

MENTHOL-BELADENE LIPIDNANOPARTIKEL FÜR CONSUMER-CARE:
ENTWICKLUNG & OPTIMIERTE CHARAKTERISIERUNG

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
SENEM ACAR KÜBART
aus Istanbul, Türkei

2016

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Professor Dr. Cornelia M. Keck und Professor Dr. Rainer H. Müller am Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Technologie, Biopharmazie und NutriCosmetics der Freien Universität Berlin, in der Zeit von Juli 2008 bis Dezember 2014 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Roland Bodmeier

2. Gutachter: Prof. Dr. Cornelia M. Keck

Datum der Disputation: 15.05.2017

*Meiner großen Familie
in Dankbarkeit gewidmet*

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

Die vorliegende Dissertation wurde durch ein Stipendium durch den Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) mit der Kennziffer A/08/76475 gefördert.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt zunächst Prof. Dr. Cornelia M. Keck und Prof. Dr. Rainer H. Müller für ihre wissenschaftliche Betreuung. Prof. Dr. Rainer H. Müller nahm mich in seine Forschungsgruppe und bot damit die Chance für die Wahl eines aktuellen Themas und einen anregenden wissenschaftlichen Rahmen. Frau Prof. Dr. Keck möchte ich für die stete interessierte Begleitung meiner Arbeit danken. Ihre zahlreichen inspirierenden Ideen und Ihre Unterstützung bei der Anfertigung der wissenschaftlichen Publikationen waren – auch durch schwierige Zeiten hindurch – eine Motivation für mich. Prof. Dr. Roland Bodmeier war dankenswerter Weise bereit, das Erstgutachten zu übernehmen und mich bei der inhaltlichen Weiterentwicklung dieser Arbeit zu unterstützen. Er hat ihre Fertigstellung damit erst ermöglicht.

Weiterhin gilt mein Dank dem Deutschen Akademischen Austausch Dienst, der mit einem Stipendium (von Mai 2009 bis Okt 2011) diese Arbeit ermöglicht hat. Ebenso danke ich der Firma PharmaSol GmbH für die finanzielle Förderung in der Anfangszeit dieser Arbeit und der Zentralen Frauenbeauftragten der Freien Universität Berlin für die finanzielle Unterstützung bei der Teilnahme an internationalen Konferenzen.

Danken möchte ich ebenfalls Herrn Dr. Wolfgang Schwabe und Herrn Dr. Wolfgang Mehnert für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der Studentenpraktika und für ihre nicht nachlassende Diskussionsbereitschaft zu Themen der vorliegenden Arbeit.

Bei meinen ehemaligen Kollegen in der Kelchstraße bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die ständige Hilfsbereitschaft sowie die viele schönen Stunden auch außerhalb des Labors. Besonders erwähnt seien hier Dr. Loaye Al Shaal, Dr. Mirko Jansch, Dr. Ranjita Shegokar, Ansgar Brinkmann und Daniel Peters. Für die Einarbeitung zu Beginn meiner Doktorandenzeit danke ich besonders Dr. Aiman Hommos und Dr. Jana Pardeike. Im Zusammenhang mit der Lagerungsstudie möchte ich mich außerdem bei Dr. Loaye Al Shaal für die Hilfe bei der Herstellung der Nanokristalle und bei Dr. Aiman Hommos für die gute Zusammenarbeit bei der umfangreichen Produktion der Nanoemulsionen und NLC-Dispersionen bedanken.

Den technischen Assistenten Frau Corinna Schmidt und Frau Inge Volz danke ich herzlich für deren Hilfe innerhalb und außerhalb des Labors. Ein herzlicher Dank gebührt auch Frau Gabriela Karsubke für ihre Hilfe bei allen Verwaltungsaufgaben.

Weiterhin bedanke ich mich bei den ehemaligen Praktikantinnen Valeska Gennrich und Tina Röschl, die mich bei den praktischen Arbeiten mit großem Engagement unterstützt haben. Dem Campus Pirmasens der FH Kaiserslautern, insbesondere Herrn Karl Theodor Hörhammer, möchte ich für die Durchführung der gaschromatographischen Untersuchungen danken.

Frau Gesine Kübart, Frau Anne Kübart und Frau Dr. Maria Deiters danke ich herzlich für die kritische Durchsicht meines Manuskripts.

Ich danke meinen Eltern Selma Acar und Feridun Acar, dass sie mir diesen Weg ermöglicht haben und mir während meiner gesamten Promotionszeit stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Großer Dank gilt auch meiner Schwester Ecem, die mir stets zur Seite gestanden hat.

Nicht zuletzt danke ich von ganzem Herzen meinem Mann Thore für seine Liebe, seine fortwährende Geduld und Unterstützung, vor allem in den arbeitsintensiven Zeiten. Meiner geliebten Tochter Ela danke ich, dass sie mir in ihren ersten Lebensjahren die Kraft und Motivation gegeben hat diese Arbeit zum Abschluss zu bringen.

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	I
INHALTSVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	1
1.1 ALLGEMEINER TEIL	1
1.1.1 Nanoemulsionen	2
1.1.2 Feste Lipidnanopartikel (SLN)	4
1.1.3 Nanostrukturierte Lipidcarrier (NLC)	7
1.1.4 Bestandteile einer typischen NLC-Formulierung	10
1.1.4.1 Lipide	10
1.1.4.2 Emulgatoren	11
1.1.4.3 Wirkstoffe	12
1.1.4.3.1 Menthol – Chemische Struktur, Herkunft und Eigenschaften	12
1.1.4.3.2 Wirkung und Anwendung von Menthol	13
1.1.4.3.3 Wirkmechanismus	14
1.1.4.3.4 Unerwünschte Wirkungen und Kontraindikationen	15
1.1.5 Methoden für die Entwicklung, Herstellung und Freisetzungsuntersuchungen	15
1.1.5.1 Screening-Verfahren für die Rezepturoptimierung	15
1.1.5.1.1 Lipid-Screening	15
1.1.5.1.2 Tensid-Screening mittels Kontaktwinkelmessungen	16
1.1.5.2 Herstellung der Lipidnanopartikel mittels Hochdruckhomogenisation	17
1.1.5.3 Partikelgrößenanalytik mittels Laserdiffraktometrie	18
1.1.5.4 Kristallinitätsuntersuchungen mittels dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC)	20
1.1.5.5 Okklusivitätsuntersuchungen	21
1.1.6 Lagerung der Lipidnanopartikel und anderen Nano-Arzneimittelträgersystemen	22
1.1.6.1 Glas	22
1.1.6.2 Kunststoffe	24
1.2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	25
2 ENTWICKLUNG, HERSTELLUNG UND FREISETZUNGSUNTERSUCHUNGEN VON MENTHOL-BELADENEN NLC	27
2.1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG DES KAPITELS	27
2.2 MATERIALIEN UND METHODEN	28
2.2.1 Materialien	28
2.2.1.1 Lipide und Wachse	28
2.2.1.1.1 Dynasan® 118	29
2.2.1.1.2 Softisan® 154	30
2.2.1.1.3 Miglyol® 812	31
2.2.1.2 Emulgatoren	31
2.2.1.2.1 TEGO® Care 450	31
2.2.1.2.2 PLANTACARE® 2000 UP	32
2.2.1.2.3 Inutec® SP1	32
2.2.1.2.4 Tween® 80	33
2.2.1.2.5 Pluronic® F68	33
2.2.1.2.6 Cetylpyridiniumchlorid (CPC)	33
2.2.1.3 Menthol	34
2.2.1.4 Sonstige Rohstoffe und Reagenzien	34
2.2.2 Methoden	34
2.2.2.1 Screening-Verfahren für die Rezepturoptimierung	34

2.2.2.1.1	Lipid-Screening	34
2.2.2.1.2	Zusammensetzung der Lipidmatrix	35
2.2.2.1.3	Herstellung der physikalischen Mischungen	35
2.2.2.1.4	Tensid-Screening mittels Kontaktwinkelmessungen	36
2.2.2.2	Herstellung der Lipidnanopartikel mittels Hochdruckhomogenisation	36
2.2.2.2.1	Reproduzierbarkeit der Herstellungsmethode.....	37
2.2.2.2.2	Einfluss der Herstellungstemperatur.....	37
2.2.2.2.3	Einfluss des Homogenisationsdruckes	37
2.2.2.2.4	Einfluss der Anzahl der Homogenisationszyklen	38
2.2.2.2.5	Einfluss der Konzentration der Lipidphase	38
2.2.2.3	Partikelgrößenanalytik	38
2.2.2.3.1	Laserdiffraktometrie (LD).....	38
2.2.2.3.2	Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)	39
2.2.2.4	Zetapotential (ZP)	41
2.2.2.5	Lichtmikroskopie	42
2.2.2.6	Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC).....	42
2.2.2.7	Freisetzungsuntersuchungen	43
2.2.2.7.1	<i>In vitro</i> Freisetzungsuntersuchungen – das membranfreie Modell	43
2.2.2.7.2	<i>In vivo</i> Freisetzungsuntersuchungen – Probandenstudie	44
2.2.2.8	Einfluss von Zerstäubung auf die Partikelgröße.....	45
2.2.2.9	Gaschromatographie	45
2.2.2.10	Leitfähigkeit und pH-Wert	46
2.2.2.11	Viskosität und Dichte	46
2.3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	47
2.3.1	<i>Entwicklung und Herstellung der Menthol-beladenen NLC</i>	47
2.3.1.1	Rezepturoptimierung.....	47
2.3.1.1.1	Lipid-Screening.....	47
2.3.1.1.2	Herstellung der physikalischen Mischungen	48
2.3.1.1.3	Tensid-Screening.....	50
2.3.1.2	Herstellung der Menthol-beladenen NLC-Dispersionen	51
2.3.1.2.1	Reproduzierbarkeit der Herstellungsmethode.....	51
2.3.1.2.2	Einfluss der Herstellungstemperatur.....	55
2.3.1.2.3	Einfluss des Homogenisationsdruckes	64
2.3.1.2.4	Einfluss der Anzahl der Homogenisationszyklen	70
2.3.1.2.5	Einfluss der Konzentration der Lipidphase	76
2.3.2	<i>Freisetzungsuntersuchungen</i>	80
2.3.2.1	<i>In vitro</i> Freisetzungsuntersuchungen – das membranfreie Modell.....	80
2.3.2.2	<i>In vivo</i> Freisetzungsuntersuchungen – Probandenstudie.....	84
2.3.3	<i>Einfluss von Zerstäubung auf die Partikelgröße</i>	85
2.4	ZUSAMMENFASSUNG DES KAPITELS	86
3	OPTIMIERTE SCREENING-VERFAHREN FÜR DIE HERSTELLUNG DER LIPIDNANOPARTIKEL	87
3.1	LIPID-SCREENING MITTELS DYNAMISCHER DIFFERENZKALORIMETRIE (DSC) UND LICHTMIKROSKOPIE	87
3.1.1	<i>Einleitung und Zielsetzung des Abschnitts</i>	87
3.1.2	<i>Materialien und Methoden</i>	87
3.1.3	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	89
3.1.3.1	Feste Lipidnanopartikel (SLN).....	89
3.1.3.1.1	Konventionelle Lipid-Screenings mittels DSC.....	89
3.1.3.1.2	Alternatives Lipid-Screening mittels Lichtmikroskopie.....	92
3.1.3.1.3	Simulation von dem Verhalten eines Teilchens im Dispersionsmedium.....	94
3.1.3.1.4	Partikelgrößenanalytik der hergestellten SLN-Dispersionen.....	96
3.1.3.1.5	Vergleich der Vorhersagekraft verschiedener Screening-Methoden	98

3.1.3.2	Nanostrukturierte Lipid Carrier (NLC)	100
3.1.3.2.1	Konventionelles Lipid-Screening mittels DSC.....	100
3.1.3.2.2	Alternative Lipid-Screenings mittels Lichtmikroskopie.....	101
3.1.3.2.3	Simulation vom Verhalten eines Teilchens im Dispersionsmedium.....	103
3.1.3.2.4	Partikelgrößenanalytik der hergestellten NLC-Dispersionen	106
3.1.3.2.5	Vergleich der Vorhersagekraft verschiedener Screening-Methoden	109
3.1.4	<i>Zusammenfassung des Abschnitts</i>	110
3.2	TENSID-SCREENING MITTELS KONTAKTWINKEL-UNTERSUCHUNGEN.....	111
3.2.1	<i>Einleitung und Zielsetzung des Abschnitts</i>	111
3.2.2	<i>Materialien und Methoden</i>	111
3.2.3	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	112
3.2.3.1	Löslichkeitsverhalten der Tenside.....	112
3.2.3.2	Untersuchung der Kontaktwinkel.....	112
3.2.3.3	Partikelgrößenanalytik der hergestellten Lipidnanopartikel-Dispersionen.....	114
3.2.4	<i>Zusammenfassung des Abschnitts</i>	115
4	OPTIMIERTE CHARAKTERISIERUNG DER LIPIDNANOPARTIKEL	117
4.1	PARTIKELGRÖßENANALYTIK MITTELS LASERDIFFRAKTOMETRIE	117
4.1.1	<i>Einleitung und Zielsetzung des Abschnitts</i>	117
4.1.2	<i>Materialien und Methoden</i>	117
4.1.2.1	Einfluss der Instrumente zur Probenahme auf die LD-Ergebnisse	119
4.1.2.2	Einfluss von Rührgeschwindigkeit und Ultraschall während der Messung auf die LD-Ergebnisse	119
4.1.3	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	119
4.1.3.1	Einfluss der Instrumente zur Probenahme auf die LD-Ergebnisse	119
4.1.3.1.1	Lichtmikroskopie und Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)-Analysen	119
4.1.3.1.2	LD-Analysen	121
4.1.3.2	Einfluss von Rührgeschwindigkeit und Ultraschall während der Messung auf die LD-Ergebnisse.....	126
4.1.3.2.1	Lichtmikroskopie und PCS-Analysen	126
4.1.3.2.2	LD-Analysen	127
4.1.4	<i>Zusammenfassung des Abschnitts</i>	131
4.2	KRISTALLINITÄTSUNTERSUCHUNGEN MITTELS DSC	133
4.2.1	<i>Stark verdünnte Lipidnanopartikel</i>	133
4.2.1.1	Einleitung.....	133
4.2.1.2	Materialien und Methoden	133
4.2.1.3	Ergebnisse und Diskussion.....	134
4.2.1.3.1	Einfluss des Wassergehalts von NLC-Dispersionen auf DSC-Ergebnisse	134
4.2.1.3.2	Einfluss der Zentrifugation auf die DSC-Ergebnisse.....	138
4.2.1.3.2.1	DSC-Thermogramme der originalen – nicht zentrifugierten – Proben.....	138
4.2.1.3.2.2	Vergleich zwischen den DSC-Thermogrammen der originalen und der zentrifugierten Proben am Tag der Produktion	139
4.2.1.3.2.3	Vergleich zwischen den DSC-Thermogrammen der originalen, ein Jahr gelagerten Proben und der zentrifugierten Proben	139
4.2.1.4	Zusammenfassung.....	140
4.2.2	<i>Die Rolle der α-Modifikation für die Stabilität der Lipidnanopartikel</i>	141
4.2.2.1	Einleitung.....	141
4.2.2.2	Materialien und Methoden	141
4.2.2.3	Ergebnisse und Diskussion.....	142
4.2.2.4	Zusammenfassung.....	146
4.3	OKKLUSIVITÄT MITTELS <i>IN VITRO</i> OKKLUSIONSTEST NACH DE VRINGER	147
4.3.1	<i>Einleitung und Problemstellung des Abschnitts</i>	147
4.3.2	<i>Materialien und Methoden</i>	147

4.3.3	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	149
4.3.3.1	Okklusionstest im Standard-Trockenofen	149
4.3.3.2	Okklusionstest im Zellinkubator	150
4.3.4	<i>Zusammenfassung des Abschnitts</i>	152
5	OPTIMIERTE LAGERUNG DER LIPIDNANOPARTIKEL UND VERGLEICH MIT ANDEREN NANO-ARZNEIMITTELTRÄGERSYSTEMEN	153
5.1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG DES KAPITELS	153
5.2	MATERIALIEN UND METHODEN	153
5.2.1	<i>Materialien</i>	153
5.2.1.1	Füllgut	153
5.2.1.2	Primäre Verpackungsmaterialien	154
5.2.2	<i>Methoden</i>	155
5.3	ERGEBNISSE	156
5.3.1	<i>Wasser als Dispersionsmedium</i>	156
5.3.1.1	Leitfähigkeit	156
5.3.1.2	pH-Wert	158
5.3.1.3	Wasserdampfpermeabilität	159
5.3.2	<i>Nanoemulsionen</i>	160
5.3.2.1	Leitfähigkeit	160
5.3.2.2	pH-Wert	163
5.3.2.3	Partikelgrößenanalytik und Partikelladung	165
5.3.3	<i>Nanosuspensionen</i>	169
5.3.3.1	Leitfähigkeit	169
5.3.3.2	pH-Wert	171
5.3.3.1	Partikelgrößenanalytik und Partikelladung	173
5.3.4	<i>Lipidnanopartikel</i>	177
5.3.4.1	Leitfähigkeit	177
5.3.4.2	pH-Wert	179
5.3.4.1	Partikelgrößenanalytik und Partikelladung	181
5.4	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	184
5.4.1	<i>Leitfähigkeit</i>	184
5.4.2	<i>pH-Wert</i>	187
5.4.3	<i>Wasserdampfpermeabilität</i>	189
5.4.4	<i>Partikelgrößenanalytik und Partikelladung</i>	190
5.4.4.1	Nanoemulsion	190
5.4.4.1	Nanosuspension	192
5.4.4.2	Lipidnanopartikel	193
5.5	ZUSAMMENFASSUNG DES KAPITELS	193
6	ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT	195
7	SUMMARY	199
8	LITERATURVERZEICHNIS	204
9	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	220
10	CURRICULUM VITAE	224

Abkürzungsverzeichnis

bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CMR1	cold- and menthol-sensitive receptor 1
CS	Cremschmelze
d. h.	das heißt
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie
engl.	englisch
et al.	und Andere
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
GRAS	allgemein als sicher anerkannt
h	Stunde
HDPE	Polyethylen hoher Dichte
HLB	hydrophilic-lipophilic balance
ID	Innendurchmesser
LD	Laserdiffraktometrie
LDPE	Polyethylen niedriger Dichte
NLC	Nanostrukturierte Lipidcarrier
PC	Polycarbonat
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PI	Polydispersitätsindex
PP	Polypropylen
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SLN	feste Lipidnanopartikel
TRPM8	transient receptor potential melastatin 8
UpM	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
z. B.	zum Beispiel
z-average	hydrodynamischer Durchmesser, ermittelt mittels PCS
ZP	Zetapotential

1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

1.1 Allgemeiner Teil

Nanotechnologie prägt die industrielle Revolution des 21. Jahrhunderts. Nach mehr als zwanzig Jahren der Grundlagenforschung und angewandten Forschung werden Nanotechnologien immer öfter auch kommerziell eingesetzt. Zahlreiche Anwendungen betreffen viele Aspekte des Alltags, wie z. B. Nahrung, Kleidung, Medikamente und auch Wohnhäuser. Ein öffentlich zugängliches Online-Inventar (NanoTechProject 2014), das die aktuellen, auf Nanotechnologie basierenden Verbraucherprodukte auflistet, belegt, wie sich die Anzahl der auf dem Markt angebotenen Produkte von Jahr zu Jahr drastisch erhöht. „Gesundheit und Fitness“ stellt die im Inventar umfangreichste Hauptkategorie dar, die insgesamt knapp 800 Produkte umfasst. Ihre größte Untergruppe bildet die Körperpflege mit knapp 300 Produkten. Einige Vertreter dieser Gruppe sind Sonnencremes mit Titandioxid-Nanopartikeln, Feuchtigkeitscremes mit nanostrukturierten, ölbeladenen Trägersystemen, antibakterielle Zahnbürsten mit Silber-Nanopartikeln, Zahnpasten mit Gold-Nanopartikeln, Babywindeln aus Nanofibrillen und nanobeschichtete Haarglätteisen.

Die Beispiele zeigen, dass nicht nur die Anwendungsbereiche der Nanotechnologie sehr unterschiedlich sind, sondern auch die verwendeten Nanomaterialien sowie die eingesetzten Techniken variieren. Eine im pharmazeutischen und kosmetischen Bereich weit verbreitete Methode ist der Einsatz von nanometergroßen Trägersystemen, wie Liposomen, Mikroemulsionen, anorganischen Nanopartikeln, Polymer-Nanopartikeln, Nanosuspensionen und festen Lipidnanopartikeln.

Die Motivation für die Entwicklung der nanopartikulären Arzneistoffträgersysteme ist unterschiedlich. Beispielsweise wurden in den letzten Jahrzehnten immer mehr Arzneistoffe und andere biologisch aktive Substanzen entdeckt bzw. synthetisiert, die eine sehr geringe Wasserlöslichkeit und damit keine ausreichende Bioverfügbarkeit aufweisen. Um die Bioverfügbarkeit dieser Stoffe zu erhöhen, können unterschiedliche Ansätze verfolgt werden – wie z. B. eine Veränderung der Löslichkeitseigenschaften durch chemische Derivatisierung oder Salzbildung. Einen entscheidenden Nachteil dieser Techniken bilden jedoch die dabei entstehenden neuen

chemischen Substanzen. Zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit ist es oft vielversprechender, geeignete galenische Formulierungen oder Arzneistoffträgersysteme zu entwickeln.

Weitere Motivationsgründe für die Entwicklung von Nano-Arzneistoffträgersystemen sind z. B. der Schutz instabiler Wirkstoffe, die kontrollierte Wirkstofffreisetzung über definierte Zeiträume sowie ein „drug targeting“ auf spezielle Gewebe oder Organe. Unter den Arzneistoffträgersystemen sind die kolloidalen Trägersysteme auf Basis von Lipiden, insbesondere im Hinblick auf ihre physiologische Verträglichkeit gegenüber anderen kolloidalen Trägersystemen, wie beispielsweise den Polymer-Nanopartikeln, zu bevorzugen.

1.1.1 Nanoemulsionen

Emulsionen sind als heterogene disperse Systeme definiert, welche aus mindestens zwei miteinander nicht mischbaren Flüssigkeiten (Phasen) bestehen. Diese miteinander nicht mischbaren Phasen werden mit Hilfe von Emulgatoren stabilisiert. Dabei bildet die innere (dispergierte) Phase kleine Tröpfchen, welche in der anderen, also der äußeren bzw. kontinuierlichen Phase, verteilt werden. Wenn die innere (unpolare, lipophile) Phase, meist ein Öl, in das wässrige Dispersionsmedium, d. h. die äußere polare Phase dispergiert ist, spricht man von einer O/W-Emulsion. Bei den sogenannten W/O-Emulsionen verhält es sich genau umgekehrt.

Neben diesen beiden klassischen Emulsionen gibt es auch multiple Emulsionen wie W/O/W und O/W/O, bei denen die disperse Phase selbst schon als ein Emulsionssystem vorliegt (Florence et al. 1982).

Neben den drei Hauptbestandteilen einer Emulsion, d. h. innere Phase, äußere Phase und Emulgator, können weitere Bestandteile je nach Ziel und Anwendung die Formulierung ergänzen – ein Arzneimittel kann z. B. in eine Phase inkorporiert werden. Auch können Co-Emulgatoren bzw. Konservierungsmittel beigelegt werden, um physikalische bzw. mikrobiologische Stabilität zu gewährleisten.

Die kolloidalen Fettemulsionen wurden in den 1950er Jahren im Rahmen der parenteralen Ernährung eingeführt. Sie entsprechen O/W-Emulsionen mit einem Fettanteil von typischerweise 10-20% und weisen eine enge Teilchengrößenverteilung mit mittleren Partikelgrößen zwischen 200 und 500 nm auf. Als Lipidphase wurden pflanzliche Öle wie z. B. Sojaöl und mittelkettige Triglyceride (z. B. Miglyol)

verwendet, welche auch für die Solubilisierung lipophiler Arzneistoffe dienen. Somit sind die kolloidalen Fettemulsionen insbesondere auch als Träger für lipophile Arzneistoffe interessant (Davis et al. 1987, Prankerd et al. 1990, Klang et al. 1998).

Die Hauptvorteile kolloidaler Fettemulsionen wurden von Baspinar wie folgt aufgelistet (Baspinar 2009):

- Lösungsvermittlung schlecht wasserlöslicher Arzneistoffe
- toxikologische Unbedenklichkeit
- hoher Anteil der Lipidphase und dadurch höhere Beladung mit dem Arzneistoff möglich
- Herstellung im Großmaßstab, z. B. per Hochdruckhomogenisation
- Sterilisierbarkeit des Endproduktes
- Stabilisierung hydrolyseempfindlicher Arzneistoffe

Neben diesen Vorteilen besitzen kolloidale Fettemulsionen auch einige Nachteile, wie beispielsweise hohe Mobilität und relativ schnelle, unkontrollierte Freisetzung (Magenheim et al. 1993, Wissing et al. 2002b, Müller et al. 2011) der inkorporierten Arzneistoffmoleküle, die in den Emulsionstropfen eingelagert wurden. Außerdem kann eine mögliche Destabilisierung des Systems – unter anderem ein mögliches Tröpfchenwachstum aufgrund von Koaleszenz der Emulsionströpfchen – wegen des flüssigen Zustands der Lipidmatrix nicht ausgeschlossen werden.

Zur Herstellung von Nanoemulsionen können unterschiedliche Techniken eingesetzt werden. So wurde gezeigt, dass neben der Hochdruckhomogenisation auch der einstufige Prozess der partiellen Phasen-Solu-Inversions-Technik (Gohla et al., 1995), die Microfluid-Methode (Nisisako et al. 2005), Emulsionsbildung via Ultraschall (Leong et al. 2009, Tan et al. 2016a), die Kugelmühle-Methode (Schmidt et al. 2013), Emulsionsbildung via Phasenumkehr (Su et al. 2016) und das *Solvent Displacement*-Verfahren (Bouchemal et al. 2004) verwendet werden können.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass ein Hochgeschwindigkeitsrührer (ART MICCRA D27) die schnelle und kostengünstige Produktion einer Nanoemulsion ermöglicht (Scholz et al. 2015). Dieser Prozess führt zu physikalisch stabilen Nanoemulsionen mit kleinen Tröpfchengrößen (z-average: 135 nm) bei einer engen Größenverteilung und schneller Produktionszeit. Für ein 1-Liter Produkt genügt beispielsweise eine

5-minütige Hochtourenrotation. Die Produktionszeit verkürzt sich auf 3 Minuten, wenn die Spaltengröße des Rotors von 1,0 mm auf 0,5 mm verändert wird.

Eine weitere Herstellungsmethode, die kürzlich untersucht wurde, ist das sogenannte Membranemulgieren (Joseph et al. 2012). Bei dieser Methode benötigt man zwar mehrere Produktionszyklen (über 20), aber man erreicht eine monomodale Tröpfchengrößenverteilung. Laut der Autoren ist die Herstellung von Nanoemulsionen mit dieser Methode komplex und empfindlich gegenüber vielen Faktoren wie Emulgatoren, Viskosität der Phasen, Oberflächenspannung, Emulsifikationsdruck, Strömungsgeschwindigkeit, Emulsifikationszyklen, Zusammensetzung der Membran und Porengröße der Membran ab.

Der Artikel von Sugumar et al. bietet eine Übersicht zu den die Herstellungsmethoden für Nanoemulsionen (Sugumar et al. 2016).

1.1.2 Feste Lipidnanopartikel (SLN)

Um die oben erwähnten Nachteile der Nanoemulsionen zu bewältigen, welche aufgrund des flüssigen Charakters der dispergierten Phase entstehen, wurde vor Erfindung der festen Lipidnanopartikel die Idee von einem festen Lipid-Partikel (engl. „Solid Lipid Nanoparticle“, SLN) unter Namen wie „Nanopellets“ und „Lipospheres“ verfolgt. Jedoch wurden die Partikel mit den zugehörigen Herstellungsmethoden [d. h. Sprühtrocknung oder Dispergierung mit hochtourigen Rührern und Ultraschall (Speiser 1986, Domb 1993)] im Mikrometerbereich nicht ausreichend zerkleinert, um sie z. B. intravenös zu applizieren. Des Weiteren benötigten die entsprechenden Methoden einen relativ hohen Tensidgehalt der Formulierungen, wodurch physikalische Instabilitäten wegen der hohen Polydispersität nicht auszuschließen sind. Um diesen Nachteilen entgegen zu wirken, wurde mit den SLN ein neuartiges Arzneistoffträgersystem entwickelt, das durch Mikroemulsionstechnik bzw. Hochdruckhomogenisation hergestellt wird (Gasco 1993, Müller et al. 1993). Bezüglich der physiologischen Verträglichkeit bieten sie die gleichen Vorteile wie die kolloidalen Fettemulsionen. Darüber hinaus bewirken sie eine langsamere Freisetzung der inkorporierten Arzneistoffe und führen zu einer höheren Stabilität der Nanopartikel.

Neben der Mikroemulsionstechnik und Hochdruckhomogenisation kamen im Laufe der Zeit weitere Herstellungstechniken hinzu. Beispiele sind die superkritische

Flüssigkeitsextraktion (Chen et al. 2006, Chattopadhyay et al. 2007), die Präzipitation aus O/W-Emulsionen (Siekman et al. 1996), die Sprühtrocknung-Methode (Zhang et al. 2008), das Emulsions-Fällungsverfahren (Sjöström et al. 1992), die Phasenumkehr-basierte Technik (Heurtault et al. 2002), die Herstellung mit Hilfe eines Membrankontaktors (Charcosset et al. 2005), die Emulsions-Diffusionstechnik (Quintanar-Guerrero et al. 1996), die Solvent-Injection-Methode (Schubert et al. 2003) und die Doppel-Emulsions-Methode (Gallarate et al. 2009, Fanguero et al. 2012).

Das oben erwähnte Membranemulgieren, welches für die Produktion von monomodalen Nanoemulsionen eingesetzt wird, ist auch für die Herstellung von Lipidnanopartikeln anwendbar (Joseph et al. 2012). Die Produktionsparameter und deren Einflüsse wurden ausgiebig untersucht (Finke et al. 2012). Sogar eine kontrollierte Kristallisation der Öltröpfchen zu festen Lipid-Partikel konnte dank dieses Mikrosystems erreicht und untersucht werden (Schoenitz et al. 2014). Somit konnte die polymorphe Transformation der Lipide erforscht werden, welche eine bedeutsame Rolle für die Eigenschaften der Lipidnanopartikel spielt, wie z.B. physikalische Stabilität und Freisetzungsprofil des beladenen Stoffes.

Außerdem stehen modifizierte Produktionsmethoden bzw. Kombinationen von bekannten Methoden zur Verfügung. Beispiele sind: eine auf Mikrowellen basierende Mikroemulsionstechnik (Shah et al. 2014), ein modifiziertes Lösungsmittelverdampfungsverfahren, das auf der Doppel-Emulsions-Methode (Soares et al. 2013) basiert sowie die Emulsions-Diffusionstechnik zusammen kombiniert mit der Flüssigkeitsextraktion (Campardelli et al. 2013).

Eine weitere Methode für die Produktion der festen Lipidnanopartikel ist die Schmelzextrusion, kombiniert mit der Hochdruckhomogenisation. Patil et al. haben gezeigt, dass die Schmelzextrusion, welche sich bereits in der Großproduktion bewährt hat, auch für eine kontinuierliche Produktion der festen Lipidnanopartikel gut geeignet ist (Patil et al. 2014).

Eine gute Übersicht zu den unterschiedlichen Herstellungsmethoden bietet der Artikel von Parhi et al. (Parhi et al. 2012). Jede der dort vorgestellten Techniken hat ihre Vor- und Nachteile.

Vorrangig hat sich die Hochdruckhomogenisation aufgrund ihrer unkomplizierten Überführung in die Produktion im Großmaßstab und ihre kurzen Herstellungszeiten durchgesetzt. Sie ist eine anerkannte und bekannte Technik der Pharma-, Kosmetik- und Lebensmittelindustrie und benötigt keine toxischen, organischen Lösemittel.

Für die Herstellung mittels Hochdruckhomogenisation existieren im Wesentlichen zwei verschiedene Varianten. Bei der sogenannten Heißhomogenisation werden die in der wässrigen Phase vordispersierten geschmolzenen Lipide homogenisiert (Schmelzhomogenisation). Alternativ ist eine Hochdruckhomogenisation der durch Mahlen vorzerkleinerten festen Lipide möglich (Kalthomogenisation, Müller et al. 2011). Dies wird insbesondere für die Inkorporation von hydrophilen Arzneistoffen, wie beispielsweise Peptiden, in die Lipidmatrix vorgeschlagen (Almeida et al. 2007). Jedoch verursacht die Kalthomogenisation größere Partikel und breitere Partikelgrößenverteilungen (Zur Mühlen 1996).

Bei der Hochdruckhomogenisation liegen die resultierenden Durchmesser der festen Lipidnanopartikel der Hauptpopulation laut Patent im Bereich von ca. 40-1000 nm (Müller et al. 1993). In der Regel können sie aber auf den Bereich 150-300 nm eingegrenzt werden. Ein Durchmesser kleiner als 100 nm bzw. größer als zu 1000 nm kann jedoch für bestimmte Zwecke produziert werden (Müller et al. 2011). Die Partikelgröße hängt sowohl von der Zusammensetzung der Formulierung als auch von der Herstellung ab. Die Partikel bestehen im Allgemeinen aus einem bei Raum- und Körpertemperatur festen Kern, welcher aus festen Lipiden oder lipidähnlichen Substanzen zusammengesetzt und mit einer Tensidhülle bedeckt und stabilisiert ist. In der Regel sind diese Lipide oder lipidähnlichen Substanzen entweder aus physiologischer Herkunft und bioabbaubar oder besitzen GRAS-Status [engl. „generally recognized as safe“ (FDA 2014)]. Somit vereinen sie die Vorteile der Nanoemulsionen, Liposomen und Polymer-Partikel: Sie bieten wie die Emulsionen eine gute Löslichkeit von lipophilen Wirkstoffen und sie sind wie die Liposomen gut verträglich (Müller et al. 2011, Lauterbach et al. 2015). Dank ihrem festen Kern, wie der von Polymer-Partikeln, besitzen sie weitere spezielle Vorteile wie Schutz und Verbesserung der chemischen Stabilität labiler Wirkstoffe gegen chemische Zersetzung und kontrollierte Wirkstoffabgabe inkorporierter Wirkstoffe (Souza et al. 2011).

Wegen ihrer geringen Partikelgröße liegt ein weiterer Vorteil in ihren adhäsiven Eigenschaften (de Vringer 1992, Wissing et al. 2001). Außerdem können in ihrer Lipidmatrix sowohl lipophile als auch hydrophile Wirkstoffe eingearbeitet werden. Diese können gelöst, dispergiert oder an der Oberfläche adsorbiert vorliegen (Müller et al. 1995). Der Übersichtsartikel von Mehnert bietet einen guten Überblick zu SLN und ihren Einsatzmöglichkeiten (Mehnert et al. 2001). Nichtsdestotrotz besitzen SLN einige Nachteile, die hauptsächlich in der Kristallstruktur und Polymorphie der Lipide begründet sind.

Polymorphie beschreibt das Auftreten mehrerer Kristallstrukturen bei ein und derselben chemischen Substanz. Sie ist eine typische Eigenschaft von Lipiden, welche abhängig von den thermodynamischen Bedingungen verschiedene Kristallstrukturen ausbilden können (Sato 2001). Die drei Hauptmodifikationen der Glyceride werden mit α , β' und β benannt (Chapman 1962). In der genannten Reihenfolge nimmt die thermodynamische Stabilität bei steigendem Schmelzpunkt zu. Eine Glyceridschmelze kristallisiert zunächst in die α -Modifikation. Während der Lagerung transformiert sie in die stabile β -Modifikation – entweder direkt oder über die metastabile β' -Modifikation. Die Umwandlung bei Lipiden ist meistens monotrop, d. h. dass sich die Modifikation nur in eine höher schmelzende Modifikation transformiert. Die Transformation in die thermodynamisch stabilere β -Modifikation führt zu einer größeren Packungsdichte der Fettsäuren. Dies wird wiederum als Ursache für physikalische Instabilitäten angenommen, wie z. B. die Aggregation, die Gelbildung und der Ausschluss des inkorporierten Arzneistoffes (Bunjes et al. 1996, Westesen et al. 1997a, Freitas et al. 1999a), wobei die Beladungskapazität der SLN schon aufgrund ihrer hochgeordneten kristallinen Matrix gering ist (Jenning et al. 2001). Diese grundsätzlichen Nachteile der SLN können durch gezielte Störung des Kristallgitters größtenteils umgangen werden. Dafür werden den sogenannten nanostrukturierten Lipidcarriern (NLC) neben festen Lipiden auch flüssige Lipide zugemischt (Müller et al. 2011).

1.1.3 Nanostrukturierte Lipidcarrier (NLC)

Die zweite Generation von Lipidnanopartikeln, sogenannte nanostrukturierte Lipidcarrier (engl. „Nanostructured Lipid Carrier“, NLC), stellen eine Weiterentwicklung konventioneller SLN dar (Müller et al. 1999). Während SLN ausschließlich mit festem Lipid hergestellt werden, bestehen die NLC aus einem Gemisch von

festem Lipid und flüssigem Öl. Durch die Zugabe von flüssigem Lipid wird die kristalline Ordnung des festen Lipids gestört – dennoch bleibt der feste Aggregatzustand der Partikel bei Raum- und Körpertemperatur erhalten.

Je nach Mischbarkeit und Menge des Ölzusatzes entstehen in der heterogenen Lipidmatrix Gitterfehlstellen (geringer Ölzusatz) oder Öl-Nanokompartimente (hoher Ölzusatz). Da die lipophilen Wirkstoffe in Ölen häufig eine höhere Löslichkeit als in festen Lipiden zeigen, die Beladungskapazität der Nanopartikel also erhöht ist, sind NLC insbesondere für eine dauerhafte Wirkstoffinkorporation geeignet (Müller et al. 2002, Andrade et al. 2014)

Dieser Unterschied in der Wirkstoffinkorporation von SLN und NLC wurde in dem Review von Müller et al. 2011 bildlich mit dem Beispiel des „symmetric brick wall“ und des „welch natural stone wall“ dargestellt: Wie Mörtel in der Wand kann sich der Arzneistoff zwischen den Steinen platzieren. Die Lokalisation des Arzneistoffes hängt von der Lipidmatrix, der Lipophilität, dem Arzneistoff selbst und aber auch dem Tensid ab. Darüber hinaus kann zwischen den Fettsäuren eine abgeschiedene Ölfraktion vorkommen, die bei der Abkühlung der geschmolzenen Lipidphase entsteht, falls eine Übersättigung der festen Lipidkomponente mit der gelösten Ölkomponente und eine dadurch bedingte Phasenseparation vorliegt.

Bezüglich der Lokalisation des Arzneistoffes und der abgeschiedenen Ölfraktion existieren verschiedene Ansichten (Abbildung 1.1-1):

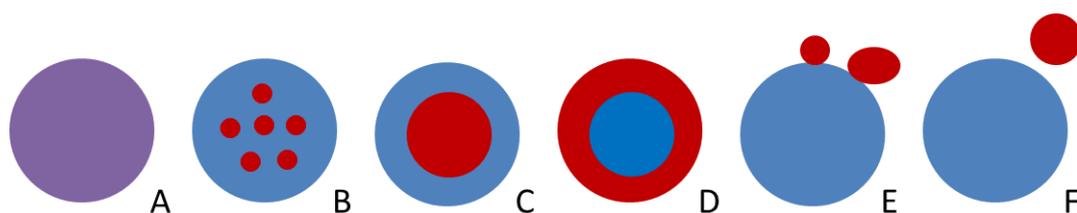


Abbildung 1.1-1: Diskutierte Modelle der Verteilung des flüssigen Lipids im festen Lipid und der daraus resultierenden Wirkstoffverteilung (Keck et al. 2013, Peters 2014)

- Das wirkstoffhaltige flüssige Lipid ist in einer festen Partikelmatrix homogen verteilt (A).
- Das wirkstoffhaltige flüssige Lipid befindet sich in Nanokompartimenten, welche im Inneren der festen Lipidmatrix gekapselt sind (B).

- Das wirkstoffhaltige flüssige Lipid befindet sich im Inneren der Lipidmatrix als ein zusammenhängender Kern (C, „Core-Shell-Model“).
- Das wirkstoffhaltige flüssige Lipid befindet sich in einer Lipid-Hülle, welche einen wirkstofffreien Lipidkern ummantelt (D).
- Das wirkstoffhaltige flüssige Lipid liegt als Tropfen neben dem Lipid-Partikel vor oder ist an dessen Oberfläche adsorbiert (E).
- Das wirkstoffhaltige flüssige Lipid bewegt sich frei in der Dispersion (F).

A, B und C sind Modelle für eine erfolgreiche Wirkstoffverkapselung, die eine verlängerte Freisetzung ermöglichen würden. Bei den Modellen D, E und F ist der Arzneistoff nicht von den Lipidnanopartikeln geschützt, womit eine verlängerte Freisetzung nicht möglich wäre.

Lipidnanopartikel – sowohl SLN als auch NLC – können in unterschiedlichen Bereichen appliziert werden. Eine parenterale Applikation kann durch weitgehend mikropartikelfreie und sterile Systeme ohne Probleme ermöglicht werden. Des Weiteren können Lipidnanopartikel-Dispersionen für perorale Applikationen lyophilisiert (Burra et al. 2013) oder sprühgetrocknet (Freitas et al. 1998) werden. Obwohl die Motivation für Lipidnanopartikel in der parenteralen und peroralen Applikation begründet war, sind sie inzwischen insbesondere für topische Applikationen interessant (Jenning et al. 2000b, Wissing et al. 2002b, Hommoss 2009, Pardeike et al. 2010). Okulare Anwendungen sind ebenso möglich (Baig et al.), für pulmonale Applikationen können die Lipidnanopartikel vernebelt werden (Pardeike et al. 2011). Der Artikel von Müller et al. bietet eine gute Zusammenfassung zu den Einsatzmöglichkeiten von Lipidnanopartikeln (Müller et al. 2011). Eine Übersicht zu den parenteralen, dermalen bzw. pulmonalen Applikationen ist bei Joshi et al. 2009, Pardeike et al. 2008 bzw. bei Weber et al. 2014 zu finden.

Neuste Erkenntnisse belegen die Bedeutung von Lipidnanopartikeln: Die Ergebnisse von Lim et al. haben gezeigt, dass NLC ein potenzielles Trägersystem für den Transport von Itrakonazol über die Blut-Hirn-Schranke sein kann (Lim et al. 2014). Die *in vivo* Studie an Mäusen hat gezeigt, dass mit Itrakonazol-beladenen NLC eine gegenüber dem reinen Itrakonazol höhere Konzentration am Gehirn erreicht werden kann. Die Verwendung von Lipidnanopartikeln als Träger und der Zusatz von Tween 80 als Tensid haben zur Permeabilität von Itrakonazol über die Blut-Hirn-Schranke beigetragen.

Des Weiteren haben Joshi et al. gezeigt, dass die Antimalaria-Aktivität von Artemether-beladenen NLC (Nanoject) im Vergleich zu den vermarkteten injizierbaren Formulierungen bedeutsam höher ist (Joshi et al. 2008a). Die Antimalaria-Aktivität von Nanoject bestand über eine längere Dauer (mehr als 20 Tage), was in einer längeren *in vivo* Zirkulation von Nanoject resultierte. Außerdem führt Nanoject im Vergleich zu den vermarkteten Formulierungen zu einer bedeutsam höheren Überlebensrate (60%).

Eine vielversprechende Innovation der Lipidnanopartikel-Forschung ist die Anwendung mathematischer Modelle, um maßgeschneiderte Partikelgrößen mit einer höchst möglichen Arzneimittel-Beladung herzustellen. Rahman et al. haben mit Hilfe einer Box-Behnken Versuchsplanung gezeigt, dass eine gute Übereinstimmung zwischen prognostizierten und gemessenen Werten für physikalische Eigenschaften wie Partikelgröße und Oberflächenladung erreichbar ist (Rahman et al. 2010).

1.1.4 Bestandteile einer typischen NLC-Formulierung

Allgemeine Bestandteile einer typischen NLC-Formulierung sind feste und flüssige Lipide, Emulgatoren (Tenside) und Wasser. Die genaue Wahl der Bestandteile hängt in erster Linie von der Applikationsroute und weiteren Eigenschaften wie Freisetzung, Zielort usw. ab.

1.1.4.1 Lipide

Hänsel definiert Lipide wie folgt: „Lipide ist eine Sammelbezeichnung für Fett und fettähnliche Stoffe, die sich als in Wasser schwer lösliche Verbindungen aus pflanzlichem oder tierischem Gewebe mit lipophilen Lösungsmitteln, z. B. Petroläther oder Chloroform, extrahieren lassen.“ (Hänsel et al. 2009).

Lipide dienen als Aufbauelement der Zellmembranen (Phospho- und Glykolipide) oder stellen Energiespeicher (Triacylglyceride) dar. Ihrer Polarität nach wird zwischen neutralen und amphiphilen Lipiden unterschieden. Zu den neutralen Lipiden zählen die Fettsäuren (e.g. Stearinsäure), die Triacylglyceride (e.g. Tristearin) und die Wachse (e.g. Cetylpalmitat). Sie sind für die Produktion der Lipidnanopartikel besonders wichtig. In der pharmazeutischen Industrie finden Lipide Einsatz in Fettemulsionen zur parenteralen Ernährung, in Suppositorien und in peroralen Arzneiformen (Ph.Eur. 2008).

Triacylglyceride (auch Triglyceride genannt) sind die Hauptbestandteile natürlicher Fette und Öle und bezeichnen Ester des Glycerols (Glycerins), in denen alle drei Hydroxygruppen des Glycerols mit Fettsäuren verestert sind.

Triacylglyceride unterscheiden sich nach Art und Position der drei mit Glycerin veresterten Fettsäuren. Bei einsäurigen Glyceriden sind alle drei OH-Gruppen mit derselben Säure verestert. Beispiele hierfür sind Tristearylglycerid und Trioleylglycerid. Triacylglyceride zeichnen sich dadurch aus, in verschiedenen polymorphen Formen zu kristallisieren. Studien zeigen, dass die Stabilität der Lipidnanopartikel stark von der Kristallstruktur des verwendeten Lipids abhängig ist (Freitas et al. 1999a, Bunjes et al. 2005). Außerdem sind sowohl die resultierenden Partikelgrößen der Lipidnanopartikeldispersionen (Zur Mühlen 1996) als auch die Freisetzung der inkorporierten Wirkstoffe vom in der Rezeptur verwendeten Lipid abhängig (Hommos et al. 2007).

1.1.4.2 Emulgatoren

Emulgatoren sind oberflächenaktive Substanzen (Tenside), die in geringen Mengen die Bildung einer Emulsion erleichtern oder ihre kolloidale Stabilität durch die Verhinderung von Aggregationen und/oder von Koaleszenzen steigern. Sie werden an Grenzflächen adsorbiert, senken die Grenzflächenspannung zwischen den Phasen und ermöglichen so die Bildung von Lipidnanopartikel-Dispersionen. Sie besitzen amphiphile Strukturen und können Mizellen bilden (Bultmann 2003). Die Wahl des Emulgators und dessen Konzentration ist in erster Linie für die physikalische Stabilität der Dispersionen bedeutsam (Müller et al. 1995, Cavalli et al. 1998). Außerdem beeinflussen Emulgatoren die sonstigen Dispersionseigenschaften wie Partikelgröße, Partikelgrößenverteilung, Oberflächenladung und Kristallinität der Lipidnanopartikel (Bunjes et al. 2003, Keck et al. 2014a, Sarpietro et al. 2014). Daher beeinflussen Emulgatoren auch andere Eigenschaften der Lipidnanopartikel, wie Okklusion oder Freisetzung des Wirkstoffs (Hommos et al. 2007).

Die letzten Studien zeigen, dass die Produktion maßgeschneiderter Lipidnanopartikel-Dispersionen mit besonders kleinen Teilchengrößen durch die Wahl der Emulgatoren nach ihrem HLB-Wert möglich ist (Keck et al. 2014b).

1.1.4.3 Wirkstoffe

Diverse Wirkstoffe wurden bereits in Lipidnanopartikel eingearbeitet. Beispiele dafür sind: Vitamine wie Vitamin E (Dingler et al. 1999), Vitamin D (Patel et al. 2012), Vitamin A (Jenning et al. 2000a) und Vitamin C (Güney et al. 2014), Hormone wie Insulin (Gallarate et al. 2009, Soares et al. 2013), Zytostatika wie Doxorubicin (Fundarò et al. 2000), Docetaxel (Venishetty et al. 2013) und Topotecan (Souza et al. 2011), Antioxidantien wie Coenzym Q10 (Wissing et al. 2004, Pardeike et al. 2010), Quercetin (Aditya et al. 2014), Resveratrol (Teskač et al. 2010), Rosmarinsäure (Campos et al. 2014) und Anthocyane (Ravanfar et al. 2016), Antimykotika wie Clotrimazol (Souto et al. 2004), Amphotericin B (Butani et al. 2016) und Griseofulvin (Tan et al. 2016b), Antibiotika wie Roxithromycin (Wosicka-Frąckowiak et al. 2015) und Tobramycin (Moreno-Sastre et al. 2016), Antiphlogistika wie Ibuprofen (Lamprecht et al. 2004), Flurbiprofen (González-Mira et al. 2011) und Curcumin (Noack et al. 2012), Tuberkulostatika wie Rifabutin (Gaspar et al. 2016) und Isoniazid (Bhandari et al. 2013) oder Triptane wie Sumatriptan (Hansraj et al. 2015).

In dieser Arbeit wird Menthol als Wirkstoff in Lipidnanopartikel eingearbeitet. Die Löslichkeitseigenschaften von Menthol stellen eine besondere Herausforderung bei der NLC-Herstellung mittels Heißhochdruckhomogenisation dar (siehe folgenden Abschnitt).

1.1.4.3.1 Menthol – Chemische Struktur, Herkunft und Eigenschaften

Menthol ist ein zyklisches Monoterpen ($C_{10}H_{20}O$, $M_r = 156.27$ g/mol, Abbildung 1.1-2) und kommt in Pflanzen der Gattung *Mentha* vor (BASF 2013). Menthol liegt als Hauptkomponente der Pfefferminzöle vom Piperita-Typ und der Minzöle vom *Mentha-arvensis*-Typ sowohl frei vor (30% - 55%), als auch gebunden an Essig- und Isovaleriansäure (Estermenthol; 3% - 12%). Je nach Varietät, Boden, Klima, Gewinnung (Trocknungsdauer der Pflanzen) und Rektifikation ändert sich die Zusammensetzung dieser Öle und ihr Mentholgehalt (Hänsel et al. 2009). Wegen ihrem hohen Mentholgehalt werden Minzöle im großen Maßstab zur Gewinnung von natürlichem Menthol benutzt.

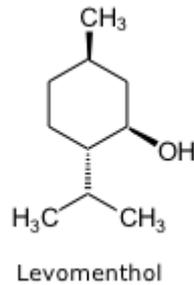


Abbildung 1.1-2: Strukturformel von Menthol (Hänsel et al. 2009)

Das Europäische Arzneibuch kennt zwei Monographien für Menthol, eine für natürliches, linksdrehendes (-)-Menthol (Levomentholum) und eine für racemisches Menthol (Mentholum racemicum, Ph.Eur. 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde Levomentholum verwendet. Natürlich gewinnt man Levomentholum aus Minzölen (Eccles 1994), es kann jedoch auch partial- und vollsynthetisch aus Citral (BASF 2012), (+)-Citronellal, Phellandren, (-)-Piperiton, (+)- Δ^3 -Caren und aus racemischem Menthol gewonnen werden (Hänsel et al. 2009). Sein Geruch wird als süß-minzig, kühl und frisch beschrieben. Es schmeckt nach Pfefferminze.

Bei Raumtemperatur ist Levomenthol praktisch unlöslich in Wasser, jedoch leicht löslich in Lipiden, insbesondere in flüssigen Lipiden, sowie in flüssigem Paraffin. Mit zunehmender Temperatur steigt seine Löslichkeit in Wasser an (Shotipruk et al. 2001), weshalb das Menthol nicht vollständig im Lipidnanopartikel inkorporiert vorliegt. Dies ist der wesentliche Unterschied zwischen Menthol und anderen lipophilen Wirkstoffen, welche in zahlreichen früheren Studien in Lipidnanopartikel eingearbeitet wurden. Laut Literatur besitzt Menthol zwei Modifikationen mit den Schmelzpunkten 35°C und 43°C (Corvis et al. 2012).

1.1.4.3.2 Wirkung und Anwendung von Menthol

Menthol wird weit verbreitet in der Pharma-, Kosmetik- und Lebensmittelindustrie eingesetzt. Aufgrund seines minzig-frischen Geruchs und pfefferminzartigen Aromas erhöht es die Verbraucherakzeptanz. Außerdem erweitert es bei der topischen Anwendung die Blutgefäße und verursacht somit ein erfrischendes Kältegefühl, wodurch es juckreiz- und schmerzlindernd wirkt (Hänsel et al. 2009).

Menthol wird in vielen rezeptpflichtigen und nicht-rezeptpflichtigen Produkten zur oralen oder dermalen Anwendung verwendet (Patel et al. 2007) – unter anderem zur

Behandlung von Hauterkrankungen, Erkältungen, Schnupfen und Sportverletzungen, meistens im Konzentrationsbereich von 0,1% bis 1%. Seine juckreizstillenden (Bromm et al. 1995), lokalanästhetischen (Galeotti et al. 2002, Watt et al. 2008), antimikrobiellen (antibakteriellen und antimykotischen) (Iskan et al. 2002, Schelz et al. 2006), entzündungshemmenden (Juergens et al. 1998) und penetrationsfördernden Eigenschaften (Yener et al. 2003, Williams et al. 2004) werden in verschiedenen Formulierungen zur dermalen Anwendung genutzt. Außerdem werden beispielsweise die folgenden Wirkstoffe mit Menthol kombiniert: Ketoprofen (Wu et al. 2001, Huang et al. 2007), Tiaprofensäure (Okyar et al. 2008), Propranolol (Zahir et al. 1998) und Nicardipinhydrochlorid (Krishnaiah et al. 2002). Auch wird Menthol oral für Magen-Darm-Erkrankungen als Karminativum und gallentreibendes Mittel verwendet (Pittler et al. 1998). Darüber hinaus schlug Borhani-Haghighi et al. für die Behandlung der gewöhnlichen akuten Migräne eine 10%ige Menthol-Lösung vor (Borhani-Haghighi et al. 2010) und Panahi et al. stellte in seiner Arbeit die Verwendung von Menthol zur Behandlung chronischer Hautveränderungen nach Senfgasexplosionen vor (Panahi et al. 2007). Weitere Verwendung findet Menthol z. B. in Zigaretten, Kaugummis, Parfümen, Hygieneartikeln und Insektiziden.

1.1.4.3.3 Wirkmechanismus

Das durch Menthol gegebene Kälteempfinden wird durch die Bindung von Menthol an den Kälterezeptor CMR1 (cold- and menthol-sensitive receptor 1) bzw. an den Rezeptor TRPM8 (transient receptor potential melastatin 8 aus der Familie der TRP-Kanäle) ausgelöst (Hänsel et al. 2009).

TRPM8 ist ein Ligand-gesteuerter, nichtselektiver Kationenkanal, der für Ca^{2+} permeabel ist. Er dient als Sensor für die Kälteempfindung an trigeminalen Ganglien und Nervenfasern der Zunge. Er wird physiologisch durch kühle Temperaturen aktiviert. Ebenso wird er auch durch Naturstoffe wie Menthol, Menthon, Eucalyptol und Icilin aktiviert und führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und der Auslösung eines Aktionspotentials, das zu Kälteempfindung und Schmerz führt. Die Aktivierung von TRPM8 durch Menthol findet bei Temperaturen zwischen 25°C und 28°C statt.

1.1.4.3.4 Unerwünschte Wirkungen und Kontraindikationen

Als unerwünschte Wirkungen von Menthol können allergische Reaktionen wie Kontaktdermatitis, Überempfindlichkeit, Augenreizung und Hautreizung bei Zubereitungen mit hoher Konzentration gezählt werden. Konzentrierte Dämpfe von Menthol und Zubereitungen aus Menthol sind für Säuglinge und Kleinkinder kontraindiziert, da sie zu einem Laryngospasmus und Kollaps führen können, wobei diese möglichen Nebenwirkungen nicht mentholspezifisch sind (Hänsel et al. 2009).

1.1.5 Methoden für die Entwicklung, Herstellung und Freisetzung-untersuchungen

In diesem Teil der Einleitung werden Methoden, die im Rahmen dieser Arbeit optimiert wurden (Abschnitt 1.2, *Zielsetzung*), vorgestellt. Detaillierte Darstellungen – sowie Erläuterungen zu weiteren Methoden, die im Rahmen dieser Arbeit ebenso eingesetzt wurden – sind in Kapitel 2.2 „*Materialien und Methoden*“ zu finden.

1.1.5.1 Screening-Verfahren für die Rezepturoptimierung

1.1.5.1.1 Lipid-Screening

Zwecks Zeit- und Kostenreduktion ist bei der Entwicklung einer Lipidnanopartikel-Formulierung bereits vor der Produktion eine Vorhersage für die optimale Zusammensetzung einer stabilen Dispersion erwünscht. Hierfür werden üblicherweise beginnend mit Lipid-Screening und anschließendem Tensid-Screening eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt. Das Lipid-Screening umfasst jene Untersuchungen, die die Eignung eines Lipides für die Beladung mit einem Wirkstoff feststellen. Häufig wird beim Lipid-Screening zunächst die Löslichkeit des Wirkstoffes im untersuchten Lipid visuell überprüft (Radtke 2003). Dazu wird das Lipid mit dem Wirkstoff in verschiedenen Konzentrationen in Vials gemischt. Um die maximale Beladung von flüssigem Lipid in festem Lipid zu identifizieren, werden festes und flüssiges Lipid in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt, bis über den Schmelzpunkt des festen Lipides hinaus erhitzt und dann auf Raumtemperatur heruntergekühlt. Nach der Kühlung wird ein Stück der verfestigten physikalischen Mischung auf einem Filterpapier angebracht, um mit der sogenannten Filterpapiermethode die Güte der Beladung festzustellen.

Nach einer Vorauswahl können dann die ausgewählten Mischungen mittels der Dynamischen Differenzkalorimetrie (DSC) (Abschnitt 1.1.5.4 und 2.2.2.6) analysiert

und auf ihr Kristallisationsverhalten hin untersucht werden. Dieses Vorgehen ist jedoch meist mit großem zeitlichem Aufwand verbunden. In Kapitel 3.1 dieser Arbeit werden unter anderem alternative Methoden evaluiert.

1.1.5.1.2 Tensid-Screening mittels Kontaktwinkelmessungen

Nach Wahl der geeigneten Lipidkomponenten besteht die nächste Stufe der Rezepturoptimierung in der Auswahl der geeigneten Tenside. Tenside verringern die Grenzflächenspannung zwischen den Phasen und ermöglichen so die Bildung von Lipidnanopartikel-Dispersionen. Somit beeinflussen sie die Stabilität der Dispersionen sowie die sonstigen Dispersionseigenschaften wie Partikelgröße, Partikelgrößenverteilung, Oberflächenladung und Partikelkristallinität (Bunjies et al. 2003, Schubert et al. 2005, Kovacevic et al. 2011). Nur ihre korrekte Auswahl ermöglicht maßgeschneiderte, physikalisch stabile Lipidnanopartikel mit den gewünschten Eigenschaften.

Ein verbreitetes Vorgehen zur Bestimmung eines geeigneten Tensids für eine physikalisch stabile NLC-Dispersion ist die Herstellung verschiedener Formulierungen mit variierendem Emulgator und die anschließende Bestimmung der physiko-chemischen Eigenschaften wie Partikelgröße, Oberflächenladung und Stabilität. Dieses Verfahren ist jedoch zeit- und kostenaufwändig. Eine kostengünstige Alternative für das Tensid-Screening ist die Kontaktwinkelmessung via Goniometer (Pardeike 2009, Al Shaal 2011). Sie ermöglicht es die Benetzungsfähigkeit einer Testflüssigkeit auf einer Testoberfläche zu untersuchen. Die Kontaktwinkelmessung via Goniometer wird bereits in vielen technologischen Prozessen wie z. B. bei der Tablettierung und der Herstellung von Suspensionen benutzt (Bauer et al. 1999). Bei Kontaktwinkelmessungen für die Formulierungsoptimierung eines NLC-Systems simuliert die Testflüssigkeit das Dispersionsmedium. Dabei entspricht die Oberfläche der Lipidnanopartikel der Testoberfläche. Geeignete Tenside verringern die Grenzflächenspannung zwischen der Testflüssigkeit und der Testoberfläche. Sie schaffen niedrige Kontaktwinkel, wodurch auf eine hohe Benetzungsfähigkeit der Tenside geschlossen werden kann. Im Gegensatz dazu haben die Tenside mit hohem Kontaktwinkel eine geringe Benetzungsfähigkeit (

Abbildung 1.1-3).

