

Untersuchungen zur Wirkung ausgewählter Akzeleratoren
auf die Mobilität nichtionischer Wirkstoffe unterschiedlicher
Polarität in isolierten Kutikularmembranen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

(Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Tuansheng Shi

aus

Provinz Shaanxi VR. China

Bonn

November 2004

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn

1. Referent:	Prof. Dr. L. Schreiber
2. Referent:	Prof. Dr. J. Schönherr
Tag der Promotion:	2. November 2004

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG.....	1
1.1	Vorkommen, Aufbau und Funktion der pflanzlichen Kutikula.....	1
1.2	Permeabilität pflanzlicher Kutikeln.....	4
1.2.1	Qualitative Betrachtungen.....	4
1.2.2	Quantitative Aspekte des kutikulären Stofftransportes.....	8
1.2.2.1	Größenselektivität und Stoffmobilitäten in Kutikeln.....	9
1.2.2.2	Einfluss der Temperatur auf die Stoffmobilität.....	10
1.2.2.3	Einfluss von Akzeleratoren.....	10
1.3	Ziele der Untersuchungen.....	12
2.	THEORIE.....	15
2.1	Permeation im Fließgleichgewicht.....	15
2.2	Bestimmung von D mit der Desorptionsmethode.....	21
2.3	Desorption aus asymmetrischen Kutikularmembranen.....	22
2.3.1	Desorption von der Außenseite der CM (UDOS).....	22
2.3.2	Desorption von der Innenseite der CM (SOFU).....	23
2.4	Kinetik der Desorption bei UDOS.....	24
3.	MATERIAL UND METHODEN.....	28
3.1	Material.....	28
3.1.1	Pflanzenmaterial.....	28
3.1.2	Chemikalien.....	32
3.1.2.1	Radioaktive Modellverbindungen.....	32
3.1.2.2	Akzeleratoren.....	34

3.1.2.3	Sonstige Chemikalien.....	36
3.1.2.4	Donatorlösungen.....	36
3.1.2.5	Rezeptorlösungen.....	37
3.2	Methoden.....	37
3.2.1	UDOS.....	37
3.2.2	SOFU.....	38
3.2.3	Messung der Radioaktivität.....	40
3.2.4	Datenauswertung.....	40
4.	ERGEBNISSE.....	41
4.1	Einfluss verschiedener Additive auf die Geschwindigkeits- konstanten der Modellverbindungen.....	41
4.2	Einfluss der Konzentration ausgewählter Akzeleratoren auf die Mobilität von 2,4-DB in <i>Stephanotis</i> CM.....	43
4.3	Einfluss lipophiler Akzeleratoren auf die Permeabilität von drei Modellverbindungen unterschiedlicher Polarität.....	50
4.3.1	Einfluss der Akzeleratoren DESU und TBP auf die Permeabilität von <i>Stephanotis</i> CM.....	54
4.3.2	Einfluss der Akzeleratoren C ₁₂ E _n (MED) auf die Permeabilität von <i>Stephanotis</i> CM.....	56
4.4	Vergleich der Penetration von Methylglucose und Calciumchlorid durch <i>Pyrus</i> CM.....	62
5.	DISKUSSION.....	65
5.1	Abhängigkeit des Akzeleratoreffektes von Art und Konzentration der Akzeleratoren.....	65
5.2	Der Einfluss ausgewählter Akzeleratoren auf die Penetrations-	

	raten von Modellverbindungen unterschiedlicher Polarität.....	73
5.2.1	Verifizierung der SOFU Methode.....	74
5.2.2	Die Wirkungen von DESU, TBP und monodispersen ethoxylierten Dodecanolen (C₁₂E_n).....	75
5.2.2.1	Die lipophilen Wirkstoffe Metribuzin und Iprovalicarb.....	76
5.2.2.2	Hydrophile nichtionische Methylglucose (MG) und ionisches CaCl₂.....	79
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	83
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	85

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Fläche	$K_{CM/Rez}$	Verteilungskoeffizient zwischen Kutikula und Rezeptor
a	Konstanten	$K_{CM/W}$	Verteilungskoeffizient zwischen Kutikula (CM) und Wasser
Akz.	Akzelerator	K_{OW}	Verteilungskoeffizient zwischen Oktanol und Wasser
b	Steigung	$K_{W/W}$	Verteilungskoeffizient zwischen Wachs und Wasser
C_0	Konzentration zur Zeit $t = 0$	$K_{Wachs/Rez}$	Verteilungskoeffizient zwischen Wachs und Rezeptor
C_{12E_n}	Alkohlethoxylate von $(n \times)$ ethylene glycol monododecyl ether	K_{wxfr}	Verteilungskoeffizient zwischen Wachs und Formulierungsrückstand
C_{AKZ}	Akzeleratorkonzentration im Desorptionmedium [mg Liter ⁻¹ od. g Liter ⁻¹]	$\log k^*_0$	Schnittpunkt mit der y-Achse im Arrhenius-Diagramm ($\log k^*$ gegen $1/T$)
C_{CM}	Konzentration in CM [g kg ⁻¹]	$\log k^{0*}$	Schnittpunkt mit der y-Achse in k^* vs. V_x
CM	Kutikularmembran	Is	Limiting skin
CMC	critical micell concentration	m	Masse [g]
C_{fr}	Konzentration im Rückstand	M_0	Gesamtstoffmenge zum Zeitpunkt $t = 0$ [dpm, g oder Mol]
cpm	Zerfälle (desintegrations) pro Minute	MBq	Megabequerel (Bq = Zerfälle pro Sekunde)
$C_{Rez.}$	Konzentration im Rezeptor [mg Liter ⁻¹ , g Liter ⁻¹ od. mg kg ⁻¹]	m_C	Masse der Kutikula
C_t	Konzentration zum Zeitpunkt t	M_C	Stoffmenge in Kutikula [dpm]
C_{Wachs}	Konzentration im Wachs [g kg ⁻¹]	MED	monodisperse ethoxylierte Dodecanole
C-Zahl	Zahl von CH ₂ -Gruppen	MG	Methylglucose
D	Diffusionskoeffizient [m ² s ⁻¹]	M_t	Stoffmenge zum Zeitpunkt t [dpm, g oder Mol]
DBS	Dibutylsebacat	m_w	Masse des Wassers
DBSU	Dibutylsuberat	MW	Molekulargewicht [g Mol ⁻¹]
DES	Diethylsebacat	M_W	Stoffmenge im Wasser [dpm]
DESU	Diethylsuberat	MX	extrahierte CM; Matrixmembran
Don	Donator	P	Permeabilität [m s ⁻¹]
E_D	Aktivierungsenergie der Diffusion [kJ Mol ⁻¹]	P^*	$P^* = P/K$ [m s ⁻¹]
EO	Ethylenoxid (CH ₃ -CH ₂ -O-)	PG	Propylenglykol
F	Fluß [g s ⁻¹ oder Mol s ⁻¹]		
GP	Genapol		
J	Diffusionsfluß [Mol s ⁻¹ od. g s ⁻¹]		
k	Geschwindigkeitskonstante (SOFU) [h ⁻¹]		
K	Verteilungskoeffizient		
k^*	Geschwindigkeitskonstante (UDOS) [h ⁻¹]		

Q ₁₀	Temperaturkoeffizient [$\Delta T=10\text{ }^\circ\text{C}$]	VB	Vertrauensbereich (95 %)
R	Ideale Gaskonstante [8.314 J / Mol·K]	V _{Don}	Donatorvolumen [m ³]
r. LF	relative Luftfeuchte [%]	V _{Rez}	Rezeptorvolumen [m ³]
Rez	Rezeptor	V _x	Molvolumen [cm ³ Mol ⁻¹]
soco	Sorptionskompartiment	β	Größenselektivität
SOFU	Simulation of <i>Foliar Uptake</i>	δ	Dichte [g cm ⁻³]
T	Temperatur [K]	Δx	Membrandicke; Diffusionsweg
t	Time od. Zeit [h]	Δx_{ls}	Dicke der 'limiting skin' [m]
TBP	Tributylphosphat	Δx_{soco}	Dicke des Sorptionskompartimentes [m]
t _e	Extrapolierte Anlaufzeit [h]	μ	chemisches Potential [J Mol ⁻¹]
UDOS	<i>Unilateral Desorption from the Outer Surface</i>	2,4-DB	2,4-Dichlorphenxybuttersäure

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung	Seite
Abb. 1.1	Schematischer Querschnitt durch die pflanzliche Kutikula.....2
Abb. 2.1	Schematische Darstellung der Versuchsanordnung und des Konzentrationsverlaufs im Fließgleichgewicht in einem Experiment mit einer homogenen Membran.....17
Abb. 2.2	Konzentrationsunterschied über eine Membran mit höherer Löslichkeit als in den umgebenden Lösungen.....18
Abb. 2.3	Bestimmung der extrapolierten (gestrichelte Linie) Anlaufzeit t_e (Pfeil) aus der Auftragung der diffundierten Menge einer Substanz gegen die Zeit.....20
Abb. 2.4	Desorptionsgraphik in der Auftragung der relativen Menge (M_t/M_0) gegen die Quadratwurzel der Zeit.....22
Abb. 2.5	Schematische Darstellung der Anordnung der CM im UDOS-Experiment.....23
Abb. 3.1	<i>Stephanotis floribunda</i> Pflanze.....29
Abb. 3.2	Außenseite einer <i>Stephanotis floribunda</i> CM.....31
Abb. 3.3	Innenseite einer <i>Stephanotis floribunda</i> CM.....31
Abb.3.4	Schematische Darstellung eines Querschnittes durch die Versuchsanordnung.....39
Abb. 4.1	Zeitlicher Verlauf der Desorption von 2,4-DB aus <i>Stephanotis</i> CM mit verschiedenen Additiven.....42
Abb. 4.2	Zeitlicher Verlauf der Penetration von Methylglucose durch <i>Stephanotis</i> CM ohne und mit Propylenglycol (PG).....43

Abb. 4.3	Ergebnisse von sieben Kontrollexperimenten (ohne Akzelerator).....	47
Abb. 4.4	Zeitlicher Verlauf der Desorption von 2,4-DB aus <i>Stephanotis</i> CM (UDOS bei 20 °C) bei unterschiedlicher Konzentration.....	50
Abb. 4.5	Zeitlicher Verlauf der Desorption von Metribuzin; Iprovalicarb und Methylglucose bei verschiedenen Konzentrationen des Akzelerators DESU im Rezeptor.....	55
Abb. 4.6	Zeitlicher Verlauf der Desorption von Metribuzin, Iprovalicarb und Methylglucose bei verschiedenen Konzentrationen des Akzelerators TBP im Rezeptor.....	56
Abb. 4.7	Einfluss der monodispersen Alkohlethoxylate (MED) auf die Permeabilität von <i>Stephanotis</i> CM für Iprovalicarb.....	58
Abb. 4.8	Einfluss der monodispersen Alkohlethoxylate (MED) auf die Permeabilität von <i>Stephanotis</i> CM für Metribuzin.....	59
Abb. 4.9	Einfluss der monodispersen Alkohlethoxylate (MED) auf die Permeabilität von <i>Stephanotis</i> CM für Methylglucose.....	60
Abb. 4.10	Zusammenstellung der Ergebnisse.....	61
Abb. 4.11	Einfluss der MED auf die Permeabilität von <i>Pyrus</i> CM für Methylglucose (A) und ihre Effekte auf die Permeabilität (B).....	62
Abb. 4.12	Vergleich der Permeation von Methylglucose und CaCl ₂ durch <i>Pyrus</i> CM.....	63
Abb. 4.13	Korrelation der Geschwindigkeitskonstanten von CaCl ₂ und Methylglucose bei <i>Pyrus</i> CM.....	64
Abb. 5.1	Korrelation der Geschwindigkeitskonstanten (k*) von 2,4-DB mit der Konzentration (C _{CM} g kg ⁻¹) von verschiedenen Akzeleratoren in <i>Stephanotis</i> CM.....	67
Abb. 5.2	Korrelation der Geschwindigkeitskonstanten (k*) von 2,4-DB mit der Konzentration von verschiedenen Akzeleratoren in <i>Stephanotis</i> Wachs.....	68
Abb. 5.3	Korrelation der Geschwindigkeitskonstanten (k*) von 2,4-DB	

	mit der Konzentration von TBP in <i>Stephanotis</i> CM und Wachs.....	69
Abb. 5.4	Vergleich von Verteilungskoeffizienten zwischen Kutikula/Rezeptor ($K_{CM/Rez}$) und Wachs/Rezeptor ($K_{Wachs/Rez}$) aus <i>Stephanotis</i> CM für die Akzeleratoren DESU, DES, DBSU, DBS und TBP.....	70
Abb. 5.5	Korrelation der Konzentration von fünf Akzeleratoren in CM und im Wachs von <i>Stephanotis</i>	70
Abb. 5.6	Korrelation des Effektes auf die Mobilität von 2,4-DB und der Konzentration in <i>Stephanotis</i> Wachs.....	72
Abb. 5.7	Korrelation zwischen dem Akzeleratoreffekt auf die Mobilität von 2,4-DB und der Konzentration der Akzeleratoren in <i>Stephanotis</i> CM und Wachs.....	73
Abb. 5.8	Zusammenhang zwischen der Permeabilität (k) von <i>Stephanotis</i> CM für Metribuzin und Iprovalicarb..... und der Konzentration ($C_{CM} \text{ g kg}^{-1}$) von DESU und TBP im Wachs.	77
Abb. 5.9	Zusammenhang zwischen der Permeabilität (k) von <i>Stephanotis</i> CM für Metribuzin und Iprovalicarb und der Konzentration (C_{Wachs}) der Akzeleratoren in Wachs bei.....	78
Abb. 5.10	Korrelation der Konzentration der Akzeleratoren (C_{12E_n}) im Wachs von <i>Stephanotis</i> und <i>Pyrus</i> CM mit der Geschwindigkeitskonstante der Desorption von Methylglucose.....	79
Abb. 5.11	Vergleich der Effekte von C_{12E_n} auf die Methylglucose Permeabilität von <i>Stephanotis</i> und <i>Pyrus</i> CM.....	80

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle		Seite
Tab. 3.1	Überblick über die Flächengewichte, durchschnittliche Wachsmenge pro Fläche und prozentualer Anteil der Wachse der Kutikeln von <i>Stephanotis</i> und <i>Pyrus</i>	30
Tab. 3.2	Eigenschaften der Modellverbindungen.....	33
Tab. 3.3	Chemische Beziehung, Struktur, Molekulargewicht und Verteilungskoeffizient der verwendeten Akzeleratoren.....	35
Tab. 4.1	Akzeleratorkonzentrationen im Rezeptor, CM und Wachs sowie die daraus resultierenden Geschwindigkeitskonstanten (k^*) und Effekte der Akzeleratoren auf die Mobilität von 2,4-DB in <i>Stephanotis</i> CM.....	45
Tab. 4.2	Einfluss der Konzentration ausgewählter Akzeleratoren auf die Permeabilität von <i>Stephanotis</i> CM für Iprovalicarb, Metribuzin und Methylglucose.....	52
Tab. 4.3	Einfluss von monodispersen ethoxylierten Dodecanolen (MED) auf die Permeabilität von <i>Stephanotis</i> CM für Iprovalicarb, Metribuzin und Methylglucose.....	53

1. EINLEITUNG

1.1 Vorkommen, Aufbau und Funktion der pflanzlichen Kutikula

Die pflanzliche Kutikula (lat. cuticula = Häutchen) bildet die Grenzfläche zwischen primären oberirdischen Organen der Höheren Pflanzen und der Umwelt. Sie liegt als kontinuierliche Membran auf den Epidermiszellen von Stängeln, Blättern, Früchten und Blüten. Die Kutikula ist eine Lipidmembran und besteht vor allem aus Kutin und Wachsen (JEFFREE, 1986; HOLLOWAY, 1982).

SCHÖNHERR (1976) unterscheidet die in Lipidlösungsmitteln unlösliche Polymermatrix und die löslichen kutikulären Lipide, die meist Wachse genannt werden. Die Polymermatrix besteht aus Kutin, Polysacchariden, Polypeptiden und weiteren Bestandteilen (KOLATTUKUDY, 1980). Das Kutin ist ein hydrophobes, unlösliches Polymer und besteht aus gesättigten und ungesättigten Hydroxyfettsäuren. Bei vielen Spezies kommen auch Epoxyfettsäuren vor. Der Anteil an ungesättigten Fettsäuren ist sehr gering, die Kettenlänge der Fettsäuren liegt vorwiegend bei C₁₆ und C₁₈. Die löslichen Wachse bestehen aus langkettigen Alkanen, Fettsäuren, Alkoholen, Aldehyden und Wachsestern. Die Kettlängen liegen zwischen C₁₆ und C₆₀ und die Wachse sind daher bei physiologischen Temperaturen Feststoffe, die entweder amorph oder kristallin vorliegen. Die Wachse werden weiter in intra- und epikutikuläre Wachse unterteilt. Die intrakutikulären Wachse sind im Kutin eingebettet, während die epikutikulären Wachse auf der Oberfläche der Kutikula abgelagert werden.

Die Struktur der pflanzlichen Kutikula variiert zwischen den Pflanzenarten erheblich. HOLLOWAY (1982) hat die Struktur in sechs Typen eingeteilt. Die Übergänge sind jedoch fließend, und die Abweichungen sind eher auf relative Unterschiede im Grad der Entwicklung der Kutikularmembran und der darunter liegenden Zellwand zurückzuführen, als auf grundlegende Unterschiede in der Chemie oder im Bauprinzip. Die typische Kutikula (Abb. 1.1) ist von außen nach innen aus einer äußeren dünnen lamellierten Schicht, der eigentlichen Kutikula (cuticle proper), und einer inneren Kutikularschicht (cuticular layer) zusammengesetzt. Die ‚cuticle proper‘ besteht aus Kutin und Wachsen und enthält keine Zellulose. Die epikutikulären

Wachse können als wenig strukturierte Wachskrusten oder als Plättchen, Röhren, Stäbchen vorliegen. In der Kutikularschicht dringen Fibrillen aus Polysacchariden (Zellulose, Pektin) von der Zellwand her ein. Der Übergang zwischen der Kutikula und der Zellwand wird oft von einer pektinreichen Zwischenschicht gebildet. Das Pektin kann durch pektolytische Enzyme abgebaut werden, was die enzymatische Isolierung der Kutikularmembran ermöglicht.

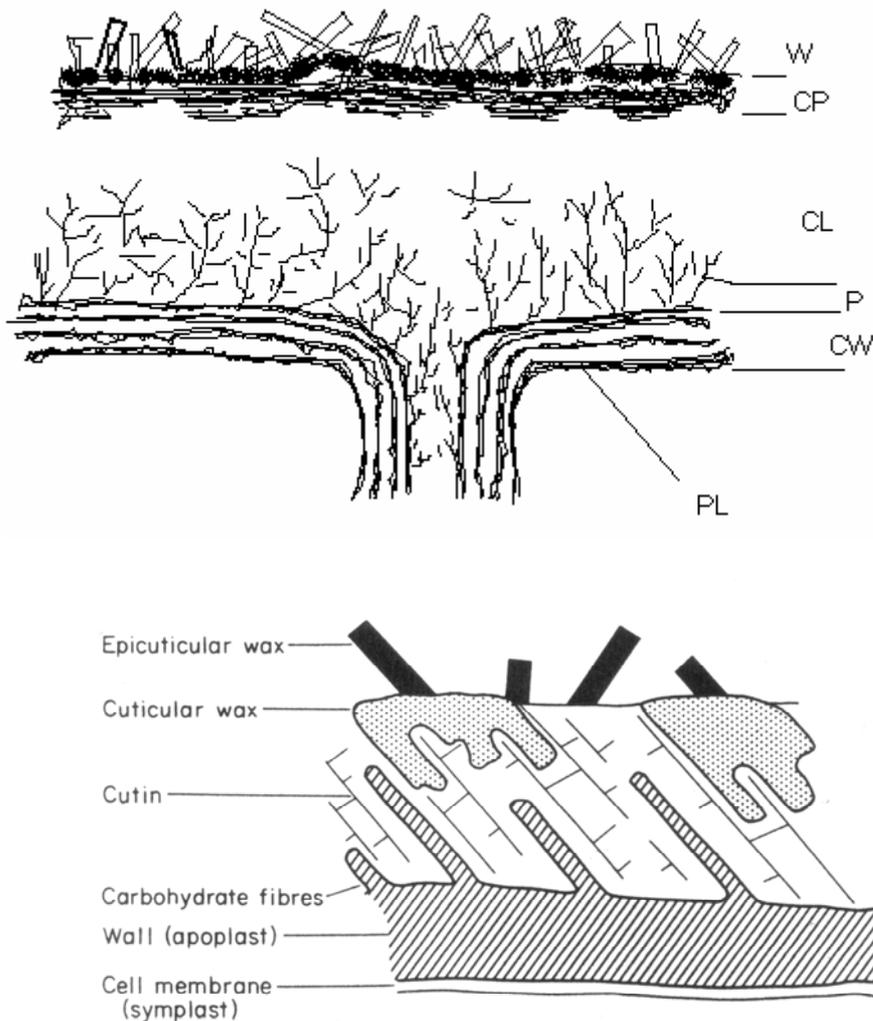


Abb. 1.1 Schematischer Querschnitt durch die pflanzliche Kutikula: W = epikutikuläre Wachse; CP = „cuticle proper“ mit lamellierter Struktur; CL = Kutikulaschicht, durchzogen von Cellulose-Mikrofibrillen; P = Pektinschicht und Mittelamelle; CW = Zellwand; PL = Plasmalemma (oben: verändert nach JEFFREE, 1986) und identische Kutikula (untere Abb. aus PRICE, 1980).

Neben der Feinstruktur variieren auch Flächengewichte, Membrandicken und prozentualer Wachsanteil der pflanzlichen Kutikula zwischen den Pflanzenarten und Habitaten erheblich. Im Allgemeinen haben die Pflanzen in Trockengebieten (Xerophyten) dickere Kutikeln, und auch der Wachsanteil ist höher. MARTIN und JUNIPER (1970) berichten, dass die Dicke der pflanzlichen Kutikeln zwischen 0,7 bis 13,5 μm variiert, dass die Kutikula von *Olea lancea* mit einem Wert vom 13,5 μm um 19-fach dicker als die von *Prunus laurocerasus* ist. BUCHHOLZ hat für die Kutikeln von 18 Pflanzenarten Gewicht, Dicke und Wachsanteil bestimmt. Die durchschnittlichen Flächengewichte (mg cm^{-2}) lagen zwischen 0,097 (*Juglans regia*) und 0,602 (*Ilex aquifolium*). Mit einem spezifischen Gewicht von $1,1 \text{ g cm}^{-3}$ ergeben sich durchschnittliche Dicken von 0,88 μm (*Juglans regia*) und 5,48 μm (*Ilex aquifolium*). Die Wachsanteile lagen bei 8,8 % (*Melicoccus*) und 29,8 % (*Schefflera*) (BUCHHOLZ, 1998).

Die „Erfindung“ Kutikula, im Zuge der Phylogenese der Farne und der Höheren Pflanzen war ein entscheidender Schritt in der Evolution, der erst die Besiedlung des Festlandes ermöglichte. Die hauptsächlichen Funktionen der Kutikula kann man in folgenden Punkten zusammenfassen:

- (1) Die Kutikula reduziert den passiven Wasserverlust der Pflanzen an die Atmosphäre und ist damit eine Grundvoraussetzung für die terrestrische Lebensform. Die Wasserpermeabilität der Kutikeln verschiedener Spezies variiert erheblich und ist den jeweiligen Standorten angepasst (KERSTIENS, 1996). Allerdings konnten bisher keine einfachen Beziehungen zwischen Wasserpermeabilität, Dicke der Kutikula oder Menge bzw. Zusammensetzung der Wachse gefunden werden.
- (2) Bei geschlossenen oder bei fehlenden Stomata (z.B. astomatäre Früchte) reguliert die Kutikula den Gasaustausch zwischen der Pflanze und der umgebenden Luft (LENDZIAN UND KERSTIENS, 1991), der sowohl für die Photosynthese als auch für die Atmung der Pflanze wichtig ist.
- (3) Die Kutikula reduziert die Benetzbarkeit des Blattes und verringert damit die mechanische Belastung durch anhaftendes Wasser. Die Infektionsgefahr durch Pathogene wird vermindert, weil sich Sporen schlecht anhaften können,

durch Regen abgewaschen werden oder weil sich kein Wasserfilm bilden kann, der für die Keimung der Sporen mancher Pathogene erforderlich ist. Dabei spielt das mikrokristalline Oberflächenwachs eine besondere Rolle.

- (4) Die Kutikula kann die Auswaschung von Nährstoffen („leaching“) herabsetzen bzw. unterbinden (SCHÖNHERR UND BAUR, 1996a).
- (5) Die Kutikula kann die Pflanze vor der schädlichen UV-Strahlung schützen. Die Kutikula und ihre assoziierten Wachsschichten bestimmen Menge und Qualität der Strahlung, die das Mesophyll erreicht (BAUR ET AL., 1998).

1.2 Permeabilität pflanzlicher Kutikeln

1.2.1 Qualitative Betrachtungen

Schon seit Jahrhunderten werden Chemikalien für den Schutz der Kulturpflanzen während ihrer Entwicklung eingesetzt. Art und Umfang des chemischen Pflanzenschutzes haben sich in den vergangenen 50 Jahren aber erheblich geändert. Es wurden zahlreiche neuartige synthetische Substanzen entwickelt, die als Fungizide, Insektizide, Akarizide, Wuchsstoffe, Herbizide und Blattdünger Verwendung finden. Diese Stoffe werden sehr häufig auf die Pflanzen gespritzt und dabei auf den Kutikeln deponiert. Systemische Wirkstoffe, also solche die erst in der Pflanze wirksam werden, müssen die Kutikula penetrieren. Dabei kann es zu Problemen kommen, weil viele Chemikalien nicht hinreichend wasserlöslich sind und die Penetration zu langsam erfolgt. Wirkstoffverluste sind die Folge. Abwaschen durch Regen, Verdampfen oder Sublimation sowie Inaktivierung durch UV-Strahlung sind die häufigsten Ursachen. Diese Probleme können überwunden werden, indem man nicht die reinen Wirkstoffe appliziert, sondern Formulierungen, das sind Mischungen von Wirkstoffen und anderen Hilfsstoffen. Diese Hilfsstoffe werden auch als Additive oder Adjuvantien bezeichnet. Sie verbessern die Wirksamkeit der Mittel indem sie die Wasserlöslichkeit und die Retention an Blättern sowie die Geschwindigkeit der Penetration in die Blätter erhöhen.

Die Geschwindigkeit der Stoffaufnahme in Blätter und Früchte hängt im Wesentlichen von der Permeabilität der Kutikeln und der Größe der treibenden Kräfte ab. Die Diffusion durch die Kutikeln ist ein rein physikalischer Prozess (SCHÖNHERR UND BAUR, 1996). Das hat wichtige Konsequenzen, denn die Diffusion ist unabhängig davon, welche physiologische Wirkung eine Substanz im Stoffwechsel hat. Die Gesetzmäßigkeiten der Permeation durch die Kutikeln sind dieselben wie bei anderen biologischen oder synthetischen Membranen.

Ursprünglich wurde die Effektivität der Wirkstoffe und Hilfsstoffe rein empirisch überprüft, indem man sie auf die Pflanzen applizierte und die Wirkungen bonitierte. Mit diesem Verfahren kann man gute und schlechte Formulierungen unterscheiden, aber die Ursachen für die Unterschiede bleiben unklar. Selbst wenn die Penetration mit Hilfe radioaktiv markierter Wirkstoffe untersucht wird, bleibt unklar wie die verwendeten Additive die Penetration beeinflusst haben, denn (KIRKWOOD, 1987; STOCK UND HOLLOWAY, P. J. 1993) Wirkungsmechanismen und Wechselwirkungen bleiben obskur und Gegenstand der Spekulation.

Die mechanistischen Untersuchungen der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass es in Kutikeln zwei parallele Transportwege gibt. (1) Hydratisierte organische und anorganische Ionen diffundieren nur in wässrigen Poren, die in allen Kutikeln vorkommen (SCHÖNHERR, 2000). Die Permeabilität der Kutikeln für Ionen war unabhängig von der Temperatur und konnte durch Einsatz von Akzeleratoren nicht beschleunigt werden. Das ist für die Formulierung von Blattdüngern, aber auch einiger Pflanzenschutzmittel und Pflanzenstärkungsmittel von großer Bedeutung. (2) Nichtelektrolyte, die im amorphen Wachs hinreichend löslich sind diffundieren durch eine amorphe lipophile Matrix, die aus Methylengruppen besteht (BAUR ET AL. 1997a; BUCHHOLZ UND SCHÖNHERR, 2000). Das gilt sowohl für amorphe Wachse als auch für Kutin, allerdings sind die kutikulären Wachse nahezu ausschließlich für die Barriereigenschaften pflanzlicher Kutikeln verantwortlich (RIEDERER UND SCHREIBER, 1995; SCHÖNHERR UND RIEDERER, 1989). Im Folgenden geht es um die weitere Charakterisierung dieses lipophilen Pfades in den Wachsen der Kutikula, der für die allermeisten Pflanzenschutzmittel aber auch für Phytohormone und Wuchsstoffe von entscheidender Bedeutung ist.

Die Geschwindigkeit der Stoffaufnahme in Blätter ist proportional der Mobilität in der Kutikula. Diese nimmt mit zunehmender Molekülgröße und sinkender Temperatur

schnell ab (BAUR ET AL., 1999a und 1999b; BUCHHOLZ ET AL., 1998), so dass bei niedrigen Temperaturen und bei Wirkstoffen mit hohem Molekulargewicht die Wirkung der Mittel oft unbefriedigend ist, weil sie nicht mehr schnell genug in die Blätter eindringen können. Dieses Problem lässt sich durch Zugabe von Akzeleratoren beheben. Akzeleratoren sind Weichmacher, die die Fluidität der amorphen Wachsfraktion und damit die Wirkstoffmobilität erhöhen (BURGHARDT ET AL., 1998; RIEDERER UND SCHREIBER, 1995; SCHÖNHERR, 1993a; SCHÖNHERR, 1993b; SCHREIBER, 1995; SCHREIBER ET AL., 1996b). Um ihre Wirkung entfalten zu können, müssen die Akzeleratoren aus dem Spritzrückstand schnell in die Wachse eindringen. Als Weichmacher sind Akzeleratoren tendenziell phytotoxisch, weil sie auch die Fluidität von Cytomembranen beeinflussen können. Daher sollten Akzeleratoren nur langsam aus der Kutikula in die Zellen diffundieren und sie sollten schnell abbaubar sein, damit toxische Konzentrationen gar nicht erst entstehen können. Diese Prozesse wurden bisher nur unzureichend untersucht.

Die Geschwindigkeit der Wirkstoffaufnahme in Blätter hängt außerdem von ihrer Löslichkeit und Konzentration im Spritzrückstand ab. Je höher die Löslichkeit eines Stoffes im Wachs und je höher seine Konzentration im Spritzrückstand umso schneller dringt er in die Blätter ein. Kutikeln sind Lipidmembranen, in denen lipophile Stoffe eine sehr viel höhere Löslichkeit aufweisen als polare. Aber auch die Löslichkeit im Spritzrückstand ist wichtig, denn die treibenden Kräfte für die Penetration sind proportional dem Verhältnis der Löslichkeit im Wachs und im Spritzrückstand (Verteilungskoeffizient). Je größer der Verteilungskoeffizient umso höher sind die Penetrationsraten (SCHÖNHERR UND BAUR, 1996; SCHÖNHERR ET AL., 1999). Die Löslichkeit der Wirkstoffe im Wachs lässt sich nicht manipulieren, weil der Wirkstoff und das Wachs feste Größen sind. Dagegen lässt sich die Zusammensetzung des Spritzrückstandes in weiten Grenzen variieren (BAUR ET AL., 1997b; MARZOUK ET AL., 1998).

