

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

Bei den verwendeten Rohstoffen handelt es sich nur teilweise um chemisch definierte Einzelsubstanzen. Vor allem im Bereich der Lipide wurden komplexe Gemische eingesetzt, die sich herstellerabhängig unterscheiden können. Daher wurde in diesen Fällen aus Gründen einer eindeutigen Zuordnung die Handelsbezeichnung verwendet.

3.1.1 Feste Matrixlipide

Als feste Matrixlipide wurden ausschließlich heterogen zusammengesetzte Glyceridgemische eingesetzt, da der Modellarzneistoff Cyclosporin A im Lipidscreening in diesen die höchste Löslichkeit gezeigt hatte [27].

3.1.1.1 Imwitor 900

Bei Imwitor 900 handelt es sich um ein stark heterogenes Gemisch aus Mono-, Di- und Triglyceriden, das der Monographie „Glycerolmonostearat 40-50 %“ des Arzneibuches entspricht. Hersteller ist die Firma Condea GmbH (D-Witten), die seit Februar 2001 zu der Sasol Gruppe gehört.

Die Fettsäurefraktion besteht zu über 90 % aus Palmitin- und Stearinsäure. Mono- und Diglyceride bilden zusammen über 85 % des Lipidgemisches, es resultiert ein HLB-Wert von 4. Die Beladungskapazität ist daher für viele Fremdstoffe besonders ausgeprägt.

Der Schmelzbereich wird mit 56 – 61 °C angegeben. Die hier verwendete Bulkware lag größtenteils in der β_1 -Modifikation vor, die Reflexe im Weitwinkelbereich waren jedoch sehr breit und deuteten auf eine heterogene kristalline Ordnung hin (zur Polymorphie von Lipiden s. Kapitel 3.5.1).

Die Substanz besitzt G.R.A.S-Status [101] und zeigt auch bei oraler Gabe eine gute Verträglichkeit. In topischen Systemen dient sie vornehmlich als Tensid oder Co-Tensid sowie als Konsistenzgeber [102].

Im Rahmen ihrer Verwendung als Matrixlipid nanopartikulärer Dispersionen steht dem großen Vorteil der hohen Beladungskapazität die geringe Langzeitstabilität der wässrigen Systeme gegenüber [3, 27].

3.1.1.2 Compritol 888 ATO

Compritol 888 ATO ist ein Handelsprodukt der Firma Gattefossé (D-Weil am Rhein) und entspricht der US/NF XVII-Monographie „Gyceryl behenate“. Die INCI-Bezeichnung Tribehenin ist insofern mißverständlich, als es sich vornehmlich um ein Diglycerid (52 - 54 %) der Behensäure (C_{22} , gesättigt) handelt, das hauptsächlich als 1,3-Ester vorliegt. Der Glyceroltribehenat-Anteil beträgt 28 - 32 %, die Monoglyceridfraktion nimmt 12 – 18 % ein. Auch kürzere Fettsäuren ($C_{16} - C_{20}$) finden sich nach Herstellerangaben in geringem Maße (<15 %).

Der Anteil an Partialglyceriden liegt deutlich niedriger als in Imwitor 900, dennoch besitzt auch Compritol leicht amphiphile Eigenschaften (HLB = 2) und ein gegenüber reinen Triglyceriden erhöhtes Inkorporierungsvermögen für Fremdstoffe. Der Schmelzbereich liegt bei 69 – 74 °C, die gelagerte Bulkware weist eindeutig eine β' -Modifikation auf.

Auch dieses Produkt besitzt G.R.A.S.-Status [101], und wird in Emulsionen hauptsächlich als Konsistenzgeber eingesetzt [102].

Auf der Basis von Compritol als Matrixlipid kolloidaler Dispersionen konnten bei geeigneter Tensidwahl bereits langzeitstabile Formulierungen erhalten werden [67]. Von Jenning wurde es in Verbindung mit Miglyol 812 zur Entwicklung der ersten NLC-Systeme verwendet [11, 73].

3.1.2 Flüssige Matrixlipide

Die Wahl flüssiger Matrixlipide wurde anhand ihres Lösungsvermögens für Cyclosporin A getroffen (s. Kapitel 4.2).

3.1.2.1 Octyldodecanol

Bei 2-Octyldodecanol (Ph. Eur. 4.0), auch als Guerbet Alkohol bezeichnet, handelt es sich um einen an 2 Position verzweigten, einwertigen Alkohol. Er wurde unter dem Handelsnamen Eutanol G von der Firma Caesar & Loretz GmbH (D-Hilden) bezogen, die Firma Condea GmbH (D-Witten) bietet ihn unter dem Namen Isofol 20 an. Er ist praktisch unlöslich in Wasser und leicht löslich in fetten Ölen, hat eine Dichte von 0,84 g / mL und eine Viskosität von ca. 60 mPas. Der Schmelzbereich wird mit -1 °C bis $+1\text{ °C}$ angegeben (Produktinformation Condea), der Trübungspunkt liegt $<-10\text{ °C}$ [103]. Er ist stabil gegen Säuren und Alkalien. Auf topischem Gebiet wird er vor allem zur Permeationsverbesserung von Salben und als Lösungsmittel für lipophile Stoffe verwendet.

3.1.2.2 Ungesättigte Fettsäuren

Zum Einsatz kamen hier die einfach ungesättigte Ölsäure (9-Octadecensäure, $C_{18}H_{34}O_2$) sowie die zweifach ungesättigte ω -6-Fettsäure Linolsäure (9,12-Octadiensäure, $C_{18}H_{32}O_2$). Ölsäure (Ph. Eur. 4.0) bildet den Hauptbestandteil vieler nativer Öle (z. B. Olivenöl, Mandelöl) sowie des Fischtrans. Es handelt sich um eine farblose, fast geruchlose Flüssigkeit mit einem Schmelzpunkt von 13 °C [104]. Bei 4 °C erstarrt sie zu einer kristallinen Masse.

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren, welche zwischen Kohlenstoffatomen oberhalb C_9 Doppelbindungen enthalten, sind für den Säugetierorganismus essentiell („Vitamin F“). Ein hoher Gehalt findet sich u. a. in Leinöl, Färberdistelöl, Nachtkerzenöl und Fischölen. Zur Gewinnung von Linolsäure eignet sich vor allem das Grapefruit-Samenöl mit einem Gehalt von >70 % [105]. Der Kristallisationspunkt wird mit –11 °C angegeben.

Hauterkrankungen wie Psoriasis und atopische Dermatitis werden mit einem Mangel an mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Verbindung gebracht. Ein Enzymdefekt (Δ^6 -Desaturase) wird als Ursache diskutiert [106]. Darüber hinaus werden mehrfach ungesättigte Fettsäuren zur unterstützenden Therapie erhöhter Blut-Cholesterinwerte eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Fettsäuren aufgrund ihres ausgezeichneten Lösungsvermögens für Cyclosporin A verwendet (s. Kapitel 4.2). Darüber hinaus wirkt vor allem Ölsäure penetrationsverbessernd, was sich bei topischer Applikation der Systeme vorteilhaft auswirken könnte [87].

Als Nachteil ist ihre Oxidationsempfindlichkeit zu nennen. Während Ölsäure unter Einfluß von Sauerstoff eine gelbbraune Färbung annimmt und einen ranzigen Geruch entwickelt, können durch Autoxidation und radikalische Polymerisation mehrfach ungesättigter Fettsäuren feste, hochmolekulare Harze entstehen. Ein Schutz der Öle durch Inkorporation in die feste Lipidmatrix ist dagegen durchaus in Betracht zu ziehen. Der Kostenfaktor reiner Linolsäure ist ebenfalls als großer Nachteil zu nennen. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten, grundlegenden Experimente wurde daher Linolsäure 60 % (ölige Lösung) der Firma Sigma Aldrich GmbH (D-Deisenhofen) verwendet.

3.1.3 Tenside

3.1.3.1 Tagat S

Bei diesem Handelsprodukt der Firma Goldschmidt Personal care / Degussa (D-Essen) handelt es sich um Polyoxyethylenglycerolmonostearat., d. h. einen nichtionischen O/W-Emulgator.

Sterische Stabilisierung wird durch die hydrophilen Molekülketten erreicht. Der HLB-Wert liegt laut Produktinformation bei ca. 16. Runge beschreibt eine temperaturabhängige Abnahme des HLB-Wertes mit einer Phaseninversionstemperatur bei ca. 55 °C [27].

3.1.3.2 Tween 80

Chemisch handelt es sich um Polyoxyethylen(20)sorbitanmonooleat, abgekürzt auch Polysorbat 80. Der HLB-Wert dieses nicht-ionischen, sterischen Emulgators und Lösungsvermittlers liegt bei 15 [102], er wurde von der Firma Deutsche ICI GmbH (D-Essen) bezogen.

