

7 Materialien

Die Herstellung von Lipidvesikeln erfolgt vorwiegend aus polaren amphiphilen Lipiden sowie den Sterolen, vor allem Cholesterol. Amphiphile Moleküle enthalten wasserlösliche und wasserunlösliche Gruppen. Die wasserlösliche Gruppe, oft hydrophile Kopfgruppe genannt, kann positiv oder negativ geladen, zwitterionisch oder durch polyhydroxylierte Bestandteile nichtionisch sein. Die nichtionischen Hydroxyl- oder Ethergruppen können Wasserstoffbrücken mit dem Wasser ausbilden. Während polare Lipide mit nur einer Kohlenstoffkette aufgrund ihrer Form eher zur Mizellbildung neigen, bilden Lipide mit zwei Kohlenstoffketten eher Lipiddoppelschichten, z.B. kugelförmige Lipidvesikel. Trotzdem sind auch Fälle beschrieben, wo aus Lipiden mit einer Kohlenstoffkette Lipidvesikel hergestellt wurden. Die in dieser Arbeit verwendeten Lipide werden im folgenden kurz charakterisiert.

7.1 Lipide mit einer Kohlenstoffkette: Brij 58

Brij[®] 58 (Polyethylenglycolmonostearylether, Serva Feinbiochemika Heidelberg, Deutschland) ist ein Gemisch von Ethern, die durch Ethoxylierung von Stearylalkohol gewonnen werden. Die Substanz kann freie Macrogole und wechselnde Mengen an freiem Stearylalkohol enthalten. Die Menge Ethylenoxid, die mit Stearylalkohol reagiert hat, beträgt 2 bis 20 Einheiten je Molekül (Ph. Eur. 2005). Brij[®] 58 ist ein o/w-Emulgator mit einem HLB-Wert von ca. 15,7. Nichtionische Lipide wie Brij[®] 58 können leichter Membranen passieren als ionische. Nichtionische Tenside beeinflussen die Lipidbilayer im SC, deren Mikroviskosität dadurch verringert wird.

7.2 Lipide mit zwei Kohlenstoffketten

7.2.1 Phospholipide

Phospholipide (auch Glycerophospholipide genannt) sind die wichtigsten Lipidbestandteile biologischer Membranen. Sie enthalten Glycerol-3-phosphat und sind an C1 und C2 mit Fettsäuren und am Phosphat mit einem Rest X verestert. Handelt es sich bei dem Rest X um Cholin, so spricht man von Phosphatidylcholin oder Lecithin (vgl. Lehninger 2001). Phospholipide sind weit verbreitete Emulgatorgemische in der pharmazeutischen Technologie. Sie sind hervorragend verträglich. Die FDA hat

Lecithin den GRAS-Status verliehen (generally recognised as safe). Bei dermalen Applikation können Phospholipide die Barrierefunktion der Haut stärken und den natürlichen TEWL stabilisieren, bei langanhaltender hochdosierter Anwendung allerdings auch stören. Phospholipide werden vor allem aus Sojabohnen oder Eiern isoliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Sojaphospholipide (Lipoid KG, Ludwigshafen, Deutschland) unterschiedlicher Reinheitsgrade verwendet, die im folgenden näher erläutert werden sollen.

- Lipoid[®] S 75: Phospholipid mit ungesättigten Alkylketten und einem Anteil von etwa 70 % Phosphatidylcholin
 Lipoid[®] S 100: Phospholipid mit ungesättigten Alkylketten und mindestens 95 % Phosphatidylcholin
 Lipoid[®] S 100-3: Phospholipid mit hydrierten Alkylketten (max. Jodzahl 3) und mindestens 95 % Phosphatidylcholin

