

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Für die Versuche wurden folgende Geräte verwendet:

Autoklav	Guwina Hofmann, Berlin
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Dermatom	Aesculap, Tuttlingen
Differential Scanning Calorimeter DSC 821	Mettler Toledo, Gießen
Elektrophorese-Zubehör	Biometa, Göttingen
Filtrationseinheit Millipore®	Millipore-Waters, Eschborn
Fraktionssammler RF 3/SMTS 5000	Roth, Karlsruhe
Franz-Zelle, Ø9mm, Durchfluss	Crown Scientific, Somerville, NJ
Frequenz-Analysator Typ ZVR	Fa. Rohde & Schwarz, München
Gefriermikrotom Frigocut® 2800 N	Leica, Bensheim
Heißhomogenisator Micron Lab 40	APV Gaulin, Lübeck
HPLC LaChrom –System	Merck-Hitachi, Darmstadt
Autosampler L-7200	
Interface L-7000	
Pumpe L-7100	
UV-Detektor L-7400	
Merck System-Manager-Software	
Laserdiffraktometer Coulter LS 230	Coulter, Miami, FL
Magnetrührer IKAMAG® RCT	Janke & Kunkel, Staufen
Orthoplan-Großfeldmikroskop	Fa. Leitz, Wetzlar
Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Jena
PH-Meter 766 Calimatic	Knick, Nürnberg
Photonenkorrelationsspektroskop Zetasizer 4	Malvern Instruments, Malvern, UK
Peristaltik-Kassentenpumpe Sarah®	Crown Scientific, Somerville, NJ
Pipetten Eppendorf Reference®	Eppendorf, Hamburg

Pipettierhilfe Pipetboy®	Integra Bioscience, Fernwald
Schüttler IKA® MTS 2	Janke & Kunkel, Staufen
Sterilarbeitsbank LaminAir®	Heraeus, Hanau
Trockenschrank UT5042EK	Heraeus, Hanau
Ultraschallbad Sonorex® RK 100	Bandelin, Berlin
Ultra-Turrax IKA® T25	Janke & Kunkel, Staufen
Vakuumpumpe Universal Vacuum System	Life Science, Frankfurt
Vakuum-Zentrifuge Speed-Vac® SC 100A	Savant, Bethesda, MD
Wasser-Deionisierungsanlage Milli-Q®	Millipore-Waters, Eschborn
Zentrifugen	
Megafuge® 1.0R	Heraeus, Hanau
Eppendorf 5415 C	Eppendorf, Hamburg

3.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Acetonitril, HPLC Qualität	Merck, Darmstadt
Amphotericin B	Clonetics, San Diego, CA
Betamethason	Sigma, Deisenhofen
Betamethason-17-valerat	Sigma, Deisenhofen
Betamethason-21-valerat	Sigma, Deisenhofen
Betnesol® V Creme	Glaxo Wellcome, Bad Oldesloe
Ceramid III	Degussa Golschmidt Personal Care, Essen
Cholesterol	Sigma, Deisenhofen
Compritol® 888 ATO	Gattefossé, Weil a. R
Dynasan® 112	Sasol Germany GmbH, Witten
Dynasan® 114	Sasol Germany GmbH, Witten
Dynasan® 116	Sasol Germany GmbH, Witten
Dynasan® 118	Sasol Germany GmbH, Witten
Einbettmedium	Leica, Bensheim
EppendorfgefäÙe Safe-Lock (0,5, 1,5, 2ml)	Merck/Eurolob, Berlin
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
Filtermembranen, Nylon, 0,22 µm, Ø 47 mm	Sigma/Aldrich, Deisenhofen

Material und Methoden

Geleol[®]

HPLC-Zubehör

Säule LiChroCart[®] (125 mm/4 mm ID)

Vorsäule LiChroCart[®] (4 mm/4 mm)

Füllmaterial LiChrospher[®] (RP-18/5 µm)

Imwitor[®] 900

Lipoid S 75

Minimum Essential Medium (MEME)

Methanol

Monosteol[®]

Miglyol[®] 812

Natriumcholat

Natriumfluorid

Pipettenspitzen Eppendorf

Poloxamer 188

Polysorbat 80

Precirol[®] ATO 5

Prednicarbat

Prednisolon

Reagenzgläser, Pyrex, 16 x 100 mm mit Deckel

Rekonstruierte Epidermis Skinethic[®]

Softisan[®] 601

Sterilfilter Minisart[®] 0,22 µm

Tesafilm[®]

Tiegel

Zellkulturflaschen (25 cm² und 75 cm²)

Glasbehälter für SLN (Injektionsflasche, 20mL)

Bördelkappe, Gummistopfen

Basiscreme

Gattefossé, Weil a. R.

Merck, Darmstadt

Sasol Germany GmbH, Witten

Lipoid KG, Ludwigshafen

Clonetics, San Diego, CA

Merck, Darmstadt

Gattefossé, Weil a. R.

Caelo, Minden

Sigma, Deisenhofen

Merck, Darmstadt

Eppendorf, Hamburg

BASF, Ludwigshafen

Fa. Caelo, Hilden

Gattefossé, Frankreich

Aventis Pharma, Bad Soden

Aventis Pharma, Bad Soden

Dunn Labortechnik, Ansbach

Skinethic, Nizza, Frankreich

Gattefossé, Weil a. R.