Sobald das Wasser der Spitzbrühe verdunstet ist, bleibt eine Mischung aus Wirkstoffen und Formulierungshilfsstoffen auf dem Blatt zurück, und dieser Rückstand ist mehr oder weniger hydratisiert, je nach Luftfeuchte und Hygroskopizität der Wirk- und Hilfsstoffe. Das ist der Grund, warum die Aufnahmegeschwindigkeit nicht mit dem Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient korreliert sein kann (SCHÖNHERR ET AL., 1999), was irrtümlicherweise immer noch

oft angenommen wird. Es ist auch gleichgültig, welche Lipidphase (Octanol, Kutin, Hexan, Hexadecan etc.) zur Abschätzung der Verteilungskoeffizienten herangezogen wird, denn es ist die Lösungsmittelphase (Wasser oder anderes), die entscheidend ist. Dazu ein Beispiel: Während der Kutikula/Wasser Verteilungskoeffizient für Bifenox 27500 beträgt so ist er für das Lösungsmittel Glycerol nur 200 und für Ethylenglykole sogar nur 0,8 (MARZOUK ET AL., 1998).

Die Konzentration im Spritzmittelrückstand ist eine weitere wichtige Determinante der Geschwindigkeit der Stoffaufnahme. Je höher die Konzentration, umso schneller die Aufnahme, weil die treibenden Kräfte höher sind. Danach erhält man maximale Raten, wenn der Wirkstoff im Rückstand als gesättigte Lösung vorliegt. Wie viel Wirkstoff im Spritzrückstand löslich ist, das hängt von der Zusammensetzung des Rückstandes ab. Enthält der Rückstand ein gutes Lösungsmittel für den Wirkstoff, dann lässt sich eine hohe Konzentration (bei gleichzeitig niedrigem Volumen des Rückstandes) realisieren. Allerdings bedeutet ein gutes Lösungsmittel auch gleichzeitig einen kleineren Verteilungskoeffizient. Die treibende Kraft der Penetration ist daher dem Produkt aus Verteilungskoeffizient und Konzentration des Wirkstoffes proportional. Für eine Optimierung der Wirkstoffaufnahme in Blätter, wie sie auch hier angestrebt wird, muss daher das Produkt von Verteilungskoeffizient und Wirkstoffkonzentration maximiert werden, nicht die einzelnen Faktoren, weil diese nicht unabhängig voneinander sind (SCHÖNHERR UND BAUR, 1996; SCHÖNHERR ET AL., 1999).

Aus diesen Gesetzmäßigkeiten lassen sich nun die Möglichkeiten ableiten, die beim Formulieren von Wirkstoffen zur Verfügung stehen, um maximale Aufnahmeraten zu realisieren:

- (1) Durch Wahl der richtigen Akzeleratoren und ihrer Konzentration in der Spritzbrühe lässt sich die Penetrationsgeschwindigkeit erhöhen. Die „richtigen“ Akzeleratoren sollten schnell in die Kutikula eindringen und eine hohe intrinsische Aktivität aufweisen, damit so wenig wie möglich benötigt wird. Außerdem sollte ihre Verweildauer in der Kutikula hinreichend lang sein, damit alle Wirkstoffmoleküle penetrieren können, ehe die Akzeleratoren selbst in die Zellen gelangen, wo sie wiederum schnell abbaubar sein sollten. Hier gibt es allerdings noch wenig gesichertes Wissen und erheblichen Forschungsbedarf.

- (2) Das Produkt aus Verteilungskoeffizient und Konzentration im Spritzrückstand muss maximal sein. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Hilfsstoffe weder humantoxisch noch phytotoxisch sein dürfen. Dazu gehören z. B. Glykole, die gute Lösungsmittel sowohl für polare als auch unpolare Wirkstoffe sind. Sie sind außerdem hygroskopisch, kaum flüchtig und binden erhebliche Mengen an Wasser im Rückstand. Auch hier fehlen z. T. noch grundlegende Informationen, wie die Löslichkeiten der diversen Wirkstoffe unterschiedlicher Polaritäten in geeigneten Formulierungshilfsstoffen und die Sorptionsisothermen für Wasser für diese Hilfsstoffe.

1.2.2 Quantitative Aspekte des kutikulären Stofftransportes

Die theoretischen Grundlagen der Permeation von Nichtelektrolyten durch die pflanzliche Kutikula lassen sich quantitativ formulieren. Der Diffusionsfluss (J) durch die Kutikula ergibt sich aus der Stoffmobilität in der Kutikula (k^*), der Weglänge durch die transportlimitierende Barriere (l_s) der Kutikula und der treibenden Kraft, die dem Produkt aus dem Wachs/Formulierungsrückstand Verteilungskoeffizient (K_{wxf}) und der Konzentration im Rückstand (C_{fr}) entspricht:

$$J = k^* l_s (K_{wxf} C_{fr}) \quad (1.1)$$

Bei der Ableitung dieser Gleichung wurde angenommen, dass die Wirkstoffe nicht in der Epidermiswand akkumulieren. Das ist für Wirkstoffe mit Kutikula/Wasser Verteilungskoeffizienten <5000 sowie für schwache Säuren und Basen der Fall (SCHÖNHERR UND BAUR, 1996). Unter Verwendung dieser Gleichung lässt sich für jeden Typ von Kutikula die Stoffmobilität der Substanzen abschätzen (BUCHHOLZ ET AL., 1998; SCHÖNHERR ET AL., 1999). Dazu ist lediglich das Molvolumen der Substanzen erforderlich, das sich nach ABRAHAM und MCGOWAN (1987) aus der Strukturformel berechnen lässt. Die Mobilität der Stoffe im Wachs und in der Kutikula ist von ihrer Lipophilie unabhängig (BAUR ET AL., 1996;

BUCHHOLZ ET AL., 1998; KIRSCH ET AL., 1997; SCHREIBER, 1995; SCHREIBER ET AL., 1996a):

$$\log k^* = \log k^{0*} + \beta \times V_x \quad (1.2)$$

Die Geschwindigkeitskonstante k^* (mit der Dimension s^{-1}) ist ein Maß für die Mobilität in der limitierenden Schicht und wird mittels UDOS gemessen (SCHÖNHERR UND BAUER, 1992). Trägt man $\log k^*$ für verschiedene Stoffe gegen deren Molvolumen (V_x) auf, so ergeben sich für jeden Kutikulatyp Gerade mit dem Schnittpunkt k^{0*} . Die Steigung der Geraden entspricht dem Parameter β . Der Achsenschnittpunkt k^{0*} charakterisiert die Mobilität eines hypothetischen Stoffes mit dem Molvolumen null in einem bestimmten Typ Kutikula. Es ist also ein reiner Membranparameter, der unabhängig von den Eigenschaften der Permeanden ist. Der Einfluss der Molekülgröße auf die Mobilität ergibt sich aus dem Produkt βV_x , wobei β die Molekülgrößenselektivität der Kutikula charakterisiert. Sind diese beiden Membranparameter einmal bestimmt worden, dann lassen sich die Mobilitäten für alle anderen Substanzen berechnen (BAUR ET AL., 1996; BUCHHOLZ ET AL., 1998).

1.2.2.1 Größenselektivität und Stoffmobilitäten in Kutikeln

Bei konstanter Temperatur war die Größenselektivität (β) bei den Kutikeln von verschiedenen Arten gleich und auch die Extraktion der Wachse hatte keinen Einfluss (BAUR ET AL., 1996; BAUR ET AL., 1999a; BUCHHOLZ UND SCHÖNHERR, 2000; BUCHHOLZ ET AL., 1998). Dagegen variierte die Mobilität von Wirkstoffen zwischen Kutikeln verschiedener Pflanzenarten um Größenordnungen und der Parameter k^{0*} beschreibt diese Eigenschaft der Kutikeln vollständig. Unterschiedliche Weglängen [l_s in Gleichung (1.1)] in den Kutikeln verschiedener Pflanzenarten sind für die Unterschiede in k^{0*} verantwortlich. Worauf diese unterschiedlichen Weglängen beruhen, ist nicht bekannt und daher ist k^{0*} bisher nicht aus elementaren Daten prognostizierbar, sondern muss für jede Pflanzenart

einzelnen bestimmt werden. Ist aber k^{0*} für eine Art bekannt, dann kann k^* für jedes Molekül im Bereich von 100 bis 400 cm³ Mol⁻¹ nach Gleichung (1.2) berechnet werden.

1.2.2.2 Einfluss der Temperatur auf die Stoffmobilität

Die Stoffmobilität nimmt mit steigenden Temperaturen sehr schnell zu. Diese Wirkung ist umso stärker ausgeprägt, je größer die Wirkstoffe und je niedriger die Mobilität in den Kutikeln bei 25 °C ist. Die Temperaturquotienten (Q_{10}) lagen zwischen 3 und 14, die Aktivierungsenergien schwankten zwischen 75 und 189 kJ/Mol (BAUR ET AL., 1997a; BUCHHOLZ UND SCHÖNHERR, 2000; SCHÖNHERR ET AL., 1999). Die Aktivierungsenergie (E_D) lässt sich aus der Steigung der Arrhenius-Graphen ($\log k^*$ vs. $1/T$) berechnen. Diese Graphen waren im physiologischen Temperaturbereich (15 bis 45 °C) bei den Kutikeln aller Spezies linear. Das heißt, dass in diesem Temperaturbereich für den lipophilen Transportweg in der Kutikula keine irreversiblen Membranveränderungen (Phasenübergänge) auftreten.

Zwischen den Pflanzenarten traten große Unterschiede sowohl bei den Schnittpunkten (k_o^*) als auch bei den Steigungen (E_D/R) der Arrhenius-Graphen auf. Beide Größen waren aber korreliert, so dass die Daten für alle einzelnen Kutikeln, alle Pflanzenarten und alle Wirkstoffe (unterschiedlicher Größe) auf einer Gerade liegen, wenn man $\log k_o^*$ gegen E_D/R aufträgt. Dieser Befund wird dahingehend gedeutet, dass alle Wirkstoffe (unabhängig von deren Größe und Lipophilität) in allen getesteten Kutikeln von allen Spezies in derselben chemischen Mikro-Umgebung diffundieren (BAUR ET AL., 1997a; BUCHHOLZ UND SCHÖNHERR, 2000). Unterschiede in der Mobilität zwischen einzelnen Kutikeln, Spezies und Wirkstoffmolekülen beruhen lediglich auf Unterschieden in der Weglänge und der Aktivierungsenergie (BAUR ET AL., 1999a).

1.2.2.3 Einfluss von Akzeleratoren

Akzeleratoren erhöhen die Stoffbeweglichkeit im Wachs, das die transportlimitierende Barriere für den lipophilen Transportweg in der Kutikula darstellt, indem sie die Fluidität der Wachse erhöhen (SCHREIBER, 1995; SCHREIBER ET AL., 1996b). Ihre Wirkung entspricht also der, die man auch durch Erhöhung der Temperatur erzielen kann, denn auch steigende Temperaturen erhöhen die Stoffmobilität indem sie die Fluidität der Wachse erhöhen. Deshalb sind Akzeleratoren bei niedrigen Temperaturen besonders wirksam.

Die Wirkung der Akzeleratoren wurde bisher vor allem für ethoxylierte Alkohole untersucht, sowohl an isolierten Kutikeln (RIEDERER UND SCHREIBER, 1995; SCHÖNHERR, 1993a; SCHÖNHERR, 1993b) als auch an rekonstituiertem Wachs (BURGHARDT ET AL., 1998; SCHREIBER, 1995; SCHREIBER ET AL., 1996b). Ethoxylierte Alkohole sind bisher auch die einzigen Akzeleratoren, für die an einer Pflanzenart (*Citrus aurantium*) eine Dosis-Wirkungskurve erstellt worden ist (RIEDERER ET AL., 1995). Die Erhöhung der Mobilität von 2,4-D war direkt proportional der Konzentration der Akzeleratoren im Wachs, wobei die Konzentration im Wachs bis zu 15 g kg^{-1} betrug. Allerdings wurde für die Bestimmung Gerstenblattwachs verwendet und nicht *Citrus* Wachs.

Bisher wurde an *Stephanotis* Kutikeln untersucht, welche Wirkungen die folgenden Akzeleratoren haben (SCHÖNHERR ET AL. 2001): Monodisperse ethoxylierte Dodecanole (MED), Dibutylsuberat (DESU) und Tributylphosphat (TBP). Alle drei Arten von Akzeleratoren haben zwölf Kohlenstoffatome. DESU und TBP sind Ester und können in den Zellen durch unspezifische Esterasen gespalten und damit entgiftet werden. Um Dosis-Wirkungsbeziehungen zu erstellen ist es erforderlich, dass reproduzierbar unterschiedliche Akzeleratorkonzentrationen in den Kutikeln eingestellt und konstant gehalten werden können. Alle bisher verwendeten Verfahren erwiesen sich jedoch als zu wenig geeignet, weil es damit nicht gelang, die Akzeleratorkonzentration in den Kutikeln über lange Zeiträume konstant zu halten. Es war daher erforderlich, ein ganz neues Testsystem zu entwickeln. Details zu diesem neuen Testsystem finden sich bei SCHÖNHERR ET AL. (2001).

Zunächst wurden Verteilungskoeffizienten für das System Kutikula/Desorptionsmedium bestimmt. Dazu wurden ^{14}C -markierte Akzeleratoren verwendet. Markiertes DESU musste aus ^{14}C -markierten Ethanol und Suberinsäure synthetisiert werden, ^{14}C -TBP konnte gekauft werden. Eine Synthese von ^{14}C -MED war nicht

möglich, so dass keine radioaktiven MED zur Verfügung standen. Nachdem die Verteilungskoeffizienten bekannt waren, konnten die isolierten Kutikeln durch Zugabe der Akzeleratoren zum Desorptionsmedium mit diskreten Mengen dieser Akzeleratoren beladen werden. Da die Konzentration in der Kutikula das Produkt aus Verteilungskoeffizient und Akzeleratorkonzentration (C_{AKZ}) im Desorptionsmedium ist, konnte durch verschiedene und konstante C_{AKZ} im Desorptionsmedium die Konzentration in der Kutikula eingestellt werden. Auf diese Art war es möglich zu messen, wie hoch die Mobilität der Modellsubstanz 2,4-Dichlorphenoxybuttersäure (2,4-DB) bei unterschiedlichen Konzentrationen der Akzeleratoren in der Kutikula war. Solche Messungen wurden bei 15, 20, 25 und 30 °C durchgeführt.

Dosis-Wirkungskurven ($\log k^*$ vs. C_{AKZ} in der Kutikula) waren konvex zur x-Achse und näherten sich bei hohen C_{AKZ} von etwa 100 g kg⁻¹ einem Plateau. Da keine ¹⁴C-markierten MED zur Verfügung standen, war die Bestimmung von Verteilungskoeffizienten dieser Akzeleratoren für das System *Stephanotis* CM/Desorptionsmedium nicht möglich. Daher konnten die gemessenen Desorptionsraten (k^*) nur gegen die MED Konzentrationen im Gerstenblattwachs (BURGHARDT ET AL., 1998) aufgetragen werden, die allerdings auch nur bei 25 °C zur Verfügung standen. Für andere Temperaturen waren Verteilungskoeffizienten nicht verfügbar.

Die Mobilität von 2,4-DB nahm mit steigender Temperatur zu. Je nach Temperatur und Akzelerator nahm die Mobilität um bis zum 48-fachen zu. In Abwesenheit von Akzeleratoren betrug die Arrhenius Aktivierungsenergie 105 kJ Mol⁻¹. Mit steigender Akzeleratorkonzentration nahmen die Aktivierungsenergien ab und erreichten bei ca. 90 g Akzelerator pro kg Kutikula 26 (DESU), 62 (TBP) und 36 kJ Mol⁻¹ (MED). Es bestanden erhebliche Unterschiede sowohl in der intrinsischen Aktivität dieser 3 Typen von Akzeleratoren, als auch in der Form der Dosis-Wirkungskurven (SCHÖNHERR ET AL., 2001).

1.3 Ziele der Untersuchungen

Es konnte bisher wahrscheinlich gemacht werden, dass nicht alle Akzeleratoren die gleiche Wirkung haben, selbst dann nicht, wenn ihre Konzentrationen in den Kutikeln

gleich sind. Einschränkend muss hier allerdings eingeräumt werden, dass die Datenbasis verfeinert werden muss, denn bei MED beziehen sich die Dosis-Wirkungskurven auf die Konzentration in Gerstenwachs bei 25 °C. Hier werden unbedingt Daten für *Stephanotis* Wachs bei verschiedenen Temperaturen benötigt. Bei DESU und TBP beziehen sich zwar die Dosis-Wirkungskurven auf die Konzentration in den Kutikeln aber es fehlen auch hier die Verteilungskoeffizienten für das System *Stephanotis* Wachs bei verschiedenen Temperaturen. Erst wenn diese Daten vollständig vorliegen lässt sich entgeltig sagen, in welchem Maße sich die verschiedenen Akzeleratoren in ihrer intrinsischen Aktivität unterscheiden, und wie diese Unterschiede von der Temperatur abhängen.

Um für einen bestimmten Wirkstoff den optimalen Akzelerator auswählen zu können und seine Mindestmenge in der Formulierung festlegen zu können, müssen zusätzlich noch folgende Fragen beantwortet werden:

1. Hängt die Wirkung der Akzeleratoren lediglich von seiner Konzentration im Wachs ab, oder bestehen zwischen Polarität von Wirkstoffen und Akzeleratoren Wechselwirkungen. Es ist gut vorstellbar, dass relativ polare Akzeleratoren für polare Nichtelektrolyte wirksamer sind, als extrem unpolare Akzeleratoren. Alle Akzeleratoren müssen lipophil sein, damit sie im Wachs löslich sind. Aber Ergebnisse mit ethoxylierten Alkoholen zeigen auch, dass Verteilungskoeffizienten von 50 ausreichen, um eine große Wirkung zu erzielen (BURGHARDT ET AL., 1998).
2. Wie groß sind die Verteilungskoeffizienten für das System *Stephanotis* Wachs/Wasser bzw. Rezeptorlösung.
3. In welchem Masse hängt die Verweildauer der Akzeleratoren im Wachs von Ihrer Lipophilität ab? Eine lange Verweildauer ist erstrebenswert, weil dann hinreichend viel Zeit für eine möglichst quantitative Penetration auch großer Wirkstoffmoleküle zur Verfügung steht. Außerdem erfolgt der Übergang der Akzeleratoren in die Epidermiszellen durch die wässrige Epidermisaußenwand umso langsamer je größer der Kutikula/Wasser Verteilungskoeffizient, d.h. je schlechter der Akzelerator im Wasser der Zellwand löslich ist. Die wässrige Zellwand wirkt als Widerstand in Serie und dieser Widerstand wird mit steigender Lipophilität der Akzeleratoren und Wirkstoffe

größer. Das wird im Methodenteil quantitativ dargestellt werden. Die Lipophilität der Akzeleratoren lässt sich erhöhen, indem man die Alkylgruppen verlängert. Mit jeder CH₂-Gruppe nimmt log *K* um 0,55 Einheiten zu (DUNN III ET AL., 1986), so dass Tripropylphosphat schon einen Verteilungskoeffizient von über 10 000 hat. Diethylsebacat hätte dann einen Verteilungskoeffizient von rund 1000 und Dibutylsebacat ebenfalls rund 10 000. Diese Substanzen sind sehr wirksame Akzeleratoren (BAUR, 1993), aber es muss noch geprüft werden, ob sie hinreichend schnell in die Kutikula eindringen und wie lang ihre Verweildauer in der Kutikula ist.

Erst wenn diese Daten verfügbar sind lässt sich *a priori* sagen, welcher Akzelerator für einen bestimmten Zweck am besten geeignet ist. Nachdem Punkt 2 inzwischen im Rahmen einer Doktorarbeit durch Eva Simanova bearbeitet worden ist und die Verteilungskoeffizienten zur Verfügung stehen befasst sich die vorliegende Arbeit mit Punkt 1.

Dabei geht vor allem um die Klärung der folgenden Fragen:

1. Zunächst soll mit UDOS-Experimenten unter Verwendung von Estern der Dicarbonsäuren Suberat und Sebacat sowie von MED deren intrinsische Aktivität bestimmt werden. Dafür sollen 2,4-DB und *Stephanotis* CM verwendet werden, weil für dieses System inzwischen die Verteilungskoeffizienten von SIMANOVA (2003) bestimmt worden sind. Die intrinsische Aktivität eines Akzelerators ist definiert als der Faktor um den sich die Mobilität bei einer bestimmten Konzentration des Akzelerators in der CM bzw. im Wachs erhöht.
2. Mit SOFU Experimenten soll danach überprüft werden, ob die Wirkung der Akzeleratoren bei konstanter Konzentration in CM bzw. Wachs von den Eigenschaften der Wirkstoffe abhängen, z. B. von Molgewicht, Verteilungskoeffizient oder elektrische Ladung.

2. THEORIE

Die pflanzliche Kutikularmembran (CM) stellt eine asymmetrische Barrieremembran dar (SCHÖNHERR UND RIEDERER, 1988). Diese Asymmetrie ist eine wichtige Besonderheit im Vergleich zu anderen Membranen. Für Nichtelektrolyte kann die CM als Löslichkeitsmembran behandelt werden, d. h. der Stofftransport erfolgt nicht durch Poren sondern in amorphen Bereichen des Kutins and der Wachse (BUCHHOLZ UND SCHÖNHERR, 2000). Es liegt auch keine durch Proteine erleichterte Permeation vor, wie sie bei Biomembranen (Plasmalemma) auftritt. Die Beschreibung des passiven Stofftransports (Diffusion) von Nichtelektrolyten in der CM kann folglich mit Methoden durchgeführt werden, die auch in der Polymerforschung verwendet werden (LIEB UND STEIN, 1972). Dabei trennt die Membran zwei Phasen, die entweder flüssig oder gasförmig sein können.

Die Asymmetrie der CM macht die Bestimmung der relevanten Variablen und Parameter, mit denen der Transport charakterisiert werden kann, schwierig. Im Folgenden wird trotzdem zunächst der Transport durch homogene Membranen behandelt, weil die Definition der Parameter so einfacher ist. Erst später werden die Heterogenität und die Abweichung vom Fließgleichgewicht explizit berücksichtigt.

2.1 Permeation im Fließgleichgewicht

Bei der Permeation im Fließgleichgewicht befindet sich die Membran zwischen zwei, meist wässrigen, Phasen. In einem typischen Experiment trennt die Membran zwei Kompartimente (Abb. 2.1). Man kann auf einer Seite (Donatorseite) einen bestimmten Stoff (Testverbindung) zugeben, und die Durchlässigkeit der Membran für diesen Stoff messen. Die Testsubstanz diffundiert nun vom Donator durch die Membran in den Rezeptor. Die Konzentrationen der beiden Lösungen, die sich in beiden Seiten der Membran befinden, werden jeweils mit C_{Don} und C_{Rez} in g m^{-3} oder Mol m^{-3} ausgedrückt. Der Stofftransportprozess umfasst folgende Schritte: Die Aufnahme in die Membran, die Diffusion in der Membran und den Austritt aus der Membran. Die Moleküle des Stoffes müssen zuerst von der Donatorlösung in die Membran gelangen. Bei einer festen Membran findet dabei ein Phasenübergang

flüssig/fest statt. Menge und Geschwindigkeit sind abhängig von der Eigenschaft des Stoffes und der Membran, dabei spielen aber auch andere Faktoren eine Rolle, z. B. die Konzentration im Donator und die Temperatur. Danach diffundieren die Moleküle durch die Membran und nach einem zweiten Phasenübergang gelangen sie wieder in eine wässrige Rezeptorlösung. Es findet dabei also Diffusion sowohl in Wasser als auch in der festen Membran statt. Diffusionskoeffizienten in Feststoffen sind meist um Größenordnungen kleiner als in flüssigen Phasen und deshalb hängt die Geschwindigkeit des Transportes im System praktisch ausschließlich von der Diffusion in der Membran ab und der Einfluss der Flüssigphase kann vernachlässigt werden. Eine Rückdiffusion ist vernachlässigbar, weil sich der Konzentrationsgradient im Fließgleichgewicht praktisch nicht ändert. Durch kräftiges Rühren der Lösungen kann der Einfluss ungerührter Schichten eliminiert werden. Dann ist die Diffusion des Stoffes durch die Membran geschwindigkeitsbestimmend. Bei Experimenten im Fließgleichgewicht („steady-state“) ist der Konzentrationsunterschied zwischen den Lösungen und der Membran konstant und deshalb ist auch der Fluss konstant und zeitunabhängig. Das kann man erreichen, indem man für Rezeptor und Donator große Volumina nimmt und die Versuchsdauer entsprechend kurz wählt. Die Zeit, die man bis zu einem Fließgleichgewicht braucht, unterscheidet sich zwischen Pflanzenarten und Stoffen. Die lipophilen Substanzen erreichen das Fließgleichgewicht schneller als hydrophile Stoffe, weil sie in der lipophilen Membran besser löslich sind.

Mit dem Konzentrationsunterschied der Lösungen $\Delta C = C_{\text{Don.}} - C_{\text{Rez.}}$ von Abbildung 2.1 ergibt sich für die Flussmenge (F) einer Substanz durch die Membran:

$$F = P \times A \times \Delta C \quad (2.1)$$

Die Flussmenge (F) einer Substanz, die pro Fläche (A) und Zeit (t) diffundiert, ist abhängig von den Eigenschaften der Membran und den über sie auftretenden treibenden Kräften. Mit der exponierten, für die Penetration zur Verfügung stehenden Flächen A, kann man somit bei Messung von F und Kenntnis von ΔC den Leitwert P (m s^{-1}) berechnen. Dieser besitzt bei gegebener Temperatur einen Substanz-,

Membran- und Lösungsmittel-abhängigen Wert und enthält die elementaren, den Transport beschreibenden Variablen D , K und Δx :

$$P = D \times \frac{K}{\Delta x} \quad (2.2)$$

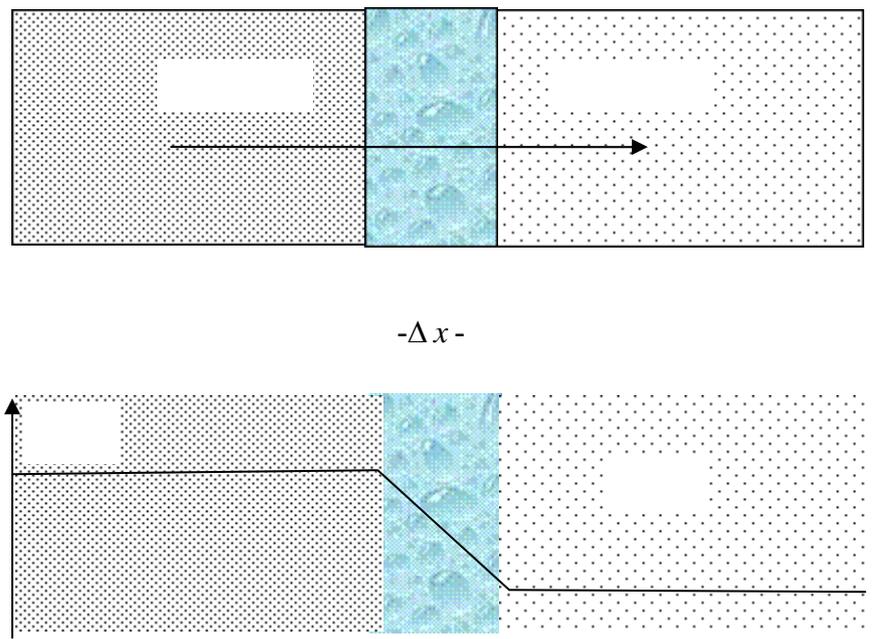


Abb. 2.1 Schematische Darstellung der Versuchsanordnung und des Konzentrationsverlaufs im Fließgleichgewicht in einem Experiment mit einer homogenen Membran (Δx = Dicke, C_{Don} bzw. $C_{\text{Rez.}}$ = Konzentration im Donator bzw. Rezeptor).

Der Diffusionskoeffizient D ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) beschreibt als kinetischer Parameter die Mobilität in der Membran; K ist der dimensionslose Verteilungskoeffizient zwischen Membran und Lösung und ist als thermodynamischer Parameter ein Maß für die Wirkstoffmenge in der Membran beim Gleichgewicht mit der Lösung. Der Verteilungskoeffizient ist neben der Größe des Stoffes auch von der Viskosität und Struktur der Membran abhängig (CUSSLER, 1984). Weil die Membran andere physikochemische Eigenschaften als die an beiden Seiten angrenzende Flüssigkeit

aufweist, muss die Löslichkeit der getesteten Substanz in der Membran berücksichtigt werden. Die Weglänge durch die Membran entspricht bei homogenen Membranen der Dicke Δx (m). Insbesondere bei biologischen Membranen können beide oft nur geschätzt werden. Man kann mit Hilfe des Quotienten aus Konzentrationsunterschied und Weglänge die Größe des Konzentrationsgradienten $\Delta C/\Delta x$ über der Membran bestimmen. Der Fluss ist proportional dem Konzentrationsgradienten ($\Delta C/\Delta x$) und dem Verteilungskoeffizient K .

In Abb. 2.1 ist ein linearer Konzentrationsgradient direkt von C_{Don} durch die Membran nach C_{Rez} eingezeichnet. Das ist das Fall, wenn die Löslichkeiten der diffundierenden Substanzen in Membran und Lösung gleichgroß sind, was allerdings fast nie der vorkommt, weil es oft bestimmte Unterschiede der Struktur und Zusammensetzung zwischen Lösung und Membran gibt. Die Löslichkeiten der getesteten Substanzen in der Membran und in der Lösung sind bei Experimenten mit CM und Nicht-Elektrolyten als Substanz oft unterschiedlich. Für lipophile Wirkstoffe gilt $K > 1$, während polare Wirkstoffe in der CM schlechter löslich sind als in Wasser und $K < 1$. Das Verhältnis der Löslichkeiten in der Membran und in der Lösung wird also mit Hilfe des Verteilungskoeffizienten ausgedrückt. Die Verteilungskoeffizienten der Wirkstoffe variieren um mehr als 6 Größenordnungen. Daher hängen die Permeabilitätskoeffizienten sehr stark vom Verteilungskoeffizient ab.

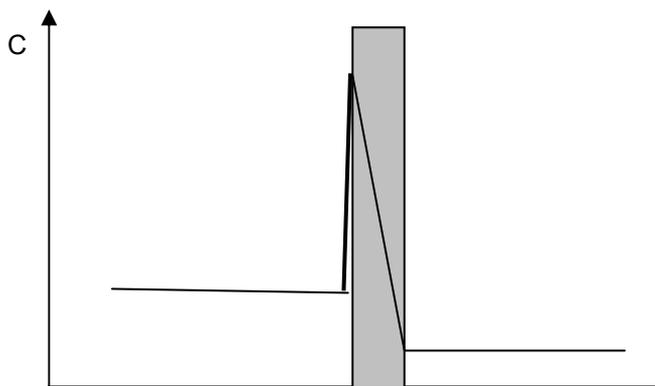


Abb. 2.2 Konzentrationsunterschied über eine Membran mit höherer Löslichkeit als in den umgebenden Lösungen

Abbildung 2.2 zeigt eine sprunghafte Zunahme der Konzentration an der Grenzfläche Donatorlösung/Membran. Das bedeutet aber nicht, dass die Substanz diffusionsgetrieben in ein höher konzentriertes Medium übertritt. Die Gleichgewichtsverteilung zwischen Wasser und Membran hängt nämlich nicht nur von der Konzentration und dem Verteilungskoeffizient ab, sondern vom chemischen Potential μ . Im Gleichgewicht ist das chemische Potential des Wirkstoffes im Wasser und in der Membran gleich (NOBEL, 1991; SCHÖNHERR UND BAUR, 1994):

$$\mu = \mu^* + RT \times \ln C \quad (2.3)$$

Hier ist μ^* ein Referenzpotential, und das ist abhängig von dem Lösungsmittel, in dem die getestete Substanz gelöst wird. Im oben gezeigten System mit der pflanzlichen Kutikula enthalten die Lösungsmittel zwei verschiedene Phasen, nämlich Donator- und Rezeptorlösung und Membran. Jede Phase, hat nach Einstellung des Gleichgewichts jeweils ihr Referenzpotential (μ^*). C ist die Konzentration der Substanz in verschiedenen Phasen (Flüssigkeit und Membran), die Konzentrationen C sind auch nicht gleich in den Flüssigkeiten und in der Membran. Die Konzentrationen der Substanz werden sich entsprechend der Löslichkeit in den beiden Phasen unterscheiden, oder die Substanz wird bei Einstellung des Gleichgewichts in beiden Phasen (Flüssigkeit und Membran) nach dem Verteilungskoeffizienten (K) zwischen der Flüssigkeiten (Donatorlösung oder Rezeptorlösung) verteilt sein. Wenn K bekannt ist, kann man dann aus der gemessenen Konzentration in den Flüssigkeiten die Konzentration in der Membran umrechnen. Wegen ungleicher Konzentrationen in der Flüssigkeit und in der Membran hat die Substanz in den beiden Phasen bei einem Gleichgewicht auch ihr eigenes entsprechendes chemisches Potential (μ_l und μ_m bedeuten jeweils das chemische Potential in der Lösung und der Membran).

