

**ABBAUKINETIK
HYDROLYSEEMPFINDLICHER
ARZNEISTOFFE IN PARENTERALEN
O/W-EMULSIONEN**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

DENNIS PAUL KRICKAU

aus Stuttgart Bad Cannstatt

Juli, 2006

BERLIN

1. Gutachter: Univ. Prof. Dr. R. H. Müller

2. Gutachter: Univ. Prof. Dr. H. H. Borchert

Disputation am: 06.09.2006

Meiner Familie
mit Liebe und Dank gewidmet

Das Fehlen einer besonderen Kennzeichnung oder eines entsprechenden Hinweises auf ein Warenzeichen, ein Gebrauchsmuster oder einen Patentschutz lässt nicht den Schluss zu, dass über die in dieser Arbeit angegebenen Dinge frei verfügt werden kann.

Inhaltsverzeichnis

I	THEORETISCHER TEIL.....	1
1.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
1.1	Parenterale Fettemulsionen.....	2
1.1.1	Therapie und Metabolismus.....	3
1.1.2	Parenterale Fettemulsionen als Arzneistoffträger	7
1.1.3	Weitere Anwendungen von parenteralen Fettemulsionen.....	9
1.1.3.1	Parenterale Fettemulsionen als Blutersatz	9
1.1.3.2	Parenterale Fettemulsionen als Kontrastmittel	9
1.2	Lagerstabilität von hydrolyseempfindlichen Arzneistoffen.....	9
1.2.1	Säure- und basenkatalysierte Esterhydrolyse	10
1.3	Besondere Anforderungen an Parenteralia	12
1.4	Problemstellung und Zielsetzung.....	13
2.	MATERIALIEN.....	16
2.1	Modellsubstanz Phenylsalicylat	16
2.1.1	Physikochemische Eigenschaften	16
2.1.1.1	Löslichkeit in gepuffertem Wasser (pH 7,4) bei 20 °C.....	17
2.1.1.2	Verteilungskoeffizienten	19
2.1.2	Hydrolytischer Abbau der Modellsubstanz.....	20
2.2	Fette Öle.....	20
2.2.1	Miglyol 812 (Mittelkettige Triglyceride).....	21
2.2.2	Olivenöl (natives)	21
2.2.3	Rapsöl (raffiniertes)	21
2.2.4	Rizinusöl (raffiniertes).....	22
2.2.5	Sojabohnenöl (raffiniertes)	22

2.3	D-α-Tocopherol	22
2.4	Emulgatoren	23
2.4.1	Nichtionische Emulgatoren.....	24
2.4.1.1	Tween 80 [®]	24
2.4.1.2	D- α -Tocopheryl-polyethylenglykol-1000-succinat (TPGS).....	24
2.4.2	Ionische Emulgatoren.....	24
2.4.2.1	Natriumoleat.....	25
2.4.3	Amphotere Emulgatoren.....	25
2.4.3.1	Lecithin.....	25
2.4.4	Polymeremulgatoren.....	26
2.4.4.1	Pluronic F 68 [®]	27
2.5	Nichtionische Isotonisierungsmittel	27
2.5.1	Glucose.....	28
2.5.2	Glycerol.....	28
2.5.3	Laktose.....	28
2.5.4	Sorbitol.....	29
2.6	Ionische Isotonisierungsmittel	29
2.6.1	Natriumchlorid.....	29
2.7	Sonstige Hilfsstoffe	29
2.7.1	L(+)-Ascorbylpalmitat.....	29
2.7.2	Cholesterol.....	30
2.7.3	Carnaubawachs.....	30
2.7.4	N-Methylpyrrolidon.....	30
2.7.5	Phosphatpuffer pH 7,4.....	30
2.7.6	Wasser.....	31

3. METHODEN	32
3.1 Herstellung der Emulsionen	32
3.1.1 De-novo-Herstellung	32
3.1.2 Herstellung der Voremulsion.....	32
3.1.3 Homogenisation der Voremulsion	34
3.1.3.1 Microfluidizer.....	35
3.1.3.2 Kolben-Spalt-Homogenisation	36
3.2 Zweilagensystem	38
3.2.1 Apparativer Aufbau	38
3.2.2 Herstellung von Liposomendispersionen.....	39
3.3 Partikelcharakterisierung	39
3.3.1 Partikelgrößen.....	40
3.3.1.1 Laserdiffraktometrie (LD).....	40
3.3.1.2 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)	43
3.3.2 Zetapotential (ZP) und Laser-Doppler-Anemometrie (LDA)	45
3.3.2.1 DLVO-Theorie	48
3.4 Differential Scanning Calorimetrie (DSC)	49
3.5 pH-Wert	50
3.6 Leitfähigkeit	50
3.7 Osmolarität	51
3.8 Viskosität	51
3.9 Grenzflächenspannung	52
3.10 Gehaltsbestimmung mittels HPLC	52
3.10.1 Methode für Phenylsalicylat, Phenol und Salicylsäure	53
3.10.1.1 Rein wässrige Systeme	53
3.10.1.2 Emulsionen bzw. Mehrphasensysteme	53

3.10.2	Methode für das Phosphatidylcholin.....	53
II	EINPHASENSYSTEME	55
4.	ABBAUKINETIK DES PHENYLSALICYLATS IN WÄSSRIGEN LÖSUNGEN	55
4.1	Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten.....	55
4.1.1	Versuchsdurchführung.....	55
4.1.2	Reaktion pseudo-erster Ordnung	55
4.1.3	Abhängigkeit der Abbaukinetik vom pH-Wert.....	57
4.2	Einfluss des Isotonisierungsmittels auf die Abbaukinetik	58
4.2.1	Hintergrund.....	58
4.2.2	Probenaufbereitung.....	59
4.2.3	Versuchsdurchführung.....	60
4.2.4	Ergebnisse und Diskussion	60
5.	ABBAUKINETIK DES PHENYLSALICYLATS IN VERSCHIE- DENEN ÖLEN.....	64
5.1	Stabilitätsuntersuchungen.....	64
5.1.1	Probenaufbereitung.....	64
5.1.2	Ergebnisse.....	65
III	MEHRPHASENSYSTEME	66
6.	ZWEILAGENSYSTEM	66
6.1	Einfluss der Grenzfläche auf die Abbaukinetik	66
6.1.1	Apparativer Aufbau und Durchführung der Versuche	67
6.1.2	Ergebnisse und Diskussion	67
6.1.2.1	Auftreten eines zusätzlichen Reaktionsproduktes.....	67
6.1.2.2	Ergebnisse und Diskussion zum Einfluss der Grenzfläche.....	68
6.2	Einfluss eines Emulgatorfilms in der Phasengrenzfläche	70
6.2.1	Kritische Mizellbildungskonzentration (CMC)	71

6.2.2	Durchführung	72
6.2.3	Ergebnisse und Diskussion	72
6.3	Liposomale Dispersionen als wässrige Phase.....	73
6.3.1	Durchführung	74
6.3.1.1	Ergebnisse mit Miglyol als Ölphase	74
6.3.1.2	Ergebnisse mit Sojabohnenöl als Ölphase	77
6.3.2	Kinetik der Hydrolyse im Zweilagensystem.....	79
6.3.2.1	Geschwindigkeitskonstante h_0 in Abwesenheit einer Katalyse durch Phenol.....	83
6.4	Prüfung verschiedener Öle.....	85
6.4.1	Durchführung	85
6.4.2	Ergebnisse und Diskussion	86
6.4.2.1	Viskosität der Öle.....	86
6.4.2.2	Einfluss des Verteilungskoeffizienten auf die Abbaukinetik nullter Ordnung.....	88
7.	EMULSIONSSYSTEME.....	91
7.1	Einfluss der Grenzfläche und der Emulgatorkonzentration auf die Hydrolysegeschwindigkeit	91
7.1.1	Durchführung	92
7.1.2	Physikalische Stabilität der Rezepturen.....	93
7.1.3	Chemische Stabilitätsdaten	95
7.1.3.1	Grenzfläche der Emulsionen	96
7.1.3.2	Anwendung des kinetischen Modells des Zweilagensystems.....	97
7.1.3.3	Geschwindigkeitskonstante h_0 in Abwesenheit einer Katalyse durch Phenol.....	99
7.1.3.4	Katalyse durch das Abbauprodukt Phenol, Proportionalitätskonstante η	101
7.1.3.5	Kinetisches Modell.....	105
7.2	Untersuchungen mit unterschiedlichen Emulgatoren in ihrem Einfluss auf die Hydrolysegeschwindigkeit.....	106
7.2.1	Durchführung	107

7.2.2	Physikalische Stabilität der Rezepturen	107
7.2.3	Chemische Stabilitätsdaten	108
7.2.4	Diskussion	109
7.3	Variation der Ölphase und ihr Einfluss auf die Abbaukinetik	110
7.3.1	Durchführung	111
7.3.2	Physikalische Stabilität der Rezepturen	112
7.3.3	Löslichkeit und Verteilung von Phosphatidylcholin	113
7.3.4	Chemische Stabilitätsdaten	113
7.3.5	Diskussion	114
7.4	Viskositätserhöhung der Ölphase mit Hilfe von Carnaubawachs	116
7.4.1	Durchführung	117
7.4.2	Charakterisierung der NLCs	118
7.4.3	Physikalische Stabilität der Rezepturen	119
7.4.4	Chemische Stabilitätsdaten	120
7.4.5	Diskussion	121
7.5	Verfestigung des Emulgatorfilms mit Hilfe von Cholesterol	123
7.5.1	Durchführung	124
7.5.2	Physikalische Stabilität der Rezepturen	124
7.5.3	Chemische Stabilitätsdaten	125
7.5.4	Diskussion	126
7.6	Eignungstest einer α-Tocopherol-Formulierung	128
7.6.1	Durchführung	129
7.6.2	Verteilung des Phenylsalicylats (α -Tocopherol/Isotonisierter Puffer)	130
7.6.3	Physikalische Stabilität der Rezepturen	131
7.6.4	Chemische Stabilitätsdaten	132
7.6.5	Diskussion	133

7.7	Überprüfung des katalytischen Effekts des Isotonisierungsmittels am Emulsionssystem	134
7.7.1	Durchführung	134
7.7.2	Physikalische Stabilität der Rezepturen	135
7.7.3	Chemische Stabilitätsdaten	136
7.7.4	Diskussion	136
IV	ZUSAMMENFASSUNG	138
V	SUMMARY	141
VI	PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE	144
1.	JOURNALARTIKEL	144
2.	POSTERPRÄSENTATIONEN	144
VII	DANKSAGUNG	145
VIII	LEBENS LAUF	146
IX	LITERATURVERZEICHNIS	147

I THEORETISCHER TEIL

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Formulierung einer Arzneiform stellt vielfältige Herausforderungen. So ist neben den biopharmazeutischen Aspekten vor allem die über den Lagerzeitraum gleich bleibende Qualität eines Arzneimittels von großer Bedeutung. Nach §4 AMG versteht man unter Qualität die „Beschaffenheit eines Arzneimittels, die nach Identität, Gehalt, Reinheit, sonstigen chemischen, physikalischen, biologischen Eigenschaften oder durch das Herstellungsverfahren bestimmt wird“. Auf dieser Basis definiert die APV-Richtlinie über Haltbarkeit und Lagerung von Arzneimitteln die Haltbarkeit als „gleich bleibende Qualität eines Fertigarzneimittels über die projektierte Haltbarkeitsperiode und zwar sowohl in galenischer, physikalischer, chemischer, biologischer als auch mikrobiologischer Hinsicht, insbesondere seinem Wirkstoffgehalt, seiner Wirkstoff-Freigabe und seiner Reinheit“ [1]. Bei der Haltbarkeitsprüfung sollten daher folgende Parameter Beachtung finden:

- Organoleptische Prüfungen von Aussehen, Geruch, Konsistenz, etc.
- Physikalische Instabilität (Veränderung physikalischer Eigenschaften wie Viskosität, Härte, Teilchengröße, etc.)
- Physikalisch-chemische Instabilität (Veränderung physikalischer Eigenschaften aufgrund chemischer Reaktionen)
- Chemische Instabilität (Chemische Zersetzung der Wirk- und Hilfsstoffe durch Hydrolyse, Oxidation, etc.)
- Mikrobiologische Instabilität (Keimzahl überschreitet akzeptables Maß).

Instabilitäten können zu einer Beeinträchtigung der Wirksamkeit, Anwendbarkeit oder der Verträglichkeit des Arzneimittels führen. Auch aus wirtschaftlicher, insbesondere logistischer Sicht sollte die projektierte Haltbarkeitsperiode hoch sein. Angestrebt wird in der Regel eine Mindesthaltbarkeit von zwei Jahren.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Lagerstabilität eines hydrolyseempfindlichen Arzneistoffs in der Arzneiform parenterale Fettemulsion.

O/W-Emulsionen werden als Vehikel für die parenterale Applikation von Arzneistoffen genutzt, die im Wässrigen schwer löslich sind [2, 3]. Außerdem besteht die Möglichkeit, einen hydrolyseempfindlichen Arzneistoff vor dem Abbau im Wässrigen zu schützen [4]. Dieser Schutz ist jedoch in der Regel limitiert, da sich der Arzneistoff zwischen den

lipophilen und den hydrophilen Kompartimenten der Emulsion verteilt. Im Wässrigen wird der Arzneistoff durch Hydrolyse weiterhin abgebaut [5]. Angesichts dieses Zusammenhangs muss das Ziel der Emulsionsformulierung sein, eine Rezeptur zu finden, in der die Hydrolyse so weit wie möglich eingeschränkt wird. Dazu ist die Kenntnis der physikochemischen Parameter nötig, die den hydrolytischen Abbau des Arzneistoffs beeinflussen. In der Literatur finden sich jedoch bislang nur wenige Arbeiten zu diesen Einflussgrößen. Sie beschränken sich auf den Verteilungskoeffizienten des Arzneistoffs zwischen Öl und Wasser sowie das Zetapotential der Öltröpfchen [6].

Je höher einerseits der Verteilungskoeffizient, desto langsamer ist die gemessene Abbaukinetik. Bezüglich des Zetapotentials wurde andererseits die Theorie entwickelt, dass es den pH-Wert in der Mikroumgebung der Öltröpfchen beeinflusst. Zeigt ein Arzneistoff eine vom pH-Wert abhängige Hydrolyse, so wird er in der Emulsion eine Abbaukinetik zeigen, welche dem pH-Wert der Mikroumgebung und nicht dem des Gesamtsystems entspricht. Dieser Zusammenhang konnte nur für Arzneistoffe mit einem niedrigen Verteilungskoeffizienten nachgewiesen werden. Hoch lipophile Stoffe zeigten sich unabhängig vom umgebenden pH-Wert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen die Kenntnis der Einflussgrößen erweitern, um sie für die Optimierung parenteraler Fettemulsionen zu nutzen.

1.1 Parenterale Fettemulsionen

Die IUPAC definiert Emulsionen als Verteilung einer Flüssigkeit und/oder eines Flüssigkristalls (dispenser Bestandteil) in einer nicht mit ihr mischbaren weiteren Flüssigkeit (Dispersionsmittel) [7]. Zwei Systeme werden unterschieden: Von O/W-Emulsionen spricht man, wenn die äußere, kontinuierliche Phase eine wässrige und die innere, dispergierte eine lipophile (meistens ein Öl) ist. W/O-Emulsionen bezeichnen den umgekehrten Fall.

Die feine Verteilung von Tröpfchen bedingt eine große Grenzfläche mit entsprechend hoher Grenzflächenenergie, die das System thermodynamisch instabil macht. Eine Stabilisierung ist nur durch kinetische Hemmung möglich, z.B. durch die Zugabe eines Emulgators.

Für den parenteralen Applikations-Weg sind ausschließlich Emulsionen vom O/W-Typ auf dem Markt. In diesem Kontext sollte das Wort parenteral nicht wörtlich mit „unter Umgehung des Magen-Darm-Kanals“ [8] übersetzt werden, sondern eher als „Applikation in das Körperinnere“ [9].

Zur maximal akzeptablen Tröpfchengröße gibt es verschiedene Lehrmeinungen: Im Hinblick auf einen Blutkapillardurchmesser von 6-30 μm [8] fordern einige Autoren den Ausschluss von Partikeln mit einem Durchmesser von 5 μm oder darüber, um eine Fettembolie zu vermeiden [19, 10, 11, 12]. Die Verformbarkeit der Öltröpfchen verringert jedoch diese Gefahr. Größere Partikel können sich, vergleichbar mit den Erythrozyten (Durchmesser: 8,4 μm [8]), durch die engsten Stellen der Kapillaren „hindurchdrücken“ [13]. Auch die schnelle Lipolyse würde für eine rasche Öffnung der blockierten Stelle sorgen [14, 15].

Anforderungen der Arzneibücher bezüglich der Partikelgröße in parenteralen Fettemulsionen gab es zuletzt 1980 in der Britischen Pharmacopoeia [16], welche eine Obergrenze der Partikelgröße von 5 μm vorgab. Diese Bedingung wurde jedoch in den folgenden Auflagen entfernt, so dass heute nur die allgemeinen Anforderungen an Injektionspräparate herangezogen werden können. Die US Pharmacopoeia lässt hier im Kapitel <788> „Particulate matter in Injections“ eine, in Abhängigkeit des Injektionsvolumen, begrenzt eine Kontamination mit Partikeln von bis zu 25 μm in ihrer längsten Ausdehnung zu.

Erstmals wurde im Jahr 1957 von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) eine Fettemulsion zur parenteralen Ernährung zugelassen. Die breite klinische Anwendung setzte sich jedoch nicht durch, da die Anwendung mit vielfältigen Nebenwirkungen verbunden war [17]. Im Jahre 1962 gelang es jedoch Wretling in Schweden, eine sichere und verträgliche Fettemulsion auf den Markt zu bringen – das Intralipid[®]. Es war als 10- oder 20 prozentige Sojaölemulsion erhältlich. Stabilisiert wurde die Emulsion mit Lecithin und isotoniert mit Glycerol. Noch heute befindet sie sich auf dem Markt, und ihre Rezeptur ist ein Vorbild für viele Folgeprodukte [18].

Die breite, sehr gut verträgliche Anwendung zu Ernährungszwecken, legte eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Emulsionen nahe: Die Nutzung als parenteralen Arzneistoffträger für schwer wasserlösliche Arzneistoffe, soweit sie sich ausreichend in den zur parenteralen Applikation zugelassenen Ölen lösen.

1.1.1 Therapie und Metabolismus

Ursprünglich wurden die parenteralen Fettemulsionen um die Mitte des 20. Jahrhunderts zur parenteralen Ernährung entwickelt. Anwendung finden sie bei der Pflege von Patienten mit kritischem Ernährungszustand, bei welchen die Nahrungszufuhr mit normaler Kost oder enteraler Sondennahrung nicht möglich ist. Sie dienen als Kalorienquelle, als Lieferant für essentielle Fettsäuren [19, 20, 21] sowie als Träger für fettlösliche Vitamine [22, 23].

Vorteilhaft sind sie vor allem als Energiequelle im Postaggressionsstoffwechsel, da hier Fette besser metabolisiert werden als Glukose [17, 24]. Die durchschnittliche Tröpfchengröße einer solchen Emulsion liegt bei 200-500 nm.

Falls erforderlich, werden sie zusammen mit Aminosäure-, Elektrolyt-, Vitamin- und Kohlenhydratlösungen infundiert. Diese „all-in-one“-Lösungen bieten den Vorteil einer geringeren Volumenbelastung des Patienten [25].

Mögliche Indikationen sind beispielsweise Traumata des Gastrointestinaltraktes, Krankheiten des Gastrointestinaltraktes (z.B. Krebs, Infektionen) oder prä- bzw. postoperative Zustände, die längere Nahrungskarenz erfordern.

Aufgrund der zahlreichen Bestandteile eines solchen „all-in-one“-Regimes ist mit Wechselwirkungen zu rechnen, welche die physikalische Stabilität der Fettemulsion stark einschränken. Zahlreiche Arbeitsgruppen befassten sich mit dieser Problematik [13, 26, 27, 28, 29]. Exemplarisch sei hier vor allem die Erniedrigung des Zetapotentials in Abhängigkeit von Konzentration und Wertigkeit der zugemischten Elektrolyte genannt. Dadurch sinken die elektrostatischen Abstoßungskräfte der Öltröpfchen, und die Wahrscheinlichkeit einer Tröpfchenkoaleszens steigt [30, 31].

Da die behandelten Patienten in der Regel einen schlechten Gesundheitszustand aufweisen, ist eine weitere Belastung durch die parenterale Ernährung so weit wie möglich auszuschließen. Vor allem die Fettsäurezusammensetzung der Öle ist in Hinblick auf Nebenwirkungen untersucht worden.

Grob unterschieden werden die mittelkettigen (C_8 - C_{14}) von den langkettigen ($> C_{14}$) Fettsäuren. Die mittelkettigen Fettsäuren (MCT) haben den Vorteil, dass sie im Fettgewebe nicht gespeichert werden. Auch die Elimination aus der Blutzirkulation, sowie der oxidative Abbau erfolgen im Vergleich schneller [32, 22], so dass sie in der Lage sind, dem Körper sehr schnell Energie zur Verfügung zu stellen. Nachteilig ist jedoch das Risiko einer Azidose. Des Weiteren enthalten sie keine essentiellen Fettsäuren [33, 34, 35].

Die langkettigen Fettsäuren (LCT) sind vor allem hinsichtlich ihrer immunologischen Wirkungen differenziert betrachtet worden [36, 37, 38, 39]. Diese Wirkungen werden den ungesättigten Fettsäuren zugeschrieben, wobei sowohl proinflammatorische als auch entzündungshemmende Vertreter beschrieben wurden.

Bei den ungesättigten Fettsäuren unterscheidet man die einfach (MUFA) und mehrfach ungesättigten Vertreter (PUFA). Zu den PUFAs gehören die beiden essentiellen Fettsäuren Linolsäure (ω -6-PUFA) und die α -Linolensäure (ω -3-PUFA). Sojabohnenöl besitzt einen hohen Anteil an ω -6-PUFAs. Ihr Abbau verläuft über die Arachidonsäure zu Eicosanoiden der 2er und 4er Reihe, welche proinflammatorische Reaktionen fördern [40]. Die auch im Sojaöl enthaltenen ω -3-PUFAs wirken wiederum über zwei Wege entzündungshemmend. Zum einen konkurrieren sie bei ihrem Metabolismus um dieselben Enzyme wie die ω -6-PUFAs, welches die Arachidonsäurebildung einschränkt. Des Weiteren führt ihr Abbau zu der Eicosapentaensäure und in der Folge zur Bildung entzündungshemmender Cytokine [41, 42]. Zusätzlich wurden im Tierversuch der Arachidonsäure wie auch der Eicosapentaensäure eine immunsupprimierende Wirkung, über eine reduzierte Lymphozytenproduktion, nachgewiesen [43].

Um die jeweiligen Vorteile der LCT und MCT zu kombinieren und das Nebenwirkungspotential zu minimieren, wurden die strukturierten Triglyceride entwickelt. Zu ihrer Herstellung wird eine Mischung von LCT und MCT hydrolysiert und die erzeugten Fettsäuren randomisiert mit Glycerol verestert. Diese Ölkomponente zeigt signifikante Vorteile im Vergleich zu einer reinen Mischung der beiden Öle [44, 45]

Neben den besprochenen Systemen sind auch Olivenöl sowie Fischölemulsionen auf dem Markt. Die Hauptkomponente des Olivenöls ist die Ölsäure. Ihr Vorteil soll in der Möglichkeit bestehen, proinflammatorische Cytokine zu inhibieren und damit entzündungshemmend zu wirken [46]. Die Fischölemulsionen zeigen dieselben Vorteile. Sie sind sehr gut verträglich und beeinflussen die Leucotrienproduktion in den Leukozyten in Richtung entzündungshemmender Reaktionen [47, 48]. Die neueste Emulsion auf dem Markt kombiniert LCT, MCT, Olivenöl und Fischöl in einer Formulierung (siehe **Tab. 1.1.1-1**).

Die zentrale Frage nach der klinischen Relevanz dieser Ergebnisse ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Die Aussagen basieren zum größten Teil auf In-vitro-Daten oder Tierversuchen. Die Übertragbarkeit auf den Menschen muss weiterhin untersucht werden [39, 38].

Eine Auswahl der auf dem Markt erhältlichen Fettemulsionen ist in **Tab. 1.1.1-1** aufgelistet.

Tabelle 1.1.1-1 Eine Auswahl an Parenteralen Fettemulsionen aus der Roten Liste 2006

Handelsname	Hersteller	Ölkomponente	Anteil in %	Lecithin- quelle	Anteil in %
ClinOleic®	Baxter	Olivenöl	20	Eigelb	1,2
Intralipid®	Baxter	Sojaöl	10/20	Eigelb	0,6/1,2
Lipofundin MCT®	Braun Melsungen	Sojaöl/MCT	(1:1) 10/20	Eigelb	0,8/1,2
Omegaven-Fresenius®	Fresenius Kabi	Öl von Hochseefischen	10	Eigelb	1,2
SMOFlipid®	Fresenius Kabi	Sojaöl/MCT/Olivenöl/Fischöl	(6:6:5:3) 20	Eigelb	1,2

Metabolisiert werden die Fettemulsionen auf zwei Wegen. Zum einen werden die Öltröpfchen wie die Chylomykronen durch das Lipoprotein Lipase hydrolysiert [18]. Dies ist auf den ersten Blick erstaunlich, da die Öltröpfchen an der Oberfläche keine Apolipoproteinen tragen, welche unter anderem als Aktivatoren der Lipoprotein-Lipase wirken. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass innerhalb von Minuten Plasma-Apolipoproteine an die Tröpfchenoberfläche transferiert werden [49, 50]. Des Weiteren erfolgt eine Aufnahme der als Fremdkörper erkannten Fetttropfchen durch das retikulo-endotheliale System (RES). Dort werden die Tröpfchen von den Makrophagen phagozytiert [51].

Untersuchungen an radioaktiv markierten Emulsionen, mit einer durchschnittlichen Tröpfchengröße von 250 nm, ergaben, dass ca. 70 % der Öltröpfchen von den Kupffer-Zellen (Makrophagen) der Leber aufgenommen wurden [52]. Der Grund für die verstärkte Aufnahme liegt in einer Adsorption von Serumproteinen, den sog. Oponinen, an die Partikeloberfläche [53]. Diese ermöglichen es den Makrophagen, die Partikel als körperfremd zu erkennen und zu phagozytieren. Das Opsinisierungsmuster ist dabei stark abhängig von der Lipo- bzw. Hydrophilie der Oberfläche [54].

Gerade im Hinblick auf die Verwendung der Emulsionen als Arzneistoffträger, ist die Pharmakokinetik Gegenstand vieler Untersuchungen. Die bevorzugte Aufnahme der Öltröpfchen durch die RES-Organen kann ausgenutzt werden, sollten sie die Zielorgane für den Arzneistoff sein.

Sollte dieser Fall nicht zutreffen, so kann man über die Modifikation der Oberfläche bzw. Variation der Partikelgrößen die Aufnahme durch das retikulo-endotheliale System minimieren, um hierdurch eine längere Zirkulation der Öltröpfchen im Blut zu erreichen [55, 56, 57, 58, 59]. Als besonders effizient erwiesen sich hierbei lange PEG-Ketten an der Oberfläche [57], welche sterisch eine Oponisierung behindern. Auch ließ sich zeigen, dass

sich mit abnehmender Partikelgröße die retikulo-endotheliale Aufnahme der Partikel verringerte [60].

Des Weiteren werden viele Anstrengungen unternommen, über modifizierte Oberflächen der Partikel bestimmte Organe, bzw. Tumorgewebe gezielt anzusteuern. In der Regel wird hierfür versucht, dem Partikel eine Bindungsaffinität zu spezifischen Zellrezeptoren zu verleihen [61, 62, 63, 64, 65, 66, 67]. Auch die Variation des Injektionsortes kann in diesem Kontext auf mögliche Vorteile hin untersucht werden [67]. Die intratumorale Injektion von Emulsionen der Partikelgröße 250 nm zeigte beispielsweise signifikant verbesserte Verweilzeiten [68].

1.1.2 Parenterale Fettemulsionen als Arzneistoffträger

Die breite und sehr gut akzeptierte klinische Anwendung der parenteralen Fettemulsionen legte es nahe, die innere Ölphase als Arzneistoffträger zu verwenden. Die Vorteile dieser Arzneiform sind:

- Lösungsvermittlung schwer wasserlöslicher Arzneistoffe
- Reduktion von Irritationen und Toxizität des Arzneistoffs wegen des Wirkstoffeinschlusses in die Öltröpfchen
- Stabilisierung hydrolyseempfindlicher Arzneistoffe
- Vermeidung eines Arzneistoffverlusts durch Adsorption
- Potential zur Ansteuerung von Zielorganen [61]
- Bewährte und verträgliche Hilfsstoffe
- Potential zur Produktion großer Chargen
- Sterilisierbarkeit des Endproduktes
- Die Möglichkeit einer gesteuerten Arzneistofffreisetzung [69]

Diesen Vorteilen stehen folgende Nachteile gegenüber:

- Schlechte Löslichkeit mancher Arzneistoffe in den für pharmazeutische Formulierungen akzeptierten Ölen
- Unsichere physikalische Stabilität
 - Hitzeempfindlichkeit
 - Inkompatibilitäten mit manchen Arzneistoffen [70]
- Für wasserlösliche Arzneistoffe bietet die O/W-Emulsion keine Vorteile [71]
- Eine eventuell auftretende Hydrolyse kann nur verlangsamt und nicht ausgeschlossen werden.

Die Vor- und Nachteile sind diversen Übersichtsartikeln entnommen [2, 4, 10, 72, 73].

Bis zur Marktreife hat es bis jetzt jedoch nur eine begrenzte Anzahl von arzneistoffhaltigen Emulsionen gebracht. Eine Auswahl ist in **Tab. 1.1.2-1** aufgelistet. Für detaillierte Informationen über diese Marktpräparate sei auf das Buchkapitel „Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration“ von Klang, S. und Benita, S. [3] sowie auf die Rote Liste 2006 verwiesen.

Tabelle 1.1.2-1 Liste arzneistoffhaltiger parenteraler Fettemulsionen auf dem Europäischen Markt

Produkt	Arzneistoff	Firma
Diazemuls [®]	Diazepam	Kabi-Pharmacia, Dumex, Skandinavien
Diazepam-Lipuro [®]	Diazepam	Braun Melsungen, Deutschland
Disoprivan [®]	Propofol	AstraZeneca Pharmaceuticals, UK
Etomidat-Lipuro [®]	Etomidat	Braun, Deutschland
Fluosol-DA [®]	Perfluorodecalin Perfluorotripropylamin	Green Cross and Alpha Therapeutics, Japan
Lipotalon [®]	Dexamethasonpalmitat	Merckle Recordati, Deutschland
Limethason [®]	Dexamethasonpalmitat	Green Cross, Japan
Stesolid [®]	Diazepam	Alpharma-ISIS, Deutschland

In der klinischen und vorklinischen Untersuchung ist ein breites Spektrum von Indikationsgebieten und Arzneistoffen zu finden. Exemplarisch seien hier die Zytostatika genannt [74, 75, 67]. Vor allem das Paclitaxel wird hinsichtlich eines besseren Nebenwirkungsprofils geprüft [76, 77, 78, 79]. Weitere Beispiele für untersuchte Arzneistoffe wären das Amphotericin B [80], das Physostigmin [69], das Clofibrin [81], das Verapamil [82] und das Mefloquin [83].

Zur Herstellung der arzneistoffhaltigen Emulsionen werden zwei Verfahren unterschieden: Die Arzneistoffzugabe zu einer Emulsion kurz vor der Applikation wird In-situ-Herstellung genannt. Als Vehikel bieten sich kommerzielle Fettemulsionen zur parenteralen Ernährung an. Der Arzneistoff wird dabei oftmals zuvor in einem organischen Lösemittel gelöst. Dieses Verfahren birgt die Gefahr einer Präzipitation des Arzneistoffs und eines eventuellen Brechens der Emulsion [25]. Es wird aus diesem Grund nur in der klinischen Forschung verwendet, nicht jedoch für zugelassene Marktpräparate.

Im industriellen Maßstab wird die De-novo-Herstellung angewandt. Hier wird der Arzneistoff zunächst in der Ölphase gelöst [25] und die Emulsionsherstellung über eine Hochdruckhomogenisation schließt sich an.

Für Arzneistoffe, die weder in den akzeptierten Ölen noch im Wässrigen löslich sind, bietet die SolEmuls[®] Technologie die Möglichkeit, Emulsionssysteme mit den genannten Vorteilen zu produzieren. Es handelt sich hierbei um eine lösemittelfreie Hochdruckhomogenisation eines mikronisierten Pulvers oder einer Nanosuspension mit einer Emulsion. Hierbei kommt es zu einem Auflösen des Arzneistoffes in der Grenzfläche der Öltröpfchen [84, 85, 86, 87].

Neben den parenteralen Emulsionen finden arzneistoffhaltige Emulsionssysteme auch bei den Ophthalmika, den peroralen Arzneiformen und den Dermatika Anwendung [73, 88].

1.1.3 Weitere Anwendungen von parenteralen Fettemulsionen

1.1.3.1 Parenterale Fettemulsionen als Blutersatz

Perfluorierte Kohlenwasserstoffe können sowohl Sauerstoff, als auch Kohlendioxid in großen Mengen physikalisch lösen. Ferner sind sie sowohl chemisch als auch biologisch inert. Diese Erkenntnisse führten zu der Entwicklung von Perfluorcarbonemulsionen als Blutersatzmittel. Vor allem im Hinblick auf das Risikopotential der Übertragung von Infektionskrankheiten bieten diese Emulsionen eine sinnvolle Alternative [89].

Eine auf dem Markt erhältliche Perfluorcarbonemulsion ist das Fluosol-DA[®] (siehe **Tab. 1.1.2-1**).

1.1.3.2 Parenterale Fettemulsionen als Kontrastmittel

Ölphasen, welche mit Elementen hoher Ordnungszahl markiert sind, werden zur Kontrastdarstellung in der Computertomographie genutzt. Anwendung finden vor allem iodierte Öle. Beispiele für Marktpräparate sind das Iopamidol-ratiopharm[®] (Ratiopharm GmbH, Deutschland) und das Lipiodol[®] Ultra-Fluid (Guerbet, Deutschland).

1.2 Lagerstabilität von hydrolyseempfindlichen Arzneistoffen

Zu den hydrolyseempfindlichen Arzneistoffen zählen unter anderem solche mit Ester-, Lacton-, Amid- oder Lactamfunktionen. An diesen Funktionen findet, in Anwesenheit von Wasser, eine Spaltung des Moleküls statt, wobei Amide und Lactame eine geringere Empfindlichkeit aufweisen als Ester und Lactone.

Problematisch werden diese Strukturen folglich dann, wenn die Arzneiform einen Kontakt des Arzneistoffs mit Wasser ermöglicht; denn die Wirksamkeit und Unbedenklichkeit eines Arzneimittels beruht, wie eingangs erwähnt, auf der Konstanz seines Wirkstoffgehaltes über die Laufzeit.

In der Regel ist es deshalb nicht möglich, einen hydrolyseinstabilen Arzneistoff in einer rein wässrigen Arzneiform zu lagern. Alternative Formulierungen bieten sich in diesen Fällen an. Eine erprobte Maßnahme ist zum einen die getrennte Lagerung der wässrigen Phase und des Arzneistoffs, beispielsweise als Lyophilisat. Erst unmittelbar vor der Applikation wird der Arzneistoff gelöst.

Zum anderen kann der Versuch unternommen werden, mit Hilfe von Cyclodextrinen, Tensiden oder emulgierten Lipiden wässrige Systeme zu entwickeln, welche den Kontakt zwischen Arzneistoff und Wasser auf ein Minimum reduzieren. Erforderlich ist dabei ein Arzneistoffeinschluss in die jeweils entstandenen Strukturen (Cyclodextrine, Mizellen oder den Lipidkern). Dieser ist abhängig von den physikochemischen Eigenschaften des Arzneistoffs und nicht immer ausreichend, eine Hydrolyse auf ein akzeptables Maß zu reduzieren.

Abschließend sei erwähnt, dass die Hydrolyseempfindlichkeit auch bei Hilfsstoffen berücksichtigt werden muss. Instabilitäten können hier zu Arzneimitteln führen, welche beispielsweise aufgrund ihrer veränderten physikalischen Eigenschaften nicht mehr applizierbar sind.

1.2.1 Säure- und basenkatalysierte Esterhydrolyse

Unter einer Esterhydrolyse versteht man die Spaltung eines Esters unter Wasseraufnahme. Die entstehenden Reaktionsprodukte sind Alkohol und eine Karbonsäure. Dabei wird ein Proton von dem Alkohol und der verbleibende Hydroxylrest von der Karbonsäure aufgenommen [112]. Katalysiert wird diese Spaltung durch Hydroxylionen (nucleophiler Angriff am Carbonyl-C-Atom, *basische Esterhydrolyse*) bzw. Protonen (elektrophiler Angriff am Carbonyl-O-Atom, *saure Esterhydrolyse*). Das Beispiel einer basenkatalysierten Esterhydrolyse zeigt **Abb. 1.2.1-1**.

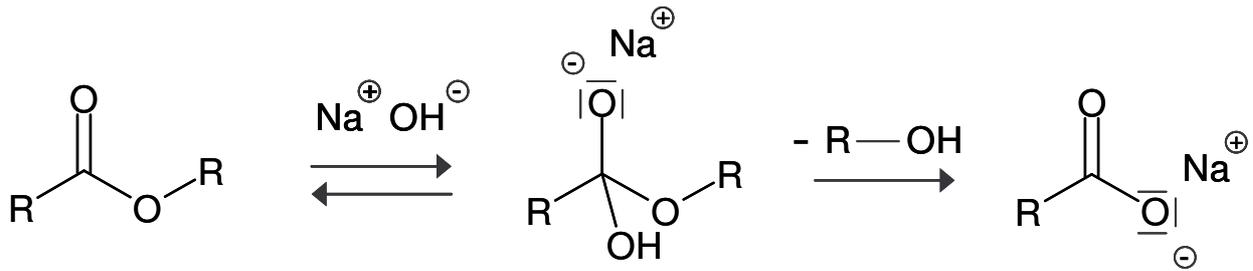


Abbildung 1.2.1-1 Reaktionsmechanismus der basischen Esterhydrolyse

Aus dieser Katalyse folgt, dass die Hydrolysegeschwindigkeit vom pH-Wert abhängig ist. Ausdruck findet dies in den folgenden Gleichungen (1) und (2):

- Saure Esterhydrolyse:

$$-\frac{dc_{\text{Ester}}}{dt} = k_{\text{H}} c_{\text{H}^+} c_{\text{Ester}} \quad (1)$$

- Basische Esterhydrolyse:

$$-\frac{dc_{\text{Ester}}}{dt} = k_{\text{OH}} c_{\text{OH}^-} c_{\text{Ester}}, \quad (2)$$

wobei k_{H} und k_{OH} die jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten, c_{H^+} die Protonenkonzentration, c_{OH^-} die Hydroxylionenkonzentration und c_{Ester} die Esterkonzentration darstellen. Es handelt sich also primär um eine Reaktion 2. Ordnung.

Da in der Regel ein Überschuss an Hydroxylionen bzw. Protonen vorliegt, sind die Konzentrationen c_{H^+} bzw. c_{OH^-} praktisch als konstant anzusehen. Man spricht in diesem Fall von einer Reaktion pseudo-erster-Ordnung. Beschrieben wird diese mit der Gleichung (3):

$$-\frac{dc_{\text{Ester}}}{dt} = k_{\text{beobachtet}} c_{\text{Ester}} \quad (3)$$

Hierbei ist $k_{\text{beobachtet}}$ die, bei einem bestimmten pH-Wert ermittelte, Reaktionsgeschwindigkeitskonstante. Eine Auftragung der Konstante gegen den pH-Wert ermöglicht es, ein Stabilitätsoptimum zu ermitteln.

Für hydrolyseempfindliche Substanzen ergibt sich jedoch häufig ein bezüglich der Stabilität optimaler pH-Wert außerhalb des physiologischen pH-Werts von 7,4 [116]. Anstelle einer isohydrischen Lösung (Lösung mit physiologischem pH-Wert) muss in diesen Fällen auf eine euhydrische Lösung ausgewichen werden. Euhydrische Lösungen weisen einen physiologisch

verträglichen pH-Wert auf, welcher sich als ein Kompromiss zwischen dem physiologischen pH-Wert und der Wirkstoffstabilität ergibt [90]. Die Auswahl des pH-Wertes ist in diesem Fall durch folgende Faktoren begrenzt:

- Die Pufferkapazität (Lösungen mit einer geringen Pufferkapazität sind besser tolerabel und können stärker vom physiologischen pH-Wert abweichen)
- Das Injektionsvolumen (je nach Pufferkapazität der Lösung sollten größere Volumina näher an dem physiologischen pH-Wert liegen)
- Dem Applikationsort (Bei einer s.c. oder i.m. Injektion ist das zur Abpufferung erforderliche Volumen an Körperflüssigkeit gering)

Weitere Parameter, welche die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflussen können, sind die Temperatur und die Ionenstärke bzw. die Dielektrizitätskonstante des Lösemittels.

Die Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten mit steigender Temperatur wird über die Arrhenius-Gleichung (4) beschrieben:

$$k = A e^{-\frac{E_A}{RT}} \quad (4)$$

Hierbei ist k die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante, A die Stoßkonstante, E_A die Aktivierungsenergie, R die allgemeine Gaskonstante und T die absolute Temperatur. Zu beachten ist, dass die Arrhenius-Gleichung nur unter folgenden Bedingungen gilt:

- Der chemische Zersetzungsprozess hat eine thermische Ursache
- Der Reaktionsmechanismus, die Reaktionsordnung und die Aktivierungsenergie bleiben im betrachteten Temperaturbereich gleich.

1.3 Besondere Anforderungen an Parenteralia

Das Europäische Arzneibuch definiert Parenteralia als sterile Zubereitungen, welche dazu bestimmt sind, in den menschlichen oder tierischen Körper infundiert, injiziert oder implantiert zu werden.

Für diese Zubereitungen gelten bestimmte Vorgaben, die die Unbedenklichkeit des Arzneimittels gewährleisten sollen. Insbesondere die mikrobielle Kontamination, die Anwesenheit von Pyrogenen, sowie der Wachstum von Organismen müssen vermieden werden.

Des Weiteren ist häufig der Zusatz von Hilfsstoffen erforderlich, welcher folgendes gewährleisten soll [90]:

- Blutisotonie
- pH-Wert Einstellung (siehe Isohydrie, Euhydrie Kap.1.2.1)
- Konservierungsmittel (insbesondere bei Mehrdosenbehältnissen)

Partikuläre Zubereitungen, wie die parenteralen Fettemulsionen, müssen zusätzliche Anforderungen an die Partikelgrößenverteilung (siehe Kap. 1.1) erfüllen. Zudem kann bei der Formulierung von Parenteralia nur auf eine begrenzte, toxikologisch unbedenkliche und zur parenteralen Applikation zugelassene Anzahl von Hilfsstoffen zurückgegriffen werden.

Die in dieser Arbeit untersuchten parenteralen Fettemulsionen orientieren sich an diesen Vorgaben. Einzig der Aspekt der Sterilität wurde als nicht relevant erachtet. Es ging nicht um die Arzneistoffstabilität während der Sterilisationsschritte, sondern vielmehr um die Abbaukinetik eines hydrolyseempfindlichen Arzneistoffes in parenteralen Fettemulsionen unter Lagerungsbedingungen bei Raumtemperatur.

1.4 Problemstellung und Zielsetzung

Die Lagerstabilität als eines der entscheidenden Anliegen bei der Formulierung parenteraler Arzneiformen stößt an Grenzen, wenn hydrolyseempfindliche Arzneistoffe vorliegen, da für parenterale Anwendungen wässrige Vehikel bevorzugt werden. Einen Ausweg bietet die Verwendung parenteraler Fettemulsionen mit der Möglichkeit, den Arzneistoff durch Einschluss in die lipophilen Kompartimente zu schützen [4].

Wie eingangs herausgestellt, wird dieser Schutz nicht vollständig sein, da es immer ein Verteilungsgleichgewicht des Arzneistoffs zwischen den einzelnen Kompartimenten in der Emulsion geben wird [5]. **Abb. 1.4-1** veranschaulicht den Zusammenhang. Ein lipophiler Arzneistoff wird die größte Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der Ölphase, also in den Öltröpfchen der Emulsion, haben. Es wird aber immer eine Verteilung in die Grenzfläche, die wässrige Phase selbst und nicht zuletzt in die flüssigkristallinen Strukturen des Emulgators in der wässrigen Phase geben. Zu der Ausbildung der flüssigkristallinen Strukturen kommt es, da der Emulgator in Konzentrationen eingesetzt wird, die über eine Absättigung der Grenzfläche hinausgehen. Diese Emulgatorkonzentrationen sind im Hinblick auf die physikalische Stabilität der Emulsion erforderlich. In der Abbildung sind exemplarisch Liposomen dargestellt, die sich für Lecithin als Emulgator in der wässrigen Phase formieren

würden. Hydrolysiert der Arzneistoff an einem dieser Aufenthaltsorte der Emulsion, so wird er im Zuge eines Konzentrationsausgleichs aus anderen Kompartimenten nachgeliefert. Dies kann selbst bei sehr geringen Aufenthaltswahrscheinlichkeiten im Hydrolysebereich zu einem inakzeptablen Wirkstoffverlust über die Lagerzeit hinaus führen.

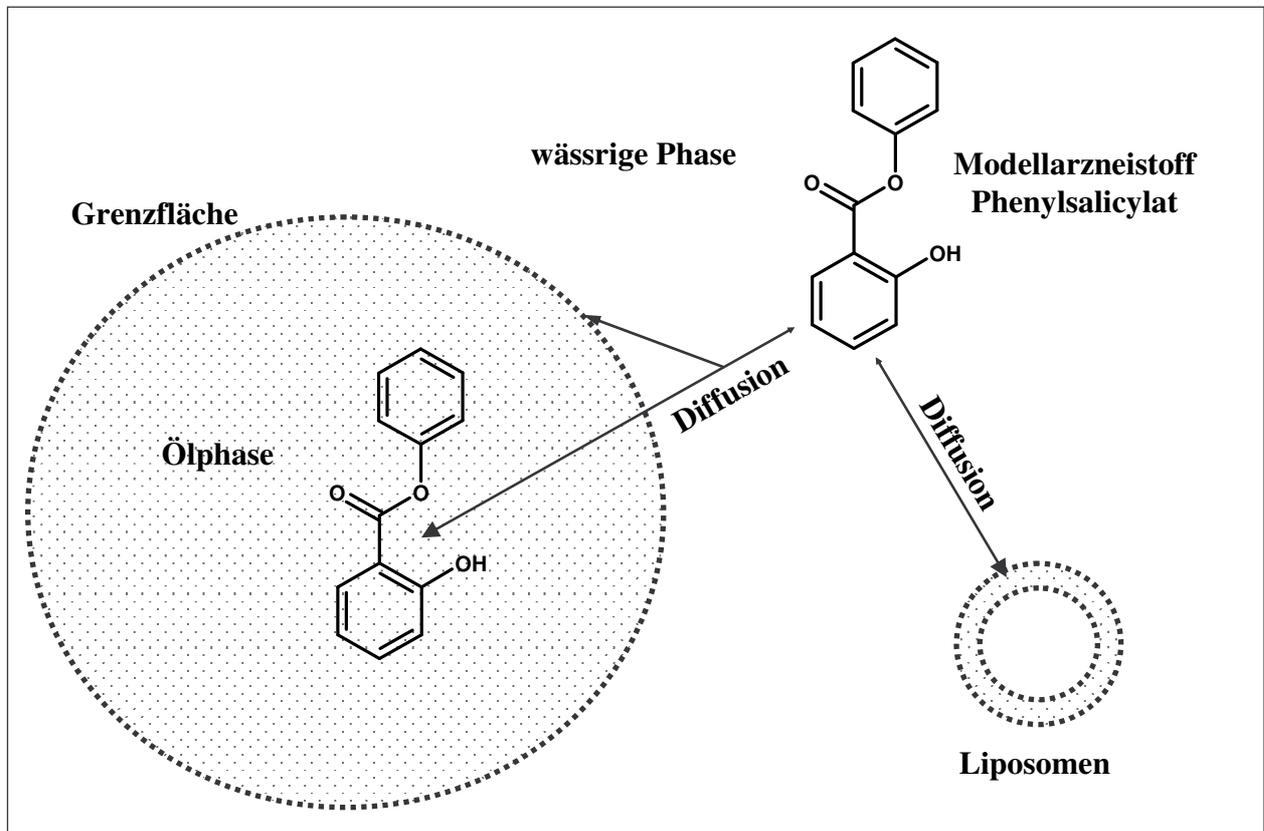


Abbildung 1.4-1 Schematische Darstellung des Diffusionsverhaltens der Modellsubstanz Phenylsalicylat in einer parenteralen Fettemulsion

Wie die einleitende Übersicht zeigt, handelt es sich bei Emulsionen um sehr komplexe Systeme, in denen mannigfaltige Variablen die Abbaukinetik eines Arzneistoffes beeinflussen und die Verteilung von Arzneistoff und Abbauprodukten für die Stabilität eine entscheidende Rolle spielen.

Viele Arbeiten beschäftigen sich lediglich phänomenologisch mit der Eignung von Formulierungen für instabile Arzneistoffe, ohne die Wirkung einzelner Parameter zu untersuchen [91, 92, 93]. Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, den bereits in der Literatur behandelten Einflussgrößen Verteilungskoeffizient und Zetapotential [6] weitere Parameter hinzuzufügen, die sich auf die Kinetik der Hydrolyse von Arzneistoffen auswirken.

Im Einzelnen wurden behandelt:

- Die Komponenten: Öl, wässrige Phase, Emulgator, Isotonisierungsmittel
- Grenzfläche zwischen Öl und Dispersionsmedium
- Emulgatorfilm an der Grenzfläche
- Emulgatorkonzentration
- Flüssig-kristalline Emulgatorstrukturen im Dispersionsmedium
- Viskosität der Ölphase

Diese Parameter leiten sich aus der **Abb. 1.4-1** ab. Wesentlich ist der Mechanismus der Arzneistoffverteilung zwischen den Emulsionskompartimenten und sein Einfluss auf die Kinetik der Hydrolyse.

Als Modellarzneistoff für die Untersuchungen wurde Phenylsalicylat gewählt. Wegen seiner geringen Wasserlöslichkeit und ausgeprägten Hydrolyseempfindlichkeit ist das Phenylsalicylat eine typische Substanz, für die parenterale Fettemulsion als Arzneistoffträger in Frage kommen.

Die Experimente wurden stufenweise aufgebaut. Den Untersuchungen an Emulsionen waren Versuche mit getrennten Öl- und Wasserphasen sowie Zweilagensystemen von wässrigen Phasen, überschichtet mit Öl, vorgeschaltet, um Größen separat messen zu können, die im komplexen Emulsionssystem nicht zugänglich waren. Zur Deutung der Ergebnisse wurde ein kinetisches Modell entwickelt, mit dem sich der hydrolytische Abbau des Phenylsalicylats und seine Abhängigkeit von den wesentlichen Einflussgrößen beschreiben lässt.

2. MATERIALIEN

2.1 Modellsubstanz Phenylsalicylat

Phenylsalicylat fand schon in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts Verwendung in medizinischen Mundwässern. Damals wurde es unter der Bezeichnung Salol vertrieben. Zur Anwendung kam es aufgrund seiner antiseptischen Eigenschaften [94]. Auch heute noch ist es ein Inhaltsstoff vieler Mundwässer. So ist es beispielsweise im wohl bekanntesten Mundwasser Odol[®] (GlaxoSmithKline Consumer Healthcare GmbH & Co. KG) enthalten. Aufgrund der dem Phenylsalicylat zugeschriebenen lokal entzündungshemmenden und leicht antiseptischen Wirkung [95] ist es auch im Balsam-Stick Dermophil Indien[®] enthalten. Er wird angewandt zur Behandlung von trockener Haut, Schründen, Frostbeulen und kältebedingten Rissen der Haut.

Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die Fähigkeit, UV-Strahlung im Wellenbereich von 230 bis 330 nm zu absorbieren. Hieraus resultiert die Verwendung in Sonnenschutzpräparaten, zur Stabilisierung photoinstabiler Substanzen [96] und als Zusatzstoff in Kunststoffen. Bei letzteren soll es einer durch UV-Strahlung bedingten Alterung vorbeugen. In die Kritik geriet es jedoch durch das Auftreten von Kontaktallergien, vor allem bei Lippenbalsamen und Kunststoffrahmen von Schutzbrillen [97, 98, 99].

Diskutiert wird auch die Verwendung des Phenylsalicylats als Akarizid. In einem vergleichenden Wirksamkeitstest erwies es sich als sehr effizient [100].

Das in dieser Arbeit untersuchte Phenylsalicylat wurde von der Fa. Lancaster (Großbritannien) bezogen.

2.1.1 Physikochemische Eigenschaften

Bei der Auswahl der Modellsubstanz sollten zwei wichtige Kriterien erfüllt sein. Sie sollte zum einen Lösungseigenschaften aufweisen, welche für einen potentiellen Wirkstoffkandidaten repräsentativ sind. In der Arzneiform parenterale Fettemulsion werden gerade solche Arzneistoffe verarbeitet, welche in Wasser eine sehr geringe Löslichkeit aufweisen [4, 10, 101]. Der Arzneistoff wird dann in den lipophilen Kompartimenten der Emulsion gelöst, steht jedoch gemäß seinem Verteilungskoeffizienten im Gleichgewicht zu einer sehr geringen Konzentration in der Wasserphase. Aufgrund dieser Verteilung kann die Hydrolyse nicht vollständig ausgeschlossen werden [5].

Zum anderen wurde eine Modellsubstanz mit hoher Hydrolyseinstabilität gesucht. Hierdurch ist, bei einer sehr geringen Konzentration im Wässrigen, noch immer eine gut verfolgbare Abbaukinetik gewährleistet.

2.1.1.1 Löslichkeit in gepuffertem Wasser (pH 7,4) bei 20 °C

Da keine Literaturstellen über die Löslichkeit des Phenylsalicylats in wässriger Lösung bei pH 7,4 vorliegen, wurde die Sättigungslöslichkeit in diesem Medium bestimmt. Ca. 100 mg Phenylsalicylat wurden in 100 mL, zuvor auf 20 °C temperierte, Pufferlösung suspendiert. Diese Proben wurden in das auf 20 °C temperierte Ultraschallbad gestellt. Die Wassertemperatur im Ultraschallbad wurde über den Messzeitraum kontinuierlich kontrolliert und gegebenenfalls mit Eis wieder auf 20 °C eingestellt. Aus einem Gefäß wurden Proben nach 1, 5, 15, 25 und 40 min gezogen. Die Konzentration des in Lösung gegangenen Phenylsalicylats wurde mittels HPLC gegen eine Standardlösung bestimmt. In **Tab. 2.1.1.1-1** sind die gefundenen Messwerte von Dreifachbestimmungen angegeben.

Tabelle 2.1.1.1-1 Phenylsalicylatkonzentration gegen die Zeit im Ultraschallbad

	Zeit				
	1 min	5 min	15 min	25 min	40 min
PS Konzentration / µg/mL P1	1,64	8,76	9,69	9,68	9,82
PS Konzentration / µg/mL P2	1,94	9,01	9,22	10,01	10,00
PS Konzentration / µg/mL P3	2,35	8,47	9,04	9,42	9,41
Mittelwert / µg/mL	1,98	8,75	9,32	9,70	9,74
Standardabweichung	0,36	0,27	0,34	0,29	0,30

Die Auswertung der ermittelten Daten erfolgte auf Basis der Noyes-Whitney-Gleichung (5).

$$\frac{dc(t)}{dt} = \frac{A}{V} b [c_s - c(t)] \quad (5)$$

Diese beschreibt die Kinetik der Auflösung eines Feststoffes in Lösungsmitteln [102]. b ist eine Konstante, welche sich aus dem Diffusionskoeffizienten und der Dicke der Diffusionsschicht zusammensetzt. Des Weiteren ist auch das Volumen (V) in dem Versuchsaufbau als konstant anzusehen. Auch die Grenzfläche (A) kann als konstant gelten, wenn nach der Sättigung ein hinreichender Überschuss an Kristallen bleibt und diese keinem Zerkleinerungsprozess unterworfen sind. Der Term vor der Klammer wird aus diesem Grund zu einer Konstanten B zusammengezogen:

$$\frac{dc(t)}{dt} = B c_s - k c(t) \quad (6)$$

Die Lösung dieser inhomogenen Differentialgleichung ist mit der Randbedingung $c(t=0) = 0$ ergibt die Gleichung (7)

$$c(t) = c_s (1 - e^{-Bt}) . \quad (7)$$

Mit Hilfe der kleinsten Fehlerquadrate wird eine Ausgleichsgerade auf Basis der Gleichung (7) an die Messwerte angepasst. Diese dient der Ermittlung der Parameter c_s und B . Es ergibt sich so eine Sättigungslöslichkeit des Phenylsalicylats von $9,7 \mu\text{g/mL}$ bei einem B -Wert von $0,374 \text{ min}^{-1}$. Die Messwerte, wie auch die Ausgleichskurve, sind in **Abb. 2.1.1.1-1** dargestellt.

