sich einer großen Bedeutung in der Humanmedizin. Um das Risiko von toxischen Nebenwirkungen auf den Organismus abschätzen zu können, ist es jedoch notwendig in präklinischen Tests mehr über das Permeations und Penetrationsverhalten von neuen Substanzen zu erfahren.

Die von SeaLife[®] Pharma entwickelten Anthrachinonderivate zeigen eine Wirkung gegen viele resistente Erreger wie z.B Staphylokokkus aureus. Sie gelten damit als Hoffnungsträger für neue, in der Literatur noch nicht beschriebene Antibiotika.

Es wurden insgesamt 13 Verbindungen synthetisiert, welche alle aus dem selben Grundgerüst bestehen und sich nur durch die Substituenten an den phenolischen Ringen unterscheiden.

Das Grundgerüst weist eine Ähnlichkeit mit der Struktur der Anthrachinone auf, welche trotz ihres breiten Wirkungsspektrums keine Anwendung als Antibiotika finden.

Ausschließlich die strukturell ähnlichen, aus den Streptomyces Arten gewonnenen Anthracycline, werden als Antibiotika mit antitumoraler Wirkung eingesetzt [1].

Über die vielseitige Wirkung und die marine Herkunft der Anthrachinone gibt es bereits diverse Vorarbeiten und literarische Werke, weshalb in der vorliegenden Diplomarbeit nicht näher darauf eingegangen wird.

1.1 Die menschliche Haut

Die Haut ist mit ihrer Gesamtfläche von etwa 2 m² funktionell das wichtigste Organ des menschlichen Körpers. Neben ihren vielseitigen Funktionen als Wärmeleiter und Sinnesorgan, bildet sie außerdem eine Schutzhülle gegen schädliche Umweltfaktoren und stellt somit das Abschlussgewebe des Körpers dar.

Dies ist möglich, da die Haut für die meisten Stoffe oder Krankheitserreger undurchlässig ist, und mit ihrem Säureschutzmantel eine Ansiedlung von Bakterien verhindern kann.

Sie besitzt neben ihrer Festigkeit auch elastische Dehnbarkeit und kann dadurch einer mechanischen Beanspruchung entgegenwirken.

Sobald die Haut jedoch verletzt ist, fehlt diese abschließende Wirkung und es kann zum Eindringen von Krankheitserregern oder anderen schädlichen Stoffen kommen [2].

1.1.1 Aufbau der menschlichen Haut

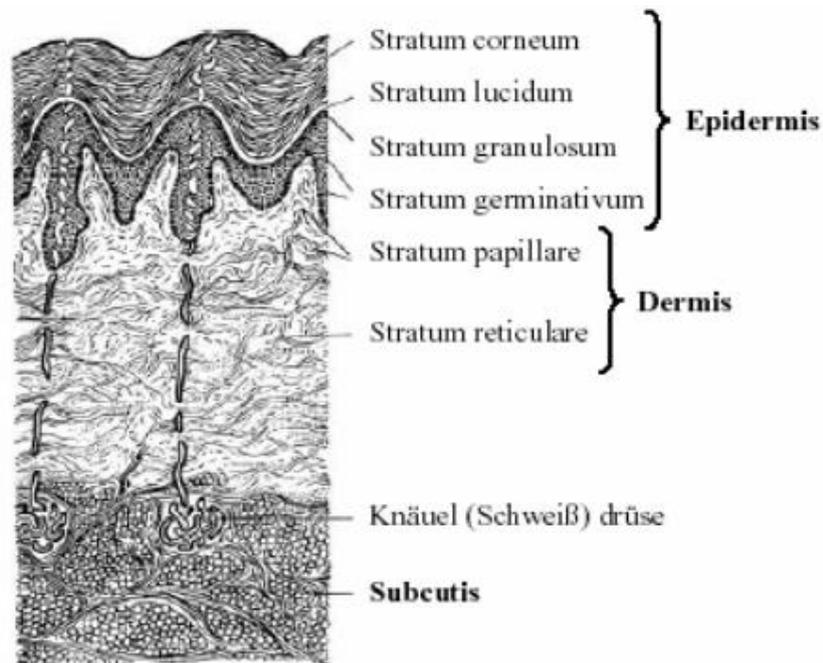


Abbildung 1: Aufbau der menschlichen Haut [3]

Die menschliche Haut kann in drei Schichten unterteilt werden: Unterhaut, Lederhaut und Oberhaut.

Die Unterhaut (Subkutis) besteht aus lockerem Bindegewebe und Fettzellen. Je mehr Fett in den Zellen eingelagert ist, desto straffer wirkt die Haut.

Ebenfalls befinden sich Schweißdrüsen und Haarfollikel in dieser Schicht.

Die Lederhaut (Corium) besteht aus festem Bindegewebe, sowie Gefäßen und Nerven, welche die Haut mit Nährstoffen versorgen.

Das Bindegewebe der Lederhaut wird von Proteinfasern durchzogen. Dabei handelt es sich um kollagene Fasern, elastische Fasern und retikulären Fasern. Diese sind für die mechanische Stabilität und Zugfestigkeit verantwortlich [4, 5].

Die Oberhaut (Epidermis) bildet die Grenzschicht des Körpers zur Außenwelt. Diese Schicht kann wiederum in mehrere Ebenen unterteilt werden. Die unterste Ebene der Oberhaut bildet die Basalzellschicht (Stratum basale), gefolgt von der Stachelzellschicht (Stratum spinosum), der Körnerschicht (Stratum granulosum) und der Glanzschicht (Stratum lucidum). Die oberste Ebene bildet die Hornschicht (Stratum corneum).

Die Dicke der Oberhaut beträgt durchschnittlich 0,05 mm und macht damit nur etwa einen Anteil von 2,6% der Gesamthaut aus. Ihre Schutzfunktion erhält sie vor allem durch die etwa 20-80µm dicke Hornschicht, welche aus abgestorbenen, verhornten Keratinozyten (Korneozyten) besteht. Die Keratinozyten werden in den Basalzellen gebildet, und durchlaufen viele verschiedene Differenzierungsschritte, bis sie schlussendlich als kernlose Hornschuppen abgestoßen werden. Der Raum zwischen diesen Zellen wird durch Lipide aufgefüllt, weshalb sich die undurchlässige Struktur der Hornschicht auch mit dem „Backstein und Mörtel“ Modell veranschaulichen lässt. Diese Barriere wird ausschließlich durch Hautanhangsgebilde, wie etwa Haarfollikeln oder Schweißdrüsen, unterbrochen [4, 5].

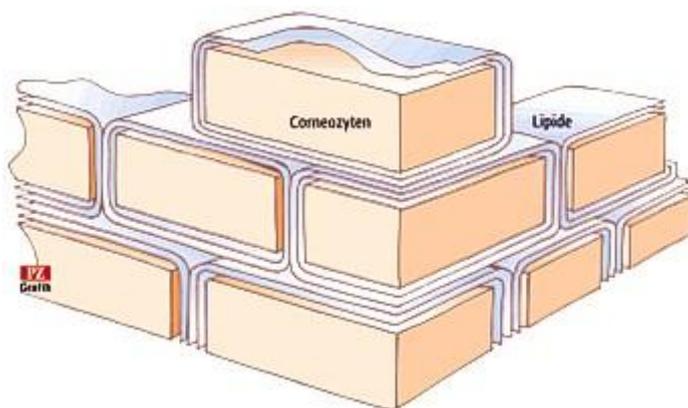


Abbildung 2: Backstein und Mörtel Modell [6]

1.1.2 Unterschiede zur tierischen Haut

Obwohl die tierische und die menschliche Haut anatomisch sehr unterschiedlich aufgebaut sind, werden beide Modelle zu Diffusionsversuchen herangezogen.

Diese speziesabhängigen Unterschiede sind zum Beispiel die Zahl der Hautanhangsgebilde, die Lipidzusammensetzung im Stratum corneum oder die Hautdicke. Das Hauptproblem stellt hierbei die fehlende Vergleichbarkeit der Ergebnisse dar [7].

Aufgrund von durchgeführten Permeationsversuchen wurde die Ähnlichkeit der perkutanen Resorption bei Affen und Schweinen gegenüber dem Menschen erkannt. Die Haut von kleinen Nagern wie Ratten und Meerschweinchen ist jedoch im Regelfall durchlässiger [5].

1.1.3 Bakterielle Hauterkrankungen

Zu den häufigsten bakteriellen Erkrankungen zählen unter anderem Infektionen von Haut und Weichgewebe.

Vor allem Staphylokokkus aureus und β -hämolyisierende Streptokokken spielen hier eine wesentliche Rolle. Diese können sowohl durch intakte (= primäre Infektion) als auch geschädigte Haut (sekundäre Infektion) ins Gewebe eindringen [8].

1.2 Wirksamkeit von antibiotischen Salben

Die Wirksamkeit der Substanzen wird nicht nur durch ihre antimikrobielle Aktivität beeinflusst, sondern vor allem durch ihr Potential ins Gewebe zu penetrieren.

Durch Einlagerung ins Stratum corneum kann es in Folge zu einem gewünschten Depoteffekt kommen.

Das Ziel jeder topischen Antibiotika Therapie besteht darin einen ausreichenden therapeutischen Spiegel am Infektionsort zu erreichen, ohne dabei zur systemischen Wirkung und damit zu möglichen Intoxikationen zu führen. Die systemische Toxizität hängt vor allem von der permeierten Konzentration des Arzneistoffes ab und ist in den meisten Lokalthérapien zu vernachlässigen [8, 9].

1.3 Perkutaner Transport von topischen Arzneistoffen

Grundsätzlich gilt es die Begriffe Penetration, Permeation und Resorption zu unterscheiden. Penetration beschreibt dabei das Eindringen einer Substanz durch die Hornschicht hindurch in die Epidermis. Permeation nennt man den Durchtritt der Substanz von der Haut ins Blutgefäß. Die Summe aus Penetration und Permeation stellt wiederum die Resorption dar [10].

Die Permeation des Wirkstoffes durch die Haut findet durch passive Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten statt und lässt sich mit dem Fick'schen Diffusionsgesetz beschreiben.

Substanzen können auf verschiedene Wege das Stratum corneum umgehen und somit in die intakte Haut penetrieren.

Eine Möglichkeit stellt der Transport entlang der Hautanhangsgebilde dar, und kann in transglandulär (über die Schweißdrüsen) und transfollikulär (über die Haarfollikel und deren Talgdrüsen) eingeteilt werden. Dieser Beitrag zur Permeation kann jedoch außer Acht gelassen werden, da er aufgrund von entgegen gerichtetem Schweiß und Talgfluss kaum vorhanden ist.

Wenn es zu einer direkten Diffusion durch das intakte Stratum corneum kommt, wird dies als transepidermaler Transport bezeichnet. Je nach pharmakokinetischen Eigenschaften der Substanz verläuft dieser auf verschiedene Weise. Fettlösliche Substanzen werden hierbei durch die lipidgefüllten Zwischenräume transportiert, während wasserlösliche Stoffe direkt durch die Keratinozyten permeieren [3, 11].

Die Stoffeigenschaften spielen ebenfalls eine große Rolle beim Transport durch die Haut. Vor allem die Molekülgröße, die Lipophilie, die Plasmaproteinbindung und die Polarität sind für diesen Vorgang entscheidend und beeinflussen damit die Eindringtiefe.

Grundsätzlich gilt, dass eine Zunahme der Molekülgröße (>500 Dalton) zu einer Abnahme der perkutanen Resorption führt.

Nicht ionisierte, lipophile Arzneistoffe können sich zwar besser im Gewebe verteilen, jedoch wird durch gesteigerte Fettlöslichkeit die Anforderung an die richtige Formulierung erschwert [8].

Ebenfalls von entscheidender Bedeutung ist die Wahl des richtigen Transportvehikels. Die Penetration wird verstärkt, wenn die Löslichkeit des Arzneistoffes im Stratum corneum höher ist als im Vehikel und die Affinität der Substanz zum Vehikel möglichst gering ist. Penetrationsbeschleuniger wie Dimethylsulfoxid können außerdem durch Veränderung der Struktur des Stratum corneum zu einer gesteigerten Resorption führen [12].

1.4 Vorteile und Nachteile topischer Verabreichungen

Der größte Vorteil in der topischen Behandlung liegt grundsätzlich in dem Antibiotikum, das direkt auf die Erreger einwirken kann.

Dadurch kommt es zu einem geeigneten therapeutischen Spiegel am Wirkort, welcher durch allgemeine Behandlung nicht zu erreichen wäre [13].

Die lokale Antibiotikatherapie zeigt in der Regel als Lösung oder Spray gute Wirksamkeit und ist den Formulierungen als Salbe oder Creme überlegen.

Durch Entfernung der oberen Hautschichten mittels keratolytischen Salben können zusätzlich bessere Bedingungen für die Lokaltherapie geschaffen werden.

Die Therapie ist grundsätzlich nicht gefährlich, jedoch muss hauptsächlich bei großflächigen Hautverletzungen mit einer vorhandenen Resorption des Arzneistoffes und in Folge mit systemischen Nebenwirkungen gerechnet werden.

Diese systemischen Nebenwirkungen können im schlimmsten Fall zu irreversiblen Schäden führen und sollten daher vermieden werden [13].

Ein weiterer Nachteil ist, dass es bei hochgradig sensiblen Patienten auch unter Lokaltherapie mit z.B. Penicillin oder Neomycin zu einer anaphylaktischen Reaktion kommen kann [9].

Das Auftreten von resistenten Mikroorganismen, welche gegen die bereits etablierten Antibiotika unempfindlich geworden sind, stellt auch bei topischer Therapie ein erhebliches klinisches Problem dar. Vorallem die Häufigkeit von multiresistenten Staphylokokkus aureus Stämmen (MRSA) verursacht große Schwierigkeiten in der Therapie. In einigen Ländern besteht daher die Rezeptpflicht auf lokale Antibiotika Präparate, um so dem falschen Gebrauch und damit der steigenden Resistenzbildung entgegenwirken zu können [8].

1.5 Grundregeln der antibiotischen Lokalthherapie

Zur topischen Antibiotikatherapie stehen viele bereits etablierte Arzneistoffe wie etwa Fusidinsäure, Gentamycin und Clindamycin zur Verfügung [8].

Grundsätzlich muss zwischen gezielter Chemotherapie und ungezielter, kalkulierter Therapie unterschieden werden. Selbst wenn ein Erregernachweis durchgeführt wird, beginnt man bis zum Vorliegen der Ergebnisse mit einer ungezielte Antibiotikatherapie, wobei bei dieser Methode gegen den erfahrungsgemäß häufigsten Erreger der Erkrankung behandelt wird [13, 14].

Vor Beginn jeder Behandlung ist so bald wie möglich ein Erregernachweis durchzuführen. Dieser kann durch einen Hautabstrich erhalten werden [8].

Es sollten jedoch bei jeder lokalen Antibiotikatherapie stets einige Grundregeln beachtet werden. Als Beispiel führt eine Kombination aus mehreren Antibiotika Gruppen zu einem verteilten Selektionsdruck und damit zu einer geringeren Resistenzbildung. Außerdem sollte man aufgrund der Gefahr von Resistenzbildung auf Antibiotika, welche zur systemischen Behandlung genutzt werden, verzichten [8].

Viele bereits etablierte Antibiotika wie Penicilline, Tetracycline oder Sulfonamide, sollten bei Hautinfektionen nicht mehr angewendet werden, da sie nicht nur zu Allergien führen, sondern auch die meisten Erreger bereits gegen die genannten Arzneistoffe resistent geworden sind [15].

1.6 Vergleichssubstanzen

Um die Versuchsergebnisse aussagekräftig zu machen, muss mit einem Standard gearbeitet werden.

Parallel dazu wurden zusätzlich Permeationsversuche zu bereits etablierten topischen Arzneistoffen wie Capsaicin (Quedenza Pflaster) oder Clindamycin (Dalacin) durchgeführt.

Coffein: Dieses kann als Modellsubstanz eingesetzt werden, da es bereits zahlreiche Informationen über dessen Permeationsverhalten gibt [16].

Capsaicin: Das Gemisch von Capsaicinoiden, welches aus dem Chillipfeffer isoliert wird, findet Einsatz als lokales Anästhetikum bei Post Zoster Neuralgien [17].

Clindamycin: Dieser Wirkstoff ist ein bakteriostatisch wirksames Antibiotikum, welches in die Proteinbiosynthese eingreift. Es ist gegen grampositive Bakterien wie Pneumokokken und Staphylokokken wirksam und wird zur Therapie von Akne vulgaris eingesetzt. Aus diversen Studien gingen keinerlei signifikante Nebenwirkungen unter der Verwendung von Clindamycin hervor. Trotzdem wurde festgestellt, dass etwa 4-5% der Substanz systemisch resorbiert werden. Die Resorption ist unter anderem vom Vehikel abhängig und beträgt bei Aceton 0,13% und bei DMSO 13,92%. Systemische Nebenwirkungen sind vor allem intestinale Beschwerden, sowie die pseudomembranöse Kolitis [4, 12].

1.7 Rationale

Nicht jedes Antibiotikum bedeutet automatisch einen Fortschritt, denn es muss zuerst auf seine Eigenschaften wie Stabilität, Resistenzprobleme, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit geprüft werden [13].

Daher wurden zu den neuen Anthrachinonderivaten der Firma SeaLife® Pharma bereits einige Vorarbeiten mit Aussage über die pharmakokinetischen Parameter, wie z.B. Stabilität, Gewebeverteilung und Lipophile, erstellt.

Aufgrund der Ergebnisse wurde das Derivat mit der Bezeichnung SL11 als potentieller Kandidat zur Weiterentwicklung ausgewählt und zusätzlichen Untersuchungen unterzogen.

In dieser Diplomarbeit wurden speziell auf das topische Verhalten der Substanz eingegangen und unterschiedliche Versuche durchgeführt.

