

3.4 Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit konnte erfolgreich eine sechs Monate stabile, durch Phytosphingosin positiv geladene Nanoemulsion mit Ceramiden entwickelt werden, die für einen Einsatz im Rahmen der pflegenden Hautkosmetik von Interesse sein dürfte.

Die gute Stabilität wurde aus folgenden Gründen ermöglicht: 1. die enge Tröpfchengrößenverteilung, die durch Optimierung der Homogenisationsprozessparameter erreicht wurde, verhinderte die Ostwald-Reifung; 2. die positive Ladung der Nanoemulsionströpfchen, die bei physiologischem pH-Wert durch Phytosphingosin induziert wurde, sorgte für eine elektrostatische Abstoßung der Öltröpfchen und 3. die Emulgatoren Lipoid E 80[®] und Tween 80[®], die die O/W-Grenzfläche besetzten, verminderten die Grenzflächenenergie und verhinderten durch sterischen Schutz die Kollision der Tröpfchen. Aufgrund dieser Eigenschaften zeigten diese Nanoemulsionen in einem Zeitraum von sechs Monaten keine Tendenz zu physikalischer Instabilität wie Flockung, Ostwald-Reifung und Koaleszenz.

Um die sehr schlecht löslichen Ceramide dermal verfügbar zu machen, müssen sie in der Formulierung gelöst vorliegen. Unter Verwendung des kosmetischen Öls Eutanol G und des natürlich vorkommenden Emulgatorgemisches Lipoid E 80[®] konnten die Ceramide ohne Rekristallisation in eine positiv geladene Nanoemulsion eingearbeitet werden.

In drei in-vivo-Hautstudien wurde der Einfluss von positiv und negativ geladenen Nanoemulsionen mit Stratum-corneum-Lipiden auf die Hauteigenschaften untersucht. Bei kosmetischen Zubereitungen ist der Wirksamkeits- und Unbedenklichkeitsnachweis unabdingbar. Diese Nachweise wurden durch die Bestimmung der Beeinflussung der Hautfeuchtigkeit, Hautelastizität und Hautrötung erbracht. In allen drei Studien wurden die Cremes regelmäßig appliziert und gut vertragen. Durch Vergleich mit Physiogel[®]-Creme als Referenzstandard konnte gezeigt werden, dass die entwickelte lipidhaltige, durch Phytosphingosin positiv geladene Nanoemulsions-Creme einen vergleichbar positiven Einfluss auf die Hautfeuchtigkeit und –elastizität hat. Da die lipidhaltigen, positiv geladenen Nanoemulsions-Cremes die Hautfeuchtigkeit und –elastizität stärker erhöhten als die lipidfreien, positiv geladenen

Nanoemulsions-Cremes, wurde abgeleitet, dass das Ceramid 3B und die Stratum-corneum-Lipide Ceramid 3, Palmitinsäure und Cholesterol essenziell für die verbesserte Wirksamkeit waren. Der Vergleich der lipidhaltigen, positiv und negativ geladenen Nanoemulsions-Cremes zeigte weiterhin den Einfluss positiver Oberflächenladungen als entscheidend für das Ausmaß der Spreitung als Voraussetzung für die vermehrte Penetration der Stratum-corneum-Lipide und Ceramid 3B in die Haut. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass in phytosphingosinhaltige, positiv geladene Nanoemulsionen eingearbeitete Ceramide eine vielversprechende Perspektive in der hautpflegenden Kosmetik haben könnten.

Im zweiten Teil der Arbeit stand die Entwicklung einer miconazolnitrathaltigen Nanoemulsion im Mittelpunkt.