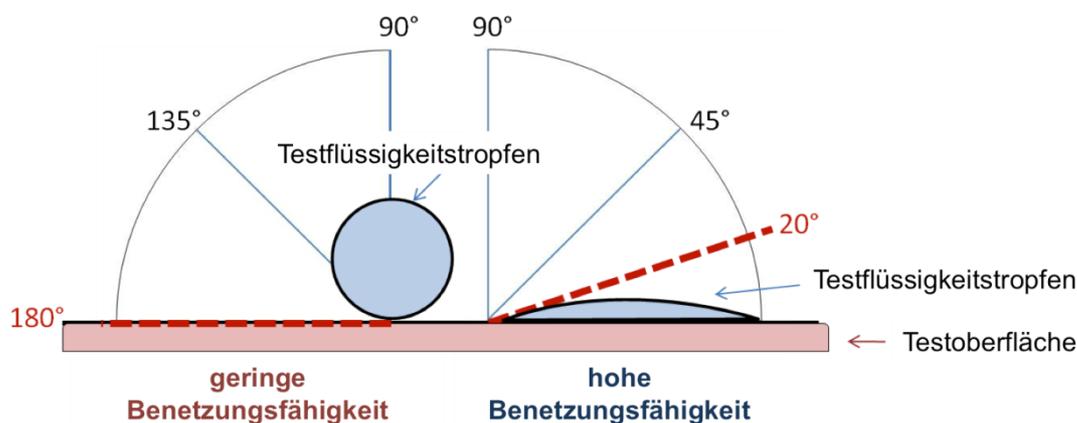


Abbildung 1.1-3: Zwei Beispiele für die verschiedenen Tropfenformen und unterschiedlichen Kontaktwinkel, die je nach Tensid entstehen können. Ein Kontaktwinkel von 180° bedeutet keine Benetzung; hingegen entspricht ein Kontaktwinkel kleiner als 45° einer guten Benetzung.

1.1.5.2 Herstellung der Lipidnanopartikel mittels Hochdruckhomogenisation

Wie bereits in Abschnitten 1.1.1 und 1.1.3 erläutert wurde, stehen unterschiedliche Herstellungsmethoden für die Produktion der Lipidnanopartikel zur Verfügung. Wegen den in Abschnitt 1.1.1 aufgeführten Vorteilen und der Möglichkeit eines Scale-up, ist die Hochdruckhomogenisation stark verbreitet (Mehnert et al. 2001, Patwekar et al. 2014). Bei einer Homogenisation mit einem Kolben-Spalt-Homogenisator ist für die Zerkleinerung der geschmolzenen, inneren Lipidphase ein kombinierter Mechanismus aus Kavitation und Turbulenz verantwortlich (Jahnke 2001). Eine gute Übersicht zur Anwendung der Hochdruckhomogenisation für die Herstellung von Lipidnanopartikeln bietet der Artikel von Mehnert et al. (Mehnert et al. 2001). Ein Vergleich zwischen den unterschiedlichen Homogenisatoren liefert der Artikel von Liedtke et al. und die Dissertation von Wissing (Liedtke et al. 2000, Wissing 2002).

Die Produktionstemperatur für die Herstellung von NLC liegt typischerweise bei etwa 10 - 15°C oberhalb des Schmelzpunktes des am höchsten schmelzenden Lipids, das in der Rezeptur auftritt (Jenning et al. 2002, Wissing et al. 2002a, Souto et al. 2006). Der Grund dafür ist die Abnahme der Viskosität bei zunehmender Temperatur. Allgemein

gilt: Je geringer die Viskosität ist, desto kleiner sind die Partikel der endgültigen Dispersion (Jahnke 2001).

Die am häufigsten verwendeten Homogenisationsdrücke für die Herstellung der Lipidnanopartikel sind derzeit 500 bar und 800 bar (Hommos 2009, Severino et al. 2012). Jedoch kann eine Reduzierung des angewandten Drucks und eine Reduzierung der Zyklen dabei helfen Produktionskosten zu sparen.

Frühere Studien zeigten, dass der Lipidgehalt in der wässrigen Phase bis auf 95% erhöht werden kann (Müller et al. 1999). Da die NLC-Dispersionen häufig als Konzentrat in das Endprodukt zugemischt werden, werden Dispersionen mit möglichst hoher Lipidkonzentration hergestellt. Jedoch kann bereits eine 5-10% Erhöhung des Lipidgehalts größere Partikel im Mikrometerbereich und eine breitere Partikelgrößenverteilung verursachen, was wiederum zu einer Partikelagglomeration führen kann (Zur Mühlen 1996). Daher muss für eine stabile Dispersion grundsätzlich eine optimale Konzentration der Lipidphase gefunden werden.

1.1.5.3 Partikelgrößenanalytik mittels Laserdiffraktometrie

Für die Charakterisierung der Lipidnanopartikel-Dispersionen und auch für andere kolloidale Systeme ist die Partikelgrößenanalytik essenziell. Eine erfolgreiche Entwicklung von kolloidalen Arzneistoffträgersystemen basiert darauf, eine angemessene Partikelgröße zu gewährleisten und zeitabhängige Veränderungen in der Partikelgröße zu verhindern, um somit die physikalische Stabilität während der Haltbarkeitsdauer des Produktes sicher zu stellen. Hierzu muss die Partikelgröße korrekt analysiert werden. Nur so können die Unterschiede, die z. B. durch Produktionsparameter, Konzentration und Art der Stabilisatoren, Lagerung usw. verursacht werden, identifiziert und optimiert werden. Eine frühe Unterscheidung zwischen „guten und schlechten“ Proben verbessert die Entwicklung der Formulierungen – Zeit und Kosten können gespart werden. Des Weiteren dient die Partikelgrößenanalytik der Bestimmung der physikalischen Stabilität der kolloidalen Systeme. Für die Partikelgrößenanalytik wurden mikroskopische Methoden (z. B. Rasterelektronenmikroskopie, Transmissionselektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie), die Zentrifugalsedimentation (Anderson et al. 2013), die Feld-Fluss-Fraktionierung (Contado et al. 2007), Coulter Counter (Coulter 1953) und Lichtstreutechniken (z. B. dynamische oder statische Lichtstreuung) entwickelt. Jede

dieser Methoden besitzt einige Vor- und Nachteile, keine dieser Techniken ist allein in der Lage, ein kolloidales System vollständig zu charakterisieren. Daher wird in der Praxis sehr oft eine Kombination verschiedener Methoden verwendet (Mehnert et al. 2001).

Laserdiffraktometrie (LD) ist statische Lichtstreuung und gehört für viele Forschungsgruppen zum Standardmessverfahren der Partikelgrößenanalyse. Sie beruht auf der Analyse der Lichtbeugungsmuster an dispergierten Teilchen, die entstehen, wenn Teilchen unterschiedlicher Größe in den Strahlengang eines Lichtstrahles eingebracht werden. Bei der Laserdiffraktometrie wird Laserlicht als Lichtquelle genutzt, welches mittels eines optischen Systems aufgeweitet wird und anschließend auf die Probe trifft. Somit werden radialsymmetrische Beugungsspektren erzeugt (Fraunhofer-Beugung). Eine Fourier-Linse fokussiert die Beugungsspektren der Teilchen auf eine Stelle eines Multielement-Detektors, unabhängig von der Position der dispergierten Teilchen. Der Beugungswinkel an einem dispergierten Teilchen hängt umgekehrt proportional vom Partikeldurchmesser ab. Kleine Partikel führen aufgrund ihrer stark gekrümmten Oberfläche zu großen Beugungswinkeln, und somit zu einer starken Intensität des gebeugten Laserlichtes auf den äußeren Ringsegmenten des Detektors. Anschließend wird aus den Beugungsspektren mittels mathematischer Analyse die vorliegende Partikelgrößenverteilung ermittelt (Müller et al. 1996).

Grundsätzlich kann die Partikelgrößenverteilung numerisch und volumetrisch berechnet werden (Scientific 2014). Meistens wird jedoch die Volumenverteilung angegeben, mit der sich der prozentuale Anteil bestimmter Partikelgrößen am Gesamtvolumen erkennen lässt. Zur Charakterisierung der Verteilung werden standardmäßig die Durchmesser $d(v)_{0,50}$ und $d(v)_{0,95}$ oder $d(v)_{0,99}$ herangezogen. Zum Beispiel gibt $d(v)_{0,95}$ den Wert an, für den genau 95% der Teilchenpopulation einen kleineren Wert haben. Der Wert $d(v)_{0,95}$ gilt als ein kritisches Maß für mögliche Mikropartikel neben der feinen Hauptfraktion in der Probe.

Vorteil der Laserdiffraktometrie ist, dass sowohl kleine Partikel (≤ 20 nm) als auch größere Teilchen und Agglomerate (bis zu 2 mm) detektiert werden können und fast jedes System analysierbar ist (Keck 2012). Außerdem führt sie zu kurzen Vorbereitungs- und Messzeiten und ist relativ einfach zu bedienen. Als ein Nachteil erweist sich die Notwendigkeit der starken Verdünnung der Probe vor der Messung, was zur Störung eines vorhandenen physiko-chemischen Gleichgewichts führen kann.

Die Folge können Aggregation und Koaleszenz sein, die sich dann wiederum in einer veränderten Partikelgröße niederschlagen (Daniels 2004). Eine gute Übersicht zur Partikelgrößenanalyse kolloidaler Systeme mittels LD und den zu beachtenden Fehlerquellen bieten zwei Artikel von Keck und die Dissertation von Keck (Keck 2006, Keck et al. 2008, Keck 2010). Demnach sind Fehlerquellen:

- Die Verwendung der Fraunhofer-Näherung oder die Anwendung der Mie-Theorie mit falschen optischen Parametern (Keck 2006, Keck et al. 2008).
- Die Überwertung von kleinen Partikeln in einem System, das Nanopartikel und größere Teilchen gleichzeitig enthält, wodurch zusätzliche Techniken verwendet werden müssen, die den Messbereich erweitern (Keck 2006, Keck et al. 2008)
- Die Instabilität der Probe während der Messung (z. B. Auflösung von Arzneistoff-Nanokristallen) (Keck 2006, Keck 2010)

Werden diese Fehlerquellen nicht beachtet und beseitigt, so kann es zu falschen und / oder nicht reproduzierbaren Ergebnissen kommen.

In Kapitel 4.1 dieser Arbeit wird die Partikelanalyse mittels Laserdiffraktometrie auf weitere mögliche Fehlerquellen untersucht.

1.1.5.4 Kristallinitätsuntersuchungen mittels dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC)

Mit Hilfe der dynamischen Differenzkalorimetrie (engl. „Differential Scanning Calorimetry“, DSC) können Prozesse untersucht werden, die mit einer Wärmeabgabe (endotherme Prozesse, z. B. Schmelzen, Sublimation, Dehydratation, Zersetzung), mit einer Wärmeaufnahme (exotherme Prozesse, z. B. Kristallisation, Kondensation, Oxidation) oder mit einer Änderung der Wärmekapazität der Probe (z. B. beim Glasübergang) einhergehen. Im pharmazeutischen Bereich wird die DSC beispielweise zur Bestimmung von Umwandlungstemperaturen, Enthalpien, Polymorphie, Reinheitsgraden und Arzneistoff-Hilfsstoff-Inkompatibilitäten benutzt.

In der Lipidnanopartikel-Forschung wird DSC insbesondere bei der Untersuchung auf Polymorphie und der Untersuchung auf Schmelz- und Rekristallisationsverhalten der Teilchen bzw. jeweiligen Ausgangsprodukte eingesetzt. Mittels DSC kann unter

anderem der feste Aggregatzustand der Lipid-Partikel nachgewiesen werden (Westesen et al. 1995, Freitas et al. 1999a, Bunjes et al. 2003). Darüber hinaus können mittels DSC mögliche Wechselwirkungen zwischen Wirkstoffen und Lipidmatrices untersucht werden (Bunjes et al. 2002, Kovacevic et al. 2011), was zu einer Änderung des Schmelzverhaltens der Lipide führen kann.

Castelli et al. haben mittels DSC die Wirksamkeit der Arzneimittel-Verkapselung von NLC bestimmt, welche von der Kristallinität der Lipidbestandteile abhängt. Dabei haben sie die statischen sowie die dynamischen DSC Methoden verwendet und versucht die Öl-Kompartimente im festen Lipid nachzuweisen (Castelli et al. 2005).

Weitere Beispiele für die DSC-Nutzung sind die Arzneistofflokalisierung durch Kombination mit anderen Verfahren (Westesen et al. 1997a) und das von de Vringer etablierte Verfahren zur Charakterisierung topischer Systeme mit darin enthaltenen Lipid-Partikeln (de Vringer et al. 1995). DSC ermöglicht es, die Existenz und Stabilität fester Lipidnanopartikel nachzuweisen.

Für detaillierte Informationen, sowie Erklärungen der Messprinzipien siehe „*Materialien und Methoden*“ in Abschnitt 2.2.2.6 und Hemminger et al. (Hemminger et al. 2012).

Wie jede Methode besitzt auch die DSC versteckte Fehlerquellen, die bei einer Messung unbedingt beseitigt bzw. beachtet werden müssen, wie z. B. der Einfluss des Wassergehaltes der Probe. So liegt die Probenmenge, die für eine DSC-Messung benötigt wird, bei festen Materialien zwischen 1 mg und 2 mg. Für in Wasser dispergierte Lipidnanopartikel ist die Probenmenge abhängig vom Lipidphase/Wasserphase-Verhältnis der Dispersion. Liegt beispielsweise eine Lipidnanopartikel-Dispersion mit einer 10% Lipidphase vor, so beträgt die benötigte Probenmenge 15 mg, um eine Probe mit 1,5 mg Lipidnanopartikeln zu erhalten. Für eine 5%ige Lipidnanopartikel-Dispersion wäre hingegen eine 30 mg DSC-Probe nötig, um die gleiche Menge an Lipidnanopartikeln zu gewährleisten. Die erste Probe hätte einen Wassergehalt von 13,5 mg, die zweite mit 28,5 mg einen mehr als doppelt so großen.

In Kapitel 4.2 dieser Arbeit wird der Einfluss des Wassergehalts auf die DSC-Ergebnisse untersucht.

1.1.5.5 Okklusivitätsuntersuchungen

Okklusion kommt von dem lateinischen Wort „occlusio“ und heißt wörtlich Verschießung. Aus pharmazeutischer Sicht steht Okklusion für luft- und wasserundurchlässiges Abdecken von Hautarealen (Wikipedia 2014). Beispiele für okklusive Materialien sind Okklusivfolien aus Kunststoff, lipophile Grundlagen wie Kohlenwasserstoffgrundlagen und Fette sowie deren W/O-Emulsionen. Das Auftragen okklusiver Materialien ist eine von zwei Möglichkeiten, um den Wassergehalt der Haut zu erhöhen (Wissing et al. 2001). Die Filmbildung nach dermalen Anwendung reduziert bzw. verhindert den transepidermalen Wasserverlust. Der Wassergehalt wird erhöht und die Hautfeuchtigkeit steigt in die Folge an. Der Nachteil von vielen okklusiven Materialien und Formulierungen ist, dass sie stark fettend, glänzend und daher ihre Applikation unangenehm sein kann. Lipidnanopartikel stellen eine Alternative dar: Sie bilden ein hoch okklusives Material, jedoch ohne die zuvor genannten Nachteile aufzuweisen.

Das Vorliegen von Okklusivität kann *in vivo* (Pardeike et al. 2010) und *in vitro* überprüft werden. Eine *in vitro* Bestimmung wird typischerweise mittels einem Okklusionstest nach de Vringer durchgeführt (de Vringer 1992).

Ein Nachteil des Okklusionstest nach de Vringer ist, dass er teure Klimakammern benötigt, die nicht zur Standardausstattung eines Labores gehören.

1.1.6 Lagerung der Lipidnanopartikel und anderen Nano-Arzneimittelträgersystemen

Erfolgreiche Nanoarzneistoffträger-Formulierungen zielen nicht nur auf eine verbesserte therapeutische Wirksamkeit des Wirkstoffes ab, sondern auch auf die physikalische, chemische und mikrobiologische Stabilität des Systems. Bei der Stabilität des Produktes spielt als letzter Parameter in der Produktionskette das Verpackungsmaterial eine Rolle. Die Hauptfunktion der Primärverpackung, die in direktem Kontakt mit dem Produkt steht, ist es das Produkt vor Umwelteinflüssen zu schützen und die Qualität des Produktes von der Herstellung bis zum Zeitpunkt des Verbrauches zu erhalten (Lockhart et al. 1996, Dean et al. 2005). Heutzutage gibt es eine Vielzahl von Primärverpackungsmaterialien. Sie können z. B. aus Glas, Kunststoffen, Metallen (wie Aluminium, Zinn, etc.), Keramik oder Porzellan, hergestellt sein. In der Pharma- und Kosmetikindustrie sind Glas und Kunststoffe die am häufigsten verwendeten Materialien für primäre Verpackungen (List 1976).

1.1.6.1 Glas

Glas ist ein festes, amorphes Material und besteht aus SiO_2 . Es neigt dazu Alkali an Lösungen abzugeben. In Folge dessen kann sich der pH-Wert vom Produkt erhöhen, womit es mit manchen Wirkstoffen (wie z. B. Alkaloidbasen) zu Unverträglichkeiten kommen kann (Schmidt 2001). Im europäischen Arzneibuch sind in der Monographie über Glas vier Klassen bezüglich der hydrolytischen Resistenz von Glas beschrieben (Ph.Eur. 2008). Glasart I hat die höchste hydrolytische Beständigkeit. Es ist aus Borosilikatglas gefertigt und kann für jede Formulierung, auch für die Formulierungen, die einen pH-Wert größer als 7 haben, verwendet werden. Glasart II wird aus Kalk-Natron-Silikat-Glas hergestellt und weist ebenso eine sehr hohe hydrolytische Beständigkeit auf. Das Innere von dieser Glassorte wird extra behandelt, um den Austritt der in das Produkt diffundierenden OH^- -Ionen zu verringern. Glasart II ist jedoch nicht geeignet für Formulierungen ab einem pH-Wert von 7. Glasart III und IV sind aus Kalk-Natron-Silikat und weisen eine mittlere bzw. niedrige hydrolytische Beständigkeit auf. Glasart III wird für parenterale Formulierungen genutzt, die kein Wasser enthalten. Glasart IV eignet sich nur für nicht-parenterale Formulierungen.

Glas als Verpackungsmaterial kann darüber hinaus chemisch behandelt werden um gewünschte Eigenschaften zu erzielen. So kann z. B. mit einer Silanisierung (Silizierung) die Hydrophobizität des Glases erhöht werden. Des Weiteren wurde von Freitas et al. gezeigt, dass die Stabilität von Lipidnanopartikeln, die in silanisierten Vials gelagert wurden, höher ist, als die der Partikel, die in nicht-silanisierten Vials gelagert wurden (Freitas et al. 1998). Aufgrund dieser Ergebnisse werden bis heute silanisierte Vials für die Lagerung von kolloidalen Arzneistoffträgersystemen empfohlen. Wegen der hohen Kosten von bereits silanisieren Vials wurden bisher üblicherweise nicht silanisierte und nicht gewaschene Vials gekauft, gereinigt und selbst silanisiert. Die selbst durchgeführte Silanisierung wurde durch Spülen des Vials mit einer handelsüblichen 2%igen Dichlordimethylsilan-Lösung und darauffolgender Trocknung in einem Ofen bei 80°C durchgeführt. Heutzutage kann dieser Silanisierungsprozess im Labor nicht mehr durchgeführt werden, da die 2%ige Dichlordimethylsilan-Lösung in 1,1,1-Trichlorethan, welche für das Silanisierungsverfahren verwendet wurde, aufgrund seiner Umwelt-Toxizität nicht mehr verkauft wird (MerckMillipore 2011). Da vorsilanisierte Vials aus dem Handel in der Regel

teuer sind, ist man grundsätzlich darin interessiert, alternative Verpackungsmaterialien einzusetzen.

1.1.6.2 Kunststoffe

Kunststoff wurde in den letzten Jahrzehnten aufgrund seiner niedrigen Produktionskosten, seiner guten chemischen Beständigkeit, seiner hohen Flexibilität und seinem geringen Gewicht zu einem beliebten, häufig verwendeten Verpackungsmaterial. Beispiele für Verpackungsmaterialien aus Kunststoff sind: HDPE (Polyethylen hoher Dichte, engl. „High Density Polyethylen“), LDPE (Polyethylen niedriger Dichte, engl. „Low Density Polyethylen“), PC (Polycarbonat), PP (Polypropylen). Diese Kunststoffe unterscheiden sich in Eigenschaften wie z. B. Härte, Elastizität und Durchlässigkeit von Wasserdampf und Sauerstoff. Insbesondere ist die Durchlässigkeit ein wichtiger Parameter für die Lagerung, weil er die physikalische und chemische Stabilität der Probe bzw. des Produktes beeinflussen kann. Im Gegensatz zu Glas muss Kunststoff vor seinem Einsatz als Verpackungsmaterial für pharmazeutische Zwecke sorgfältig bezüglich seiner Eigenschaften untersucht werden, da die Eigenschaften des Kunststoffes durch die Zugabe von chemischen Additiven wie Antioxidantien, Stabilisatoren, Weichmacher, Gleitmittel und mechanische Verstärker variieren können (Zitting 1998, Helmroth et al. 2002). Wenn Zusatzstoffe des Verpackungsmaterials mit dem verpackten Produkt interagieren (z. B. durch Migration, Sorption und Gasdurchlässigkeit), können sich die physischen und die chemischen Eigenschaften des Produktes (z. B. Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung, Leitfähigkeit und pH-Wert) unerwartet ändern. Die Stabilität des Produktes kann damit beeinflusst werden. So zeigten Studien von Schwape et al., Song et al. und Lv et al., dass Kunststoff-Verpackungen, die als inert bekannt waren, mit dem Produkt (Schwope et al. 1987, Song et al. 2003, Lv et al. 2009) interagierten. Die Interaktion konnte sowohl während der langen Lagerung als auch unmittelbar nach der Abfüllung auftreten (Hodgson et al. 2000). Daher wird empfohlen, für jedes Paar aus Produkt und Verpackung einen Stabilitätstest durchzuführen (Ph.Eur. 2008).

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Das erste Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Charakterisierung eines Menthol-beladenen NLC für Consumer-Care-Produkte (wie z. B. Zahnpaste, Mundwasser usw.), dessen Lipid-Partikel in einem festen Zustand vorliegen, gegenüber Langzeitlagerung und Zerstäubung physikalisch stabil bleiben und eine verlängerte Freisetzung des Menthols ermöglichen. Hieraus leiteten sich die folgenden Teilziele ab.

Für die **Entwicklung der Formulierung** galt es zunächst geeignete Lipide zu finden, in denen sich Menthol möglichst gut und lang anhaltend lösen lässt. In einem nächsten Schritt war die optimale Zusammensetzung der Lipidmatrix zu bestimmen. Abschließend sollte ein Tensid identifiziert werden, das eine besonders stabile, Menthol-beladene NLC-Dispersion erlaubt.

Die Teilziele der **Herstellung** waren einerseits ihre Reproduzierbarkeit und andererseits die systematische Untersuchung des Einflusses der Lipidphasenkonzentration und der Produktionsparameter (inklusive Herstellungstemperatur, Homogenisationsdruck und Anzahl der Homogenisationszyklen) auf die Parameter Partikelgröße, Partikelladung, Kristallinität und Stabilität. Dabei ist die Reproduzierbarkeit die wichtigste Voraussetzung, um beobachtete Unterschiede fundiert zu erläutern.

Dem Ziel einer **verlängerten Freisetzung** werden Vergleichsstudien zwischen SLN und NLC als Mentholträgersystem durchgeführt.

Da eine erfolgreiche Rezepturoptimierung, Herstellung und Charakterisierung eng mit den verwendeten Methoden verknüpft ist, bestand das zweite Hauptziel der Arbeit darin, ausgewählte Prozesse aus dem ersten Teil der Arbeit am Beispiel der Menthol-beladenen Lipidnanopartikel zu optimieren. Auch wird dadurch eine effektivere Entwicklung ermöglicht und zukünftige Ergebnisse und Beobachtungen könnten aussagekräftiger erläutert werden.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit wurde insbesondere durch Beobachtungen und Erkenntnisse während der praktischen Arbeiten an der Entwicklung, der Charakterisierung und der Lagerung der Menthol-beladenen Lipidnanopartikel motiviert. Die zur Optimierung ausgewählten Prozesse sind in Tabelle 1-1 zu finden.

Tabelle 1-1: Die zur Optimierung ausgewählten Prozesse

Prozesse	Methode	Optimierung durch Bearbeitung folgender Fragestellungen
Lipid-Screening	<ul style="list-style-type: none"> • dynamische Differenzkalorimetrie • Lichtmikroskopie • neu entwickelte „Zäpfchen-Methode“ (Simulation von dem Verhalten eines Teilchen im Dispersionsmedium, Seite 78) 	Was ist eine möglichst zuverlässige und effiziente Lipid-Screening-Methode, um eine Voraussage über die physikalische Stabilität der hergestellten Formulierungen zu treffen?
Tensid-Screening	Kontaktwinkeluntersuchungen mittels Goniometer	Liefern die Vorbereitungsmethoden englische und kontinentale Methode zuverlässige Ergebnisse beim Tensid-Screening? Welche ist zuverlässiger?
Partikelgrößenanalyse	Laser Diffraktometrie	Wie beeinflussen die Parameter <ul style="list-style-type: none"> • Instrumente zur Probenahme, • Rührgeschwindigkeit, • Anwendung von Ultraschall, die Partikelgrößenergebnisse?
Kristallinitätsuntersuchungen	dynamische Differenzkalorimetrie	Wie beeinflusst der Wassergehalt der Probe die Ergebnisse? Kann der Wassergehalt durch Zentrifugation verringert werden, ohne die Kristallinität der Partikel zu beeinflussen? Ist die herkömmlich angewandte Berechnung der Enthalpie, die sich auf die Gesamtprobenmenge bezieht, sinnvoll? Gibt es eine Alternative? Welche Bedeutung hat die α -Modifikation für die physikalische Stabilität der Lipid-Nanopartikel?
Test auf Okklusivität	<i>in vitro</i> Okklusionstest nach de Vringer	Kann der Okklusionstest nach de Vringer auch einfach in einem Ofen durchgeführt werden und dennoch reproduzierbare und brauchbare Ergebnisse liefern?
Lagerung	Verpackungstest	Hat das Verpackungsmaterial einen Einfluss auf die Stabilität der gelagerten Dispersionen?

Dieser Zielstellung folgend ist die vorliegende Arbeit in mehreren Themenabschnitten verfasst. Für eine bessere Verständlichkeit wird auf Materialien und Methoden in den jeweiligen Abschnitten einzeln eingegangen.

2 Entwicklung, Herstellung und Freisetzungsuntersuchungen von Menthol-beladenen NLC

2.1 Einleitung und Zielsetzung des Kapitels

Menthol ist ein zyklischer Terpenalkohol und wird weit verbreitet in der Pharma-, Kosmetik- und Lebensmittelindustrie insbesondere aufgrund seines angenehmen Pfefferminz-Aromas und seiner Kühlwirkung eingesetzt. Dadurch erhöht es die Akzeptanz der Verbraucher. Es wird in vielen Produkten zur oralen oder dermalen Anwendung verwendet (Patel et al. 2007). Die Beladung der NLC mit Menthol kann einige Vorteile gegenüber herkömmlichen Formulierungen (wie Lösungen, Cremes oder Gele) bieten. Aufgrund des Okklusionseffektes der Lipidnanopartikeln kann die Verweildauer des Arzneimittelmoleküls auf der Schleimhaut bzw. der Haut erhöht werden (Wissing et al. 2002a, Teeranachaideekul et al. 2008, Luo et al. 2011). Somit können die relevanten Eigenschaften von Menthol, wie z. B. der Geschmack, verlängert werden. Mit den verlängerten Freisetzungseigenschaften wird eine lang anhaltende Wirkung des Wirkstoffes erzielt (Hommos et al. 2007). Die Beladung der flüchtigen Substanz Menthol in eine Lipidmatrix verhindert auch den Verlust durch Verdampfung. Die Nicht-Verwendung von organischen Lösungsmitteln wie Ethanol, welche in herkömmlichen, mentholhaltigen Produkten oft verwendet werden, um das Menthol aufzulösen, erhöht zusätzlich die Verbraucherakzeptanz. Die Menthol-beladenen NLC können in Endprodukten wie Mundwasser, Zahnpasta, Cremes, Salben, etc. eingearbeitet werden.

Die Löslichkeitseigenschaften des Menthols stellen eine Herausforderung bei der NLC-Herstellung mittels Heißhochdruckhomogenisation dar. Menthol löst sich bei Raumtemperatur in Ölen sehr gut, in Wasser hingegen praktisch nicht. Hingegen steigt seine Löslichkeit im Wasser mit zunehmender Temperatur drastisch (Shotipruk et al. 2001), weshalb der Arzneistoff nicht vollständig im Lipidnanopartikel inkorporiert vorliegt.

Das erste Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Charakterisierung eines Menthol-beladenen NLC für Consumer-Care-Produkte, dessen Partikelgröße im Submikrometerbereich liegt. Die Anforderungen waren, dass die Partikel bei Zimmertemperatur und Körpertemperatur einen festen Zustand aufweisen, gegenüber Langzeitlagerung und Zerstäubung physikalisch stabil bleiben und eine verlängerte Freisetzung des Menthols ermöglichen.

Dazu mussten zunächst die geeigneten Bestandteile der Formulierung ausgewählt und deren Konzentration optimiert werden. Außerdem war der Einfluss von Produktionsparametern wie Herstellungstemperatur, Homogenisationsdruck, Anzahl der Homogenisationszyklen und Konzentration der Lipidphase auf die physiko-chemischen Eigenschaften der Dispersion zu untersuchen, um anschließend die optimalen Produktionsparameter zu bestimmen. Insbesondere auch dafür galt es die Reproduzierbarkeit sicher zu stellen.

2.2 Materialien und Methoden

2.2.1 Materialien

2.2.1.1 Lipide und Wachse

Die in Tabelle 2-1 aufgeführten Lipide und Wachse wurden auf ihr Potenzial für eine Menthol-beladene NLC-Formulierung gescannt. Das angewandte Lipid-Screening wird in Abschnitten 1.1.5.1.1 und 2.2.2.1.1 beschrieben. Dabei erwiesen sich drei Lipide als besonders viel versprechend. Aufgrund ihrer Bedeutung für die vorliegende Arbeit werden sie im Folgenden ausführlicher vorgestellt.

Tabelle 2-1: Für die Formulierungsentwicklung gescannte Lipide und Wachse

	Handelsname	Beschreibung	Hersteller/Lieferant
feste Lipide und Wachse	Apifil	PEG-8 Bienenwachs	Gattefossé GmbH, Deutschland
	Cera flava	gelbes Bienenwachs	Gustav Heess, Deutschland
	Cera carnaubae	Carnaubawachs	Kahl Wax, Deutschland
	Cutina CP	Cetylpalmitat	Cognis GmbH, Deutschland
	Compritol 888 ATO	Glycerylbehenat	Gattefossé GmbH, Deutschland
	Dynasan 116	mikrokristalline Tripalmitin	Sasol GmbH, Deutschland
	Dynasan 118	mikrokristalline Tristearin	Sasol GmbH, Deutschland
	Imwitor 900P	Glycerylstearat	Sasol GmbH, Deutschland
	Softisan 154	hydriertes Palmöl	Sasol GmbH, Deutschland
	Sasolwax 2113	Paraffin, Schmelzpunkt: 62-64 °C	Sasol GmbH, Deutschland
	Sasolwax 5403	Paraffin, Schmelzpunkt: 54-56 °C	Sasol GmbH, Deutschland
	flüssige Lipide	Miglyol 812	mittelkettige Triglyceride
Oleum arachidis		Erdnussöl	Henry Lamotte GmbH, Deutschland
Oleum helianthi		Sonnenblumenöl	Henry Lamotte GmbH, Deutschland
Oleum lini virginale		Leinöl	Caesar & Loretz GmbH, Deutschland
Oleum maydis		Maiskeimöl	Henry Lamotte GmbH, Deutschland

2.2.1.1.1 Dynasan[®] 118

Dynasan 118 (mikrokristalline Tristearin) gehört zur Gruppe der mikrokristallinen Triglyceride. Seine Fettsäuren sind gesättigt, unverzweigt, geradzahlig und haben einen natürlichen und pflanzlichen Ursprung. Das Hauptsäurekomponent dieses Lipids ist Stearinsäure, die durch eine C18-Kette gebildet wird. Laut Herstellerinformationen liegt der Schmelzpunkt von Dynasan 118 bei ca. 70°C. Sein Kristallisationsverhalten dient als ein klassisches Beispiel von monotroper Umwandlungen der α -Modifikation über die metastabile β' -Modifikation in die stabile β -Modifikation. Nach Hagemann beträgt für Dynasan 118 der Schmelzpunkt der α -Modifikation 55°C und der Schmelzpunkt der β -Modifikation 73°C (Dingler 1998).

Laut Literatur ist Dynasan 118 unlöslich in Wasser und Ethanol, aber leicht löslich in Aceton (Dingler 1998, Wissing 2002). Durch Untersuchungen, die im Zusammenhang dieser Arbeit erfolgten, konnte die Löslichkeit in Aceton bei Raumtemperatur jedoch nicht bestätigt werden. Andererseits ist Dynasan 118 gut mischbar mit anderen Fetten und Ölen.

Dynasan 118 wird sowohl in der kosmetischen, als auch in der pharmazeutischen Industrie für viele Formulierungen eingesetzt. Zum Beispiel findet es Verwendung als strukturbildende Komponente in dermalen Produkten (wie Cremes und Lotionen) und als Gleitmittel in Tabletten. Außerdem dient es als Nukleierungsmittel zur Verbesserung des Erstarrungsprozesses in Suppositorien, vaginalen Ovulae und in kosmetischen Sticks.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Dynasan 118 von der Firma Sasol GmbH (Deutschland) bezogen. Es wurde als weißer Puder mit neutralem Geruch und Geschmack geliefert. Laut Herstellerinformation ist Dynasan 118 frei von Zusätzen wie Antioxidantien und weiteren Stabilisatoren.

2.2.1.1.2 Softisan[®] 154

Softisan 154 (hydriertes Palmöl) ist ein Hartfett, das zu den Triglyceriden mit gemischten, gesättigten, unverzweigten, geradzahigen Fettsäuren gehört. Es besteht zu 49% aus Palmitinsäure (C16-Kette), zu 46% aus Stearinsäure (C18-Kette) und aus weiteren gering anteiligen kürzeren und längeren Fettsäuren. Neben den Triglyceriden (ca. 96%) besitzt dieses Lipid auch Diglyceride (ca. 4%). Aufgrund der vorhandenen freien Hydroxylgruppen weist Softisan 154 als Partialglycerid eine erhöhte Emulgierfähigkeit für eingearbeitete Wirkstoffe auf (Müller 1989). Laut Herstellerinformationen liegt der Schmelzpunkt von Softisan 154 bei ca. 55°C. Ähnlich wie Dynasan 118 zeigt Softisan 154 eine Rekristallisation in verschiedenen Modifikationen. Jedoch ist die polymorphe Umwandlung der α -Modifikation in die stabile β -Modifikation aufgrund der inhomogenen Zusammensetzung dieses Lipides gestört (Thoma et al. 1983, Garti et al. 1989). Somit tritt Bulk-Softisan 154 nicht in der stabilen β -Modifikation sondern in der β' -Modifikation auf. In der Literatur sind die Schmelzpunkte der Modifikationen von Softisan 154 mit 48,5°C für die α -Modifikation und 56,1°C für die β' -Modifikation angegeben (Dingler 1998).

Laut Herstellerinformationen ist Softisan 154 unlöslich in Wasser und Ethanol, leicht löslich hingegen in Aceton. Genau wie bei Dynasan 118 konnte in eigens durchgeführten Untersuchungen auch hier bei Raumtemperatur keine Löslichkeit in Aceton beobachtet werden. Mit anderen Fetten und Ölen ist Softisan 154 gut mischbar.

Softisan 154 wird wegen seiner guten Eigenschaften – wie seiner Härte, Stabilität gegenüber Oxidation, Geruchsneutralität, hautschützenden und hautpflegenden

Merkmale – in vielen kosmetischen und pharmazeutischen Produkten eingesetzt. Insbesondere findet es Verwendung als spreitungs- und penetrationsfördernder Zusatz in Salben, Cremes und Emulsionen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Softisan 154 von der Firma Sasol GmbH (Deutschland) in Form von weißen bis leicht gelblichen Flocken bezogen. Genau wie Dynasan 118 ist es laut Herstellerinformation frei von Zusätzen wie Antioxidantien und weiteren Stabilisatoren.

2.2.1.1.3 Miglyol® 812

Miglyol 812 (mittelkettige Triglyceride), auch bekannt als Neutralöl, ist ein flüssiges, halbsynthetisches Triglycerid. Es handelt sich um ein Triglyceridgemisch von Fettsäuren mittlerer Kettenlänge. Seine Hauptfettsäurekomponenten sind Capryl- und Caprinsäure, wobei der Caprylsäureanteil höher ist.

Es ist löslich bei 20°C in Hexan, Toluol, Diethylether, Ethylacetat, Aceton, Isopropanol und im Ethanol-Wasser Gemisch (96%). Außerdem ist es in beliebiger Konzentration mit natürlichen Ölen mischbar (Sasol 2014).

Miglyol 812 wird wegen seiner guten Eigenschaften wie biologischer Abbaubarkeit, Stabilität gegenüber Oxidation, geringer Viskosität, hervorragender Löseeigenschaften und hoher Mischbarkeit mit Fetten in vielen pharmazeutischen und kosmetischen Produkten eingesetzt – z. B. als spreitungs- und penetrationsfördernder Zusatz in Salben, Cremes, Emulsionen und Suspensionen oder als Kristallisationshemmer in Suppositorien auf Hartfettbasis (Sasol 2014). Des Weiteren wird Miglyol 812 in parenteralen Emulsionen als lipophiler Bestandteil verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Miglyol 812 von der Firma Caesar & Loretz GmbH (Deutschland) bezogen. Es wurde niedrigviskos, fast farblos (bis leicht gelblich), geruchlos und ohne charakteristischen Geschmack geliefert. Laut Herstellerinformation ist dieses Öl frei von Zusätzen wie Antioxidantien, Lösemittelresten und Katalysatoren.

2.2.1.2 Emulgatoren

2.2.1.2.1 TEGO® Care 450

TEGO Care 450 (Polyglyceryl-3 Methylglucosidstearat) ist ein PEG-freier, nichtionischer O/W-Emulgator mit einem HLB-Wert von 11,5. Sein Schmelzpunkt

liegt bei 55°C. Bei Raumtemperatur ist TEGO Care 450 in Wasser unlöslich und wird mit steigender Temperatur in Wasser emulgierbar (z. B. bei 60°C ca. 100 g/l) (Pardeike 2009). Seine Stabilität ist im pH-Bereich von 4,5 bis 8,5 und über einen großen Temperaturbereich gegeben (Fiedler 2002). Es eignet sich zur Herstellung von O/W-Cremes und Lotionen.

In dieser Arbeit wurde TEGO Care 450 von der Firma Goldschmidt (Deutschland) bezogen. Es liegt in Form von festen Pellets in einer Elfenbein-Bernsteinfarbe vor.

2.2.1.2.2 PLANTACARE® 2000 UP

PLANTACARE 2000 UP (Decylglucosid) ist ein nicht-ionischer O/W Emulgator mit einem HLB-Wert von ca. 15. Es ist eine wässrige Lösung eines mit Fettalkoholen der Kettenlänge C8-C16 veretherten Polyglykosids und enthält 33% bis 40% C8-, 21% bis 28% C10-, 27% bis 32% C12- und 9% bis 12% C14-Fettalkohole. Fettalkohole mit C6- und C16-Kette dürfen maximal zu 1% in PLANTACARE 2000 UP auftreten. Die Fettalkoholkomponenten wurden aus Kokos- und Palmkernöl gewonnen. Der Glucose-Teil des Moleküls basiert auch auf natürlichen Stoffen wie Mais- und Kartoffelstärke. PLANTACARE 2000 UP besitzt einen sehr hohen pH-Wert (ca. 12) und benötigt daher keine Konservierungsstoffe (DrugBase 2014b).

Es wird wegen seiner ausgezeichneten Schaumbildung und guten Hautverträglichkeit in kosmetischen Produkten sowohl als Emulgator (Haupt und Co-Emulgator) als auch als aktiver Bestandteil (z. B. bei Gesichtereinigungsprodukten) verwendet.

Das in dieser Arbeit verwendete PLANTACARE 2000 UP wurde von der Firma Cognis (Deutschland) als trübe und viskose Flüssigkeit bezogen.

2.2.1.2.3 Inutec® SP1

Inutec SP1 (Inulin Lauryl Carbamat) ist ein kalt-verarbeitbarer, nicht-ionischer O/W-Emulgator mit einem HLB-Wert von 8 (Naturochim 2014). Es ist 100% natürlich und hat einen Schmelzpunkt bei 170°C (Booten et al. 2004). Es löst sich nicht in Wasser, ist aber in Wasser und in hydrophoben Medien wie Ölen leicht dispergierbar. Eine besondere Eigenschaft von Inutec SP1 ist seine hohe Elektrolyt-Toleranz, also seine hohe Stabilität in Dispersionsmedien mit einem hohen Elektrolytgehalt. Es kann als Emulsionsstabilisator für O/W-Emulsionen und als Dispergiermittel für hydrophobe Partikel eingesetzt werden (DrugBase 2014a).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Inutec SP1 von der Firma Orafti Bio Based Chemicals (Belgien) als weißes, kristallines Pulver erworben.

2.2.1.2.4 Tween[®] 80

Tween 80 (Polysorbat 80, Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonooleat) ist ein nicht-ionischer, sterischer O/W-Emulgator und Lösungsvermittler aus der Gruppe der ethoxylierten Sorbitanfettsäureester mit einem HLB-Wert von 15 (DrugBase 2014d). Tween 80 ist löslich in Wasser und in den meisten organischen Lösemitteln. Wegen seiner geringen Toxizität wird es in zahlreichen Produkten der Pharma-, Kosmetik- aber auch der Lebensmittelindustrie verwendet. Außerdem ist es einer der Emulgatoren, welche für parenterale und pulmonale Administration zugelassen sind (Fiedler 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Tween 80 von der Firma Uniqema (Belgien) als eine leicht gelbliche, klare, ölige Flüssigkeit mit einem charakteristischen Geruch erworben.

2.2.1.2.5 Pluronic[®] F68

Pluronic F68, welches auch als Poloxamer 118 bekannt ist, ist ein sterischer Stabilisator mit einem HLB-Wert von 29 (DrugBase 2014c). Es besteht aus einem Block-Copolymer von Polyoxyethylen-Polyoxypropylen. Während der Polyoxyethylen-Anteil des Moleküls hydrophil ist, ist der Polyoxypropylen-Anteil des Moleküls lipophil. Sein Schmelzpunkt liegt im Bereich zwischen 52°C und 57°C. Es ist sehr leicht in Wasser und anderen Lösemitteln wie Ethanol löslich. Es wird hauptsächlich als Emulgier- oder Solubilisierungsmittel in oralen, parenteralen und topischen Formulierungen verwendet. Außerdem kommt es als Hilfsstoff in intravenösen Injektionen, Inhalationen und ophthalmologischen und topischen Formulierungen zum Einsatz.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Pluronic F68 von der Firma BASF AG (Deutschland) als weißes Granulat erworben.

2.2.1.2.6 Cetylpyridiniumchlorid (CPC)

Cetylpyridiniumchlorid (Hexadecylpyridiniumchlorid) ist ein kationisches O/W-Tensid, welches im Rahmen dieser Arbeit nur in Formulierungen für die *in vitro* Freisetzungsuntersuchungen (Abschnitt 2.2.2.7.1) benutzt wurde. Sein Schmelzpunkt liegt bei 79°C (Monohydrat). Es ist leicht löslich in Wasser, hingegen unlöslich in Aceton

und Ethanol. CPC wird als grenzflächenaktives Konservierungsmittel (0,001% - 0,01%) und als Desinfiziens (0,01% - 0,1%) häufig in Mundspülungen, Zahnpasten, Hals-, Atem- und Nasensprays verwendet.

Cetylpyridiniumchlorid-Monohydrat wurde von der Firma Sigma-Aldrich (Deutschland) als Granulat mit einem charakteristischen, pyridinähnlichen Geruch erworben.

2.2.1.3 Menthol

Die chemische Struktur von Menthol, seine Herkunft, seine Eigenschaften, seine Wirkung und Anwendung, sein Wirkmechanismus sowie unerwünschte Wirkungen und Kontraindikationen von Menthol sind in Abschnitt **Error! Reference source not found.** zu finden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Menthol (Levomentholum) von der Firma Caesar & Loretz GmbH (Deutschland) als farbloser Kristall mit minzig-frischem Geruch erworben.

2.2.1.4 Sonstige Rohstoffe und Reagenzien

Sonstige Rohstoffe und Reagenzien, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, entsprechen den Herstellerspezifikationen oder offiziellen Monografien. Für alle Produktionen wurde das Wasser benutzt, welches durch Umkehrosmose und anschließende Aufreinigung in einer MilliQ-plus-Anlage (Millipore GmbH, Deutschland) hergestellt wurde und der Arzneibuchmonographie „Aqua purificata“ entspricht. Physiologische NaCl-Lösung, die für die Zetapotentialmessungen verwendet wurde, wurde von der B. Braun Melsungen AG (Deutschland) bezogen. Im Rahmen der gaschromatographische Analytik wurde Cyclohexan puriss 99,5% (Riedel-de Haen, Deutschland) als Lösungsmittel verwendet. 1-Octanol (Riedel-de Haen, Deutschland), 1-Decanol (Fluka, Deutschland) und 1-Undecanol (Fluka, Deutschland) wurden als interne Standards eingesetzt. Sie waren hochrein und für die Gaschromatographie ohne Reinigungsschritt geeignet.

2.2.2 Methoden

2.2.2.1 Screening-Verfahren für die Rezepturoptimierung

2.2.2.1.1 Lipid-Screening

Im ersten Schritt der Rezepturoptimierung wurden feste und flüssige Lipide auf ihre Fähigkeit Menthol aufzulösen gescreent. Dafür wurden unterschiedliche Mengen von Menthol (10%, 30% und 50% – m/m) entweder in dem erhitzten Öl (50°C) oder dem geschmolzenen Lipid gelöst und anschließend auf Raumtemperatur heruntergekühlt. Ihre Fähigkeit, das Menthol aufzulösen, wurde durch eine makroskopische Analyse der noch enthaltenen Menthol Kristalle beurteilt. Darüber hinaus wurden die Menthol-Lipid-Mischungen nach einer Woche Lagerung bei Raumtemperatur erneut untersucht.

2.2.2.1.2 Zusammensetzung der Lipidmatrix

Um die maximale Beladung von flüssigem Lipid in festem Lipid zu identifizieren, wurden festes und flüssiges Lipid in 1:1, 5:4, 11:7, 2:1 Verhältnissen gemischt und bis über den Schmelzpunkt des festen Lipides hinaus erhitzt. Um eine homogene Verteilung zu gewährleisten, wurden die Mischungen mittels eines Schüttelinkubators (100 UpM, 1 Stunde) hergestellt und dann auf Raumtemperatur heruntergekühlt. Nach der Kühlung wurde ein Lipid-Screening nach der Filterpapier-Methode durchgeführt. Bei der Filterpapiermethode wird ein Stück der verfestigten physikalischen Mischung auf einem Filterpapier angebracht, um die Güte der Beladung festzustellen. Ein sich auf dem Filterpapier um das feste Lipid herum ausbreitender Öl-Fleck ist dabei Indikator für eine schlechte Verkapselung des flüssigen Lipides. Ein solcher Öl-Fleck entsteht durch Austreten des flüssigen Lipides aus der festen Lipidmatrix. Bei einer entsprechend guten Kapselung wird ein solcher Öl-Fleck nicht beobachtet (Hommos 2009).

2.2.2.1.3 Herstellung der physikalischen Mischungen

Nach Ermittlung der am besten geeigneten Lipide und deren maximalen Beladungskapazität mit flüssigem Lipid bzw. Menthol wurden die physikalischen Mischungen aus allen Komponenten der NLC-Matrix hergestellt. Dafür wurden die Lipid-Mischungen wie oben beschrieben (Abschnitt 2.2.2.1.1) hergestellt, zusammen mit Menthol gemischt und anschließend heruntergekühlt. Die verfestigten Mischungen wurden hinsichtlich ihrer Schmelztemperatur und Kristallinität mittels Dynamischer

Differenzkalorimetrie analysiert. Aus den Ergebnissen wurden die für eine Menthol-beladene NLC-Formulierung am besten geeigneten Lipidmatrices für weitere Experimente ermittelt.

2.2.2.1.4 Tensid-Screening mittels Kontaktwinkelmessungen

Ein kostengünstiges und zeitsparendes Vorgehen zur Bestimmung eines geeigneten Tensids für eine physikalisch stabile NLC-Dispersion ist die Kontaktwinkelmessung mittels eines Goniometers (Pardeike 2009, Al Shaal 2011).

Bei den herkömmlichen Kontaktwinkelmessungen (englische Methode) wird das Tensid in Wasser gelöst (Testflüssigkeit) und auf die Lipidphase der Lipidnanopartikel (Testoberfläche) getropft. Anschließend wird der Kontaktwinkel zwischen Lösungströpfchen und Lipidoberfläche gemessen. Jedoch wird in Kapitel 3.2 dieser Arbeit mit einer Studie belegt, dass diese Methode nicht für Tenside anwendbar ist, welche eine schlechte Löslichkeit in Wasser (z. B. TEGO Care 450) aufweisen. Daher wurde für diesen Abschnitt der Arbeit die vorgeschlagene, modifizierte Methode – die kontinentale Methode – verwendet. Anstatt die Tenside in der Wasserphase zu lösen, werden sie hierbei in der Lipidphase gelöst oder dispergiert. Die goniometrischen Kontaktwinkel wurden mittels eines Contact Angle Meter G1 (Krüss, Deutschland) gemessen. Insgesamt wurden fünf nicht-ionische Tenside (Inutec SP1, PLANTACARE 2000 UP, Pluronic F68, TEGO Care 450 und Tween 80) hin auf ihre Eignung als Stabilisator für eine Menthol-beladene NLC-Dispersion untersucht.

2.2.2.2 Herstellung der Lipidnanopartikel mittels Hochdruckhomogenisation

In dieser Arbeit wurde zur Herstellung der Lipidnanopartikel-Dispersionen das Verfahren der Heißhochdruckhomogenisation angewandt. Für die Homogenisation kam ein Kolben-Spalt-Homogenisator (Micron LAB 40, APV Deutschland GmbH, Deutschland) zum Einsatz, der diskontinuierlich betrieben wurde. Durch seine Wasserbadmantel-Konstruktion ist die Produktionstemperatur kontrollierbar und Temperaturschwankungen bei der Homogenisation werden gering gehalten. Die Chargengröße betrug in der Regel 40 ml.

Wenn im Folgenden nicht anders erwähnt, dann wurde für die Herstellung der NLC-Dispersionen folgendes Protokoll eingehalten:

Gemäß dem kontinentalen Emulgierverfahren wurde der Emulgator in die Lipidphase gelöst, welche feste und flüssige Lipide enthält. Die nun den Emulgator enthaltene

Lipidphase und die Wasserphase wurden separat auf die gewünschte Temperatur erhitzt. Kurz vor der Zugabe der erwärmten Wasserphase in die Lipidphase wurde das Menthol mit der Lipidphase vermengt. Die Präemulsion wurde mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 (Jahnke und Kunkel, Deutschland) hergestellt (1 Min. mit 11000 UpM) und anschließend bei variierender Temperatur, variierendem Druck bzw. variierender Anzahl der Zyklen (je nach Anwendung) homogenisiert. Die genauen Produktionsparameter werden in den entsprechenden Abschnitten der Arbeit genannt. Die hergestellte heiße Nanoemulsion wurde in transparente, nicht gefärbte, silanisierte Vials der Glasart II abgefüllt und kühlte in einem Wasserbad bei 20°C zur Lipidnanopartikel-Dispersion ab. Die resultierenden Lipidnanopartikel wurden hinsichtlich ihrer Partikelgröße, Oberflächenladung, physikalischen Stabilität und kristallinen Zustände eine Stunde nach der Produktion (d0) und an den Tagen 1, 7, 14, 28, 90, 180, 360 und 720 nach der Produktion analysiert. Sie wurden bei Raumtemperatur gelagert. Die Optimierung der Menthol-beladenen Lipidnanopartikel-Dispersionen wurde unter Berücksichtigung der folgenden Parameter durchgeführt.

2.2.2.2.1 Reproduzierbarkeit der Herstellungsmethode

Die Reproduzierbarkeit der Herstellungsmethode wurde durch dreimaliges Wiederholen des Vorgangs untersucht. Dabei waren alle Produktionsparameter konstant.

2.2.2.2.2 Einfluss der Herstellungstemperatur

Um den Einfluss der Herstellungstemperatur zu untersuchen, wurden die Formulierungen bei drei verschiedenen Temperaturen produziert:

- knapp oberhalb vom Schmelzpunkt des festen Lipids,
- 5°C über dem Schmelzpunkt des festen Lipids,
- 15°C über dem Schmelzpunkt des festen Lipids.

Die weiteren Produktionsparameter (Homogenisationsdruck und Anzahl der Homogenisationszyklen) wurden konstant gehalten. Die am besten geeignete Produktionstemperatur wurde für alle weiteren Schritte ausgewählt.

2.2.2.2.3 Einfluss des Homogenisationsdruckes

Um den Einfluss des Homogenisationsdruckes zu untersuchen, wurden für jedes feste Lipid drei Dispersionen unter der Verwendung von je drei Homogenisationszyklen

hergestellt. Für jede Dispersionen variierte dabei der Homogenisationsdruck zwischen 300, 500 und 800 bar.

2.2.2.2.4 Einfluss der Anzahl der Homogenisationszyklen

Die Anzahl der Homogenisationszyklen variierte zwischen eins und fünf.

2.2.2.2.5 Einfluss der Konzentration der Lipidphase

Um den Einfluss der Konzentration der Lipidphase zu untersuchen, wurde der Lipidgehalt der Formulierungen zwischen 5% und 30% (m/m) variiert. Die Herstellungen wurden mit den zuvor optimierten Produktionsparametern durchgeführt.

Tabelle 2-2 fasst die untersuchten Produktionsparameter zusammen.

Tabelle 2-2: Untersuchte Produktionsparameter

	festes Lipid	Herstellungstemperatur (°C)	Homogenisationsdruckes (bar)	Anzahl der Homogenisations-zyklen	Konzentration der Lipidphase (%)
1. Reproduzierbarkeit der Herstellungsmethode	Softisan 154	60	500	3	20
	Dynasan 118	Cremschmelzverfahren (CS)			
2. Einfluss der Herstellungstemperatur	Softisan 154	55, 60, 70	500	3	20
	Dynasan 118	CS, 70,75,85			
3. Einfluss des Homogenisationsdruckes	Softisan 154	55	300, 500, 800	3	20
	Dynasan 118	70			
4. Einfluss der Anzahl der Homogenisationszyklen	Softisan 154	55	500	2, 3, 5	20
	Dynasan 118	70	800	1, 2, 3	
5. Einfluss der Konzentration der Lipidphase	Softisan 154	55	500	3	5, 10, 20, 30
	Dynasan 118	70			

2.2.2.3 Partikelgrößenanalytik

Für die Partikelgrößenanalyse der Lipidnanopartikel-Dispersionen wurde im Rahmen dieser Arbeit die statische Lichtstreuung (Laserdiffraktometrie) mit der dynamischen Lichtstreuung (Photonenkorrelationsspektroskopie) kombiniert. Darüber hinaus wurden lichtmikroskopische Untersuchungen herangezogen, um mögliche Partikel oder Aggregate im Mikrometerbereich zu detektieren.

2.2.2.3.1 Laserdiffraktometrie (LD)

Das Meßprinzip, sowie Vorteile und mögliche Fehlerquellen der Laserdiffraktometrie wurden bereits in Abschnitt 1.1.5.3 erläutert.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte Laserdiffraktometrie mit einem Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, UK), der mit einem Dispergiergerät (Hydro S) ausgestattet ist. Um auch kleine Partikel im Submikrometerbereich detektieren zu können, benutzt dieses Gerät eine zusätzliche Technik, das so genannte Blaulicht-Detektionssystem.

Wenn nicht anders erwähnt, so wurden die LD-Messungen in gereinigtem Wasser mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 2975 UpM und ohne Ultraschallbehandlung (vor oder während der Messung) durchgeführt. Außerdem diente standardmäßig eine Eppendorf-Pipette bei der Probenahme. Die Berechnung der Partikelgrößenverteilung aus den Rohdaten erfolgte unter Anwendung der Mie-Theorie mit den optischen Parametern 1,456 als realen Brechungsindex und 0,001 als imaginären Index. Die berechnete Verteilung ist eine Volumenverteilung und lässt den prozentualen Anteil bestimmter Partikelgrößen am Gesamtvolumen erkennen. Zur Charakterisierung der Verteilung wurden standardmäßig die Durchmesser $d(v)_{0,50}$ und $d(v)_{0,95}$ oder $d(v)_{0,99}$ herangezogen. Jeder dieser Werte ist ein Mittelwert aus vier Messungen.

2.2.2.3.2 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Ein weiteres Standardverfahren zur Analyse der Partikelgröße im Submikronbereich ist die Photonenkorrelationsspektroskopie, welche ein dynamisches Laserstreulichtverfahren darstellt, bei dem man neben dem mittleren Teilchendurchmesser (z-average) der kolloidalen Teilchen auch die Breite der Partikelgrößenverteilung (den Polydispersitätsindex, PI) erhält (Müller et al. 1996). Ein Vorteil gegenüber der Laserdiffraktometrie ist das deutlich niedrigere Messvolumen (ca. 1 ml statt 100 ml - 150 ml) dieser Technik und somit die deutlich geringere Menge an Probenmaterial, die benötigt wird. Ein weiterer Vorteil ist, dass das Verfahren nicht vom Brechungsindex abhängig ist, welcher nicht immer vorliegt oder schwer zu ermitteln ist. Wie bei der Laserdiffraktometrie kann als Vorteil die schnelle und einfache Durchführung der Messungen gesehen werden. Ein Nachteil dieser Technik ist der relativ enge Messbereich von 0,6 nm bis 6 μm (Malvern 2004).

Bei einer PCS-Messung wird die Streuung von Laserlicht an dispergierten Partikeln genutzt. Diese bewegen sich im Dispersionsmedium aufgrund der Brownschen

Molekularbewegung der Dispersionsmittelmoleküle. Die Geschwindigkeit der dispergierten Partikel hängt dabei von ihrer Partikelgröße ab – je kleiner die Partikelgröße, desto größer ihre Beschleunigung durch die Dispersionsmittelmoleküle – desto größer ihr Diffusionskoeffizient. PCS bestimmt den Diffusionskoeffizienten, um dann aus der Stokes-Einstein-Gleichung den mittleren hydrodynamischen Radius der Partikel als einzige Unbekannte zu berechnen. Zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten wird das Messmedium mit Laserlicht bestrahlt, welches wiederum von den Partikeln gestreut wird. Ein Photomultiplier detektiert zu verschiedenen Zeitpunkten die Intensitätsschwankungen des gestreuten Lichtes bei einem bestimmten Winkel. Die Intensitätsänderung zwischen zwei Messungen ist bei schnellen Partikeln im Schnitt höher, da sich die Ortskoordinaten der schnelleren Partikel stärker verändern und somit die Wahrscheinlichkeit für ein verändertes Interferenzmuster des gestreuten Lichtes höher ist. PCS berechnet nun eine Korrelationsfunktion der Intensitätsänderungen. Diese kann als abfallende e -Funktion dargestellt werden, deren negativer Exponent als Unbekannte nur den Diffusionskoeffizienten enthält.

Zu beachten ist, dass die Stokes-Einstein-Gleichung neben dem Diffusionskoeffizienten auch noch von der dynamischen Viskosität des Messmediums und der Temperatur abhängig ist. Daher müssen diese Parameter so konstant wie möglich gehalten werden

Außerdem funktioniert PCS nur für Teilchen mit einem Durchmesser von bis zu etwa 3 μm , da größere Partikel sedimentieren und ihre Bewegung nicht mehr durch die Stokes-Einstein-Gleichung beschreibbar ist.

Der dimensionslose PI ist die Breite der Partikelgrößenverteilung, welcher neben dem mittleren Partikeldurchmesser zum Ergebnis einer PCS-Messung gehört und zwischen 0 und 1 liegt. In der Praxis spricht man bei Werten unter 0,06 von Monodispersität. Werte bis 0,15 kennzeichnen eine enge Verteilung. Dispersionen mit einem PI über 0,50 werden als Dispersionen mit einer breiten Verteilung unbestimmter Form bezeichnet (Müller et al. 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit kam ein Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) zum Einsatz. Das Gerät arbeitet mit einem roten Laser der Wellenlänge 633 nm und misst die Rückstreuung mittels eines Detektors, der bei 173° platziert ist. Die Proben

wurden mit gereinigtem Wasser auf die empfohlene Streulichtintensität verdünnt, um Mehrfachstreuungen zu vermeiden. Für jede Probe wurden bei 25°C zehn PCS-Messungen durchgeführt und der Mittelwert dieser Messungen wurde als Ergebnis angegeben.