Dazu zählen sowohl die in vivo Untersuchungen an Meerschweinchen, als auch die in vitro Versuchsreihen auf einem ausgewählten Hautmodell.

2 Experimenteller Teil

2.1 Substanzen und Reagenzien

Tabelle 1: Verwendete Substanzen und fertige Arzneispezialitäten

Substanzen	Typ/Ch.-B./Lot Nr.	Herstellungsfirma
SL11		Sealife Pharma
Clindamycin-Phosphat	Dalacin Lotion, H32197	Pfizer Corporation
Clindamycin-Phosphat	Dalacin Lösung, 3F0911	Pfizer Corporation
Capsaicin	BCBM1193V	Sigma Aldrich
Coffein	5898/ 1213	GATT - KOLLER

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien

Reagenzien	Typ	Herstellungsfirma
Acetonitril		Chem-Lab nv, Belgien
Aqua purificata		Department für Pharmakognosie, Universität Wien
Assaymedium	EPI 100 LLMMX	MatTek Corporation
Dimethylsulfoxid	D8418 – 100 ml	Sigma Aldrich
Essigsäure conc.	338626	Sigma Aldrich
Methanol		Merck KG
Myristylalkohol	PHR 1135	Sigma Aldrich
Phosphatpuffertablette	P4417	Sigma Aldrich

2.2 Geräte und Material

Tabelle 3: Verwendete Geräte und Materialien

Geräte und Materialien	Typ	Herstellungsfirma
Analysenwaage	Sartorius Handy H110	Sartorius Mechatronics Austria GmbH
Akku betriebene Pipettierhilfe	Pipetus [®] , 100-240 Volt, 0,1-200ml	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG
Conical Tubes	50ml	SPL LifeScience Co.
Einmal Latexhandschuhe	Class 1, AQL 1,5	VWR [®] International
Eppendorf Gefäße	Micro Tubes, Plastibrand, 1,5ml	BRAND GmbH, Deutschland
EpiDerm™-Hautmodell	EPI-100-FIX	MatTek Corporation
Kulturplatten	6 well, Ref 351146	Corning Incorporated
Kühlschrank		
Laminar Air Flow	Biosafe 2	Ehret GmbH
Mikropipetten	Eppendorf Research 2-20µl, 2-200µl, 10-100µl, 100-1000µl	Eppendorf AG
Mikropipetten	Finnpipette Digital 2-10ml	Thermo Scientific [®]
Magnetrührer	MR 300 1 K	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG
Parafilm	Laboratory Film „M“	Bemis Company, Neenah
Pasteurpipetten (Glas)	150mm Gesamtlänge	Assistent, Deutschland
Pasteurpipetten (Plastik)	153 mm, LOT 09	Serobac Handelsgmbh
Pipettenspitzen	Universal blue Tips, 50 - 1000 µl	VWR [®] International
Pipettenspitzen	Universal yellow Tips, 2-200µl	VWR [®] International
Pinzette		

Pipettenspitzen	Finntip 63 for volume range 2-10ml	Thermo Scientific®
Reagenzgläser	Starkwandig 100x16mm	Assistent, Deutschland
Reaktionsgefäßständer	Mikro Test Tube Rack	BRAND GmbH, Deutschland
Spitzen zum verletzen der Haut	Nr. 18	Terumo Europe
Septum für Sampler Fläschchen	8 - ST15	CHROMACOL®
Tiefkühlschrank, -80 °C	UF755G	Dometic
Ultraschallbad	BANDELIN SONOREX RK 510	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG
Vials (HPLC)		CHROMACOL®
Zentrifuge	Labofuge 400 Function Line	Heraeus Instruments GmbH
5ml und 10 ml Pipetten	Non- Pyrogenic	Costar

2.3 Auswertung

Zur Auswertung und Erstellung von Graphen wurden folgende Programme verwendet:

- Microsoft® Office Excel
- Microsoft® Office Word
- GraphPad Prism 6

2.4 HPLC

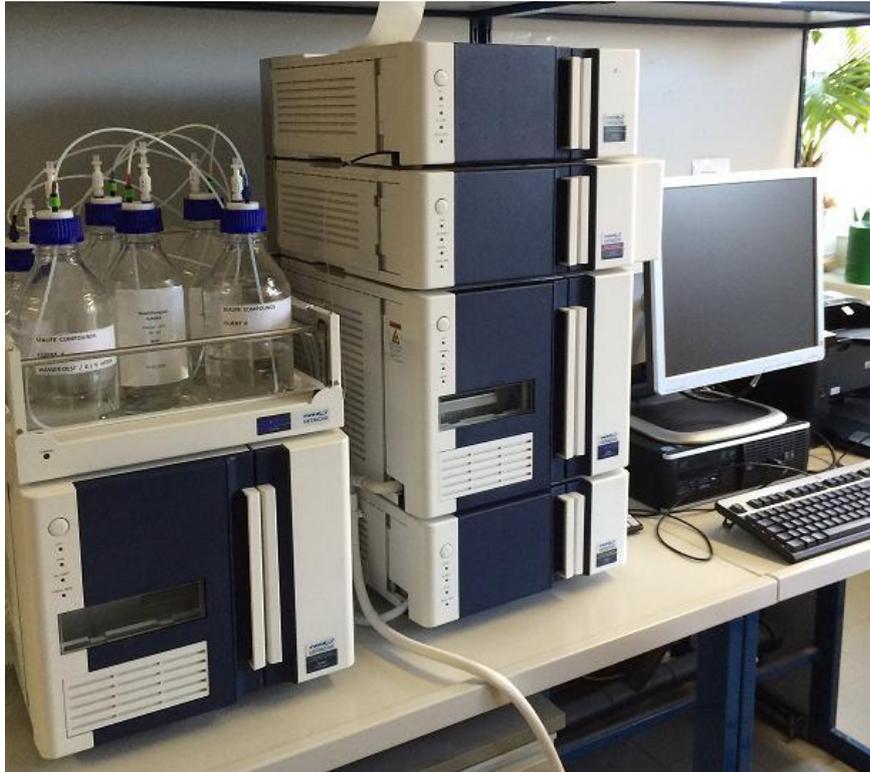


Abbildung 3: HPLC Anlage Chromaster der Firma Merck VWR® HITACHI

Tabelle 4: Daten zur HPLC Anlage Chromaster

Typ	Merck VWR® Chromaster HPLC Anlage
Vorsäule	Nukleosil LiChrospher® 100RP-18, 5µm (LiChroCART® Merk Hitachi)
Trennsäule	Zorbax Eclipse XDB-C8, 250 x 4,6 mm ID 5µm (Agilent) Technolo-
Autosampler	5210 , 16 °C
Ofentemperatur	36 °C
Eluenten	Gradient (Eluent A + Eluent B)
Flussrate	0,5ml/min
Druck	28 bar
Wellenlänge	Dual wavelength, 270 nm bzw. 235 nm
Analysendauer	42 min
Retentionszeit	SL11 : 14,6 min Clindamycin: 10,5 min Capsaicin: 16,8 min
Software	Chromaster - Manager



Abbildung 4: HPLC Anlage LaChrom der Firma Merck VWR® HITACHI

Tabelle 5: Daten zur HPLC Anlage LaChrom

Typ	Merck HITACHI LaChrom HPLC Anlage
Vorsäule	Nukleosil LiChrospher® 100RP-18, 5µm (LiChroCART® Merk Hitachi)
Trennsäule	ACE 3 C 8 , 150 x 4,6 mm id
Autosampler	L-7200 La Chrom
Heizsystem	CTO-10A, SHIMADZU
Thermostat	Peltier sample Thermostat
Ofentemperatur	36 ± 1°C
UV Detektor	L-7400 LaChrom
Pumpe	L-7120 LaChrom
Degaser	MODEL 2003, Firma VWR
Flussrate	0,75ml/min
Druck	89-107 bar
Wellenlänge	272 nm
Analysendauer	10 min
Retentionszeit	Coffein: 3,21 min
Software	LaChrom Integration und Steuerungssoftware

Alle Messungen wurden auf der HPLC Anlage Chromaster durchgeführt. Ausschließlich die Coffein Proben wurden mittels HPLC Anlage LaChrom analysiert.

2.5 Allgemein

2.5.1 Herstellung von Eluenten

- **Eluent SL11 / Eluent Clindamycin / Eluent Capsaicin**

Alle drei Substanzen wurden mittels Gradientenelution analysiert:

Eluent A: Aqua Purificata + Essigsäure (99:1, V:V)

Eluent B: ACN + Essigsäure (99:1, V:V)

- **Eluent Coffein:**

ACN + Aqua Purificata (25:75, V:V)

Die Eluenten müssen zur Entgasung 30 min ins Ultraschallbad gestellt werden. Um einen Druckausgleich möglich zu machen wird die Öffnung des Vorratsgefäßes nur mit Parafilm verschlossen.

2.5.2 Herstellung der Waschflüssigkeit

Aqua purificata und ACN werden im Verhältnis 20:80 (V:V) etwa 10 min am Magnetrührer gemischt und anschließend im Ultraschallbad entgast.

2.5.3 Erstellung der Eichgeraden

SL 11: Stammlösung 1mg/ml DMSO 32%

- ➔ Davon 20µl + 980µl PBS (=20µg/ml)
- ➔ Davon 1 ml + 1 ml PBS (=10µg/ml)
- ➔ Davon 1 ml + 1 ml PBS (=5µg/ml)
- ➔ Davon 1 ml + 1 ml PBS (=2,5µg/ml)
- ➔ Davon 1 ml + 1 ml PBS (=1,25µg/ml)

Coffein: Stammlösung 1mg/ml PBS

- Davon 10µl + 990µl PBS (=10µg/ml)
- Davon 1 ml + 1 ml PBS (=5µg/ml)
- Davon 300 µl + 700 µl PBS (=1,5µg/ml)

Clindamycin: Stammlösung 10mg/ml (Dalacin)

- Davon 10µl + 990µl Eluent A (= 100µg/ml)
- Davon 1ml + 1 ml Eluent A (=50µg/ml)
- Davon 1ml + 1 ml Eluent A (=25µg/ml)
- 100µl von 100µg/ml + 900µl Eluent A (=10µg/ml)
- Davon 1ml + 1 ml Eluent A (=5µg/ml)
- Davon 200µl + 800µl Eluent A (=1µg/ml)

Capsaicin: Stammlösung 10mg/ml

- Davon 10µl + 990µl Eluent B (= 100µg/ml)
- Davon 1ml + 1 ml Eluent B (=50µg/ml)
- Davon 1ml + 1 ml Eluent B (=25µg/ml)
- 100µl von 100µg/ml + 900µl Eluent B (=10µg/ml)
- Davon 1ml + 1 ml Eluent B (=5µg/ml)
- Davon 200µl + 800µl Eluent B (=1µg/ml)

2.5.4 Ermitteln der Nachweisgrenze von SL11

Eine Stammlösung von 1mg SL11/ml DMSO 32% wurde hergestellt und diese dann mittels folgender Verdünnungsreihe auf verschiedene Konzentrationen eingestellt:

Verdünnungsreihe:

Stammlösung = 1000µg/1000µl

- davon 10µl entnommen, in einen 10ml Messkolben gegeben und mit PBS aufgefüllt = 1µg/1000µl
- davon 500µl entnommen und mit 500µl PBS verdünnt = 0,5µg/1000µl
- davon 500µl entnommen und mit 500µl PBS verdünnt = 0,25µg/1000µl

→ davon 500µl entnommen und mit 500µl PBS verdünnt = 0,12µg/1000µl

→ davon 500µl entnommen und mit 500µl PBS verdünnt = 0,06µg/1000µl

→ davon 500µl entnommen und mit 500µl PBS verdünnt = 0,03µg/1000µl

→ davon 500µl entnommen und mit 500µl PBS verdünnt = 0,01µg/1000µl

Von den verschiedenen Konzentrationen wurden jeweils 40µl in die HPLC injiziert und analysiert.

2.5.5 Coffein Standard

Für den Standard wurde eine Stammlösung von 30mg Coffein pro ml PBS und eine Stammlösung von 10mg Coffein pro ml PBS hergestellt und diese dann mittels folgender Verdünnungsreihen auf 1,5µg/ml bzw 5µg/ml eingestellt.

Verdünnungsreihe:

Stammlösung = 30 000µg/1000µl

→ davon 50µl entnommen und mit 950µl PBS verdünnt = 1500µg/1000µl

→ davon 50µl entnommen und mit 950µl PBS verdünnt = 75µg/1000µl

→ davon 200µl entnommen und mit 800µl PBS verdünnt = 15µg/1000µl

→ davon 100µl entnommen und mit 900µl PBS verdünnt = 1,5µg/1000µl

Stammlösung = 10 000µg/1000µl

→ davon 50µl entnommen und mit 950µl PBS verdünnt = 500µg/1000µl

→ davon 50µl entnommen und mit 950µl PBS verdünnt = 25µg/1000µl

→ davon 200µl entnommen und mit 800µl PBS verdünnt = 5µg/1000µl

Von der Konzentration 5µg/ml und 1,5µg/ml wurden jeweils 40µl injiziert und mittels HPLC analysiert.

2.6 In vitro Modell

2.6.1 Beschreibung des EpiDerm™ Modells

Das von MatTek patentierte EpiDerm™ System besteht aus menschlichen epidermalen Keratinozyten (NHEK), welche kultiviert wurden, um ein mehrschichtiges Modell einer menschlichen Epidermis zu erzeugen.

Jüngste Studien haben gezeigt, dass das EpiDerm™ Hautmodell ähnliche Barriereeigenschaften aufweist wie die menschliche Haut. Dies liegt womöglich an der ähnlichen Anordnung (Backstein-Mörtel-Modell) der Lipidlamellen, wie sie sonst nur in der menschlichen Hornhaut vorkommen.

Zusätzlich weist das EpiDerm™ Modell metabolische und mitotische Aktivität auf, welche auch in der menschlichen Epidermis eine Rolle spielt und zum Beispiel in Haut von Kadavern nicht vorhanden ist.

Dadurch werden mittels des EpiDerm™ Modells, reproduzierbarere Ergebnisse erzeugt, als mit der isolierten Haut aus Kadavern.

Das EpiDerm™ Hautmodell ähnelt also in vieler Hinsicht stark der menschlichen Haut, wodurch es hervorragend geeignet ist, um sowohl Toxizitätstests als auch Permeabilitätstest von neuen topischen Arzneistoffen durchzuführen [18].

Stratum Corneum -

Epidermis -

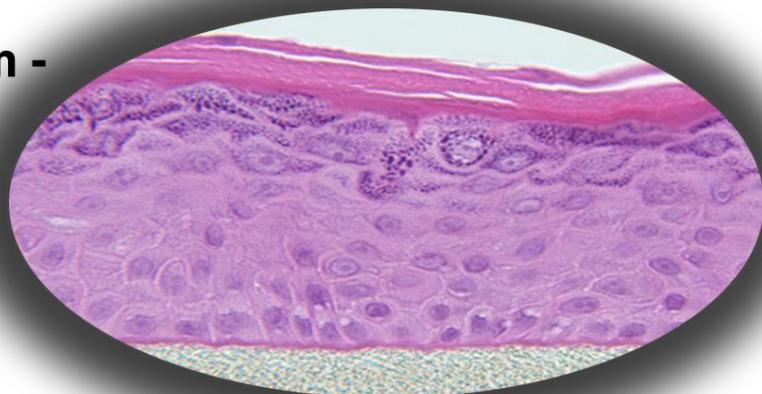


Abbildung 5: Aufbau der Haut im EpiDerm™ Modell [18]

Bei dem von uns verwendeten Modell handelt es sich um das EPI 100 FIX.

Das Gerät selbst besteht aus zwei Teflonringen welche mittels vier Schrauben ineinander befestigt werden. Dabei dürfen die Schrauben nicht zu stark angezogen werden, da es sonst zu einer Verformung des Kunststoffes kommen kann. Zwischen diesen zwei Teflonringen wird die gezüchtete Haut eingespannt.

Die gesamte Apparatur wird in eine Sixwell Kulturplatte gegeben, in welcher sich in jedem Well 5ml PBS Puffer befinden.

In den inneren Ringraum des EPI 100 FIX wird die jeweilige Donor-Zubereitung (siehe 2.6.3) auf die gespannte Haut aufgetragen.

Der innere Durchmesser der kreisförmigen Öffnung beträgt 0,57 cm und die Auftragefläche 0,256 cm². Um die Dosis pro cm² zu berechnen muss daher die aufgetragene Menge mit dem Faktor 3,9 multipliziert werden.



Abbildung 6: Teile des Epi 100 FIX



Abbildung 7: gezüchtete Haut

Um sterile Bedingungen zu erzeugen wurden alle Arbeitsschritte unter dem Laminar Air Flow durchgeführt und ausschließlich mit sterilem Medium und Puffer gearbeitet.

Die aufgetragenen Donor-Formulierungen konnten nicht unter dem Laminar Air Flow zubereitet werden. Daher erfolgte die Herstellung so gut als möglich unter sterilen Bedingungen.

2.6.2 Durchführung der Permeabilitätstests

Die Anleitung zur Durchführung der Versuche wurde aus der Literatur des Herstellers entnommen und in einer modifizierten Form angewendet [18, 19].

