

## **4 Methoden und Methodenentwicklung**

### **4.1 Herstellung kolloidaler Lipiddispersionen**

Prinzipiell existieren für die Herstellung dieser Systeme verschiedene Verfahren. Entwickelt wurde die Präzipitation aus O/W-Emulsionen (Siekman und Westesen 1996), die Herstellung aus warmen Mikroemulsionen (Gasco 1993, Cavalli et al. 1996) und die Produktion mittels Mikromischern (Hildebrand et al. 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die SLN- und NLC-Dispersion durch Homogenisation an Kolben-Spalt-Homogenisatoren hergestellt. Die Hochdruckhomogenisation bietet gegenüber den anderen erwähnten Verfahren die Vorteile, dass auf die Verwendung von organischen Lösungsmitteln verzichtet wird und dass die Konzentration der Lipidphase auf ca. 40% (abhängig vom Lipid) erhöht werden kann. Ein kombinierter Mechanismus von Turbulenz und Kavitation ist für die Zerkleinerung der geschmolzenen, inneren Lipidphase verantwortlich (Jahnke 2002). Eine gute Übersicht über dieses Verfahren bietet der Artikel von Mehnert und Mäder (Mehnert und Mäder 2001).

In dieser Arbeit wurde das Verfahren der Heißhomogenisation angewandt. Hierbei kamen verschiedene Homogenisatoren zum Einsatz.

Für Chargengrößen von 40 g fand ein Mircron LAB 40 der Firma APV Systems, Deutschland Verwendung. Die Lipidphase (d.h. festes Lipid und lipophile Bestandteile der Rezeptur) und Wasserphase wurden separat erhitzt. Die Präemulsion wurde mit Hilfe eines Ultraturrax T25 (Jahnke und Kunkel, Staufen, Deutschland) hergestellt (30 s mit 8000 U/min) und anschließend bei variierenden Temperaturen (abhängig vom Schmelzpunkt des verwendeten Lipids) und 3 Homogenisationszyklen à 500 bar homogenisiert. In silanisierte Glasvials abgefüllt, kühlte die heiße Nanoemulsion bei Raumtemperatur ab.

Chargen von 2 kg (Technikumsmaßstab) wurden an einem kontinuierlich arbeitenden, modifizierten LAB 60, APV Systems, Deutschland hergestellt (Müller 2000). Alle produktberührenden Teile waren komplett beheizbar. Der Druck am ersten Ventil betrug 500 bar, am Druckhalteventil herrschten 50 bar. Im Produktbehälter erfolgte nach Vereinigung der geschmolzenen Lipidphase und der ebenfalls erhitzten Emulgatorlösung zunächst die Herstellung einer Rohemulsion. Diese wurde dann unter den oben aufgeführten Bedingungen 30 min lang im Umlauf

homogenisiert. Die heiße Nanoemulsion kühlte anschließend - ebenfalls in silanisierte Glasvials abgefüllt - bei Raumtemperatur ab.

Bei Herstellung der als Vergleich dienenden Nanoemulsionen wurde ebenso verfahren.

Die Einarbeitung von Titandioxid erfolgt durch Zugabe der heißen Nanoemulsion nach Herstellung des ersten Zyklus am LAB 40, d.h. Titandioxid wurde in einem Becherglas vorgelegt. Danach erfolgt eine Homogenisation mittels Ultraturrax T25. Anschließend folgten zwei weitere Homogenisationszyklen am LAB 40. Beim LAB 60 wurde das Titandioxid direkt mit den anderen lipophilen Bestandteilen gemischt und danach die Rohemulsion hergestellt.

## **4.2 Verbesserung der kosmetischen Qualität von NLC-Formulierungen**

SLN- und NLC-Systeme, deren Konzentration der Lipidphase typischerweise 10-20% beträgt, sind im allgemeinen ungeeignet, um direkt als Kosmetikum eingesetzt zu werden. Ihre Viskosität wird als zu niedrig betrachtet (Freitas 1998, Jenning 1999). Vielmehr werden vom Anwender viskose Systeme mit einer Fließgrenze bevorzugt. Die Herstellung halbfester, topischer NLC-Systeme kann prinzipiell auf drei Wegen erfolgen.