7.2.2 Ceramide

Die Ceramide sind Amide von Fettsäuren mit langkettigen hydroxylierten Aminbasen, den Sphingoiden. Sie gehören daher zu den Sphingolipiden. Zum einen kommen sie in vielen tierischen und pflanzlichen Geweben sowie im Blut zusammen mit ihren Derivaten, den Glykosphingolipiden, vor. Vor allem aber sind sie integraler Bestandteil der interzellulären Lipiddomänen des Stratum corneum und damit unerlässlich für die Ausbildung der Barrierefunktion, die die Existenz von höheren Lebensformen erst ermöglicht. Die für diese Arbeit verwendeten Ceramide der Firma Cosmoferm (Degussa Care Specialties, Delft, Niederlande) leiten sich von Phytosphingosin als Base ab. Diese Ceramide haben 3 chirale Kohlenstoffatome (C2-C4). Von den 8 möglichen Konfigurationen hat nur die 2S, 3S, 4R Konfiguration die gewünschte biologische Wirksamkeit. Die hautidentischen Ceramide werden zur Erzielung dieser Konfiguration in zwei Phasen gewonnen. Zunächst wird Tetraacetylphytosphingosin (TAPS) biotechnologisch mit Hefezellen hergestellt. Danach wird TAPS zu Phytosphingosin deacetyliert und mit verschiedenen Fettsäuren gekoppelt.

Ceramid III. Das Ceramid III (N-stearyl-phytosphingosin), ein weißes bis schwach gelbliches Pulver ($T_s = 123,8 \text{ °C}$), ist das Amid der Stearinsäure mit Phytosphingosin. Es unterstützt die Wiederherstellung der natürlichen Barrierefunktion der Haut und vermindert den TEWL. Es ist daher besonders geeignet für einen Langzeitschutz der Haut und die Regeneration empfindlicher und trockener Haut.

Ceramid IIIB. Beim Ceramid IIIB (N-oleyl-phytosphingosin), einem weißen bis schwach gelblichen Pulver ($T_s = 100,4 \text{ °C}$), handelt es sich um das Amid aus Ölsäure und Phytosphingosin (Anteil ca. 75 %). Ein Anteil von ca. 15 % besteht aus N-Linoleyl-phytosphingosin, etwa 10 % aus N-Stearylphytosphingosin. Die Eigenschaften von Ceramid IIIB ähneln denen von Ceramid III. Allerdings ist die Löslichkeit in verschiedenen Hilfsstoffen höher, so dass die Verarbeitung einfacher ist.

7.2.3 Partialglyceride

Partialglyceride sind Ester des Glycerols mit Fettsäuren natürlicher Herkunft, wobei einige Hydroxylgruppen des Glycerols unverestert bleiben. Bei der Herstellung wird die Zahl der freien Hydroxylgruppen durch Steuerung des molaren Verhältnisses zwischen Glycerol und Fettsäuren festgelegt. Darüber hinaus können über die Kettenlängen und Sättigungsgrade der Fettsäuren die HLB-Werte sowie die Löslichkeit und der Aggregatzustand des Emulgators in einem weiten Bereich variiert werden. Meistens liegen als Endprodukte Gemische aus Mono-, Di- und Triestern mit geringen Anteilen unveresterten Glycerols vor. Partialglyceride von Speisefettsäuren werden durch die FDA generell als sicher eingestuft (GRAS-Status) und finden vielfältige Anwendung in Pharmazie, Kosmetik und Lebensmitteltechnologie. Partialglyceride werden aufgrund ihrer Oberflächenaktivität als Emulgatoren, Co-Emulgatoren, Lösungsvermittler, Gleitmittel oder Weichmacher eingesetzt.

Imwitor[®] 742. Der Emulgator Imwitor[®] 742 (Caprylic/Capric glycerides, Sasol GmbH, Witten, Deutschland) ist ein Gemisch von Estern des Glycerols mit Caprylsäure (C8) und Caprinsäure (C10). Die weiße flüssig-pastöse Masse entspricht der Monographie Mittelkettige Partialglyceride DAB 1999 und enthält ca. 50 % Monoglyceride, 40 % Diglyceride sowie 8 % Triglyceride. Solche Partialglyceride haben ein breites Lösungsspektrum und sind z. B. in MCT und in Polyethylenglycolen löslich. Imwitor[®] 742 verbessert als Zusatz zu MCT die selbstemulgierenden Eigenschaften von Körperölen, Badepräparaten oder Weichgelatinefüllmassen.