Arbeitsschritte:

1. Die Haut aus dem Agarose Medium in 2ml Assay Medium geben.
2. Danach über Nacht inkubieren ($37 \pm 1^\circ\text{C}$, $5 \pm 1\%$ CO_2 , 95% RH).
3. Inkubierte Haut in EPI 100 FIX einspannen und ins Akzeptor Medium überführen (= 5 ml PBS in jeder Sixwell Kulturplatte)
4. Die Haut muss anschließend noch 15min an die Permeationstemperatur (Raumtemperatur) angepasst werden.
5. Von den verschiedenen Donor-Formulierungen (siehe 2.6.3) werden je 0,5 ml in den inneren Ringraum des EPI 100 FIX aufgetragen (= Zeitpunkt 0). Es werden jeweils Doppelbestimmungen bzw. Dreifachbestimmungen der verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Das Konzentrationsverhältnis Donor/Akzeptor beträgt üblicherweise 1:1000. Die Donor Lösung hat nun Zeit durch die Haut zu permeieren.
(Konzentration in mg * Faktor 3,9 = tatsächliche Dosis in mg/cm^2)
6. Zum Zeitpunkt X wird die Apparatur mit der Haut um eine Reihe hinunter versetzten (d.h. von Reihe A nach B). Empfohlen werden die Zeitpunkte X= 0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 6 ; 24 ; 26 Stunden.
Die Platten sind von Probennahme zu Probennahme im Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 zu lagern.
7. In Reihe A wird aus allen drei Wells die gesamte Akzeptorlösung entfernt. Ein Teil wird eingefroren, der andere Teil wird mittels HPLC analysiert, wobei das Volumen des Akzeptormedium mittels Speedvak eingengt werden kann und somit eine stärker konzentrierte Analysenlösung hergestellt werden kann.
8. Nach vorgegebenem Zeitpunkt X wird die Apparatur wieder um eine Reihe hinunter versetzt und somit in 5ml frisches Akzeptormedium gegeben. Jenes Akzeptormedium aus der vorhergehenden Reihe wird wie oben beschrieben aufgearbeitet.

Die Einsätze sind mit sterilem Mull trocken abzutupfen bevor sie in das frische Medium eingesetzt werden.

9. Dieser Schritt wird in bestimmten Zeitabständen mehrmals wiederholt. Nachdem die letzte Probe gezogen wurde, sollte jedenfalls auch eine Probe der Donor-Formulierung analysiert werden, um zu überprüfen ob deren Konzentration für den Zeitraum des Experiments konstant war.

Vor Wiederverwendung der Teflonringe müssen diese durch Einlegen in 70% Ethanol für 30 min sterilisiert werden.

10. Am Ende des Versuchs kann, wenn gewünscht, die Durchflussrate bestimmt und der Permeationskoeffizient K_p berechnet werden.

C_d = Konzentration der Substanz in der Donor Lösung

C_r = Konzentration der Substanz in der Akzeptor Lösung

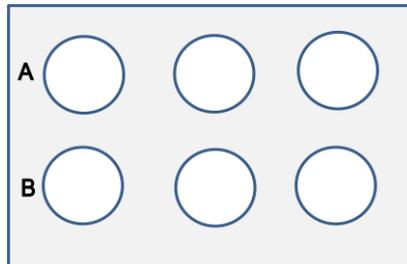


Abbildung 9: Leere Sixwell Platte

+ 5ml PBS
→

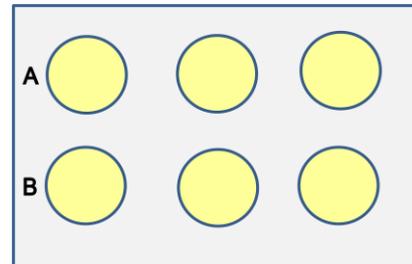


Abbildung 8: Sixwell Platte + Akzeptormedium

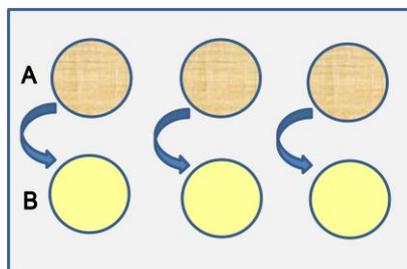


Abbildung 11: Sixwell Platte mit Haut in Reihe A

Reihe versetzen
→

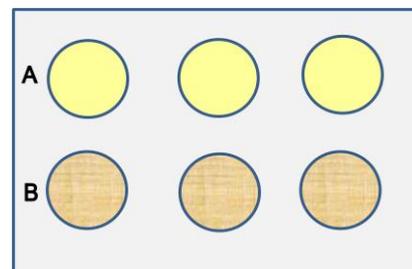


Abbildung 10: Sixwell Platte mit Haut in Reihe B

2.6.3 Herstellung der Donor – Formulierungen

- [Myristylalkohol 15%ig in Ultrabas](#)

Die Creme ohne Wirkstoff gilt als Negativ Kontrolle.

Dazu wurden 750mg Myristylalkohol (100%ig) vorgelegt und bei 48 °C am Ultraschallbad (jedoch ohne Ultrabeschallung) in 4250mg Ultrabas eingerührt bis eine homogene Masse entstanden ist.

Danach lässt man die Grundlage auf Raumtemperatur abkühlen und kann sie unter Lichtschutz lagern. Die Creme darf jedoch niemals unter 15 °C gekühlt werden.

- [DMSO 5%ig in Ultrabas](#)

Die Creme ohne Wirkstoff gilt ebenfalls als Negativ Kontrolle.

Die Formulierung wurde auf gleiche Weise hergestellt wie jene mit Myristylalkohol, jedoch wurden hier 50mg DMSO (100%ig) vorgelegt und bei 48 °C am Ultraschallbad (ohne Ultrabeschallung) in 950mg Ultrabas eingearbeitet.

Nach abkühlen auf Raumtemperatur kann man auch diese Grundlage unter Lichtschutz lagern. Die Creme darf nicht unter 15 °C gekühlt werden.

- [SL11 \(1%ig\) in Myristylalkohol 15% und Ultrabas](#)

Es wurden 49,7mg SL11 (100%ig) bei 48 °C am Ultraschallbad in 759mg Myristylalkohol (100%) gelöst. Die klare Lösung wurde in die bei ebenfalls 48 °C am Ultraschallbad vorgelegte Menge von 4200mg Ultrabas eingearbeitet und konnte danach bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz gelagert werden.

Wichtig war bei Myristylalkohol als Träger, dass man die Lösung innerhalb von 15min in die Grundlage einrührt und dabei ohne Ultrabeschallung arbeitet.

- [SL11 \(1%ig\) in DMSO 2,5% und Ultrabas](#)

Es wurden 49,9mg SL11 (100%ig) bei 48 °C am Ultraschallbad in 126mg DMSO (100%) gelöst. Die klare Lösung wurde in die bei ebenfalls 48 °C am Ultraschallbad (jedoch ohne Ultrabeschallung) vorgelegte Menge von 4800mg Ultrabas eingearbeitet.

Bei dieser Formulierung kam es schon nach etwa 30 min zur Kristallisation, weshalb sie nicht gelagert werden konnte, und erst unmittelbar vor den Versuchen hergestellt werden musste.

- [SL11 \(1%ig\) in DMSO 5% und Ultrabas](#)

Analog zu SL11 in DMSO 2,5% wurden 49,8mg SL11 (100%ig) bei 48 °C am Ultraschallbad in 254mg DMSO (100%) gelöst. Die klare Lösung wurde in die bei ebenfalls 48 °C am Ultraschallbad (ohne Ultrabeschallung) vorgelegte Menge von 4700mg Ultrabas eingerührt.

Die Creme konnte unter Lichtschutz bei Raumtemperatur gelagert werden.

- [Lösung von SL11 \(0,01%ig\) in DMSO 0,5% und PBS](#)

Da DMSO ein Penetrationsbeschleuniger ist, kann ein zu hoher Gehalt zu intensiven Wechselwirkungen mit den Lipiden oder Corneozyten der Hornhaut führen [3]. Da die Permeabilitätsversuche dadurch negativ beeinflusst werden können, haben wir zum Vergleich auch eine SL11 Formulierungen mit einem niedrigeren Gehalt an DMSO hergestellt.

Dabei wurde 1 mg SL11 am Ultraschallbad bei 48 °C mit 1ml DMSO 5% versetzt. Von der entstandenen Suspension wurden 200 µl entnommen und mit 1800ml PBS vermischt. Diese Mischung wurde sofort in das Ultraschallbad bei 48 °C für 10 Minuten gestellt bis eine klare Lösung entstand.

Dadurch betrug jedoch die Wirkstoffkonzentration nur 0,01% und es befand sich in der Auftragemenge (=0,5ml) eine Konzentration von 50µg statt den üblichen 5mg.

Aufgrund der geringen Konzentration von SL11 wurden von dieser Lösung 100µl in die HPLC injiziert.

- [Coffein \(0,6%ig\) in PBS, DMSO 5% und Ultrabas](#)

Ursprünglich war geplant eine 1%ige Formulierung von Coffein in DMSO 5% und Ultrabas herzustellen. Da sich jedoch Coffein in DMSO 5% nicht löst, musste es zuerst mit PBS versetzt werden.

Dazu wurden 50mg Coffein eingewogen und in 2,5ml PBS am Ultraschallbad gelöst. Anschließend wurde die klare Lösung analog zu den vorherigen Proben bei 48 °C mit 250mg DMSO (100%) vermischt und in 4700mg Ultrabas eingearbeitet.

Die Konzentration von Coffein betrug daher nicht 1% sondern nur 0,6% und in der Auftragemenge (= 0,5ml) befanden sich dementsprechend nur 3,3mg statt den sonstigen 5mg.

- [Coffein \(0,6%ig\) in PBS, Myristylalkohol 15% und Ultrabas](#)

Analog zur Formulierung mit DMSO 5% löst sich die Menge von 50mg Coffein ebenso nicht in Myristylalkohol und es müssen daher zuerst 2,5ml PBS am Ultraschallbad zugesetzt werden.

Die klare Lösung wurde genauso weiter behandelt wie die Formulierung mit DMSO 5%, jedoch wurden statt dem DMSO, hierfür 750mg Myristylalkohol (100%) und 4200mg Ultrabas verwendet.

Da in dieser Formulierung schon nach wenigen Stunden eine Phasentrennung zwischen der Coffein Lösung und dem Ultrabas zu erkennen war (siehe Abbildung 12), wurden die zukünftigen Formulierungen als Lösungen hergestellt und aufgetragen.

- [Lösung von Coffein \(1%ig\) in PBS und DMSO 2,5%](#)

Die Lösung wurde hergestellt um ein Brechen der Formulierung zu verhindern.

Dazu wurden 50mg Coffein am Ultraschallbad in 4826µl PBS gelöst und mit 124µl DMSO (100%) versetzt.

- [Lösung von Coffein \(3%ig\) in PBS und DMSO 0,5%](#)

Da DMSO ein Penetrationsbeschleuniger ist, und ein zu hoher Gehalt die Permeabilitätsversuche negativ beeinflussen könnte, haben wir zum Vergleich eine Coffein Formulierung mit einem niedrigeren Gehalt an DMSO hergestellt.

Dazu wurden 75 mg Coffein in 2413µl PBS am Ultraschallbad gelöst und mit 12µl DMSO (100%) versetzt. Dementsprechend befand sich in der Auftragemenge (= 0,5ml) 15mg Coffein.

- [Lösung von Coffein \(1%ig\) in PBS und DMSO 0,5%](#)

Es wurde außerdem eine Formulierung mit niedrigerem Coffein und DMSO Gehalt hergestellt.

Dazu wurden 25 mg Coffein in 2463 μ l PBS am Ultraschallbad gelöst und mit 12 μ l DMSO (100%) versetzt. Dementsprechend befand sich in der Auftragemenge (= 0,5ml) 5mg Coffein.

- [Lösung von Capsaicin in DMSO 0,5%](#)

Für die Capsaicin Lösung wurden 1,3mg Capsaicin eingewogen und in 2,7ml DMSO 0,5% gelöst. Dies ergibt eine Konzentration von 481 μ g/ml und damit befinden sich in der Auftragemenge (=0,5ml) etwa 241 μ g Capsaicin.

- [Dalacin Lotion und Lösung](#)

Für die Versuche mit dem etablierten topischen Antibiotikum Clindamycin wurden zwei Spezialitäten verwendet und als solche aufgetragen. Die Konzentration betrug jeweils 10mg/ml.



Abbildung 12: Phasentrennung in der Ultrabas Formulierung

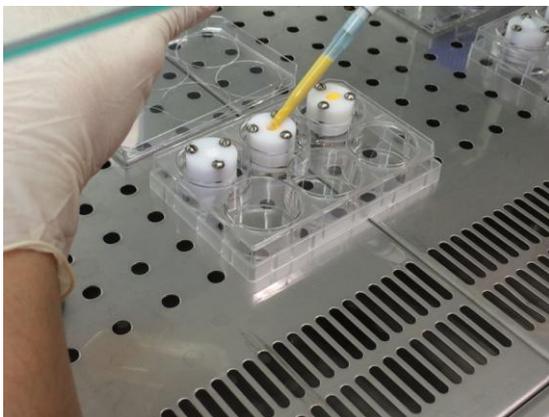


Abbildung 13: Auftragen der Donor - Substanzen auf das zusammengesetzten Epi 100 FIX in der Sixwell Kulturplatte

2.6.4 Planung der in vitro Versuchsreihen

S1-S3 gibt die Anzahl der Parallelversuche an. Kinetik verweist auf zwei Werte die jeweils in den Stunden 1-6 gezogen wurden. SS (Steady State) ist der nach 6 Stunden einmalig gezogene Wert.

Versuchsreihe 1 (SET A-D)

Tabelle 6: Versuchsreihe 1 in vitro

Haut Nr.	Substanz	Lösungsmittel	Grundlage	Anmerkung
1	Leerwert	Myristylalkohol (15%ig)	Ultrabas	Kinetik
2	Leerwert	DMSO (5%ig)	Ultrabas	Kinetik
3	SL11 (1%ig)	DMSO (2,5%ig)	Ultrabas	Kinetik, S1
4	SL11 (1%ig)	DMSO (2,5%ig)	Ultrabas	Kinetik, S2
5	SL11 (1%ig)	DMSO (2,5%ig)	Ultrabas	Kinetik, S3
6	SL11 (1%ig)	DMSO (2,5%ig)	Ultrabas	SS
7	SL11 (1%ig)	DMSO (5%ig)	Ultrabas	Kinetik, S1
8	SL11 (1%ig)	DMSO (5%ig)	Ultrabas	Kinetik, S2
9	SL11 (1%ig)	DMSO (5%ig)	Ultrabas	Kinetik, S3
10	SL11 (1%ig)	DMSO (5%ig)	Ultrabas	SS
11	SL11 (1%ig)	Myristylalkohol (15%ig)	Ultrabas	Kinetik, S1
12	SL11 (1%ig)	Myristylalkohol (15%ig)	Ultrabas	Kinetik, S2
13	SL11 (1%ig)	Myristylalkohol (15%ig)	Ultrabas	Kinetik, S3
14	SL11 (1%ig)	Myristylalkohol (15%ig)	Ultrabas	SS
15	SL11 (0,01%ig)	PBS + DMSO (0,5%ig)	Lösung	Kinetik, S1
16	SL11 (0,01%ig)	PBS + DMSO (0,5%ig)	Lösung	Kinetik, S2

17	Coffein (1%ig)	PBS + DMSO (2,5%ig)	Lösung	Kinetik, S1
18	Coffein (1%ig)	PBS + DMSO (2,5%ig)	Lösung	Kinetik, S2
19	Coffein (0,6%ig)	PBS + DMSO (5%ig)	Ultrabas	Kinetik, S1
20	Coffein (0,6%ig)	PBS + DMSO (5%ig)	Ultrabas	Kinetik, S2
21	Coffein (0,6%ig)	PBS + Myristylalkohol (15%ig)	Ultrabas	Kinetik, S1
22	Coffein (0,6%ig)	PBS + Myristylalkohol (15%ig)	Ultrabas	Kinetik, S2
23	Coffein (1%ig)	PBS + DMSO (0,5%ig)	Lösung	Kinetik
24	Coffein (3%ig)	PBS + DMSO (0,5%ig)	Lösung	Kinetik

Versuchsreihe 2 mit verletzter Haut (SET E)

Um Permeabilitätstests an Verletzungen zu simulieren, wurden ausgewählte, bereits in Versuchsreihe 1 verwendete Hautstücke, jeweils drei Mal mit einer Nadel durchstochen und danach bestimmte Salbenformulierungen aufgetragen.

Tabelle 7: Versuchsreihe 2 in vitro

Haut Nr.	Substanz	Lösungsmittel	Grundlage	Anmerkung
3	SL11 (1%ig)	DMSO (2,5%ig)	Ultrabas	Kinetik, S1
6	SL11 (1%ig)	DMSO (2,5%ig)	Ultrabas	SS
7	SL11 (1%ig)	DMSO (5%ig)	Ultrabas	Kinetik, S1
10	SL11 (1%ig)	DMSO (5%ig)	Ultrabas	SS

Versuchsreihe 3 (SET F-I)

In der letzten Versuchsreihe wurden die Proben sowohl auf verletzte, als auch auf intakte Haut aufgetragen.

Außerdem wurden zum Vergleich Permeabilitätsversuche mit bereits etablierten topischen Arzneistoffen durchgeführt.