Ein einfacher Schritt zur dermatologischen Rezeptur ist die Verdickung der Dispersion mit einem Hydrogelbildner. Ein großer Vorteil dieses Verfahrens ist, dass die Konzentration der Wirkstoffe der NLC-Formulierung nicht erniedrigt wird. Die Sicherstellung der gleichmäßigen Verdickung erfolgte mit einem hochoberflächigen Flügelrührer (Cito Unguator, Deutschland).

Ebenfalls können die flüssigen Lipiddispersionen in O/W- oder W/O-Cremes als Bestandteil der wässrigen Phase eingearbeitet werden (Dingler 1999, Schütt 1998, Radtke 2003). Bei der Herstellung der halbfesten Formulierungen wurde der entsprechende Teil der Wasserphase einer kommerziellen, kosmetischen O/W-Creme durch die entsprechende Lipiddispersion (NLC-Dispersion oder Nanoemulsion) ersetzt. Die Lipidgrundlage der Creme setzte sich qualitativ wie

nachfolgend aufgeführt zusammen, wobei eine vollständige quantitative Angabe aus Gründen des Firmengeheimnisses nicht möglich ist:

Dicaprylylmalolat, Dimethicon 350, Cetylalkohol und Tocopherolacetat (Diese Mischung wird in den Kapiteln 5.2.5.7 und 5.3.4 synonym für „Lipidphase“ verwendet.)

Die Herstellung lief in folgender Weise ab: Lipid- und Wasserphase werden getrennt auf 80°C erhitzt, anschließend mit einem hochtourigen Flügelrührer emulgiert und bis 40°C gerührt. Bei dieser Temperatur wird die NLC-Dispersion zugegeben und das Produkt kaltgerührt.

Als dritter Weg wurde die Erhöhung der Lipidkonzentration von wässrigen Dispersionen zur direkten Erzeugung halbfester Formulierungen im Rahmen der Heißhomogenisation beschrieben (Lippacher 2000).

### **4.3 Partikelgröße und Partikelladung**

#### **4.3.1 Laserdiffraktometrie (LD)**

Grundlage der Laserdiffraktometrie ist die Lichtbeugung am dispergierten Teilchen, wobei nach Form und Größe ein typisches Beugungsmuster entsteht. Es werden radialsymmetrische Beugungsspektren erzeugt (Fraunhofer-Beugung) (Müller und Schuhmann 1996), die durch eine Fourierlinse unabhängig von der Position des Teilchens immer zentriert auf die gleiche Position eines Multielementdetektors abgebildet werden. Als Lichtquelle wird Laserlicht genutzt, das mittels eines optischen Systems aufgeweitet wird und anschließend auf die Probe trifft. Vereinfacht ausgedrückt sind die Beugungswinkel von kleinen Teilchen groß, von großen Teilchen hingegen klein. Es kommt zur Überlagerung der Beugungsmuster der einzelnen Partikelgrößen. Die erhaltene Gesamtverteilungskurve ist eine Volumenverteilung und lässt den prozentualen Anteil bestimmter Partikelgrößen am Gesamtvolumen erkennen.

Der Messbereich liegt aufgrund der eingesetzten PIDS-Technologie zwischen 40 nm und 2000 µm. PIDS steht für Polarization Intensity Differential Scattering und ermöglicht die exakte Bestimmung der Partikelgrößen im Submikronbereich. Zur Berechnung der Partikelgrößenverteilung der SLN- und NLC-Dispersionen wurde die Mie-Theorie angewandt, da sie auch für Partikel im Submikronbereich anwendbar ist.

Dazu muss der Brechungsindex des Dispersionsmediums und der Partikel und das Adsorptionsvermögen der Partikel beachtet werden. Die Messungen erfolgten im wässrigen Dispersionsmedium (Brechungsindex 1,33). Der Brechungsindex der Partikel wurde mit 1,45636 (= Realanteil) und die Lichtabsorption mit 0,01 (= Imaginäranteil) angesetzt. Es ergibt sich eine Volumenverteilung der Teilchenpopulation. Zur Charakterisierung der Verteilung wurden die Durchmesser  $d_{50\%}$ ,  $d_{90\%}$ ,  $d_{95\%}$  und  $d_{99\%}$  herangezogen. Der Wert  $d_{99\%}$  bedeutet, dass 99% der Gesamtpopulation bezogen auf die Volumenverteilung unterhalb des Größenwertes liegen, d. h., bei  $d_{99\%} = 1,2 \mu\text{m}$  sind 99% aller Partikel kleiner als  $1,2 \mu\text{m}$ . Es handelt sich dabei stets um eine volumenbezogene Verteilung, so dass größere Partikel stärker gewichtet werden.