Imwitor[®] 375. Bei Imwitor[®] 375 (Glyceryl Citrate/Lactate/Linoleate/Oleate, E 472b/c, Sasol GmbH, Witten, Deutschland) handelt es sich um partiell neutralisierte Ester von Mono- und Diglyceriden ungesättigter Speisefettsäuren mit Citronen- und Milchsäure.

Die gelbe Masse besitzt honigartige Konsistenz, einen charakteristischen Geruch und neutralen Geschmack. Imwitor[®] 375 ist ein o/w-Emulgator.

7.3 Weitere Lipide und Tenside

7.3.1 Cholesterol

Cholesterol (5-Cholesten-3 β -ol, Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland) ist ein weißes kristallines Pulver ($T_s = 147-150$ °C), das praktisch unlöslich in Wasser und wenig löslich in Aceton und Ethanol ist. Es gehört zu den w/o-Emulgatoren und darf auch für peroral und parenteral applizierte Arzneiformen verwendet werden.

7.3.2 Phytosphingosin

Phytosphingosin (1-Amino-2S, 3S, 4R-octadecantriol, Cosmoferm, Delft, Niederlande) ist eine freie, amphiphile Spingoidbase mit einem pK_b -Wert von ca. 9. Die in dieser Arbeit verwendeten Ceramide (siehe 1.2.2) gehören alle zu den Fettsäureamiden des Phytosphingosins. Phytosphingosin wurde zur positiven Aufladung der Lipidvesikel benutzt. Phytosphingosin kommt im SC in hohen Konzentrationen vor. Es hat antimikrobielle und entzündungshemmende Eigenschaften.

7.3.3 Polysorbat 80

Polysorbate sind Partialestergemische von Fettsäuren mit Sorbitol und seinen Anhydriden, deren freie Hydroxylgruppen mit Ethylenoxid ethoxyliert wurden, wobei etwa 20 mol Ethylenoxid für jedes Mol Sorbitol und Sorbitolanhydrid ethoxyliert sind (Ph. Eur. 2005). Im Polysorbat 80 (Tween[®] 80, Polyoxyethylen(20)sorbitanmonooleat, ICI surfactants, Everberg, Belgien) wurde vorwiegend Ölsäure als Fettsäure verwendet. Die ölige, gelbliche bis bräunliche, klare Flüssigkeit ist ein nichtionischer o/w-Emulgator mit einem HLB-Wert von 15,0.

7.3.4 DPME

Die Spinsonde 14-Doxylpalmityl-1-methylester wurde gemäß einer bereits publizierten Vorschrift synthetisiert (Hubbell und McConell 1971) und bis zur Verwendung unter Lichtschutz bei -20 °C gelagert.

7.3.5 Triacetin

Triacetin (1,2,3-Propantrioltriacetat, Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland) ist eine klare farblose, viskose, brennbare Flüssigkeit ($T_s = -78\text{ °C}$), die eine geringe Mischbarkeit mit Wasser besitzt. Triacetin wird unter anderem als Weichmacher verwendet, z.B. in Materialien für Tablettenüberzüge.