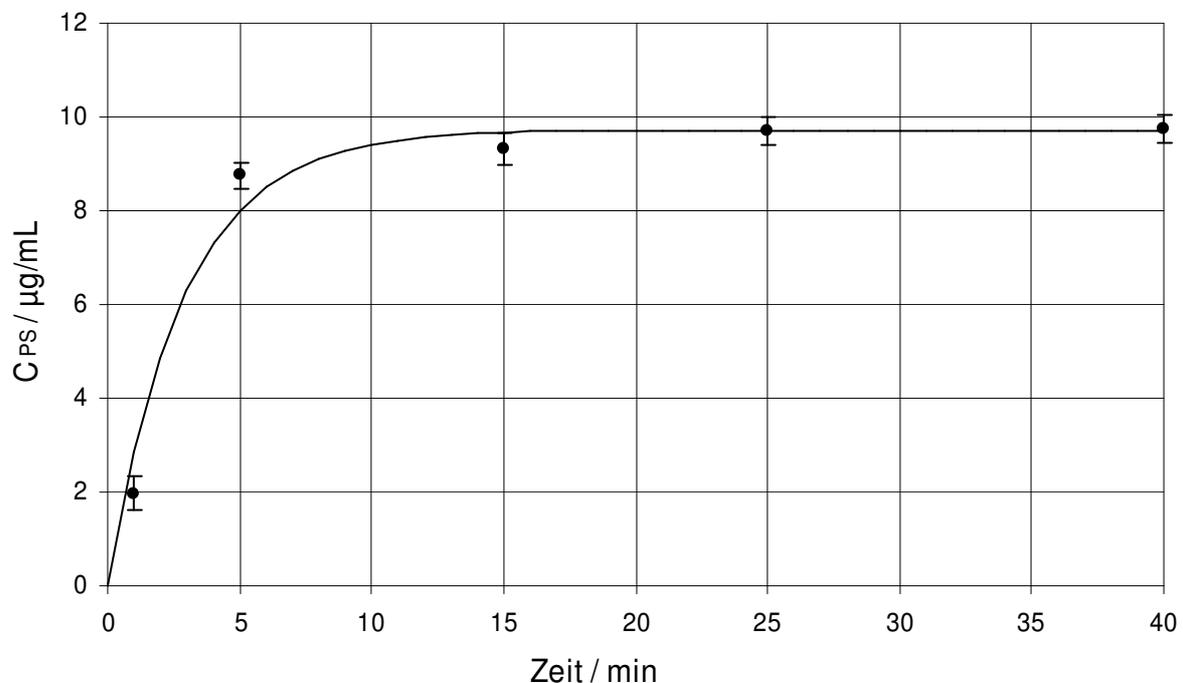


Abbildung 2.1.1.1-1 Phenylsalicylatkonzentration gegen die Zeit. Auftragung der Messwerte (•) und der Ausgleichskurve (-)

Nach der Festlegung im Europäischen Arzneibuch ist das Phenylsalicylats in der Pufferlösung als praktisch unlöslich einzuordnen.

2.1.1.2 Verteilungskoeffizienten

In einem System aus zwei nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten wird sich ein gelöster Arzneistoff zwischen den zwei Phasen bis zu einem bestimmten Verhältnis oder bis zur Sättigung verteilen. Der Gleichgewichtszustand wird beschrieben durch die Gleichung (8).

$$\frac{c_{\text{Öl}}}{c_{\text{Wasser}}} = \kappa \quad (8)$$

$c_{\text{Öl}}$ und c_{Wasser} bezeichnen die Gleichgewichtskonzentrationen des Arzneistoffes in der jeweiligen Phase. Die Gleichgewichtskonstante κ wird als Verteilungskoeffizient bezeichnet [103]. Schon früh wurde die Bedeutung des Verteilungskoeffizienten für die Wirksamkeit des Konservierungsmittels in Emulsionssystemen erkannt, da sich Bakterien im System Öl in Wasser bevorzugt in der wässrigen Phase und an der Grenzschicht aufhalten [104]. Aus diesem Grund ist für die Wirksamkeit des Konservierungsmittels der Verteilungskoeffizient und die daraus resultierende Konzentration im Wässrigen entscheidend. Verschiedene Arbeiten haben sich mit dieser Thematik befasst [104, 105, 106, 107]. Auch für die Lagerstabilität von hydrolyseempfindlichen Arzneistoffen in Emulsionen wird der Verteilungskoeffizient als wichtiger Parameter postuliert [6, 108]. Dieser Ansatz wird in dem Teil „Mehrphasensysteme“ dieser Arbeit diskutiert.

Zur Übersicht seien hier die Verteilungskoeffizienten des Phenylsalicylats zwischen den untersuchten Ölen und der auf pH 7,4 gepufferten wässrigen Lösung gegeben (siehe **Tab. 2.1.1.2-1**).

Tabelle 2.1.1.2-1 Verteilungskoeffizienten des Phenylsalicylats Zwischen dem Phosphat Puffer und verschiedenen Ölen

Wasserphase	Ölphase	κ_{PS}
Phosphatpuffer pH 7,4	Miglyol	20 698 ± 765
	Olivenöl	12 811 ± 230
	Rapsöl	13 553 ± 331
	Rizinusöl	11 326 ± 118
	Sojabohnenöl	13 957 ± 392

Die Werte wurden mit Hilfe des später beschriebenen Zweilagensystems ermittelt.

2.1.2 Hydrolytischer Abbau der Modellschubstanz

Die Esterfunktion des Phenylsalicylats wird im wässrigen Medium, unter der Bildung der Abbauprodukte Salicylsäure und Phenol, hydrolysiert. Die Hydrolyse verläuft nach einer Kinetik pseudo-1. Ordnung (siehe Kapitel 1.2.1). Beschrieben wird sie nach Gleichung (9)

$$-\frac{dc_{\text{PS}}(t)}{dt} = k c_{\text{PS}}(t) \quad (9)$$

Die Integration der Differentialgleichung mit der Randbedingung für die Ausgangskonzentration $c(t=0) = c_0$ ergibt Gleichung (10). Die Proportionalitätskonstante k wird dabei als Geschwindigkeitskonstante bezeichnet.

$$c_{\text{PS}}(t) = c_{0\text{PS}} e^{-kt} \quad (10)$$

Aufgrund der zur Esterfunktion orthoständigen Hydroxylgruppe ist die Hydrolyse intramolekular basenkatalysiert [109, 110]. Die Autokatalyse ist schematisch in **Abb. 2.1.2-1** dargestellt. Diese zusätzliche Destabilisierung des Esters unterstützt die Eignung des Phenylsalicylats als Modellschubstanz für die kinetischen Untersuchungen in dieser Arbeit.

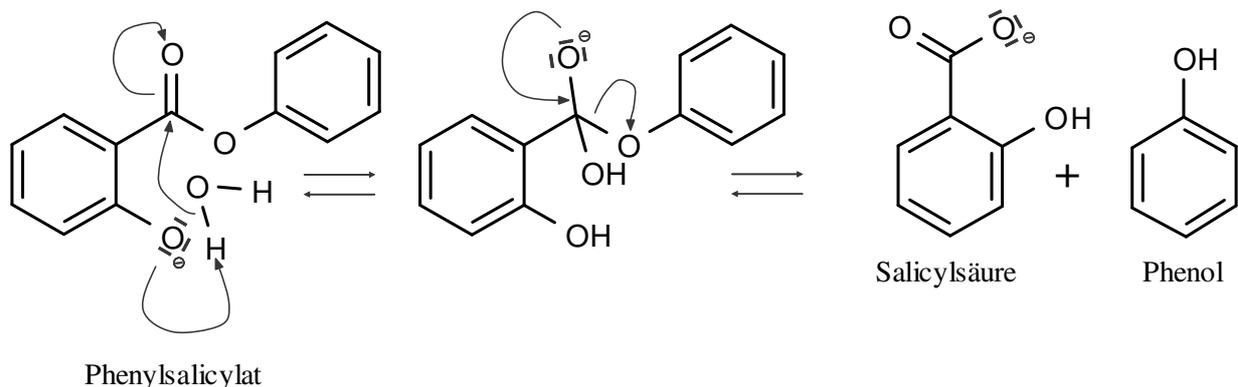


Abbildung 2.1.2-1 Mechanismus der alkalisch autokatalysierten Hydrolyse des Phenylsalicylats

2.2 Fette Öle

Unter fetten Ölen versteht man Triacylglyceride, also Glycerolester gesättigter und ungesättigter Fettsäuren, welche bei Raumtemperatur flüssig sind. Die in dieser Arbeit untersuchten fetten Öle sind ausschließlich pflanzlichen Ursprungs. Die Fettsäuren dieser Öle sind fast ausnahmslos unverzweigt und besitzen eine gerade Anzahl an Kohlenstoffatomen. Des Weiteren sind, in der Regel, die Hydroxylgruppen eins und drei des Glycerols mit einer gesättigten, die Position zwei jedoch mit einer ungesättigten Fettsäure verestert.

Charakteristisch für die rein pflanzlichen Öle ist das Vorkommen von Begleitstoffen wie Sterolen, Tocopherolen, Fettsäuren und anderer hydrophober Substanzen.

2.2.1 Miglyol 812 (Mittelkettige Triglyceride)

Miglyol 812 (Cognis Deutschland GmbH & Co. KG, Deutschland) ist ein halbsynthetisches, flüssiges Triglyceridgemisch gesättigter Pflanzenfettsäuren mittlerer Kettenlänge. Die nach Ph. Eur. 5.03 erforderliche Fettsäurezusammensetzung lautet: Capronsäure maximal 2 %, Caprylsäure 50-80 %, Caprinsäure 20-50 %, Laurinsäure maximal 3 % und Myristinsäure maximal 1 %. Das Öl ist praktisch farblos, geschmacklich, sowie geruchlich neutral und niedrigviskos. Die Bestimmung der dynamischen Viskosität bei 20 °C ergab einen Wert von 27,2 mPas. Oral findet es Anwendung als öliges Vehikel für Suspensionen oder Lösungen. Des Weiteren als spreitungs- und permeationsförderndes Agens in Salben, Cremes und Hautölen [111, 112]. Auch als lipophile Komponente in parenteralen Fettemulsionen erfährt es eine breite Verwendung [22, 113].

2.2.2 Olivenöl (natives)

Olivenöl (Fa. Bombastus-Werke AG, Deutschland) wird durch das kalte Pressen des Fruchtfleisches der Olivenfrucht gewonnen. Es besitzt eine hellgelbe bis schwach grüne Färbung und ist dünnflüssig. Die Bestimmung der dynamischen Viskosität bei 20 °C ergab einen Wert von 78,0 mPas. Chemisch ist es ein Gemisch von Glycerinestern verschiedener Ölsäuren folgender Zusammensetzung: Spuren von Myristin-, 9,0 % Palmitin-, 2,3 % Stearin-, 0,2 % Arachin-, 82,5 % Öl- und 6,0 % Linolsäure. Anwendung findet es beispielsweise als Arzneiträger für ölige Injektionen, Salbenzubereitungen und in O/W-Emulsionen [111, 112].

2.2.3 Rapsöl (raffiniertes)

Rapsöl (Fa. Bombastus-Werke AG, Deutschland), auch als Rüböl bezeichnet, wird durch Kaltpressung aus den Samen der Rapspflanze gewonnen. Es ist hellgelb und leicht bitter im Geschmack. Nach der Ph. Eur. 5.03 enthält die Fettsäurefraktion maximal 2 % Erukasäure, maximal 5 % Eicosensäure, 50-67 % Ölsäure, 16-30 % Linolsäure, 6-14 % Linolensäure und 2,5-6 % Palmitinsäure. Eine dynamische Viskosität von 70,6 mPas wurde ermittelt. In Salben und Weichgelatine kapsel wird das Rapsöl als Hilfsstoff verwandt [111, 112].

2.2.4 Rizinusöl (raffiniertes)

Rizinusöl (Fa. Bombastus-Werke AG, Deutschland) ist das aus Rizinussamen durch Kaltpressung gewonnene Öl. Es ist blassgelb gefärbt, geruch- und geschmacklos, sowie hochviskos. Die Bestimmung der dynamischen Viskosität ergab einen Wert von 1090,0 mPas. Die Fettsäuren setzen sich nach den Anforderungen der Ph. Eur. 5.03 wie folgt zusammen: weniger als 1 % Arachin-, weniger als 2 % Palmitin-, 7-14 % Stearin- und 78-91 % Ricinolsäure. Die Ricinolsäure wirkt laxierend, weswegen das Öl zur Behandlung der Obstipation Anwendung findet. Des Weiteren wird es technologisch zur Herstellung von Augentropfen und Injektionen genutzt. Besonders geeignet ist es als Vehikel für Steroidhormone, wobei in der Regel noch Benzylbenzoat, zur Reduktion der Viskosität, zugesetzt wird [111, 112, 113].

2.2.5 Sojabohnenöl (raffiniertes)

Sojabohnenöl (Fa. Lipoid KG, Deutschland) wird aus Sojabohnen durch Pressen oder Extraktion gewonnen. Es ist hellgelb, sowie geruch- und geschmacklos. Die dynamische Viskosität beträgt 62,0 mPas. Nach der Ph. Eur. 5.03 gilt für die Fettsäurezusammensetzung folgende Vorgabe: Weniger als 0,2 % Myristinsäure, 3-5 % Stearinsäure, 9-13 % Palmitinsäure, 17-30 % Ölsäure, 48-58 % Linolsäure und 5-10 % Linolensäure. Außer als Nahrungsmittel findet es Anwendung in kosmetischen Zubereitungen und zur Herstellung injizierbarer Fettemulsionen [111, 112, 113].

2.3 D- α -Tocopherol

Die Tocopherole sind eine Gruppe natürlicher und synthetischer Verbindungen. Der prinzipielle Aufbau besteht aus einem Chromangrundkörper, welcher eine Phenolgruppe und eine Isoprenoidseitenkette trägt. Unterschiede in dieser Stoffgruppe bestehen in Anzahl und Stellung der Methylgruppen am Chromanring. Der bekannteste Vertreter ist das D- α -Tocopherol (Fluka Chemie GmbH, Schweiz), er wird auch als Vitamin E bezeichnet. Es ist ein potentes, lipidlösliches Antioxidans. Seine wohl wichtigste physiologische Funktion besteht in dem Schutz ungesättigter Fettsäuren in Biomembranen vor Oxidation [114, 115]. Technologisch wird es als Antioxidans zum Schutz von Wirk- oder Hilfsstoffen eingesetzt [116]. Auch als Ölkomponente für die Herstellung arzneistoffhaltiger parenteraler Fettemulsionen wird es diskutiert [76, 117].

2.4 Emulgatoren

Die „klassischen“ Emulgatoren gehören zu der Stoffklasse der Tenside. Diese sind durch einen polaren und einen unpolaren Molekülteil gekennzeichnet. Sie sind dadurch amphiphil, d. h. sie besitzen eine Affinität sowohl zu Wasser, als auch zu unpolaren Lösemitteln und reichern sich an der Grenzfläche zwischen Wasser und Öl oder Wasser und Gas an [116].

Bei der Dispersion zweier nicht miteinander mischbarer Flüssigkeiten entsteht, in direkter Abhängigkeit von der Grenzflächenspannung an der erzeugten Grenzfläche, eine hohe Grenzflächenenergie. Aufgrund dieser hohen Grenzflächenenergie handelt es sich bei den Emulsionen um thermodynamisch instabile Systeme.

Der Emulgator ist für die Stabilisierung solcher Systeme von entscheidender Bedeutung. Ohne ihn würde mit hoher Wahrscheinlichkeit der zufällige Zusammenstoß von Tröpfchen zu einer irreversiblen Koaleszens (Zusammenfließen) führen, die sich fortsetzt bis zum Brechen (Phasentrennung) der Emulsion. Aufgabe des Emulgators ist es, diese Wahrscheinlichkeit soweit abzusenken, dass eine lagerfähige Emulsion erhalten wird. Neben der Koaleszens kann es auch zum Aggregieren (reversible Verbindung zwischen Tröpfchen unter dem Erhalt einer Grenzschicht) oder Aufrahmen (Sedimentieren) kommen.

Der Emulgator hat die Aufgabe, das thermodynamische Bestreben der Emulsion zur Phasentrennung so weit kinetisch zu hemmen, dass die Emulsion lagerfähig wird. Erreichen kann er dies indem er sich an der Grenzfläche anreichert und dort unter der Wirkung eines Grenzflächendrucks ausdehnt. Um diesen Grenzflächendruck wird die Grenzflächenspannung vermindert [118].

Des Weiteren spielt die sterische und/oder elektrostatische Stabilisierung durch den Emulgator eine entscheidende Rolle.

Bei der elektrostatischen Stabilisierung handelt es sich um eine Abstoßung der Tröpfchen infolge gleichsinniger Oberflächenladung, welche über das Zetapotential charakterisiert werden kann. Behandelt werden diese Effekte im Unterkapitel 3.3.2 Zetapotential.

Die sterische Stabilisierung wird im Unterkapitel 2.4.3 Polymeremulgatoren besprochen. Hierbei wird die Annäherung der Tröpfchen sterisch behindert. Die Polymeremulgatoren werden neben den „klassischen“ Emulgatoren zur Emulsionsstabilisierung verwendet.

Ein schnelles Migrieren des Emulgators in die Grenzfläche, sowie das Ausbilden eines intakten Grenzflächenfilms, sind für die genannten Wirkungen Voraussetzung.

Nur eine begrenzte Zahl von Emulgatoren ist, aufgrund der toxikologischen Daten, für die parenterale Anwendung geeignet. Zu ihnen zählen insbesondere die im Folgenden aufgelisteten.

2.4.1 Nichtionische Emulgatoren

Bei den nichtionischen Emulgatoren handelt es sich um Tenside, deren hydrophiler Molekülteil aus ungeladenen Hydroxyl- oder Polyoxyethylengruppen besteht. Den lipophilen Teil bildet in der Regel ein langkettiger Alkylrest.

2.4.1.1 Tween 80[®]

Das Tween 80[®] (Polyoxyethylen(20)sorbitanmonooleat) gehört zu der Gruppe der Polysorbate. Es handelt sich chemisch betrachtet um Partialester des Sorbitols und seiner Anhydride mit höheren Fettsäuren, welche mit ca. 20 Molen Ethylenoxid pro mol Sorbitol copolymerisiert sind. Im Falle des Tween 80[®] wird als Fettsäure die Ölsäure eingesetzt.

Anwendung findet es als nichtionischer, sterischer O/W-Emulgator und als Lösungsvermittler [111, 112]. Aufgrund seiner geringen Toxizität ist es auch in parenteralen Zubereitungen zugelassen [119].

2.4.1.2 D- α -Tocopheryl-polyethylenglykol-1000-succinat (TPGS)

Das TPGS (Fa. Eastman, USA) ist eine wachsartige Substanz von weißer bis hellgelber Farbe. Der Schmelzpunkt liegt bei ca. 38 °C. Es besitzt eine sehr hohe Löslichkeit im Wässrigen (bis zu 20 %). Anwendung finden kann es daher als wasserlösliche Quelle des Vitamins E. Aufgrund seiner amphiphilen Struktur ist es sogleich auch ein wichtiger Hilfsstoff und wird genutzt als Emulgator, Lösungsvermittler und Absorptionsbeschleuniger [76, 113].

2.4.2 Ionische Emulgatoren

Ionische Emulgatoren sind Tenside, bei denen die hydrophile Gruppe im Molekül eine geladene funktionelle Gruppe darstellt. Unterscheiden kann man hierbei noch die Untergruppen anionisch und kationisch, je nach Ladungsträger im Molekül. Die kationischen Emulgatoren werden in der Pharmazie nur als Desinfektions- oder Konservierungsmittel verwendet [116]. Anionische Emulgatoren hingegen werden, vor allem als Koemulgator, auch zur Emulsionsherstellung genutzt.

2.4.2.1 Natriumoleat

Das Natriumoleat (Fa. Lipoid KG, Deutschland) ist ein weißes, agglomeriertes Pulver. Anwendung finden die Salze langkettiger Fettsäuren als Koemulgator bei der Emulsionsherstellung [120]. Sie gehören zu der Gruppe der anionischen Emulgatoren.

2.4.3 Amphotere Emulgatoren

Bei den amphoteren Emulgatoren handelt es sich um einen Spezialfall der ionischen Emulgatoren. Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass sie sowohl negative, als auch positive Ladungen tragen.

2.4.3.1 Lecithin

Lecithin ist ein komplexes Gemisch von Phosphoglyceriden. Bei den Phosphoglyceriden handelt es sich um Stoffe, bei denen Glycerol mit einer Phosphorsäure und zwei Fettsäuren verestert ist. Die Phosphorsäure ist zusätzlich mit einer stickstoffhaltigen Komponente verbunden.

Hauptbestandteil des Lecithins sind die Phosphatidylcholine. Sie besitzen als stickstoffhaltige Komponente das Cholin. Unterschiede bestehen in der Fettsäurezusammensetzung, so dass es sich auch hier um ein Stoffgemisch handelt [121, 122]. Weitere Lecithinbestandteile sind exemplarisch die Phosphatidylethanolamine, die Lyso-Phosphatidylcholine und die Lyso-Phosphatidylethanolamine.

Die Phosphatidylcholine sind als Baustein von Biomembranen ubiquitär verbreitet. Diese zeigen einen doppelschichtigen Aufbau, bei dem die Acylketten nach innen orientiert sind. Die polaren Kopfgruppen orientieren sich hierbei nach außen und stehen im Kontakt mit dem sie umgebenden wässrigen Medium.

Pharmazeutische Bedeutung haben vor allem die natürlichen Lecithine, die meist aus Sojabohnen oder Hühnereigelb gewonnen werden. Durch verschiedene Aufarbeitungs- und Fraktionierungsschritte ist das Lecithin in unterschiedlichen Qualitäten erhältlich. Dies ist von entscheidender Bedeutung, da beispielsweise die Stabilität der Emulsion stark von der Zusammensetzung des Stoffgemisches abhängt [127].

Aufgrund seiner guten Verträglichkeit findet das Lecithin eine breite Anwendung in Form von Liposomen (z.B. DaunoXome[®]) oder als Emulgator zur Herstellung parenteraler Fettemulsionen (siehe **Tab. 1.1.1-1**).

In den Untersuchungen dieser Arbeit kam das Handelspräparat Lipoid E80[®] (Fa. Lipoid KG, Deutschland) zur Anwendung. Es hatte eine gelbe Färbung und war von wachsartig bis fester Konsistenz. Als Lecithinquelle diente hier das Hühnereigelb. Der Anteil an Phosphatidylcholin wurde auf 80 % eingestellt. Die zweitgrößte Stoffgruppe waren in diesem Produkt die Phosphatidylethanolamine mit 7 bis 9,5 %.

2.4.4 Polymeremulgatoren

Eine Alternative zu den „klassischen“ Emulgatoren bieten die Polymeremulgatoren. Es handelt sich hierbei um grenzflächenaktive Makromoleküle, welche, in der Regel, eine räumliche Trennung zwischen hydrophilen und lipophilen Bereichen im Molekül aufweisen. Auffällig ist, dass zwar ein Assoziationsvermögen besteht, aber keine kritische Mizellbildungskonzentration ermittelt werden kann.

Ihr Vorteil liegt in der geringeren Empfindlichkeit gegenüber Elektrolyten. Des Weiteren besitzen einige Makromoleküle mukoadhäsive Eigenschaften, welches bei verschiedenen Indikationen von Vorteil sein kann [123].

Die Orientierung der Polymere an der Grenzfläche wird mit Hilfe des „tail-loop-train“ Modells beschrieben (siehe **Abb. 2.4.4-1**) [124]. Die losen Enden des Polymers werden als tail, die Schleifen als loop und die an der Grenzfläche orientierten Bereiche als train bezeichnet.

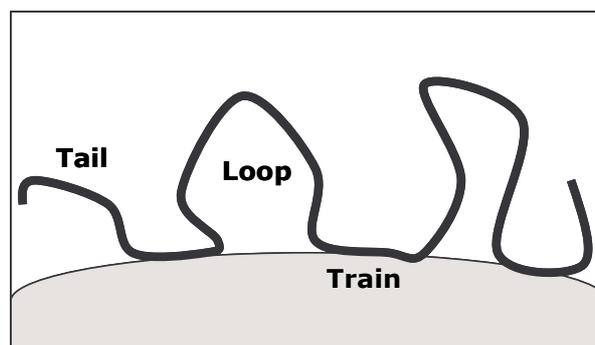


Abbildung. 2.4.4-1 Schematische Darstellung der Adsorption von Polymeremulgatoren an eine Grenzfläche

Für den Schutz vor Koaleszenz der Tröpfchen ist das Verhältnis von den train-, zu den loop-Bereichen entscheidend [125]. Weit ins wässrige reichende loop-Bereiche verhindern sterisch das Annähern und im Folgenden das Koaleszieren der Tröpfchen.

Die sterische Stabilisierung hat zwei Ursachen:

1. Die Enthalpiestabilisierung

Nähern sich zwei Tröpfchen, so überlappen sich die adsorbierten Schichten. Als Folge der erhöhten Polymerkonzentration im Überlappungsbereich erzeugt dies einen Anstieg des osmotischen Drucks. Dies erzwingt einen Konzentrationsausgleich, welcher durch das Auseinanderdiffundieren der Tröpfchen erreicht wird.

2. Die Entropiestabilisierung

Die Polymerdeformation und -kompression im Überlappungsbereich schränkt deren Bewegungsfreiheit ein. Hierdurch wird die Ordnung des Systems erhöht, was eine Absenkung der Entropie zur Folge hat. Dies ist thermodynamisch ungünstig und begünstigt ebenfalls die Trennung.

Um eine Flockung der Tröpfchen zu vermeiden, muss einer Aggregation der Makromoleküle verhindert werden. Diese ist bei ausreichender Solvatisierung der Polymersegmente eingeschränkt.

2.4.4.1 Pluronic F 68[®]

Das Pluronic F 68[®] (BASF, D-Ludwigshafen) ist ein weißer Feststoff. Er gehört zu der Gruppe der Poloxamere. Hierbei handelt es sich um Blockcopolymere, welche durch Kondensation von Ethylenoxid und Propylenoxid gewonnen werden. Der Polymerisationsgrad der einzelnen Bausteine und das Molekulargewicht sind variabel. Je nach Molekulargewicht sind die Poloxamere fest oder flüssig.

Beim Pluronic F 68[®] liegt ein mittleres Molekulargewicht von 7680-9510 vor. Der Anteil an Ethylenoxid im Molekül beträgt ca. 80 %.

Als Lösungsvermittler, Netzmittel und Emulgator findet es in der pharmazeutischen Technologie Anwendung. Aufgrund seiner geringen Toxizität ist es auch parenteral applizierbar [111, 112].

2.5 Nichtionische Isotonisierungsmittel

Da die nichtionischen Isotonisierungsmittel das Zetapotential nicht beeinflussen, finden sie Verwendung bei der Produktion von parenteralen Fettemulsionen. Eine hohes Zetapotential ist vorteilhaft, um eine ausreichende physikalische Stabilität der Emulsion über eine elektrostatische Abstoßung zu erreichen [126]. Dies trifft z.B. für Emulsionen zu, die mit

Lecithin stabilisiert werden [127]. Ionische Isotonisierungsmittel können das Zetapotential durch eine Kompression der diffusen Schicht erniedrigen. Dies führt zu einer reduzierten elektrostatischen Abstoßung und erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Koaleszens. Letztlich bedingt dies eine schnellere Phasentrennung [128]. Siehe dazu auch Abschnitt 3.3.2.

2.5.1 Glucose

Die Glucose (Fa. Merck, Deutschland) ist ein weißes, kristallines Pulver, welches sehr gut wasserlöslich ist. Sie wird überwiegend über den enzymatischen Abbau von Stärke gewonnen.

Anwendung findet sie als Füllstoff bei der Tablettenpressung. Weiterhin nutzt man sie als Kohlenhydratkomponente in der parenteralen Ernährung, sowie als osmotisch wirksamen Bestandteil in Flüssigkeitsersatzlösungen [111, 112].

2.5.2 Glycerol

Glycerol (Fa. Merck, Deutschland) ist eine farblose, viskose und sehr hygroskopische Flüssigkeit. Sie ist in jedem Verhältnis mit Wasser mischbar.

Das Glycerol findet vorwiegend in drei Bereichen Anwendung: Als Feuchthaltemittel in topischen Zubereitungen bzw. Kapseln, peroral sowie rektal als Abführmittel und parenteral als osmotisch wirksamer Zusatz [111, 112].

2.5.3 Laktose

Laktose (Fa. Merck, Deutschland) bzw. Milchzucker, ein Disaccharid der Glucose und Galactose, wird aus der Molke von Kuhmilch gewonnen. Über modifizierte Kristallisations- und Trocknungsschritte werden unterschiedliche Qualitäten erhalten, die α - und die β -Form. Das weiße kristalline Pulver der α -Form ist als Monohydrat oder wasserfrei, das der β -Form nur wasserfrei erhältlich.

Verwendet wird die Laktose als mildes Laxans und als Füllstoff bei der Tablettierung. Die sprühgetrocknete Laktose kann als Trockenbindemittel bei der Direkttablettierung eingesetzt werden [111, 112].

Gelegentlich wurden Unverträglichkeiten beschrieben, welche jedoch keine signifikant toxischen Risiken in sich bergen [129].

2.5.4 Sorbitol

Das weiße, sehr gut wasserlösliche Pulver Sorbitol (Fluka Chemie GmbH, Schweiz) ist ein sechswertiger Alkohol. Er wird großtechnisch bei der katalytischen Hydrierung der Glucose gewonnen.

Anwendung findet es als Zuckeraustauschstoff zur Kariesprophylaxe. Sprühgetrocknetes Sorbitol wird zur Tablettenherstellung genutzt. Ferner dient es als Feuchthaltemittel und Weichmacher in Weichgelatinekapselform [111, 112].

2.6 Ionische Isotonisierungsmittel

In allen Systemen, welche keine Stabilitätsprobleme durch eine Beeinflussung des Zetapotentials aufzeigen, bietet sich der Einsatz eines kostengünstigen, ionischen Isotonisierungsmittels an. In dieser Arbeit diente der Einsatz nur zu Vergleichszwecken.

2.6.1 Natriumchlorid

Das Natriumchlorid (Fa. Merck, Deutschland) ist ein weißer, kristalliner Feststoff, welcher sich sehr gut im Wasser löst. Durch eine Verunreinigung mit Magnesiumchlorid oder -sulfat wird es hygroskopisch.

Für den menschlichen Organismus ist es von entscheidender Bedeutung. Es dient beispielsweise der Aufrechterhaltung der osmotischen Konzentrationen im Biosystem oder der Reizweiterleitung.

In der pharmazeutischen Technologie wird es als ionisches Isotonisierungsmittel verwendet. Das bekannteste Handelspräparat ist die isotonische Natriumchloridlösung.

Auch in der Tablettenfabrikation kann es als direkt verpressbare Füllsubstanz genutzt werden [111, 112].

2.7 Sonstige Hilfsstoffe

2.7.1 L(+)-Ascorbylpalmitat

Das Ascorbylpalmitat (Fa. Merck, Deutschland) ist ein weißes, kristallines Pulver und schwer löslich in kaltem Wasser. Synthetisiert wurde es, um die antioxidativen Eigenschaften der Ascorbinsäure auch in lipophilen Medien nutzen zu können. Besonders hilfreich ist es insofern beim Schutz von Fetten und fettlöslichen Vitaminen vor der Oxidation [111]. In Kombination mit D- α -Tocopherol wurden synergistische Effekte bei der antioxidativen Wirksamkeit beschrieben [130, 131].

Aufgrund seiner lipophilen aliphatischen Kette und der hydrophilen Ascorbinsäure zeichnet sich das Molekül durch eine ausgeprägte Amphiphilie aus. Seine Eignung als Emulgator wurde aus diesem Grund diskutiert. Limitierend wurde jedoch die geringe Stabilität gegenüber Oxidantien erwähnt [132].

2.7.2 Cholesterol

Der Hauptvertreter der Sterine, das Cholesterol (Solvay Duphar BV, Niederlande) wird aus Wollwachs, Rückenmark oder Gallensteinen mittels Extraktion gewonnen. Es stellt sich als ein weißer platten- oder pulverförmiger Feststoff dar. Im Wässrigen ist es praktisch unlöslich.

Anwendung findet es in der pharmazeutischen Technologie vornehmlich als Emulgator [111]. Vor allem wegen seiner membranverfestigenden Eigenschaften in Phospholipid-doppelschichten wird es in der Literatur diskutiert [133, 134, 135].

2.7.3 Carnaubawachs

Aus den Blättern der Carnaubapalme wird das Carnaubawachs (Aldrich-Chemie GmbH & Co KG, Deutschland) gewonnen. Es ist gelb gefärbt und weder in Wasser noch in Alkohol, wohl aber in Fetten löslich [111].

Anwendung findet es zu der Verfestigung von Salben und Cremes. Auch die Anwendbarkeit für die Produktion von festen Lipid-Nanopartikel als Arzneistoffträger wird untersucht [136, 137].

2.7.4 N-Methylpyrrolidon

Unter der Handelsbezeichnung Pharmasolve[®] wird das N-Methylpyrrolidon (Fa. ISP Technologies, USA) vertrieben. Es ist eine farblose, niedrig viskose Flüssigkeit, die mit Wasser und den gebräuchlichen Lösemittel in jedem Verhältnis mischbar ist.

Technologisch findet es Verwendung als Extraktionsmittel zur Gewinnung technologischer Kohlenwasserstoffe sowie als Lösemittel für Kunststoffe [111]. Auch als Lösungsvermittler für schwer wasserlösliche Arzneistoffe wird es verwandt [113]. Beispiele für Handelspräparate sind Eligard[®] (Wirkstoff: Leuprolidacetat) und Atrigel[®] (Wirkstoff: Doxycyclin).

2.7.5 Phosphatpuffer pH 7,4

Zur Herstellung des Phosphatpuffers wurden 6,8 g Kaliumdihydrogenphosphat und 34,7 g 1N Natronlauge mit Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Mit 0,1 N Natronlauge bzw. 0,1 N

Salzsäure wurde der pH-Wert eingestellt. Alle drei Chemikalien stammten von der Fa. Merck (Deutschland). Der Puffer hatte eine Osmolarität von ca. 100 mOsm/kg.

2.7.6 Wasser

Das in dieser Arbeit verwendete Wasser entsprach der Monographie „Water, purified“ der European Pharmacopoeia 5.03. Die Wasseraufbereitungsanlage Purelab Plus[®] (USF Elga, D-Siershahn) wurde zur Herstellung genutzt. Sie erzeugt eine Wasserqualität, welche durch eine Wasserleitfähigkeit von 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$, einem Widerstand von 18,2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ und einem **TOC-Wert (Total Organic Carbon)** von 3 bis 8 ppb charakterisiert ist.

3. METHODEN

3.1 Herstellung der Emulsionen

Wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, wird die In-situ- von der De-novo-Herstellung arzneistoffhaltiger O/W Emulsionen unterschieden. In dieser Arbeit fand ausschließlich die De-novo-Herstellung Anwendung, welche, da im industriellen Maßstab eingesetzt, eine größere praktische Relevanz besitzt. Auch weisen die mit Hilfe der In-situ-Methode produzierten Emulsionen eine geringere physikalische Stabilität auf [25, 70]. Dies würde eine Beobachtung über einen längeren Zeitraum erschweren.

Von jeder Emulsion wurden drei wirkstoffhaltige sowie eine Placeboemulsion produziert. Die Placeboemulsion diente, bei der Gehaltsbestimmung mittels HPLC, der Ermittlung von eventuell störenden Matrixpeaks.

3.1.1 De-novo-Herstellung

Die Emulsionen wurden wie folgt hergestellt: In dem Öl wurden bei 40 °C der Modellarzneistoff, sowie der Emulgator gelöst. Bei manchen verwendeten Ölphasen war zur Lösung des Emulgators Lecithin eine weitere Temperaturerhöhung auf 60 °C nötig. Grundsätzlich ist es auch möglich, den Emulgator in der wässrigen Phase zu dispergieren [138]. Ein Lösen in der Ölphase bietet jedoch den Vorteil, dass der Emulgator sehr schnell in die neu entstehenden Grenzflächen diffundiert und diese schon beim Entstehen stabilisiert [139].

Die wässrige Phase, eine isotonisierte Pufferlösung, wurde vor der Herstellung der Voremulsion auf 40 °C temperiert.

Im Anschluss erfolgte mit Hilfe dieser beiden Phasen die Herstellung einer Voremulsion bei 40 °C (siehe Kap. 3.1.2), welche dann zur finalen Emulsion bei 40 °C homogenisiert wurde (siehe Kap. 3.1.3). Hiernach erfolgten nur noch die Einstellung des pH-Wertes sowie ein Abfüllen in die Probengefäße. Schematisch ist der Ablauf in **Abb.3.1.1-1** zu sehen.

3.1.2 Herstellung der Voremulsion

Wie aus dem Fließdiagramm in **Abb. 3.1.1-1** ersichtlich, erfolgt die Emulsionsherstellung über zwei Stufen. Initial wird eine Voremulsion produziert, welche im Anschluss homogenisiert wird. Um ein optimales Ergebnis bei der Emulsionsherstellung zu erreichen, ist

die Qualität der Voremulsion von entscheidender Bedeutung. Optimal ist die Verarbeitung einer Voremulsion mit Partikelgrößen unter 20 μm [72, 139, 140].

Die Bedingungen, unter denen die Voremulsion hergestellt wurde, basierten auf den Untersuchungen von Thomas Bock [139]. Er nutzte eine Phaseninversionsmethode, welche sich als sehr geeignet erwies.

Bei dieser Methode legt man die Ölphase vor und arbeitet die wässrige Phase anteilsweise ein. Initial erhält man so über die Volumenverhältnisse eine W/O-Emulsion. Im Zuge der weiteren Wasserzugabe erfolgt jedoch eine Phaseninversion zu einer sehr feindispersen O/W-Emulsion. Dispergiert wurde die Voremulsion dabei mittels eines Ultra-Turrax T25 (Fa. Jahnke und Kunkel, Deutschland). Ein Ultra-Turrax ist eine Zahnkranzdispergiermaschine, welche nach dem Rotor-Stator Prinzip arbeitet. Ein gezählter Rotor dreht sich dabei mit sehr hoher Geschwindigkeit in einem ebenso gezählten Stator. Dies erzeugt turbulente Strömungsverhältnisse, welche die Öltröpfchen feinst zerteilen.

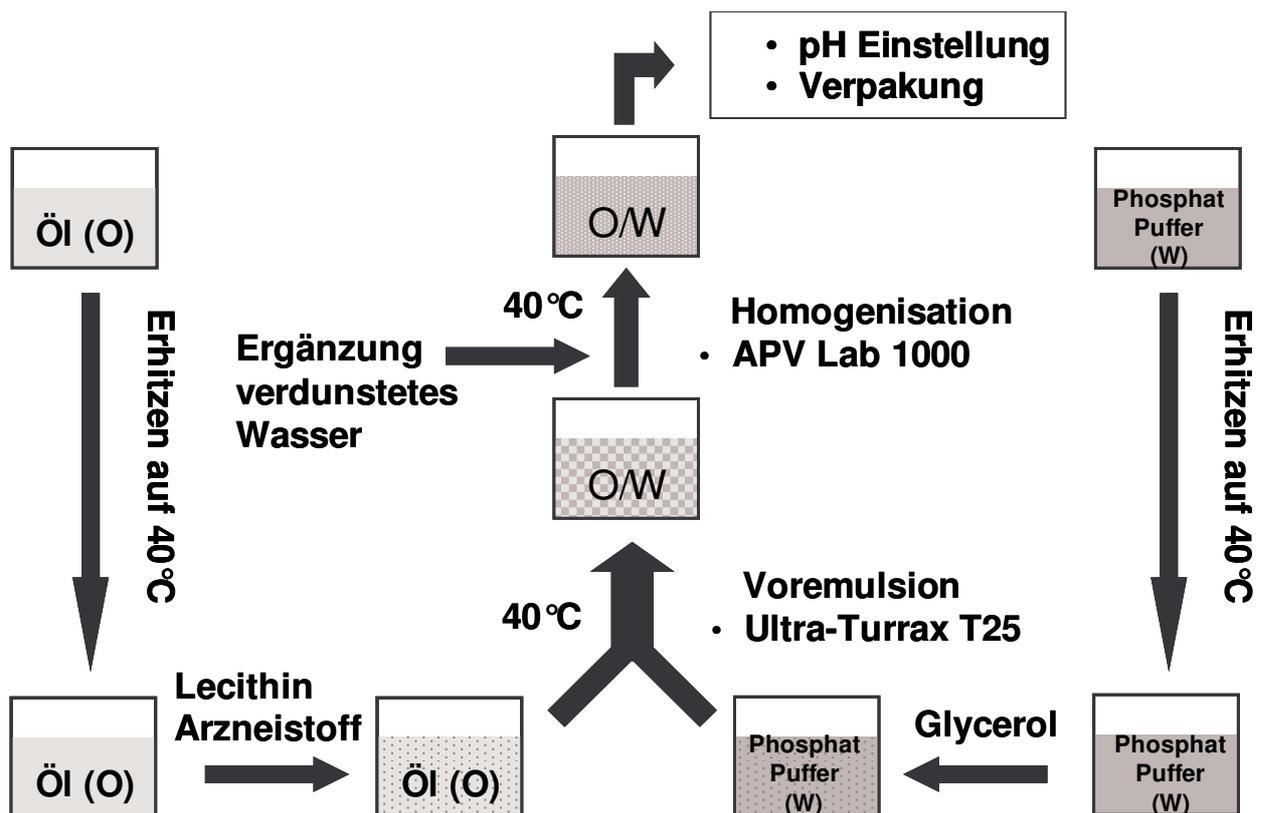


Abbildung 3.1.1-1 Fließdiagramm der De-novo-Herstellung einer arzneistoffhaltigen Emulsion

Durch die Zentrifugalbeschleunigung der Voremulsion kommt es des Weiteren zu einem sehr starken Saugeffekt unterhalb des Rotors. Dieser sorgt für eine gute Durchmischung der Emulsion.

Die verwendete Rührgeschwindigkeit des Ultra-Turrax lag bei 8000 rpm. Nach der kompletten Wasserzugabe wurde noch drei Minuten weiter dispergiert und die Voremulsion, nach dem Ergänzen des bei diesem Herstellungsschritt verdunsteten Wassers, direkt in den Homogenisator für die abschließende Bearbeitung überführt.

3.1.3 Homogenisation der Voremulsion

Die eigentliche Emulsionsherstellung erfolgt durch eine Homogenisation der Voremulsion. Hierbei wird die innere Phase zu feinsten Tröpfchen homogenen zerteilt. Die damit verbundene Vergrößerung der spezifischen (volumenbezogenen) Grenzfläche erfordert einen hohen Energieeintrag in das System.

Mechanismen, welche zu einer solchen feinsten Verteilung führen, sind beispielsweise Prallvorgänge und Scherung (siehe Kapitel 3.1.3.1), Turbulenzen und die Kavitation (siehe Kapitel 3.1.3.2).

Drei verschiedene Methoden finden zurzeit Anwendung: Ultraschall-, Rohr- und Kolben-Spalt Homogenisierung. Bei der ersten Methode erzeugt ein Generator elektrische Schwingungen im Ultraschallbereich. Ein Schallwandler überträgt die elektrischen Schwingungen in mechanische und leitet sie auf eine sog. Sonotrode, welche im direkten Kontakt mit dem zu homogenisierenden Gut steht und die Ultraschallschwingungen auf dieses weiterleitet [141, 142]. Für parenterale Fetteemulsionen erlangte diese Methode keine große Bedeutung. Hier finden Strömungsdispergiermaschinen, wie die Rohrhomogenisatoren (Microfluidizer) oder die Kolben-Spalt-Homogenisatoren Anwendung.

Bei der Herstellung der in dieser Arbeit untersuchten Emulsionen wurde ausschließlich ein Kolben-Spalt-Homogenisator verwendet. Die Funktionsweise soll im Kapitel 3.1.3.2 beschrieben werden. Der Vollständigkeit halber sei unter Kapitel 3.1.3.1 auch das Wirkprinzip des Microfluidizers kurz erläutert.

Seit den späten 80er Jahren wird auch die Emulsionsherstellung mittels Membranen diskutiert. Hierbei wird die Voremulsion unter Druck durch eine Membran gepresst. Die Membraneigenschaften richten sich dabei nach den verwendeten Ausgangsstoffen und dem gewünschten Produktionsergebnis. Die minimal erreichbaren Partikelgrößen liegen derzeit nur knapp unter einem Mikrometer [143].

3.1.3.1 Microfluidizer

Bei dem Microfluidizer wird die Voremulsion mittels einer Hochdruckpumpe durch eine Interaktionskammer gepresst (siehe **Abb. 3.1.3.1-1**). Der maximale Homogenisationsdruck liegt hier bei 800 bar [144]. Die Interaktionskammer besteht aus Mikrokänen, die einen Strahl in zwei Teilstrahlen aufspalten. Am Ende der Interaktionskammer, dem sog. Staupunkt, treffen die Teilstrahlen mit einer sehr hohen Geschwindigkeit (bis zu 500 m/s) aufeinander. Die im Staupunkt erzeugten Prall- und Scherkräfte führen dann zu einer Reduktion der Partikelgrößen.

Die Prozessparameter, welche den Zerteilungsgrad bestimmen, sind die Anzahl der Zyklen, die Homogenisationstemperatur und der angewandte Druck.

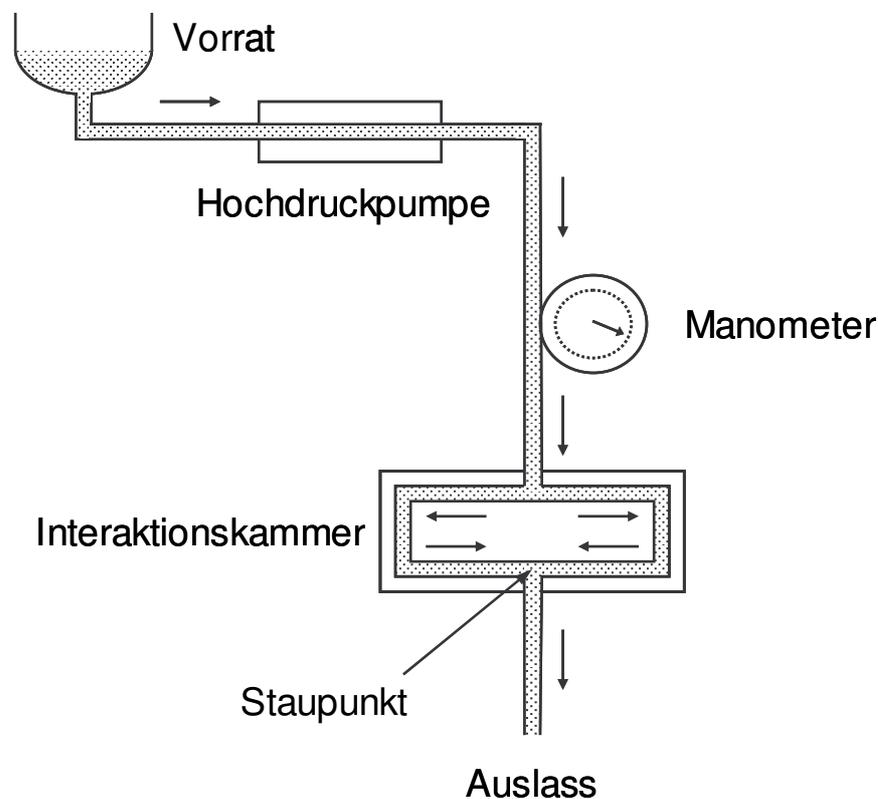


Abbildung 3.1.3.1-1 Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Microfluidizers

Um einen eventuellen Metallabrieb in der Interaktionskammer zu verhindern, sind die Mikrokanäle bei den neueren Geräten aus Keramik gefertigt. Ein kontinuierliches Arbeiten ist mit dem Microfluidizer möglich [145].

3.1.3.2 Kolben-Spalt-Homogenisation

Der erste Hochdruckhomogenisator wurde schon ca. 1900 zum Homogenisieren von Milch in der Lebensmitteltechnologie angewandt. Der prinzipielle Aufbau besteht aus einer Hochdruckpumpe, welche eine Flüssigkeit in ein Ventil presst. In dem Ventil durchläuft die Flüssigkeit einen schmalen Spalt und erfährt dadurch einen sehr starken Anstieg der Strömungsgeschwindigkeit, da dasselbe Flüssigkeitsvolumen pro Zeit einen kleineren Strömungsquerschnitt durchfließen muss. Nach dem Passieren des Spalts wird die Flüssigkeit schlagartig entspannt.

Die Arbeitsdrücke können beim Kolben-Spalt-Homogenisator 1000 bar überschreiten. Das Zerkleinerungsprinzip dieser Methode besteht in der Kavitation [146], welche wie folgt abläuft: Nach der Bernoulli-Gleichung (11, 12) ist die Summe aus dem statischen Wanddruck (P_{st}) und dem dynamischen Druck (P_{dyn}) der Flüssigkeit konstant.

$$P_{st} + P_{dyn} = K \quad (11)$$

$$P_{dyn} = \frac{1}{2} \delta v^2 \quad (12)$$

Hierbei ist K eine Konstante, δ die Dichte der Flüssigkeit und v die Strömungsgeschwindigkeit. Steigt nun aufgrund der hohen Strömungsgeschwindigkeit P_{dyn} , so sinkt der statische Wanddruck (siehe **Abb. 3.1.3.2-1**). Unterschreitet dieser den Dampfdruck der Flüssigkeit, so kommt es zu der Ausbildung von Gasblasen, den sog. Kavitationsblasen sowie von Schockwellen. Am Spaltaustritt fällt die Strömungsgeschwindigkeit schlagartig ab, da dort die Verengung endet. In den Gasbläschen entsteht nun ein starker Unterdruck, der zu einem Implodieren der Bläschen führt. Jedes implodierende Bläschen sendet dabei Schockwellen und winzige Flüssigkeitsstrahlen mit einer sehr hohen Geschwindigkeit aus, die auf die nähere Umgebung einwirken. Die in der Flüssigkeit enthaltenen Öltröpfchen werden beschleunigt, verformt, zerrissen und zerkleinert.

Wie beim Microfluidizer sind die Prozessparameter, welche den Zerteilungsgrad bestimmen, die Anzahl der Zyklen, die Homogenisationstemperatur und der angewandte Druck.

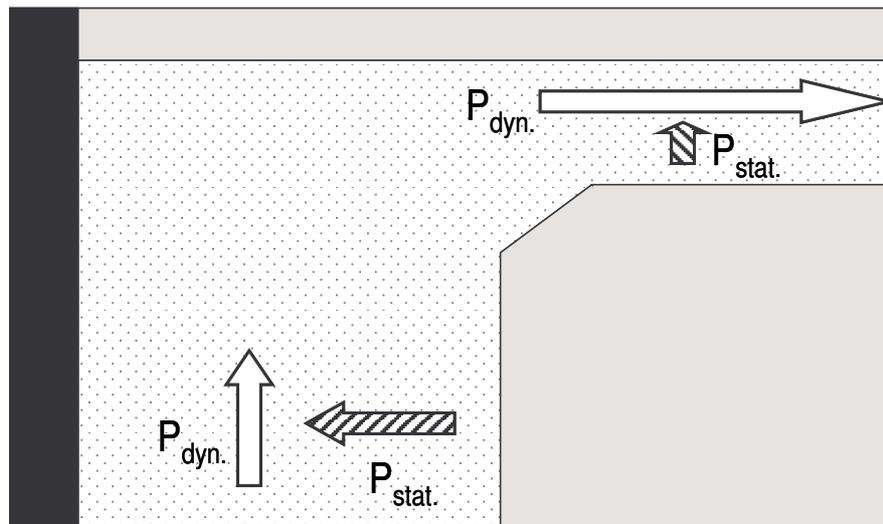


Abbildung 3.1.3.2-1 Schematische Darstellung der rechten Ventilhälfte eines Kolben-Spalthomogenisators

In Zuge dieser Arbeit wurde ein Kolben-Spalt-Homogenisator zu Emulsionsherstellung genutzt (Modell LAB 1000, Fa. APV, Deutschland). Homogenisiert wurde in der Regel bei 40 °C.

Eine Temperaturkontrolle im Gerät selbst war nicht möglich. Aus diesem Grund wurde die Probe initial in einem Wasserbad erwärmt. Der Homogenisator wurde mit temperiertem Reinstwasser betrieben, um ihn vorzuwärmen. Nach jedem Homogenisationszyklus erfolgte eine Temperaturkontrolle. Da bei dem Homogenisationsprozess eine Erwärmung der Emulsion erfolgte [147], war eine weitere Wärmebehandlung im Wasserbad nicht mehr erforderlich.

Die Zyklenzahl, sowie die angewandten Drucke sind in **Tab. 3.1.3.2-1** chronologisch angegeben, d.h., es wurde die Homogenisation mit hohen Drücken begonnen. Nach T. Bock [139] produziert der zu Beginn eingesetzte hohe Druck eine kleine mittlere Teilchengröße. Die weiteren Zyklen bei niedrigeren Drücken, verengen im Anschluss die Breite der Verteilung.

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit konnten mit den tabellierten Produktionsparametern Emulsionen hergestellt werden, welche über den Beobachtungszeitraum stabil waren.

Tabelle 3.1.3.2-1 Herstellungsparameter bei der Hochdruckhomogenisation

800 bar	600 bar	400 bar
Zyklen	Zyklen	Zyklen
2	2	2

Immer wenn von dieser Herstellungsmethode abgewichen wurde, ist darauf im experimentellen Teil gesondert hingewiesen.

3.2 Zweilagensystem

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Emulsionen durch Zwei-Phasen-Systeme simuliert, bei denen in einem Glasgefäß eine wässrige Phase mit einer Ölphase überschichtet wurde. Dies hatte den Vorteil, dass man explizit einen Parameter unter ansonsten konstanten Bedingungen variieren konnte. Die so erlangten Ergebnisse dienen dazu, Rückschlüsse zu ziehen, welche bei der Beschreibung der sehr komplexen Emulsionssysteme Anwendung fanden.

3.2.1 Apparativer Aufbau

Der apparative Aufbau ist in **Abb. 3.2.1-1** gezeigt.

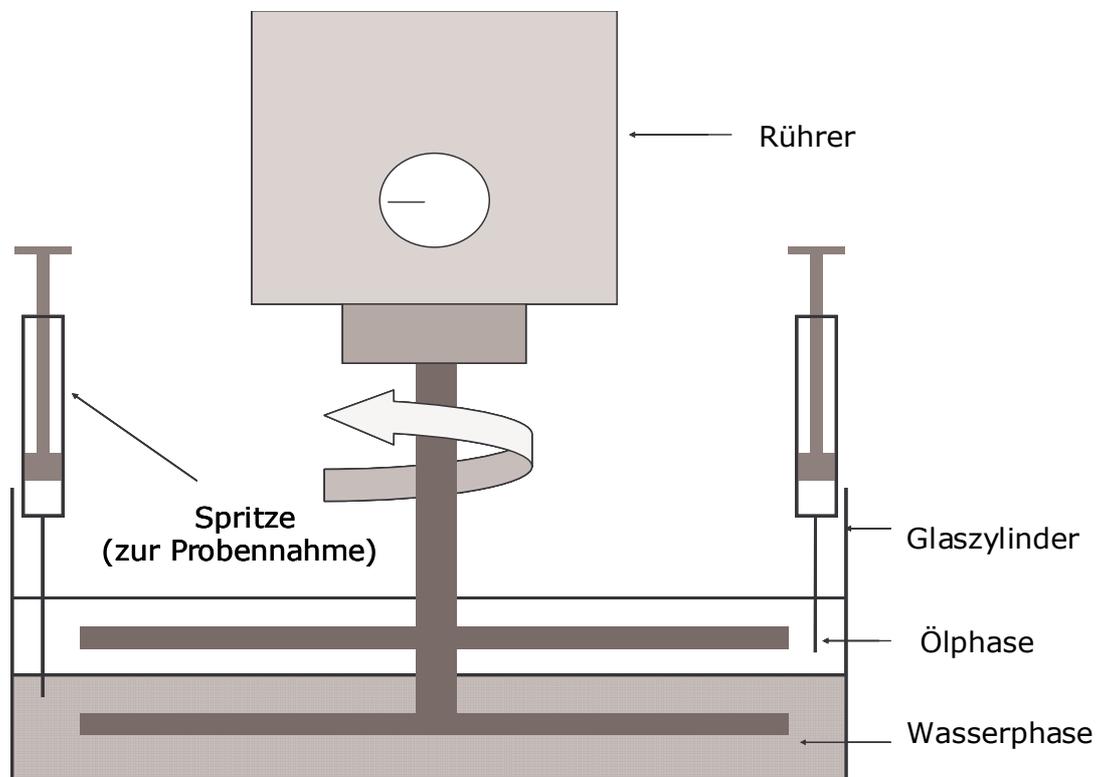


Abbildung 3.2.1-1 Zeichnung des gerührten, zylindrischen Zweilagensystems. Eine wässrige Phase ist von einer öligen überschichtet

In einem Glaszylinder (C) wurden 540 mL einer wässrigen Phase mit 60 mL einer Ölphase überschichtet. Dieses Öl-zu-Wasser-Volumenverhältnis entsprach dem der untersuchten Emulsionssysteme, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten

Die homogene Verteilung der gelösten Stoffe in den Phasen, wurde über ein Rühren beider Phasen mit Hilfe eines zweiblättrigen Rührers (A) (ein Rührblatt für jede Phase) gewährleistet. Die Umdrehungszahl des Rührers lag bei niedrigen 15 rpm, um Verwirblungen und das Aufreißen der Grenzfläche zu verhindern.

Um einen Probenzug aus jeder einzelnen Phase zu ermöglichen, waren zwei Spritzen in der Nähe der Glaswand befestigt worden

3.2.2 Herstellung von Liposomendispersionen

Um den Einfluss der Liposomen auf die Abbaukinetik des Phenylsalicylats zu testen (siehe Kapitel 6.4), wurden verschieden konzentrierte Liposomendispersionen als wässrige Phase im Zweilagensystem untersucht. Die Testkonzentrationen lagen bei 22,5, 45, 67,5 und 90 mg Lecithin pro mL isotonisierter Pufferlösung.

Die Herstellung erfolgte über zwei Schritte. Zuerst wurden das Lecithin und die Pufferlösung mit Hilfe eines Ultra-Turrax T25 (Fa. Jahnke und Kunkel, Deutschland) bei 8000 rpm zu einer groben Dispersion verarbeitet, welche in einem zweiten Schritt mittels eines Hochdruckhomogenisators (LAB 1000, Fa. APV, Deutschland) homogenisiert wurde.

Bei einer Temperatur von 40 °C wurden fünf Homogenisationszyklen bei 500 bar angewandt.