Sartorius, Göttingen

Beiersdorf, Hamburg

Mettler, Gießen

Renner, Dannstadt

PACKSYS, Starnberg

Iphas, Würselen

Caelo, Hilden

3.1.3 Nährmedien und Lösungen

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):

0,2 g/l KCl

8,0 g/l NaCl

0,2 g/l KH_2PO_4

1,44 g/l Na_2HPO_4 , pH 7,4

Akzeptormedium der Permeation-/Penetrationsuntersuchungen:

MEME

0,1% Glucose

2 mM Glutamin

50 ng/ml Amphotericin B

20 µg/ml Gentamicinsulfat

3.2 Herstellung von Festen Lipid-Nanopartikeln

Mit BMV beladene Feste Lipid-Nanopartikel (BMV-SLN) wurden mit dem Heißhomogenisations-Verfahren hergestellt, da der Wirkstoff ausreichend thermostabil ist. BMV wurde im geschmolzenen Lipid gelöst oder dispergiert. Die wirkstoffhaltige Lipidschmelze wurde anschließend in eine wässrige Tensidlösung von gleicher Temperatur gegeben. Durch Rühren mit einem Rotor-Stator-Rührer (Ultra-Turrax, 8000U/min, 30s) wurde eine O/W-Voremulsion hergestellt. Durch Hochdruckhomogenisation in einem Kolben-Spalt-Homogenisator (LAB 40, Fa. APV, Standardbedingungen: 500bar, 3 Zyklen) bei einer Temperatur, die etwa 15°C oberhalb des Schmelzpunktes des Lipides liegen sollte entstand eine O/W-Nanoemulsion. Diese wurde in silanisierte Glasbehälter gefüllt, verschlossen und unmittelbar in einem Wasserbad auf 22°C abgekühlt. Beim Abkühlen bildeten sich durch Rekristallisation Feste Lipid-Nanopartikel. Die Lipid-Nanodispersionen wurden anschließend bei einer Temperatur von 8°C aufbewahrt. Für Penetrationsexperimente eingesetzte Nanoemulsionen (NE) wurden ebenfalls unter den oben beschriebenen Bedingungen hergestellt.

3.2.1 Charakterisierung der Hilfsstoffe

Die Zusammensetzung der Lipidmatrix muss so gewählt werden, dass ein möglichst hohes Lösungsvermögen für den Wirkstoff gegeben ist. Tenside sind als Stabilisatoren für Lipid-Nanodispersionen unverzichtbar. Die Art und Konzentration des ausgewählten Lipids und Tensids bestimmen entscheidend die physikalische Stabilität der Dispersionen.

-Compritol® 888 ATO

Compritol® 888 ATO (Compritol) ist ein Ester des Glycerols mit Behensäure (C22) und besteht aus Mono- (12 – 18%), Di- (52%) und Triglyceriden (28 – 32%). Neben der Behensäure (>85%) sind C16 – C20 Fettsäuren vorhanden. Auf Grund des Gehalts an Partialglyceriden weist die Substanz schwach amphiphile Eigenschaften auf, welche vorteilhaft für eine Arzneistoffinkorporation sein können. Das Lipid ist ein wachsartiges, weißes Pulver. Compritol® 888 ATO wird in der Tablettierung als Schmiermittel und als Lipidmatrix zur Retardierung der Freisetzung von Arzneistoffen nach peroraler Applikation eingesetzt. In kosmetischen Produkten dient das Lipid als Konsistenzgeber in Emulsionen und als Kompaktiermittel in Pudern. Der Schmelzbereich liegt zwischen 69 und 74°C, der HLB-Wert beträgt etwa 2.

-Precirol® ATO 5

Precirol® ATO 5 (Precirol) stellt ein Gemisch aus Glycerol-Palmitinsäure- und Stearinsäure-estern dar und setzt sich aus Mono- (8 - 17%), Di- (54%) und Triglyceriden (29 - 38%) des Glycerolpalmitats und -stearats (~ 40% Monoglyceride) zusammen. Im Gegensatz zu Compritol ist Precirol den diaciden Glyceriden zuzuordnen. Palmitin- und Stearinsäure kommen auch in den Glyceriden der Depotfette von Säugetieren vor. Die Bestandteile von Precirol sind auch in vielen anderen natürlichen Fetten enthalten. Das Lipid ist ein feines wachsartiges Pulver, das in sprühgetrockneter Form vorliegt. Es wird als Tablettierhilfsstoff eingesetzt und auch in der Lebensmittelindustrie verwendet. F. 53 - 57°C, HLB-Wert ≈ 2

-Geleol®

Geleol® (Geleol) ist ein Glycerolmonostearat mit einem Monoestergehalt von mindestens 40% und höchstens 50%. Das Lipid liegt als wachsartige Pastillen vor. Es ist unlöslich in Wasser. Eingesetzt wird das Lipid als nichtionische, nicht

selbstemulgierende Grundlage für topische Arzneizubereitungen. Es eignet sich in Konzentration von 3 - 10% auch als Verdickungsmittel zur Konsistenzeinstellung für Emulsionen und Lotionen. F. 55 -59°C, HLB-Wert \approx 3 - 4

-Imwitor® 900

Imwitor® 900 (Imwitor) ist ein diacides Mischglycerid aus Palmitin- und Stearinsäure. Der hohe Anteil an Monoglyceriden (mindestens 40%) läßt dieses Lipid als sehr geeignet zur Wirkstoffinkorporierung erscheinen. Das Lipid ist ein weißes, wachstypisches Pulver und wird als Emulgator, Koemulgator und Konsistenzgeber in Dermatika und auch zur Herstellung von Lebensmitteln eingesetzt. F. 56 - 61°C, HLB-Wert \approx 4