3.1.3.3 Poloxamer 188

Unter dem Namen Lutrol F68 wurde dieses Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockpolymer von der Firma BASF (D-Ludwigshafen) bezogen. Auch hier sind sterische Effekte für die stabilisierende Wirkung verantwortlich, der HLB-Wert liegt bei 29 [107].

3.1.3.4 Natriumcholat

Natriumcholat ist ein Salz der Trihydroxygallensäure und wird als anionischer O/W-Emulgator eingesetzt. Physiologisch bilden Gallensalze vor allem mit peptidartig gebundenem Glycin oder Taurin einen wesentlichen Bestandteil des Gallensekrets. Die emulgierenden Eigenschaften liegen in der ausgeprägten räumlichen Trennung der koplanaren, lipophilen Ringe von den hydrophilen Partialstrukturen und der daraus resultierenden Amphiphilie begründet. Der HLB-Wert liegt laut Produktinformation bei ca. 18.

Gallensalze zeigen darüber hinaus die Tendenz, alleine oder in Kombination mit anderen amphiphilen Molekülen flüssigkristalline Strukturen auszubilden [108]. Die Substanz wurde von der Sigma Aldrich GmbH (D-Deisenhofen) bezogen.

3.1.3.5 Natriumdodecylsulfat

Natriumdodecylsulfat (SDS, Natriumlaurylsulfat) wurde über die Sigma Aldrich GmbH (D-Deisenhofen) bezogen und besitzt als anionisches Netzmittel und Tensid einen HLB-Wert (nach Davies) von ca. 40 [107]. Der Gehalt an Natrium-n-dodecylsulfat muß mindestens 85 % betragen, andere Natriumalkylsulfate sind aber ebenfalls enthalten.

SDS dient als Emulgator in Cremes und Salben, sowie als Netzmittel in festen Arzneiformen. Der Einsatz in parenteralen Präparaten ist aufgrund hepatotoxischer und hämolytischer Eigenschaften der Substanz von der FDA nicht zugelassen.

3.1.3.6 Sacharosestearat

Sacharosestearat wurde in Form des Handelsproduktes sucrose stearate S-1670 der japanischen Firma Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation eingesetzt. Laut Produktinformation liegt der Stearinsäureanteil dieses Gemisches bei ca. 70 %.

Der Veresterungsgrad der Sacharose ist zu 50 % nur einfach, die übrigen Zuckermoleküle sind jedoch zwei- bis mehrfach verestert. Der HLB-Wert wird mit 16 angegeben. Bei Raumtemperatur ist das Pulver löslich in Wasser, der Schmelzpunkt liegt zwischen 49 und 56 °C.

Sacharoseester gewinnen auch in Europa und den USA zunehmend an Bedeutung, da sie selbst in hohen Konzentrationen eine sehr gute Haut- und Schleimhautverträglichkeit zeigen [109].

3.1.3.7 Tego Care 450

Dieses Produkt der Firma Goldschmidt Personal Care / Degussa (D-Essen) besteht aus Polyglycerol-Methylglucosidistearat, einem nicht-ionischen Molekül mit einem HLB-Wert von 11,5. Stabilität ist bei einem pH zwischen 4,5 und 8,5 und über einen großen Temperaturbereich gegeben [102]. Wie auch der Zuckerester ist dieses Tensid PEG-frei, ein Vorteil, da Emulgatoren mit einer solchen Teilstruktur aufgrund ihres herstellungsbedingten potentiellen Restgehalts an Dioxan oder freiem Ethylenoxid kontrovers diskutiert werden [110].

3.1.3.8 Miranol Ultra C32

Dieses Glycinamphotere (INCI = Sodium-Cocoamphoacetate) wurde von der Firma Rhodia (D-Frankfurt) bezogen. Der isoelektrische Punkt liegt bei pH 7, der pH einer 20 %igen Lösung bei 9, zwischen pH 2 und pH 13 ist die Substanz als stabil zu bezeichnen.

Die hydrophile Kopfgruppe des Moleküls ist relativ klein und seine Fettsäureketten ebenfalls kurz, so daß eine hohe Beweglichkeit des Moleküls resultiert. Grenzflächen können dadurch schnell besetzt werden [6]. Vom Hersteller wurde der HLB-Wert des Tensids nicht bestimmt, Jennings schätzt ihn anhand entsprechender Experimente jedoch mit etwa 34 ein [12].

3.1.4 Modellarzneistoff Cyclosporin A

Ziel dieser Arbeit war u. a. die vergleichende Untersuchung von SLN und NLC in Bezug auf ihr Inkorporierungsvermögen von Fremdstoffen. Vor allem stellte sich die Frage, ob die von Jenning für Retinol beobachtete Erhöhung der Beladungskapazität durch Zusatz einer flüssigen Lipidkomponente auch auf andere Arzneistoffmoleküle übertragbar ist. Der Modellarzneistoff sollte dabei möglichst keine chemische Ähnlichkeit mit Lipiden aufweisen und auch durch seine Größe eine Inkorporierung erschweren. Da sowohl die prinzipiell für jeden Applikationsweg geeigneten, flüssigen Lipiddispersionen, als auch die topischen Systeme untersucht werden sollten, war eine vielseitige Indikationsstellung für den Arzneistoff wünschenswert. Die Herstellung übersättigter topischer Systeme sollte eine verstärkte Penetration des Modellarzneistoffes bewirken, so daß bei einem diesbezüglich problematischen Wirkstoff mit einem echten therapeutischen Nutzen zu rechnen wäre.

Die Wahl fiel daher auf das bereits von Runge zur SLN-Herstellung eingesetzte Immunsuppressivum Cyclosporin A [27, 111].

Obwohl die Markteinführung der aus dem Bodenpilz *Tolypocladium inflatum* gewonnenen Substanz bereits 20 Jahre zurückliegt und ihre Anwendung in der Praxis durch die hohe dosisabhängige Nephrotoxizität nur eingeschränkt möglich ist, stellt sie noch immer den Hauptpfeiler jeder Transplantat erhaltenden Therapie dar. Die Nierenschädigung beruht auf dem Wirkungsmechanismus von Cyclosporin A als Calcineurin-Inhibitor in T-Lymphozyten. Die Bildung der Zytokine Interleukin-2, -3, -6 und -7 sowie von Interferon wird dadurch gehemmt.

Neuere Immunsuppressiva mit anderen Wirkmechanismen wie die monoklonalen Antikörper Basiliximab und Daclizumab oder das makrozyklische Lacton Sirolimus (Rapamycin) besitzen jedoch eine zu geringe eigene Wirkstärke, um Cyclosporin A in der Therapie vollständig zu ersetzen [112, 113].

Neben seinem Einsatz in der Transplantationsmedizin wird Cyclosporin A u. a. auch zur Behandlung immunologischer und entzündlicher Erkrankungen des Auges [114], der Graft-versus-host-Erkrankung, der rheumatoiden Arthritis [115] sowie der therapieresistenten atopischen Dermatitis und Psoriasis eingesetzt [116].

Aufgrund der ungenügenden Hautpenetration des Arzneistoffs ist die alleinige topische Applikation jedoch bislang nicht von ausreichender Wirksamkeit [28, 117], auf dem internationalen Markt ist daher kein einziges dermales Handelspräparat zu finden. Mit dem Calcineurin-Inhibitor Tacrolimus konnten hier größere Erfolge erzielt werden (Protopic®) [118, 119]. Als neuestes Produkt ist seit Februar 2003 in Deutschland das Handelspräparat Elidel® (1 % Creme) der Firma Novartis mit dem Macrolactam-Derivat Pimecrolimus – ebenfalls ein Calcineurin-Inhibitor - zugelassen. Dieses wirkt jedoch laut Fachinformation primär antiinflammatorisch.

Aufgrund der vielfältigen Indikationsgebiete und des Mangels an echten Alternativen konzentriert sich die Arbeit zahlreicher Forschergruppen weltweit auf die Entwicklung neuer galenischer Konzepte, die bei oraler oder intravenöser Gabe die Bioverfügbarkeit optimieren, die Nebenwirkungsrate verringern oder aber die dermale Penetration verbessern können. Den ersten Schritt bildete dafür die Entwicklung der im Handel befindlichen Mikroemulsion Sandimmun Optoral® der Firma Novartis Pharma AG [120-122]. Durch Inkorporation des Wirkstoffs in SLN konnte Runge die bei Gabe der Mikroemulsion auftretenden hohen Plasmaspeaks vermeiden [27]. Der enzymatische Abbau der entwickelten SLN-Formulierung wird von Olbrich beschrieben [76].