3.3 Partikelcharakterisierung

Für die Beschreibung von Emulsionssystemen ist der Charakterisierung der dispersen Phase von besonders großer Bedeutung. Charakterisiert werden insbesondere die Partikelgröße und das Zetapotential.

Bei parenteralen Fettemulsionen kann beispielsweise die physiologische Verträglichkeit, als auch die Organverteilung der Emulsion von der Partikelgröße abhängen (siehe Kapitel 1.1). Deshalb ist die Messung der Tröpfchengröße zur Kontrolle des Herstellprozesses wie auch zur Qualitätsprüfung über die Laufzeit der Emulsion unerlässlich.

Darüber hinaus ist die Messung des Zetapotentials im Hinblick auf eine kinetische Stabilisierung des thermodynamisch instabilen Systems notwendig (siehe Kapitel 3.3.2.2).

Im Zuge dieser Arbeit sollte des Weiteren aufgeklärt werden, inwieweit physikochemische Parameter der Emulsion die Abbaukinetik eines hydrolyseinstabilen Arzneistoffs beeinflussen. Dies erfordert eine genaue Beschreibung der Öltröpfchen.

3.3.1 Partikelgrößen

Zur Charakterisierung der Partikelgrößen im Nano- und Mikrometerbereich stehen unterschiedliche Messverfahren zur Verfügung. Exemplarisch seien hier die Mikroskopie, der Coulter Counter, die Laserdiffraktometrie (LD), sowie die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) genannt.

Die Messprinzipien, die Messbereiche, sowie die Messergebnisse dieser Methoden sind unterschiedlich. So ist beispielsweise die Lichtmikroskopie sehr gut geeignet, geringe Mengen an Mikropartikeln in einer Hauptpopulation von Nanopartikeln sichtbar zu machen.

Der Coulter Counter besitzt den Vorteil, ein hochauflösendes Einzelzählverfahren zu sein. Sein Messprinzip beruht auf der Detektion von Widerstandsänderungen in einer Messkapillare. Diese Methode ist auf Durchmesser von 0,4 bis 1200 μm beschränkt.

Da die Methoden LD und PCS für die Untersuchungen dieser Arbeit Anwendung fanden, sollen sie in den folgenden Kapiteln detaillierter besprochen werden. Beide Methoden sind für die Größenbestimmung von Öltröpfchen in Fettemulsionen weit verbreitet und etabliert [14, 126, 148, 149]. Mit der Kombination beider Verfahren ist eine verlässliche Beschreibung der Größenverteilung möglich.

3.3.1.1 Laserdiffraktometrie (LD)

Die Grundlage der Partikelgrößenbestimmung bei der Laserdiffraktometrie ist die Lichtbeugung an dispergierten Teilchen. Je nach Form und Größe eines Partikels entstehen unterschiedliche Beugungsbilder.

Sphärische Partikel erzeugen bei der Lichtbeugung radial symmetrische Beugungsbilder. Die Intensitätsverteilungen dieser Beugungsmuster können mit Hilfe des Fraunhoferschen Beugungsintegrals beschrieben werden. Aus den Minima und Maxima dieses Integrals werden die Radien der Beugungsringe des Beugungsbildes berechnet.

Der Beugungswinkel hängt von der Tröpfchengröße ab: Je kleiner das Tröpfchen, desto kleiner der Durchmesser und desto größer der Beugungswinkel.

Es ist darauf hinzuweisen, dass eine Bestimmung der Partikelgrößen aus dem Beugungsmuster mit Hilfe der Fraunhoferschen Theorie die optischen Eigenschaften der

Partikel vernachlässigt. Aus diesem Grund berechnet sie nur Partikelgrößen von $4\ \mu\text{m}$ Durchmesser und darüber korrekt [150]. Für Partikeldurchmesser unter $4\ \mu\text{m}$ kommt es zur Überlappung und Streulichtphänomenen.

Der apparative Aufbau eines Laserdiffraktometers ist in **Abb. 3.3.1.1-1** gezeigt. Zur Durchführung einer Messung wird ein Laserlicht mittels eines optischen Systems aufgeweitet und auf die Probe geleitet. An den dispergierten Teilchen in der Probe kommt es zu einer Beugung des eingestrahlinten Laserlichts, mit dem für sie charakteristischen Beugungsbild. Über eine nachgeschaltete Fourierlinse wird das Beugungsbild, unabhängig von der Position des Partikels im Messmedium, auf den ringförmigen Elementen des Detektors dargestellt, wo die Intensität des gebeugten Lichts gemessen wird. Große Partikel werden dabei, aufgrund der kleineren Beugungswinkel, mit einer höheren Beugungslichtintensität auf den inneren Segmenten des Detektors dargestellt werden, kleinere Partikel auf den äußeren.

Die Breite der Detektorelemente nimmt von innen nach außen hin zu, da die Peakbreite der Maxima im Beugungsbild für kleine Partikel größer ist als für große.

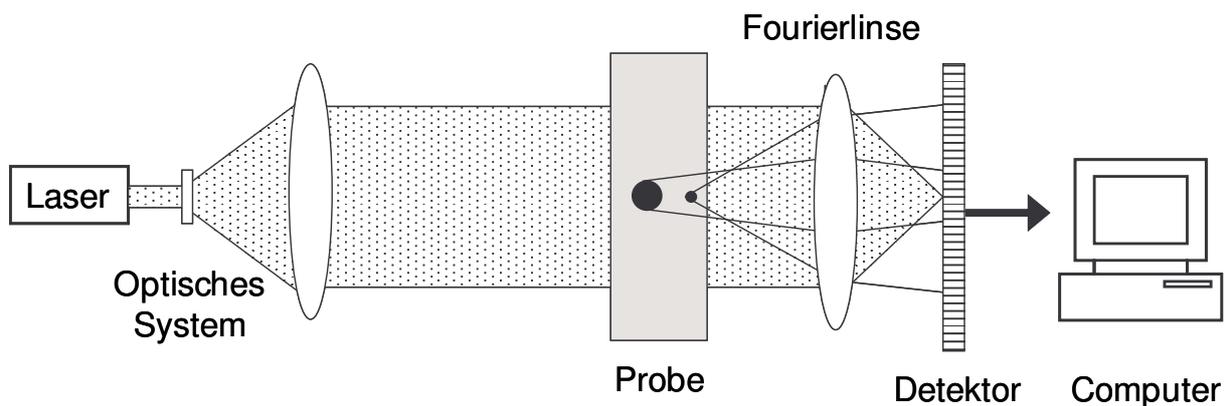


Abbildung 3.3.1.1-1 Schematischer Aufbau eines Laserdiffraktometers sowie der Beugungswinkel unterschiedlicher Teilchengrößen

Es ist darauf hinzuweisen, dass durch die ringförmige Anordnung der Detektorelemente eine radialsymmetrische Intensitätenverteilung und somit sphärische Partikel vorausgesetzt werden. Dies ist bei den Emulsionssystemen der Fall, kann jedoch bei der Vermessung anderer Systeme zu Verfälschungen führen. Das Detektorsignal wird schließlich zur Auswertung einem Computer zugeleitet.

In dieser Arbeit fand das LS 230 der Fa. Coulter Electronics als Messgerät Anwendung. Es arbeitet mit einem Halbleiterlaser, welcher eine Wellenlänge von $750\ \text{nm}$ hat. Des Weiteren

werden zur Datenaufnahme zwei Fourierlinsen und drei Detektoren gleichzeitig genutzt. Die Detektoren erfassen unterschiedliche Beugungswinkel, die hiernach als D_L (low-angle-detector), D_M (mid-angle-detector) und D_H (high-angle-detector) bezeichnet werden. Durch die gleichzeitige Anwendung der PIDS-Technologie (**P**olarization **I**ntensity **D**ifferential **S**cattering-Technology) ermöglicht das Gerät eine Messung im Bereich von 0,04 bis 2000 μm im Durchmesser.

Bei der PIDS-Technologie handelt es sich um eine Bestimmungsmethode der Teilchen im Submikronbereich, welche mit Hilfe der Laserdiffraktometrie nur schwer darzustellen sind, da sich die Beugungsbilder unter großen Winkeln zunehmend ähneln.

Als Messmethode dient die Streuung von polarisiertem Licht. Die Auswertung der Daten folgt der Mie-Theorie zur Lichtstreuung polarisierten Lichts. Horizontal und vertikal polarisiertes Licht der Wellenlängen 450, 600 und 900 nm wird von dem Gerät genutzt um die Probe zu bestrahlen. Das Streulicht wird von PIDS-Detektoren unter den Winkeln 60° , 75° , 90° , 105° , 120° und 145° erfasst. Die PIDS-Technik ist grundsätzlich an eine laserdiffraktometrische Messung gekoppelt, so dass das erhaltende Messergebnis eine Kombination aus den Ergebnissen beider Methoden darstellt.

Auf Grund der Softwareausstattung des LS 230 ist eine Datenauswertung, der mittels Laserdiffraktometrie erhaltenen Messergebnisse, auf Basis der Fraunhofer- oder der Mie-Theorie möglich. Für den Größenbereich unter 4 μm Durchmesser ist es genauer, die Mie-Theorie anzuwenden. Diese bezieht zusätzlich noch den realen (RI_{real}) und imaginären (RI_{imag}) Brechungsindex der Partikel bei der Berechnung mit ein. Der imaginäre Brechungsindex repräsentiert den Absorptionswert der dispergierten Teilchen.

Das Ergebnis der Datenauswertung ist eine Volumenverteilung der Teilchendurchmesser. Errechnet wird diese mit Hilfe eines Iterationsverfahrens. Die Teilchengrößenverteilung wird initial abgeschätzt und die dazugehörigen Intensitätsverteilungen je nach gewähltem Modell berechnet. Es folgt eine Abgleichung mit den Messwerten und eine erneute Abschätzung, so lange, bis eine optimale Übereinstimmung gefunden wurde.

Als Zielgrößen zur Charakterisierung der Teilchengrößen sollen in dieser Arbeit der D50- und der D99-Wert dienen. 50 bzw. 99 % des Volumens der inneren Phase besteht aus Teilchen mit einer Größe kleiner oder gleich diesem Wert.

Die Auswertung der in dieser Arbeit produzierten Emulsionen erfolgte auf Basis der Untersuchungen von Müller und Schuhmann [151]. Sie erhielten die besten Ergebnisse mit

einer Auswertung nach der Mie-Theorie mit PIDS ($RI_{\text{real}}: 1,456$ und $RI_{\text{imag}}: 0,01$). Alle Messungen wurden nach ausreichender Verdünnung der Proben als Dreifachbestimmung durchgeführt.

3.3.1.2 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Die Photonenkorrelationsspektroskopie ist ein dynamisches Streulichtverfahren, welches die Partikelgrößenbestimmung im Durchmesserbereich von 0,6 bis 6 μm ermöglicht. Dieser Größenbereich beruht auf der Herstellerangabe zum ZetaSizer Nano-ZS der Fa. Malvern Instruments, UK. Die Probe wird bei dieser Methode mit einem Laser bestrahlt, und zeitabhängige Streulichtintensitätsschwankungen werden detektiert [152].

Ursachen der Intensitätsschwankungen sind zum einen Interferenzerscheinungen und zum anderen Schwankungen der Teilchenanzahl im Messvolumen, die von der Brownschen Molekularbewegung verursacht werden. Weil die Diffusionsgeschwindigkeit von der Partikelgröße abhängig ist, können aus den Intensitätsschwankungen Rückschlüsse auf die Partikelgröße gezogen werden. Kleine Partikel weisen eine höhere Diffusionsgeschwindigkeit auf als große.

Jegliche Partikelbewegung, die sich der Diffusionsgeschwindigkeit aufgrund der Brownschen Molekularbewegung überlagert, verfälscht naturgemäß das Messergebnis. Insbesondere Sedimentation bzw. das Aufrahmen müssen ausgeschlossen werden. Diese Vorgänge sind von der Partikelgröße sowie dem Dichteunterschied zwischen dispergiertem Teilchen und Dispersionsmedium abhängig. Da die Sedimentationsgeschwindigkeit mit der Partikelgröße zunimmt, ist der Messbereich nach oben hin begrenzt.

Als Ergebnis der PCS-Messung erhält man den mittleren hydrodynamischen Durchmesser (Z-average), sowie den Polydispersitätsindex (PI). Der PI ist ein Maß für die Breite der Verteilung. Der Wert hat keine Dimension und liegt zwischen 0 und 1. Eine Dispersion gilt als monodispers bei PI-Werten zwischen 0,03 und 0,06. Werte zwischen 0,1 und 0,2 zeigen eine enge Verteilung an; Werte zwischen 0,2 und 0,5 eine breite. Von einem PI-Wert von 0,5 an, ist es nicht mehr möglich, eine verlässliche Aussage über die Breite der Verteilung zu machen [151].

Das Gerät erfasst die Intensitätsschwankungen mit einem Photomultiplier. Im Anschluss wird mit Hilfe eines Korrelators eine Autokorrelationsfunktion berechnet, welche an eine theoretische Korrelationsfunktion (13) angepasst wird. Die mathematische Abweichung zwischen der errechneten und der theoretischen Funktion findet sich im PI wieder.

$$g(\tau) = e^{-2DK^2\tau} \quad (13)$$

D: Diffusionskonstante

K: Betrag des Streulichtvektors

τ : Verzögerungszeit

$g(\tau)$: Korrelationsfunktion

Da K und τ während einer Messung konstante und bekannte Größen sind, wird mit Hilfe der Gleichung (13) die für die Größenbestimmung wichtige Diffusionskonstante errechnet.

Eingesetzt in die Stokes-Einstein-Gleichung (14) errechnet sich der mittlere hydrodynamische Durchmesser (d).

$$d = \frac{wT}{3\pi\eta D} \quad (14)$$

w: Boltzmann-Konstante

T: absolute Temperatur

η : dynamische Viskosität

In dieser Arbeit fand der ZetaSizer Nano-ZS (Fa. Malvern Instruments, UK) Anwendung. Der Aufbau ist in **Abb. 3.3.1.2-1** dargestellt.

Ein He-Ne Laser der Wellenlänge 633 nm dient dem Gerät als Lichtquelle. Die Intensität des Laserlichts wird über einen Attenuator reguliert. Stellgröße für den Attenuator ist die Streulichtintensität, welche den Detektor erreicht. Eine bewegliche Linse reguliert automatisch die Messposition. Kleine Partikel oder gering konzentrierte Lösungen werden zur Küvettenmitte hin, große Partikel oder hochkonzentrierte Lösungen näher am Küvettenrand vermessen. Man vermeidet im letzteren Fall eine Mehrfachstreuung, da die Wegstrecke des Streulichts durch die Probe minimiert wird.

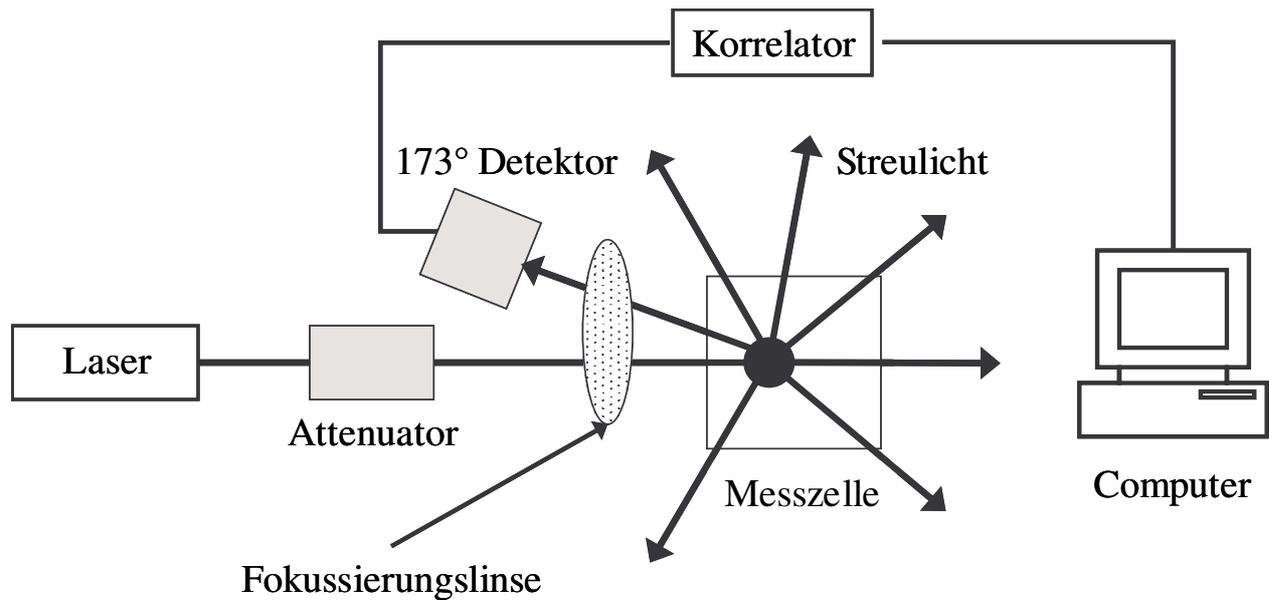


Abbildung 3.3.1.2-1 Schematischer Aufbau eines PCS Messgeräts mit NIBS Technologie

Die Detektion des Streulichts erfolgt im Winkel von 173° . Diese Technik wird auch als **Non-Invasive Backscatter Detection (NIBS)** bezeichnet. Dies soll es im Vergleich zur Detektion bei 90° ermöglichen, höherkonzentrierte Proben zu vermessen. Begründet wird dies mit einem kürzeren Weg des Streulichts durch die Probe, welches das Risiko von Mehrfachstreuung reduziert.

Die Proben wurden vor der Messung mit Reinstwasser im Verhältnis 1/1000 verdünnt. Dabei wurde der Tyndall-Effekt sichtbar. Vermessen wurde im automeasuring mode. Die Zahl der Einzelmessungen sowie die Messzeit wurden hier automatisch festgelegt.

3.3.2 Zetapotential (ZP) und Laser-Doppler-Anemometrie (LDA)

Im Hinblick auf die Lagerstabilität disperser Systeme wie den Emulsionen ist das Zetapotential als Maß für die elektrostatischen Abstoßungskräfte von entscheidender Bedeutung (siehe auch Kapitel 3.3.2.1-DLVO Theorie). Mit abnehmendem Betrag des Zetapotentials kann die Lagerstabilität einer Emulsion von Jahren auf wenige Tage reduziert werden. Dieses Problem tritt unter anderem bei den **TPN-Regimen (Total Parenteral Nutrition)** auf. Hier führt der Elektrolytzusatz zu einer Reduktion des Zetapotentials [30, 128].

Anhand der **Abb. 3.3.2-1** sei erläutert, wie es zur Ausbildung des Zetapotentials an der Tröpfchenoberfläche kommt: Teilchen, welche an der Oberfläche dissoziierbare Gruppen tragen, bilden nach der Dispersion in einer Elektrolytlösung eine positive oder negative Oberflächenladung (Nernst Potential) aus. Die Art der dissoziierbaren Gruppen bedingt dabei

die sich ergebende Ladung. An dieser Oberfläche kommt es, bedingt durch van der Waals Wechselwirkungen, zur Anlagerung von Ionen. In der Regel sind dies Anionen, welche wegen ihrer geringeren Ladungsdichte weniger stark hydratisiert sind, bei der Adsorption ihre Hydrathülle abstreifen und auf einen Abstand nähern können, in dem die van-der-Waals Anziehung die elektrostatischen Kräfte überbietet. Diese erste Adsorptionsschicht wird innere Helmholtz-Schicht genannt. Daran lagern sich nun primär über elektrostatische Anziehungskräfte hydratisierte Kationen an und bilden die so genannte äußere Helmholtz-Schicht. Beide Helmholtz-Schichten werden zusammen als Sternschicht bezeichnet. Sie ist fest fixiert und kann nicht abgeschert werden. Da die Kationen hydratisiert sind und einen höheren Platzbedarf beanspruchen, können sie nicht zu einem vollständigem Ladungsausgleich führen. Das Potential am Rande der Sternschicht (Sternpotential) weist noch immer einen negativen Wert auf. Erst eine diffuse Schicht aus hydratisierten Kationen und Anionen, welche das Teilchen wie eine Wolke umgeben, führt dann zu einer asymptotischen Annäherung der Ladung gegen Null. Die unterschiedlichen Ladungsverteilungen führen zu linearen Potentialverläufen in der Sternschicht und zu einem exponentiellen Abfall des Potentialbetrags in der diffusen Schicht.

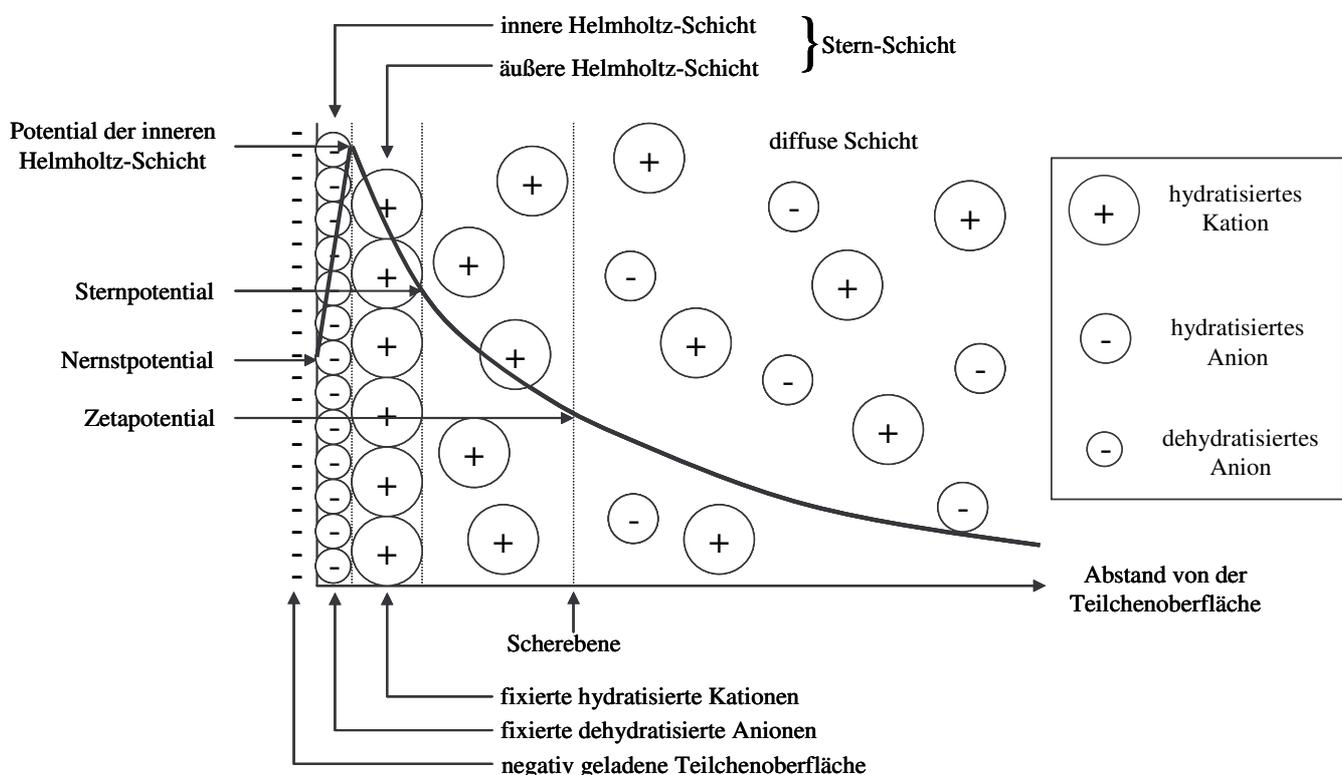


Abbildung 3.3.2-1 Darstellung der Ladungsverhältnisse eines in einer Elektrolytlösung dispergierten Teilchens mit negativ geladener Oberfläche und der sich ergebende Potentialverlauf nach dem Sternmodell (modifiziert nach Müller [153])

Durch Reibungskräfte kommt es bei der Diffusionsbewegung der Teilchen zu einem teilweisen Abstreifen der diffusen, nicht fixierten Schicht. Das Teilchen ist nach außen hin nicht mehr neutral und kann nach dem Anlegen eines elektrischen Feldes zur entgegengesetzt geladenen Elektrode hin beschleunigt werden. Die Beschleunigung führt zu einer weiteren Erhöhung der Reibungskräfte, was eine weitere Abstreifung der diffusen Schicht zur Folge hat. Ein ausreichend starkes elektrisches Feld ist in der Lage, die diffuse Schicht bis kurz vor dem fixierten Sternpotential abzustreifen. Ein Rest der diffusen Schicht wird noch über die Hydrathülle der Sternschicht gehalten. Das Potential an der Scherebene nach dem Abstreifen wird als Zetapotential (ZP) bezeichnet. Der nach dem Abstreifen verbleibende Rest der diffusen Schicht ist in seiner Ausdehnung von der Elektrolytkonzentration des Dispersionsmediums abhängig. Je höher die Konzentration, desto komprimierter die gesamte sowie die zetapotentialbestimmende, verbleibende diffuse Schicht, desto geringer der Betrag des Zetapotentials. Deshalb verringert Elektrolytzusatz die elektrostatische Abstoßung der Tröpfchen untereinander und wirkt der kinetischen Stabilisierung der Emulsion entgegen.

Ermittelt werden kann das ZP über die Teilchengeschwindigkeit im elektrischen Feld, welche mit Hilfe der Laser-Doppler-Anemometrie bestimmt werden kann. Dieses Verfahren nutzt die Streuung von Laserlicht, das in die Messzelle eingestrahlt wird, zur Bestimmung der Teilchengeschwindigkeit in einem elektrischen Feld.

Das von den Teilchen gestreute Licht wird detektiert. Aufgrund des Dopplereffekts kommt es, im Vergleich zum ursprünglichen Laserstrahl, zu einer Frequenzverschiebung des Streulichts. Diese ist abhängig von der Teilchengeschwindigkeit. Die Gleichung (15) beschreibt diesen Zusammenhang und ermöglicht die Berechnung der Partikelgeschwindigkeit.

$$f_d = \frac{2 \sin(\Theta/2)}{\lambda} v \quad (15)$$

f_d : Dopplerfrequenz

$\Theta/2$: Winkel, unter dem das Streulicht detektiert wird

λ : Wellenlänge des Laserlichts

v : Partikelgeschwindigkeit

Um aus der Geschwindigkeit das ZP zu ermitteln, muss zunächst die elektrophoretische Mobilität (EM) nach Gleichung (16) errechnet werden.

$$EM = \frac{v[\text{cm/s}]}{E[\text{esuV/cm}]} \quad (16)$$

E: Feldstärke in elektrostatischen Volt

Mittels der Gleichung von Helmholtz-Smoluchowski (17) wird das ZP berechnet.

$$ZP = EM \frac{4\pi\eta}{\varepsilon} \quad (17)$$

ZP: Zetapotential in elektrostatischen Volt

η : Viskosität des Dispersionsmediums in Poise bei der Messtemperatur

ε : Dielektrizitätskonstante des Dispersionsmediums bei der Messtemperatur

Es gilt zu beachten, dass die Gleichungen nicht für SI-Einheiten gelten. Eine Umformung in SI-Einheiten ist unter der Berücksichtigung des Zusammenhangs: 1 V = 1/300 esu V möglich.

Zu einer vertiefenden Information über das Zetapotential und seiner Bedeutung für die pharmazeutische Technologie sei auf die komplette Abhandlung von R. H. Müller verwiesen [153].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Messungen an einem ZetaSizer Nano-ZS (Fa. Malvern Instruments, UK) bei einer Feldstärke von 20 V/cm durchgeführt. Die Proben wurden zuvor im Verhältnis 1/1000 verdünnt. Um Messwertschwankungen aufgrund unterschiedlicher pH-Werte bzw. unterschiedlicher Elektrolytgehalte auszuschließen, wurde für alle Proben zum Verdünnen eine wässrige Lösung mit dem pH-Wert 7,4 und einer Leitfähigkeit von 50 $\mu\text{S/cm}$ verwendet [153]. Diese Lösung wurde unmittelbar vor der Probenverdünnung durch Mischen aus Natronlauge und Salzsäure hergestellt, deren Konzentrationen auf die Leitfähigkeit von 50 $\mu\text{S/cm}$ eingestellt waren. Die Proben wurden im Anschluss luftblasenfrei in die Messküvette eingefüllt und jeweils dreimal vermessen.

3.3.2.1 DLVO-Theorie

Das Bestreben der Emulsionssysteme, aufgrund der hohen Grenzflächenenergie die Grenzfläche zu verkleinern und dadurch einen thermodynamisch günstigeren Zustand zu erreichen, birgt die Gefahr, dass jede Agglomeration (Flockung) der Tröpfchen zu einer Koaleszenz, also dem Zusammenfließen der Tröpfchen führt. Dieser Vorgang ist irreversibel und qualitätsmindernd [25]. Eine physikalisch stabile Emulsion darf bei der Annäherung von Partikeln kein Teilchenwachstum zeigen.

Das Zusammenspiel stabilisierender elektrostatischer Abstoßung (V_R) und destabilisierender van-der-Waals-Anziehung (V_A) wird mit Hilfe der Theorie von Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeck (**DLVO**-Theorie) beschrieben. Die Gesamtwechselwirkungsenergie (V_T) dispergierter Teilchen wird als Funktion des Teilchenabstandes (H) berechnet [154, 155].

V_T durchläuft mit zunehmender Annäherung zweier Partikel zuerst ein sekundäres Minimum. Hier dominieren die anziehenden Kräfte leicht und es kommt zu einer reversiblen Flockung der Partikel. Eine weitere Annäherung erfordert die Überwindung eines Maximums, dessen Höhe von der elektrostatischen, abstoßenden Energie geprägt ist, da die van-der-Waals-Kräfte erst bei sehr kurzen Abständen wirksam werden. Erst nach dem Überwinden dieser Energiebarriere erfolgt eine irreversible Aggregation der Teilchen, die im Falle von Emulsionen zu einer Koaleszenz führen kann.

Das Zetapotential ist die Messgröße, welche die elektrostatischen abstoßenden Kräfte repräsentiert. Nach den bisherigen Erfahrungen reicht ein Zetapotential von mindestens 30 mV zur Stabilisierung von Emulsionssystemen aus [153].

3.4 Differential Scanning Calorimetrie (DSC)

Die Dynamische Differenz-Kalorimetrie (engl. **Differential Scanning Calorimetrie, DSC**.) ist eine Technik, bei der eine Prüfsubstanz und ein Referenzmaterial einem geregelten Temperaturprogramm unterworfen werden und die Differenz der Energiezufuhr (Wärmeströme) zu der Substanz einerseits und dem Referenzmaterial andererseits als Funktion der Temperatur gemessen wird. Zur Messung wurde nach dem Prinzip der Dynamischen Leistungskompensations-Differenz-Kalorimetrie vorgegangen. Beim Dynamischen Leistungskompensations-Differenz-Kalorimeter wird die Temperaturdifferenz zwischen Probe und Referenz elektrisch kompensiert, d.h., die Wärmestromdifferenz ist gleich der elektrischen Heizleistungsdifferenz für die Probe und die Vergleichsprobe.

Mit der DSC können Vorgänge untersucht werden, bei denen eine Reaktionswärme oder eine Änderung der spezifischen Wärmekapazität auftreten. Aus einer derartigen Messung können charakteristische Daten wie Reaktionstemperaturen und Reaktionswärmen, Art der Reaktion (exotherm oder endotherm) und die spezifische Wärmekapazität oder deren Änderung erhalten werden. In dieser Arbeit diente die Messung der näheren Charakterisierung der festen Lipidmischung aus dem Kapitel 7.4, über die Beobachtung von endothermen Schmelz- und exothermen Kristallisationsvorgängen.

Zur DLC-Messung wurde das Gerät DSC822e der Fa. Mettler Toledo (USA) eingesetzt. Die Proben wurden in einen verschlossenen 40 μ L Aluminium Standardtiegel abgefüllt. Als Referenz diente ein leerer Referenztiegel. Der Ofen wurde von Stickstoffgas mit einer Flussgeschwindigkeit von 50 mL/min umspült. Die Aufheizrate lag bei 5 und die Abkühlrate bei 10 K/min. Es wurde ein Temperaturbereich von 20 bis 120 °C abgefahren.

3.5 pH-Wert

Ein pH-Meter (pH-meter 766 calimatic, Knick, Deutschland) mit einer Mikro-Glaselektrode (InLab® 442, Mettler Toledo, Schweiz) wurde für die pH-Wert Bestimmungen genutzt.

Die Glaselektrode besteht aus einem äußeren Mantel mit Referenzelektrode in Elektrolytlösung und einem inneren Rohr mit Messelektrode ebenfalls in Elektrolytlösung, das in einer kugelförmigen Glasmembran ausläuft. Diese Membran besitzt eine innere und eine äußere Quellschicht, die je nach pH-Wert der Messlösung Protonen aufnimmt oder abgibt, infolge dessen das Potential zwischen den Elektroden verändert wird. Nach einer Kalibrierung mit Pufferlösungen ist die Bestimmung des pH-Wertes über eine Potentialmessung möglich.

Das pH-Meter wurde arbeitstäglich mit Standard-Pufferlösungen von pH 4, 7 und 9 (Riedel-de Haën, Deutschland) kalibriert.

Bei den Messungen wurden die Messwerte erst abgelesen, wenn der angezeigte Wert wenigstens eine Minute stabil war.

3.6 Leitfähigkeit

Eine Leitfähigkeitsmessung war für die Herstellung des Verdünnungsmediums bei der Bestimmung des Zetapotentials erforderlich, da diese eine Auskunft über die Ionenkonzentration ermöglicht. Anwendung fand das Leitfähigkeitsmessgerät LF 530 (Fa. WTW, Deutschland) mit der Leitfähigkeitsmesszelle LTA/KS (Fa. WTW, Deutschland). Der Einsatzbereich der Messzelle wurde mit 1 μ S/cm bis 20mS/cm angegeben. Auskunft über die Zellgeometrie (Elektrodenabstand und Elektrodenfläche) gibt die Zellkonstante K. Diese ist auf der Messzelle angegeben. Zur Messung der Leitfähigkeit (L) wird mittels zweier Elektroden der Widerstand (R) der Lösung bestimmt. Über die Zellkonstante berechnet das Messgerät die Leitfähigkeit. Dieser ist der reziproke Wert des spezifischen Widerstands (ρ).

Der Zusammenhang ist in Gleichung (18) dargestellt.

$$L = 1/p = K/R \quad (18)$$

Die Leitfähigkeit ist wie die Ionenbeweglichkeit sehr stark temperaturabhängig. Aus diesem Grund führt das Gerät über einen angeschlossenen Temperaturfühler eine Temperaturkompensation durch.

3.7 Osmolarität

Der osmotische Druck wurde mittels eines Dampfdruck-Osmometers (Dampfdruck-Osmometer VAPRO Mod. 5520, Fa. Wescor, USA) bestimmt. Eine Probe von etwa 10 μL wird in die Probenkammer gegeben, die als Sensor ein Feindraht-Thermoelement-Hygrometer enthält.

Nach dem Prinzip der hygrometrischen Dampfdruckbestimmung wird in der Kammer der Taupunkt bestimmt, nachdem der Dampfdruck der Probe sein Gleichgewicht erreicht hat. Der Taupunkt, also die Temperatur für eine Luftfeuchtigkeit von 100 %, weicht von dem reinen Wassers nach unten ab, wenn der Dampfdruck durch die Anwesenheit von Gelöstem erniedrigt wird. Die Taupunktserniedrigung ist folglich ein Maß für die Konzentration gelöster Stoffe und damit für die Osmolarität einer Lösung.

3.8 Viskosität

Die Viskosität der untersuchten Öle wurde mit einem Mikroviskosimeter bestimmt (Modell AMVn, Fa. Anton Paar, Österreich). Das Gerät arbeitet nach dem Kugelfallprinzip. Hierbei wird die Fallzeit einer Stahlkugel in einer mit Probe gefüllten, schräg gestellten Glaskapillare, zwischen zwei Messmarken gemessen. Nach einer Beschleunigungsphase ist die Fallgeschwindigkeit der Kugel konstant, wenn die, von der Viskosität abhängigen, Reibungskraft gleich der Kraft ist, welche die Kugel beschleunigt. Beschrieben wird dies über das Stokes-Gesetz, welches im Kugelfallviskosimeter jedoch nur bedingt gilt [112]. Hier rollt die Kugel an der Glaswand entlang. Die verdrängte Flüssigkeit fließt über einen Sichelspalt oberhalb der Kugel ab. Der Einfluss des Sichelspalts und der Schräglage der Glaskapillare fließen in eine Gerätekonstante ein. Mit Hilfe des Stokes Gesetzes und der Gerätekonstanten wird aus der Fallgeschwindigkeit die dynamische Viskosität berechnet. Die Messtemperatur lag bei allen untersuchten Ölen bei 20 °C.

3.9 Grenzflächenspannung

Die Grenzflächenspannung zwischen der Öl- und der Wasserphase wurde mit Hilfe eines Lecompte du Noüy Ringtensiometers (Digital tensiometer KIO, Krüss, Hamburg, Germany) ermittelt.

Das Ringtensiometer besteht aus einem horizontal aufgehängtem Platiniridiumring bekannter Geometrie, welcher in die zu untersuchende Flüssigkeit eingetaucht und anschließend, durch ein Absenken des Probengefäßes, wieder herausgezogen wird. Über eine automatische Torsionsdraht-Waage wird die Kraft gemessen, welche zum Herausziehen einer Flüssigkeitslamelle aus der Grenzfläche benötigt wird. Bei der Dehnung der Lamelle wird, kurz vor dem Abreißen der Lamelle, ein Kraftmaximum durchlaufen, das bei der Messung registriert wird. Dieses Maximum ist mit der Grenzflächenspannung gleichzusetzen und wird vom Tensiometer angezeigt.

Zur Probenaufbereitung wurden 20 mL der isotonierten Pufferlösung mit 20 mL Öl überschichtet. Bevor der Ring, zur Bestimmung der Grenzflächenspannung, in die Grenzfläche positioniert wurde, standen die Proben für zwei Stunden in dem auf 20 °C temperierten Probengefäß des Tensiometers, um eine Gleichgewichtseinstellung zu gewährleisten.

3.10 Gehaltsbestimmung mittels HPLC

Für die in dieser Arbeit notwendigen Gehaltsbestimmungen wurden HPLC-Methoden eingesetzt. Unter die Stoffe deren Konzentration zu vermessen war, fallen das Phenylsalicylat und seine Abbauprodukte Phenol und Salicylsäure für die kinetischen Messungen sowie das Phosphatidylcholin als Hauptbestandteil von Lecithin, das als Emulgator verwendet wurde. Standardlösungen dieser Substanzen dienten der Kalibrierung.

Die HPLC-Anlage bestand aus einer Pumpe (Model P580, Fa. Dionex, USA), einem automatischen Probengeber (Model ASI 100, Dionex, USA) und einer Trennsäule. Als Detektor diente ein Diodenarray-Detektor (Model PDA 100, Fa. Dionex, USA).

Die Proben wurden, nach Bedarf vor der Gehaltsbestimmung mit Tetrahydrofuran so weit verdünnt, dass ihre Konzentrationen von der Kalibriergeraden abgedeckt waren.

Je nach Substanz und Matrix wurden verschiedene Verfahrensbedingungen gewählt.

3.10.1 Methode für Phenylsalicylat, Phenol und Salicylsäure

Für die Gehaltsbestimmung des Phenylsalicylats und seiner Abbauprodukte wurde die Trennsäule Xterra[®] RP8, 3,5 µm, mit 4,6 mm Innendurchmesser und einer Länge von 150 mm (Fa. Waters, USA) verwendet. Die Detektionswellenlängen waren 270 nm für das Phenol und 301 nm für die Salicylsäure, als auch für das Phenylsalicylat.

3.10.1.1 Rein wässrige Systeme

Die Chromatographie fand unter isokratischen Bedingungen statt mit einer Flussrate von 0,7 mL/min. Die mobile Phase bestand aus Acetonitril, Methanol und Wasser in einem Volumenverhältnis von 40:10:50, sowie 0,1 % Eisessig. Ein Probenvolumen von 60 µL wurde injiziert.

Unter diesen Bedingungen hatte das Phenol eine Retentionszeit von 5 min, die Salicylsäure von 6 min und das Phenylsalicylat von 14 min.

3.10.1.2 Emulsionen bzw. Mehrphasensysteme

In den Chromatogrammen der Emulsionen und Mehrphasensystemen traten Matrixpeaks auf, die bei Anwendung des für wässrige Systeme entwickelten Verfahrens die Gehaltsbestimmung störten. Aus diesem Grund wurde eine Gradientenmethode mit den mobilen Phasen A, bestehend aus Wasser mit 0,1 % Eisessig, und B, bestehend aus Acetonitril, entwickelt.

Der Gradient fiel innerhalb von 20 min linear von 100 % mobile Phase A zu 80 % mobile Phase B. Im Anschluss folgten ein 10-minütiges Spülen mit der mobile Phase B, sowie weitere 10 min mit der mobile Phase A. Injiziert wurde wieder ein Volumen von 60 µL.

Unter diesen Bedingungen hatte das Phenol eine Retentionszeit von 10 min, die Salicylsäure von 14 min und das Phenylsalicylat von 22 min.

3.10.2 Methode für das Phosphatidylcholin

Zur Gehaltsbestimmung des Phosphatidylcholins wurde die Trennsäule Lichrosorb[®] NH₂, 10 µm, mit 4 mm Innendurchmesser und einer Länge von 250 mm genutzt. Die Detektionswellenlänge lag bei 207 nm.

Die Chromatographie fand unter isokratischen Bedingungen, mit einer Flussrate von 1,0 mL/min, statt. Als mobile Phase diente ein Gemisch aus Acetonitril, Methanol und

1 %iger wässriger Phosphorsäure im Verhältnis 49,5:49,5:1. Das Injektionsvolumen betrug 20 µL.

Unter diesen Bedingungen hatte das Phosphatidylcholin eine Retentionszeit von 3,8 min.

II EINPHASENSYSTEME

4. ABBAUKINETIK DES PHENYLSALICYLATS IN WÄSSRIGEN LÖSUNGEN

Der stufenweise Ansatz, die Emulsionssysteme zu beschreiben, bedingt im Vorfeld die jeweiligen Phasen der Emulsion – Wasser und Öl im Einzelnen zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Messungen dienen der allgemeinen Charakterisierung des hydrolytischen Abbaus der Modellsubstanz und sollen im weiteren Verlauf zur Dateninterpretation in den Mehrphasensystemen herangezogen werden.

Im wässrigen System wurde die Abhängigkeit des Abbaus von der Temperatur, dem pH-Wert sowie dem Isotonisierungsmittel untersucht.

4.1 Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten

Die für die Reaktionsgeschwindigkeit charakteristische Größe ist die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k , die in Gleichung (3) aus dem Kapitel 1.2.1 eingeführt wurde. Gleichung (10) aus dem Kapitel 2.1.2 zeigt die Lösung der Differentialgleichung für die Hydrolyse der Modellsubstanz. Wie im Kapitel 4.1.2 dargestellt, kann der hydrolytische Abbau des Phenylsalicylats im Wässrigen mit Hilfe einer Kinetik pseudo-erster Ordnung beschrieben werden. Aus den Messdaten der Phenylsalicylatkonzentrations-Zeit-Kurven wurde k durch Regression nach Gleichung (10) bestimmt.

4.1.1 Versuchsdurchführung

Ca. 5 μ g Phenylsalicylat pro mL Pufferlösung wurden in einem Tropfen Acetonitril gelöst und in die Pufferlösung überführt. Im Anschluss wurden die Probengefäße für drei Minuten in ein Ultraschallbad gestellt, um eine vollständige Lösung des Phenylsalicylats zu gewährleisten. Für alle Versuche wurden drei Ansätze bereitet.

4.1.2 Reaktion pseudo-erster Ordnung

Nach Gleichung (10) der Reaktion pseudo-erster Ordnung fällt die Konzentration hydrolyseempfindlicher Substanzen exponentiell mit der Zeit ab. Die logarithmische Auftragung der Konzentrationen gegen die Zeit ergibt einen linearen Zusammenhang.

Exemplarisch seien hier die Konzentrations-Zeit-Kurve sowie ihre halblogarithmische Auftragung für den hydrolytischen Abbau von Phenylsalicylat bei einem pH-Wert von 7,4

und einer Temperatur von 60 °C mit den dazugehörigen Ausgleichskurven dargestellt (siehe **Abb. 4.1.2-1**; **Abb. 4.1.2-2**).

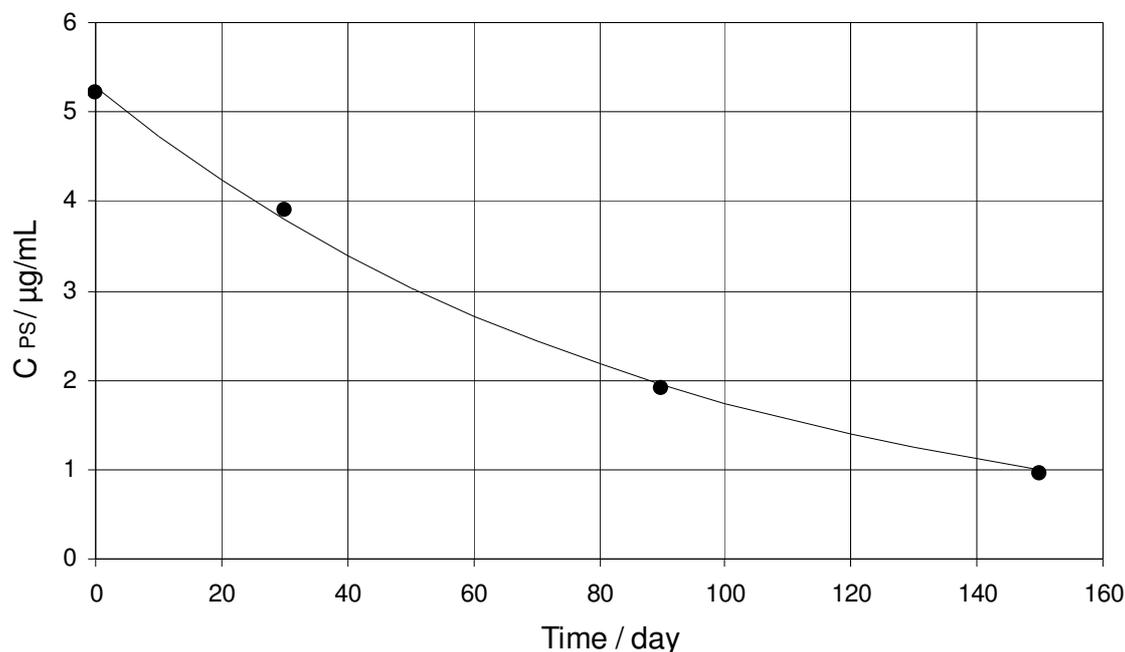


Abbildung 4.1.2-1 Phenylsalicylatkonzentration in einem Phosphatpuffer pH 7,4 gegen die Zeit (bei 60 °C). Auftragung der Messwerte (•) und der exponentiellen Ausgleichskurve (-)

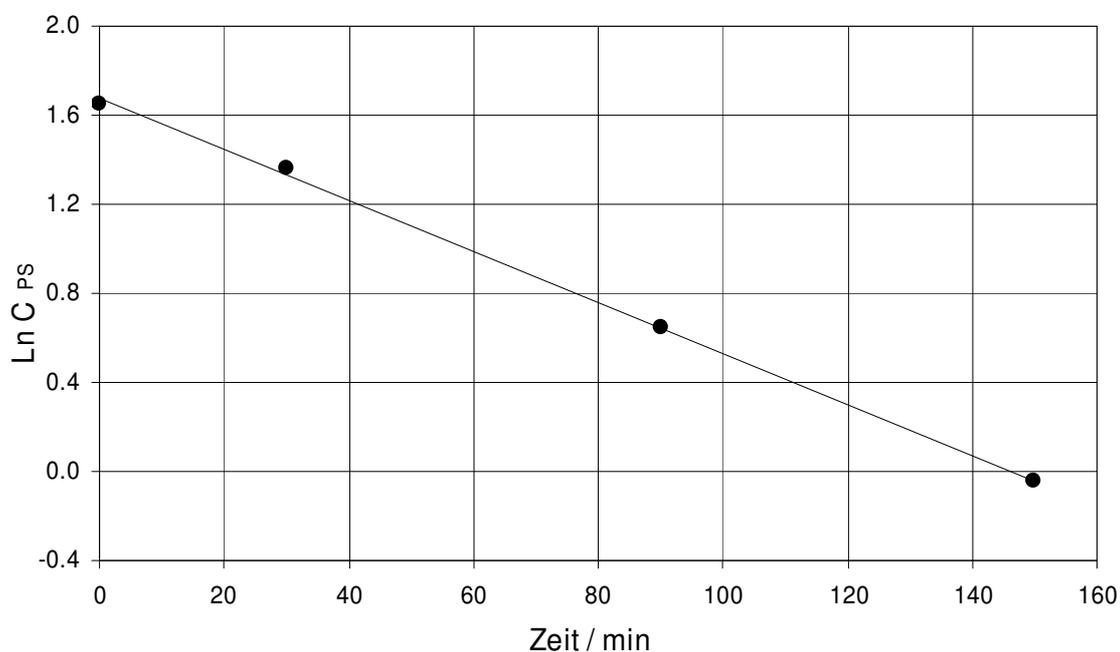


Abbildung 4.1.2-2 Logarithmische Auftragung der Phenylsalicylatkonzentration in einem Phosphatpuffer pH 7,4 gegen die Zeit (bei 60 °C). Auftragung der Messwerte (•) und der Ausgleichsgeraden (-)

Die sehr gute Übereinstimmung der Messwerte mit der Ausgleichsgeraden belegt die in der Literatur beschriebene Reaktionsordnung für den hydrolytischen Abbau des Phenylsalicylats.

Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit für den Vergleich der Abbaugeschwindigkeiten herangezogen werden.

Eine zusätzliche Vergleichsmöglichkeit bietet die Aktivierungsenergie, die sich aus der Arrhenius-Gleichung (4) (siehe Kapitel 1.2.1) über die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten berechnen lässt.

4.1.3 Abhängigkeit der Abbaukinetik vom pH-Wert

Wie in Kapitel 1.2.1 erwähnt, besteht eine Abhängigkeit zwischen dem pH-Wert und der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k . Ein pH-Wert von 7,4 liegt allen Untersuchungen dieser Arbeit zu Grunde. Folglich ist zu eruieren, inwieweit pH-Wert Schwankungen, welche sich beispielsweise durch eine ungenügende Pufferkapazität ergeben, Einfluss auf die Abbaukinetik nehmen können.

Untersucht wurde ein Bereich von pH 6 bis pH 8 in Schritten von 0,2 pH Einheiten. Die Probenaufbereitung erfolgte entsprechend Kapitel 4.1.1. Als Pufferlösungen wurden 100 mmolare Phosphat Puffer der entsprechenden pH-Werte nach der USP-NF 2004 [156] Vorschrift „Buffer Solutions – Phosphate Buffer“ hergestellt. Ermittelt wurde die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Esterhydrolyse in den gepufferten Lösungen bei 20 °C.

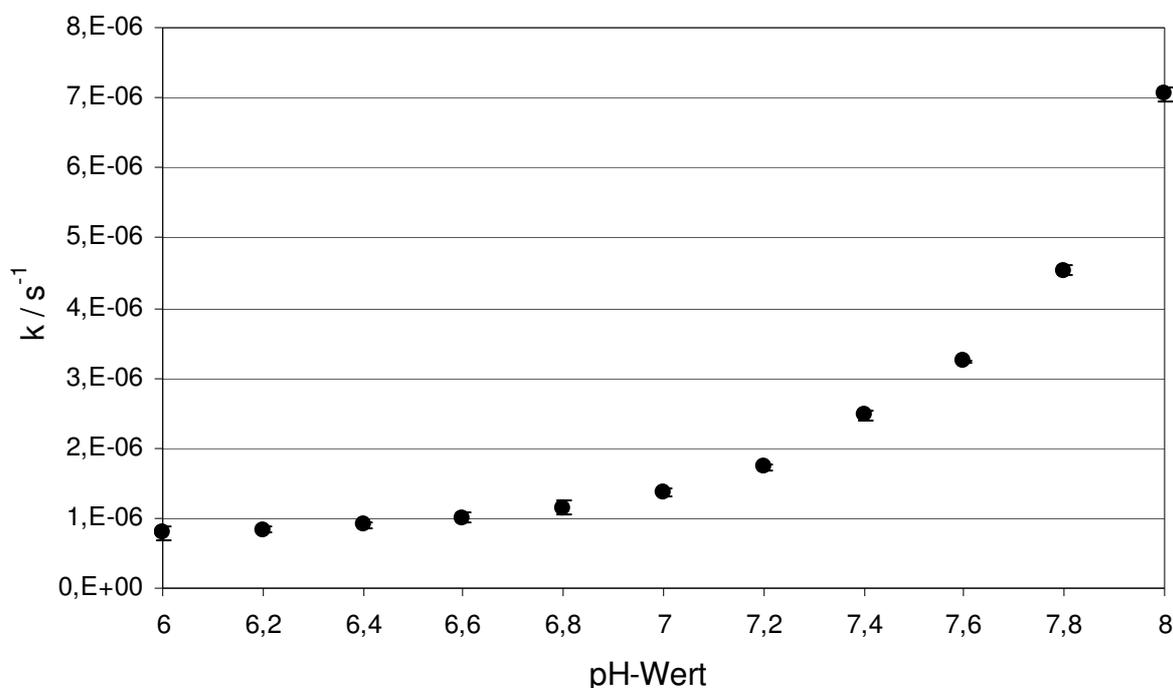


Abbildung 4.1.3-1 Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k in Abhängigkeit vom pH-Wert

Abb. 4.1.3-1 belegt eine starke Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von dem pH-Wert. Es konnte eine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit hin zu basischen pH-Werten festgestellt werden.

Aus diesem Grund erfolgte bei allen weiteren Versuchen eine werkstätige pH-Wert-Kontrolle aller untersuchten Lösungen. Bei Abweichungen wurde wieder ein pH-Wert von 7,4 mit Hilfe von 0,1 N HCl bzw. 0,1 N NaOH eingestellt. Dies galt insbesondere für die im Abschnitt III beschriebenen Versuche, welche einen Beobachtungszeitraum von 30 Tagen hatten.

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass die Hydrolyse im schwach Sauren merklich langsamer verläuft als bei physiologischem pH-Wert, ein Befund, der bei der Formulierungsentwicklung beachtet werden sollte. In dieser Arbeit wurde dennoch der pH-Wert von 7,4 gewählt, weil er einen umfassenden Standard setzt und kinetische Effekte deutlicher zum Ausdruck kommen.

4.2 Einfluss des Isotonisierungsmittels auf die Abbaukinetik

Ein fester Bestandteil der wässrigen Phase von Emulsionen ist das Isotonisierungsmittel. Wie im Kap. 1.3 beschrieben, dient es der Einstellung der Osmolarität auf einen blutisotonen Wert. Ob das Isotonisierungsmittel die Abbaukinetik der Modellsubstanz beeinflussen würde, war Ziel der im Folgenden beschriebenen Untersuchungen.

Zur Formulierung einer Emulsion als Arzneistoffträger für einen hydrolyseempfindlichen Arzneistoff, sollte die Zusammensetzung der wässrigen Phase die Hydrolyse so wenig wie möglich fördern. Es ist also sinnvoll, zu prüfen, ob das Isotonisierungsmittel, als Bestandteil der wässrigen Phase, die Hydrolyse beeinflusst.

4.2.1 Hintergrund

In parenteralen Fettemulsionen kommen in der Regel nichtionische Isotonisierungsmittel zur Anwendung, da sie das Zetapotential nicht beeinflussen (siehe Kapitel 3.3.2.2). Ionische Isotonisierungsmittel würden das Zetapotential reduzieren, die rückstoßenden Kräfte zwischen den Öltröpfchen herabsetzen und somit eine Phasentrennung fördern [128].

Untersucht wurden verschiedene, nichtionische Isotonisierungsmittel (siehe **Tab. 4.2.2-1**). Parenteral zugelassen sind für diesen Zweck ausschließlich Zucker und Zuckeralkohole.

Verglichen wurden die Ergebnisse zum einen mit einer nichtisotonisierten Lösung, zum anderen mit einer isotonen Kochsalzlösung, als Beispiel für einen ionischen Isotonisierungszusatz.

Zusätzlich wurde das N-Methylpyrrolidon, ein parenteral zugelassener Lösungsvermittler (siehe Kapitel 2.7.4), mit in die Untersuchung aufgenommen. Es sollte als alternativer nichtionischer Isotonisierungszusatz geprüft werden, welcher keine Hydroxylgruppen trägt.

4.2.2 Probenaufbereitung

Der Modellarzneistoff und das Isotonisierungsmittel wurden in dem Phosphatpuffer pH 7,4 gelöst. Die Phenylsalicylat-Konzentration lag bei ca. 5 µg/mL. Die Konzentrationen der Isotonisierungsmittel sind in **Tab. 4.2.2-1** angegeben.

Tabelle 4.2.2-1 Gehalt an Isotonisierungsmittel

Isotonisierungsmittel	Konzentration (mg/mL)
Glycerol	25
Sorbitol	50
Glucose	50
Laktose	100
N-Methylpyrrolidon	35
Natriumchlorid	9

Das Isotonisierungsmittel lag in einer Konzentration vor, welche die wässrige Lösung auf einen physiologischen osmotischen Druck von 300 mOsm/kg einstellt. Durch die Osmolarität des Phosphatpuffers in Höhe von 100 mOsm/kg, ergab sich eine Osmolarität der Testlösungen von ca. 400 mOsm/kg (siehe **Tab. 4.2.2-1**).