Tabelle 8: Versuchsreihe 3 in vitro

Haut Nr.	Substanz	Lösungsmittel	Grundlage	Anmerkung
25	SL11 (0,01%ig)	PBS + DMSO (0,5%ig)	Lösung	Kinetik, S3
26	SL11 (0,01%ig)	PBS + DMSO (0,5%ig)	Lösung	Kinetik, S4
27	SL11 (0,01%ig)	PBS + DMSO (0,5%ig)	Lösung	Kinetik, S5
28	SL11 (0,01%ig)	PBS + DMSO (0,5%ig)	Lösung	Kinetik, verletzt S1
29	SL11 (0,01%ig)	PBS + DMSO (0,5%ig)	Lösung	Kinetik, verletzt S2
30	SL11 (0,01%ig)	PBS + DMSO (0,5%ig)	Lösung	Kinetik, verletzt S3
31	Capsaicin	DMSO (0,5%ig)	Lösung	Kinetik, S1
32	Capsaicin	DMSO (0,5%ig)	Lösung	Kinetik, S2

33	Capsaicin	DMSO (0,5%ig)	Lösung	Kinetik, S3
34	Capsaicin	DMSO (0,5%ig)	Lösung	Kinetik, verletzt S1
35	Capsaicin	DMSO (0,5%ig)	Lösung	Kinetik, verletzt S2
36	Capsaicin	DMSO (0,5%ig)	Lösung	Kinetik, verletzt S3
37	Clindamycin	Dalacin, Arzneispezialität	Lotion	Kinetik, S1
38	Clindamycin	Dalacin, Arzneispezialität	Lotion	Kinetik, S2
39	Clindamycin	Dalacin, Arzneispezialität	Lotion	Kinetik, S3
40	Clindamycin	Dalacin, Arzneispezialität	Lösung	Kinetik, S1
41	Clindamycin	Dalacin, Arzneispezialität	Lösung	Kinetik, S2
42	Clindamycin	Dalacin, Arzneispezialität	Lösung	Kinetik, S3

2.7 In vivo Modell

2.7.1 Beschreibung des in vivo Modells

Das in vivo Modell wurde mit Meerschweinchen durchgeführt. Die Tiere wurden auf einer Fläche von etwa 8x5 cm² rasiert und die unterschiedlichen topischen Zubereitungen (siehe 2.7.3.) großflächig aufgetragen.

Nach etwa zwei Stunden Einwirkzeit wurden einmalig Blutproben entnommen und mittels HPLC analysiert. Die Tiere waren dabei mit einer Mischung aus Fentanyl, Medetomidine, Midazolam und Ketamin narkotisiert.

2.7.2 Durchführung der Permeabilitätstests

Die Durchführung der in vivo Versuche wurden am AKH Wien unter der Leitung von Herrn Prof. Burgmann vorgenommen. Die Plasmaproben wurden anschließend an der Division für klinische Pharmazie und Diagnostik wie folgt aufbereitet und analysiert:

Es wurden 200µl der jeweiligen Probe mit 500µl ACN versetzt und 5 Minuten bei 800 Upm zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben erneut 2 Minuten bei 12000 Upm scharf zentrifugiert.

Der Überstand wurde in Sampler Fläschchen überführt und 40µl in die HPLC injiziert.

2.7.3 Planung der in vivo Versuchsreihe

Versuchsreihe 1 (28.03.14)

Tabelle 9: Versuchsreihe 1 in vivo

Tier Nr.	Zubereitung	Uhrzeit Applikation	Uhrzeit Blutabnahme	Anmerkung
1	SL11 1% Creme (50ml) 15% Myristylalkohol in Vaseline	10:45	13:25	Dormicum, Dormitor nachgespritzt
2	SL11 1% Creme (50ml) 15% Palmitylalkohol in Vaseline	10:45	13:18	Dormicum, Dormitor nachgespritzt
3	SL11 1% Creme (50ml) 2% DMSO in Ultrabas	10:47	13:12	
4	Negativ Kontrolle Creme (50ml) 15% Myristylalkohol in Vaseline	10:47	13:08	
5	SL11 1% Creme (50ml) 15% Myristylalkohol Ultrabas	10:49	13:05	
6	Unbehandelt , nur Narkose (Leerwert)	10:49	13:00	

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Allgemein

3.1.1 Erstellung der Eichgeraden

SL11:

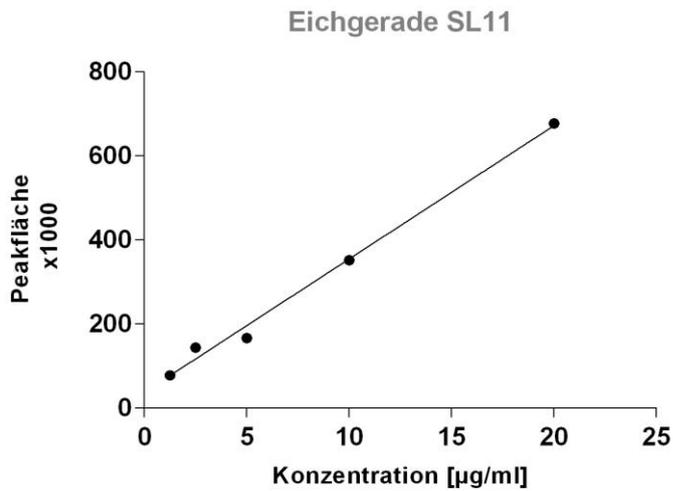


Abbildung 14: Eichgerade von SL11 in PBS

Steigung (k) = 31,72

Achsenabschnitt (d) = 38

Coffein:

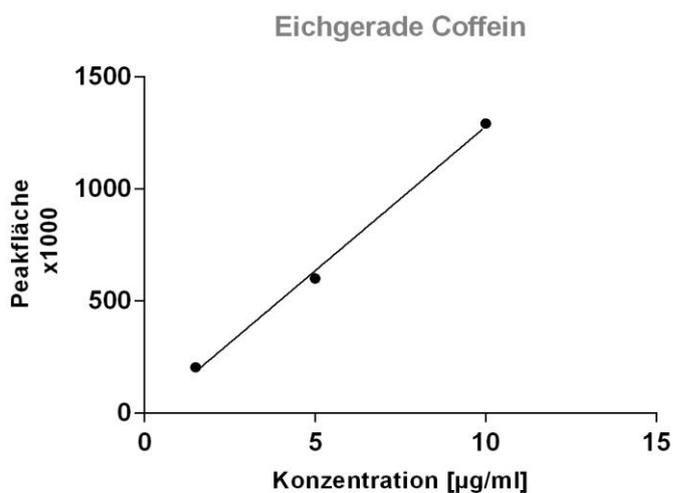


Abbildung 15: Eichgerade von Coffein in PBS

Steigung (k) = 128,7

Achsenabschnitt (d) = -9

Clindamycin:

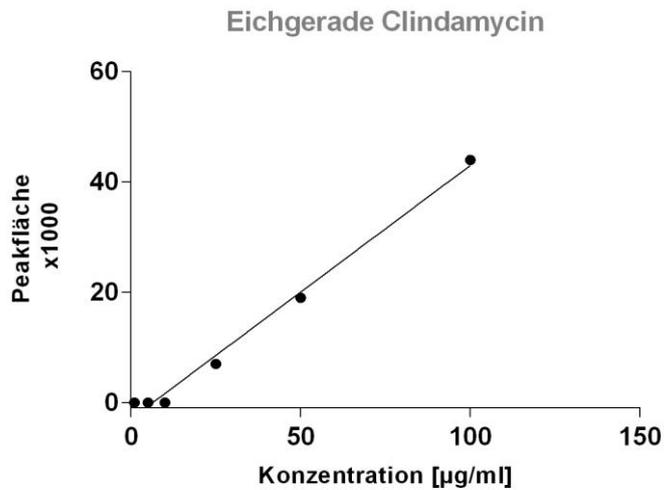


Abbildung 16: Eichgerade von Clindamycin in Eluent A

Steigung (k) = 0,46

Achsenabschnitt (d) = -3

Capsaicin:

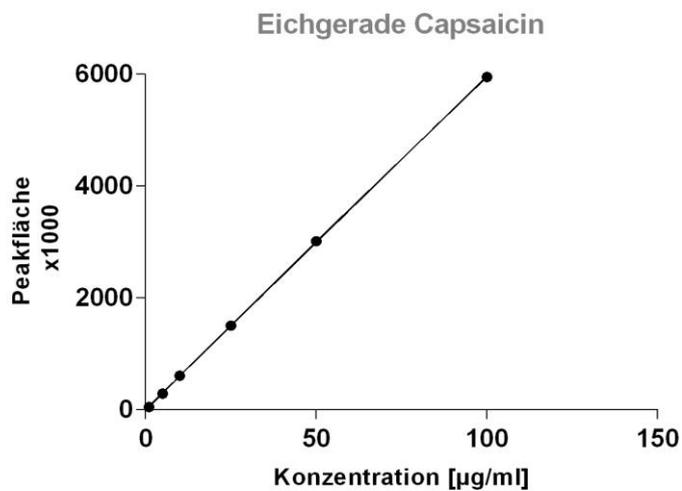


Abbildung 17: Eichgerade von Capsaicin in Eluent B

Steigung (k) = 59,58

Achsenabschnitt (d) = 8

Durch Erstellung der Eichgeraden erhält man die Steigung k. Diese dient dazu, die Konzentration anhand der Peakfläche einer mittels HPLC detektierten Substanz zu berechnen.

3.1.2 Ermitteln der Nachweisgrenze von SL11

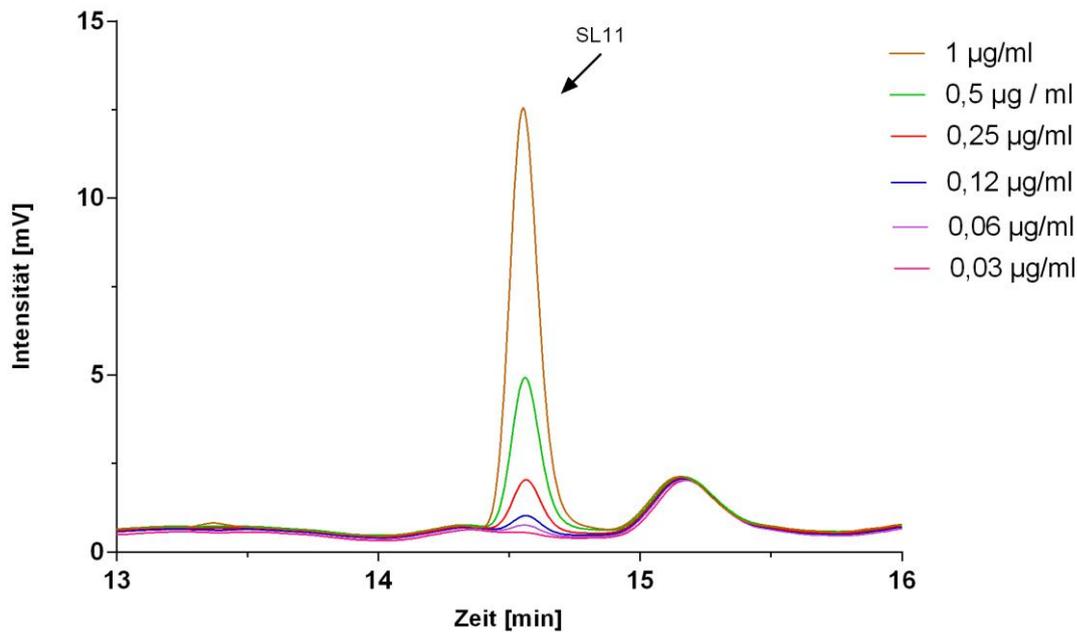


Abbildung 18: Nachweisgrenze von SL11

Die Verdünnungsreihe wurde durchgeführt um das Limit of Quantification (LOQ), sowie das Limit of Detection (LOD) zu bestimmen.

LOQ, auch Bestimmungsgrenze genannt, gibt die kleinste Menge oder Konzentration eines Analyten an, welche quantitativ bestimmt werden kann.

Erst wenn die detektierte Menge oder Konzentration oberhalb der Bestimmungsgrenze liegt, wird diese als Analyseergebnis angegeben.

LOD, auch Nachweisgrenze genannt, ist die kleinste nachweisbare Menge oder Konzentration eines Analyten.

Diese Werte können die Interpretation der Ergebnisse verifizieren und stellen damit wichtige Validierungsparameter einer analytischen Methode dar [20].

Das Limit of Quantification von SL11 wurde bei einer Konzentration von 0,06µg/ml gemessen und das Limit of Detection bei einer Konzentration von 0,03µg/ml.

3.1.3 Coffein Standard

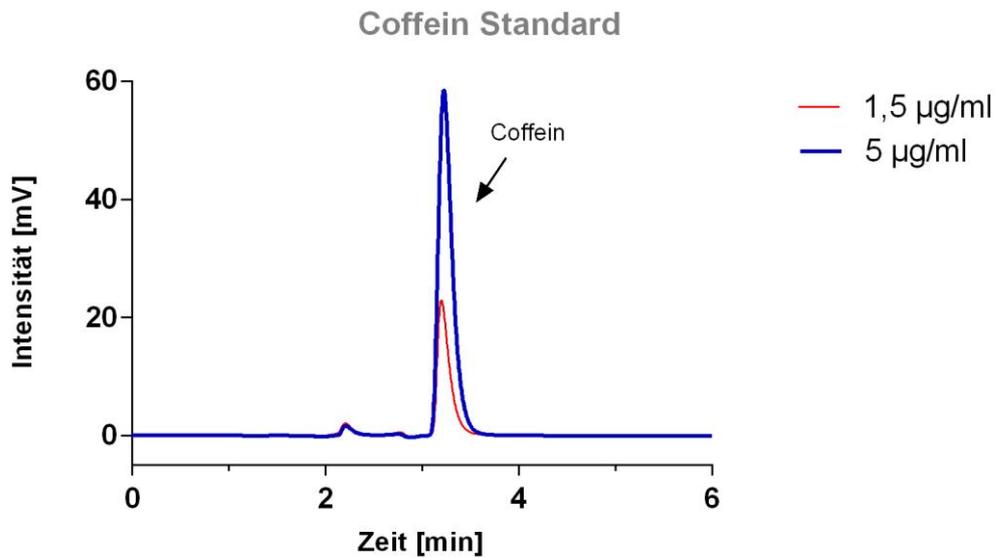


Abbildung 19: Coffein Standard in PBS

Die Peakflächen des Standards können bei der Interpretation der Permeabilität als Vergleich herangezogen werden.

3.2 In vitro Versuchsreihen

3.2.1 Leerwerte

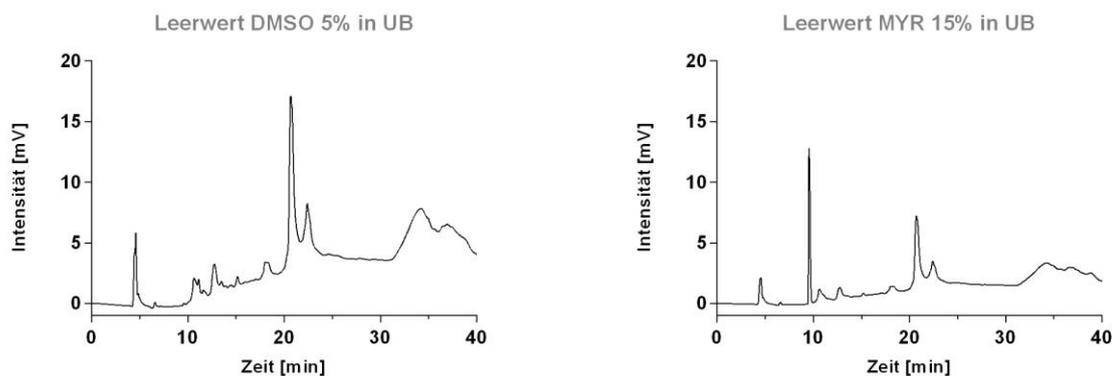


Abbildung 20: HPLC Chromatogramm der Leerwerte

Da in der Formulierung des Leerwertes kein Wirkstoff enthalten ist, können die vorhandenen Peaks ausschließlich von Substanzen aus der Grundlage oder dem Phosphatpuffer (Akzeptorlösung) stammen.

Die Analyse der Leerwerte wurde durchgeführt, um vorhandene Peaks in den folgenden Chromatogrammen richtig zuzuordnen zu können.