2.2.2.4 Zetapotential (ZP)

Für ein Teilchen, das sich in einer Dispersion bewegt, ist das Zetapotential durch das elektrische Potential an der Scherebene gegeben. Die Scherebene eines Teilchens grenzt den äußeren Teil der diffusen Schicht ab, der aufgrund der Teilchenbewegung durch Reibung abgetragen wird. Da die wirkende Reibungskraft proportional zur Geschwindigkeit ist (Stokessches Gesetz), ist das Zetapotential insbesondere von der Geschwindigkeit des Teilchens abhängig. Wird das Teilchen in ein elektrisches Feld gebracht, wandert das Teilchen mit zunehmender Geschwindigkeit zur entgegengeladenen Elektrode, da die diffuse Schicht Stück für Stück abgetragen wird und somit die Potentialdifferenz an der Scherebene zunimmt. Ist das elektrische Feld ausreichend stark, so nähert sich die Scherebene bis auf einen dünnen Film der diffusen Schicht der sogenannten Sternschicht an. Das in diesem Zustand gemessene Zetapotential entspricht in etwa dem Nernstpotential, welches die Oberflächenladung beschreibt. Je größer also der Betrag eines derart gemessene Zetopotentials, desto größer ist die elektrostatische Abstoßung zwischen den dispergierten Teilchen und desto stabiler ist die Dispersion (Müller 1996). Generell können Dispersionen mit einem gemessenen ZP-Wert, dessen Betrag größer als 30 mV ist, als stabil bezeichnet werden. Andersherum kann bei geringen ZP-Werten nicht automatisch Instabilität angenommen werden, da auch eine sterische Stabilisierung (Verdickung der diffusen Schicht) vor Aggregation bzw. vor Koaleszenz schützen kann.

Die ZP-Messung der durch ein elektrisches Feld beschleunigten Teilchen erfolgt über die Laser-Doppler-Anemometrie. Dafür wird die Probe mit Laserlicht bestrahlt, das von den wandernden Teilchen gestreut wird. Aufgrund des Doppler-Effektes kommt es zu einer geschwindigkeitsabhängigen Frequenzverschiebung der Wellenlänge des gestreuten Lichtes. Die Teilchengeschwindigkeit wird nun indirekt durch das Messen der Frequenz bestimmt und ergibt zusammen mit der angelegten Feldstärke die elektrophoretische Mobilität. Diese wird nach Helmholtz-Smoluchowski in das Zetapotential umgerechnet.

Die ZP-Messungen wurden bei einer Feldstärke von 20 V/cm an einem Nano ZS Zetasizer (Malvern Instruments, UK) durchgeführt. Da das Zetapotential erheblich durch Schwankungen der Leitfähigkeit und Schwankungen des pH-Wertes im eingesetzten Messmedium beeinflusst wird, erfolgten die Standardmessungen durch Verdünnung der Probe mit bidestilliertem Wasser, welches mit einer 0,9%igen (m/V) Natriumchlorid-Lösung auf eine konstante Leitfähigkeit (50 μ S/cm) eingestellt wurde. Der pH-Wert des sogenannten Leitfähigkeitswassers lag zwischen 5,51 und 5,65. Wenn nicht anders erwähnt, wurden neben den Standardmessungen zusätzliche Messungen mit einer wässrigen Lösung von Tensid (anstatt des Leitfähigkeitswassers) durchgeführt. Somit konnten Aussagen über die Dicke der diffusen Schicht und daher auch über die sterische Stabilität gewonnen werden. Für jede Probe wurden bei 25°C drei ZP-Messungen durchgeführt und der Durchschnitt dieser Messungen wurde als Ergebnis angegeben.

2.2.2.5 Lichtmikroskopie

Um in Menthol-beladenen NLC-Dispersionen freie Mentholkristalle oder auch Partikel und Aggregate im Mikrometerbereich zu detektieren, wurden lichtmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Verwendet wurde ein Leitz Orthoplan Mikroskop (Leitz, Deutschland), das bis zu 1000-fach vergrößert. Als Kamera diente eine CMEX3200 Digitalkamera (Euromex Mikroskope, Niederlande). Standardmäßig wurden die Proben (n=3) bei einer 160-fachen Vergrößerung mit und ohne polarisiertem Licht untersucht. Bei polarisiertem Licht leuchten die Mentholkristalle aufgrund ihres anisotropischen Verhaltens, so dass sie auch im Submikrometerbereich leicht erkennbar sind. Für detailliertere Untersuchungen wurde die 1000-fache Vergrößerung gewählt. Die Proben wurden in ihrem ursprünglichen Zustand, also unverdünnt, mikroskopiert.

2.2.2.6 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Typische Anwendungen der dynamischen Differenzkalorimetrie wurden bereits in Abschnitt 1.1.5.4 vorgestellt. Die in dieser Arbeit erfolgten DSC-Messungen wurden mit einem dynamischen Differenz-Wärmestrom-Kalorimeter (Mettler Toledo DSC 821e, Mettler-Toledo GmbH, Deutschland) durchgeführt. Der Messsensor der DSC 821 besteht aus zwei Messstellen für Probe und Referenz, die jeweils mit Thermoelementen bestückt und elektrisch miteinander verbunden sind. Dabei

befinden sich Probe- und Referenztiegel im gleichen Ofen. Wird der Ofen erhitzt, so fließt die Wärme durch die Probe und durch die Referenz in den Messsensor und wird dort mittels der Thermoelemente abgenommen. Sind Probe und Referenz gleich, so fließen gleich große Wärmeströme durch den Sensor, die Wärmestromdifferenz ist damit null. Entsteht eine Temperaturdifferenz zwischen Probe und Referenz aufgrund von endo- bzw. exothermen Vorgängen in der Probe, so resultiert dies in einer Thermospannung. Diese Thermospannung, welche direkt proportional zu der Temperaturdifferenz zwischen den beiden Tiegeln ist, ist die eigentliche Messgröße von DSC. Der gemessene, der Temperaturdifferenz entsprechende Wärmestrom wird dann aus dem Quotienten der Temperaturdifferenz zwischen Proben- und Referenztiegel und dem bekannten thermischen Widerstand des Systems zurückgerechnet. Die Kalibrierung des DSC-Gerätes wurde anhand der Schmelzenthalpie von Indium durchgeführt.

Die DSC-Proben wurden in 40 µl Aluminiumniederdrucktiegel so abgewogen, dass sie 1 - 2 mg kristalline Substanz aufwiesen. Anschließend wurden die Tiegel kaltverschweißt und blieben im Deckel ungelocht, um Wasserverdunstung zu vermeiden. Die Messung erfolgte gegen einen leeren Referenztiegel. Standardgemäß wurden die Proben mit einer Heizrate von 10 K/Min. ausgehend von 25°C auf 85°C erwärmt. Während der Messungen wurde der Ofen mit Stickstoffgas unter einer Fließgeschwindigkeit von 80 ml/Min. umspült. Die Kenngrößen (der Schmelzpunkt, die Peakbreiten und die Enthalpie) wurden mit Hilfe der Star Software (Mettler-Toledo GmbH, Deutschland) ermittelt. Anders als üblich und wie in Kapitel 4.2.1 ausführlich begründet, wurde als Maß für die Schmelzenthalpien der Lipidnanopartikel das Verhältnis aus der gemessenen Schmelzenthalpie der Nanodispersion und dem Gewicht der darin enthaltenen Lipidnanopartikel genommen. Nur so erhält man einen Vergleichswert, der unabhängig von der Dispersionskonzentration ist. Die zeitliche Veränderung der Kristallinität wurde in Prozent angegeben.

2.2.2.7 Freisetzungsuntersuchungen

2.2.2.7.1 In vitro Freisetzungsuntersuchungen – das membranfreie Modell

Für die Durchführung der *in vitro* Freisetzungsuntersuchungen von Menthol aus Lipidnanopartikel wurde ein membranfreies Modell verwendet, das bereits von Hommos und Wissing genutzt wurde (Wissing 2002, Hommos 2009). Hierbei findet

eine Diffusion des Wirkstoffs in ein lipophiles Akzeptormedium statt. Dieses Modell ermöglicht einen Vergleich der relativ – nicht absolut – freigesetzten Wirkstoffmenge aus Formulierungen.

Fünf Milliliter wässrige, Menthol-beladene Dispersion wurde in ein Vial gefüllt, das mit 10 ml Miglyol 812 als Akzeptormedium überschichtet wurde. Dabei wurden Sink-Bedingungen sichergestellt, d. h. die Sättigung des Menthols im Akzeptormedium wurde während der gesamten Testzeit nie erreicht. Die vorbereiteten Proben wurden in einem temperierbaren Schüttelinkubator (Innova 423, New Brunswick Scientific, USA) bei konstanter Temperatur von 32°C mit einer Geschwindigkeit von 75 UpM geschüttelt. In definierten Zeitabständen (1, 3, 6, 24 und 48 Stunden) wurden aus dem Akzeptormedium 1-ml-Proben entnommen, die durch frisches Akzeptormedium ersetzt wurden. Die entnommenen Proben wurden mittels Gaschromatographie (Abschnitt 2.2.2.9) analysiert (n = 2).

Tabelle 2-3: Zusammensetzung der untersuchten Dispersionen (Angaben in % (m/m))

	Ladung	Bezeichnung	festes Lipid		Miglyol 812	Menthol	Emulgator		ultra-gereinigtes Wasser		
SLN	positiv	SLN _{Sof} (+)	Softisan 154	7,00%	-	3,00%	CPC	0,25%	89,75%		
		SLN _{Dyn} (+)	Dynasan 118								
	negativ	SLN _{Sof} (-)	Softisan 154						TEGO Care 450	1,80%	88,20%
		SLN _{Dyn} (-)	Dynasan 118								
NLC	positiv	NLC _{Sof} (+)	Softisan 154	2,00%			CPC	0,25%	87,75%		
		NLC _{Dyn} (+)	Dynasan 118								
	negativ	NLC _{Sof} (-)	Softisan 154						TEGO Care 450	1,80%	86,20%
		NLC _{Dyn} (-)	Dynasan 118								

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Freisetzung von Menthol vergleichend für SLN bzw. NLC und für positiv bzw. negativ geladene Partikel untersucht. Außerdem wurde die Freisetzung von Menthol für verschiedene, feste Lipide studiert (Tabelle 2-3).

2.2.2.7.2 *In vivo* Freisetzungsuntersuchungen – Probandenstudie

Für die *in vivo* Freisetzungsuntersuchungen wurde das Menthol-beladene NLC-Konzentrat (bestehend aus * 6,4% Dynasan 118, * 2,0% Miglyol 812, * 1,6% Menthol * 1,8% TEGO Care 450 und * 88,2% ultra-gereinigtes Wasser,

Angaben in % (m/m)) bei 70°C und 500 bar mit drei Zyklen hergestellt. Das Konzentrat wurde für die NLC-haltige Mundspülung mit Wasser so verdünnt (1:15), dass die Konzentration von Menthol 0,1% (m/m) betrug. Als Vergleichsmuster für eine konventionelle Mundspülung wurde 0,1% (m/m) Menthol in einer 4%igen (m/V) Ethanol-Wasser Mischung gelöst. Zwölf Probanden verwendeten beide Proben in einer Blindstudie und notierten ihre Eindrücke über Geschmack, Kühleffekt und Erfrischungseffekt, sowie die Dauer der Effekte. Die einzelnen Eindrücke wurden von den Probanden auf einer Skala von 1 (sehr intensiv) bis 5 (sehr schwach) bewertet. Dabei hatte jeder der Probanden darauf zu achten, dass er die zweite Probe am darauf folgenden Tag unter möglichst gleichen Bedingungen zu sich nahm.

2.2.2.8 Einfluss von Zerstäubung auf die Partikelgröße

In einem nächsten Schritt wurde der Einfluss der Zerstäubung der NLC-Dispersion auf die Partikelgröße untersucht. Dazu wurden das NLC-Konzentrat und verdünnte Proben mittels einer konventionellen Sprühflasche (Abbildung 2.2-1) jeweils in einem Becherglas zerstäubt. Die zerstäubten Dispersionen wurden anschließend bezüglich ihrer Partikelgröße mittels PCS und LD analysiert.



Abbildung 2.2-1: Beispiel einer konventionellen Sprühflasche (CarlRoth 2014)

2.2.2.9 Gaschromatographie

Nach Abschluss der membranfreien Freisetzung wurde die Mentholkonzentration der entnommenen Proben mittels eines Gaschromatographen (GC) bestimmt, der mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) kombiniert war. Die GC-FID-Anlage war mit einem Trace 2000 Gaschromatographen (Thermo Scientific, Deutschland) und mit

einem ThermoQuest CE (Stada Rivalenta, Italien) ausgestattet. Für die Analyse der GC-Daten wurde die Software ThermoQuest CE Instruments Ver 1,04 benutzt. Als Kapillarsäule wurde ein PBX5 (30 m × 0,25 mm ID und 1 µm Filmdicke) verwendet. Die Messbedingungen waren wie folgend angegeben: Der Injektorport war auf eine Temperatur von 250°C eingestellt und Helium wurde als Trägergas verwendet, das eine Durchflussrate von 1,5 ml/Min. aufwies. Die Temperatur des Flammenionisationsdetektors wurde auf 380°C eingestellt. Während der Analyse wurde die Säule bei 50°C für eine Minute gehalten und dann so programmiert, dass die Temperatur sich mit einer Rate von 30°C/Min. auf 350°C erhöhte. Die Gesamtzeit der Analyse betrug 20 Minuten. Die Probeninjektion wurde manuell durchgeführt (Splitverhältnis=1:10). Vor der Analyse wurden die entnommenen Proben der Freisetzungsuntersuchungen in Cyclohexan puriss 99,5% (Riedel-de Haen, Deutschland) gelöst. Als interne Standards wurden die Stoffe 1-Octanol (Riedel-de Haen, Deutschland), 1-Decanol (Fluka, Deutschland) und 1-Undecanol (Fluka, Deutschland) verwendet.

2.2.2.10 Leitfähigkeit und pH-Wert

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Leitfähigkeitswerte mit einem inoLab Cond Level 1 (WTW GmbH, Deutschland) und die pH-Werte mit einem DocuMeter pH mit Glaselektrode (Sartorius AG, Deutschland) bestimmt.

2.2.2.11 Viskosität und Dichte

Die Viskosität der inneren Phase, welche ein Maß für die innere Reibung darstellt, korreliert mit der Teilchengröße und Größenverteilung von via Hochdruck-homogenisation hergestellten Lipidnanopartikeln (Jahnke 2001). Je niedriger die Viskosität der inneren Phase ist, desto kleiner und homogener sind die Teilchen. Um die Viskosität als mögliche Ursache für Unterschiede in der Partikelgröße auszuschließen, wurden die dynamischen Viskositäten der festen Lipide bei den Produktionstemperaturen der Dispersionen bestimmt (Abschnitt 2.3.1.2.2). Zur Berechnung der Viskosität wurde die erforderliche kinematische Viskosität mittels eines KPG-Ubbelohde Viskosimeters (Schott-Geräte GmbH, Deutschland) und die erforderliche Dichte mittels eines Densitometers (Anton Paar DMA 5000, Österreich) bestimmt (jeweils n=3).

2.3 Ergebnisse und Diskussion

2.3.1 Entwicklung und Herstellung der Menthol-beladenen NLC

2.3.1.1 Rezepturoptimierung

2.3.1.1.1 Lipid-Screening

Das Lipid-Screening ist eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung von NLC mit hoher Wirkstoffladung. Ziel des Verfahrens ist es solche Lipide zu identifizieren, die den Zielwirkstoff in möglichst hoher Konzentration lösen.

Tabelle 2-4: Feste und flüssige Lipide, die in dieser Arbeit untersucht wurden und ihre Fähigkeit, Menthol aufzulösen

	Lipid	Mischverhältnis (Menthol : Lipid) Fähigkeit Menthol aufzulösen		
		10:90	30:70	50:50
feste Lipide und Wachse	Apifil	+	+	+
	Cera flava	+	+	+
	Cera carnaubae	+	+	+
	Cutina CP	++	+	+
	Compritol 888 ATO	+	+	+
	Dynasan 116	+	+	+
	Dynasan 118	++	+	+
	Imwitor 900P	+	+	+
	Softisan 154	++	+	+
	Sasolwax 2113	+	+	+
	Sasolwax 5403	+	+	+
flüssige Lipide	Miglyol 812	++	++	+
	Oleum arachidis	++	+	+
	Oleum helianthi	++	+	+
	Oleum lini virginale	++	+	+
	Oleum maydis	++	+	+

Für alle in dieser Studie untersuchten festen und flüssigen Lipide war eine Beladung mit Menthol von bis zu 50% (m/m) möglich (Tabelle 2-4). Während der Lagerung wurde jedoch ein Wachstum von Mentholkristallen für die meisten der untersuchten physikalischen Mischungen beobachtet. Die Mentholkristalle traten auf der Oberfläche der physikalischen Mischung und/oder in der physikalischen Mischung auf.

Bei den festen Lipiden konnte nur für die Lipidmischungen mit 10% Menthol und Cetylpalmitat (Cutina CP), Dynasan 118 bzw. Softisan 154 kein Kristallwachstum beobachtet werden. Für die anderen Proben korrelierte der Grad des Kristallwachstums mit dem Mentholgehalt der physikalischen Mischung. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden die drei festen Lipide Cetylpalmitat (Cutina CP), Dynasan 118 und Softisan 154 für die weiteren Experimente dieser Studie ausgewählt.

Bezüglich der Mischungen mit flüssigen Lipiden konnte Miglyol 812 einen Anteil von 30% Menthol komplett auflösen – während der Lagerung traten also keine Mentholkristalle auf. Hingegen konnten andere Öle nur 10% Menthol erfolgreich lösen. Daher wurde Miglyol 812 als das am besten geeignete flüssige Lipid für die zu entwickelnden Rezepturen verwendet.

Für die drei ausgewählten festen Lipide wurde deren Miglyol 812-Beladungskapazität mit der Filterpapiermethode untersucht, die auch in der Arbeit von Hommoss beschrieben wurde (Hommoss 2009). Sie betrug bei allen drei etwa 45%, womit das Verhältnis von festem zu flüssigem Lipid 5:4 entsprach. Ein größerer Anteil des Öls führte zum Auftreten von großen Ölflecken auf dem Filterpapier. Für die Lipide in allen Ziel-Rezepturen wurde daher das Verhältnis von festem zu flüssigem Lipid auf 5:4 festgelegt.

Des Weiteren wurde 10% (m/m) als maximaler Mentholanteil für die Ziel-Rezepturen ausgewählt, da alle beteiligten Lipide mindestens 10% Menthol lösen.

2.3.1.1.2 Herstellung der physikalischen Mischungen

Wie bereits erwähnt rekristallisieren nach einem Schmelzereignis die festen Lipide in verschiedene polymorphe Modifikationen (Kapitel 1.1.1). Die niedrig schmelzende Modifikation (α) besitzt eine hohe thermodynamische Energie und eine höhere Arzneistoffbeladungskapazität als die dicht geordnete, hoch schmelzende Modifikation (β), welche als stabil bekannt ist (Chapman 1962, Westesen et al.

1997a). Um das Schmelzverhalten der reinen, festen Materialien (d. h. Cetylpalmitat, Dynasan 118 und Softisan 154) und deren physikalischen Mischungen (enthält 50% festes Lipid, 40% Miglyol 812 und 10% Menthol, Angaben in % (m/m)) zu untersuchen, wurden sie mittels DSC analysiert. Zur Simulation des heißen Hochdruckhomogenisationsprozesses wurden die reinen, festen Materialien ein zweites Mal aufgeheizt. Die DSC-Thermogramme sind in Abbildung 2.3-1 und Abbildung 2.3-2 zu sehen.

Für die reinen Lipide und auch Menthol wurden niedrig und hoch schmelzende polymorphe Modifikationen nachgewiesen. Für die physikalischen Mischungen wurde kein freier Mentholpeak gefunden, was die vollständige Auflösung des Menthols in der Lipidphase belegt. Die Beladung des Miglyol 812 und des Menthols in die festen Lipide verhinderte die Bildung der thermodynamischen instabilen Lipidmodifikation (α) und führte zur Abnahme der Kristallinität aufgrund einer Störung des Kristallgitters (Jenning et al. 2000c, Uner et al. 2005). Zusätzlich waren die Schmelzpunkte bei den physikalischen Mischungen 2°C geringer als bei den reinen festen Lipiden. Jedoch waren noch alle Mischungen kristallin. Wie schon bekannt ist, kann das Auflösen des Wirkstoffes zu einer Abnahme der Kristallisationstemperaturen der Lipide führen (Müller et al. 2008). Eine weitere Abnahme der Schmelztemperatur tritt typischerweise in Folge von Nanonisierungsprozessen auf (Teeranachaideekul et al. 2008, Kovacevic et al. 2011). Aus diesen Gründen und um eine „Supercooled melt“-Bildung zu vermeiden bzw. um feste Nanopartikel bei Raum- und Körpertemperatur herzustellen, wurde Cetylpalmitat, dessen physikalische Mischung bereits eine sehr niedrige Schmelztemperatur besitzt (ca. 32°C), für die folgenden Untersuchungen nicht mehr betrachtet. In weiteren Schritten der Studie wurden nun feste Lipide mit einem höheren Schmelzpunkt – also Softisan und Dynasan – zur Herstellung der NLC ausgewählt.

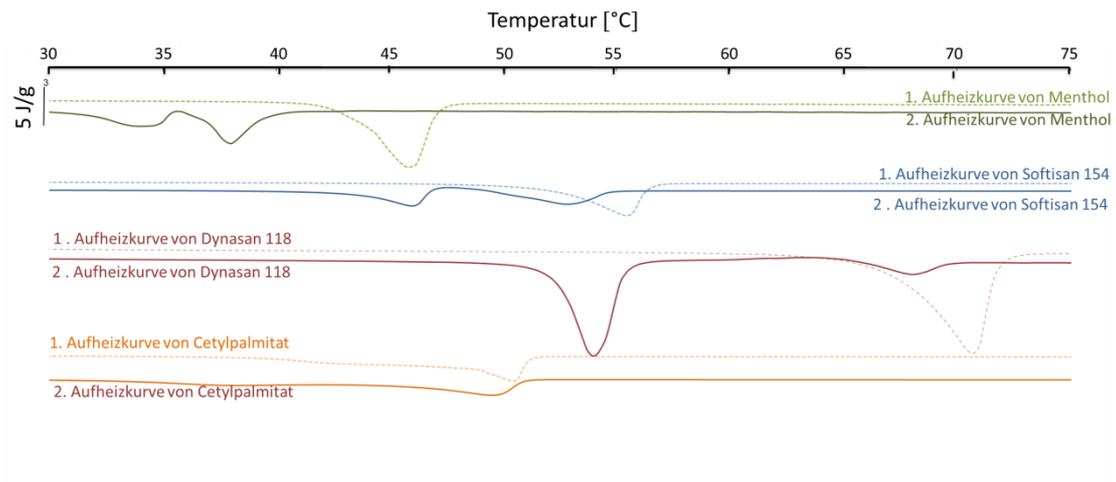


Abbildung 2.3-1: Erste und zweite Aufheizkurve von ausgewählten, reinen Lipiden und reinem Menthol. Heizrate 10 K/Min.

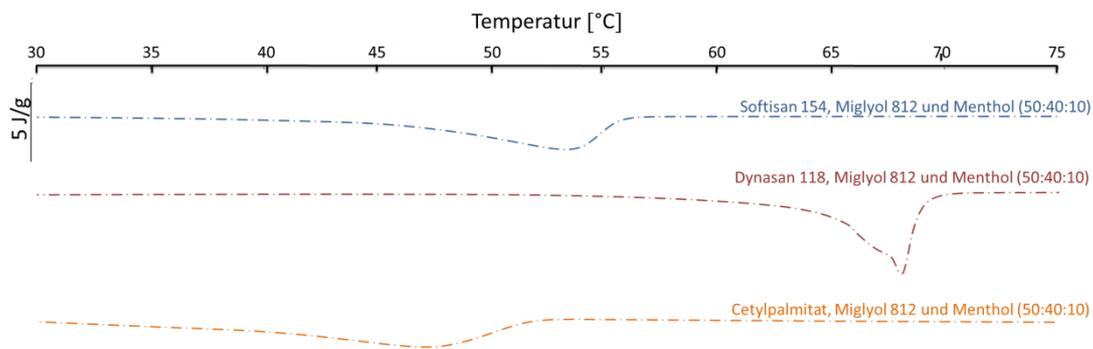


Abbildung 2.3-2: DSC-Thermogramme der physikalischen Mischungen ausgewählter Lipide mit Menthol und Miglyol 812. Aufgenommen nach der Herstellung der Mischung bei 85°C und anschließendem Abkühlen auf 20°C. Heizrate: 10 K/Min.

2.3.1.1.3 Tensid-Screening

Die Ergebnisse vom Tensid-Screening werden in Kapitel 3.2 ausführlich erläutert, da sie Teil einer unabhängigen Studie innerhalb dieser Arbeit sind, welche Tensid-Screening mittels Kontaktwinkel-Untersuchungen optimiert.

Aufgrund seiner Benetzungseigenschaften bezüglich Softisan und Dynasan – bestätigt durch Messen des jeweils kleinen Kontaktwinkels – wurde TEGO Care 450 für die weiteren Experimente als Stabilisator ausgewählt (Ergebnisse aus Kapitel 3.2). Die Konzentration des Stabilisators TEGO Care 450 wurde basierend auf den Ergebnissen vorangegangener Studien auf 1,8% (m/m) festgelegt (Hommos 2009).

Die grundlegende Rezeptur für die folgenden Experimente setzte sich demnach wie folgt zusammen: * 10,0% festes Lipid (entweder Softisan oder Dynasan), * 8,0% Miglyol 812 (flüssiges Lipid), * 2,0% Menthol, * 1,8% TEGO Care 450 und * 78,2% ultra-gereinigtes Wasser (Angaben in % (m/m)). Tabelle 2-5 zeigt alle untersuchten Rezepturen.

Tabelle 2-5: Zusammensetzung der NLC-Dispersionen, die zu weiteren Untersuchungen der Herstellung der Menthol-beladenen NLC-Dispersionen herangezogen wurden. Als festes Lipid wurde für die mit 1 gekennzeichneten Rezepturen Softisan verwendet, für die mit 2 gekennzeichneten Rezepturen wurde Dynasan verwendet.

	Rezeptur A	Rezeptur B	Rezeptur C	Rezeptur D
festes Lipid (Softisan 154 oder Dynasan 118)	10,0%	2,5%	5,0%	15,0%
Miglyol 812	8,0%	2,0%	4,0%	12,0%
Menthol	2,0%	0,5%	1,0%	3,0%
TEGO Care 450	1,8%	1,8%	1,8%	1,8%
ultra-gereinigtes Wasser	78,2%	93,2%	88,2%	68,2%
% Lipidphase	20,0	5,0	10,0	30,0
Mischverhältnis (festes Lipid : flüssiges Lipid : Arzneistoff)	5 : 4 : 1	5 : 4 : 1	5 : 4 : 1	5 : 4 : 1

2.3.1.2 Herstellung der Menthol-beladenen NLC-Dispersionen

2.3.1.2.1 Reproduzierbarkeit der Herstellungsmethode

Eine erfolgreiche Entwicklung der Formulierung ist nur zu erreichen, wenn der Produktionsprozess reproduzierbar ist. Andernfalls ist eine zuverlässige Analyse der Einflüsse auf die Eigenschaften der NLC, z. B. durch die Produktionsbedingungen, nicht möglich. Zunächst wurde die Reproduzierbarkeit der Produktion von Menthol-beladenen NLC untersucht.

Dafür wurden die Rezepturen A1 und A2 (Tabelle 2-5) jeweils in dreifacher Ausführung mittels Heißhochdruckhomogenisation hergestellt. Die Softisan-Dispersionen wurden bei 60°C, also 5°C über dem Schmelzpunkt von Softisan, hergestellt. Mit einer neuen Herstellungsmethode, dem sogenannten Cremeschmelzverfahren (CS-Verfahren), wurden die Dynasan-Dispersionen hergestellt. Für das Cremeschmelzverfahren wurde die Lipidphase bis zu einer Temperatur knapp unterhalb der Schmelztemperatur erhitzt, so dass die Lipidphase trüb blieb. Dieses Verfahren ist für

die Herstellung von Suppositorien mit Kakaobutter bereits bekannt (Hosny et al. 1996, Kutz et al. 2007). Die Grundidee dieser Methode wird in Abschnitt 2.3.1.2.2 ausführlich erläutert.

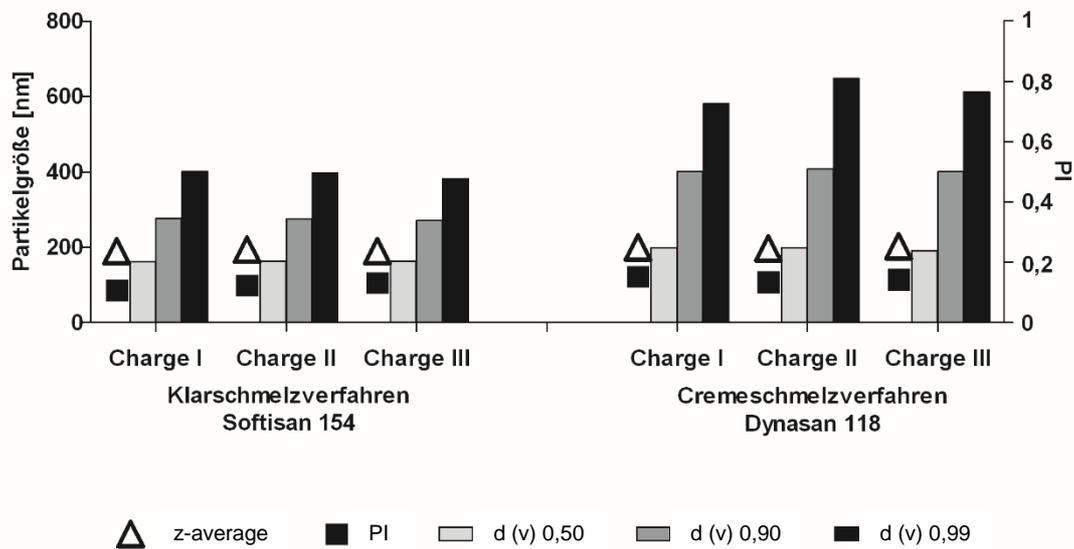


Abbildung 2.3-3: Partikelgröße (PCS und LD) der zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit hergestellten NLC-Dispersionen am Tag der Herstellung

Für beide Rezepturen führten die drei Produktionen zu jeweils vergleichbaren Ergebnissen. Weder für die Softisan-Proben noch für die Dynasan-Proben konnten Unterschiede in der Teilchengröße (Abbildung 2.3-3), dem ZP-Wert (Tabelle 2-6) und in der Kristallinität (Tabelle 2-7) beobachtet werden. Auch die gemessenen Langzeitstabilitäten der Chargen waren gleich. Darüber hinaus blieben bei Raumtemperatur alle hergestellten Dispersionen mindestens ein Jahr lang stabil (Abbildung 2.3-4).

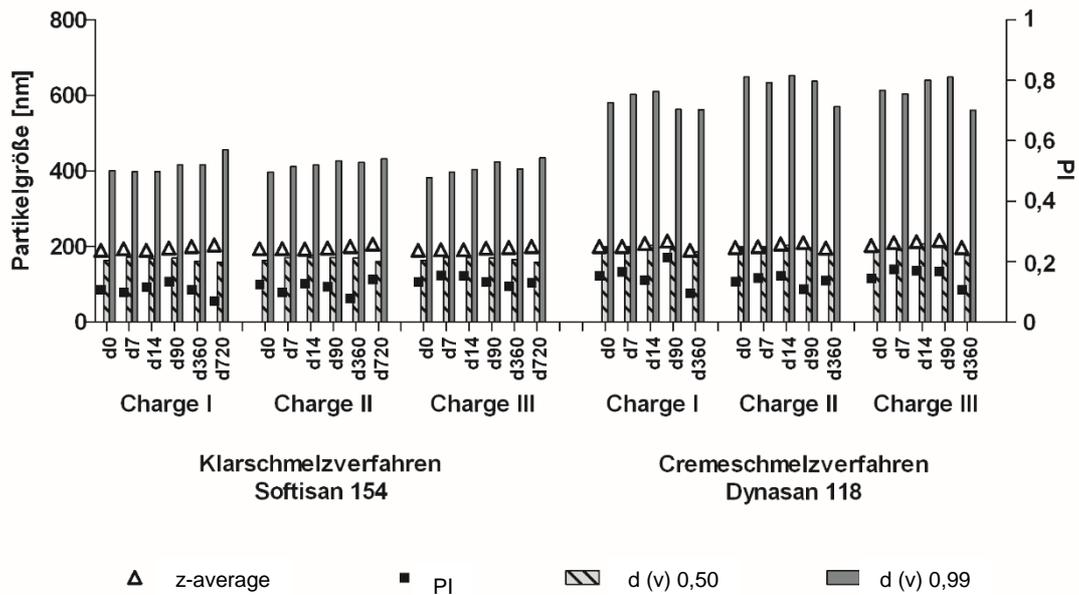


Abbildung 2.3-4: Partikelgröße (PCS und LD) der zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit hergestellten NLC-Dispersionen in Abhängigkeit von der Lagerungszeit

Ein Vergleich zwischen den Softisan- und Dynasan-Dispersionen zeigte keine Unterschiede in der mittleren Teilchengröße und im PI. Jedoch waren die $d(v)_{0,99}$ -Werte der Dispersionen unterschiedlich. Die Softisan-Dispersion besaß mit 393 nm einen kleineren $d(v)_{0,99}$ -Wert als die Dynasan-Dispersion mit 614 nm. Der Grund dafür könnte der Unterschied in der Zusammensetzung der festen Lipide sein (Abschnitt 2.2.1.1). Es könnte aber auch an den unterschiedlichen Produktionstemperaturen liegen. Der Frage danach wird in den Abschnitten 2.3.1.2.2 und 2.3.1.2.3 nachgegangen.

Tabelle 2-6: ZP-Werte der zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit hergestellten NLC-Dispersionen am Tag 1 (Mittelwert \pm SD, n=3)

	festes Lipid	variabler Parameter	ZP in [mV]
Rezeptur A	Softisan 154	Charge I	-49,9 \pm 2,9
		Charge II	-47,1 \pm 1,5
		Charge III	-47,0 \pm 0,9
	Dynasan 118	Charge I	-58,3 \pm 1,4
		Charge II	-56,1 \pm 1,3
		Charge III	-59,1 \pm 0,6

Tabelle 2-7: Übersicht der Partikelgrößen (PCS und LD), Enthalpien sowie Veränderungen in der Kristallinität der zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit hergestellten NLC-Dispersionen

festes Lipid	variabler Parameter	Partikelgrößenwerte (Tag 0)		Partikelgrößenwerte (Tag 360)		Schmelzenthalpien [J/g] (Tag 0)			Schmelzenthalpien [J/g] (Tag 720)			Veränderungen in der Kristallinität [%]
		z-average [nm]	d (v) 0,99 [nm]	z-average [nm]	d (v) 0,99 [nm]	niedrig schmelzende Modifikation	hoch schmelzende Modifikation	Total	niedrig schmelzende Modifikation	hoch schmelzende Modifikation	Total	
Softisan 154	Charge I	190	400	200	416	7,25	14,85	22,10	3,45	54,35	57,80	161,54
	Charge II	190	397	200	464	7,25	14,90	22,15	3,40	56,70	60,10	171,33
	Charge III	194	382	197	405	6,90	15,20	22,10	3,35	56,75	60,10	171,95
Dynasan 118	Charge I	200	581	208	611	3,20	61,40	64,60	5,55*	59,55*	65,10*	0,77
	Charge II	197	613	206	625	3,45	60,60	64,05	5,50*	60,25*	65,75*	2,65
	Charge III	203	648	209	644	3,10	64,50	67,60	5,35*	60,00*	65,35*	3,33

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass die Produktion gut reproduzierbar ist und somit die erste Voraussetzung an eine systematische Entwicklung der Formulierung erfüllt ist. Dies gilt sogar für die neuartige Herstellungsmethode – für das Cremeschmelzverfahren.

2.3.1.2.2 Einfluss der Herstellungstemperatur

Wie bereits erwähnt liegt die Produktionstemperatur für die Herstellung von NLC typischerweise bei etwa 10 - 15°C oberhalb des Schmelzpunktes des am höchsten schmelzenden Lipids, da die Viskosität bei zunehmender Temperatur abnimmt und somit eine Dispersion mit kleineren Partikel erreicht werden kann (Jahnke 2001). In dieser Studie wurde jedoch die Beladung des Wirkstoffes Menthol in Lipidnanopartikel untersucht, der einen genügend hohen Sättigungsdampfdruck besitzt (Bhatia et al. 2008), um bei Raumtemperatur zu verdunsten. Um die Verdampfung des Wirkstoffs zu verhindern, musste die Herstellungstemperatur so gering wie möglich gehalten werden. Deswegen wurde in diesem Teil der Studie der Einfluss der Herstellungstemperatur auf die physiko-chemischen Eigenschaften der Menthol-beladenen NLC untersucht. Dafür wurden die Rezepturen A1 und A2 (Tabelle 2-5) mit drei verschiedenen Temperaturen homogenisiert:

- knapp oberhalb vom Schmelzpunkt des festen Lipids,
- 5°C über dem Schmelzpunkt des festen Lipids,
- 15°C über dem Schmelzpunkt des festen Lipids.

Somit ergaben sich für die Softisan-Dispersionen die Produktionstemperaturen 55°C, 60°C und 70°C. Für die Proben mit Dynasan ergaben sich die Produktionstemperaturen 70°C, 75°C und 85°C. Außerdem wurden die Dynasan-Chargen, die mit dem Cremeschmelzverfahren (CS) produziert wurden, zum Vergleich herangezogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.3-5 dargestellt.

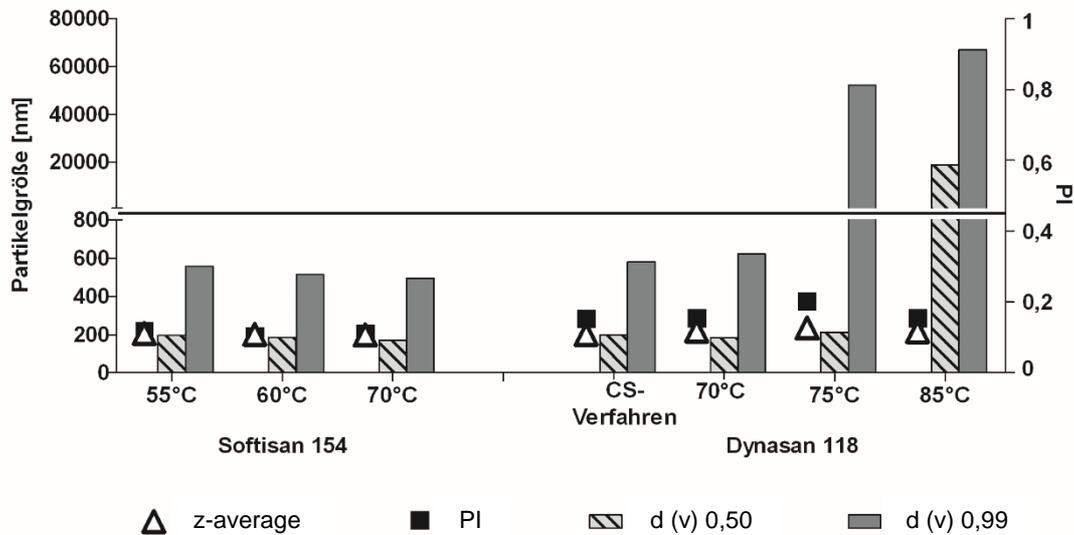


Abbildung 2.3-5: Partikelgröße (PCS und LD) der zur Überprüfung des Einflusses der Produktionstemperatur hergestellten NLC-Dispersionen am Tag der Herstellung

Es wurde erwartet, dass durch eine Erhöhung der Produktionstemperatur die Partikelgröße aufgrund der Abnahme der Viskosität der Lipidphase abnehmen würde. Dieser Effekt war für die Softisan-Dispersionen zu beobachten: Die mittlere Teilchengröße verkleinerte sich von 206 nm auf 198 nm, während die Temperatur von 55°C auf 70°C stieg. Für die Dynasan-Partikel traf dieser Effekt jedoch nicht ein. Hier wurde sogar eine Zunahme der Partikelgröße beobachtet. Mittels Lichtmikroskopie wurden große Teilchen als Mentholkristalle bei den beiden höheren Produktionstemperaturen 75°C und 85°C identifiziert (Abbildung 2.3-6). Der Grund für ihre Bildung liegt wahrscheinlich an der erhöhten Löslichkeit von Menthol in der Wasserphase. Da die Menthol-Löslichkeit beim Abkühlen wieder abnimmt, kommt es zur Rekristallisation und in der Folge zur Entstehung großer Mentholkristalle in der Wasserphase.

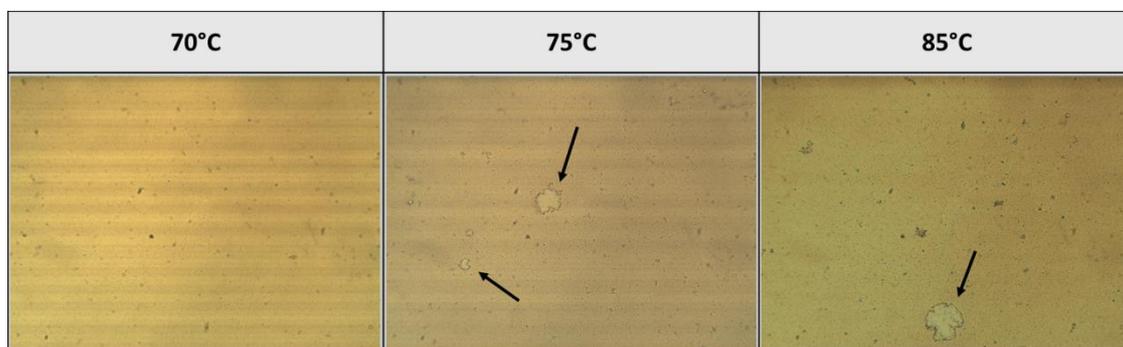


Abbildung 2.3-6: Mikroskopische Aufnahmen der zur Überprüfung des Einflusses der Produktionstemperatur hergestellten Dynasan-NLC-Dispersionen. Vergrößerung: 160-fach. Die Pfeile zeigen auf die identifizierten Mentholkristalle, die mit Agglomerationen verbunden sind.

Trotz der Unterschiede in der Qualität (Entstehen bzw. Nichtentstehen großer Menholkristalle und Agglomerate) sind die ZP-Werte der bei höheren und niedrigeren Temperaturen hergestellten Dynasan-Dispersionen mit einer Leitfähigkeit von 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ in destilliertem Wasser für alle Proben ähnlich (Tabelle 2-8).

Tabelle 2-8: ZP-Werte der zur Überprüfung des Einflusses der Produktionstemperatur hergestellten NLC-Dispersionen (Mittelwert \pm SD, n=3)

	festes Lipid	variabler Parameter	ZP in [mV]
Rezeptur A	Softisan 154	55°C	-51,1 \pm 0,7
		60°C	-53,5 \pm 3,8
		70°C	-51,2 \pm 2,9
Dynasan 118	CS-Verfahren	70°C	-58,3 \pm 1,4
		75°C	-44,8 \pm 0,4
		75°C	-46,9 \pm 2,4
		85°C	-47,6 \pm 2,6

Langzeitstabilitätsuntersuchungen zeigten, dass alle Softisan-Dispersionen und jene Dynasan-Dispersionen, die knapp über dem Schmelzpunkt produziert wurden, mindestens ein Jahr stabil blieben (Abbildung 2.3-7).

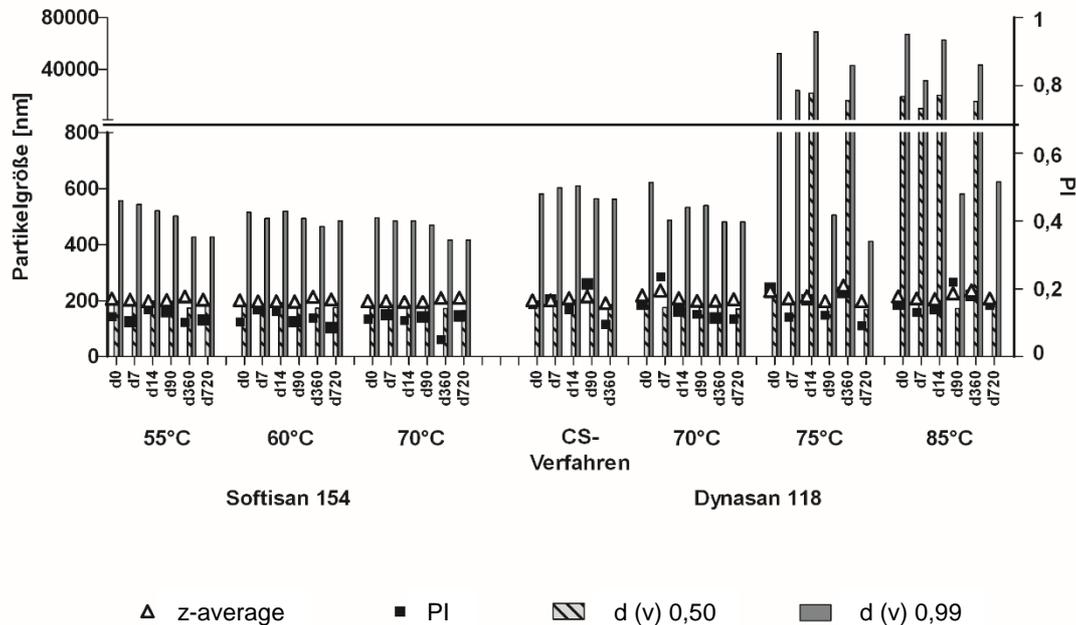


Abbildung 2.3-7: Partikelgröße (PCS und LD) der zur Überprüfung des Einflusses der Produktionstemperatur hergestellten NLC-Dispersionen in Abhängigkeit von der Lagerungszeit

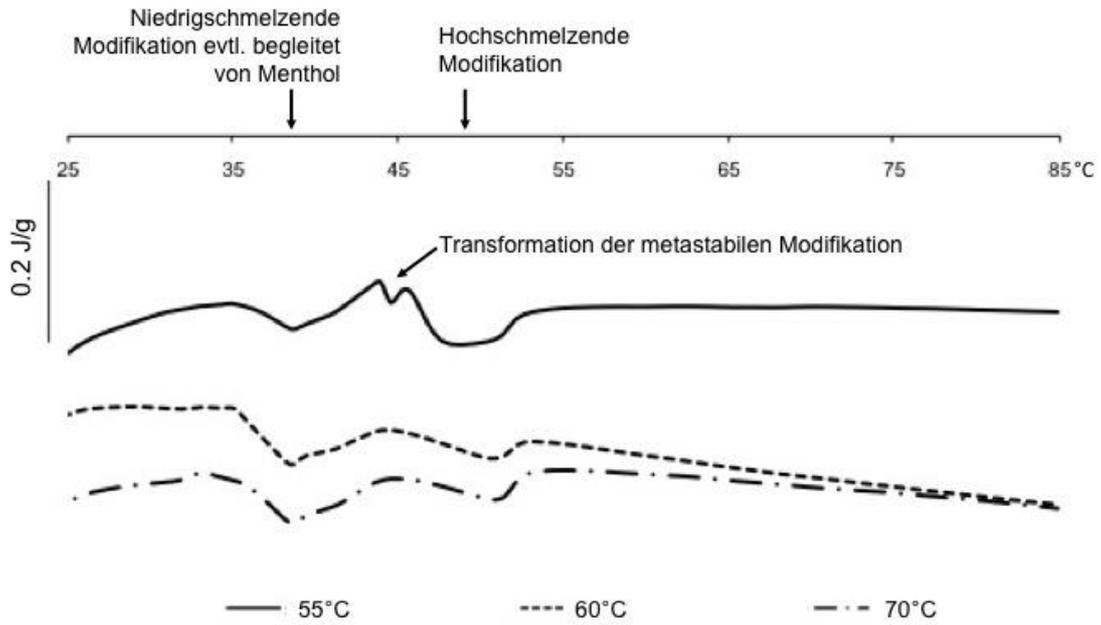
Westesen et al. untersuchten die Beziehung zwischen der Stabilität der Lipidnanopartikel-Dispersionen und ihrem Kristallisationsverhalten (Westesen et al. 1997b). Sie

zeigten, dass der Gelierungsprozess der Lipidnanopartikel-Dispersionen von einer Erhöhung der Kristallinität und von der Transformation der weniger geordneten, thermodynamisch instabilen α -Modifikation in die geordnete, thermodynamisch stabile β -Modifikation begleitet wurde. Die Transformation verursacht eine Veränderung der zuvor kugeligen Partikelform und führt somit zu einer Vergrößerung der Partikeloberfläche, welche daher durch eine größere Anzahl von Tensidmolekülen neu überdeckt werden muss. Werden die Partikeloberflächen nicht erfolgreich überdeckt, so können die Partikel agglomerieren. Außerdem kann die Transformation, die von einer Neuordnung der Lipidmoleküle und von der Zunahme der Gitterdichte begleitet wird, zu einem Ausstoß des inkorporierten Wirkstoffes führen (Bunjes et al. 2003). Um eine hohe physikalische Stabilität der Dispersion sicherzustellen, sind in der Literatur zwei Möglichkeiten vorgeschlagen. Bunjes et al. empfehlen, dass die Umwandlung der α -Modifikation in die β -Modifikation inhibiert werden soll (Bunjes et al. 2007a). Souto et al. schlagen vor, dass das Lipid so weit wie möglich in die β -Modifikation rekristallisieren soll (Souto et al. 2010).

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeiten sind die thermischen Analysen der homogenisierten Dispersionen sehr wichtig. In den Abbildungen 2.3-8 und 2.3-9 werden die DSC-Ergebnisse der hergestellten Dispersionen dargestellt. Sie spiegeln die Komplexität der Systeme wider. Für die softisan- und die dynasanhaltigen Dispersionen wurden nicht nur endothermische, sondern auch exothermische Ereignisse detektiert. Mögliche Gründe für die exothermischen Ereignisse sind:

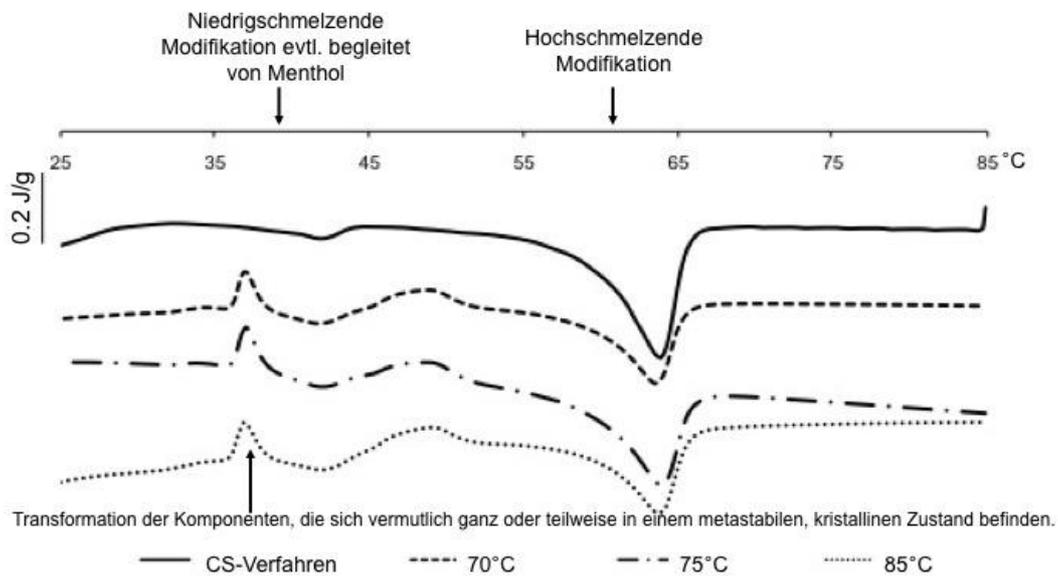
1. Verunreinigungen im Proben- oder Referenztiegel, die zu einem verfälschten Messergebnis führen,
2. Komponenten der Probe, die sich vermutlich ganz oder teilweise in einem metastabilen, kristallinen Zustand befinden.

Im zweiten Fall führt das Erwärmen der Probe unter dem Einfluss der weiteren Komponenten, vor allem dem von Wasser, zu einer exothermen Umkristallisation in eine stabile, kristalline Phase, die dann bei weiterer Temperaturerhöhung schmilzt. Dies passiert vor allem bei der Herstellung von Mischungen, die zunächst temperiert und dann relativ rasch abgekühlt werden, wie z. B. bei der Herstellung von NLC-Dispersionen.



Softisan 154

Abbildung 2.3-8: DSC-Aufheizkurven der Softisan-NLC-Dispersionen in Abhängigkeit von der Produktionstemperatur. Obere Kurve: hergestellt knapp oberhalb des Schmelzpunktes von Softisan, mittlere Kurve: hergestellt bei 5°C über dem Schmelzpunkt von Softisan, untere Kurve: hergestellt bei 15°C über dem Schmelzpunkt von Softisan



Dynasan 118

Abbildung 2.3-9: DSC-Aufheizkurven der Dynasan-NLC-Dispersionen in Abhängigkeit von der Produktionstemperatur. Oberste Kurve: hergestellt mit dem CS-Verfahren, zweite Kurve von oben: hergestellt knapp oberhalb des Schmelzpunktes von Dynasan, zweite Kurve von unten: hergestellt bei 5°C über dem Schmelzpunkt von Dynasan, unterste Kurve: hergestellt bei 15°C über dem Schmelzpunkt von Dynasan

Um den ersten Fall – mögliche Verunreinigungen – auszuschließen, wurden Proben zuvor temperiert. Das heißt sie wurden für 10 Minuten auf die Temperatur erhitzt, bei der die exothermischen Peaks beobachtet wurden. Anschließend wurden die Proben wieder auf Raumtemperatur abgekühlt und dann erneut gemessen. Die DSC-Thermogramme der Proben, die mit diesem Verfahren behandelt wurden, zeigten keine exothermischen Peaks mehr. Somit wurden Verunreinigungen im Proben- oder Referenztiegel ausgeschlossen. Damit ist der zweite Fall als Ursache für die exothermischen Ereignisse bestätigt, in dem die exothermischen Peaks mit der metastabilen Modifikation begründet werden.

Die DSC-Thermogramme der homogenisierten Dispersionen zeigten, dass die Schmelzpunkte und die Kristallinität der Partikel im Vergleich zu den reinen Lipiden bzw. physikalischen Mischungen geringer wurden. Dies wurde erwartet und ist eine Folge des Nanonisierungsprozesses durch Homogenisation (Bunjes et al. 2007b). Ähnlich wie bei den DSC-Thermogrammen der physikalischen Mischungen besaßen die hergestellten Dispersionen keine freien Mentholpeaks. Jedoch im Gegensatz zu den physikalischen Mischungen, die nur eine hoch schmelzende Modifikation besaßen, zeigten die hergestellten Dispersionen, ähnlich zu der zweiten Heizkurve der reinen Lipide, niedrig und hoch schmelzende Modifikationen. Die Schmelztemperatur der hoch schmelzenden Modifikation betrug für die homogenisierten Dispersionen etwa 5°C weniger als die Schmelztemperatur derselben Modifikation desselben reinen Lipides. Hingegen hatte die niedrig schmelzende Modifikation einen um fast 9°C niedrigeren Schmelzpunkt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Gastmoleküle, also die Mentholmoleküle, hauptsächlich in der thermodynamisch instabilen niedrig schmelzenden Modifikation lokalisiert sind.

Die DSC-Ergebnisse vom Tag der Herstellung zeigten, dass für beide Rezepturen die unterschiedlichen Herstellungstemperaturen zu unterschiedlich großen Mengen der verschiedenen polymorphen Modifikationen des Lipids führten (Tabelle 2-9).

Tabelle 2-9: Übersicht der Partikelgrößen (PCS und LD), Enthalpien sowie Veränderungen in der Kristallinität der zur Überprüfung des Einflusses der Produktionstemperatur hergestellten NLC-Dispersionen

festes Lipid	variabler Parameter	Partikelgrößenwerte (Tag 0)		Partikelgrößenwerte (Tag 360)		Schmelzenthalpien [J/g] (Tag 0)			Schmelzenthalpien [J/g] (Tag 720)			Veränderungen in der Kristallinität [%]
		z-average [nm]	d (v) 0,99 [nm]	z-average [nm]	d (v) 0,99 [nm]	niedrig schmelzende Modifikation	hoch schmelzende Modifikation	Total	niedrig schmelzende Modifikation	hoch schmelzende Modifikation	Total	
Softisan 154	55°C	206	557	214	426	5,90	9,35	15,25	7,05	18,20	25,25	65,57
	60°C	200	515	213	464	7,60	2,90	10,50	6,90	16,85	23,75	126,19
	70°C	198	495	209	416	8,15	3,45	11,60	7,85	22,15	30,00	158,62
Dynasan 118	CS-Verfahren	200	581	208	611	3,20	61,40	64,60	5,55*	59,55*	65,10*	0,77*
	70°C	218	622	199	481	5,45	56,15	61,60	4,95	66,35	71,30	15,75
	75°C	235	52276	253	42990	5,35	53,75	59,10	6,90	61,70	68,60	16,07
	85°C	215	67000	236	43037	6,55	53,25	59,80	6,60	75,75	82,35	37,71

Im Vergleich zur Produktion bei höheren Temperaturen führte die Produktion mit einer Temperatur knapp über dem Schmelzpunkt zu einer kleineren Menge der niedrig schmelzenden Modifikation und zu einer größeren Menge der hoch schmelzenden Modifikation. So betrug die bezüglich des Lipidgehaltes der Probe berechnete Schmelzenthalpie für die niedrig schmelzende Modifikation der Dynasan-Partikel am Tag der Herstellung 5,45 J/g für 70°C bzw. 6,55 J/g für 85°C Herstellungstemperatur. Für die hoch schmelzende Modifikation dieser NLC wurden 56,15 J/g für 70°C und 53,25 J/g für 85°C gemessen. Die nach zwei Jahren Lagerung erfolgten DSC-Messungen wiesen für beide NLC neben der hoch schmelzenden Modifikation immer noch die niedrig schmelzende Modifikation nach. Der Schmelzpunkt der niedrig schmelzenden Modifikation blieb während der Lagerzeit unverändert. Im Gegensatz dazu wurde der Schmelzpunkt der hoch schmelzenden Modifikation mit der Zeit höher. Außerdem waren die beobachteten Veränderungen in der Kristallinität der mit unterschiedlichen Temperaturen hergestellten Dispersionen verschieden stark. Die Veränderungen waren für die Dispersionen stärker ausgeprägt, die mit höheren Temperaturen hergestellt wurden.

Diese interessante Beobachtung motivierte das sogenannte Cremeschmelzverfahren. Die Schmelzenthalpien der niedrig und hoch schmelzenden Modifikationen der via Cremeschmelzverfahren hergestellten Dispersionen waren 3,20 J/g und 61,40 J/g. Dieser deutliche Unterschied in den Schmelzenthalpien bestätigte somit die obige Beobachtung, dass die Enthalpie für die niedrig schmelzende Modifikation bei einer niedrigeren Herstellungstemperatur geringer wird, die Enthalpie der hoch schmelzenden Modifikation jedoch ansteigt. Im Gegensatz zu den Dispersionen, die traditionell über dem Schmelzpunkt des Lipids hergestellt wurden, hat sich während der Lagerung die Kristallinität der Dispersionen kaum verändert, die nach dem Cremeschmelzverfahren entstanden sind.

Wie bereits oben erklärt wurde, kann das Kristallisationsverhalten der Lipidnanopartikel die Stabilität ihrer Dispersion beeinflussen. Um den Zusammenhang zwischen dem Kristallisationsverhalten und der Stabilität der Partikel besser beurteilen zu können, wurden die DSC-Daten der Partikel mit der physikalischen Stabilität der Partikel verglichen. Die nach zwei Jahren Lagerungszeit auftretende niedrig schmelzende Modifikation und die hohen Stabilitäten der Softisan-NLC

wiesen darauf hin, dass für diese Proben keine polymorphe Transformation der Lipidmodifikation, welche zu einer Instabilität führen könnte, stattgefunden hat.

Im Gegensatz zu den Softisan-Dispersionen konnten Unterschiede in Stabilität und Kristallisationsverhalten der bei variierender Temperatur hergestellten Dynasan-Dispersionen festgestellt werden und für eine Zusammenhangsanalyse verwendet werden. Wie oben bereits erklärt wurde, waren die bei niedrigeren Temperaturen hergestellten Chargen stabiler als die, die bei höheren Temperaturen hergestellt wurden. Außerdem führte die Produktion bei einer Temperatur knapp über dem Schmelzpunkt zu kleineren Mengen der niedrig schmelzenden Modifikation und zu größeren Mengen der hoch schmelzenden Modifikation. Diese Beobachtungen bezüglich der Dynasan-Dispersionen unterstützen die Hypothese von Souto et al., welche davon ausgeht, dass eine große Menge an hoch schmelzender Modifikation zu stabilen Partikeln führt (Souto et al. 2010).