Tabelle 4.2.2-1 Osmolarität der Testlösungen in mOsm/kg

Probe	Temperatur / °C		
	20	40	60
Reine Pufferlösung	100,3 ± 2,1	98,7 ± 1,5	97,3 ± 2,9
Glycerol	399,7 ± 5,7	398,3 ± 5,9	393,0 ± 1,7
Sorbitol	398,3 ± 2,3	397,7 ± 2,3	396,3 ± 2,1
Glucose	401,0 ± 0,0	396,7 ± 1,5	395,0 ± 3,0
Lactose	397,3 ± 3,2	397,3 ± 3,2	393,0 ± 0,0
N-Methylpyrrolidon	398,3 ± 1,2	400,7 ± 5,1	398,3 ± 2,9
Natriumchlorid	397,7 ± 3,5	399,7 ± 2,1	393,7 ± 1,5

Der pH-Wert der Lösungen wurde vor Testbeginn kontrolliert und bei Abweichungen mit 0,1 N HCl oder 0,1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Am Testende wurde der pH-Wert ein weiteres Mal ermittelt, um eventuelle Abweichungen über den Testzeitraum aufzudecken.

4.2.3 Versuchsdurchführung

Die nach Kap. 4.2.2 hergestellten Proben wurden bei 20, 40 und 60 °C in Klimaschränken (Model B6760, Fa. Heraeus, Deutschland) gelagert. Der Beobachtungszeitraum lag, je nach Temperatur in der obigen Reihenfolge, bei 2000, 200 und 150 Minuten. Zu Beginn sowie innerhalb dieses Zeitraums wurden Proben gezogen, um mittels HPLC, gegen einen externen Standard, die Phenylsalicylat-Konzentration zu bestimmen. Wie im Kapitel 4.1.2 beschrieben, wurden aus den Konzentrations-Zeit-Verläufen die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten bestimmt. Die Abhängigkeit der Konstanten von der Temperatur gibt wiederum die Möglichkeit, über eine Regression nach der Arrhenius-Gleichung (4) die Aktivierungsenergien für die verschiedenen Isotonisierungsmittel zu berechnen.

Vor der Anwendung der Arrhenius-Gleichung (4) wurde geprüft, ob die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten mit ihr beschrieben werden kann.

Gilt ein Zusammenhang nach Arrhenius, so leitet sich aus der Gleichung (4) ab, dass die Auftragung der Logarithmen der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten gegen den Kehrwert der absoluten Temperatur eine Gerade ergibt.

4.2.4 Ergebnisse und Diskussion

Die ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten sind in **Tab. 4.2.4-1** angegeben. Die Auftragung ihres Logarithmus gegen den Kehrwert der absoluten Temperatur ergibt einen linearen Zusammenhang. Exemplarisch ist dies in der **Abb. 4.2.4-1** für die nicht isotonisierte Pufferlösung, gezeigt.

Es ist also im Folgenden möglich, die Aktivierungsenergien mit Hilfe einer linearen Regression aus der Arrhenius-Gleichung zu errechnen. In **Abb. 4.2.4-2** sind die aus der Regression ermittelten Aktivierungsenergien dargestellt.

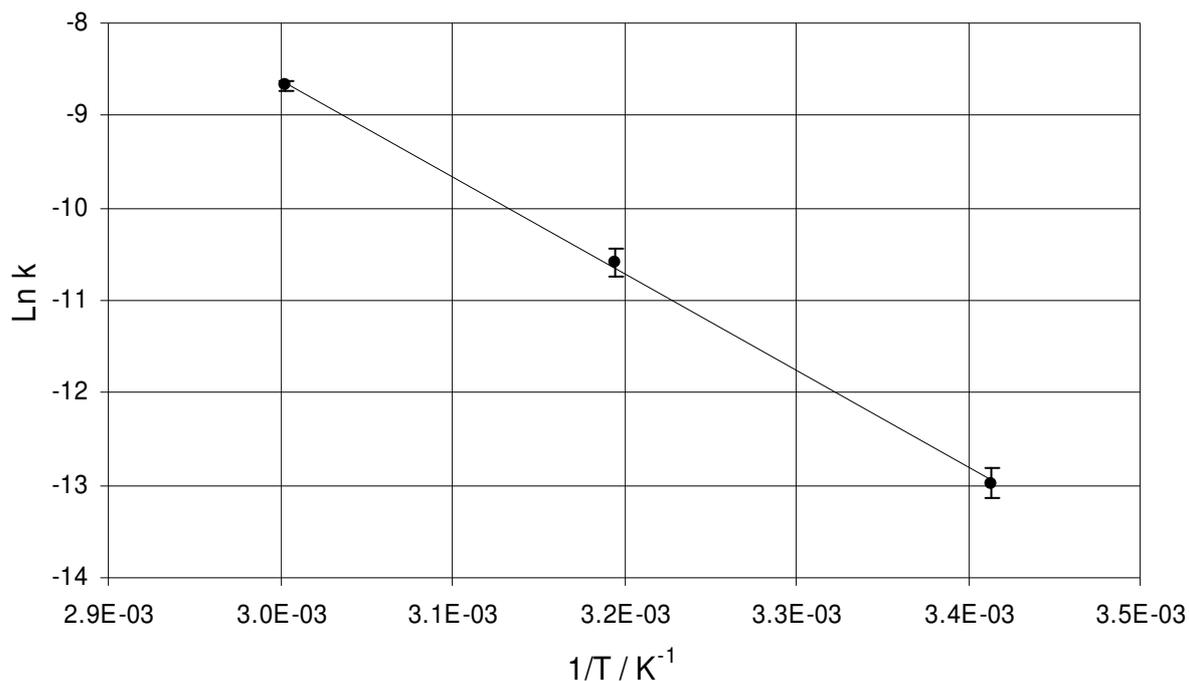


Abbildung 4.2.4-1 Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k . Logarithmische Auftragung der Messwerte (\bullet), welche mit Hilfe der nicht isotonierten Pufferlösung erhalten wurden und der Ausgleichsgeraden (-)

Die Werte Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten belegen eine signifikante Beschleunigung des Phenylsalicylat-Abbaus in Gegenwart nichtionischer Isotonisierungsmittel. Diese Beschleunigung findet auch in den, verglichen mit dem Blindwert, reduzierten Aktivierungsenergien für die nichtionisch isotonierten Lösungen Ausdruck.

Tabelle 4.2.4-1 Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Testlösungen in s^{-1}

Probe	Temperatur / °C		
	20	40	60
Reine Pufferlösung	$2,3 \text{ E-}6 \pm 0,4 \text{ E-}6$	$2,5 \text{ E-}5 \pm 0,4 \text{ E-}5$	$1,7 \text{ E-}4 \pm 1,1 \text{ E-}5$
Glycerol	$5,6 \text{ E-}6 \pm 0,3 \text{ E-}6$	$4,4 \text{ E-}5 \pm 0,5 \text{ E-}5$	$2,5 \text{ E-}4 \pm 9,7 \text{ E-}5$
Sorbitol	$6,5 \text{ E-}6 \pm 0,7 \text{ E-}6$	$6,9 \text{ E-}5 \pm 1,0 \text{ E-}5$	$2,9 \text{ E-}4 \pm 2,6 \text{ E-}5$
Glukose	$8,7 \text{ E-}6 \pm 0,8 \text{ E-}6$	$9,4 \text{ E-}5 \pm 0,6 \text{ E-}5$	$3,8 \text{ E-}4 \pm 1,7 \text{ E-}5$
Laktose	$12,4 \text{ E-}6 \pm 1,6 \text{ E-}6$	$10,6 \text{ E-}5 \pm 0,6 \text{ E-}5$	$4,8 \text{ E-}4 \pm 3,0 \text{ E-}5$
N-Methylpyrrolidon	$10,6 \text{ E-}6 \pm 1,4 \text{ E-}6$	$7,5 \text{ E-}5 \pm 0,8 \text{ E-}5$	$2,6 \text{ E-}4 \pm 1,4 \text{ E-}5$
Natriumchlorid	$3,3 \text{ E-}6 \pm 0,8 \text{ E-}6$	$3,9 \text{ E-}5 \pm 0,9 \text{ E-}5$	$1,8 \text{ E-}4 \pm 1,3 \text{ E-}5$

Zu bemerken ist, dass in der Reihe der **Abb. 4.2.4-2** mit sinkender Aktivierungsenergie, vom Glycerol zum Sorbitol und von der Glukose zur Laktose, die Zahl der Hydroxylgruppen im Molekül des Isotonisierungsmittels zunimmt.

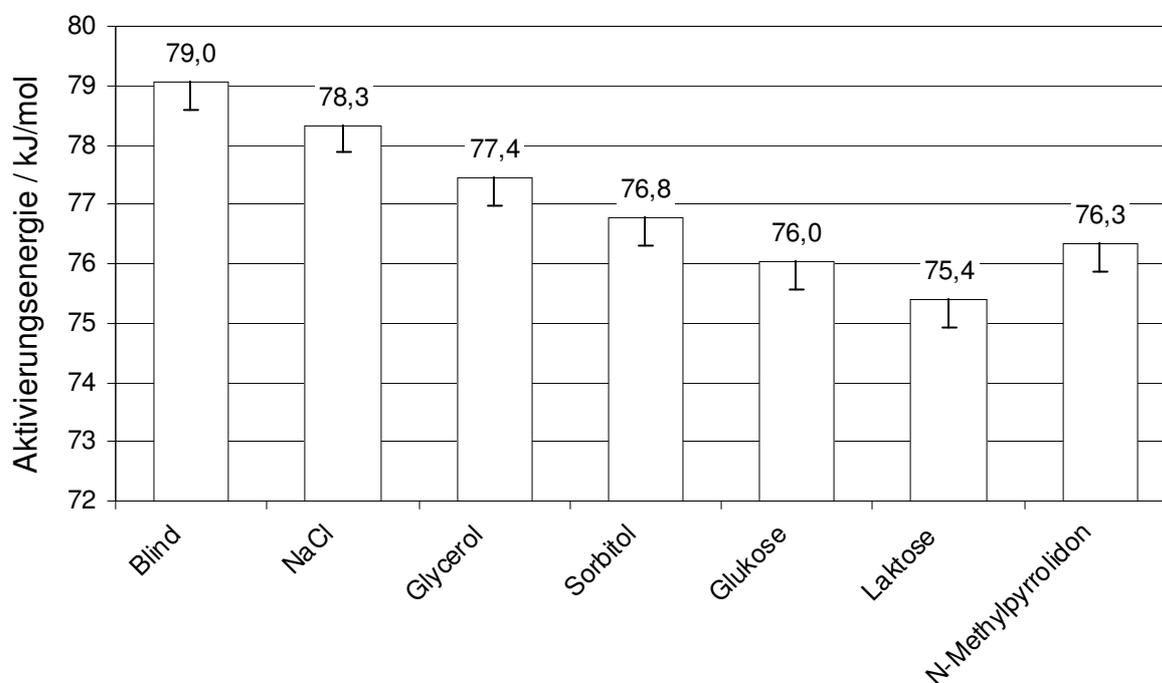


Abbildung 4.2.4-2 Abnahme der Aktivierungsenergie der Esterhydrolyse in Abhängigkeit vom Isotonisierungsmittel

Eine Rolle kann folglich ein nukleophiler Angriff von Hydroxylgruppen an der Carbonylfunktion des Phenylsalicylats spielen. Solch ein Angriff würde den Ester destabilisieren, wie es in **Abb. 4.2.4-3** dargestellt ist.

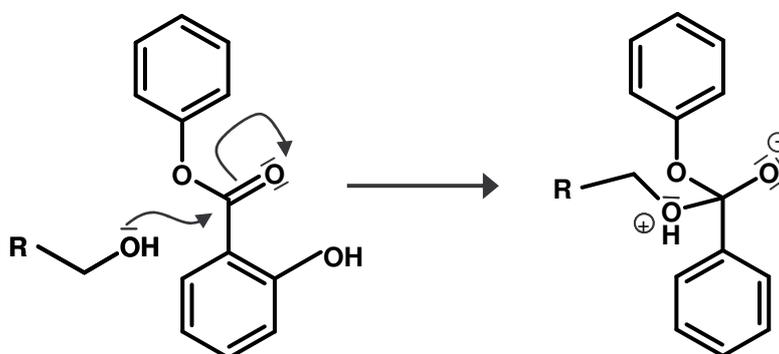


Abbildung 4.2.4-3 Destabilisierung des Phenylsalicylat Esters durch einen nukleophilen Angriff einer Hydroxylgruppe. R-OH stellt das Isotonisierungsmittel dar

Diese katalytische Wirkung auf die Verseifung würde dann mit der Konzentration der Hydroxylgruppen und damit mit ihrer Anzahl im Molekül zunehmen. Khan [157] beschreibt analog den nukleophilen Angriff und die hieraus resultierende Destabilisierung des Phenylsalicylats, durch die freien Elektronenpaare von primären und sekundären Aminen.

Auch eine destabilisierende nucleophile Interaktion des Ketons vom N-Methylpyrrolidon wäre über diesen Weg denkbar. Diese Substanz fiel ein wenig aus der Testreihe, da seine Stellung in der Reihe mit der Temperatur wechselte. Den stärksten katalytischen Effekt wies es bei 20 °C auf, den geringsten bei 60 °C (siehe **Tab. 4.2.4-1** und **Abb. 4.2.4-4**).

20°C:	Laktose	>	Pharmasolve[®]	>	Glukose	>	Sorbitol	>	Glycerol	>	NaCl
40°C:	Laktose	>	Glukose	>	Pharmasolve[®]	≈	Sorbitol	>	Glycerol	≈	NaCl
60°C:	Laktose	>	Glukose	>	Sorbitol	>	Pharmasolve[®]	≈	Glycerol	>	NaCl

Abbildung 4.2.4-4: Ranking der Geschwindigkeitskonstanten in der Gegenwart verschiedener Isotonisierungsmittel aus der **Tab. 4.2.4-1**

Die Interpretation der Daten zeigt, dass das Isotonisierungsmittel, welches für die Herstellung einer O/W-Emulsion Anwendung findet, die chemische Stabilität eines hydrolyseinstabilen Arzneistoffs beeinflussen kann.

Ob sich dieser Einfluss im Emulsionssystem bestätigen lässt, wird später in weiteren Versuchen geklärt werden. Im Rahmen dieser Arbeit werden Emulsionen verglichen, welche entweder mit Glycerol oder mit Sorbitol isotonisiert wurden. Daten und Ergebnisse werden im Kapitel 7.7 präsentiert.

5. ABBAUKINETIK DES PHENYLSALICYLATS IN VERSCHIEDENEN ÖLEN

Es ist davon auszugehen, dass die Ölphasen in Emulsionssystemen eine Wassersättigung aufweisen. Dies resultiert zum einen aus dem hohem Überschuss an Wasser in Emulsionen, zum anderen gewährleistet die Homogenisation, als ein Schritt der Emulsionsherstellung, eine sehr gute Durchmischung der beiden Phasen. Durch die Anwesenheit von Wasser in der Ölphase ist eine hydrolytische Zersetzung des Phenylsalicylats prinzipiell möglich.

Da es für die Beschreibung der Abbaukinetik in Emulsionssystemen von entscheidender Bedeutung ist, ob ein hydrolytischer Abbau des Phenylsalicylats in einer wassergesättigten Ölphasen abläuft, soll dies durch die Betrachtung der Stabilität des Phenylsalicylats in den verwendeten Ölphasen untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit fanden die Öle Miglyol, Sojaöl, Rizinusöl, Olivenöl und Rapsöl sowohl im Zweilagigen-, als auch in den Emulsionssystemen Anwendung.

5.1 Stabilitätsuntersuchungen

Für den Nachweis einer Hydrolyse in wassergesättigten Öl genügt eine Stabilitätsuntersuchung bei 60 °C als höchste und daher belastendster der in dieser Arbeit gewählten Temperaturen. Der Beobachtungszeitraum wurde zudem auf zwei Wochen ausgedehnt.

5.1.1 Probenaufbereitung

Um eine Wassersättigung der untersuchten Öle zu erreichen, wurden sie einem Verhältnis von 1:1 mit Phosphat-Puffer pH 7,4 gemischt und 24 Stunden lang mit Hilfe eines Kleinschüttlers (IKA-Vibrax-VXR, Fa. IKA Werke GmbH und Co. KG, Deutschland) sanft geschwenkt. Im Anschluss daran wurden die Phasen mittels Zentrifugation getrennt.

Die so gewonnenen Ölphasen wurden nach Lösen des Modellarzneistoffs Phenylsalicylat in einer Konzentration von ca. 15 µg/mL bei 60 °C in einem Klimaschrank (Modell B6760, Fa. Heraeus, Deutschland) eingelagert, und zwar von jedem Öl drei Ansätze. Proben wurden zu Beginn, nach einer Woche und nach zwei Wochen gezogen, um sie auf Wirkstoffgehalt und Abbauprodukte zu untersuchen.

5.1.2 Ergebnisse

Über den gesamten Beobachtungszeitraum konnte bei keinem der untersuchten Öle das Auftreten der Abbauprodukte Phenol, bzw. Salicylsäure detektiert werden. Auch die Wirkstoffkonzentration blieb bei allen Ölen während des untersuchten Zeitraums konstant. Die ermittelten Wirkstoffkonzentrationen sind in **Tab. 5.2.2-1** aufgelistet.

Tabelle 5.2.2-1 Auflistung der Phenylsalicylatkonzentrationen in den bei 60 °C gelagerten Ölen über den Beobachtungszeitraum von zwei Wochen

Öl	Probe	Phenylsalicylatkonzentration / µg/mL		
		Start	1 Woche	2 Wochen
Rizinusöl	P1	15,7	15,7	16,0
	P2	15,6	15,7	15,4
	P3	14,2	14,1	14,0
Olivenöl	P1	16,3	16,2	16,4
	P2	16,2	16,2	16,3
	P3	14,7	14,3	14,4
Rapsöl	P1	14,3	14,5	14,5
	P2	15,5	15,8	15,5
	P3	16,1	16,3	16,1
Sojaöl	P1	15,7	15,6	15,4
	P2	15,6	15,5	16,0
	P3	14,8	14,9	14,6
Miglyol	P1	15,0	15,4	15,4
	P2	16,6	16,3	17,0
	P3	14,4	14,2	14,3

Das Phenylsalicylat zeigte selbst bei hoher thermischer Belastung von 60°C nach vierzehn Tagen der Beobachtung keine Hydrolyse in den wassergesättigten Ölen. Umso unwahrscheinlicher ist eine Hydrolyse in der Ölphase unter den thermisch weit weniger belastenden Bedingungen der Mehrphasenversuche, die bei Raumtemperatur stattfanden. Dieser Befund berechtigt dazu, bei der späteren Interpretation der Daten aus den Mehrphasenversuchen die Hydrolyse des Phenylsalicylats in der Ölphase zu vernachlässigen.

III MEHRPHASENSYSTEME

6. ZWEILAGENSYSTEM

Das Zweilagensystem stellt eine sehr elegante Methode dar, die Verteilungsvorgänge während der Hydrolyse in Emulsionen zu simulieren. Abbauprodukte und Arzneistoff selbst sind in den einzelnen Phasen ohne Verfälschung durch Phasentrennung der quantitative Auswertung zugänglich.

Es ist des Weiteren möglich, einzelne Parameter, wie z.B. Grenzfläche und Emulgatorkonzentration, getrennt zu variieren und so ihre Auswirkungen voneinander zu separieren. Die so erhaltenen Daten sollen im Anschluss genutzt werden, um sie auf die Emulsionssysteme zu übertragen und ein kinetisches Modell zur Beschreibung des Abbaus zu entwickeln.

Für eine Übertragbarkeit der mit dem Zweilagensystem ermittelten Ergebnisse auf die Emulsionssysteme müssen die Wirkstoffkonzentration und das Öl-zu-Wasser-Volumenverhältnis identisch sein. Aus diesem Grund wurden für alle Systeme eine Wirkstoffkonzentration im Gesamtsystem von 2,5 mg/mL und ein Ölanteil von 10 % festgelegt. Auch ein pH-Wert von 7,4 sowie die Lagerung bei Raumtemperatur (Klimatisiertes Labor mit einer Durchschnittstemperatur von 23 °C) wurden für beide Systeme eingehalten.

Da im Kapitel 4.2 gezeigt wurde, dass das Isotonisierungsmittel die hydrolytische Zersetzung des Phenylsalicylats beeinflusst, wurde bei allen Versuchen im Zweilagensystem eine mit Glycerol isotonisierte Phosphatpufferlösung pH 7,4 verwendet, welche auch zur Emulsionsherstellung genutzt wurde. Die Konzentration des Glycerols wurde so gewählt, dass eine rein wässrige Lösung einen physiologischen osmotischen Druck von 300 mOsm/kg aufweisen würde (25 mg/mL Glycerol in Pufferlösung). Durch die Osmolarität des Phosphat-Puffers in Höhe von ca. 100 mOsm/kg ergab sich eine Osmolarität der verwendeten wässrigen Phasen von ca. 400 mOsm/kg.

6.1 Einfluss der Grenzfläche auf die Abbaukinetik

Der erste Parameter der anhand des Zweilagensystems untersucht werden sollte war die Grenzfläche. Aus diesem Grund fanden drei Glasgefäße unterschiedlichen Durchmessers Anwendung. Nach den Untersuchungen an den Einphasensystemen, stellte dies die erste

Annäherung an ein Emulsionssystem dar, das die Beobachtung des kinetischen Verhaltens unabhängig vom Einfluss eines Emulgators erlaubt.

Aufzuklären wäre zum einen, inwieweit sich der Massenfluss des Phenylsalicylats vom Öl über die Grenzfläche in die wässrige Phase auf die Abbaukinetik auswirkt. Zum anderen stellt die Grenzfläche potentiell einen zusätzlichen Verteilungsraum für den Arzneistoff dar, welcher einen Kontakt mit dem Wasser ermöglicht und damit die Hydrolyse fördern mag.

6.1.1 Apparativer Aufbau und Durchführung der Versuche

Um die Grenzfläche zu variieren, wurden drei Kristallisierschalen mit den Durchmessern 8,4 cm, 13,6 cm und 18,6 cm als Glasgefäße genutzt. Die sich hieraus ergebenden Grenzflächen sind $55,1 \text{ cm}^2$, $145,0 \text{ cm}^2$ und $271,7 \text{ cm}^2$. In den Glasgefäßen wurden 540 mL isotonisierter Pufferlösung pH 7,4 mit 60 mL Miglyol überschichtet. 1,5 g Phenylsalicylat wurden zuvor in dem Miglyol gelöst. Aufgrund des Gesamtvolumens der Testlösungen von 600 mL ergibt sich so eine Phenylsalicylatkonzentration von 2,5 mg/mL. Im Anschluss daran wurden die Spritzen in den einzelnen Phasen positioniert und der Rührer in Betrieb gesetzt.

Über einen Beobachtungszeitraum von 30 Tagen wurden aus beiden Phasen Proben gezogen und mittels HPLC, gegen externe Standardlösungen, die Konzentrationen von Phenol, Salicylsäure und Phenylsalicylat bestimmt. Von jeder untersuchten Grenzfläche wurden drei Ansätze bereitet.

6.1.2 Ergebnisse und Diskussion

6.1.2.1 Auftreten eines zusätzlichen Reaktionsproduktes

Eine interessante Beobachtung bei der Auswertung der Konzentrationen mittels HPLC war das Auftreten eines zusätzlichen Peaks im Chromatogramm der wässrigen Phase; der im Einphasensystem nicht zu erkennen war. Die Fläche dieses Peaks nahm linear mit der Zeit zu.

Die Gegenwart der Ölphase bzw. einer Grenzfläche bewirkt also entweder einen zusätzlichen Reaktionsweg, welcher zu einem neuem Abbauprodukt führt, oder eines der Abbauprodukte unterliegt einer Folgereaktion.

Da die Hydrolyse von Phenylsalicylat äquimolar zur Bildung der Abbauprodukte Phenol und Salicylsäure führt, muss dies auch in den Konzentrations-Zeit-Kurven Ausdruck finden. Die molaren Konzentrationen der Salicylsäure lagen jedoch unter denen des Phenols. Der zusätzliche Peak muss also auf Kosten der Salicylsäurekonzentration entstanden sein. Dies ist exemplarisch für die untersuchte Grenzfläche $145,0 \text{ cm}^2$ in der **Abb. 6.1.2.1-1** dargestellt.

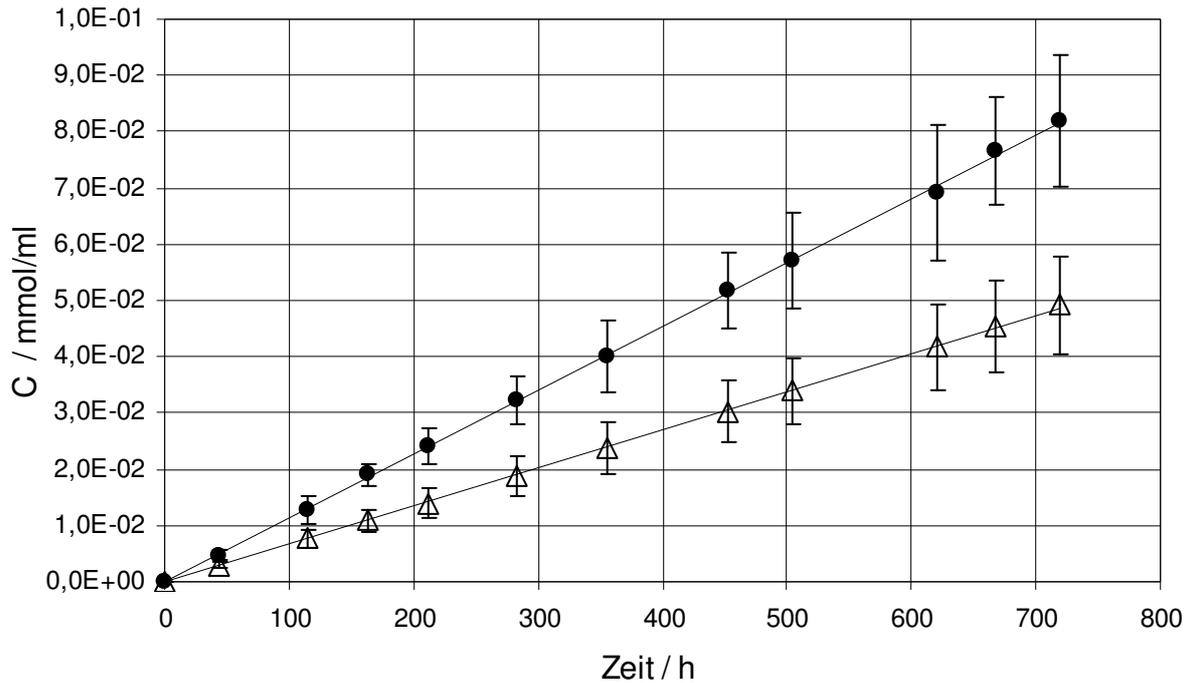


Abbildung 6.1.2.1-1 Molare Konzentrationen der Abbauprodukte Phenol (●), und Salicylsäure (Δ) gegen die Zeit für die getestete Grenzfläche 145,0 cm²; (n=3)

Die genaue Aufklärung dieses zusätzlichen Reaktionsproduktes sollte nicht Ziel dieser Arbeit sein. Die Beobachtung bedeutet jedoch, dass die Salicylsäure-Konzentrationen sich nicht zur Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit eignet.

Da gemeinhin die Konzentrationszunahme eines Abbauproduktes eine exaktere Messung der Reaktionsgeschwindigkeit erlaubt als die Konzentrationsabnahme des Ausgangsstoffes, wird von den drei Substanzen – Phenylsalicylat, Salicylsäure und Phenol – der Konzentrationsverlauf des Phenols mit der Zeit zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten genutzt.

6.1.2.2 Ergebnisse und Diskussion zum Einfluss der Grenzfläche

Die Konzentrationen des Phenylsalicylats und des Phenols wurden detektiert. Die Zeitkurven sind in den **Abb. 6.1.2.2-1** und **6.1.2.2-2** dargestellt. **Abb. 6.1.2.2-1** zeigt die Phenylsalicylatkonzentration in der wässrigen Phase, **Abb. 6.1.2.2-2** die Phenolkonzentration im Gesamtsystem, welche sich rechnerisch nach Gleichung (19) aus den ermittelten Konzentrationen der einzelnen Phasen ergibt.

$$\frac{C_{\text{Phenol}/\text{Öl}} V_{\text{Öl}} + C_{\text{Phenol}/\text{Wasser}} V_{\text{Wasser}}}{V_{\text{Gesamt}}} \quad (19)$$

Drei Erkenntnisse können aus diesen Daten gewonnen werden. Erstens bleibt die Phenylsalicylatkonzentration in der wässrigen Phase über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant, zweitens steigt die Phenolkonzentration linear mit der Zeit, und drittens scheint die Grenzfläche keinen Einfluss auf die Phenolkonzentrationszunahme zu nehmen. Aufgrund des letztgenannten Befundes wurden alle folgenden Untersuchungen im Zweilagensystem mit einer Grenzfläche von $145,0 \text{ cm}^2$ durchgeführt.

Aus der Konstanz der Phenylsalicylatkonzentration in der wässrigen Phase lässt sich schließen, dass der Massenfluss über die Grenzfläche im Vergleich zum Abbau sehr rasch erfolgt. Jeder Verlust durch die Hydrolyse wird sofort durch einen Nachtransport aus der Ölphase kompensiert. Dies gilt auch für die niedrigste spezifische Grenzfläche von $55,1 \text{ cm}^2/600 \text{ cm}^3 = 0,092 \text{ cm}^{-1}$ und wird erst recht für die Emulsionssysteme gelten, welche spezifische Grenzflächen von ca. $4,2 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/250 \text{ cm}^3 \approx 17,000 \text{ cm}^{-1}$ (siehe Kapitel 7.1) aufweisen.

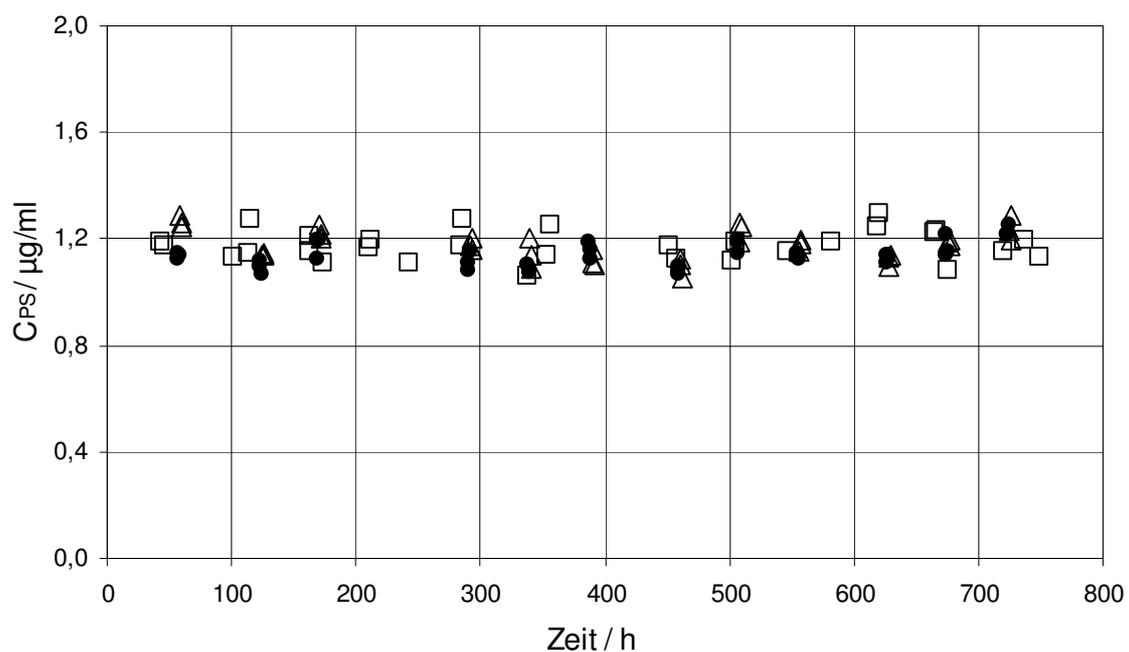


Abbildung 6.1.2.2-1 Zeitverlauf der Phenylsalicylatkonzentrationen in der Wasserphase des Zweilagensystems Miglyol über Puffer für die drei Grenzflächen $55,1$ (●), $145,0$ (▲) und $271,7 \text{ cm}^2$ (□); ($n=3$).

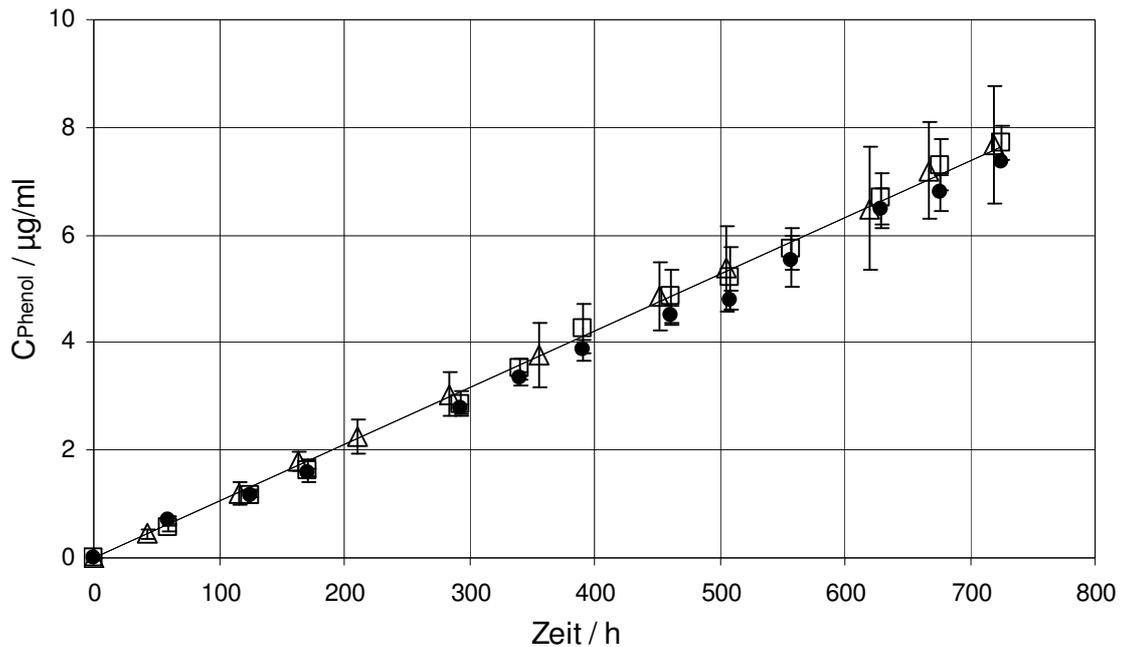


Abbildung 6.1.2.2-2 Gesamtkonzentration des Abbauprodukts Phenol im Zweilagensystem Miglyol über Puffer gegen die Zeit für drei getestete Grenzflächen 55,1 (●), 145,0 (Δ) und 271,7 cm² (□); (n=3)

Im Miglyolsystem stellt die Grenzfläche demnach keine Diffusionsbarriere dar.

Andere Auswirkungen der Grenzfläche sind nicht auszuschließen, lassen sich aber möglicherweise erst nach dem Sprung auf die um fünf Größenordnungen höhere spezifische Grenzfläche der Emulsionen erkennen (siehe Kapitel 7.1).

6.2 Einfluss eines Emulgatorfilms in der Phasengrenzfläche

Da Emulsionen mit Hilfe eines Emulgators stabilisiert werden, folgte als weitere Annäherung der Zweilagensimulation an die Emulsionssysteme die Zugabe eines Emulgators und die Untersuchung seiner Wirkung auf die Kinetik. Denkbar wäre beispielsweise, dass der Emulgatorfilm in der Phasengrenzfläche eine Art Diffusionsbarriere darstellt und das Potential besitzt, den Arzneistoff schützend in der Ölphase zu halten. Auch wird die Grenzfläche als solche in ihren physikochemischen Eigenschaften verändert und mag dadurch die Abbaukinetik beeinflussen.

Um dies zu untersuchen, wurde im Vorfeld die kritische Mizellbildungskonzentration für den Emulgator Lecithin bestimmt, da zunächst eine Mizellbildung in der wässrigen Phase vermieden werden sollte (siehe Kapitel 6.2.1). Mizellen, bzw. im Fall des Lecithins:

Liposomen, bilden einen weiteren Verteilungsraum, dessen Einfluss erst später betrachtet werden soll.

6.2.1 Kritische Mizellbildungskonzentration (CMC)

Wird eine amphiphile Substanz einer Lösung zugesetzt, kommt es mit steigender Gesamtkonzentration zu einer Sättigung der Lösung sowie der Grenzfläche. Weitere Emulgatorzugabe nach der Sättigung führt zur Ausbildung von Mizellen. In der Lösung liegen dann Monomere des Amphiphils und Mizellen im Gleichgewicht vor. Die Konzentration, bei der die Sättigung erreicht ist, wird als kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) bezeichnet. [9, 116].

Zur Bestimmung der CMC wurde in dieser Arbeit genutzt, dass die Grenzflächenspannung zwischen Öl und Wasser mit steigendem Gehalt an Emulgator bis zur CMC hin abnimmt. Oberhalb der CMC bleibt die Grenzflächenspannung konstant, da die Grenzfläche gesättigt ist [9, 116].

Die Messung der Grenzflächenspannung im Zweilagensystem zwischen isotonisierter Pufferlösung und Miglyol, versetzt mit steigender Konzentration an Lecithin (Lipoide E80[®]) ergab die in **Abb. 6.2.1-1** aufgetragenen Werte.

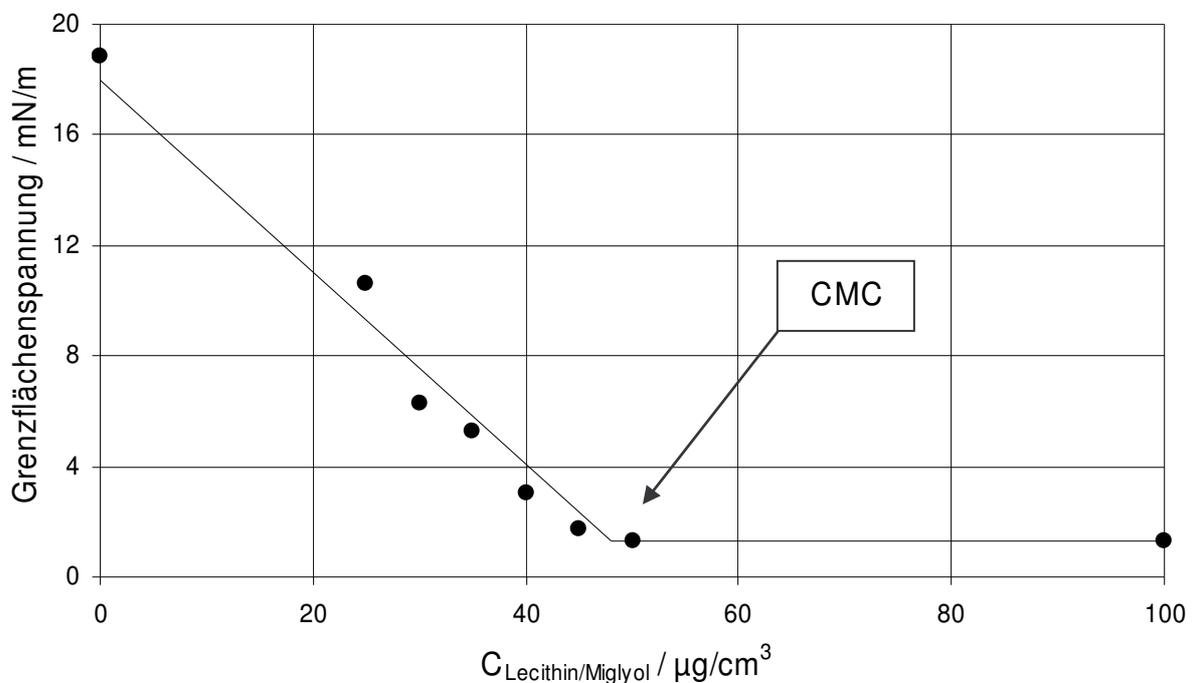


Abbildung 6.2.1-1 Auftragung der Grenzflächenspannung gegen den Lecithingehalt im Miglyol zu Bestimmung der CMC

Die CMC lässt sich im Knickpunkt des Verlaufs ablesen. Sie beträgt ca. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Lecithin in Miglyol. Diese Konzentration wurde für die kinetischen Messungen in Anwesenheit eines Grenzflächenfilms aus Lecithin eingestellt.

6.2.2 Durchführung

Die Messungen wurden durchgeführt wie im Kapitel 6.1.1 beschrieben. Als Glasgefäß diente die Kristallisierschale mit dem Durchmesser von 13,6 cm. Vor der Überschichtung wurden 3 mg Lecithin in den 60 mL Miglyol gelöst. Die unter diesen Bedingungen ermittelten Phenolkonzentrations-Zeit-Kurven wurden mit den zum selben Glasgefäß gehörigen Ergebnissen aus dem Kapitel 6.1.1 verglichen.

6.2.3 Ergebnisse und Diskussion

Die **Abb. 6.2.3-1** zeigt eine lineare Zunahme der Phenolkonzentration mit der Zeit für beide Systeme. Kein signifikanter Unterschied ist im Kurvenverlauf der beiden Kurven zu erkennen.

Auch die Phenylsalicylatkonzentration im Wässrigen blieb während des Untersuchungszeitraums konstant und ihr Wert unterschied sich nicht signifikant von dem ohne Anwesenheit des Lecithinfilms (siehe **Abb.6.2.3-2**).

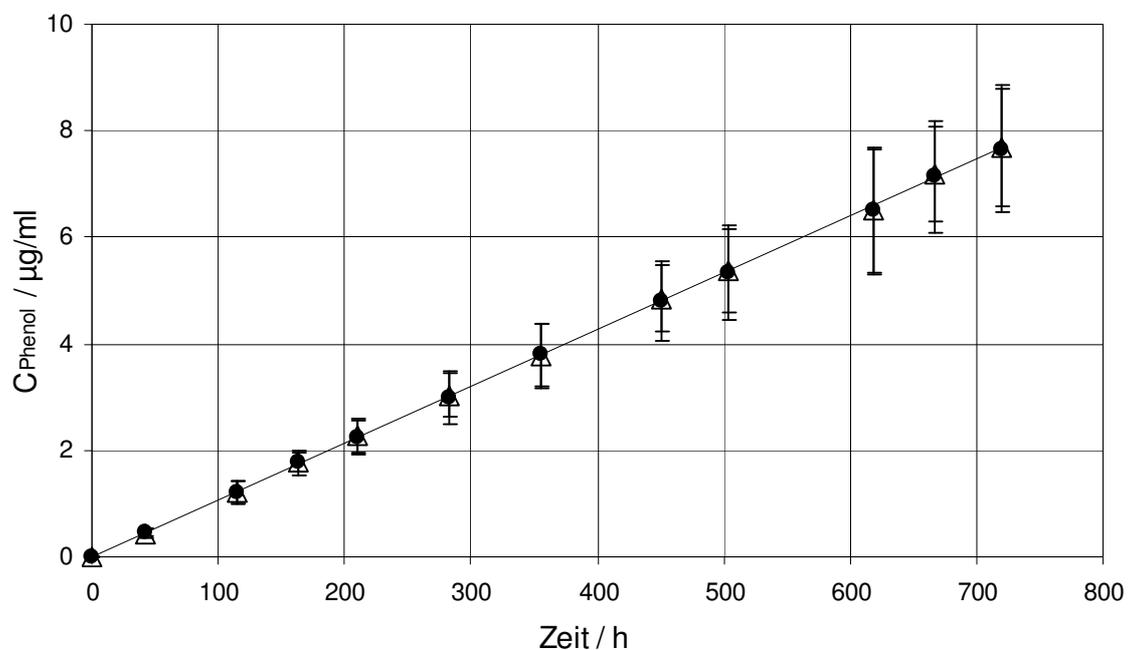


Abbildung 6.2.3-1 Phenolkonzentration gegen die Zeit für das Zweilagensystem Miglyol über Puffer mit (●) und ohne (Δ) lecithingesättigter Grenzfläche

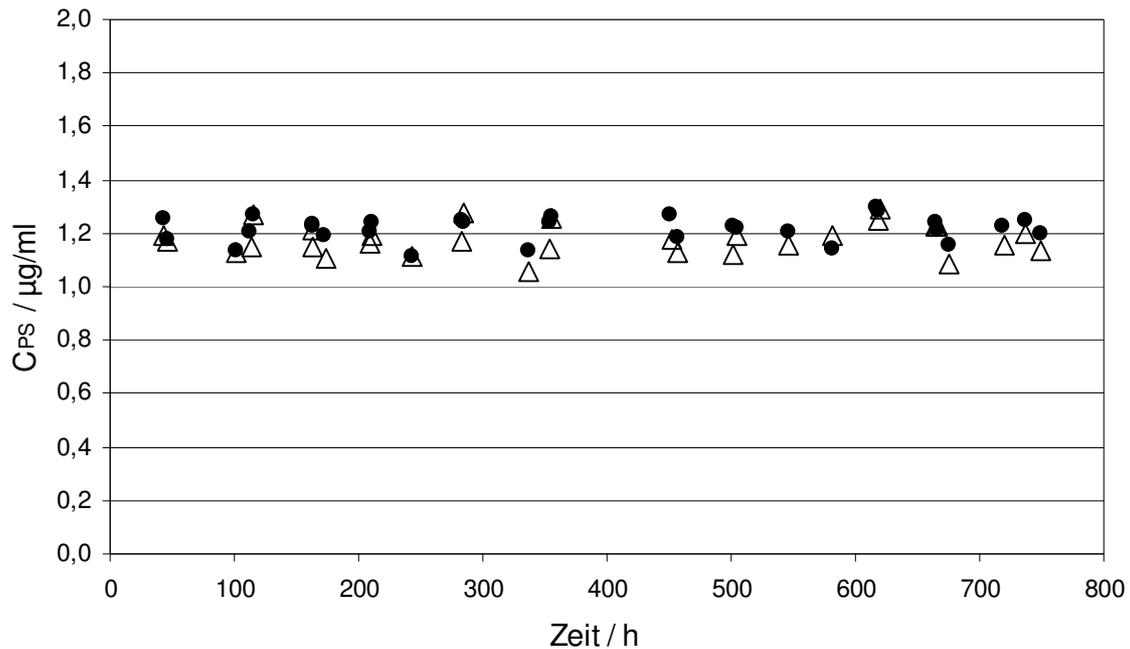


Abbildung 6.2.3-2 Phenylsalicylatkonzentration gegen die Zeit für das Zweilagensystem Miglyol über Puffer mit (●) und ohne (△) lecithingesättigter Grenzfläche

Es zeigte sich also, dass der Emulgator Lecithin in der Grenzfläche nicht in der Lage war, den Massenfluss des Phenylsalicylats in die wässrige Phase in einem Ausmaß zu reduzieren, welches die Hydrolyse verlangsamen würde.

Ob die veränderten physikochemischen Eigenschaften der Grenzfläche einen Einfluss auf den Abbau haben, kann mit diesen Ergebnissen nicht hundertprozentig beantwortet werden. Möglich wäre es, dass Effekte erst bei einer Grenzfläche in der Größenordnung einer Emulsion zum Tragen kommen.

6.3 Liposomale Dispersionen als wässrige Phase

Die Emulsionsstabilisierung mittels Lecithin geht einher mit der Bildung von Liposomen in der wässrigen Phase. Diese wurden über eine Auftrennung der Emulsion mittels Ultrazentrifugation [158, 159, 160] sowie elektronenmikroskopisch nachgewiesen [161, 162].

Ob die Liposomen auf die Abbaukinetik eines Arzneistoffs in Emulsionssystemen Einfluss nehmen können, soll im Folgenden untersucht werden.

Für rein wässrige Emulgatordispersionen wurde schon ein wirkstoffstabilisierendes Potential nachgewiesen. Da die Emulgatormolekülen im Wässrigen Aggregate ausbilden, wird postuliert, dass der Arzneistoff über eine Inkorporation in diese Strukturen vor dem Abbau

geschützt wird [163,164]. Der Schutz war jedoch in keinem der untersuchten Fälle hundertprozentig.

6.3.1 Durchführung

Um den Einfluss der Liposomen zu testen und zu quantifizieren wurden verschieden konzentrierte liposomale Dispersionen hergestellt (siehe Kapitel 3.2.2) und als wässrige Phase im Zweilagensystem verwendet.

Erneut wurden diese Versuche entsprechend Kapitel 6.1.1 durchgeführt. Als Gefäß diente die Kristallisierschale mit dem Durchmesser von 13,6 cm. Anstelle der isotonierten Pufferlösung fanden nun die isotonierten und gepufferten Liposomendispersionen Anwendung.

Neben Miglyol wurde als Ölphase Sojaöl eingesetzt. Im ersten Fall wurden die Lecithinkonzentrationen 22,5, 45, 67,5. and 90 mg pro mL isotonisierter Pufferlösung untersucht. Die Ergebnisse wurden mit denen der isotonierte Pufferlösung ohne Lecithinzugabe aus dem Abschnitt 6.1.2.2 verglichen. Im zweiten Fall wurden nur die Lecithinkonzentrationen 0, 22,5 und 45 mg/mL untersucht.

6.3.1.1 Ergebnisse mit Miglyol als Ölphase

Der primäre Befund dieser Untersuchungen war, dass der Einsatz liposomaler Dispersionen zu einem signifikanten Anstieg der Phenylsalicylatkonzentration in der wässrigen Phase führte. Es ergab sich eine lineare Korrelation der Lecithin- mit der Phenylsalicylatkonzentration (siehe **Abb. 6.3.1.1-1**).

Mit Hilfe der bekannten Ausgangskonzentration von 25 mg/mL Phenylsalicylat in der Ölphase vor der Überschichtung, konnten die Verteilungskoeffizienten des Phenylsalicylats für die einzelnen Lecithinkonzentrationen berechnet werden.

Da außerdem die Konzentration des Abbauprodukts Phenol in beiden Phasen separat bestimmt wurde, konnte auch dessen Verteilungskoeffizient berechnet werden. **Tab. 6.3.1.1-1** listet die Verteilungskoeffizienten gegen die Lecithinkonzentration auf.

Es ist auffällig, dass auch der Verteilungskoeffizient des Phenols von der Lecithinkonzentration abhängig ist. Eine Auftragung des reziproken Verteilungskoeffizienten gegen den Lecithingehalt ergibt einen linearen Zusammenhang. Dies ist in **Abb.6.3.1.1-2** dargestellt.

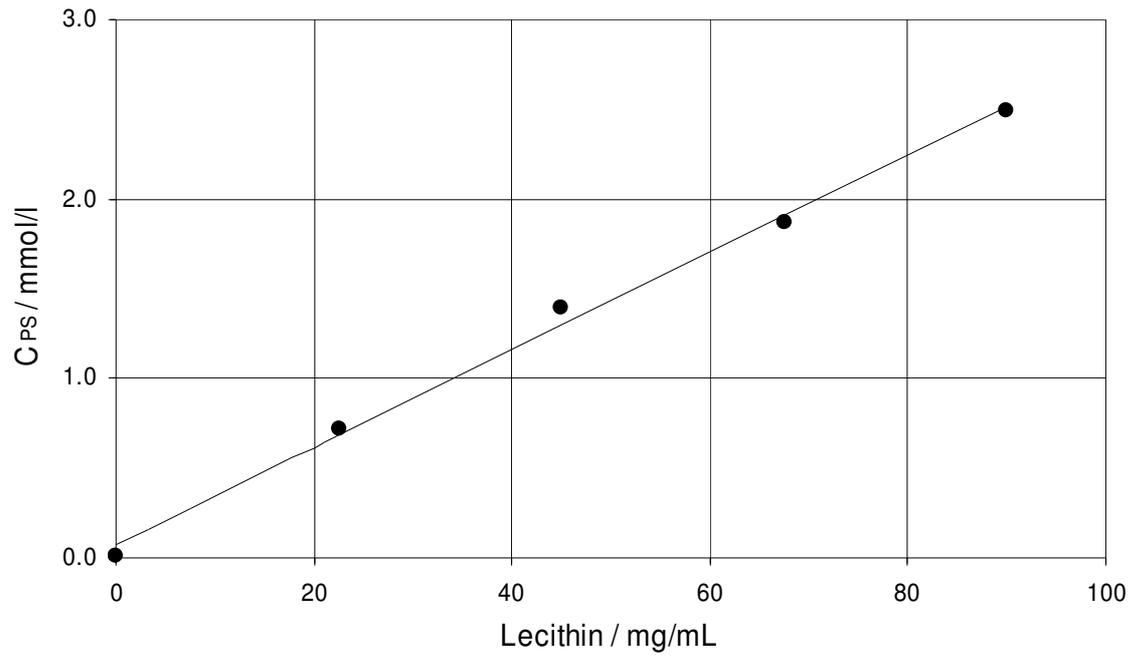


Abbildung 6.3.1.1-1 Konzentration des Phenylsalicylats gegen die Lecithinkonzentration in der wässrigen Phase des Zweilagensystems

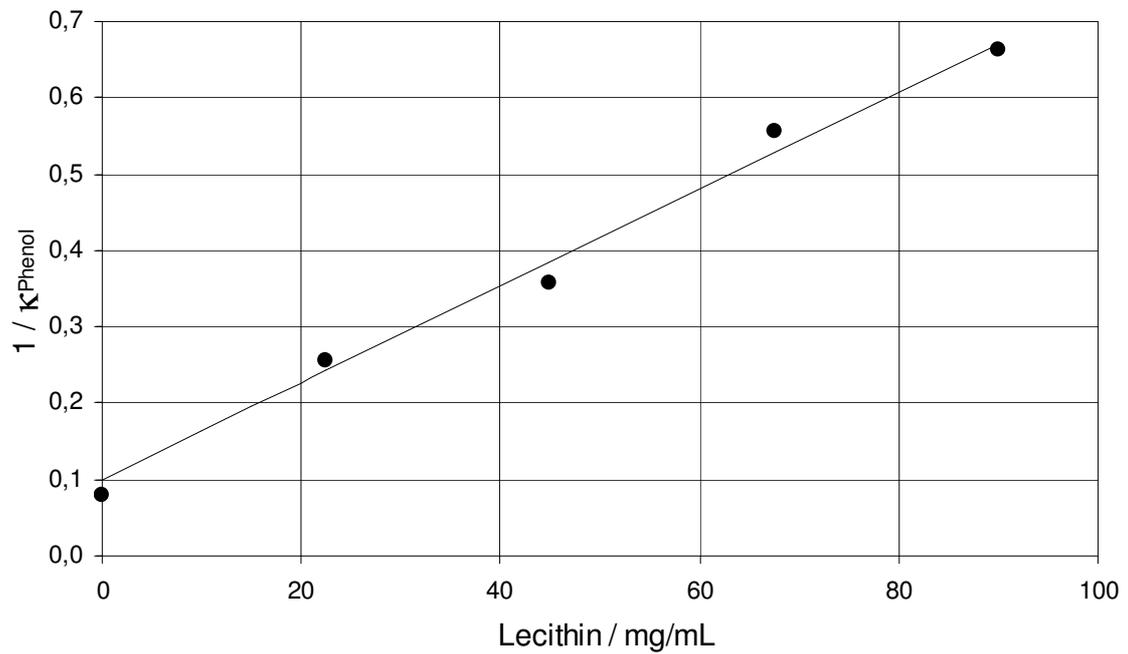


Abbildung 6.3.1.1-2 Auftragung des reziproken Verteilungskoeffizienten für das Abbauprodukt Phenol gegen die Lecithinkonzentration

Tabelle 6.3.1.1-1 Verteilungskoeffizienten des Phenylsalicylats und des Phenols in Abhängigkeit von der Lecithinkonzentration in der wässrigen Phase

Lecithingehalt / mg/mL	K_{PS}	K_{Phenol}
0	20308,7	12,6
22,5	161,3	4,1
45	83,9	2,7
67,5	62,3	1,9
90	46,9	1,5

Das Abbauprodukt Salicylsäure konnte mittels HPLC in der Ölphase über den gesamten Untersuchungszeitraum nicht nachgewiesen werden. Offensichtlich wird die Säure nicht detektierbar in die Ölphase verteilt.

Ein weiterer wichtiger Befund war, dass mit zunehmender Lecithinkonzentration in der wässrigen Phase der Abbau beschleunigt wurde. Dies ist aus der **Abb. 6.3.1.1-2** ersichtlich, in welcher die Konzentration des Abbauprodukts Phenol gegen die Zeit, für die einzelnen Lecithinkonzentrationen aufgetragen wurde. Zusätzlich zu der beschleunigten Abbaukinetik fällt hier auf, dass die Steigung einer jeden Kurve mit der Zeit zunimmt.

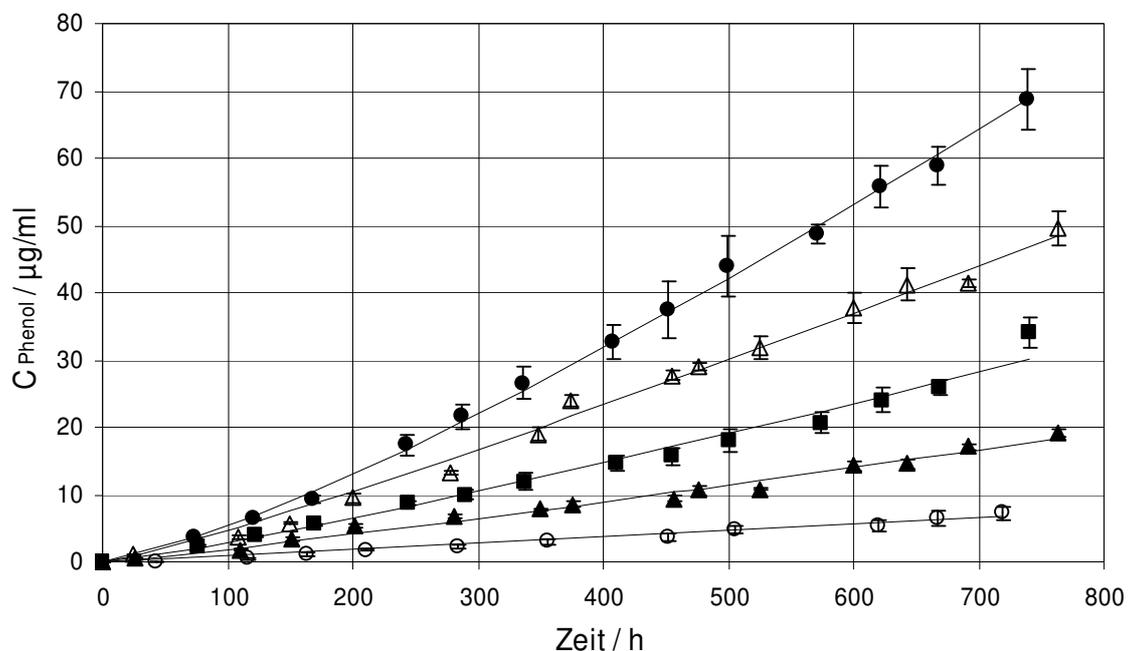


Abbildung 6.3.1.1-2 Konzentration des Abbauprodukts Phenol in Abhängigkeit der Zeit für verschiedene Lecithinkonzentrationen im Zweilagensystem Miglyol über Wasser. Die getesteten Lecithinkonzentrationen waren 0 mg/mL (○), 22,5 mg/mL (▲), 45 mg/mL (■), 67,5 mg/mL (△) und 90 mg/mL (●)

Dies könnte mit einer katalytischen Wirkung eines der Abbauprodukte erklärt werden, welches Leuenberger [102] auch schon für die Acetylsalicylsäure beschrieben hat. Der hydrolytische Abbau der Acetylsalicylsäure zeigt einen Kurvenverlauf, welcher den hier gezeigten Kurven ähnelt.

