

Institut für Pharmazeutische Chemie¹ der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, und Fachklinik² Bad Bentheim, Germany

Zur Elementbestimmung in psoriatischer und nichtpsoriatischer Haut

H. LAHL¹, A. AZIZKABIRI¹, M. STÄNDER² und B. UNTERHALT¹

Bei Untersuchungen zur Penetration und Permeation von Na⁺- und Mg²⁺-Ionen aus verdünnten und konzentrierten Lösungen bei Human- und Schweinehaut [1, 2] zeigte sich, daß analytische Daten, die die Auswirkung der drastisch erhöhten Proliferationsrate der Epidermis von Psoriatikern auf den Elementgehalt der gebildeten Hautschuppen betreffen, bisher selten und zudem widersprüchlich sind. So wurden teils erhebliche, teils gar keine Unterschiede z. B. im Zn-, Cu- und Mg-Gehalt von Psoriasis-schuppen gegenüber nichtpsoriatischen Schuppen und der Haut selbst gefunden [3–9].

Als Analysenmethode bietet sich die induktiv gekoppelte Hochfrequenzplasma-Atomemissionsspektrometrie (ICP-AES) aufgrund ihres großen dynamischen Bereichs und ihrer Fähigkeit zur Multielementanalyse an. Die Ergebnisse der ICP-AES-Analyse der Elementkonzentrationen von Na, Zn, Mg, Cu, Sr und B in Psoriasis-Hautschuppen und in nichtpsoriatischer Haut sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Der mean-/median-Vergleich zeigt eine bemerkenswerte Einheitlichkeit der Elementgehalte.

Die Werte der Psoriasis-Schuppen stimmen gut mit denen von Molokhia [6] und Schmidt [8] überein (Tabelle 1).

In psoriatischen Schuppen ist der Gehalt an Na und Zn tendenziell geringer und der an Mg größer als der in Schuppen von Kontrollpersonen [8]; der Cu-Gehalt ist unverändert. Für Sr und B liegen keine Werte von Kontrollpersonen vor.

Im Vergleich zur intakten nichtpsoriatischen Haut werden deutlich geringere Na- und höhere Zn-, Mg-, Cu-, Sr- und B-Werte gefunden. Bei Sr und B ist diese Aussage nur über den Medianwert möglich.

Experimenteller Teil

1. Geräte und Methoden

ICP-AES als sequentielle Analyse mit dem ICP-5500-Gerät, Perkin Elmer, Datenverarbeitung mit Data System 10 und PR-100 Printer. Probenzuführungssystem: Minipuls-2-Schlauchpumpe der Firma Abimed und Cross-Flow-Zerstäuber.

Probenaufschluß in 40-ml-Quarzglas-Langhalsgefäßen mit Hilfe des VAO-Naßveraschungsautomaten, Kürner; weitere Probenvorbereitung und -aufbewahrung mit Eppendorf-Pipetten sowie 20-ml-Polyvials, Zinsser.

Zur Vermeidung externer Kontaminationen finden Probenvorbereitung und Messungen in einer Reinstraumanlage statt. Sämtliche Gefäße, Diffusionskammern, Pipetten und Gegenstände, mit denen die Proben in Kontakt kommen, werden vorbehandelt: 10 d lang in 10% HNO₃ einlegen und kurz

Tabelle 2: Analysenbedingungen zur ICP-AES

Beobachtungshöhe	15 mm	Plasmagas	12 l/min
Spaltbreite	0,02 nm	Zerstäubergas	0,6 l/min
Wiederholungen	2	Zerstäubergasdruck	25 psi
Spülzeit	30 s	Rf.-power	1,25 Kw

Element	Wellenlänge (nm)	Untergrundkompensation BGL	BGH
Na	589,59	—	0,10
Cu	324,75	0,05	0,05
Mg	383,23	0,06	0,05
Zn	213,90	0,05	0,05
B	208,96	0,13	0,08
Sr	407,77	0,06	0,05

vor der Verwendung dreimal mit AquaMilliQ spülen sowie bei 60 °C trocknen. Als Bezugslösungen kommen entsprechend verdünnte, angesäuerte Stammlösungen, Merck, zur Anwendung; die Auswertung erfolgt direkt gegen die Bezugslösungen.