3.2.2 Permeation von SL 11

Die verschiedenen Formulierungen wurden auf die Haut aufgetragen und ergaben folgende Chromatogramme:

- [SL11 \(1%ig\) in Myristylalkohol 15% und Ultrabas](#)

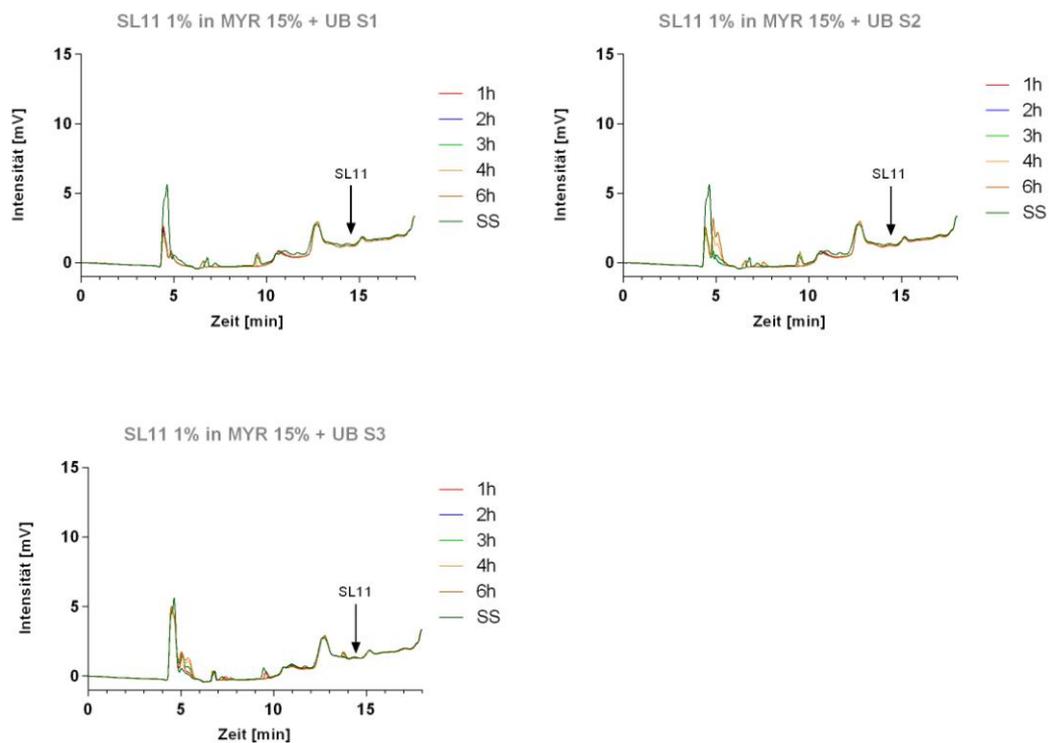


Abbildung 21: Permeation von SL11 in Myristylalkohol 15% durch das Epiderm™ Hautmodell

- SL11 (1%ig) in DMSO 2,5% und Ultrabas

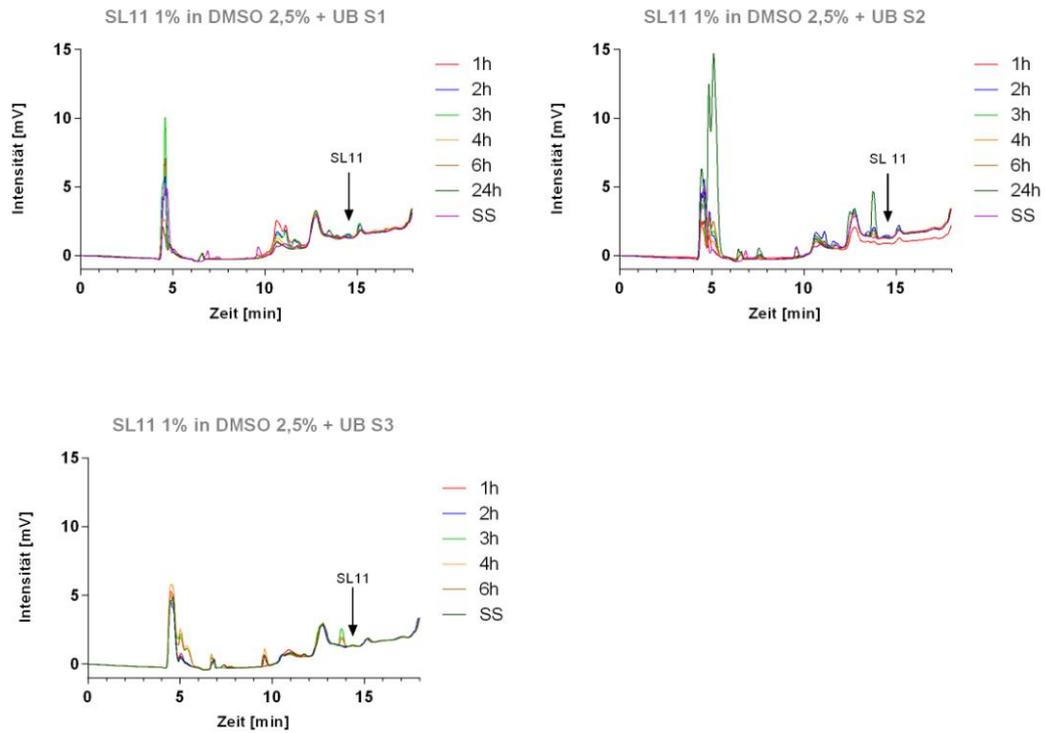


Abbildung 22: Permeation von SL11 in DMSO 2,5% durch das Epiderm™ Hautmodell

- SL11 (1%ig) in DMSO 5% und Ultrabas

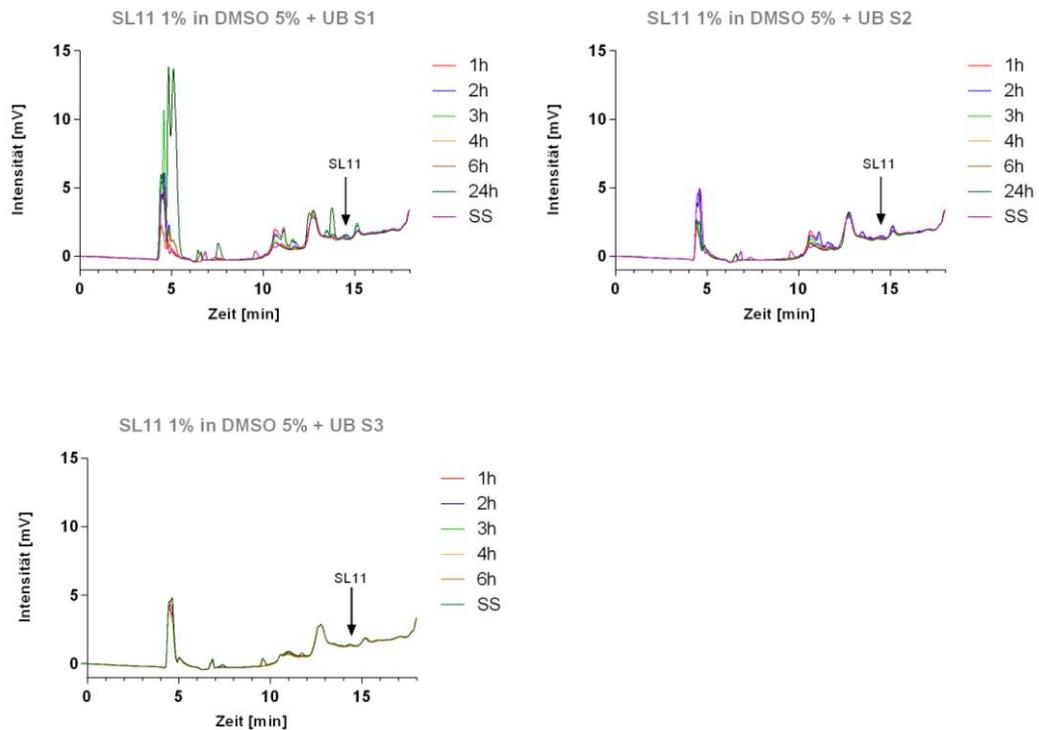


Abbildung 23: Permeation von SL11 in DMSO 5% durch das Epiderm™ Hautmodell

- [Lösung von SL11 \(0,01%ig\) in DMSO 0,5% und PBS](#)

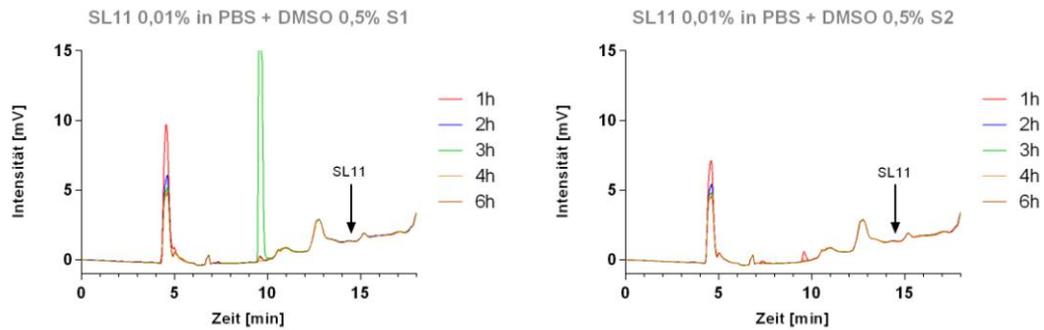


Abbildung 24: Permeation von SL11 in DMSO 0,5% durch das Epiderm™ Hautmodell

- [SL11 \(1%ig\) in DMSO 2,5% und Ultrabas auf verletzter Haut](#)

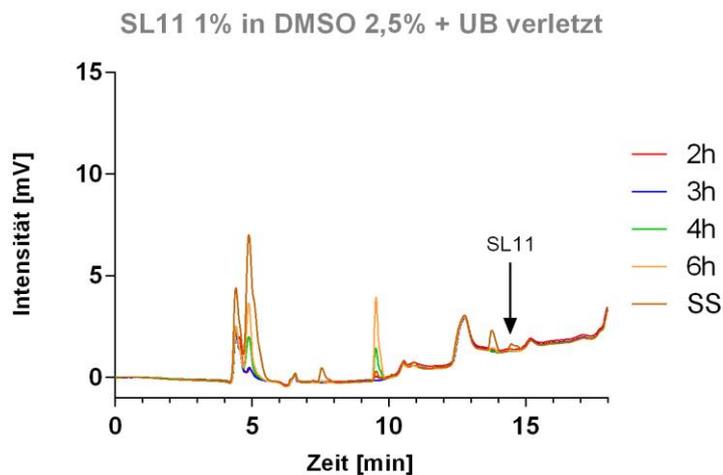


Abbildung 25: Permeation von SL11 in DMSO 2,5% durch das verletzte Epiderm™ Hautmodell

- [SL11 \(1%ig\) in DMSO 5% und Ultrabas auf verletzter Haut](#)

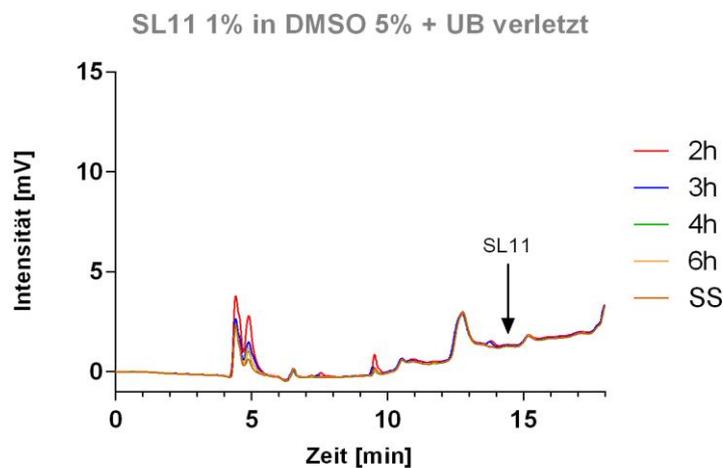


Abbildung 26: Permeation von SL11 in DMSO 5% durch das verletzte Epiderm™ Hautmodell

- [Lösung von SL11 \(0,01%ig\) in DMSO 0,5% und PBS auf verletzter Haut](#)

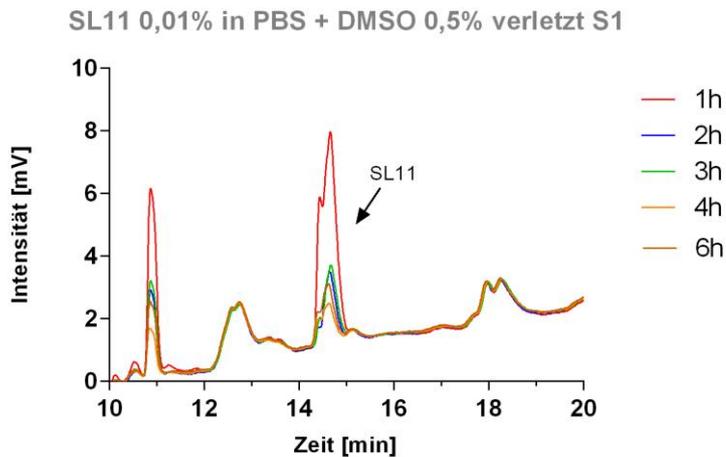


Abbildung 27: Permeation von SL11 in DMSO 0,5% durch das verletzte Epiderm™ Hautmodell

In allen Graphen der unverletzten Modelle ist zu sehen, dass es zu keinem Peak bei der Retentionszeit von SL11 gekommen ist. Dies lässt darauf schließen, dass SL11 nicht durch die intakte Haut penetriert und nur oberflächlich wirkt.

Ebenso kam es in den verletzten Hautmodellen zu keiner nennbaren Permeation von halbfesten SL11 Formulierungen in das Akzeptormedium.

Ausschließlich bei den Versuchen mit SL11 als Lösung kam es zum Durchtritt des Wirkstoffes durch die verletzte Haut (siehe Abbildung 27).

3.2.3 Permeation von Coffein

Als Vergleich wurden die Versuche ebenfalls mit Coffein durchgeführt und ergaben folgende Chromatogramme.

- [Coffein \(0,6%ig\) in PBS, DMSO 5% und Ultrabas](#)

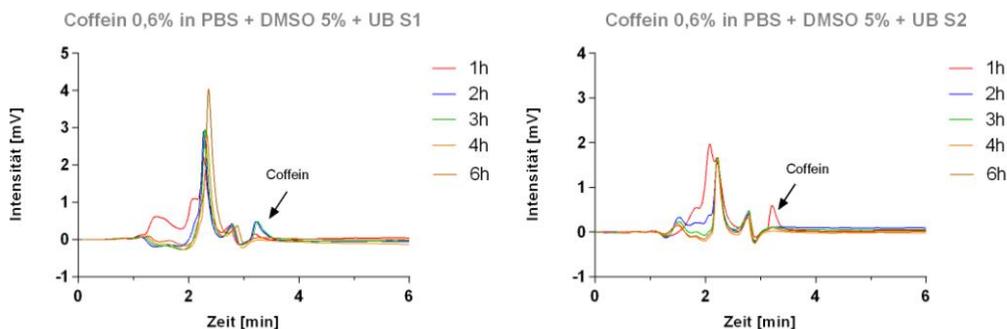


Abbildung 28: Permeation von Coffein in DMSO 5% durch das Epiderm™ Hautmodell

- [Coffein \(0,6%ig\) in PBS, Myristylalkohol 15% und Ultrabas](#)

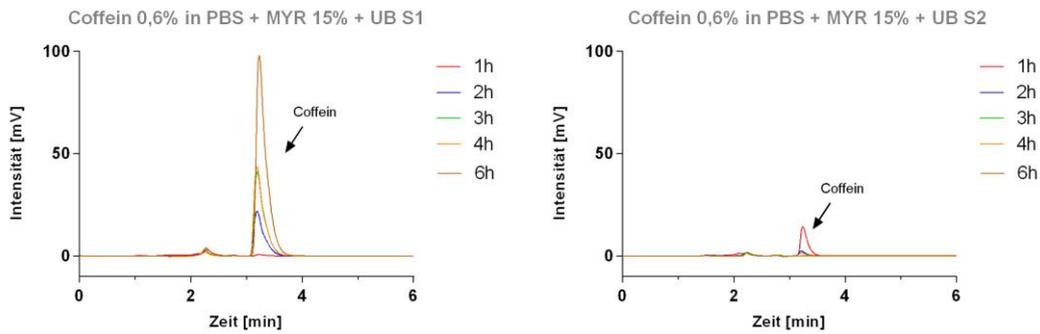


Abbildung 29: Permeation von Coffein in Myristylalkohol 15% durch das Epiderm™ Hautmodell

- [Lösung von Coffein \(1%ig\) in PBS und DMSO 2,5%](#)

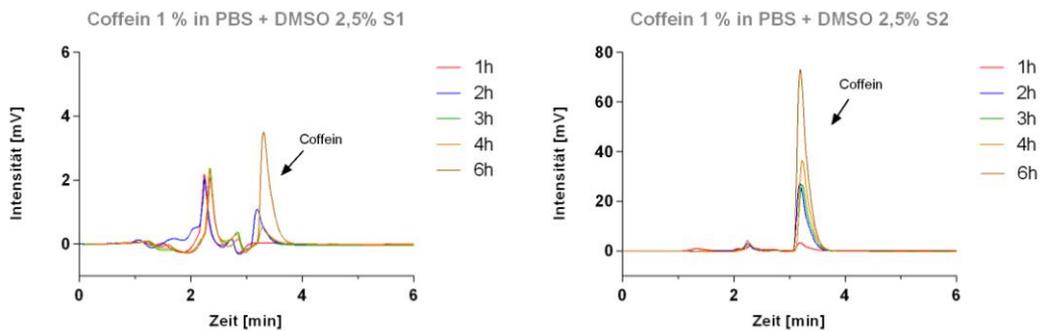


Abbildung 30: Permeation von Coffein in DMSO 2,5% durch das Epiderm™ Hautmodell

- [Lösung von Coffein \(3%ig\) in PBS und DMSO 0,5%](#)

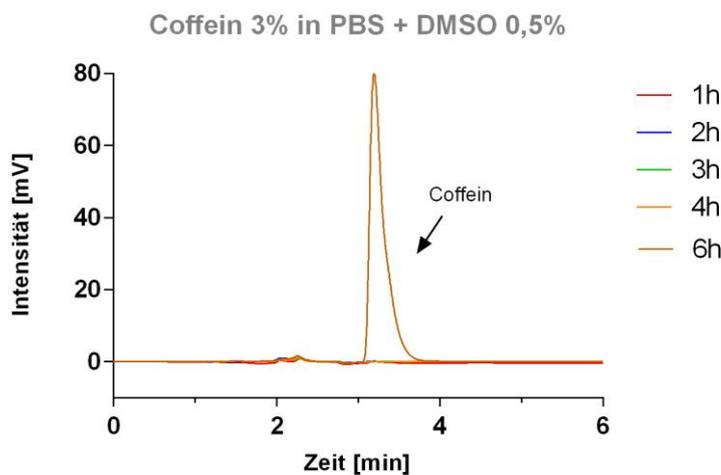


Abbildung 31: Permeation von Coffein 3% in DMSO 0,5% durch das Epiderm™ Hautmodell

- [Lösung von Coffein \(1%ig\) in PBS und DMSO 0,5%](#)

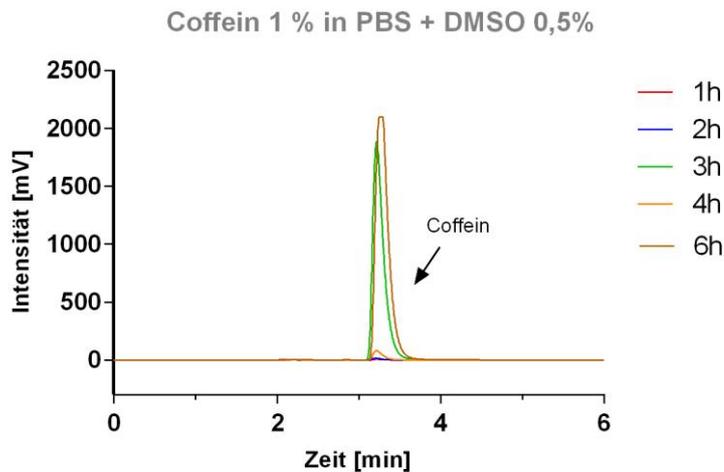


Abbildung 32: Permeation von Coffein 1% in DMSO 0,5% durch das Epiderm™ Hautmodell

Bei allen Formulierungen mit Coffein ist wie erwartet eine deutliche Permeation durch das Epiderm™ Hautmodell zu erkennen.