Darüber hinaus finden sich in der Literatur u. a. Cyclosporin A-Formulierungen auf der Basis von Liposomen [123-125], Nanosuspensionen [126, 127], Polymer-Nanopartikeln [127, 128], Lipid-Nanopartikeln [27, 129, 130] oder Mikropartikeln [131]. Zur topischen Applikation werden zusätzlich penetrationsverbessernde Ansätze mittels Enhancern wie Azone, Propylenglykol oder Polyethylenglykol-8-glycerolcaprylat beschrieben. Die Cyclosporin-Konzentration lag hier zwischen 1 % und 10 % [132-135]. Die mangelhafte dermale Penetration von Cyclosporin A ist in seiner chemischen Struktur und Größe begründet. Es handelt sich um ein zyklisches, poly-N-methyliertes Undecapeptid (Abbildung 3-1) mit einem Molekulargewicht von 1203 D. Bis auf eine Aminosäure (⁸D-Ala) liegen diese in L-Konfiguration vor. Der Schmelzpunkt des weißen, kristallinen Pulvers wird mit 148 - 151 °C angegeben (Herstellerinformation und [105]). Aufgrund seiner hohen Lipophilie ist es in Wasser nur schwer löslich (0,04 mg / mL bei 25 °C [122]), in Methanol, Ethanol, Aceton, Ether und Chloroform ist die Löslichkeit dagegen gut. Die Substanz wurde von der Firma Poli Industria Chimica (I-Rozzano) bezogen.

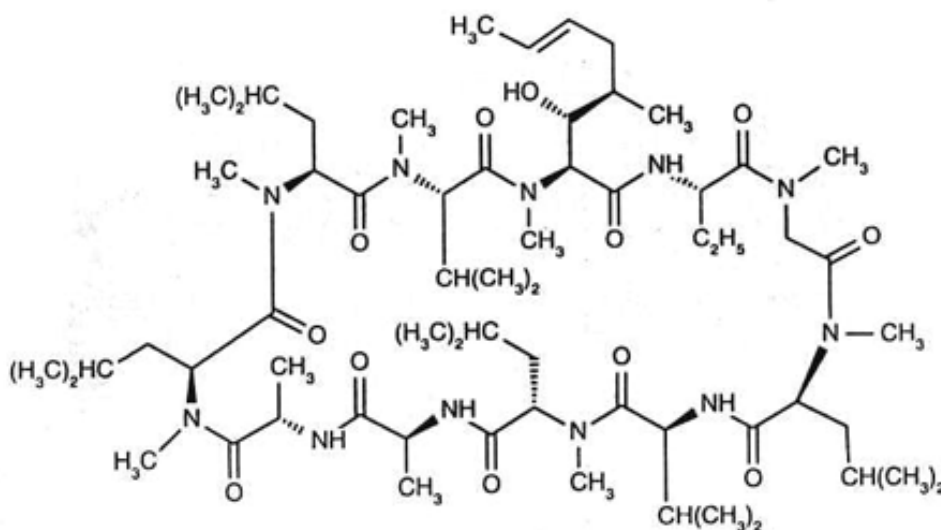


Abbildung 3-1: Chemische Struktur des Modellarzneistoffes Cyclosporin A

3.1.5 Sonstige Rohstoffe und Reagenzien

Alle sonstigen Rohstoffe und Reagenzien entsprachen den Herstellerspezifikationen oder offiziellen Monographien. Sie sind in Tabelle 3-1 aufgeführt.

Tabelle 3-1: Sonstige Rohstoffe und Reagenzien

Substanz	Hersteller/Lieferant	Beschreibung und Verwendung
Miglyol 812	Caesar & Loretz GmbH (D-Hilden)	Flüssiges Triglycerid mit Fettsäuren der Kettenlänge C ₈ – C ₁₂ Lösungsmittel und Hautöl, hier lipophiler Bestandteil der Cremegrundlage
Tristan	Sigma Aldrich GmbH (D-Deisenhofen)	= Tromethamol oder Tromethamin, primäres Amin zur Neutralisation von Carbopol-haltigen Gelen oder Cremes
Carbopol 940	Caesar & Loretz GmbH (D-Hilden)	Polyacrylat, Gelbildner und Verdickungsmittel der beschriebenen O/W-Creme
Glycerol 100 %	Merck Eurolab GmbH (D-Darmstadt)	Feuchthaltemittel
Acetonitril (HPLC-Qualität)	Merck Eurolab GmbH (D-Darmstadt)	Bestandteil des verwendeten HPLC-Fließmittels
Tert. Butyl-methyl-ether (HPLC-Qualität)	Merck Eurolab GmbH (D-Darmstadt)	Bestandteil des verwendeten HPLC-Fließmittels
Aceton (HPLC-Qualität)	Merck Eurolab GmbH (D-Darmstadt)	Lösungsmittel im Rahmen der HPLC-Analytik
Wasser	Millipore (D-Schwalbach)	Hergestellt durch Umkehrosmose und anschließende Aufreinigung in einer MilliQ plus-Anlage, entspricht Arzneibuchmonographie „Aqua purificata“

3.2 Herstellung kolloidaler Lipiddispersionen

Prinzipiell können für die Herstellung kolloidaler Lipiddispersionen verschiedene Verfahren herangezogen werden. Zu nennen sind hier in erster Linie die Präzipitation aus O/W-Emulsionen [44], die Herstellung aus warmen Mikroemulsionen [43, 136], die Produktion mittels Mikromischern [137] und vor allem die bereits auch im Großmaßstab erfolgreich angewandte Hochdruckhomogenisation (heiß oder kalt) [42].

Im Rahmen dieser Arbeit kam hauptsächlich das Verfahren der heißen Hochdruckhomogenisation mittels eines Micron LAB 40, einem Kolben-Spalt-Homogenisator der Firma APV Systems (D-Unna), zum Einsatz. Die Hochdruckhomogenisation bietet gegenüber den anderem erwähnten Verfahren vor allem den Vorteil, daß die Konzentration der Lipidphase auf mind. 40 % erhöht werden kann und auf die Verwendung organischer Lösungsmittel verzichtet wird. Die Chargengröße betrug in der Regel 40 mL.

Für die Zerkleinerung der geschmolzenen, inneren Lipidphase ist der kombinierte Mechanismus von Turbulenz und Kavitation verantwortlich [138]. Physikalisches Grundprinzip ist hier die Bernoulli-Gleichung:

$$p_{\text{stat}} + p_{\text{dyn}} = \text{konstant}$$

In einem System ist folglich die Summe aus statischem und dynamischen Druck konstant. Wird nun die Dispersion im Homogenisationsventil durch den Ringspalt gepreßt, steigt die Strömungsgeschwindigkeit und damit der dynamische Druck so stark an, daß der statische Druck unter den Dampfdruck des Dispersionsmediums (in der Regel Wasser) abfällt und dieses beginnt zu sieden [139]. Bei Austritt aus dem Spalt sinkt der dynamische Druck abrupt durch Abnahme der Strömungsgeschwindigkeit und die Gasblasen implodieren unter Erzeugung von Stoßwellen, die zur Zerteilung der inneren Phase führen (Kavitation).

Nach neueren Erkenntnissen sind jedoch vor allem die Bildung der Gasbläschen im Ringspalt und die daraus resultierenden Turbulenzen von entscheidender Bedeutung für die Zerkleinerungseffizienz.

Die den Herstellungsprozeß beeinflussenden Faktoren wie z. B. Druck, Temperatur und Zyklenzahl wurden bereits ausgiebig untersucht [64, 67, 140, 141].

Darauf basierend wurde folgendes Standard-Herstellungsprotokoll gewählt:

1. Herstellung einer Rohemulsion aus der auf gleiche Temperatur erwärmten Lipid- und Wasserphase mittels eines Ultra-Turrax T25 (9.500 UpM, 1 min; Jahnke und Kunkel GmbH, D-Staufen). Bei Verwendung von Imwitor wurde eine Herstellungstemperatur von 85 °C gewählt, für Compritol-Chargen und hochkonzentrierte Proben wurde sie auf 95 °C erhöht.
Der Arzneistoff Cyclosporin A wurde bei der Herstellung wirkstoffhaltiger Dispersionen zuvor in der Lipidphase gelöst. Durch Verwendung eines Wasserbades wurde gewährleistet, daß die Temperatur zu keinem Zeitpunkt über 95 °C anstieg.
2. Hochdruckhomogenisation der Rohemulsion bei 500 bar, 3 Zyklen, bei 85 °C oder 95 °C (s. 1.)
3. Abfüllung der heißen Nanoemulsion in silanierte Glasvials (flüssige Formulierungen) oder Metalltuben (halbfeste Systeme).