-Softisan® 601

Softisan® 601 (Softisan) ist eine Mischung von Tri- und Partialglyceriden natürlicher Fettsäuren mit hautverträglichen nichtionischen Emulgatoren. Das Lipid ist eine weiße, schmalzartige Masse und in warmem Wasser dispergierbar. Es besitzt eine gute Haut- und Schleimhautverträglichkeit ohne Kontaktallergenität (Meerschweinchenversuch). Softisan® 601 dient als gebrauchsfertige Salben- bzw. Emulsionsgrundlage für pharmazeutische und kosmetische Cremes. In Kombination mit Softisan® 378 wird es z.B. als Grundlage für Steroidcremes angewendet (Fiedler, 1996). F. 40 - 44°C.

-Monosteol®

Monosteol® (Monsteol), ein Propylenglycolmonosterat mit einem Monoestergehalt von mindestens 50% (Ph. Eur.), ist eine weiße, feste Masse, die als wachstypische Pastillen vorliegt, und ist in der Wärme leicht in Wasser dispergierbar. Eingesetzt wird das Lipid als Verdickungsmittel zur Konsistenzeinstellung von Emulsionen und Lotionen in Konzentration von 5 - 25%. F. 33 - 36°, HLB-Wert \approx 4.

-Miglyol® 812

Miglyol® 812 (Miglyol) ist ein bei Raum- und Kühlschranktemperatur (4 - 8°C) flüssiges Triglycerid aus gesättigten C₈- und C₁₀- Fettsäuren. Es weist eine niedrige Viskosität (280 - 320mPas) und eine Dichte bei 20°C zwischen 0,945 und 0,955 g/ml auf. Miglyol® 812 dient bei peroralen Arzneiformen als Vehikel für Suspensionen,

Lösungen und Weichgelatinekapselformen. Es wird auch als Hautöl und Lösungsmittel verwendet (Fiedler, 1996). Miglyol[®] 812 wurde als Lipidphase in NE ausgewählt, die als Referenz-Zubereitung eingesetzt wurde.

-Poloxamer 188

Poloxamer 188 ist ein flocken- oder pulverförmiges Produkt und gehört zur Gruppe der nichtionischen Tenside. Der HLB-Wert beträgt ca. 29. Poloxamere sind Blockpolymere, die aus zwei Polyoxyethylenketten und einer Polyoxypropylenkette aufgebaut sind. Diese polymeren Tenside werden als Solubilisatoren, Emulgatoren, Netzmittel, Dispergier- und Verdickungsmittel eingesetzt. Zu den pharmazeutischen Anwendungen zählt vor allem der Einsatz als Emulgator in parenteralen Fettemulsionen, hauptsächlich wegen des geringen Schaumbildungsvermögens. Wegen seiner eingeschränkten Molekularbewegung zeigt Poloxamer 188 keine eindeutige kritische Mizellbildungskonzentration (Bauer, 1990).

-Polysorbat 80

Polysorbat 80 (Tween 80, Polyoxyethylen-20-sorbitanmonooleat) ist eine klare, gelb gefärbte, viskose Flüssigkeit. Polysorbat 80 ist in Wasser und Ethanol gut löslich, in Mineralöl und Paraffinöl dagegen praktisch unlöslich. Polysorbat 80 besitzt einen HLB-Wert von 15 und wird als nichtionischer O/W-Emulgator in Salben und Cremes sowie als Lösungsvermittler verwendet. Aufgrund des Ölsäurerestes ist es anfällig gegenüber Autoxidation und sollte luftdicht verschlossen sowie lichtgeschützt aufbewahrt werden. Von der Humanhaut und dem Kaninchenauge wird das Tensid ohne Irritationen gut vertragen. Die Erhöhung der physikalischen Stabilität von SLN-Dispersionen durch Polysorbat 80 ist auf eine sterische Stabilisierung zurückzuführen, die auf Entropie- und Enthalpieeffekte zurückzuführen ist. Polysorbat 80 wird auch als Penetration-Enhancer eingesetzt (Nokhodchi et al, 2003).

3.3 Charakterisierung der Festen Lipid-Nanopartikeln

3.3.1 Laserdiffraktometrie

Die Laserdiffraktometrie (LD) dient zur Charakterisierung der Partikelgröße der SLN bzw. NE-Dispersionen. Die LD beruht auf der Lichtbeugung an dispergierten Partikeln. Vereinfacht dargestellt führen kleine Partikel auf Grund ihrer stark gekrümmten Oberfläche zu großen Beugungswinkeln. Dadurch nimmt die Intensität des gebeugten Laserlichts auf den äußeren Ringsegmenten des Detektors zu. Die Partikelgrößenverteilung kann aus den Beugungsspektren berechnet werden. Mittels LD können Partikelgrößen im Bereich von 0,1 bis 2000µm erfasst werden. Das Laserdiffraktometer Coulter LS 230 läßt mittels PIDS (Polarisation Intensity Differential Scattering)-Technologie Größenmessungen ab 40nm zu. Die Volumenverteilung der Partikel werden als Durchmesser angegeben, z.B. LD (50%) oder LD (95%), d.h. 50% bzw. 95% der gemessenen Partikel weisen einen kleineren oder gleichen Durchmesser auf als den genannten.