Der Faktor 10 in der Abb. 2.2 ist willkürlich gewählt worden. Die Werte für K variieren sehr stark zwischen den Wirkstoffen, während sie nur wenig davon abhängen von welcher Pflanzenart die CM stammen. Ein vom Verteilungskoeffizienten unabhängiges Maß für die Mobilität kann wie folgt definiert werden als P^* :

$$P^* = \frac{P}{K} = \frac{D}{\Delta x} \quad (2.4)$$

Wenn man K und Δx kennt oder abschätzen kann, ist es möglich, dass man mit Hilfe des Leitwertes P den Quotienten $D/\Delta x$ und D berechnen kann. Diese Berechnung ist allerdings nur bei homogenen Membranen sinnvoll.

Außerdem kann der Diffusionskoeffizient selbst nun ebenfalls durch Experimente im Fließgleichgewicht erhalten werden. Nach Zugabe der Versuchssubstanzen in das Donatorkompartiment zum Zeitpunkt $t = 0$ wird der Fluss nämlich erst nach einer zeitlichen Verzögerung (t_e) konstant (Abb. 2.3), das bedeutet, der Fluss wird erst nach Einstellung des Fließgleichgewichts konstant.

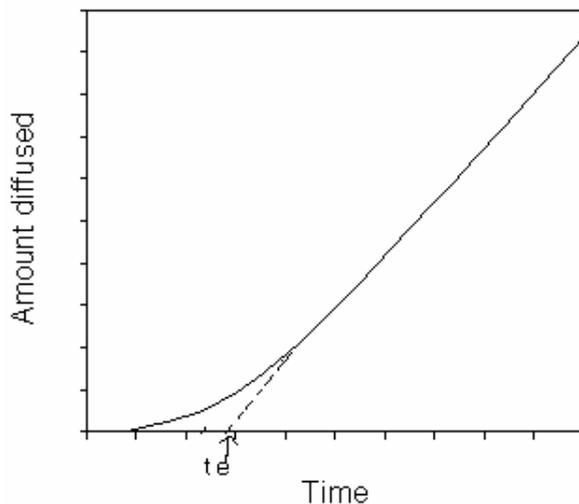


Abb. 2.3 Bestimmung der extrapolierten (gestrichelte Linie) Anlaufzeit t_e (Pfeil) aus der Auftragung der diffundierten Menge (Mol oder g) einer Substanz gegen die Zeit.

Wenn nur die Dicke der benutzten homogenen Membran bekannt ist und keine weiteren Sorptionskompartimente im Transportsystem vorhanden sind, lässt sich der Diffusionskoeffizient D , der unabhängig von der Konzentration ist, leicht aus dieser Anlaufzeit (t_e) mit Annahmen für Δx mit Hilfe folgender Gleichung (2.5) bestimmen (VIETH, 1991):

$$D = \frac{(\Delta x)^2}{6 \times t_e} \quad (2.5)$$

Die Anlaufzeit (t_e) bis zum Fließgleichgewicht der Substanz hängt stark von der Membrandicke ab und sie nimmt direkt mit dem Quadrat der Membrandicke (Δx) zu. Es kann bei dünnen biologischen Membranen zur Anlaufzeit (t_e) im Bereich von nur Mikrosekunden führen, so dass diese Permeationsmethode dafür meist ungeeignet ist (LIEB UND STEIN, 1972). Für CM ist das Verfahren ebenfalls ungeeignet, weil sie nicht homogen sind.

2.2 Bestimmung von D mit der Desorptionsmethode

Die einfachere Desorptionsmethode wird im Vergleich zu der Permeationsmethode genutzt, wenn die Substanzen hohe Verteilungskoeffizienten besitzen. Es wird hier die Menge der Substanz in der Membran als Funktion der Zeit gemessen. Bei der Desorptionsmethode wird die Stoffzunahme im Rezeptor bestimmt. Die Methode hat mehrere Vorteile, z.B. ist sie relativ unempfindlich gegenüber kleinen Löchern im Polymer und die Form der Membran (der Barriere) kann grundsätzlich beliebig sein kann.

Nachdem das Polymer mit der sorbierten Substanz im Gleichgewicht ist, wird sie zum Zeitpunkt t_0 wieder desorbiert. Für kürzere Zeiträume gilt folgende Näherung (VIETH, 1991):

$$\frac{M_t}{M_0} = \frac{4}{\Delta x} \times \sqrt{\frac{D \times t}{\pi}} \quad (2.6)$$

wobei M_t die gesamte zum Zeitpunkt t von Polymer (Membran) desorbierte Menge ist und M_0 den Ausgangswert in der Membran darstellt. Eine Auftragung von M_t/M_0 gegen \sqrt{t} ergibt einen anfangs linearen Graphen, aus dessen Steigung der Diffusionskoeffizient D berechnet werden kann (Abb. 2.4).

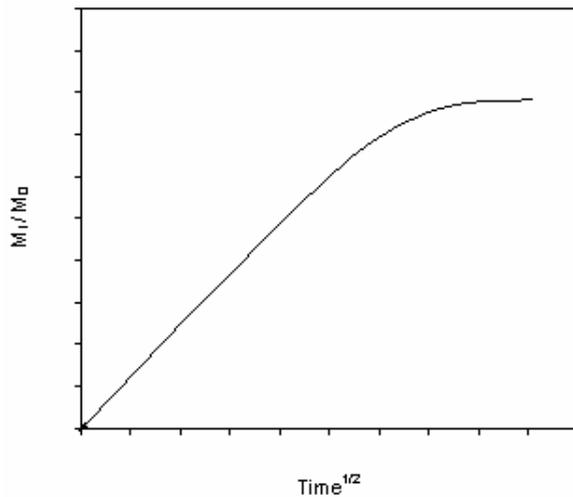


Abb. 2.4 Desorptionsgraphik in der Auftragung der relativen Menge (M_t/M_0) gegen die Quadratwurzel der Zeit

Die Desorptionsmethode wurde für die Bestimmung der Diffusionskoeffizienten im rekonstituierten Wachs verwendet (SCHREIBER UND SCHÖNHERR, 1993; SIMANOVA, 2003; SIMANOVA ET AL., 2004).

2.3 Desorption aus asymmetrischen Kutikularmembranen

2.3.1 Desorption von der Außenseite der CM (UDOS)

Pflanzliche Kutikeln sind strukturell wie funktionell stark asymmetrisch. Die Asymmetrie der Kutikula wird durch unterschiedliche Desorptionsraten nach beiden Seiten bestätigt (SCHÖNHERR UND RIEDERER, 1988). Die Desorption von 2,4-D von der morphologischen Innenseite war 50 bis 80fach schneller als von der Außenseite. Weil sich eine dichte Schicht in der Kutikulaaußenseite (sie besteht aus Wachsen und Kutin) befindet, ist die Permeabilität der Modellverbindungen in der Außenseite niedriger. Die auf der Außenseite der Kutikula lokalisierte Barriere mit geringerer Stoffbeweglichkeit (limitierende Schicht oder 'limiting skin') besteht nicht nur für organische Verbindungen, sondern auch gilt auch für Elektrolyte (TYREE ET

AL., 1990). Denn alle Substanzen müssen zunächst die ganze Barriere auf der Pflanzenoberfläche überwinden, um in die Pflanze über die Kutikula einzudringen. Nachdem die Stoffe in die Pflanzen durch die Kutikula eingedrungen sind, können die Stoffe von den Pflanzen aufgenommen werden und wirksam werden. Wegen der Asymmetrie der CM kann die Stoffmobilität nicht mit Gleichungen 2.5 und 2.6 bestimmt werden. Dafür wurde das Verfahren UDOS (**u**nilateral **d**esorption from the **o**uter **s**urface) entwickelt (BAUER UND SCHÖNHERR, 1992). Die entsprechende Anordnung der Kutikula während eines zeitabhängigen Desorptionsexperimentes ist in Abbildung 2.5 dargestellt.

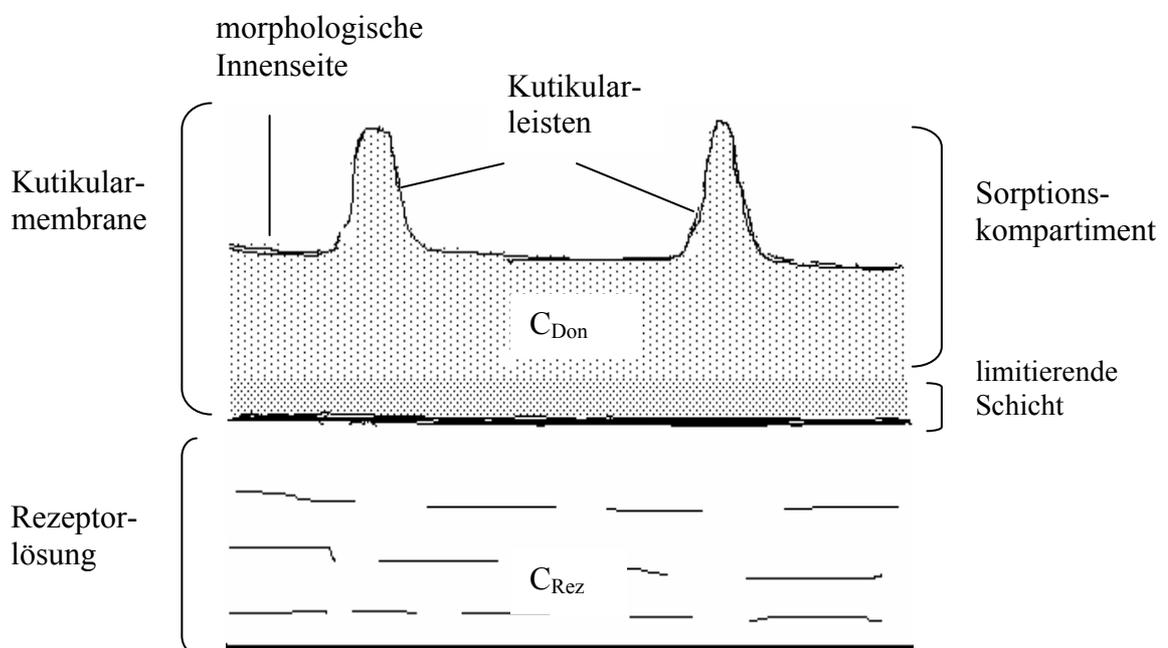


Abb. 2.5 Schematische Darstellung der Anordnung der CM im UDOS-Experiment. Die morphologische Außenseite grenzt an die Rezeptorlösung

2.3.2 Desorption von der Innenseite der CM (SOFU)

Die UDOS Methode eignet sich nur zur Bestimmung der Mobilität relativ lipophiler Substanzen. Das liegt darin, dass vor Beginn der Desorption der Wirkstoff im Sorptionskompartiment (im Wesentlichen im Kutin) der CM vorliegen muss, aus dem

er dann später durch die limitierende Schicht hindurch desorbiert wird. Daher ist es nicht möglich, den Einfluss von Akzeleratoren auf die Mobilität von Substanzen mit einem Verteilungskoeffizienten $K < 1$ (sehr polare Substanzen) mittels UDOS zu bestimmen.

Für diesen Zweck wurde das Verfahren SOFU (**s**imulation **o**f **f**oliar **u**ptake) entwickelt. Dabei wird der Wirkstoff zusammen mit dem Akzelerator auf die Außenseite der CM appliziert und nach Verdunsten des Wassers wird der Wirkstoff von der Innenseite der CM desorbiert. Das Verfahren ist also sehr ähnlich wie UDOS, nur dass die CM umgekehrt eingebaut werden müssen, d.h. die Innenseite der CM ist hier in Kontakt mit dem Rezeptor.

2.4 Kinetik der Desorption bei UDOS

Abbildung 2.5 zeigt, dass sich eine dünne und dichte Schicht in der morphologischen Außenseite befindet, die die äußere begrenzende Barriere darstellt („limitierende Schicht“). Die angrenzende, innere Schicht entspricht dem Donatorvolumen (V_{Don}), in dem die hohen Diffusionskoeffizienten eine ausreichende Durchmischung (C_{Don}) der sorbierten Substanz gewährleisten und damit zu keinem Konzentrationsgradienten innerhalb dieses Volumenelementes führen. Je nach Pflanzenart können so genannte „cuticular pegs“ (diese Kutikularleisten sind Fortsätze der Kutikularschicht, die sich zwischen die antiklinen Zellwände schieben) dieses Volumen vergrößern. Die Rezeptorlösung (V_{Rez}) grenzt an die Außenseite der Kutikula und nimmt die penetrierenden Moleküle auf (C_{Rez}). Es liegt kein Fließgleichgewicht mehr vor, da die Menge der sorbierten Substanz in der Kutikula mit fortschreitender Versuchsdauer abnimmt.

Die Abnahme der Wirkstoffkonzentration im Donatorkompartiment folgt einer Kinetik erster Ordnung wobei k^* die Geschwindigkeitskonstante des Stofftransfers darstellt. Der Konzentrationsunterschied ist nun zeitabhängig und kann wie folgt beschrieben werden (BAUER UND SCHÖNHERR, 1992; BAUR, 1993):

$$\ln \frac{C_{Don} - C_{Rez}}{C_0} = -P \times A \times \left(\frac{1}{V_{Don}} + \frac{1}{V_{Rez}} \right) \times t \quad (2.7)$$

C_0 entspricht der Ausgangskonzentration im Donator zum Zeitpunkt $t = 0$, C_{Don} und C_{Rez} sind jeweils die Konzentrationen im Donator und Rezeptor zum Zeitpunkt (t). V_{Don} und V_{Rez} sind die Volumina für Donator und Rezeptor. Das Donatorvolumen V_{Don} entspricht hier dem Sorptionskompartiment der Kutikula, das aus der Masse der Kutikula und einer Dichte der Kutikula von ca. 10^3 kg m^{-3} berechnet werden kann (BAUER UND SCHÖNHERR, 1992).

Da das Volumen (V_{Rez}) des Rezeptors um ein Vielfaches größer ist als das Sorptionskompartiment (V_{Don}) und das Rezeptorvolumen mehrfach während des Experimentes ausgetauscht wird ($V_{Rez} \gg V_{Don}$), ist der Wert für $1/V_{Rez}$ ziemlich klein und man kann ihn vernachlässigen, so dass sich der Ausdruck in der Klammer auf $1/V_{Don}$ reduziert (Gl. 2.8):

$$\ln \frac{C_{Don} - C_{Rez}}{C_0} = -P \times A \times \left(\frac{1}{V_{Don}} \right) \times t \quad (2.8)$$

Da bei der Konzentration in der Kutikula C_{Don} den Verteilungskoeffizienten K schon berücksichtigt wurde (der Wirkstoff ist in Kutin gelöst und nicht in Wasser), wird P durch das vom Verteilungskoeffizienten unabhängige Maß der Mobilität P^* ($P^* = P/K$) ersetzt.

Zudem wird in dem Desorptionsexperiment ein löslicher Zitronensäurepuffer als Rezeptorlösung verwendet. (manchmal enthält die Rezeptorlösung auch die ausgewählten Akzeleratoren oder Tenside in bestimmten Konzentrationen). Die Konzentration von radioaktiver Substanz (der ausgewählten Testverbindung) im Rezeptor wird damit praktisch auf Null ($C_{Rez} = 0$) gehalten. Dadurch vereinfacht sich Gleichung 2.8 zu:

$$\ln \frac{C_{Don}}{C_0} = -P^* \times A \times \left(\frac{1}{V_{Don}} \right) \times t \quad (2.9)$$

Bei gleich bleibendem Volumen ($V_{Don.}$) entspricht das Verhältnis der relativen Konzentrationen zueinander dem der relativen Mengen und der Ausdruck kann wie folgt geschrieben werden:

$$\ln \frac{C_{Don}}{C_0} = \ln \left(1 - \frac{M_t}{M_0} \right) \quad (2.10)$$

Wird Gl. 2.9 in Gl. 2.10 eingesetzt dann ergibt sich:

$$-\ln \left(1 - \frac{M_t}{M_0} \right) = P^* \times A \times \frac{1}{V_{Don}} \times t \quad (2.11)$$

Durch Auftragen des natürlichen Logarithmus der relativen Menge im Donator gegen die Zeit erhält man lineare Graphen mit der Steigung k^* wobei:

$$k^* = P^* \times A \times \frac{1}{V_{Don}} \quad (2.12)$$

Das Volumen des Donators (V_{Don}) wird aus der Fläche (A) und der durchschnittlichen Dicke des Sorptionskompartimentes (Δx_{soco}) gebildet, und $V_{Don} = A \times \Delta x_{soco}$.

Da k^* (h^{-1}) aus der Steigung der Auftragung $[-\ln(1-M_t/M_0)]$ gegen die Zeit (t) erhältlich ist, lässt sich mit Kenntnis von Δx_{soco} schließlich P^* berechnen. Allerdings sind für Δx_{soco} nur Näherungswerte möglich. So wurde von SCHREIBER und SCHÖNHERR (1990) das spezifische Gewicht für Kutikeln von *Citrus* und *Capsicum* auf 1,04 und 1,10 $g\ cm^{-3}$ geschätzt. Die Daten von SCHÖNHERR und RIEDERER (1988) ergeben für die „limiting skin“ eine Massenfraktion von ca. 10 %. Weil P^* und k^* einander

proportional sind, bietet es sich an, für den Vergleich der Mobilitäten verschiedener Substanzen in der gleichen CM die Werte von k^* heranzuziehen.

Schließlich lässt sich mit Annahmen für die Dicke des Sorptionskompartimentes (Δx_{soco}) und der limitierenden Schicht ('limiting skin'; Δx_{ls}) auch der Diffusionskoeffizient (D) abschätzen:

$$D = k^* \times \Delta x_{soco} \times \Delta x_{ls} \quad (2.13)$$

Es ist darauf zu achten, dass die Weglänge der Diffusion in der Kutikula nicht mit der Dicke des Sorptionskompartimentes übereinstimmt. Weil der Diffusionsweg größer als die Dicke der Kutikula ist (BAUR ET AL., 1996; BUCHHOLZ UND SCHÖNHERR, 2000), können die Moleküle der Substanzen während der Diffusion in der Kutikula keinen direkten (linearen/geraden) Weg nehmen. Bei der Berechnung der Diffusionskoeffizienten müsste man den Umwegfaktor berücksichtigen, der aber nicht mit unabhängigen Methoden bestimmt werden kann.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Pflanzenmaterial

Für die Transportmessungen wurden enzymatisch isolierte Kutikularmembran (CM) von voll ausgewachsenen Blättern der tropischen Schlingpflanze *Stephanotis floribunda* (Brongn.) und von Birne (*Pyrus communis* L.) verwendet. *Stephanotis* war im Gewächshaus kultiviert worden und Birnenblätter stammten von Bäumen aus dem Freiland. Die adaxialen Blattseiten beider Spezies sind frei von Spaltöffnungen und Trichomen und die Kutikeln lassen sich leicht als ganzes Stück enzymatisch isolieren. Die Kutikularmembranen (CM) der Blätter von beiden Pflanzen sind deshalb als Versuchsmaterial gut geeignet.

Die Akzeleratoren sind bei den Kutikeln aller Arten wirksam (SCHÖNHERR UND BAUR, 1996), aber ihre Wirkung ist umso besser, je niedriger die Stoffmobilität in den Kutikeln bei Abwesenheit von Akzeleratoren ist (SCHÖNHERR, 1993a; SCHÖNHERR, 1993b; BURGHARDT ET AL., 1998). Die Pflanze *Stephanotis floribunda* (Abb. 3.1) stammt aus Madagaskar, ihre CM sind sehr gute Barrieren (SCHÖNHERR ET AL., 1999) und stellen daher ein sehr empfindliches Testsystem für die Versuche dar.



Abb. 3.1 *Stephanotis floribunda* Pflanze

Zur Isolierung der Kutikeln wurden kreisrunde Blattscheiben (ohne Mittelrippe) mit einem Durchmesser von 2,2 cm mittels eines speziellen Apparates ausgestanzt. Zur späteren Unterscheidung von Ober- und Unterseite wurde die Blattunterseite vorher mit einem blauen Filzstift markiert. Anschließend wurden die Blattscheiben in eine 10 %ige Pektinase-Lösung (Fructozym, Erbslöh Geisenheim Getränketechnologie GmbH, Geisenheim, Deutschland) gegeben, die mit Citronensäurepuffer (Citronensäure, Reinheit > 99 %, Merck, Darmstadt, Deutschland) (2 g Liter^{-1}) und KOH auf pH 4 eingestellt war. Nach mehrmaliger Vakuumfiltration der Blattscheiben mit der Enzymlösung standen diese ca. eine Woche bei Raumtemperatur. Die Lösung enthielt dabei Natriumazid ($1 \text{ mMol Liter}^{-1}$) (NaN_3 , >99 %, Merck, Darmstadt, Deutschland), um das Wachstum von Mikroorganismen während der Inkubation der Blattscheiben zu unterdrücken. Sobald sich die Kutikeln durch Auflösung des Blattgewebes in der Lösung voneinander trennten, wurden die Blattoberseiten in eine 0,01M Boraxpufferlösung sortiert in der sie ca. 2 Tage blieben. Die Lösung enthielt dabei ebenfalls NaN_3 ($1 \text{ mMol Liter}^{-1}$).

Nach Waschen in deionisiertem Wasser wurden die Kutikulamembranen auf Teflonplättchen nach vorherigem Spülen mit H_2O aufgezogen und bei

Raumtemperatur in der Luft getrocknet. Während die Kutikularmembranen von der Lösung auf Teflonplättchen aufgezogen wurden, wurde ein schwacher Druckluftstrom manchmal zum Entrollen einiger Membranen zu Hilfe genommen. Nach dem Trocknen auf Teflonplättchen wurden die Kutikulamembranen vor dem Verwenden für Experimente zunächst ca. drei Wochen bei Raumtemperatur und anschließend bei 8 °C gelagert. Dies war notwendig, da die Permeabilität für Wasser während der anfänglichen Lagerung leicht abnimmt (GEYER UND SCHÖNHERR, 1990). Nach ca. zwei Wochen Lagerung sind die Permeabilitäten einheitlicher und weisen keine weitere Zeitabhängigkeit auf, das bedeutet, dass die Transporteigenschaft dann unabhängig von der Lagerungszeit ist.

Die folgende Tabelle (Tab. 3.1) zeigt einige Daten der CM beider Spezies.

Tab. 3.1 Flächengewichte, durchschnittliche Wachsmenge pro Fläche und prozentualer Anteil der Wachse der Kutikeln von *Stephanotis* und *Pyrus*

Art	Flächengewichte (CM) (mg·cm ⁻²) ± VB ^a	Wachsmenge (µg cm ⁻²)	Wachsanteil (%)
<i>Stephanotis floribunda</i>	0,30 ± 0,01	20,7	6,9
<i>Pyrus communis</i>	0,26 ± 0,02	65,0	25,0

^a 95 % Vertrauensbereich. Daten aus BAUR (1993)

Die kutikuläre Wachszusammensetzung zwischen den Pflanzenarten ist ebenfalls unterschiedlich. Bei *Pyrus* besteht das Wachs größtenteils aus n-Alkanen (~70 %) und einigen Prozent 1-Alkanolen (RIEDERER UND SCHÖNHERR, 1990). Bei *Stephanotis* ist keine Substanzklasse ähnlich vorherrschend. Die vier Hauptgruppen sind Ester (10 %), Alkanale (10 %), 1-Alkanole (24 %) und Triterpenole (17 %) (BAUR, 1993).

Die Innen- und Außenseiten der CM von *Stephanotis* zeigen die beiden folgenden REM Aufnahmen (BUCHHOLZ, 1998) (Abb. 3.2 und 3.3).

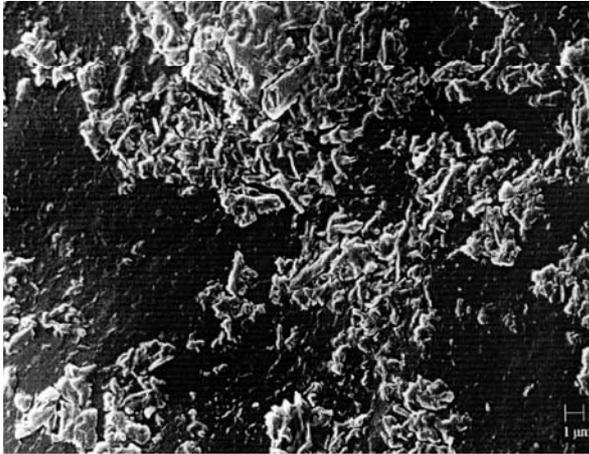


Abb. 3.2 Außenseite einer *Stephanotis floribunda* CM. Es ist Wachs in Form von unregelmäßigen Wachsplättchen aufgelagert.

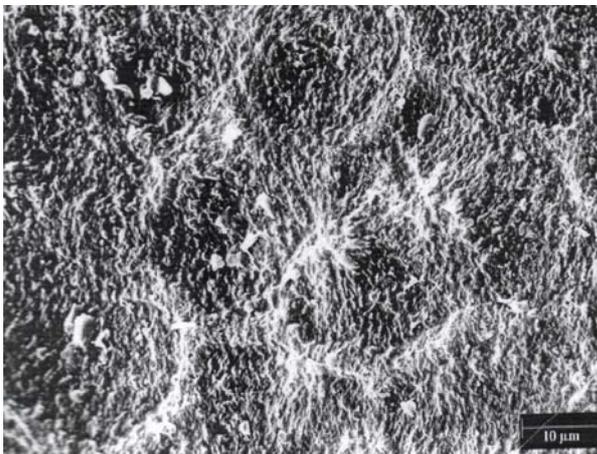


Abb. 3.3 Innenseite einer *Stephanotis floribunda* CM. Die Umrisse der Epidermiszellen sind nur vage zu erkennen, weil die Kutikularleisten nur schwach ausgebildet sind.

3.1.2 Chemikalien

3.1.2.1 Radioaktive Modellverbindungen

Die Transportexperimente wurden mit folgenden ^{14}C - und ^{45}Ca -markierten Modellverbindungen (Substanzen) durchgeführt. Bei den ausgewählten Substanzen handelte es sich meist um Wirkstoffe in Pflanzschutzmitteln wie z. B. Herbizide und Fungizide. Methylglukose ist eine Modellverbindung mit sehr hoher Wasserlöslichkeit. Tab. 3.2 zeigt die radioaktiven Modellverbindungen mit ihren Trivialnamen, der chemischen Bezeichnung, der spezifischen Aktivität und den Verteilungskoeffizienten ($\log K$). Die Auswahl umfasst eine anorganische ionische Substanz (CaCl_2), eine nichtionische polare Substanz (Methylglukose), eine schwache Säure (2,4-DB), die lipophil ist, wenn sie nicht ionisiert ist und zwei andere nichtionische Stoffe mit unterschiedlichen Molgewicht und $\log K_{ow}$. Die radioaktiven Stammlösungen wurden bei 5 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Tab. 3.2 Eigenschaften der Modellverbindungen

Chemische Bezeichnung	Trivialname	Formel	Molgewicht (g Mol ⁻¹)	Spez. Aktivität (MBq mg ⁻¹)	log K _{ow}
2,4-Dichlorphenoxybuttersäure ^a	2,4-DB	C ₁₀ H ₁₀ Cl ₂ O ₃	249,1	1,6	3,05 ^e
{2-Methyl-1[1-(4-methylphenyl)-ethylcarbonyl]-propyl}-carbamic acid isoproyl ester ^b	Iprovalicarb	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₃	320,4	1,0	3,18
4-Amino-6-tert-butyl-3-methylthio-1,2,4-triazin-5(4H)-one ^b	Metribuzin	C ₈ H ₁₄ N ₂ OS	214,3	0,029	1,6
3-O-(¹⁴ C-methyl)-D-glucose ^c	Methylglucose	C ₇ H ₁₄ O ₆	194,2	10,5	-0,89 ^f
⁴⁵ CaCl ₂ ^d	Calciumchlorid	CaCl ₂	111,0	396	

Bezugsquellen: ^a International Isotopes München; ^b Bayer AG, Leverkusen; ^c Sigma Chemie, Deisenhofen; ^d Merck, Darmstadt;

^e log_{CM/Wasser}, Daten aus BUCHHOLZ, A. (1998); ^f Daten aus BAUR (1993)

3.1.2.2 Akzeleratoren

Akzeleratoren sind Weichmacher, die definiert sind als flüssige oder feste Substanzen meist esterartiger Natur, die ohne chemische Reaktion meist durch ihr Löse- oder Quellvermögen mit hochpolymeren Stoffen in physikalische Wechselwirkung treten und ein homogenes physikalisches System mit diesen bilden können (SOMMER ET AL., 1982). Durch die Weichmacherwirkung werden bestimmte Eigenschaften der Polymere wie Formvermögen, Glasübergangstemperatur, Elastizität und Härte verändert. Die Akzeleratoren können die Penetrationsgeschwindigkeit der Stoffe in der CM beschleunigen und werden auch in Pflanzenschutzmitteln verwendet.

Um die Effekte der verschiedenen Akzeleratoren auf den Stofftransport zu untersuchen, wurden die Akzeleratoren DESU, DES, DBSU, DBS, TBP und homologe Fettalkoholethoxylate ($C_{12}E_n$) ausgewählt. Ihre chemische Bezeichnungen, Formeln, Molekulargewichte, Strukturen, Reinheit, Dichte, Bezugsquellen und Verteilungskoeffizienten zwischen Kutikula und Rezeptor bzw. zwischen kutikulärem Wachs und Rezeptor ($K_{CM/Rez}$ bzw. $K_{W/Rez}$) sind in der Tabelle 3.3 zusammengestellt.

Die Akzeleratoren gehören zwei verschiedenen Klassen an. Die Ester der Dicarbonsäuren (Sebacat und Suberat) haben verschiedene Molekulargewichte, die von 230,1 (DESU) bis zu 314,47 (DBSU) $g\ Mol^{-1}$ variieren. Die Molgewichte der monodispersen ethoxylierten Alkohole (MED) gehen von 274,5 ($C_{12}E_2$) bis 538,8 ($C_{12}E_8$) $g\ Mol^{-1}$. Sie sind monodispers und unterscheiden sich nur in der Anzahl der polaren Ethylenoxydgruppen (EO-Gruppen, CH_3-CH_2-O-), die bei 2 bis 8 liegen. Von diesen Akzeleratoren sind nur die MED oberflächenaktiv und beeinflussen die Benetzung der CM. Um bei den Experimenten unterschiedliche Benetzung als Variable zu eliminieren, wurden zu den Donatorlösungen die Netzmittel Glucopon 215 CSUP oder Plantacare 1200 UP zugegeben (s.u.).