Bei Herstellung der als Vergleich eingesetzten Nanoemulsionen wurde ebenfalls nach dem beschriebenen Protokoll verfahren.

3.3 Herstellung SLN / NLC-haltiger O/W-Cremes

Bei der Herstellung der in Kapitel 5 beschriebenen halbfesten Formulierungen wurden zunächst 40 % der Wasserphase einer kommerziellen, kosmetischen O/W-Creme durch die entsprechenden Lipiddispersionen (SLN, NLC, Nanoemulsion) ersetzt. Die Lipidgrundlage der Creme setzte sich qualitativ folgendermaßen zusammen (INCI Volldeklaration), eine quantitative Angabe ist aus Gründen des Firmengeheimnisses nicht möglich:

Glyceryl Stearate Citrate, Hydrogenated Coco Glycerides, Tridecyl Stearate, Tridecyl Trimelliate, Dipentaerythrityl Hexacaprylate / Hexacaprate, Octyl Cocoate, Camelia sinensis, Butyrospermum parkii, Octyl Methoxycinnamate, Myristyl Alcohol, Cetyl Alcohol, Carbomer, Glycerin, Titane dioxide, Phenoxyethanol, Methyl-, Ethyl-, Propyl- and Butylparaben, Methylidibromo Glutaronitrile

Röntgendiffraktometrische und thermoanalytische Untersuchungen partikelfreier Cremes ergaben eine durch den Emulgator Glycerolstearatcitrat hervorgerufene Eigenkristallinität, die eine exakte Charakterisierung des Kristallstatus einzuarbeitender Lipidpartikel erschweren würde.

Um diese Eigenkristallinität aufzuheben wurde ein Teil der Lipidphase durch Miglyol 812 ersetzt. Die dadurch reduzierte Emulgatorkonzentration wurde durch einen Tween 80-Zusatz zur Wasserphase ausgeglichen.

Als generelle Zusammensetzung der Cremeformulierungen ergab sich folglich:
Kommerzielle Lipidgrundlage 12 %, Miglyol 812 10 %, Glycerol 10 %, Tween 80 2 %, Tristan 0,4 %, Carbopol 940 0,4 %, Nanodispersion 40 %, Aqua ad 100 %.

Es wurde nach folgendem Herstellungsprotokoll verfahren:

1. Getrenntes Erhitzen der Fett- und Wasserphase auf 85 °C. Sollte die Cremegrundlage Arzneistoff enthalten, wurde dieser in der Lipidphase gelöst.
2. Emulgierung der Phasen mittels hochtourigem Rührer über 1 min bei 500 UpM (Cito Unguator, Apotheker Konizcki, D-Bamberg)
3. Abkühlung auf 40 °C unter Rühren
4. Zusatz der Dispersion (1 Min. rühren) und anschließender Zusatz des Gelbildners Carbopol, Neutralisierung erfolgt dabei über das in der Wasserphase enthaltene Tristan
5. Nach ca. 10 Min. erneutes Rühren und Abfüllung in Metalltuben.

Der Gehalt an SLN / NLC bzw. Ölphase (aus der Nanoemulsion) lag in Abhängigkeit von der eingesetzten Lipidkonzentration bei 6 bzw. 8 % bezogen auf die Creme. In den als Vergleich hergestellten, dispersionsfreien Cremes wurde der Lipidanteil um diesen Prozentsatz erhöht, um eine identische Lipidkonzentration zu gewährleisten.

3.4 Charakterisierung von Partikelgröße und -ladung

Zur Größencharakterisierung von Partikeln oder Emulsionstropfen im Nanometer- und unteren Mikrometerbereich können prinzipiell eine Reihe von Verfahren wie z. B. die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS), die Laserdiffraktometrie (LD), die Elektronenmikroskopie oder der Coulter Counter herangezogen werden [142, 143]. Da jedes Verfahren mit Vor- und Nachteilen behaftet ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Kombination von PCS und LD zur Partikelgrößenanalytik ausgewählt. Beide Verfahren basieren auf der Annahme kugelförmiger Partikel, die im Fall von Lipidpartikeln jedoch häufig nicht ausgebildet werden. Der dadurch hervorgerufene systematische Fehler führt zwar zu ungenauen absoluten Größenwerten, eine vergleichende Beurteilung der Langzeitstabilität, die im Rahmen dieser Arbeit von vorrangiger Bedeutung war, ist jedoch möglich.

Das Vorhandensein von Partikeln oder Aggregaten im Mikrometerbereich wurde vor allem in den halbfesten Systemen darüber hinaus durch lichtmikroskopische Studien überprüft und abgesichert.

Kenntnis der Partikelladung ermöglicht häufig Voraussagen über die Stabilität des Systems gegenüber Lagerung und äußeren Einflüssen [144]. Das Zetapotential der hergestellten Formulierungen wurde daher durch Laser-Doppler-Anemometrie bestimmt. Die Bedeutung der ermittelten Werte wird jedoch dadurch eingeschränkt, daß in einem Großteil der Chargen hauptsächlich sterische Stabilisatoren zum Einsatz kamen. Eine geringe Partikelladung muß unter diesen Umständen nicht notgedrungen zu instabilen Systemen führen.

3.4.1 Laserdiffraktometrie

Das Verfahren der Laserdiffraktometrie nutzt die Analyse der Beugungsmuster die entstehen, wenn Teilchen unterschiedlicher Größe in den Strahlengang eines (Laser-)Lichtstrahles eingebracht werden. Die Beugungsbilder sind charakteristisch für den Partikeldurchmesser – je kleiner der Partikel desto größer der Beugungswinkel - und können mittels mathematischer Analyse zur Ermittlung der vorliegenden Partikelgrößenverteilung herangezogen werden [142, 145].

In der Praxis handelt es sich um ein Vorwärtsmeßverfahren. Der Laserstrahl wird durch ein optisches System aufgeweitet. Durch eine der Probe nachgeschaltete Fourier-Linse wird dafür gesorgt, daß die Beugungsbilder unabhängig von der Lage der Partikel im Meßvolumen an einer Stelle des aus Ringsegmenten aufgebauten Multielementdetektors fokussiert werden.

Der Meßbereich des verwendeten LS230 der Firma Coulter Electronics liegt aufgrund der Verwendung zweier Fourier-Linsen und dreier Detektoren (low-, mid- und high-angle-detector) sowie der kombiniert eingesetzten PIDS-Technologie zwischen 40 nm und 2000 µm. Die Abkürzung PIDS steht für Polarization Intensity Differential Scattering und ermöglicht die exakte Bestimmung von Partikelgrößen im Submikronbereich anhand der unterschiedlichen Streuung polarisierten Lichtes durch diese Teilchen. Für die Messung wird durch ein Filtrerrad jeweils nur das Licht einer Polarisationssebene (senkrecht oder parallel zur Streuebene) und einer Wellenlänge (450 nm, 600 nm oder 900 nm) aus der gebündelten weißen Lichtquelle herausgefiltert. Die Symmetrie des Streumusters wird von sechs sogenannten PIDS-Detektoren im Winkel von 60°, 75°, 90°, 105°, 120° und 146°erfaßt.

Die Auswertung der LD-Beugungsbilder kann mathematisch nach der Fraunhofer- oder der Mie-Theorie erfolgen. Da die Fraunhofer-Näherung für Partikel gilt, deren Größe deutlich über der Wellenlänge der verwendeten Lichtquelle liegt (hier Halbleiterlaser mit ca. 750 nm), wurde im Rahmen dieser Arbeit die Mie-Theorie zur

Berechnung herangezogen (Gültigkeit im Submicronbereich). Deren Anwendung setzt jedoch u. a. die Kenntnis des realen Brechungsindex der Partikel sowie des durch die Partikel absorbierten Anteils des Laserlichtes (imaginärer Teil) voraus. Als Konvention wurden die berechneten Werte einer milchigen Lipidemulsion herangezogen. Als Brechungsindex der Partikel wurde folglich 1,45635 und als Lichtabsorption 0,01 festgelegt.

Als charakteristische Parameter wurden in erster Linie die Durchmesser LD 50, LD 90, LD 95 und LD 99 festgelegt. Der Wert LD 50 besagt dabei, daß 50 % der detektierten Teilchen einen kleineren Durchmesser aufweisen als der genannte. Es handelt sich dabei stets um eine volumenbezogene Verteilung, so daß größere Partikel stärker gewichtet werden.