Nach Optimierung der Homogenisationsprozessparameter konnte für Miconazolnitrat eine durch Phytosphingosin positiv geladene Nanoemulsion mit hoher physikalischer Stabilität entwickelt werden. Diese wurde unter anderem durch das hohe Zetapotenzial erreicht, welches durch den pH-Wert und die amphiphilen Formulierungsbestandteile Phytosphingosin und Miconazolnitrat bestimmt werden. Der an der O/W-Grenzfläche lokalisierte Anteil des Miconazolnitrats trug durch Protonierung seines Imidazol-Stickstoffes zu der positiven Aufladung der Öltöpfchen bei. Phytosphingosin und Lipoid E 80[®] erwiesen sich als gute Lösungsvermittler für Miconazolnitrat in der Ölphase der positiv geladenen Nanoemulsion. Diese Nanoemulsion wirkte schon bei geringen Konzentrationen gegen den Pilz *Candida albicans*. Dies wird auf die Phospholipide im Lipoid E 80[®] zurückgeführt, die eine starke Interaktion mit den Pilzzellwänden eingehen und so die Einschleusung des Miconazolnitrats begünstigen. Gleichzeitig wurde der membranstabilisierende Effekt der phospholipidhaltigen Nanoemulsion nachgewiesen, so dass die entwickelte positiv geladene Nanoemulsion als gut verträglich eingestuft werden kann.

Aufgrund des höheren Verteilungskoeffizienten setzten die Lipoid E 80[®]-haltigen, positiv geladenen Nanoemulsionen Miconazolnitrat aus der inneren Ölphase retardierter frei als aus den negativ geladenen und Lipoid E 80[®]-freien, positiv geladenen Nanoemulsionen. Die Penetrationsuntersuchungen an exzidiierter Humanhaut zeigten jedoch, dass der Arzneistoff via positiv geladener Nanoemulsion stärker in die Haut penetrierte als aus negativ geladener und

Lipoid E 80[®]-freier, positiv geladener Nanoemulsion. Somit waren Lipoid E 80[®] und Phytosphingosin für die verstärkte Penetration des Arzneistoffes in die Haut verantwortlich. Zusätzlich wurde die Penetration durch die Teilchengröße der inneren Ölphase der positiv geladenen Nanoemulsion im Vergleich zu der entsprechenden Makroemulsion begünstigt. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch Phytosphingosin positiv geladene Nanoemulsionen vielversprechende Träger zur topisch dermalen Applikation von schwerlöslichen Arzneistoffen darstellen.

Zur Charakterisierung der Nanoemulsionen wurde im dritten Teil der Arbeit die ESR-Spektroskopie eingesetzt. Da die Nanoemulsionen keine ESR-aktiven Bestandteile enthalten, wurden ihnen stabile Nitroxylradikale (Spinsonden) als Reporter-moleküle zugesetzt, deren Aufgabe es ist, über die physikochemischen Eigenschaften ihrer Mikroumgebung (z.B. Mikroviskosität und -polarität) sowie das Penetrations- und Permeationverhalten Auskunft zu geben. Mit TEMPO und TEMPOL wurden zwei Spinsonden mit unterschiedlicher Lipophilie ausgewählt. Die physikalische und chemische Stabilität der Nanoemulsionen mit diesen Spinsonden war über einen Zeitraum von zwei Wochen gewährleistet. Die Auswertungen der ESR-Spektren zeigten, dass das lipophile TEMPO hauptsächlich in der lipophilen Phase der positiv geladenen Nanoemulsionen lokalisiert war, während sich das hydrophilere TEMPOL vorwiegend in der äußeren Wasserphase befand. Nach Zugabe des Reduktionsmittels Natriumascorbat nahm durch Reduktion der Nitroxidspinsonde zum diamagnetischen Hydroxylamin die Signalintensität rasch ab, und die Spinsondenkonzentration fiel bei den TEMPOL-haltigen, positiv geladenen Nanoemulsionen bereits nach zwei Minuten unter die Nachweisgrenze. Das TEMPO in den positiv geladenen Nanoemulsionen wurde langsamer reduziert und lag nach acht Minuten unterhalb der Nachweisgrenze. Dieses Reduktionsverhalten läßt die Schlussfolgerung zu, dass die lipophilen TEMPO-Moleküle, die vorwiegend in der Ölphase lokalisiert sind, sich aufgrund des hohen Laplace-Drucks der Nanoemulsionströpfchen an die O/W-Grenzfläche verteilen und dort durch Ascorbat reduziert werden. Das dabei entstehende stark basische Hydroxylamin erhöhte den pH-Wert und verursachte dadurch eine Abnahme des Zetapotenzials.