### 4.3.2 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Bei der PCS handelt es sich um ein dynamisches Streulichtverfahren, bei dem man neben dem mittleren Teilchendurchmesser (Z-average) auch den Polydispersitätsindex (PI) als Maß für die Breite der Verteilung erhält (Müller, B.W. und Müller R.H. 1983). Der Messbereich liegt zwischen ca. 3 nm und  $3 \mu\text{m}$ . Der PI ist dimensionslos und liegt zwischen 0 und 1. Dispersionen mit einem  $PI < 0,05$  werden als monodispers bezeichnet. Werte bis 0,15 kennzeichnen eine enge Verteilung. Hingegen sind Dispersionen mit einem  $PI > 0,3$  ausgeprägt polydispers und es kann keine Aussage über die mittlere Partikelgröße gemacht werden (Schuhmann 1995). Durch die Bewegung der dispergierten Teilchen kommt es zu zeitabhängigen Schwankungen des gestreuten Laserlichts. Diese Änderungen sind größenabhängig, da kleine Teilchen eine größere Diffusionsgeschwindigkeit aufweisen als größere. Die Intensitätsschwankungen werden an einem Photomultiplier erfasst und über die errechnete Diffusionskonstante lässt sich der mittlere Partikelradius bestimmen. Um Mehrfachstreuungen zu reduzieren, wurden die Proben bis zum Sichtbarwerden einer schwachen Opalessens verdünnt. Die Messungen wurden an einem Zetasizer 4, Malvern Instruments, Deutschland durchgeführt. Die Messzeit betrug 200 s (10 Einzelmessungen zu 20 s).

### 4.3.3 Zetapotential (ZP)

Das Zetapotential erlaubt eine Aussage über die Lagerstabilität disperser Systeme. Meist besitzen Partikel in Suspensionen eine negative Oberflächenladung. An dieser lagern sich negative, dehydratisierte Ionen an. Man bezeichnet sie als innere Helmholtzschicht. Darauf befinden sich positiv geladene Gegenionen (äußere Helmholtzschicht). Beide Schichten sind fest fixiert und werden bei Bewegung der Teilchen im elektrischen Feld nicht abgeschert. Weiter entfernt von der Partikeloberfläche befindet sich die diffuse Schicht, die bei Anlegen eines elektrischen Feldes abgeschert wird. Das ZP, welches das Potential an der Scherebene darstellt, wird gemessen. Je größer das ZP eines Partikels ist, desto größer ist die elektrostatische Abstoßung zwischen den Teilchen und um so höher ist die Stabilität des Systems. ZP-Werte mit einem Betrag  $>30$  mV gelten als stabil. Die Messung erfolgt über die Laser-Doppler-Anemometrie (LDA). Ein elektrisches Feld wird angelegt, die Probe mit einem Laser bestrahlt, die Frequenzverschiebung des Laserlichts durch Streuung an den Partikeln der Probe erlaubt die Berechnung der Teilchengeschwindigkeit, die im elektrischen Feld von der Ladung abhängig ist (Müller 1996). Die elektroforetische Mobilität wird nach der Gleichung von Helmholtz-Smoluchowski ins Zetapotential konvertiert.

Die Messungen am einem Zetasizer 4 erfolgten durch Verdünnung der Probe mit bidestilliertem Wasser, das mit Kochsalz auf eine Leitfähigkeit von  $50 \mu\text{S/cm}$  eingestellt wurde. Der pH-Wert der Messlösung wurde mit einem pH-Meter CG840 mit Glaselektrode 405/60/88/TE S7/120, Mettler Toledo, Deutschland bestimmt.

## 4.4 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Im Bereich der Untersuchungen von Lipidnanopartikel-Formulierungen wurde die DSC bereits vielfach zur Untersuchung des Kristallstatus eingesetzt (Freitas et al. 1999, Siekmann et al. 1994). Eine Unterscheidung flüssiger, amorpher und kristalliner Strukturen sowie die Detektion unterkühlter Schmelzen und damit ein

Rückschluss auf die Stabilität des untersuchten Systems ist damit möglich (Westesen et al. 1995).