3.4.2 Photonenkorrelationsspektroskopie

Bei der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS), auch als QUELS (quasi-elastic light scattering) oder DLS (dynamic light scattering) bezeichnet, handelt es sich um ein dynamisches Laserstreulichtverfahren, dessen Theorie und Praxis bereits ausgiebig in der Literatur beschrieben wurden [142, 146]. Grundlage des Meßverfahrens ist die Streuung von Licht an kolloidalen Teilchen, man erhält den mittleren Partikeldurchmesser sowie die in Form des Polydispersitätsindex (PI) angegebene Breite der Verteilung.

Der Meßbereich liegt zwischen 3 nm und 3 - 5 µm. Erfasst werden die durch Diffusion der Teilchen hervorgerufenen Schwankungen der Streulichtintensität, wobei die Detektion in der Regel in einem Winkel von 90° erfolgt. Kleinere Teilchen besitzen eine geringere Trägheit und werden deshalb durch die Brownsche Molekularbewegung der sie umgebenden Flüssigkeitsmoleküle zu einer schnelleren Bewegung angeregt als große Partikel. Oberhalb 5 µm tritt zusätzlich noch eine das Meßergebnis verfälschende Sedimentation der Partikel auf, wodurch sich die obere Begrenzung des Meßbereiches erklärt.

Die Intensitätsschwankungen werden durch einen Photomultiplier erfaßt. Mit Hilfe eines Korrelators wird eine Autokorrelationsfunktion berechnet und diese an eine theoretische Korrelationsfunktion $g(\tau)$ angepaßt. Der Polydispersitätsindex beschreibt dabei die mathematische Abweichung zwischen der gemessenen und der theoretischen Korrelationsfunktion. Bei einer monomodalen Partikelpopulation wären diese identisch, der PI nähme den Wert 0 an. In der Praxis spricht man bei Werten unter 0,06 von Monodispersität, bei einem PI zwischen 0,1 und 0,25 kann die Verteilung noch als eng bezeichnet werden.

Über die theoretische Korrelationsfunktion wird die Diffusionskonstante D ermittelt, welche wiederum in die Einstein-Gleichung eingesetzt werden kann. Der Radius der Hauptpopulation kann anschließend über diese wie folgt errechnet werden:

$$r = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D}$$

r = mittlerer Teilchenradius

k = Boltzmann-Konstante

η = dynamische Viskosität des Meßmediums

T = absolute Temperatur

Es ist an dieser Stelle festzuhalten, daß die erläuterten Zusammenhänge nur für kugelförmige Partikel gelten und sowohl die Temperatur als auch insbesondere die Viskosität des Meßmediums von entscheidender Bedeutung sind.

Im Rahmen dieser Arbeit kam ein Zetasizer 4 (Malvern Instruments, UK) zum Einsatz. Das Gerät verwendet einen Laser der Wellenlänge 632,4 nm und mißt standardmäßig in einem Winkel von 90°. Die Proben wurden mit Reinstwasser auf die empfohlene Streulichtintensität verdünnt, um Mehrfachstreuungen zu vermeiden. Die Meßzeit betrug 200 s (10 Einzelmessungen zu 20 s), die Meßzeit Δt wurde vom Gerät automatisch festgelegt.

3.4.3 Zetapotential und Laser-Doppler-Anemometrie

Das Zetapotential ist definiert als das Potential zwischen der Scherebene und einem Punkt in unendlicher Entfernung vom Teilchen im Dispersionsmedium. In Medien mit geringer Leitfähigkeit kann es näherungsweise mit der Oberflächenladung gleichgesetzt werden.

Je größer der Betrag des Zetapotentials, desto größer ist die elektrostatische Abstoßung zwischen den dispergierten Teilchen, und desto stabiler ist folglich das System. Wie aus der Technologie der Fettemulsionen bekannt ist, können Systeme mit einem Zetapotential von betragsmäßig >30 mV als stabil bezeichnet werden. Durch zusätzliche sterische Stabilisierung kann jedoch auch bei geringeren Werten Aggregation bzw. Koaleszenz verhindert werden.

Die Laser-Doppler-Anemometrie erfaßt die Wanderungsgeschwindigkeit der Partikel im elektrischen Feld indirekt über die Frequenzverschiebung von an den Partikeln gestreutem Laserlicht (Doppler Effekt).

Hierzu wird ein kohärenter Laserstrahl aufgespalten, umgelenkt und über ein Spiegelsystem in einer Küvette zum Schnitt gebracht. Einer der Teilstrahlen wird dabei um eine Frequenz von 250 Hz verschoben, so daß im Schnittpunkt ein durchlaufendes Interferenzstreifenmuster resultiert. Auf diese Weise kann zusätzlicher Aufschluß über die Bewegungsrichtung der Partikel und damit das Vorzeichen des Potentials gewonnen werden.

Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der angelegten Feldstärke. Setzt man beide Werte ins Verhältnis resultiert die elektrophoretische Mobilität, die wiederum nach Helmholtz-Smoluchowski ins Zetapotential konvertiert werden kann. Zur detaillierten Beschreibung des Zetapotentials vergleiche [144].

Die Messungen wurden an einem Zetasizer 4 der Firma Malvern Instruments (UK-Malvern) durchgeführt. Da das Zetapotential erheblich von dem eingesetzten Meßmedium beeinflusst wird, wurden alle Messungen in bidestilliertem Wasser durchgeführt, das mit NaCl-Lösung auf eine Leitfähigkeit von 50 $\mu\text{S} / \text{cm}$ eingestellt wurde. Die Feldstärke betrug durchgängig 20 V / cm. Der pH-Wert der Meßlösung wurde mit einem pH-Meter CG840 mit Glaselektrode (Mettler-Toledo, D-Steinbach) bestimmt.

Um die Stabilität der Partikeldispersionen nach Einarbeitung in eine Cremegrundlage abschätzen zu können, wurde bei ausgewählten Proben zusätzlich das Potential in Wasser gemessen, welches zuvor auf die Leitfähigkeit und den pH-Wert der Creme eingestellt wurde.

3.5 Charakterisierung der Kristallstruktur

Wie bereits eingangs diskutiert hat die Kristallstruktur lipidischer Arzneistoffträger einen erheblichen Einfluß auf die Parameter Langzeitstabilität und Arzneistoffinkorporation. Ausgiebige Untersuchungen zur Polymorphie von Lipiden finden sich daher bereits seit den 50er Jahren [147-151] wobei unter pharmazeutischem Aspekt hauptsächlich Suppositorien auf Hartfettbasis diskutiert wurden [152].

Auch bezüglich der Polymorphie von Lipidnanopartikeln finden sich bereits detaillierte Untersuchungen in der Literatur [7, 12, 69, 72, 153, 154]. Es werden daher an dieser Stelle die bei Mischglyceriden auftretenden polymorphen Phänomene sowie die zu deren Analytik eingesetzten Methoden nur im kurzen Überblick erläutert.

3.5.1 Polymorphie von Lipiden

Unter Polymorphie versteht man die Fähigkeit eines Feststoffes unterschiedliche innere Kristallstrukturen auszubilden. Kristallumwandlungen treten auch bei Lipiden auf und sind in der Regel monotroper Natur in Richtung auf die stabilste Form (= Hochtemperatur-Modifikation). Bei langgestreckten Lipidmolekülen ist zwischen der Kristallordnung der Gesamtmoleküle in einer sogenannten Elementarzelle als kleinster sich wiederholender Raumeinheit und der Ordnung innerhalb der Moleküle (CH_2 -Gruppen) in Form sogenannter Subzellen zu unterscheiden. Lipide können in lamellarer, hexagonaler oder kubischer Struktur auftreten. Für polyacide Mischglyceride können folgende lamellare Modifikationen unterschieden werden [149, 152]:

α : hexagonale Elementarzelle; Fettsäureketten sind frei um ihre Achse drehbar; instabile und energiereichste Modifikation mit niedrigsten Schmelzpunkt; tritt in der Regel kurz nach der Kristallisation der zuvor geschmolzenen Lipide auf und geht dann unterschiedlich schnell in die stabileren β -Modifikationen über;
WAXS-Muster: nur ein Streureflex bei $d = 0,41 - 0,42 \text{ nm}$

β' : orthorhombische Subzelle; Fettsäureketten zeigen bereits zwischenmolekulare Bindungskräfte und sind nicht mehr frei drehbar; Anzahl der Gitterdefekte noch relativ groß;
WAXS-Muster: Reflexe bei $d = 0,42 - 0,43 \text{ nm}$ und $d = 0,37 - 0,40 \text{ nm}$

β_i : Kristallzelle hat wahrscheinlich orthorhombische und triklinen Merkmale; tritt nur bei komplexen Lipidgemischen (Mono-/Diglyceride, polyacide Glyceride) auf; bei diesen dann häufig die stabilste Modifikation, da die Ausbildung hochkristalliner Strukturen durch Gitterfehlstellen (Kinken) und unterschiedliche Fettsäurelängen behindert wird;
WAXS-Muster: Reflex bei $d = 0,46 \text{ nm}$ und $0,42 \text{ nm}$, weitere Reflexe z. B. bei $d = 0,37 - 0,39 \text{ nm}$ sind möglich

β : Triklone Elementar- und Subzelle; hochkristallin mit höchstem Schmelzpunkt; findet sich in reiner Form hauptsächlich bei monoaciden Triglyceriden; bietet durch den Mangel an Fehlstellen wenig Raum für Fremdmoleküle;
WAXS-Muster: Reflex bei $d = 0,46 \text{ nm}$ und häufig zwischen $d = 0,37$ und $0,39 \text{ nm}$, Reflex bei $d = 0,42 \text{ nm}$ ist im Unterschied zu β_i meist nicht vorhanden oder nur schwach ausgeprägt.