Tab. 3.3 Chemische Beziehung, Struktur, Molekulargewicht und Verteilungskoeffizient der verwendeten Akzeleratoren

Chemische Bezeichnung	Formel	Molgewicht (g Mol ⁻¹)	K _{CM/Rez} ± VB	K _{W/Rez} ± VB ^e	Reinheit (%)
Diethylsuberat (DESU) ^a	C ₁₂ H ₂₂ O ₄	230,1	92±4 ^c	56±5	>98
Diethylsebacat (DES) ^a	C ₁₄ H ₂₆ O ₄	258,36	1 213±53 ^d	447±166	>95
Dibutylsuberat (DBSU) ^a	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	286,41	15 996±696 ^d	5 319±1266	>99
Dibutylsebacat (DBS) ^a	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	314,47	210 762±9169 ^d	28 590±1297	>97
Tributylphosphat (TBP) ^b	C ₁₂ H ₂₄ O ₄ P	266,3	343±28 ^c	244±35	>98
Diethyleneglycol monododecyl ether (C ₁₂ E ₂) ^b	C ₁₆ H ₃₄ O ₃	274,5		21 125±2897	>98
Tetraethyleneglycol monododecyl ether (C ₁₂ E ₄) ^b	C ₂₀ H ₄₂ O ₅	362,6		7 909±596	>98
Hexaethyleneglycol monododecyl ether (C ₁₂ E ₆) ^b	C ₂₄ H ₅₀ O ₇	450,7		2 626±350	>98
Octaethyleneglycol monododecyl ether (C ₁₂ E ₈) ^b	C ₂₉ H ₅₈ O ₉	538,8		962±209	>98

^a Merck-Schuchardt; ^b Fluka Chemie AG u. Sigma-Aldrich; ^c Daten aus SCHÖNHERR ET AL. (2001); ^d berechnete Werte;

^e Daten aus SIMANOVA ET AL. (2004)

3.1.2.3 Sonstige Chemikalien

Außerdem wurden die Alkyl Polyglycoside (APG) Plantacare 1200 UP und Glucopon 215 CSUP (Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, Deutschland) als Netzmittel bei der Herstellung der Donatorlösung für SOFU-Experimenten benutzt. Während der UDOS Experimente mit den Dicarbonsäureestern als Weichmacher wurde Propylenglykol (1,2-Propandiol im folgender PG genannt) (>98%, Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, Deutschland) den Rezeptorlösungen zugegeben (10 %) um die Löslichkeit der Akzeleratoren zu verbessern.

Citronensäuerpuffer (>99 %, Merck, Darmstadt, Deutschland), L(+)Milchsäurpuffer (80 %, Roth, Karlsruhe, Deutschland), Kaliumhydroxid (KOH), Ethanol, Natriumazid (NaN_3 , >99 %, Merck, Darmstadt, Deutschland) und der Szintillationscocktail (Aquasafe 500, Zinsser Analytic, Frankfurt, Deutschland) wurden ebenfalls während der Untersuchungen benutzt.

Die Verwendung und die Konzentration in den Lösungen der oben erwähnten Chemikalien werden im folgenden Abschnitt (Donatorlösung und Rezeptorlösung) beschrieben.

3.1.2.4 Donatorlösungen

Die Donatorlösungen bestanden aus den radioaktive Substanzen, L(+)Milchsäurpuffer (2 g Liter^{-1} pH 3,8) (Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 2,4-DB, deionisiertes Wasser mit $1 \text{ mMol Liter}^{-1}$ NaN_3 und Ethanol (ca. 40 - 50 % bei UDOS für 2,4-DB und bei SOFU für Metribuzin und Iprovalicarb). Plantacare ($0,2 \text{ g Liter}^{-1}$) wurde zu Metribuzin, Iprovalicarb und Methylglucose bei UDOS-Experimenten hinzugegeben. Ethanol wurde für lipophile Modellverbindungen eingesetzt, um damit die Löslichkeiten der Substanzen im wässrigen Donator zu verbessern. Die Zugabe von $1 \text{ mMol Liter}^{-1}$ NaN_3 verhinderte das Wachstum von Mikroorganismen. Die Radioaktivität der Donatorlösung wurde so gewählt, dass in einem $5 \mu\text{l}$ Tropfen 25 000 bis 40 000 dpm waren. Die Konzentration von Plantacare 1200 UP in der Donatorlösung betrug $0,2 \text{ g Liter}^{-1}$.

3.1.2.5 Rezeptorlösungen

Die Rezeptorlösung wurde durch Mischen von 900 g Citronensäurepuffer (2 g Liter⁻¹, pH 6,0) mit 100 g Propylenglykol (PG, Fluka Deutschland) hergestellt. Sie enthielt außerdem NaN₃ (1 mMol Liter⁻¹). Diese Mischung wurde immer verwendet, wenn der Rezeptor DESU, DES, DBSU, DBS und TBP enthielt. Aber bei den Experimenten mit den MED wurde auf PG verzichtet.

Die Konzentrationen der Akzeleratoren im Rezeptor wurde so ausgewählt, dass bestimmte Akzeleratorkonzentrationen in der Kutikula realisiert werden konnten. Unter Berücksichtigung der Verteilungskoeffizienten dieser Substanzen ergaben sich Akzeleratorkonzentrationen von 100 bis 500 mg Liter⁻¹ für DESU und 0,1 bis 0,4 mg Liter⁻¹ für DBS. Die Konzentrationen der MED im Rezeptor betrug das 5-fache der CMC (critical micell concentration) (RIEDERER ET AL., 1995) und sie variierten von 38,5 mg Liter⁻¹ (C₁₂E₂) bis 264 mg Liter⁻¹ (C₁₂E₈). Die genauen Konzentrationen der verschiedenen Akzeleratoren im Rezeptor finden sich in Tab. 4.1 und 4.2 (Kapitel 4).

3.2 Methoden

3.2.1 UDOS

Diese Methode (**U**nilateral **D**esorption of the **O**uter **S**urface), die von SCHÖNHERR und BAUER (1992) entwickelt worden ist, wurde mit einigen Veränderungen angewandt. Zudem waren die Kammern anderer Bauart. Ein schematischer Querschnitt durch die Versuchsanordnung ist in Abbildung 3.4 gezeigt. Die benutzte Kammer besteht aus zwei Teilen, der eigentlichen Desorptionskammer und einem Ring, die aus speziellem Edelstahl (Novorox FALC 233 Krupp Südwestfalen AG, Siegen) gefertigt sind. Die ringförmige Auflagefläche der Kammer für die Kutikula wurde dünn mit einem Hochvakuumsilikonfett (Baysilone, Bayer, Leverkusen) eingestrichen (ca. 5 mg). Dabei wurde streng darauf geachtet, dass kein Fett über den Innenrand in den Hohlzylinder der Kammer gelangt. Die morphologische Innenseite der Kutikularmembranen wurde durch die Färbung mit kationischem

Methylenblau (Färbung der COOH-Gruppen) identifiziert. Die Kutikula wurde so auf die Kammer aufgelegt, dass die morphologische Außenseite dem Kammerinneren zugewandt war. Durch einen leichten Zug mit dem Pinsel wurde die Membran vom Außenrand der Kammer her glattgestrichen. Es waren 1,13 cm² der Kutikula frei exponiert. Anschließend wurde ein Tropfen der Donatorlösung direkt auf die frei nach oben zeigende morphologische Innenseite der Kutikularmembran gegeben (vgl. Abb. 2.5 und 3.4). Die Kammern blieben so über Nacht bei Raumtemperatur stehen. In dieser Zeit wurde die radioaktive Modellverbindung in der Kutikula sorbiert, während die wässrige Applikationslösung langsam verdunstete (3-6 h). Der Halt der Kutikula auf der Kammer wurde durch das Aufsetzen eines ebenfalls gefetteten Ringes verstärkt. Vor Beginn des Desorptionsexperimentes wurde der Ring mit Tesafilm (Beiersdorf, Hamburg) versiegelt. Dies verhindert eine radioaktive Kontamination bei einem Loch in der Kutikula und gewährleistet 100 % Luftfeuchtigkeit. Die Kammern wurden umgedreht und das Experiment wurde durch die Zugabe des Desorptionsmediums (~0,6 ml) durch die Probenöffnung der Kammer gestartet. Während des Experimentes standen die Kammern in zylindrischen Aussparungen eines thermostatisierten Aluminiumblocks (Abb. 3.4). Dieser bot 100 (10x10) Kammern Platz. Der Aluminiumblock wurde von einer isolierten Haube bedeckt und befand sich auf einem Schüttelgerät (Bühler SM 25, Tübingen), das horizontal rotierte (Frequenz: ~75 U/min). In bestimmten Zeitintervallen, die der Versuchsanordnung angepasst waren, wurde das Desorptionsmedium aus der Kammer quantitativ mit einer Spritze entfernt und durch ein frisches ersetzt. Der exponierte Teil der Kutikula wurde bei Versuchsende mit einem Skalpell ausgeschnitten und die Restaktivität bestimmt.

3.2.2 SOFU

Ein sehr ähnliches Verfahren (SOFU) wird zur Messung der Penetrationsgeschwindigkeit von Nichtelektrolyten, aber auch von Salzen (CaCl₂) verwendet. Die SOFU-Experimente (engl.: **S**imulation **o**f **F**oliar **U**ptake) wurden mit denselben Edelstahlkammern durchgeführt wie die UDOS-Versuche, allerdings zeigt die morphologische Außenseite hier nach außen. Nach Aufbringen der Donatorlösung ist

in diesen Fällen die Modellverbindung nicht unbedingt in der Kutikula gelöst, sondern befindet sich vor allem bei polaren Stoffen vor allem im hydratisierten Formulierungsrückstand. Dieser Rückstand enthält alle nichtflüchtigen Additive und etwas sorbiertes Wasser. Der Donator diffundiert durch die CM und wird wie bei UDOS in der Rezeptorphase aufgefangen. Auch hier lässt sich der diffundierte Anteil durch Probenahmen quantitativ bestimmen. Da die Bedingungen ähnlich denen nach Aufbringen eines Pflanzenschutzmittels oder der Aufnahme eines in Nebeltropfen gelösten Stoffes sind, wird die Methode einfach Simulationstest oder SOFU genannt (BAUR, 1993). Auch dieses Verfahren eignet sich zur Messung der Permeation außerhalb des Fließgleichgewichts und die Steigungen der Penetrationsgraphen sind Geschwindigkeitskonstanten. Im Gegensatz zu UDOS sind die Wirkstoffe hier aber nicht im Kutin gelöst, sondern im Formulierungsrückstand. Daher dürfen die so gewonnen Geschwindigkeitskonstanten (k) nicht mit denen von UDOS (k^*) verwechselt werden. Die k -Werte der SOFU Experimente sind lediglich ein quantitatives Maß für die Permeabilität der CM, sie sind aber nicht proportional zu D und daher kein Maß für die Mobilität einer Substanz in der CM. Das ist nur bei k^* der Fall.

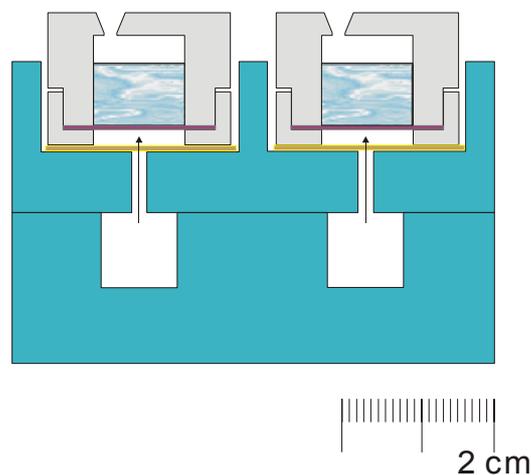


Abb.3.4 Schematische Darstellung eines Querschnitts durch die Versuchsanordnung

3.2.3 Messung der Radioaktivität

Die Proben der ausgetauschten Rezeptormedien mit den radioaktiven Modellsubstanzen wurden unmittelbar in ein entsprechendes Probengefäß aus Polyethylen gegeben und mit 3 ml eines Szintillationscocktails (Aquasafe, Lumac LSC, Groningen, Niederlande) vermischt. Dieser Cocktail diente ebenfalls als Extraktionsmedium für die bei Versuchsende noch in der Kutikularmembran verbliebene Menge an Radioaktivität. Für die Messung der Radioaktivität standen zwei Szintillationszähler (TriCarb 2000, Packard, Downers Grove, USA und Wallac 1409, Turku, Finnland) zur Verfügung. Die Zählung war i.d.R. auf drei Minuten oder einen Zählfehler (2σ) von 2 % programmiert. Der Zählfehler erreichte bis zu 12 %, bewegte sich jedoch bei den meisten Messungen im Bereich von 1 bis 5 %. Die Zählungen erfolgten bei konstanter Löschung, weil die Zusammensetzung von Donator- und Rezeptorproben gleich waren.

3.2.4 Datenauswertung

Nach Addition der Radioaktivität (cpm = counts per minute) aller aus einer Kammer gezogenen Proben und der in der Kutikula verbliebenen Restradioaktivität ergibt sich die gesamte desorbierte bzw. wiedergefundene Radioaktivität M_0 . M_t gibt die bis zum Zeitpunkt t desorbierte Menge an Radioaktivität an. Der relative in (oder auf) der Kutikula verbliebene Anteil zum Zeitpunkt t resultiert aus $(1 - M_t/M_0)$. Wird nun $[-\ln(1 - M_t/M_0)]$ gegen die Zeit t aufgetragen, ergibt sich eine Gerade, deren Steigung der Geschwindigkeitskonstanten k^* (UDOS) oder k (SOFU) entspricht. Sie wird durch die Berechnung der Regressionsgeraden für jede einzelne Kutikula bestimmt. Die Zählerdaten wurden in ein dafür geschriebenes Programm von K. Cronfeld übernommen und ausgewertet. Es wurden geometrische Mittel mit asymmetrischen 95 % Vertrauensbereichen berechnet. Graphiken wurden mit SigmaPlot 8.0 erstellt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Einfluss verschiedener Additive auf die Geschwindigkeitskonstanten der Modellverbindungen

Im Donator und Rezeptor sind Tenside und andere Additive verwendet worden, damit die Benetzung der CM gesichert bzw. die Löslichkeit der Akzeleratoren verbessert werden konnte. Es wurde daher zunächst überprüft, ob die Substanzen einen Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstanten bei UDOS haben.

Abbildung 4.1 ist eine Darstellung der Ergebnisse für UDOS Experimente von Experimenten mit Propylenglykol, Glucopon 215 CSUP und Plantacare 1200 UP, die z. T. im Rezeptor enthalten waren. Die Steigungen der Regressionsgeraden, die in den Graphen angegeben sind, waren nicht signifikant verschieden von der Kontrolle (A). Die Additive hatten also keine Akzeleratoreigenschaften.

Die Ergebnisse von SOFU Experimenten mit der Kombination von PG und Methylglucose zeigen ebenfalls, dass PG keinen Effekt auf die Geschwindigkeitskonstante von Methylglucose hatte (Abb. 4.2).

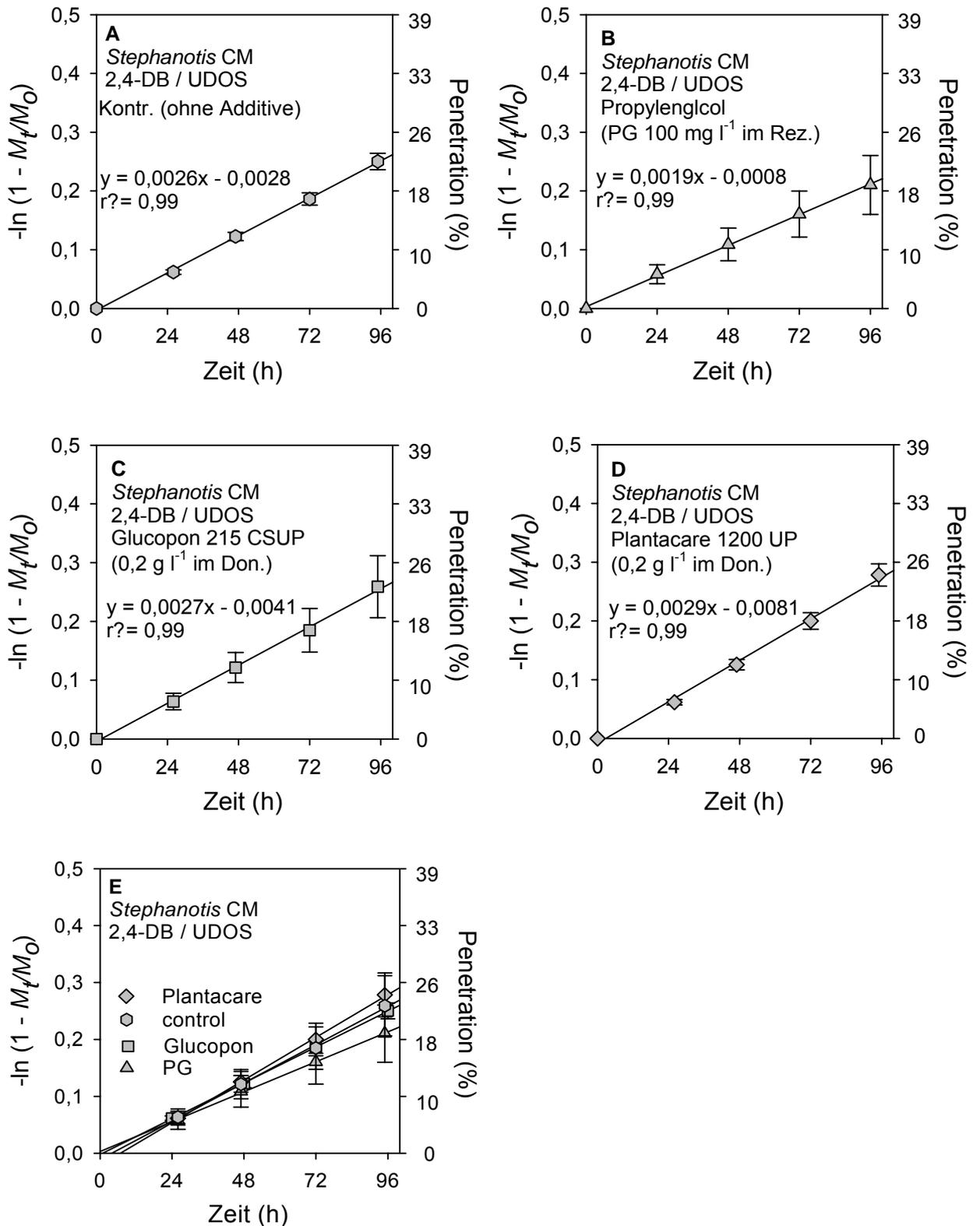


Abb. 4.1 Zeitlicher Verlauf der Desorption von 2,4-DB aus *Stephanotis* CM mit verschiedenen Additiven, deren Konzentrationen im Rezeptor in den Graphen angegeben sind. In Abb. E sind die Steigungen zur besseren Vergleichbarkeit zusammengefasst.

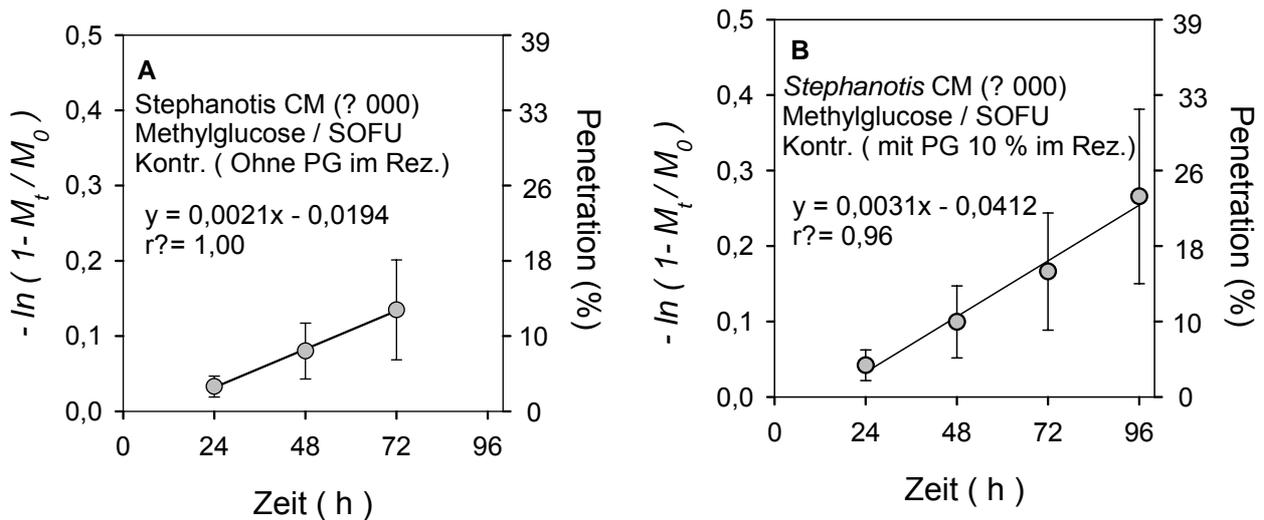


Abb. 4.2 Zeitlicher Verlauf der Penetration von Methylglucose durch *Stephanotis* CM ohne und mit Propylenglycol (PG) bei 100 % relativer Luftfeuchte. A: Kontrolle, Mittelwert aus 78 CM; B: mit 10 %-igem PG, Mittelwert aus 96 CM.

4.2 Einfluss der Konzentration ausgewählter Akzeleratoren auf die Mobilität von 2,4-DB in *Stephanotis* CM

Der Einfluss verschiedener Konzentrationen von DESU, DES, TBP, DBSU und DBS auf die Mobilität von 2,4-DB wurde bei 20 °C untersucht. Die Akzeleratoren, Verteilungskoeffizienten, verwendete Konzentrationen sowie die Ergebnisse der Experimente wurden in Tabelle 4.1 und folgende Abbildungen dargestellt.

Die Akzeleratoren wurden in unterschiedlichen Konzentrationen dem Rezeptor zugegeben. Bei den sehr lipophilen DBSU und DBS musste der erste Rezeptor in einer viel höheren Konzentration zugegeben werden, als es den Gleichgewichtsrezeptoren in Tabelle 4.1 entspricht. Das war erforderlich, weil die sorbierte Menge Akzelerator in der CM sehr groß war relativ zum Rezeptorvolumen (0,6 ml). Nach der Aufladung der CM mit den Akzeleratoren mit dem ersten Rezeptor, wurden im Folgenden die Gleichgewichtskonzentrationen im Rezeptor verwendet (Tabelle 4.1).

Die im ersten Rezeptor verwendeten Konzentrationen wurden aus der Masse der CM und den Verteilungskoeffizienten zwischen Rezeptor und CM bzw. Wachs (K_{CMRez}

oder $K_{CM/Rez}$ und $K_{WachsRez}$ oder $K_{Wachs/Rez}$) errechnet. Die dabei angestrebten Akzeleratorkonzentrationen in der CM betragen ca. 10 bis 100 $g\ kg^{-1}$.

Tab. 4.1 Akzeleratorkonzentrationen im Rezeptor, CM und Wachs sowie die daraus resultierenden Geschwindigkeitskonstanten (k^*) und Effekte der Akzeleratoren auf die Mobilität von 2,4-DB in *Stephanotis* CM (Mittelwerte mit 95 %-VB.).

Akzelerator	Verteilungskoeffizienten (K)		Konzentration in				k^* (h^{-1})	Effekt
	$K_{CM/Rez.}$	$K_{Wachs/Rez.}^a$	1. Rezeptor ($mg\ kg^{-1}$)	2.Rezeptor ($mg\ kg^{-1}$)	CM ^b ($g\ kg^{-1}$)	Wachs ^b ($g\ kg^{-1}$)	$k^* \times 10^3$	
Kontr.				0	0	0	8,3±1,2	1,0±0,1
DESU	92±4 ^c	56±5	100	100	9,2±0,4	5,6±0,6	66,1±23,5	8,0±2,8
			200	200	18,4±0,8	11,2±1,2	121,4±36,5	14,6±4,4
			300	300	27,6±1,2	16,8±1,8	207,0±46,0	24,9±5,5
			400	400	36,8±1,6	22,4±2,4	252,6±26,3	30,3±3,2
			500	500	46,0±2,0	28,0±3,0	325,7±19,5	39,2±2,4
DES	1213±53 ^d	447±166	10	10	12,1±0,5	4,5±1,7	56,7±13,7	6,8±1,7
			20	20	24,3±1,0	8,9±3,4	95,3±20,6	11,5±2,5
			30	30	36,4±1,6	13,4±5,0	149,9±25,7	18,1±3,1
			40	40	48,5±2,1	17,9±6,6	228,5±31,0	27,5±3,7
			50	50	60,7±2,7	22,4±8,3	245,2±26,5	29,5±3,2
DBSU	15996±696 ^d	5319±1266	5,7	0,63	10,1±0,4	3,4±0,8	39,4±10,7	4,8±1,3
			11,5	1,25	20,0±0,9	6,6±1,6	70,1±22,5	8,5±2,7
			17,3	1,88	30,1±1,3	10,0±2,4	86,6±23,2	10,4±2,8

ERGEBNISSE

			23,0	2,50	40,0±1,7	13,3±3,2	116,9±26,3	14,1±3,2
			28,8	3,13	50,0±2,2	16,6±4,0	143,2±36,7	17,3±4,4
DBS	210762±9169 ^d	28590±1297	5,0	0,1	21,1±0,9	2,9±0,1	30,0±10,5	3,6±1,3
			10,0	0,2	42,2±1,8	5,7±0,3	32,5±9,0	3,9±1,1
			16,0	0,3	63,3±2,8	8,6±0,4	52,4±16,3	6,3±2,0
			21,0	0,4	84,4±3,7	11,4±0,5	70,1±20,8	8,5±2,5
TBP	343±28 ^c	244±35	60	60	20,6±1,7	14,6±2,1	67,0±21,2	8,1±2,6
			120	120	41,2±3,4	29,3±4,2	131,8±32,2	15,9±3,9
			180	180	61,7±5,0	43,9±6,3	284,8±30,1	34,3±3,6
			240	240	82,3±6,7	58,6±8,4	331,5±22,2	39,9±2,7
			300	300	102,9±8,4	73,2±10,5	337,4±12,0	40,7±1,5

^a Daten von SIMANOVA ET AL. (2004); ^b Daten sind nach $K_{CM/Rez}$ und $K_{Wachs/Rez}$ umgerechnet; ^c Daten von SCHÖNHERR ET AL. (2001);

^d berechnet nach SANGSTER (1997)

Abbildung 4.3 zeigt die Ergebnisse von sieben Kontrollexperimenten ohne Akzelerator. Der Mittelwert der Geschwindigkeitskonstanten (k^*) beträgt $0,0083 \pm 0,0012 \text{ h}^{-1}$ (Abb. 4.3A und B). Experimente 1-5 wurden mit denselben 100 *Stephanotis* CM bei den gleichen Bedingungen fünfmal nacheinander durchgeführt und ergaben sehr ähnliche Ergebnisse, was die Eignung von *Stephanotis* CM für diese Experimente bestätigt.

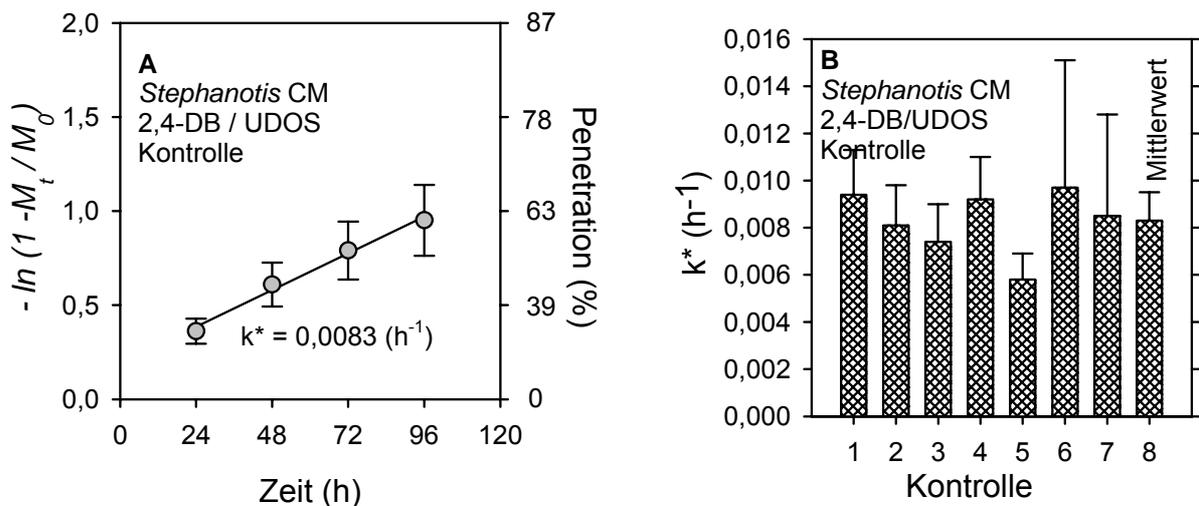
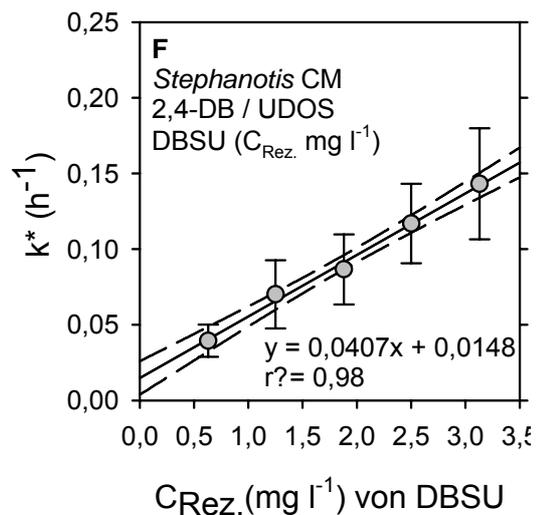
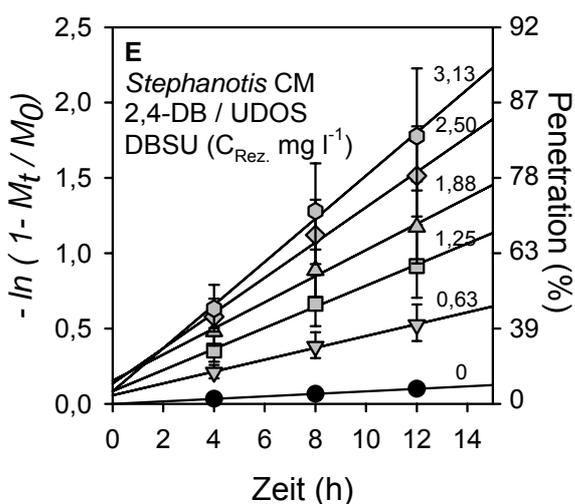
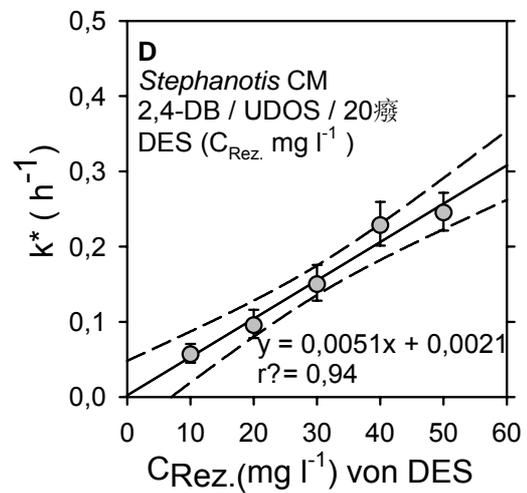
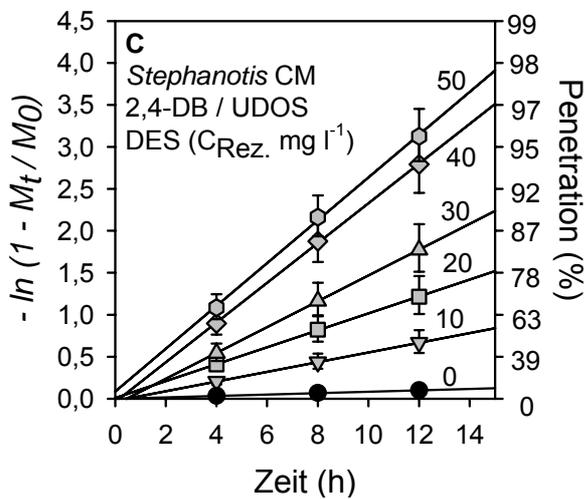
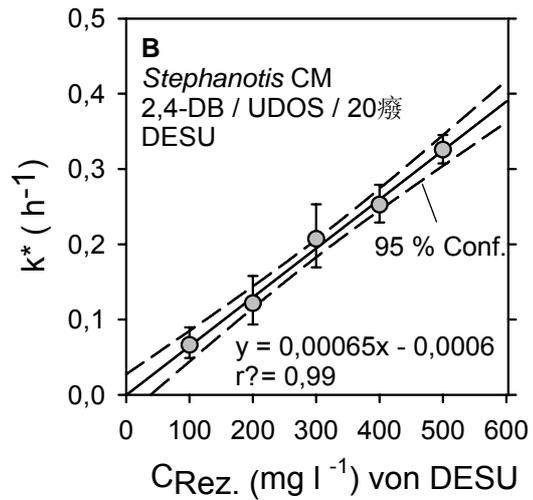
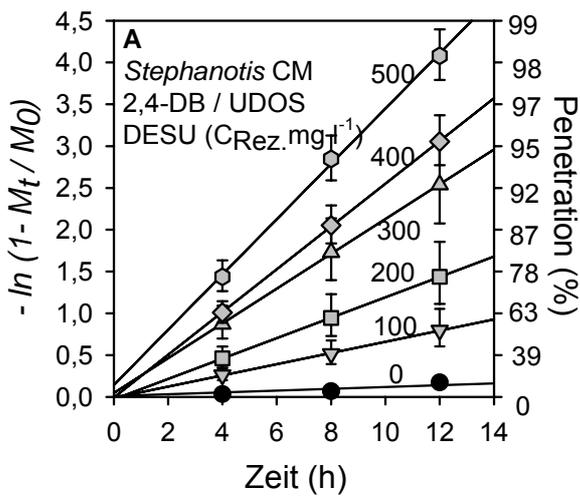


Abb. 4.3 Ergebnisse von sieben Kontrollexperimenten (ohne Akzelerator). A: Zeitlicher Verlauf der Desorption von 2,4-DB aus *Stephanotis* CM (UDOS und 20 °C); B: Zusammenstellung der Ergebnisse der sieben Experimente (Mittelwerte und VB.); der Mittelwert aus allen Experimenten ist als „Nr. 8“ dargestellt.