6.3.1.2 Ergebnisse mit Sojabohnenöl als Ölphase

Die qualitativen Aussagen im vorigen Kapitel zur Abbaukinetik im Zweilagensystem mit liposomalen Dispersionen wurden mit dem Sojaöl bestätigt. Quantitativ lagen die Werte hier jedoch deutlich über denen des Miglyols. Die Konzentrationszunahme des Phenylsalicylats in der wässrigen Phase war in Gegenwart von Lecithin höher und der Abbau lief schneller ab. (siehe **Abb. 6.3.1.2-1** und **Abb. 6.3.1.2-2**).

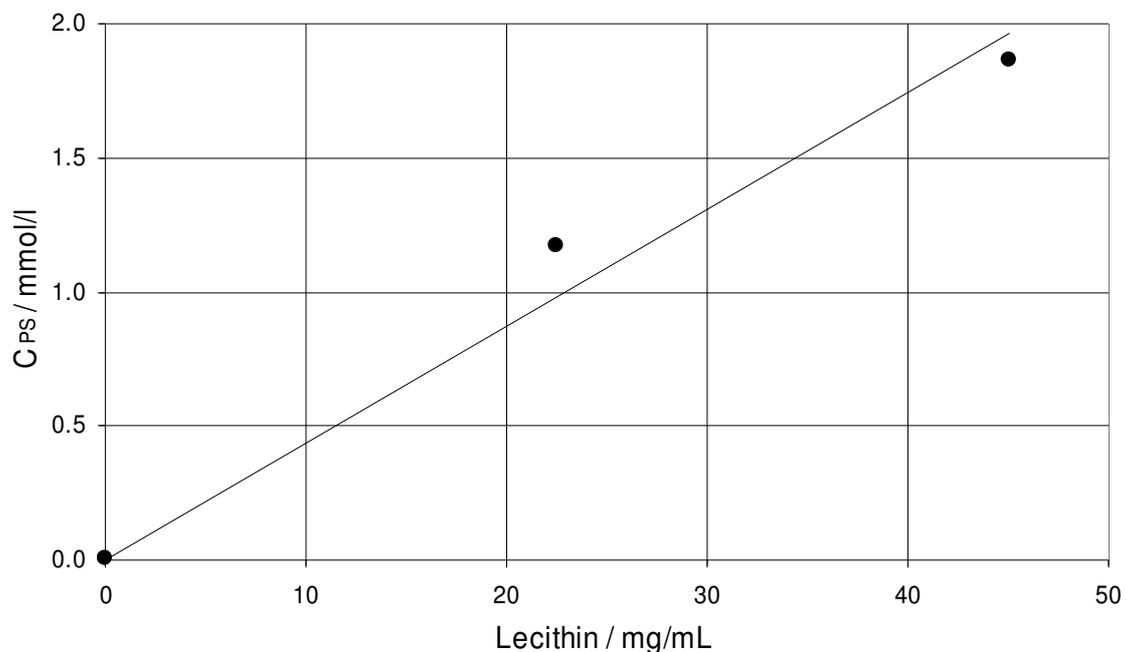


Abbildung 6.3.1.2-1 Konzentration des Phenylsalicylats gegen die Lecithinkonzentration in der wässrigen Phase des Zweilagensystems

Die für das Phenylsalicylat sowie für das Phenol berechneten Verteilungskoeffizienten sind in **Tab. 6.3.1.2-1** aufgelistet. Auch im Sojaöl war die Salicylsäure über den gesamten Versuchszeitraum nicht mittels HPLC zu detektieren.

Ein Vergleich der **Tab. 6.3.1.1-1** und **6.3.1.2-1** sowie der **Abb. 6.3.1.1-1** und **6.3.1.2-1** verdeutlicht, dass die Verteilung des Phenylsalicylats für 45 mg/mL Lecithin im Sojaölsystem der von 67,5 mg/mL Lecithin im Miglyolsystem gleicht. Die Verteilungskoeffizienten der beiden Öle stehen für alle Lecithinkonzentrationen wie auch für das lecithinfreie System etwa

im Verhältnis 1,5:1. Im Vergleich mit dem Sojaöl bietet das Miglyol offensichtlich einen attraktiveren Verteilungsraum.

Tabelle 6.3.1.2-1 Verteilungskoeffizienten des Phenylsalicylats und des Phenols in Abhängigkeit von der Lecithinkonzentration in der wässrigen Phase.

Lecithingehalt / mg/mL	K_{PS}	K_{Phenol}
0	13957,0	5,1
22,5	99,2	1,6
45	62,5	1,2

Auch das Phenol zeigt eine geringere Rückverteilung in das Öl. Die Verteilungskoeffizienten ergeben für alle Lecithinkonzentrationen einen geringeren Wert als für das Miglyolsystem. Das Verhältnis beträgt etwa 2,4:1 zugunsten des Miglyols. Bei der Auswertung der Ergebnisse im Kapitel 6.3.2 ist dies, im Hinblick auf eine katalytische Wirkung der Abbauprodukte, zu beachten. Der Verteilungskoeffizient des Phenols muss dabei berücksichtigt werden.

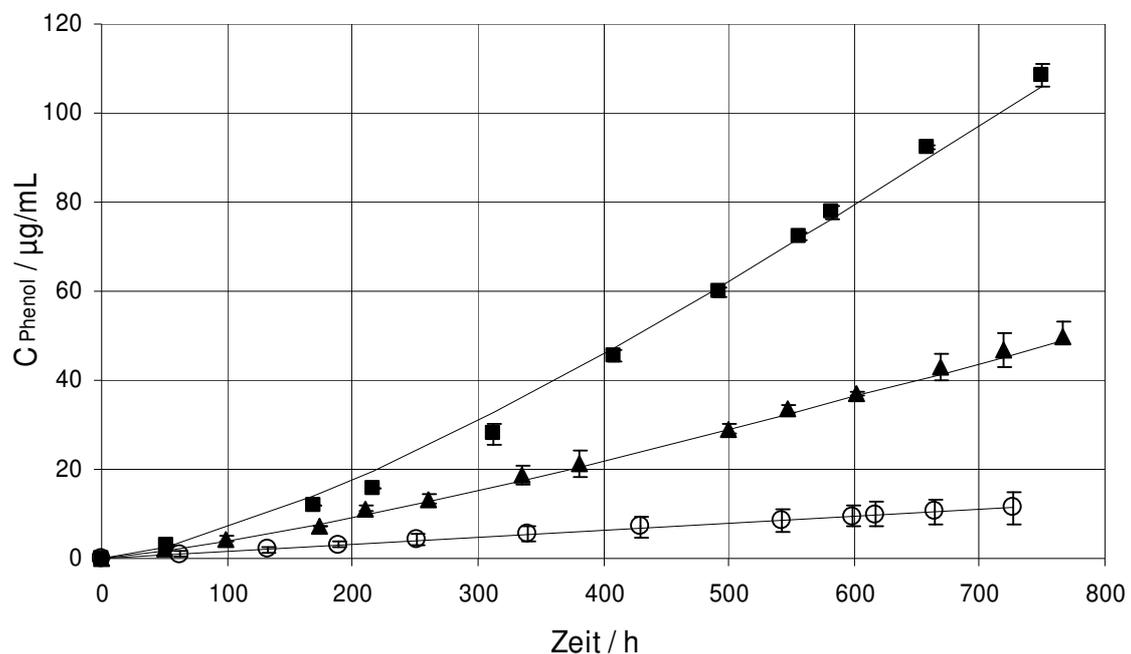


Abbildung 6.3.1.2-2 Konzentration des Abbauprodukts Phenol in Abhängigkeit der Zeit für verschiedene Lecithinkonzentrationen im Zweilagensystem Sojaöl über Wasser. Die getesteten Lecithinkonzentrationen waren 0 mg/mL (o), 22,5 mg/mL (▲) und 45 mg/mL (■)

Ferner wurde für das Sojaöl eine geringere Löslichkeit des Lecithins festgestellt (siehe Kapitel 9.3). Da das Lecithin im Zweilagensystem ebenso wie Wirkstoff und Abbauprodukt einer Verteilung zwischen der Öl- und der Wasserphase unterliegt, ist zu erwarten, dass der Liposomengehalt in der wässrigen Phase beim Sojaöl höher sein wird. Eine erhöhte Liposomenkonzentration wiederum bewirkt eine erhöhte Löslichkeit des Phenylsalicylats, wie aus den **Abb.6.3.1.1-1** und **6.3.1.2-1** ersichtlich ist.

6.3.2 Kinetik der Hydrolyse im Zweilagensystem

Die bisher im Zweilagensystem erhobenen Daten, sollen im Folgenden genutzt werden, um ein Kinetisches Modell zu entwickeln. Eine Interpretation ist mit einem einfachen Zwei-Phasen-System möglich. **Abb. 6.3.2-1** verdeutlicht den Ansatz.

Das Phenylsalicylat verteilt sich entsprechend seinem Verteilungskoeffizienten zwischen den beiden Phasen. In der wässrigen Phase muss das reversible Reaktionspaar aus Verseifung und Veresterung unter der Beteiligung der Abbauprodukte Phenol und Salicylsäure in Betracht gezogen werden. In der Ölphase konnte keine Hydrolyse nachgewiesen werden, so dass sie im Folgenden ausgeschlossen wird (siehe Kapitel 5).

Durch Verseifung bilden sich die Abbauprodukte Phenol und Salicylsäure, von denen sich nur das Phenol entsprechend seinem Verteilungskoeffizienten zwischen der Öl- und der Wasserphase verteilt.

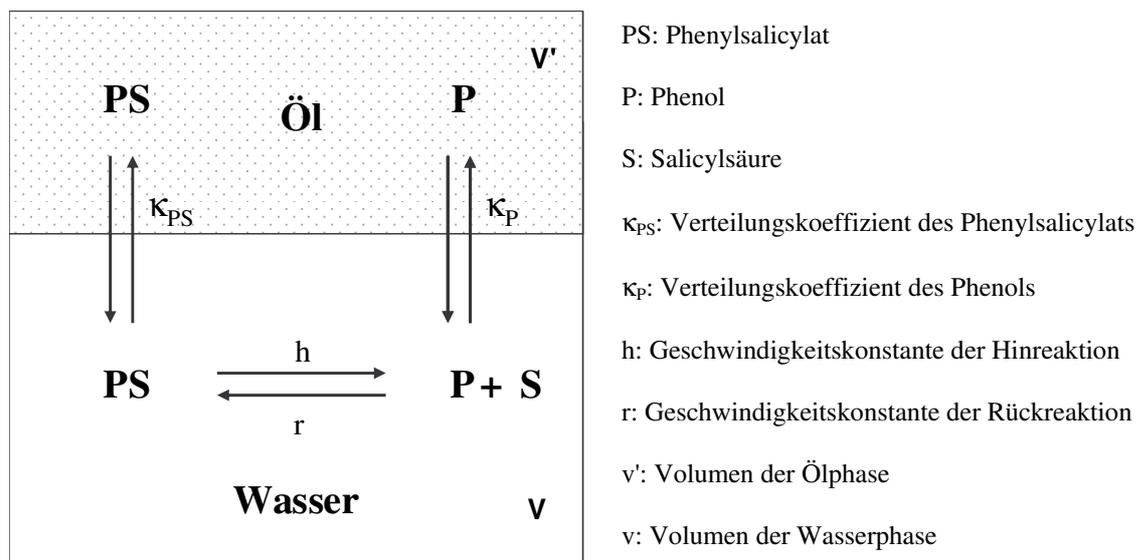


Abbildung 6.3.2-1 Zweiphasenmodell der hydrolytischen Zersetzung des Phenylsalicylats

Zu beachten ist, dass im kinetischen Modell molare Konzentrationen verwendet werden.

Die Bildungsgeschwindigkeit des Phenols im Gesamtsystem durch Hydrolyse wird durch Gleichung (20) beschrieben:

$$\frac{dX}{dt} = h [\text{PS}] - r [\text{S}] x \quad (20)$$

Dabei ist X die Gesamtphenolkonzentration, h die Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion, r die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion, $[\text{PS}]$ die Phenylsalicylatkonzentration im Wässrigen sowie $[\text{S}]$ die wässrige Salicylsäurekonzentration.

Die Salicylsäure und das Phenol werden in äquimolaren Mengen gebildet. Des Weiteren wird die Salicylsäure nur vernachlässigbar von der Ölphase aufgenommen. Mit einem Gesamtvolumen $V = v$ (Volumen der Wasserphase) + v' (Volumen der Ölphase) gilt die folgende Massenbilanz:

$$[\text{S}] v = X V \quad (21)$$

Im Gegensatz zur Salicylsäure verteilt sich das Phenol gemäß seines Verteilungskoeffizienten κ_p auf Wasser- und Ölphase:

$$\kappa_p = x'/x \quad (22)$$

Dabei ist x' die Phenolkonzentration in der Ölphase und x die Phenolkonzentration in der Wasserphase.

Für die Phenolkonzentrationen gilt damit die Massenbilanz

$$X V = x v + x \kappa_p v' \quad (23)$$

Eingesetzt in Gl. (20) ergibt dies Gleichung (24):

$$\frac{dX}{dt} = h [\text{PS}] - r \frac{V^2}{v(v + \kappa_p v')} X^2 \quad (24)$$

Die Hydrolyse wurde durch die Anwesenheit der Abbauprodukte verstärkt (siehe Kapitel 6.3.1.1). Dem lässt sich Rechnung tragen, indem man eine Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante h von der Phenolkonzentration in der wässrigen Phase einführt. Im kinetischen Modell repräsentiert das Phenol beide Abbauprodukte; denn Salicylsäure und Phenol sind nach Gleichung (21) miteinander verknüpft. In erster Näherung sei eine lineare Abhängigkeit angenommen:

$$h = h_0 + \eta x \quad (25)$$

h_0 ist die Geschwindigkeitskonstante in Abwesenheit von Phenol und η eine Proportionalitätskonstante. Gl. (20) wird damit zu:

$$\frac{dX}{dt} = h_0 [\text{PS}] + \eta [\text{PS}] \frac{V}{v + \kappa_p v'} X - r \frac{V^2}{v(v + \kappa_p v')} X^2 \quad (26)$$

Da die Phenylsalicylatkonzentration und die Volumen konstant bleiben, ist es angebracht, die Gleichung durch Einführung neuer Konstanten zu vereinfachen

$$H_0 = h_0 [\text{PS}] \quad (27)$$

$$H = \eta [\text{PS}] \frac{V}{v + \kappa_p v'} \quad (28)$$

$$R = r \frac{V^2}{v(v + \kappa_p v')} \quad (29)$$

So dass folgt:

$$\frac{dX}{dt} = H_0 + H X - R X^2 \quad (30)$$

Für die Lösung seien zwei Fälle unterschieden:

Die Rückreaktion ist vernachlässigbar	Die Rückreaktion ist nicht vernachlässigbar
$\frac{dX}{dt} = H_0 + H X \quad (31)$	$\frac{dX}{dt} = H_0 + H X - R X^2 \quad (32)$
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> $X = \frac{H_0}{H} (e^{Ht} - 1) \quad (33)$ </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> $X = \frac{A^- A^+ (1 - e^{-kt})}{A^- - A^+ e^{-kt}} \quad (34)$ </div>
	<p>mit $A^- = \frac{H}{2R} - a \quad (35)$</p>
	$A^+ = \frac{H}{2R} + a \quad (36)$
	$k = 2 a R \quad (37)$
	$a = \sqrt{\left(\frac{H}{2R}\right)^2 + \frac{H_0}{R}} \quad (38)$

Ein signifikanter Einfluss der Rückreaktion über eine Veresterung würde zu einer nachlassenden Steigung der Phenolkonzentrations-Zeit-Kurven führen. Dies ist aus den **Abb. 6.3.1.1-2** und **6.3.1.2-2** nicht ersichtlich. Aus diesem Grund ist es eine vertretbare Vereinfachung, die Rückreaktion für die gewählten Beobachtungszeiträume zu vernachlässigen.

Um dies zu überprüfen, fand für beide Fälle eine Anpassung der Gleichungen (33) und (34) mit Hilfe der kleinsten Fehlerquadrate an die Phenolkonzentrationszeitkurven statt. Die beiden Kurven lagen innerhalb der Messwertschwankungen und zeigten kaum Unterschiede im Verlauf. Damit ist gerechtfertigt, die Rückreaktion im kinetischen Modell unberücksichtigt zu lassen, und Gleichung (24) wandelt sich zu Gleichung (39).

$$\frac{dX}{dt} \approx h [\text{PS}] \quad (39)$$

Mit dem Wegfall der Rückreaktion erübrigt sich auch die Berücksichtigung der Folgereaktion von Salicylsäure, die im Kapitel 6.1.2.1 beschrieben wurde.

Im Hinblick auf die katalytische Wirkung des Abbauprodukts ist eine verfeinerte Näherung möglich, wenn man in Rechnung stellt, dass die Verstärkung der Hydrolyse durch das Abbauprodukt eine Sättigung erreichen sollte. Die Katalyse wird dann nicht durch den linearen Ansatz der Gleichung (25), sondern durch eine Gleichung der Form:

$$h = h_0 + h' (1 - e^{-kx}), \quad (40)$$

beschrieben, so dass für Gl. (39) folgt:

$$\frac{dX}{dt} = h_0[\text{PS}] + h' [\text{PS}](1 - e^{-kx}) \quad (41)$$

Mit Gl. (27) sowie

$$H' = h' [\text{PS}] \quad (42)$$

und

$$k' = k \frac{V}{v + \kappa_p v'} \quad (43)$$

wird Gl. (41) zu

$$\frac{dX}{dt} = H_0 + H' (1 - e^{-k'X}) \quad (44)$$

umgeformt. Die Lösung lautet:

$$X = \frac{1}{k'} \ln \frac{H' + H_0 e^{k'(H' + H_0)t}}{H' + H_0} \quad (45)$$

Auch diese Funktion wurde mittels der Methode der kleinsten Fehlerquadrate an die Messwerte angepasst. Im Vergleich mit den Anpassungen von Gleichung (33) und (34) ließen sich wieder keine signifikanten Abweichungen im Kurvenverlauf erkennen.

Die Abbaukinetik des Phenylsalicylats wird also von der Gleichung (33) befriedigend beschrieben. Die Anpassungen nach Gleichung (33) ergaben die Parameter H_0 und H , aus denen über die Gleichungen (27) und (28) die Konstanten h_0 und η berechnet wurden. Zusammen mit den Konzentrationen von Lecithin und Phenylsalicylat sind diese Werte für beide Zweilagensysteme in **Tab. 6.3.2-1** angegeben.

Tabelle 6.3.2-1 Die Parameter h_0 und η der Geschwindigkeitskonstanten $h = h_0 + \eta x$ sowie die Konzentrationen von Lecithin im Gesamtsystem sowie von Phenylsalicylat in der wässrigen Phase des Zweilagensystems

Ölphase	Lecithingehalt / mg/ml	[PS] / mmol/L	h_0 / h^{-1}	η / L/(mmol h)
Miglyol	0	5,75 E-03	1,76 E-02	1,34 E-01
	22,5	7,24 E-01	2,93 E-04	1,08 E-03
	45	1,39 E+00	2,14 E-04	1,01 E-03
	67,5	1,87 E+00	2,84 E-04	3,98 E-04
	90	2,49 E+00	2,83 E-04	3,93 E-04
Sojaöl	0	8,38 E-03	1,66 E-02	1,24 E-01
	22,5	1,18 E+00	4,30 E-04	7,28 E-04
	45	1,87 E+00	4,46 E-04	8,61 E-04

6.3.2.1 Geschwindigkeitskonstante h_0 in Abwesenheit einer Katalyse durch Phenol

Wie in den Kapiteln 6.3.1.1 und 6.3.1.2 beschrieben, nimmt die Hydrolysegeschwindigkeit mit steigender Lecithinkonzentration im Zweilagensystem zu. Dieser Anstieg resultiert nicht aus einer erhöhten Basis-Geschwindigkeitskonstanten h_0 , sondern vielmehr aus einer erhöhten Phenylsalicylatkonzentration in der wässrigen Phase; verursacht durch die Liposomen. Die h_0 -Werte für die vier unterschiedlichen Lecithinkonzentrationen mit Miglyol als Öl schwankten im Wesentlichen zwischen 2 bis $3 \cdot 10^{-4} h^{-1}$ und zeigten keinerlei Tendenzen mit

zunehmender Lecithinkonzentration. Die Versuche mit dem Sojabohnenöl ergaben im Vergleich zum Miglyol höhere h_0 -Werte zwischen 4,3 und $4,5 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$.

Die Resultate belegen, dass die Hydrolyse in dem Zweilagensystem einer Kinetik nullter Ordnung folgt. Die Kinetik ist nur abhängig von der Konzentration des hydrolyseempfindlichen Stoffes in der wässrigen Phase, die in den untersuchten Systemen über den Beobachtungszeitraum konstant bleibt. Verglichen mit dem Zweiphasensystem ohne Lecithin, ist für beide Öle jedoch auffällig, dass dessen h_0 -Werte um fast zwei Zehnerpotenzen größer sind als der Wert für die Dispersionen. Dies bedeutet, dass das Lecithin zwar die Konzentration des Phenylsalicylats in der wässrigen Phase erhöht, jedoch nur ein kleiner Teil dieser Erhöhung auch für eine Beschleunigung der Reaktionsrate nullter Ordnung bei der Hydrolyse sorgt. Wahrscheinlich ist der beträchtlichste Teil des Phenylsalicylats derart in den Liposomen inkorporiert, dass es vor einer Hydrolyse geschützt ist. Nur ca. 1,5 % der erhöhten Phenylsalicylatkonzentration im Miglyolsystem scheinen mit Wasser in Kontakt zu treten und so einer Hydrolyse zugänglich zu werden. Im Sojaöl beträgt der Prozentsatz etwa 2,5 % Diese Anteile errechnen sich aus den Verhältnissen der h_0 -Werte mit und ohne Lecithin. Angenommen nämlich, in Gleichung (27) ändere sich mit der Lecithinzugabe nicht h_0 , sondern von der Konzentration [PS] befinde sich nur der Teil [PS]' außerhalb der Liposomen, dann gilt für den scheinbaren Wert h_0' in Gegenwart der Liposomen:

$$h_0' [\text{PS}] = h_0 [\text{PS}]' \quad (46)$$

und

$$[\text{PS}]'/[\text{PS}] = h_0'/h_0 \quad (47)$$

Diese Deutung macht auch die höheren h_0 -Werte für das Sojaölsystem nach Lecithinzugabe im Vergleich mit dem Miglyolsystem verständlich. Das Sojaöl zeigte bei gleichen Lecithinkonzentrationen höhere Phenylsalicylatkonzentrationen. Im Durchschnitt liegt das Verhältnis von Phenylsalicylat- zu Lecithinkonzentration beim Sojaöl um den Faktor 1,5 höher (siehe Kapitel 6.3.1.2). Nimmt man nun eine Verteilung zwischen Wasser und Liposomen an, so ist es durchaus möglich, dass bei höherer Konzentration das Phenylsalicylat nicht im gleichen Verhältnis in die Liposomen aufgenommen wird wie im Miglyolsystem, weil es zu einer Sättigung der Liposomen kommt. Folglich bleibt ein höherer Anteil der Phenylsalicylatkonzentration der Hydrolyse unterworfen, was im kinetischen Modell durch einen höheren h_0 -Wert zum Ausdruck kommt.

Eine derartige Sättigung wird später bei der Diskussion der Proportionalitätskonstanten η aus Gleichung (27) bestätigt. Die Werte dieser Konstanten, die eine Katalyse durch eines der Abbauprodukte berücksichtigt, sollen im Kapitel 7.1 in Zusammenhang mit den dort ermittelten Daten interpretiert werden.

6.4 Prüfung verschiedener Öle

Um den Befund zu erhärten, dass die Abbaukinetik einer nullten Ordnung folgt, sollten verschiedene Öle im Zweiphasensystem ohne Emulgatorzugabe untersucht werden. Wie schon in der Problemstellung diskutiert, konnte N. Pongcharoenkiat [6] nachweisen, dass die Hydrolysegeschwindigkeit mit abnehmenden Verteilungskoeffizienten, also einer höheren Wirkstoffkonzentration im Wässrigen, zunahm. Er variierte den Verteilungskoeffizienten über die Nutzung verschiedene Parabene als Modellsubstanzen. In dieser Arbeit jedoch sollte der Verteilungskoeffizient über die unterschiedlichen Löslichkeiten der Modellsubstanz in den Ölen variiert werden. Mittels der Gleichung (33) und den Definitionen für H_0 und H sollen wieder die Konstanten h_0 und η aus den Zeitkurven errechnet und die Tauglichkeit des Modells überprüft werden. Zusätzlich floss die Viskosität des Öls in die Betrachtung mit ein, weil diese sich auf das Diffusionsverhalten des gelösten Arzneistoffes auswirkt.

6.4.1 Durchführung

Der apparative Aufbau und die Versuchsdurchführung folgten der Beschreibung im Kapitel 6.1.1. Anwendung fand die Kristallisierschale mit dem Durchmesser von 13,6 cm. Einzig die Ölphase wurde variiert.

Untersucht wurden die Öle Rizinusöl, Olivenöl und das Rapsöl. Die Ergebnisse zu Miglyol und Sojaöl lagen schon vor und wurden zum Vergleich mit herangezogen. Die dynamische Viskosität der Öle wurde mit einem Mikroviskosimeter bestimmt (siehe **Tab. 6.4.2.1-1**).

Der Verteilungskoeffizient des Phenylsalicylats sowie des Phenols zwischen der isotonisierten Pufferlösung und dem Öl sollen bei der Diskussion Betrachtung finden. Diese wurden im Vorfeld nicht ermittelt. Da aus der Öl-, sowie der Wasserphase Proben gezogen werden, ergibt sich der Verteilungskoeffizient sehr elegant aus den bei der Versuchsdurchführung erhobenen Daten. **Tab. 6.4.2.2-1** zeigt die so erhaltenen Verteilungskoeffizienten.

6.4.2 Ergebnisse und Diskussion

6.4.2.1 Viskosität der Öle

Die Diffusion vom Öl in die Kompartimente der Emulsion, in denen ein Abbau einer hydrolyseempfindlichen Substanz stattfindet, trägt entscheidend zur Wirkstoffstabilität bei. Das erste Fick'sche Gesetz (48) beschreibt die lineare Diffusion aufgrund der Brownschen Molekularbewegung eines Moleküls. Hiernach ist der Massenfluss (dm/dt) durch eine Querschnittsfläche (F) pro Zeit proportional dem Konzentrationsgradienten (dc/dx).

$$-\frac{dm}{dt} = D F \frac{dc}{dx} \quad (48)$$

Die Proportionalitätskonstante D , der Diffusionskoeffizient, steht in Abhängigkeit zum Teilchenradius (r) und der Viskosität (η) der Lösung (siehe Gleichung (49)). In diese Gleichung fließen auch die absolute Temperatur (T) sowie die Boltzmann-Konstante (w) ein.

$$D = \frac{w T}{6 \pi r \eta} \quad (49)$$

Eine hohe Viskosität führt nach dieser Gleichung zu einem verlangsamten Massenfluss.

Sollte dies in den Emulsionssystemen mit verschiedenen Ölen eine Auswirkung zeigen, so wäre eine Verarmung der Phenylsalicylatkonzentration im Wässrigen zu beobachten, da ein Konzentrationsverlust durch die Hydrolyse nicht sofort durch einen Nachtransport aus der Ölphase kompensiert würde.

Tab. 6.4.2.1-1 zeigt die ermittelten Viskositäten der untersuchten Öle. Das Rizinusöl besitzt die mit Abstand höchste Viskosität. Ein Einfluss der Viskosität käme hier am deutlichsten zum Ausdruck.

Tabelle 6.4.2.1-1 Viskosität der untersuchten Öle

Öl	dynamische Viskosität / mPas
Miglyol	27,2
Rizinusöl	1090,0
Olivenöl	78,0
Rapsöl	70,6
Sojabohnenöl	62,0

Deshalb wird der Übersichtlichkeit halber in **Abb. 6.4.2.1-1** nur der Konzentrations-Zeit-Verlauf des Rizinusöls mit dem des Miglyols verglichen. Die Zeit-Verläufe der anderen Öle zeigen ein qualitativ ähnliches Bild.

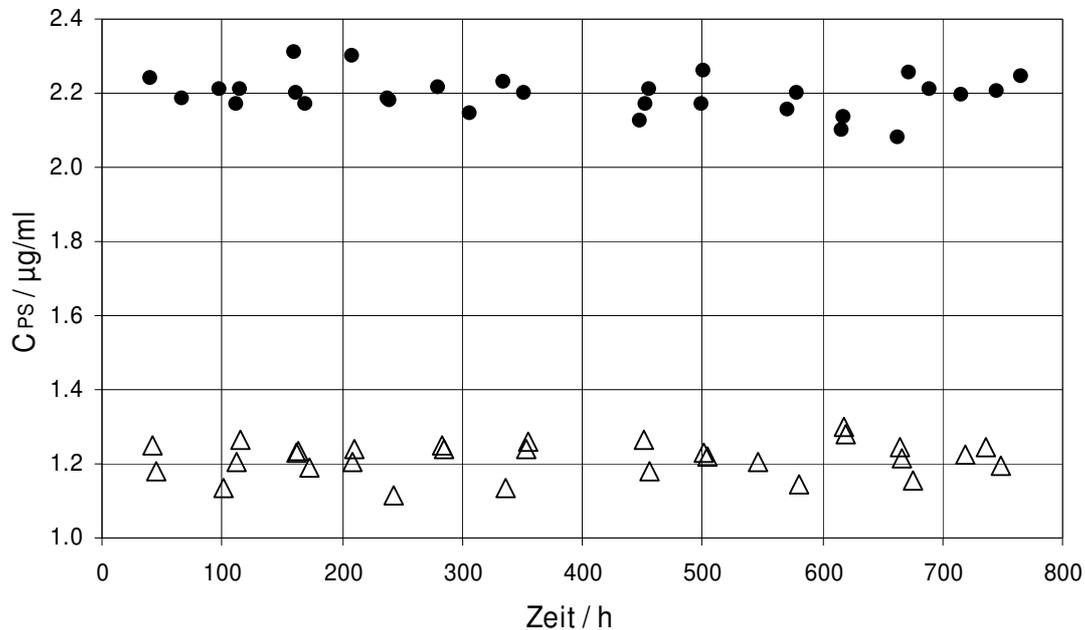


Abbildung 6.4.2.1-1 Phenylsalicylatkonzentrationen gegen die Zeit in den Ansätzen mit den Ölen Rizinusöl (●) und Miglyol (Δ)

In **Abb. 6.4.2.1-2** sind die Durchschnittskonzentrationen des Phenylsalicylats über den gesamten Zeitverlauf wiedergegeben. Auf Basis dieser Konzentrationen wurden die Verteilungskoeffizienten berechnet.

Aus **Abb. 6.4.2.1-1** ist ersichtlich, dass es trotz des großen Unterschiedes in den Viskositäten auch beim Rizinusöl zu keiner Verarmung des Phenylsalicylats in der wässrigen Phase kommt. Der Massenfluss des Phenylsalicylats vom Öl ins Wässrige ist weiterhin schnell genug, den Substanzverlust durch die Hydrolyse auszugleichen. Eine Beeinflussung der Kinetik aufgrund der erhöhten Viskosität ist bei den untersuchten Ölen nicht zu erwarten.

Ob eine weitere Erhöhung der Viskosität durch das Lösen von Carnaubawachs in Miglyol zu einer Abnahme des Massenflusses und im Folgenden zu einem verlangsamten Abbau führt, ist Gegenstand der Untersuchungen im Kapitel 7.4.

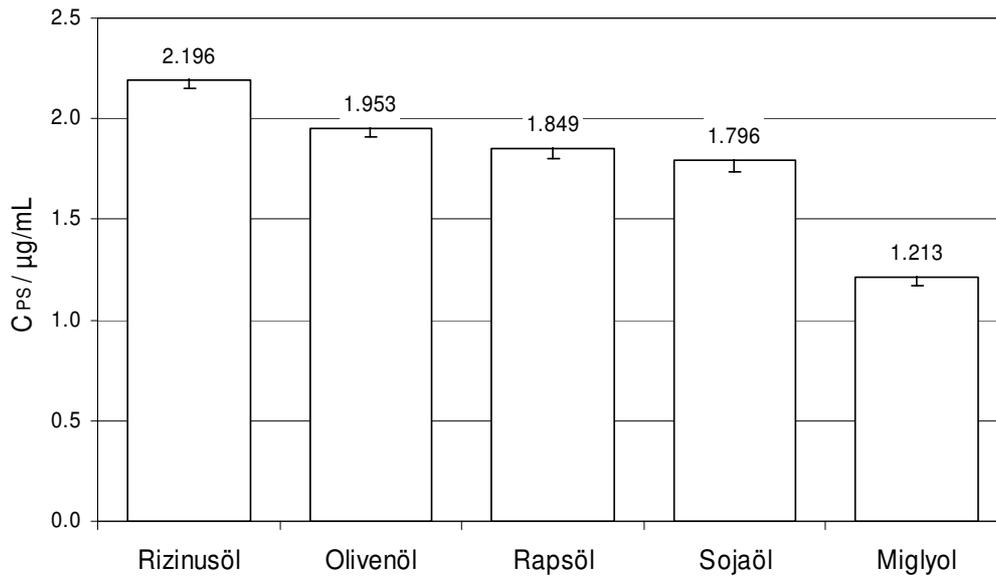


Abbildung 6.4.2.1-2 Durchschnittskonzentration des Phenylsalicylats im Wässrigen über den gesamten Untersuchungszeitraum für die jeweiligen Ölphasen

6.4.2.2 Einfluss des Verteilungskoeffizienten auf die Abbaukinetik nullter Ordnung

Im Vergleich zu dem Miglyol zeigten alle anderen Öle einen geringeren Verteilungskoeffizienten (siehe **Tab. 6.4.2.2-1**).

Wie es zu erwarten war, wurde ein erniedrigter Verteilungskoeffizient, also eine höhere Konzentrationen des Phenylsalicylats im Wässrigen von einem beschleunigten Abbau und somit einer schnelleren Zunahme der Phenolkonzentration begleitet.

Tabelle 6.4.2.2-1 Verteilungskoeffizienten des Phenylsalicylats und des Phenols zwischen der isotonierten Pufferlösung und den verschiedenen Ölen

Wasserphase	Ölphase	K_{PS}	K_{Phenol}
Isotonierte Pufferlösung	Miglyol	$20\ 698 \pm 765$	$12,2 \pm 0,5$
	Rizinusöl	$11\ 326 \pm 118$	$18,4 \pm 1,5$
	Olivenöl	$12\ 811 \pm 230$	$5,0 \pm 0,5$
	Rapsöl	$13\ 553 \pm 331$	$5,3 \pm 0,4$
	Sojabohnenöl	$13\ 957 \pm 392$	$5,1 \pm 0,2$

Dies findet Ausdruck in den Konzentrations-Zeit-Kurven des Abbauprodukts Phenol (siehe **Abb. 6.4.2.2-1**).

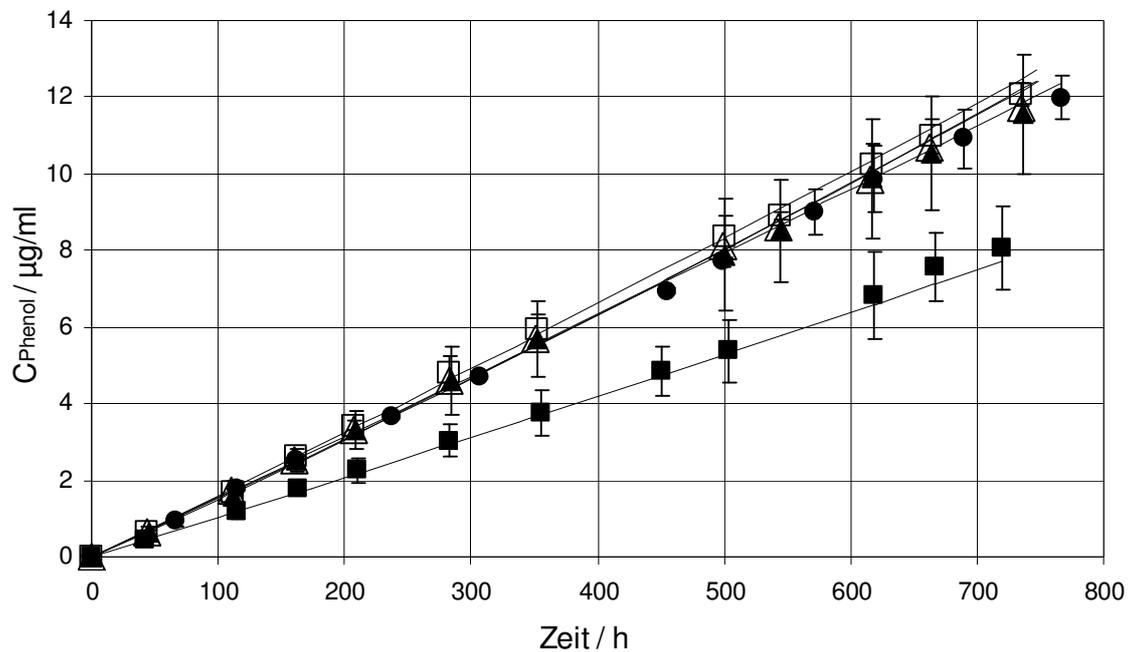


Abbildung 6.4.2.2-1 Messpunkte und Ausgleichskurven der Phenolkonzentrationen gegen die Zeit für die Ansätze mit den Ölen Miglyol (■), Rizinusöl (●), Olivenöl (Δ), Rapsöl (□) und Sojaöl (▲)

Mit Hilfe der Methode der kleinsten Fehlerquadrate wurde Gleichung (33) an die ermittelten Zeitverläufe angepasst, um über die Gleichungen (27) und (28) für H_0 und H die Konstanten h_0 und η zu errechnen. Die so erhaltenen Werte sind in **Tab. 6.4.2.2-2** aufgelistet.

Eine gute Übereinstimmung der errechneten Kurve mit den Messwerten ist aus **Abb. 6.4.2.2-1** ersichtlich. Die Ausgleichskurven lagen für den gesamten Beobachtungszeitraum innerhalb der Messwertschwankungen.

Tabelle 6.4.2.2-2 Die Parameter h_0 und η der Geschwindigkeitskonstanten h sowie die Phenylsalicylatkonzentration im Wässrigen für das Zweilagensystem

Ölphase	[PS] / mmol/L	h_0 / h^{-1}	η / L/(mmol·h)
Miglyol	5,75 E-03	1,76 E-02	1,34 E-01
Rizinusöl	9,36 E-03	1,65 E-02	1,20 E-01
Olivenöl	9,12 E-03	1,78 E-02	1,19 E-01
Rapsöl	8,63 E-03	1,61 E-02	1,32 E-01
Sojaöl	8,38 E-03	1,66 E-02	1,24 E-01

Mit Werten zwischen $1,6$ und $1,8 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ für die Konstante h_0 liegen alle Öle dicht beieinander und zeigen damit, dass die unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten nur durch die unterschiedlichen wässrigen Phenylsalicylatkonzentrationen bedingt sind. Da diese über die Beobachtungszeit konstant bleiben, bestätigt sich die Kinetik nullter Ordnung im Zweilagensystem. Das Öl legt die Abbaugeschwindigkeit über den Verteilungskoeffizienten fest.

Auch die Proportionalitätskonstante η , welche die Geschwindigkeitskonstante mit der Konzentration des katalytisch wirkenden Abbauprodukts in Verbindung setzt, zeigt eine geringe Schwankung zwischen den Werten $1,2$ und $1,3 \cdot 10^{-1} \text{ L}/(\text{mmol} \cdot \text{h})$. Die katalytische Wirkung wurde also durch das Öl nicht beeinflusst, sondern war einzig von der Konzentration des Abbauprodukts abhängig.

7. EMULSIONSSYSTEME

Anhand der Untersuchungen an den Einphasen- sowie dem Zweilagensystem wurden wichtige Ergebnisse gewonnen, welche für die Interpretation der kinetischen Daten von Emulsionssystemen im Folgenden notwendig sind. Insbesondere das kinetische Modell aus dem Kapitel 6.3.2 soll zur Beschreibung herangezogen werden.

Unterschiedlich zusammengesetzte Emulsionen sollten Betrachtung finden, um Aussagen treffen zu können, inwieweit einzelne Rezepturbestandteile die physikochemischen Parameter einer Emulsion verändern und welche Auswirkungen dies auf die Abbaukinetik eines hydrolyseempfindlichen Arzneistoffs zeigt. Dabei bewegten sich die Variationsmöglichkeiten der Emulsionsrezeptur in folgenden Grenzen:

Da ein konstanter pH-Wert der Lösung erforderlich war, wurde die wässrige Phase mit Phosphat gepuffert. Die Lagerstabilität der Emulsionen war hierdurch eingeschränkt, da über den Elektrolytzusatz das Zetapotential erniedrigt wurde. Dies hatte eine Reduktion der elektrostatischen abstoßenden Kräfte zur Folge und machte eine Annäherung und hierüber eine Koaleszens der Öltröpfchen wahrscheinlicher (siehe Kapitel 3.3.2). Für den Beobachtungszeitraum von nur vier Wochen erwiesen sich die Emulsionen, bis auf eine Ausnahme, allerdings als hinreichend stabil.

Eine zusätzliche Einschränkung bei der Auswahl der stofflichen Zusammensetzung einer Emulsion stellte der parenterale Applikationsweg dar. Hier war insbesondere die Unbedenklichkeit der Bestandteile zu berücksichtigen, um toxische Wirkungen aufgrund des Arzneistoffträgers weitestgehend auszuschließen.

Die Auswahl der im Folgenden untersuchten Emulsionen trug diesen Vorgaben Rechnung.

7.1 Einfluss der Grenzfläche und der Emulgatorkonzentration auf die Hydrolysegeschwindigkeit

Der Einfluss der Grenzfläche wurde schon im Zweilagensystem untersucht. Das Ergebnis war eine gleich bleibende Abbaukinetik für alle untersuchten Grenzflächen (siehe Kapitel 6.1). Weil die untersuchten Grenzflächen sehr viel kleiner waren, als die Grenzflächen in Emulsionssystemen, sollte dieser Parameter hier ein weiteres Mal Betrachtung finden.

Zu diesem Zweck wurden die Grenzflächen über die Tröpfchengrößen der Emulsionen variiert. Je kleiner die Tropfchengröße ist, desto größer ist die hieraus resultierende

Grenzfläche. Diese Variation konnte über unterschiedliche Homogenisationsbedingungen sowie geänderte Emulgatorkonzentrationen erreicht werden.

7.1.1 Durchführung

Für die Öle Miglyol und Sojaöl wurden Emulsionen mit einem Emulgatoranteil von 0,6, 1,2 und 2,4 % hergestellt. Die Rezeptur der untersuchten Emulsionen ist in **Tab. 7.1.1-1** wiedergegeben. Es wurden von jeder Emulsion 250 mL hergestellt.

Als wässrige Phase diente die isotonierte Pufferlösung, welche auch bei den Untersuchungen am Zweilagensystem eingesetzt wurde (siehe Kapitel 6).

Mit dem Natriumoleat wurde in sehr geringer Konzentration (0,03 %) ein Ko-Emulgator eingesetzt, welcher in der Lage ist, die physikalische Stabilität einer Emulsion zu erhöhen [120, 139, 165]. Dies wurde genutzt, da, wie einleitend erwähnt, als wässrige Phase ein Puffersystem Anwendung fand, welches über die hohen Elektrolytkonzentrationen das Zetapotential erniedrigt.

Tabelle 7.1.1-1 Rezeptur der untersuchten Emulsionen mit unterschiedlichen Emulgatoranteilen und 10 % Miglyol bzw. Sojaöl als Ölkomponente. Die Werte sind für ein Gesamtvolumen von 100 mL angegeben

Komponente	Emulsion 1	Emulsion 2	Emulsion 3
Phenylsalicylat	250 mg	250 mg	250 mg
Miglyol bzw. Sojaöl	10 mL	10 mL	10 mL
Lipoid E80 [®]	600 mg	1200 mg	2400 mg
Natrium Oleat	30 mg	30 mg	30 mg
Isotonisierter Phosphatpuffer pH 7,4	90 mL	90 mL	90 mL

Zur Variation der Partikelgrößen wurde von den im Kapitel 3.1.3.2 beschriebenen Herstellungsparametern bei der Homogenisation abgewichen. Die angewandten Drucke sowie die Zyklenzahlen sind in **Tab. 7.1.1-2** dargestellt.

Durch die geringeren Drucke bei einem Lecithingehalt von 0,6 % gelang es, mit der Emulsion 1, im Vergleich zu den anderen Emulsionen, große Partikel zu produzieren. Zyklenzahl und Drucke waren für die Emulsionen 2 und 3 gleich. Die Partikelgröße wurde allein über den Lecithingehalt reguliert. Die Homogenisationstemperatur lag in allen Fällen bei 40 °C.

Tabelle 7.1.1-2 Herstellungsparameter der Hochdruckhomogenisation in Abhängigkeit vom Lecithingehalt der Emulsionen. Die angegebenen Werte waren für die zwei untersuchten Öle gleich

Emulsion	Druck	800 bar	600 bar	400 bar
	Lecithin Gehalt	Zyklen	Zyklen	Zyklen
1	0,6 %	/	3	3
2	1,2 %	2	2	2
3	2,4 %	2	2	2

Die Emulsionen wurden über einen Zeitraum von vier Wochen bei Raumtemperatur gelagert. Werkstäglich wurde der pH-Wert kontrolliert.

Als Maß für die physikalische Stabilität der untersuchten Emulsionen dienten sowohl die mittels PCS und LD bestimmte Partikelgröße, als auch das Zetapotential zu Beginn und am Ende der Beobachtungsperiode von vier Wochen. Zusätzlich wurde das Aussehen der Emulsionen visuell überprüft, um etwaige „Fettaugen“ zu erkennen, welche eine Phasentrennung anzeigen. Trat dieser Fall ein, so wurde die Emulsion ein weiteres Mal homogenisiert.

Die chemische Stabilität des Phenylsalicylats wurde wie bisher über die HPLC-Gehaltsbestimmung des Abbauprodukts Phenol und die Auftragung der Phenolkonzentrations-Zeit-Kurven geprüft.

7.1.2 Physikalische Stabilität der Rezepturen

Die Stabilitätsprüfung bei beiden verwendeten Ölen ergab, dass die Emulsionen 2 und 3 über den Untersuchungszeitraum hinweg stabil waren. Es kam zu keiner auffälligen Größenzunahme der Partikel (siehe **Tab. 7.1.2-1**). Auch war keine Koaleszens zu erkennen. Einzig die Emulsion 1 zeigte bei beiden Ölen eine Phasentrennung. Deswegen musste innerhalb des Untersuchungszeitraums zwei weitere Male homogenisiert werden. Offensichtlich reichte der geringe Lecithingehalt nicht aus, die Emulsion zu stabilisieren. Wie aus der **Tab. 7.1.2-1** ersichtlich ist, war es jedoch möglich, die Partikelgrößen nach der erneuten Homogenisation weitestgehend konstant zu erhalten.

Tabelle 7.1.2-1 Partikelcharakterisierung von Miglyol- und Sojaöl-Emulsionen mit unterschiedlichen Lecithingehalten zu Beginn und am Ende der Testperiode

Miglyol

Zu Beginn

	Methode	Emulsion 1			Emulsion 2			Emulsion 3		
		P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
PCS	Z-average / nm	362	353	355	222	202	212	150	160	154
	PI	0,22	0,20	0,33	0,11	0,12	0,08	0,08	0,08	0,10
LD	D50 / μm	0,416	0,400	0,394	0,325	0,240	0,314	0,205	0,208	0,201
	D99 / μm	1,638	1,234	1,615	0,732	0,676	0,701	0,536	0,553	0,515
Zetapotential /mV		-41,7	-43,0	-42,7	-44,7	-43,8	-42,8	-42,9	-44,0	-44,2

Nach 4 Wochen

PCS	Z-average / nm	354	363	347	226	214	227	158	164	161
	PI	0,42	0,29	0,37	0,15	0,17	0,22	0,1	0,12	0,12
LD	D50 / μm	0,386	0,445	0,384	0,398	0,276	0,324	0,388	0,259	0,272
	D99 / μm	1,575	1,258	1,412	1,246	0,717	1,057	0,686	0,657	0,629
Zetapotential /mV		-42,2	-41,4	-44,7	-44,13	-44,9	-45,1	-42,7	-43,5	-45,0

Sojaöl

Zu Beginn

	Methode	Emulsion 1			Emulsion 2			Emulsion 3		
		P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
PCS	Z-average / nm	345	363	380	196	195	186	174	172	172
	PI	0,22	0,20	0,33	0,13	0,15	0,12	0,16	0,08	0,12
LD	D50 / μm	0,498	0,479	0,568	0,270	0,266	0,244	0,274	0,246	0,234
	D99 / μm	1,562	1,554	1,685	0,705	0,604	0,563	0,724	0,676	0,647
Zetapotential /mV		-57,7	-57,5	-58,5	-55,9	-55,4	-54,5	-55,4	-55,8	-55,2

Nach 4 Wochen

PCS	Z-average / nm	360	377	375	212	216	217	170	170	171
	PI	0,35	0,31	0,31	0,22	0,22	0,24	0,07	0,09	0,08
LD	D50 / μm	0,477	0,538	0,557	0,326	0,374	0,342	0,225	0,220	0,229
	D99 / μm	1,500	1,565	1,543	1,085	1,007	1,048	0,633	0,614	0,658
Zetapotential /mV		-56,4	-58,1	-56,7	-57,5	-56,2	-57,9	-58,2	-58,8	-56,5

7.1.3 Chemische Stabilitätsdaten

Aus den Konzentrations-Zeit-Kurven des Abbauprodukts Phenol in den **Abb. 7.1.3-1** und **2** ist ersichtlich, dass der Abbau des Phenylsalicylats mit zunehmendem Lecithingehalt und abnehmender Tröpfchengröße zunahm.

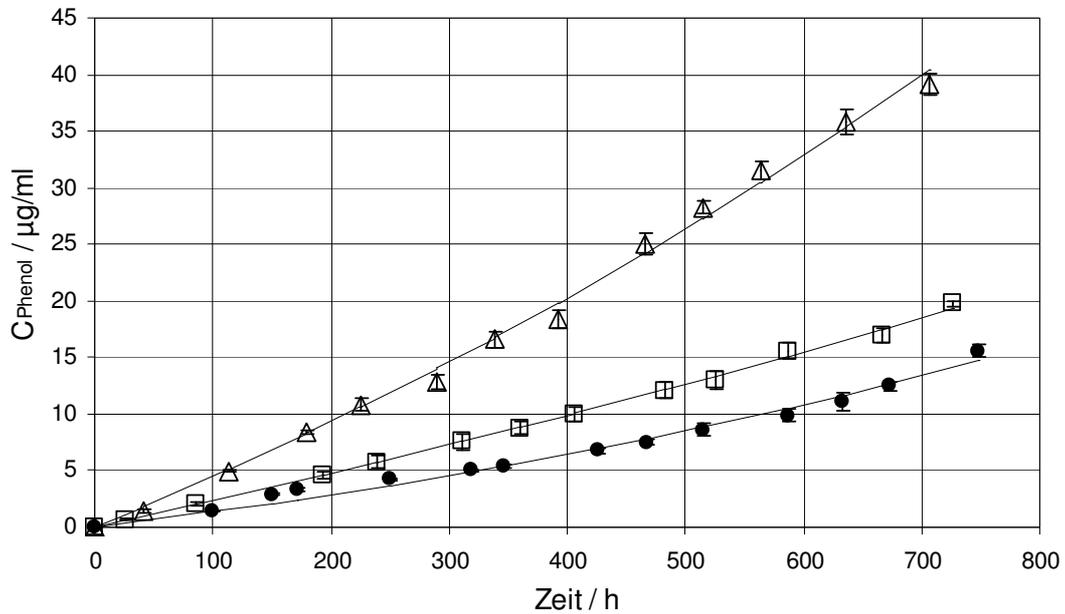


Abbildung 7.1.3-1 Ausgleichskurven und ermittelte Konzentrationen des Abbauprodukts Phenol gegen die Zeit. Die Lecithingehälter waren 0,6 % (●), 1,2 % (□) und 2,4 % (Δ); das Öl Miglyol

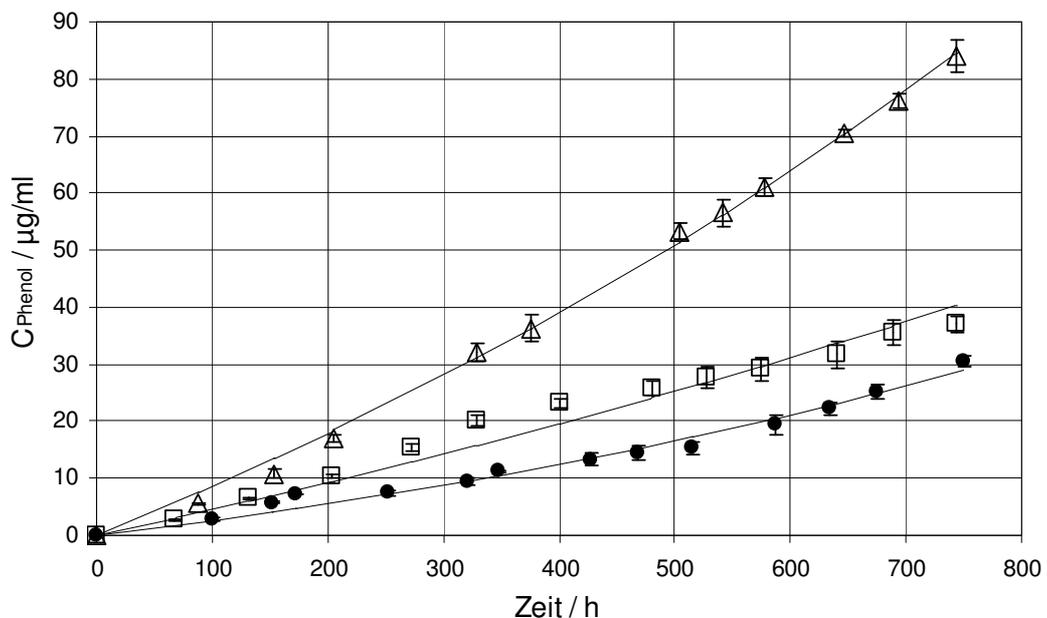


Abbildung 7.1.3-2 Ausgleichskurven und ermittelte Konzentrationen des Abbauprodukts Phenol gegen die Zeit. Die Lecithingehälter waren 0,6 % (●), 1,2 % (□) und 2,4 % (Δ); das Öl Sojaöl

7.1.3.1 Grenzfläche der Emulsionen

Zur weiteren Interpretation der Ergebnisse ist es erforderlich, die Grenzfläche (A) der einzelnen Emulsionen zu bestimmen.

Wie aus den Daten der **Tab. 7.1.2-1** hervorgeht, kam es, besonders in den Miglyol-Emulsionen, zu einer deutlichen Abnahme der Tröpfchengröße mit zunehmendem Lecithingehalt. Über das bekannte Ölvolumen (V_o) aller Emulsionen von 25 mL ist anhand der Partikelgröße die Partikelanzahl (N_d) zu berechnen. Zur Vereinfachung wurde eine einheitliche Tröpfchengröße mit dem Durchmesser des Z-average-Werts (z_{av}) aus der Größenbestimmung mittels PCS angenommen.

$$N_d = \frac{6 V_o}{\pi z_{av}^3} \quad (50)$$

Nach Gleichung (51) kann so die Grenzfläche (A) berechnet werden:

$$A = N_d \pi z_{av}^2 \quad (51)$$

Mit dem bekannten Gesamtvolumen (V_t) einer Emulsion und der Substitution von N_d in der Gleichung (51) durch Gleichung (50), ergibt sich Gleichung (52) für die spezifische Grenzfläche (A_V) einer Emulsion:

$$A_V = \frac{6 V_o}{z_{av} V_t} \quad (52)$$

Zum Vergleich der kinetischen Daten werden die Partikelgrößen herangezogen, welche unmittelbar nach der Herstellung ermittelt wurden. Die damit errechneten spezifischen Grenzflächen der Emulsionen sind in **Tab. 7.1.3.1-1** wiedergegeben.