Während das äußerst monoglyceridreiche Lipid Imwitor 900 hauptsächlich in einer α -Modifikation auskristallisiert und sich dann im Verlauf der folgenden Wochen bis Monate über β' zur β_i -Modifikation umwandelt, konnte bei Glycerolbehenat-Mischungen (Compritol) die α -Modifikation bislang nur während des Kristallisationsprozesses als Übergangszustand beobachtet werden. Die β' -Modifikation wird direkt im Anschluß ausgebildet und kann in Abhängigkeit von Formulierung und Lagertemperatur über Monate bis Jahre konserviert werden.

3.5.2 Dynamische Differenzkalorimetrie

Wie bereits erläutert unterscheiden sich die verschiedenen Lipidmodifikationen u. a. in ihrem Schmelz- und Kristallisationsverhalten. Mittels der Differential Scanning Calorimetry (DSC) - auch dynamische Differenz-Wärmestrom-Kalorimetrie genannt - können die endothermen Schmelz- und exothermen Kristallisationsprozesse thermoanalytisch verfolgt werden [155, 156]. Verwendet wurde eine Mettler DSC 821e (Mettler, D-Gießen), welche die Differenz der Wärmeströme zu einem Proben- und einem leeren Referenztiegel während eines kontrollierten Temperaturprogramms erfaßt.

Im Bereich der Lipidnanopartikel-Forschung wurde die DSC bereits ausgiebig zur Untersuchung des Kristallstatus eingesetzt [7, 69, 72]. Eine Unterscheidung flüssiger, amorpher und kristalliner Strukturen sowie die Detektion unterkühlter Schmelzen ist auf thermoanalytischem Weg möglich [157].

Darüber hinaus kann die DSC durch Kombination mit anderen Verfahren zur Aufklärung der Arzneistofflokalisierung beitragen [5]. De Vringer etablierte das Verfahren zur Charakterisierung topischer Systeme mit darin enthaltenen Lipidpartikeln [26]. Im Unterschied zu Liposomen-haltigen Präparaten kann hier die Existenz und Stabilität von Lipidpartikeln über die Quantifizierung der Schmelzenthalpie leicht erfaßt werden.

Als wichtige Kenngrößen der DSC-Analytik dienen die Onset-Temperatur, die Temperatur der Peakmaxima / -minima sowie die Enthalpie des Schmelz- bzw. Kristallisationsprozesses. Ein direkter Vergleich der Parameter von Bulkmaterial und Nanopartikeldispersionen ist nicht zulässig, da die Größe der Kristalle diese stark beeinflusst [158].

Für kolloidale Kristalle kann die Thomson-Gleichung herangezogen werden [159], die besagt, daß der Schmelzpunkt eines Kristalls im Nanometerbereich stets niedriger liegt als der des Bulkmaterials.

$$\ln \frac{T}{T_0} = \frac{2 \cdot \gamma \cdot V_s}{r \cdot \Delta H}$$

T = Schmelzpunkt des Kristalls, T₀ = Schmelzpunkt des Bulkmaterials

γ = Grenzflächenenergie des Kristalls

V_s = Molvolumen der festen Substanz

r = Kristallradius

ΔH = molare Schmelzenthalpie

Dies ist auch bei aggregierten oder stark polydispersen Systemen zu berücksichtigen. Es ist weiterhin zu beachten, daß es bei Partialglyceriden und Lipidgemischen häufig zu fließenden Übergängen zwischen den verschiedenen Modifikationen kommt, die auch durch geringe Heizraten nicht getrennt erfaßt werden können. Der Schmelzprozeß ist gekennzeichnet durch Peakschultern und Nebenmaxima. Die Enthalpie kann dementsprechend nur als Summe aller ablaufenden thermischen Prozesse berechnet werden.

Besonders geeignet ist die DSC daher zur vergleichenden Analytik im Rahmen der Langzeituntersuchung von größenstabilen Partikeldispersionen. Aussagen über Kristallmodifikationen und den Aufbau von Elementarzellen sind dagegen ohne Ergänzung durch andere Analyseverfahren nur beschränkt sinnvoll. Folglich wurde im Rahmen dieser Arbeit die Thermoanalyse stets durch Röntgendiffraktometrie ergänzt.

Für die Analyse wurden jeweils Probeneinwaagen gewählt, die ca. 1 mg kristalline Substanz enthielten. Verwendet wurden 40 µL Aluminiumtiegel, die zur Vermeidung von Wasserverdunstung verschweißt wurden.

Die Heizrate betrug 5 K / min. Zunächst wurden die Proben dabei von 25 °C auf 85 °C erwärmt, dort 5 Minuten isotherm belassen und anschließend auf 20 °C abgekühlt. Zur Charakterisierung der Ölkomponenten (NLC) wurden die Proben bei gleicher Heizrate von 25 °C auf -60 °C abgekühlt und anschließend wieder auf 25 °C erwärmt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Star Software, Version 6.0 (Mettler, D-Gießen), die Parameter Onset und Peakweite wurden durch diese Software errechnet.

3.5.3 Röntgendiffraktometrie

Röntgenstrahlen sind elektromagnetische Wellen mit einer Länge, die in der Größenordnung atomarer Abstände in Kristallen liegt (ca. 1 Å). Setzt man voraus, daß Kristalle aus gleichwertigen parallelen Ebenen mit einem konstanten Abstand (Netzebenenabstand = d) aufgebaut sind, so tritt bei Beugung des Röntgenstrahles an jeder einzelnen Netzebene eine Überlagerung von Wellen auf. Die Beugung kann dabei auch als einfache Reflexion aufgefaßt werden [160]. In Abhängigkeit von der Geometrie des Kristalls und des Streuwinkels kommt es zu Interferenzerscheinungen wie Verstärkung oder Auslöschung. Eine maximale Intensität wird erreicht, wenn die Bragg'sche Reflexionsbedingung erfüllt wird. Diese besagt, daß die an verschiedenen Netzebenen eines Kristalls reflektierten Strahlen nur dann in Phase schwingen, wenn der Weglängenunterschied ein ganzzahliges Vielfaches (n) der Röntgenwellenlänge (λ) beträgt:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \Theta$$

Abbildung 3-2 erläutert die Zusammenhänge auf einfache Weise. Treffen zwei Röntgenstrahlen I und II unter dem Winkel Θ auf zwei benachbarte Netzebenen des Abstandes d so werden sie im gleichen Winkel gebeugt. Der Wegunterschied zwischen den beiden Strahlen ergibt sich demnach zu $2 d \sin \Theta$.

Zur Angabe der Lage eines Intensitätsmaximums wird entweder der Streuwinkel als 2Θ , der Netzebenenabstand d oder der Streuvektor s als reziproker Netzebenenabstand verwendet. Bei lamellarer Anordnung der Moleküle ergibt sich für die Streuvektoren eine charakteristische Wiederholungsrate von einfachen ganzzahligen Vielfachen.

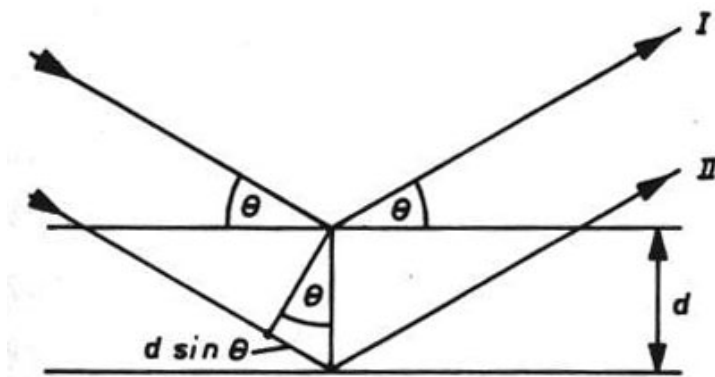


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Reflexion zweier Röntgenstrahlen mit Einstrahlwinkel Θ an benachbarten Netzebenen im Abstand d (nach [161])

Man unterscheidet zwischen Weitwinkelmessungen (WAXS = wide angle x-ray scattering) in einem Winkelbereich von $2\Theta = 2 - 40^\circ$ und Klein- oder Nahwinkelmessungen (SAXS = small angle x-ray scattering) im Bereich $<2^\circ$.