Die bei niedrigeren Temperaturen hergestellten Dispersionen wiesen keine Mentholkristalle auf, obwohl sie eine sehr geringe Menge an niedrig schmelzender Modifikation besaßen, welche als Hauptreservoir für Gastmoleküle gilt. Das Nichtauftreten von Peaks einer niedrig schmelzenden Modifikation kann daher auf einen nicht kristallinen (d. h. flüssigen) Zustand der Lipidmatrix hindeuten. Trotz der niedrigen Kristallinität der niedrig schmelzenden Modifikation sind die Partikel, die bei der Schmelztemperatur des festen Lipides hergestellt wurden, aufgrund ihrer extrem hohen Stabilität vielversprechend für die Entwicklung einer neuen Generation von Lipidnanopartikeln.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse dieses Studienteils, dass niedrige Produktionstemperaturen knapp unter oder knapp über dem Schmelzpunkt zu kleinen Partikelgrößen und physikalisch stabilen Nanopartikeln führen. Dieses Ergebnis wurde erhofft, jedoch nicht erwartet, da Jahnke zuvor gezeigt hatte, dass eine gewünschte kleine Tröpfchengröße für Wachsemulsionen mit einer Produktionstemperatur über dem Schmelzpunkt von Wachs erzielt werden kann (Jahnke 2001). Jahnkes Methode galt seitdem als die Produktionsmethode für Lipidnanopartikel.

Weiterhin wurde beobachtet, dass die unterschiedlichen Herstellungstemperaturen zu unterschiedlichem Kristallisationsverhalten führen. Dies bedeutet, dass die

gewünschte Kristallinität der Partikel durch eine Optimierung der Herstellungstemperatur erreicht werden kann.

Für die Produktion der Menthol-beladenen Lipidnanopartikel wurden die optimalen Herstellungstemperaturen mit 55°C für die Softisan- und mit 70°C für die Dynasan-Dispersionen ermittelt.

2.3.1.2.3 Einfluss des Homogenisationsdruckes

Wie bereits erwähnt sind die am häufigsten verwendeten Homogenisationsdrücke für die Herstellung der Lipidnanopartikel derzeit 500 bar und 800 bar (Abschnitt 1.1.5.2). Da eine Reduzierung des angewandten Drucks Produktionskosten sparen würde, wurde in diesem Teil der Studie der Einfluss des Homogenisationsdruckes auf die physiko-chemischen Eigenschaften der Menthol-beladenen NLC untersucht und die Effizienz der Homogenisierung bei unterschiedlichen Drücken verglichen. Dafür wurden die Rezepturen A1 und A2 (Tabelle 2-5) jeweils 3-mal, unter Verwendung von drei Homogenisationszyklen bei geringem (300 bar), mittlerem (500 bar) und hohem (800 bar) Homogenisationsdruck hergestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.3-10 zu sehen.

Bei den Ergebnissen bezüglich der Partikelgröße wurden jeweils die gleichen Trends für beide Formulierungen beobachtet. Je höher der Homogenisationsdruck war, desto kleiner und homogener waren die Partikel. Diese Beobachtung war nicht signifikant für die mittlere Partikelgröße (216 nm, 202 nm, 188 nm für Softisan-NLC bzw. 239 nm, 227 nm, 210 nm für Dynasan-NLC bei 3x300 bar, 3x500 bar, 3x800 bar), aber deutlich sichtbar in den LD-Ergebnissen. Als der Homogenisationsdruck von 300 bar auf 800 bar erhöht wurde, sind die $d(v)_{0,99}$ -Werte für die Softisan Chargen von 634 nm auf 472 nm und die für die Dynasan Chargen von 668 nm auf 518 nm gesunken (Abbildung 2.3-10).

Eine gleiche Versuchsanordnung führte bei den Softisan-Dispersionen zu vergleichsweise kleineren Partikeln. Dieser Unterschied kann nicht mit den unterschiedlichen Viskositäten erklärt werden, da die Viskositäten der beiden Lipidphasen bei den untersuchten Herstellungstemperaturen sehr ähnlich waren. Die Viskosität von Softisan betrug 24,1 mPas bei 55°C und die Viskosität von Dynasan betrug 22,5 mPas bei 70°C. Eine mögliche Erklärung können jedoch die Diglyceride im Softisan sein, welche als Co-Emulgatoren wirken können und somit zu kleineren Partikeln führen.

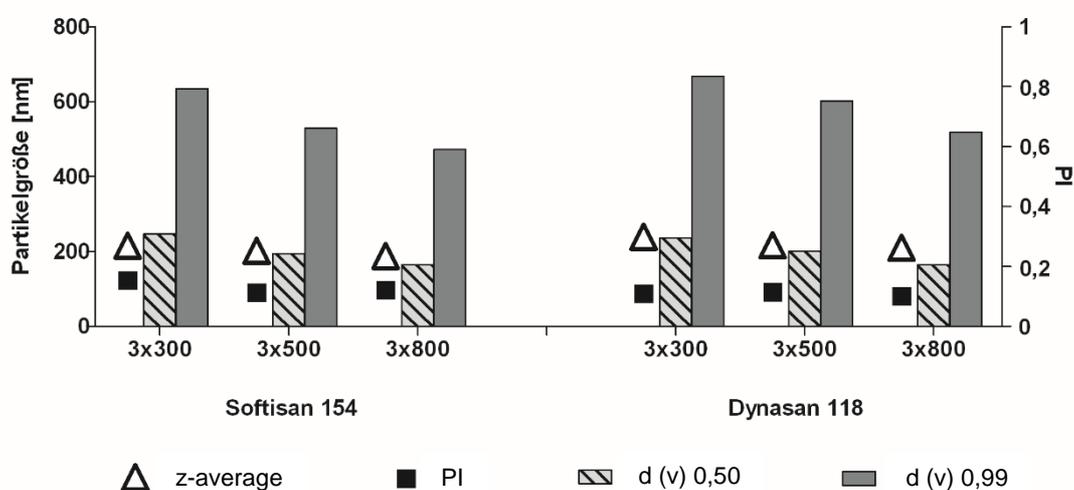


Abbildung 2.3-10: Partikelgröße (PCS und LD) der zur Überprüfung des Einflusses des Homogenisationsdruckes hergestellten NLC-Dispersionen am Tag der Herstellung

Die Langzeitstabilitätsergebnisse sind in Abbildung 2.3-11 zu sehen. Für die Softisan Chargen wurde keine Zunahme in der Partikelgröße festgestellt und es wurden keine freien Mentholkristalle gefunden. Dies galt sogar bei Herstellung mit dem niedrigsten Homogenisationsdruck, der in dieser Studie untersucht wurde, also für 300 bar. Die hohe physikalische Stabilität der Softisan-Chargen können wiederum mit den Diglyceriden, die als Co-Emulgator wirken, erklärt werden.

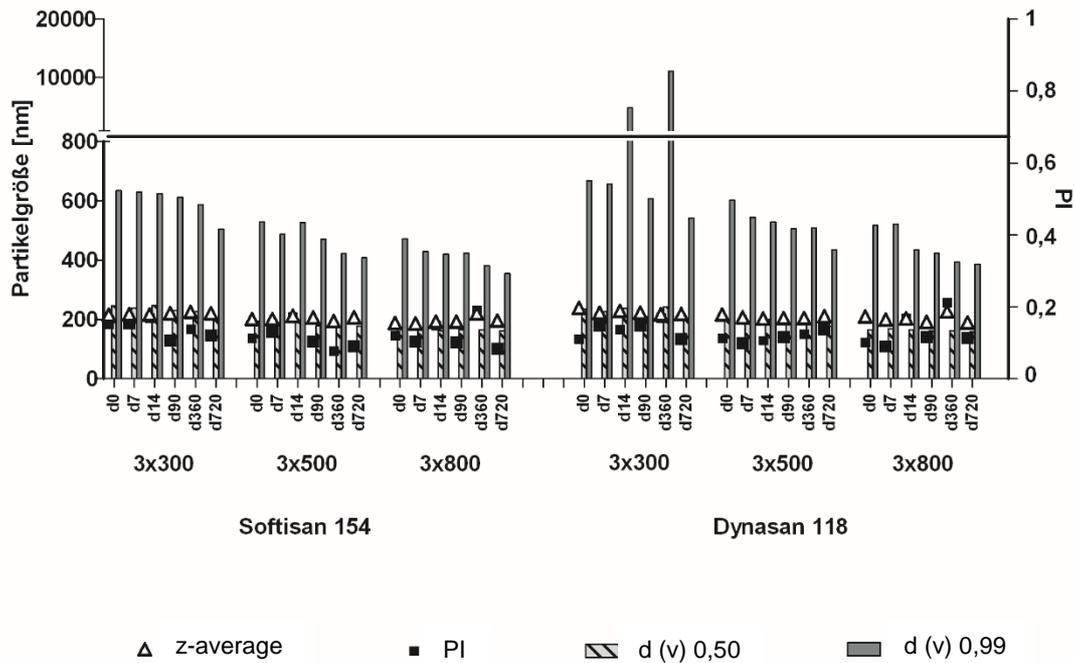


Abbildung 2.3-11: Partikelgröße (PCS und LD) der zur Überprüfung des Einflusses des Homogenisationsdruckes hergestellten NLC-Dispersionen in Abhängigkeit von der Lagerungszeit

Im Gegensatz dazu waren die Dynasan-Partikel, die mit 300 bar hergestellt wurden, nicht stabil – sie agglomerierten stark. Trotz des ausreichend hohen ZP-Wertes (Tabelle 2-10), d. h. oberhalb von -30 mV, wurden für diese Probe große Partikel bereits zwei Wochen nach der Produktion gefunden. Diese Partikel konnten mittels Laserdiffraktometrie nicht bei jeder Messung detektiert werden. Die möglichen Ursachen dafür werden in Kapitel 4.1 erklärt. Sowohl die mikroskopischen als auch die makroskopischen Beobachtungen demonstrieren die Instabilität der Probe klar (Abbildung 2.3-12).

Tabelle 2-10: ZP-Werte der zur Überprüfung des Einflusses des Homogenisationsdruckes hergestellten NLC-Dispersionen (Mittelwert±SD, n=3)

	festes Lipid	variabler Parameter	ZP in [mV]
Rezeptur A	Softisan 154	3x300	-53,3±1,8
		3x500	-54,0±2,6
		3x800	-52,7±2,8
	Dynasan 118	3x300	-48,1±0,8
		3x500	-48,6±2,0
		3x800	-49,2±3,1

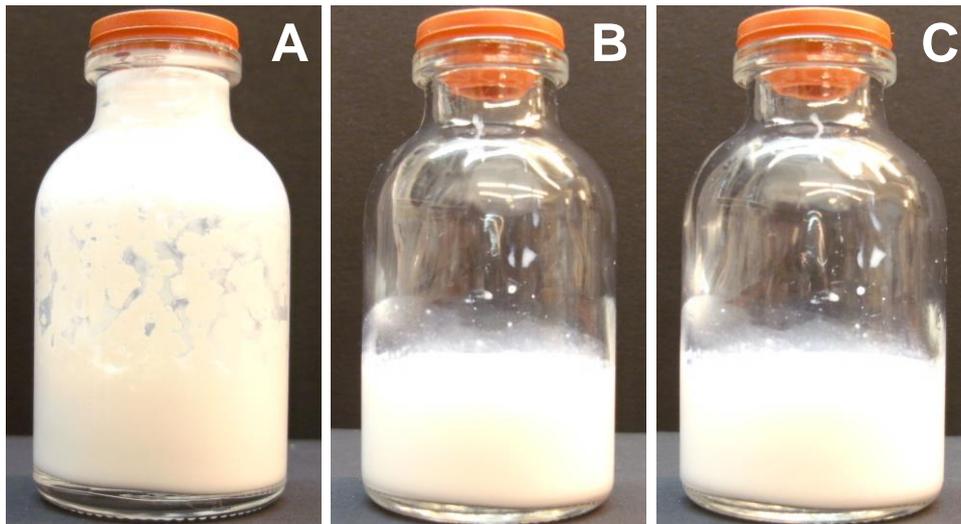


Abbildung 2.3-12: Makroskopische Aufnahmen der Dynasan-NLC-Dispersionen in Abhängigkeit vom Homogenisationsdruck nach einjähriger Lagerung. A: hergestellt mit 300 bar, B: hergestellt mit 500 bar, C: hergestellt mit 800 bar

Die DSC-Thermogramme der Dispersionen zeigten, dass ein höherer Homogenisationsdruck nicht nur zu kleineren Partikeln führt, sondern aufgrund der kleineren Partikelgröße auch zu einer niedrigeren Kristallinität der Partikel (

Tabelle 2-11). So z. B. betragen die auf Basis des Lipidgehalts berechneten Schmelzenthalpien der Dynasan-Partikel je nach Homogenisationsdruck 46,8 J/g für 300 bar bzw. 38,6 J/g für 800 bar. Dieser Einfluss der Partikelgröße auf die Kristallinität der Partikel ist auf den Gibbs-Thomson-Effekt zurück zu führen (Perez 2005). Ein weiterer Grund für den beschriebenen Einfluss ist die kritische Anzahl der Kristallisationskeime, die für die Initiation der Rekrystallisation benötigt werden und mit die mit steigendem Homogenisationsdruck abnehmen (Boistelle 1988). Die Wahrscheinlichkeit dafür, dass sich genügend viele Rekrystallisationspromotoren in einem Tröpfchen befinden, ist für kleine Tröpfchen geringer als für große. Daher findet die Rekrystallisation der kleinen Partikel verzögerter statt (Souto et al. 2006).

Tabelle 2-11: Übersicht der Partikelgrößen (PCS und LD), Enthalpien sowie Veränderungen in der Kristallinität der zur Überprüfung des Einflusses des Homogenisationsdruckes hergestellten NLC-Dispersionen

festes Lipid	variabler Parameter	Partikelgrößenwerte (Tag 0)		Partikelgrößenwerte (Tag 360)		Schmelzenthalpien [J/g] (Tag 0)			Schmelzenthalpien [J/g] (Tag 720)			Veränderungen in der Kristallinität [%]
		z-average [nm]	d (v) 0,99 [nm]	z-average [nm]	d (v) 0,99 [nm]	niedrig schmelzende Modifikation	hoch schmelzende Modifikation	Total	niedrig schmelzende Modifikation	hoch schmelzende Modifikation	Total	
Softisan 154	3x300	216	634	226	586	5,00	8,25	13,25	8,05	14,10	22,15	67,17
	3x500	202	529	195	422	7,55	3,65	11,20	7,65	23,75	31,40	180,36
	3x800	188	472	220	382	7,50	2,50	10,00	7,40	25,70	33,10	231,00
Dynasan 118	3x300	236	668	218	11083	3,30	43,45	46,75	6,30	55,45	61,75	32,09
	3x500	217	602	205	508	3,65	36,60	40,25	7,30	65,20	72,50	80,12
	3x800	210	518	227	393	4,80	33,80	38,60	6,25	59,25	65,50	69,69

Neben der Gesamtkristallinität wurde auch das Verhältnis zwischen der niedrig- und der hoch schmelzenden Modifikation durch den Homogenisationsdruck beeinflusst. Ein höherer Homogenisationsdruck – also ein höherer Energieeintrag – führte zu einer größeren Menge der niedrig schmelzenden und zu einer kleineren Menge der hoch schmelzenden Modifikation. Außerdem hat sich die Kristallinität bei den mit unterschiedlichen Homogenisationsdrücken hergestellten Dispersionen während der Lagerungszeit unterschiedlich verändert. Allgemein konnte beobachtet werden: Je höher der Homogenisationsdruck war, desto größer war die Änderung der Kristallinität im Laufe der Zeit. Daher kann geschlussfolgert werden, dass der Homogenisationsdruck (d. h. der Energieeintrag) so niedrig wie möglich gehalten werden sollte, um die Bildung von niedrig schmelzenden, instabilen Modifikationen und die zeitlichen Veränderungen der Kristallinität zu verhindern und somit physikalische stabile NLC-Systeme zu ermöglichen.

Der mögliche Zusammenhang zwischen dem Kristallisationsverhalten und der Langzeitstabilität der Partikel wurde bereits in Abschnitt 2.3.1.2.2 erläutert. Auch in diesem Fall kann bezüglich der Softisan-NLC keine Aussage getroffen werden, da alle Softisan-Proben stabil blieben, sich jedoch in ihren Kristallinitäten unterschieden. Andererseits wurde aufgrund der DSC-Daten der Dynasan-Dispersionen erwartet, dass die Dynasan-Dispersion, die mit 300 bar hergestellt wurde, eine lange Zeit stabil bleiben würde. Die Probe erfüllte die Hypothese von Souto et al. (Souto et al. 2010). Sie besaß die größte Menge der hoch schmelzenden Modifikation. Aufgrund des zusätzlichen Auftretens der niedrig schmelzenden Modifikation erfüllte sie ebenso die Hypothese von Bunjes et al. (Bunjes et al. 2007a) (Abschnitt 2.3.1.2.2).

Die Dispersion agglomerierte jedoch bereits 14 Tage nach der Produktion. Diese Beobachtung zeigt, dass für eine Vorhersage der physikalischen Stabilität der Lipidnanopartikel nicht allein das Kristallisationsverhalten ausreicht. In diesem Fall kann die große Partikelgröße der Grund für die Instabilität dieser Dispersion sein.

Weiterhin wurde erwartet, dass während der Lagerung die Kristallinität dieser Dynasan-Probe aufgrund von Agglomerationsbildung stark zunehmen würde. Die DSC-Daten, die nach zwei Jahren Lagerung gemessen wurden, ergaben jedoch nur eine sehr geringe Zunahme der Kristallinität. Dieses Artefakt kann mit den

Agglomerationen erklärt werden, die am inneren Glas des Vials hafteten (Abbildung 2.3-12) und aufgrund derer die DSC-Messungen nicht mit dem repräsentativen Lipidgehalt durchgeführt werden konnten.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse dieses Studienteils, dass der Homogenisationsdruck nicht nur die Partikelgröße der NLC, sondern auch die Stabilität und die Kristallinität der Partikel beeinflusst.

2.3.1.2.4 Einfluss der Anzahl der Homogenisationszyklen

Das Ziel dieser Teilstudie war es, zu untersuchen, ob eine Variation in der Anzahl der Zyklen zu unterschiedlichen Ergebnissen führt. Für die Auswahl der Anzahl von Homogenisationszyklen wurden die Produktionsparameter betrachtet, die derzeit am häufigsten verwendet werden (Hommos 2009). Diese sind entweder drei Zyklen bei 500 bar oder zwei Zyklen bei 800 bar. Mit 500 bar und 800 bar wurden zugleich die effektivsten Homogenisationsdrücke verwendet, die in dem vergangenen Schritt definiert wurden. Bei 500 bar wurden zwei, drei und fünf Zyklen, bei 800 bar ein, zwei und drei Zyklen zur Homogenisation der Dispersionen der Rezepturen A1 und A2 (Tabelle 2-5) durchgeführt.

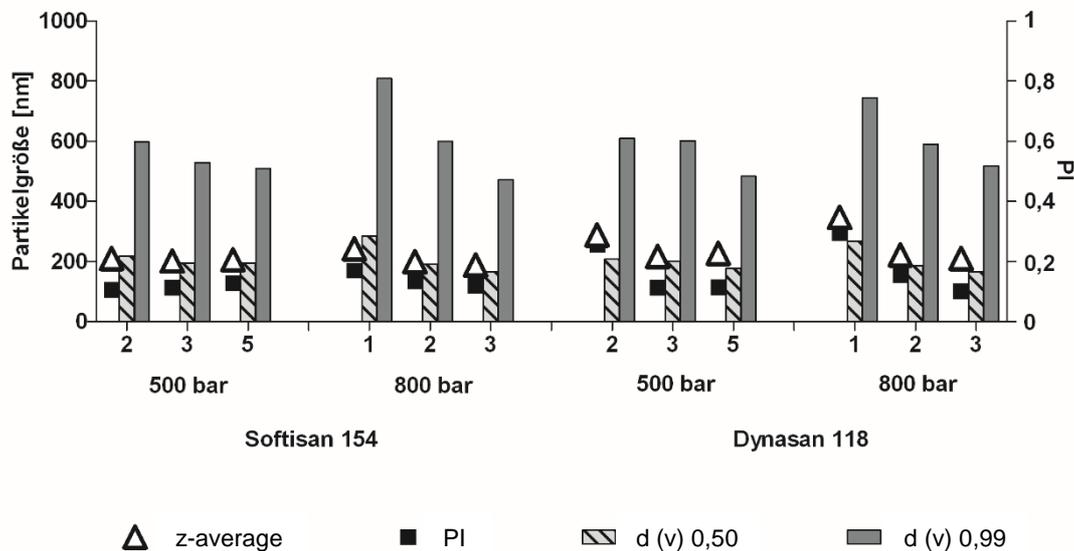


Abbildung 2.3-13: Partikelgröße (PCS und LD) der zur Überprüfung des Einflusses der Zyklenanzahl hergestellten NLC-Dispersionen am Tag der Herstellung

Für die beiden untersuchten Formulierungen führte eine Erhöhung der Zyklanzahl zur Abnahme der Partikelgröße und zur Zunahme der Homogenität (Abbildung 2.3-13). Für die beiden untersuchten Homogenisationsdrücke wurden jeweils die größten Teilchengrößen und die breitesten PIs bei der Herstellung mit der jeweils kleinsten untersuchten Anzahl von Homogenisationszyklen festgestellt. Also mit zwei Zyklen für 500 bar und mit einem Zyklus für 800 bar. Außerdem konnte festgestellt werden, dass die Homogenisierung bei 500 bar mit drei Zyklen ähnliche Ergebnisse wie die Homogenisierung bei 800 bar mit zwei Zyklen ergab. Zum Beispiel betragen die mittleren Teilchengrößen der Softisan-NLC-Dispersionen, die bei 500 bar mit drei Zyklen und bei 800 bar mit zwei Zyklen hergestellt wurden, 202 nm mit einem PI von 0,11 bzw. 199 nm mit einem PI von 0,14.

Tabelle 2-12: ZP-Werte der zur Überprüfung des Einfluss der Zyklanzahl hergestellten NLC-Dispersionen (Mittelwert \pm SD, n=3)

	festes Lipid	variabler Parameter	ZP in [mV]
Rezeptur A	Softisan 154	2x500	-54,8 \pm 0,2
		3x500	-54,0 \pm 2,6
		5x500	-52,7 \pm 1,4
		1x800	-56,5 \pm 0,8
		2x800	-54,6 \pm 0,5
		3x800	-52,7 \pm 2,8
	Dynasan 118	2x500	-51,7 \pm 1,4
		3x500	-50,7 \pm 2,0
		5x500	-51,1 \pm 2,6
		1x800	-53,5 \pm 1,1
		2x800	-51,1 \pm 0,9
		3x800	-48,8 \pm 3,1

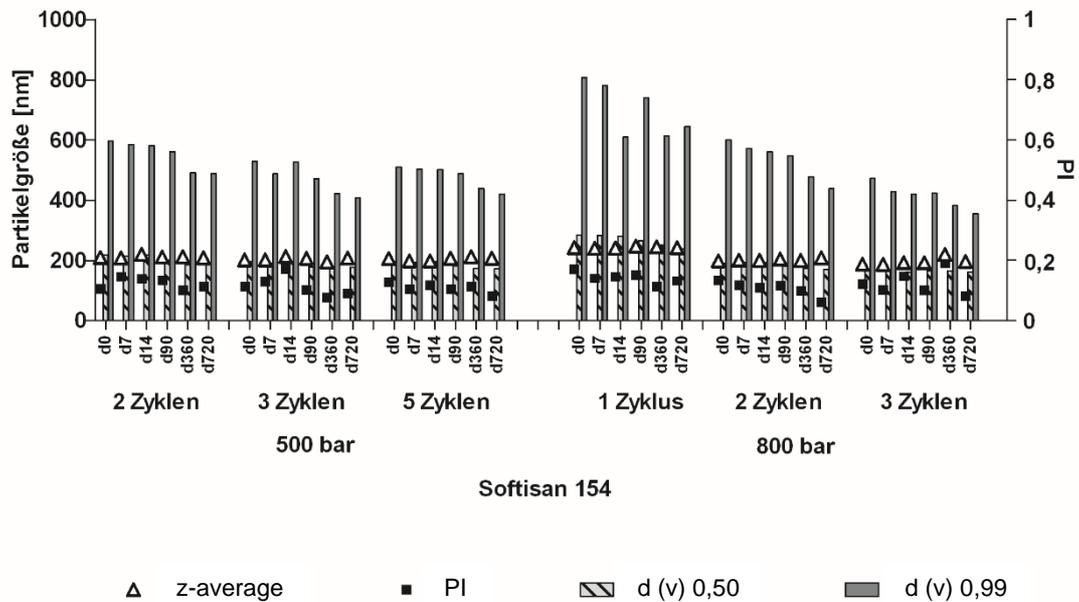


Abbildung 2.3-14: Partikelgröße (PCS und LD) der zur Überprüfung des Einflusses der Zyklenanzahl hergestellten Softisan-NLC-Dispersionen in Abhängigkeit von der Lagerungszeit

Der Einfluss der Anzahl von Homogenisationszyklen war bezüglich der PCS-Ergebnisse begrenzt. Der PCS-Wert 200 nm bildete die Grenze für die Partikelgrößenreduktion. Nach Erreichen dieses PCS-Wertes verringerten weitere Homogenisationszyklen die mittlere Partikelgröße nicht mehr. Anders war hingegen das Verhalten der $d(v)_{0,99}$ -Werte. Mit weiteren Zyklen nahmen die $d(v)_{0,99}$ -Werte der Dispersionen weiter ab. Auch beeinflusste die Anzahl von Homogenisationszyklen die PI-Werte, wobei der Einfluss auf die bei 800 bar hergestellten Dispersionen deutlicher erkennbar war.

Die ZP-Ergebnisse der Dispersionen, die für diesen Teil der Studie gemessen wurden, sind in Tabelle 2-12 aufgelistet. Die Abbildung 2.3-14 und die Abbildung 2.3-15 zeigen die Langzeitstabilitätsergebnisse der hergestellten Dispersionen. Sie belegen, dass die Softisan-Chargen während der gesamten Lagerungszeit stabil waren. Für diese Dispersionen wurden keine Agglomerationen und kein Partikelgrößenwachstum festgestellt. Dies galt sogar für die Probe, die mit nur einem Zyklus produziert wurde. Dies ist hervorzuheben, da das Ziel einer effizienten Produktion insbesondere die Zeit- und Kostenreduzierung ist. Eine Homogenisierung mit nur einem Zyklus – und nicht zwei – kann die Energiekosten der Produktion halbieren. Dies ist besonders für die großtechnische Produktion interessant.

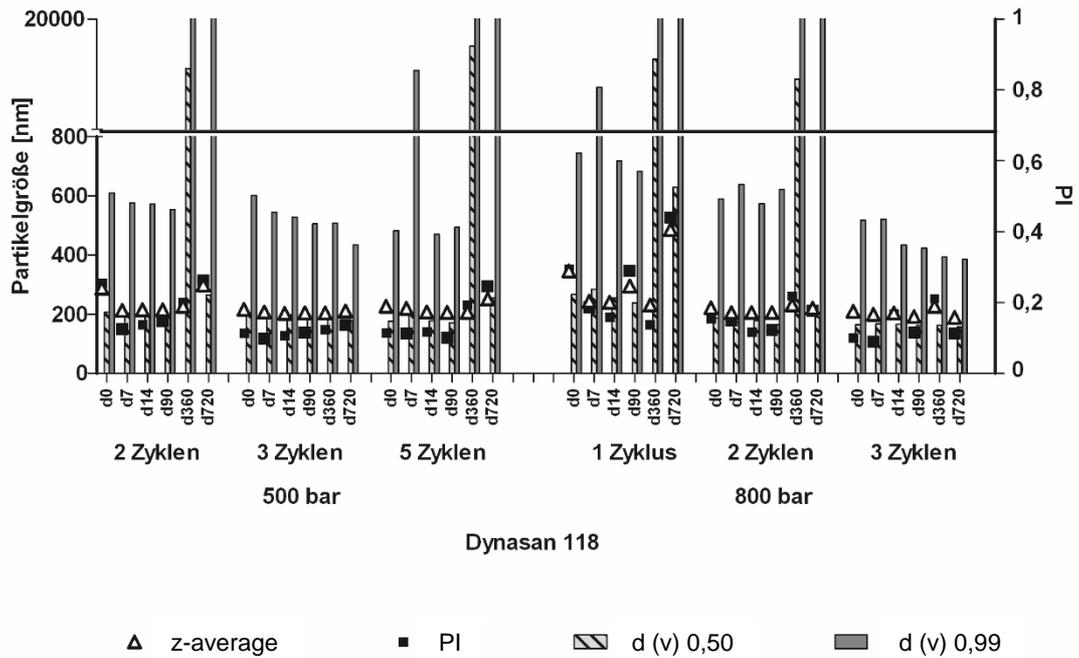


Abbildung 2.3-15: Partikelgröße (PCS und LD) der zur Überprüfung des Einfluss der Zyklenanzahl hergestellten Dynasan-NLC-Dispersionen in Abhängigkeit von der Lagerungszeit

Die Produktion mit nur einem Zyklus ergab jedoch nicht immer stabile Dispersionen. Um stabile, Dynasan enthaltende NLC-Dispersionen herzustellen, war eine Produktion mit nur einem Zyklus nicht ausreichend. Für diese Rezeptur ergab eine Produktion mit zwei Zyklen solche Partikel, die über sechs Monate stabil blieben, später dann aber agglomerierten. Für die Dynasan enthaltende Dispersion war eine Herstellung mit drei Zyklen optimal. Dies galt für die beiden untersuchten Homogenisationsdrücke, also für 500 bar und 800 bar. Die Anwendung von mehr als drei Zyklen führte wiederum zu einer Art der Überbearbeitung und somit zu instabilen Partikeln, die eine Folge des hohen Energieeintrages sind (Mehnert et al. 2001). Des Weiteren führte der Wasserverlust, welcher während längerer Produktionszeiten bei hohen Temperaturen entsteht, zu einer Erhöhung in der Konzentration der Lipidphase. Folglich kamen die Lipidnanopartikel gegenseitig in engen Kontakt, was zur Agglomeration führte.

Tabelle 2-13: Übersicht der Partikelgrößen (PCS und LD), Enthalpien sowie Veränderungen in der Kristallinität der zur Überprüfung des Einflusses der Zyklenanzahl hergestellten NLC-Dispersionen

festes Lipid	variabler Parameter	Partikelgrößenwerte (Tag 0)		Partikelgrößenwerte (Tag 360)		Schmelzenthalpien [J/g] (Tag 0)			Schmelzenthalpien [J/g] (Tag 720)			Veränderungen in der Kristallinität [%]
		z-average [nm]	d (v) 0,99 [nm]	z-average [nm]	d (v) 0,99 [nm]	niedrig schmelzende Modifikation	hoch schmelzende Modifikation	Total	niedrig schmelzende Modifikation	hoch schmelzende Modifikation	Total	
Softisan 154	2x500	210	597	212	491	6,15	4,05	10,20	7,10	11,20	18,30	79,41
	3x500	202	529	195	422	7,55	3,65	11,20	7,65	23,75	31,40	180,36
	5x500	206	509	212	439	7,80	2,75	10,55	6,90	24,55	31,45	198,10
	1x800	243	808	245	613	4,80	11,75	16,55	4,20	32,50	36,70	121,75
	2x800	199	600	200	477	6,10	3,80	9,90	7,75	18,35	26,10	163,64
	3x800	188	472	220	382	7,50	2,50	10,00	7,40	25,70	33,10	231,00
Dynasan 118	2x500	288	609	227	36020	4,30	34,85	39,15	5,45	71,65	77,10	96,93
	3x500	217	602	205	508	3,65	36,60	40,25	7,30	65,20	72,50	80,12
	5x500	227	483	207	47503	3,05	38,95	42,00	7,05	65,30	72,35	72,26
	1x800	347	774	231	41840	1,65	56,80	58,45	4,20	81,25	85,45	46,19
	2x800	222	590	232	36887	4,00	41,70	45,70	6,05	64,65	70,70	54,70
	3x800	210	518	227	393	4,80	33,80	38,60	6,25	59,25	65,50	69,69

Die DSC-Ergebnisse der untersuchten Dispersionen sind in Tabelle 2-13 aufgelistet. Ein Vergleich der DSC-Ergebnisse vom Tag der Herstellung zeigt, dass im Allgemeinen mit der Zunahme der Anzahl von Homogenisationszyklen auch die Menge der niedrig schmelzenden Modifikation zunimmt, wohingegen die Menge der hoch schmelzenden Modifikation abnimmt. Die Ergebnisse nach zwei Jahren Lagerung ergaben, dass eine höhere Anzahl der Produktionszyklen im Allgemeinen zu größeren Änderungen in der Kristallinität der Proben führt.

Um den möglichen Zusammenhang zwischen dem Kristallisationsverhalten und der Langzeitstabilität der Partikel zu untersuchen, wurden die beiden Dispersionen bezüglich dieser Eigenschaften verglichen. Da auch hier alle Softisan-Dispersionen stabil blieben, konnte keine nicht triviale Aussage über den Zusammenhang zwischen Kristallisationsverhalten und Stabilität der Partikel getroffen werden. Andererseits zeigte ein Vergleich innerhalb der Dynasan-Dispersionen, wie bereits in Abschnitt 2.3.1.2.3 erläutert wurde, dass die Erwartungen, die durch das Kristallisationsverhalten der Partikel geweckt wurden, nicht mit der realen Stabilität der Partikel vereinbar sind. Zum Beispiel war anhand der DSC-Ergebnisse der Dynasan-Dispersionen zu erwarten, dass die Dispersion, die mit einem Zyklus bei 800 bar hergestellt wurde, stabil bleiben würde. Die Annahme beruhte darauf, dass sie einen hohen Anteil an hoch schmelzender Modifikation und eine in der Größe unveränderte Menge an niedrig schmelzender Modifikation besaß. Allerdings agglomerierte die Probe bereits sieben Tage nach der Produktion. Diese Beobachtung und andere ähnliche Fälle (Abschnitt 2.3.1.2.3) zeigen, dass das Kristallisationsverhalten alleine nicht ausreicht, um die physikalische Stabilität der Lipidnanopartikel vorherzusagen. Neben dem gewünschten Kristallisationsverhalten müssen weitere Eigenschaften, wie zum Beispiel eine hohe Oberflächenladung, eine kleine Partikelgröße usw. erreicht werden, um physikalisch stabile Partikel zu erhalten.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse dieses Studienteils, dass auch durch Variation der Homogenisationsparameter die Teilchengröße, die Langzeitstabilität und das Kristallisationsverhalten der Teilchen manipuliert werden können. Unter den untersuchten Herstellungsparametern erwies sich eine Produktion am Schmelzpunkt des festen Lipides bei 500 bar mit drei Zyklen als am besten geeignet.

2.3.1.2.5 Einfluss der Konzentration der Lipidphase

Um die optimale Lipidphasenkonzentration für die Menthol-beladenen NLC herauszufinden, wurde in diesem Teil der Studie der Einfluss der Konzentration der Lipidphase auf die physiko-chemischen Eigenschaften der NLC untersucht. Dafür wurde die Konzentration der Lipidphase zwischen 5% und 30% (m/m) variiert.

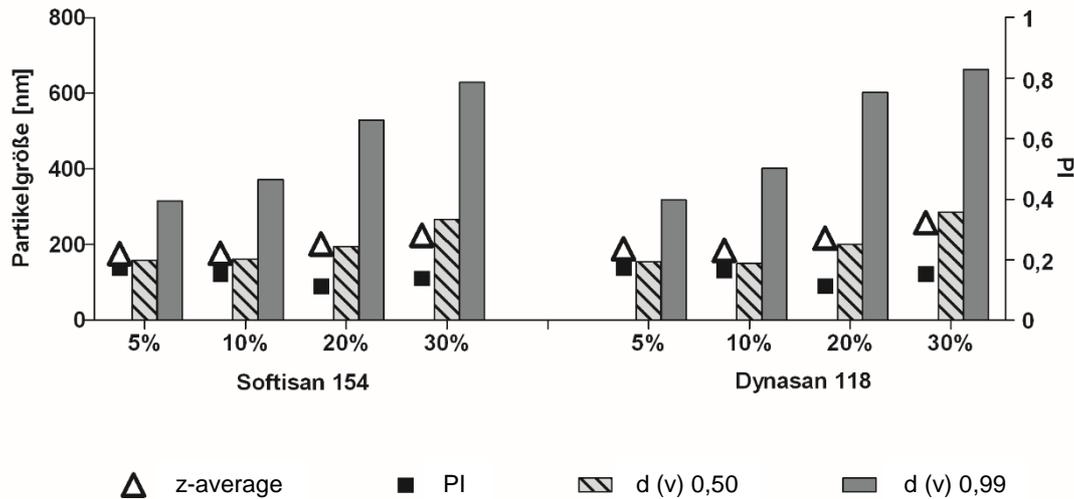


Abbildung 2.3-16: Partikelgröße (PCS und LD) der zur Überprüfung des Einflusses der Lipidphasenkonzentration hergestellten NLC-Dispersionen am Tag der Herstellung

Die Ergebnisse vom Produktionstag sind in Abbildung 2.3-16 zu sehen. Bezüglich der mittleren Partikelgröße gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen 5% (B Rezepturen) und 10% (C Rezepturen). Die Erhöhung des Lipidgehalts von 10% (C Rezepturen) auf 30% (D Rezepturen) führte jedoch zu einem Anstieg der mittleren Partikelgröße. Andererseits wurde für die $d(v)_{0,99}$ -Werte ein kontinuierlicher Anstieg als Folge der Konzentrationserhöhung beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte mit steigendem Lipidgehalt für die PI-Werte keine Tendenz festgestellt werden. Während die Konzentration der Lipidphase von 5% auf 20% stieg, nahmen die PI-Werte ab. Bei einer weiteren Zunahme der Konzentration kam es jedoch zu keiner weiteren Abnahme der PI-Werte, so dass der niedrigste PI-Wert für die Dispersionen mit einer 20% Lipidphase beobachtet wurde. Die PI-Werte der Chargen mit einer 30% Lipidphase waren ähnlich hoch wie bei den Dispersionen mit einer 5% und 10% Lipidphase.

Interessanterweise besaßen die Dispersionen mit einer 5% und einer 10% Lipidphase (B und C Rezepturen) für die beiden untersuchten festen Lipide am Tag der Herstellung ähnliche Partikelgrößen, obwohl die 20% und 30%igen Softisan-Proben kleinere Partikel als die gleich prozentigen Dynasan-Proben aufwiesen. Diese Beobachtung zeigt, dass der Einfluss des Lipidphasengehalts ab einer bestimmten Konzentration zu unterschiedlichen Partikelgrößen führt. Bei niedrigeren Konzentrationen erhält man ähnliche Ergebnisse, obwohl die Zusammensetzung der Lipide unterschiedlich ist. Der Grund für die kleineren Partikel der 20%igen und 30%igen Softisan-Dispersionen könnten die Diglyceride sein, welche Bestandteil der Zusammensetzung des Lipids sind und als Co-Emulgator wirken.

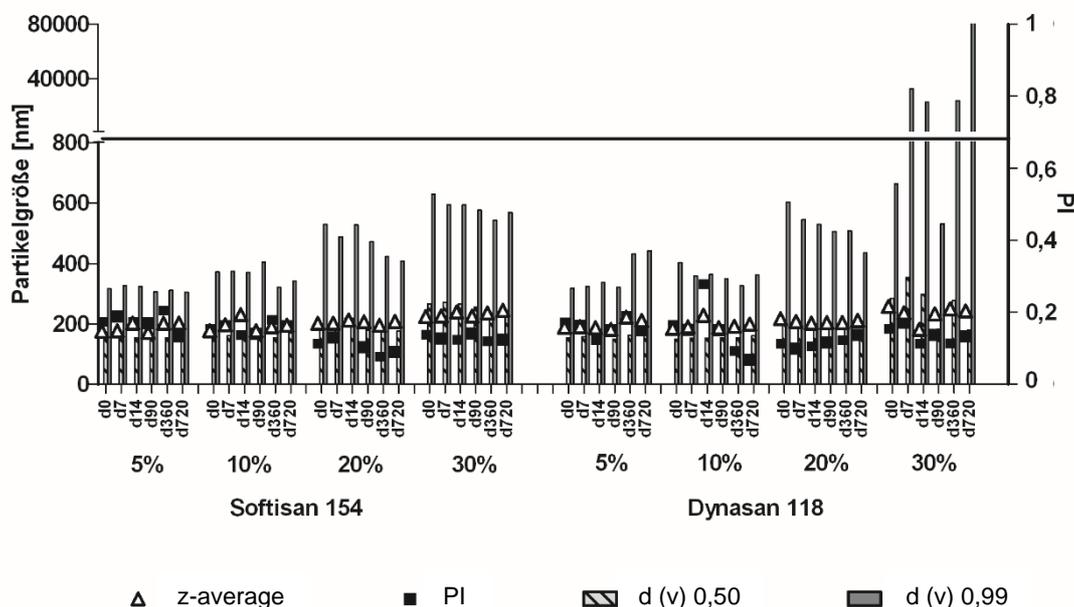


Abbildung 2.3-17: Partikelgröße (PCS und LD) der zur Überprüfung des Einflusses der Lipidphasenkonzentration hergestellten NLC-Dispersionen in Abhängigkeit von der Lagerungszeit

Die ZP-Ergebnisse der Proben sind in Tabelle 2-14 und die Langzeitstabilitätsergebnisse in Abbildung 2.3-17 dargestellt. Für die Softisan-Dispersionen gab es keine Aggregate und keine Veränderungen in der Partikelgröße für einen Zeitraum von einem Jahr. Andererseits ist die Dynasan-Dispersion, die eine 30% Lipidphase enthielt, am 7. Tag der Lagerung agglomeriert, obwohl alle anderen Dynasan-Proben für mindestens ein Jahr stabil blieben. Die Stabilitätsunterschiede zwischen den 30%igen Softisan- und Dynasan-Dispersionen sind ebenso auf die Diglyceride zurückzuführen. Als Co-Emulgatoren können sie eine bessere Stabilisierung der Softisan-Proben sicherstellen. Als ein weiterer Grund ist der

höhere, herstellungsbedingte Wasserverlust der Dynasan-Probe zu nennen. Da die Produktionstemperatur der Dynasan-Chargen höher als die der Softisan-Chargen war, ergab sich somit auch ein höherer Wasserverlust für die Dynasan-Proben. Daher war zu erwarten, dass der tatsächliche Lipidgehalt der Dynasan-Dispersionen höher als der der Softisan-Dispersionen war. Wenn der tatsächliche Lipidgehalt die sogenannte kritische Konzentration der Lipidphase überschreitet, kommen, wie bereits erwähnt, die Lipidteilchen miteinander in engen Kontakt, was zu Agglomerationen und Instabilitäten führt.

Tabelle 2-14: ZP-Werte der zur Überprüfung des Einflusses der Lipidphasenkonzentration hergestellten NLC-Dispersionen (Mittelwert \pm SD, n=3)

festes Lipid	Rezeptur	variabler Parameter	ZP in [mV]
Softisan 154	B	5%	-50,0 \pm 0,4
	C	10%	-48,9 \pm 2,8
	A	20%	-54,0 \pm 2,6
	D	30%	-51,6 \pm 0,5
Dynasan 118	B	5%	-49,8 \pm 3,9
	C	10%	-46,8 \pm 0,9
	A	20%	-48,6 \pm 2,0
	D	30%	-50,9 \pm 0,9

Die DSC-Ergebnisse in Tabelle 2-15 zeigen, dass für die Dispersionen mit einer 5% Lipidphase kein Schmelzpeak detektiert wurde. Mit steigendem Lipidgehalt wurden die Peaks, die den beiden Modifikationen der Lipide entsprechen, detektiert. Es wird in Abschnitt 4.2.1.3.1 gezeigt, dass der Nichteintritt eines Schmelz-ereignisses auch eine Folge der hohen Wassermenge der Probe sein kann. Im Unterschied zu den Ergebnissen aus Abschnitt 4.2.1.3.1 kann der Nichteintritt hier aber auch aufgrund einer Wechselwirkung des Stabilisators mit der Lipidmatrix vorkommen (Zur Mühlen 1996, Kovacevic et al. 2011), da die Lipidgehalt/Tensid-Verhältnisse für die Rezepturen A bis D unterschiedlich waren. Die Verhältnisse waren 2,78 bzw. 16,67 für die Rezepturen F (mit einer 5% Lipidphase) und H (mit einer 30% Lipidphase).

Tabelle 2-15: Übersicht der Partikelgrößen (PCS und LD), Enthalpien sowie Veränderungen in der Kristallinität der zur Überprüfung des Einflusses der Lipidphasenkonzentration hergestellten NLC-Dispersionen

festes Lipid	variabler Parameter	Partikelgrößenwerte (Tag 0)		Partikelgrößenwerte (Tag 360)		Schmelzenthalpien [J/g] (Tag 0)			Schmelzenthalpien [J/g] (Tag 720)			Veränderungen in der Kristallinität [%]
		z-average [nm]	d (v) 0,99 [nm]	z-average [nm]	d (v) 0,99 [nm]	niedrig schmelzende Modifikation	hoch schmelzende Modifikation	Total	niedrig schmelzende Modifikation	hoch schmelzende Modifikation	Total	
Softisan 154	5%	176	316	202	311	0,00	0,00	0,00	4,40	56,80	61,20	-
	10%	178	372	190	321	5,10	2,70	7,80	7,60	37,00	44,60	471,79
	20%	202	529	195	422	7,55	3,65	11,20	7,65	23,75	31,40	180,36
	30%	225	629	236	542	10,83	3,63	14,47	7,67	11,97	19,63	35,71
Dynasan 118	5%	189	318	222	432	0,00	0,00	0,00	0,00	101,00	101,00	-
	10%	185	402	192	326	6,90	10,90	17,80	5,90	74,20	80,10	350,00
	20%	217	602	205	508	3,65	36,60	40,25	7,30	65,20	72,50	80,12
	30%	258	663	250	23454	3,17	59,17	62,33	2,27	86,37	88,63	42,19

Alle Proben wurden während der Lagerung kristalliner. Jedoch wurden weniger Veränderungen in der Kristallinität bei zunehmender Konzentration der Lipidphase beobachtet. Die Veränderungen in der Kristallinität konnten für die 5%igen Dispersionen aufgrund der nicht vorhandenen Schmelzpeaks am Tag der Produktion nicht berechnet werden. Die Veränderungen in der Kristallinität lagen für die 10%igen Dispersionen bei über 300%, während sie für die 30%igen Dispersionen bei unter 50% blieben. Die Messungen nach zwei Jahren Lagerung zeigten, dass die Dispersionen mit niedriger Lipidphasenkonzentration eine höhere Kristallinität aufwiesen, als die Dispersionen, die einen höheren Lipidgehalt besaßen. Wenn diese Beobachtung, wie Kovacevic et al. behaupten, auf das Lipidgehalt/Tensid-Verhältnis zurückzuführen ist, so kann wie folgt geschlossen werden: Zunächst deprimiert das Tensidmolekül die Kristallisation der Partikel, wohingegen es dann während der Lagerung die Kristallinität verstärkt. Diese Erklärung stimmt mit den Ergebnissen von Kovacevic et al. überein, die eine kristallisationsverstärkende Wirkung für die Tenside mit langen Alkylkettenlänge feststellten (Kovacevic et al. 2011).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieses Studienteils, dass die Konzentration der Lipidphase einen Einfluss auf die physiko-chemischen Eigenschaften der Partikel hat. Mit der Variation des Lipidgehaltes können die Partikelgröße, die Langzeitstabilität, sowie die Kristallinität der Partikel verändert werden. Die optimale Konzentration der Lipidphase ist abhängig vom Lipid, wobei eine Lipidphasenkonzentration bis zu 20% noch für beide Formulierungen zu stabilen Partikeln führt.

2.3.2 Freisetzungsuntersuchungen

2.3.2.1 In vitro Freisetzungsuntersuchungen – das membranfreie Modell

In diesem Teil der Arbeit wurde die Freisetzung von Menthol vergleichend für SLN und NLC bzw. für positiv und negativ geladene Partikel *in vitro* untersucht. Außerdem wurde die Freisetzung von Menthol für verschiedene, feste Lipide studiert. Die Formulierungen der untersuchten Dispersionen und die durchgeführte Methode sind in Abschnitt 2.2.2.7.1 zu finden.

Die untersuchten Dispersionen wurden zunächst mittels Partikelgrößenanalysen charakterisiert, um die möglichen Unterschiede im Freisetzungsprofil durch Unterschiede in der Partikelgröße auszuschließen. Die Partikelgrößenergebnisse der unter-

suchten Dispersionen sind in Abbildung 2.3-18 zu sehen. Die mittleren Partikelgrößen aller untersuchten Dispersionen lagen zwischen 148 nm und 175 nm. Die gemessenen $d(v)_{0,50}$ -Werte waren sehr ähnlich; sie unterschieden sich um höchstens 18 nm. Deutlichere Unterschiede konnten jedoch bei den $d(v)_{0,95}$ -Werten festgestellt werden. Während mit 233 nm der niedrigste $d(v)_{0,95}$ -Wert für die positiv geladenen Dynasan-SLN beobachtet wurde, lag der mit 326 nm höchste $d(v)_{0,95}$ -Wert bei positiv geladenem Dynasan-NLC vor.

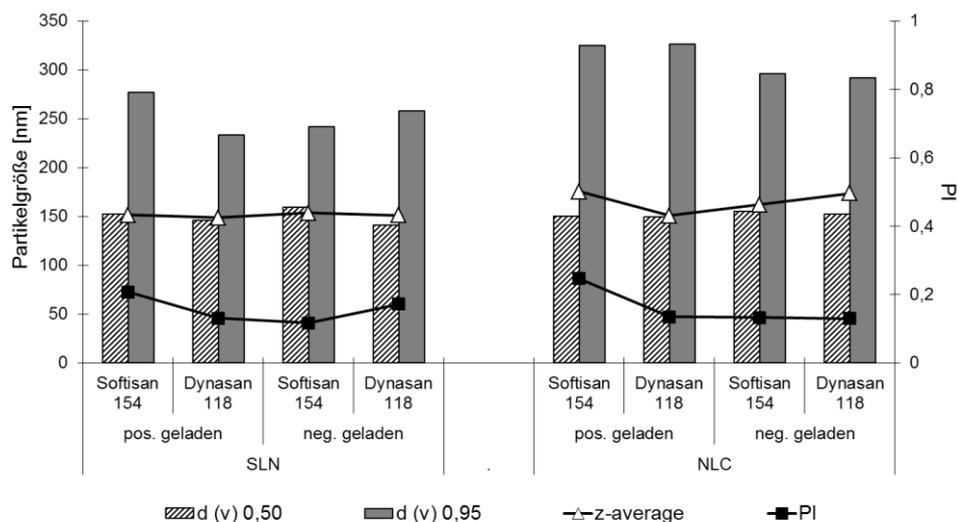


Abbildung 2.3-18: Partikelgrößen der für die *in vitro* membranfreien Freisetzungsuntersuchungen hergestellten, Menthol-beladenen Lipidnanopartikeln am Tag der Herstellung

Die Ergebnisse der membranfreien Freisetzungsuntersuchungen sind in Abbildung 2.3-19 und für die ersten zwei Messpunkte vergrößert in Abbildung 2.3-20 zu sehen. Eine verzögerte Freisetzung des Menthols wurde bei allen untersuchten Dispersionen beobachtet, wobei in der ersten Stunde nur ca. 20% des Menthols freigesetzt wurden. Die fast komplette Freisetzung des Menthols fand innerhalb von 24 Stunden statt. Aufgrund der Ergebnisse dieser *in vitro* Freisetzungsstudie sind der erwünschte verlängerte Erfrischungseffekt und der verlängerte Mentholgeschmack – im Gegensatz zu konventionellen mentholhaltigen Produkten – für Produkte mit den Menthol-beladenen Lipidnanopartikeln zu erwarten.

Im Allgemeinen konnte beobachtet werden, dass die Geschwindigkeit der Menthol-Freisetzung mit den folgenden Charakteristika der Dispersion vergleichsweise stieg: SLN, positiv geladene Partikel und Dynasan. NLC, negativ geladene Partikel und Softisan als Dispersion-Charakteristika ließen das Menthol vergleichsweise langsamer freisetzen.

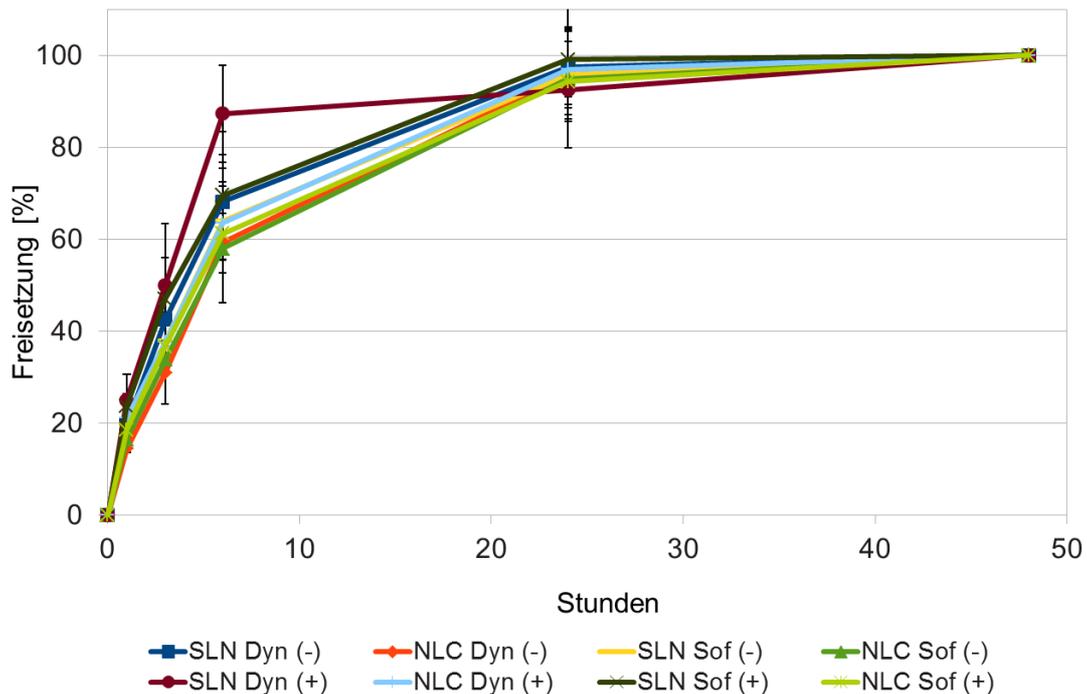


Abbildung 2.3-19: In vitro membranfreie Freisetzungsuntersuchungen von Menthol aus positiv- (CPC) und negativ- (TC) geladenem Dynasan (Dyn) und Softisan (Sof) Lipidnanopartikeln (SLN und NLC)

Ein Vergleich zwischen den Ergebnissen für die Freisetzung bezüglich der ersten drei Messpunkte (nach der ersten, dritten und sechsten Stunde) und den Ergebnissen bezüglich der Partikelgröße zeigten, dass Folgendes gilt: Je kleiner die Partikel, desto höher die Konzentration des freigesetzten Menthols. Mit der Zeit verlangsamte sich dann die Freisetzung der kleinen Partikel. Da der Partikelgrößenunterschied zwischen den Proben nicht sehr groß war, ist davon auszugehen, dass auch die Kristallinität der Partikel eine Rolle bei der Freisetzung spielt. Je kristalliner die Partikel sind, desto dichter sind die Molekularanordnungen der Partikelbestandteile. Wenn die Molekularanordnungen der Partikelbestandteile dicht sind, bekommt das Gastmolekül, in diesem Fall Menthol, weniger Platz, sich zu lokalisieren. Diese Situation erzwingt die Freisetzung des Gastmoleküls (Dingler 1998). Es ist bekannt, dass SLN eine höhere Kristallinität als NLC besitzen (Müller et al. 2011) und Dynasan eine höhere Kristallinität als Softisan (Acar Kübart et al. 2011) besitzt. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich folgern: Je kristalliner die Partikel sind, desto größer ist die Konzentration des freigesetzten Wirkstoffes. Somit wurde eine weitere Möglichkeit vorgestellt, um die maßgeschneiderten Partikel mit den gewünschten Freisetzungseigenschaften zu entwickeln.

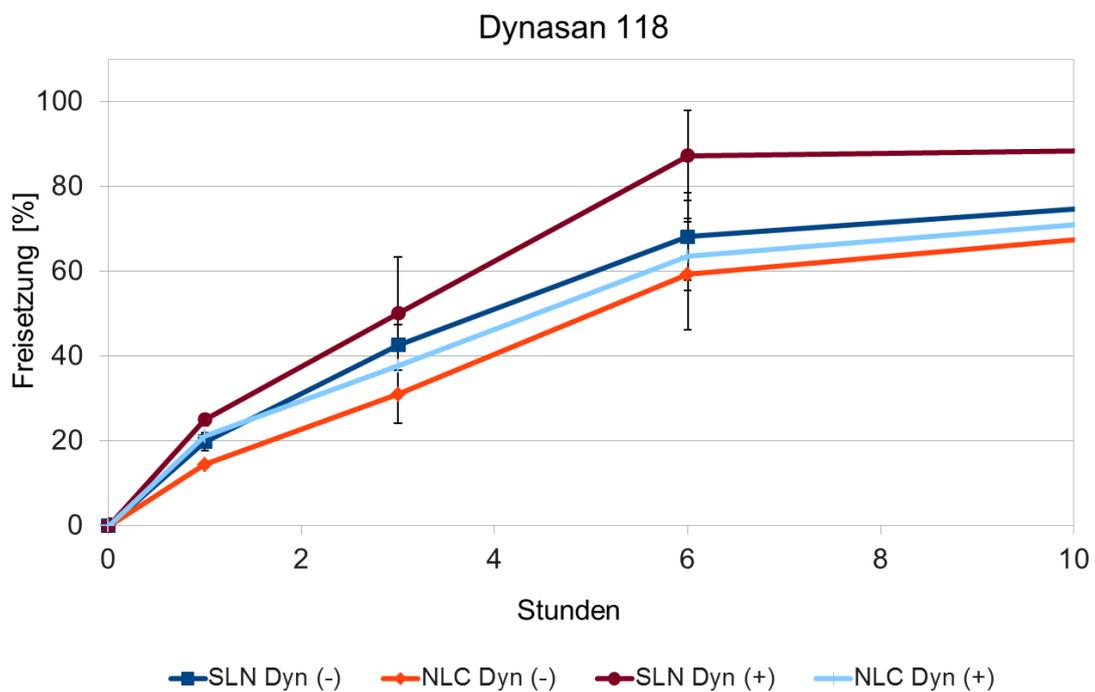
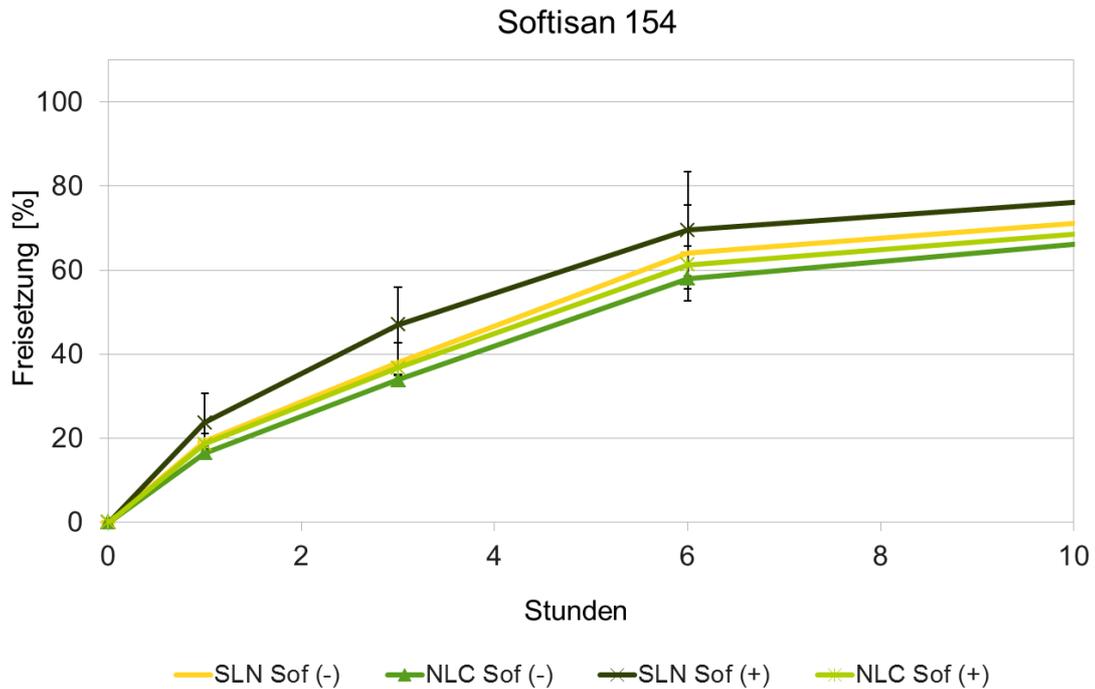


Abbildung 2.3-20: Ausschnitten aus Abbildung 2.3-19, Freisetzungsuntersuchungen zwischen der 2. und 10. Stunde. Oben: softisanhaltige Partikel. Unten: dynasanhaltige Partikel

Allgemein dienen derartige Freisetzungsuntersuchungen der Wirkstofflokalisierung (Zur Mühlen et al. 1998, Wissing 2002). Eine Wirkstofflokalisierung war jedoch in der vorliegenden Studie aufgrund der sehr ähnlich verlaufenden Freisetzungsprofile nicht möglich.