Der zeitliche Verlauf der Desorption von 2,4-DB mit verschiedenen Akzeleratorkonzentration und die Korrelation der Geschwindigkeitskonstanten mit Konzentration von DESU, DES, DBSU, DBS und TBP im Rezeptor (C_{Rez}) werden in Abbildungen 4.4 gezeigt. Es ist deutlich, dass alle fünf Akzeleratoren bei sehr verschiedener Konzentration im Rezeptor einen positiven Einfluss auf die Mobilität von 2,4-DB in *Stephanotis* CM hatten. Die Effekte nahmen mit steigender Konzentration der Akzeleratoren zu. Mit DESU nahmen bei einem Anstieg der Konzentration von $100 \text{ mg Liter}^{-1}$ auf $500 \text{ mg Liter}^{-1}$, die Geschwindigkeitskonstanten und der Effekt jeweils um fast das Fünffache zu (k^* von $0,0661$ auf $0,3257 \text{ h}^{-1}$, der

Effekt von 8,0 auf 39,2. Abb. 4.4 A und B). Im Fall von DBSU jedoch nehmen bei einem Anstieg der Konzentration um den Faktor fünf 0,63 auf 3,13 mg Liter⁻¹ die Geschwindigkeitskonstanten und der Effekt jeweils nur um das ca. 3,6 Fache zu (k^* von 0,0394 auf 0,1432 h⁻¹, Effekt von 4,8 auf 17,3. Abb. 4.4 E und F).

Für TBP war die Beziehung zwischen k^* bzw. dem Effekt und der Konzentration im Rezeptor nicht linear. Bei einer Konzentration von unter 200 mg Liter⁻¹ nahmen k^* und der Effekt mit zunehmender Konzentration deutlich zu, während die Effekte der Konzentration über 200 mg Liter⁻¹ im Rezeptor ein Plateau anstreben (Abb.4.4 I und J).



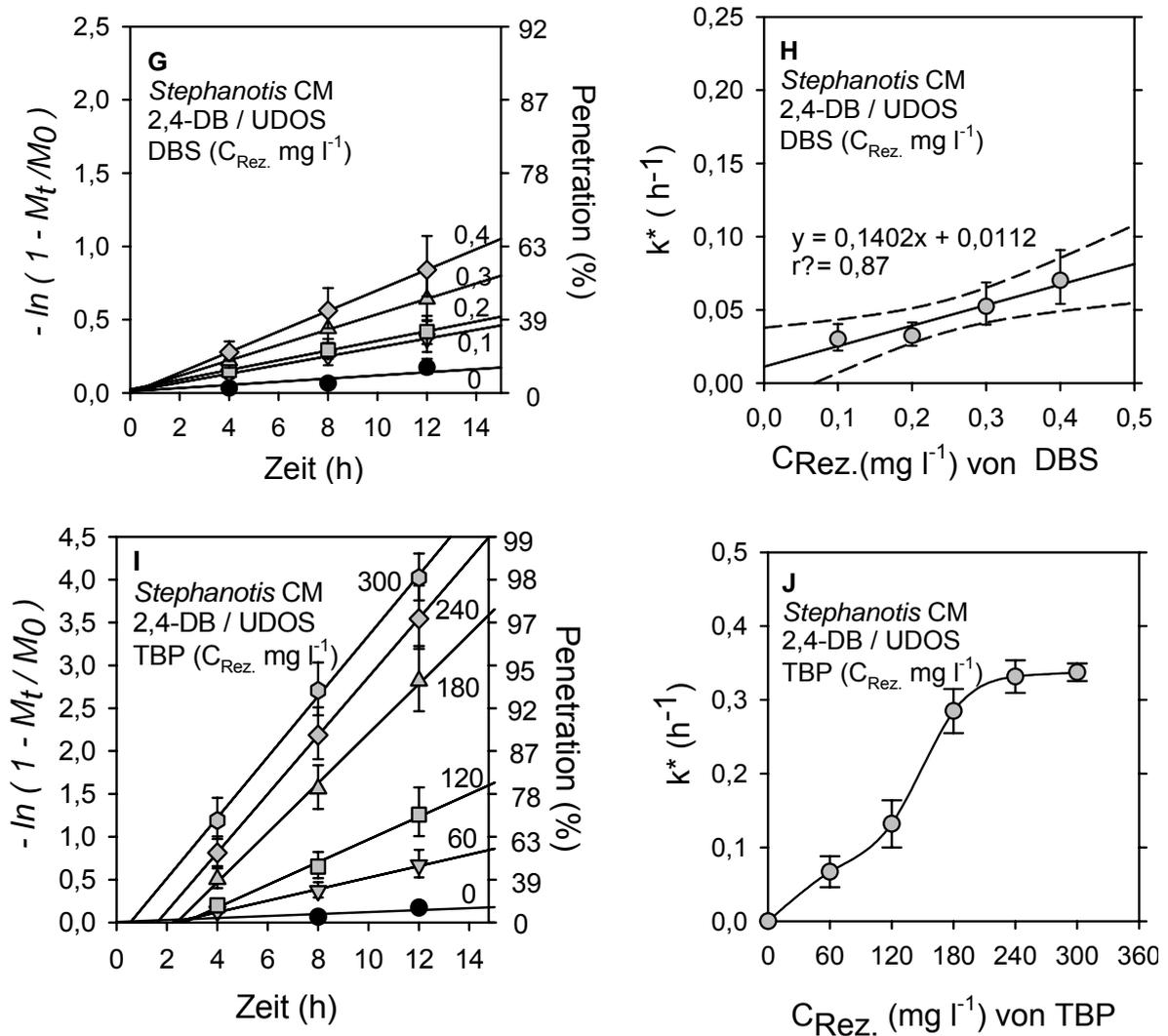


Abb. 4.4 Zeitlicher Verlauf der Desorption von 2,4-DB aus *Stephanotis* CM (UDOS bei 20 °C) bei unterschiedlicher Konzentration (linke Spalte: A, C, E, G, I) und Korrelation zwischen der Geschwindigkeitskonstanten (k^*) von 2,4-DB und Akzeleratorenkonzentration im Rezeptor ($C_{\text{Rez.}}$ mg l⁻¹) (rechte Spalte: B, D, F, H, J). Daten aus Tab. 4.1.

4.3 Einfluss lipophiler Akzeleratoren auf die Permeabilität von drei Modellverbindungen unterschiedlicher Polarität

Akzeleratoren sind Hilfsstoffe, die die Stoffmobilität in Kutikeln temporär erhöhen, indem sie die Fluidität der amorphen Wachse erhöhen. Das lässt sich elegant mit

UDOS Experimenten zeigen, bei denen die Modellsubstanzen anfangs im Sorptionskompartiment der CM sorbiert vorliegen. Daher sind UDOS Experimente nur unter Verwendung von Substanzen möglich, die hinreichend löslich im Kutin sind. Der Einfluss der Akzeleratoren auf die Mobilität polarer Stoffe kann daher mit UDOS Experimenten nicht untersucht werden. Das ist nur mit SOFU Experimenten möglich, bei denen die Modellsubstanzen auf der Kutikula in gelöster Form vorliegen. Die Akzeleratoren werden dabei über den Rezeptor appliziert, so dass sie keinen Einfluss auf die Löslichkeit der Modellsubstanzen ausüben können.

Bei SOFU Experimenten werden die radioaktiv markierten Modellsubstanzen von der Innenseite der CM desorbiert und die Geschwindigkeitskonstanten (k) sind somit ein Maß für den Einfluss der Akzeleratoren auf die Permeabilität der CM, und nicht, wie bei UDOS auf die Mobilität. Für diese SOFU Experimente wurden die Modellsubstanzen Metribuzin, Iprovalicarb und Methylglucose ausgewählt. Die meisten Experimente wurden zur besseren Vergleichbarkeit mit *Stephanotis* CM durchgeführt. Die Ergebnisse, die dabei mit Methylglucose erzielt wurden, wurden zusätzlich unter Verwendung von *Pyrus* CM überprüft. Die Temperatur betrug immer 20 °C. Als Akzeleratoren wurden DESU, TBP und MED ($C_{12}E_n$) ausgewählt. Wegen der schlechten Wasserlöslichkeit von DESU und TBP enthielt der Rezeptor immer 10 % PG. Bei MED war das nicht erforderlich. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 und 4.3 darstellt.

Tab. 4.2 Einfluss der Konzentration ausgewählter Akzeleratoren auf die Permeabilität von *Stephanotis* CM für Iprovalicarb, Metribuzin und Methylglucose. Es sind geometrische Mittel mit 95 % Vertrauensbereichen angegeben.

Akzelerator	C im Rez. (mg l ⁻¹)	C im CM (g kg ⁻¹)	C im Wachs (g kg ⁻¹)	k (h ⁻¹)			Effekt .		
				Iprovalicarb	Metribuzin	Methylglucose	Iprovalicarb	Metribuzin	Methylglucose
Kontr.				0,0008 ±0,0002	0,0007 ±0,0001	0,0031 ±0,0013	1,0 ±0,3	1,0 ±0,1	1,0 ±0,4
DESU	200	18,4 ±0,8	11,2 ±1,0	0,0028 ±0,0005	0,0011 ±0,0003	0,0026 ±0,0019	3,4 ±0,6	1,5 ±0,4	0,8 ±0,6
	400	36,8 ±1,6	22,4 ±2,0	0,0047 ±0,0006	0,0028 ±0,0008	0,0018 ±0,0014	5,6 ±0,7	3,8 ±1,1	0,6 ±0,5
	600	55,2 ±2,4	33,6 ±3,0	0,0077 ±0,0018	0,0065 ±0,0017		9,3 ±2,2	8,9 ±2,3	
	800	73,6 ±3,2	44,8 ±4,0	0,0208 ±0,0048	0,0118 ±0,0034		24,8 ±5,7	16,0 ±4,6	
	1000	92,0 ±4,0	56,0 ±5,0	0,0257 ±0,0062	0,0260 ±0,0071		30,7 ±7,4	35,5 ±9,7	
TBP	30	10,3 ±0,8	7,3 ±1,0		0,0010 ±0,0003			1,7 ±0,4	
	60	20,6 ±1,7	14,6 ±2,1	0,0011 ±0,0002			1,3 ±0,2		
	85	29,2 ±2,4	20,7 ±3,0			0,0040 ±0,0023			1,3 ±0,7
	90	30,9 ±2,5	22,0 ±3,2	0,0013 ±0,0003	0,0020 ±0,0003		1,6 ±0,4	2,1 ±0,4	
	120	41,2 ±3,4	29,3 ±4,2	0,0018 ±0,0004			2,2 ±0,5		
	150	51,5 ±4,2	36,6 ±5,3	0,0029 ±0,0007			3,5 ±0,8		
	170	58,3 ±4,8	41,5 ±6,0			0,0030 ±0,0022			1,0 ±0,7
	180	61,7 ±5,0	43,9 ±6,3		0,0040 ±0,0012			5,2 ±1,6	
	270	92,6 ±7,6	65,9 ±9,5		0,0070 ±0,0024			8,9 ±3,3	
	300	102,9 ±8,4	73,2 ±10,5	0,0084 ±0,0017			8,7 ±1,8		
360	123,5 ±10,1	87,8 ±12,6		0,0170 ±0,0039			22,6 ±5,3		

Tab. 4.3 Einfluss von monodispersen ethoxylierten Dodecanolen (MED) auf die Permeabilität von *Stephanotis* CM für Iprovalicarb, Metribuzin und Methylglucose. Es sind geometrische Mittel mit 95 % Vertrauensbereichen angegeben.

Akzeleratoren	C im Rez. (mg l ⁻¹)	C im Wachs (g kg ⁻¹)	k (h ⁻¹)			Effekt		
			Iprovalicarb	Metribuzin	Methylglucose	Iprovalicarb	Metribuzin	Methylglucose
Kontr.			0,0010 ±0,0003	0,0007 ±0,0001	0,0021 ±0,0011	1,0 ±0,3	1,0 ±0,1	1,0 ±0,5
C ₁₂ E ₂	7,7	162,5 ±22,3	0,0432 ±0,0033	0,0273 ±0,0034	0,0020 ±0,0008	41,7 ±3,2	37,5 ±4,7	1,0 ±0,4
C ₁₂ E ₄	15,6	123,3 ±9,3	0,0174 ±0,0049	0,0155 ±0,0032	0,0043 ±0,0017	16,7 ±4,7	21,2 ±4,4	2,0 ±0,8
C ₁₂ E ₆	29,7	78,1 ±10,4	0,0055 ±0,0021	0,0055 ±0,0006	0,0062 ±0,0038	5,3 ±2,0	7,6 ±0,8	3,0 ±1,8
C ₁₂ E ₈	52,8	50,8 ±11,0	0,0026 ±0,0009	0,0022 ±0,0005	0,0105 ±0,0068	2,6 ±0,9	3,0 ±0,7	5,0 ±3,2
GP C-100	1000,0		0,0028 ±0,0006	0,0026 ±0,0009	0,0045 ±0,0022	2,7 ±0,6	3,6 ±1,2	2,1 ±1,0

4.3.1 Einfluss der Akzeleratoren DESU und TBP auf die Permeabilität von *Stephanotis* CM

DESU und TBP erhöhten die Permeabilität von *Stephanotis* CM erheblich, und ihre Wirkung nahm mit steigender Konzentration zu. Das gilt aber nur für die lipophilen Wirkstoffe Metribuzin und Iprovalicarb (Abb. 4.5A,B und 4.6A,B). Im Gegensatz dazu hatten DESU und TBP keine signifikante Erhöhung der Permeabilität für Methylglucose zur Folge, sie nahm sogar tendenziell leicht ab (Abb. 4.5 C und 4.6 C).

Bei Zunahme der Konzentration von DESU im Rezeptor von $0,2 \text{ g Liter}^{-1}$ auf $1,0 \text{ g Liter}^{-1}$ (also um das Fünffache) stieg die Permeabilität (der k- Wert) für Metribuzin von $0,0011 \text{ h}^{-1}$ auf $0,0260 \text{ h}^{-1}$ und für Iprovalicarb von $0,0028 \text{ h}^{-1}$ auf $0,0257 \text{ h}^{-1}$. Dabei nahm der Effekt im Vergleich zur Kontrolle von 3,4 auf 30,7 (Iprovalicarb) bzw. 1,5 auf 35,5 (Metribuzin) zu (Tab. 4.2).

Die Tendenz des Effekts von TBP auf den k – Wert von Metribuzin und Iprovalicarb war dieselbe wie bei DESU, aber die Wirkung von TBP war etwas schwächer. Wenn z. B. die TBP-Konzentrationen im Rezeptor von $0,03 \text{ g Liter}^{-1}$ auf $0,36 \text{ g Liter}^{-1}$ erhöht wurden, stieg der k-Wert für Metribuzin von $0,001 \text{ h}^{-1}$ auf $0,017 \text{ h}^{-1}$, und der Effekt von 1,7 auf 22,6. Wurde die TBP – Konzentration im Rezeptor von $0,06 \text{ g Liter}^{-1}$ auf $0,30 \text{ g Liter}^{-1}$, also um das Fünffache erhöht, stieg der k - Wert für Iprovalicarb von $0,0011 \text{ h}^{-1}$ auf $0,0084 \text{ h}^{-1}$, und der Effekt nahm von 1,3 auf 8,7 zu (Abb. 4.6 AB und Tab. 4.2).

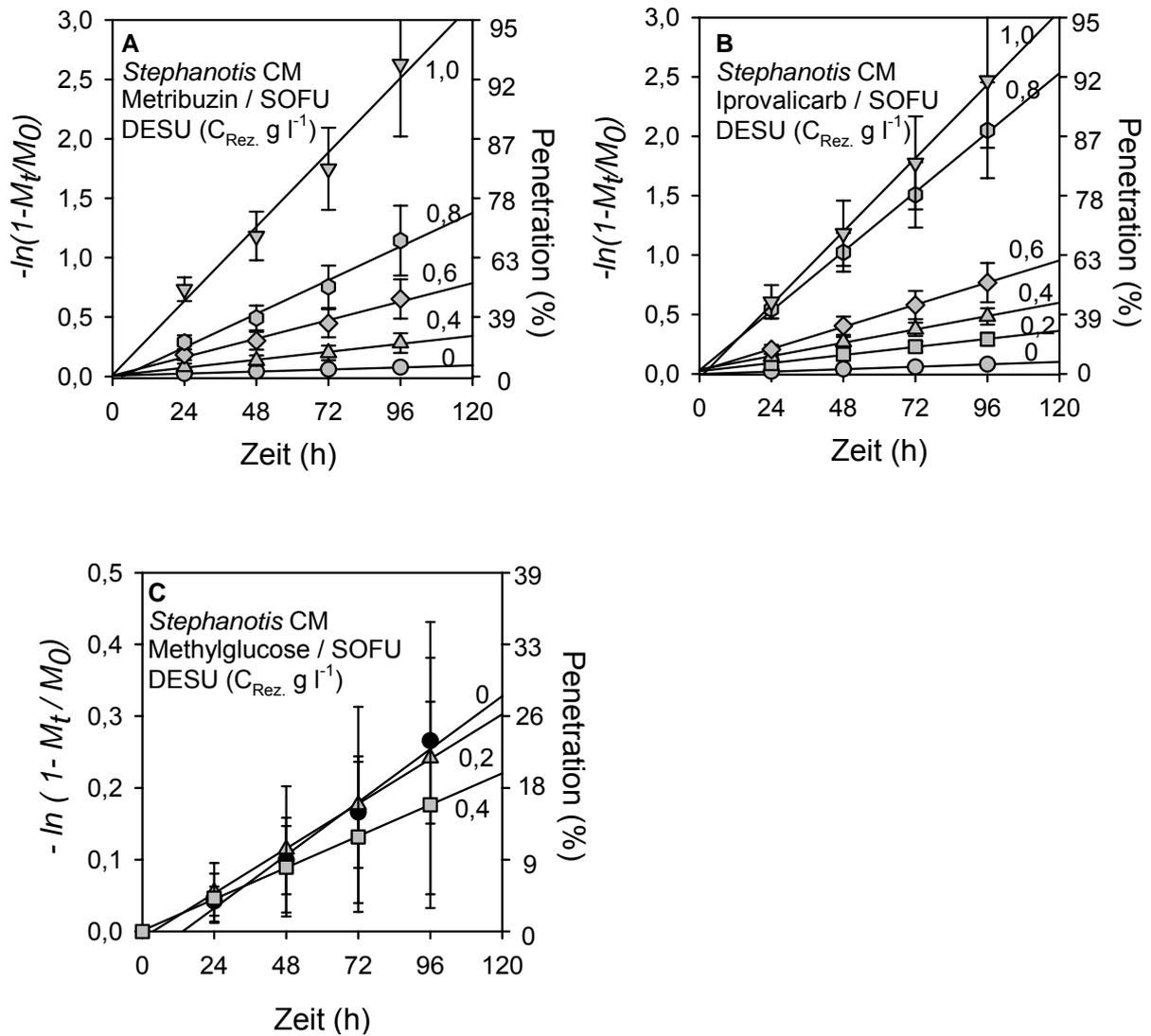


Abb. 4.5 Zeitlicher Verlauf der Desorption von Metribuzin; Iprovalicarb und Methylglucose bei verschiedenen Konzentrationen des Akzelerators DESU im Rezeptor.

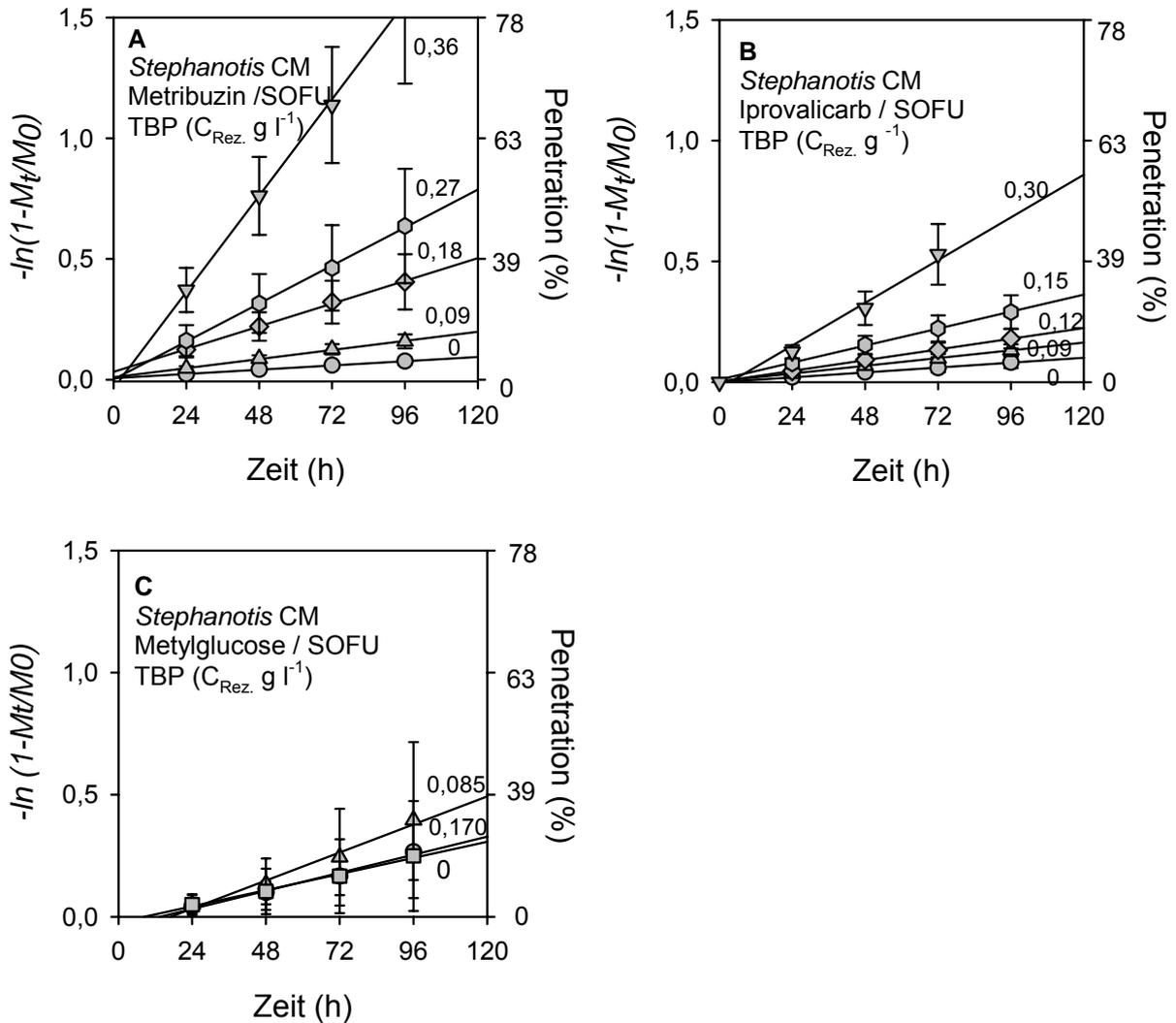


Abb. 4.6 Zeitlicher Verlauf der Desorption von Metribuzin, Iprovalicarb und Methylglucose bei verschiedenen Konzentrationen des Akzelerators TBP im Rezeptor.

4.3.2 Einfluss der Akzeleratoren $C_{12}E_n$ (MED) auf die Permeabilität von *Stephanotis* CM

Die Ergebnisse der Experimente mit den Fettalkohlethoxylaten $C_{12}E_n$ (n ist die Anzahl der Ethoxygruppen und betrug 2, 4, 6, bzw. 8) werden in den Abbildungen 4.7-4.9 dargestellt. Die Penetrationsgraphen waren in jedem Fall linear, d. h. die Wirkstoffkonzentration auf der Außenseite der CM nahm mit der Zeit exponentiell ab und die Penetration war ein Prozess 1. Ordnung. Das zeigt, dass die Konzentration

der Akzeleratoren in der CM konstant und zeitunabhängig war. Hier ist darauf hinzuweisen, dass die Konzentrationen der Akzeleratoren ($C_{12}E_n$) im Rezeptor der fünffachen kritischen Micellkonzentration (CMC) betragen. Dadurch wurde sichergestellt, dass durch Sorption in der CM die Akzeleratorkonzentration im Rezeptor immer über der CMC lag. Nur so ist die Konzentration in der CM konstant und kann aus der CMC und der Verteilungskoeffizienten berechnet werden (Tabelle 4.3). Bei Experimenten mit Methylglucose wurden die *Stephanotis* CM am Ende des Kontrollexperimentes (ohne Akzelerator) nicht ausgeschnitten, sondern drei mal mit dem Wasser gewaschen, um die restliche Menge Methylglucose zu ermitteln. Die CM wurden dann in zwei oder vier Gruppen sortiert, deren mittlerer k-Wert annähernd gleich war. Diese Gruppen wurden dann zur Messung des Effekts der Akzeleratoren verwendet (verbundener Stichproben).

Die Abbildungen 4.10 und 4.11 zeigen die Zusammenstellungen des zeitlichen Verlaufs der Desorption von den Modellverbindungen in *Stephanotis* und *Pyrus* CM. Die Effekte der Akzeleratoren auf die Permeabilität werden als Säulendiagramme angegeben. Dabei ist der Effekt das Verhältnis der k-Werte (Steigungen) die mit bzw. ohne Akzelerator gemessen worden sind. Bei Iprovalicarb und Metribuzin nahmen die Effekte mit steigender Anzahl der Ethoxygruppen ab, während es bei Methylglucose genau umgekehrt war.

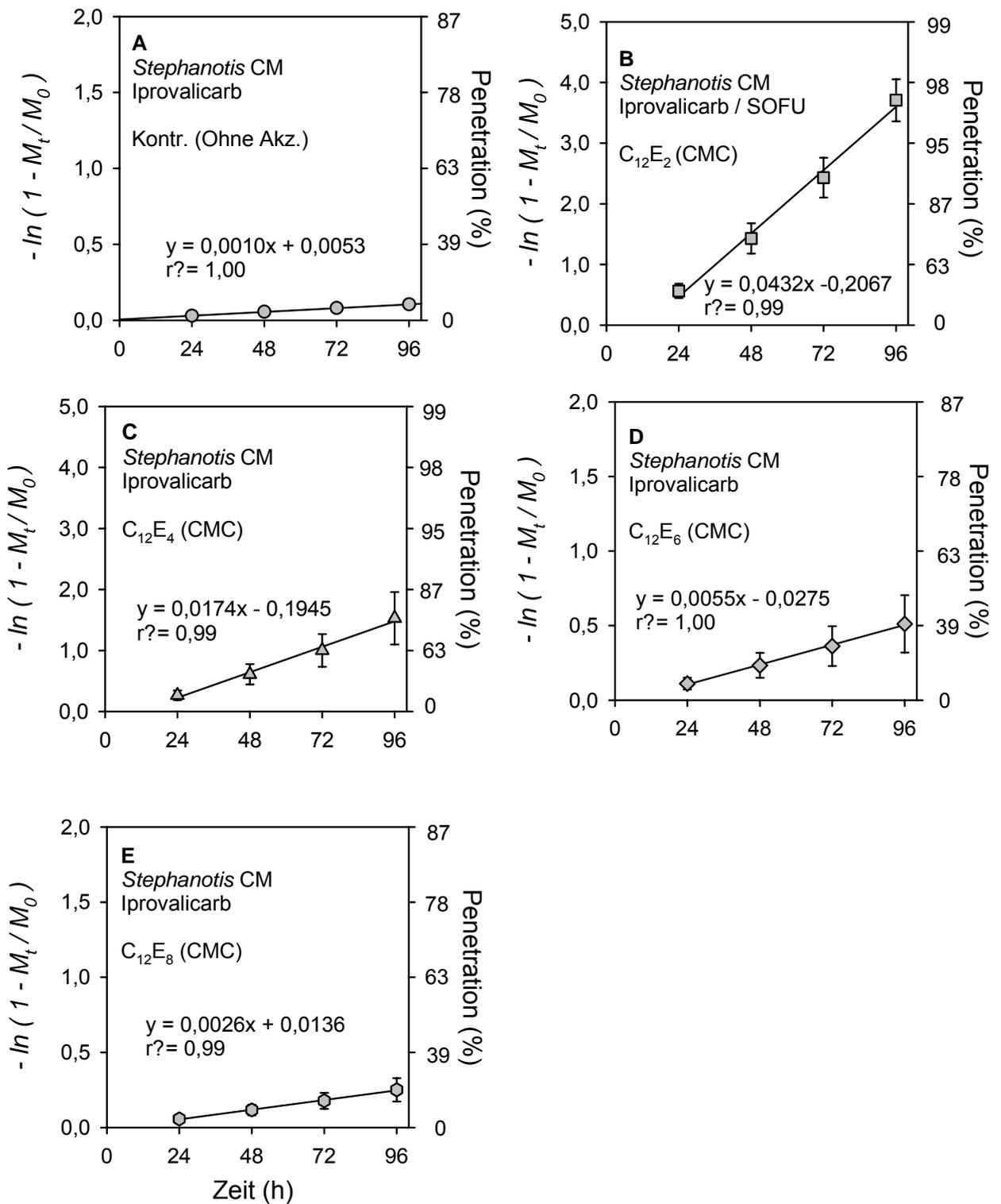


Abb. 4.7 Einfluss der monodispersen Alkohlethoxylate (MED) auf die Permeabilität von *Stephanotis* CM für Iprovalicarb. Die Steigungen der Geraden entsprechen der Permeabilität (k).