Kleine Strukturen erscheinen bei der Röntgenstrukturanalyse immer bei großen Winkeln und umgekehrt. Bezüglich der Spektren von Glyceriden finden sich daher in einem Winkelbereich von $2\Theta = 18 - 25^\circ$ Streureflexe, die Informationen über die seitlichen Abstände der Fettsäureketten zueinander enthalten und somit auf die Kristallmodifikation schließen lassen. Sie werden auch als short spacings bezeichnet. Die long spacings tauchen dagegen bei kleineren Winkeln auf ($2\Theta = 1 - 8^\circ$) und geben den Abstand zweier endständiger Methylgruppen an, die sich im Gitter an einer vergleichbaren Position befinden (sogenannte (001) Kristallebene). Hieraus ergibt sich der senkrechte Netzebenenabstand d_{001} , welcher bei Glyceriden durch die Länge der Fettsäureketten und deren Neigungswinkel bestimmt wird. Bei vorliegender α -Modifikation ist der Neigungswinkel maximal und senkrecht zur (001) Netzebene, mit zunehmender Kristallordnung sinkt der Neigungswinkel auf $<90^\circ$, wodurch die Kristallschichtdicke ebenfalls abnimmt [151].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Röntgenmessungen im Reflexionsmodus mit einem Philips X-Ray Generator PW 1830 durchgeführt (Philips, NL-Amelo). Erzeugt wurde die Strahlung mittels einer Kupfer Glühkathode (40 kV, 25 mA, Wellenlänge 1,5418 Å), die Detektion erfolgte mit einem ortsbeweglichen Goniometer PW 18120. Es kamen drei unterschiedliche Meßmethoden zum Einsatz:

a) Übersichtsmessung auf einem offenen Träger: Meßzeit 2 sec / $0,04^\circ$ im Bereich von $2\Theta = 0,6 - 30^\circ$. Flüssige Proben wurden zuvor mit Johannisbrotkernmehl angedickt. Dazu wurden 200 μ L der Dispersion in einem Achatmörser mit ca. 5 mg des Gelbildners versetzt und nach einer Quellzeit von 1 min kurz verrührt. Vergleichende Untersuchungen von Jenning [12] ergaben keinen Einfluß dieser Präparation auf die short spacings der Formulierungen. Zur Absicherung wurden einzelne Proben nach Methode b untersucht.

b) Detailmessung in durch Mylarfolie verschlossener Kammer: Meßzeit 20 sec / $0,04^\circ$ im Bereich von $2\Theta = 0,6 - 30^\circ$. Um Einträge durch die Folie zu minimieren, wurde das identisch aufgenommene Spektrum einer vergleichbaren Emulsion (ohne kristalline Eigenreflexe) von den Spektren der Lipidpartikelformulierungen subtrahiert und die Differenzen gegen 2Θ aufgetragen.

c) kurze Detailmessung im offenen System: Meßzeit 10 sec / $0,04^\circ$ im Bereich von $2\Theta = 18 - 25^\circ$. Flüssige Proben wurden zuvor ebenfalls mit Johannisbrotkernmehl angedickt (s. Methode a)).

3.6 Trocknung der Lipiddispersionen

Zwischen dem Trocknungsverhalten einer Lipid-Nanopartikeldispersion und deren Freisetzungsverhalten wird in der Literatur ein Zusammenhang postuliert [13]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zur Freisetzung verwendeten Chargen daher parallel einem Trocknungsexperiment unterworfen, das den Freisetzungsprozeß simulieren sollte. Zu diesem Zweck wurden je 100 µL der Formulierungen auf die Aussparungen der offenen Röntgenprobenhalter gegeben und über 24 h bei 32 °C getrocknet. Die Anzahl der Probenträger pro Formulierung entsprach dabei der Anzahl der Meßpunkte. Nach 1 h, 2 h, 6 h und 24 h wurde dem Temperierschrank jeweils ein Träger entnommen, eine ausreichende Menge an Probe für die DSC-Messung entfernt (ca. 5 mg) und der Träger mit der Restprobe röntgendiffraktometrisch untersucht.

3.7 Lichtmikroskopie

Von besonderer Bedeutung war im Rahmen dieser Arbeit die Beurteilung des Inkorporierungsvermögens der verschiedenen Formulierungen für den Modellarzneistoff Cyclosporin A. Da das verwendete Röntgendiffraktometer eine zu geringe Empfindlichkeit besaß, um auskristallisierenden Arzneistoff sicher zu erfassen, wurden die Proben zusätzlich polarisationsmikroskopisch untersucht. Cyclosporin A-Kristalle wiesen eine charakteristische, polyedrische Form auf und waren in den meisten Fällen gut erkennbar. Auch die Detektion lamellarer, flüssigkristalliner Strukturen erfolgte auf diesem Weg. Bei ausreichender Größe zeigen diese anisotropen Strukturen ebenfalls Doppelbrechung.

Verwendet wurde ein Leitz Orthoplan Mikroskop (D-Wetzlar) mit bis zu 1000facher Vergrößerung und gekreuzten Polarisatoren.

3.8 HPLC-Analytik

Für die Bestimmung des Gesamtgehaltes der Cyclosporin A-haltigen Formulierungen sowie zur Quantifizierung der Arzneistofffreisetzung wurde die von Runge etablierte HPLC-Methode eingesetzt [27], die eine leicht modifizierte Variante der USP XXII-Methode darstellt. Die Analytik wurde an einer Kontron-Anlage (Kontron-Instruments, D-Neufahrn) durchgeführt, die Auswertung erfolgte mit der Software Kroma System 2000.

3.8.1 Probenaufbereitung

Zur Bestimmung des Gesamtgehaltes wurde eine geeignete Menge der Formulierung (entsprechend der detektierbaren Cyclosporin A-Konzentration) ad 5,0 mL in Aceton gelöst. Aceton wurde gewählt, da sich sowohl der Arzneistoff ($\gg 100$ mg / mL) als auch die Lipide in ausreichender Menge darin lösen. Nach einer Behandlung im Ultraschallbad (Sonorex, Bandelin, D-Berlin) über 15 min wurden die Proben zentrifugiert und der klare Überstand zur HPLC-Analyse herangezogen.

Runge entwickelte im Rahmen seiner Arbeit eine Methode zur Bestimmung des freien, d. h. nicht in SLN verkapselten Anteils an Cyclosporin A. Dazu versetzte er zunächst eine wirkstofffreie SLN-Dispersion mit einem Überschuß an Cyclosporin A und zentrifugierte die Partikel nach einer 15 minütigen Behandlung im Ultraschallbad über weitere 15 Minuten bei 17.000 U / min ab. Die im Überstand ermittelte Konzentration wurde der maximalen Löslichkeit in der wäßrigen Emulgatorphase gleichgesetzt. Anschließend zentrifugierte er die Cyclosporin A-beladenen Proben ohne weiteren Zusatz auf die gleiche Weise und stellte fest, daß diese Maximalkonzentration nicht wieder erreicht wurde. Er setzte daraufhin die im Überstand ermittelten Konzentrationen dem freien Arzneistoffanteil gleich. Die Differenz aus Gesamtgehalt und freiem Anteil ergab hier die Menge an inkorporiertem Arzneistoff, die nach dieser Methode über 30 Tage bei Lagertemperaturen zwischen 4 °C und 40 °C konstant bei über 95 % lag.