Lipide besitzen die Fähigkeit, verschiedene innere Kristallstrukturen auszubilden (Polymorphie). Sie sind in der Regel monotroper Natur in Richtung der stabilsten Form (Sato und Garti 1988). Bei lang gestreckten Lipidmolekülen ist zwischen der Kristallordnung der Gesamtmoleküle in einer so genannten Elementarzelle als kleinster sich wiederholender Raumeinheit und der Ordnung innerhalb der Moleküle (CH<sub>2</sub>-Gruppen) in Form so genannter Subzellen zu unterscheiden. Lipide können u. a. in lamellarer, hexagonaler oder kubischer Struktur auftreten (Weiner 1993). Triacylglyceride kommen in drei lamellaren Modifikationen vor, die als  $\alpha$ ,  $\beta'$  und  $\beta$  bezeichnet werden (Chapman 1962). Lipidmodifikationen unterscheiden sich u. a. in ihrem Schmelz- und Kristallisationsverhalten. Mittels der dynamischen Differenzkalorimetrie können endotherme Schmelz- und exotherme Kristallisationsprozesse thermoanalytisch verfolgt werden (Burger 1982). SLN- und NLC-Dispersionen wurden mittels DSC untersucht, um den festen Aggregatzustand der Lipidnanopartikel nachzuweisen (Dingler 1998, Westesen et al. 1995), die Polymorphie von Lipiden zu untersuchen (Jenning 1999), die Wirkstofflokalisierung in SLN nachzuweisen (Westesen et al. 1997) und zur Quantifizierung von SLN und NLC nach Einarbeitung in halbfeste Systeme (de Vringer und de Ronde 1995, Radtke 2003). Über die Quantifizierung der Schmelzenthalpie kann hier die Existenz und Stabilität fester Lipidnanopartikel erfasst werden. Besonders geeignet ist die DSC daher zur vergleichenden Analytik im Rahmen von Langzeituntersuchungen. Aussagen über Kristallmodifikationen und den Aufbau von Elementarzellen sind ohne Ergänzungen, wie z. B. durch Röntgendiffraktometrie, nur beschränkt sinnvoll.

Wichtige Kenngrößen der DSC-Analytik sind die Onset-Temperatur, der Schmelzpunkt (= Temperatur des Peakmaximums) und die Enthalpie des Schmelzprozesses. Die Onsettemperatur lässt sich aus dem Schnittpunkt der Tangente der Kurvensteigung mit der Basislinie ermitteln. Der Kristallinitätsindex wurde aus den durch Integration der Peakfläche errechneten Enthalpien ermittelt. Dabei wurde die Enthalpie des Ausgangsmaterials mit 100% festgelegt und der Lipidgehalt (kristallines, d.h. festes Lipid) der Formulierung berücksichtigt.

Die Werte des Bulkmaterials und der Nanopartikeldispersionen sind nicht direkt vergleichbar, da die Größe der Partikel die gemessenen Parameter stark beeinflussen (Unruh et al. 1999).

Die Durchführung der Messungen erfolgte an einer Mettler Toledo DSC 821e, Mettler Toledo, Deutschland, welche die Differenz der Wärmeströme zwischen einem Proben- und einem leeren Referenztiegel vergleicht. Die Proben wurden in 40  $\mu\text{L}$  Aluminiumdrucktiegel eingeschweißt, um einen „Wasserbauch“ durch verdunstendes Wasser zu vermeiden. Es wurden immer Probenmengen gewählt, die 1-2 mg kristalliner Substanz entsprachen. Der Ofen wurde von Stickstoffgas mit einer Fließgeschwindigkeit von 80 mL/min umspült. Die Aufheizrate betrug 5K/min. Die Proben wurden von 25 auf 85°C erwärmt. Die Kenngrößen wurden mit Hilfe der Star Software, Mettler, Deutschland ermittelt.

### **4.5 Lichtmikroskopie**

Die Aufnahmen erfolgten mit einem Lichtmikroskop (Leitz, Deutschland) bei 1000-facher Vergrößerung. Als Kamera diente eine CF 20 DX (Kappa).