3.3.2 Photonenkorrelationsspektroskopie

Die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) ist ein dynamisches Lichtstreuverfahren, mit dem Partikelgrößen zwischen 3nm und 5µm bestimmt werden können. Die Methode nutzt die Streuung von Laserlicht an dispergierten Teilchen, die auf Grund der Brownschen Molekularbewegung der Moleküle des Dispersionsmittels diffundieren. Die gemessene Streulichtintensität ändert sich zeitabhängig durch die Bewegung der Teilchen. Da kleine Partikel eine höhere Diffusionsgeschwindigkeit aufweisen als größere, sind Intensitätsschwankungen bei kleinen Teilchen stärker ausgeprägt. Neben dem mittleren Partikeldurchmesser kann die Partikelgrößenverteilung mit PCS bestimmt werden. Bei einem Polydispersitätsindex (PI) bis 0,06 kann von einer monodispersen Verteilung ausgegangen werden. PI-Werte zwischen 0,1 und 0,2 charakterisieren eine enge, Werte zwischen 0,25 und 0,50 eine breite Verteilung. Größere PI-Werte als 0,50 weisen auf eine sehr breite Verteilung der Partikel hin, die nicht mehr auswertbar ist.

Die Probe wurden mit destilliertem Wasser auf eine empfohlene Streulichtintensität verdünnt, um Mehrfachstreuungen zu verringern. Die Messungen (Zetasizer 4)

wurden bei einem Winkel von 90° und bei einer Temperatur von 24 – 26°C durchgeführt.

3.3.3 Dynamische Differenzkalorimetrie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Dynamische Wärmestrom-Differenzkalorimetrie (DSC) als thermoanalytisches Verfahren eingesetzt. Es erfasst durch Messung der Wärmeströme zwischen der zu untersuchenden Probe und einer Referenz die durch thermische Effekte in der Probe, wie z.B. Schmelzen oder Kristallisieren, verursachten Temperaturänderungen. Endotherme und exotherme Vorgänge können über die Differenz der Wärmeströme, die in die Probe und Referenz fließen, erkannt und gemessen werden. Mit diesem Verfahren wurden Schmelzverhalten und Kristallisationsgrad des Lipides in Lipid-Nanodispersionen untersucht. So kann festgestellt werden, ob das Lipid nach der Hochdruckhomogenisation beim Abkühlen rekristallisiert und somit feste Lipid-Nanopartikeln vorliegen. Aus dem Thermogramm kann die zum Aufschmelzen der kristallinen Anteile benötigte Energie, die Schmelzenthalpie, durch Integration des endothermen Peaks ermittelt werden. Zusätzlich kann der Kristallinitätsgrad der Lipid-Nanopartikel bestimmt werden. Hierzu wird die Schmelzenthalpie der SLN-Dispersion mit derjenigen des Ausgangsmaterials verglichen.

$$\text{Kristallisationsgrad (\%)} = \frac{\text{Enthalpie (J/g) SLN-Dispersion}}{\text{Enthalpie (J/g) Bulkmaterial}}$$

Bei diesem Verfahren zur Bestimmung des Kristallinitätsgrades ist kritisch anzumerken, daß das Schmelzverhalten und die Schmelzenthalpie des Lipides in den Dispersionen insbesondere durch die geringe Partikelgröße, das zugesetzte Tensid und den inkorporierten Wirkstoff im Vergleich zum reinen Bulkmaterial bereits verändert sein wird.

Die Messungen erfolgte mit einer Mettler Toledo DSC 821e. Die Proben (ca. 10 - 20µl) wurden in einen 40µl Aluminiumtiegel eingewogen und mit einem Deckel verschweißt. Als Referenz diente ein leerer Tiegel. Die Aufheizrate betrug 5 K/min, der Messbereich lag zwischen – 5°C und 85°C, der Ofen wurde mit Stickstoff (80 ml/min) gespült.

3.3.4 Lichtmikroskopie

Im Gegensatz zu PCS und LD gibt die mit Lichtmikroskopie direkte Informationen über Form und Größe von Partikeln im Mikrometerbereich. Neben den Wirkstoff-Kristallen können auch Aggregate von Lipid-Nanopartikeln leicht erkannt werden. Die SLN-Dispersionen wurden nach Verdünnung mit destilliertem Wasser bei 160-facher Vergrößerung mit einem Orthoplan-Großfeldmikroskop untersucht.

3.3.5 Bestimmung der chemischen Stabilität von BMV-SLN

Die chemische Stabilität von BMV sollte nach Einarbeitung der SLN-Dispersion bestimmt werden. Hierzu wurde die Dispersion mit destilliertem Wasser 1 : 200 verdünnt. 50µl der verdünnten Probe wurden nach Zugabe von 30µl einer Lösung des Internen Standards PD zweimal mit je 1 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden eingedampft und in 100µl Methanol aufgenommen. Mittels HPLC-Analytik (s. 2.4.1) wurde der Gehalt an BMV bestimmt.

3.3.6 Parelektrische Spektroskopie

Die Messung erfolgte im Institut für Experimentalphysik, Fachbereich Physik FU Berlin.

Für eine Erklärung der Ergebnisse der Penetrationsuntersuchungen wurde die Parelektrische Spektroskopie (PS) eingesetzt, um die Verteilung des Wirkstoffs in der Lipidmatrix bzw. eine Assoziation des Wirkstoffs an der Partikeloberfläche erkennen zu werden.