Die ESR-Tomografie wurde zur Charakterisierung der Hautpenetration bzw. -permeation der Spinsonden aus den verschiedenen Zubereitungen herangezogen. Dabei wurden die ESR-Tomogramme in die einzelnen Spektren zerlegt, und aus ihnen Informationen hinsichtlich der Radikalkonzentration (über die Signalintensität im Vergleich zum externen Standard), Mikroviskosität (über die Rotationskorrelationszeit) und Mikropolarität (über die Hyperfeinkopplungskonstante) gewonnen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Nanoemulsionen mit zunehmender Zeit eine Abnahme der Viskosität der oberen Hautschichten bewirkten, die die Hautpenetration begünstigte. Dabei reicherte sich das lipophile TEMPO in den lipidreichen Strukturen der unteren Dermis an, während TEMPOL überwiegend in die oberen polaren Bereiche der Haut penetrierte und sich nur sehr langsam aus diesen Bereichen in die tieferen Schichten verteilte. Die verbesserte Penetration dürfte auf die in den Nanoemulsionen enthaltenden Phospholipide zurückzuführen sein, die bekanntlich eine starke Fluidisierung des Stratum corneums bewirken. Diese Viskositätsverminderung war bei den positiv geladenen Nanoemulsionen stärker ausgeprägt als bei den negativ geladenen Nanoemulsionen. Darüber hinaus bewirkten die TEMPO-haltigen, positiv geladenen Nanoemulsionen eine stärkere Polaritätserhöhung in den oberen Hautschichten bis 250 μm als die entsprechenden negativ geladenen Nanoemulsionen. Folglich ist das Phytosphingosin und die durch diesen Aminoalkohol induzierte positive Ladung der Nanoemulsionströpfchenoberfläche für die starke Wechselwirkung mit der Haut verantwortlich, die zu einer starken Fluidisierung und einem verstärkten, osmotisch bedingten Wassereinstrom führte.

3.5 Summary

In the first part of this work a six months stable phytosphingosine induced positively charged nanoemulsion containing ceramides could be successfully developed and might be of interest in the field of cosmetic skin care.

The good stability was due to: 1. the close droplet size distribution, which was achieved by optimisation of the homogenisation process parameters, preventing Ostwald ripening; 2. the positive charge of the nanoemulsion droplets, which was induced by phytosphingosine at physiological pH, providing electrostatic repulsion of the oil droplets, and 3. the surfactants, Lipoid E 80[®] and Tween 80[®], which occupied the oil/water interface, preventing collision of the droplets by a steric shield. Due to these properties the nanoemulsions did not show a tendency to physical instability such as flocculation, Ostwald ripening and coalescence within six months.

The low soluble ceramides must be kept dissolved in the formulations in order to achieve dermal availability. By using the cosmetic oil Eutanol G and the naturally found surfactant mixture Lipoid E 80[®] ceramides could be incorporated in a positively charged nanoemulsion and did not show a tendency to recrystallisation within a period of six months.

Three in vivo skin studies were performed in order to investigate the effect of lipid-containing, positively and negatively charged nanoemulsions on skin properties. The proof of efficacy and harmlessness of cosmetic products is necessary. These evidences were provided by determining the effect on skin humidity, skin elasticity and skin redness. The creams were applied regularly and well tolerated throughout the study. The comparison of the lipid-containing phytosphingosine induced positively charged nanoemulsion cream with the reference Physiogel[®] cream revealed comparable positive effects on skin humidity and elasticity. These lipid-containing positively charged nanoemulsion creams increased the skin humidity and elasticity stronger than the lipid-free positively charged nanoemulsion creams. Thus, the lipid ceramide 3B, and the stratum corneum lipids ceramide 3, palmitic acid, and cholesterol were essential for the improved skin efficacy. The comparison of the lipid-containing positively, and negatively charged nanoemulsion creams showed further, that the positive charge of the nanodroplet surfaces were responsible for the improved spreadability on skin and, consequently, for the improved

penetration of the stratum corneum lipids and ceramide 3B into the skin. Thus, stratum corneum lipids such as ceramides, incorporated in phytosphingosine-containing positively charged nanoemulsions, might have a promising perspective in the field of cosmetic skin care.

The second part of the work was focused on the development of a miconazol nitrate-containing nanoemulsion.