### **4.6 Transmissionselektronenmikroskopie**

Um SLN und NLC in flüssigen Proben zu visualisieren, wurden diese auf eine mit amorphen Kohlenstoff beschichtete Folie aufgebracht, im Vakuum getrocknet und mit Hilfe eines Elektronenmikroskopes (Philips CM 200, Deutschland) untersucht. Im Gegensatz zum Lichtmikroskop werden Elektronenstrahlen benutzt.

### **4.7 UV-VIS-Spektroskopie**

Der Bereich der UV-Spektren erstreckt sich von 50 bis ca. 400 nm, der der VIS-Spektren von ca. 400 bis 900 nm. Wird eine Substanz mit Licht bestrahlt, so kann durch die Absorption eines Energiequants ( $h \cdot \nu$ ) ein Elektron aus einem

Molekülorbital auf ein höheres Energieniveau angehoben werden (Rücker et al. 1992). Die Aufnahme des Spektrums erfolgt, indem die Substanz oder Dispersion in einem geeigneten Lösungsmittel mittels einer Küvette in den Strahlenbereich eines Photometers gebracht wird. Der gesamte interessierende Wellenlängenbereich wird mit monochromatischem Licht überstrichen und die Absorption relativ zur eingestrahlten Lichtmenge gemessen. Nach dem Gesetz von Lambert und Beer stehen die Konzentration und die Absorption (A) des Lichtes in folgendem Zusammenhang:

$$A = \xi \cdot c \cdot d$$

( $\xi$  = molarer Extinktionskoeffizient, setzt sich aus dem Absorptionskoeffizienten und dem Streukoeffizienten zusammen, eine für die Substanz spezifische Naturkonstante,  $c$  = Konzentration des zu untersuchenden Stoffes in der Probelösung,  $d$  = Schichtdicke der Lösung im Strahlengang).

#### **4.7.1 Absorptionsmessung verdünnter wässriger Dispersionen**

Die SLN- und NLC-Dispersionen wurden so verdünnt, dass das Absorptionsmaximum zwischen 0,2 und 0,8 lag, da das Lambert-Beersche Gesetz nur für verdünnte Lösungen gilt (Rein 2001). Die Proben wurden 5 min im Ultraschallbad bei Raumtemperatur dispergiert. Danach wurden sie in einem Uvikon 940 Spektrophotometer, Kontron Instruments, Deutschland über den Wellenlängenbereich 450-280 nm gegen Wasser vermessen.

#### **4.7.2 Transpore™ Test (nach Diffey)**

Dieser Test wurde von Diffey entwickelt und angewendet (Diffey und Robson 1989, Diffey und Farr 1991). Die Ergebnisse erlauben zu einem gewissen Ausmaß eine in vitro-in vivo-Korrelation. Die Formulierungen wurden gleichmäßig auf Transpore Klebeband (3M, Deutschland) verstrichen, welches auf Quarzküvetten geklebt wurde. Es handelt sich um

ein perforiertes medizinisches Pflaster, welches ein optimales Haften der Formulierung ermöglicht und im gewissen Maße dem Hautrelief ähnelt. Nach 15 min

Trocknungszeit an der Luft wurden die Proben mit einem Uvikon 940 Spektrophotometer, Kontron Instruments, Deutschland von 450-280 nm vermessen.

### **4.7.3 Sun-to-See™ Test**

Der Test erfolgte mit Sun-to-See-Strips (UV-Signal GmbH, Hamburg, Deutschland). Diese werden über Apotheken vertrieben und dienen der individuellen Bestimmung der Dauer eines Sonnenbades in Abhängigkeit vom Hauttyp und des aufgetragenen Sonnenschutzmittels. Nach dem Aufkleben auf die Haut soll der Benutzer den Strip wie die übrige Haut mit der Formulierung eincremen, dieser verfärbt sich unter Einwirkung des Sonnenlichts und über einen Farbvergleich kann man erkennen, wann die Haut nicht mehr ausreichend geschützt ist. Die Strips enthalten einen UV-sensitiven Farbstoff, dessen Absorptionsmaximum bei 603 nm liegt. Es wurden 100 mg der Probe auf die Stripfläche von 3,8 cm<sup>2</sup> aufgetragen, nach 15 min Trocknungszeit für 90 min mit einem Suntest Schnellbelichtungsgerät (Heraeus, Deutschland) bestrahlt und anschließend manuell vom Strip entfernt. Der Farbstoff wurde mit 2 mL Aceton extrahiert und bei 603 nm photometrisch mit einem Uvikon 940 Spektrophotometer (Kontron Instruments, Deutschland) vermessen. Der Versuch wurde mit n=3 durchgeführt.