Ein Frequenz-Analysator (Typ ZVR der Fa. Rohde & Schwarz, München) sendet mit einstellbarer Hochfrequenz eine Welle in eine Koaxialleitung, deren offenes Ende zwischen Innen- und Außenleiter einen Kondensator bildet. Taucht man diesen Kondensator in die Messprobe, so wird die hinlaufende Welle reflektiert und die Änderungen in Betrag und Phase der reflektierten Welle lassen die Berechnung von Dispersion und Absorption der Dielektrizitätskonstanten der Messprobe zu.

Im Analysator werden hin- und rücklaufende Welle verglichen und ein Auswerteprogramm stellt die beiden Größen Dipoldichte $\Delta\epsilon$ und Dipolbeweglichkeit

f_0 zur Verfügung. Die Abtastung des interessierenden Frequenzbereichs (0,1...100) MHz geschieht in jeweils 200 logarithmisch äquidistanten Schritten rechnergesteuert. Die Proben können durch einen geschlossenen Wasserkreislauf im Bereich (1,0...99,0)°C auf jeweils +/- 0,2°C temperaturstabil gehalten werden. Die Kombination aus Frequenz-Analysator und Steuer-/Auswerterechner muss aus den gemessenen Änderungen des Reflexionsfaktors der hinlaufenden Welle am Substanz-gefüllten Kondensator für jede der 201 Messfrequenzen f die Dispersion $\epsilon'(f)$ und die Absorption $\epsilon''(f)$ liefern. Dazu sind drei Eichungen, nämlich mit Luft, destilliertem Wasser und isotonischer NaCl-Lösung mit deren bekannter elektrischer Leitfähigkeit von $\sigma = 0,15 \text{ S m}^{-1}$ nötig.

-Anpass-Parameter in den DEBYE'schen Gleichungen

Die folgende Abb. 3.1 zeigt den Verlauf der elektrischen Dispersion $\epsilon'(f)$ und der elektrischen Absorption $\epsilon''(f)$ für eine konstante Temperatur T und eine konstante Wirkstoffkonzentration c :

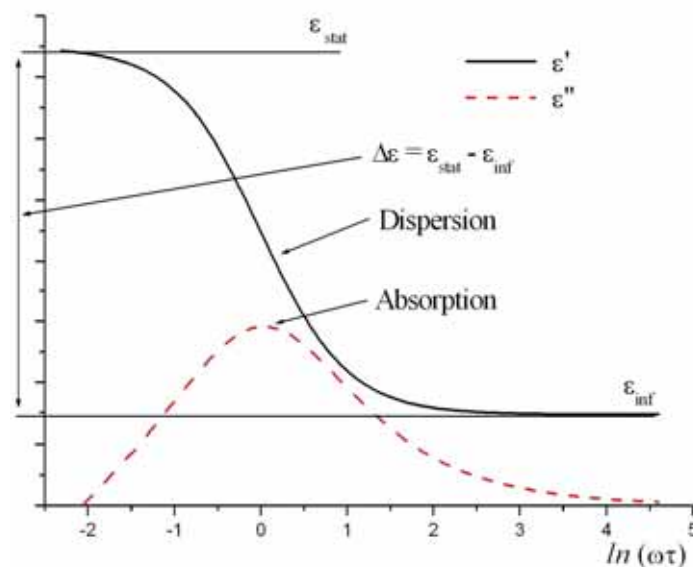


Abb. 3.1
Parelektrische Spektroskopie: Registrierte Parameter

In dieser Darstellung wurde eine elektrische Leitfähigkeit $\sigma = 0$ angenommen. Die beiden relevanten Parameter sind Beweglichkeit f_0 und Dichte $\Delta\epsilon$ der permanenten Dipolmomente. Der konstante Beitrag ϵ_∞ gibt die Reaktion der induzierten

Dipolmomente wieder, der hier nicht interessiert (dieser Beitrag nimmt erst im Bereich von ca. 10^{14} Hz auf den Wert $\varepsilon_{\infty} = 1$ ab).

Beide Kurvenverläufe $\varepsilon'(f)$ und $\varepsilon''(f)$ werden durch die DEBYE'schen Gleichungen beschrieben. Wir nennen die unabhängige Variable $x = \ln(f / \text{MHz})$ und den Anpass-Parameter $x_0 = \ln(f_0 / \text{MHz})$. Den im Absorptionsteil enthaltenen Summand $\sigma / \varepsilon_0 \cdot \omega$ schreiben wir mit $\omega = 2\pi \cdot f$ und ε_0 als der Influenzkonstanten in der Form

$$\sigma / \varepsilon_0 \cdot \omega = 18\,000 \cdot (\sigma / \text{Sm}^{-1}) \cdot e^{-x} = s \cdot e^{-x}$$

und finden dann die DEBYE'schen Gleichungen mit ihren vier Anpass-Parametern in der Form

$$\varepsilon'(x) = \varepsilon_{\infty} + \Delta\varepsilon / (1 + e^{2(x-x_0)}), \quad \varepsilon''(x) = s \cdot e^{-x} + \Delta\varepsilon \cdot e^{x-x_0} / (1 + e^{2(x-x_0)}).$$

Es waren also aus den 201 Messwerten die folgenden vier Parameter zu bestimmen

:

ε_{∞}	Beitrag der induzierten Dipolmomente	- für uns uninteressant,
σ	Beitrag der elektrischen Leitfähigkeit	- für uns uninteressant,
$\Delta\varepsilon$	Dichte der permanenten Dipole	- wichtig für uns,
$f_0 = e^{x_0}$	Beweglichkeit der permanenten Dipole	- wichtig für uns

-Interpretation der c- abhängigen Größen $f_0(c)$ und $\Delta\varepsilon(c)$

Aus der EINSTEIN-DEBYE-Relation als Interpretation der Dipolbeweglichkeit folgt für die Größe f_0 die Proportionalität $f_0 \sim 1/m$, m = Masse der Dipolträger. Hätte man bei Wirkstoffkonzentration $c = 0$ nur die Massen m_0 der SLN als Dipolträger, so würdet man eine maximale Beweglichkeit $f_{0,\text{max}}$ erwarten. Für Werte $c > 0$ mit dann die Dipole tragenden Massen $m > m_0$ sollte die Messung dann Werte der Beweglichkeit $f_0(c) < f_{0,\text{max}}$ liefern. Dies setzt voraus, dass sich die Wirkstoffe innerhalb der SLN befinden, also lediglich die Massenzunahme $m_0 \rightarrow m > m_0$ für die Änderungen der Dipolbeweglichkeit verantwortlich ist. Da aber mit steigenden Werten c die Abhängigkeit $f_0 = f_0(c)$ ein Maximum durchläuft, musste dieses einfache Modell verlassen werden.

3.4 HPLC-Analytik für Betamethason-17-valerat

3.4.1 Methodenbeschreibung

Die BMV-Konzentrationen wurden mit Hilfe der Reversed-Phase-Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (RP-HPLC) bestimmt. Milli-Q[®] Wasser, das der Elution diente, wurde vor Gebrauch durch einen Membranfilter (0,22µm) vakuumfiltriert und anschließend im Ultraschallbad (30min) entgast. Acetonitril wurde ebenfalls 30min entgast. Die in Methanol aufgenommenen Proben wurden über eine Niederdruck-Gradientenelution an einer RP18/5µm – Säule chromatographisch gereinigt. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten der innerhalb von 25min von 80 : 20 v/v (Acetonitril : Wasser) zu 100% Acetonitril wechselte. Die Flussrate betrug 1 ml/min, die Detektion von BMV erfolgte mittels UV-Absorption bei 254nm. Die Auswertung erfolgte über die Integration der Peakflächen mit dem HPLC System Manager (HSM 32[®]) anhand von PD als internem Standard.

3.4.2 Herstellung der Kalibrierung – Stammlösungen und Ermittlung der Eichwerte

Zur Kalibrierung der BMV-Analytik wurden jeweils 3 unabhängig voneinander eingewogene Stammlösungen zur Herstellung von Kalibratoren hergestellt. 2,38mg BMV wurden in jeweils 5ml Methanol gelöst, so dass Stammlösungen mit 10⁻³M entstanden. Die Stammlösungen wurden mit Methanol so verdünnt, dass folgende Kalibratoren entstanden: 4,77, 3,57, 2,38, 1,19 und 0,48 µg/ml, die der Berechnung der Probenkonzentration an BMV zugrunde lagen. Für den Proben-internen Standard PD wurden externe Kalibrierungsreihen nach dem für BMV-beschriebenen Verfahren hergestellt.

3.4.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze gilt für qualitative Analysen und gibt die niedrigste Konzentration einer Substanz an, die mit dem Verfahren noch zuverlässig nachgewiesen werden kann. Die Bestimmungsgrenze gilt für quantitative Bestimmungen und ist die niedrigste Masse, die unter den angegebenen Analysenbedingungen in dem vorliegenden Material mit akzeptabler Präzision und

Richtigkeit noch bestimmt werden kann. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von BMV wurden anhand der Kalibriergeraden ermittelt. Sie betragen 119ng BMV/ml und 4177ng BMV/ml.

3.4.4 Überprüfung der Anwendbarkeit des internen Standard

Da der freie Alkohol PD (log P: 1,69) hydrophiler als BMV (log P: 3,98) ist, ist es theoretisch denkbar, dass PD im Vergleich zu BMV schlechter aus der Wasserphase extrahierbar ist. Zur Überprüfung, ob der interne Standard PD zur Konzentrationsbestimmung von BMV aus biologischen Proben geeignet ist, wurde die methanolische Lösung unterschiedlicher Konzentrationen von PD entweder direkt oder nach Extraktion aus PBS analysiert. Wie aus Abb. 3.2 jedoch zu entnehmen ist, ist PD gut extrahierbar und zeigt eine ausreichende Wiederfindung. Somit ist PD als interner Standard für die BMV-Analytik gut geeignet.