After optimisation of the homogenisation process parameters, the developed miconazole nitrate-containing, phytosphingosine induced positively charged nanoemulsion showed high physical stability especially due to the high positive zeta potential, which was affected by the pH and the amphiphilic formulation compounds phytosphingosine and miconazole nitrate. The fraction of miconazole nitrate, which was located at the oil/water interface contributed to the positive charge of the oil droplets by the protonation of its imidazole nitrogen. Phytosphingosine and Lipoid E 80[®] proved to be good solubilising agents for miconazole nitrate in the oil phase of the positively charged nanoemulsion. The developed nanoemulsion was effective against the fungus *Candida albicans* at low concentrations due to the phospholipids in Lipoid E 80[®], which strongly interact with the cell wall of the fungus, resulting in an enhanced skin penetration of miconazole nitrate. Concomitantly, the membrane stabilising effect of the phospholipid-containing nanoemulsions was proved, so that the developed positively charged nanoemulsion can be categorised as harmless.

Due to its higher partition coefficient Lipoid E 80[®]-containing positively charged nanoemulsion released miconazole nitrate slower than negatively charged and Lipoid E 80[®]-free positively charged nanoemulsion. However, the penetration investigations on excised human skin revealed a stronger penetration of the drug into the skin by positively charged nanoemulsions with Lipoid E 80[®] compared to the negatively charged and the Lipoid E 80[®]-free positively charged nanoemulsions. Thus, Lipoid E 80[®] and phytosphingosine were responsible for the enhanced penetration of miconazole nitrate into the skin. Moreover, the drug penetration was favored by the droplet size of the positively charged nanoemulsions compared to the corresponding macroemulsions. These results show, that phytosphingosine induced positively charged

nanoemulsions are promising drug carrier systems for the dermal application of low soluble drugs such as miconazole nitrate.

In the third part of the work, ESR spectroscopy was used for the characterisation of nanoemulsions. To conduct ESR measurements, nitroxyl radicals (spin labels) were added to the nanoemulsions as reporter molecules, which give information about the physicochemical properties of their microenvironment (e.g. microviscosity and –polarity) and about the penetration and permeation behaviour. TEMPO and TEMPOL were used as spin labels with different lipophilic properties. The physical and chemical stability of the nanoemulsions with these spin labels were given at least for two weeks. The analysis of the ESR spectra showed, that the lipophilic TEMPO was mainly located in the lipophilic phase of the positively charged nanoemulsions, whereas the hydrophilic TEMPOL was predominantly found in the outer water phase. The addition of the reducing agent sodium ascorbate to the nanoemulsions resulted in a rapid reduction of the spin label signal intensity by forming diamagnetic ESR-silent hydroxylamine. This reduction led to a decrease of the TEMPOL concentration in the positively charged nanoemulsions below the detection limit in two minutes. TEMPO was more slowly reduced than TEMPOL, reaching the detection limit after eight minutes. That reduction behaviour revealed, that prior to their reduction the lipophilic TEMPO molecules, which are predominantly located in the oil phase, move to the oil/water interface due to high Laplace pressure of the nanosized oil droplets. The formed highly basic hydroxylamine increased the pH and led to a decline of the zeta potential.

ESR tomography was used for the characterisation of the skin penetration and permeation of the spin labels via positively and negatively charged nanoemulsions. For this the ESR tomograms were splitted into the individual spectra in order to gain information regarding radical concentration, microviscosity, and –polarity. The results showed that with time the nanoemulsions caused a decrease of the viscosity in the upper skin layer, and improved skin penetration. The lipophilic TEMPO accumulated in the high-lipid structures of the lower dermis, whereas TEMPOL was found predominantly in the polar upper layers of the skin and partitioned very slowly from these areas into the lower skin layers.

The improved penetration was probably due to the phospholipids of the nanoemulsion, which led to a strong fluidisation of the stratum corneum, as it is generally known. The increase of the viscosity in the upper skin layer was more pronounced for the positively charged nanoemulsion. Additionally, the TEMPO-containing positively charged nanoemulsion caused a higher increase of polarity in the upper skin layers (up to 250 μm) than the negatively charged nanoemulsions. Consequently, phytosphingosine and its induced positive charge of the nanoemulsion droplet surfaces are responsible for the strong interaction with the skin, leading to a strong fluidisation of the skin and to an increasingly, osmotically caused water influx.