### **4.7.4 SPF in vitro-Bestimmung von SLN-, NLC-Dispersionen und Nanoemulsionen**

Der Lichtschutzfaktor (LSF, SPF) dient als Leistungsmerkmal für Sonnenschutzmittel. Er beschreibt das Verhältnis der Erythemschwellendosis von geschützter und ungeschützter Haut (Schulze 1956). Die Erythemschwelle (MED) ist definiert als die minimale Strahlendosis mJ/cm<sup>2</sup>, die ein scharf abgrenzbares, gerade noch erkennbares Erythem mit einer Mindestfläche von 1 cm<sup>2</sup> hervorruft (Lowe 1990).

Das in vivo-Verfahren ist teuer und zeitaufwendig. Außerdem bestehen ethische Bedenken, die menschliche Haut lange mit schädigenden Strahlen zu belasten. Alternativ wird daher ein von Diffey und Robson (Diffey und Robson 1989) entwickeltes in vitro-Verfahren angewendet.

Die Untersuchung der Proben wurde extern durchgeführt. Mit einer in vitro-Messeinrichtung (SPF-Messsystem Labsphere) erfolgte die Bestrahlung eines Sonnenschutzmittelaustriches. Die Applikationsmenge betrug  $2 \text{ mg/cm}^2$ , das entspricht einer Auftragsmenge auf einen  $12,25 \text{ cm}^2$  großen Quarzobjektträger (Sample Plates Quarz,  $35 \times 35 \text{ mm}$ , Glen Spectra) von  $24,5 \text{ mg}$ . Der Aufnehmer, direkt unterhalb des Objektträgers angeordnet, weist eine spektrale Empfindlichkeit auf, die der Erythemwirksamkeitskurve der Haut entspricht. Die Bestrahlungseinrichtung ist einmal an einem ausreichend großen Probandenkollektiv auf einen Wert für die minimale Erythemdosis geeicht und mit dieser Dosis werden die Proben dann bestrahlt.

Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, auch im UV-A-Bereich einen Schutzfaktor zu normen, wobei es wünschenswert ist, wenn beide Schutzfaktoren etwa gleich sind, um bei einer verlängerten Sonnenexposition mit dem erythem erzeugenden UV-B auch gleichzeitig das für Altersveränderungen verantwortliche UV-A in gleicher Größenordnung herauszufiltern. Je näher der Quotient (UV-A/UV-B-ratio) bei eins liegt, desto höher ist die Schutzwirkung der Formulierung im UV-A-Bereich. Die kritische Wellenlänge (kritische  $\lambda$  (nm)) zeigt diejenige Wellenlänge an, bei der noch 90% des eingestrahnten UV vom Sonnenschutzmittel absorbiert werden (Tonnier et al. 1996, Tonnier 1999). Liegt der Wert oberhalb von  $370 \text{ nm}$ , spricht man von einem hohen UV-A-Schutz, bei Werten unterhalb von  $325 \text{ nm}$  weist das Produkt keinen Schutz in diesem Bereich auf (Kindl 2000).

Probleme der in vitro-Messtechnik bestehen in der Auftragstechnik und der Herstellung einer gleichmäßigen Schichtdicke (Tonnier 1999). Die gemessenen Werte waren daher auch mit hohen Streuungen behaftet (vergleiche Standardabweichungen). Deshalb war es sinnvoll, Formulierungen einem in vivo-Test zu unterziehen.