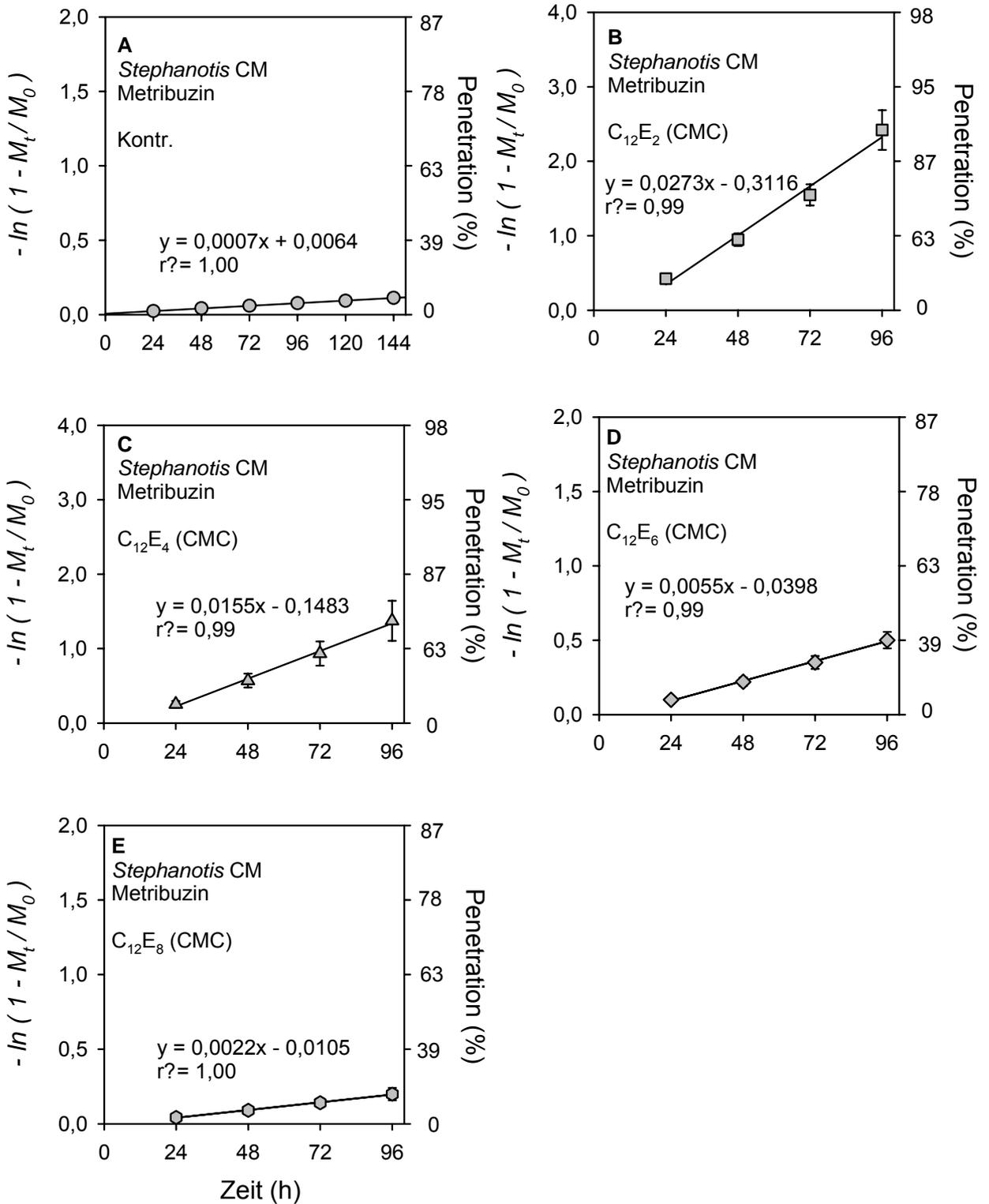


Abb. 4.8 Einfluss der monodispersen Alkohlethoxylate (MED) auf die Permeabilität von *Stephanotis* CM für Metribuzin. Die Steigungen der Geraden entsprechen der Permeabilität.

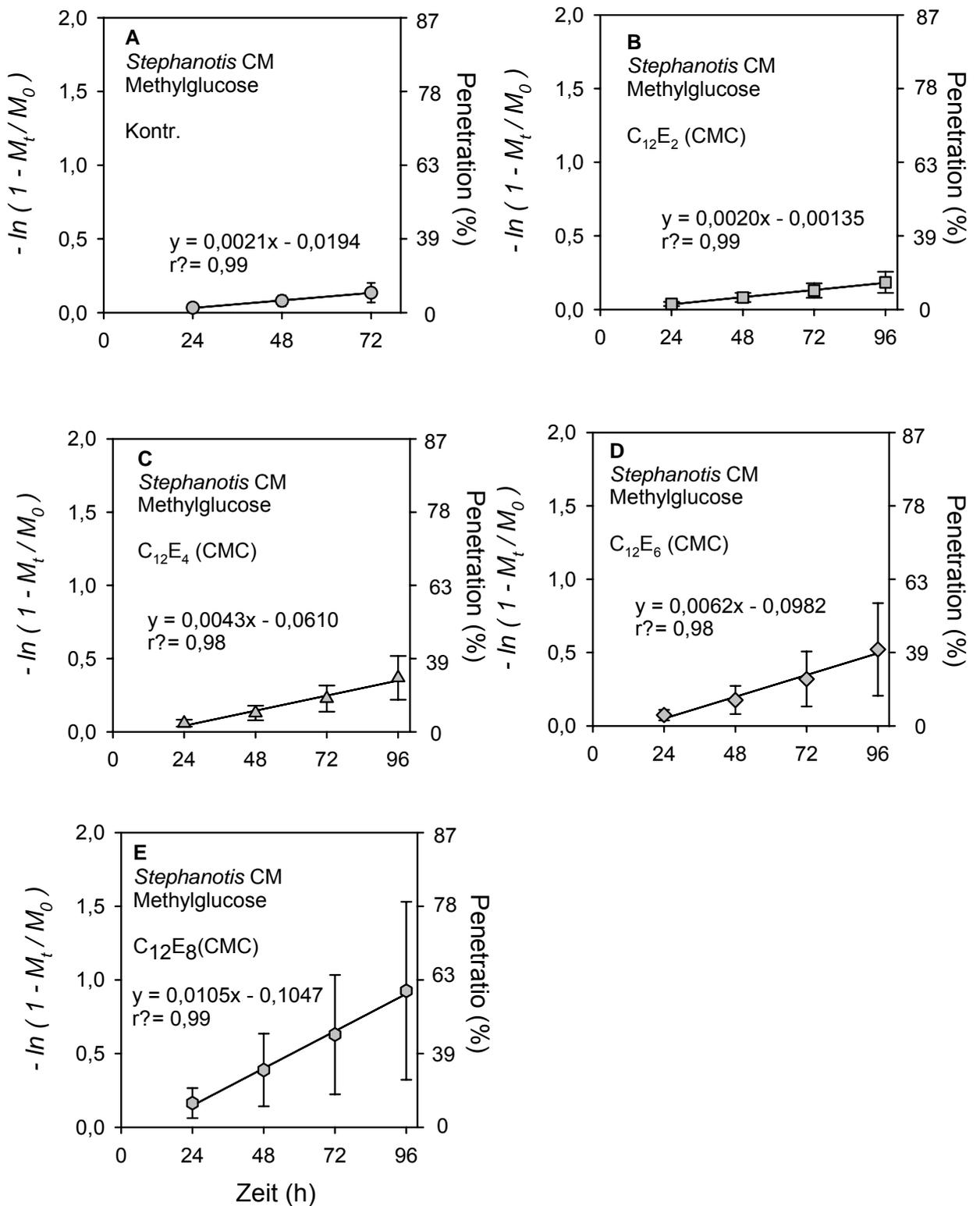


Abb. 4.9 Einfluss der monodispersen Alkohlethoxylate (MED) auf die Permeabilität von *Stephanotis* CM für Methylglucose. Die Steigungen der Geraden entsprechen der Permeabilität.

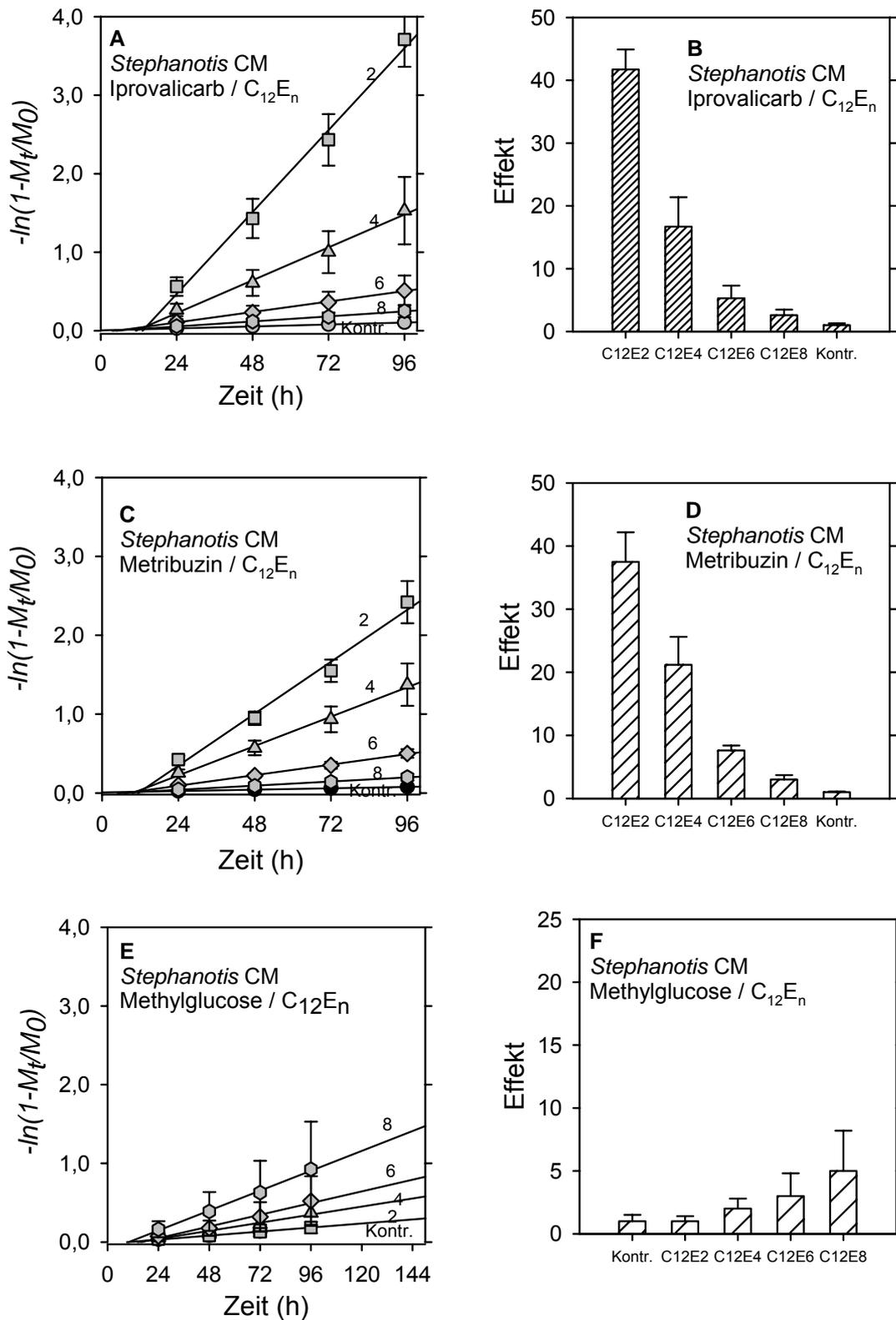


Abb. 4.10 Zusammenstellung der Ergebnisse aus Abb. 4.7, 4.8 und 4.9. Die Effekte entsprechen dem Verhältnis der Steigungen mit und ohne Akzelerator (linke Seite).

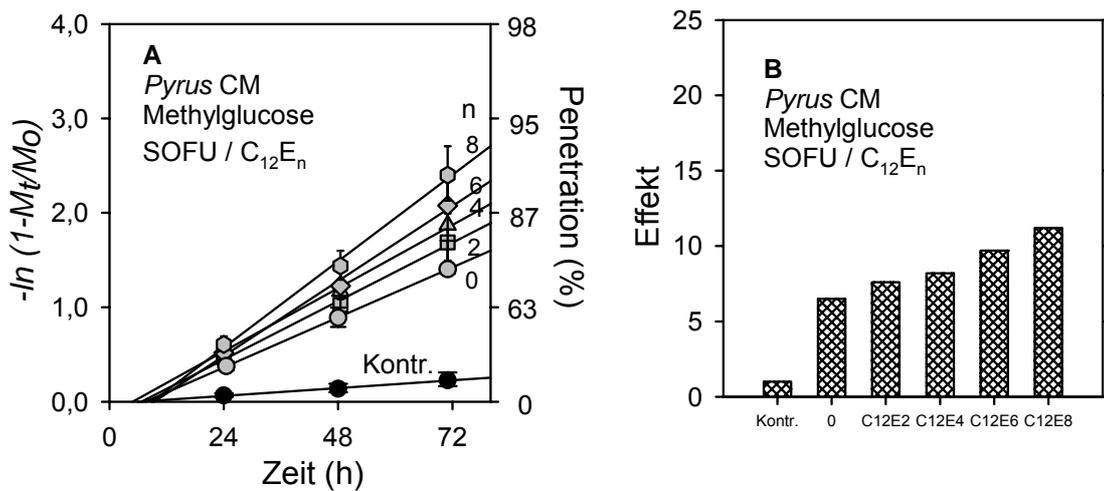


Abb. 4.11 Einfluss der MED auf die Permeabilität von *Pyrus* CM für Methylglucose (A) und ihre Effekte auf die Permeabilität (B). Als Kontrolle diente Methylglucose ohne Netzmittel. Bei allen Behandlungen mit MED wurde Glucopon 215 CSUP als Netzmittel zugegeben. Das gilt auch für die Behandlung n=0. Der Unterschied zwischen Kontrolle und Netzmittel (n=0) ist also ein reiner Benetzungseffekt.

Auch bei *Pyrus* CM nahm die Permeabilität für Methylglucose und die Effekte mit steigendem Ethoxylierungsgrad zu (Abb. 4.11). Als Kontrolle diente Methylglucose ohne Netzmittel. Bei allen Behandlungen wurde Glucopon 215 CSUP als Netzmittel zugegeben. Das gilt auch für die Behandlung n = 0. Der Unterschied zwischen Kontrolle und Netzmittel ist also ein reiner Benetzungseffekt. Darüber hinaus nahm die Permeabilität der *Pyrus* CM durch Behandlung mit MED zu und das kann folglich nicht auf verbesserte Benetzung zurückgeführt werden.

4.4 Vergleich der Penetration von Methylglucose und Calciumchlorid durch *Pyrus* CM

Alle bisher verwendeten Modellverbindungen und Wirkstoffe waren nicht-ionisch, d.h. sie hatten keine permanente elektrische Ladung. Kutikeln, die für ionische Stoffe, wie z.B. CaCl₂ durchlässig sind, enthalten polare Poren. Diese Poren könnten für sehr polare nichtionische Wirkstoffe (z.B. Methylglucose) als Diffusionspfade zur

Verfügung stehen. Es wurde daher geprüft, wie hoch die Permeabilität von *Pyrus* CM für CaCl_2 und Methylglucose ist.

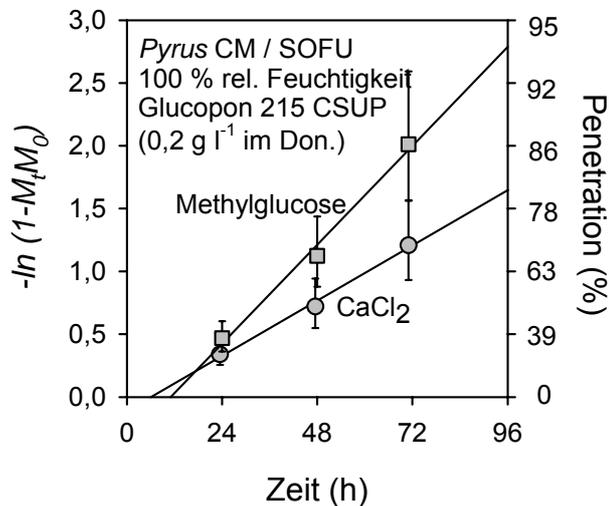


Abb. 4.12 Vergleich der Permeation von Methylglucose und CaCl_2 durch *Pyrus* CM. Die Konzentration beider Substanzen betrug 1.0 g Liter^{-1} .

Für beide Substanzen waren die Penetrationsgraphen linear, d.h. ihre Konzentration im Donator auf der Oberseite der CM nahm exponentiell mit der Zeit ab und die Penetration war ein Prozess 1. Ordnung. Die Permeabilität war aber für Methylglucose ($k = 0,033 \text{ h}^{-1}$) fast doppelt so hoch wie für CaCl_2 ($k = 0,018 \text{ h}^{-1}$).

In einem weiteren Experiment wurde mit einem neuen Satz von CM geprüft, ob sich die höhere Permeabilität für Methylglucose im Vergleich zu CaCl_2 auch bei einem paarweisen Vergleich bestätigt. Dabei wurde mit demselben Satz CM zunächst die Permeabilität für CaCl_2 gemessen und dann die für Methylglucose. Die Ergebnisse zeigt die Abb. 4.13.

Bei einigen CM war die Permeabilität für beide Substanzen gleich und die Datenpunkte liegen auf oder über der Diagonale. Bei den meisten CM wurde eine deutlich höhere Permeabilität für Methylglucose als für CaCl_2 gemessen.

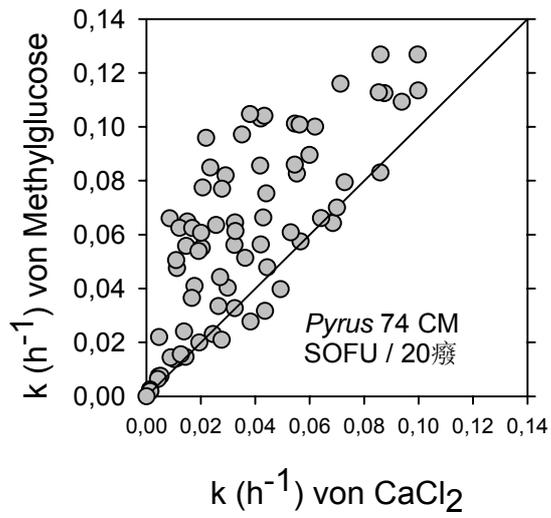


Abb. 4.13 Korrelation der Geschwindigkeitskonstanten (k) von CaCl_2 und Methylglucose bei *Pyrus* CM.

5. DISKUSSION

5.1 Abhängigkeit des Akzeleratoreffektes von Art und Konzentration der Akzeleratoren

Pflanzliche CM sind asymmetrische Barrieren. Eine dünne Schicht, die sich an der morphologischen Außenseite der CM befindet, ist verantwortlich für Barrierewirkungen der CM (RIEDERER UND SCHREIBER, 1995; SCHÖNHERR UND BAUR, 1994). Diese Schicht wird begrenzende oder limitierende Schicht genannt und kutikuläre Wachse, die im Kutin eingebettet sind, sind für die z.T. extrem niedrigen Diffusionskoeffizienten verantwortlich. Durch Extraktion der Wachse wird die Permeabilität der CM um Größenordnungen erhöht, was die Bedeutung der Wachse für die Barriereigenschaften zeigt.

Unter der begrenzenden Schicht befindet sich das sog. Sorptionskompartiment, das den Hauptteil der Masse der CM ausmacht (SCHÖNHERR UND RIEDERER, 1986). Bei der UDOS Methode diffundiert die radioaktive Substanz, die anfänglich im Sorptionskompartiment enthalten ist, durch die begrenzende Schicht in das Desorptionsmedium (Rezeptorlösung). Das ist ein Prozess 1. Ordnung, wenn der Graph $[-\ln(1-M_t/M_0)]$ gegen die Zeit linear ist. Die Steigung ist die Geschwindigkeitskonstante (k^*). Sie charakterisiert die Beweglichkeit von 2,4-DB in der limitierenden Schicht und sie ist dem Diffusionskoeffizienten proportional (SCHÖNHERR UND BAUER, 1992).

Alle hier verwendeten Akzeleratoren sind lipophile Flüssigkeiten. Die Löslichkeit für DESU ist 92fach höher in CM als im Rezeptor und 56fach höher im Wachs als im Rezeptor. Mit steigender Anzahl von Kohlstoffatomen (oder CH_2 -Gruppen) werden die Verteilungskoeffizienten ($K_{\text{CM/Rez}}$ bzw. $K_{\text{Wachs/Rez}}$) größer und erreichen bei DBS einen Wert für $K_{\text{CM/Rez}}$ und $K_{\text{Wachs/Rez}}$ von 210762 bzw. 28590 (Tab. 3.3 und 4.1, 4.2). Die Konzentrationen der Akzeleratoren in den CM und im Wachs im Gleichgewicht (C_{CM} und C_{Wachs}) hängen von den Verteilungskoeffizienten zwischen CM und Rezeptor bzw. Wachs und den Konzentrationen im Rezeptor (C_{Rez}) ab. Sind die Verteilungskoeffizienten und die Konzentrationen bekannt, dann lassen sich die Konzentrationen in der CM bzw. im Wachs berechnen:

$$C_{CM} = K_{CM/Rez} \times C_{Rez}$$

$$C_{Wachs} = K_{Wachs/Rez} \times C_{Rez} \quad (5.1)$$

Trägt man die Geschwindigkeitskonstanten (k^*) gegen die Konzentrationen der Akzeleratoren in CM bzw. Wachs auf so erhält man Gerade, die die Wirksamkeit der Akzeleratoren charakterisieren.

$$k^* = bC + a \quad (5.2)$$

$$Effekt = bC + a \quad (5.3)$$

In diesen Gleichungen ist k^* die Stoffmobilität, die mit UDOS Experimenten bestimmt werden kann. Der Effekt ist das Verhältnis von k^* (mit Akzelerator) geteilt durch k^* (ohne Akzelerator, Kontrolle), b ist die Steigung der Regressionsgeraden, C ist die Konzentrationen ($g\ kg^{-1}$) des Akzelerators in CM bzw. im Wachs (C_{CM} und C_{Wachs}) und a ist eine Kostante (h^{-1}), die dem Achsenabschnitt der y-Achse entspricht.

Die Verteilungskoeffizienten zwischen CM bzw. Wachs und die Konzentrationen der fünf ausgewählten Akzeleratoren sind in der Tabellen 3.3 und 4.1-4.2 aufgelistet. Die Beziehungen zwischen der Geschwindigkeitskonstanten (k^*) der Desorption von 2,4-DB aus *Stephanotis* CM bei 20 °C bzw. den Effekten der Akzeleratoren und den umgerechneten Konzentrationen in CM und im Wachs von fünf Akzeleratoren in *Stephanotis* CM sind in Abbildungen 5.1 - 5.3 dargestellt.

Die Abbildungen und Regressionsgleichungen zeigen, dass k^* (Abb. 5.1A und Abb. 5.2A) mit zunehmenden Konzentrationen von Akzeleratoren in CM und Wachs ansteigen. Die Beziehung ist linear. Die Steigungen der Geraden (b) charakterisieren die intrinsische Aktivität der Akzeleratoren. Diese nahm in der Reihenfolge DESU>DES>DBSU>DBS ab. Bezogen auf die Konzentration in der CM war die intrinsische Aktivität von DESU 13,8fach größer als die von DBS. Bezogen auf die Konzentration im Wachs war der Unterschied aber nur 2,22fach. Die Effekt-Graphen zeigen ein ähnliches Bild. Die Akzeleratoren erhöhten die Mobilität von 2,4-DB bis zu einem Faktor von 40 (Abb. 5.1B und 5.2B).

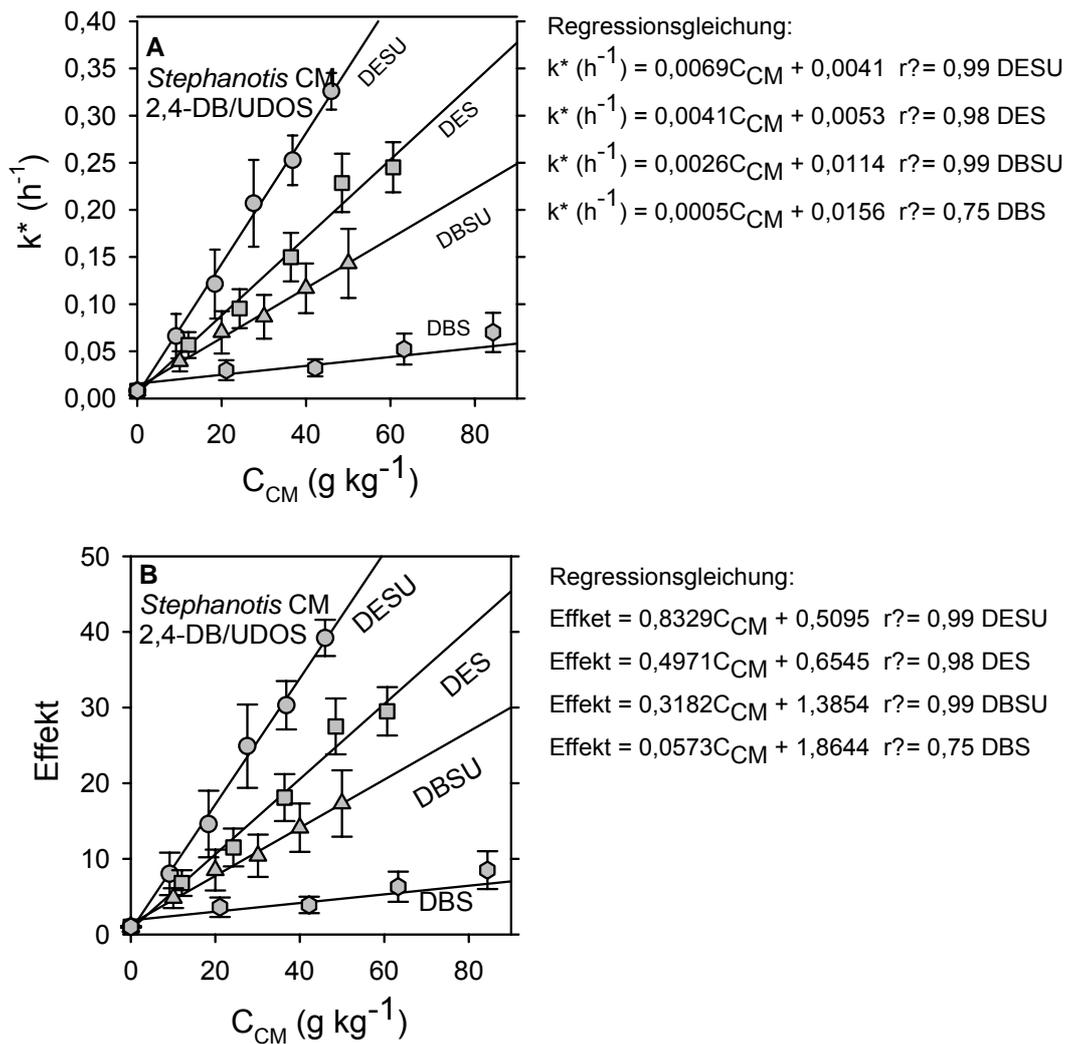


Abb. 5.1 Korrelation der Geschwindigkeitskonstanten (k^*) von 2,4-DB mit der Konzentration (C_{CM} $g\ kg^{-1}$) von verschiedenen Akzeleratoren in *Stephanotis* CM (UDOS bei 20 °C) (A) und Korrelation des Effekts der Akzeleratoren auf die Mobilität 2,4-DB mit der Konzentration in der CM (C_{CM} $g\ kg^{-1}$). Daten aus Tab. 4.1.

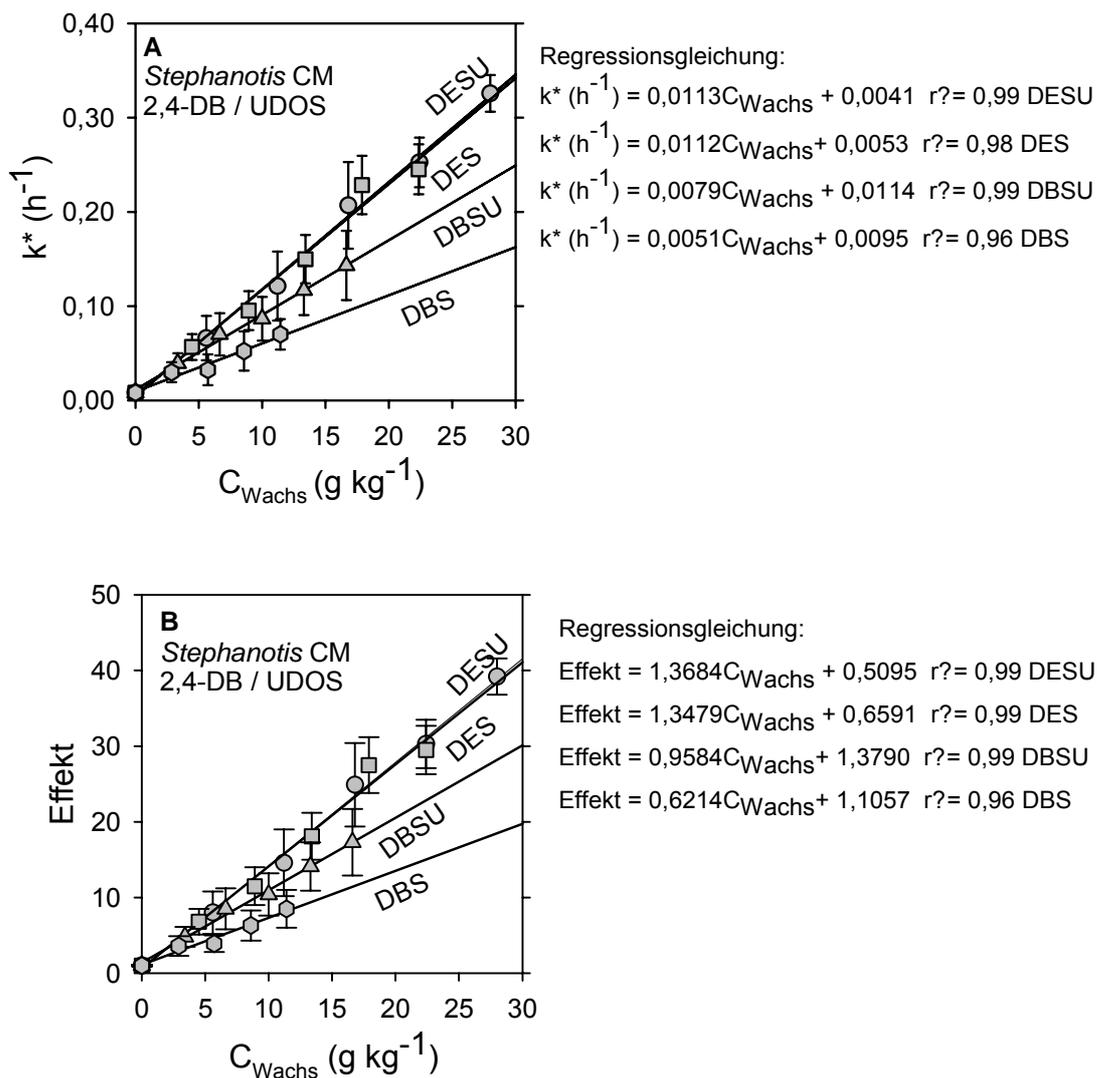


Abb. 5.2 Korrelation der Geschwindigkeitskonstanten (k^*) von 2,4-DB mit der Konzentration von verschiedenen Akzeleratoren in *Stephanotis* Wachs (UDOS bei 20 °C) (A) und Korrelation des Effekts der Akzeleratoren auf die Mobilität von 2,4-DB mit Konzentration im Wachs (B). Daten aus Tab. 4.1.

TBP zeigte eine nichtlineare Beziehung zwischen k^* bzw. Effekt und der Konzentration. Aber auch hier lag der maximale Effekt bei etwa 40 (Abb. 5.3).