2.3.2.2 *In vivo* Freisetzungsuntersuchungen – Probandenstudie

Nach den *in vitro* Freisetzungsuntersuchungen folgten im nächsten Schritt die *in vivo* Freisetzungsuntersuchungen. Die untersuchte Formulierungen und die durchgeführte Methode ist in Abschnitt 2.2.2.7.2 zu finden.

Die Studie zeigte, dass die Freisetzung von Menthol aus NLC verlängert wurde. Es konnte nachgewiesen werden, dass die NLC-haltige Mundspülung einen um 30% - 45% länger anhaltenden Mentholgeschmack, Kühl- und Erfrischungseffekt besitzt (Abbildung 2.3-21), wobei die konventionelle Mundspülung in den ersten Minuten einen intensiveren Geschmack als die NLC-haltige Mundspülung aufwies. Dies ist darauf zurückzuführen, dass eine identische Menge Menthol in der Lösung schneller freigesetzt wird.

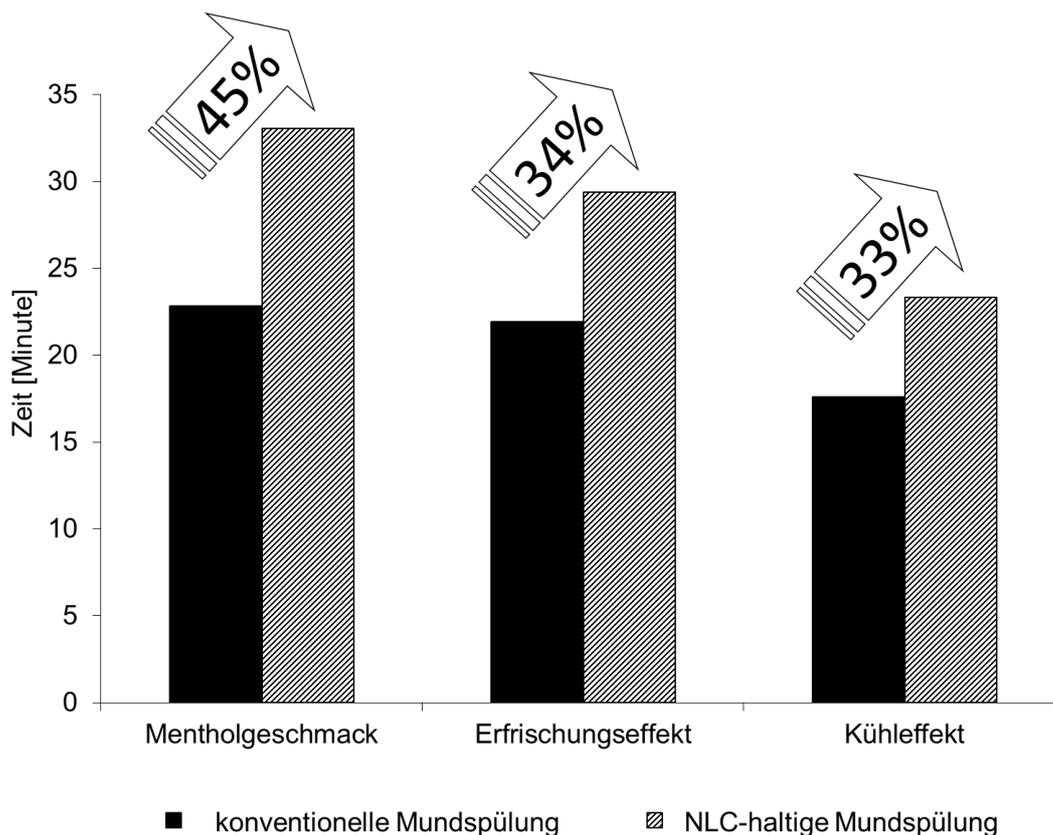


Abbildung 2.3-21: Dauer des Mentholgeschmacks, des Erfrischungs- und Kühleffekts von konventionellen und NLC-haltigen Mundspülungen

Zur Erzielung gleicher Wirkintensität wie bei konventionellen mentholhaltigen Lösungen muss entweder die in die Lipidnanopartikel eingearbeitete Mentholkonzentration erhöht werden oder freies Menthol in die Endformulierung hinzugegeben werden. Somit kann der zunächst schwache Geschmack der NLC-haltigen Mundspülung verbessert werden.

2.3.3 Einfluss von Zerstäubung auf die Partikelgröße

Im letzten Schritt wurden die Menthol-beladenen Lipidnanopartikel dahin gehend untersucht, ob die Zerstäubung einen negativen Einfluss auf die Partikelgröße hat. Die mit PCS und LD ermittelten Partikelgrößenverteilungen ergaben, dass es bei unverdünnten NLC-Dispersionen nach dem Versprühen zur Aggregation kommt (Durchmesser $d(v)_{0,95} > 20 \mu\text{m}$), während mindestens 1:2 verdünnte Dispersionen keine Änderung in der Partikelgröße vor und nach dem Zerstäuben aufweisen (Abbildung 2.3-22).

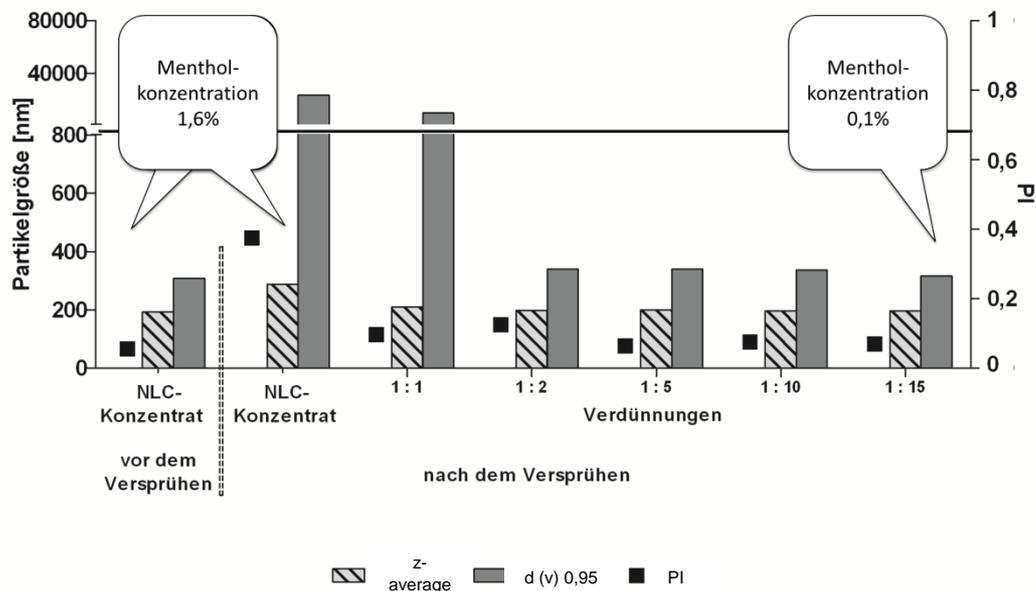


Abbildung 2.3-22: Partikelgrößen (PCS und LD) des NLC-Konzentrats und verdünnten NLC. Links: vor dem Versprühen. Rechts: nach dem Versprühen.

2.4 Zusammenfassung des Kapitels

In diesem Teil der Arbeit wurden die Formulierungen für stabile Menthol-beladene Lipidnanopartikel entwickelt. Aufgrund der Ergebnisse des Lipid- bzw. Tensid-Screenings wurden Dynasan 118 und Softisan 154 als feste Lipide, Miglyol 812 als flüssiges Lipid und TEGO Care 450 als Tensid gewählt. Die Formulierungen enthielten * 10,0% festes Lipid (entweder Softisan oder Dynasan), * 8,0% Miglyol 812 (flüssiges Lipid), * 2,0% Menthol, * 1,8% TEGO Care 450 und * 78,2% ultragereinigtes Wasser (Angaben in % (m/m)).

Die Herstellung der Menthol-beladenen NLC war unter identischen Herstellungsparametern sehr gut reproduzierbar, so dass ein adäquater Vergleich der verschiedenen Chargen gewährleistet ist.

Bezüglich der Produktionstemperatur führten selbst kleine Veränderungen zur andersartigen Einarbeitung von Menthol in die Lipidnanopartikel und damit zu unterschiedlichen Produkteigenschaften. Es wurde ebenso festgestellt, dass die Produktion am Schmelzpunkt (Cremeschmelzverfahren) vom festen Lipid nicht nur möglich ist, sie ist sogar empfehlenswert, um möglichst stabile Dispersionen mit gewünschtem Kristallisationsverhalten, d. h. mit einer geringeren Menge niedrig-schmelzender und einer größeren Menge hoch schmelzender Modifikation, herzustellen. Außerdem kann die Herstellung bei einer niedrigeren Temperatur die Wirksamkeit der Verkapselung von Substanzen wie Menthol verbessern, welche eine temperaturabhängige Löslichkeit in der Wasserphase besitzen. Weitere Vorteile von einer Produktion bei niedriger Temperatur sind der Schutz der thermolabilen Aktiven und die reduzierten Produktionskosten.

Andere Produktionsparameter waren ebenso entscheidend für die Produkteigenschaften. Bei höherem Homogenisationsdruck und mehr Homogenisationszyklen waren die Partikel im Allgemeinen kleiner und die Partikelgrößenverteilung war enger. Für beide der untersuchten festen Lipide ergab eine Homogenisierung mit 500 bar bei drei Zyklen die optimale Teilchengröße und die höchste physikalische Stabilität. Jedoch ist zu erwähnen, dass abhängig vom festen Lipid auch eine Produktion stabiler NLC-Dispersionen mit nur einem Zyklus bei 800 bar möglich war.

3 Optimierte Screening-Verfahren für die Herstellung der Lipidnanopartikel

3.1 Lipid-Screening mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) und Lichtmikroskopie

3.1.1 Einleitung und Zielsetzung des Abschnitts

In dieser Studie wurde zunächst untersucht, ob die DSC für Lipid-Screening, zwecks Zeit- und Kostenreduktion, zuverlässige Vorhersagen trifft und effizient ist. Ein weiteres Ziel bestand darin, eine günstigere und einfachere Lipid-Screening-Methode zu bestimmen, welche eine gute Voraussage über die physikalische Stabilität der hergestellten Formulierungen zulässt.

3.1.2 Materialien und Methoden

Für diese Studie wurden eine Reihe SLN-Formulierungen und eine Reihe NLC-Formulierungen verwendet, die jeweils eine konstante Konzentration der Lipidphase besaßen (10%, m/m), jedoch verschiedene Lipid/Wirkstoff-Verhältnisse aufwiesen. Im ersten Schritt der Studie wurden die physikalischen Mischungen der Lipidmatrices hergestellt. Dazu wurden die Komponenten der Lipidphase, also Menthol (Modellarzneistoff) und Softisan 154 (festes Lipid) – und bei den NLC Formulierungen zusätzlich Migylol 812 (flüssiges Lipid) – in verschiedenen Verhältnissen gemischt und bis zur Lipidschmelze erhitzt. Dem Ziel der Studie folgend, wurden die vorbereiteten Lipidschmelzen mit jeweils einer der folgenden drei Methoden weiter bearbeitet und analysiert:

- Methode A: Konventionelle Methode – DSC-Untersuchung: 1-2 mg von der Lipidschmelze wurden im geschmolzenen Zustand in einem Tiegel gewogen, kalt verschweißt und nach einstündiger Rekristallisation mittels DSC (Abschnitt 2.2.2.6) standardgemäß analysiert.
- Methode B: Alternative Methode – Lichtmikroskopische Untersuchung: Jeweils ein Tropfen der Lipidmischung wurde im geschmolzenen Zustand auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckgläschen bedeckt und bezüglich seiner Struktur lichtmikroskopisch (Abschnitt 2.2.2.5) untersucht.

- Methode C: Makroskopische Untersuchung von Zäpfchen, die aus der physikalischen Mischung hergestellt wurden und somit als großes Modell der Lipidnanopartikel dienen. Die Zäpfchen wurden sowohl in trockener Umgebung als auch in Wasser (das Dispersionsmedium simulierend) gelagert und währenddessen makroskopisch untersucht.

Die Verhältnisse zwischen Menthol, festem und flüssigem Lipid sind für die einzelnen Formulierungen in Tabelle 3-1 aufgelistet.

Um die Ergebnisse der unterschiedlichen Lipid-Screenings auf ihre Aussagekraft hin zu untersuchen, wurden nachfolgend die entsprechenden SLN und NLC-Dispersionen (Zusammensetzung siehe Tabelle 3-1) via Heißhochdruckhomogenisation (Abschnitt 2.2.2.2) bei 55°C mit einem Druck von 500 bar, jeweils mit drei Zyklen, hergestellt. Für die hergestellten Partikel wurde die physikalische Stabilität durch Partikelgrößenanalyse (Abschnitt 2.2.2.3), ZP-Messungen (Abschnitt 2.2.2.4) und lichtmikroskopischer Analyse (Abschnitt 2.2.2.5) bestimmt.

Tabelle 3-1: Zusammensetzung der untersuchten SLN- und NLC-Reihen (Angaben in % (m/m))

Bezeichnung		Bestandteile der physikalischen Mischung			TEGO Care 450	ultra-gereinigtes Wasser
		Softisan 154	Menthol	Miglyol 812		
SLN-Reihe	SLN Sof100	10,0%	-	-	1,8%	88,2%
	SLN Sof80	8,0%	2,0%			
	SLN Sof70	7,0%	3,0%			
	SLN Sof50	5,0%	5,0%			
	SLN Sof30	3,0%	7,0%			
	SLN Sof10	1,0%	9,0%			
	SLN Sof0	-	10,0%			
NLC-Reihe	NLC Sof100	8,0%	-	2,0%	1,8%	88,2%
	NLC Sof80	6,4%	1,6%			
	NLC Sof70	5,6%	2,4%			
	NLC Sof50	4,0%	4,0%			
	NLC Sof30	2,4%	5,6%			
	NLC Sof10	0,8%	7,2%			
	NLC Sof0	-	8,0%			

Die Partikelgrößenanalyse wurde mittels LD und PCS am Tag der Herstellung (d0) sowie am Tag 1, 3, 7 und 14 nach der Herstellung und bei einer Lagerung in Raumtemperatur gemessen. Für die SLN-Dispersionen erfolgte am Tag 28 eine erneute Partikelgrößenanalyse. Die stabileren NLC-Dispersionen wurden ab dem 14. Tag einem sogenannten Stresstest unterzogen, um die Langzeitstabilität nach kurzer Zeit abschätzen zu können. Für den Stresstest wurden die 14 Tage alten NLC-Dispersionen in ihrem originalen Zustand, also ohne Verdünnung, in einem Schüttelinkubator bei 100 UpM, sieben Tage lang geschüttelt. Parallel zum Stresstest wurde die Partikelgrößenanalyse mittels LD durchgeführt.

3.1.3 Ergebnisse und Diskussion

3.1.3.1 Feste Lipidnanopartikel (SLN)

3.1.3.1.1 Konventionelle Lipid-Screenings mittels DSC

In Abbildung 3.1-1 sind die DSC-Thermogramme der physikalischen Mischungen dargestellt und in Tabelle 3-2 sind die entsprechenden Enthalpien zu sehen. Zu beachten ist, dass die physikalischen Mischungen bereits bei der Vorbereitung der Mischungen einmal schmolzen. Das heißt, dass die präsentierten Thermogramme den zweiten Aufheizkurven der physikalischen Mischungen entsprechen. Die DSC-Ergebnisse zeigen, dass das reine Softisan 154 (SLN Sof100) zwei polymorphe Modifikationen besaß. Die Schmelzpunkte dieser polymorphen Modifikationen wurden bei 50,0°C für die niedrig schmelzende Modifikation und bei 55,6°C für die hoch schmelzende Modifikation gemessen. Dieses Ergebnis stimmt mit den Angaben aus der Literatur überein (Dingler 1998). Die niedrig schmelzende Modifikation ist für ihre hohe Wirkstoff-Beladungskapazität und ihre thermodynamische Instabilität bekannt. Sie transformiert mit der Zeit in die thermodynamisch stabilere hoch schmelzende Modifikation. Bekannt ist, dass diese Transformation von einem Gelierungsprozess der Lipidnanopartikel-Dispersion begleitet wird (Westesen et al. 1993). Aufgrund des hohen Anteils der instabilen niedrig schmelzenden Modifikation in der physikalischen Mischung SLN Sof100 und der daher gegebenen Transformationsgefahr wurde erwartet, dass sich die homogenisierte Dispersion SLN Sof100 physikalisch instabil verhält und geliert.

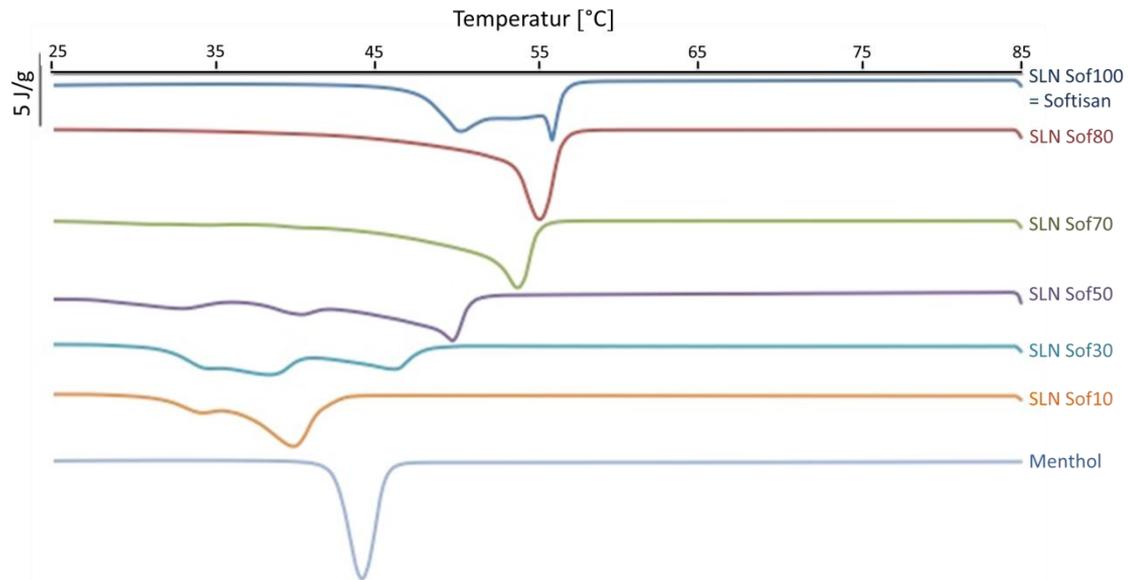


Abbildung 3.1-1: DSC-Thermogramme der physikalischen Mischungen der SLN-Reihe mit verschiedenen Mentholkonzentrationen, aufgenommen nach der Herstellung der Mischung bei 85°C und anschließendem Abkühlen auf 20°C. Heizrate: 10 K/min

Die physikalische Mischung SLN Sof80 bestand aus 80% Softisan und 20% Menthol (Angaben in % (m/m)). Die DSC-Kurve dieser Mischung besaß nur einen Schmelzpeak bei 54,7 C°. Dies bedeutet, dass die Wirkstoffzugabe die Bildung der niedrig schmelzenden Modifikation inhibiert. Die im Vergleich zur SLN Sof100 festgestellten Abnahme von Schmelztemperatur und Kristallinität (Tabelle 3-2) beweist, dass der Wirkstoff das Kristallgitter des Lipides stört. Diese Erkenntnis und das Fehlen eines freien Mentholpeaks (der etwa zwischen 33°C und 43°C zu beobachten wäre) belegen, dass der Wirkstoff Menthol bei einer SLN Sof80 Mischung komplett im Lipid gelöst vorliegt. Daher – und aufgrund des Fehlens der niedrig schmelzenden Modifikation – ist zu erwarten, dass sich die homogenisierte Dispersion SLN Sof80 physikalisch stabil verhält, nicht geliert und keine freien Mentholkristalle bildet.

Tabelle 3-2: Charakteristische DSC-Kenn Daten der physikalischen Mischungen der SLN-Reihe. Die Thermogramme der physikalischen Mischungen sind in Abbildung 3.1-1 zu finden.

Lipid-Mischung		SLN Sof100	SLN Sof80	SLN Sof70	SLN Sof50	SLN Sof30	SLN Sof10	Menthol
Peak No 1	Enthalpie [J/g]	41,95	147,48	122,68	77,80	44,01	83,02	88,45
	T _{onset} [C°]	52,01	52,67	50,26	44,94	38,15	35,40	42,25
	T _{peak} [C°]	55,66	54,74	53,43	49,58	46,07	39,58	43,55
Peak No 2	Enthalpie [J/g]	91,07		11,21	24,28	48,51	22,19	
	T _{onset} [C°]	47,19		29,59	36,50	27,75	31,29	
	T _{peak} [C°]	50,02		42,18	40,31	38,22	34,24	
Peak No 3	Enthalpie [J/g]			10,50	20,73	26,30		
	T _{onset} [C°]			25,83	27,20	24,18		
	T _{peak} [C°]			34,65	32,99	34,58		

Eine weitere Erhöhung des Mentholgehaltes führte zur weiteren Abnahme von Schmelztemperatur und Kristallinität (Tabelle 3-2). Obwohl die physikalische Mischung SLN Sof70 ähnlich wie die physikalische Mischung SLN Sof80 nur einen Haupt-Schmelzpeak besaß, wurden bei dieser Mischung zusätzliche Schmelzbereiche detektiert. Bei ihr waren die Schmelzbereiche mit einer kleinen Enthalpie verhältnismäßig breit. Diese Schmelzbereiche sind der instabilen Modifikation und dem nicht gelösten Menthol zuzuordnen. Sie konnten mit einem weiteren Anstieg des Mentholgehaltes (für die Mischungen SLN Sof50, SLN Sof30 und SLN Sof10) deutlicher und als Peaks detektiert werden. Aufgrund der Peaks, die die instabile Modifikation und das Auftreten von freiem Menthol belegen, war zu erwarten, dass die homogenisierten Dispersionen SLN Sof70, SLN Sof50, SLN Sof30 und SLN Sof10 nicht stabil sein werden.

3.1.3.1.2 Alternatives Lipid-Screening mittels Lichtmikroskopie

In Abbildung 3.1-2 sind die mikroskopischen Aufnahmen der physikalischen Mischungen zu sehen. Im Gegensatz zu den DSC-Ergebnissen sind die mikroskopischen Daten vergleichsweise leicht zu interpretieren. Bei der physikalischen Mischung SLN Sof100, also reinem Softisan 154, wurden große Kristallstrukturen gefunden. Die Zugabe des Wirkstoffes Menthol veränderte das Aussehen der Kristalle. Die physikalischen Mischungen SLN Sof80 und SLN Sof70 wiesen im Vergleich zu reinem Lipid feinere und kleinere Kristallstrukturen auf. Beginnend mit 50%igem Anteil des Wirkstoffes wurden bei den physikalischen Mischungen SLN Sof50, SLN Sof30 und SLN Sof10 freie Mentholkristalle erkannt. Sie belegten, dass sich das Menthol nicht vollständig gelöst hatte. Bei einem Vergleich zwischen den physikalischen Mischungen, die keine freien Mentholkristalle besaßen, war die feinste Struktur bei der Mischung SLN Sof70 zu erkennen.

Anhand dieser mikroskopischen Aufnahmen war zu erwarten, dass das Verhältnis der physikalischen Mischungen (SLN Sof50, SLN Sof30 und SLN Sof10), welche freie Mentholkristalle besitzen, zu instabilen homogenisierten Dispersionen führen. Grund hierfür ist die offensichtlich nicht erfolgreiche Einkapselung des Wirkstoffes.

Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass die Formulierungen mit 70% Softisan und 30% Menthol bzw. 80% Softisan und 20% Menthol zu physikalisch vergleichsweise stabilsten Dispersionen führen.

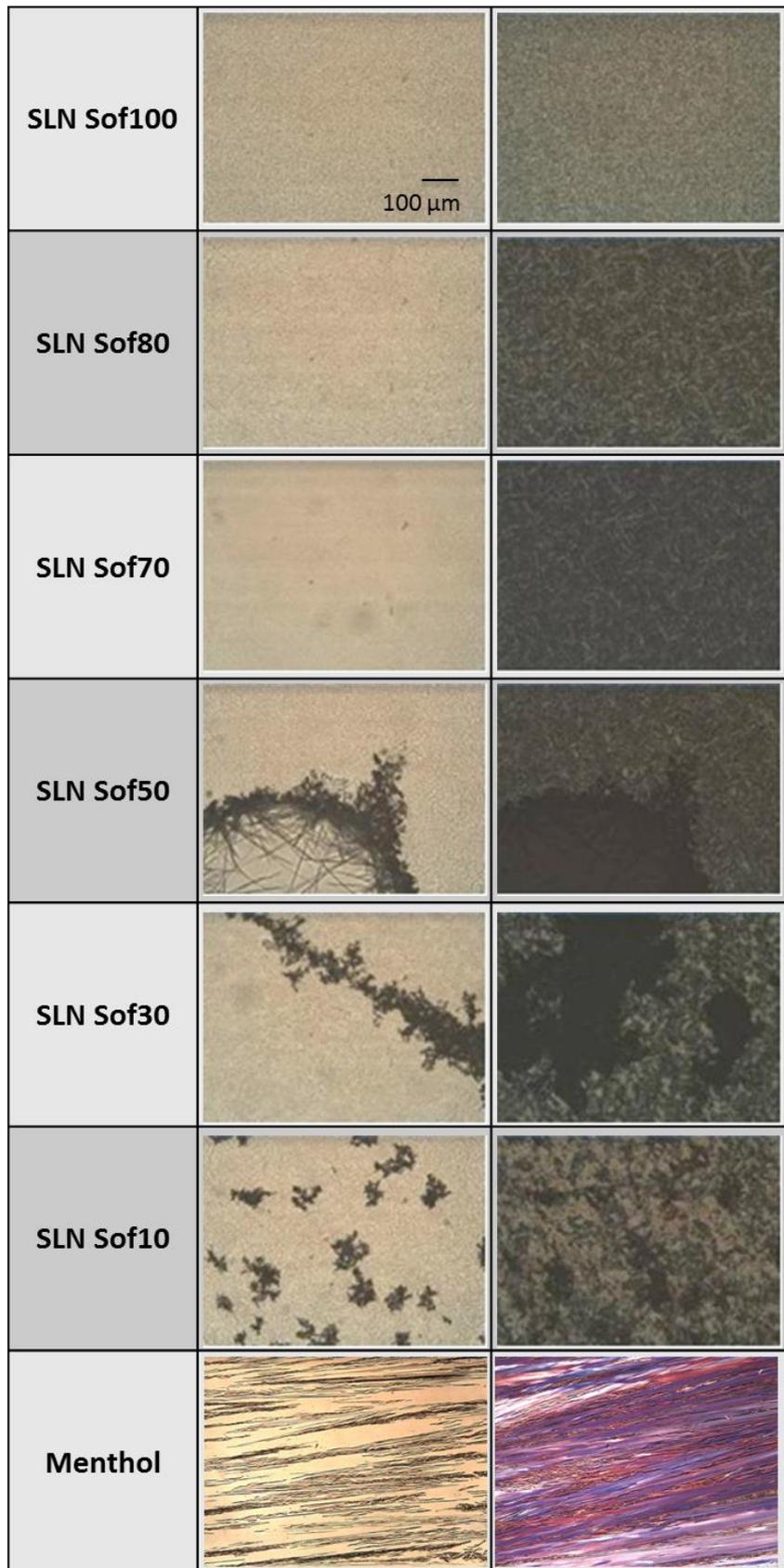


Abbildung 3.1-2: Mikroskopische Aufnahmen der physikalischen Mischungen der SLN-Reihe. Vergrößerung: 160-fach. Links: Lichtmikroskopische Aufnahmen. Rechts: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen

3.1.3.1.3 Simulation von dem Verhalten eines Teilchens im Dispersionsmedium

Abbildung 3.1-3 und Abbildung 3.1-4 zeigen die makroskopischen Aufnahmen der hergestellten Zäpfchen am Herstellungstag, einen Tag danach und nach zehn Wochen Lagerung. Zusätzlich sind jeweils Beschreibungen über den Zustand, sowohl für die trocken gelagerten als auch für die im Wasser gelagerten Zäpfchen, angegeben.

	SLN Sof100	SLN Sof80	SLN Sof70
am Tag der Herstellung			
	homogene, feste Masse	raue, flauschige Oberfläche transparente Hülle weißer Kern Mentholkristalle ausgetreten	feste, transparente Hülle weißer, pulveriger Kern Menthol tritt aus.
nach einem Tag im Vial			
	keine Veränderung	nadelförmige Mentholristalle nicht aufgequollen	nadelförmige Mentholristalle nicht aufgequollen
nach 10 Wochen			
	keine Veränderung	transparente Hülle transparenter innerer Kern weißer äußerer Kern	transparente Hülle transparenter innerer Kern weißer äußerer Kern
nach 10 Wochen im Vial			
	keine Veränderung	keine Veränderung	leicht aufgequollen

Abbildung 3.1-3: Makroskopische Aufnahmen der hergestellten Zäpfchen SLN Sof100, SLN Sof80 und SLN Sof70 am Tag der Herstellung, einen Tag danach und nach zehn Wochen Lagerung. Beschreibungen über den Zustand, sowohl für die trocken gelagerten als auch für die im Wasser gelagerten Zäpfchen

	SLN Sof50	SLN Sof30	SLN Sof10
am Tag der Herstellung			
	bröselige Oberfläche weißer, pulvriger Kern (>Sof SLN 70%)	homogene, marmorierte Masse	marmorierte, weiche Masse
nach einem Tag im Vial			
	aufgequollen	keine Veränderung	keine Veränderung
nach 10 Wochen			
	weiße, pulvrige Hülle transparenter Kern	weiße, pulvrige Masse	homogene, pulvrige Masse
nach 10 Wochen im Vial			
	stark aufgequollen	leicht aufgequollen	keine Veränderung

Abbildung 3.1-4: Makroskopische Aufnahmen der hergestellten Zäpfchen SLN Sof50, SLN Sof30 und SLN Sof10 am Tag der Herstellung, einen Tag danach und nach zehn Wochen Lagerung. Beschreibungen über den Zustand, sowohl für die trocken gelagerten als auch für die im Wasser gelagerten Zäpfchen

Die makroskopischen Beobachtungen zeigten, dass sich mit purem Lipid (SLN Sof100) homogene Zäpfchen gießen lassen. Die SLN Sof100-Zäpfchen zeigten in den beiden untersuchten Lagerungszuständen keine Veränderungen nach zehn Wochen.

Die Zugabe des Wirkstoffes Menthol änderte die Struktur der Zäpfchen. Eine deutliche Anlagerung von Menthol an der Zäpfchenoberfläche wurde für die Zäpfchen der physikalischen Mischungen SLN Sof80, SLN Sof70 und SLN Sof50 in trockener Lagerung einen Tag nach Herstellung beobachtet. Für die Zäpfchen der physikalischen Mischungen SLN Sof30 und SLN Sof10 wurden einheitliche Menthol-Kristallstrukturen beobachtet, die ähnlich der mentholhaltigen Oberfläche der oben genannten Zäpfchen waren.

Die eintägige Lagerung im Wasser führte zu keiner Veränderung in der Struktur der SLN Sof30-Zäpfchen und der SLN Sof10-Zäpfchen. Im Gegensatz dazu wurden nadelförmige Mentholkristalle für die Zäpfchen SLN Sof80 und SLN Sof70 beobachtet. Die interessanteste Beobachtung war die Aufquellung des SLN Sof50-Zäpfchens nach zehntägiger Lagerung.

Nach zehn Wochen wurden folgende Beobachtungen für die trocken gelagerten Zäpfchen gemacht: Die Oberflächen der Zäpfchen SLN Sof80, SLN Sof70 und SLN Sof50 bekamen einen transparenten inneren Kern. Außerdem wurde die transparente Hülle des SLN Sof50-Zäpfchens weißer und pulvriger. Diese weiße und pulvrige Masse wurde auch für die Zäpfchen SLN Sof30 und SLN Sof10 beobachtet. Während der zehnwöchigen Lagerung im Wasser wurden für die Zäpfchen SLN Sof80, Sof30 und Sof10 keine Veränderung beobachtet. Andererseits sind die Zäpfchen SLN Sof70 und SLN Sof50 aufgequollen, wobei die Aufquellung des SLN Sof50-Zäpfchens stärker war.

3.1.3.1.4 Partikelgrößenanalytik der hergestellten SLN-Dispersionen

Die Dispersionen SLN Sof30, SLN Sof10 und SLN Sof0 gelierten sofort nach der Homogenisierung, die Dispersion SLN Sof50 gelierte nach einem Tag Lagerung. Die Ergebnisse bezüglich der Teilchengröße der nicht gelierten Dispersionen (SLN Sof100, SLN Sof80 und SLN Sof70) sind in Abbildung 3.1-5 dargestellt. Am Tag der Herstellung betrug die mittlere Teilchengröße aller Dispersionen weniger als 200 nm und alle wiesen schmale PI-Werte auf, die kleiner als 0,2 waren. Wegen einer

instrumentellen Störung konnten die LD-Messungen am Tag der Herstellung nicht durchgeführt werden.

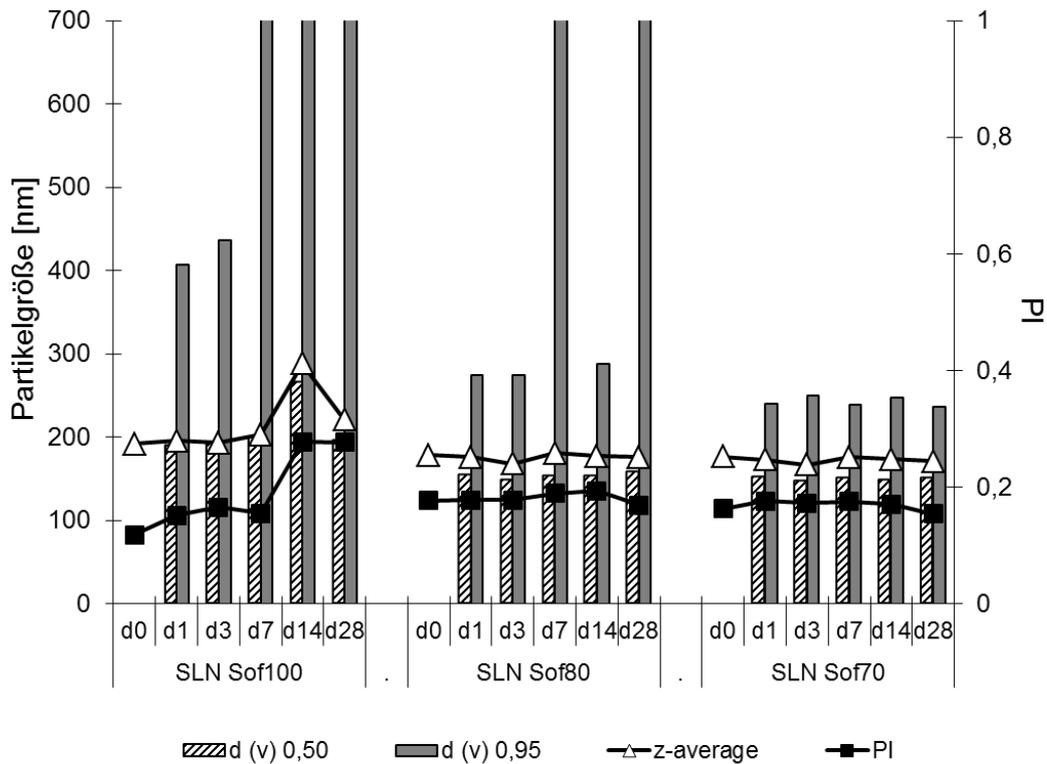


Abbildung 3.1-5: Partikelgrößen (PCS und LD) der hergestellten und nicht gelierten SLN-Dispersionen

Die negativen Oberflächenladungswerte waren für alle Dispersionen größer als -40 mV (Tabelle 3-3). Trotz dieser ausreichend hohen Oberflächenladungen, die im Allgemeinen Partikelagglomerationen inhibiert, wurden große d(v)0,95-Werte bei den Dispersionen SLN Sof100 und SLN Sof80 bereits am 7. Tag nach der Herstellung gemessen. Nur die Dispersion SLN Sof70 war länger als einen Monat stabil. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen bestätigten die Partikelgrößenergebnisse, die zuvor mittels PCS und LD gemessen wurden. Die mikroskopischen Aufnahmen der hergestellten Partikel sind in Abbildung 3.1-6 zu sehen.

Tabelle 3-3: ZP-Werte der hergestellten und nicht gelierten SLN-Dispersionen

Dispersion	SLN Sof100	SLN Sof80	SLN Sof70	SLN Sof50
Zetapotential [mV]	-48,8±1,3	-44,1±2,6	-46,3±5,0	-45,8±0,1

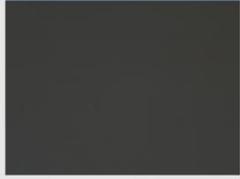
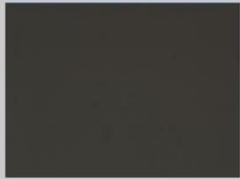
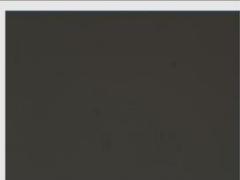
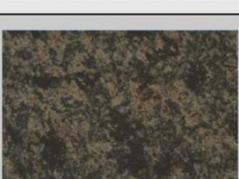
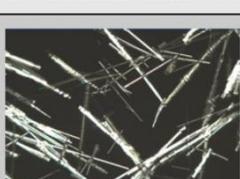
	pysikalische Mischungen		SLN-Dispersionen	
	ohne polarisiertes Licht	mit polarisiertem Licht	ohne polarisiertes Licht	mit polarisiertem Licht
SLN Sof100				
SLN Sof80				
SLN Sof70				
SLN Sof50				
SLN Sof30				
SLN Sof10				

Abbildung 3.1-6: Mikroskopische Aufnahmen der hergestellten SLN-Dispersionen im Vergleich zu den mikroskopischen Aufnahmen ihrer physikalischen Mischungen. Vergrößerung: 160-fach

3.1.3.1.5 Vergleich der Vorhersagekraft verschiedener Screening-Methoden

Im Gegensatz zu den DSC-Ergebnissen (Methode A) korrelieren die lichtmikroskopischen Ergebnisse (Methode B) mit den physikalischen Stabilitätsergebnissen aller hergestellten SLN-Dispersionen. Die Dispersionen der physikalischen Mischungen, welche ungelöste Mentholkristalle aufwiesen, gelierten

in kurzer Zeit. Die physikalische Mischung SLN Sof70, welche die feinste Struktur besaß, ergab tatsächlich die stabilste Dispersion.

Ein Vergleich zeigt, dass die Stabilitätsergebnisse der hergestellten Dispersionen nicht wie erwartet mit den DSC-Ergebnissen der physikalischen Mischungen korrelieren (Abschnitt 3.1.3.1.1). Die Gelierung der Dispersionen SLN Sof50, SLN Sof30 und SLN Sof10 korrelierte mit den DSC-Ergebnissen, da diese Mischungen einen eindeutigen Mentholpeak aufwiesen. Die aufgrund der DSC-Ergebnisse erwartete deutlich höchste Stabilität der Dispersion SLN Sof80 stimmte jedoch nicht mit der Realität überein – diese Dispersion war bereits am 7. Tag der Lagerung stark agglomeriert. Die Dispersion SLN Sof70 blieb hingegen über einen Monat stabil, was nicht der aus den DSC-Ergebnissen abgeleiteten Erwartung entspricht.

Die Beobachtungen an den hergestellten Zäpfchen (Methode C), die die Lipid-Partikel simulierten, korrelieren nicht vollständig mit den physikalischen Stabilitätsergebnissen der hergestellten SLN-Dispersionen. Beispielsweise zeigte das Zäpfchen SLN Sof100 während der Lagerung keine Veränderungen und blieb stabil, während die entsprechende Dispersion innerhalb von sieben Tagen agglomerierte. Hingegen stimmten die Beobachtungen an den Zäpfchen und die Ergebnisse der hergestellten Dispersionen in den Fällen SLN Sof50 und SLN Sof30 überein. Die beiden Zäpfchen waren im trockenen Zustand bröselig-pulvrig und im Wasser aufgequollen. Die entsprechenden Dispersionen gelierten bereits nach eintägiger Lagerung.

Darüber hinaus erwies sich die Zäpfchen-Methode als nützlich, um weitere Hinweise über die hergestellten Partikel zu erhalten. Die Beobachtungen zeigten, dass sich Menthol bevorzugt an der Oberfläche lokalisiert und während der Lagerung weiter nach außen drängt. Die visuellen Veränderungen der Zäpfchenform lassen morphologische Veränderungen der Partikel im Dispersionsmedium während der Lagerung vermuten.

3.1.3.2 Nanostrukturierte Lipid Carrier (NLC)

3.1.3.2.1 Konventionelles Lipid-Screening mittels DSC

In Abbildung 3.1-7 sind die DSC-Thermogramme der physikalischen Mischungen, die für die NLC-Formulierungen vorbereitet wurden, zu sehen und in Tabelle 3-4 die entsprechenden Enthalpien.

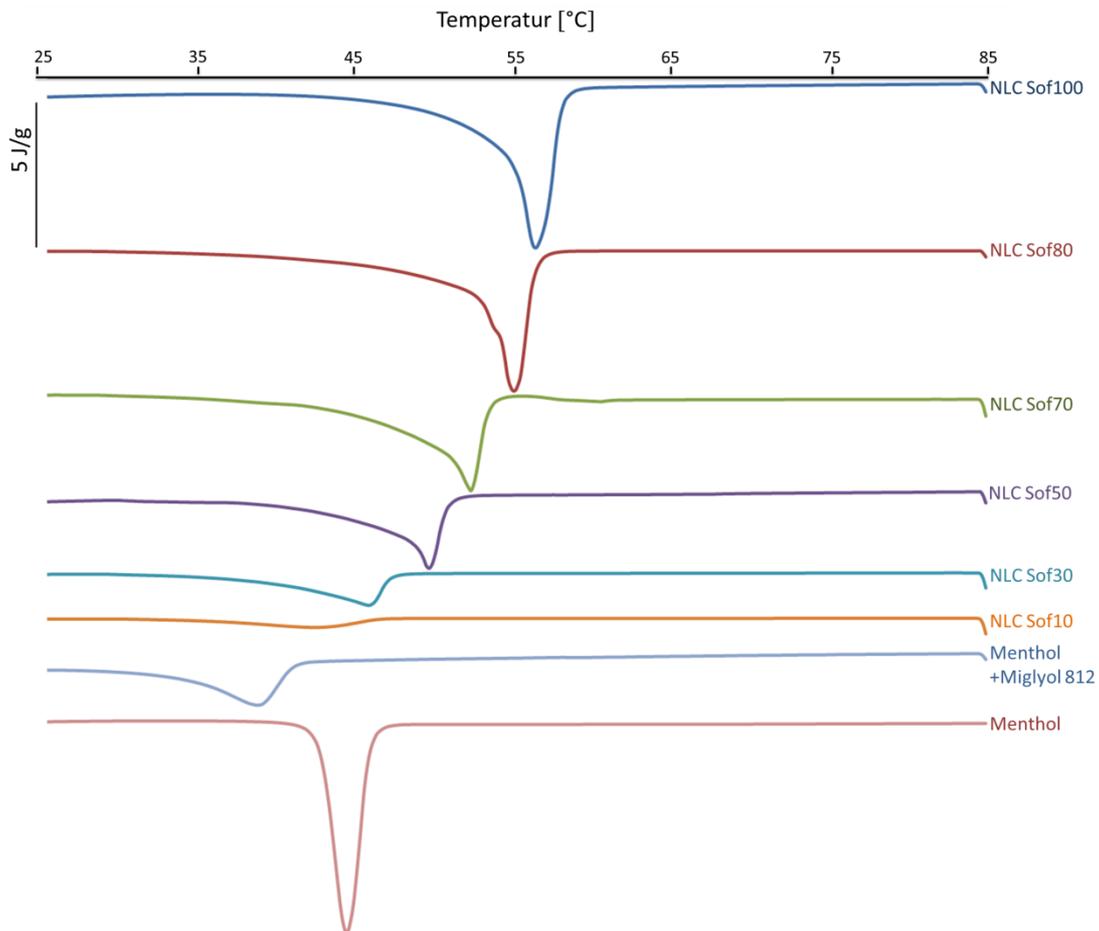


Abbildung 3.1-7: DSC-Thermogramme der physikalischen Mischungen der NLC-Reihe mit verschiedener Mentholkonzentration, aufgenommen nach der Herstellung der Mischung bei 85°C und anschließendem Abkühlen auf 20°C. Heizrate: 10 K/min

Die physikalische Mischung NLC Sof100, die eine Mischung aus festem und flüssigem Lipid (80% + 20%, (m/m)) ist, besaß nur die hoch schmelzende stabile Modifikation des festen Lipides. Die Zugabe des Wirkstoffes Menthol führte zur Abnahme des Schmelzpunktes und der Schmelzenthalpien. Für die in diesem Kapitel untersuchten Lipidmatrixen wurden keine freien Mentholpeaks detektiert. Dies lässt darauf schließen, dass das Menthol in der Lipidmatrix erfolgreich gelöst wurde. Die im Vergleich zu den physikalischen Mischungen der SLN-Reihe höhere Menthol-

Löslichkeit der physikalischen Mischungen der NLC-Reihe ist mit dem flüssigen Lipid zu begründen, welches ein zusätzliches Lösemedium für das Menthol bildet. Die physikalischen Mischungen NLC Sof30 und NLC Sof10 besaßen bereits im Ausgangszustand sehr niedrige Kristallinitäten. Es ist bereits bekannt, dass die Kristallinität der Lipidnanopartikel niedriger ist, als die der physikalischen Mischungen selbst und dass die somit niedrige Kristallinität der physikalischen Mischungen die „Supercooled melt“-Bildung begünstigt (Westesen et al. 1995). Anhand der DSC-Daten war daher zu erwarten, dass die Lipidnanopartikel aus den physikalischen Mischungen NLC Sof30 und NLC Sof10 nicht auskristallisieren und dass alle anderen Formulierungen stabile Lipidnanopartikel-Dispersionen ergeben.

Tabelle 3-4: Charakteristische DSC-Kenn Daten der physikalischen Mischungen der NLC-Reihe. Die Thermogramme der physikalischen Mischungen sind in Abbildung 3.1-7 zu finden.

Lipid-Mischung		NLC Sof100	NLC Sof80	NLC Sof70	NLC Sof50	NLC Sof30	NLC Sof10	Menthol+ Miglyol
Peak No 1	Enthalpie [J/g]	139,98	126,00	103,51	72,89	39,00	13,92	47,51
	T _{onset} [C°]	53,70	52,29	48,33	46,36	38,77	34,08	32,78
	T _{peak} [C°]	55,89	54,21	51,88	49,20	45,47	42,15	38,29

3.1.3.2.2 Alternative Lipid-Screenings mittels Lichtmikroskopie

Die mikroskopischen Aufnahmen der physikalischen Mischungen der NLC-Reihe sind in Abbildung 3.1-8 zu sehen. Die physikalischen Mischungen NLC Sof100, NLC Sof80 und NLC Sof70 besaßen eine homogene Struktur, welche für die Menthol enthaltenden Mischungen auf komplett gelöstes Menthol schließen lässt. Mit weiterer Zugabe des Wirkstoffes Menthol konnten Mentholkristalle mittels Lichtmikroskopie erkannt werden. Nach den mikroskopischen Untersuchungen war zu erwarten, dass für die aus den physikalischen Mischungen NLC Sof50, Sof30 und Sof10 hergestellten Dispersionen die Verkapselung des Menthols nicht erfolgreich stattfindet. Im Gegensatz dazu war aufgrund der mikroskopischen Aufnahmen für die physikalischen Mischungen NLC Sof100, Sof80 und Sof70 zu erwarten, dass die zugehörigen Dispersionen eine hohe Langzeitstabilität haben und dass sich das Menthol erfolgreich einkapseln lässt.

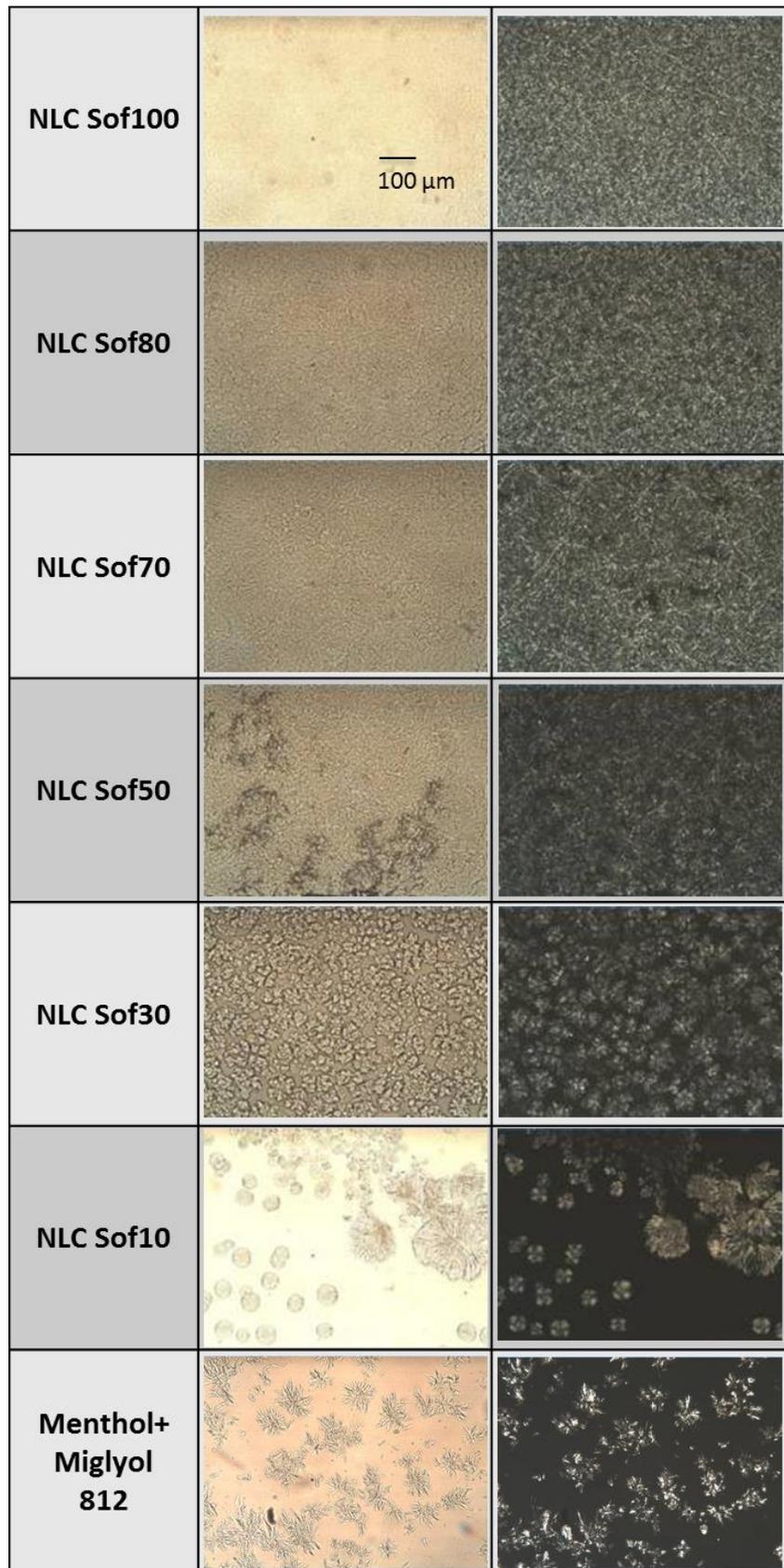


Abbildung 3.1-8: Mikroskopische Aufnahmen der physikalischen Mischungen der NLC-Reihe. Vergrößerung: 160-fach. Links: Lichtmikroskopische Aufnahmen. Rechts: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen

3.1.3.2.3 Simulation vom Verhalten eines Teilchens im Dispersionsmedium

Die Abbildung 3.1-9 und Abbildung 3.1-10 zeigt die makroskopischen Aufnahmen der Zäpfchen, die aus den physikalischen Mischungen der NLC-Reihe hergestellt wurden. Anders als die SLN-Zäpfchen, besaßen fast alle NLC-Zäpfchen eine homogene Struktur mit nachgiebiger Konsistenz. Am Tag der Herstellung wurde beobachtet, dass die Zugabe des Menthols keinen Strukturunterschied verursacht. Während der Lagerung wurde dann Austritt von Öl bei allen Zäpfchen beobachtet. Die NLC Sof100-Zäpfchen blieben auch nach zehn Wochen im Aussehen unverändert. Im Gegensatz dazu bekamen die NLC Sof80-Zäpfchen und die NLC Sof70-Zäpfchen eine glatte, transparente Hülle und einen pulvrigen Kern. Somit verhielten sich die NLC Sof80-Zäpfchen und die NLC Sof70-Zäpfchen genau umgekehrt zu den entsprechenden SLN-Zäpfchen. Dies ist mit dem Öl zu erklären, welches sich an der Oberfläche der Zäpfchens angereicht hat (Keck et al. 2013). Ab NLC Sof50 wurden die Zäpfchenmassen derart pulvrig, dass sie sich einfach zerdrücken ließen, um dann komplett zu Pulver zu zerfallen. Die im Wasser gelagerten Zäpfchen NLC Sof100, Sof80 und Sof70 zeigten während der zehnwöchigen Lagerung keine Veränderungen. Hingegen haben sich die Zäpfchen NLC Sof50, Sof30 und Sof10 während der Lagerung verformt. Die Stärke der Verformung hing dabei von der Konzentration des Wirkstoffes ab. Je höher der Mentholgehalt war, desto stärker war auch die Verformung.

	NLC Sof100	NLC Sof80	NLC Sof70
am Tag der Herstellung			
	weiche, homogene Masse	weiche Oberfläche weißer innerer Kern	weiche, spröde Masse
nach einem Tag im Vial			
	keine Veränderung	keine Veränderung	keine Veränderung
nach 10 Wochen			
	feste, homogene Masse Miglyol ausgetreten	glatte, transparente Hülle pulvriger Kern Miglyol ausgetreten	glatte, transparente Hülle pulvriger Kern Miglyol ausgetreten
nach 10 Wochen im Vial			
	keine Veränderung	keine Veränderung	keine Veränderung

Abbildung 3.1-9: Makroskopische Aufnahmen der hergestellten Zäpfchen NLC Sof100, NLC Sof80 und NLC Sof70 am Tag der Herstellung, einen Tag danach und nach zehn Wochen Lagerung. Beschreibungen über den Zustand, sowohl für die trocken gelagerten als auch für die im Wasser gelagerten Zäpfchen

	NLC Sof50	NLC Sof30	NLC Sof10
am Tag der Herstellung			
	weiche, homogene Masse	weiche, homogene Masse	homogene, marmorierte Masse
nach einem Tag im Vial			
	keine Veränderung	keine Veränderung	keine Veränderung
nach 10 Wochen			
	homogene, pulvrige Masse Miglyol ausgetreten	homogene, pulvrige Masse Miglyol ausgetreten	weiße, pulvrige Masse Miglyol ausgetreten
nach 10 Wochen im Vial			
	beginnt teilweise sich aufzulösen	leicht verformt Menthol ausgetreten	komplett verformt Miglyol ausgetreten

Abbildung 3.1-10: Makroskopische Aufnahmen der hergestellten Zäpfchen NLC Sof50, NLC Sof30 und NLC Sof10 am Tag der Herstellung, einen Tag danach und nach zehn Wochen Lagerung. Beschreibungen über den Zustand, sowohl für die trocken gelagerten als auch für die im Wasser gelagerten Zäpfchen

3.1.3.2.4 Partikelgrößenanalytik der hergestellten NLC-Dispersionen

Die Partikelgröße und die Oberflächenladung der hergestellten NLC-Dispersionen am Tag der Homogenisation sind in Abbildung 3.1-11 und Tabelle 3-5 zu sehen. Alle untersuchten Dispersionen bestanden ausschließlich aus submikronen Partikeln und hatten eine schmale Partikelgrößenverteilung ($<0,2$). Die Dispersion NLC Sof100 besaß mit 203 nm die größte mittlere Partikelgröße und die größten LD-Werte ($d(v)_{0,50} = 207$ nm und $d(v)_{0,95} = 488$ nm). Bis auf die Dispersion NLC Sof100 hatten alle anderen untersuchten Systeme einen ähnlichen $d(v)_{0,95}$ -Wert (ca. 300 nm). Die mittlere Partikelgröße der Dispersionen nahm mit Zunahme des Mentholgehaltes ab.

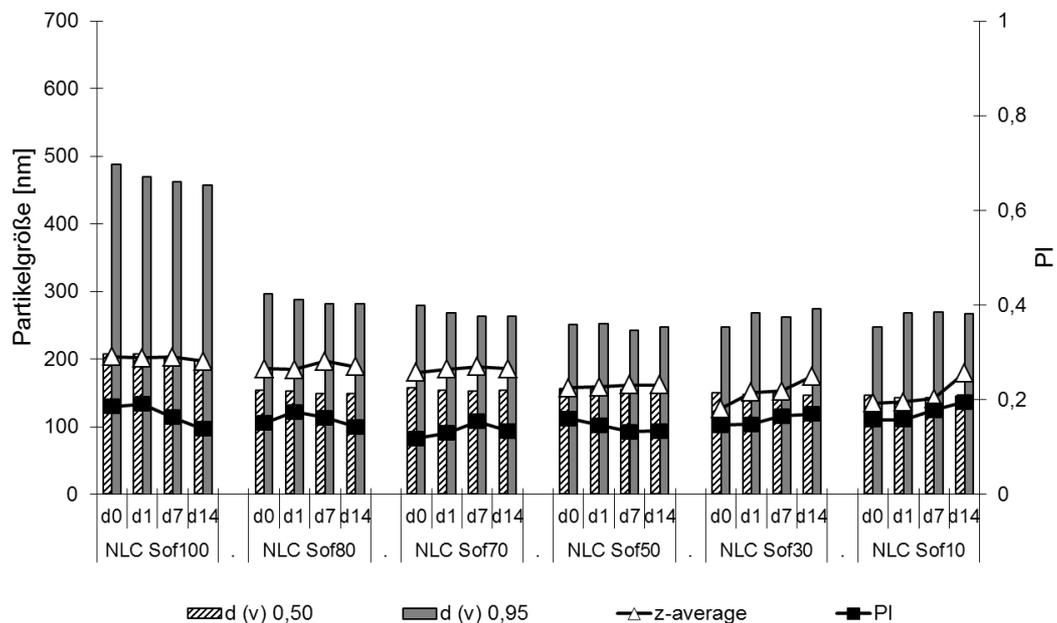


Abbildung 3.1-11: Partikelgrößen (PCS und LD) der hergestellten NLC-Dispersionen

Die negativen Oberflächenladungen aller Systeme waren größer als -45 mV und liegen damit im stabilen Bereich.

Tabelle 3-5: ZP-Werte der hergestellten NLC-Dispersionen

Dispersion	NLC Sof100	NLC Sof80	NLC Sof70	NLC Sof50	NLC Sof30	NLC Sof10	NLC Sof0 (Menthol+Miglyol 812)
Zetapotential [mV]	-53,5±4,2	-52,3±5,2	-50,4±2,4	-50,1±3,3	-47,3±0,8	-58,6±4,4	-72,5±5,9

NLC-Systeme besitzen im Allgemeinen eine höhere physikalische Stabilität als SLN-Systeme (Müller et al. 2011). Um in dieser Studie die Langzeitstabilität zu simulieren und um die für eine Auswertung notwendigen Daten in kurzer Zeit zu erhalten, wurde ein sogenannter Stresstest durchgeführt. Dafür wurden die hergestellten NLC-Dispersionen in ihrem originalen Zustand, also ohne Verdünnung, in einem Schüttelinkubator bei 100 UpM sieben Tage lang geschüttelt. Parallel zum Stresstest wurde die Partikelgrößenanalyse mittels LD durchgeführt. Die Ergebnisse des Stresstests der ersten 48 Stunden sind in Abbildung 3.1-12 dargestellt. Die Messwerte nach dem Stresstest zeigten keine Veränderungen gegenüber den Werten, die am Herstellungstag gemessen wurden. Aufgrund der LD-Werte würde man diese Dispersionen als stabil bezeichnen.