Diese Ergebnisse dienen als Beweis, dass das Epiderm™ Modell mit allen Formulierungen funktioniert. Die Substanz kann sowohl aus Lösungen, als auch aus einer festen Grundlage, wie Ultrabas, durch die Haut permeieren.

Zur besseren Übersicht dient Tabelle 10, welche die Größe der Peakflächen von Coffein aus den jeweiligen Formulierungen verdeutlicht, und zur Berechnung des permeierten Wirkstoffanteiles dient.

Tabelle 10: Peakflächen x 1000 von den verschiedenen Coffein Formulierungen

Lösung	Coffein 1%, DMSO 2,5% S1	Coffein 1%, DMSO 2,5% S2	Coffein 1%, DMSO 0,5%	Coffein 3%, DMSO 0,5%
1h	7,82	37,75	73,09	14,10
2h	13,62	339,07	157,46	8,42
3h	6,19	333,05	1781,57	7,49
4h	6,14	451,09	739,12	3,78
6h	43,22	906,78	1366,41	1010,65

Ultrabas	Coffein 0,6%, DMSO 5% S1	Coffein 0,6%, DMSO 5% S2	Coffein 0,6%, MYR 15% S1	Coffein 0,6%, MYR 15% S2
1h	11,70	2,20	1214,33	134,74
2h	9,32	4,99	7,96	28,55
3h	9,76	5,44	271,68	7,71
4h	12,82	4,58	511,72	11,00
6h	6,67	3,06	542,95	29,40

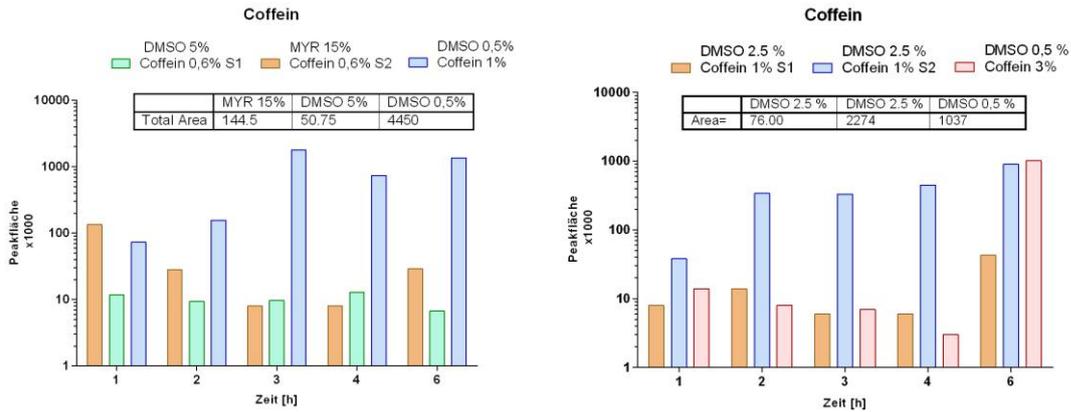


Abbildung 33: Vergleich der Peakflächen von den verschiedenen Coffein Formulierungen

In Abbildung 33 wird anhand eines Diagrammes das Verhältnis der einzelnen Peakflächen zueinander veranschaulicht.

Bei den Formulierungen mit einem niedrigeren DMSO Gehalt kann man deutlich die stärkere Permeation erkennen. Dies erscheint vorerst als nicht nachvollziehbar, da DMSO einen Penetrationsbeschleuniger darstellt. Jedoch gilt es zu wissen, dass bei einem zu hohen DMSO Gehalt die Zellen des Epiderm™ Modelles geschädigt werden können und es so zu Veränderungen im Permeationsverhalten kommen kann.

3.2.4 Permeation von etablierten topischen Arzneispezialitäten

- Dalacin Lotion und Lösung

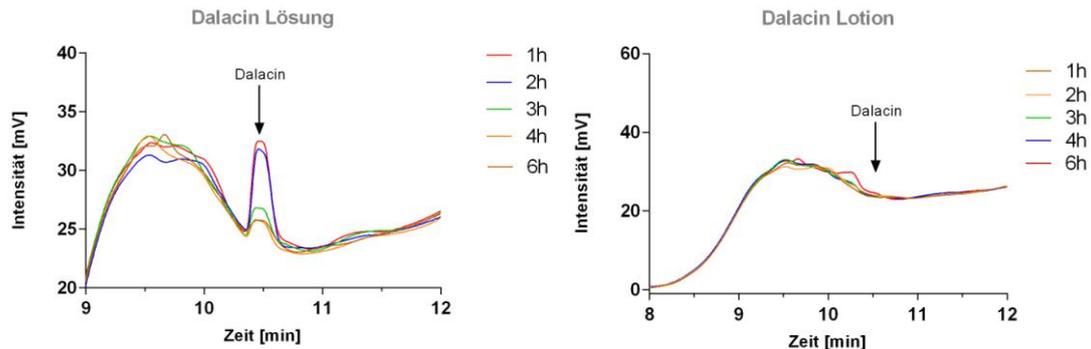


Abbildung 34: Vergleich Permeation von Dalacin Lösung und Lotion durch das Epiderm™ Hautmodell

- Lösung von Capsaicin in DMSO 0,5%

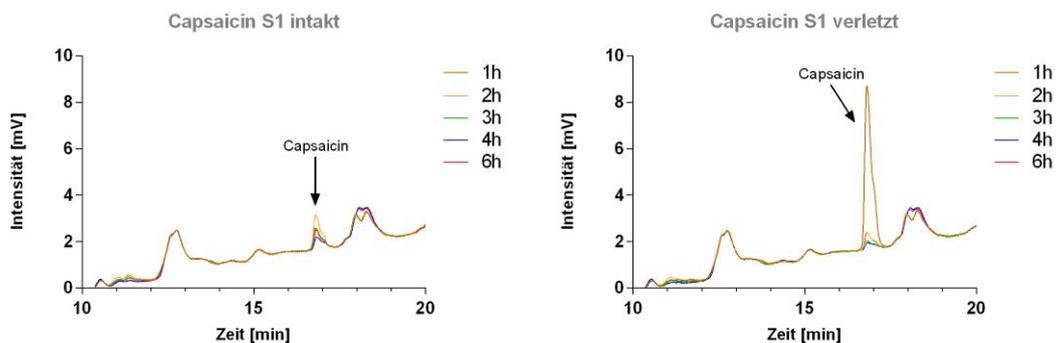


Abbildung 35: Vergleich Permeation von Dalacin Lösung und Lotion durch das Epiderm™ Hautmodell

Dalacin wurde sowohl als Lotion, als auch als Lösung auf die Haut aufgetragen und im Anschluss das Akzeptormedium mittels HPLC analysiert.

Im Chromatogramm ist gut zu erkennen, dass es nur bei der Lösung zu einer Permeation durch das Hautmodell gekommen ist.

Der Grund dafür könnte möglicherweise die Konsistenz der aufgetragenen Spezialitäten sein. Wie sich während der letzten Versuchsreihe herausgestellt hat, ist das Epiderm™ Hautmodell ideal geeignet für Lösungen. Salben und andere halb feste Zubereitungen stellen jedoch ein Hindernis dar, da es zu einem Anhaften der Formulierung an den inneren Ringraum kommen kann.

Dadurch bildet sich innen ein Luftraum und eine gleichmäßige Verteilung des Wirkstoffes auf der eingespannten Haut kann nicht mehr gewährleistet werden.

3.2.5 Vergleich der Permeation von SL11 und etablierten Arzneistoffen

In den nachfolgenden Tabellen wird der Permeationsunterschied zwischen intakter und verletzter Haut verdeutlicht, sowie die Ergebnisse der Vergleichsproben beleuchtet.

Durch die intakte Haut hat keine Permeation von SL11 stattgefunden. Es kam jedoch zu einem Eindringen des Wirkstoffes über die verletzte Haut.

Somit stellt die intakte Haut mit ihrem Stratum corneum eine Penetrationsbarriere für SL11 dar, und verhindert die systemische Wirkung des potentiellen Antibiotikums.

Wie bereits in den Chromatogrammen zu erkennen war, kam es teilweise zu unterschiedlich großen Peakflächen bei Dreifachbestimmungen.

Dies könnte, wie schon besprochen, an der Konsistenz der verschiedenen Formulierungen liegen.

Um möglichst genaue Darstellungen zu erhalten, wurden die nachfolgenden Diagramme mit den Mittelwerten der Analyseergebnisse erstellt.

- [Lösung von SL11 \(0,01%ig\) in DMSO 0,5% und PBS](#)

Tabelle 11: Peakflächen x 1000 von SL11 bei WL 1 (235nm) auf intakter und verletzter Haut

SL11 intakte Haut	S1	S2	S3	Mittelwert	SD +/-
1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SL11 verletzte Haut	S1	S2	S3	Mittelwert	SD +/-
1h	127,0	117,0	115,0	119,7	6,4
2h	67,0	7,0	135,0	69,7	64,0
3h	63,0	0,0	77,0	46,7	41,0
4h	26,0	0,0	39,0	21,7	19,9
6h	38,0	0,0	64,0	34,0	32,2

Tabelle 12: Peakflächen x 1000 von SL 11 bei WL 2 (270nm) auf intakter und verletzter Haut

SL11 Intakte Haut	S1	S2	S3	Mittelwert	SD +/-
1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

SL11 verletzte Haut	S1	S2	S3	Mittelwert	SD +/-
1h	49,0	45,0	44,0	46,0	2,6
2h	25,0	4,0	63,0	30,7	29,9
3h	27,0	8,0	32,0	22,3	12,7
4h	10,0	0,0	13,0	7,7	6,8
6h	14,0	0,0	18,0	10,7	9,5

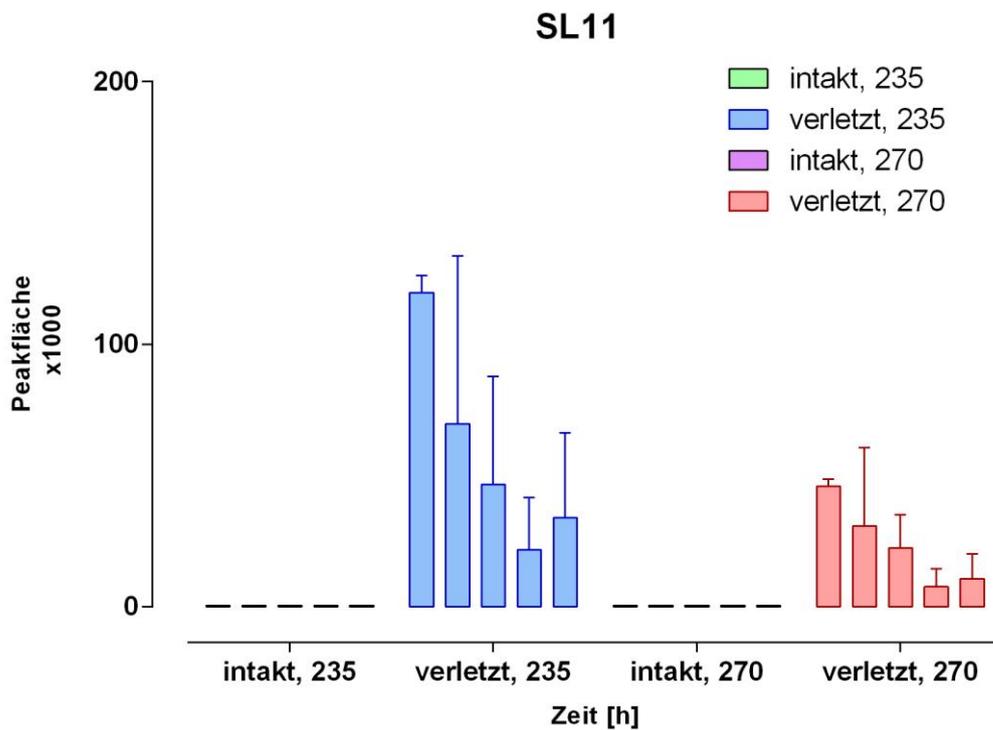


Abbildung 36: Vergleich MW der Peakflächen von SL11 auf intakter und verletzter Haut bei 235nm und 270nm.

- [Dalacin Lotion und Lösung](#)

Tabelle 13: Peakflächen x 1000 von Dalacin Lotion und Lösung bei WL 1 (235nm)

Dalacin Lotion	S1	S2	S3	Mittelwert	SD +/-
1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Dalacin Lösung	S1	S2	S3	Mittelwert	SD +/-
1h	0,0	85,0	0,0	28,3	49,1
2h	0,0	74,0	0,0	24,7	42,7
3h	0,0	28,0	0,0	9,3	16,2
4h	0,0	18,0	0,0	6,0	10,4
6h	0,0	17,0	0,0	5,7	9,8

Tabelle 14: Peakflächen x 1000 von Dalacin Lotion und Lösung bei WL 2 (270nm)

Dalacin Lotion	S1	S2	S3	Mittelwert	SD +/-
1h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Dalacin Lösung	S1	S2	S3	Mittelwert	SD +/-
1h	0,0	5,0	0,0	1,7	2,9
2h	0,0	6,0	0,0	2,0	3,5
3h	0,0	5,0	0,0	1,7	2,9
4h	0,0	6,0	0,0	2,0	3,5
6h	0,0	6,0	0,0	2,0	3,5

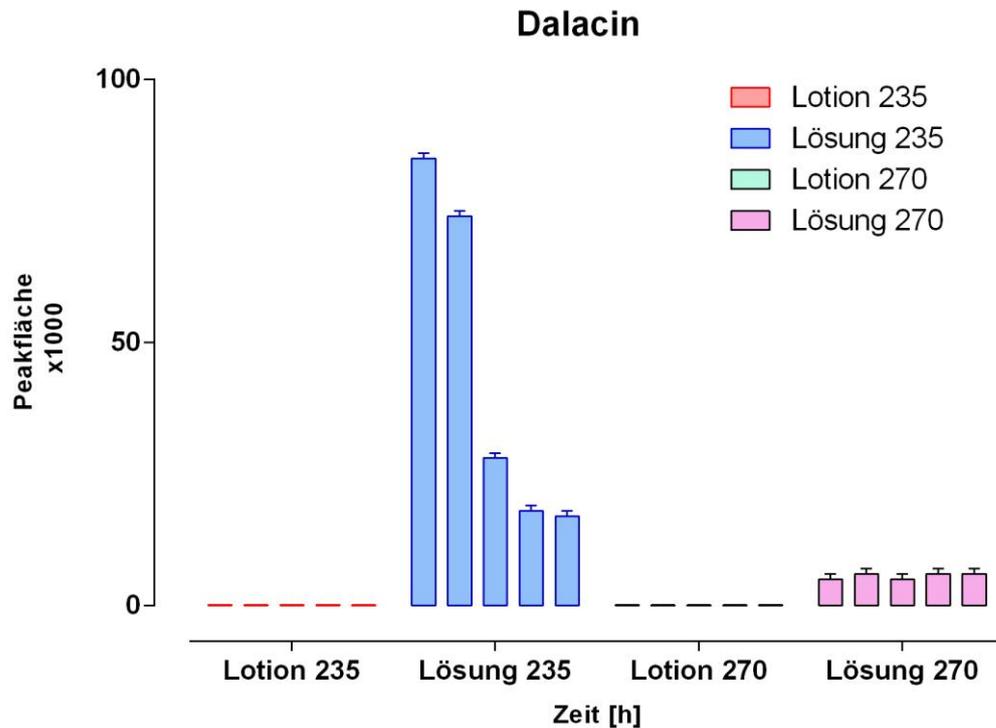


Abbildung 37: Vergleich der Peakflächen von Dalacin Lotion und Lösung bei 235nm und 270nm

- [Lösung von Capsaicin in DMSO 0,5%](#)

Tabelle 15: Peakflächen x 1000 von Capsaicin bei WL 1 (235nm) auf intakter und verletzter Haut

Capsaicin intakte Haut	S1	S2	S3	Mittelwert	SD +/-
1h	41,0	0,0	53,0	31,3	27,8
2h	63,0	75,0	190,0	109,3	70,1
3h	42,0	81,0	20,0	47,7	30,9
4h	132,0	0,0	0,0	44,0	76,2
6h	43,0	84,0	17,0	48,0	33,8
Capsaicin verletzte Haut	S1	S2	S3	Mittelwert	SD +/-
1h	325,0	212,0	332,0	289,7	67,4
2h	49,0	18,0	0,0	22,3	24,8
3h	14,0	0,0	0,0	4,7	8,1
4h	11,0	0,0	0,0	3,7	6,4
6h	153,0	6,0	24,0	61,0	80,2

Tabelle 16: Peakflächen x 1000 von Capsaicin bei WL 2 (270nm) auf intakter und verletzter Haut