Tabelle 7.1.3.1-1 Spezifische Grenzflächen der untersuchten Emulsionen

Miglyol

	Emulsion 1			Emulsion 2			Emulsion 3		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
A_V / cm^{-1}	1,7 E+04	1,7 E+04	1,6 E+04	2,7 E+04	3,0 E+04	2,9 E+04	4,0 E+04	3,8 E+04	3,9 E+04

Sojaöl

	Emulsion 1			Emulsion 2			Emulsion 3		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
A_V / cm^{-1}	1,7 E+04	1,7 E+04	1,6 E+04	3,1 E+04	3,1 E+04	3,2 E+04	3,5 E+04	3,5 E+04	3,5 E+04

7.1.3.2 Anwendung des kinetischen Modells des Zweilagensystems

Im Folgenden soll die Gleichung (33) zur Dateninterpretation Anwendung finden. Mit Hilfe der Methode der kleinsten Fehlerquadrate wurde an die ermittelten Zeitkurven die Gleichung (33) angepasst. Die so erhaltenen Ausgleichsgeraden sind in den **Abb. 7.1.3-1** und **2** eingezeichnet. Für die Errechnung der Konstanten h_0 und η über die Gleichungen (27) und (28) sowie den Konstanten H_0 und H ist die Kenntnis der Konzentration des Phenylsalicylats in der Wasserphase ($[PS]$) sowie des Verteilungskoeffizienten des Phenols (κ_P) erforderlich.

Nach den Ergebnissen im Kapitel 6.3 ist sowohl $[PS]$ als auch der reziproke Verteilungskoeffizient des Phenols linear von der Lecithinkonzentration abhängig. Unter Nutzung dieser Abhängigkeit lassen sich aus der Lecithinkonzentration die Konzentrationen von Phenylsalicylat und Phenol in der wässrigen Phase berechnen. Dabei ist allerdings der Verlust des Lecithins zur Bildung des Grenzflächenfilms zu berücksichtigen, der im Zweilagensystem wegen der kleinen spezifischen Grenzfläche noch vernachlässigbar war.

Mit der Molmasse (M) eines Emulgators und seinem Platzbedarf a in einem gesättigten monomolekularen Film ergibt sich seine Flächenkonzentration (Γ_{mono}) aus Gleichung (53):

$$\Gamma_{\text{mono}} = \frac{M}{a N_A} \quad (53)$$

N_A stellt hier die Avogadro-Konstante dar.

Lecithin besteht im Wesentlichen aus Phosphatidylcholin. Deshalb werden vereinfacht der molekulare Platzbedarf und die Molmasse dieses Moleküls für das Lecithin eingesetzt: $a = 7.2 \cdot 10^{-15} \text{ cm}^2$ [166], $M = 720 \text{ g/mol}$.

Für die Flächenkonzentration berechnet sich dann $1.66 \cdot 10^{-7} \text{ g/cm}^2$, und das Produkt mit der spezifischen Grenzfläche aus **Tab. 7.1.3.1-1** ergibt den Konzentrationsverlust (c_{mono}) an die Grenzfläche. In **Tab. 7.1.3.2-1** sind für die sechs Emulsionen die mittleren hydrodynamischen Durchmesser, die spezifischen Grenzflächen und die daraus berechneten Werte für c_{mono} zusammengestellt.

Es lässt sich eine gute Übereinstimmung mit den von J. Férézou [159] erhaltenen Ergebnissen feststellen. Er trennte 10 %ige Sojaölemulsionen mit einem Lecithingehalt von 1,2 % mittels unterschiedlicher Ultrazentrifugationsstufen in einen Lipidkuchen und eine phospholipidreiche wässrige Mesophase. Für die Mesophase bestimmte er einen Phospholipidgehalt von $\sim 5,5 \text{ mg/mL}$. Bei einer Gesamtphospholipidkonzentration von

12 mg/mL bedeutet das eine Konzentrationsabgabe an die Grenzfläche sowie an die Ölphase von etwa 6,5 mg/mL. Unter der Berücksichtigung der schlechten Löslichkeit des Lecithins im Sojaöl (siehe **Tab. 7.3.3-1**), liegt dieser Wert nicht weit von dem in dieser Arbeit gefundenen Konzentrationsverlust von 5,2 mg/mL.

Tabelle 7.1.3.2-1 Mittlerer hydrodynamischer Durchmesser, spezifische Grenzfläche und Massenverlust c_{mono} von Lecithin an die Grenzfläche in Miglyol- und Sojaöl-Emulsionen mit verschiedenen Lecithingehalten

Miglyol

Lecithingehalt	0,6 %	1,2 %	2,4 %
Mittelwert des z_{av} / nm aus Tab. 7.1.2-1	357	212	154
A_V / cm^{-1}	1,7 E+04	2,9 E+04	3,9 E+04
c_{mono} / mg/mL	2,8	4,7	6,5

Sojaöl

Lecithingehalt	0,6 %	1,2 %	2,4 %
Mittelwert des z_{av} / nm aus Tab. 7.1.2-1	363	192	173
A_V / cm^{-1}	1,7 E+04	3,1 E+04	3,5 E+04
c_{mono} / mg/mL	2,7	5,2	5,8

Aus den bekannten Ausgangskonzentrationen des Lecithins und den ermittelten Verlusten an die Grenzfläche wurde die verbleibende Volumenkonzentration ermittelt. Diese korrigierten Lecithinkonzentrationen (c_L) wurden zur Berechnung von [PS] und κ_P genutzt.

Tab. 7.1.3.2-2 listet die so errechneten Konstanten auf. Zur Interpretation der Ergebnisse sollen auch die Werte aus dem Zweilagensystem herangezogen werden. Aus diesem Grund sind sie zur Übersicht ein weiteres Mal dargestellt.

Tabelle 7.1.3.2-2 Die Parameter h_0 und η der Geschwindigkeitskonstanten h sowie die Konzentration des Phenylsalicylats im Wässrigen ([PS]) für das Zweilagensystem und Emulsionen mit unterschiedlichen Ölen bzw. Lecithinkonzentrationen

Miglyol

System	$c_L /$ mg/ml	[PS] / mmol/L	$A_Y /$ cm ² /ml	$h_0 /$ h ⁻¹	$\eta /$ L/(mmol h)
Zweilagen, kein Lecithin	0	0,005	0,242	1,76 E-02	1,34 E-01
Zweilagen, mit Lecithin	22,5	0,724	0,242	2,93 E-04	1,08 E-03
Zweilagen, mit Lecithin	45	1,391	0,242	2,14 E-04	1,01 E-03
Zweilagen, mit Lecithin	67,5	1,872	0,242	2,84 E-04	3,98 E-04
Zweilagen, mit Lecithin	90	2,490	0,242	2,83 E-04	3,93 E-04
Emulsion, 0,6% Lecithin	3,2	0,164	16800	8,44 E-04	1,15 E-02
Emulsion, 1,2% Lecithin	7,3	0,277	28300	8,64 E-04	2,73 E-03
Emulsion, 2,4% Lecithin	17,5	0,557	38900	8,28 E-04	1,87 E-03

Sojaöl

System	$c_L /$ mg/ml	[PS] / mmol/L	$A_Y /$ cm ² /ml	$h_0 /$ h ⁻¹	$\eta /$ L/(mmol h)
Zweilagen, kein Lecithin	0	0,008	0,242	1,66 E-02	1,24 E-01
Zweilagen, mit Lecithin	22,5	1,176	0,242	4,30 E-04	7,28 E-04
Zweilagen, mit Lecithin	45	1,867	0,242	4,46 E-04	8,61 E-04
Emulsion, 0,6% Lecithin	3,2	0,227	16500	1,14 E-03	6,27 E-03
Emulsion, 1,2% Lecithin	7,3	0,378	31300	1,23 E-03	1,75 E-03
Emulsion, 2,4% Lecithin	17,5	0,852	34700	1,13 E-03	1,05 E-03

7.1.3.3 Geschwindigkeitskonstante h_0 in Abwesenheit einer Katalyse durch Phenol

Die höhere Abbaugeschwindigkeit mit Sojaöl, die im Zweilagensystem beobachtet und im Kapitel 6.3.2.1 erklärt wurde, bestätigt sich in den Emulsionen.

Das Verhältnis der Lecithin- zur Phenylsalicylatkonzentration erreichte im Zweilagensystem mit 22,5 mg/mL Lecithin und Miglyol als Ölphase einen Wert von ca. 30. Beim Sojaöl liegt dieser Wert bei ca. 20. Dieselben Verhältnisse wurden auch bei den jeweiligen Emulsionen mit einem Lecithingehalt von 2,4 % erreicht, nachdem der Lecithinverlusts an die Grenzfläche korrigiert wurde. Obwohl in diesen Fällen der Schutz des Phenylsalicylats über eine Inkorporation in die Liposomen identisch sein muss, ist der h_0 -Wert bei beiden Ölen auf das zwei- bis dreifache gestiegen.

Im Vergleich zum Zweilagensystem hat sich die Grenzfläche durch die Emulgierung dramatisch erhöht. Trägt man die spezifischen Grenzflächen für beide Systeme gegen die Gesamtvolumenkonzentration des Lecithins ($c_{L\text{Gesamt}}$) auf, so erhält man die Kurven der **Abb. 7.1.3.3-1**, aus der eine obere Grenze nicht wesentlich über $40000 \text{ cm}^2/\text{mL}$ hervorgeht.

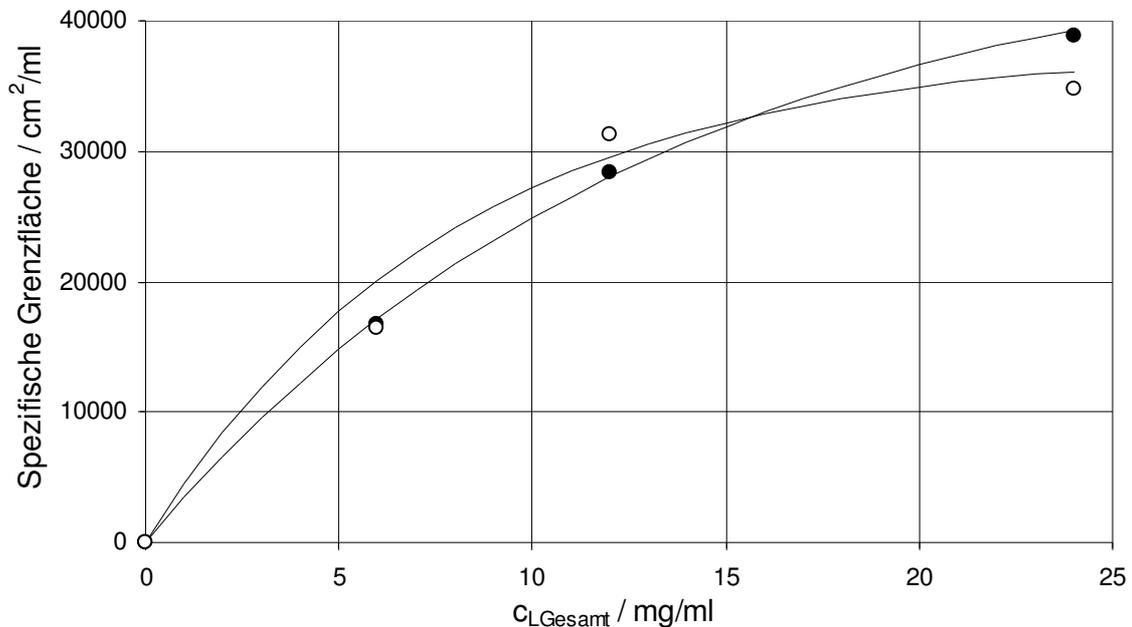


Abbildung 7.1.3.3-1 Die spezifische Grenzfläche der Emulsionen gegen die Lecithinkonzentration für die Öle Miglyol (●) und Sojaöl (○)

Es liegt nahe, in diesem Anstieg der spezifischen Grenzfläche die Ursache für die Zunahme der h_0 -Werte der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten in den Emulsionen zu suchen. Die Grenzfläche bildet dann einen weiteren Verteilungsraum mit Bedingungen, die der Hydrolyse förderlich sind. Denkbar sind ungünstige pH-Bedingungen im Mikrobereich der Grenzfläche [6] oder eine Erniedrigung der Aktivierungsenergie der Verseifung durch besondere räumliche Anordnung des Phenylsalicylats an der Grenzfläche. Diese reaktionsbeschleunigende Wirkung ist den Werten der **Tab. 7.1.3.2-2** zufolge schon bei 0,6 % Lecithin mit einer spezifischen Grenzfläche von ca. $1,7 \cdot 10^4 \text{ cm}^2/\text{mL}$ vollständig ausgebildet (siehe **Abb. 7.1.3.3-2**). Eine weitere Erhöhung der Grenzfläche hat keine nennenswerte Beschleunigung mehr zur Folge. Das kann an der mit der Grenzfläche steigenden Lecithinkonzentration der Emulsionen liegen. Da sich sowohl das Phenylsalicylat, als auch das Lecithin in der Emulsion auf die Ölphase, Wasserphase, Grenzfläche und die Liposomen verteilen, wird mit einer zunehmenden Lecithinkonzentration im Gesamtsystem auch die Konzentration in der Grenzfläche ansteigen.

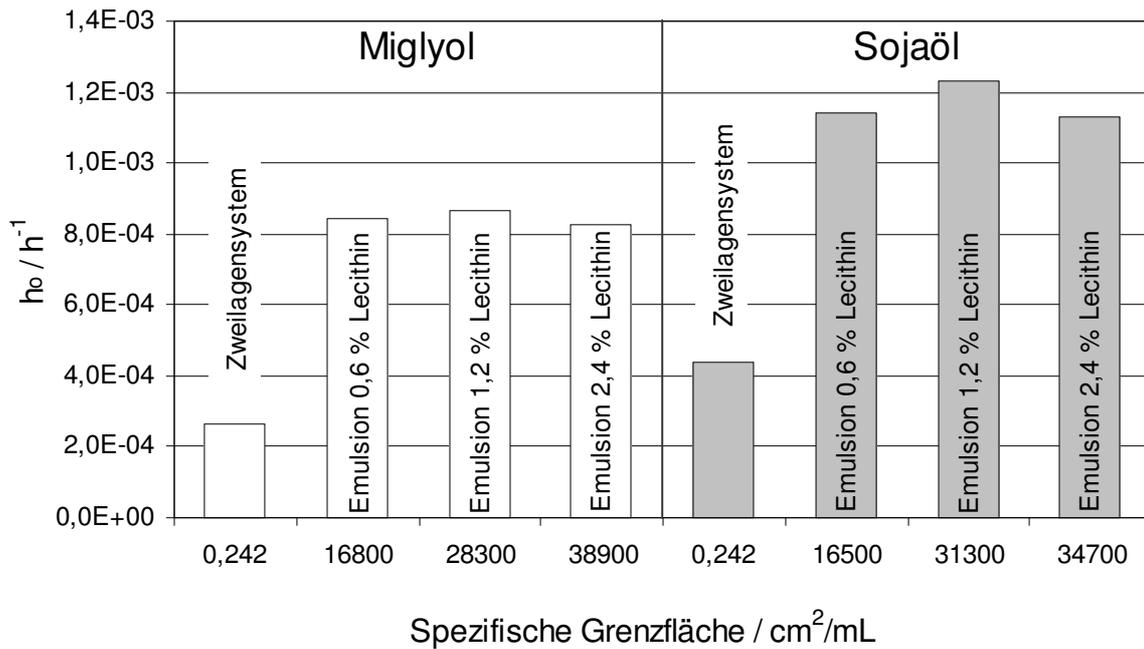


Abbildung 7.1.3.3-2 Die Basis-Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten h_0 ohne die Katalyse durch das Abbauprodukt gegen die spezifische Grenzfläche der Öle Miglyol (weiß) und Sojaöl (grau)

Da die Phenylsalicylatkonzentration bei allen Emulsionen konstant war, ließe sich postulieren, dass die zunehmende Lecithinkonzentration in der Grenzfläche das Phenylsalicylat aus dieser verdrängt und dadurch die reaktionsbeschleunigende Wirkung der Grenzfläche kompensiert.

Eine zahlenmäßige Zunahme der Grenzfläche ginge aus diesem Grund nicht mit einer erhöhten Phenylsalicylatkonzentration in der Grenzfläche einher.

7.1.3.4 Katalyse durch das Abbauprodukt Phenol, Proportionalitätskonstante η

Die Proportionalitätskonstante η aus der Gleichung (25) setzt die Geschwindigkeitskonstante des hydrolytischen Abbaus in Beziehung zur Phenolkonzentration im Wässrigen und berücksichtigt so eine katalytische Wirkung des Abbauprodukts. Diese soll im Folgenden für die Ergebnisse aus den Zweilagensystemen und den Emulsionssystemen zusammenfassend diskutiert werden.

Die Abhängigkeit der Proportionalitätskonstanten von der Lecithinkonzentration ist in **Abb. 7.1.3.4-1** – gemeinsam für das Zweilagensystem und die Emulsionen – halblogarithmisch dargestellt, um den Verlauf im unteren Konzentrationsbereich des Lecithins hervorzuheben. η nimmt mit steigender Lecithinkonzentration ab, und – anders als

bei h_0 – zeigt sich kein Sprung im Verlauf beim Übergang vom Zweilagensystem zur Emulsion. Die spezifische Grenzfläche scheint also keinen Einfluss zu nehmen.

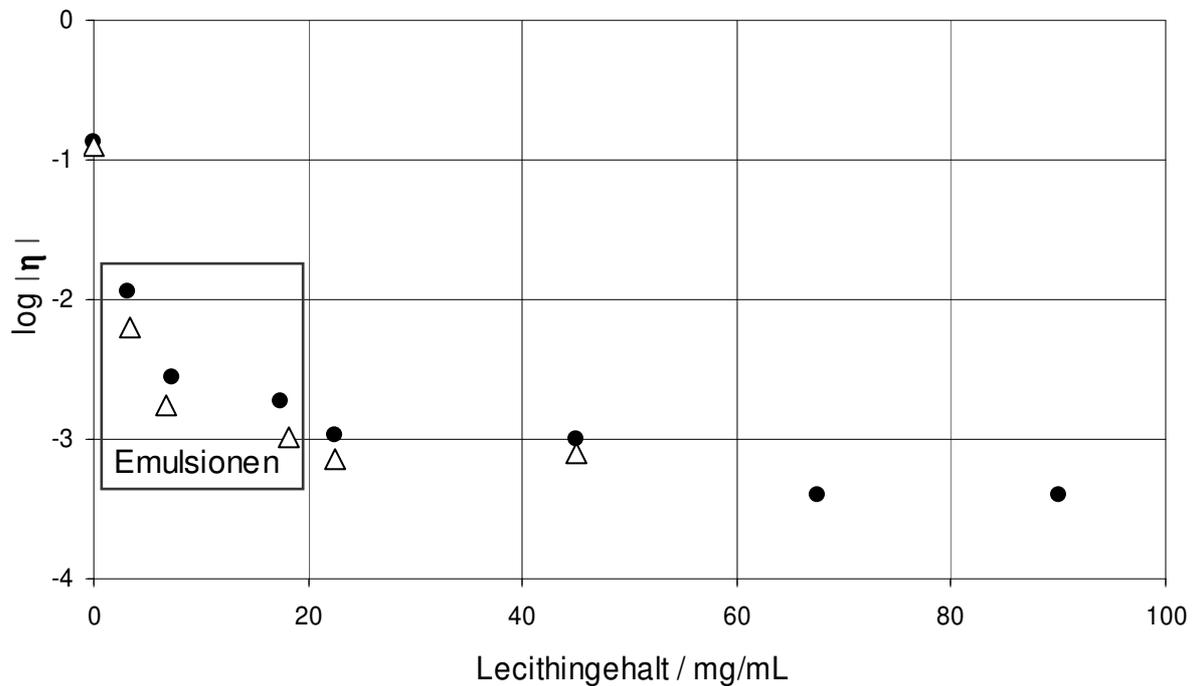


Abbildung 7.1.3.4-1 Halblogarithmische Auftragung der Proportionalitätskonstanten η , welche die Geschwindigkeitskonstante des hydrolytischen Abbaus in Beziehung zur Phenolkonzentration im Wässrigen setzt, gegen die Lecithinkonzentration für die Öle Miglyol (●) und Sojaöl (Δ)

Wie schon beim Phenylsalicylat, kann dies für das katalytisch wirksame Abbauprodukt durch die Inkorporation in die Liposomen erklärt werden. Dabei wird es der wässrigen Phase entzogen und der katalytisch wirksame Anteil der Konzentration erfährt eine Verringerung. Bei den ermittelten η -Werten der **Tab. 7.1.3.2-2** handelte es sich also um scheinbare Proportionalitätskonstanten, reduziert durch den Anteil der Konzentration, welcher nicht katalytisch wirksam werden kann.

Die leicht erniedrigten η -Werte beim Sojaöl im Vergleich zum Miglyol können über die schlechtere Löslichkeit des Lecithins im Sojaöl erklärt werden (siehe Kapitel 7.3). Demzufolge wird im Gleichgewicht des Lecithins zwischen der Öl- und der Wasserphase bei den Sojaöl-Emulsionen eine höhere wässrige Lecithinkonzentration erreicht. Damit ist eine stärkere Inkorporation des katalytisch wirksamen Abbauprodukts in die Liposomen gegeben, wodurch die η -Werte reduziert werden.

Den Anteil der wässrigen Konzentration des katalytisch wirksamen Abbauprodukts außerhalb der Liposomen erhält man, wenn man die η -Werte der lecithinhaltigen Systeme mit dem des lecithinfreien Systems ins Verhältnis setzt.

Dieses Verhältnis ist in **Abb. 7.1.3.4-2** gegen den Lecithingehalt halblogarithmisch aufgetragen

Dabei ist die katalytisch wirksame Konzentration als x' und die Gesamtkonzentration im Wässrigen als x bezeichnet. x' entspricht dem η -Wert in Gegenwart, x den in Abwesenheit von Lecithin.

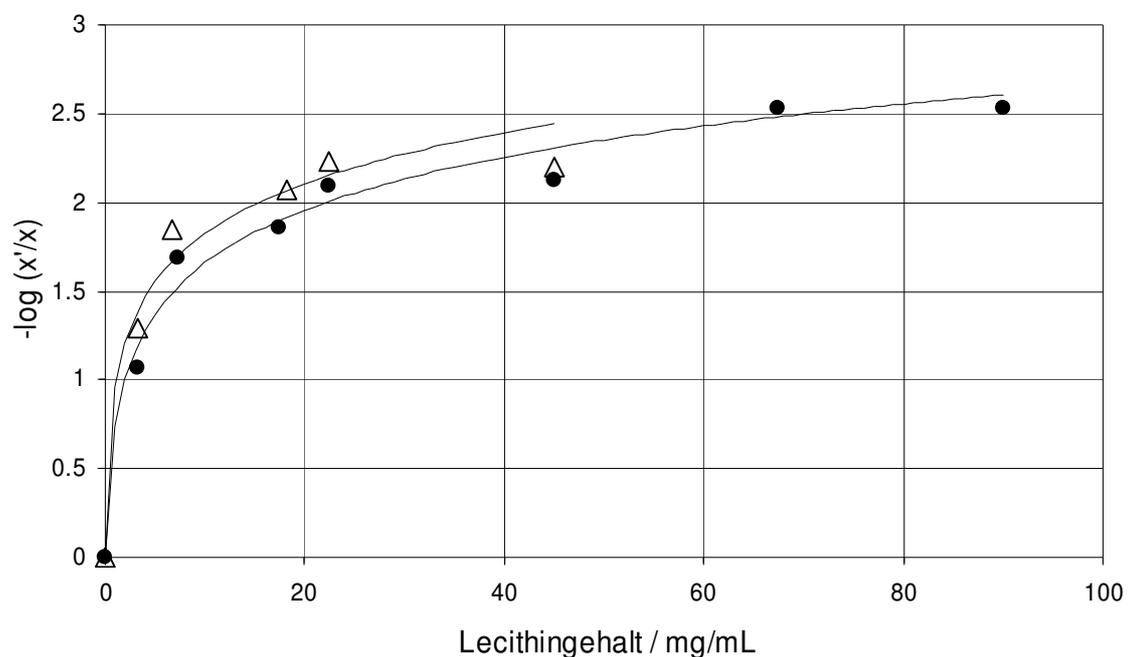


Abbildung 7.1.3.4-2 Negativ logarithmische Auftragung des katalytisch wirksamen Anteils der wässrigen Phenolkonzentration (x'/x) gegen die Lecithinkonzentration für die Öle Miglyol (●) und Sojaöl (Δ). Die Ausgleichskurve (-) basiert auf einem Ansatz, der für die Inkorporation des katalytisch wirksamen Abbauprodukts in die Liposomen die der Langmuir-Adsorptionsisotherme entlehnt

Für die Beschreibung des Kurvenverlaufs wurde angenommen, dass die Inkorporation des Phenols einer Langmuir-Adsorptionsisotherme folgt, die mit zunehmender Konzentration der wässrigen Phase einer Sättigung zustrebt. Mit der Konstanten K und der Sättigungskonzentration x_s des katalytisch wirksamen Abbauprodukts in den Liposomen lautet die Isotherme:

$$x - x' = \frac{x_s x'}{K + x'} \quad (54)$$

Formt man die Gleichung für den Anteil nicht inkorporierten katalytisch wirksamen

Abbauprodukts $R = \frac{x'}{x}$ um, ergibt sich:

$$x(1-R) = \frac{x_s R}{\frac{K}{x} + R} \quad (55)$$

$$R^2 + R \left(\frac{x_s + K}{x} - 1 \right) - \frac{K}{x} = 0 \quad (56)$$

Da die Gesamt- wie auch die Sättigungskonzentration Funktionen der Lecithinkonzentration sind, ergibt sich für:

$$x = a + b c_L \quad (57)$$

$$x_s = s c_L \quad (58)$$

die Lösung:

$$\frac{x'}{x} = \frac{1}{2} \left(1 - \frac{s c_L + K}{a + b c_L} \right) + \sqrt{\frac{1}{4} \left(1 - \frac{s c_L + K}{a + b c_L} \right)^2 + \frac{K}{a + b c_L}} \quad (59)$$

Dabei fußt die Gleichung (57) mit den Konstanten a und b auf der im Kapitel 6.3.1.1 beschriebenen linearen Abhängigkeit der Konzentration vom Lecithingehalt, und für die Sättigungskonzentration wurde der proportionale Ansatz (58) gewählt.

Die Gleichung (59) verknüpft nun den Anteil katalytisch aktiven katalytisch wirksamen Abbauprodukts mit der Lecithinkonzentration und beschreibt nach Anpassung der Parameter s, a, b und K überzeugend den Verlauf des Verhältnisses von η in Gegenwart und Abwesenheit von Lecithin. Die scheinbare Abnahme von η mit der zunehmenden Lecithinkonzentration lässt sich damit als Entzug eines Teils der Konzentration des katalytisch wirksamen Abbauprodukts in die Liposomen interpretieren. In den Liposomen ist es nicht länger katalytisch wirksam.

7.1.3.5 Kinetisches Modell

Die bisher erhobenen Daten geben Anlass, das im Kapitel 6.3.2 vorgestellte kinetische Modell, wie in **Abb. 7.1.3.5-1** skizziert, zu verfeinern.

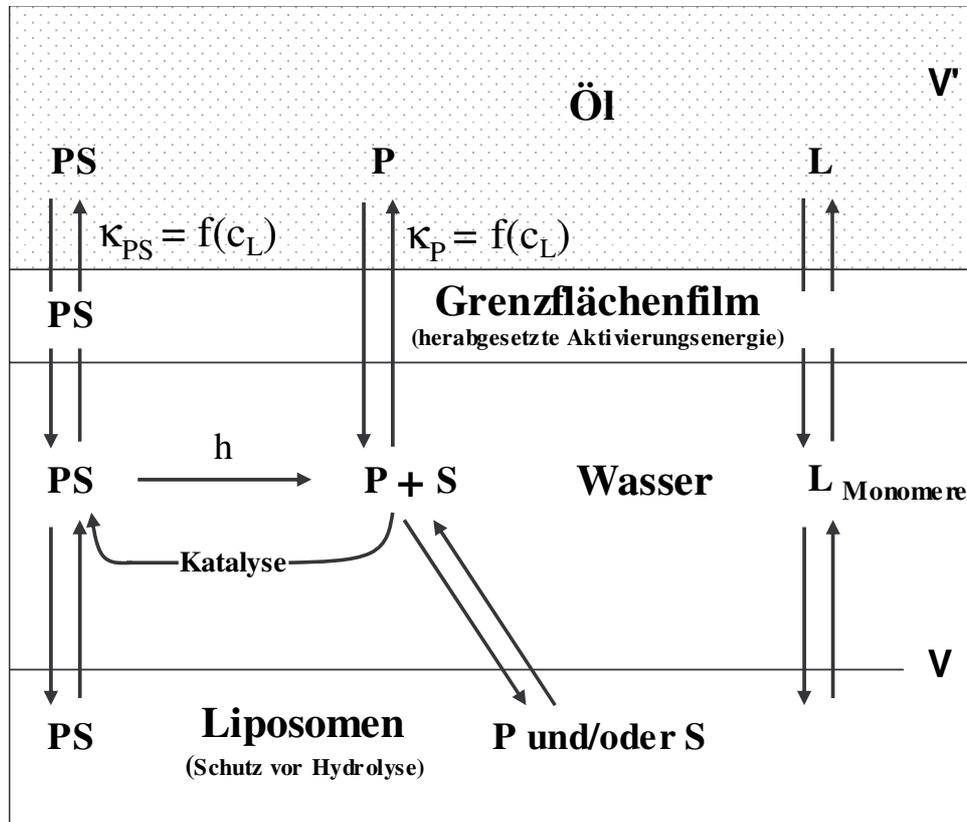


Abbildung 7.1.3.5-1 Verfeinertes kinetisches Modell des hydrolytischen Abbaus von Phenylsalicylat in einer Emulsion (PS: Phenylsalicylat, P: Phenol, S: Salicylsäure, L: Lecithin, v : Volumen Wasserphase, v' : Volumen Ölphase, h : Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse, κ_{PS} : Verteilungskoeffizient des Phenylsalicylats, κ_P : Verteilungskoeffizient des Phenols)

In der Emulsion verteilt sich der zur Herstellung notwendige Emulgator (im vorliegendem Fall Lecithin (L)) auf Öl und Wasserphase und bildet einen Grenzflächenfilm sowie, mit seinem Überschuss, Liposomen in der wässrigen Phase. Der Modellarzneistoff Phenylsalicylat (PS) und sein Abbauprodukt Phenol (P) verteilen sich auf Ölphase, wässrige Phase, Grenzfläche und Liposomen. Das zweite Abbauprodukt, die Salicylsäure (S), wird von der Ölphase nicht aufgenommen.

Nur in der wässrigen Phase findet der Abbau des Phenylsalicylats durch Hydrolyse statt. Der Massentransport von der Öl- in die Wasserphase läuft schnell ab im Vergleich zur Hydrolyse. Deshalb bleibt die Phenylsalicylatkonzentration in der Wasserphase konstant und die

Verseifung folgt zunächst einer Kinetik nullter Ordnung, wird aber nach der Bildung der Abbauprodukte katalytisch beschleunigt. Eine weitere Beschleunigung erfährt die Reaktion an der Grenzfläche.

Geschützt wird das Phenylsalicylat dagegen durch Inkorporation seiner selbst und des katalytisch wirksamen Abbauprodukts in die Liposomen. Dort ist das Phenylsalicylat dem Angriff des Wassers entzogen, und die katalytische Wirkung des katalytisch wirksamen Abbauprodukts wird in Folge der Verringerung seiner Konzentration in der wässrigen Umgebung abgeschwächt.

7.2 Untersuchungen mit unterschiedlichen Emulgatoren in ihrem Einfluss auf die Hydrolysegeschwindigkeit

An den lecithinstabilisierten Emulsionen konnte gezeigt werden, dass der Emulgator einen entscheidenden Einfluss auf die Wirkstoffstabilität einer hydrolyseinstabilen Substanz nehmen kann. Über die Liposomen kommt es zu einer ausgeprägten Verschiebung des Phenylsalicylat-Verteilungskoeffizienten hin zu der wässrigen Phase, welches mit einem beschleunigten Abbau der Substanz einhergeht. Zwar wird das Phenylsalicylat über eine Inkorporation in die Liposomen geschützt; jedoch ist dieser Schutz nicht vollständig, da sich auch zwischen Liposomen und umgebendem Wasser ein Konzentrationsgleichgewicht einstellt. Insgesamt kam es zu einer Verschlechterung der Stabilität (siehe Kapitel 6.3 und 7.1). Bei den unterschiedlichen Emulgatoren, welche zur Emulsionsherstellung Anwendung finden, ist zu erwarten, dass die Konzentration, wie auch die sich ausbildende Aggregationsform des Tensids, im Wässrigen variiert.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die stark vergrößerte Grenzfläche der Emulsionen im Vergleich mit dem Zweilagensystem die Abbaukinetik des Phenylsalicylats beschleunigte. Eine mögliche Erklärung hierfür waren die physikochemischen Eigenschaften der Grenzfläche, wie beispielsweise ungünstige pH-Bedingungen im Mikrobereich der Grenzfläche (siehe Kapitel 7.3.3). Unterschiedliche Emulgatoren können diesen Parameter verändern, wodurch möglicherweise die Lagerstabilität beeinflusst wird.

Ob die Wahl des Emulgators sich tatsächlich auf die Arzneistoffstabilität auswirkt, sollte im Folgenden untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die nicht ionischen Emulgatoren D- α -Tocopheryl-polyethylenglykol-1000-succinat (TPGS) und Polyoxyethylen(20)sorbitanmonooleat (Tween 80[®]), sowie der Polymeremulgator Pluronic F 68[®] eingesetzt, um die

Abbaukinetiken in den so hergestellten Emulsionen zu verfolgen und die Ergebnisse mit denen der lecithinstabilisierten Emulsionen aus dem Kapitel 7.1 zu vergleichen.

Auf die Bestimmung der wässrigen Konzentration und des Verteilungskoeffizienten von Phenylsalicylat und Phenol sowie der Konstanten h_0 und η wurde für diese rein qualitative Bewertung verzichtet.

7.2.1 Durchführung

Miglyol-Emulsionen mit einem Emulgatoranteil von 1,2 % wurden nach der im Kapitel 7.1.1 beschriebenen Rezeptur mit den genannten Emulgatoren anstelle von Lecithin hergestellt (siehe **Tab. 7.2.1-1**).

Tabelle 7.2.1-1 Rezeptur der untersuchten Emulsionen mit unterschiedlichen Emulgatoren. Die Werte sind für ein Gesamtvolumen von 100 mL angegeben

Komponente	Emulgator		
	TPGS	Pluronic F 68 [®]	Tween 80 [®]
Phenylsalicylat	250 mg	250 mg	250 mg
Miglyol	10 mL	10 mL	10 mL
Emulgator	1200 mg	1200 mg	1200 mg
Natrium Oleat	30 mg	30 mg	30 mg
Isotonisierter Phosphatpuffer pH 7,4	90 mL	90 mL	90 mL

Bei der Herstellung wurde nur in einem Punkt von den Vorgaben aus dem Kapitel 3.1 abgewichen. Die Emulgatoren wurden nicht in der Ölphase gelöst, sondern, da es sich um wasserlösliche Emulgatoren handelt, vor der Herstellung der Voremulsion in der wässrigen Phase bei 40 °C dispergiert. In diese Tensidlösung wurde die Ölphase eingearbeitet.

Das Produktionsvolumen lag für alle Emulsionen bei 250 mL. Über einen Beobachtungszeitraum von vier Wochen wurde die Konzentration der Abbauprodukte verfolgt.

7.2.2 Physikalische Stabilität der Rezepturen

Wie aus den Angaben in der **Tab. 7.2.2-1** ersichtlich, war es mit den oben beschriebenen Herstellungsbedingungen möglich, mit den gewählten Emulgatoren Emulsionen herzustellen, welche durch eine sehr kleine Tröpfchengröße und eine sehr enge Größenverteilung charakterisiert sind.

Über den gesamten Untersuchungszeitraum waren die Partikel stabil. Es ließ sich mit dem Auge keine Phasentrennung beobachten und auch die analytische Erfassung der Teilchengrößen ließ keine Stabilitätsprobleme erkennen (siehe **Tab. 7.2.2-1**).

Tabelle 7.2.2-1 Partikelcharakterisierung der Emulsionen zu Beginn und am Ende der Testperiode

Methode		TPGS			Pluronic F 68 [®]			Tween 80 [®]		
		P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
PCS	Z-average / nm	168	163	167	180	175	185	162	163	170
	PI	0,07	0,03	0,1	0,09	0,07	0,09	0,10	0,12	0,08
LD	D50 / μm	0,204	0,198	0,205	0,247	0,250	0,266	0,222	0,218	0,226
	D99 / μm	0,551	0,505	0,561	0,644	0,634	0,666	0,601	0,590	0,554
Zetapotential / mV		-37,8	-36,4	-35,6	-33,8	-34,2	-34,7	-34,2	-34,5	-33,8
Nach 4 Wochen										
PCS	Z-average / nm	169	165	167	191	189	192	169	167	174
	PI	0,06	0,09	0,09	0,09	0,08	0,06	0,06	0,07	0,15
LD	D50 / μm	0,211	0,219	0,224	0,256	0,249	0,253	0,208	0,212	0,218
	D99 / μm	0,536	0,595	0,618	0,663	0,653	0,665	0,545	0,560	0,606
Zetapotential / mV		-35,7	-34,5	-37,4	-34,1	-36,1	-35,4	-37,6	-36,4	-36,0

7.2.3 Chemische Stabilitätsdaten

Die Phenolkonzentrations-Zeit-Kurven der Emulsionen sind in **Abb. 7.2.3-1** zusammen mit der Kurve der lecithinstabilisierten Miglyol-Emulsionen aus dem Kapitel 7.1.3 wiedergegeben.

Der Vergleich der Kurven zeigt eine deutliche Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit des Phenylsalicylats von dem gewählten Emulgator. Die mit Lecithin stabilisierten Emulsionen erwiesen sich dabei als am empfindlichsten. Über den gesamten Untersuchungszeitraum lag die Phenolkonzentration über den Werten aller anderen Emulsionen. Im Vergleich zu den mit TPGS oder mit Pluronic F 68[®] stabilisierten Emulsionen, hatte sich die Phenolkonzentration nach 30 Tagen sogar schon verdoppelt.

Die Emulsionen mit dem Emulgator Tween 80[®] nahmen eine Zwischenstellung ein. Verglichen mit dem Lecithin zeigte der Phenolkonzentrations-Zeit-Verlauf einen Stabilitätsgewinn. Jedoch waren die Emulsionen der Emulgatoren TPGS und Pluronic F 68[®]

bezüglich der Arzneistoffstabilität deutlich überlegen. Sie zeigten beide einen ähnlichen Kurvenverlauf mit der langsamsten Abbaukinetik in dieser Versuchsreihe.

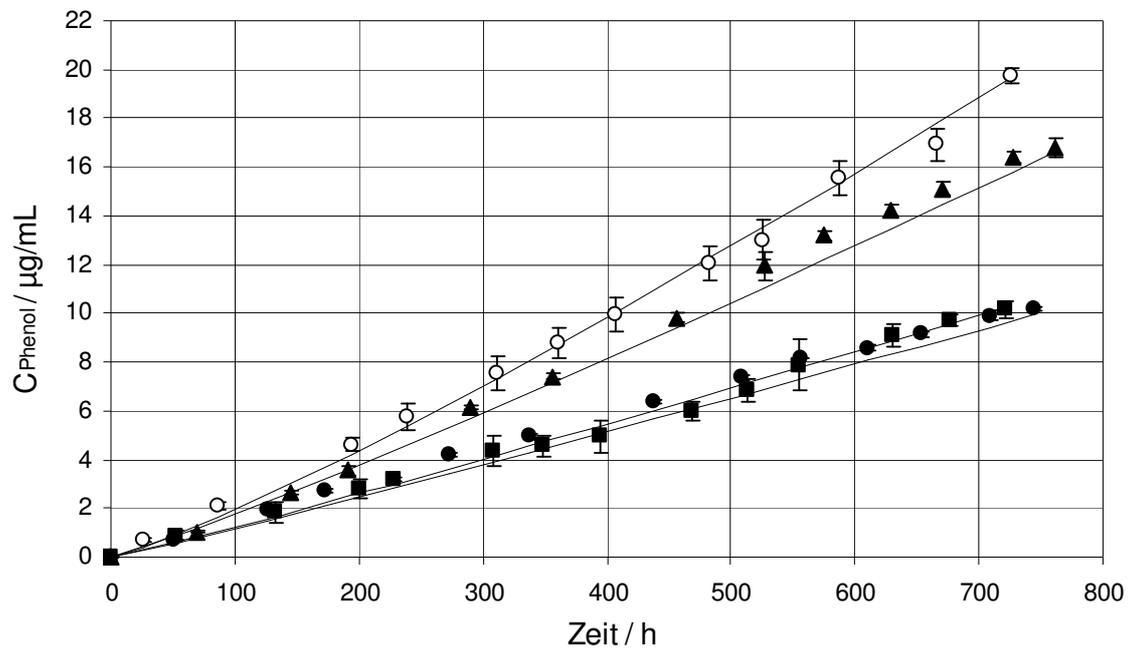


Abbildung 7.2.3-1 Konzentration des Abbauprodukts Phenol gegen die Zeit in Miglyol Emulsionen stabilisiert mit Lecithin (○), Tween 80[®] (▲), Pluronic F 68[®] (●) sowie TPGS (■)

7.2.4 Diskussion

Die einleitend aufgestellte Hypothese, nach der der Emulgator die Abbaukinetik beeinflussen könnte, wurde mit den hier ermittelten Daten bestätigt. Da es sich um eine Vielzahl möglicher Einflussgrößen handelt, fällt es jedoch schwer, eine Wertung vorzunehmen.

Über die erniedrigten, jedoch untereinander vergleichbaren Zetapotentiale der neu untersuchten Emulsionen im Vergleich zu den lecithinstabilisierten Emulsionen, lässt sich herleiten, dass die physikochemischen Eigenschaften der Grenzflächen Unterschiede aufwiesen. Eine direkte Korrelation des Zetapotentials mit den chemischen Stabilitätsdaten, wie es Pongharoenkiat [6] postulierte, lies sich hier jedoch nicht ableiten. Die mit dem Emulgator Tween 80[®] hergestellten Emulsionen hatten ein nahezu identisches Zetapotential wie die mit Pluronic F 68[®] stabilisierten Emulsionen, die chemische Stabilität des Phenylsalicylats war jedoch geringer.

Die wohl wahrscheinlichste Ursache dieser Ergebnisse ist in den unterschiedlichen Verteilungen des Phenylsalicylats in hydrolytisch wirksame Bereiche der Emulsionen zu suchen. Sowohl die Affinität des Phenylsalicylats zu den wässrigen Aggregationsformen des

Emulgators, als auch deren stabilisierendes Potential wird hier eine ausschlaggebende Rolle gespielt haben. Es ist des Weiteren zu beachten, dass der Emulgator selbst einer Verteilung zwischen Öl- und Wasserphase unterliegt (siehe Kapitel 7.1.3.5). Unterschiedliche Emulgatorkonzentrationen im Wässrigen, aufgrund unterschiedlicher Löslichkeiten im Öl, würden auch bei den hier untersuchten Emulgatoren die Wirkstoffstabilität beeinflussen.

Da es, wie in der Einleitung erwähnt, in diesem Kapitel nur um die qualitative Aussage ging, ob unterschiedliche Emulgatoren die Abbaukinetik beeinflussen, bleibt festzuhalten, dass die Lagerstabilität des Phenylsalicylats in Emulsionen, über die richtige Wahl des Emulgators, erhöht werden konnte.

7.3 Variation der Ölphase und ihr Einfluss auf die Abbaukinetik

Über Diffusionsvorgänge des Arzneistoffs kommt es zur Einstellung eines Verteilungsgleichgewichts zwischen den einzelnen Kompartimenten einer Emulsion. Die Ölphase stellt hierbei einen Verteilungsraum dar, in welchem eine Wirkstoffhydrolyse ausgeschlossen werden kann (siehe Kapitel 5). Für die Stabilität eines hydrolyseinstabilen Arzneistoffs ist es also entscheidend, zu welchem Anteil er sich in der Ölphase aufhält. Diese Verteilung hängt von den physikochemischen Eigenschaften des Öls ab. Beispielsweise werden die Lösungseigenschaften des Wirkstoffs im verwendeten Öl das Verteilungsverhalten bestimmen. Auch das Lösungsvermögen des Öls für den verwendeten Emulgator ist von Bedeutung, da von ihm die Tensidkonzentration in der Wasserphase mit ihrer Auswirkung auf die Wirkstoffstabilität abhängt (siehe Kapitel 6.3).

Aus diesen Überlegungen erschließt sich das Potential, über die richtige Wahl der Ölphase einen Stabilitätsgewinn für eine hydrolyseinstabile Substanz in Emulsionen zu erzielen.

Für das Zweilagensystem gelang der experimentelle Nachweis, dass die Abbaukinetik des Phenylsalicylats einzig von der konstanten wässrigen Wirkstoffkonzentration abhängig ist (siehe Kapitel 6.4). Der Verteilungskoeffizient des Phenylsalicylats zwischen den untersuchten Ölen und dem Phosphatpuffer bestimmt die chemische Stabilität. Die Reaktion folgt einer Kinetik nullter Ordnung.

Unter Verwendung der Öle Miglyol und Sojaöl wurden im Abschnitt 7.1 bereits Emulsionen in die Untersuchung einbezogen. Diese sollen nun um Messungen an lecithinstabilisierten Emulsionen mit den restlichen, im Zweilagensystem eingesetzten Ölen erweitert werden.

Sie seien hier, nach fallendem Verteilungskoeffizienten geordnet, noch einmal genannt:

Miglyol > Sojaöl > Rapsöl > Olivenöl > Rizinusöl

Da die Phenylsalicylatkonzentration in der Wasserphase von der Verteilung des Emulgators zwischen Öl und Wasser abhängt, müssen zur Deutung der kinetischen Ergebnisse die Sättigungslöslichkeiten des Lecithins in den verschiedenen Ölen bekannt sein.

7.3.1 Durchführung

Die Emulsionen mit Rapsöl und Olivenöl wurden entsprechend Kapitel 3.1 ohne Abweichungen hergestellt. Diese Bedingungen waren für das Rizinusöl nicht geeignet, da die Viskosität der Ölphase sehr hoch war (siehe **Tab. 6.4.2.1-1**), und kein befriedigendes Homogenisationsergebnis erzielt werden konnte. Deshalb musste Arbeitstemperatur von 40 auf 80 °C sowohl bei der Herstellung der Voremulsion, als auch zur eigentlichen Homogenisation erhöht werden.

Diesen Ausweg ermöglicht die starke Temperaturabhängigkeit der Viskosität [116]. Diese sinkt mit steigender Temperaturen, da die kinetische Energie der Moleküle zunimmt, während die Kohäsionskräfte schwächer werden.

Die Rezeptur der untersuchten Emulsionen ist in **Tab. 7.3.1-1** wiedergegeben und entsprach in ihrer Zusammensetzung den mit 1,2 % Lecithin stabilisierten Emulsionen aus dem Kapitel 7.1.

Von jeder Emulsion wurden 250 mL hergestellt, um die Abbaukinetik über vier Wochen zu verfolgen.

Tabelle 7.3.1-1 Rezeptur der untersuchten Emulsionen mit unterschiedlichen Ölphasen. Die Werte sind für ein Gesamtvolumen von 100 mL angegeben

Komponente	Ölphase		
	Rizinusöl	Olivenöl	Rapsöl
Phenylsalicylat	250 mg	250 mg	250 mg
Öl	10 mL	10 mL	10 mL
Lipoid E80®	1200 mg	1200 mg	1200 mg
Natrium Oleat	30 mg	30 mg	30 mg
Isotonisierter Phosphatpuffer pH 7,4	90 mL	90 mL	90 mL

Neben der Emulsionsherstellung wurde die Sättigungslöslichkeit des Emulgators in den verwendeten Ölen bestimmt. Hierzu wurden die Öle 24 Stunden lang bei Raumtemperatur mit einem Gramm Lecithin pro Milliliter Öl gerührt. Nach Abzentrifugation des nicht gelösten Lecithins wurde der Gehalt des Phosphatidylcholins im Überstand der Proben mittels HPLC bestimmt (siehe Kapitel 3.10.2). Phosphatidylcholin ist der Hauptbestandteil des Stoffgemisches Lipoid E80[®]. Sein Gehalt kann deshalb als gute Näherung für den Lecithingehalt angesehen werden.

7.3.2 Physikalische Stabilität der Rezepturen

Die Bestimmung der Partikelgrößen mittels PCS ergab Z-average Werte zwischen 190 und 225 nm. Derselbe Größenbereich wurde auch bei den Emulsionen der Öle Miglyol bzw. Sojaöl erreicht. Die Breite der Verteilung mit Werten zwischen 0,15 und 0,30 erwies sich im Vergleich als etwas erhöht (siehe **Tab. 7.1.2-1**).

Tabelle 7.3.2-1 Partikelcharakterisierung der Emulsionen zu Beginn und am Ende der Testperiode

Zu Beginn										
		Rizinusöl			Olivenöl			Rapsöl		
	Methode	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
PCS	Z-average / nm	224	221	224	189	197	201	218	221	225
	PI	0,23	0,27	0,23	0,15	0,20	0,16	0,19	0,17	0,15
LD	D50 / µm	0,322	0,285	0,298	0,272	0,280	0,275	0,348	0,337	0,338
	D99 / µm	1,015	1,087	1,112	0,802	0,741	0,809	0,900	0,927	0,866
Zetapotential /mV		-40,0	-40,9	-41,4	-53,7	-51,5	-52,4	-49,8	-51,2	-52,2
Nach 4 Wochen										
PCS	Z-average / nm	238	235	240	209	211	215	245	254	243
	PI	0,33	0,32	0,19	0,21	0,27	0,36	0,24	0,26	0,27
LD	D50 / µm	0,296	0,306	0,316	0,287	0,299	0,295	0,371	0,377	0,403
	D99 / µm	1,259	1,156	1,236	0,965	1,027	1,117	1,012	1,115	1,178
Zetapotential /mV		-39,4	-40,2	-42,2	-53,0	-51,3	-49,5	-51,6	-52,8	-52,0

Eine physikalische Stabilität der Emulsionen war über den gesamten Untersuchungszeitraum gegeben. Die Emulsionen zeigte keine - mit dem Auge erkennbare - Phasentrennung. Die Bestimmung der Partikelgrößen offenbarte jedoch eine leichte Zunahme der Teilchendurchmesser nach vier Wochen.

7.3.3 Löslichkeit und Verteilung von Phosphatidylcholin

Tab. 7.3.3-1 zeigt neben den Verteilungskoeffizienten des Phenylsalicylats ohne Emulgator die Sättigungslöslichkeiten des Phosphatidylcholins in den verschiedenen Ölen. Für Miglyol und Rizinusöl liegt die Löslichkeit über dem Angebot von Lecithin mit 12 mg/mL im Gesamtsystem. In diesen Emulsionen wird sich der Emulgator seinem Verteilungskoeffizienten (κ_L) entsprechend auf die Phasen verteilen. Dagegen weisen Olivenöl, Rapsöl und Sojaöl vergleichsweise niedrige Sättigungskonzentrationen für Phosphatidylcholin auf. Aus diesen und dem Gesamtangebot von 12 mg/mL Lecithin lassen sich die Konzentrationen des Emulgators in der Wasserphase abschätzen. Setzt man näherungsweise die Phosphatidylcholin- mit der Lecithinkonzentration gleich und korrigiert die Werte um den Lecithinverlust an die Grenzfläche entsprechend Kapitel 7.1.3.2, so ergeben sich die ebenfalls in **Tab. 7.3.3-1** angegebenen Werte.

Tabelle 7.3.3-1 Sättigungslöslichkeit des Phosphatidylcholins (PC) sowie der Verteilungskoeffizient des Phenylsalicylats in den untersuchten Ölen bei Raumtemperatur. Zusätzlich ist die geschätzte Emulgatorkonzentration in der Wasserphase angegeben

Öl	κ_{PS}	Sättigungslöslichkeit des PC / mg/mL	Emulgatorkonzentration in der Wasserphase / mg/mL
Miglyol	20 698 ± 765	172,27	gemäß κ_L
Rizinusöl	11 326 ± 118	147,10	gemäß κ_L
Olivenöl	12 811 ± 230	0,49	8,07
Rapsöl	13 553 ± 331	19,02	6,73
Sojabohnenöl	13 957 ± 392	0,16	8,11

7.3.4 Chemische Stabilitätsdaten

Beim Vergleich der Abbaukinetiken des Phenylsalicylats in den getesteten Emulsionen ließ sich eine Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit von der verwendeten Ölphase nachweisen. Dies ergab sich aus der Konzentrationszunahme des Abbauprodukts Phenol gegen die Zeit (siehe **Abb. 7.3.3-1**).

Die nach Gleichung (33) an die Messdaten angepassten Kurven sind in die Grafik eingezeichnet. Auf eine Bestimmung der Phenylsalicylatkonzentration im Zweilagensystem und die Berechnung von h_0 und η aus den Gleichungen (27) und (28) wurde, wie im Kapitel 7.2, verzichtet, weil die qualitativen Aussagen für die Auswahl eines geeigneten Emulsionssystems genügen.

Miglyol gewährleistet mit Abstand die beste Wirkstoffstabilität. Die Phenolkonzentration erreichte hier nach 30 Tagen mit $20 \mu\text{g/mL}$ den geringsten Wert aller getesteten Öle. Dem Miglyol folgten die Öle Rizinus- sowie Rapsöl, welche mit Phenolkonzentrationen von knapp unter $30 \mu\text{g/mL}$ nach 30 Tagen schon um nahezu 50 % über denen des Miglyols lagen. Untereinander zeigten diese beiden Öle eine ähnliche Abbaugeschwindigkeit des Modellarzneistoffes. Die Messwerte lagen während der gesamten Untersuchungsperiode sehr eng beieinander.

Das System mit der geringsten Wirkstoffstabilität war die Sojaöl-Emulsion. Verglichen mit dem Miglyol, kam es nach 30 Tagen nahezu zu einer Verdopplung der Phenolkonzentration, auf einen Wert von ca. $37,5 \mu\text{g/mL}$.

Die Olivenöl-Emulsion schließlich lag mit einer Phenolkonzentration von ca. $34 \mu\text{g/mL}$ nach 30 Tagen zwischen dem Raps- und dem Sojaöl.

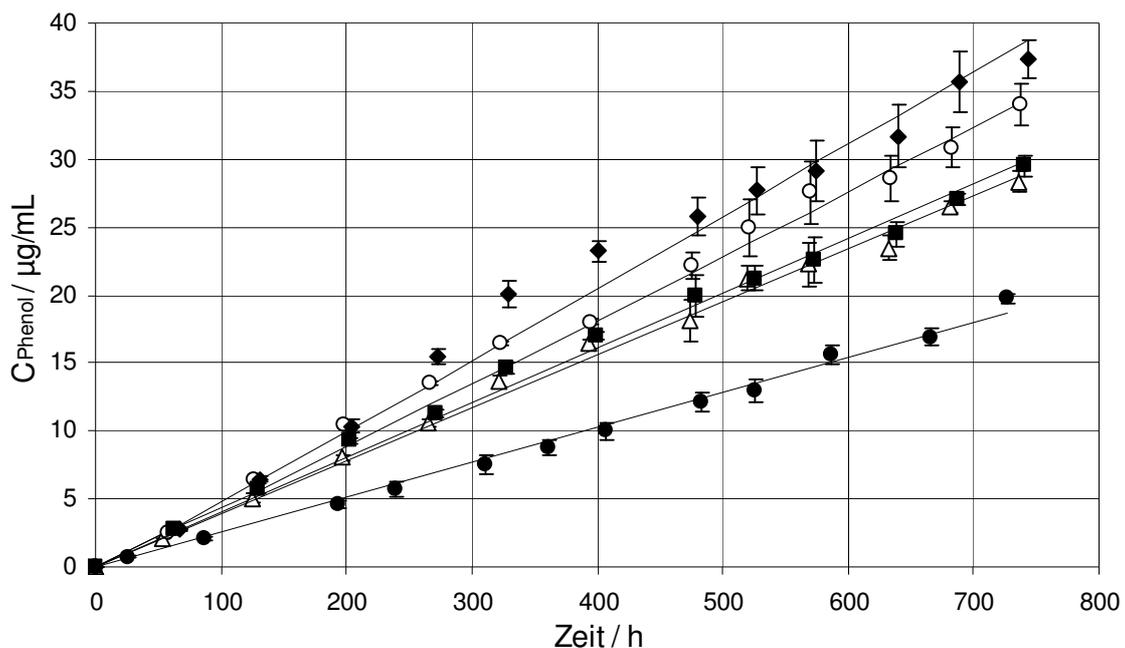


Tabelle 7.3.3-1 Konzentration des Abbauprodukts Phenol gegen die Zeit in Emulsionen mit den Ölphasen Miglyol (●), Rizinusöl (Δ), Rapsöl (■), Olivenöl (○) und Sojaöl (◆)

7.3.5 Diskussion

Aus den kinetischen Daten ergibt sich für die chemische Stabilität des Phenylsalicylats die folgende Rangfolge der fünf untersuchten Emulsionen:

Miglyol » Rizinusöl \approx Rapsöl > Olivenöl > Sojaöl

Diese Reihenfolge steht im Einklang mit den bisher aus dem kinetischen Modell abgeleiteten Gesetzmäßigkeiten.

Die Abbaureaktion von Phenylsalicylat in Emulsionen ist nullter Ordnung, und wird durch die konstante Phenylsalicylatkonzentration in der Wasserphase bestimmt. Diese ist ihrerseits abhängig vom Verteilungskoeffizienten des Phenylsalicylats zwischen Öl- und Wasserphase, und der Verteilungskoeffizient hängt wiederum von der Emulgatorkonzentration in der Wasserphase ab.

Ein Blick auf **Tab. 7.3.3-1** zeigt zunächst zweierlei: Der Phenylsalicylat-Verteilungskoeffizient liegt für Miglyol erheblich höher, als für die anderen Öle, und die Sättigungskonzentration von Lecithin im Öl ist nur für Miglyol und Rizinusöl nicht erreicht. Nimmt man deshalb für diese Systeme ähnliche Lecithinkonzentrationen in der Wasserphase an, so wird der Unterschied in der Abbaugeschwindigkeit nur vom Phenylsalicylat-Verteilungskoeffizienten bestimmt sein. Im Miglyolsystem ist die Phenylsalicylatkonzentration wesentlich stärker zum Öl hin verschoben; darum ist das Phenylsalicylat in dieser Emulsion bedeutend stabiler als in der Rizinusöl-Emulsion.