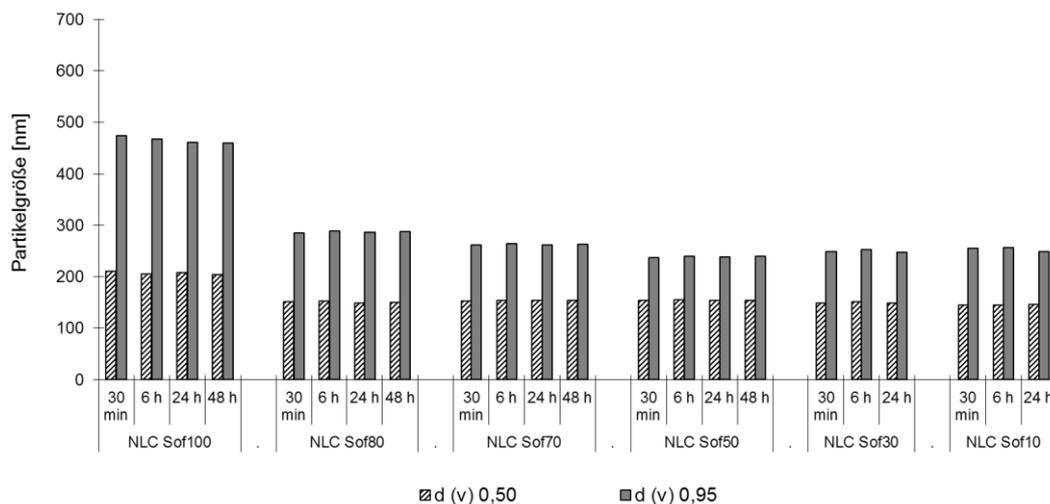


Abbildung 3.1-12: Partikelgrößen (LD) der hergestellten NLC-Dispersionen während des Stresstests

Um die gemessenen LD-Ergebnisse zu überprüfen, wurden für die Dispersionen zusätzliche mikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Wie bereits bekannt ist, hängen die LD-Messungen von vielen Parametern ab wie zum Beispiel der Rührgeschwindigkeit der Rührereinheit während der Messung und dem Instrument zur Probenahme ab (Kapitel 4.1). Daher sind für zuverlässige Ergebnisse zusätzliche mikroskopische Untersuchungen notwendig (Keck et al. 2008). Die mikroskopischen Aufnahmen, die während des Stresstests entstanden, sind in Abbildung 3.1-13 zu sehen. Sie zeigen, dass nach 30 Minuten Mentholkristalle bei den Dispersionen NLC Sof30 und NLC Sof10 austraten. Das heißt, dass diese Dispersionen nicht stabil waren, obwohl man dies aus den LD-Werten ablesen würde.

Diese Beobachtung belegt, dass die Partikelgrößenanalyse ohne zusätzliche mikroskopische Untersuchungen täuschen kann. Wahrscheinlich lässt das hohe Dispersionsvolumen des LD-Instrumentes Mentholkristalle auflösen, die bereits im Mikrometerbereich vorliegen. Somit konnten die Kristalle mittels LD nicht detektiert werden. Bei den restlichen gestressten Dispersionen NLC Sof100, NLC Sof80, NLC Sof70 und NLC Sof50 sind in den mikroskopischen Aufnahmen Agglomerationen erst am siebten Tag nach der Herstellung zu erkennen. Da ansonsten keine weiteren Unterschiede wie z. B. in der Stärke der Agglomeration zu erkennen sind, ist eine weitere Diskriminierung der betrachteten Dispersionen nicht möglich. Festzuhalten ist jedoch die im Vergleich zu den Dispersionen NLC Sof30 und NLC Sof10 höhere physikalische Stabilität der Dispersionen NLC Sof100, NLC Sof80, NLC Sof70 und NLC Sof50.

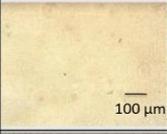
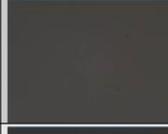
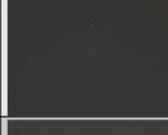
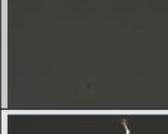
	physikalische Mischungen		NLC-Dispersionen beim Stesstest – nach 30 Minuten		NLC-Dispersionen beim Stesstest – nach 7 Tagen	
	ohne polarisiertes Licht	mit polarisiertem Licht	ohne polarisiertes Licht	mit polarisiertem Licht	ohne polarisiertes Licht	mit polarisiertem Licht
NLC Sof100						
NLC Sof80						
NLC Sof70						
NLC Sof50						
NLC Sof30					X	X
NLC Sof10					X	X

Abbildung 3.1-13: Mikroskopische Aufnahmen der hergestellten NLC-Dispersionen im Vergleich zu den mikroskopischen Aufnahmen ihrer physikalischen Mischungen. Vergrößerung: 160-fach

3.1.3.2.5 Vergleich der Vorhersagekraft verschiedener Screening-Methoden

Ein Vergleich zeigt, dass die Stabilitätsergebnisse der hergestellten Dispersionen und die DSC-Ergebnisse der physikalischen Mischungen (Methode A) nicht korrelieren. Die einzige nennenswerte Aussage, die aus den DSC-Ergebnissen abzuleiten ist, ist die Gefahr der möglichen Bildung von „Supercooled melts“ für die Formulierungen NLC Sof30 und NLC Sof10. Bezüglich der Stabilität der Dispersionen konnten aufgrund der DSC-Ergebnisse keine Aussagen getroffen werden.

Im Gegensatz zu den DSC-Ergebnissen korrelieren die lichtmikroskopischen Ergebnisse (Methode B) mit den physikalischen Stabilitätsergebnissen der hergestellten NLC Dispersionen recht gut. Bei den physikalischen Mischungen, welche ungelöste Mentholkristalle aufwiesen, traten auch bei den zugehörigen Dispersionen nach 30-minütigem Stresstest Mentholkristalle auf.

Eine Ausnahme gab es jedoch. Obwohl die physikalische Mischung NLC Sof50 ungelöstes Menthol aufwies, besaß die hergestellte Dispersion NLC Sof50 eine ähnliche Stabilität wie die anderen stabilen Dispersionen (NLC Sof80 und NLC Sof70), deren physikalischen Mischungen das Menthol hervorragend gelöst hatten. Die gute Stabilität der Dispersion NLC Sof50 ist wahrscheinlich mit dem Mentholverlust zu erklären, welcher während des langen Homogenisationsprozesses entstehen konnte. Eine weitere Erklärung könnte das in der Wasserphase gelöste Menthol sein. Durch die Homogenisation und durch die Löseprozesse in der Wasserphase könnte die tatsächliche Konzentration des Menthols derart verringert worden sein, dass die gesamte Menge des Arzneistoffes in der Lipidmatrix erfolgreich gelöst wurde.

Ein Vergleich zwischen den hergestellten Zäpfchen (Methode C) und den Dispersionen zeigt, dass die Beobachtungen der Zäpfchen gut mit den Stabilitätsergebnissen der NLC-Dispersionen korrelieren. Bei den Zäpfchen, welche bröselig und pulvrig waren, traten auch bei den zugehörigen Dispersionen nach 30-minütigem Stresstest Mentholkristalle auf. Mit der gleichen Begründung wie bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen stellte auch hier die Dispersion NLC Sof50 eine Ausnahme dar.

3.1.4 Zusammenfassung des Abschnitts

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die DSC-Methode für das Lipid-Screening in der frühen Phase der Formulierungsentwicklung weniger geeignet ist als allgemein angenommen. Für die Löslichkeitsuntersuchungen des Wirkstoffes in der Lipidphase ist DSC vergleichsweise teuer und schwieriger zu interpretieren. Außerdem erwies sich die DSC-Methode für die Vorhersage der Stabilität der hergestellten Dispersion als nicht zuverlässig.

Die Mikroskop-Methode hingegen ist leicht vorzubereiten, kostet weniger und benötigt weniger Zeit. Sie ist eine nützliche Methode für das Lipid-Screening. Ihre Ergebnisse sind im Vergleich zur DSC-Methode zuverlässiger und erlauben eine Vorhersage über die Stabilität der Lipidnanopartikel-Dispersionen.

Die Zäpfchen-Methode ist ebenso leicht vorzubereiten. Jedoch benötigt sie eine relativ große Stoffmenge. Dies stellt einen Nachteil besonders bei teureren Wirkstoffen dar. Sie ist auch eine nützliche Methode für das Lipid-Screening wie die Mikroskop-Methode. Auch wenn diese Methode keine absolut zuverlässige Vorhersage über die Stabilität der Lipidnanopartikel-Dispersionen zulässt, so liefert sie dennoch konstruktive Informationen wie z. B. über die Lage des beladenen Stoffes in dem Partikel.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist das Lipid-Screening mittels Lichtmikroskopie zu empfehlen. Die neue Zäpfchen-Methode erwies sich als hilfreich, ist aber verbesserungsbedürftig.

3.2 Tensid-Screening mittels Kontaktwinkel-Untersuchungen

3.2.1 Einleitung und Zielsetzung des Abschnitts

Nach Wahl der geeigneten Lipidkomponenten besteht die nächste Stufe der Rezepturoptimierung in der Auswahl der geeigneten Tenside. Eine kostengünstige Möglichkeit für das Tensid-Screening ist die Kontaktwinkelmessung via Goniometer (Pardeike 2009, Al Shaal 2011). Für die goniometrischen Messungen steht jedoch keine Standardmethode zur Verfügung, da die Tenside verschiedene Löslichkeits- und Dispergiereigenschaften im Wasser bzw. im Lipid aufweisen. Die Proben für die goniometrischen Messungen können z. B. mit der englischen Methode oder mit der kontinentalen Methode (jeweils bekannt aus der Herstellung von Emulsionen) vorbereitet werden (Bultmann 2003).

Das Ziel in diesem Teil der Arbeit war es, zu untersuchen, welche der beiden Vorbereitungsmethoden zuverlässigere Ergebnisse beim Tensid-Screening liefert.

3.2.2 Materialien und Methoden

Die goniometrische Kontaktwinkelmessungen wurden mittels eines Goniometer G1 (Krüss, Deutschland) für folgende Tenside durchgeführt: Inutec SP1, PLANTACARE 2000, Pluronic F68, TEGO Care 450, Tween 80. Gemäß der englischen Methode wurden die Tenside (1% m/m) in der äußeren Phase (im Wasser), je nach vorliegender Löslichkeit, entweder gelöst oder dispergiert. Im Gegensatz dazu wurden bei der kontinentalen Methode die Tenside in der inneren Phase (in der Lipidmatrix) gelöst oder dispergiert. Die Tabelle 3-6 vergleicht die englische und kontinentale Methode bezüglich der Testflüssigkeit und der Testoberfläche.

Die Untersuchungen wurden wie folgt durchgeführt: Um eine glatte Testoberfläche zu erhalten wurde die geschmolzene Mischung der Lipidmatrix-Komponenten auf einen Objekträger getropft und es wurde gewartet, bis sie sich vollständig verfestigte. Danach wurde die hergestellte Testflüssigkeit auf die Testoberfläche getropft. Da sich dabei die Testflüssigkeit abhängig von der Tropfzeit zu den Rändern ausbreitet, wurde der Kontaktwinkel konstant fünf Sekunden nach dem Auftropfen ($n = 3$) ermittelt. Um die Ergebnisse der jeweiligen Kontaktwinkelmessungen interpretieren zu können, wurden die Löslichkeitseigenschaften der Tenside während der Probenvorbereitung dokumentiert.

Um die Aussagekraft der Kontaktwinkelmessung als Tensid-Screening für beide Fälle zu überprüfen, wurden jeweils die entsprechenden NLC-Dispersionen mittels heißer Hochdruckhomogenisation hergestellt. Dafür wurde folgende Rezeptur verwendet: * 10,2% Softisan 154, * 6,8% Miglyol 812, * 3,0% Menthol, * 1,0% Emulgator und * 79,0% ultra-gereinigtes Wasser (Angaben in % (m/m)). Die Produktionsparameter für die Hochdruckhomogenisation waren: 60°C, 800 bar und zwei Zyklen. Nach der Herstellung wurden die NLC-Dispersionen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Eigenschaften der verschiedenen NLC-Dispersionen, wie Partikelgröße, physikalische Langzeitstabilität und Zetapotential wurden am Tag der Herstellung und am Tag 7, 30, 90, 180 und 360 nach der Herstellung untersucht. Die Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen der Kontaktwinkelmessungen auf Korrelation verglichen.

Tabelle 3-6: Zusammensetzung der Testflüssigkeit und Testoberfläche nach Vorbereitungsmethode

Vorbereitungsmethode	Testflüssigkeit	Testoberfläche
englische Methode	Wasser+Tensid 1% (m/m)	Lipidphase der Lipidnanopartikel (fest- und flüssige Lipid + Menthol)
kontinentale Methode	Wasser	Lipidphase der Lipidnanopartikel + Tensid 1% (m/m)

3.2.3 Ergebnisse und Diskussion

3.2.3.1 Löslichkeitsverhalten der Tenside

Die Löslichkeitseigenschaften der Tenside waren unterschiedlich. Während PLANTACARE 2000 und Tween 80 sowohl im Wasser als auch in Lipid gut löslich waren, löste sich Inutec SP1 in beiden Phasen nicht. Pluronic F68 löste sich gut im Wasser. Im Lipid ließ es sich nicht lösen. TEGO Care 450 hingegen war nur in der Lipidphase löslich.

3.2.3.2 Untersuchung der Kontaktwinkel

Die Ergebnisse der Kontaktwinkel-Untersuchungen, die in Tabelle 3-7 gelistet sind, zeigen, dass die englische und die kontinentale Methode zu unterschiedlichen Kontaktwinkeln führen und damit keine einstimmige Aussage zulassen.

Tabelle 3-7: Kontaktwinkelwerte der untersuchten Tenside sowie deren Löslichkeitsverhalten. Verglichen mit der Partikelgröße und den ZP-Ergebnissen der mit den untersuchten Tensiden stabilisierten Lipidnanopartikel

Tensid	Löslichkeit		Kontaktwinkel [°]		Partikelgröße [nm]		Zetapotential [mV]	
	in Wasserphase	in Lipidphase	englische Methode	kontinentale Methode	z-average	d(v)0,95	im destillierten Wasser (Leitfähigkeit= 50 µS/cm)	im Originalmedium
Inutec SP1	-	-	90	105	209	2209	-24,8	-11,4
PLANTACARE 2000	+	+	48	58	265	1167	-42,6	-29,7
Pluronic F68	+	-	86	114	384	2838	-23,9	-25,5
TEGO Care 450	-	+	90	9	232	622	-50,5	-76,4
Tween 80	+	+	75	98	471	844	-19,3	-12,9

Dieser Befund ist besonders wichtig, da in einigen Studien (Joshi et al. 2008b, Al Shaal 2011) die Art der Vorbereitung der Proben nicht erwähnt wurde und damit ein Vergleich der publizierten Ergebnisse nicht möglich ist. Die Korrelation zwischen den Ergebnissen der Kontaktwinkelmessungen und den Löslichkeitsuntersuchungen belegt einen Zusammenhang zwischen der Probenvorbereitungsmethode und den Löslichkeitseigenschaften der Tenside. Die Tenside, die ein ähnliches Löslichkeitsverhalten in beiden Phasen besitzen, führen zu ähnlichen Kontaktwinkeln sowohl mit der englischen als auch mit der kontinentalen Methode. Im Gegensatz dazu wurden enorme Unterschiede für die Tenside gemessen, die entweder nur im Wasser oder nur in der Lipidphase löslich sind. Für TEGO Care 450 ergab sich zwischen der englischen und der kontinentalen Methode ein Kontaktwinkelunterschied von 80°.

Die Kontaktwinkel, die nach Anwendung der englischen Methode gemessen wurden, lassen erwarten, dass die NLC-Dispersion, welche mit dem Tensid PLANTACARE 2000 stabilisiert wurde, die besten Eigenschaften wie kleinste Partikelgröße und höchste physikalische Stabilität besitzen wird. Für PLANTACARE 2000 wurde mit 48° der kleinste Kontaktwinkel gemessen. Die NLC-Dispersionen, die mit TEGO Care 450 oder Inutec SP1 stabilisiert wurden, lassen deutlich schlechtere Eigenschaften erwarten, da ihre Kontaktwinkel mit über 90° gemessen wurden.

Die kontinentale Methode lässt im Gegensatz zur englischen Methode erwarten, dass TEGO Care 450 das am besten geeignete Tensid für die in dieser Studie untersuchte Rezeptur ist. Es ergab sich hier ein Kontaktwinkel von 9°.

3.2.3.3 Partikelgrößenanalytik der hergestellten Lipidnanopartikel-Dispersionen

Die mittleren Teilchengrößen aller hergestellten NLC-Proben lagen zwischen 209 nm (Inutec SP1) und 471 nm (Tween 80). Jedoch wurden größere Partikel oder Agglomerate bei den Inutec SP1- und Pluronic F68-Proben gefunden. Sie wurden mit Hilfe von LD-Messungen festgestellt. Für die mit TEGO Care 450 stabilisierte Dispersion wurde der niedrigste $d(v)_{0,95}$ -Wert gefunden.

Das Zetapotential, welches ein Maß für die Oberflächenladung darstellt, ist ein Frühindikator für die physikalische Stabilität der kolloidalen Systeme und stark abhängig vom Stabilisator. Die ionischen Tenside beugen mit Hilfe der Oberflächenladung einer Agglomeration der Partikel vor und stabilisieren so das System. Die nicht-ionischen Tenside erreichen dies durch eine sterische Stabilisierung der Partikel (Müller 1996). Für die ionischen Tenside weist ein ZP-Wert ab ± 30 mV auf eine gute physikalische Stabilität der Teilchen hin. Dieser optimale Wert gilt nicht für die nicht-ionischen Tenside. Um die sterische Stabilität zu untersuchen, werden ZP-Messungen nicht nur in destilliertem Wasser mit einer Leitfähigkeit von 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ durchgeführt, sondern auch im Originaldispersionsmedium. Dabei wird die Dicke der Surfactant-Schicht untersucht.

Die ZP-Ergebnisse sind in Tabelle 3-7 aufgeführt. Die mit TEGO Care 450 stabilisierte Dispersion wies die höchsten ZP-Werte auf. Sie wurden sowohl im Wasser als auch im Originalmedium mit mehr als -50 mV gemessen. Auch für das System mit PLANTACARE 2000, für das die zweithöchsten ZP-Werte gemessen wurden, ist eine sehr gute physikalische Stabilität zu erwarten. Die Ergebnisse zur Untersuchung der physikalischen Langzeitstabilität der Partikel (Abbildung 3.2-1) bestätigen diese Annahme.

Die physikalisch stabilsten Teilchen wies die mit TEGO Care 450 stabilisierte NLC-Dispersion auf. Sie zeigte weder ein Partikelgrößenwachstum noch Agglomeration über einen Zeitraum von 18 Monaten. Die zweitbeste physikalische Stabilität war bei der mit PLANTACARE 2000 stabilisierten NLC-Dispersion zu beobachten. Sie wies erst zum letzten Messzeitpunkt, nach 18 Monaten, Agglomerationen auf.

Unzureichende physikalische Stabilitäten ergaben sich für die Systeme, die mit Tween 80, Inutec SP1, Pluronic F68 stabilisiert wurden.

Ein Vergleich zeigt (Tabelle 3-7), dass die Partikelgrößen und die Kontaktwinkel, die im Fall der kontinentalen Methode gemessen wurden, stark miteinander korrelieren. Der niedrigste Kontaktwinkel (9°) und damit die höchste Affinität des Stabilisators für die Partikeloberfläche wurden für TEGO Care 450 beobachtet. Das zweitbeste Tensid war PLANTACARE 2000.

Die Langzeitstabilitätsergebnisse der Dispersionen bestätigten die Ergebnisse der Kontaktwinkel-Untersuchungen, die nach Anwendung der kontinentalen Methode gemessen wurden. Gleichzeitig führen die Stabilisatoren mit einem Kontaktwinkelwert von über 90° zu großen Partikeln oder zu Agglomeraten in den Dispersionen und folglich zu physikalischen Instabilitäten.

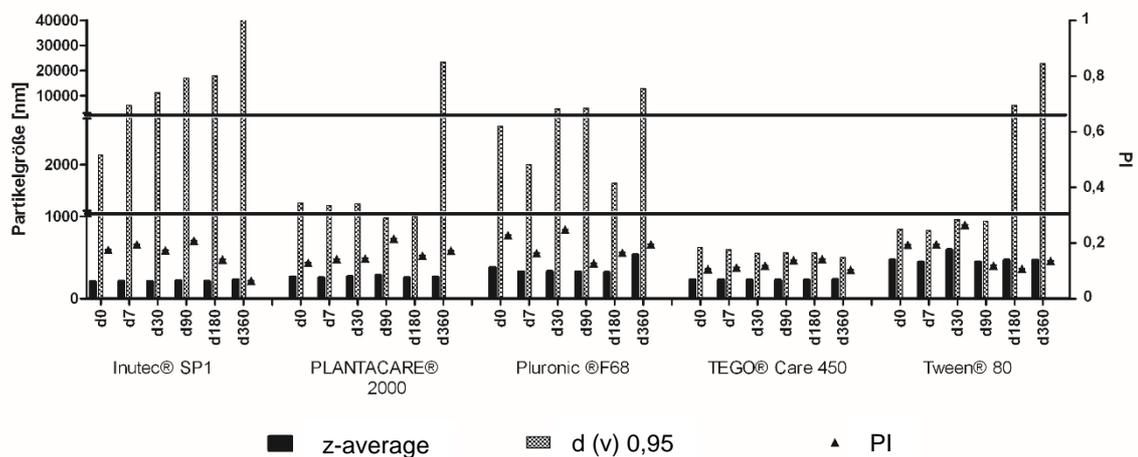


Abbildung 3.2-1: Partikelgrößen (PCS und LD) der hergestellten NLC-Dispersionen während der einjährigen Lagerung

3.2.4 Zusammenfassung des Abschnitts

Rückblickend kann festgehalten werden, dass die Kontaktwinkelmessungen in Abhängigkeit von der jeweiligen Probenvorbereitungsmethode zu unterschiedlichen Ergebnissen führen, aus denen sich keine übereinstimmenden Aussagen ableiten lassen. Die Angabe der verwendeten Vorbereitungsmethode ist damit eine Mindestvoraussetzung für die Vergleichbarkeit verschiedener Ergebnisse von Kontaktwinkelmessungen. Die Ergebnisse unter Verwendung der kontinentalen Methode korrelierten in dieser Studie am stärksten mit den Stabilitätseigenschaften der hergestellten Partikel und sind damit gegenüber der Ergebnisse unter Anwendung

der englischen Methode aussagekräftiger. Die Kontaktwinkelmessung unter Anwendung der kontinentalen Methode zeigt sich als ein nützliches Instrument, um bereits in einem frühen Stadium der Formulierungsentwicklung die Eignung verschiedener Tenside für die Stabilisierung von NLC-Dispersionen vorherzusagen.

4 Optimierte Charakterisierung der Lipidnanopartikel

4.1 Partikelgrößenanalytik mittels Laserdiffraktometrie

4.1.1 Einleitung und Zielsetzung des Abschnitts

Die Laserdiffraktometrie ist eine der Methoden zur Partikelgrößenanalyse, die heutzutage routinemäßig zur Charakterisierung kolloidaler Lipid-Dispersionen eingesetzt werden. Die Vorteile dieses Verfahrens wurden bereits in Abschnitt 1.1.5.3 benannt. Zusätzlich besitzt die Laserdiffraktometrie zahlreiche mögliche Fehlerquellen, die bereits in früheren Studien untersucht wurden (Abschnitt 1.1.5.3, Keck 2006, Keck et al. 2008, Keck 2010).

In diesem Teil der Arbeit sollte die Partikelanalyse mittels Laserdiffraktometrie auf weitere mögliche Fehlerquellen untersucht werden. Dazu wurden die einzelnen Schritte des Messverfahrens kritisch analysiert. Insbesondere wurden wiederkehrende Schritte im Messprozess genauer beobachtet. Als Ergebnis wurden die folgenden kritischen Punkte identifiziert:

- Instrumente zur Probenahme: Verwendung von verschiedenen Pipettenarten
- Rührgeschwindigkeit während der Messung: Anwendung sich variierender Rührgeschwindigkeiten mit oder ohne Ultraschall

Diese Parameter und ihre möglichen Einflüsse auf die Partikelgrößenergebnisse wurden systematisch untersucht.

4.1.2 Materialien und Methoden

Die Optimierung der Partikelgrößenanalytik mittels Laserdiffraktometrie wurde mit verschiedenen NLC-Dispersionen als Proben durchgeführt, deren Zusammensetzungen in Tabelle 4-1 aufgelistet sind. Sie wurden mit Heißhochdruck-homogenisation hergestellt und nach einer lichtmikroskopischen Untersuchung in Gruppen eingeteilt (siehe *Ergebnisse*, Abschnitt 4.1.3). Im Anschluss wurden die Partikelgrößenanalysen mittels PCS und LD durchgeführt.

Tabelle 4-1: Zusammensetzung der untersuchten Dispersionen (Angaben in % (m/m))

	Bezeichnung	festes Lipid		Menthol	Miglyol 812	Emulgator	
Gruppe A	A1	Softisan 154	10,0%	8,0%	4,0%	TEGO Care 450	1,8%
	A2	Dynasan 118	7,0%	7,0%	6,0%	TEGO Care 450	1,8%
	A3	Dynasan 118	8,0%	6,0%	6,0%	TEGO Care 450	1,8%
	A4	Dynasan 118	9,0%	7,0%	4,0%	TEGO Care 450	1,8%
	A5	Softisan 154	10,2%	6,8%	3,0%	TEGO Care 450	1,0%
	A6	Softisan 154	10,2%	6,8%	3,0%	Tween 80	1,0%
	A7	Softisan 154	10,0%	8,0%	2,0%	PLANTACARE 2000	1,8%
	A8	Softisan 154	10,2%	6,8%	3,0%	PLANTACARE 2000	1,0%
	A9	Dynasan 118	9,0%	9,0%	2,0%	PLANTACARE 2000	1,8%
	A10	Softisan 154	7,0%	0,0%	3,0%	TEGO Care 450	1,8%
Gruppe B	B1	Softisan 154	10,0%	8,0%	2,0%	TEGO Care 450	1,8%
	B2	Dynasan 118	10,0%	8,0%	2,0%	TEGO Care 450	1,8%
	B3	Dynasan 118	9,0%	9,0%	2,0%	TEGO Care 450	1,8%
	B4	Dynasan 118	8,0%	8,0%	4,0%	TEGO Care 450	1,8%
	B5	Softisan 154	8,0%	0,0%	2,0%	TEGO Care 450	1,8%
Gruppe C	C1	Softisan 154	10,2%	6,8%	3,0%	Pluronic F68	1,0%
	C2	Softisan 154	10,2%	6,8%	3,0%	Inutec SP1	1,0%
	C3	Softisan 154	10,0%	0,0%	0,0%	TEGO Care 450	1,8%

Zur Probenahme wurden Eppendorf-Pipetten (Modell: Research[®], 10-100 µl; Eppendorf AG, Deutschland) mit gelben universal Pipettenspitzen (Mund-Durchmesser: 0,52 mm; VWR International GmbH, Deutschland) und Pasteur-Pipetten (Mund-Durchmesser: ca. 1,50 mm, aus Polyethylen mit niedriger Dichte (LDPE), Modell: High Performance, Allzweck-, VWR International GmbH, Deutschland) verwendet (Abbildung 4.1-1).



Abbildung 4.1-1: Instrumente zur Probenahme. A: Eppendorf-Pipette, B: Pasteur-Pipette

Die als mögliche Fehlerquellen identifizierten Messbedingungen wie Probenahme, Rührgeschwindigkeit und Ultraschall wurden während der Studie variiert.

4.1.2.1 Einfluss der Instrumente zur Probenahme auf die LD-Ergebnisse

Hierfür wurden die Proben (A10, B4, C3) mit Standard-Messbedingungen gemessen: vier kontinuierliche Messungen in gereinigtem Wasser, eine Rotationsgeschwindigkeit von 2975 UpM, Anwendung des Blaulicht-Detektionssystems und keine Ultraschallbehandlung (vor oder während der Messung). Die Proben wurden je einmal mit einer Eppendorf-Pipette und einmal mit einer Pasteur-Pipette dispensiert.

4.1.2.2 Einfluss von Rührgeschwindigkeit und Ultraschall während der Messung auf die LD-Ergebnisse

Die Proben (A1 bis A9, B1-B4, C1 und C2) wurden ausschließlich unter Verwendung einer Eppendorf-Pipette dispensiert. Das Rühren während der Messung wurde wie folgt variiert:

- Methode 1 (M1): Rührgeschwindigkeit von 1085 UpM, ohne Ultraschallbehandlung
- Methode 2 (M2): Rührgeschwindigkeit von 2975 UpM, ohne Ultraschallbehandlung
- Methode 3 (M3): Rührgeschwindigkeit von 2975 UpM, mit Ultraschallbehandlung

Wenn nicht anders erwähnt, so ist das Ergebnis einer Probe als Mittelwert von vier aufeinanderfolgenden Messungen angegeben.

4.1.3 Ergebnisse und Diskussion

4.1.3.1 Einfluss der Instrumente zur Probenahme auf die LD-Ergebnisse

4.1.3.1.1 Lichtmikroskopie und Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)-Analysen
In diesem Teil der Studie wurden die Proben A10, B5 und C3 aus Tabelle 4-1 verwendet. Die mikroskopischen Aufnahmen der Proben sind in Abbildung 4.1-2 zu sehen. Die Probe A10 besaß keine μm -Partikel und wies keine Agglomerationen auf. Im Gegensatz dazu besaß die Probe B5 leichte Agglomerationen, welche mit 160-facher Vergrößerung nicht sichtbar waren und erst durch zusätzliche Vergrößerungen detektiert wurden (siehe rote Pfeile in Abbildung 4.1-2). Deutlich erkennbare und

starke Agglomerationen, welche größer als 200 μm waren, wurden in der Probe C3 gefunden.

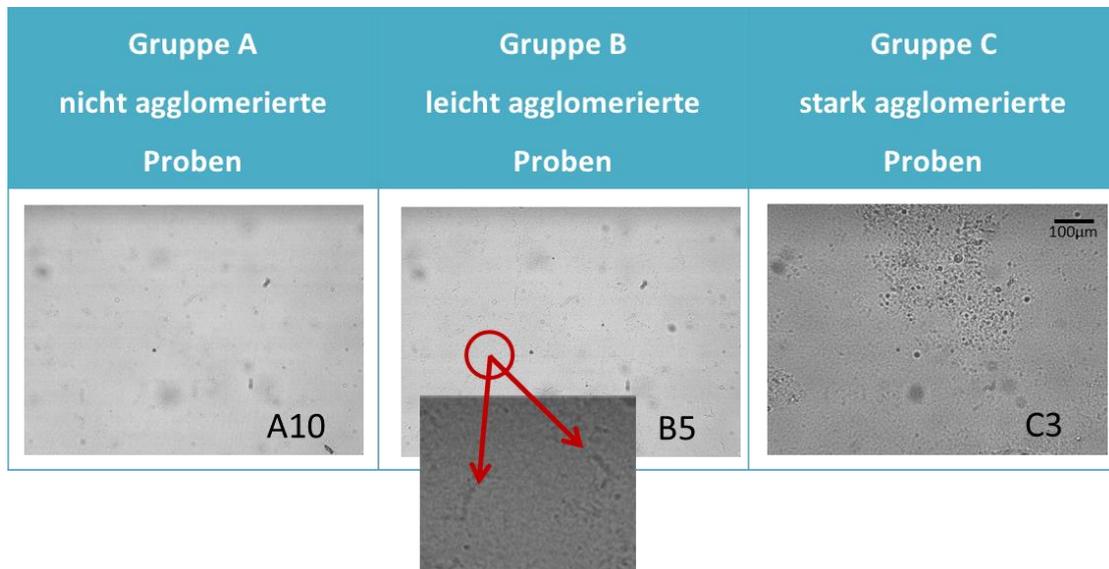


Abbildung 4.1-2: Mikroskopische Aufnahmen der Beispiel-Proben für die jeweilige Gruppe. Links: Proben der Gruppe A enthalten keine Agglomerate. Mitte: Proben der Gruppe B enthalten geringe und leichte Agglomerationen. Sie sind nur mit einer höheren Vergrößerung (rote Pfeile) nachweisbar. Rechts: Proben der Gruppe C enthalten einige Agglomerate. Vergrößerung: 160-fach

Die PCS-Daten (Abbildung 4.1-3) zeigen, dass die Proben A10 und B5 keinen Unterschied bezüglich der mittleren Partikelgröße (ca. 200 nm) aufweisen. Für die Probe C3 wurde jedoch ein leicht erhöhter Wert (ca. 300 nm) detektiert. Trotz der oberen Nachweisgrenze von 6 μm wurden mittels PCS keine μm -Partikel und keine Agglomerationen gefunden, welche mittels Lichtmikroskopie für die Proben C3 und B5 hingegen detektiert wurden.

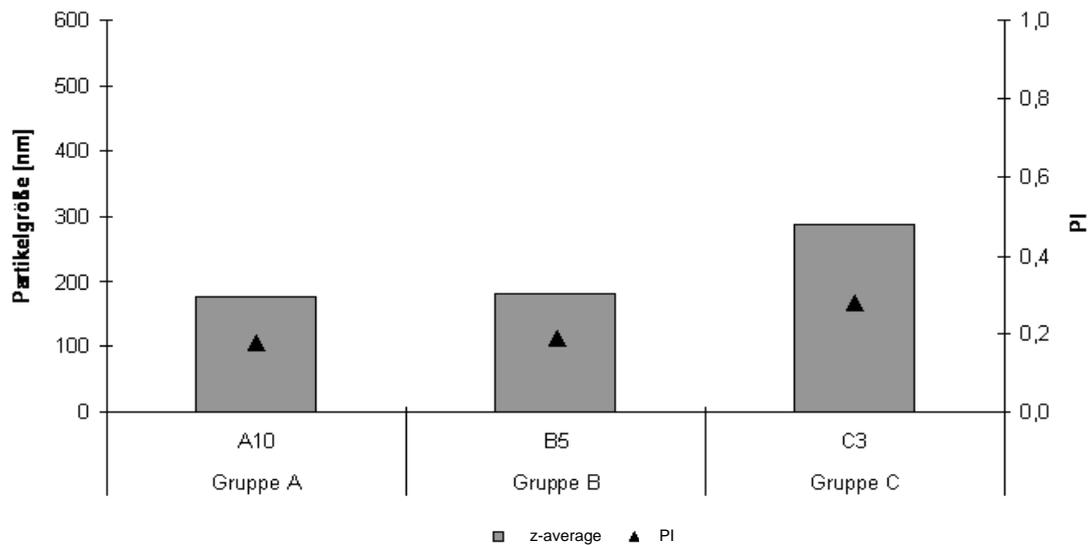


Abbildung 4.1-3: z-average [nm] und PI der untersuchten Lipidnanopartikel-Dispersionen

4.1.3.1.2 LD-Analysen

Die Proben wurden mittels einer Eppendorf-Pipette und einer Pasteur-Pipette aus dem Vial entnommen und dann direkt ins Instrument pipettiert. Unter Standard-Messbedingungen (Rührgeschwindigkeit 2975 UpM, kein Ultraschall) wurde eine Partikelgrößenanalyse mittels LD durchgeführt. Abbildung 4.1-4 zeigt die erhaltenen Ergebnisse, wobei oben die $d(v)_{0,50}$ -Werte und unten die $d(v)_{0,95}$ -Werte dargestellt sind. Für die nicht agglomerierte Probe A10 konnte bezüglich der $d(v)_{0,50}$ - und $d(v)_{0,95}$ -Werte kein Unterschied zwischen den beiden Pipetten festgestellt werden. Für die Probe B5, welche schwach agglomeriert war, wurden nach Anwendung der Eppendorf-Pipette für beide Parameter vergleichsweise größere Durchmesser ermittelt. Dieser Effekt war bei der Probe C3 noch stärker ausgeprägt (insbesondere für den $d(v)_{0,50}$ -Wert), welche unter der Lichtmikroskopie noch größere Aggregate aufwies.

Der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse liegt wahrscheinlich in den verschiedenen Durchmessern und Formen der Pipettenspitzen. Der Durchmesser der Spitzenöffnung der Eppendorf-Pipette beträgt nach Herstellerangabe 0,52 mm. Sie besitzt eine stark zugespitzte Form. Die Pasteur-Pipette besitzt eine Spitzenöffnung, die mit 1,50 mm fast dreimal so groß ist und eine weniger zugespitzte Form aufweist. Aufgrund dieser Unterschiede können unterschiedlich starke Kräfte während des Ein- und Auspipettierens auf die Partikel wirken wie beispielsweise Scherkräfte, die bei der Eppendorf-Pipette vergleichsweise größer sind. Im Allgemeinen sind Scherkräfte

als die Kräfte bekannt, die die Partikel wie bei einer Homogenisation zerkleinern (Dingler 1998). Deshalb wurde zunächst erwartet, dass insbesondere die Anwendung der Eppendorf-Pipette zur Deaggregation der Agglomerate führen kann.

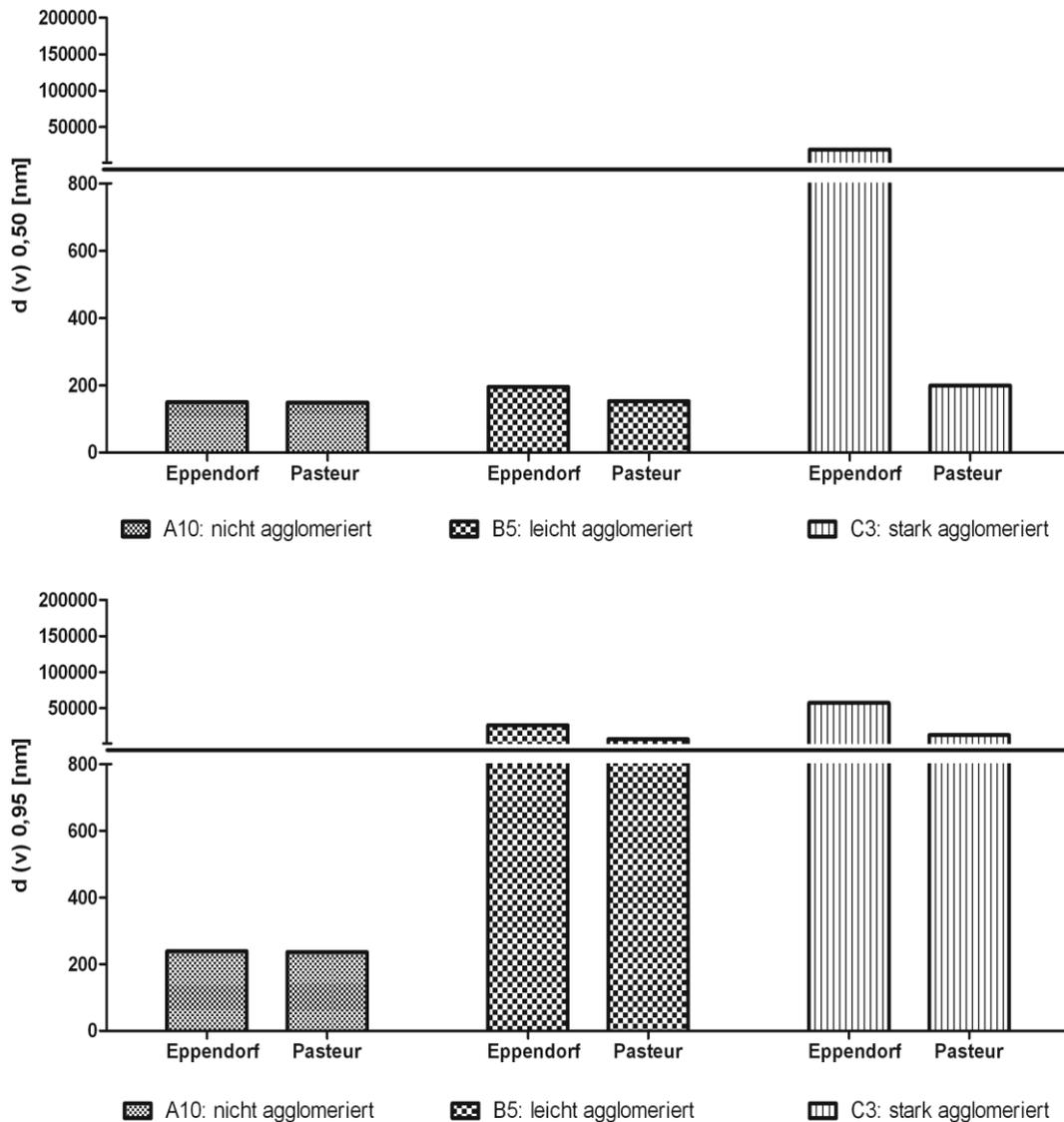


Abbildung 4.1-4: LD-Partikelgrößen in Abhängigkeit von dem Instrument zur Probenahme. Gemessen unter Standard-Bedingungen (Rührgeschwindigkeit 2975 UpM, kein Ultraschall). Oben sind die $d(v)_{0,50}$ -Werte, unten sind die $d(v)_{0,95}$ -Werte dargestellt.

Der Prozess der Deaggregation hängt von der Stärke der Scherkräfte und der Stärke der Agglomerationen ab und führt zu der Vermutung, dass die leichten Agglomerationen der Probe B5 im Vergleich zu den stärkeren Agglomerationen der Probe C3 eher zerstört werden. Somit sollte für die Probe B5 der $d(v)_{0,95}$ -Wert bei einer Messung mit Einsatz der Eppendorf-Pipette vergleichsweise kleiner sein. Dies

konnten die erzielten Ergebnisse jedoch nicht bestätigen. Die Ergebnisse der Probe B5 und insbesondere der Probe C3 zeigten, dass die Partikel bei Verwendung der Eppendorf-Pipette eher zu Agglomerationen neigen. Die Agglomerationen sind Folge der engen Öffnung der Eppendorf-Pipette und können mit der DLVO Theorie erklärt werden. Während des Auspipettierens werden die Partikel, insbesondere dort, wo sie aus der Pipettenöffnung austreten, so sehr zusammengedrückt und beschleunigt, dass sie miteinander in engen Kontakt kommen. Bezüglich der DLVO Theorie (Rupprecht 1975, Lagaly et al. 1999) kann die Beschleunigungsenergie ausreichend groß sein, um den kritischen Abstand zwischen den Teilchen zu überwinden. Dadurch werden die Abstoßungskräfte zwischen den Teilchen geringer und folglich die anziehenden Kräfte (z. B. van der Waals-Kräfte) dominanter, was wiederum zur Agglomeration der Partikel führt (Müller 1991). Dieser Effekt tritt dann auf, wenn der Stabilisator der Partikel ungeeignet ist, um eine ausreichende elektrostatische oder sterische Stabilisierung sicher zu stellen.

Um den beschriebenen Effekt nachzuprüfen, wurden die Dispersionen zusätzlich unter einer weiteren Messkonfiguration – mit einer weiteren Rührgeschwindigkeit – analysiert. Das Rühren ist notwendig, um die Partikel in der Messzelle ständig zirkulieren zu lassen. Nur so kann eine fast konstante Anzahl der Partikel in der Messzelle während der gesamten Messung garantiert werden (Malvern 2007). Ohne ein Rühren könnten größere Partikel, abhängig von ihrer Dichte, sedimentieren bzw. aufschwimmen, was zu verfälschten Ergebnissen führen würde. Andererseits könnte die Rührkraft die lockeren Agglomerate der Probe deagglomerieren, was ebenso zu verfälschten Ergebnissen führen würde.

Wie die meisten modernen LD-Instrumente erlaubt der Mastersizer 2000, welcher in dieser Arbeit verwendet wurde, die Einstellung der Rührgeschwindigkeit. Um den Einfluss der Instrumente zur Probenahme besser zu untersuchen und die Frage zu beantworten, ob die Agglomerate, die während der Anwendung der Eppendorf-Pipette entstehen, durch die Rührkraft zerstört werden, wurden die Dispersionen A10, B5 und C3 mit einer geringeren Rührgeschwindigkeit (1085 UpM = Messmethode 1 (M1)) nochmals untersucht. Vermutet wurde, dass die geringere Rührkraft zu weniger Deagglomerationen und somit zu höheren LD-Werten führt. Die bei der geringeren Rührgeschwindigkeit (M1=1085 UpM) erhaltenen Messergebnisse sind in Abbildung 4.1-5 im Vergleich zu der Standardmessbedingung (M2=2975 UpM) dargestellt.

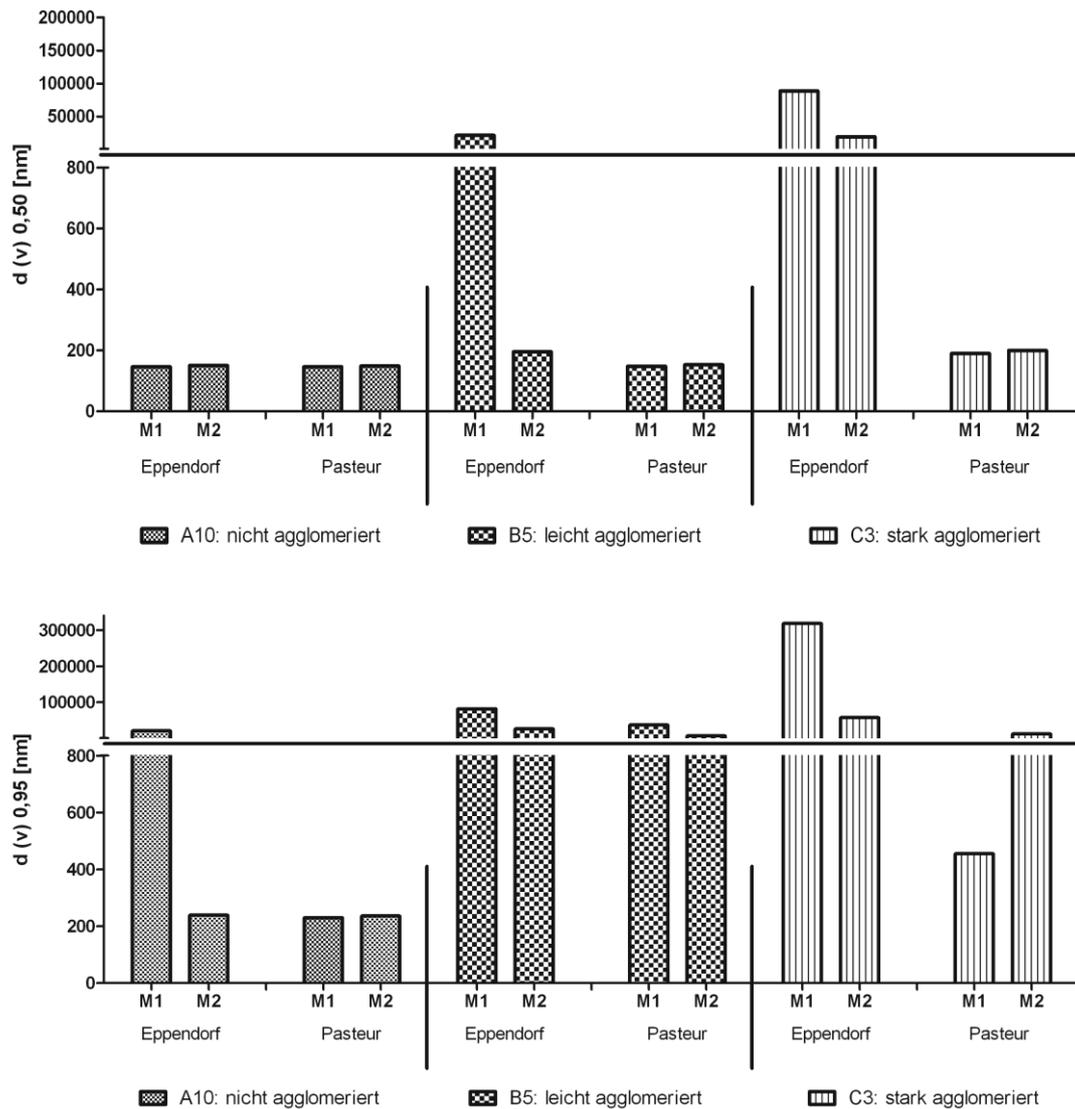


Abbildung 4.1-5: LD-Partikelgrößen in Abhängigkeit von dem Instrument zur Probenahme und unterschiedlicher Rührkräfte: M1-1085 UpM, M2-2975 UpM. Kein Ultraschall. Oben sind die $d(v)_{0,50}$ -Werte, unten sind die $d(v)_{0,95}$ -Werte dargestellt.

Für die nicht agglomerierte Probe A10 wurde kein Unterschied für den $d(v)_{0,50}$ -Wert bezüglich der beiden angewandten Rührgeschwindigkeiten M1 und M2, sowie der beiden Pipettierinstrumenten gefunden (Abbildung 4.1-5, oben). Jedoch konnten unterschiedliche $d(v)_{0,95}$ -Werte bei gleicher Rührgeschwindigkeit M1 und unterschiedlichen Pipetten festgestellt werden (Abbildung 4.1-5, unten). Dieser Parameter wurde mit etwa 20 μm für die Eppendorf-Pipette und nur etwa 195 nm für die Pasteur-Pipette gemessen.

Da für die Probe A10 keine großen Partikel oder Agglomerate mittels Lichtmikroskopie festgestellt wurden und auch bei der Anwendung der Pasteur-Pipette keine μm -Partikel detektiert wurden, bestätigen die obigen Ergebnisse den agglomerisierenden Effekt der Eppendorf-Pipette. Dieser Effekt kann auch durch die Ergebnisse der Probe B5, welche geringe Agglomerationen besaß, bestätigt werden. Bei dieser Probe zeigten sich im Parameter $d(v)_{0,95}$ kaum Unterschiede, aber deutliche Unterschiede im Parameter $d(v)_{0,50}$. Eine derart starke Abweichung bei niedrigen LD-Parametern wie $d(v)_{0,50}$ deutet auf unterschiedliche Grade der Agglomerationen hin. Mit einer Bewertung der Neigung zur Agglomeration kann eine Aussage über die Stabilität der Dispersion getroffen werden.

Ein aggregatfördernder Effekt der Eppendorf-Pipette wurde auch für die stark agglomerierte Probe C3 beobachtet, er war jedoch weniger stark ausgeprägt. Außerdem wurde bei der Probe C3 unter Verwendung der Pasteur-Pipette beobachtet, dass die höhere Rührgeschwindigkeit (M2) den $d(v)_{0,95}$ -Wert und in einem geringeren Ausmaß auch den $d(v)_{0,50}$ -Wert absinken lässt.

Dies lässt vermuten, dass die ungenügende Rührgeschwindigkeit große und schwere Partikel (die Verwendung der Pasteur-Pipette beeinflusst die Größe nicht) sedimentieren lässt. Somit entweichen größere Partikel aus der Messzelle, was zur Messung einer kleineren Partikelgröße führt.

Als Zusammenfassung dieses Studienteils ist festzuhalten, dass die Verwendung von verschiedenen Instrumenten zur Probenahme grundsätzlich eine potentielle Fehlerquelle für die Partikelgrößenanalyse mittels LD sein kann, da die verschiedenen Instrumente in einer sonst gleichen Messkonfiguration zu unterschiedlichen Partikelgrößenergebnissen führen können.

Jedoch eröffnet sich hiermit auch eine Möglichkeit, die Proben voneinander zu unterscheiden und sie besser zu klassifizieren. Pipettierinstrumente wie die Eppendorf-Pipetten, die starke Scherkräfte verursachen, fördern die Agglomerationen von instabilen Proben. Daraus resultiert die Möglichkeit, die Unterschiede zwischen den Proben in einer sehr frühen Phase der Formulierungsentwicklung zu erkennen. Außerdem haben die Ergebnisse der Studie angedeutet, dass unterschiedliche Rührgeschwindigkeiten zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können. Dies wird im nächsten Teil dieses Kapitels näher untersucht.

Frühere Studien hatten bereits gezeigt, dass die Größe der Probenmenge, die ins Instrument gegeben wird, die LD-Ergebnisse beeinflussen kann (Keck 2006, Keck 2010). Die ein- und auspipettierte Menge ist bei den Pasteur-Pipetten nicht so präzise einstellbar wie bei den Eppendorf-Pipetten. Wenn jedoch sicher ist, dass die Ergebnisse nicht von der Größe der Probenmenge beeinflusst werden, so wird als Ergebnis dieses Studienteils die Verwendung einer Pasteur-Pipette empfohlen, da diese Pipette nicht zur Agglomeration der Partikel führt.

Wenn bekannt ist, dass die Partikelgrößenergebnisse konzentrationsabhängig sind, aber auch wenn eine solche Abhängigkeit noch nicht untersucht wurde, so muss eine Eppendorf-Pipette verwendet werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind in diesem Fall unabdingbar mittels einer zusätzlichen Messmethode abzusichern.

4.1.3.2 Einfluss von Rührgeschwindigkeit und Ultraschall während der Messung auf die LD-Ergebnisse

4.1.3.2.1 Lichtmikroskopie und PCS-Analysen

Die Ergebnisse des ersten Teils dieser Studie ließen vermuten, dass die Rührgeschwindigkeit des LD-Instruments einen erheblichen Einfluss auf die Partikelgröße haben kann. Deshalb wurde dieser Effekt in diesem Teil näher untersucht. Hierzu wurden die Proben (deren Zusammensetzungen sind in Tabelle 4-1 zu finden) vor der Partikelgrößenanalyse mittels Lichtmikroskopie analysiert.

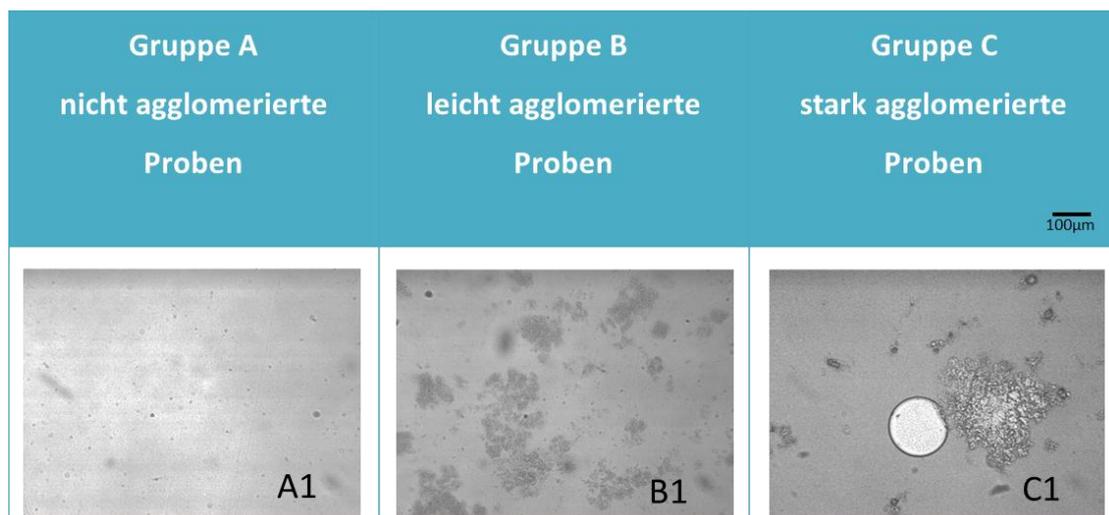


Abbildung 4.1-6: Mikroskopische Aufnahmen der Beispiel-Proben für die jeweilige Gruppe. Links: Proben der Gruppe A enthalten keine Agglomerate. Mitte: Proben der Gruppe B enthalten geringe und leichte Agglomerationen. Rechts: Proben der Gruppe C enthalten starke Agglomerate. Vergrößerung: 160-fach

Basierend auf dieser Analyse wurden die Proben in drei Klassen eingeteilt. Abbildung 4.1-6 zeigt die mikroskopischen Aufnahmen je eines Vertreters einer Klasse. Die Proben der Gruppe A wiesen keine nachweisbaren μm -Partikel und keine Agglomerationen auf. Die Proben der Gruppe B besaßen einige lose Agglomerate. Proben, die Agglomerate oder auch größere Teilchen aufwiesen, wurden der Gruppe C zugeordnet. Die PCS-Ergebnisse der Proben sind in Abbildung 4.1-7 dargestellt. Die mittleren Partikelgrößen fast aller Dispersionen lagen im Bereich zwischen 200 nm und 350 nm; alle Polydispersitätsindices waren kleiner als 0,3 und belegen damit eine relativ enge Partikelgrößenverteilung. Somit erbrachte die PCS-Analyse keine erwähnenswerten Unterschiede für fast alle Proben. Eine Ausnahme bildete die Probe A6. Sie besaß eine mittlere Partikelgröße von etwa 530 nm, was für diese Art von Nanotransporter relativ groß ist. Allerdings zeigte die Lichtmikroskopie keine μm -Partikel in der Probe A6, so dass sie auch der Gruppe A zugeordnet wurde.

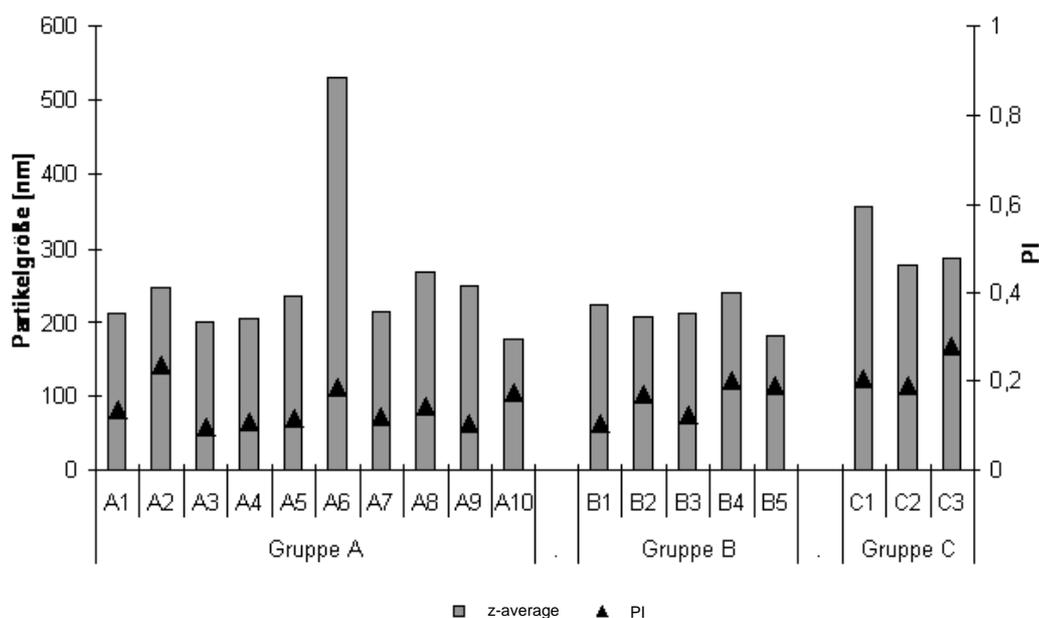


Abbildung 4.1-7: z-average [nm] und PI der untersuchten Lipidnanopartikel-Dispersionen

4.1.3.2.2 LD-Analysen

Die Partikelgrößenanalyse mittels LD wurde, wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, durchgeführt. Während die Konfiguration M1 einer Messung mit einer Rührgeschwindigkeit von 1085 UpM entsprach, entsprach M2 der Messung mit 2975 UpM. Zusätzlich wurde in diesem Teil der Studie der mögliche Einfluss des Ultraschalls untersucht – mit einer Messkonfiguration M3. Bei M3 wurden die Proben

während des Rührens mit 2975 UpM zusätzlichem Ultraschall ausgesetzt. Die Ergebnisse aller Messungen (M1, M2 und M3) sind in Abbildung 4.1-8 dargestellt. Oben stehen die $d(v)_{0,50}$ -Werte und unten die $d(v)_{0,95}$ -Werte. Die Proben wurden ausschließlich mit der Eppendorf-Pipette dispensiert.

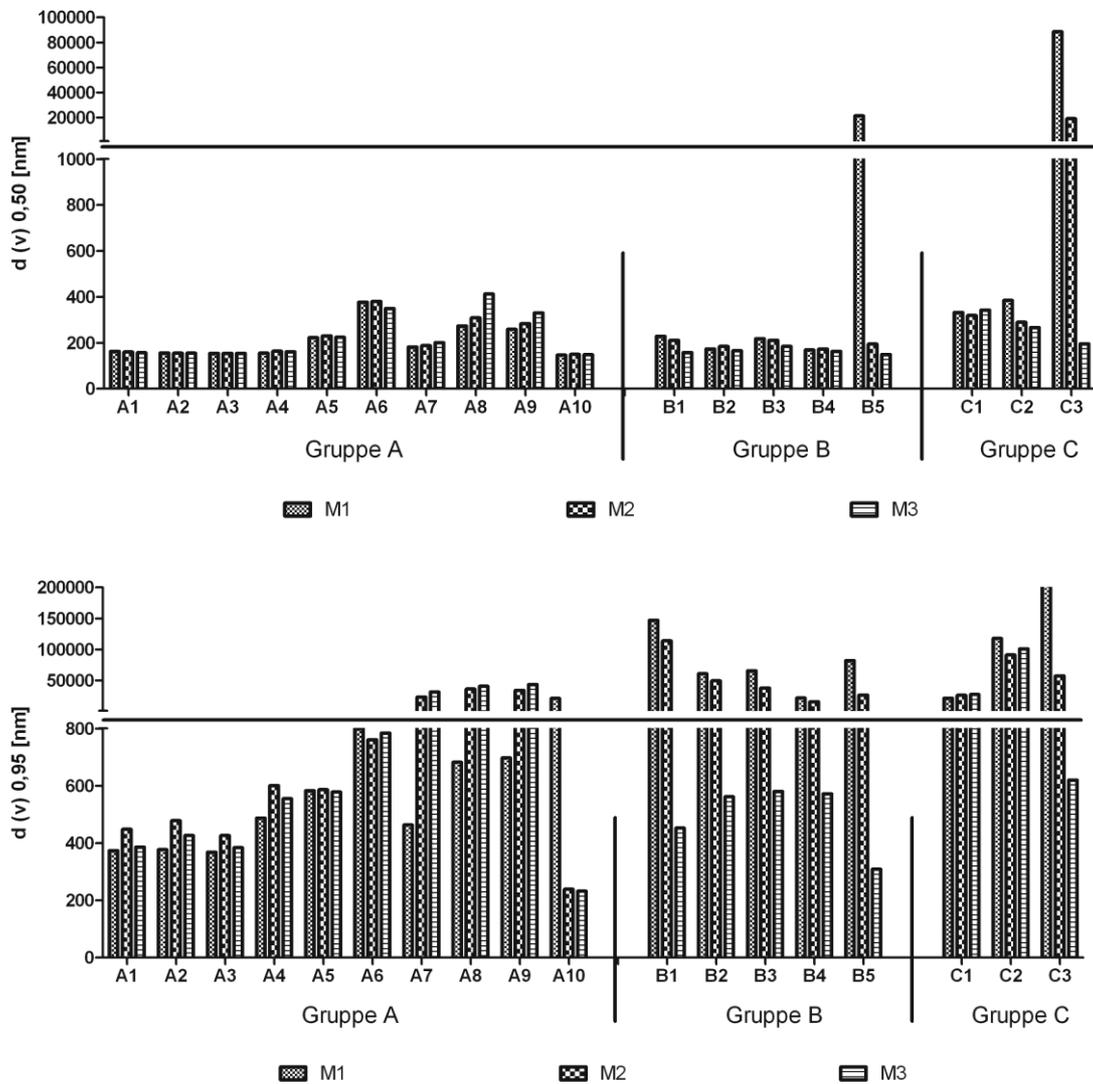


Abbildung 4.1-8: LD-Partikelgrößen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Rührkräften: M1-1085 UpM und kein Ultraschall, M2-2975 UpM und kein Ultraschall, M3-2975 UpM und Ultraschall. Oben sind die $d(v)_{0,50}$ -Werte, unten sind die $d(v)_{0,95}$ -Werte dargestellt. Instrument zur Probenahme: Eppendorf-Pipette

Für die meisten Proben der Gruppe A (A1 bis A6) wurde kein signifikanter Einfluss der Rührgeschwindigkeiten M1, M2 und M3 (wie M2, aber mit Ultraschall) beobachtet.