### **4.7.5 SPF in vivo- und Wasserfestigkeitsbestimmung einer NLC-Dispersion und Nanoemulsion**

Die in vivo-Bestimmung von UV-Schutz und Wasserfestigkeit wurde am ASTER Cosmeotology Research Center, Paris an 5 Probanden durchgeführt. Die Bestimmung folgte dem COLIPA (European Cosmetic Toiletry and Perfumery Assoziation) Standardprotokoll (Colipa 1994). Die Prüfprodukte (NE, NLC, s. Kapitel 5.2.5.6) wurden im Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin im 2 kg Maßstab hergestellt. Die Proben wurden auf dem Rücken der Probanden appliziert, nach UV-Bestrahlung (UV-B und UV-A) erfolgte die Bestimmung des Sonnenschutzfaktors vor und nach 2 Waschperioden. Die Waschperiode dauerte je 20 min in zirkulierendem Wasser. Die Wassertemperatur betrug 23-32°C. Bei allen Probanden wurde der individuelle SPF (SPFi) ermittelt. Der SPF der Formulierungen ergab sich aus dem arithmetischen Mittel. Als erstes wurde der SPF nach der Colipa/FDA-Methode bestimmt (UV-Bestrahlung an Tag 1, Ablesen des Ergebnisses (Minimale Erythem Dosis, MED) am Tag 2). MED ist definiert als die kleinste UV-Dosis (UV-B und UV-A), welches ein Erythem 22-24 Stunden nach UV-Exposition auf der Haut induziert. Als zweites erfolgte die SPF-Bestimmung nach Waschungen (Waschungen und Bestrahlung am Tag 2, Ablesen des Ergebnisses am Tag 3). Die Bestimmung der Wasserfestigkeit ergibt sich aus dem Vergleich des SPF vor und nach den Waschungen. Die Proben wurden auf einer Hautfläche von 49 cm<sup>2</sup> auf dem mittleren Rücken verteilt und einmassiert. Es ergab sich eine Schichtdicke von 2 mg/cm<sup>2</sup>. Die Proben wurden 15 min vor der Bestrahlung bzw. Waschung aufgetragen. Die Bestrahlung erfolgt mittels künstlichen Lichts (6 Dosen UV-B- und UV-A-Strahlung, jede Dosis 25% höher als die vorherige) auf alle geschützten und ungeschützten Hautflächen. Die MED wurde durch geschultes Personal anhand von Skalen festgestellt.

#### **4.7.6 Orientierende sensorische Beurteilung der kosmetischen Qualität**

Die verschiedenen Formulierungen wurden durch 7 Probanden (3 Frauen und 4 Männer im Alter von 22 bis 42 Jahren) nach kleinflächiger Applikation auf der Haut (Handrücken oder Unterarm) sensorisch geprüft. Beurteilt wurden dabei das Hautgefühl, die Verteilbarkeit, der Weißeffekt und die Klebrigkeit. Die Beurteilung fand extern statt und erfolgte durch Auswertung von Fragebögen. Es handelt sich um eine nicht standardisierte Prüfmethode. Der subjektive Eindruck der einzelnen Probanden spielte eine große Rolle.

### **4.8 HPLC-Analytik und Probenaufbereitung**

Die Untersuchungen dienten der Konzentrationsbestimmung von Retinol in NLC-Dispersionen, Nanoemulsionen und NLC-haltigen Cremes. Die Analytik wurde von Jenning (Jenning 1999) übernommen.

Es wurde eine LiChrospher 60 RP-select B Säule (Merck KGaA, Deutschland) verwendet. Bei dieser Säule handelt es sich um ein sphärisches, speziell behandeltes Kieselgel mit C<sub>8</sub> Alkyl-Oberflächenmodifikation. Die Retentionszeit für Retinol betrug 6,8 min (Fluss 1mL/min). Das Fließmittel bestand aus einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (80:20), versetzt mit 0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Retinol besitzt eine hohe spezifische Absorption, molare Absorption  $\xi$  (325 nm) = 52470 L/mol/cm. Aus diesem Grund erfolgte die Detektion mittels UV-Vis-Detektor bei 325 nm.

Circa 50 mg der NLC-Dispersion bzw. Nanoemulsion oder 200 mg der NLC-haltigen Creme, genau gewogen, wurden in 10 mL Aceton gelöst oder suspendiert. Die Suspension wurde für 5 min im Ultraschallbad (Sonorex, Bandelin, Deutschland) bei Raumtemperatur behandelt. Die Proben wurden anschließend für 24 h im Kühlschrank aufbewahrt. Gebildete Niederschläge aus kristallinen Fett wurden abzentrifugiert.