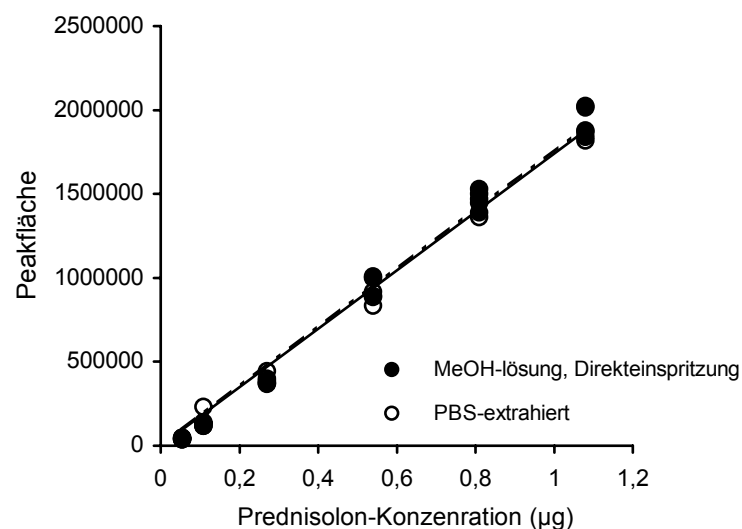


Abb. 3.2
Vergleich der PD-Kalibriergeraden mit oder ohne Extraktion aus PBS

3.4.5 Qualitätsparameter der Analytik

Zur Überprüfung der Qualität des analytischen Verfahrens wurden die Intraday- und Interday-Variabilität von BMV unterschiedlicher Konzentration im Verhältnis zum internen Standard PD (10^{-4} M, 30µl) ermittelt.

Dieser Vergleich wurde in 3 unabhängigen Experimenten an jeweils 3 Tagen ausgeführt. Die BMV/PD-Quotienten wurden für jeden Konzentrationspunkt in der

Serie (Intraday-Variabilität) und bei den 3 verschiedenen Serien (Interday-Variabilität) berechnet und in Tab. 3.1 dargestellt. Die prozentualen Abweichungen des mittleren Standardfehlers waren für die Intraday-Variabilität im Bereich zwischen 0 und 24% zu finden und für die Interday-Variabilität im Bereich von 6 bis 16%.

Die ermittelten Größenordnungen der Variationen garantieren die Qualität und damit die Anwendbarkeit des analytischen Verfahrens.

Tab. 3.1

Darstellung der Intraday- und Interday-Variabilität der BMV-Analytik. Angegeben wurden die Mittelwerte der BMV/PD-Quotienten aus 3 unabhängigen Experimenten und die Variationskoeffizienten (%), der Experimente, die an 3 verschiedenen Tagen (V_X) wiederholt wurden. Die Interday-Variabilität wurde unter V_{1-3} dargestellt.

Injizierte BMV-Konzentration (µg/ml)	Mittelwerte der BMV/PD-Quotienten (CV x 100)			
	V1	V2	V3	V1-3
0,238	0,09 (11)	0,09 (11)	0,09 (24)	0,09 (14)
0,417		0,10 (10)	0,10 (22)	0,10 (15)
0,477	0,11 (16)	0,11 (20)	0,12 (13)	0,11 (15)
1,192	0,57 (3)	0,61 (11)	0,67 (17)	0,61 (13)
2,383	1,42 (5)	1,59 (11)	1,61 (12)	1,54 (11)
3,575	2,36 (0)	2,45 (8)	2,54 (7)	2,46 (6)
4,766	2,63 (14)	3,53 (8)	3,35 (11)	3,17 (16)
R^2	0,98	0,98	0,99	0,99

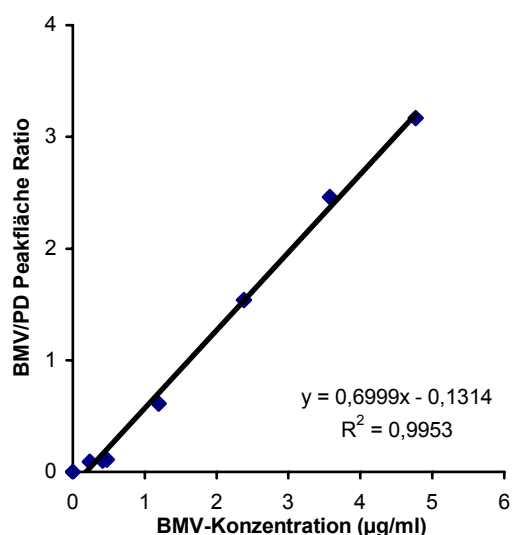


Abb. 3.3

Verhältnis des experimentell ermittelten BMV/PD-Quotienten zur theoretischen BMV-Konzentration

3.4.6 Wiederfindungsrate

Die Wiederfindungsrate gibt den Anteil der gefundenen Wirkstoffmenge an, der nach Aufarbeitung des Probenmaterials im Vergleich zur theoretisch enthaltenen Wirkstoffmenge detektierbar ist. Die Wiederfindungsraten aus Human- und Schweinehaut sind > 75%.

3.5 Penetrationsuntersuchungen

3.5.1 Vorbereitung von Humanhaut und Schweinehaut

Die in vitro Testung der kutanen Resorption an vitaler exzidierten humanen Haut oder Haut tierischen Ursprungs stellt eine Alternative zu Tierversuchen dar und erfüllt gleichzeitig den hohen Anspruch der realitätsnahen Anwendung. Allerdings streuen die Ergebnisse interindividuell erheblich, was jedoch der in vivo Situation entspricht.

Die exzidierte Humanhaut wurde durch das Behring-Krankenhaus in Berlin-Zehlendorf zur Verfügung gestellt. Das Material stammt aus der Bauch- oder Brustregion weiblicher Patienten im Alter zwischen 21 und 62 Jahren, die sich Bauch- und Brustverkleinerungen Eingriffen unterzogen (Genehmigung der Ärztekammer Berlin liegt vor).