Capsaicin Intakte Haut	S1	S2	S3	Mittelwert	SD +/-
1h	34,0	0,0	40,0	24,7	21,6
2h	84,0	27,0	65,0	58,7	29,0
3h	44,0	80,0	64,0	62,7	18,0
4h	10,0	0,0	0,0	3,3	5,8
6h	39,0	45,0	21,0	35,0	12,5
Capsaicin verletzte Haut	S1	S2	S3	Mittelwert	SD +/-
1h	122,0	68,0	112,0	100,7	28,7
2h	40,0	12,0	0,0	17,3	20,5
3h	8,0	0,0	0,0	2,7	4,6
4h	6,0	0,0	0,0	2,0	3,5
6h	22,0	0,0	12,0	11,3	11,0

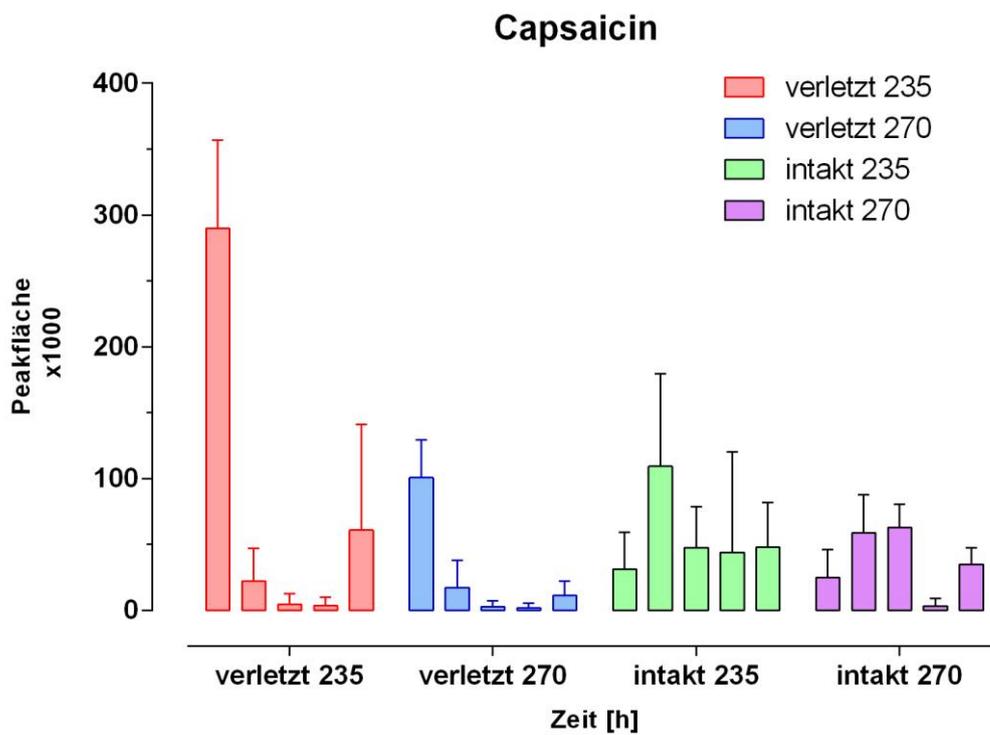


Abbildung 38: Vergleich MW der Peakflächen von Capsaicin auf intakter und verletzter Haut bei 235nm und 270nm

3.2.6 Berechnung des permeierten Arzneistoffanteils

Die Berechnung kann mittels folgender Formel durchgeführt werden:

y = Peakfläche

k = Steigung

x = Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)

d = Achsenabschnitt

Durch Umformen erhält man die Formel: —

- SL11: k = 31,72 d = 38
- Coffein: k = 128,7 d = -9
- Capsaicin: k = 59,58 d = 8
- Dalacin: k = 0,4597 d = -3

Die jeweiligen Peakflächen wurden aus den Tabellen 10, 11, 13 und 15 entnommen.

Permeation von Coffein:

Tabelle 17: Permeierter Anteil von Coffein

Substanz	WH	Zubereitung	Haut	1h	2h	3h	4h	6h	24h	SS
Coffein 1%	S1	DMSO 2,5% LSG	intakt	0,13	0,18	0,12	0,12	0,41	nd	nd
Coffein 1%	S2	DMSO 2,5% LSG	intakt	0,36	2,70	2,66	3,57	7,12	nd	nd
Coffein 0,6%	S1	DMSO 5% + UB	intakt	0,16	0,14	0,15	0,17	0,12	nd	nd
Coffein 0,6%	S2	DMSO 5% + UB	intakt	0,09	0,11	0,11	0,11	0,09	nd	nd
Coffein 0,6%	S1	MYR 15% + UB	intakt	9,51	0,13	2,18	4,05	4,29	nd	nd
Coffein 0,6%	S2	MYR 15% + UB	intakt	1,12	0,29	0,13	0,13	0,30	nd	nd
Coffein 1%	S1	DMSO 0,5% LSG	intakt	0,64	1,29	13,92	5,81	10,68	nd	nd
Coffein 3%	S1	DMSO 0,5% LSG	intakt	0,18	0,13	0,12	0,09	7,92	nd	nd

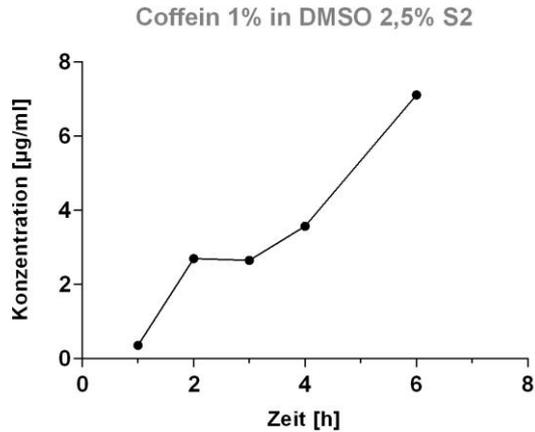


Abbildung 39: Konzentrations-/Zeit-Kurve am Beispiel von Coffein (S2)

Permeation von SL11:

Tabelle 18: Permeierter Anteil von SL11

Substanz	WH	Zubereitung	Haut	1h	2h	3h	4h	6h	24h	SS
SL11 1%	S1	DMSO 2,5% + UB	intakt	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ
SL11 1%	S2	DMSO 2,5% + UB	intakt	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	nd
SL11 1%	S3	DMSO 2,5% + UB	intakt	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	nd	nd
SL11 1%	S1	DMSO 5% + UB	intakt	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ
SL11 1%	S2	DMSO 5% + UB	intakt	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	nd
SL11 1%	S3	DMSO 5% + UB	intakt	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	nd	nd
SL11 1%	S1	MYR 15% + UB	intakt	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	nd	LOQ
SL11 1%	S2	MYR 15% + UB	intakt	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	nd	nd
SL11 1%	S3	MYR 15% + UB	intakt	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	nd	nd
SL11 0,01%	S1	DMSO 0,5% LSG	intakt	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	nd	nd
SL11 0,01%	S2	DMSO 0,5% LSG	intakt	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	nd	nd
SL11 0,01%	S3	DMSO 0,5% LSG	intakt	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	nd	nd
SL11 0,01%	S4	DMSO 0,5% LSG	intakt	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	nd	nd
SL11 0,01%	S5	DMSO 0,5% LSG	intakt	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	nd	nd
SL11 1%	S1	DMSO 2,5% + UB	verletzt	nd	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	nd	LOQ
SL11 1%	S1	DMSO 5% + UB	verletzt	nd	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	nd	LOQ
SL11 0,01%	S1	DMSO 0,5% LSG	verletzt	2,81	0,91	0,79	LOQ	LOQ	nd	nd
SL11 0,01%	S2	DMSO 0,5% LSG	verletzt	2,49	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	nd	nd
SL11 0,01%	S3	DMSO 0,5% LSG	verletzt	2,43	3,06	1,23	0,03	0,82	nd	nd

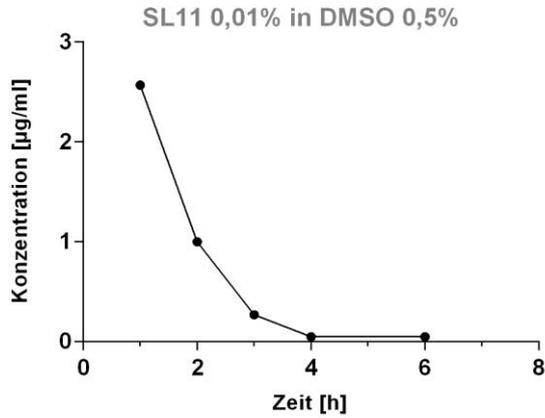


Abbildung 40: Konzentrations/Zeit-Kurve am Beispiel von SL11 (MW)

Permeation von Clindamycin:

Tabelle 19: Permeierter Anteil von Clindamycin

Substanz	WH	Zubereitung	Haut	1h	2h	3h	4h	6h	24h	SS
Clindamycin	S1	Dalacin Lösung	intakt	X	X	X	X	X	nd	nd
Clindamycin	S2	Dalacin Lösung	intakt	191,43	167,50	67,44	45,68	43,51	nd	nd
Clindamycin	S3	Dalacin Lösung	intakt	X	X	X	X	X	nd	nd
Clindamycin	S1	Dalacin Lotion	intakt	X	X	X	X	X	nd	nd
Clindamycin	S2	Dalacin Lotion	intakt	X	X	X	X	X	nd	nd
Clindamycin	S3	Dalacin Lotion	intakt	X	X	X	X	X	nd	nd

X = keine Konzentration messbar

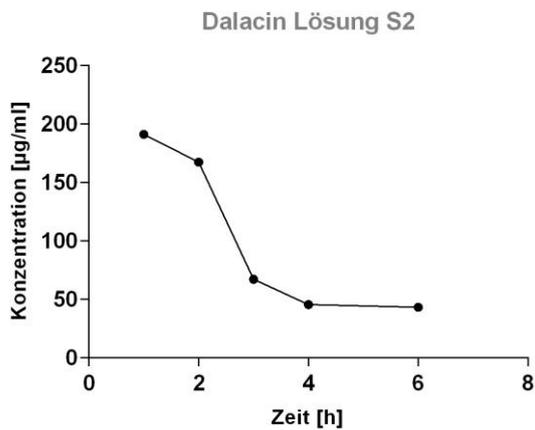


Abbildung 41: Konzentrations/Zeit-Kurve am Beispiel von Dalacin Lösung (S2)

Permeation von Capsaicin:

Tabelle 20: Permeierter Anteil von Capsaicin

Substanz	WH	Zubereitung	Haut	1h	2h	3h	4h	6h	24h	SS
Capsaicin	S1	DMSO 0,5%	intakt	0,55	0,92	0,57	2,08	0,59	nd	nd
Capsaicin	S2	DMSO 0,5%	intakt	X	1,12	1,23	X	1,28	nd	nd
Capsaicin	S3	DMSO 0,5%	intakt	0,76	3,05	0,20	X	0,15	nd	nd
Capsaicin	S1	DMSO 0,5%	verletzt	5,32	0,69	0,10	0,05	2,43	nd	nd
Capsaicin	S2	DMSO 0,5%	verletzt	3,42	0,17	X	X	0,00	nd	nd
Capsaicin	S3	DMSO 0,5%	verletzt	5,44	X	X	X	0,27	nd	nd

X = keine Konzentration messbar

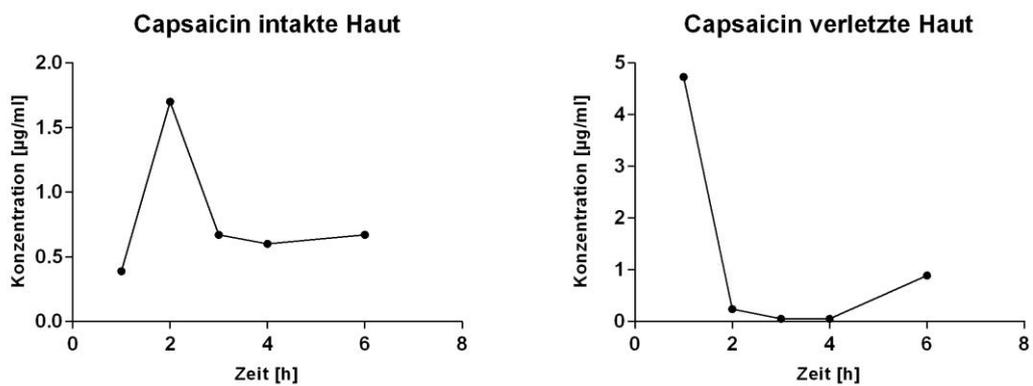


Abbildung 42: Konzentrations/Zeit-Kurve am Beispiel von Capsaicin auf intakter und verletzter Haut

3.3 In vivo Versuchsreihen

3.3.1 Leerwerte

Die Leerwerte wurden durchgeführt um unbekannte Peaks im Chromatogramm zuordnen zu können.

- MS 6 = Tier Nr. 6 unbehandelt, nur Narkose

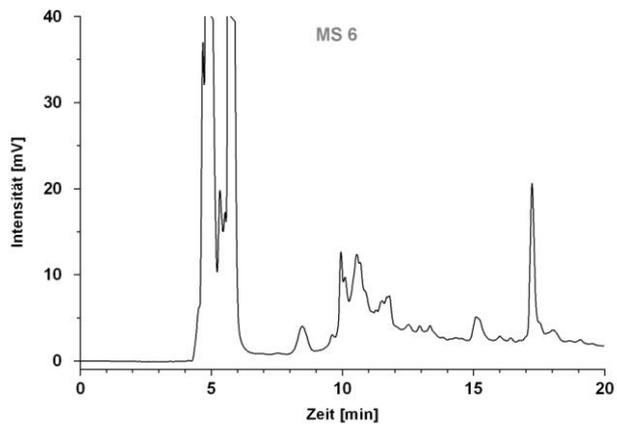


Abbildung 43: Chromatogramm der Plasmaprobe von Tier Nr.6

- MS 4 = Tier Nr. 4 Negativkontrolle + Myristylalkohol 15% in Vaseline

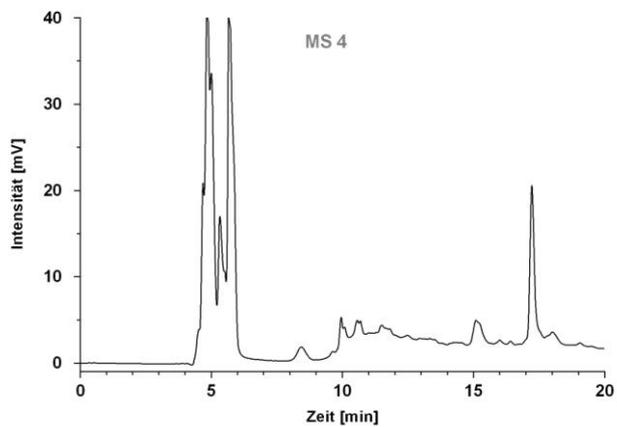


Abbildung 44: Chromatogramm der Plasmaprobe von Tier Nr.4

3.3.2 Permeation von SL 11

- [MS 1 = Tier Nr. 1 mit SL11 1% + Myristylalkohol 15% in Vaseline](#)

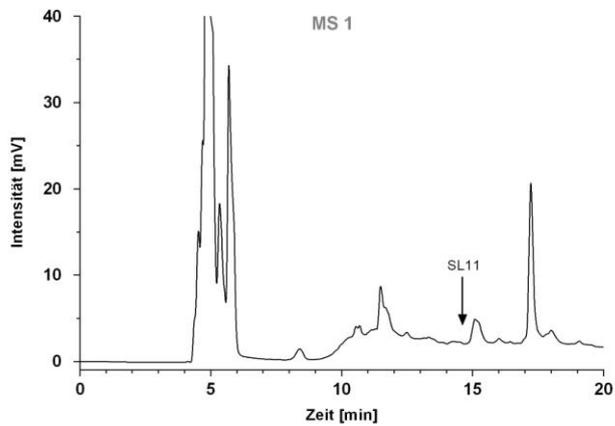


Abbildung 45: Chromatogramm der Plasmaprobe von Tier Nr.1

- [MS 2 = Tier Nr. 2 mit SL11 1% + Palmitylalkohol 15% in Vaseline](#)

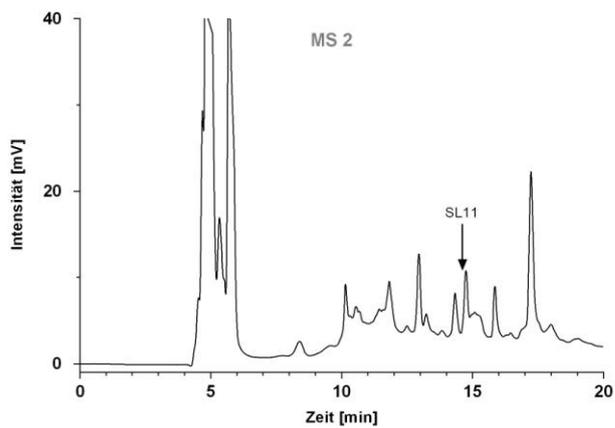


Abbildung 46: Chromatogramm der Plasmaprobe von Tier Nr.2

- [MS 3 = Tier Nr. 3 mit SL11 1% + DMSO 2% in Ultrabas](#)

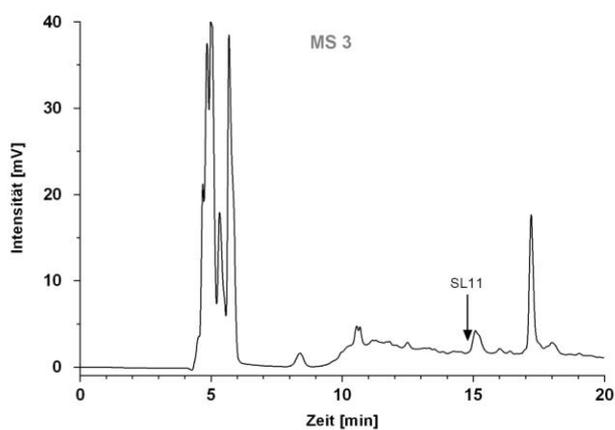


Abbildung 47: Chromatogramm der Plasmaprobe von Tier Nr.3

- MS 5 = Tier Nr. 5 mit SL11 1% + Myristylalkohol 15% in Ultrabas

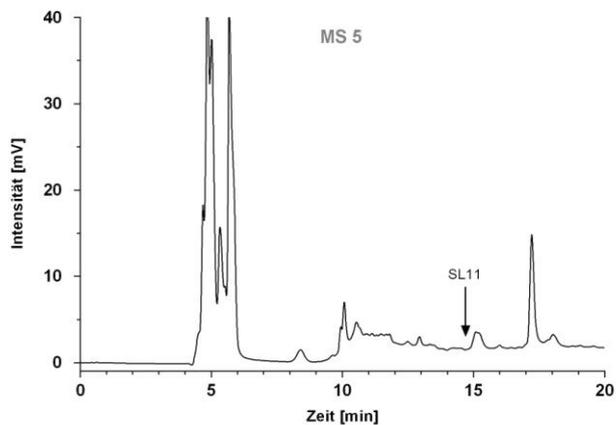


Abbildung 48: Chromatogramm der Plasmaprobe von Tier Nr.5

Wenn man die Chromatogramme der Leerwerte mit den restlichen Chromatogrammen vergleicht, erkennt man sehr ähnliche Peaks. Die Chromatogramme erscheinen beinahe ident.