Für Dispersionen A7, A8, und A9 der Gruppe A nahmen die Partikelgrößen mit steigender Rührgeschwindigkeit zu. Eine Ausnahme hat die Probe A10 gebildet, die eine Abnahme der $d(v)_{0,95}$ -Werte mit steigender Rührgeschwindigkeit aufwies. Der

Effekt, der für die Probe A10 beobachtet wurde, liegt in der Verwendung der Eppendorf-Pipette und wurde bereits in Abschnitt 4.1.3.1 diskutiert.

Die verschiedenen Effekte, die zwischen den Proben A1 bis A6 und A7 bis A9 beobachtet wurden, können wie folgt erklärt werden: Die Proben A1 bis A6 können als extrem stabil betrachtet werden, denn für sie wurden bei der lichtmikroskopischen Analyse keine Agglomerate bzw. keine größeren Partikel (μm -Partikel) gefunden und außerdem zeigten die Rührgeschwindigkeit und die Ultraschallbehandlung keinerlei Einfluss auf die Partikelgrößen der Proben.

Im Gegensatz dazu sind die Proben A7 bis A9, welche mit erhöhter Rührgeschwindigkeit und mit Anwendung von Ultraschall agglomerierten, nicht derart stabil, obwohl sie unter dem Lichtmikroskop keine Agglomerate bzw. μm -Partikel aufweisen. Die Zunahme der Partikelgröße (Bildung der Aggregate) nach dem Energieeintrag (Erhöhung der Rührgeschwindigkeit oder den Einsatz von Ultraschall) beruht auf ungeeigneten Stabilisatoren, die die Agglomeration nicht verhindern können (Abschnitt 4.1.3.1.2).

Dieser Effekt – der Partikelgrößenanstieg in einem kolloidalen System aufgrund eines Energieeintrages – entspricht dem Prinzip eines Standard-Stresstests. Ein solcher wird z. B. bei der Stabilitätsprüfung von Emulsionen durchgeführt. Ein kurzer Stresstest kann durch Variation des Energieeintrages, wie hier mit Hilfe der Rührgeschwindigkeit, als Frühindikator für die physikalische Stabilität der nanodispersen Systeme verwendet werden.

Die Partikelgrößen der Proben der Gruppe B und die der Probe C3 wurden mit erhöhter Rührgeschwindigkeit kleiner. Dies belegt die Deaggregation der Partikel, die aufgrund des Energieeintrages stattfand. Kein oder nur wenig Einfluss der Rührgeschwindigkeit wurde für die stark agglomerierten Proben C1 und C2 festgestellt. Das zeigt, dass die Partikelgrößenveränderungen, die bei unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten auftreten, ebenfalls verwendet werden können, um lose, leicht oder stark agglomerierte Proben voneinander zu diskriminieren.

Natürlich hängt der Agglomerations- und der Deagglomerationsprozess von der Partikelgröße ab. Es sollte theoretisch möglich sein über eine längere Analysezeit mit wiederholten Messungen hintereinander die Änderungen in der Partikelgröße zu

beobachten. Damit wäre es möglich, die Proben hinsichtlich ihres Agglomerationsgrades zu klassifizieren.

Eine schnelle Abnahme der Partikelgröße bedeutet, dass die Agglomerate in den Proben beim Rühren schnell zerstört werden und lässt auf sehr lockere Agglomerationen schließen. Eine langsamere Abnahme der Partikelgröße im Verlauf der Analysezeit deutet auf stärkere Agglomerationen hin und verweist auf ein weniger effizient stabilisiertes System. Wenn die größeren Aggregate bestehen bleiben, muss es sich um eine sehr stark aggregierte Probe bzw. um große Kristalle in der Probe handeln.

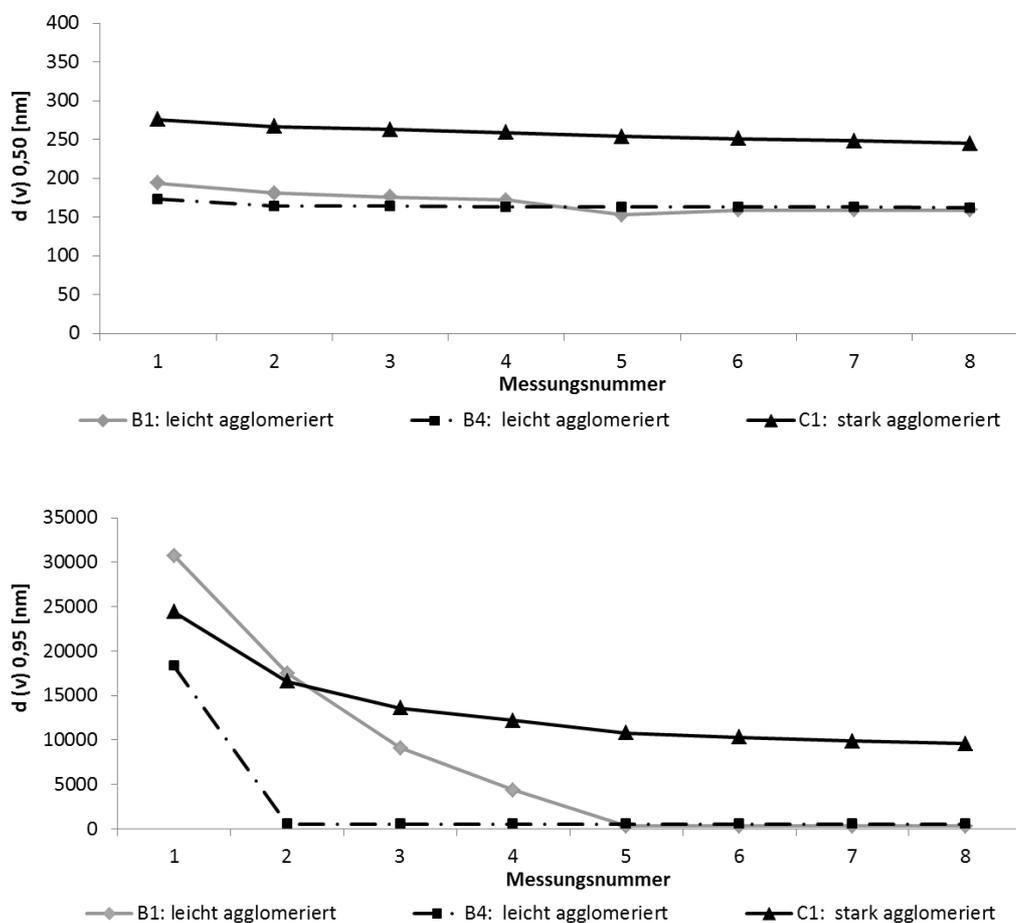


Abbildung 4.1-9: LD-Partikelgrößen der Proben B1, B4 und C1 in Abhängigkeit von der Messzeit. Analysiert unter M3-Messbedingungen (Rührgeschwindigkeit 2975 UpM und Ultraschall). Oben sind die $d(v)_{0,50}$ -Werte, unten sind die $d(v)_{0,95}$ -Werte dargestellt. Instrument zur Probenahme: Eppendorf-Pipette

Diese Überlegungen zeigen, dass die beschriebene Methode helfen kann, stark-instabile Proben von leicht-instabilen Proben zu unterscheiden. Für derart klassifizierte Proben können Entscheidungen bezüglich der Formulierungs-entwicklung in einer früheren Phase getroffen werden. Somit können Zeit und Kosten

gespart werden. Außerdem wäre es sogar bei Verwendung verschiedener Messmedien – statt Wasser z. B. simulierter Magen- oder Darmsaft – möglich, die Formulierungen nach oraler Applikation bezüglich stark instabilem und leicht instabilem Verhalten zu unterscheiden.

Daher wurden die Proben mit einer längeren Messzeit (d. h. acht Messungen statt vier) analysiert, um die Möglichkeit einer Unterscheidung der Proben hinsichtlich der Dichte ihrer Agglomerate zu untersuchen. Die Ergebnisse für die Proben B1, B4 und C1 sind in Abbildung 4.1-9 dargestellt.

Für die $d(v)_{0,50}$ -Werte wurden im Verlauf der Analysezeit nur kleine Änderungen beobachtet (Abbildung 4.1-9, oben). Im Gegensatz dazu wurden deutliche Abnahmen der $d(v)_{0,95}$ -Werte detektiert (Abbildung 4.1-9, unten). Alle Werte verringerten sich zunächst exponentiell und erreichten dann ihre minimale Größe. Die Verringerung der Partikelgröße und / oder die endgültig erreichte Partikelgröße war für die einzelnen Proben unterschiedlich. So war beispielsweise die Verringerung der Partikelgröße der Probe B4 im Vergleich zur Probe B1 zügiger. Nach fünf Einzelmessungen hatten beide Proben jedoch ähnliche minimale $d(v)_{0,95}$ -Werte. Für die Proben B1 und C3 war die erforderliche Zeit den jeweils minimalen $d(v)_{0,95}$ -Wert zu erreichen gleich. Die minimalen Werte selbst unterschieden sich jedoch stark. Die endgültige Partikelgröße, die die Probe C3 erreichte, war wesentlich größer.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Agglomerationen der Probe B1 stärker waren, als die der Probe B4. Damit ist die Probe B1 weniger stabil. Wird jedoch genügend viel Rührkraft auf beide Proben angewandt, so weisen die Proben nach einer gewissen Rührzeit eine ähnliche Partikelgröße auf, und somit auch ähnliche Eigenschaften, die durch die Partikelgröße wesentlich mitbestimmt werden. Im Gegensatz zu den Proben B1 und B4 enthielt die Probe C3 größere Partikel/Agglomerate, die nicht mittels Rühren deaggregiert werden konnten, womit auch der Agglomerationsgrad von C3 wesentlich höher war.

4.1.4 Zusammenfassung des Abschnitts

Die Ergebnisse dieser Studie ergaben, dass das Instrument zur Probenahme, die Rührgeschwindigkeit sowie der Einsatz von Ultraschall einen großen Einfluss auf die Ergebnisse der Partikelgrößenanalytik mittels LD haben. Um aussagekräftige Ergebnisse zu gewährleisten, müssen bezüglich einer Probe die einzelnen Parameter

festgelegt und während der LD-Analyse konstant gehalten werden. Analog zu den optischen Parametern und sonstigen Mess- und Analysebedingungen (Keck 2006, Keck et al. 2008, Keck 2010) sollten auch die hier untersuchten Parameter, als Komplementierung der Beschreibung der Messbedingungen, veröffentlicht werden, um einen Vergleich der erzielten Ergebnisse zu ermöglichen. Ansonsten sind die Partikelgrößendaten nicht aussagekräftig und nicht zuverlässig interpretierbar.

Neben der Gefahr verfälschter Analyseergebnisse aufgrund nicht konstanter Messbedingungen kann der systematische Einsatz variierender Messbedingungen eine verbesserte Formulierungsentwicklung unterstützen und die Differenzierung zwischen „guten und schlechten“ Formulierungen bereits zu einem sehr frühen Stadium der Formulierungsentwicklung ermöglichen. Dies erscheint ein interessanter Ansatz zu sein, um langfristige Lagerstudien zu umgehen.

Die Laserdiffraktometrie ist eine wichtige Methode für die Partikelgrößenanalyse und die Charakterisierung von kolloidalen Systemen. Ihre Fehlerquellen müssen bei Messungen berücksichtigt werden und können zugleich vorteilig ausgenutzt werden.

4.2 Kristallinitätsuntersuchungen mittels DSC

4.2.1 Stark verdünnte Lipidnanopartikel

4.2.1.1 Einleitung

Die dynamische Differenzkalorimetrie und ihr Einsatz zur Erforschung und Entwicklung von Lipidnanopartikeln wurde bereits in Abschnitt 1.1.5.4 bzw. in Kapitel 3.1 vorgestellt.

Wie bereits in Abschnitt 1.1.5.4 erläutert wurde, liegt die Probenmenge, die für eine DSC-Messung benötigt wird, bei festen Materialien zwischen 1 mg und 2 mg. Für in Wasser dispergierte Lipidnanopartikel variiert die Probenmenge abhängig vom Lipidphase/Wasserphase-Verhältnis der Dispersion.

Daher war das erste Ziel in Kapitel 4.2 den Einfluss des Wassergehalts auf die DSC-Ergebnisse zu untersuchen. Der Wassergehalt kann durch Zentrifugation der Probe kontrolliert werden und ohne den Einsatz von Hitze, welche die Kristallinität der Probe ändern würde, verringert werden. Daher war das zweite Ziel zu untersuchen, ob und inwieweit die Zentrifugation die Kristallinität der Lipidnanopartikel beeinflusst.

4.2.1.2 Materialien und Methoden

Um den Einfluss des Wassergehalts auf die DSC-Ergebnisse zu untersuchen, wurden zwei 20%ige Basisdispersionen (Rezeptur A aus der Tabelle 4-2) durch Hochdruckhomogenisation (Herstellungparameter: 500 bar, drei Zyklen und 55°C für die softisanhaltige NLC-Dispersion bzw. 70°C für die dynasanhaltige NLC-Dispersion) hergestellt. Die 20%igen Dispersionen wurden mit reinem Wasser zu 10%igen und 5%igen Dispersionen verdünnt. Die Partikelgrößenanalysen wurden mittels PCS (Abschnitt 2.2.2.3.2) und LD (Abschnitt 2.2.2.3.1) durchgeführt. Danach erfolgten für die Proben DSC-Analysen (Abschnitt 2.2.2.6). Die Probenmengen für die DSC-Untersuchungen enthielten jeweils 1,5 mg Lipidnanopartikel, wobei dies für die 20%ige Dispersionen 7,5 mg Dispersion war, für die 10%ige Dispersionen 15 mg und für die 5%ige Dispersionen 30 mg. Der Wassergehalt der DSC-Proben betrug 6 mg, 13,5 mg bzw. 28,5 mg für die 20%igen, 10%igen bzw. 5%igen Dispersionen.

Für das zweite Ziel der Studie wurden ebenso 5%ige und 10%ige NLC-Dispersionen (Rezeptur B und C aus der Tabelle 4-2) durch Hochdruckhomogenisation (Herstellungparameter: 500 bar, drei Zyklen und 55°C für die softisanhaltige NLC-Dispersion bzw. 70°C für die dynasanhaltige NLC-Dispersion) hergestellt. Danach

wurden die Öl- und die Wasserphase der Dispersionen durch Zentrifugation (Zentrifuge Megafuge 1.0R, Heraeus, Deutschland, 1 Stunde bei 17000 UpM, 23800 G) getrennt, um anschließend die Wassermengen auf ca. die Hälfte zu reduzieren. Daraufhin wurden Restwasser und Ölphase mittels eines Vortex redispergiert, um im nächsten Schritt die DSC-Untersuchungen für die zentrifugierten und für die originalen, nicht behandelten Proben durchführen zu können. Alle Proben wurden so eingewogen, dass der Feststoffanteil zwischen 1 und 2 mg lag. Außerdem wurde die Kristallinität der originalen Proben am Tag 7, 14, 28 und 365 nach der Herstellung untersucht.

Tabelle 4-2: Zusammensetzung der NLC-Dispersionen, die zu Kristallinitätsuntersuchungen herangezogen wurden (Angaben in % (m/m))

	Rezeptur A	Rezeptur B	Rezeptur C
festes Lipid (Softisan 154 oder Dynasan 118)	10,0%	2,5%	5,0%
Miglyol 812	8,0%	2,0%	4,0%
Menthol	2,0%	0,5%	1,0%
TEGO Care 450	1,8%	1,8%	1,8%
ultra-gereinigtes Wasser	78,2%	93,2%	88,2%

4.2.1.3 Ergebnisse und Diskussion

4.2.1.3.1 Einfluss des Wassergehalts von NLC-Dispersionen auf DSC-Ergebnisse

Wie bereits gezeigt wurde, ist der kristalline Zustand der Lipidnanopartikel von der Partikelgröße abhängig (Bunjes et al. 2007b). Daher war es für diesen Teil der Studie wichtig, in den untersuchten Dispersionen eine identische Verteilung der Partikelgrößen sicher zu stellen. Hierfür wurden die Partikelgrößen der durch Hochdruckhomogenisation hergestellten Basisdispersion (20%) sowie der verdünnten Dispersionen (5% und 10%) analysiert. Die Analysen zeigten zwischen den untersuchten Proben keine nennenswerten Unterschiede in den Partikelgrößen (Abbildung 4.2-1). Damit konnte bestätigt werden, dass die Verdünnung keinen Einfluss auf die Partikelgröße hat und mögliche Unterschiede in den DSC-Ergebnissen nicht auf unterschiedliche Partikelgrößen zurückzuführen sind.

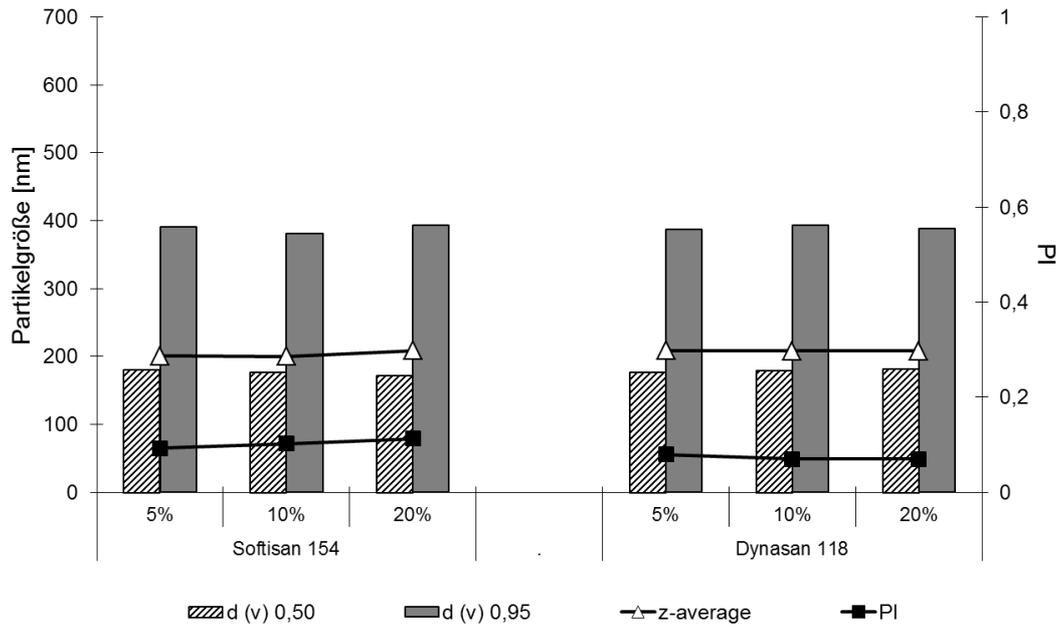


Abbildung 4.2-1: Partikelgrößen (PCS und LD) der Basisdispersionen (20%ig) und der verdünnten Dispersionen (5%ig und 10%ig)

Wie in der Literatur (Bunjes et al. 2002, Kovacevic et al. 2011) beschrieben wird, beeinflusst auch das Tensid und dessen Konzentration den kristallinen Zustand der Partikel. Da die Dispersionen mit den niedrigen Partikelkonzentration von 5% und 10% durch die Verdünnung derselben 20%igen Basisdispersion entstanden, sind die Zusammensetzungen der Partikel identisch geblieben. Somit konnte ein Einfluss des Tensidgehalts und ein Einfluss einer unterschiedlichen Zusammensetzung der Partikel ausgeschlossen werden.

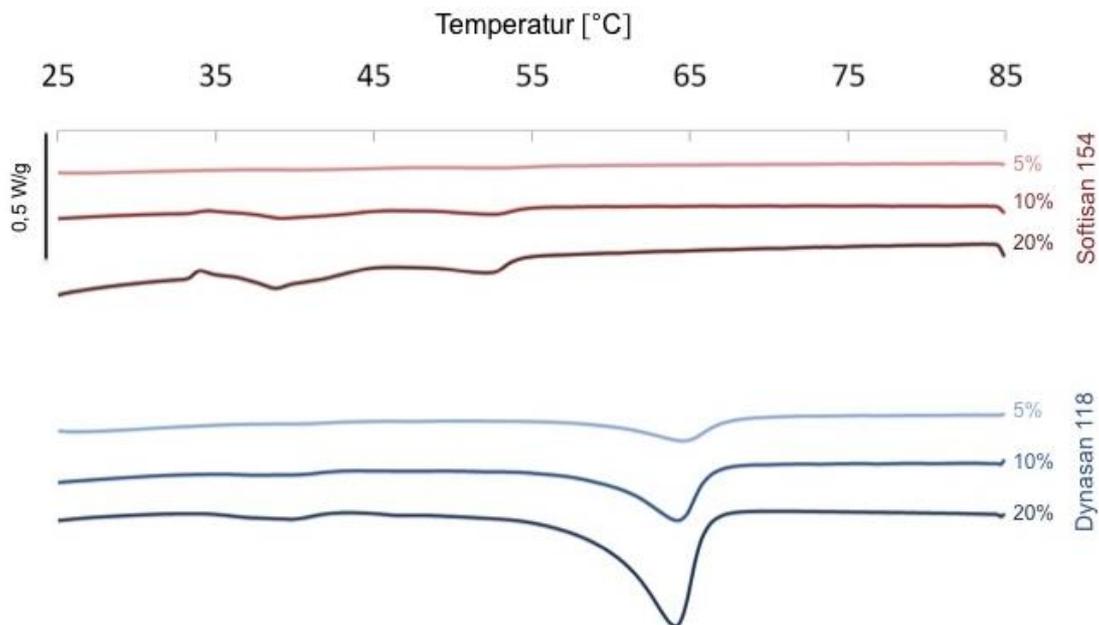


Abbildung 4.2-2: DSC-Thermogramme der Basisdispersionen (20%ig) und verdünnten Dispersionen (5%ig und 10%ig). Die für eine DSC-Analyse benötigte Probenmenge ist ca. 30 mg für die 5%igen Dispersionen, 15 mg für die 10%igen Dispersionen und 7,5 mg für die 20%igen Dispersionen. Somit enthielten alle DSC-Proben ungefähr 1,5 mg Lipidnanopartikel. Heizrate: 10 K/Min.

Abbildung 4.2-2 zeigt die DSC-Thermogramme der untersuchten Dispersionen. Für beide NLC-Varianten wurde eine Abnahme der Schmelzenthalpie (berechnet in Bezug auf die Gesamtmenge der analysierten Probe) bei gleichzeitiger Erhöhung des Wassergehalts beobachtet (Tabelle 4-3). Des Weiteren wurde mit steigendem Wassergehalt eine Verbreiterung der Schmelzpeaks festgestellt. So betrug z. B. die Breite des Schmelzpeaks bei 63°C für 20%ige, 10%ige und 5%ige Dynasan-NLC-Dispersionen 4,0°C, 4,1°C bzw. 4,9°C. Die Abnahme der Enthalpien – z. B. durch Zumischung von Arzneistoffen verursacht – und die Verbreiterungen der Peaks können das Erkennen der thermischen Ereignisse unmöglich machen damit zu einer falschen Interpretation der Daten führen.

Bezüglich 20%iger Dynasan-NLC liegt ein Schmelzpeak bei 39,5°C vor, der eine Enthalpie von 0,67 J/g besitzt. Dieser Peak war jedoch für die 5%igen und 10%igen Dynasan-Dispersionen nicht nachweisbar. Für das 5%-Softisan-NLC wurde kein einziges Schmelzereignis gefunden, obwohl die zugehörige 20%ige Dispersion zwei Schmelzpeaks bei 38,7°C und 52,2°C zeigte, deren Enthalpiewerte mit 2,43 J/g und 1,26 J/g gemessen wurden. Somit führt die Auswertung der 5%igen Softisan-Dispersion fälschlicherweise zur Erkenntnis, dass in ihr keine festen Partikel enthalten sind.

Tabelle 4-3: Charakteristische DSC-Kenndaten der Basisdispersionen (20%ig) und verdünnten Dispersionen (5%ig und 10%ig). Die Thermogramme der untersuchten Dispersionen sind in Abbildung 4.2-2 zu sehen.

	Lipidkonzentration [%]	niedrigschmelzende Modifikation		hochschmelzende Modifikation	
		Schmelzpunkt [°C]	Breite des Peaks [°C]	Schmelzpunkt [°C]	Breite des Peaks [°C]
Softisan 154	5	-	-	-	-
	10	38,9	5,6	52,2	3,8
	20	38,7	5,4	52,2	3,7
Dynasan 118	5	-	-	63,9	4,9
	10	-	-	63,8	4,1
	20	39,5	4,8	63,9	4,0

Die auf die gesamte Probe bezogene Berechnung der Enthalpien führt zu sehr großen Unterschieden in den Werten (Abbildung 4.2-3). Damit kann diese klassische Methode zur Berechnung der Enthalpien, zu falschen Interpretationen der DSC-Ergebnisse führen.

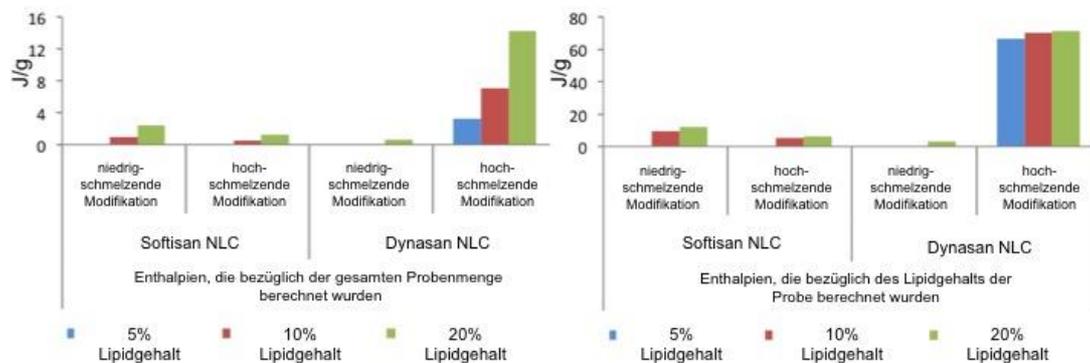


Abbildung 4.2-3: Enthalpien der Basisdispersionen (20%ig) und verdünnten Dispersionen (5%ig und 10%ig). Links: berechnet in Bezug auf die gesamte Probe, rechts: berechnet in Bezug auf den Lipidgehalt der Probe

Im Gegensatz dazu waren die Unterschiede zwischen den Enthalpien, die bezogen auf den Lipidgehalt berechnet wurden, kleiner. Auch wenn eine signifikante Abnahme der Schmelzenthalpien bei gleichzeitiger Zunahme des Wassergehaltes ebenso beobachtbar ist, ist die auf den Lipidgehalt bezogene Berechnung der Enthalpien zu empfehlen.

4.2.1.3.2 Einfluss der Zentrifugation auf die DSC-Ergebnisse

4.2.1.3.2.1 DSC-Thermogramme der originalen – nicht zentrifugierten – Proben

Die DSC-Ergebnisse der ursprünglichen Proben (nicht zentrifugiert, 5% und 10% Lipidphase) sind in Abbildung 4.2-4 dargestellt. Am Tag der Produktion und am siebten Tag danach ergaben die Proben mit einer 5% Lipidphase noch keinen Schmelzpeak, ein solcher konnte jedoch im weiteren Verlauf der Lagerung detektiert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die Partikel in eine kristalline Struktur übergehen. Die NLC-Dispersionen mit einer 10% Lipidphase zeigten direkt nach der Produktion geringe Kristallinitäten, die sich während der Lagerung verstärkten.

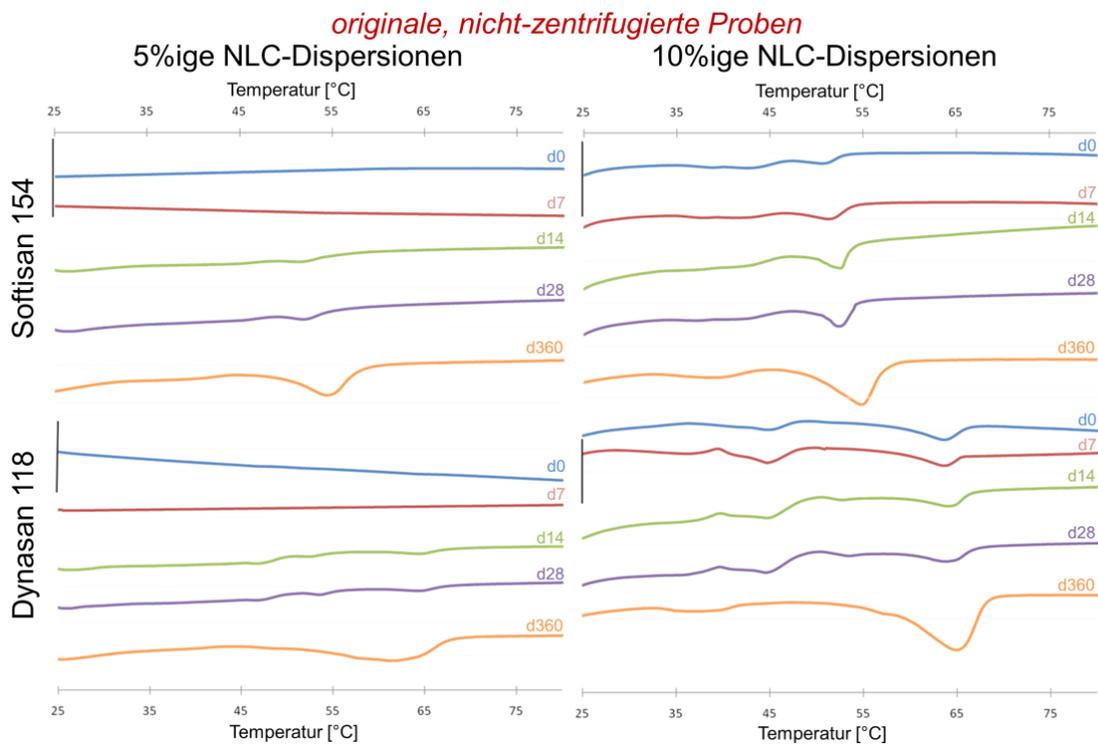


Abbildung 4.2-4: DSC-Thermogramme der ursprünglichen NLC (ohne Vorbehandlung) in Abhängigkeit von der Lagerungszeit. Maßstabsbalken: 0,2 J/g. Heizrate: 10 K/Min.

4.2.1.3.2.2 Vergleich zwischen den DSC-Thermogrammen der originalen und der zentrifugierten Proben am Tag der Produktion

Im Gegensatz zu den originalen Proben wurden bei den zentrifugierten Proben bereits am Tag der Herstellung in allen DSC-Thermogrammen Schmelzereignisse detektiert (Abbildung 4.2-5). Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der Kristallisation, welche durch die Scherkräfte, die während der Zentrifugation entstehen, induziert wird (Freitas et al. 1999a).

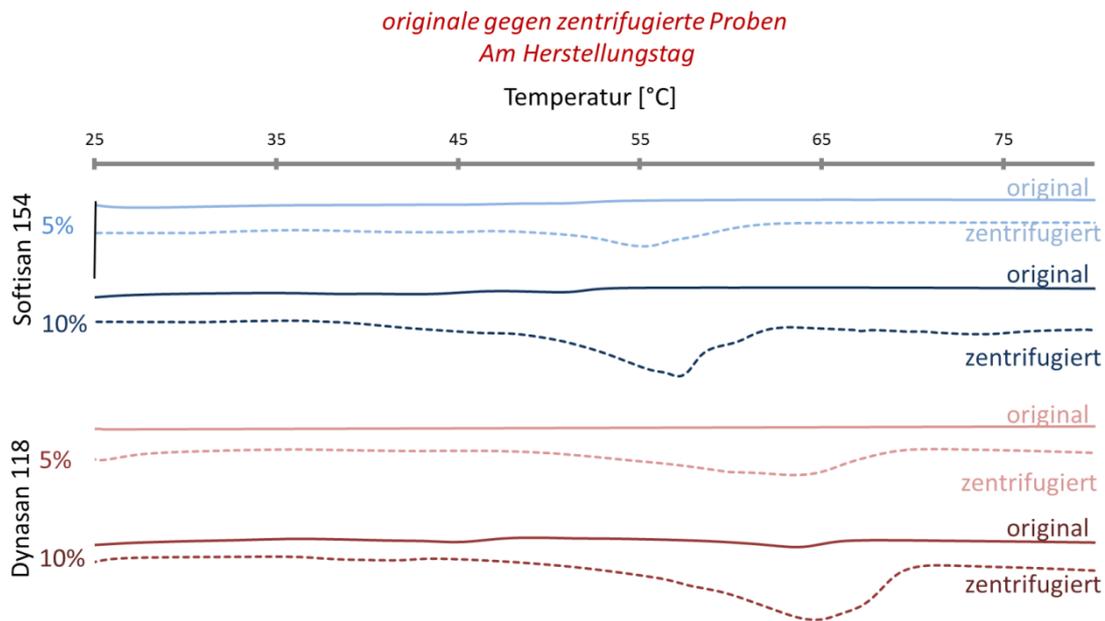


Abbildung 4.2-5: Vergleich der DSC-Thermogramme der ursprünglichen nicht zentrifugierten Proben und zentrifugierten Proben am Tag der Herstellung. Maßstabsbalken: 0,5 J/g. Heizrate: 10 K/Min.

4.2.1.3.2.3 Vergleich zwischen den DSC-Thermogrammen der originalen, ein Jahr gelagerten Proben und der zentrifugierten Proben

Die Thermogramme der einjährig gelagerten, nicht zentrifugierten Proben und die der zentrifugierten Proben weisen einen ähnlichen charakteristischen Verlauf auf (Abbildung 4.2-6). Schmelzereignisse wurden für jede gemessene Dispersion gefunden. Bis auf die höheren Enthalpien und der somit höheren Kristallinität der zentrifugierten Proben konnte kein wesentlicher Unterschied gefunden werden. Die Ergebnisse deuten somit an, dass eine Vorhersage über das Kristallisationsverhalten der Proben sowie über voraussichtliche Schmelzpunkte unterkühlter Schmelzen durch Zentrifugation, ohne zeitraubende Lagerung, möglich ist.

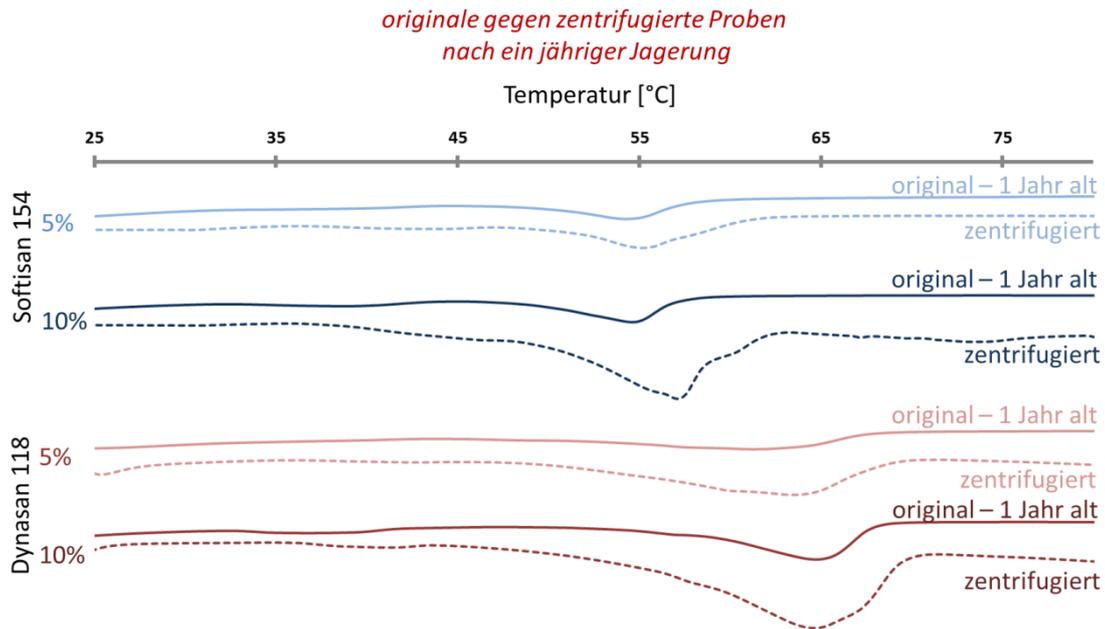


Abbildung 4.2-6: Vergleich der DSC-Thermogramme der ursprünglichen nicht zentrifugierten Proben und zentrifugiert Proben nach einjähriger Lagerung. Maßstabsbalken: 0,5 J/g. Heizrate: 10 K/Min.

4.2.1.4 Zusammenfassung

Der Wassergehalt einer Probe beeinflusst die DSC-Ergebnisse der Lipidnanopartikel-Dispersionen. Eine große Wassermenge führt in einer Probe zu einer Abnahme der Schmelzenthalpie und eventuell sogar zur Auslöschung von Schmelzereignissen. Eine auf den Lipidgehalt bezogene Berechnung ist für einen Vergleich der Enthalpie-Ergebnisse sinnvoller als die herkömmlich angewandte Berechnung, die sich auf die Gesamtprobenmenge bezieht. Für einen adäquaten Vergleich der Ergebnisse müssen die Dispersionen, die durch DSC analysiert werden, einen ähnlichen Wassergehalt aufweisen. Um alle thermischen Ereignisse sicher zu erfassen muss der Wassergehalt bei Proben mit einem hohem Wasseranteil (z. B. > 90%) reduziert werden.

Eine Zentrifugation zur Reduzierung des Wasseranteils erhöht die Kristallinität der Lipidnanopartikel. Dies kann zur falschen Interpretation der DSC-Ergebnisse führen. Andererseits kann die Beschleunigung des Kristallisationsprozesses dazu verwendet werden, unterkühlte Schmelzen in kristalline Partikel zu transformieren. Darüber hinaus kann sie dazu dienen, schon zu einem frühen Stadium der Formulierungsentwicklung, eine Vorhersage des Kristallisationsverhaltens während der Lagerung zu ermöglichen.

4.2.2 Die Rolle der α -Modifikation für die Stabilität der Lipidnanopartikel

4.2.2.1 Einleitung

Die Anwendungsbereiche von DSC in der Lipidnanopartikel-Forschung wurden in Abschnitt 1.1.5.4 beschrieben. In Kapitel 3.1 wurde gezeigt, dass der Anwendungsbereich Lipid-Screening mittels DSC für die Entwicklung der Lipidnanopartikeln weniger geeignet ist als allgemein angenommen.

Eine weiterer Anwendungsbereich von DSC ist es, die Beziehung zwischen der Stabilität einer Lipidnanopartikel-Dispersion und ihrer Kristallstruktur zu untersuchen. Dies ist für viele Forschergruppen (Westesen et al. 1997b, Freitas et al. 1999a, Das et al. 2012) von Interesse. Es ist bekannt, dass der Gelierungsprozess der Lipidnanopartikel-Dispersionen von einer Erhöhung der Kristallinität und von der Transformation der weniger geordneten, thermodynamisch instabilen α -Modifikation in die geordnete, thermodynamisch stabile β -Modifikation begleitet wird. Entsprechende Studien wurden vorwiegend am Beispiel der SLN durchgeführt. In Fachkreisen wird eine Überlegenheit von NLC gegenüber SLN bezogen auf physikalische Stabilität und Beladungskapazität diskutiert, welche mit den unterschiedlichen Kristallstrukturen der jeweiligen Lipidmatrix begründet wird.

Das Ziel von diesem Teil der Arbeit war ein direkter Vergleich zwischen SLN und NLC, um die Bedeutung der α -Modifikation auf die physikalische Stabilität der Lipidnanopartikel zu untersuchen.

4.2.2.2 Materialien und Methoden

Diesem Ziel folgend wurden SLN- und NLC-Dispersionen mittels Heißhochdruckhomogenisation (mit den Herstellungsparametern 500 bar, drei Zyklen und 70°C) produziert, deren Zusammensetzungen in Tabelle 4-4 aufgelistet sind. Diese Lipidnanopartikel wurden sowohl mit dem Modellarzneistoff Menthol beladen, wie auch unbeladen hergestellt, um zusätzlich den Einfluss der Wirkstoffinkorporation auf die Kristallstruktur zu untersuchen. Die hergestellten Dispersionen wurden mittels DSC periodisch über ein Jahr lang analysiert, um die Veränderung in der Kristallstruktur während der Zeit zu beobachten. Die physikalische Stabilität der hergestellten Dispersionen wurde mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (Abschnitt 2.2.2.3.2), Laserdiffraktometrie (Abschnitt 2.2.2.3.1) und Lichtmikroskopie (Abschnitt 2.2.2.5) untersucht.

Um die Kristallstruktur der Lipidnanopartikel besser zu verstehen, wurden durch Zusammenschmelzen der Bestandteile der Lipidphase die physikalischen Mischungen derselben hergestellt und ebenfalls mittels DSC thermisch analysiert.

Tabelle 4-4: Zusammensetzung der untersuchten Proben (Angaben in % (m/m))

	Unbeladene SLN	Unbeladene NLC	Menthol-beladene SLN	Menthol-beladene NLC
Dynasan 118	10,0%	8,0%	7,0%	5,6%
Miglyol 812	-	2,0%	-	2,0%
Menthol	-	-	3,0%	2,4%
TEGO Care 450	1,8%	1,8%	1,8%	1,8%
ultra-gereinigtes Wasser	88,2%	88,2%	88,2%	88,2%
% Lipidphase	10,0	10,0	10,0	10,0
Mischverhältnis (festes Lipid : Arzneistoff)	10 : 0	8 : 0	7 : 3	7 : 3

4.2.2.3 Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 4.2-7 zeigt links die DSC-Thermogramme der physikalischen Mischungen und rechts die der homogenisierten Dispersionen. Die Thermogramme der physikalischen Mischungen (Abbildung 4.2-7 links) und der homogenisierten Dispersionen (Abbildung 4.2-7 rechts) waren nicht identisch. Das zeigt, dass der Herstellungsprozess oder andere Parameter (z. B. Wassergehalt der Probe, siehe Abschnitt 4.2.1) einen gewissen Einfluss auf die kristalline Struktur der Lipidmatrix ausüben. Ein Vergleich der Thermogramme der homogenisierten Dispersionen wies die höchste Menge an instabiler α -Modifikation für die unbeladenen SLN-Dispersionen nach, die nur aus festen Lipiden bestehen (Abbildung 4.2-7, blaue Kurve).

Nach Beladung mit dem Modellarzneistoff (Menthol) verringerte sich die Menge der α -Modifikation (beladene SLN-Dispersion, gelbe Kurve). Ein vollständiges Verschwinden der α -Modifikation konnte nach der Zugabe des flüssigen Lipides (Öl) für die NLC-Systeme beobachtet werden (rote und blaue Kurven). Hier konnte nur ein Schmelzereignis bei höheren Temperaturen beobachtet werden, was für eine stabile Modifikation spricht.

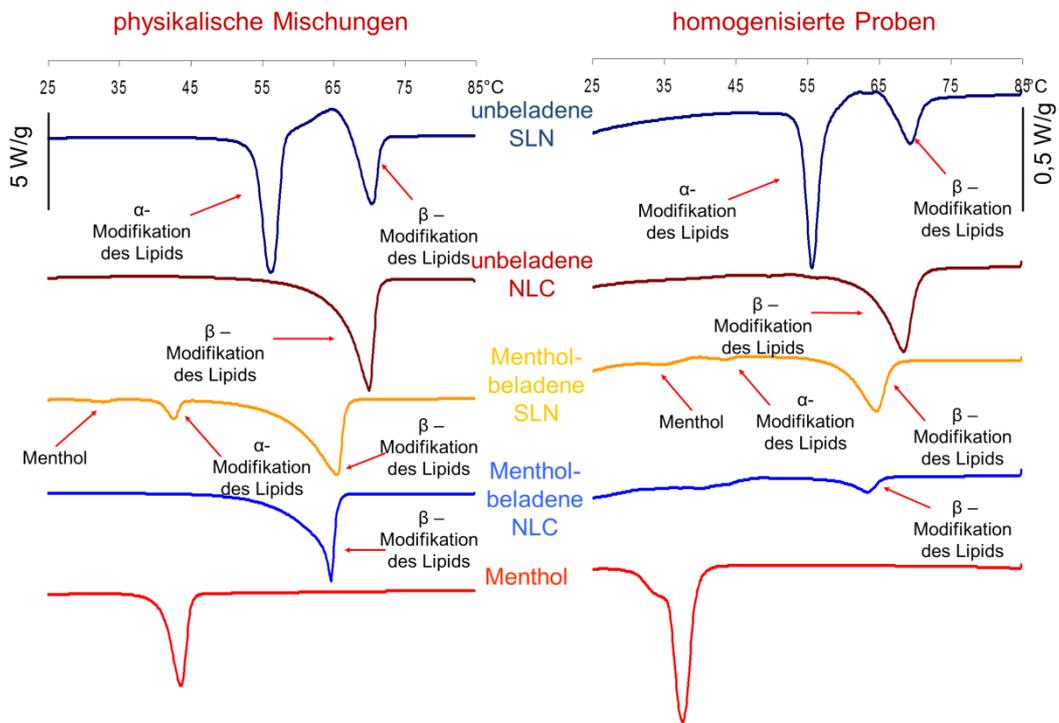


Abbildung 4.2-7: DSC-Thermogramme der physikalischen Mischungen und homogenisierten Lipidnanopartikel-Dispersionen. Heizrate: 10 K/Min.

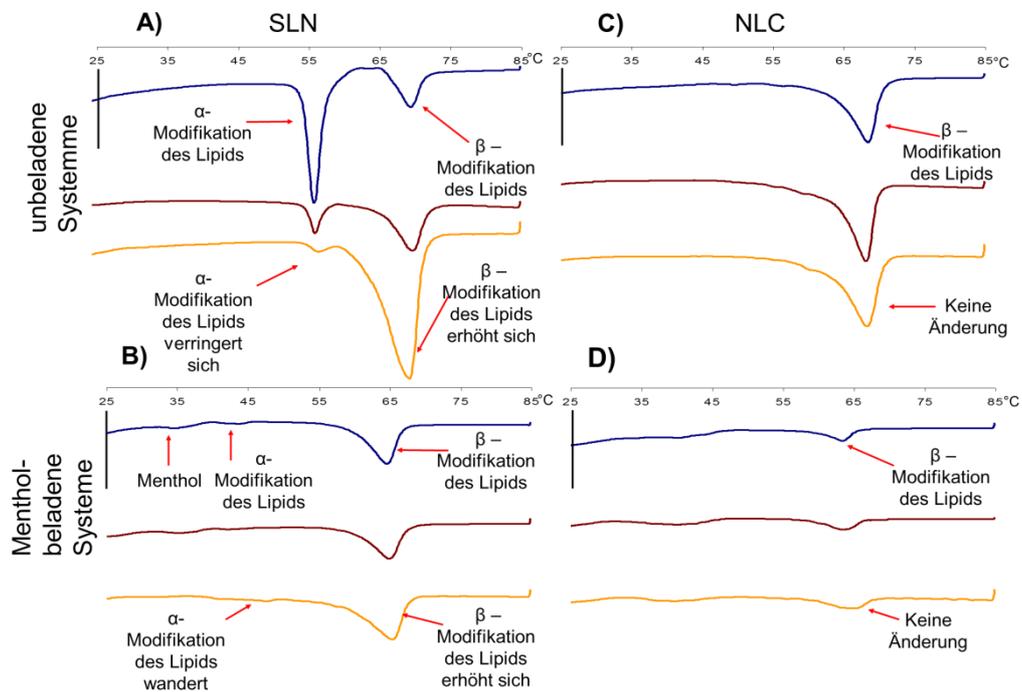


Abbildung 4.2-8: DSC-Thermogramme der homogenisierten Lipidnanopartikel-Dispersionen am Tag der Herstellung (blaue Kurven), nach einmonatiger Lagerung (rote Linien) und nach einjähriger Lagerung (orange Linien). Maßstabsbalken: 0,5 J/g. Heizrate: 10 K/Min.

Abbildung 4.2-8 zeigt über einen Beobachtungszeitraum von einem Jahr die Veränderungen der untersuchten Systeme bezogen auf die Kristallinität. Bei den unbeladenen SLN wurde eine Abnahme der α -Modifikation beobachtet, die zugleich von einer Erhöhung der β -Modifikation begleitet wurde (Abbildung 4.2-8, A). Ähnliche Beobachtungen konnten für die beladenen SLN gemacht werden, obwohl die Menge der α -Modifikation gleich nach der Herstellung wesentlich kleiner als bei den unbeladenen SLN war (Abbildung 4.2-8, B). Im Gegensatz zu den beiden SLN-Systemen wurden für die beiden NLC-Dispersionen keine Änderungen beobachtet (Abbildung 4.2-8, C und D).

Die Ergebnisse der Partikelgrößenanalytik, die mit dem dynamischen und statischen Lichtstreuungsverfahren über den Beobachtungszeitraum gemessen wurden, sind in Abbildung 4.2-9 zu finden. Die instabilste Dispersion war die der unbeladenen SLN. Diese gelierte bereits im ersten Monat der Lagerung. Eine weitere Partikelgrößenmessung wurde danach nicht mehr durchgeführt. Die nächstniedrigere Stabilität wiesen die beladenen SLN auf. Diese Dispersionen gelierten zwar nicht, die beobachtete Erhöhung der Partikelgröße zeigte aber ihre geringe physikalische Stabilität. Im Gegensatz zu den beiden SLN-Dispersionen besaßen die beiden NLC-Dispersionen eine sehr gute physikalische Stabilität über die gesamte Lagerungszeit. Für diese Dispersionen konnte für den gesamten Zeitraum kein Partikelwachstum beobachtet werden.

Ein Vergleich zwischen den Partikelgrößenergebnissen und den DSC-Ergebnissen zeigt, dass die physikalischen Stabilitätsergebnisse in Abhängigkeit zu der Menge der α -Modifikation der Lipidmatrix stehen. Je höher die Menge der α -Modifikation war, desto weniger stabil war die Dispersion.

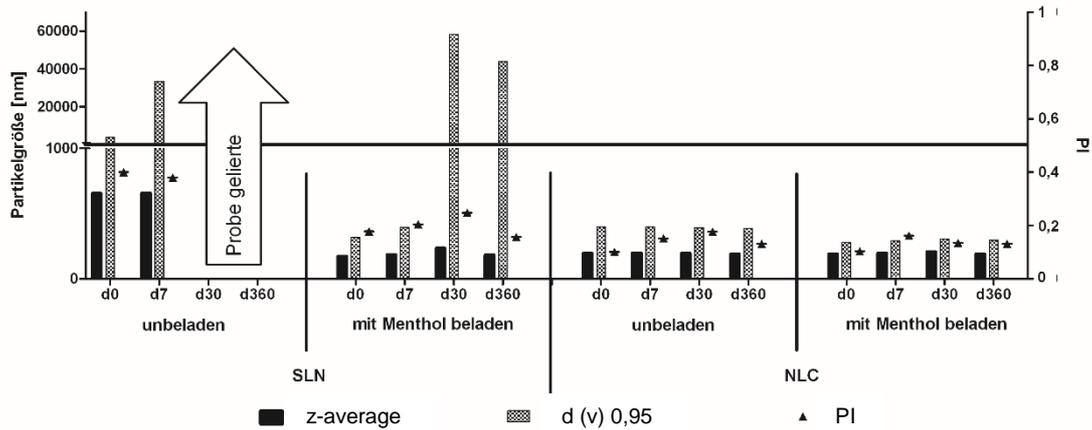


Abbildung 4.2-9: Partikelgrößen (PCS und LD) der zur Vorhersage der physikalischen Stabilität untersuchten Dispersionen. Links: SLN-Dispersionen, rechts: NLC-Dispersionen

Um die erhaltene Partikelgrößenanalyse zu bestätigen, wurden zusätzliche Untersuchungen mittels Lichtmikroskopie durchgeführt.

Größere Teilchen können auf Agglomeration von Lipidnanopartikeln oder auf Bildung der präzipitierten Arzneistoffkristalle hindeuten. Durch Arzneistoffausstoß des lipophilen Wirkstoffes in die Wasserphase können sich Wirkstoffkristalle bilden (Müller et al. 2011, Hommos 2009). Die Ergebnisse der Lichtmikroskopie der Menthol-beladenen SLN und NLC Systeme sind in Abbildung 4.2-10 dargestellt.

Beide beladenen Systeme hatten eine homogene Partikelverteilung und wiesen keine großen Partikel direkt nach der Herstellung auf (Abbildung 4.2-10, A und C). Nach drei Monaten Lagerung blieben die NLC-Dispersionen unverändert (Abbildung 4.2-10, D), wohingegen große Mentholkristalle für die SLN-Dispersionen detektiert wurden (Abbildung 4.2-10, B). Diese Beobachtung zeigt, dass die Bildung der Mentholkristalle, welche bei der SLN-Dispersion beobachtet wurde, mit der Abnahme der α -Modifikation in Zusammenhang gebracht werden kann.

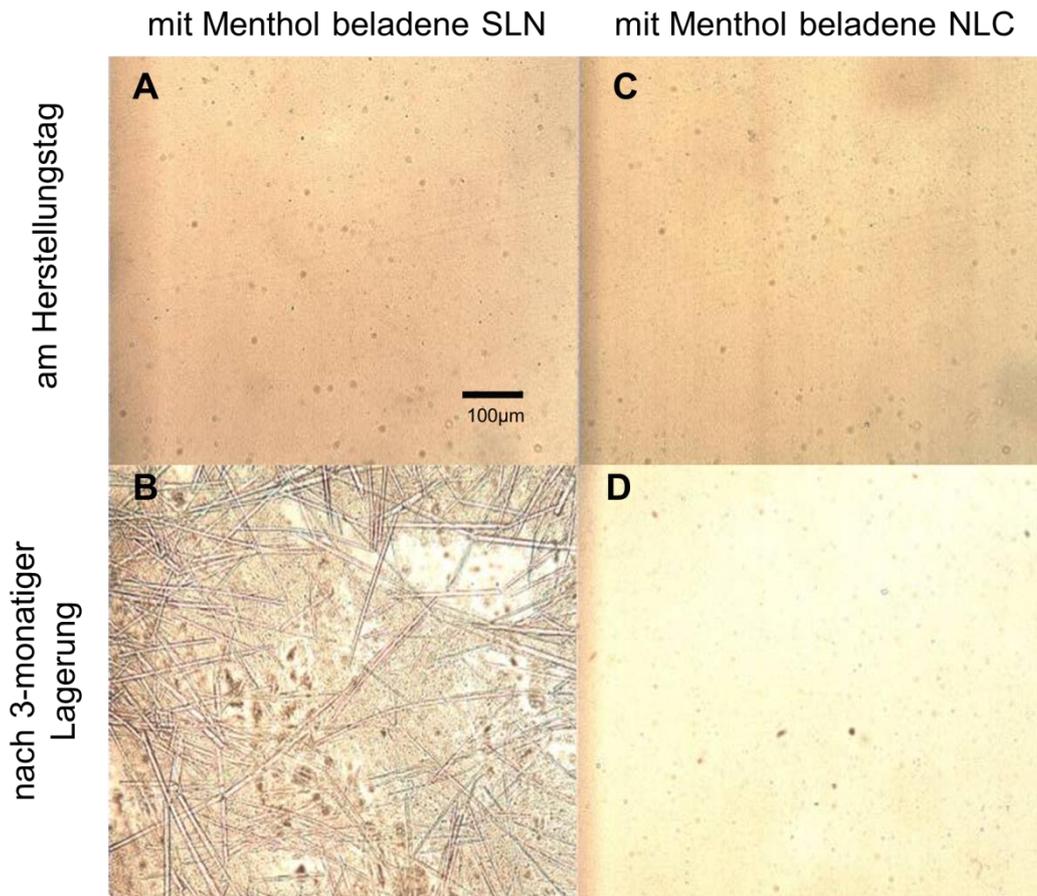


Abbildung 4.2-10: Mikroskopische Aufnahmen der zur Vorhersage der physikalischen Stabilität untersuchten, Menthol-beladenen Dispersionen. A und C: am Tag der Herstellung, B und D: nach 3-monatiger Lagerung. Links: SLN-Dispersion, rechts: NLC-Dispersion. Vergrößerung 160-fach

4.2.2.4 Zusammenfassung

Es wurde ein Zusammenhang zwischen dem Kristallisationsverhalten der Lipidnanopartikel und der physikalischen Stabilität der Lipidnanopartikel-Dispersionen bestätigt.

Da die Umwandlung der α -Modifikation in die β -Modifikation zur Zunahme der Packungsdichte des Lipides und somit zum Arzneimitteleusstoß führt, sollten für ein stabiles System hohe Mengen der α -Modifikation vermieden werden. Die Menge der α -Modifikation konnte durch Inkorporation des Arzneimittels verringert werden. Die komplette Verhinderung der Kristallisation der α -Modifikation ist durch Zugabe von flüssigem Lipid, also mit NLC als Arzneistoffträger, möglich.

Mit dem Modellarzneistoff Menthol konnte eine Überlegenheit von NLC gegenüber SLN bezüglich der physikalischen Stabilität und der Beladungskapazität gezeigt werden.

4.3 Okklusivität mittels *in vitro* Okklusionstest nach de Vringer

4.3.1 Einleitung und Problemstellung des Abschnitts

Lipidnanopartikeln weisen okklusive Eigenschaften auf. Daher ist die Bestimmung von Okklusivität in der Lipidnanopartikel-Forschung wichtig. Mittels einem Okklusionstest nach de Vringer kann das Vorliegen von Okklusivität *in vitro* bestimmt werden (de Vringer 1992). Für einen solchen Test werden Becher, die mit Wasser gefüllt und mit einem Filterpapier abgedichtet sind, verwendet. Die Probe, deren Okklusivität untersucht werden soll, wird auf das Filterpapier aufgetragen. Die Becher werden in einer Klimakammer bei 33°C und 58% relativer Luftfeuchtigkeit gelagert. Die Wassermenge, die dabei während der Lagerung durch das mit der Probe versehene Filterpapier verdunstet, wird mit der Wassermenge, die bei der Referenz (ein Becher mit Filterpapier ohne Probe) verlorengegangen ist, verglichen. Allerdings sind Klimakammern, welche die Luftfeuchtigkeit einstellen können, kostenintensiv und nicht in jedem Labor vorhanden. In dieser Studie wurde daher untersucht, ob der Okklusionstest nach de Vringer auch in einem einfachen Ofen durchgeführt werden kann und reproduzierbare und brauchbare Ergebnisse liefern kann.

4.3.2 Materialien und Methoden

Dem Ziel der Studie folgend wurden zunächst vier Lipidnanopartikel-Dispersionen, deren Formulierungen (E bis H) in Tabelle 4-5 aufgelistet sind, mittels Heißhochdruckhomogenisation hergestellt. Die Herstellungsparameter waren 500 bar, drei Zyklen und 55°C für Softisan-Dispersionen bzw. 70°C für Dynasan-Dispersionen. Entsprechend den Beschreibungen in de Vringers Patent wurden die Becher mit 50 ml destilliertem Wasser gefüllt und mit einem Filterpapier abgedeckt. Die Formulierungen (jeweils 200 µl) wurden das Filterpapier gleichmäßig bedeckend aufgetragen. Anschließend wurden die Becher gewogen und in eine Kammer gestellt.