Unmittelbar nach der Entnahme der Hautstücke wurde das subkutane Fettgewebe mittels eines Skalpell abpräpariert. Danach wurde die Haut in OP-Tücher eingeschlagen, um eine Kontamination mit evtl. noch vorhandenem restlichen Fettgewebe zu verhindern. Die so vorbereitete Haut wurde gekühlt ins Labor transportiert, um den nativen Hydratationszustand der Haut zu erhalten. Nach dem Transport wurde die Oberfläche der Haut mit PBS vorsichtig gereinigt und die Haut innerhalb einer Stunde für das Experiment eingesetzt. Die Vitalität der exzidierten Haut ist für 6 – 10h garantiert (Gysler, 1998).

Schweinehaut wurde der Axillarregion entnommen. Die getöteten Schweine unterlagen nicht dem sonst üblichen Brühvorgang. Die Oberfläche der Hautstücke wurde nach Entfernung des Fettgewebes mit einem mit PBS angefeuchteten Tuch vorsichtig gereinigt. Die Weiterverarbeitung erfolgte unter gleichen Bedingungen wie bereits bei der Humanhaut beschrieben.

3.5.2 Durchführung des Penetrationsversuchs

In der vorliegenden Arbeit diente die Franz-Diffusions-Zelle zur Untersuchung der Penetration von Wirkstoffen in die Haut. Mit diesem von Franz etablierten

Standardverfahren (Franz, 1975) können die Quantität und die Geschwindigkeit, mit der ein Wirkstoff durch die Haut diffundiert, bestimmt werden.

Es wurden Durchfluss-Franzzellen verwendet, die einen kontinuierlichen Zu- und Abfluss (6 ml/h) des Akzeptormediums ermöglichten und über die Flussrateinstellungen ein Arbeiten unter Sinkbedingungen garantierten. Darüber hinaus wurde das Akzeptormedium mittels Magnetrührer ständig durchmischt. Ummantelte Durchfluß-Franzzellen waren über einen Thermostaten so temperierbar, dass im Donorkompartiment eine Temperatur von 32°C garantiert werden konnte.

Für Penetrationsversuche wurde Vollhaut der Human- bzw. Schweinehaut benutzt. Es wurden kreisrunde Scheiben von 15mm Durchmesser mittels Lochseisen aus exzidierte Haut ausgestanzt und zwischen Donor und Akzeptorkammer der Franz-Zellen gespannt. Die Hautkontaktfläche mit Donor- und Akzeptormedium betrug 9mm. Die zu prüfenden wirkstoffhaltigen Formulierungen (je 100 µl) wurden im Donorkompartiment auf die Epidermis appliziert. Die Experimente wurden für 6 bzw. 24 Stunden durchgeführt.

3.5.3 Abtragung des Stratum corneums mittels Klebefilm

Um die in die obersten Hautschichten penetrierten Wirkstoffmengen bestimmen zu können, wurde die Hautoberfläche mit trockenen Wattestäbchen vorsichtig abgetupft, mittels Adhäsivklebeband (Tesa®-Klebefilm) sukzessive entfernt (Stripping) und der Gehaltsbestimmung zugeführt. Nach dem Reinigen wurden das behandelte Hautareal (9mm) ausgestanzt und die Oberfläche der Hautbiopsie mittels Tesa® Film unter Aufwenden eines gleichmäßigen Druckes und anschließendem Entfernen des Tesa® Strips 2 bzw. 15 mal abgetragen. Die Tesa® Strips wurden in ein 1ml Ethylacetat enthaltene 2ml Eppendorfgefäß überführt und mit 30µl internem Standard (PD 10⁻⁴M) versetzt. Der in den Klebestreifen anhaftenden Hornschichten enthaltene Wirkstoff wurde extrahiert. Die Ethylacetat-Extrakte wurden bei 45°C in der Vakuumpumpe zur Trockene eingedampft und anschließend in 100µl Methanol aufgenommen. Die BMV-Gehaltsbestimmung erfolgte wie unter 3.4.1 beschrieben.

3.5.4 Probenaufarbeitung auf die Haut zur Penetrationsbestimmung

Die ausgestanzten Hautproben wurden entweder nach Entfernung des SC oder direkt mit Einbettmedium auf einer Fixierungsplatte mit der epidermalen Seite nach

oben unter jeweils gleichem Druck mittels eines Objektträgers bei -25°C angefroren und mit Hilfe eines Gefriermikrotoms ebenfalls bei -25°C horizontal in $10\mu\text{m}$ dicke Horizontalschnitte geschnitten. Je 5 bzw. 10 dieser Schnitte wurden in einem 2ml Eppendorf-Gefäß vereint und mit $30\mu\text{l}$ internem Standard ($\text{PD } 10^{-4}\text{M}$) versetzt. Zunächst wurden $700\mu\text{l}$ PBS zugegeben und die Proben 5 – 10 mal in flüssigem Stickstoff eingefroren, anschließend im Wasserbad bei etwa 30°C aufgetaut. Danach wurden die Proben zweimal mit 1ml Ethylacetat unter starkem Schütteln (Vortex, 2min) extrahiert. Die Ethylacetat-Extrakte wurden vereinigt, bei 45°C im Vakuum zur Trockene eingedampft und der Rückstand in $100\mu\text{l}$ Methanol aufgenommen. Anschließend erfolgte, wie unter 3.4.1 beschrieben, die Gehaltsbestimmung von BMV.