2. Material und Probenvorbereitung

Zur Untersuchung gelangen Schuppen- und Hautproben von Patienten der Fachkliniken Bad Bentheim, Hornheide und Nordhorn. Die Gewinnung der Schuppen, eine Ganzkörperabnahme, erfolgt vor der stationären Behandlung in Bad Bentheim durch sehr vorsichtiges Abstreifen, so daß sich nur solche Schuppen lösen, die kurz vor dem selbsttätigen Abfallen sind. Der Patient steht dabei auf einer Polyethylenfolie, von der aus die Schuppen in vorbehandelte Polyvials übergeführt werden. Die Schuppen haben einen Durchmesser von 1 und 5 mm und sind silberig, 3 Proben rosafarben. Die Patienten haben mindestens 4 Tage vor der Schuppennahme keine äußerlichen Präparate verwendet. Die Hautproben sind der Hautsicherungszone von 50–60jährigen Krebspatienten sowie dem Abdominalbereich einer 40jährigen Patientin entnommen worden.

Für die Mineralisation der Schuppen werden zwischen 40 und 200 mg, für den Aufschluß der Haut je 100 bis 140 mg, genau gewogen, in Gefäße gegeben, mit 3 ml 65% HNO₃ versetzt und 12 h lang zum Abklingen der ersten Reaktion stehengelassen. Im offenen Naßaufschluß werden zwei Durchgänge vorgenommen: Beim Schuppenaufschluß beträgt die Blocktemperatur im ersten Durchgang 180 °C, bei einem Vorschub von 6 min und dem Gradienten 0/0/0/0. Nach einer Abkühlphase werden je 0,3 ml konz. HNO₃ zugegeben. Der zweite Durchgang erfolgt bei einer Blocktemperatur von 270 °C, einem Vorschub von 4 min und gleichem Gradienten. In den Gefäßpositionen 1, 2 und 3 werden insgesamt 4 ml 30% H₂O₂ zupipettiert. Für den Hautaufschluß erfolgt der erste Durchgang bei einer Blocktemperatur von 180 °C, einem Vorschub von 30 min und dem Gradienten 6/5/3/0/0. Für den zweiten Durchgang gibt man je Probe 0,5 ml konz. H₂SO₄ hinzu. Die Blocktemperatur beträgt 300 °C, der Vorschub 15 min. Das Temperaturprofil entspricht dem ersten Schritt. In den Gefäßpositionen 1, 2 und 3 erfolgt die Zugabe von insgesamt 6 ml 30% H₂O₂. Alle Proben sind nach dem letzten Durchgang fast bis zur Trockne eingedunstet. Mit AquaMilliQ werden sie in 10,0-ml-Meßkolben überführt, bis zur Eichmarke aufgefüllt und bis zur Messung in vorbehandelten Polyvials bei 20 °C aufbewahrt.

3. Messungen

Die Analysenbedingungen zur ICP-AES zeigt Tabelle 2. Zur Bestimmung von Na werden die Proben 1 + 9 verdünnt, alle anderen werden ohne weitere Verdünnung gemessen. Es werden verwendet: AquaMilliQ Waters mit

Tabelle 1: Mittel- und Medianwerte der Elementgehalte in Psoriasis-Schuppen und nichtpsoriatischer Haut im Vergleich zu Werten von Molokhia [6] und Schmidt [8]

Element	Schuppen psoriatische n = 15 (mg/kg)		Haut nichtpsoriatische n = 5 (mg/kg)		Schuppen nichtpsoriatische (mg/kg) Schmidt [8]	Schuppen psoriatische (mg/kg) Schmidt [8]	Schuppen psoriatische (mg/kg) Molokhia [6]
	mean	median	mean	median			
Na	1213 ± 508	1206	3025 ± 390	3080	3323 ± 2967	1350 ± 698	—
Zn	51,9 ± 8,4	52,7	8,0 ± 1,2	7,7	137 ± 141	137 ± 93	71,7 ± 11,1
Mg	355 ± 131	346	69,6 ± 5,6	70,5	246 ± 86	432 ± 256	—
Cu	4,8 ± 2,8	3,8	1,1 ± 0,3	1,07	3,5 ± 2,6	7,9 ± 4,4	4,35 ± 0,57
Sr	1,4 ± 1,5	0,9	0,18 ± 0,09	0,14	—	—	—
B	17,7 ± 13,8	17,0	6,15 ± 2,7	5,9	—	—	—

einem Widerstand von 18 MegOhm · cm, HNO₃ 65% p. a. und H₂SO₄ 95 bis 97% p. a. Merck, H₂O₂ 30% p. a. Baker sowie Einzelementstandards von Na, Cu, Mg, Zn, B, Sr der Firma Merck. Die Standards werden auf folgende Endkonzentrationen in mg/l und einen Gehalt von 1% HNO₃ verdünnt: Na 20,00; Mg 5,00; Cu und Zn 2,00; B 1,50; Sr 0,10.

Danksagung: Wir danken den Fachkliniken Bad Bentheim und Hornheide für die Überlassung der Humanhautproben.