7.3.6 Propylenglycol

1,2-Propandiol ist eine klare, farblose, nahezu geruchlose und stark hygroskopische Flüssigkeit ($T_s = -60\text{ °C}$). Es ist mit Wasser und Ethanol mischbar, mit fetten Ölen dagegen nicht. Bei hohen Temperaturen oberhalb 150 °C ist es oxidationsempfindlich. Der zweiwertige Alkohol kommt als Kotensid in Mehrkomponentensystemen zur Anwendung und ist in der Lage, w/o-Emulsionen zu fördern. Es wirkt als Feuchthaltemittel und Weichmacher. Es kann die Löslichkeit verschiedener Wirkstoffe deutlich verbessern und eine stabilere Dispersion von Arzneistoffen in Salben gewährleisten. Darüber hinaus kann es häufig zu einer deutlichen Resorptionsverbesserung verschiedener Wirkstoffe beitragen. Die antimikrobielle Wirksamkeit macht einen Einsatz weiterer Konservierungsmittel häufig überflüssig. Das Irritationspotenzial an der Haut ist in starkem Maße konzentrationsabhängig, ein geringer Zusatz von 10 – 15 % wird aber allgemein als tolerierbar angesehen. Eine 40 prozentige wässrige Lösung wurde an der Schleimhaut als leicht irritierend eingestuft. Am Kaninchenauge verursachten bis zu 50 prozentige Lösungen keine Reizungen, unverdünnte Applikation führt zu schwachen Rötungen der Konjunktiva. Gelegentlich auftretende osmotische Reizungen hielten nur wenige Sekunden an. Im Humanversuch zeigten 70 prozentige Propylenglycolsalben keine Schädigungen und Reizungen (Grant 1993).

7.3.7 Poloxamere

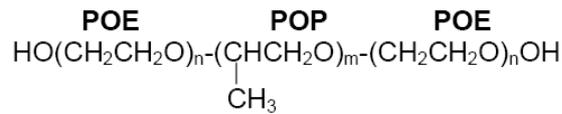


Abb. 48: Allgemeine Strukturformel der Poloxamere

Poloxamere sind tensidartige nichtionische Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Blockpolymere mit einem zentralen hydrophoben Polypropylenglycol-Teil ($m=15-67$), der an beiden Kettenenden mit jeweils einem hydrophilen Polyethylenglycol-Anteil ($n=2-146$) verknüpft ist (Ph. Eur. 2005). Sie werden in ihrer Bezeichnung durch eine zwei oder dreistellige Ziffernfolge charakterisiert. Die letzte Ziffer mit dem Faktor 10 multipliziert gibt etwa den relativen Massenanteil der Ethylenoxideinheiten in Prozent an, die voranstehende(n) Ziffer(n) codieren die relative Molekülmasse des Polypropylenglycol-Blockes. Poloxamere sind grenzflächenaktiv und sehr leicht in Wasser löslich. Poloxamere bilden in etwa 10-30-prozentiger Konzentration transparente, annähernd neutrale (pH 5-7,5) Gele, die sich mit sinkender Temperatur verflüssigen. Diese Gele besitzen gute Verträglichkeit auf Haut, Schleimhaut, Wunden und im Auge. Poloxamere sind in wässriger Lösung oder als Gel autoklavierbar. Poloxamere können u.a. die Löslichkeit für Arzneistoffe erhöhen, mit geeigneten hydrophilen Komponenten und Lipiden Mikroemulsionen bilden und die Benetzung und Haftfähigkeit auf Haut und Schleimhaut verbessern (Neues Rezeptur Formularium 2006).

Poloxamer 407. Das Polymertensid Poloxamer 407 (Lutrol[®] F 127, BASF, Ludwigshafen, Deutschland) ist ein weißer Feststoff (T_s ca. 50 °C) und hat eine mittlere Molekülmasse von 9840 bis 14600 ($n=98$, $m=67$, HLB 22).

Poloxamer 184. Beim Poloxamer 184 (Synperonic[®] L 64, C.H. Erbslöh, Düsseldorf-Hafen, Deutschland) handelt es sich um eine viskose Flüssigkeit ($\eta = 720$ mPa s, 25 °C) mit einem mittleren Molekulargewicht von ca. 2900 ($n=13$, $m=30$, HLB 15).