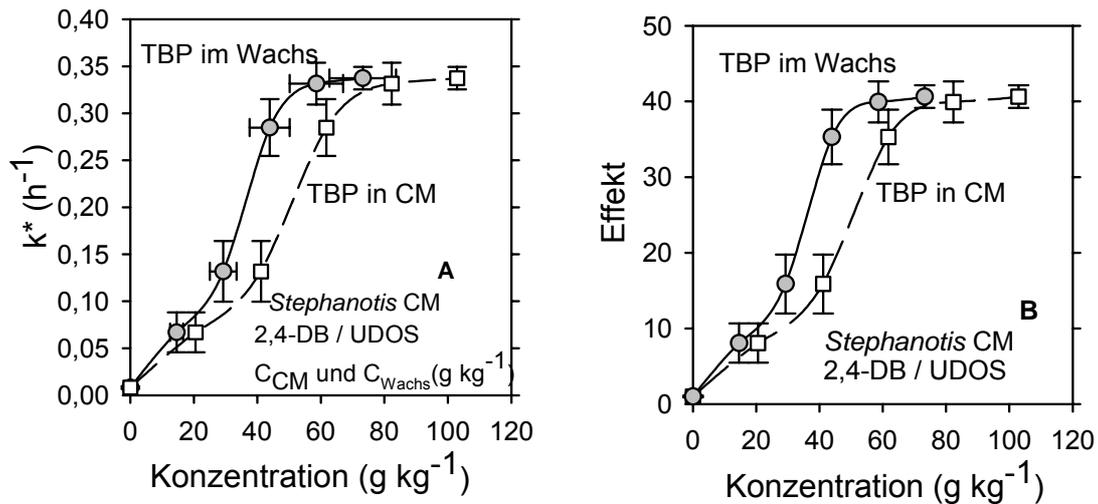


Abb. 5.3 Korrelation der Geschwindigkeitskonstanten (k^*) von 2,4-DB mit der Konzentration von TBP in *Stephanotis* CM und Wachs (UDOS bei 20 °C) (A) und Korrelation des Effekts von TBP auf die Mobilität von 2,4-DB mit Konzentration in der CM und im Wachs (B). Daten aus Tab.4.1.

Die Extraktion der Wachse aus der CM erhöht die Durchlässigkeit der CM für Wasser und organischen Nichtelektrolyte um Größenordnungen. Daraus kann man ableiten, dass kutikuläre Wachse die hauptsächliche Barriere in der pflanzlichen Kutikula bilden. Bezieht man die intrinsische Aktivität auf die Konzentration der Akzeleratoren in *Stephanotis* Wachs dann ergeben sich im Vergleich zu CM größere Steigungen (b) aber die Unterschiede zwischen den Akzeleratoren sind viel kleiner (Abb. 5.1B, 5.2B, 5.3B). Das zeigt, dass die Weichmacher im Wachs die 2,4-DB Mobilität viel stärker erhöhen als im Kutin.

Weil die Verteilungskoeffizienten zwischen Wachs und Rezeptor ($K_{\text{Wachs/Rez}}$) kleiner als zwischen CM und Rezeptor ($K_{\text{CM/Rez}}$) sind (siehe Tab. 3.3 und Abb. 5.4), waren die Konzentrationen der Akzeleratoren im Wachs immer kleiner als die Konzentration in CM. Dieses Verhältnis war allerdings nicht konstant. Wenn die Konzentration im Wachs gegen die Konzentration in der CM aufgetragen wird, ergeben sich Gerade. Für TBP und DESU haben die Steigungen die Werte von 0,71 bzw. 0,61. Die Steigungen für DES (0,37), DBSU (0,33) und DBS (0,14) sind viel kleinerer. Es scheint, dass die Sorption der Weichmacher (Akzeleratoren) im Wachs mit zunehmendem Molgewicht (bzw. Anzahl von CH_2 -Gruppe) behindert wird. Für DESU und TBP waren experimentelle Verteilungskoeffizienten ($K_{\text{CM/Rez}}$) verfügbar. Für

andere drei Akzeleratoren wurden jedoch $K_{CM/Rez}$ Werte berechnet, und ein Inkrement in $\log K$ von 0,56 für jede Methylengruppe wurde zugrunde gelegt. QSAR (Quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehung) Studien stützen diese Annahme der Abhängigkeit der Verteilungskoeffizienten von der Anzahl der C-Atome (RIEDERER ET AL., 1995; SANGSTER, 1997).

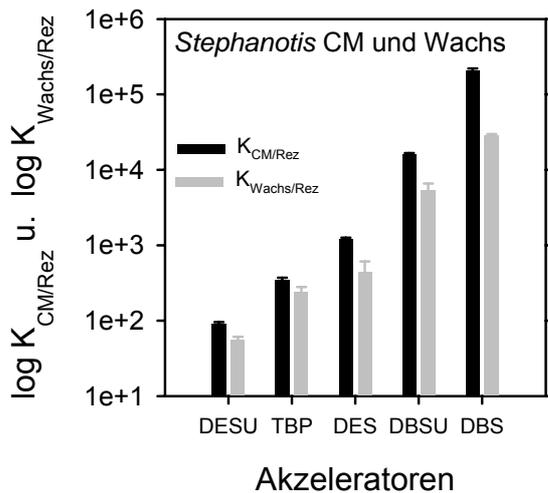


Abb. 5.4 Vergleich von Verteilungskoeffizienten zwischen Kutikula/Rezeptor ($K_{CM/Rez}$) und Wachs/Rezeptor ($K_{Wachs/Rez}$) aus *Stephanotis* CM für die Akzeleratoren DESU, DES, DBSU, DBS und TBP (Mittelwerte mit 95 % Vertrauensbereich, Daten aus Tab. 3.3).

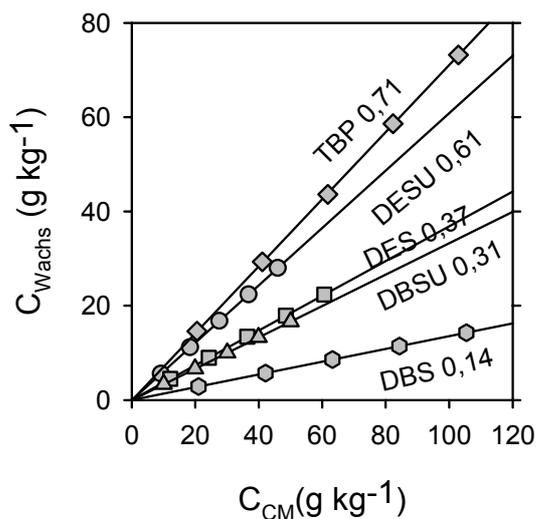


Abb. 5.5 Korrelation der Konzentration von fünf Akzeleratoren in CM und im Wachs von *Stephanotis* (Daten aus Tab. 3.3 und 4.1).

In Abbildung 5.2B (Effekt gegen Konzentration im Wachs) liegen die beiden Regressionsgeraden für DESU und DES übereinander, weil die Steigungen von 0,136 und 0,134 identisch sind. Das bedeutet, dass die Akzeleratoren DESU und DES die gleiche intrinsische Wirksamkeit haben. Auch die Effekte von DBSU und DBS auf die Mobilität von 2,4-DB sind nahezu gleich (Abb. 5.6A und B).

Der Effekt eines Akzelerators ist das Verhältnis der k^* -Werte, die mit und ohne Akzeleratoren gemessen wurden. Der Effekt gegen die Akzeleratorenkonzentration war linear (Abb. 5.1; 5.2 u. 5.6). Diese Akzeleratoren haben auf die Beweglichkeit von 2,4-DB in CM und Wachsen um 3 bis 40fach erhöht. Die Penetrationsraten sind proportional der Beweglichkeit der Substanzen in CM und im Wachs, und eine vergleichbare Wirkung auf die Penetrationsraten in CM und im Wachs kann erwartet werden.

Mit TBP wurden nichtlineare Beziehungen erhalten und die Kurven laufen bei hohen Konzentrationen zusammen. Der größte Unterschied wurde bei ungefähr 40 g kg^{-1} beobachtet und er betrug etwa einen Faktor von 2,2 (Abb. 5.3B). Diese Daten sind konsistent mit der Tatsache, dass Wachse die Hauptbarriere bei der Diffusion organischer Nichteurolyte sind. Die Wirkungen der Akzeleratoren auf die Zunahme der Substanzenbeweglichkeit im Wachs sind größer als in Kutin.

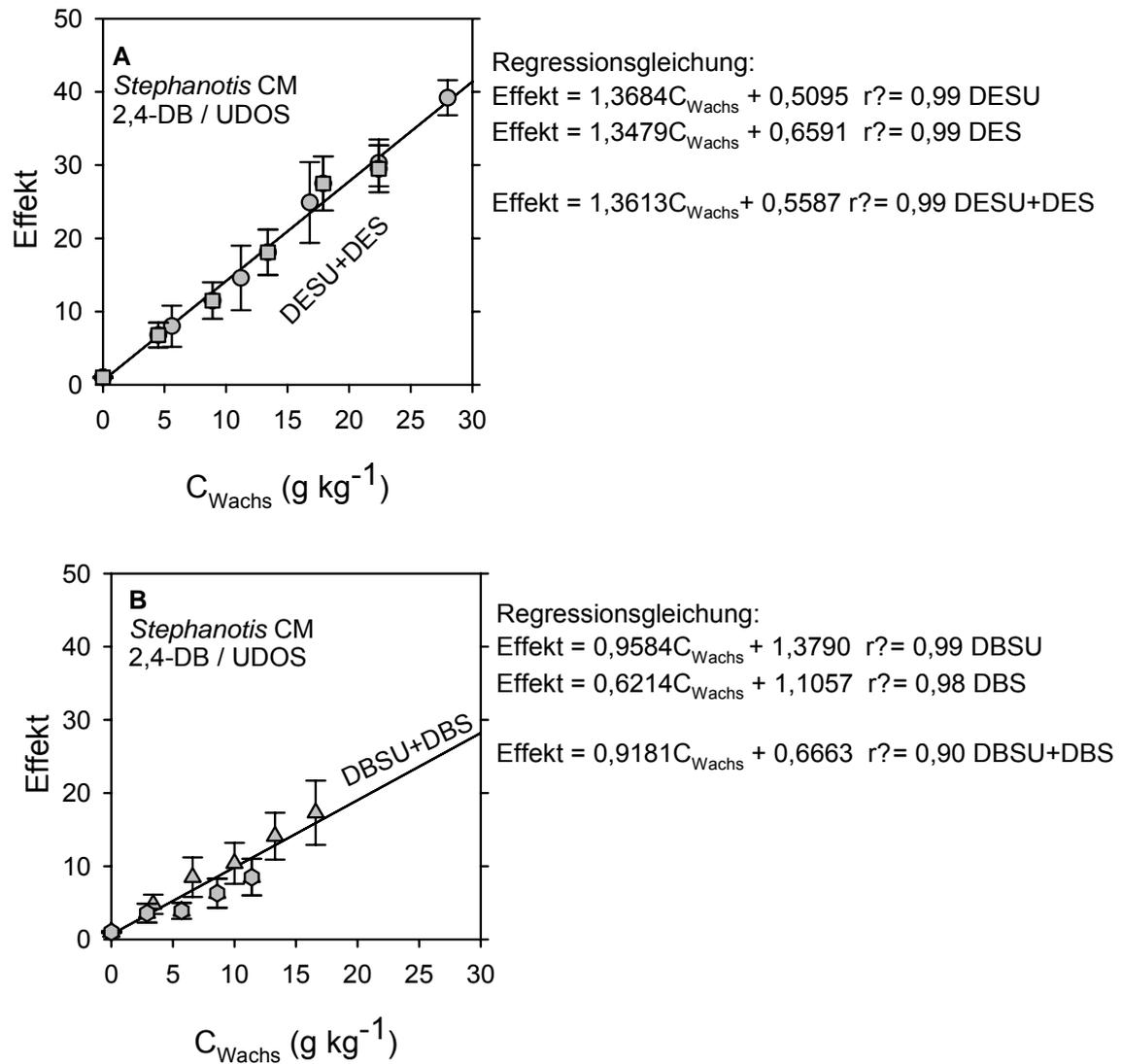


Abb. 5.6 Korrelation des Effektes auf die Mobilität von 2,4-DB und der Konzentration in *Stephanotis* Wachs. A: Effekt gegen Konzentration von DESU + DES; B: Effekt gegen Konzentration von DBSU + DBS.

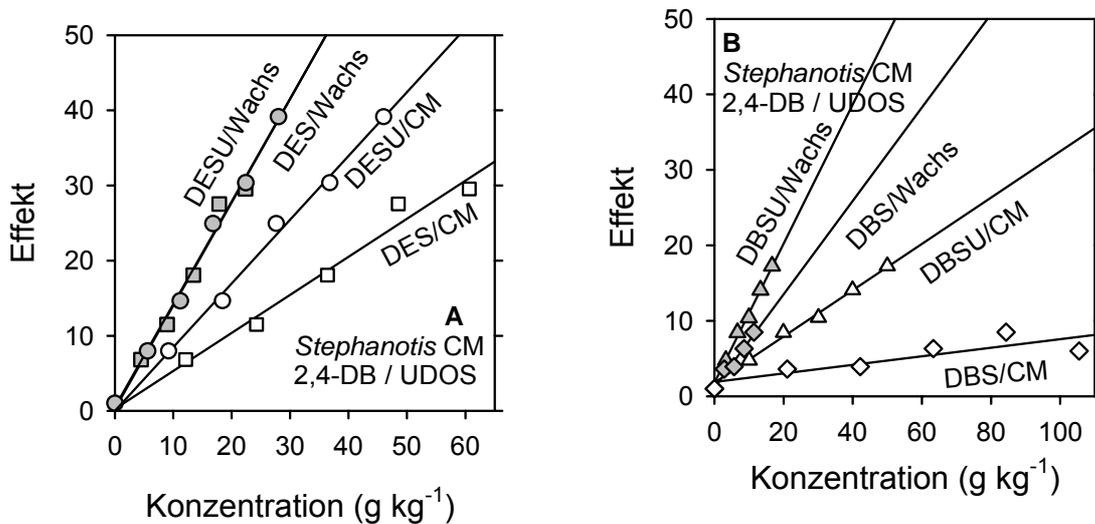


Abb. 5.7 Korrelation zwischen dem Akzeleratoreffekt auf die Mobilität von 2,4-DB und der Konzentration der Akzeleratoren in *Stephanotis* CM und Wachs. A: DESU und DES; B: DBSU und DBS.

5.2 Der Einfluss ausgewählter Akzeleratoren auf die Penetrationsraten von Modellverbindungen unterschiedlicher Polarität

Das UDOS Verfahren hat den Nachteil, dass damit der Einfluss von Akzeleratoren nur für lipophile Wirkstoffe geprüft werden kann. Viele Wirkstoffe sind aber hydrophil und als Vertreter dieser Substanzklasse wurde in dieser Arbeit Methylglucose (MG) ausgewählt. Da MG im Kutin und Wachs nur sehr wenig löslich ist, wurde die SOFU Methode gewählt, um zu prüfen, ob Akzeleratoren die Penetration von polaren Wirkstoffen genauso beschleunigen, wie die der lipophilen Substanzen. Mit SOFU wird die Penetrationsrate gemessen, nicht die Mobilität. Durch geschickte Wahl der Versuchsanordnung lässt sich aber vermeiden, dass die zu testenden Akzeleratoren einen Einfluss auf das Lösen der Wirkstoffe, ihren Verteilungskoeffizienten oder auf das Spreiten des Donortropfens auf den CM haben. Unter diesen Bedingungen sind die Geschwindigkeitskonstanten (k), die mit SOFU gemessen werden, den Diffusionskoeffizienten proportional und der Effekt der Akzeleratoren auf k ist ein Effekt auf die Mobilität von MG.

5.2.1 Verifizierung der SOFU Methode

In der vorliegende Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Akzeleratoren DESU, DES, DBSU, DBS, TBP und EA die Mobilität von lipophilen 2,4-DB, Metribuzin und Iprovalicarb in pflanzlichen CM erheblich steigern konnten. Um quantitative Dosis-Wirkungsbeziehungen etablieren zu können, musste sichergestellt werden, dass die Additive keinen Einfluss auf die Verteilung der Wirkstoffe hatten. Außerdem mussten die Konzentrationen der Akzeleratoren in den CM und im Wachs bekannt, konstant und zeitunabhängig sein. Bei diesen Experimenten wurden PG und Plantacare 1200 UP als die Additive im Rezeptor oder im Donator verwendet. Mögliche Wirkungen der Akzeleratoren auf die Verteilung der Wirkstoffe zwischen Donator und CM wurden durch Hinzufügen der Akzeleratoren zum Rezeptor, anstatt zum Donator, verhindert. Die gleichmäßige Verteilung des Rückstandes des Donators auf den CM wurde durch Hinzufügen eines Netzmittels zu allen Donatorlösungen gesichert. Dadurch konnte vermieden werden, dass es bei Verwendung von Akzeleratoren, die Oberflächenaktivität haben (ethoxylierte Alkohole), zu unterschiedlicher Ausbreitung der Tropfen kam. Es musste zunächst geprüft werden, ob und in welchem Masse die Geschwindigkeitskonstanten durch die Additive beeinflusst werden. Die Abb. 4.1 zeigt, dass PG im Rezeptor (100 g Liter^{-1}), das zur Verbesserung der Löslichkeit von DESU und TBP erforderlich war, keinen signifikanten Einfluss auf die Mobilität von 2,4-DB hatte. Experimente mit Glucocon 215 CSUP oder Plantacare 1200 UP ergeben ebenfalls, dass diese Netzmittel im Donator ($0,2 \text{ g Liter}^{-1}$) keinen Einfluss hatten. Die k^* -Werte ohne und mit den Additiven waren nicht signifikant verschieden von der Kontrolle (Abb. 4.1E). Das bedeutet, dass weder Glucocon, Plantacare noch PG im Rezeptor auf die Permeabilität der CM für 2,4-DB in *Stephanotis* CM einen Einfluss hatten.

Akzeleratoren wurden zum Rezeptor hinzugefügt und mussten von der Innenseite der CM in die Kutikeln eindringen. Die Einstellung des Gleichgewichtes zwischen Rezeptor und CM erfolgte schnell. Mit DESU und TBP waren signifikante Anlaufzeiten (t_e) nicht erkennbar (Abb. 4.5 u. 4.6). Mit den MED ($C_{12}E_n$) dauerte es ungefähr 10 h (Abb. 4.10 und 4.11). Nach der Einstellung des Gleichgewichtes war die Konzentration der Akzeleratoren in der CM während der Experimente konstant, weil die Rezeptorlösungen 5 bis 7 mal entnommen und durch neue ersetzt wurden.

Aus der spezifischen Aktivität und den Molgewichten der ^{14}C -markierten Wirkstoffe wurden deren Konzentrationen im Donator berechnet. Sie betragen $9,5 \text{ mg Liter}^{-1}$ (MG), $3,45 \text{ mg Liter}^{-1}$ (Metribuzin), $100 \text{ mg Liter}^{-1}$ (Iprovalicarb), $62,5 \text{ mg Liter}^{-1}$ (2,4-DB) und $1000 \text{ mg Liter}^{-1}$ für CaCl_2 . Aus der Konzentration des Donators und dem Tropfenvolumen von $5 \mu\text{L}$ ergeben sich die Massen der Wirkstoffe, die auf die CM deponiert worden sind. Sie lagen bei $0,05 \mu\text{g}$ (MG) bis zu $17,2 \mu\text{g}$ (Metribuzin) und bei Plantacare 1200 UP war es $1 \mu\text{g}$. Das Gewicht der CM betrug ungefähr $300 \mu\text{g cm}^{-2}$ und für eine Fläche des Tropfenrückstandes von $0,5 \text{ cm}^{-2}$ ergibt sich eine Massenbelegung von rund $150 \mu\text{g}$. Somit lagen die Massenprozentage der Wirkstoffe in der CM bei rund $0,033$ (MG) bis zu $11,5$ (Metribuzin). Es fanden sich keine Anzeichen, dass die unterschiedlichen Konzentrationen der Wirkstoffe in der CM einen Einfluss auf die Wirkung der Akzeleratoren gehabt hätten.

Nach Trocknung der $5 \mu\text{L}$ Tröpfchen konnte auf der Oberfläche der CM ein Rückstand, der die radioaktiven Substanzen und Additive enthielt, beobachtet werden. Dieser Rückstand war im flüssigen Zustand und glänzte. Bei 100% Feuchtigkeit werden die Hydroxylgruppen von Plantacare 1200 UP und Methylglucose hydratisiert, aber die genaue Konzentration der Substanzen ist nicht bekannt. Die Penetrationsgraphen waren in allen Fällen linear, d.h. die Penetration war ein Prozess 1. Ordnung und die Konzentration der Wirkstoffe nahmen exponentiell mit der Zeit ab. Da die Luftfeuchte über dem Donator immer 100% betrug waren die Wirkstoffe immer gelöst.

5.2.2 Die Wirkungen von DESU, TBP und monodispersen ethoxylierten Dodecanolen (C_{12}E_n)

Die Permeabilität von *Stephanotis* CM ist sehr niedrig. In Abwesenheit der Akzeleratoren betragen die SOFU Geschwindigkeitskonstanten (k) für Iprovalicarb und Metribuzin 7×10^{-4} bzw. $10 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$. Das ergibt Halbzeiten [$t_{1/2} = (-\ln 0,5) / k$] von 990 bzw. 693 h. Mit *Stephanotis* CM war die Halbzeit für Methylglucose (MG) 266 h (Abb. 4.7, 4.8 und 4.9), und mit *Pyrus* CM betrug die Halbzeit allerdings nur 31 h (Abb. 4.11). Für systemische Wirkstoffe sind solche Halbwertszeiten viel zu lang. Sie lassen sich aber mit Akzeleratoren deutlich verkürzen, z.B. kann man mit DESU bei einer Konzentration von $800 \text{ mg Liter}^{-1}$ im Rezeptor (das sind $73,6 \text{ g kg}^{-1}$ in der CM bzw. $44,8 \text{ g kg}^{-1}$ im Wachs) die Halbzeit von 990 h auf 33 h (Iprovalicarb) und für

Metribuzin von 693 auf 58 h verkürzen. Die Wirkungen der Akzeleratoren auf die Permeabilität von *Stephanotis* CM hingen von der Polarität der Wirkstoffe ab. Sie werden deshalb getrennt diskutiert.

5.2.2.1 Die lipophilen Wirkstoffe Metribuzin und Iprovalicarb

Trägt man $\log k$ für Metribuzin und Iprovalicarb gegen die Konzentrationen der Akzeleratoren im Wachs auf, so erhält man mit DESU, TBP und den MED ($C_{12}E_n$) lineare Regressionsgrafiken der Form:

$$\log k = bC_{\text{Wachs}} + a \quad (5.4)$$

Diese Gleichung beschreibt die Akzeleratorenwirkungen auf die Permeabilität von *Stephanotis* CM für die Modellverbindungen, wobei k die Geschwindigkeitskonstante ist, b ist die Steigung der Regressionsgeraden, C_{Wachs} ist die Akzeleratorenkonzentration im Wachs (g kg^{-1}) und a ist eine Konstante (h^{-1}). Hier wurde die Konzentration der Akzeleratoren im Wachs gewählt, da Wachse die Hauptbarriere für die Diffusion in den CM bilden (SIMANOVA ET AL., 2004, im Druck).

Die Konstanten (a) sind die y -Abschnitte der Regressionsgeraden. Sie betragen (Abb. 5.9) -3,01 bzw. -3,20 und der Durchschnitt war $-3,11 \pm 0,07$ (log Skala). D.h. in Abwesenheit der Akzeleratoren betrug die durchschnittliche Permeabilität (k - Wert) der beiden Substanzen $7,76 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$. Die Steigungen (b) der Regressionsgeraden sind ein Maß für die intrinsische Aktivität der Akzeleratoren. Sie war für Metribuzin und Iprovalicarb gleich, nahm aber in der Reihenfolge DESU (0,029) > über TBP (0,015) > $C_{12}E_n$ (0,010) ab. Die intrinsische Aktivität von DESU war um den Faktor 1,93 höher als die von TBP und 2,90fach höher als die von MED (log Skala). Mit Hilfe der Regressionsgleichungen (5.4), den Steigungen (b) und dem der durchschnittlichen Konstanten ($a = -3,11$) kann man die Permeabilität (k -Wert) und die Effekte abschätzen. Wenn die Konzentrationen der drei Akzeleratoren im Wachs gleich ist und 50 g kg^{-1} betragen, erreichen die berechneten k -Werte der beiden Modellsubstanzen jeweils $21,8 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ (DESU), $4,36 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ (TBP) und $2,45 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ($C_{12}E_n$). Die drei verschiedenen Akzeleratoren erhöhten die Permeabilität der

CM also um den Faktor 28,1 (DESU), 5,6 (TBP) bzw. 3,16 ($C_{12}E_n$). Sowohl die intrinsische Aktivität als auch Effekt der Akzeleratoren war vom Molgewicht und den Verteilungskoeffizienten der beiden Wirkstoffe unabhängig. Für eine gegebene Pflanzenart ist die intrinsische Aktivität nur eine Eigenschaft der Akzeleratoren. Es zeigt in welchem Ausmaß die Fluidität der amorphen Wachse (die bei den verschiedenen Pflanzen variieren) durch die sorbierten Akzeleratoren erhöht werden kann.

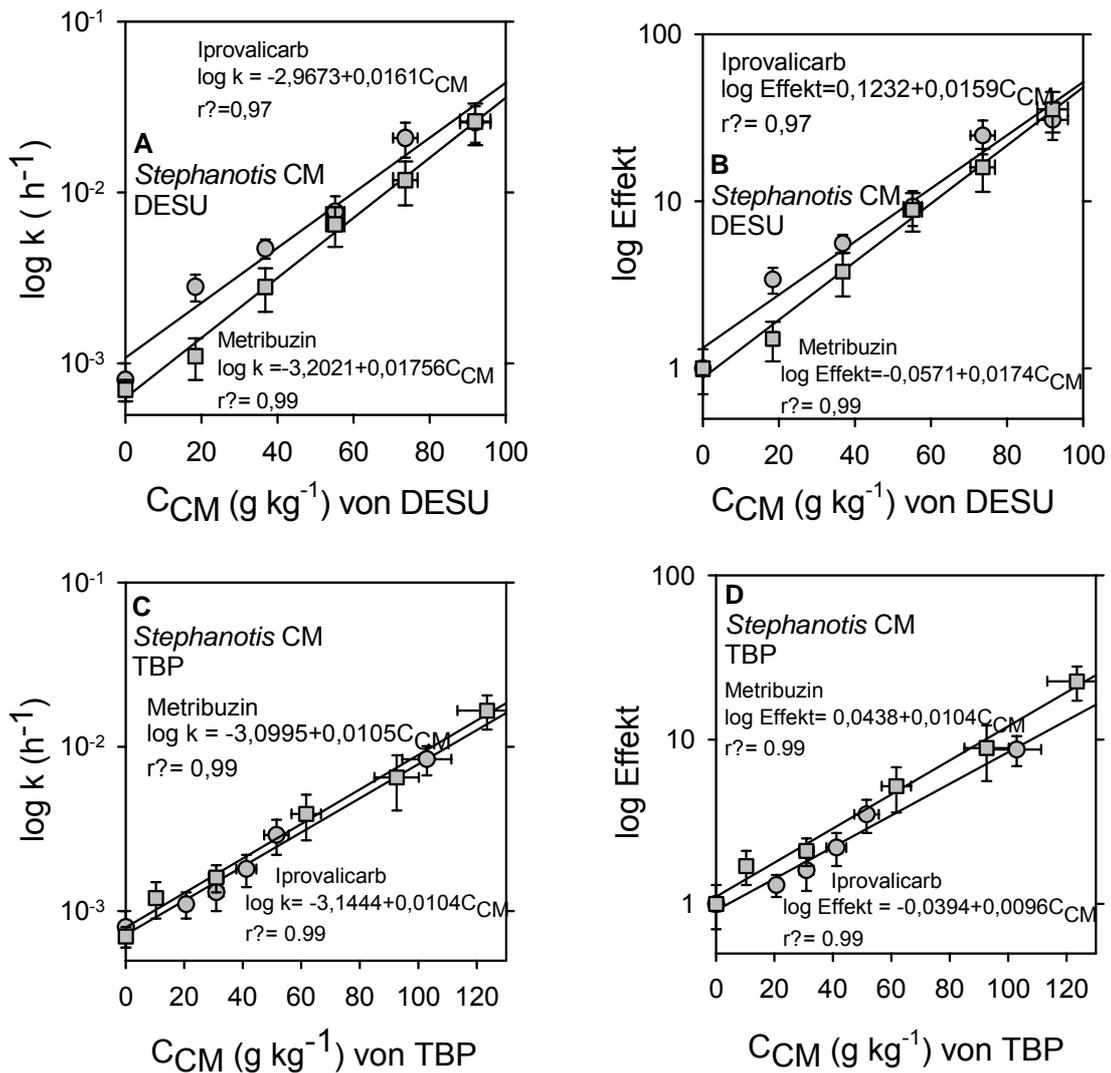


Abb. 5.8 Zusammenhang zwischen der Permeabilität (k) von *Stephanotis* CM für Metribuzin und Iprovalicarb und der Konzentration (C_{CM} g kg^{-1}) von DESU und TBP im Wachs (SOFU bei 20°C, Daten aus Tab. 4.2).

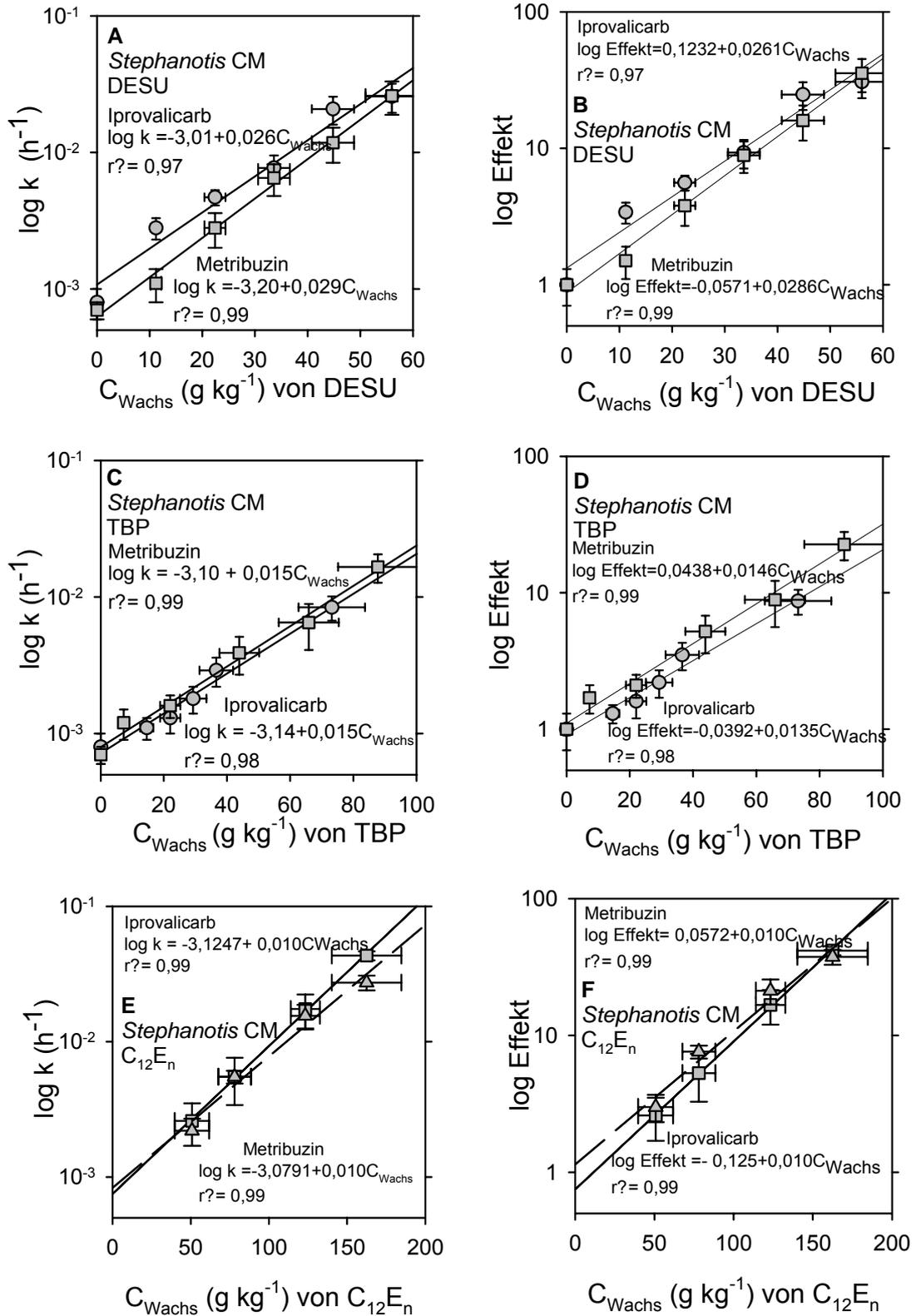


Abb. 5.9 Zusammenhang zwischen der Permeabilität (k) von *Stephanotis* CM für Metribuzin und Iprovalicarb und der Konzentration (C_{Wachs}) der Akzeleratoren in Wachs bei (SOFU bei 20°C). Daten aus Tab. 4.2 und 4.3.