Polarisationsmikroskopische Untersuchungen der analog zusammengesetzten Proben im Rahmen dieser Arbeit konnten diese hohe Einkapselungsrate über den genannten Zeitraum jedoch nicht bestätigen. Runges Schlußfolgerung, daß bei Vorliegen einer geringeren Konzentration als der ermittelten Sättigungskonzentration in der wäßrigen Emulgatorphase keine Arzneistoffkristalle außerhalb der Lipidpartikel existieren, die bei Zentrifugation der Proben ebenfalls aus dem System entfernt werden würden, muß folglich angezweifelt werden. Auf die Bestimmung des freien Anteils nach der von ihm beschriebenen Methode wurde demnach verzichtet. Eventuell kam es bei der beschriebenen Methode zur Bestimmung der Sättigungslöslichkeit mit Einsatz von Ultraschall zu einer (Über-)Sättigung, die durch den aus den Partikeln auskristallisierenden Arzneistoff nicht erreicht werden kann. Um die beobachtete Arzneistoffausscheidung analytisch zu erfassen, wurden den Vials statt dessen nach 35 Tagen Lagerung ohne vorheriges Schütteln Proben aus dem oberen und unteren Bereich entnommen und getrennt analysiert. Nach anschließender Durchmischung wurde der Gesamtgehalt bestimmt. Zusätzlich wurde polarisationsmikroskopisch sichergestellt, daß eine Aufkonzentrierung am Gefäßboden nicht nur auf sedimentierten Partikelaggregaten sondern tatsächlich auf freigesetztem Arzneistoff beruht (d. h. Nachweis von Kristallen).

Die aus dem Rezeptormedium der Franz-Zellen entnommenen Proben der Freisetzungsuntersuchungen konnten ohne weitere Aufbereitung zur Analyse verwendet werden.

3.8.2 Trennsystem Cyclosporin A

Die Spezifikationen der verwendeten HPLC-Analytik können Tabelle 3-2 entnommen werden. Als Präzision ist die Wiederholstandardabweichung (Variationskoeffizient VK(%)) aus n=6 Messungen erfaßt, die die Probeneinwaage, Probenaufbereitung und quantitative Analyse einschließt. Die Nachweisgrenze entspricht der Konzentration, deren Signal-Rausch-Verhältnis 3:1 beträgt.

Als stabiler Standard wurden vor und nach jeder Meßreihe drei Proben einer Lösung von 0,4 mg / mL Benzoesäure in Acetonitril / Wasser (50:50) vermessen. Die Retentionszeit dieser Lösung unter den unten genannten Spezifikationen lag bei 2,3 min, die Präzision der Messungen bei 0,7 % (n = 6).

Für die Kalibrierung wurden drei Stammlösungen mit definierter Konzentration von Cyclosporin A in Aceton hergestellt, in Stufen verdünnt und die resultierenden Peakflächen bestimmt (n = 3). Die Linearität der Ergebnisse wurde für den Konzentrationsbereich von 0,012 bis 1,55 mg / mL geprüft und belegt. Der lineare Regressionskoeffizient R betrug 0,9998 (s. Abbildung 3-3).

Tabelle 3-2: Spezifikationen der angewandten HPLC-Analytik von Cyclosporin A

Parameter	Spezifikation
Vorsäule	RP18, 5 µm, LiChrospher
Hauptsäule	RP18, 4 µm, 250 x 4 mm, Superspher-100
Injektionsvolumen	20 µl
Mobile Phase:	
Wasser	485 T
Acetonitril	460 T
tert. Butyl-methylether	55 T
Phosphorsäure konz.	1 T
Flußrate	1,3 mL / min
Säulenofentemperatur	80 °C
UV-Detektion	210 nm
Laufzeit	23 min
Retentionszeit von Cyclosporin A	15-17 min
Präzision	3,5 %
Nachweisgrenze	2,2 µg / mL

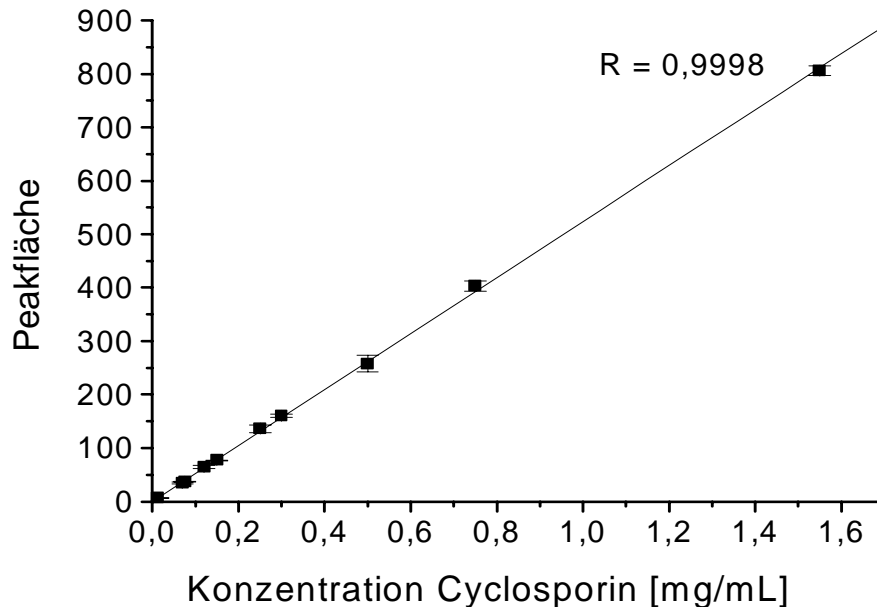


Abbildung 3-3: HPLC-Kalibrationsgerade von Cyclosporin A (n=3) in Aceton

3.9 Freisetzungsuntersuchungen

Die ersten Freisetzungsuntersuchungen aus SLN erfolgten in vitro mit Hilfe der Paddle Methode, wobei sich jedoch besonders die Abtrennung der Partikel aus dem Rezeptormedium als problematisch herausstellte [64, 67]. Auch Runge bediente sich dieser Methodik zur Ermittlung der Cyclosporin A Freisetzung aus SLN. Jennings konnte für seine Retinol-haltigen Systeme eine bessere Eignung von Franz-Diffusionszellen [162] besonders in Hinblick auf die dermale Applikation ermitteln. Eine Membran (natürlich oder synthetisch) trennt hier das Donatorkompartiment von der Rezeptorflüssigkeit. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls auf Franz-Diffusionszellen zurückgegriffen. Diese wurden von der Firma PermeGear Inc. (USA, PA-Bethlehem) bezogen und wiesen einen Durchmesser von 0,9 cm (entsprechend einer Fläche von 0,64 cm²), sowie einen Wassermantel zur Temperierung (37 °C) auf (Temperatur an Membran ca. 32 °C). Das Rezeptorvolumen betrug 6,5 mL. Um die Nachweisgrenze des Arzneistoffes Cyclosporin A nicht zu unterschreiten, wurde im geschlossenen System kumulativ gearbeitet und als Rezeptorflüssigkeit Ethanol 40 % verwendet. Die hohe Löslichkeit des Arzneistoffes in diesem Medium gewährleistete darüber hinaus auch ohne Durchfluß das Vorliegen von sink-Bedingungen. Das Rezeptormedium wurde während des Versuches konstant durch einen Magneten bei 300 U / min gerührt.

Als Membran wurde ein VMTP-Polycarbonatfilter (Milipore, D-Schwalbach) mit einem Porendurchmesser von 0,05 µm eingesetzt. Laut Runge adsorbieren an diesem Filtermaterial keine nennenswerten Mengen an Arzneistoff. Der geringe Porendurchmesser verhindert einen Übertritt der dispergierten Lipidphase in das Rezeptorkompartiment. Zur Erfassung der Freisetzungskinetik sind synthetische Materialien besser geeignet als die mit großem Permeationswiderstand und erheblicher Standardabweichung der Ergebnisse behafteten natürlichen Materialien wie Schweine- oder Humanhaut. Für einen realitätsnahen Vergleich der Arzneistoffpenetration wären diese jedoch unverzichtbar.

Die Versuche wurden jeweils mit $n = 3$ durchgeführt. Das Probenvolumen betrug bezüglich der SLN-Formulierungen 100 µL, von den topischen Formulierungen wurden 50 mg eingesetzt (entsprechend einer Arzneistoffmenge von 1,5 - 4,5 mg / cm²). Nach 1, 2, 4, 6, und 24 h wurde jeweils eine Probe von 200 µL gezogen und ohne weitere Behandlung mittels HPLC vermessen. Das Akzeptormedium der Zellen wurde entsprechend aufgefüllt.

Nach Abschluß des Freisetzungsexperimentes wurden die Membranfilter inklusive der aufgetragenen Formulierung in je einem Reagenzglas mit 2 mL Aceton versetzt und dadurch die verbliebene Menge an Cyclosporin A extrahiert. Nach Zentrifugation wurde die Konzentration im Überstand mittels HPLC bestimmt und die Gesamt-Wiederfindungsrate des Arzneistoffs nach Addition der im Rezeptormedium enthaltenen Menge errechnet. Die Wiederfindungsrate betrug bei allen durchgeführten Experimenten >90 % des zuvor ermittelten Gesamtgehaltes.