7.4 Cyclodextrine

Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin. Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin (HP- β -CD, 2-Hydroxypropylether des β -CD) ist ein mit Poly(hydroxypropyl)ether partiell substituiertes β -CD. Die Anzahl Hydroxypropylgruppen je Anhydroglucose-Einheit, ausgedrückt als molare Substitution, beträgt mindestens 0,40 und höchstens 1,50 (Hydroxypropylbetadex, Ph. Eur. 2005). Es ist ein weißes bis fast weißes, amorphes oder kristallines Pulver, das leicht löslich in Wasser ($c_s = 50$ g/ 100ml, Wacker Chemie 1999) und Propylenglycol ist.

Hydroxypropyl-gamma-Cyclodextrin. Hydroxypropyl-gamma-Cyclodextrin (HP- γ -CD, 2-Hydroxypropylether des γ -CD) ist ein mit Poly(hydroxypropyl)ether partiell substituiertes γ -CD. Es ist ein weißes bis fast weißes, amorphes oder kristallines Pulver, das leicht löslich in Wasser ($c_s = 80$ g/ 100ml, Wacker Chemie 1999) ist.

7.5 Herkunft weiterer Materialien

Alle weiteren Materialien wurden von renommierten Lieferanten bezogen und wiesen pharmazeutische bzw. analytische Qualität auf.

Immunsuppressiva

| | |
|----------------------|-----------------------------------|
| Ciclosporin | Novartis AG, Basel (Schweiz) |
| Everolimus | Novartis AG, Basel (Schweiz) |
| Mycophenolat Mofetil | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Sirolimus | LC Laboratories, Woburn (MA, USA) |

Hilfsstoffe

| | |
|---------------------------------------|------------------------------|
| Benzylalkohol | Fluka, Buchs (Schweiz) |
| Benzoessäure/ Natriumbenzoat | Fluka, Buchs (Schweiz) |
| Collodiumlösung 4 % (m/m) DAC 2003 | Caesar & Loretz GmbH, Hilden |
| Dihexadecylphosphat (Dicetylphosphat) | Fluka, Buchs (Schweiz) |
| Dilaurylphosphatidylcholin | Sigma Aldrich, Steinheim |

| | |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Dimyristylphosphatidylcholin | Lipoid GmbH, Ludwigshafen |
| Dodecanol | Fluka, Buchs (Schweiz) |
| Glyceroldistearat (Precirol [®] Ato 5) | Gattefossé, Saint-Priest (Frankreich) |
| Hydroxyethylcellulose | Caesar & Loretz GmbH, Hilden |
| Hydroxypropylcellulose | Caesar & Loretz GmbH, Hilden |
| Hydroxypropylmethylcellulose | Caesar & Loretz GmbH, Hilden |
| Isopropylpalmitat | Caesar & Loretz GmbH, Hilden |
| Isopropylmyristat | Caesar & Loretz GmbH, Hilden |
| Laurinsäure | Merck KgaA, Darmstadt |
| Mittelkettige Triglyceride | Caesar & Loretz GmbH, Hilden |
| Milchsäure | Caesar & Loretz GmbH, Hilden |
| Myrj [®] 52 | Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg |
| Natriumcholat | Sigma Aldrich, Steinheim |
| 1-Octanol | J. T. Baker, Deventer (Niederlande) |
| Rizinusöl | Caesar & Loretz GmbH, Hilden |
| Solutol [®] HS 15 | BASF AG, Ludwigshafen |
| Stearylamin | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Tagat [®] S | Vaseline Fabrik E. Wasserfuhr GmbH, Bonn |

Lösungsmittel

| | |
|---------------------------------------|---------------------------|
| Acetonitril (gradient grade für HPLC) | Merck KgaA, Darmstadt |
| Chloroform | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Methanol (gradient grade für HPLC) | Merck KgaA, Darmstadt |
| Reinstwasser | Millipore, Schwalbach |

Deuterte Lösungsmittel für ¹H NMR

| | |
|----------------------------------|----------------------------------------|
| Deutertes Methanol | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Deutertes Chloroform | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Deutertes Wasser (Deuteriumoxid) | Chemotrade Chemiehandels GmbH, Leipzig |