Literatur

- 1 Lahl, H.; Azizkabiri, A.; Ständer, M.; Unterhalt, B.: Phys. Rehab. Kur Med. **8**, 202 (1998)
- 2 Azizkabiri, A.: Diss. Münster 1997
- 3 Grundin, Th.; Roomans, G. H.; Forlind, B.; Lindberg, M.; Werner, Y.: J. Invest. Dermatol. **85**, 370 (1985)
- 4 Lipkin, G.; Gowdey, J.; Wheatley, V. R.: J. Invest. Derm 42, 205 (1962)
- 5 McCardle, R. C.; Eugman, M. F. Jr.; Eugman, M. F. Sr.: Archs. Derm. **44**, 429 (1941)
- 6 Molokhia, M.; Portnoy, B: Br. J. Derm. **83**, 376 (1970)
- 7 Ponomareva, L. V.: Vest. Derm. Vener. **40**, 14 (1966)
- 8 Schmidt, K.; Bayer, W.; Geckeler, K.; Schieferstein, G.: Trace Element Analytical Chemistry in Medicine and Biology, p. 167, Walter de Gruyter & Co Berlin New York, 1980
- 9 Voorhees, J. J.: Archs. Derm. **100**, 669 (1969)

Eingegangen am 4. März 1999
Angenommen am 15. April 1999

Dr. Herbert Lahl
Institut für Pharmazeutische Chemie
Hittorfstr. 58–62
D-48149 Münster

Graduate Institute of Pharmaceutical Sciences¹, Taipei Medical College, Taipei, Research Center for Clinical Pharmacy², Taipei Municipal Wanfang Hospital, Taipei and School of Pharmacy³, Chia Nan College of Pharmacy and Science, Tainan Hsien, Taiwan

Influence of coupling medium on *in vitro* sonophoresis of clobetasol 17-propionate

J.-Y. FANG^{1,2}, K. C. SUNG³ and S.-C. CHIEN^{1,2}

Sonophoresis (phonophoresis), defined as the movement of drug molecules contained in a coupling medium through the skin under the influence of ultrasound, has been studied for clinical uses and is known to increase skin permeation of corticosteroids [1]. Clobetasol 17-propionate (CP; C₂₅H₃₂ClFO₅) is currently considered to be the most potent corticosteroid. However, the transmission of ultrasound through commercial CP cream (Dermovate®) is very low [2]. Hence, an optimal selection of the ultrasound coupling medium (vehicle) to achieve desired drug delivery characteristics is needed in broadening the range of applying sonophoresis. The frequency of ultrasound used for sonophoresis typically ranges from 20 kHz to 10 MHz [3]. Low frequency ultrasound enhances the percutaneous absorption of drugs more effectively than therapeutic ultrasound. The low frequency ultrasound can also induce acoustic cavitation which causes several biological effects [4]. Accordingly, low frequency ultrasound (20 kHz) was used in this study to enhance the *in vitro* permeation of CP through hairless mouse skin.

The Fig. shows the *in vitro* CP permeation through hairless mouse skin with or without 4 h continuous ultrasound at an intensity of 0.2 W/cm². The results show that the ultrasound effectively increased the permeation of CP for all the vehicles examined. The various enhancement ratios (E.R.) after ultrasound application (Table) suggests that the coupling medium in the donor greatly influenced the effect of sonophoresis. Results from the experiment of passive CP permeation revealed that both the flux and solubility of CP in vehicles increased in the order of pH 7.4 buffer < propylene glycol (PG)/pH 7.4 buffer < ethanol (EtOH)/pH 7.4 buffer. This indicates that a greater extent of solubilization resulted in a significantly greater flux. However, the calculation of permeability coefficients (P.C.) (Table), shows an exactly opposite trend. This decrease of P.C. reflects that the media of 20% PG and 20% EtOH were less polar and more attractive environments for lipophilic drugs, resulting in lower skin P.C.

The sonophoretic enhancements of CP in various media are also shown in the Table. Despite the fluxes of CP were independent of medium compositions, higher sonophoretic enhancements of CP in pH 7.4 buffer and PG/pH 7.4 buffer were observed, which can be partially explained by the fact that the amounts of CP in the skin were significantly increased by sonophoresis (Table). This result is in good agreement with the previous result that the transdermal sonophoretic enhancement of corticosterone is greatly reduced after incorporation of EtOH in pH 7.4 phosphate buffer [5]. The enhancement ratio of CP in PG/pH 7.4 buffer was slightly lower than that in pH 7.4 buffer, which may be due to the influence of viscosity. The viscosity of PG was 51.2 cps measured by a cone and plate viscometer in our laboratory which was higher than the viscosity of water (1.0019 cps) mentioned in the literature [6]. Previous literature indicates that a low or therapeutic frequency of ultrasound is relatively ineffective in enhancing molecular transport when applied with a