5.2.2.2 Hydrophile nichtionische Methylglucose (MG) und ionisches CaCl_2

Die Abbildungen 4.5C und 4.6C zeigen deutlich, dass sowohl DESU als auch TBP die Permeabilität (k) der *Stephanotis* CM für die hydrophile Methylglucose (MG) nicht erhöhten. Eine Wirkung von C_{12}E_n auf die Permeabilität von *Stephanotis* und *Pyrus* CM war messbar, aber nur schwach ausgeprägt (Abb. 5.10 und 5.11). C_{12}E_2 war in dieser Serie am lipophilsten und hatte keinen Einfluss auf die Permeabilität von *Stephanotis* und *Pyrus* CM. Nur wenn 4 oder mehr Ethoxygruppen vorlagen, wurde die Permeabilität der CM erhöht. Bei *Stephanotis* CM betrug der Effekt 1,0 für C_{12}E_2 ; 2,0 für C_{12}E_4 ; 3,0 für C_{12}E_6 und 5,0 für C_{12}E_8 (Abb. 5.11). Bei *Pyrus* CM wurde die gleiche Tendenz beobachtet, aber die Effekte waren größer als in *Stephanotis* CM und betrugen jeweils 7,6 für C_{12}E_2 ; 8,2 für C_{12}E_4 ; 9,7 für C_{12}E_6 und 11,2 für C_{12}E_8 (Abb. 5.11). Auch die Geschwindigkeitskonstanten waren bei *Pyrus* CM höher als in *Stephanotis* CM (Abb. 5.10).

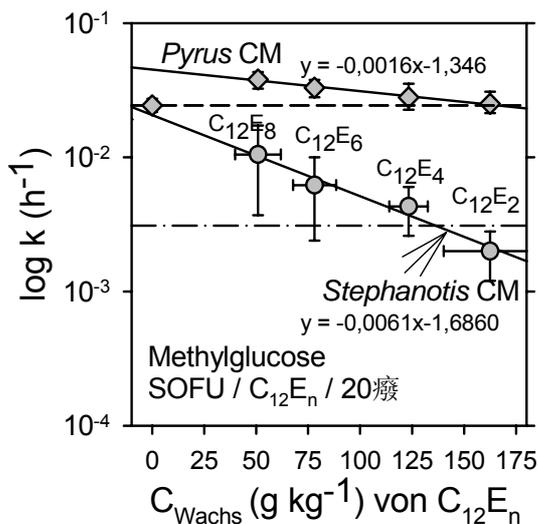


Abb. 5.10 Korrelation der Konzentration der Akzeleratoren (C_{12}E_n) im Wachs von *Stephanotis* und *Pyrus* CM mit der Geschwindigkeitskonstante der Desorption von Methylglucose. Es wurden geometrische Mittel und 95 % Vertrauensbereiche dargestellt.

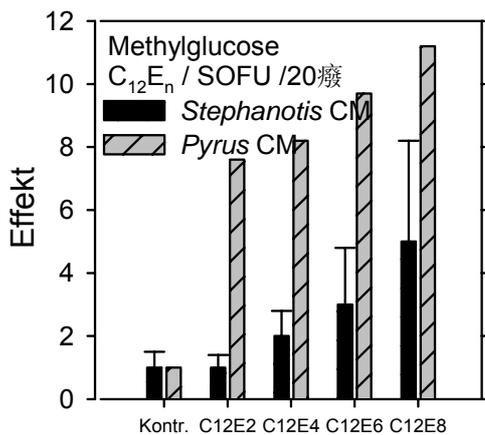


Abb. 5.11 Vergleich der Effekte von $C_{12}E_n$ auf die Methylglucose Permeabilität von *Stephanotis* und *Pyrus* CM.

Die Wirkungen und die Effekte der Akzeleratoren $C_{12}E_n$ auf die Permeabilität (k) nahmen mit zunehmender Anzahl der EO-Gruppen zu. Mit steigender Anzahl der EO-Gruppen werden die MED polarer und ihre Konzentration im Wachs nahm ab. Wir haben hier also das Paradoxon, dass die Permeabilität mit abnehmender MED Konzentration im Wachs zunahm. Das war bei den lipophilen Wirkstoffen Metribuzin und Iprovalicarb nicht der Fall (Abb. 5.9).

Methylglucose (MG) ist im Wasser viel löslicher als in der CM (Tab. 3.2), aber als Nichtelektrolyt kann es in lipophile Phasen eindringen und diffundieren. Sein Verteilungskoeffizient zwischen CM und Wasser ($K_{CM/W}$) ist 0,13. Dies besagt, dass die Konzentration in Wasser ungefähr 7,7fach höher als in der CM ist. Ein Verteilungskoeffizient zwischen Wachs und Wasser ist nicht verfügbar, aber er ist vermutlich beträchtlich kleiner. STOCK ET AL. (1993) zitieren einen Verteilungskoeffizienten zwischen Octanol und Wasser ($K_{O/W}$) von 10^{-3} . Wässrige Poren durchqueren die CM einiger Pflanzenarten, wenn auch in verschiedenem Ausmaß (SCHÖNHERR, 2000). Diese Poren sind zugänglich für polare und ionische Stoffe mit Molgewichten bis 500 g Mol^{-1} (SCHÖNHERR UND SCHREIBER, 2004), deshalb kann Methylglucose auch durch diese Poren diffundieren. Geschwindigkeitskonstanten, die für CaCl_2 und MG bei *Pyrus* CM (20°C) gemessen worden sind, waren sehr ähnlich und häuften sich um die Diagonale herum, wobei die k -Werte für MG oft höher waren als die für CaCl_2 (Abb. 4.13).

Wenn die Permeabilität (k) für MG höher als für CaCl_2 ist, muss ein alternativer Diffusionsweg vorhanden sein, der nur für MG nicht aber für ionisches CaCl_2 verfügbar ist. Das könnte erklären, warum der k -Wert von MG bei gleichen Bedingungen höher war als der k -Wert für CaCl_2 (Abb. 4.12 und 4.13). Die Beiträge des ionischen und des alternativen Pfades können geschätzt werden, wenn angenommen wird, dass die Geschwindigkeitskonstanten additiv sind.

$$k = k_{aq} + k_{alt} \quad (5.5)$$

In Gleichung 5.5 ist k_{aq} mit CaCl_2 bestimmt worden und k mit Methylglucose. Der Beitrag des alternativen Pfades zum gesamten Fluss kann geschätzt werden, indem man den mit CaCl_2 gemessenen k -Wert von dem, den man mit MG erhalten hat, subtrahiert: $k_{alt} = 0,060 \text{ (MG)} - 0,036 \text{ (CaCl}_2) = 0,024 \text{ [h}^{-1}\text{]}$.

Nach diesem additiven Modell sind 40 % der MG über den alternativen und 60 % über den wässrigen Pfad diffundiert. Abb. 4.13 beruht auf Messungen an 74 CM und die Berechnungen könnten auch für jede CM einzeln durchgeführt werden. Für einige CM ist $k < k_{aq}$, wenn sie unter der Diagonale liegen. Dies ist physikalisch unmöglich. Vermutlich liegt das daran, dass das Molekulargewicht von MG 1,75fach größer als das von CaCl_2 und die Behinderung von MG in den wässrigen Poren größer ist. Die Größenselektivität der wässrigen Poren in *Pyrus* CM ist nicht bekannt und eine Korrektur kann zur Zeit nicht gemacht werden. Mit Pappel CM wäre k_{aq} für MG um den Faktor 0,57 kleiner als der k -Wert für CaCl_2 gewesen (SCHÖNHERR UND SCHREIBER, 2004).

Diese Betrachtungen könnten erklären, warum die Wirkung der Akzeleratoren auf die Permeabilität der CM für sehr hydrophile Substanzen gering ist. Bei Ionen kann die Permeabilität der CM mit Netzmitteln erheblich erhöht werden, aber es wurden nie Wirkungen der Akzeleratoren beobachtet (SCHÖNHERR, 2000; SCHÖNHERR, 2002). Dies muss erwartet werden, da Akzeleratoren die Fluidität amorpher Wachse erhöhen, aber hydratisierte Ionen sind vom lipophilen Pfad ausgeschlossen und deshalb bleibt die Erhöhung der Fluidität der Wachse ohne Wirkung auf die Penetration von Ionen.

Die Permeabilität wässriger Poren in CM verringert sich mit sinkender Luftfeuchte (SCHÖNHERR, 2000; SCHÖNHERR, 2002). Dies ist wahrscheinlich eine Folge

verminderter Quellung der Poren. Bei sehr niedriger Luftfeuchte ist der Beitrag der wässrigen Pfade vermindert und könnte sogar bedeutungslos werden. Dann würde der alternative Pfad die Penetration bestimmen und es ist gezeigt worden, dass bestimmte Netzmittel die Penetrationsraten polarer Wirkstoffe erhöhen können (BAUR, 1998; BAUR ET AL., 1999a u. b; BAUR, 1999; STOCK ET AL., 1993). Allerdings hatten weder DESU noch TBP einen positiven Einfluss auf die Permeabilität der *Stephanotis* CM für MG (Abb. 4.5C und 4.6C) und auch das sehr lipophile $C_{12}E_2$ war wirkungslos. Leichte, aber signifikante Zunahmen der Permeabilität wurden nur mit 6 oder 8 EO-Gruppen beobachtet und diese Akzeleratoren ($C_{12}E_6$ und $C_{12}E_8$) haben niedrigere Konzentrationen in *Stephanotis* Wachs als die lipophileren Homologe ($C_{12}E_2$ und $C_{12}E_4$) (Tab. 4.3 und Abb. 4.9-10, 5.10-11).

Die Unwirksamkeit von TBP und DESU auf die Penetration der MG könnte anzeigen, dass MG nicht dieselben Diffusionspfade in der CM nutzte wie Metribuzin und Iprovalicarb. Der Verteilungskoeffizient von MG zwischen CM und Wasser ist bekannt (Tab. 3.2), aber der Verteilungskoeffizient von MG zwischen dem Wachs und dem Wasser ist noch nicht bestimmt worden. CM können isolierte polare Domänen enthalten, die aus Polysacchariden bestehen, so dass die Löslichkeit von MG in Kutin und amorphen Wachsen viel kleiner sein könnte als es der Verteilungskoeffizient von 0,13 erwarten lässt. MG lag vermutlich nur in minimalen Mengen im Wachs gelöst vor und das könnte die Unwirksamkeit von DESU und TBP erklären.

Somit ergibt sich die Frage nach der Natur des alternativen Pfades für MG, der weder wässrig noch wachsartig ist. Gibt es einen dritten alternativen Pfad in der CM? Wie wird die Diffusion von MG in diesem hypothetischen Pfad durch die relativ polaren $C_{12}E_6$ und $C_{12}E_8$ erhöht? Diese Frage kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht gelöst werden. Sie erfordert weitere Aufmerksamkeit und Forschung.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die pflanzliche Kutikularmembran (CM) ist eine mit dem Wachs imprägnierte asymmetrische heterogene Barrieremembran (Polymermembran). An der morphologischen Außenseite der pflanzlichen CM ist eine sehr dünne, partiell kristalline Wachsschicht, die für die hohe Undurchlässigkeit der Kutikula für Wasser und darin gelöste Stoffe verantwortlich ist. Die Kutikula der landlebenden Pflanzen überzieht Blätter und Früchte, um sie vor unkontrolliertem Wasserverlust zu schützen. Bei der Applikation von Pflanzenschutzmitteln, die für ihre Wirksamkeit über in die Blätter aufgenommen werden müssen, bildet die Wachsschicht der Kutikula eine sehr wirksame Transportbarriere, die überwunden werden muss. Dies wird in der Regel dadurch erreicht, indem die Wirkstoffe mit Formulierungshilfsstoffen zusammen angeboten werden.

Diese Formulierungshilfsstoffe haben neben verschiedenen anderen Effekten die Wirkung, dass sie die Barriereigenschaften der kutikulären Wachse herabsetzen und damit die Aufnahmeraten der Wirkstoffe beschleunigen. Daher werden diese Stoffe Akzeleratoren genannt. In dieser Arbeit sollten bestimmte Gesetzmäßigkeiten der Stoffaufnahme durch pflanzliche CM untersucht werden, indem die Beziehungen zwischen verschiedenen Akzeleratoren und dem Transport verschiedener Modellverbindungen gemessen wurden. Die Experimente wurden mit enzymatisch isolierten CM der beiden Arten *Stephanotis* und *Pyrus* untersucht.

Unter Verwendung lipophiler Akzeleratoren unterschiedlicher chemische Beschaffenheit (Dicarbonsäuren, Tertbutylphosphat und Aklhoholethoxylate) konnte gezeigt werden, dass die Mobilität lipophiler ^{14}C -markierter Wirkstoffe (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, Iprovalicarb und Metribuzin) in der CM um das 40-fache erhöht werden kann. Die Wirksamkeit der Akzeleratoren korrelierte mit deren Konzentration in der transportlimitierenden Barriere aus Wachsen. Bei gleichen internen Akzeleratorkonzentrationen hatten die verschiedenen Akzeleratoren sehr unterschiedliche Effekte. Die Wirksamkeit der Akzeleratoren nahm mit zunehmendem Molekulargewicht ab.

Unter Verwendung der beiden polaren Modellverbindungen ^{14}C -Methylglucose und $^{45}\text{CaCl}_2$ wurde untersucht, inwieweit lipophile Akzeleratoren auch die kutikuläre Aufnahme polarer Wirkstoffe beeinflussen können. Im Gegensatz zu ihrer fördernden Wirkung auf den Transport der lipophilen Modellsbstanzten hatten die lipophilen

Akzeleratoren nahezu keine Wirkung auf den Transport der polaren Modellsubstanzen. Dies deutet darauf hin, dass die polaren Stoffe in der Kutikula vorhandene polare Transportpfade nutzen, die weder für lipophile Wirkstoffe noch für lipophile Akzeleratoren von Bedeutung sind. Dieser Befund ist neu und von wichtiger angewandter Bedeutung für die zukünftige Applikation von Pflanzenschutzmitteln. Es gibt lipophile und polare Wirkstoffe aber auch lipophile und polare Pfade in der Kutikula. Diese Erkenntnis sollte in Zukunft bei der Entwicklung von Formulierungen für Pflanzenschutzmittel zur Optimierung der Wirkstoffaufnahme in Nutzpflanzen unbedingt berücksichtigt werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- ABRAHAM, M. H., MCGOWAN, J. C. (1987) The use of characteristic volumes to measure cavity terms in reversed phase liquid chromatography. *Chromatographia* 23: 243-246
- BAUER, H., SCHÖNHERR, J. (1992) Determination of mobilities of organic compounds in plant cuticles and correlation with molar volumes. *Pestic. Sci.* 35: 1-11
- BAUR, P. (1993) Barriereigenschaften pflanzlicher Kutikularmembranen und ihre Beeinflussung durch organische Xenobiotica. Dissertation, TU München
- BAUR, P. (1998) Mechanistic aspects of foliar penetration of agrochemicals and effects of adjuvants. *Rec. Res. Devel. Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2: 809-837
- BAUR, P. (1999) Surfactant effects on cuticular penetration of neutral polar compounds: Dependence on humidity and temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 753-761
- BAUR, P., BUCHHOLZ, A., SCHÖNHERR, J. (1997a) Diffusion in plant cuticles as affected by temperature and size of organic solutes: Similarity and diversity among species. *Plant Cell Environ.* 20: 982-994
- BAUR, P., GRAYSON, B. T., SCHÖNHERR, J. (1999a) Polydisperse ethoxylated fatty alcohol surfactants as accelerators of cuticular penetration. 2. Separation of effects on driving force and mobility and reversibility of surfactant action. *Pestic. Sci.* 55: 831-842
- BAUR, P., GRAYSON, B.T., SCHÖNHERR, J. (1997b) Polydisperse ethoxylated fatty alcohol surfactants as accelerators of cuticular penetration. 1. Effects of ethoxy chain length and size of penetrants. *Pestic. Sci.* 51: 131-152
- BAUR, P., MARZOUK, H., SCHÖNHERR, J., BAUER, H. (1996) Mobilities of organic compounds in plant cuticles as affected by structure and molar volumes of chemicals and plant species. *Planta* 199: 404-412
- BAUR, P., MARZOUK, H., SCHÖNHERR, J. (1999b) Estimation of path lengths for diffusion of organic compounds through leaf cuticles. *Plant Cell Environment* 22: 291-299

- BAUR, P., STULLE, K., UHLIG, B., SCHÖNHERR, J. (1998) Absorption von Strahlung im UV-B bis Blaulichtbereich in Blattkutikeln ausgewählter Nutzpflanzen. *Gartenbauwiss.* 63:145-152
- BUCHHOLZ, A. (1998) Größenselektivität und Temperaturabhängigkeit der Diffusion organischer Verbindungen in der pflanzlichen Kutikular. Dissertation, Universität zu Kiel
- BUCHHOLZ, A., BAUR, P., SCHÖNHERR, J. (1998) Differences among plant species in cuticular permeabilities and solute mobilities are not caused by differential selectivities. *Planta* 206: 322-328
- BUCHHOLZ, A., SCHÖNHERR, J. (2000) Thermodynamic analysis of diffusion of non-electrolytes across plant cuticles: the effects of waxes and plasticisers on the lipophilic pathway. *Planta* 212: 103-111
- BURGHARDT, M., SCHREIBER, L., RIEDERER, M. (1998) Enhancement of the diffusion of active ingredients in barley leaf cuticular wax by monodisperse alcohol ethoxylates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 1593-1602
- CUSSLER, E. L. (1984) Diffusion. Mass transfer in fluid systems. Cambridge Univ. Press, Cambridge
- DUNN III, W. H., GRIGRAS, S., JOHANSSON, E. (1986) Principal component analysis of partition coefficient data: an approach to a new method of partition coefficient estimation. Pp 21-36 in *Partition coefficient: and Estimation*, Dunn, W.J., Block, J.H., Pearlman, R.S. (eds.) Pergamon Press inc. Oxford, England
- GEYER, U., SCHÖNHERR, J. (1990) The effect of environment on permeability and composition of Citrus leaf cuticles: Water permeability of isolated cuticular membranes. *Planta* 180: 147-153
- HOLLOWAY, P. J. (1982) Structure and histochemistry of plant cuticular membranes: An overview. In: Cutler DF, Alvin KL, Price CE. (eds.) *The plant cuticle*, Academic Press, London
- JEFFREE, C. E. (1986) The cuticle, epicuticular waxes and trichomes of plants, with reference to their structure, functions and evolution. In: JUNIPER BE, SOUTHWOOD TRE. (eds.) *Insects and the Plant surface*. Edward Arnold Ltd., London

- KERSTIENS, G. (1996) Cuticular water permeability and its physiological significance. *J. Exp. Bot.* 47: 1813-1832
- KIRKWOOD, R.C. (1987) Uptake and movement of herbicides from plant surfaces and the effects of formulation and environment upon them. In: *Pesticides on plant surfaces*, 1-25, Cottrell, ed., John Wiley und Sons, Chichester, Neu York
- KIRSCH, T., KAFFARNIK, F., RIEDERER, M., SCHREIBER, L. (1997) Cuticular permeability of the three tree species *Prunus laurocerasus* L., *Ginkgo boloba* L. and *Juglans regia* L. – Comparative investigation of the transport properties of intact leaves, isolated cuticles and reconstituted cuticular waxes. *Journal of Experimental Botany* 48: 1035-1045
- KOLATTOKUDY, P. E. (1980) Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science* 208: 990-1000
- LENDZIAN, K. J., KERSTIENS, G. (1991) Sorption and transport of gases and vapors in plant cuticles. *Rev. Environm. Contam. Toxicol.* 121: 65-128
- LIEB, W. R., STEIN, W. D. (1972) The molecular basis of simple diffusion within biological membranes. In: *Current topics in membrane transport*, Vol. 2, Bonner, Kleinzeller, (eds.) Academic Press, New York
- MARTIN, J. T., JUNIPER, B. E. (1970) *The Cuticles of Plants*. London: Edward Arnold
- MARZOUK, H., BAUR, P., SCHÖNHERR, J. (1998) Relative solubilities of bifenoxy and naphthylacetic acid (NAA) in plant cuticles and in selected pure or aqueous glycol adjuvants. *Pestic. Sci.* 53: 278-234
- NOBEL, P. S. (1991) *Physicochemical and environmental plant physiology*. Academic Press, London
- PRICE, C. E. (1980) A review of eth factors influencing the penetration of pesticides through plant leaves. *The Plant Cuticle*, Linnean Society Symposium Series London 10: 241
- RIEDERER, M., BURGHARDT, M., MAYER, S., OBERMEIER, H., SCHÖNHERR, J. (1995) Sorption of monodisperse alcohol ethoxylates and their effects on the mobility of 2,4-D in isolated plant cuticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43:1067-1075

- RIEDERER, M., SCHÖNHERR, J. (1990) Waxes: Effects of surfactants on water permeability of isolated plant cuticles and on the composition of their cuticular waxes. *Pestic. Sci.* 29: 85-94
- RIEDERER, M., SCHREIBER, L. (1995) Waxes: transport barriers of plant cuticles. In: R.J. Hamilton, ed., *Waxes*. pp. 131-156
- SANGSTER, J. (1997) *Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*. John Willey & Sons, Chichester, Toronto
- SCHÖNHERR, J. (1976) Water permeability of isolated cuticular membranes: The effect of cuticular waxes on diffusion of water. *Planta* 131: 159-164
- SCHÖNHERR, J. (1993a) Effects of monodisperse alcoholethoxylates on mobility of 2,4-D in isolated plant cuticles. *Pestic. Sci.* 38: 155-164
- SCHÖNHERR, J. (1993b) Effects of alcohols, glycols and monodisperse ethoxylated alcohols on mobility of 2,4-D in isolated plant cuticles. *Pestic. Sci.* 39: 213-223
- SCHÖNHERR, J. (2000) Calcium chloride ions penetrate plant cuticles via aqueous pores. *Planta* 212: 112-118
- SCHÖNHERR, J. (2002) A mechanistic analysis of penetration of glyphosate salts across stomatous cuticular membranes. *Pestic. Sci.* 58: 343-351
- SCHÖNHERR, J., BAUER, H. (1992) Analysis of effects of surfactants on permeability of plant cuticles. In: *Adjuvants and Agrichemicals*, Vol 2, pp 17-35, FOY, C.L. (eds.) CRC Press, Boca Raton, Florida, USA
- SCHÖNHERR, J., BAUR, P. (1994) Modelling penetration of plant cuticles by crop protection agents and effects of adjuvants on their rates of penetration. *Pestic. Sci.* 42:185-208
- SCHÖNHERR, J., BAUR, P. (1996) Effects of temperature, surfactants and other adjuvants on rates of uptake of organic compounds. G. Kerstiens (Eds.) *Plant Cuticles – An integrated Functional Approach*. BIOS Scientific Publ. Oxford, 134-154
- SCHÖNHERR, J., BAUR, P. (1996a) Cuticle permeability studies- A model for estimating leaching of plant metabolites to leaf surfaces. In: Morris CE, Nicot PC, Ngyen-The C. (eds.) *Aerial plant surface microbiology*. Plenum press, New York

- SCHÖNHERR, J., BAUR, P., BUCHHOLZ, A. (1999) Modelling foliar penetration: its role in optimising pesticide delivery. In Brooks, G.T., Roberts, T.R. (eds.) Pesticide Chemistry and the Bioscience. The Food-Environment Challenge. Royal Society of Chemistry, London pp. 134-151
- SCHÖNHERR, J., RIEDERER, M. (1986) Plant cuticles sorb lipophilic compounds during enzymatic isolation. *Plant Cell Environ.* 9: 459-466
- SCHÖNHERR, J., RIEDERER, M. (1988) Desorption of chemicals from plant cuticles: evidence for asymmetry. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17: 13-19
- SCHÖNHERR, J., RIEDERER, M. (1989) Foliar penetration and accumulation of organic chemicals in plant cuticles. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 108: 1-70
- SCHÖNHERR, J., SCHREIBER, L. (2004) Size selectivity of aqueous pores in astomatous cuticular membranes isolated from *Populus canescens* (Aiton) Sm. Leaves. *Planta* 219: 405-411
- SCHÖNHERR, J., SCHREIBER, L., BUCHHOLZ, A. (2001) Effects of temperature and concentration of the accelerators ethoxylated alcohols, diethyl sebacate and tributyl phosphate on the mobility of [¹⁴C] 2,4-dichlorophenoxy butyric acid in plant cuticles. *Pestic. Sci.* 57: 17-24
- SCHREIBER, L. (1995) A mechanistic approach towards surfactant wax interaction: effects of octaethyleneglycolmonododecylether on sorption and diffusion of organic chemicals in reconstituted cuticular wax of barley leaves. *Pestic. Sci.* 45: 1-11
- SCHREIBER, L., KIRSCH, T., RIEDERER, M. (1996a) Transport properties of cuticular waxes of *Fagus sylvatica* L. and *Picea abies* (L.) Karst. : estimation of size selectivity and tortuosity from diffusion coefficient of aliphatic molecules. *Planta* 198: 104-109
- SCHREIBER, L., RIEDERER, M., SCHORN, K. (1996b) Mobilities of organic compounds in reconstituted cuticular wax of barley leaves: Effects of monodisperse alcohol ethoxylates on diffusion of pentachlorophenol and tetracosanoic acid. *Pestic. Sci.* 48: 117-124
- SCHREIBER, L., SCHÖNHERR, J. (1990) Phase transition and thermal expansion coefficients of plant cuticles: The effect of temperature on structure and function. *Planta* 182: 186-193

- SCHREIBER, L., SCHÖNHERR, J. (1993) Mobilities of organic compounds in cuticular wax of barley leaves: determination of diffusion coefficients. *Pestic. Sci.* 38: 353-361
- SIMANOVA, E. (2003) Sorption of n-alkyl esters and alcohol ethoxylates into reconstituted plant waxes and their effects on herbicide mobility. Dissertation Universität Bonn
- SIMANOVA, E., SHI, T., SCHÖNHERR, J., SCHREIBER, L. (2004) Sorption in reconstituted wax of homologous series of n-alkyl esters of suberate and sebacate and their effects on mobility of 2,4-DB. *Pestic. Sci.* (im Druck)
- SOMMER, W., WICKE, W., MAYER, D. (1982) Weichmacher. In: Bd. 24: 249-380, Ullmanns Lexikon Chemie
- STOCK, D., HOLLOWAY, P. J. (1993) Possible mechanisms for surfactant induced foliar uptake of agrochemicals. *Pestic. Sci.* 38: 165-177
- STOCK, D., HOLLOWAY, P. J., GRAYSON, B. T., WHITEHOUSE, P. (1993) Development of a predictive uptake model to rationalise selection of polyoxyethylene surfactant adjuvants for foliage-applied agrochemicals. *Pestic. Sci.* 37:233-245
- TYREE ET, M. T., SCHERBATSKOY, T., TABOR, C. A. (1990) Leaf cuticles behave as asymmetric membranes. Evidence from the measurement of diffusion potentials. *Plant Physiol.* 92: 103-111
- VIETH, W. R. (1991) Diffusion in and through polymers. Carl Hanser, München Wien New York

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PROF. DR. J. SCHÖNHERR und Herrn PROF. DR. L. SCHREIBER für die Betreuung während meiner Zeit als Doktorand, der interessanten Themenstellung, den ausgezeichneten Arbeitsbedingungen, den wertvollen Diskussionen und der Überlassung nicht veröffentlichter Ergebnisse.

Für die vielseitige Hilfe und Unterstützung besonders bei Experimenten und Datenauswertungen und hilfreichen Diskussionen und der Korrektur der vorliegenden Arbeit möchte ich Frau P. CRONFELD und Herrn K. CRONFELD vielmals danken

Für die vielfältige freundliche Hilfe bin ich Herrn PROF. DR. G. BÜNEMANN, Herrn P. GRIMM-WETZEL, Frau K. LADER, Frau K. SCHULZE und Herrn Dr. T. SCHLEGEL dankbar.

Für die freundschaftliche Zusammenarbeit möchte ich ebenfalls der Mitdotorandin Frau E. SIMANOVA danken.

Für die Korrektur dieser Arbeit möchte ich Frau SABINE HERMANN auch herzlich danken.

Für die Unterstützung während der ganzen Zeit meiner Doktorarbeit danke ich meiner Frau SHENGWEI WIE, meiner Tochter und meinen Eltern.

Die Arbeit wurde von Deutschen Forschungsgemeinschaft (SCHO 197/13) unterschützt, auch dafür möchte ich ihr meinen Dank sagen.

An Eides Statt versichere ich, dass ich diese Arbeit

„Untersuchungen zur Wirkung ausgewählter Akzeleratoren auf die Mobilität nichtionischer Wirkstoffe unterschiedlicher Polarität in isolierten Kutikularmembranen“

unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Lukas Schreiber und Herrn Prof. Dr. Jörg Schönherr als Koreferent selbst und ohne jegliche unerlaubte Hilfe angefertigt habe, dass diese oder eine ähnliche Arbeit noch an keiner anderen Stelle zur Prüfung vorgelegen hat und dass sie an der nachstehend aufgeführten Stelle vollständig veröffentlicht worden ist.

Bonn, den

.....

(Tuansheng Shi)

Lebenslauf

Personliche Daten

Name: Tuansheng Shi
Geburtsdatum: 14. April 1962
Geburtsort: Wugong Provinz Shaanxi VR. China
Staatsangehörigkeit: Chinesisch

Schulbildung

1968 - 1973 Besuch der Grundschule in Xiaoma Wugong
1973 - 1979 Besuch des Gymnasiums in Nanren Wugong

Studium

09. 1979 - 07. 1983 Studium der Forstwissenschaft (Diplom) an der Forstwissenschaftliche Fakultät in der Nordwestlichen Technischer und Wissenschaftlicher Universität für Land- und Forstwirtschaft in der VR. China

04. 1998 - 09. 1998 Besuch als Stipendiat der DAAD am Deutsch-Sprachkurs im Goethe-Institut in Göttingen, DSH-Prüfung der Uni-Göttingen bestanden;

10. 1998 - 03. 2001 Studium (Magister) als Stipendiat der DAAD in Forstwissenschaftlichen Fakultät der Uni-Göttingen, Studienfach: (Aufbaustudiengang) tropische und subtropische Forstwissenschaft. Im Waldbau-Institut Magisterarbeit (Thema: Untersuchungen über den Einfluß der Standortbedingungen und der Begründungsverfahren auf das Wachstum von Metasequoia-Jungbeständen in der VR. China). Betreuer: Herr Prof. Dr. B. von Lüpke und Herr Dr. N. Bartsch.

03. 2003 - 11. 2004 Promotion in der Abteilung Ökophysiologie im Botanischen Institut der Fachkommission Biologie der

Wissenschaftliche Tätigkeit

07. 1983 - 03. 1998 Tätigkeit als Dozent am Institut für Waldbau und Obstbau der Forst-Universität in der Provinz ShaanXi YangLing, VR. China.
08. 2001. - 10. 2004 Arbeit als Teilnehmer des Forschungsprojektes der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SCHO 197/13) im Institut für Gemüsebau und Obstbau, Abteilung Obstbau, Universität Hannover.

Publikationen:

1. Šimáňová E, Shi T, Schönherr J, Schreiber L (2004) Sorption in reconstituted waxes of homologous series of alcohol ethoxylates and n-alkyl esters of suberate and sebacate and their effects on mobility of 2,4-dichlorophenoxybutyric acid. Pest Management Science (in press)
2. Shi T, Šimáňová E, Schönherr J, Schreiber L (2004) Effects of accelerators on mobility of ¹⁴C-2,4-dichlorophenoxy butyric acid in plant cuticles depends on type and concentration of accelerator. Journal of Agricultural and Food Chemistry (submitted)
3. Shi T, Schönherr J, Schreiber L (2004) Accelerators increase permeability of cuticles for the lipophilic solutes metribuzin and iprovalicarb but not for hydrophilic methyl glucose. Journal of Agricultural and Food Chemistry (submitted)