Die Phenylsalicylat-Verteilungskoeffizienten für die drei übrigen Öle liegen in der gleichen Größenordnung; jedoch ist die Lecithinkonzentration in der Wasserphase der Rapsöl-Emulsionen niedriger als in den Olivenöl- und Sojaöl-Emulsionen. Die Stabilität des Phenylsalicylats in den Rapsöl-Emulsionen muss also – wie tatsächlich beobachtet – höher sein als in den beiden anderen Emulsionen.

An ihre Grenzen stößt die Deutung nach dem kinetischen Modell, wenn die Rangordnung von Oliven- und Sojaöl zu erklären ist. Da sich die Lecithinkonzentrationen in der Wasserphase kaum unterscheiden, müsste der Phenylsalicylat-Verteilungskoeffizient bestimmend sein. Dieser bedingt aber eine höhere Phenylsalicylatkonzentration in der Wasserphase der Olivenöl-Emulsionen, und daraus ergäbe sich - im Widerspruch zum experimentellen Befund – eine höhere Phenylsalicylat-Stabilität im Sojaölsystem.

Zusammenfassend sei festgehalten: In Emulsionssystemen beeinflusst die Ölphase die Wirkstoffstabilität nicht nur über den Verteilungskoeffizienten des Wirkstoffs, sondern auch über die Löslichkeit des Emulgators und die dadurch bestimmte wässrige Konzentration. Hohe Tensidkonzentrationen und eine geringe Affinität der hydrolyseinstabilen Substanz zum gewählten Öl beeinträchtigen in Emulsionssystemen die chemische Stabilität.

7.4 Viskositätserhöhung der Ölphase mit Hilfe von Carnaubawachs

Die Überlegungen zur Viskosität des Öls im Kapitel 6.4.2.1 befassten sich mit der Möglichkeit, über eine hochviskose Ölphase den Arzneistofftransport vom Öl in die wässrige Phase einzuschränken und somit einen hydrolytischen Abbau zu verlangsamen. Wie die Ergebnisse im Kapitel 6.4.2.1 am Beispiel des hochviskosen Rizinusöls im Zweilagensystem zeigten, konnte jedoch keine Verarmung an Phenylsalicylat in der wässrigen Phase beobachtet werden. Vielmehr war der Massenfluss des Phenylsalicylats vom Öl ins Wässrige weiterhin schnell genug, den Substanzverlust durch die Hydrolyse auszugleichen. In diesem Kapitel soll die Wirkung einer noch drastischeren Viskositätserhöhung durch Dispersion einer festen Ölphase untersucht werden.

Im Jahre 1996 ist erstmalig ein Trägersystem mit festen Lipid-Nanopartikeln, **Solid Lipid Nanospheres (SLN)**, patentiert worden [167]. Die Nanopartikel, die im Gegensatz zu den Öltröpfchen in Emulsionssystemen aus Lipiden oder Lipidmischungen im festen Aggregatzustand bestehen, werden in einer wässrigen Phase dispergiert. Prinzipiell werden die SLNs auf zwei möglichen Wegen hergestellt – dem Kalt- und dem Heisshomogenisationsverfahren. Für die genaue Herstellung sei an dieser Stelle auf die Literatur verwiesen [5, 167, 168, 169, 170].

Der Nachteil dieses Trägersystems liegt in der begrenzten Beladungskapazität für den Wirkstoff. Diese ist abhängig von der Löslichkeit des Arzneistoffs in der Lipidschmelze sowie der Kristallstruktur des Lipids [171]. Je mehr Fehlstellen das Kristallgitter aufweist, desto mehr Raum steht für die Inkorporation des Wirkstoffs zur Verfügung.

Ebenso kann es während der Lagerung zur Ausbildung einer stabileren, geordneteren Kristallmodifikation und somit einer Reduktion des amorphen Anteils der Lipide kommen, so dass die Möglichkeit einer Verdrängung des Wirkstoffs aus den Lipidpartikeln besteht [172].

Diese Nachteile wurden mit der neuen Generation fester Lipid Nanopartikel, den **Nanostructured Lipid Carriers (NLC)**, minimiert. Hierbei dient als innere Phase eine Mischung eines festen Lipids mit einem bestimmten Anteil eines flüssigen Lipids. Dreierlei NLC-Typen werden unterschieden [173, 174]:

1. Der imperfekte Typ

Diese NLCs sind vergleichbar mit den SLN, jedoch kommt es aufgrund der Mischung chemisch sehr unterschiedlicher Lipide zu einer vermehrten Ausbildung von Fehlstellen im Kristallgitter und einer geringeren Tendenz zur Modifikationsänderung des Lipids während

des Zeitraums der Lagerung. Damit erhöht sich sowohl die Beladungskapazität als auch die Lagerstabilität.

2. Der strukturlose Typ

Mit einer speziellen Mischung von festen mit flüssigen Lipiden ist es möglich, eine Lipidphase zu erzeugen, welche beim Abkühlen zwar erhärtet, jedoch nicht auskristallisiert. Auch hiermit lassen sich die Beladungskapazität und die Lagerstabilität verbessern.

3. Der multiple O/F/W Typ

Dieser Typ ist dadurch gekennzeichnet, dass in der festen Lipidmatrix der Lipid-Nanopartikel kleinste flüssige Lipid-Nanokompartimente enthalten sind. Bei diesem System wird ausgenutzt, dass die Löslichkeit eines Stoffes in einem flüssigen Lipid höher ist als in einem festen.

Zur Produktion der NLCs wird in der Regel das Heisshomogenisationsverfahren angewandt (siehe Kapitel 7.4.1). Alternativ wird die „solvent diffusion“ Methode diskutiert. Für die Verfahrensschritte dieser Methode sei auf die Literatur verwiesen [175].

Diese neuartigen Carriersysteme sind für die Aufgabenstellung dieser Arbeit von großer Bedeutung, da gezeigt werden konnte, dass instabile Stoffe über die Inkorporation in die Lipidmatrix vor chemischer Zersetzung geschützt werden [176, 177, 178].

Ein Weg, NLCs zu erhalten, besteht in der Nutzung von Carnaubawachs als festem Lipidbestandteil [136, 179]. In Kombination mit der flüssigen Lipid-Komponente Miglyol wurden in dieser Arbeit NLCs über das Heisshomogenisationsverfahren hergestellt und die Stabilität der Modellsubstanz in diesem Träger untersucht werden. Um die Wirkstoffstabilität zu bewerten, wurden die ermittelten Abbaugeschwindigkeiten mit denen der Miglyol-Emulsionen verglichen, die mit 1,2 % Lecithin stabilisierten waren.

7.4.1 Durchführung

Beim Prozess des Heisshomogenisationsverfahrens zur Herstellung von NLCs wird aus dem festen und dem flüssigen Lipid unter Erwärmung eine Schmelze erzeugt. Nach dem Zusatz eines Emulgators wird die Schmelze heiß homogenisiert und zunächst eine Emulsion hergestellt. In der so gewonnenen Emulsion kommt es beim Abkühlen auf Raumtemperatur zur Ausbildung der NLCs.

Die Rezeptur der in dieser Arbeit untersuchten NLCs ist in **Tab. 7.4.1-1** wiedergegeben. Aus Gründen des beabsichtigten kinetischen Vergleichs wurde die mit 1,2 % Lecithin stabilisierte

Miglyol-Emulsion nur so weit abgewandelt, dass ein Teil des Miglyols durch Carnaubawachs ersetzt wurde.

Zur Herstellung der NLCs musste das verwendete Carnaubawachs zunächst gemörsert werden, da es aus sehr großen Plättchen bestand. Im Anschluss wurden das Carnaubawachs, das Phenylsalicylat und das Lecithin in dem Miglyol bei 75 °C gelöst. Nach ca. 20 Minuten war eine klare Schmelze gefertigt, welche sich beim Abkühlen auf Raumtemperatur verfestigte.

Tabelle 7.4.1-1 Rezeptur des untersuchten lipid carriers. Die Werte sind für ein Gesamtvolumen von 100 mL angegeben

Komponente	
Phenylsalicylat	250 mg
Miglyol	8,5 mL
Carnaubawachs	1500 mg
Lipoid E80 [®]	1200 mg
Natrium Oleat	30 mg
Isotonisierter Phosphatpuffer pH 7,4	90 mL

Im heißen Zustand wurden mit dieser Schmelze nach Kapitel 3.1 250 mL einer Emulsion produziert. Einzig der Parameter Temperatur wurde bei der Herstellung der Voremulsion, sowie der Homogenisation von 40 auf 80 °C erhöht. Die weiteren Parameter blieben unverändert.

7.4.2 Charakterisierung der NLCs

Zur Charakterisierung der NLCs wurden sie, wie auch das reine Carnaubawachs, nach Kapitel 3.4 mittels DSC vermessen. Die DSC-Daten sind in **Abb. 7.4.2.1** wiedergegeben. Sie zeigen bei einer Heizrate von 5 K/min die mehr oder weniger gut getrennten Phasenumwandlungen der im Wachs enthaltenen natürlichen Bestandteile. Im Bereich um 60 °C konnte die Schmelze von Cerotinsäuremyricylester, gefolgt von den Schmelzbereichen der restlichen Bestandteile von 70 °C und 86 °C, beobachtet werden. Auch nach mehrmaligem Aufheizen und kontrolliertem Abkühlen der Probe kristallisierten über 90 % der Probenmasse reproduzierbar aus.

In Mischung mit Miglyol kann eine deutliche Verschiebung der Schmelzeffekte zu tieferen Temperaturen (Schmelzpunktdepression), bei gleichzeitiger Signalverbreiterung, beobachtet

werden. Im Gesamtbild werden alle Phasenumwandlungen wie beim reinen Carnaubawachs detektiert. Zusätzliche Effekte konnten nicht ausgemacht werden.

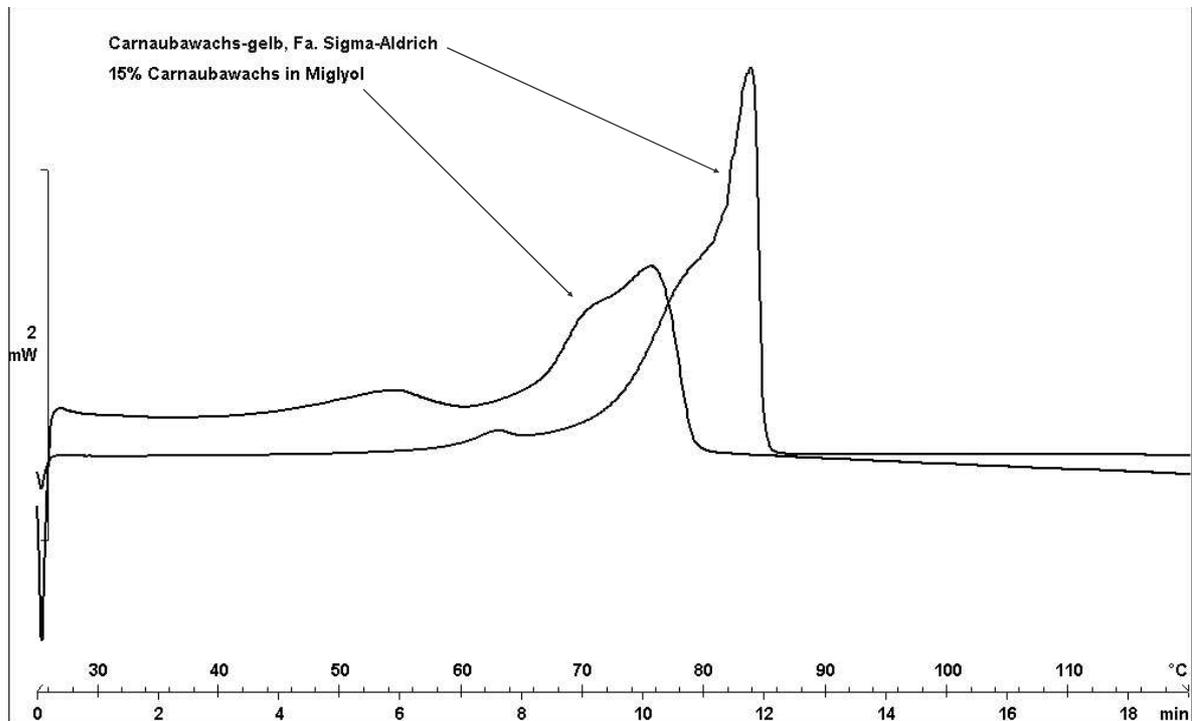


Abbildung 7.4.2-1 Vergleich des Schmelzverhaltens der festen Lipide Carnaubawachs und 15 % Carnaubawachs in Miglyol. Die Darstellung ist auf die Einwaage normiert.

Die Verschiebung der Phasenumwandlungstemperaturen von Carnaubawachs in Anwesenheit von Miglyol ist schon von Jenning beschrieben worden. Anhand verschiedener Miglyol/Compritol-Mischungen hat er einen linearen Zusammenhang zwischen dem Miglyolgehalt und der Schmelzpunktdepression nachgewiesen [180]. Er führte die Schmelzpunktdepression auf eine Störung des Kristallgitters durch das Miglyol zurück.

Aufgrund des sehr hohen Anteils an flüssigem Lipid, ist bei den hier untersuchten NLCs anzunehmen, dass es sich um den multiplen O/F/W Typ handelte, bei dem ein Teil des Miglyols flüssig in einer festen Lipidmatrix inkorporiert ist [173].

7.4.3 Physikalische Stabilität der Rezepturen

Im Zuge der kinetischen Messungen zeigte sich, dass das NLC-Trägersystem tatsächlich die Hydrolyse des Arzneistoffs erheblich verlangsamt. Deshalb wurde die bislang übliche Beobachtungsperiode von einem Monat auf 14 Wochen ausgeweitet. Dieser Endpunkt wurde

durch die physikalische Stabilität erzwungen. Nach 14 Wochen zeigte sich eine irreversible Phasentrennung.

Die Charakterisierung der Partikel weist eine kontinuierliche Zunahme der Teilchengrößen vom Start der Untersuchungen bis hin zu der letzten Charakterisierung nach 10 Wochen auf (siehe **Tab. 7.4.3-1**). Da es nach 14 Wochen zur Bildung größerer Agglomerate kam, welche auch nach intensivem Schütteln nicht wieder zu redispergieren waren, wurde die Untersuchung hier abgebrochen und auch auf eine weitere Analyse der Partikel verzichtet. Um die Phenolkonzentration am Ende zu bestimmen, wurden die NLCs unter Erwärmen mittels Ultra-Turrax dispergiert, um von jedem Ansatz eine Probe für die HPLC-Analyse zu ziehen.

Tabelle 7.4.3-1 Partikelcharakterisierung der Emulsionen zu Beginn und während der Testperiode

		Zu Beginn			Nach 4 Wochen			Nach 10 Wochen		
Methode		P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
PCS	Z-average / nm	328	305	353	346	352	363	360	415	420
	PI	0,25	0,27	0,30	0,39	0,35	0,41	0,44	0,49	0,49
LD	D50 / μm	0,496	0,530	0,642	0,687	0,687	0,746	0,712	0,832	0,846
	D99 / μm	1,562	1,512	1,789	2,134	2,125	2,206	3,012	3,125	3,412
Zetapotential / mV		-46,6	-46,9	-45,9	-48,6	-49,7	-48,9	-50,6	-50,4	-51,2

Bereits nach 10 Wochen war mit dem Auge ein leichtes Flocken der Partikel zu erkennen. Diese Flockungen waren jedoch durch ein Aufschütteln wieder zu dispergieren, so dass mit den NLCs weiter gearbeitet wurde. Die geringe physikalische Stabilität ist mit dem Einsatz eines Puffers als wässrige Phase zu erklären. Dieser war nötig, um den pH-Wert konstant zu halten, da die Kinetik durch eine pH-Wert Änderung verfälscht würde. Der Puffer wies jedoch eine sehr hohe Elektrolytkonzentration im Wässrigen auf, so dass es zu einer Reduktion des Zetapotentials kam sowie als Konsequenz zu einer Reduktion der elektrostatischen abstoßenden Kräfte, welches eine irreversible Aggregation der Partikel wahrscheinlicher machte (siehe Kapitel 3.3.2). Durch die Ausdehnung des bislang gewählten Beobachtungszeitraums von vier Wochen kamen diese Effekte zum Tragen.

7.4.4 Chemische Stabilitätsdaten

Wie erwartet, zeigten die chemischen Stabilitätsdaten der NLCs eine klare Überlegenheit gegenüber den Miglyol-Emulsionen (siehe **Abb. 7.4.4-1**).

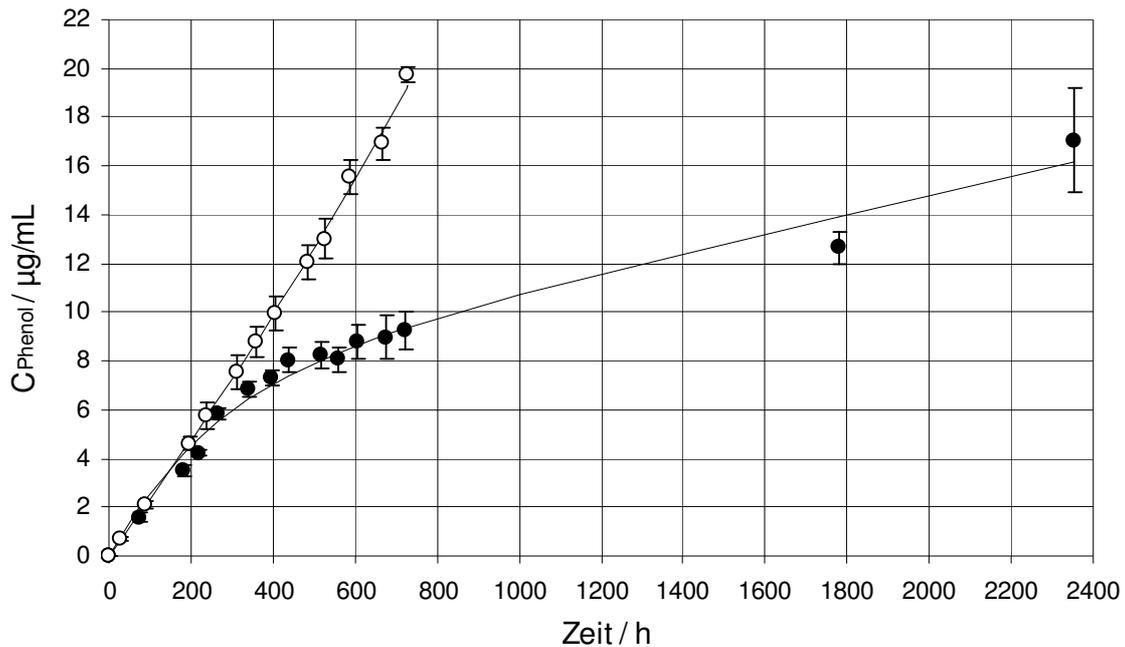


Tabelle 7.4.4-1 Konzentration des Abbauprodukts Phenol gegen die Zeit bei den NLCs der Lipide Miglyol und Carnaubawachs (●) sowie den lecithinstabilisierte Miglyol Emulsionen (○)

Es fällt auf, dass der Kurvenverlauf von dem der Emulsionen abweicht. Bis zu den ersten ca. 250 h der Untersuchung laufen beide Kurven annähernd parallel; danach knickt die Kurve des NLC-Systems jedoch im Sinne einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit ab. Als die Untersuchung nach ca. 2350 h abgebrochen wurde, lag die Phenolkonzentration bei ca. 17 µg/mL. Dieser Wert wurde bei den Emulsionssystemen bereits nach ca. 650 h erreicht.

7.4.5 Diskussion

Die Vermutung, dass eine hydrolyseempfindliche Substanz über eine Viskositätserhöhung der Ölphase stabilisiert werden kann, wurde anhand des NLC-Systems bestätigt. Es war möglich, den Materialtransport des Modellarzneistoffs in die wässrige Phase zu vermindern und die Hydrolyse auf diesem Weg zu verlangsamen.

Um den Kurvenverlauf der Abbaukinetik im NLC-System zu deuten, muss im kinetischen Modell einer Verarmung der der Phenylsalicylatkonzentration in der Wasserphase durch den gehinderten Massentransport aus der Ölphase Rechnung getragen werden. Erst wenn die Abbaugeschwindigkeit infolge der Phenylsalicylat-Konzentrationsabnahme so langsam geworden ist, dass sich der Verlust durch Hydrolyse mit dem Nachtransport aus der Ölphase die Waage hält, bleibt die Phenylsalicylatkonzentration, und damit die Abbaugeschwindigkeit, wieder konstant.

Für die Beschreibung dieses Ablaufs sei wieder die Rückreaktion der Veresterung vernachlässigt. Außerdem soll in erster Näherung die Katalyse durch das Phenol unberücksichtigt bleiben. Für die Bildung des Phenols im Gesamtsystem folgt dann aus Gleichung (24)

$$\frac{dX}{dt} = h [\text{PS}] \quad (60)$$

Die Phenylsalicylatkonzentration in der Wasserphase bleibt jetzt nicht mehr konstant: Phenylsalicylat geht einerseits durch Verseifung verloren, andererseits wird es mit dem Massenfluss j aus der Ölphase nachgeliefert.

$$\frac{d[\text{PS}]}{dt} = -h [\text{PS}] + j \quad (61)$$

Unter der Anfangsbedingung der Phenylsalicylatkonzentration $[\text{PS}]_0$ zur Zeit $t = 0$ lautet die Lösung der Differentialgleichung (61):

$$[\text{PS}] = \left([\text{PS}]_0 - \frac{j}{h} \right) e^{-ht} + \frac{j}{h} \quad (62)$$

Eingesetzt in Gleichung (60) ergibt sich

$$\frac{dX}{dt} = (h [\text{PS}]_0 - j) e^{-ht} + j \quad (63)$$

Mit der Lösung dieser Differentialgleichung wiederum erhält man die Zeitabhängigkeit der Phenolkonzentration im Gesamtsystem:

$$X = \left([\text{PS}]_0 - \frac{j}{h} \right) (1 - e^{-ht}) + j t, \quad (64)$$

die mit den Parametern $[\text{PS}]_0$, j und h an die Messwerte der **Abb. 7.4.4.-1** angepasst wurde. Aus der Anpassung ergaben sich eine Anfangskonzentration des Phenylsalicylats von $8 \mu\text{g/mL}$, ein Massenfluss aus der Ölphase von $4,0 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL h}$ und eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von $3,9 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$.

Die Anfangskonzentration des Phenylsalicylats muss durch den Herstellungsprozess bedingt sein. Solange während der Homogenisation bei $80 \text{ }^\circ\text{C}$ die Mischung von Carnaubawachs und Miglyol noch geschmolzen ist, setzt sich die Phenylsalicylatkonzentration zwischen Öl- und Wasserphase ins Gleichgewicht. Erst wenn der Materialtransport gehindert ist, verarmt Phenylsalicylat in der Wasserphase durch seine Verseifung.

Wie die Ergebnisse zeigen, wird die Abbaugeschwindigkeit im NLC-System vom Nachtransport des Phenylsalicylats aus der Ölphase bestimmt. In der Formulierungsentwicklung eines NLC-Systems gilt es, diesen Nachtransport durch die Wahl der Zusammensetzung so weit einzuschränken, dass der Abbau für eine brauchbare Lagerstabilität hinreichend verlangsamt wird.

7.5 Verfestigung des Emulgatorfilms mit Hilfe von Cholesterol

Wie mit der Verfestigung der Ölphase kann auch versucht werden, durch Modifikation des Grenzflächenfilms eine Transportbarriere zu schaffen, die den Abbau des Arzneistoffs verlangsamt. In Kapitel 6.2 wurde gezeigt, dass ein Emulgatorfilm allein keine hinreichende Diffusionsbarriere schafft. Jedoch ist für das Cholesterol als Zusatzstoff in diesem Zusammenhang in der Literatur ein interessanter Effekt beschrieben worden. Es ist in der Lage, Phospholipidmembranen zu „verfestigen“ [133, 135, 181]. Dies bedeutet, dass Cholesterol die Mikroviskosität der Membranen erhöht; wobei man unter dem Begriff der Mikroviskosität die Anwendung des makroskopischen Konzeptes der Viskosität auf mikroskopische (makromolekulare) Systeme zu verstehen hat. Die Bestimmung der Mikroviskosität erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenz-Polarisationsspektroskopie [182].

Die Erklärung für diesen Effekt ergibt sich aus der hydrophoben Wechselwirkung des Cholesterols mit den Acyl-Seitenketten der Phospholipide, wodurch es zu einer dichteren und festeren Packung der Phospholipide kommt und demzufolge die Viskosität der Membranen steigt [133].

Ob die Erhöhung der Mikroviskosität des Emulgatorfilms lecithinstabilisierter Emulsionen, mittels Cholesterol, einen Einfluss auf die Wirkstoffstabilität zeigt, wurde untersucht und soll in diesem Kapitel beschrieben werden. Zu diesem Zweck wurden Miglyol-Emulsionen mit einem 10, 30 und 50 %igem Cholesterolanteil am Lecithingehalt hergestellt und die Abbaukinetik mit den Ergebnissen der Emulsionen ohne Cholesterol verglichen. Ausgewertet wurden die Daten mittels Gleichung (33) aus dem Kapitel 6.3.2. Als Zielgröße diente der Parameter h_0 , also die Geschwindigkeitskonstante in Abwesenheit einer Katalyse durch das Abbauprodukt Phenol.

7.5.1 Durchführung

Die Emulsionen wurden nach der Vorschrift für Emulsionen aus dem Kapitel 3.1 ohne Abweichungen hergestellt. Die genaue Rezeptur der untersuchten Emulsionen ist in **Tab 7.5.1-1** wiedergegeben.

Tabelle 7.5.1-1 Rezeptur der untersuchten Emulsionen mit unterschiedlichen Cholesterolanteilen am Emulgator. Die Werte sind für ein Gesamtvolumen von 100 mL angegeben

Komponente	Emulsion 1	Emulsion 2	Emulsion 3
Phenylsalicylat	250 mg	250 mg	250 mg
Miglyol	10 mL	10 mL	10 mL
Cholesterol	120 mg	360 mg	600 mg
Lipoid E80 [®]	1080 mg	840 mg	600 mg
Natrium Oleat	30 mg	30 mg	30 mg
Isotonisierter Phosphatpuffer pH 7,4	90 mL	90 mL	90 mL

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass sich die Rezeptur an der mit 1,2 % Lecithin stabilisierten Miglyol-Emulsion orientierte. Dies war aus Gründen der exakten Vergleichbarkeit erforderlich. Als einziger Rezepturbestandteil wurde ein Anteil des Emulgators Lipoid E80[®] durch das Cholesterol ersetzt.

Von jeder Emulsion wurden 250 mL hergestellt und die chemische sowie die physikalische Stabilität über vier Wochen beobachtet.

7.5.2 Physikalische Stabilität der Rezepturen

Betrachtet man die Partikelgrößenbestimmung sowie das Zetapotential der hergestellten Emulsionen (siehe **Tab. 7.5.2-1**), fällt zunächst auf, dass es einen Zusammenhang zwischen diesen Parametern und dem Cholesterolgehalt gab. Mit zunehmendem Gehalt an Cholesterol stiegen sowohl die Partikelgrößen als auch das Zetapotential an. Die Zunahme der Partikelgrößen ist mit der, auf Kosten des Cholesterols, abnehmenden Lecithinkonzentration zu begründen. Dieser Zusammenhang wurde schon im Kapitel 7.1.3.3 diskutiert. Das Cholesterol ist zwar als Co-Tensid wirksam [111], jedoch offensichtlich nicht in der Lage, die fehlende Lecithinkonzentration zu kompensieren.

Tabelle 7.5.2-1 Partikelcharakterisierung der Emulsionen zu Beginn und am Ende der Testperiode

Zu Beginn										
	Methode	10 % Cholesterol			30 % Cholesterol			50 % Cholesterol		
		P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
PCS	Z-average / nm	218	215	220	254	262	252	304	300	313
	PI	0,08	0,14	0,12	0,1	0,09	0,11	0,23	0,11	0,11
LD	D50 / μm	0,247	0,253	0,231	0,285	0,259	0,305	0,419	0,389	0,385
	D99 / μm	0,681	0,673	0,618	0,783	0,769	0,749	1,102	1,058	1,128
Zetapotential /mV		-45,8	-45,1	-42,7	-49,0	-48,7	-49,0	-53,7	-53,4	-50,8
Nach 4 Wochen										
PCS	Z-average / nm	221	220	224	262	258	264	315	330	320
	PI	0,12	0,12	0,12	0,11	0,10	0,12	0,17	0,20	0,16
LD	D50 / μm	0,273	0,264	0,258	0,311	0,312	0,310	0,407	0,417	0,412
	D99 / μm	0,649	0,651	0,630	0,810	0,837	0,916	1,491	1,567	1,412
Zetapotential /mV		-45,0	-46,5	-43,2	-49,0	-49,5	-48,5	-52,9	-53,6	-54,0

Die Abhängigkeit des Zetapotentials vom Cholesterolgehalt ist eventuell ein weiteres Indiz für den membranverfestigenden Effekt des Cholesterols in den Phospholipidschichten. Bedingt durch eine dichtere Packung der Emulgatormoleküle in der Grenzfläche, aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Cholesterol, wird die Flächendichte der Moleküle an der Grenzfläche ansteigen. Diese Verdichtung geht mit einem Anstieg der Ladungsdichte einher, da im Grenzflächenfilm ladungstragende Moleküle, wie beispielsweise das Oleat oder die Lyso-Phosphatidylcholine, enthalten sind.

Physikalisch erwiesen sich die Emulsionen als lagerstabil. Zwar weist der Blick auf die Emulsionen mit einem Cholesterolanteil von 30 und 50 % auf eine leichte Zunahme der Partikelgrößen hin. In allen drei Emulsionen war jedoch über den gesamten Untersuchungszeitraum keine Phasentrennung zu erkennen.

7.5.3 Chemische Stabilitätsdaten

Wie aus den Zeitabhängigkeiten in **Abb. 7.5.3-1** ersichtlich, zeigen sich deutliche Unterschiede in der Abbaugeschwindigkeit der Emulsionen.

Die Emulsionen ohne einen Cholesterolzusatz zeigten die schnellste Zunahme der Phenolkonzentration pro Zeit. Mit ansteigenden Cholesterolanteilen sank die

Abbaugeschwindigkeit des Phenylsalicylats. Bei einem Cholesterolanteil von 50 %, lag die Phenolkonzentration nach ca. 30 Tagen mit annähernd 12 $\mu\text{g/mL}$ 40 % unter der erreichten Phenol-Endkonzentration von 20 $\mu\text{g/mL}$ ohne Cholesterolzusatz.

Zu beachten ist jedoch, dass für die Zugabe von Cholesterol der Anteil an Lecithin verringert wurde und dass nach den Befunden aus Abschnitt 6.3 schon die Abnahme der Lecithinkonzentration den hydrolytischen Abbau verlangsamt. Um die Auswirkung des Cholesterols zu fassen, müssen also die Einflüsse beider Komponenten voneinander separiert werden. Diese Separation ist anhand des kinetischen Modells möglich und wird im Folgenden vorgenommen.

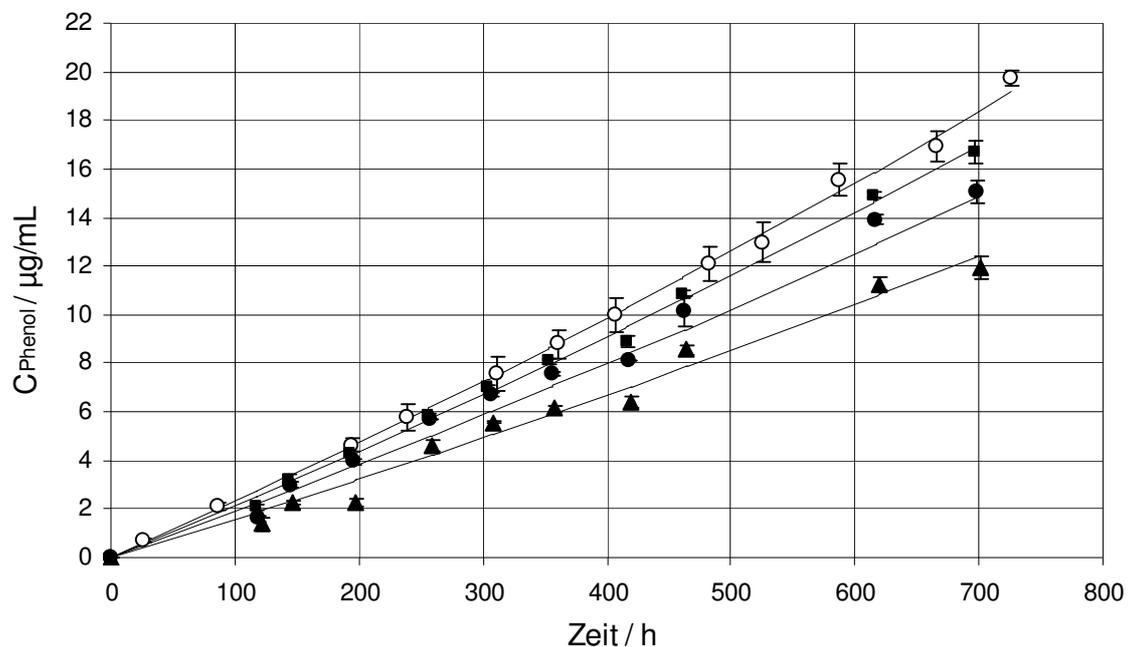


Tabelle 7.5.3-1 Konzentration des Abbauprodukts Phenol gegen die Zeit in Emulsionen mit dem Emulgator Lecithin und einem Cholesterolgehalt von 0 % (○), 10 % (■), 30 % (●) und 50 % (▲)

7.5.4 Diskussion

In **Abb. 7.5.3-1** sind die Ausgleichskurven nach Anpassung der Gleichung (33) an die Messpunkte eingezeichnet. Die Anpassung ergibt die Parameter H_0 und H , aus denen nach Gleichung (27) und (28) die Konstanten h_0 und η berechnet werden können, wenn die Phenylsalicylatkonzentrationen und der Phenol-Verteilungskoeffizient bekannt sind. Diese beiden Größen wurden den Daten des Zweilagensystems entnommen. Hierfür wurden die linearen Zusammenhänge zwischen der Lecithinkonzentration und $[\text{PS}]$ sowie $1/\kappa_p$ (siehe Kapitel 6.3) ausgenutzt. Zur Berechnung wurde näherungsweise nur die

Lecithinkonzentration der Emulsionen berücksichtigt und ein potentieller Einfluss des Cholesterols auf die Arzneistoffverteilung vernachlässigt. Der Lecithinverlust an die Grenzfläche der Emulsionen wurde, wie im Kapitel 7.1.3.2 beschrieben, in Betracht gezogen, um die Lecithinkonzentration im Wässrigen zu ermitteln. Die so berechneten Parameter sind in der **Tab. 7.5.4-1** zusammengestellt.

Wäre das Cholesterol wirksam für die Ausbildung einer Diffusionsbarriere, so müsste nach obiger Berechnung der Wert h_0 mit steigender Cholesterolkonzentration abnehmen. Außerdem wäre ein Kurvenverlauf mit einer Beugung in Richtung abnehmender Steigung ähnlich dem in **Abb. 7.4.4-1** zu erwarten. Beides ist nicht der Fall. Die errechneten h_0 -Werte schwanken zwischen 8,7 und 9,2 h^{-1} und liegen sogar leicht über dem Wert von 8,6 h^{-1} , welcher ohne einen Cholesterolzusatz ermittelt wurde.

Aus diesen Daten ist zu schließen, dass einzig die Reduktion des Lecithingehalts der einzelnen Emulsionen die Abbaukinetik beeinflusste. Das Cholesterol war nicht in der Lage, über eine Erhöhung der Mikroviskosität der Emulgatorschicht Einfluss auf die Abbaukinetik des Phenylsalicylats zu nehmen. Eine Diffusionsbarriere wurde nicht ausgebildet.

Tabelle 7.5.4-1 Die Parameter h_0 und η der Geschwindigkeitskonstanten h sowie die Konzentration des Phenylsalicylats im wässrigen ([PS]) als auch die über den Grenzflächenverlust korrigierte Lecithinkonzentration für die Emulsionen mit unterschiedlichen Cholesterolanteilen am Emulgator

Cholesterolanteil	$c_L /$ mg/ml	[PS] / mmol/L	$A_V /$ cm ² /ml	$h_0 /$ h ⁻¹	$\eta /$ L/(mmol h)
0 %	7,3	0,277	28300	8,64 E-04	2,73 E-03
10 %	6,3	0,256	27272	8,71 E-04	2,63 E-03
30 %	4,5	0,206	23529	9,17 E-04	3,32 E-03
50 %	4,0	0,192	20000	8,83 E-04	3,42 E-03

Die Proportionalitätskonstante η aus der Gleichung (25) setzt, im Sinne einer katalytischen Wirkung, die Geschwindigkeitskonstante des hydrolytischen Abbaus in Beziehung zur Phenolkonzentration im Wässrigen. Die hierfür errechneten Werte in **Tab. 7.5.4-1** zeigen einen Anstieg mit zunehmenden Cholesterol- und abnehmenden Lecithinanteil. Dem kinetischen Modell zufolge stehen damit weniger Liposomen für die Inkorporation des katalytisch wirksamen Abbauprodukts zur Verfügung und die erhöhte freie Konzentration des letztgenannten sorgt für eine verstärkte Katalyse: η nimmt zu.

7.6 Eignungstest einer α -Tocopherol-Formulierung

Als eigenständiges Kapitel sollen hier die Ergebnisse mit einer α -Tocopherol-Formulierung wiedergegeben werden. Da die Versuche, eine Tocopherol-Emulsion mit Hilfe des Emulgators Lecithin zu produzieren, fehlgeschlagen sind (die Ergebnisse sind in dieser Arbeit nicht gezeigt), konnte es im Kapitel 7.3 nicht als weitere Ölkomponente aufgenommen werden.

In parenteralen Fettemulsionen findet dieses hochviskose Lipid schon länger als Antioxidans oder zur parenteralen Supplementierung von Vitamin E Anwendung [183, 184, 185, 186]. Relativ neu ist hingegen die Nutzung des α -Tocopherols als Ölphase arzneistoffhaltiger O/W-Emulsionen. Die Vorteile dieses Arzneistoffträgers werden im Potential einer verzögerten Freisetzung sowie einer Stabilisierung labiler Arzneistoffe gesehen [76, 187, 188]. In den Publikationen werden diese positiven Erwartungen auf lipophile Arzneistoffe mit einer hohen Löslichkeit im α -Tocopherol begrenzt. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, da bei einer geringen Löslichkeit in der Ölphase der Anteil in den wässrigen Kompartimenten erhöht und somit die Wirkstoffstabilität abnimmt.

Das Potential dieser Emulsionen, einen im wässrigen instabilen Wirkstoff zu stabilisieren, kann nach Kapitel 7.4 auf die hohe Viskosität des α -Tocopherols zurückgeführt werden. Die Viskosität des in dieser Arbeit untersuchten α -Tocopherols lag bei 5174 mPas und war somit ca. fünfmal so hoch wie die Viskosität des Rizinusöls (siehe **Tab. 6.4.2.1-1**). Im Kapitel 6.4, wo der Einfluss der Viskosität des Öls auf die Abbaukinetik betrachtet wurde, war das Rizinusöl das Öl mit der höchsten Viskosität. Dort zeigte sich allerdings, dass seine hohe Viskosität von 1090 mPas noch nicht ausreichte, den Massenfluss der Modellsubstanz in die wässrige Phase zu inhibieren.

Wie erwähnt, war eine Emulgierbarkeit des α -Tocopherols mit dem Emulgator Lecithin nicht möglich, so dass auf eine alternative Formulierung zurückgegriffen werden musste, welche als Emulgator das TPGS enthielt. Die genaue Rezeptur und Herstellung sind in dem Kapitel 7.6.1 dargelegt. Anhand dieser Formulierung sollte überprüft werden, ob die Modellsubstanz, im Vergleich zu der lecithinstabilisierten Miglyol-Emulsionen, in diesem neuen Arzneistoffträger einen Stabilitätsgewinn erfährt. Die Miglyol-Emulsion diene als Vergleich, da sie eine Rezeptur aufwies, wie sie in den handelsüblichen Emulsionen Anwendung findet (siehe Rote Liste 2006).

7.6.1 Durchführung

Lambert et al [188] fanden eine Tocopherolformulierung, welche sich für den Arzneistoff Paclitaxel, nicht zuletzt hinsichtlich der Wirkstoffstabilität, als geeigneter Träger erwies. Diese Emulsion diente als Vorlage zur Formulierung des Phenylsalicylats.

Die Rezeptur der untersuchten Emulsionen ist in **Tab. 7.6.1-1** gegeben. Zur Herstellung wurden in einem Rundkolben das Phenylsalicylat, das Tocopherol, das TPGS und das Ascorbyl-6-Palmitat bei 40-45 °C in ca. 10-fachem Volumen wasserfreien Ethanol gelöst. Nach der vollständigen Lösung der Feststoffe wurde der Ethanol in einem Rotationsverdampfer unter Vakuum bei 40 °C auf einen Restgehalt von 0,3 % abgedampft.

Tabelle 7.6.1-1 Rezeptur der alternativen Tocopherol-Formulierung. Die Werte sind für ein Gesamtvolumen von 100 mL angegeben

Komponente	
Phenylsalicylat	250 mg
Tocopherol	3000 mg
TPGS	2000 mg
Ascorbyl-6-Palmitat	250 mg
Isotonisierter Phosphatpuffer pH 7,4	90 mL

Die verbleibende zähe Masse bildete ein selbstemulgierendes System. Schüttelte man dieses mit der auf 40 °C erwärmten isotonisierten Pufferlösung, bildete sich spontan eine Emulsion, die visuell keine Phasentrennung erkennen ließ. Diese Voremulsion wurde im Anschluss bei 40 °C mittels eines Hochdruckhomogenisators homogenisiert. Zyklenzahl und angewandte Drücke beim Homogenisieren sind in **Tab. 7.6.1-2** wiedergegeben.

Tabelle 7.6.1-2 Herstellungsparameter bei der Hochdruckhomogenisation der Tocopherolformulierung

800 bar	600 bar	400 bar
Zyklen	Zyklen	Zyklen
2	2	2

Die so hergestellten Emulsionen wurden über einen Zeitraum von vier Wochen auf die chemische und der physikalische Stabilität geprüft.

Hinsichtlich der chemischen Stabilität des Arzneistoffs wird in den Publikationen vor allem die Löslichkeit vom Arzneistoff im Tocopherol hervorgehoben. Deshalb ist es aufschlussreich, den Verteilungskoeffizienten des Phenylsalicylats zwischen der isotonierten Pufferlösung und dem α -Tocopherol mit Hilfe des Zweilagensystems zu ermitteln. Hierfür fand der apparative Aufbau nach Kapitel 6.4.1 Anwendung. Die Phenylsalicylatkonzentration wurde mittels HPLC, über einen Untersuchungszeitraum von einer Woche, in der wässrigen Phase verfolgt. Zur Berechnung des Verteilungskoeffizienten wurde für die Ölkonzentration die Ausgangskonzentration eingesetzt.

Ferner war es für die Interpretation der kinetischen Daten wichtig, die Abbaukinetik des Phenylsalicylats im α -Tocopherol zu kennen. Deshalb wurde, entsprechend dem Versuchsablauf des Kapitels 5, der Abbau des Phenylsalicylats im Einphasensystem verfolgt.

7.6.2 Verteilung des Phenylsalicylats (α -Tocopherol/Isotonisierter Puffer)

Die ermittelten Phenylsalicylatkonzentrationen im Wässrigen sind in der **Abb. 7.6.2-1** wiedergegeben.

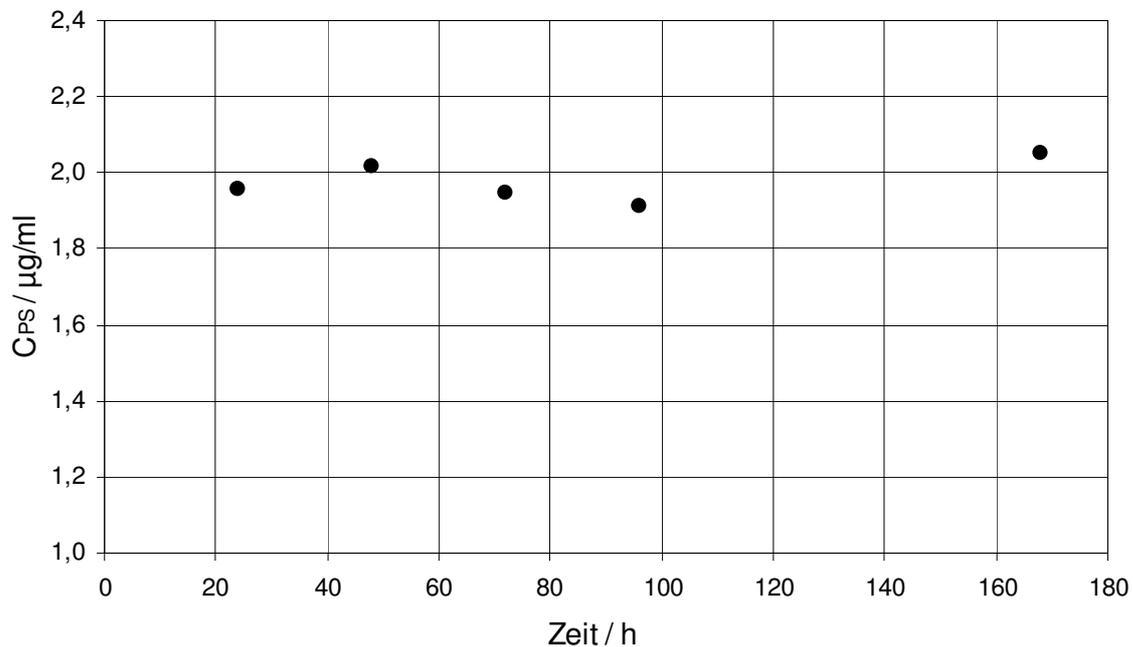


Abbildung 7.6.2-1 Phenylsalicylatkonzentration in der wässrigen Phase des Zweilagensystems, mit Tocopherol als Ölphase, gegen die Zeit

Die Phenylsalicylatkonzentration bleibt über 150 h nahezu konstant. Folglich halten sich Abbau und Nachlieferung aus der Ölphase die Waage. Das Konzentrationsverhältnis zwischen Öl- und Wasserphase beträgt ca. 12650.

Auch mit dem α -Tocopherol als Lipidphase kam es, aufgrund der ausgeprägten Lipophilie der Modellsubstanz, nur zu einer sehr geringen Abgabe an die wässrige Phase. Das Konzentrationsverhältnis lag in der Größenordnung der in dieser Arbeit untersuchten Öle, mit Ausnahme des Miglyols, welcher mit einem Wert von ca. 20700 um das gut anderthalbfache höher war (siehe **Tab. 6.4.2.2-1**).

7.6.3 Physikalische Stabilität der Rezepturen

Wie aus den Daten in der **Tab. 7.6.3-1** ersichtlich ist, war die Rezeptur, wie auch die Herstellmethode, gut geeignet, O/W-Emulsionen zu produzieren. Die Bestimmung der Teilchengröße mittels PCS ergab einen Z-average-Wert von ca. 170 nm. Die Teilchengrößenverteilung war mit einem Polydispersitätsindex von 0,16-0,20 gerade noch als eng zu bezeichnen.

Tabelle 7.6.3-1 Partikelcharakterisierung der Emulsionen zu Beginn und am Ende der Testperiode

		Zu Beginn			Nach 4 Wochen		
Methode		P1	P2	P3	P1	P2	P3
PCS	Z-average / nm	174	171	166	170	168	172
	PI	0,20	0,18	0,16	0,25	0,22	0,25
LD	D50 / μm	0,277	0,265	0,255	0,312	0,317	0,355
	D99 / μm	0,987	0,912	0,878	1,098	1,012	1,101
Zetapotential /mV		-65,3	-67,0	-66,2	-67,2	-68,0	-67,8

Bezüglich der Lagerstabilität konnte mittels der organoleptischen Prüfung des Emulsions-Aussehens während des gesamten Untersuchungszeitraumes von vier Wochen keine Veränderung, geschweige denn eine Phasentrennung festgestellt werden. Ebenso ergab die Charakterisierung der Teilchen nur eine geringe Zunahme in der Breite der Verteilung und der Partikelgröße. Das Zetapotential war nach vier Wochen nahezu unverändert.

7.6.4 Chemische Stabilitätsdaten

Während der Untersuchungen am Einphasensystem Tocopherol konnten die Abbauprodukte Phenol und Salicylsäure über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht detektiert werden. Auch die Wirkstoffkonzentration blieb beim α -Tocopherol über den untersuchten Zeitraum hinweg konstant. Die ermittelten Wirkstoffkonzentrationen sind in **Tab. 7.6.4-1** aufgelistet.

Auch im Fall des Tocopherols darf also eine Hydrolyse des Wirkstoffs in der organischen Phase vernachlässigt werden.

Tabelle 7.6.4-1 Auflistung der Phenylsalicylatkonzentrationen in dem bei 60 °C gelagerten Tocopherol über den Beobachtungszeitraum von zwei Wochen

Lipid	Probe	Phenylsalicylatkonzentration / $\mu\text{g/mL}$		
		Start	1 Woche	2 Wochen
Tocopherol	P1	16,2	15,9	16,1
	P2	15,2	15,5	15,0
	P3	15,5	15,8	15,5

Die mit der Emulsion erhobenen Messdaten belegen, dass im Vergleich zu den mit 1,2 % Lecithin stabilisierten Miglyol-Emulsionen die Tocopherolformulierung als neu untersuchter Arzneistoffträger eine bedeutend höhere Abbaugeschwindigkeit der Modellsubstanz Phenylsalicylat aufweist. Das Abbauprodukt Phenol erlangte nach dem Beobachtungszeitraum von vier Wochen eine Konzentration von ca. 155 $\mu\text{g/mL}$ und war somit etwa 7,5-mal so hoch wie die entsprechende Phenolkonzentration der Vergleichsemulsionen (siehe **Abb. 7.6.4-1**). Eine ausreichende Stabilisierung der Modellsubstanz, wie es für das Paclitaxel nachgewiesen werden konnte [188], war mit dieser Formulierung nicht möglich.

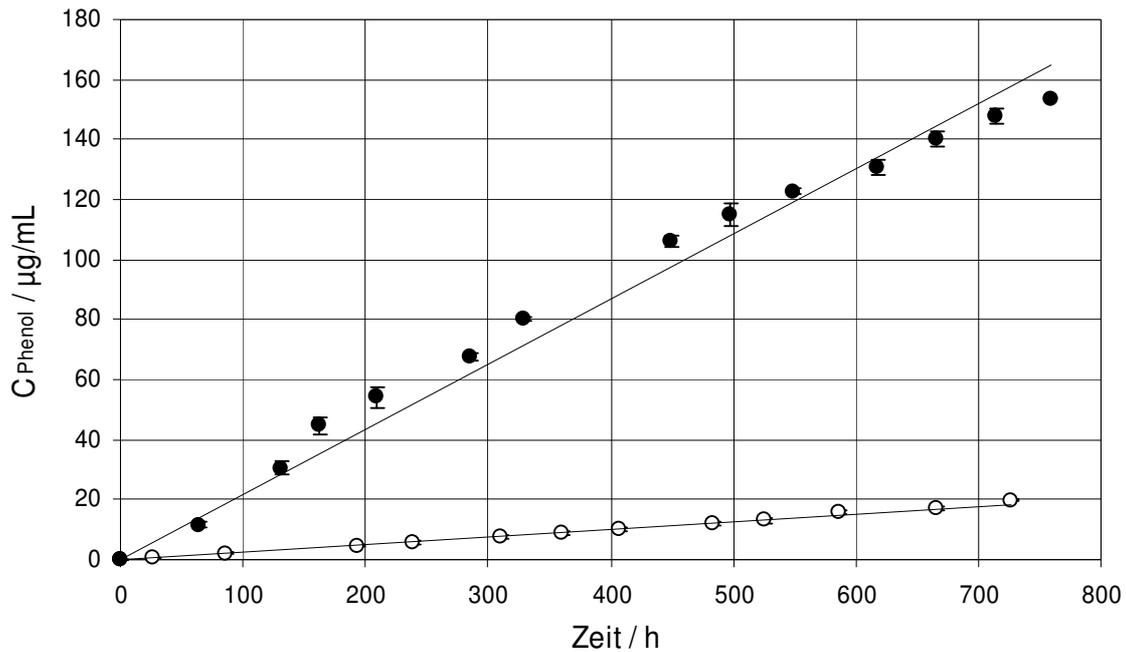


Abbildung 7.6.4-1 Konzentration des Abbauprodukts Phenol gegen die Zeit der alternativen Tocopherol Formulierung (●) verglichen mit den Miglyol-Emulsionen, stabilisiert mit 1,2 % Lecithin, aus dem Kapitel 7.1 (○)

7.6.5 Diskussion

Die Tocopherolformulierung wies eine unerwartet schnelle hydrolytische Zersetzung der Modellsubstanz auf. Die Phenolendkonzentration war fast um das Achtfache höher, als in der Miglyol-Emulsion.

Da auch mit dieser Formulierung keine Hydrolyse der Modellsubstanz im Lipidkern abläuft, muss die Ursache neben dem geringeren Verteilungskoeffizienten in dem Beitrag des Emulgators liegen. Verglichen mit den Miglyol-Emulsionen, wurde in der Tocopherol-Formulierung die ca. 1,7-fache Menge an Emulgator eingesetzt, um eine um ca. 70 % geringere lipophile Phase zu stabilisieren. Der Emulgatorüberschuss, d.h., der Anteil am Emulgatorgehalt, welcher nicht in der Grenzfläche lokalisiert ist, wird bei dieser Rezeptur also entschieden höher sein.

Wie im Kapitel 6.3 gezeigt wurde, führte die Konzentrationserhöhung des Emulgators Lecithin, zu einer Konzentrationserhöhung des Wirkstoffs in der wässrigen Phase. Diese Konzentrationserhöhung ging einher mit einer beschleunigten Hydrolyse der Modellsubstanz.

Man kann diesen Zusammenhang nun nutzen, um die schnelle hydrolytische Zersetzung des Phenylsalicylats in der Tocopherol-Emulsion zu erklären. In der letztgenannten Formulierung wird eine sehr hohe Konzentration an Emulgator in der wässrigen Phase zu einer starken Zunahme der wässrigen Phenylsalicylatkonzentration und dem daraus resultierenden schnelleren Abbau geführt haben.

7.7 Überprüfung des katalytischen Effekts des Isotonisierungsmittels am Emulsionssystem

Im Einphasensystem wurde ein Einfluss des Isotonisierungsmittels auf die Abbaukinetik des Phenylsalicylats beobachtet (siehe Kapitel 4.2). Im Folgenden wird untersucht, ob sich diese Beobachtung im Emulsionssystem bestätigt. Alle bislang untersuchten Emulsionen enthielten das Isotonisierungsmittel Glycerol. Zur Prüfung des Einflusses wurde als weiteres Isotonisierungsmittel das Sorbitol gewählt. Dieses zeigte, verglichen mit dem Glycerol, unter allen im Kapitel 4.2 untersuchten nichtionischen Isotonisierungsmitteln die geringste Zunahme der Abbaugeschwindigkeitskonstanten im Einphasensystem. Spielt der beschleunigende Effekt eine bedeutsame Rolle bei der Lagerstabilität einer Emulsionsformulierung, so sollte schon beim Sorbitol, im Vergleich zum Glycerol, ein Effekt zu erkennen sein.

7.7.1 Durchführung

Für den Vergleich der beiden Isotonisierungsmittel wurde das mit 1,2 % Lecithin stabilisierte Miglyol-Emulsions-System gewählt. Mit dem Isotonisierungsmittel Sorbitol wurden drei Emulsionen hergestellt. Die Rezeptur ist in **Tab. 7.7.1-1** wiedergegeben. Sie entsprach mit Ausnahme des Sorbitols in der Zusammensetzung der Emulsion zwei aus Kapitel 7.1.1.

Als wässrige Phase diente eine mit Sorbitol isotonierte Pufferlösung. Zur Herstellung dieser Lösung wurden 50 mg Sorbitol in 1 mL isotonierte Phosphatpufferlösung pH 7,4 gelöst. Die Konzentration des Sorbitols wurde wieder so gewählt, dass sie eine rein wässrige Lösung auf einen physiologischen osmotischen Druck von 300 mOsm/kg einstellen würde. Durch die Osmolarität des Phosphat Puffers, in Höhe von ca. 100 mOsm/kg, ergab sich eine Osmolarität der verwendeten wässrigen Phasen von ca. 400 mOsm/kg.

Tabelle 7.7.1-1 Rezeptur der untersuchten Emulsion mit Sorbitol als Isotonisierungsmittel. Die Werte sind für ein Gesamtvolumen von 100 mL angegeben

Komponente	
Phenylsalicylat	250 mg
Miglyol	10 mL
Lipoid E80[®]	1200 mg
Natrium Oleat	30 mg
Mit Sorbitol isotonisierter Phosphatpuffer pH 7,4	90 mL

Drei Emulsionen von je 250 mL wurden unter den Bedingungen aus dem Kapitel 3.1.3.2 ohne Abweichungen hergestellt.

7.7.2 Physikalische Stabilität der Rezepturen

Die Emulsionen mit Sorbitol konnten in ähnlich guter Qualität hergestellt werden, wie die mit Glycerol isotonisierten Vergleichsemulsionen. Dies geht aus den Messwerten in der **Tab. 7.7.2-1** hervor. Die Emulsionen hatten eine enge Partikelgrößenverteilung und eine durchschnittliche Partikelgröße von ca. 200 nm. Das Zetapotential lag bei durchschnittlich -44 mV. Dieser Wert wurde auch bei den Vergleichsemulsionen gemessen.