Wichtig ist auch, dass sowohl bei den Leerwerten, als auch bei den restlichen Chromatogrammen keine Peaks bei der Retentionszeit von SL11 vorhanden sind.

Diese Erkenntnis bestätigt die Ergebnisse der in vitro Untersuchungen und beweist das Ausbleiben der Permeation von SL11 auf intakter Haut.

4 Zusammenfassung

Die vorliegende Diplomarbeit behandelt das Thema der humanen *in vitro* und tierischen *in vivo* Untersuchungen zur Permeation von neuen Anthrachinonderivaten durch die Haut und deren potentiellen Einsatz als topische Antibiotika.

Aufgrund der Ergebnisse von präklinischen Untersuchungen aus anderen Diplomarbeiten wurde das Derivat SL11 als Strukturanalogon zu weiteren Untersuchungen ausgewählt.

Vorab war es notwendig, die Nachweisgrenze der zu untersuchenden Substanz zu ermitteln, und geeignete HPLC Systeme zu entwickeln.

Ziel der Untersuchung war es, die Permeationsbarriere der Haut mittels des Epiderm™ Hautmodelles zu simulieren, und den Durchtritt verschiedener Formulierungen durch das Modell zu analysieren.

Später wurden die Ergebnisse der *in vitro* Versuchsreihen mit den gewonnenen Informationen aus *in vivo* Versuchen an Meerschweinchen verglichen.

Es gab ebenfalls eine Gegenüberstellung zwischen den erhaltenen Daten aus den Versuchen mit SL11 und den Ergebnissen, welche aus Permeationsversuchen an bereits etablierten Arzneistoffen gewonnen wurden.

Die berechneten Ergebnisse aus den *in vitro* Untersuchungen zeigten, dass es wie gewünscht zu keiner systemischen Resorption des Anthrachinonderivates SL11 durch die Haut gekommen ist.

Diese Ergebnisse werden durch die an Meerschweinchen durchgeführten *in vivo* Versuche bestätigt, bei denen es ebenfalls zu keinem messbaren Plasmaspiegel von SL11 gekommen ist.

Zum Vergleich zeigten die als Standard herangezogenen Ergebnisse aus den Versuchen mit Coffein sowohl in Lösung als auch in Salben eine hohe Permeationsrate und stimmen dadurch mit der Literatur überein.

5 Abstract

The present Diploma thesis deals with the topic of human *in vitro* and animal *in vivo* studies on the permeation of new anthraquinone derivatives through the skin and its potential use as topical antibiotics.

Based on the results of preclinical studies from other theses, SL11 was selected as structural analogue for further investigations.

In advance, it was necessary to determine the detection limit of the test substance and to develop appropriate HPLC systems.

The aim of the study was to simulate the permeation barrier of the skin by Epiderm™ skin model and to analyse the permeation of various formulations using the model.

Furthermore, the results of the *in vitro* test series were compared with the information obtained from *in vivo* experiments in guinea pigs.

A comparison was made between the data obtained from the experiments with SL11 and the results which were received from permeation tests with already established drugs.

As desired the calculated results from the *in vitro* studies showed that there was no systemic absorption of the anthraquinone derivative SL11 through the skin.

These results are confirmed by the *in vivo* experiments in guinea pigs, in which no measurable plasma levels of SL11 were found.

For comparison the results from the experiments with caffeine, both in solution and in ointments, taken as the standard showed a high permeation rate and therefore agree with the literature match.

6 Conclusio

Die Ergebnisse erlauben einen ersten genauen Einblick über das Verhalten von neuen Anthrachinonderivaten auf tierischer (in vivo) und gezüchteter menschlicher Haut (in vitro).

Aufgrund der gesammelten Daten kann eine systemische Resorption von SL11 durch die intakte Haut ausgeschlossen werden.

Damit könnte SL11 grundsätzlich als topisches Antibiotikum eingesetzt werden, ohne dabei mit potentiellen systemischen Nebenwirkungen oder Intoxikationen rechnen zu müssen.

Hervorzuheben sei jedoch das Problem der passenden galenischen Zubereitung, da es durch die physikochemischen Eigenschaften von SL11 zum Brechen von Formulierungen oder Instabilitäten aufgrund von Photosensibilität kommen kann. Deshalb sollten eventuell noch weitere Untersuchungen mit neuen Formulierungen oder anderen potentiellen Derivaten durchgeführt werden.

Das Epiderm™ Hautmodell erlaubt vor allem Aussagen darüber, ob der Arzneistoff durch die Haut permeiert, nicht aber in welcher Konzentration er sich im Gewebe verteilt. Um eine Aussage über die Bioverfügbarkeit am Wirkort treffen zu können müssen daher weiteren Penetrationstests wie z.B. die Tape-Stripping-Methode angewendet werden.

7 Anhang

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der menschlichen Haut [3]	12
Abbildung 2: Backstein und Mörtel Modell [6].....	13
Abbildung 3: HPLC Anlage Chromaster der Firma Merck VWR® HITACHI	22
Abbildung 4: HPLC Anlage LaChrom der Firma Merck VWR® HITACHI	23
Abbildung 5: Aufbau der Haut im EpiDerm Modell [18]	27
Abbildung 6: Teile des Epi 100 FIX.....	28
Abbildung 7: gezüchtete Haut.....	28
Abbildung 8: Sixwell Platte + Akzeptormedium	30
Abbildung 9: Leere Sixwell Platte.....	30
Abbildung 10: Sixwell Platte mit Haut in Reihe B	30
Abbildung 11: Sixwell Platte mit Haut in Reihe A	30
Abbildung 12: Phasentrennung in der Ultrabas Formulierung.....	34
Abbildung 13: Auftragen der Donor - Substanzen auf das zusammengesetzten Epi 100 FIX in der Sixwell Kulturplatte	34
Abbildung 14: Eichgerade von SL11 in PBS	40
Abbildung 15: Eichgerade von Coffein in PBS	40
Abbildung 16: Eichgerade von Clindamycin in Eluent A	41
Abbildung 17: Eichgerade von Capsaicin in Eluent B	41
Abbildung 18: Nachweisgrenze von SL11	42
Abbildung 19: Coffein Standard in PBS.....	43
Abbildung 20: HPLC Chromatogramm der Leerwerte.....	43
Abbildung 21: Permeation von SL11 in Myristylalkohol 15% durch das Epiderm™ Hautmodell	44
Abbildung 22: Permeation von SL11 in DMSO 2,5% durch das Epiderm™ Hautmodell	45
Abbildung 23: Permeation von SL11 in DMSO 5% durch das Epiderm™ Hautmodell.....	45
Abbildung 24: Permeation von SL11 in DMSO 0,5% durch das Epiderm™ Hautmodell	46
Abbildung 25: Permeation von SL11 in DMSO 2,5% durch das verletzte Epiderm™ Hautmodell	46
Abbildung 26: Permeation von SL11 in DMSO 5% durch das verletzte Epiderm™ Hautmodell	46
Abbildung 27: Permeation von SL11 in DMSO 0,5% durch das verletzte Epiderm™ Hautmodell	47
Abbildung 28: Permeation von Coffein in DMSO 5% durch das Epiderm™ Hautmodell.....	47
Abbildung 29: Permeation von Coffein in Myristylalkohol 15% durch das Epiderm™ Hautmodell	48
Abbildung 30: Permeation von Coffein in DMSO 2,5% durch das Epiderm™ Hautmodell.....	48
Abbildung 31: Permeation von Coffein 3% in DMSO 0,5% durch das Epiderm™ Hautmodell	48
Abbildung 32: Permeation von Coffein 1% in DMSO 0,5% durch das Epiderm™ Hautmodell	49
Abbildung 33: Vergleich der Peakflächen von den verschiedenen Coffein Formulierungen	50

Abbildung 34: Vergleich Permeation von Dalacin Lösung und Lotion durch das Epiderm™ Hautmodell	51
Abbildung 35: Vergleich Permeation von Dalacin Lösung und Lotion durch das Epiderm™ Hautmodell	51
Abbildung 36: Vergleich MW der Peakflächen von SL11 auf intakter und verletzter Haut bei 235nm und 270nm.....	53
Abbildung 37: Vergleich der Peakflächen von Dalacin Lotion und Lösung bei 235nm und 270nm	55
Abbildung 38: Vergleich MW der Peakflächen von Capsaicin auf intakter und verletzter Haut bei 235nm und 270nm.....	56
Abbildung 39: Konzentrations/Zeit-Kurve am Beispiel von Coffein (S2)	58
Abbildung 41: Konzentrations/Zeit-Kurve am Beispiel von Dalacin Lösung (S2)	59
Abbildung 40: Konzentrations/Zeit-Kurve am Beispiel von SL11 (MW)	59
Abbildung 42: Konzentrations/Zeit-Kurve am Beispiel von Capsaicin auf intakter und verletzter Haut	60
Abbildung 43: Chromatogramm der Plasmaprobe von Tier Nr.6	61
Abbildung 44: Chromatogramm der Plasmaprobe von Tier Nr.4	61
Abbildung 45: Chromatogramm der Plasmaprobe von Tier Nr.1	62
Abbildung 46: Chromatogramm der Plasmaprobe von Tier Nr.2	62
Abbildung 47: Chromatogramm der Plasmaprobe von Tier Nr.3	62
Abbildung 48: Chromatogramm der Plasmaprobe von Tier Nr.5	63

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Substanzen und fertige Arzneispezialitäten	19
Tabelle 2: Verwendete Reagenzien	19
Tabelle 3: Verwendete Geräte und Materialien	20
Tabelle 4: Daten zur HPLC Anlage Chromaster	22
Tabelle 5: Daten zur HPLC Anlage LaChrom.....	23
Tabelle 6: Versuchsreihe 1 in vitro	35
Tabelle 7: Versuchsreihe 2 in vitro	37
Tabelle 8: Versuchsreihe 3 in vitro	37
Tabelle 9: Versuchsreihe 1 in vivo	39
Tabelle 10: Peakflächen x 1000 von den verschiedenen Coffein Formulierungen	49
Tabelle 11: Peakflächen x 1000 von SL11 bei WL 1 (235nm) auf intakter und verletzter Haut.....	52
Tabelle 12: Peakflächen x 1000 von SL 11 bei WL 2 (270nm) auf intakter und verletzter Haut	53
Tabelle 13: Peakflächen x 1000 von Dalacin Lotion und Lösung bei WL 1 (235nm).....	54
Tabelle 14: Peakflächen x 1000 von Dalacin Lotion und Lösung bei WL 2 (270nm).....	54
Tabelle 15: Peakflächen x 1000 von Capsaicin bei WL 1 (235nm) auf intakter und verletzter Haut	55
Tabelle 16: Peakflächen x 1000 von Capsaicin bei WL 2 (270nm) auf intakter und verletzter Haut	56
Tabelle 17: Permeierter Anteil von Coffein	57
Tabelle 18: Permeierter Anteil von SL11	58
Tabelle 19: Permeierter Anteil von Clindamycin	59
Tabelle 20: Permeierter Anteil von Capsaicin.....	60

III. Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
Bzw.	Beziehungsweise
d.h.	Das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
EG	Eichgerade
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
LSG	Lösung
MS	Meerschweinchen
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
Min	Minuten
MW	Mittelwert
MYR	Myristylalkohol
nd	Not done
Nr.	Nummer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
SS	Steady State
UB	Ultrabas
Upm	Umdrehung pro Minute
WL	Wellenlänge
WH	Wiederholung

III. Literaturverzeichnis

- [1] Brockmann, H.: Anthracyclinones and Anthracyclines (Rhodomycinone, Pyrromycinone and Their Glycosides). Fortschr Chem Org Naturst, 1963. p. 121-182.
- [2] Ferner, H.: Nervensystem, Haut und Sinnesorgane. In Benninghoff u. Görttler: Lehrbuch der Anatomie des Menschen, Dritter Band: 9., vollständig neubearbeitete Auflage, München: Urban & Schwarzenberg, 1975. p. 449
- [3] Junqueira, L., Carneiro, J.: Histologie. 3., erweiterte und völlig überarbeitete Auflage, Springer-Verlag, Berlin 1991
- [4] Raab, W., et al., Pflegekosmetik. 5., neu bearbeitete Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2012.p. 1-11, 64-68
- [5] Niedner, R., Ziegenmeyer, J.: Dermatika: therapeutischer Einsatz, Pharmakologie und Pharmazie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1992. p. 2-17, 88-94, 153, 244-260
- [6] <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/uploads/pics/titel071701.JPG>, eingesehen am 23.2.2015
- [7] Potts, R.O.: Physical characterization of the stratum corneum: the relationship of mechanical and barrier properties to lipid and protein structure. In Hadgraft, J., Guy, R.H, eds., Dekker: Transdermal Drug Delivery, New York/Basel 1989. p. 23
- [8] Ackermann, G.: Antibiotika und Antimykotika : Substanzen, Krankheitsbilder, Erregerspezifische Therapie. 3., völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2009. p. 6-8, 416-423
- [9] Bork, K.: Arzneimittelnebenwirkungen an der Haut: Klinik – Diagnostik zur Erkennung der auslösenden Medikamente – Pathogenese – Therapie. 2., überarbeitete und erweiterte Auflage, Stuttgart ; New York: Schattauer 1999. p. 9-10

[10] Vuia, A.G.: Rekonstruierte humane Epidermis für die Bestimmung der perkutanen Absorption in vitro, Freie Universität Berlin Dissertation, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Berlin 2007

[11] Heymann, E.: Haut, Haar und Kosmetik : eine chemische Wechselwirkung; Handbuch für Körperpflegeberufe, Apotheker und Dermatologen. 2., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Bern u.a.: Huber, 2003. p. 181-184

[12] Nater, J.P., de Groot, A.C., Liem, D.H.: Unwanted effects of cosmetics and drugs used in dermatology. 2nd ed., Elsevier, Amsterdam; New York; Oxford 1985. p. 170-176

[13] Simon, C., Stille, W.: Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis. 6., neubearbeitete und erweiterte Auflage, Stuttgart ; New York: Schattauer, 1985. p.201, 420-434, 554-557

[14] Meta, A., Estler, C.J., Legler, F.: Antibiotika und Chemotherapeutika : bakteriologische Grundlagen, Pharmakologie und therapeutischer Einsatz antibakteriell wirksamer Arzneistoffe. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1990. p.156-160

[15] Dietrich, H.A., Eichler, H.G., Kurz, A.: Antiinfektiva : ein Kurzlehrbuch zur Therapie mit Antibiotika, Antimykotika, antiviralen und antiparasitären Mitteln. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1998. p. 25-30

[16] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 428 Skin Absorption: in vitro Method, ISSN: 2074-5788, eingesehen am 23.2.2015

[17] Garbe, C., Reimann, H.: Dermatologische Rezepturen. 2., vollständig neu bearbeitete Auflage, Stuttgart : New York: Georg Thieme Verlag 1996. p. 59-60

[18] <http://www.mattek.com/EpiDerm/data-sheet>, eingesehen am 17.2.2015

[19] EpiDerm™ Arbeitsvorschrift, Percutaneous Absorption, For use with EpiDerm™ Skin Model (EPI-200X, EPI -212.X, & EPI-606-X), MatTek Corporation

[20] Kromidas, S. Handbuch Validierung in der Analytik, 2. Überarbeitete Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co.KGaA 2011.

IV. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Vor- und Zuname: Bianca Krotky
Geburtsdatum: 23. 05. 1988
Geburtsort: Wien
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: Österreich

Ausbildung

Seit Okt 2007 Universität Wien, Studium der Pharmazie
1999 - 2007 Bundes und Bundesrealgymnasium Perchtoldsdorf,
neusprachlicher Zweig
1995-1999 Volksschule, Brunn am Gebirge

Berufserfahrung

Seit März 2013 Sonnen Apotheke, 1210 Wien
Oktober 2014 – Jänner 2015 Tutorin im Praktikum „Klinische Pharmazie und chemische Diagnostik“
April 2010 – Januar 2014 Dres. Wicke, Wiesmayr Fachärzte für Radiologie OG, 1010 Wien

Zusatzqualifikationen

Sprachen: Deutsch (Muttersprache)
Englisch (fließend)
Französisch (Grundkenntnisse)
EDV: Gute MS Office Kenntnissen
Sonstiges: Reifeprüfung in Chemie
Absolvierter Erste Hilfe Kurs
Führerschein Klasse B