Über den Beobachtungszeitraum von vier Wochen waren alle Emulsionen hinsichtlich des Zetapotentials sowie der Partikelgrößen stabil. Es kam zu keiner auffälligen Größenzunahme der Partikel (siehe **Tab. 7.7.2-1**). Auch war nach visueller Beurteilung keine Koaleszenz erkennbar.

Tabelle 7.7.2-1 Partikelcharakterisierung der Emulsionen zu Beginn und bei Abschluss der Testperiode

		Zu Beginn			Nach 4 Wochen		
Methode		P1	P2	P3	P1	P2	P3
PCS	Z-average / nm	196	197	196	193	196	197
	PI	0,12	0,09	0,11	0,14	0,18	0,19
LD	D50 / μm	0,227	0,225	0,269	0,279	0,293	0,290
	D99 / μm	0,512	0,532	0,590	0,734	0,727	0,740
Zetapotential / mV		-43,2	-43,1	-45,2	-44,8	-44,2	-45,7

7.7.3 Chemische Stabilitätsdaten

Vergleicht man die Konzentrationen des Abbauprodukts Phenol in den unterschiedlich isotonierten Emulsionen, so wird deutlich, dass in den Emulsionen, welche mit Sorbitol isotonisiert wurden, der hydrolytische Abbau der Modellsubstanz Phenylsalicylat schneller ablief (siehe **Abb. 7.7.3-1**). Das Phenol erreichte am Ende des Untersuchungszeitraums eine Konzentration, welche mit ca. 55 $\mu\text{g/mL}$ mehr als doppelt so hoch lag wie die Konzentration der Vergleichs- Emulsionen (ca. 20 $\mu\text{g/mL}$).

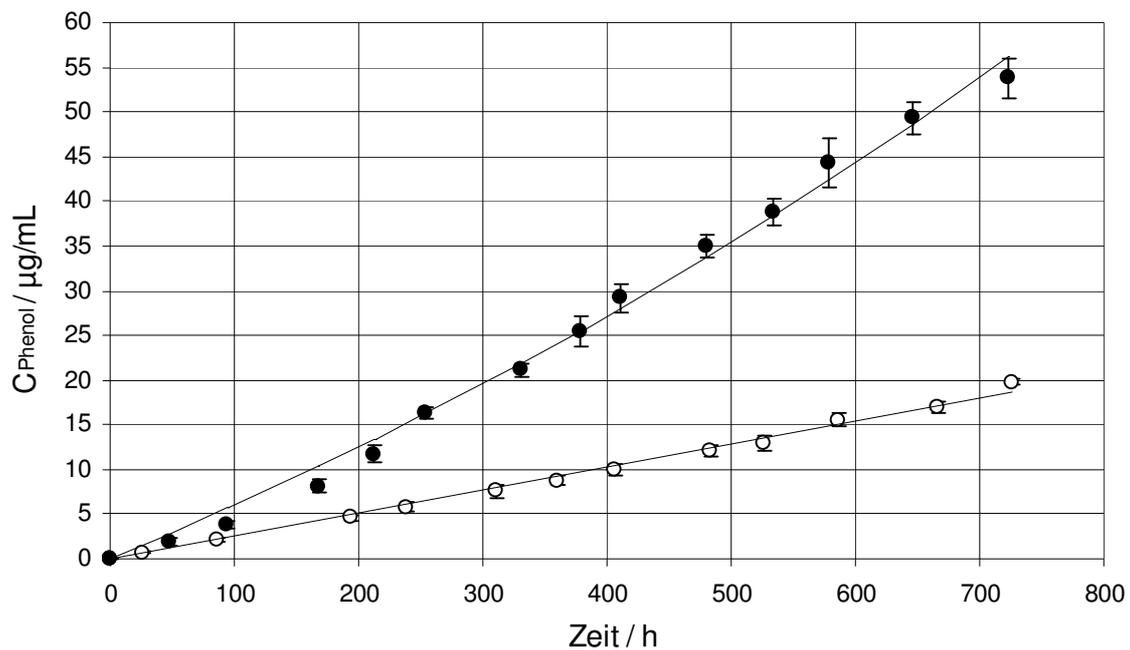


Tabelle 7.7.3-1 Konzentration des Abbauprodukts Phenol gegen die Zeit in Emulsionen, isotonisiert mit Sorbitol (●) oder Glycerol (○)

7.7.4 Diskussion

Im Einphasensystem konnte nachgewiesen werden, dass die gebräuchlichen, nichtionischen Isotonisierungsmittel einen katalytischen Effekt auf den Abbau der Modellsubstanz zeigten. Dieser Effekt war für die einzelnen Isotonisierungsmittel unterschiedlich stark ausgeprägt. Auch anhand der Emulsionssysteme konnte nun gezeigt werden, dass das Isotonisierungsmittel den hydrolytischen Abbau der Modellsubstanz beschleunigen kann.

Die beiden untersuchten Isotonisierungsmittel erniedrigten die Aktivierungsenergie der Hydrolyse von 79 kJ/mol im nichtisotonierten Einphasensystem auf 77,4 kJ/mol im Falle von Glycerol und 76,8 kJ/mol im Falle von Sorbitol. Im Emulsionssystem verursacht die

Differenz der Aktivierungsenergien mehr als eine Verdopplung der Reaktionsgeschwindigkeit vom Glycerol zum Sorbitol als Isotonisierungsmittel.

Wie für das Glycerol-System wurde Gleichung (33) auch für das Sorbitol-System an die Messwerte angepasst. Die hierüber erhaltenen Ausgleichskurven sind in der **Abb. 7.7.3-1** mit eingezeichnet. Aus den Anpassungsparametern H_0 und H wurden die Konstanten h_0 und η über Gleichung (27) und (28) errechnet. Dies erfordert die Kenntnis der wässrigen Konzentration des Phenylsalicylats ([PS]) wie auch des Verteilungskoeffizienten des Phenols (κ_p). Diese Werte mussten für die Emulsionssysteme, aus den Daten des Zweilagensystems, hergeleitet werden. Auch in diesem Fall wurden hierfür die linearen Zusammenhänge zwischen der Lecithinkonzentration und [PS] sowie $1/\kappa_p$ (siehe Kapitel 6.3) genutzt. Mit Kenntnis der um den Verlust an die Grenzfläche korrigierten Lecithinkonzentrationen der Emulsionen konnten anhand der Ausgleichsgeraden die beiden Unbekannten ermittelt werden. Die so errechneten Werte sind in der **Tab. 7.7.4-2** angegeben.

Tabelle 7.7.4-2 Die Parameter h_0 und η der Geschwindigkeitskonstanten h sowie die Konzentration des Phenylsalicylats im Wässrigen ([PS]) für die Emulsionen mit unterschiedlichen Isotonisierungsmitteln

Isotonisierungsmittel	$c_L /$ mg/ml	[PS] / mmol/L	$A_y /$ cm ² /ml	$h_0 /$ h ⁻¹	$\eta /$ L/(mmol h)
Glycerol	7,3	0,277	28300	8,64 E-04	2,73 E-03
Sorbitol	6,9	0,206	30600	49,8 E-04	2,35 E-03

Diese Tabelle verdeutlicht, dass die Konstante h_0 , in Abwesenheit einer Katalyse durch das Phenol stark von dem gewählten Isotonisierungsmittel abhängt. Im Falle des Sorbitols lag sie fast sechsmal so hoch wie der Wert für die mit Glycerol isotonierten Emulsionen. Diese Ergebnisse belegen abschließend, dass bei der Entwicklung einer Emulsion als Arzneistoffträger für eine hydrolyseinstabile Substanz die richtige Wahl des Isotonisierungsmittels von entscheidender Bedeutung ist.

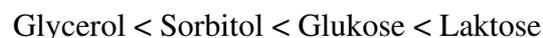
IV ZUSAMMENFASSUNG

O/W-Emulsionen bieten der Literatur nach die Möglichkeit, als parenterales Trägersystem hydrolyseempfindliche Arzneistoffe stabil zu halten. Nutzt man Emulsionen für die Formgebung, so ist die Kenntnis der physikochemischen Größen wichtig, von der die Abbaukinetik eines Arzneistoffs in einer Emulsion abhängt. In der vorliegenden Arbeit wurden über kinetische Messungen wesentliche Parameter in ihrem Einfluss auf die Abbaukinetik von Phenylsalicylat als Modellarzneistoffs erfasst. Zentrale Aufgabe der Arbeit war dabei, ein kinetisches Modell zu entwickeln, das die Verteilungsvorgänge und den hydrolytischen Abbau der Substanz in einer Emulsion beschreibt.

Phenylsalicylat wurde aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit sowie der guten Löslichkeit in den parenteral akzeptierten Ölen gewählt. Es ist aus diesen Gründen ein typischer Kandidat für die Formulierung in einer parenteralen Fettemulsion. Zusätzlich machte die ausgeprägte, über eine intramolekulare Autokatalyse verstärkte Hydrolyseempfindlichkeit die Substanz für kinetische Untersuchungen geeignet.

Die Untersuchungen wurden stufenweise aufgebaut und führten von Einphasensystemen über Zweilagensysteme von Öl über wässriger Phase bis zu komplexen Emulsionssystemen.

Auf der ersten Stufe wurde die Hydrolyse von Phenylsalicylat in den getrennten Phasen verfolgt: In der Ölphase konnte kein Abbau nachgewiesen werden. In der Wasserphase zeigte sich eine katalytische Wirkung der typischerweise in parenteralen Fettemulsionen eingesetzten nichtionischen Isotonisierungsmittel. Diese Wirkung war für die einzelnen Isotonisierungsmittel unterschiedlich und wuchs zunehmender Anzahl an Hydroxylgruppen im Molekül. Die Rangordnung war wie folgt:



Diese katalytische Beschleunigung wurde später bei den Emulsionssystemen bestätigt.

Die experimentelle Stufe des Zweilagensystems diente unter Einsatz verschiedener Öle zunächst der Ermittlung der Verteilungskoeffizienten von Modellarzneistoff und Abbauprodukten zwischen Öl- und Wasserphase. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Transport des Arzneistoffs von der Öl- in die Wasserphase schnell verläuft im Vergleich zur Hydrolyse. Folglich blieb die Phenylsalicylatkonzentration in der Wasserphase konstant, und die Abbaureaktion lief nach nullter Ordnung ab.

In Annäherung an die Bedingungen im Emulsionssystem wurde das Zweilagensystem dazu genutzt, um den Einfluss des Emulgators Lecithin auf die Abbaukinetik zu untersuchen. Es zeigte sich, dass mit zunehmendem Emulgatorgehalt die Konzentration an Phenylsalicylat in der Wasserphase, und mit ihr die Abbaugeschwindigkeit, erhöht wurde. Ein Emulgatorfilm an der Phasengrenzfläche bildete keine Diffusionsbarriere gegen den Materialtransport von der Öl- in die Wasserphase, welches zu einer Verarmung des Phenylsalicylats in der Wasserphase führen würde. Ebenso zeigte sich die Viskosität verschiedener Öle mit ihrer Auswirkung auf die Diffusionsgeschwindigkeit des Phenylsalicylats ohne Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit.

Die Erhöhung der Grenzfläche vom Zweilagen- zum Emulsionssystem führt zu einem schnelleren Abbau des Phenylsalicylats. Der Einsatz von α -Tocopherol als Ölphase mit extrem hoher Viskosität oder die Verfestigung des Grenzflächenfilms mit Cholesterol bestätigte auch für Emulsionen, dass sich die Abbaureaktion des Phenylsalicylats über eine Behinderung des Massentransports durch die Ölviskosität oder eine Grenzflächenbarriere nicht nennenswert verlangsamen lässt.

Erst mit dem Einsatz eines so genannten Nanostructured Lipid Carrier (NLC), d.h. einer im wässrigen dispergierten festen lipophilen Phase durch Zumischen von Carnaubawachs zu Miglyol, konnte ein System hergestellt werden, in dem die Hydrolyse stark verlangsamt ablief.

Sowohl der Öl- als auch der Emulgator-Typ zeigten einen Einfluss auf die Abbaukinetik. Die Verteilung von Phenylsalicylat und dem Emulgator zwischen den zwei Phasen bestimmt die wässrige Konzentration des Phenylsalicylats und demzufolge die Abbaugeschwindigkeit des Arzneistoffs in der wässrigen Phase.

Auf der Grundlage der Messergebnisse konnte ein plausibles kinetisches Modell entwickelt werden, von dem sich, gepaart mit den Literaturdaten, die folgende Vorstellung von den kinetischen Abläufen ableiten, denen der Modellarzneistoff in einer Emulsion unterworfen ist.

- In der Emulsion sind Ölphase, Grenzfläche und Wasserphase mit Emulgatormonomeren und Liposomen oder Mizellen zu unterscheiden.
- Arzneistoff, Abbauprodukte und Emulgator verteilen sich auf Ölphase, Grenzfläche, Wasserphase und Liposomen oder Mizellen
- In der Wasserphase findet der hydrolytische Abbau des Arzneistoffs statt

- Dadurch verarmt die Wasserphase an Arzneistoff, und die Abbaugeschwindigkeit nimmt ab, bis sich Verlust durch Hydrolyse und Nachlieferung aus der Ölphase die Waage halten und der Abbau in eine Reaktion nullter Ordnung übergeht
- Die Hydrolysereaktion kann von Abbauprodukten katalysiert werden
- Die Abbaugeschwindigkeit hängt ab vom Verteilungskoeffizienten des Arzneistoffs zwischen Öl- und Wasserphase. Je mehr die Verteilung zugunsten der Ölphase verschoben wird, desto langsamer hydrolysiert der Arzneistoff
- Eine Erhöhung der Emulgatorkonzentration verschiebt den Verteilungskoeffizienten in Richtung der Wasserphase und fördert damit den Abbau
- Flüssigkristalline Strukturen des Emulgators in der Wasserphase, wie z.B. Liposomen oder Mizellen, inkorporieren einen Teil des Arzneistoffs und seiner Abbauprodukte und bieten so Schutz vor Hydrolyse

V SUMMARY

Literature data suggest that O/W emulsions as parenteral formulation vehicles have the capacity to stabilize drug substances prone to hydrolysis. When using emulsion formulations the knowledge of the physical chemical parameters governing the degradation kinetics of an active ingredient is important. Using kinetic measurements in this thesis, essential parameters were studied with respect to their influence on the hydrolysis of phenyl salicylate as model drug. The pivotal task was to develop a kinetic model that describes the distribution processes and the hydrolytic degradation of the substance in an emulsion.

Phenyl salicylate was chosen as typical candidate to be formulated in a parenteral lipid emulsion due to its low solubility in water as opposed to its good solubility in those oils generally accepted for parenteral use. Furthermore, its susceptibility to hydrolysis enhanced by an intramolecular autocatalysis made it well suited to kinetic studies.

The studies were designed stepwise leading from one-phase systems over two-layer oil over water systems to complex emulsion systems.

On the first stage the hydrolysis of phenyl salicylate was observed in separate phases: No degradation was detected in the oil-phase, whereas the hydrolysis in the aqueous-phase was found to be accelerated by non-ionic isotonicizing agents typically used in parenteral fat emulsions. This rate enhancing effect was different for the individual isotonicizers and increased with increasing number of hydroxyl groups in the molecule. The ranking is as follows:

Glycerol < Sorbitol < Glucose < Lactose

The catalytic acceleration by isotonicizers was later confirmed for the emulsion systems.

Using different oil phases the two-layer system initially served the determination of the distribution coefficients of the model drug and its degradation products between the oil and the water phase. The measurements also revealed that the material transport of the drug from the oil to the water phase was fast compared to its hydrolysis. Hence the concentration of phenyl salicylate in the aqueous phase remained constant and the chemical decomposition followed a zero order kinetic.

Approaching the conditions of an emulsion the two-layer system was then used to study the influence of the emulsifier lecithin on the degradation kinetics. It was shown that an increase

in the emulsifier content afforded an increase of drug concentration in the aqueous phase thus the degradation rate. The interfacial layer of emulsifier did not act as a diffusion barrier that would slow down the material transport from the oil phase to an extent leading to a depletion of phenyl salicylate in the aqueous phase. Neither did the viscosity of different oils, which may reduce the diffusion velocity of phenyl salicylate, influence the degradation rate.

The increase of the interfacial area of an emulsion system compared to the two-layer system led to a faster degradation of phenyl salicylate. The use of α -tocopherol as oil phase with extremely high viscosity or an interfacial layer condensed by means of cholesterol confirmed for the emulsion system that the degradation rate of phenyl salicylate could not be reduced significantly by impeding the mass transport through the viscosity of the oil or an interfacial barrier.

Only when using so called nanostructured lipid carriers (NLC), i.e. a solid lipophilic phase dispersed in water, by adding carnauba wax to Miglyol, a system with significantly decelerated hydrolysis was found.

The kind of both oil and emulsifier has impact on the degradation kinetics. The distribution of phenyl salicylate and the emulsifier between the two phases govern the concentration of the drug and hence its degradation rate in the aqueous phase.

Based on the results as well as literature data a plausible kinetic model could be developed producing the following concept of the kinetic processes to which the model drug substance is subjected.

- Emulsions consist of oil phase, interface and aqueous phase containing emulsifier as monomers and liquid crystalline structures
- Drug substance, degradation products and emulsifier are distributed amongst oil phase, interface, aqueous phase and liquid crystalline structures
- The drug hydrolyses in the aqueous phase
- This leads to a depletion of the drug in the aqueous phase so that the degradation rate decreases until the loss through hydrolysis is balanced by the resupply from the oil phase and the degradation becomes a zero order reaction
- The hydrolytic reaction can be catalyzed by the degradation product

- The degradation rate depends on the distribution coefficient of the drug between oil and water phase. The more the distribution favours the oil phase the slower is the hydrolysis
- An increase in the emulsifier concentration shifts the distribution coefficient towards the aqueous phase thus promoting the degradation
- Liquid crystalline structures of the emulsifier, such as liposomes or micelles, may incorporate part of the drug and its degradation products and in this way effect protection from hydrolysis

VI PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE

1. JOURNALARTIKEL

Krickau, D., Thomsen, J., Müller, R.H.: Degradation kinetics of hydrolytically susceptible drugs in O/W emulsions – effects of interfacial area and lecithin, eingereicht beim European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

Krickau, D., Thomsen, J., Müller, R.H.: The Right Choice of Isotonizing Agents for Drugs Prone to Hydrolysis in Parenteral Lipid Emulsions, eingereicht beim International Journal of Pharmaceutics

2. POSTERPRÄSENTATIONEN

Krickau, D., Thomsen, J., Reer, O., Müller, R.H.: Influence of Interfacial Area and Surfactant on the Degradation Kinetics of Drugs Prone to Hydrolysis in Parenteral Lipid Emulsions, American Association of Pharmaceutical Scientists (American Association of Pharmaceutical Sciences-Annual Meeting, 2005, Nashville, USA)

Krickau, D., Thomsen, J., Reer, O., Müller, R.H.: Influence of Isotonizing Agents on the Kinetics of Hydrolysis of Drugs in Parenteral Lipid Emulsions, American Association of Pharmaceutical Scientists (American Association of Pharmaceutical Sciences-Annual Meeting, 2005, Nashville, USA)

VII DANKSAGUNG

Aus Datenschutzgründen ist die Danksagung
nicht in der Online-Version enthalten

VIII

LEBENS LAUF

Aus Datenschutzgründen ist der Lebenslauf
nicht in der Online-Version enthalten

IX LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Grimm, W.: Haltbarkeit und Haltbarkeitsprüfung von Arzneimitteln (APV-Richtlinie mit Kommentar), Pharm. Ind. 47 (6), 627-632 (1985)
- 2 Tamilvanan, S.: Oil-in-water lipid emulsions: implications for parenteral and ocular delivery systems, Prog. Lipid. Res. 43 (6), 489-533 (2004)
- 3 Klang, S., Benita, S.: Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration in "Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery" Benita, S. (Ed.), Harwood Academic Publishers imprint Verlag Taylor&Francis, p. 119 (1998)
- 4 Pranker, R.J., Stella, V.J.: The use of oil-in-water emulsions as a vehicle for parenteral drug administration, J. Parenter. Sci. Technol. 44 (3), 139-49 (1990)
- 5 Dingler, A., Blum, R.P., Niehus, H., Mueller, R.H., Gohla, S.: Solid lipid nanoparticles (SLN/Lipopearls) a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products, J. Microencapsul. 16 (6), 751-767 (1999)
- 6 Pongharoenkiat, N., Narsimhan, G., Lyons, R., Hem, S.L.: The effect of surface charge and partition coefficient on the chemical stability of solutes in O/W-Emulsions, J. of Pharm. Sci. 91 (2), 559-570 (2002)
- 7 Everett, D.H.: IUPAC Division of physical chemistry, Manual of symbols and terminology for physicochemical quantities and units, Appendix II, Definitions, terminology and symbols in colloid and surface chemistry Part I (1971)
- 8 Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, 260. Aufl., Walter de Gruyter Verlag Berlin (2004)
- 9 Mutschler, E.: Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 8. Aufl. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (2001)
- 10 Singh, M., Ravin, L.J.: Parenteral emulsions as drug carrier systems, J. Parenter. Sci. Tech. 40, 34-41 (1986)

- 11 Discoll, D.F., Bhargava, H.N., Li, L., Zaim, R.H., Babayan, V.K., Bistran, B.R.: Stability of a fat emulsion based intravenous feeding mixture, *Int. J. Pharm.* 52, 623-634 (1995)
- 12 Fujita, T., Sumaya, T., Yokohama, K.: Fluorocarbon emulsion as a candidate for artificial blood. Correlation between particle size of the emulsion and acute toxicity., *Eur. Surg. Res.* 3 (6), 436-453 (1971)
- 13 Burnham, W.R., Hansrani, P.K., Knott, C.E., Cook, C.A., Davis, S.S.: Stability of a fat emulsion based intravenous feeding mixture, *Int. J. Pharm.* 13, 9-22 (1983)
- 14 Müller, R.H., Heinemann, S.: Fat emulsions for parenteral nutrition. I: Evaluation of microscopic and laser light scattering methods for the determination of the physical stability, *Clin. Nutr.* 11, 223-236 (1992)
- 15 Nishikawa, M., Takakura, Y., Hashida, M.: Biofate of fat emulsions in Drug Targeting and Delivery, pp. 99-118, Eds. Simon Benita, Harwood Academic Publishers (Netherlands) (1998)
- 16 British Pharmacopoeia 1980, Her Majesty's Stationary Office, London, Vol. II, p. 580
- 17 Schmitt, W.: Parenterale Ernährung – vom reinen Nährstoff zum metabolic support beim Intensivpatienten, *Ellipse* 16 (4), 107-112 (2000)
- 18 Iriyama, K.: Lipid for a parenteral use: development and future perspectives, *Nutrition.* 10 (5 Suppl.), 521-522 (1994)
- 19 Geyer, R.P., Watkin, D.M., Matthews, L.W., Stare, F.J.: Parenteral nutrition XI. Studies with stable and unsatble fat emulsions administered intravenously, *Proc. Exp. Biol.* 77, 872-876 (1951)
- 20 Shafiroff, B.G., Mulholland, J.H.: Effects on human subjects of intravenous fat emulsions of high caloric potency, *Ann. Surg.* 133 (2), 145-152 (1951)
- 21 Johnsen, W.A., Freeman, S., Meyer, K.A.: Some effects of intravenous fat emulsions on human subjects, *J. Lab. Clin. Med.* 39 (2), 176-83 (1952)
- 22 Adolph, M.: Lipid emulsions in parenteral nutrition, *Ann. Nutr. Metab.* 43 (1), 1-13 (1999)
- 23 Forbes, A.: Parenteral nutrition, *Curr. Opin. Gastroenterol.* 22 (2) 160-164 (2005)

-
- 24 Druml, W., Fischer, M., Ratheiser, K.: Use of intravenous lipids in critically ill patients with sepsis without and with hepatic failure, *J. Parenter. Enteral. Nutr.* 22 (4), 217-223 (1998)
- 25 Lucks, J.S., Müller, B.W.: Parenterale Fettemulsionen – Struktur, Stabilität, Verwendung und In-vivio Schicksal, *Krankenhauspharmazie* 15. Jahrgang Nr. 2 (1994)
- 26 Black, C.D., Popovich, N.G.: A study of intravenous emulsion compatibility. Effects of dextrose, amino acids and selected electrolytes, *Drug Intell. Clin. Pharm.* 15, 184-193 (1981)
- 27 Balogh, J., Bubenik, J., Dredan, J., Csemesz, F., Kiss, D., Zelko, R.: The effect of structured triglycerides on the kinetic stability of total nutrient admixtures, *J. Pharm. Sci.* 8 (3), 552-557 (2005)
- 28 Grzegorzewska, I., Czarnecki, A.: The influence of electrolytes on fat emulsions stability in total parenteral nutrition mixtures, *Acta. Pol. Pharm.* 52 (1), 17-20 (1995)
- 29 Lee, M.D., Yoon, J.E., Kim, S.I., Kim, I.C.: Stability of total nutrient admixtures in reference to ambient temperatures, *Nutrition* 19 (10), 886-890 (2003)
- 30 Müller, R.H., Heinemann, S.: Fat emulsions for parenteral nutrition. III: Lipofundin MCT/LCT regimes for total parenteral nutrition (TPN) with low electrolyte load, *Int. J. Pharm.* 101, 175-189 (1994)
- 31 Washington, C.: The electrokinetic properties of phospholipid stabilized fat emulsions VI. Zeta potentials of Intralipid 20% in TPN mixtures, *Int. J. Pharm.* 87 (1-3), 167-174 (1992)
- 32 Lutz, O., Lave, T. Frey, A.: Activities of lipoprotein lipase on long- and medium-chain triglyceride emulsions used in parenteral nutrition, *Metabolism* 38, 507-513 (1989)
- 33 Mascioli, E.A., Bistran, B.R., Babayan, V.K.: Medium chain triglycerides and structured lipids as unique nonglucose energy sources in hyperalimentation, *Lipids*. 22 (6), 421-423 (1987)
- 34 Miles, J.M., Cattami, M., Sharbrough, F.W.: Metabolic and neurologic effects of an intravenous medium-chain triglyceride emulsion, *J. Parenter. Enteral. Nutr.* 15, 37-41 (1991)

-
- 35 Cotter, R., Taylor, C.A., Johnson, R.: A metabolic comparison of a pure long-chain triglyceride lipid emulsion (LCT) and various medium-chain triglyceride (MCT)-LCT combination emulsions in dogs, *Am. J. Clin. Nutr.* 45, 927-939 (1987)
- 36 Monson, J.R., Sedmann, P.C., Ramsden, C.W.: Total parenteral nutrition adversely influences tumour-directed cellular cytotoxic responses in patients with gastrointestinal cancer, *Eur. J. Surg. Oncol.* 14, 935-943 (1988)
- 37 Sedmann, P.C., Ramsden, C.W., Brennan, T.G.: Pharmacological concentrations of lipid emulsions inhibit interleukin-2 dependant lymphocyte responses in vitro, *J. Parenter. Enteral. Nutr.* 14, 12-17 (1990)
- 38 Yaqoob, P.: Fatty acids and the immune system: from basic science to clinical applications, *Proc. Nutr. Soc.* 63 (1), 89-104 (2004)
- 39 Wanten, G.: An update on parenteral lipids and immune function: only smoke, or is there any fire, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 9 (2), 79-83 (2006)
- 40 Blackburn, G.L.: Nutrition and inflammatory events: highly unsaturated fatty acids (Ω -3 vs Ω -6) in surgical injury *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 200, 183-188 (1992)
- 41 Mayer, K., Grimm, H., Grimminger, F., Seeger, W.: Parenteral nutrition with n-3 lipids in sepsis, *Br. J. Nutr.* 87 (1), 69-75 (2002)
- 42 Tomobe, Y.I., Morizawa, K., Tsuchida, M., Hibino, H., Nakano, Y., Tanaka, Y.: Dietary docosahexaenoic acid suppresses inflammation and immunoresponses in contact hypersensitivity reaction in mice, *Lipids.* 35 (1), 61-69 (2000)
- 43 Peterson, L.D., Jeffery, N.M., Thies, F., Sanderson, P., Newsholme, E.A., Calder, P.C.: Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids alter rat spleen leukocyte fatty acid composition and prostaglandin E2 production but have different effects on lymphocyte functions and cell-mediated immunity, *Lipids.* 33 (2), 171-180 (1998)
- 44 Mendez, B., Ling, P.R., Nawfal, W.I.: Effects of different lipid sources in total parenteral nutrition on whole body protein kinetics and tumor growth, *J. Parenter. Enteral. Nutr.* 16, 545-551 (1992)
- 45 Mok, K.T., Maiz, A., Yamazaki, K.: Structured medium-chain and long-chain triglyceride emulsions are superior to physical mixtures in sparing body protein in the burned rat, *Metabolism* 33, 910-915 (1984)

-
- 46 Reimund, J.M., Scheer, O., Muller, C.D., Pinna, G., Duclos, B., Baumann, R.: In vitro modulation of inflammatory cytokine production by three lipid emulsions with different fatty acid compositions, *Clin. Nutr.* 23 (6), 1324-1332 (2004)
- 47 Morlion, B.J., Torwesten, E., Lessire, H., Sturm, G., Peskar, B.M., Furst, P., Puchstein, C.: The effect of parenteral fish oil on leukocyte membrane fatty acid composition and leukotriene-synthesizing capacity in patients with postoperative trauma, *Metabolism.* 45 (10), 1208-1213 (1996)
- 48 Wachtler, P., König, W., Senkal, M., Kemen M., Köller, M.: Influence of total parenteral nutrition supplemented with ω -3 fatty acids on leukotriene-synthesis of peripheral leukocytes from patients with major upper gastrointestinal surgery *Clin. Nutr.*, 14 (2), 11 (1995)
- 49 Richelle, M., Bury, J., Kasry, A.: In vitro exchange of lipids and apolipoproteins between HDL and exogenous fat, *Clin. Nutr.* 5 (Suppl. 1), 55 (1986)
- 50 Asami, H., Iriama, K.: In vitro transfer of apolipoproteins from plasma lipoproteins to artificial lipid particles, *Nutrition* 6, 143-145 (1990)
- 51 Takino, T., Nakajima, C., Takakura, Y., Sezaki, H., Hashida, M.: Controlled biodistribution of highly lipophilic drugs with various parenteral formulations, *J. Drug Target.* 1, 117-124 (1993)
- 52 Takino, T., Nakajima, E., Sakaeda, T., Yamashita, F., Takakura, Y., Hashida, M.: Pharmacokinetic disposition analysis of lipophilic drugs injected in various lipid carriers in the single-pass rat liver perfusion system, *Int. J. Pharm.* 114, 43-54 (1995)
- 53 Chonn, A., Semple, S.C., Cullis, P.R.: Association of blood proteins with large unilamellar liposomes in vivo: relation to circulation lifetimes, *Biol. Chem.* 15, 18759-18765 (1992)
- 54 Carrstensen, H., Müller, R.H., Müller, B.W.: Particle size, surface hydrophobicity and interaction with serum of parenteral fat emulsions and model drug carriers as parameters related to RES uptake, *Clin. Nutr.* 11 (5), 289-297 (1992)
- 55 Ueda, K., Yamazaki, Y., Teshima, Y., Yamashita, C., Sakaeda, T., Iwakawa, S.: Effect of particle size on the pharmacokinetics of menatrrnone incorporated in O/W lipid emulsions prepared with hydrogenated castor oils and soybean oil in rats, *J. Drug Target.* 11 (4), 241-246 (2003)

-
- 56 Sakaeda, T., Hirano, K.: Effect of composition on biological fate of oil particles after intravenous injection of O/W lipid emulsions, *J. Drug Target.* 6 (4), 273-284 (1998)
- 57 Liu, F., Liu, D.: Long-circulating emulsions (oil-in-water) as carriers for lipophilic drugs, *Pharm. Res.* 12 (7), 1060-1064 (1995)
- 58 Takino, T., Konishi, K., Takakura, Y., Hashida, M.: Long circulating emulsion carrier systems for highly lipophilic drugs, *Biol. Pharm. Bull.* 17 (1), 121-125 (1994)
- 59 Tomii, Y.: Lipid formulation as a drug carrier for drug delivery, *Curr. Pharm. Des.* 8 (6), 467-474 Review (2002)
- 60 Allen, T.M., Everest, J.M.: Effect of liposome size and drug release properties on pharmacokinetics of encapsulated drugs in rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 226, 539-544 (1983)
- 61 Dierling, A.M., Cui, Z.: Targeting primaquine into liver using chylomicron emulsions for potential vivax malaria therapy, *Int. J. Pharm.* 303 (1-2), 143-152 (2005)
- 62 Managit, C., Kawakami, S., Yamashita, F., Hashida, M.: Uptake characteristics of galactosylated emulsion by HepG2 hepatoma cells, *Int. J. Pharm.* 301.(1-2), 255-261 (2005)
- 63 Seki, J., Sonoke, S., Saheki, A., Fukui, H., Sasaki, H., Mayumi, T.: A nanometer lipid emulsion, lipid nano-sphere (LNS[®]), as a parenteral drug carrier for passive drug targeting, *Int. J. Pharm.* 273 (1-2) 75-83 (2004)
- 64 Graziani, S.R., Igreja, F.A., Hegg, R., Meneghetti, C., Brandizzi, L.I., Barboza, R., Amâncio, R.F., Pinotti, J.A., Maranhão, P.C.: Uptake of a cholesterol-rich emulsion by breast cancer, *Gyn. Oncol.* 85 (3), 493-497 (2002)
- 65 Kawakami, S., Yamashita, F., Hashida, M.: Disposition characteristics of emulsions and incorporated drugs after systemic or local injection, *Adv. Drug Del. Rev.* 45 (1), 77-88 (2002)
- 66 Yeeprae, W., Kawakami, S., Higuchi, Y., Yamashita, F., Hashida, M.: Biodistribution characteristics of mannosylated and fucosylated O/W emulsions in mice, *J. Drug Target.* 13 (8-9), 479-487 (2005)
- 67 Hashida, M., Kawakami, S., Yamashita, F.: Lipid carrier systems for targeted drug and gene delivery, *Chem. Pharm. Bull.* 53 (8), 871-880 (2005)

-
- 68 Nomura, T., Koreeda, N., Yamashita, F., Takakura, Y., Hashida, M.: Effect of particle size and charge on the disposition of lipid carriers after intratumoral injection into tissue-isolated tumors, *Pharm. Res.* 15 (1), 128-132 (1998)
- 69 Benita, S., Friedmann, D., Weinstock, M.: Physostigmine emulsion: a new injectable controlled release delivery system, *Int. J. Pharm.* 30, 47-55 (1986)
- 70 Sznitowska, M., Janivki, S., Dabrowska, E., Zurowska-Pryczkowska, K.: Submicron emulsions as drug carriers, studies on destabilisation potential of various drugs, *Eur. J. Pharm. Sci.* 12, 175-179 (2001)
- 71 Benita, S.: Introduction and overview in "Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery" Benita, S. (Ed.), Harwood Academic Publishers imprint Verlag Taylor&Francis, p. 1 (1998)
- 72 Collins-Gold, L.C., Lyons, R.T., Bartholow, L.C.: Parenteral emulsions for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 5, 189-208 (1990)
- 73 Marti-Mestres, G., Nielloud, F.: Emulsions in health care applications - an overview, *J. Disper. Sci. Technol.* 23 (1-3), 419-439 (2002)
- 74 Repta, A.J.: Formulation of investigational anticancer drugs, in "Topics in Pharmaceutical Sciences", Breimer, D. D.; Speiser, P. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, p. 131 (1981)
- 75 El-Sayed, A.A., Repta, A.J.: Solubilisation and stabilisation of an investigational antineoplastic drug (NSC no. 278214) in an intravenous formulation using an emulsion vehicle, *Int. J. Pharm.* 13, 303-312 (1983)
- 76 Constantinides, P.P., Tustian, A., Kessler, D.R.: Tocol emulsions for drug solubilisation and parenteral delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1243-1255 (2004)
- 77 Simamora, P., Dannenfelser, R.M., Tabibi, E., Yalkowsky, S.H.: Emulsion formulations for intravenous administration of paclitaxel, *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 52 (4), 170-172 (1998)
- 78 Lundberg, B.B.: A submicron lipid emulsion coated with amphipathic polyethylene glycol for parenteral administration of paclitaxel (Taxol), *J. Pharm. Pharmacol.* 49, 16-21 (1997)

-
- 79 Kan, P.K., Chen, Z.B., Lee, C.J., I.M. Chu.: Development of non-ionic surfactant/phospholipids O/W emulsion as a paclitaxel delivery system, *J. Contr. Release* 58, 271-278 (1999)
- 80 Sorkine, P., Nagar, H., Weinbroum, A., Setton, A., Israitel, E., Scarlatt, A., Silbiger, A., Rudick, V.K., Halpern, P.: Administration of amphotericin B in lipid emulsion decreases nephrotoxicity. Results of a prospective, randomized, controlled study in critically ill patients, *Crit. Care Med.* 2, 1311-1315 (1996)
- 81 Santos Magalhaes, N.S., Seiller, G.C., Benita, S.: The stability and in vitro release kinetics of a clofibrade emulsion, *Int. J. Pharm.* 76, 225-237 (1991)
- 82 Tebutt, S., Harvey, M., Nicholson, T., Cave, G.: Intralipid prolongs survival in a rat model of verapamil toxicity, *ACAD Emerg. Med.* 13 (2), 134-139 (2006)
- 83 Mbela, T.K.M.N., Ludwig, A.: Physical properties and stability evaluations of submicron mefloquine emulsions, *STP Pharma. Sci.* 5 (3), 225-231 (1995)
- 84 Akkar, A., Müller, R.H.: Formulation of intravenous Carbamazepin emulsions by SolEmuls[®] technology, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 55, 305-312 (2003)
- 85 Akkar, A., Müller, R.H.: Intravenous itraconazole emulsions produced by SolEmuls[®] technology, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56, 29-36 (2003)
- 86 Akkar, A., Müller, R.H.: Solubilisation by emulsification, *Pharm. Ind.* 66 (21), 1537-1544 (2004)
- 87 Müller, R.H., Schmidt, S., Buttle, I., Akkar, A., Schmitt, J., Brömer, S.: SolEmuls[®] - novel technology for the formulation of i.v. emulsions with poorly soluble drugs, *Int. J. Pharm.* 269, 293-302 (2004)
- 88 Yamaguchi, M., Yasueda, S., Isowaki, A., Yamamoto, M., Kimura, M., Inada, K., Ohtori, A.: Formulation of an ophthalmic lipid emulsion containing an anti-inflammatory steroidal drug, difluprednate, *Int. J. Pharm.* 301, 121-128 (2005)
- 89 Spahn, D.R., Kocian, R.: Artificial O₂ carriers: Status 2005, *Curr. Pharm. Des.* 11, 4099-4114 (2005)
- 90 Nürnberg, E., Surmann, P.: Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis Band 2 (Methoden), Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1991)
- 91 Kristl, J. Volk, B., Gasperlin, M. Sentjurc, M., Jurkovic, P.: Effect of colloidal carriers on ascorbyl palmitate stability, *Eur. J. Pharm. Sci.* 19, 181-189 (2003)

-
- 92 Gallarate, M., Carlotti, M.E., Trotta, M., Bovo, S.: On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use, *Int. J. Pharm.* 188, 233-241 (1999)
- 93 Sakai, Y., Yasueda, S.I., Ohtori, A.: Stability of latanoprost in an ophthalmic lipid emulsion using polyvinyl alcohol, *Int. J. Pharm.* 305, 176-179 (2005)
- 94 Riewerts, K.: Kosmetische Mittel vom Kaiserreich bis zur Zeit der Weimarer Republik – Herstellung, Entwicklung und Verbraucherschutz, *Dissertationsschrift, Hamburg* (2005)
- 95 Monograph phenyl salicylat, *Food and cosmetics toxicology*, 14 (1), 837-839 (1976)
- 96 Deota, P.T., Upadhyay, P.R., Patel, K.B.: Effect of some ultraviolet light absorbers on photo-stabilization of azadirachtin-A, *Nat. Prod. Let.*, 16 (5), 329-334 (2002)
- 97 Calnan, C.D.; Cronin, E.; Rycroft R.J.: Allergy to phenyl salicylat, *Cont. Derm.* 7 (4), 208-211 (1981)
- 98 Sonnex, T.S.; Rycroft, R.J.: Dermatitis from phenyl salicylate in safety spectacle frames, *Cont. Derm.* 14, 268-270 (1986)
- 99 Fimiani, M.; Casini, L.; Bocci, S.: Contact dermatitis from phenyl salicylate in a galenic cream, *Cont. Derm.* 22, 239 (1990)
- 100 Kalpaklioglu, A.F.; Ferizli, A.G.; Misirligil, Z.: The effectiveness of benzyl benzoate and different chemicals as acaricides, *Allergy* 51, 164-170, (1996)
- 101 Müller, R.H.; Hildebrand, G.E.: *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1998)
- 102 Leuenberger, H.: *Martin, physikalische Pharmazie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (2002)
- 103 Martin, A.N.; Swarbrick, J.; Cammarata, A.: *Physikalische Pharmazie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1980)
- 104 Shimamoto, T.; Mima, H.: A model for the prediction of preservative activity in oil in water emulsions, *Chem. Pharm. Bull.* 27 (11), 2743-2750 (1979)
- 105 Watrobska-Swietlikowska, D., Sznitowska, M.: Partitioning of parabens between phases of submicron emulsions stabilized with egg lecithin, *Int J Pharm.* 9 (2006)
- 106 Kazmi, S.J.; Mitchell, A.G.: Preservation of solubilized and emulsified systems I: Correlation of mathematically predicted preservative availability with antimicrobial activity, *J. Pharm. Sci.* 67 (9), 1260-1266 (1978)

-
- 107 Kurup, T.R.R.; Wan, L.; Chan, L.W.: Availability and activity of preservatives in emulsified systems, *Pharm. Acta Hely.* 66 (3), 76-82 (1991)
- 108 Teagarden, D.L., Anderson, B.D., Petre, W.J.: Dehydration kinetics of prostaglandin E₁ in a lipid emulsion, *Pharm. Res.* 6, 210-215 (1989)
- 109 Capon, B.; Ghosh, B.C.: The mechanism of the hydrolysis of phenyl salicylate and catechol monobenzoate in the presence and absence of borat ions, *J. Chem. Soc. B*, 472 (1966)
- 110 Kahn, M.N.; Olagbemiro, T.O.; Umar, U.Z.: The kinetics and mechanism of hydrolytic cleavage of phenyl salicylate under highly alkaline medium, *Tetrahedron* 39, 811 (1983)
- 111 Hoepfner, E.M.; Reng, A.: *Fiedler Lexikon der Hilfsstoffe*, Editio Cantor Verlag Aulendorf (2002)
- 112 Burger, A.; Wachter, H.: *Hunnius pharmazeutisches Wörterbuch*, Walter de Gruyter Verlag Berlin New York (1998)
- 113 Strickley, R.G.: Solubilizing excipients in oral and injectable formulations, *Ph. Res.* 21 (2), 201-230 (2005)
- 114 Schneider, C.: Chemistry and biology of vitamin E, *Mol. Nutr. Food Res.* 49 (1), 7-30 (2005)
- 115 Armutcu, F.; Coskun, O.; Gurel, A.: Vitamin E protects against acetone-induced oxidative stress in rat red blood cells, *Cell. Biol. Tox.* 21 (1), 53-60 (2005)
- 116 Bauer, K.H.; Fömming, K.H.; Führer, C.: *Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1999)
- 117 Han, J.: The formulation and evaluation of intravenous vitamin E emulsions for the delivery of Paclitaxel, *Ph.D. Thesis*, Nottingham (2000)
- 118 Mollet, H.; Grubenmann, A.: *Formulierungstechnik Emulsionen, Suspensionen, feste Formen*, Wiley-VCH Verlag Weinheim (2000)
- 119 Strickley, R.G.: Parenteral formulations of small molecules therapeutics marketed in the United States (1999)-Part I, *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 54 (2), 152-169 (2000)
- 120 Buszello, K., Harnisch, S., Müller, R.H., Müller B.W.: The influence of alkali fatty acids on the properties and the stability of parenteral O/W emulsions modified with solutol HS 15, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 49 (2), 143-149 (2000)

-
- 121 Kuksis, A., Breckenridge, W.C., Marai, L., Stachnyk, O.: Molecular species of lecithins of rat heart, kidney, and plasma, *J. Lipid. Res.* 10, 25-32, (1969)
- 122 Marai, L., Kuksis, A.: Molecular species of lecithins from erythrocytes and plasma of man, *J. Lipid Res.* 10 (2), 141-52 (1969)
- 123 Ilan, E., Amselm, S., Weisspapier, M.R., Schwarz, J.S., Yogev, A., Zawoznik, E., Friedmann, D.I.: Improved oral delivery of Desmopressin via a novel vehicle: Mucoadhesive submicron emulsion, *Pharm. Res.* 13, 1083-1087 (1996)
- 124 Frieberg, S.E.: Emulsion stability in Sjödblöm, J. (ed.) *Emulsions – A fundamental and practical approach*, Kluwer Academic Publishers Dodrecht (1992)
- 125 Cardenas-Valera, A.: Graft copolymers as stabilizers for oil in water emulsions Part 2, preparation of emulsions and the factors affecting their stability, *Colloids Surfaces A.: Physicochemical and engineering aspects* 97, 1-12 (1995)
- 126 Müller, R.H.; Heinemann, S.: Fat emulsions for parenteral nutrition. II: Characterisation an physical long term stability of Lipofundin MCT/LCT, *Clin. Nutr.* 12, 298-309 (1993)
- 127 Davis, S.S.: The stability of fat emulsions for intravenous administration, Jhonsen, I.D.A.-*Advances in Clinical Nutrition.*, MTP Press Limited, Lancaster/Bosten/The Hague 213-239 (1983)
- 128 Müller, R.H.; Heinemann, S.: Fat emulsions for parenteral nutrition. IV. Lipofundin MCT/LCT regimes for total parenteral nutrition (TPN) with high electrolyte load, *Int. J. Pharm.* 107, 121-131 (1994)
- 129 Matthews, S.B., Waud, J.P., Roberts, A.G., Campbell A.K.: Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem, *Postgrad Med.* 81, 167-173 (2005)
- 130 Wagner, K.H., Feigl, P., Elmadfa, I.: Ascorbyl palmitate and its synergism to tocopherols, *Forum Nutr.* 56, 347-348 (2003)
- 131 Thomas, C.E., McLean, L.R., Parker, R.A., Ohlweiler, D.F.: Ascorbate and phenolic antioxidant interactions in prevention of liposomal oxidation, *Lipidis.* 27 (7), 543-550 (1992)
- 132 Palma, S. Lo Nostro, P., Manzo, R., Allemandi, D.: Evaluation of the surfactant properties of ascorbyl palmitate sodium salt, *Eur. J. Pharm. Sci.* 16 (1-2), 37-43 (2002)

-
- 133 Cao, H., Tokutake, N., Regen, S.L.: Unrevealing the mystery surrounding cholesterol's condensing effect, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (52), 16182-16183 (2003)
- 134 Fiorini, R., Gratton, E., Curatola, G.: Effect of cholesterol on membrane microheterogeneity: a study using 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene fluorescence lifetime distributions, *Biochim. Biophys. Acta* 1006, 198-202 (1989)
- 135 Guyer, W., Bloch, K.: Phosphatidylcholine and cholesterol interactions in model membranes, *Chem Phys Lipids.* 33 (4), 313-322 (1983)
- 136 Villalobos-Hernandez J.R., Muller-Goymann C.C.: Novel nanoparticulate carrier system based on carnauba wax and decyl oleate for the dispersion of inorganic sunscreens in aqueous media, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60 (1), 113-122 (2005)
- 137 Benita S, Zouai O, Benoit JP.: 5-Fluorouracil:carnauba wax microspheres for chemoembolization: an in vitro evaluation, *J. Pharm. Sci.* 75 (9), 847-851 (1986)
- 138 Hansari, P.K., Davis, S.S., Groves, M.J.: The preparation and properties of sterile intravenous emulsions, *J. Pharm. Sci. Technol.* 37, 145-150 (1983)
- 139 Bock, T.: Parenterale Arzneistoffträgersysteme, *Dissertationsschrift*, Kiel (1994)
- 140 Pandolfe, W.: Effect of premix condition, surfactant concentration, and oil level on the formation of oil-in-water emulsions by homogenization. *J. Disper. Sci. technol.* 16 (7), 633-650 (1995)
- 141 Guay, F., Bisailon, S.: Evaluation of fat emulsions prepared by ultrasonic waves. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 5, 107-126 (1979)
- 142 Teipel, U.: Einfluss der Tropfengröße auf das rheologische Verhalten von Emulsionen. *Chem. Ing. Tech.* 73, 10006-1012 (2001)
- 143 Vladisavljevic, G.T., Williams, R.A.: Recent developments in manufacturing emulsions and particulate products using membranes. *Adv. Colloid. Interface Sci.* 113 (1), 1-20 (2005)
- 144 Naini, V, Singh, S.K.: Homogenization and homogenizers in Swarbrick, J. (ed.) *Encyclopedia of pharmaceutical technology*, Marcel Dekker Inc. New York Basel, 2.Aufl. (2002)
- 145 Washington, C, Davis, S.S.: The production of parenteral feeding emulsions by microfluidizers, *Int. J. Pharm.* 44, 169-176 (1988)

-
- 146 Jahnke, S.: The theory of high-pressure homogenisation in Müller, R.H. (ed.) Dispersion techniques for laboratory and industrial scale processing, APV Paperback, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (2001)
- 147 Brandl, M., Bachmann, D., Drechsler, M., Bauer, K.H.: Liposome preparation by a new high pressure homogenisator Gaulin Micron LAB 40, Drug Development and Industrial Pharmazie 16 (1990)
- 148 Koster, V.S., Kuks, P.F.M., Lange, R., Talsma, H.: Particle size in parenteral fat emulsions, what are the true limitations?, Int. J. Pharm. 134, 235-238 (1996)
- 149 Komatsu, H., Kitajima, A., Okada, S.: Pharmaceutical characterisation of commercially available intravenous fat emulsions: Estimation of average particle size, size distribution and surface potential using photon correlation spectroscopy, Chem. Pharm. Bull. 43 (8), 1412-1415 (1995)
- 150 Weiner, B.B.: Particle and droplet sizing using Fraunhofer diffraction in H.G. Barth (ed.) Modern methods of particle size analysis, J. Wiley and Sons, New York (1984)
- 151 Müller, R.H. (ed.), Schuhmann, R.: Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis, APV Paperback Band 38, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1996)
- 152 Müller, B.W., Müller, R.H.: Bestimmung von mittleren Durchmessern und Größenverteilungen an Teilchen im Submikroskopischen Bereich mit der Photonenkorrelationsspektroskopie, Pharm. Ind. 45, 1150-1153 (1983)
- 153 R.H., Müller (ed.): Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis, APV Paperback Band 37, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1996)
- 154 Verwey, E.J.W., Overbeck, J.T.G.: Theory of the stability of lyophobic colloids, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam New York (1948)
- 155 Lagaly, G.: Energetische Wechselwirkungen in Dispersionen und Emulsionen, Asche, H., Essig, D., Schmidt, P.C. (ed.) Technologie von Salben, Suspensionen und Emulsionen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1984)
- 156 The United States Pharmacopeial Convention (Hrsg.), USP NF 2004, USP 27 – The United States Pharmacopeia / NF 22, The National Formulary, Rockville 2003
- 157 Khan, M.N.: Structure-Reactivity Relationships and the Rate-Determining Step in the Nucleophilic Cleavage of Phenyl Salicylate with Primary and Secondary Amines. J. Org. Chem. 48, 2046-2052 (1983)

-
- 158 Rotenberg, M., Rubin, M., Bor, A., Meyuhas, D., Talmon, Y., Lichtenberg, D.: Physico-chemical characterization of Intralipid[®] emulsions, *Bioch. Biophys. Acta* 1068, 265-272 (1991)
- 159 Ferezou, J. Lai, N.T., Leray, C., Hajri, T., Frey, A., Cabaret, Y., Courtieu, J., Lutton, C., Bach, A.: Lipid composition and structure of commercial parenteral emulsions, *Bioch. Biophys. Acta* 1213, 149-158 (1994)
- 160 Bach, A., Ferezou, J., Frey, A.: Phospholipid-rich particles in commercial parenteral fat emulsions. An overview, *Prog. Lipid Res.* 35 (2), 133-153 (1996)
- 161 Westesen, K., Wehler, T.: Particle size determination of a submicron-sized emulsion, *Coll. and Surf.* 78, 125-132 (1993)
- 162 Groves, M.J., Wineberg, M., Brain, A.P.R.: The presence of liposomal material in phosphate stabilized emulsions, *J. Disper. Sci. Technol.* 6 (2), 237-243 (1958)
- 163 Plamondon; J.E., Nairn, J.G.: The effects of surfactants on the rate of decarboxylation of p-aminosalicylic acid in acidic solutions, *J. Pharm. Sci.* 86 (2), 205-207 (1997)
- 164 Murthy, K.S., Rippie, E.G.: Acetylsalicylic acid hydrolysis in aqueous solutions of polysorbate 80, *J. Pharm. Sci.* 56 (8), 1026-1027 (1967)
- 165 Krishna, G., Wood, G.C., Sheth, B.B.: Improving emulsification efficacy of lecithin by formulation design I: Effect of adding a secondary surfactant, *J. Pharm. Sci. Technol.* 52 (6), 331-336 (1998)
- 166 Wabel, C.: Influence of lecithin on structure and stability of parenteral fat emulsions, *Dissertationsschrift, Erlangen-Nürnberg* (1998)
- 167 Müller, R.H., Lucks, S.: Arzneistoffträger aus festen Lipidteilchen – Feste Lipidnanosphären (SLN), *European Patent No. 0605497* (1996)
- 168 Schwarz, C., Mehnert, W., Lucks, J.S., Müller, R.H.: Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterisation and sterilisation, *J. Contr. Rel.* 30, 83-96 (1994)
- 169 Müller, R.H., Dingler, A.: Feste Lipid-Nanopartikel als neuartige Carrier für Wirkstoffe, *Pharmazeutische Zeitung* Nr. 49 (1998)
- 170 Mehnert, W. Mäder, K.: Solid lipid nanoparticles Production, characterisation and applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47, 165-196 (2001)

-
- 171 Wissing, S.A., Kayser, O., Müller, R.H.: Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1257-1272 (2002)
- 172 Mehnert, W., zur Mühlen, A., Dingler, A., Weyhers, H., Müller, R.H.: Solid lipid nanoparticles (SLN) – ein neuartiger Wirkstoff-Carrier für Kosmetika und Pharmazeutika: II. Wirkstoff-Inkorporation, Freisetzung und Sterilisierbarkeit, *Pharm. Ind.* 59 (6), 511-514 (1997)
- 173 Müller, R.H., Radtke, M., Wissing, S.A.: Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs, *Int. J. Pharm.* 242, 121-128 (2002)
- 174 Wissing, S.A., Kayser, O., Müller, R.H.: Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1257-1272 (2004)
- 175 Hu, F.Q., Jiang, S.P., Du, Y.Z., Yuan, H., Ye, Y.Q., Zeng, S.: Preparation and characterisation of monostearin nanostructured lipid carriers, *Int. J. Pharm.* 314, 83-89 (2006)
- 176 Dingler, A., Blum, R.P., Niehus, H., Müller, R.H., Gohla, S.: Solid lipid nanoparticles (SLN/Lipopearls)--a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products, *J. Microencapsul.* 16 (6), 751-767 (1999)
- 177 Jennings, V., Gohla, S.H.: Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles, *J. Microencapsul.* 18 (2), 149-158 (2001)
- 178 Üner, M., Wissing, S.A., Yener, G., Müller, R.H.: Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for application of ascorbyl palmitate, *Pharmazie* 60 (8), 577-582 (2004)
- 179 Villalobos-Hernandez, J.R., Muller-Goymann, C.C.: Physical stability, centrifugation tests, and entrapment efficiency studies of carnauba wax-decyl oleate nanoparticles used for the dispersion of inorganic sunscreens in aqueous media, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* Apr 16, ahead of print (2006)
- 180 Jennings, V., Thünemann, A.F., Gohla, S.: Characterisation of a novel solid lipid nanoparticulate carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids, *Int. J. Pharm.* 199, 167-177 (2000)
- 181 Cogan, U., Shinitzky, M., Weber, G., Nishida, T.: Microviscosity and order in the hydrocarbon region of phospholipid-cholesterol dispersions determined with fluorescent probes, *Biochemistry* 12 (3), 521-528 (1973)

- 182 Diederichs, J.E., Müller, R.H.: Microviscosity measurements, theory and application to parenteral fat emulsions, *Pharm. Tech.* 21, 41-60 (1997)
- 183 Krohn, K., Koletzko, B.: Parenteral lipid emulsions in paediatrics, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 9 (3), 319-323 (2006)
- 184 Becvarova, I., Saker, K.E., Swecker, W.S., Troy, G.C.: Peroxidative protection of parenteral admixture by D-alpha-tocopherol, *Vet. Ther.* 6 (4), 280-290 (2005)
- 185 Manuel-y-Keenoy, B., Nonneman, L., De Bosscher, H., Vertommen, J., Schrans, S., Klutsch, K., De Leeuw, I.: Effects of intravenous supplementation with alpha-tocopherol in patients receiving total parenteral nutrition containing medium- and long-chain triglycerides, *Eur. J. Clin. Nutr.* 56 (2), 121-128 (2002)
- 186 Steger, P.J., Muhlebach, S.F.: Lipid peroxidation of i.v. lipid emulsions in TPN bags: the influence of tocopherols, *Nutrition* 14 (2), 179-185 (1998)
- 187 Constantinides, P.P., Han, J., Davis, S.S.: Advances in the use of tocopherols as drug delivery vehicles, *Pharm. Res.* 23 (2), 243-255 (2006)
- 188 Lambert, K.J., Constantinides, P.P., Quay, S.C.: Emulsion vehicle for poorly soluble drugs, US Patent No. 6,458,373 (2002)