Tabelle 4-5: Zusammensetzung der untersuchten Dispersionen (Angaben in % (m/m))

	Rezeptur E	Rezeptur F	Rezeptur G	Rezeptur H
Dynasan 118	7,0%	7,0%	-	-
Softisan 154	-	-	7,0%	7,0%
Miglyol 812	-	2,0%	-	2,0%
Menthol	3,0%	3,0%	3,0%	3,0%
TEGO Care 450	1,8%	1,8%	1,8%	1,8%
ultra-gereinigtes Wasser	88,2%	86,2%	88,2%	86,2%

Der Okklusionstest wurde in zwei verschiedenen Kammern durchgeführt:

- ein Standard-Trockenschrank (Memmert, Deutschland) mit einem Schlupfloch, welches gesättigte Luftfeuchtigkeit vermeidet.
- eine Inkubationskammer (Heraeus, Deutschland) ohne Schlupfloch.

Beide Kammern boten nicht die Möglichkeit, die Luftfeuchtigkeit einzustellen.

Die Wassermenge, die während der Lagerung verdampfte, wurde nach 48 Stunden durch Wiegen der Bechergläser bestimmt. Die Okklusionsfaktoren wurden unter Verwendung von nachstehender Gleichung berechnet:

$$F = \left(\frac{A - B}{A} \right) * 100$$

F: Okklusionsfaktor – gibt die relative Okklusivität in % an.

A: Die Wassermenge, die während der Lagerung durch das mit der Probe versehene Filterpapier verdampft.

B: Die Wassermenge, die bei der Referenz (ein Becher mit Filterpapier ohne Probe) verdampft.

Während der Versuche wurden die Temperatur und die relative Luftfeuchtigkeit an verschiedenen Stellen innerhalb der Kammer mit einem Thermometer und einem Hygrometer gemessen. Jede Formulierung (E bis H) wurde dreifach getestet. Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu überprüfen, wurde der gesamte Testvorgang dreifach durchgeführt (n=3).

4.3.3 Ergebnisse und Diskussion

4.3.3.1 Okklusionstest im Standard-Trockenofen

Abbildung 4.3-1 zeigt die Ergebnisse der in dem Standard-Trockenofen durchgeführten *in vitro* Okklusionstests. Sie belegen, dass die Durchführung der Okklusionstests in dem Standard-Trockenofen hohe Standardabweichungen zwischen den Triplikaten verursachen. Wird die Rezeptur G im dritten Test betrachtet, so beträgt der Mittelwert der gemessenen Okklusionsfaktoren 18, während die Standardabweichung 20 beträgt. Aufgrund der großen Standardabweichungen sind die Unterschiede zwischen den Rezepturen E bis H nicht signifikant. Daher ist eine statistisch bedeutende Differenzierung der Rezepturen mit diesem Verfahren nicht möglich.

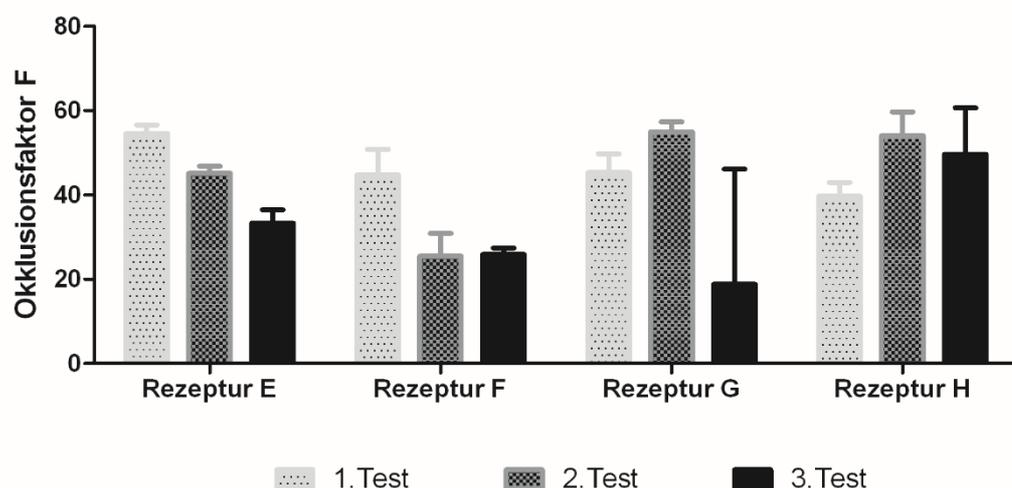


Abbildung 4.3-1: Untersuchung der Reproduzierbarkeit des Okklusionstests im Standard-Trockenofen. Okklusionsfaktor F von vier getesteten Rezepturen im Triplikate. Der Okklusionstest wurde dreimal durchgeführt.

Gleichzeitig waren die Ergebnisse nach Anwendung des Standard-Trockenofen-Verfahrens nicht reproduzierbar. Signifikante Unterschiede, welche für die Rezeptur E zwischen dem ersten und dem dritten Test sowie zwischen dem zweiten und dem dritten Test gefunden wurden, bestätigen diese Aussage.

Interessanterweise wiesen die Becher, welche in der Mitte des Ofens platziert wurden, den höchsten Okklusionsfaktor auf. Becher, die sich in der Nähe der Kammerwandung befanden, besaßen geringere Okklusionsfaktoren. Dieser Zusammenhang kann eine Folge der nicht regulierbaren Luftfeuchtigkeit sein. Es kann aber auch eine Folge der unterschiedlichen Temperaturen innerhalb des

Trockenschrankes sein, da Messungen der Temperatur an verschiedenen Stellen im Ofen zeigten, dass die Wärme in der Kammer nicht homogen verteilt war. In der Nähe der Innenwand des Ofens war die Temperatur fast 2°C höher als in der Mitte des Ofens.

4.3.3.2 Okklusionstest im Zellinkubator

Um die Temperatur genauer steuern zu können, wurde im nächsten Teil der Studie ein Zellinkubator verwendet. Der Inkubator lieferte eine sehr gute Homogenität der Wärmeverteilung in der gesamten Kammer mit einer Abweichung von $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Die relative Luftfeuchte konnte während des Tests jedoch nicht konstant gehalten werden. Im Laufe der Testzeit stieg sie von 40% auf bis zu 90% an. Wie zu erwarten war, besaßen damit die Ergebnisse aus diesem Test hohe Standardabweichungen. Deshalb wurde auf einen zweiten und dritten Testvorgang verzichtet.

Die Daten zeigen deutlich, dass für aussagefähige Ergebnisse sowohl die Temperatur als auch die relative Luftfeuchtigkeit konstant gehalten werden müssen. Dies stellt ohne eine geeignete Klimakammer zunächst ein Problem dar. In der Literatur wird eine konstante Luftfeuchtigkeit durch die Verwendung einer gesättigten Lösung von hygroskopischen Verbindungen beschrieben (Rockland 1960).

Als hygroskopische Verbindung wurde in dieser Studie Natriumbromid ausgewählt. Natriumbromid ist ungiftig und seine gesättigte Lösung ergibt eine konstante relative Luftfeuchtigkeit von 57% bei einer Temperatur von 30°C bis 35°C (Rockland 1960). Vor dem Test wurde eine gesättigte NaBr-Lösung hergestellt und in die Klimakammer gebracht. Während des Tests wurde die relative Luftfeuchtigkeit über einen Zeitraum von 48 Stunden gemessen. Im Test blieb für mindestens 48 Stunden die relative Luftfeuchtigkeit bei 60% bis 63% annähernd konstant (Abbildung 4.3-2). Die Daten bestätigten, dass die Verwendung einer gesättigten Natriumbromidlösung die Regulierung der relativen Luftfeuchtigkeit ermöglicht.

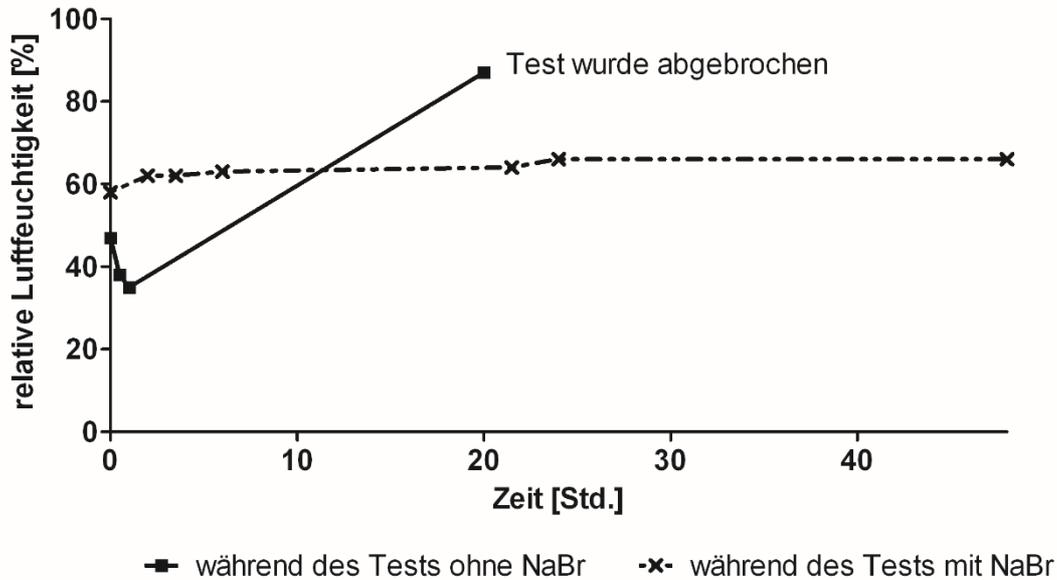


Abbildung 4.3-2: Relative Luftfeuchtigkeitswerte während des Testes ohne NaBr im Vergleich zum Test mit NaBr im Zellinkubator

In Abbildung 4.3-3 werden die Ergebnisse der Okklusionstests gezeigt, die in der Inkubationskammer mit der gesättigten Lösung von NaBr durchgeführt wurden. Die Daten zeigen eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Tests und geringe Standardabweichungen. Die beschriebene Methode (in der Inkubationskammer, mit der gesättigten Lösung von NaBr) ermöglicht nun die Differenzierung der verschiedenen okklusiven Eigenschaften der getesteten Rezepturen.

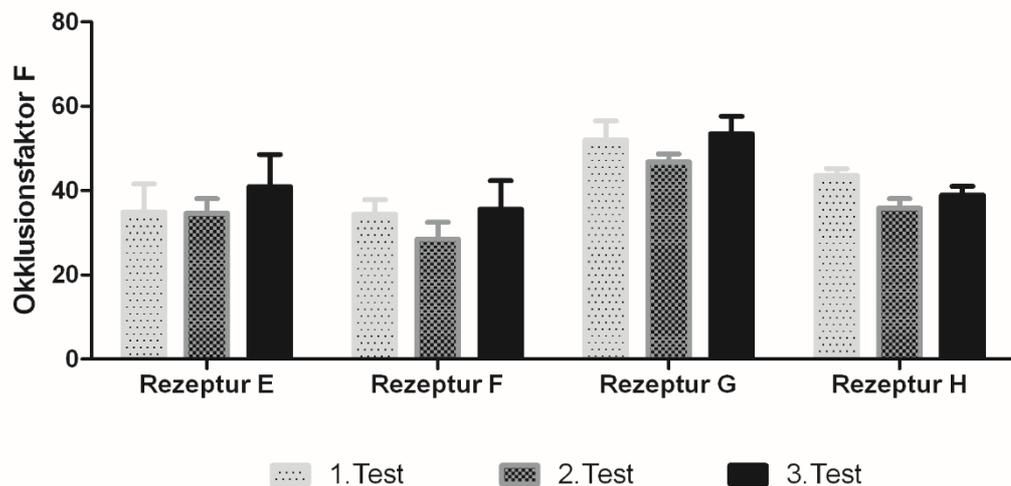


Abbildung 4.3-3: Untersuchung der Reproduzierbarkeit des Okklusionstests in der Inkubationskammer mit der gesättigten Lösung von NaBr. Okklusionsfaktor F von vier getesteten Rezepturen im Triplikate. Der Okklusionstest wurde dreimal durchgeführt.

4.3.4 Zusammenfassung des Abschnitts

Die Ergebnisse der *in vitro* Okklusionstests nach de Vringer sind stark von der Temperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit abhängig. Daher müssen diese Parameter während der Untersuchungen eingestellt und konstant gehalten werden.

Inkubationskammern bieten eine nahezu bestmögliche Homogenität der Wärmeverteilung. Obwohl sie keine direkte Regulierung der Luftfeuchtigkeit erlauben, kann die Luftfeuchtigkeit unter Einsatz einer gesättigten Lösung von nichttoxischem Natriumbromid konstant gehalten werden. Dieser Ansatz zur Durchführung eines Okklusionstests ist einfach, robust und kostengünstig.

5 Optimierte Lagerung der Lipidnanopartikel und Vergleich mit anderen Nano-Arzneimittelträgersystemen

5.1 Einleitung und Zielsetzung des Kapitels

In Abschnitt 1.1.6 wurden bereits die gängigen primären Packmittel für Lipidnanopartikeln, deren Unterschiede und ihre Bedeutung für die Stabilität der Lipidnanopartikel-Dispersionen vorgestellt.

Das Ziel in diesem Teil der Arbeit war es, für die Lagerung von Lipidnanopartikel-Dispersionen eine Alternative zu selbst silanisierten Vials zu eruieren, da das Mittel für die Silanisierung nicht mehr verfügbar ist (siehe allgemeiner Teil). Dafür wurde der Einfluss der verschiedenen Verpackungsmaterialien auf die physiko-chemischen Eigenschaften (z. B. physikalische Stabilität) der Lipidnanopartikel-Dispersionen untersucht. Darüber hinaus wurde zum Zwecke eines Vergleichs der Einfluss des Verpackungsmaterials auf andere Nanoarzneistoffträgersysteme (Nanoemulsionen und Nanosuspensionen) bzw. auf reines Wasser (als Dispersionsmedium) analysiert.

5.2 Materialien und Methoden

5.2.1 Materialien

5.2.1.1 Füllgut

Um den Einfluss der Verpackungsmaterialien auf die kolloidalen Arzneistoffträgersysteme systematisch zu untersuchen, wurden als Füllgut reines Wasser, eine Nanoemulsion, eine Nanosuspension und eine Menthol-beladene NLC-Dispersion verwendet. Deren Zusammensetzungen sowie deren Herstellungsmethode sind in Tabelle 5-1 aufgelistet.

Tabelle 5-1: Zusammensetzung der untersuchten Füllgüter

Füllgut	Zusammensetzung	Herstellung
ultra-gereinigtes Wasser	Aqua purificata	hergestellt durch Umkehrosmose und anschließender Aufreinigung in einer MilliQ-plus-Anlage
Nanoemulsion	10,00% Miglyol 812 1,80% TEGO Care 450 88,20% ultra-gereinigtes Wasser	hergestellt durch Heißhochdruckhomogenisation bei 55°C mit 500 bar und drei Zyklen
Nanosuspension	6,00% Apigenin 0,33% Tween 80 0,17% EUXYL PE 9010 93,50% ultra-gereinigtes Wasser	Die Herstellung wurde in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt wurde das grobe Suspensionskonzentrat (18,00%) von Apigenin unter Verwendung von 0,6-0,8 µm Perlen gemahlen (sieben Passagen mit 2000 U/min). Nach der Zugabe eines Konservierungsmittels (EUXYL PE 9010) wurde die Nanosuspension auf 6,00% verdünnt und dann unter Verwendung eines Avestin C50 bei 300 bar, mit drei Zyklen homogenisiert.
Menthol-beladene NLC	7,00% Dynasan 118 3,00% Menthol 2,00% Miglyol 812 1,80% TEGO Care 450 86,20% ultra-gereinigtes Wasser	hergestellt durch Heißhochdruckhomogenisation bei 70°C mit 500 bar und drei Zyklen

5.2.1.2 Primäre Verpackungsmaterialien

Drei verschiedene Vials und vier verschiedene Plastikgefäße dienten als primäre Verpackungsmaterialien (Abbildung 5.2-1). Die Flaschen von Glasart II wurden in silanisiertem Zustand und nicht-vorbehandeltem Zustand (unsilanisiert) untersucht. Die Silanisierung der Vials wurde unter Verwendung einer 2%igen Dichlordimethylsilan-Lösung in 1,1,1-Trichlorethan (Merck, GmbH, Deutschland) durchgeführt. Vor der Abfüllung wurden die Glasvials und die Plastikgefäße mit gereinigtem Wasser ausgespült und an der Luft getrocknet.



Abbildung 5.2-1: Untersuchte primäre Verpackungsmaterialien

Tabelle 5-2 listet die Behältnisse und deren ungefähre Kosten auf.

Tabelle 5-2: Ungefähre Kosten der untersuchten primären Verpackungsmaterialien. Die Kosten sind für 20-30 ml Vials inklusive Verschluss angegeben. Silanisierung kostet ca. 0,22 € pro Vial (Packsys GmbH, Deutschland)

Verpackungsmaterial	Kosten in € pro Stück	Lieferant
Glasart I	0,56	VWR, Deutschland
Glasart II	0,47	Packsys GmbH, Deutschland
Polycarbonat (PC)	2,33	VWR, Deutschland
Polyethylen hoher Dichte(HDPE)	0,62	VWR, Deutschland
Polyethylen niedriger Dichte(LDPE)	0,60	VWR, Deutschland
Polypropylen(PP)	0,74	VWR, Deutschland

5.2.2 Methoden

In jedes Vial und jedes Gefäß wurden 20 ml des Produktes gefüllt und bei drei Temperaturen (4°C, Raumtemperatur und 40°C) über einen Zeitraum von einem Jahr gelagert (n=3). Während dieser Zeit wurden alle Proben hinsichtlich ihrer Leitfähigkeit und ihres pH-Werts untersucht (Abschnitt 2.2.2.10). Darüber hinaus wurden die reinen Wasser-Proben hinsichtlich Gewichtsverlust und die Nanoarzneistoffträgersysteme hinsichtlich ihrer Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung (PCS und LD mit der jeweiligen Standardmethode (Abschnitt 2.2.2.3) analysiert. Für die LD-Messungen betragen der reale und der imaginäre Brechungsindex 1.456 und 0,001 für die Nanoemulsionen und NLC-Dispersionen bzw. 1.736 und 0,01 für die Apigenin-Nanokristalle. Die Zetapotentialuntersuchungen (Abschnitt 2.2.2.4) wurden in Leitfähigkeitswasser (Müller 1996) und im

Originalmedium, welches durch Filtration der Dispersionen gewonnen wurde, durchgeführt. Die Proben der Nanosuspension wurden zusätzlich in einer Tensidlösung gemessen, welche die gleiche Menge Tensid enthielt, die der Nanosuspension zur Stabilisierung zugesetzt wurde. Außerdem wurden die Arzneistoffträgersysteme mikroskopisch (Abschnitt 2.2.2.5) sowie makroskopisch untersucht.

Die Werte aus den pH- und Leitfähigkeitsmessungen wurden unter Verwendung der GraphPad Prism Software (GraphPad Software, USA) statistisch analysiert. Aufgrund der normalverteilten Datensätze wurde für die statistische Auswertung eine einfache Varianzanalyse (ANOVA) gewählt. Für den Paarvergleich wurde der Tukey-Test als Post-Test gewählt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde für alle statistischen Auswertungen auf $p=0,05$ festgelegt.

5.3 Ergebnisse

Die zugehörige Diskussion der Ergebnisse erfolgt in Abschnitt 5.4.

5.3.1 Wasser als Dispersionsmedium

5.3.1.1 Leitfähigkeit

Die Ergebnisse zur Leitfähigkeit der Wasser-Proben, die in verschiedenen Verpackungsmaterialien und bei verschiedenen Temperaturen über ein Jahr gelagert wurden, sind in Abbildung 5.3-1 zu sehen. Für alle Proben stiegen die Leitfähigkeitswerte mit der Zeit an. Der Grad des Anstiegs hing von der Lagerungstemperatur ab. Grundsätzlich führten höhere Lagerungstemperaturen zu höheren Leitfähigkeitswerten. Eine Ausnahme für die beobachtete Temperaturabhängigkeit bildeten die Proben, die in PC-Fläschchen gelagert wurden. Die Leitfähigkeit der PC-Proben, die bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden, war höher als bei den PC-Proben, die bei 40°C gelagert wurden.

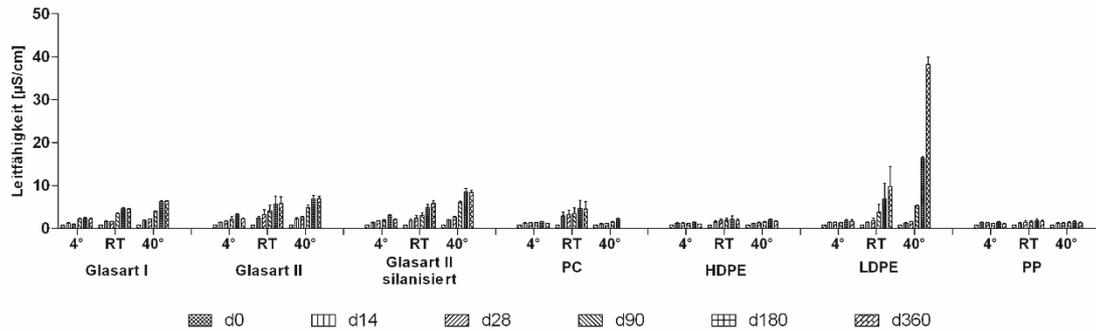


Abbildung 5.3-1: Leitfähigkeitswerte der Wasser-Proben, die in verschiedenen Verpackungsmaterialien und bei 4°C, bei Raumtemperatur (RT) und bei 40°C gelagert wurden. Beobachtungszeitraum: 360 Tage

Neben dem Einfluss der Lagerungstemperatur wurde ebenso ein Einfluss des Verpackungsmaterials beobachtet. Die bei 40°C gelagerte LDPE-Probe wies einen ununterbrochenen Anstieg der Leitfähigkeitswerte auf, sodass ihr Leitfähigkeitswert ab dem 6. Monat im Vergleich zu den anderen Proben signifikant höher war. Auch die bei Raumtemperatur aufbewahrte LDPE-Probe besaß im Vergleich zu den anderen Raumtemperatur-Proben deutlich höhere Leitfähigkeitswerte. Unter den bei 4°C gelagerten Proben wurden die höchsten Leitfähigkeitswerte jedoch bei den Glas-Proben gemessen.

Ein Vergleich zwischen den Glassorten (Glasart II (silanisiert), Glasart II (nicht silanisiert) und Glasart I) zeigte, dass die Glasart I-Proben etwas geringere Leitfähigkeiten als die Glasart II-Proben besaßen (Abbildung 5.3-2). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

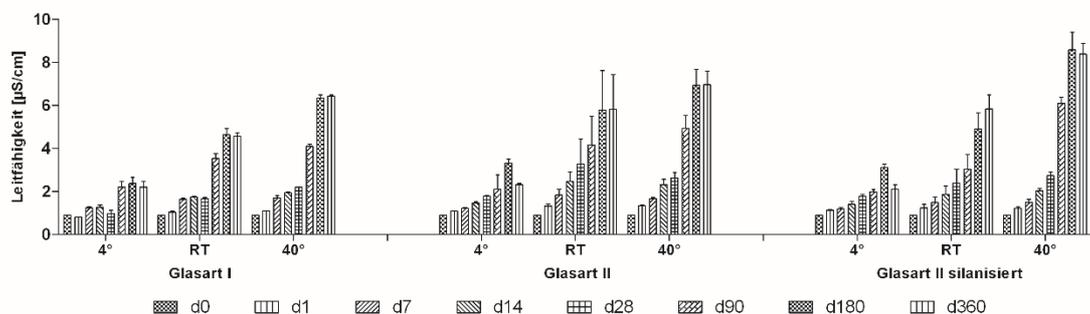


Abbildung 5.3-2: Leitfähigkeitswerte der Wasser-Proben, die in verschiedenen Glasarten bei 4°C, bei Raumtemperatur (RT) und bei 40°C gelagert wurden. Beobachtungszeitraum: 360 Tage

Auf der anderen Seite zeigte der Vergleich zwischen silanisiertem und nicht silanisiertem Glas, dass in den ersten zwei Wochen der Lagerung das Wasser in den silanisierten Vials eine geringere Leitfähigkeit besaß. Diese Differenz wurde jedoch im Laufe der Zeit kleiner und am Ende der Studie hatte das Wasser im silanisierten Glas sogar eine leicht höhere Leitfähigkeit. Insgesamt war der Unterschied so gering, dass kein signifikanter Leitfähigkeitsunterschied zwischen den Proben in den silanisierten und den nicht silanisierten Glasvials festgestellt werden konnte.

Die kleinsten Veränderungen der Leitfähigkeit zeigte sich bei den Proben, die in PP gelagert wurden. Der zweitgeringste Anstieg der Leitfähigkeit wurde bei den HDPE-Proben beobachtet.

5.3.1.2 pH-Wert

Die Ergebnisse zu diesem Teil der Studie sind in Abbildung 5.3-3 zu sehen. Der initiale pH-Wert des Wassers lag bei 5,8.

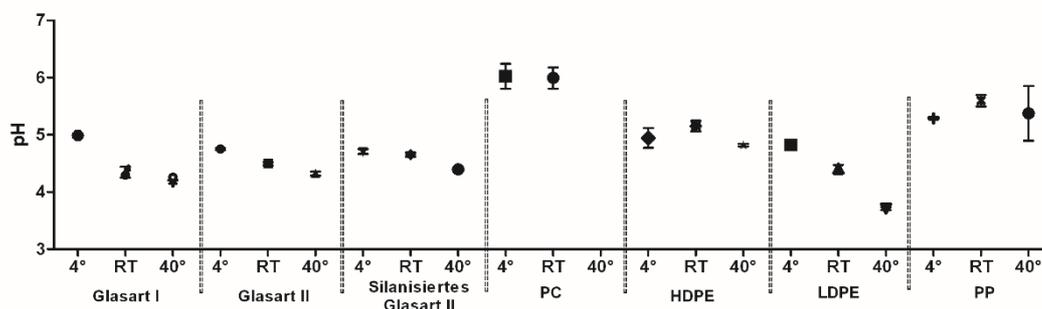


Abbildung 5.3-3: pH-Werte der Wasser-Proben nach einjähriger Lagerung, die in verschiedenen Verpackungsmaterialien und bei 4°C, bei Raumtemperatur (RT) und bei 40°C gelagert wurden

Wegen ihrer zahlreichen Inhaltsstoffe ist es für die Kunststoffverpackungen grundsätzlich schwierig eine Tendenz des pH-Wertes vorauszusagen. Im Gegensatz dazu ist im Allgemeinen für die Glas-Proben ein Anstieg der pH-Werte zu erwarten. Der Grund dafür ist die Diffusion der OH-Ionen aus der Glasoberfläche in das gelagerte Wasser hinein. Bei fast allen hier untersuchten Wasser-Proben konnte jedoch nach einjähriger Lagerung eine Verringerung der pH-Werte festgestellt werden. Die einzige Ausnahme bildeten die PC-Proben, bei denen ein leichter Anstieg der pH-Werte (6,0) beobachtet wurde.

Ein Zusammenhang zwischen der Lagerungstemperatur und der Abnahme der pH-Werte wurde für die meisten untersuchten Verpackungsmaterialien festgestellt. Je höher die Lagerungstemperatur war, desto niedriger waren die pH-Werte. Der Einfluss der Temperatur war signifikant für die Proben, die in LDPE bzw. in den Glasvials gelagert wurden. Neben dem Einfluss der Temperatur wurde auch ein Einfluss des Verpackungsmaterials beobachtet. Die Wasser-Proben, die in den LDPE-Flaschen bei 40°C aufbewahrt wurden, bildeten im Mittel den niedrigsten pH-Wert. Die nächst niedrigeren pH-Werte wurden für die Proben gemessen, die im Glas bei 40°C gelagert wurden. Zwischen den einzelnen Glassorten wurde bei gleicher Lagerungstemperatur kein signifikanter Unterschied festgestellt. Die höchsten pH-Werte wurden für die PC- und PP-Proben gefunden. Ein Vergleich zwischen den Leitfähigkeits- und pH-Ergebnissen zeigte eine negative Korrelation. Je höher die Leitfähigkeit der Wasser-Probe war, desto niedriger war deren pH-Wert.

5.3.1.3 Wasserdampfpermeabilität

Um die Wasserdampfpermeabilität des Verpackungsmaterials zu untersuchen, wurde die Menge der Flüssigkeit gewogen, die nach einem Jahr Lagerung übrig blieb. Mittels dieser Ergebnisse wurde die jeweils verdampfte Wassermenge berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.3-4 zu sehen.

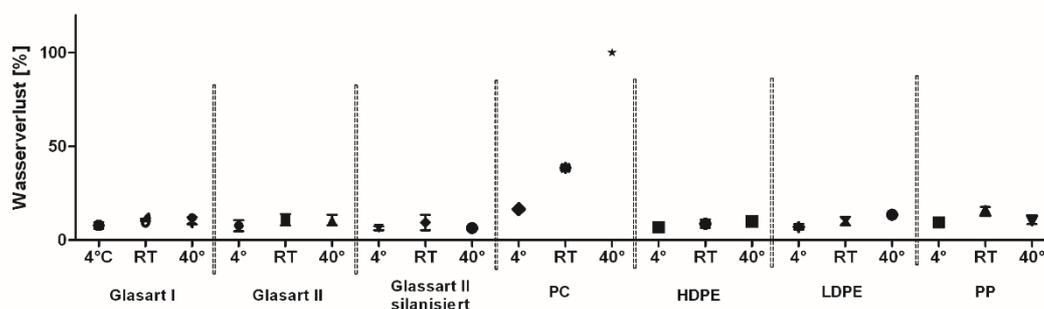


Abbildung 5.3-4: Wasserverlust [%] der Wasser-Proben nach einjähriger Lagerung, in Abhängigkeit vom Verpackungsmaterial und von der Lagerungstemperatur

Die Ergebnisse zeigen, dass die größte Menge an Wasser aus den PC-Flaschen heraus verdampfte, die bei 40°C gelagert wurden. Die gesamte Menge des Wassers, welche am Anfang der Studie 20 ml betrug, verdampfte innerhalb von einem Jahr (Abbildung 5.3-5). Bezüglich der bei Raumtemperatur gelagerten Proben zeigten wieder die PC-Proben einen im Vergleich zu den Proben der anderen Materialien signifikant höheren

Gewichtsverlust. Unter den anderen untersuchten Verpackungsmaterialien konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.



Abbildung 5.3-5: Makroskopische Aufnahme der Wasser-Proben, die in PC-Flaschen gelagert wurden. Links: bei 4°C, Mitte: bei Raumtemperatur, Rechts: bei 40°C

Für die weiteren Schritte der Studie wurde das Verpackungsmaterial PC wegen seiner sehr hohen Wasserdampfdurchlässigkeit ausgeschlossen, da es für die anderen wasserhaltigen Systeme ungeeignet ist. Die Gründe dafür werden in Abschnitt 5.4.3 diskutiert. Des Weiteren konnten die silanisierten Vials von Glasart II nicht weiter untersucht werden, da die Chemikalie für die Silanisierung nicht mehr verkauft wurde und somit die Vials nicht mehr silanisiert werden konnten.

5.3.2 Nanoemulsionen

5.3.2.1 Leitfähigkeit

Die Leitfähigkeitsergebnisse der Nanoemulsionen sind in Abbildung 5.3-6 zu sehen. Die Leitfähigkeit der Ausgangsnanoemulsion betrug am Tag der Herstellung 126 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Wie bei den Ergebnissen der Wasser-Proben (Abschnitt 5.3.1.1) stiegen die Leitfähigkeitswerte der in den verschiedenen Verpackungsmaterialien aufbewahrten Nanoemulsionen während der Lagerzeit. Jedoch war der Anstieg der Leitfähigkeit bei den Nanoemulsionen nicht kontinuierlich. Außerdem traten höhere

absolute Anstiege in kürzerer Zeit auf. So stieg die Leitfähigkeit der Nanoemulsion, die in Glasart I Vials bei 4°C gelagert wurde, von 126 $\mu\text{S}/\text{cm}$ auf 133 $\mu\text{S}/\text{cm}$ innerhalb von ca. 14 Tagen an, wobei die Leitfähigkeit des Wassers bei gleichen Bedingungen von 0,9 $\mu\text{S}/\text{cm}$ auf 2,2 $\mu\text{S}/\text{cm}$ in einem Jahr anstieg.

Die Ergebnisse der Messungen, die 14 Tage nach der Abfüllung durchgeführt wurden, zeigten, dass der Anstieg der Leitfähigkeit von der Lagerungstemperatur abhing. Die höheren Lagerungstemperaturen führten zu signifikant höheren Leitfähigkeiten. Allerdings wurde der Effekt der Lagerungstemperatur im Laufe der Zeit unbedeutend und schließlich verschwand er.

Des Weiteren wurde ein Einfluss vom Verpackungsmaterial auf die Leitfähigkeit der Nanoemulsionen beobachtet. Im Gegensatz zu dem Einfluss der Lagerungstemperatur war der Einfluss der Verpackungsmaterialien erst nach drei Monaten Lagerung erkennbar. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied unter den Glas- bzw. unter den Kunststoff-Proben festgestellt werden. Ein solcher wurde nur zwischen den Glas- und den Kunststoff-Proben beobachtet. Nach drei Monaten besaßen die Glas-Proben höhere Leitfähigkeiten als die in den Kunststoffflaschen gelagerten Nanoemulsionen. Im Laufe der Zeit erreichten fast alle Nanoemulsionen ihr Plateau bei einem Wert von 155-160 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Danach schwankten ihre Leitfähigkeitswerte auf diesem Niveau. Eine Ausnahme bildete die Nanoemulsion, die in LDPE bei 40°C gelagert wurde. Die Leitfähigkeit dieser Nanoemulsion erhöhte sich ununterbrochen. Damit wurde für diese Nanoemulsion der signifikant höchste Leitfähigkeitswert – wie bei der Wasser-Studie – gemessen. Analog zur Wasser-Studie wurde kein Unterschied zwischen Glasart I und Glasart II beobachtet.

Da bis zum Ende der Studie keine Probe tendenziell dauerhaft niedrige Leitfähigkeitswerte aufwies, ist kein Material dem anderen aufgrund der Leitfähigkeitseigenschaften zu bevorzugen.

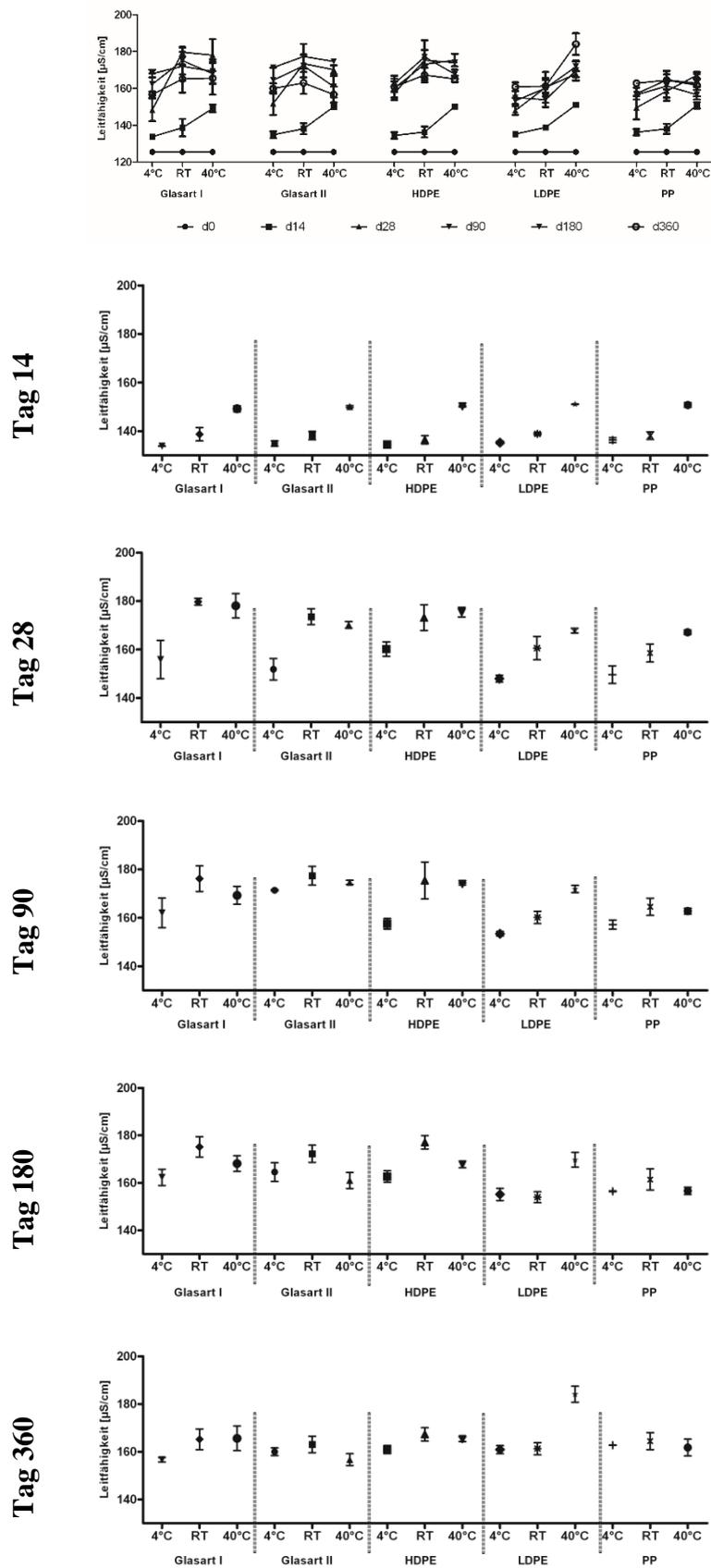


Abbildung 5.3-6: Leitfähigkeitswerte der Nanoemulsion-Proben, die in verschiedenen Verpackungsmaterialien bei 4°C, bei Raumtemperatur (RT) und bei 40°C gelagert wurden. Beobachtungszeitraum: 360 Tage

5.3.2.2 *pH-Wert*

Die pH-Werte der Nanoemulsionen sind in Abbildung 5.3-7 dargestellt. Der initiale pH-Wert der Nanoemulsion betrug 7,7. Während sich die Leitfähigkeiten der Nanoemulsionen erhöhten, verringerten sich ihre pH-Werte. Die Abnahme der pH-Werte war bei den Nanoemulsionen stärker als in der Wasser-Studie. Die Werte sind bis auf 4,6 gesunken. Wie bei der Wasser-Studie wurde auch für die Nanoemulsionen ein Einfluss der Lagerungstemperatur auf die pH-Werte beobachtet. Die bei den höheren Temperaturen gelagerten Nanoemulsionen hatten bereits nach dem 14. Tag Lagerung niedrigere pH-Werten als die bei den niedrigeren Temperaturen gelagerten Nanoemulsionen. Nach drei Monaten Lagerung führten die unterschiedlichen Lagerungstemperaturen für fast alle Nanoemulsionen zu signifikanten Unterschieden in den pH-Werten. Die 40°C-Nanoemulsionen besaßen niedrigere pH-Werte als die RT-Emulsionen, welche wiederum niedrigere pH-Werte als die 4°C-Nanoemulsionen aufwiesen. Dieser Trend blieb bis zum Ende der Studie erhalten.

Ein Einfluss der Verpackungsmaterialien auf den pH-Wert ist erstmals nach drei Monaten Lagerung beobachtet worden. Die im Glas gelagerten Nanoemulsionen besaßen signifikant niedrigere pH-Werte als die in Kunststoff aufbewahrten Nanoemulsionen. Zwischen den verschiedenen Glas- bzw. Kunststoff-Typen konnten keine unterschiedlichen Auswirkungen auf den pH-Wert beobachtet werden. Der Unterschied zwischen Glas und Kunststoff blieb nach dem 3. Monat bis zum Ende der Studie unverändert für die Nanoemulsionen, die bei den niedrigeren Temperaturen gelagert wurden (4°C und Raumtemperatur). Bei den 40°C-Nanoemulsionen verschwanden zum Ende der Studie die Unterschiede in den pH-Werten.

Obwohl die im Glas gelagerten Nanoemulsionen generell saurer als die im Kunststoff gelagerten Nanoemulsionen waren, besaß am Ende der Studie die bei 40°C in LDPE aufbewahrte Nanoemulsion den insgesamt niedrigsten pH-Wert. Die höchsten pH-Werte traten ab dem 3. Monat für die HDPE und PP-Proben auf, die bei 4°C gelagert wurden.

Die zwei Eigenschaften Leitfähigkeit und pH-Wert korrelieren miteinander. Je höher die Leitfähigkeit der Nanoemulsion war, desto niedriger war deren pH-Wert. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die Wahl der Lagerungstemperatur und des Verpackungsmaterials zunächst die Leitfähigkeit der Nanoemulsion beeinflusste und erst zu einem späteren Lagerzeitpunkt Auswirkungen auf den pH-Wert der Nanoemulsion hatte.

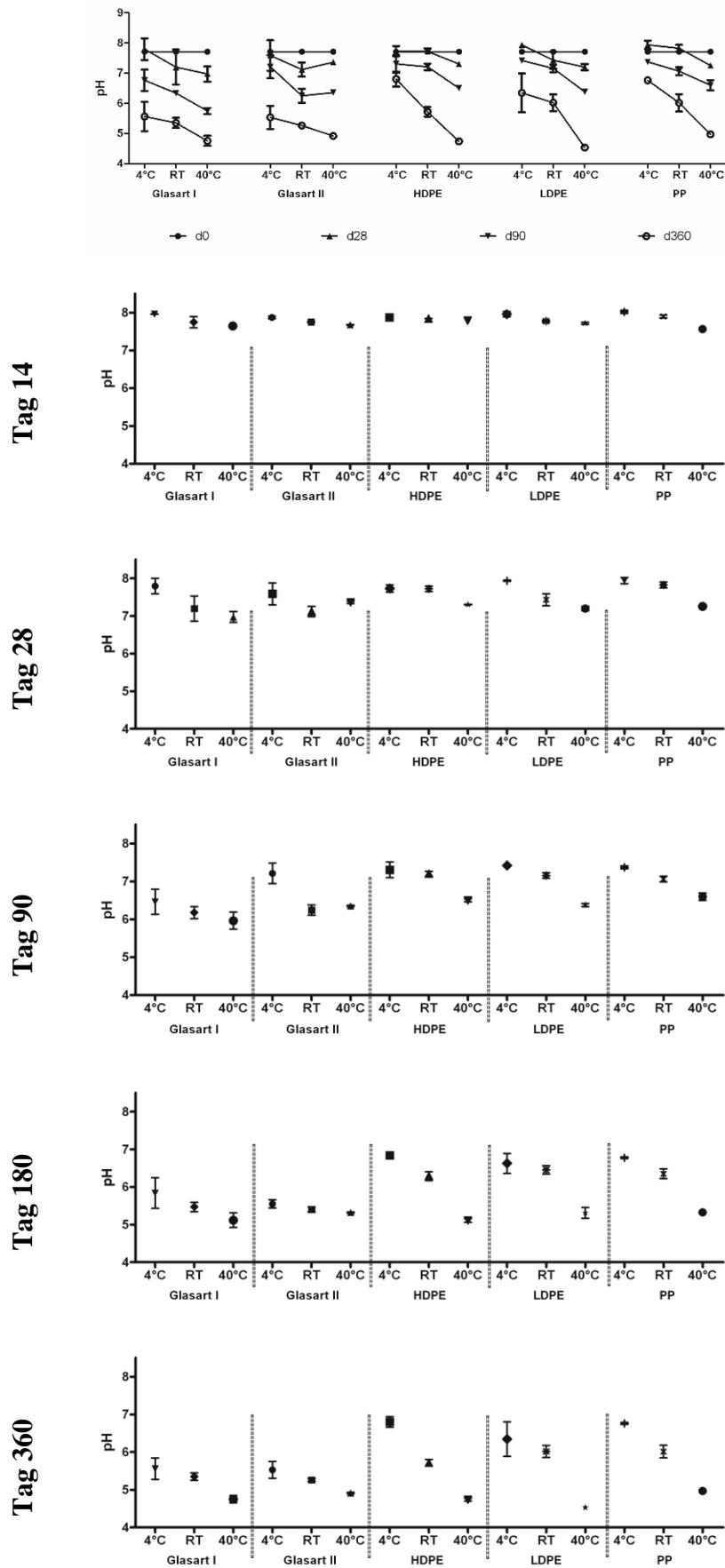


Abbildung 5.3-7: pH-Werte der Nanoemulsion-Proben, die in verschiedenen Verpackungsmaterialien bei 4°C, bei Raumtemperatur (RT) und bei 40°C gelagert wurden. Beobachtungszeitraum: 360 Tage

5.3.2.3 Partikelgrößenanalytik und Partikelladung

Die Stabilitätsergebnisse bezüglich der Partikelgröße und der Partikelgrößenverteilung der Nanoemulsionen sind in Abbildung 5.3-8 zu sehen. Am Tag der Herstellung lagen die Tröpfchengrößen der Ausgangsnanoemulsion eng verteilt ($PI=0,11$) um den Mittelwert von 180 nm vor. Der $d(v)_{0,95}$ -Wert betrug 325 nm. Die Langzeitstabilitätsergebnisse zeigten, dass die mittlere Tröpfchengröße mit 180 nm während der Lagerung bezüglich aller untersuchten Verpackungsmaterialien und Lagerungstemperaturen nahezu unverändert blieb. Der PI-Wert erhöhte sich bei manchen Nanoemulsionen leicht, blieb jedoch immer unter dem Wert von 0,19, was auf ein fast monodisperses System hindeutet. Ein leichter Anstieg wurde auch für die $d(v)_{0,95}$ -Werte aller der Nanoemulsionen beobachtet, die bei 40°C gelagert wurden. Beispielsweise hat sich der $d(v)_{0,95}$ -Wert der in Glasart I gelagerten Nanoemulsion um ca. 70 nm auf 396 nm erhöht. Bezüglich der Ergebnisse zur Partikelgrößenanalyse und bezüglich der mikroskopischen Untersuchungen konnten für die untersuchten Verpackungsmaterialien keine Unterschiede beobachtet werden.

Die Oberflächenladungen (ZP) der verschieden gelagerten Nanoemulsionen sind in Tabelle 5-3 aufgelistet. Am Tag der Herstellung lag das ZP der Nanoemulsion bei -58,7 mV. Die ZP-Werte, die in gereinigtem Wasser gemessen wurden, lagen für alle untersuchten Proben zwischen -53,3 mV und -65,4 mV.

Um eine verlässliche Aussage über die physikalische Stabilität der Nanoemulsionen zu erhalten, wurde deren ZP nach einem Jahr Lagerung nochmals im originalen Dispersionsmedium untersucht. Das originale Dispersionsmedium einer Nanoemulsion-Probe wurde nach deren Zentrifugation mit anschließender Membranfiltration gewonnen. Die ZP-Werte, die im originalen Dispersionsmedium gemessen wurden, waren niedriger (zwischen -42,1 mV und -57,3 mV) als die ZP-Werte, die im gereinigten Wasser gemessen wurden, lagen jedoch ebenso im stabilen Bereich.

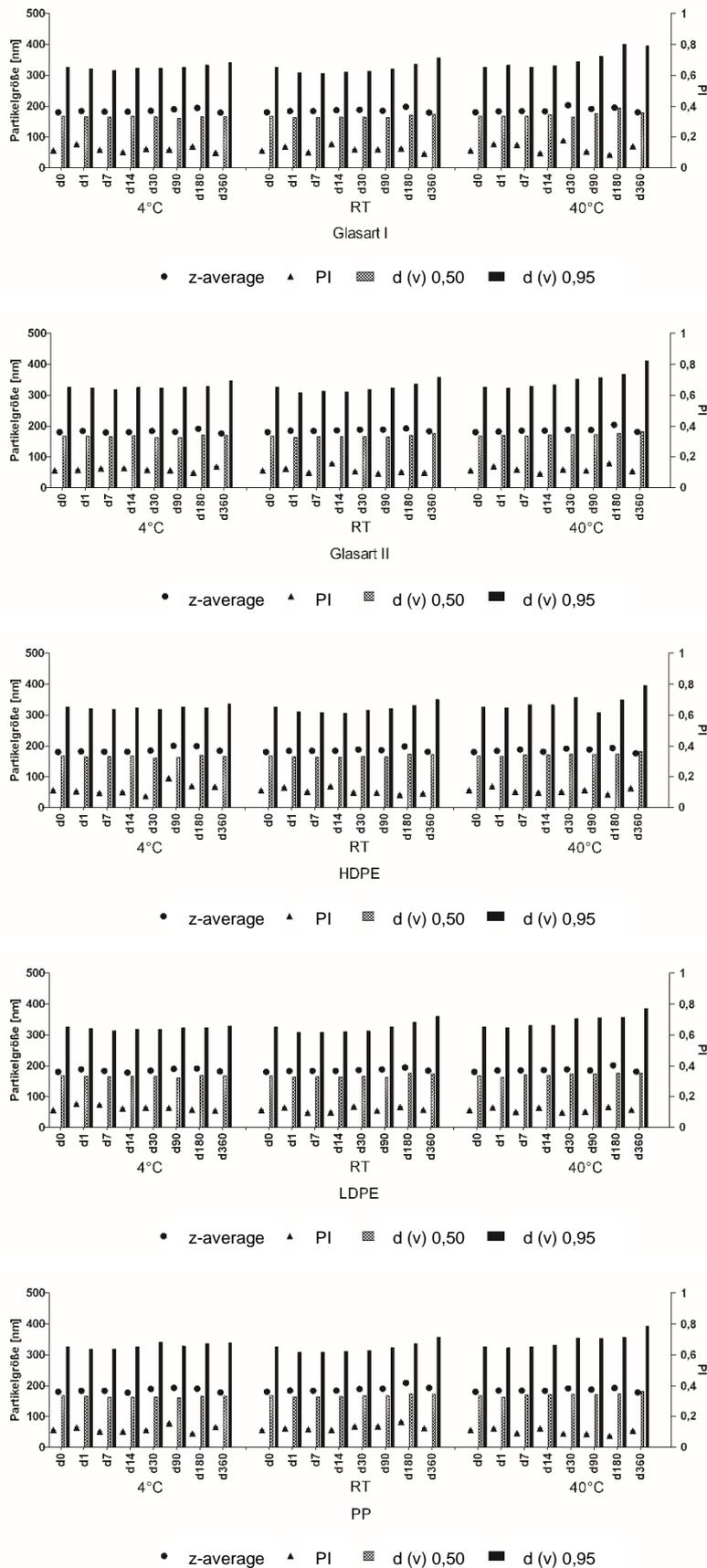


Abbildung 5.3-8: Partikelgrößen (PCS und LD) der Nanoemulsion-Proben, die in verschiedenen Verpackungsmaterialien bei 4°C, bei Raumtemperatur (RT) und bei 40°C gelagert wurden. Beobachtungszeitraum: 360 Tage

Tabelle 5-3: ZP-Werte der Nanoemulsion-Proben, die in verschiedenen Verpackungsmaterialien und bei 4°C, bei Raumtemperatur (RT) und bei 40°C gelagert wurden. Beobachtungszeitraum: 360 Tage. (Mittelwert±SD, n=3)

Material	Lagerung	Zetapotential [mV]					
		im destillierten Wasser (Leitfähigkeit= 50 µS/cm)					im Originalmedium
		d0	d14	d90	d180	d360	T360
Glasart I	4°C	-58,7±1,3	-62,3±4,5	-60,2±2,7	-57,1±2,9	-61,3±1,2	-44,3±0,3
	RT		-61,9±4,5	-59,6±2,5	-57,1±0,8	-61,1±1,7	-42,1±0,4
	40°C		-59,8±3,2	-60,1±4,0	-60,0±2,0	-64,0±0,6	-48,0±0,9
Glasart II	4°C		-59,1±0,8	-58,1±3,1	-58,0±2,4	-58,7±1,1	-45,7±0,9
	RT		-58,7±0,6	-61,4±4,5	-55,3±0,9	-59,8±0,3	-45,9±0,2
	40°C		-60,4±0,3	-62,0±2,1	-57,7±1,9	-62,0±0,7	-50,5±0,9
HDPE	4°C		-57,0±0,9	-57,1±1,0	-56,6±0,7	-53,3±1,9	-53,4±5,3
	RT		-61,6±1,1	-59,2±1,8	-55,0±1,4	-63,2±1,4	-44,7±0,6
	40°C		-64,2±4,7	-58,8±0,3	-56,2±0,8	-65,4±3,3	-45,8±1,1
LDPE	4°C		-58,7±3,9	-59,1±4,4	-55,7±2,4	-62,5±2,5	-57,3±1,2
	RT		-66,3±6,0	-60,7±3,7	-57,1±1,5	-61,0±0,9	-47,7±0,6
	40°C		-59,3±0,9	-61,0±4,1	-56,4±0,2	-62,7±2,0	-44,0±0,9
PP	4°C		-56,3±2,0	-56,1±1,0	-54,1±1,5	-54,1±1,2	-57,2±0,5
	RT		-63,7±5,9	-62,3±3,9	-60,4±3,4	-57,5±2,4	-46,5±0,2
	40°C		-59,0±0,8	-59,5±1,4	-57,9±1,8	-56,1±0,4	-49,5±0,4

Die makroskopischen Untersuchungen führten zu einer interessanten Beobachtung: Während der Studie schimmelten die bei 4°C und bei Raumtemperatur im Glas gelagerten Nanoemulsionen leicht (Abbildung 5.3-9). Im Gegensatz dazu war auch nach einjähriger Lagerung kein Schimmel bei den Kunststoff-Proben erkennbar.



Abbildung 5.3-9: Makroskopische Aufnahme der im Gläschen von Glasart II bei RT gelagerten Nanoemulsion-Probe nach einjähriger Lagerung

5.3.3 Nanosuspensionen

5.3.3.1 Leitfähigkeit

Die Leitfähigkeitsergebnisse der Apigenin-Nanosuspensionen sind in Abbildung 5.3-10 dargestellt. Die Leitfähigkeit dieser Nanokristall-Dispersionen betrug 65 $\mu\text{S}/\text{cm}$ am Tag der Herstellung. Ähnlich wie bei den Leitfähigkeitsergebnissen der Wasser- und Nanoemulsion-Proben nahmen die Leitfähigkeitswerte der Nanosuspensionen während der Lagerung zu. Die Zunahme der Leitfähigkeitswerte der Nanosuspensionen war größer als die der Wasser-Proben, jedoch kleiner als die der Nanoemulsionen. Ähnlich wie bei den anderen beiden untersuchten Systemen war die Zunahme der Leitfähigkeitswerte für die Nanosuspensionen stark abhängig von der Lagerungstemperatur. Höhere Lagerungstemperaturen führten zu höheren Leitfähigkeitswerten, die ununterbrochen anstiegen. Andersherum führten tiefere Lagerungstemperaturen zu niedrigeren Leitfähigkeitswerten. Die Leitfähigkeitsergebnisse der bei 4°C gelagerten Nanosuspensionen zeigten sogar eine Abnahme der Leitfähigkeiten nach drei Monaten Lagerung. Neben dem Einfluss der Lagerungstemperaturen auf die Leitfähigkeiten war bei höheren Lagerungstemperaturen ein zusätzlicher Einfluss der Verpackungsmaterialien auf die Leitfähigkeiten zu beobachten. Ein Vergleich zwischen den bei 40°C gelagerten Nanosuspensionen zeigte, dass – ähnlich zu den vorherigen Leitfähigkeitsergebnissen – die in LDPE gelagerten Nanokristall-Dispersionen die deutlich höchsten Leitfähigkeitswerte besaßen. Der niedrigste Leitfähigkeitswert wurde für die 4°C-Probe in Glasart I gemessen. Dieses Material verursachte auch bei den höheren Temperaturen vergleichsweise geringe Veränderungen in der Leitfähigkeit. Daher kann gefolgert werden, dass bezüglich der Konduktivität die Glasart I für die Verpackung der Apigenin-Nanosuspensionen geeigneter ist als die anderen untersuchten Materialien.

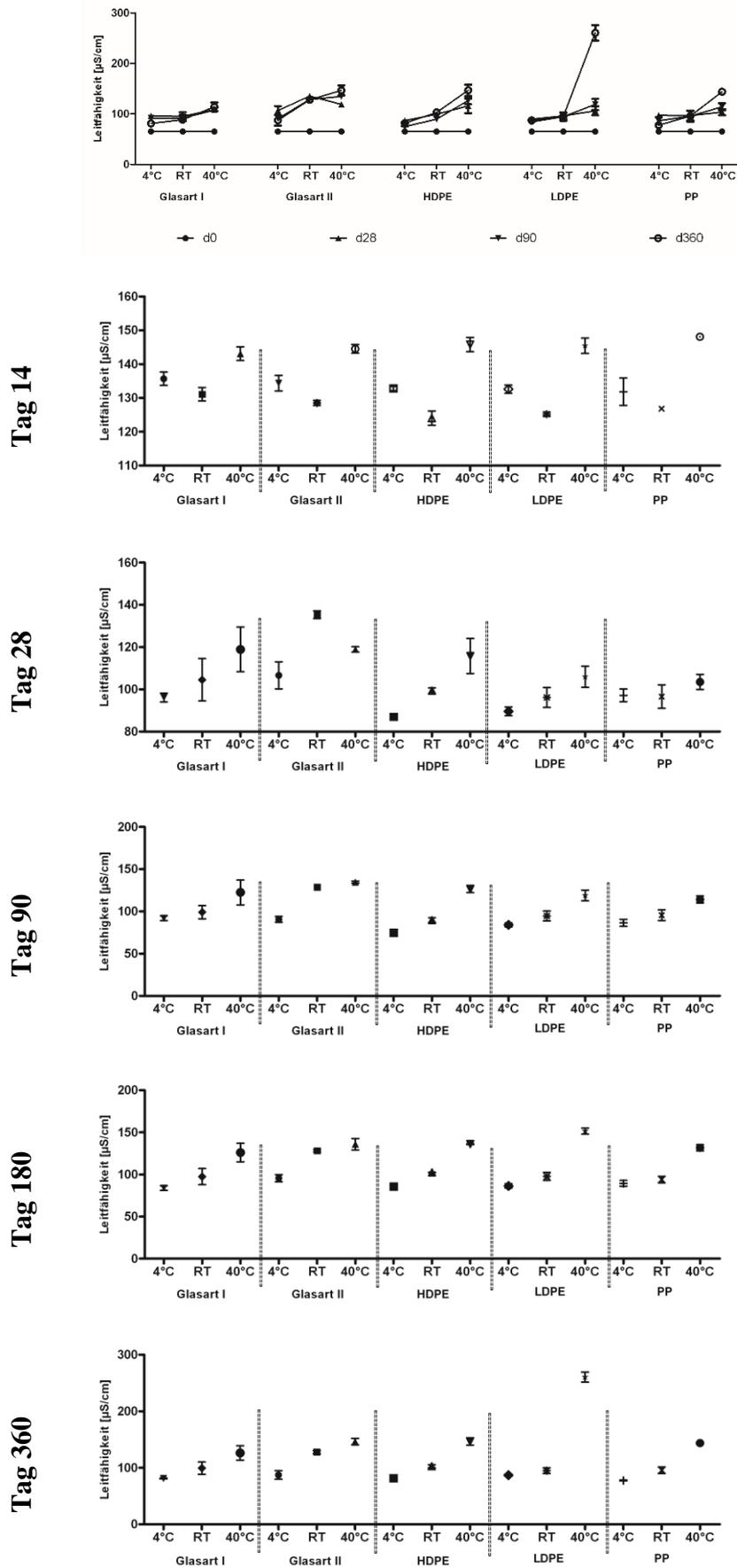


Abbildung 5.3-10: Leitfähigkeitswerte der Nanosuspension-Proben, die in verschiedenen Verpackungsmaterialien bei 4°C, bei Raumtemperatur (RT) und bei 40°C gelagert wurden. Beobachtungszeitraum: 360 Tage

5.3.3.2 *pH-Wert*

Die pH-Ergebnisse der Nanosuspensionen sind in Abbildung 5.3-11 zu sehen. Der pH-Wert betrug 4,2 am Tag der Herstellung. Der saure Charakter dieser Apigenin-Nanosuspension bildet einen Unterschied gegenüber den beiden vorangegangenen Verpackungsmaterial-Studien mit Wasser bzw. Nanoemulsionen.

Ähnlich zu den Ergebnissen der Wasser- und Nanoemulsions-Studie sanken die pH-Werte während der Lagerung. Die Abnahme im pH-Wert war für die Nanosuspension geringer als bei den Wasser- und Nanoemulsion-Proben. Auch hier war die Lagerungstemperatur der wichtigste Einflussfaktor auf die pH-Werte. Je höher sie war, desto niedriger waren die gemessenen pH-Werte. Der Einfluss der Lagerungstemperaturen wurde zunächst für die in Glas gelagerten Nanosuspensionen und dann für die im Kunststoff aufbewahrten Nanosuspensionen offensichtlich. Unterschiedliche Lagerungstemperaturen führten nach drei Monaten sowohl für die Glas- als auch die Kunststoff-Proben zu signifikanten Unterschieden in den pH-Werten, die bis zum Ende der Studie bestehen blieben.

Die Untersuchung des Einflusses der Verpackungsmaterialien auf den pH-Wert zeigte, dass die bei 40°C gelagerten LDPE-Fläschchen – ähnlich zu den vorherigen Ergebnissen – die größten Veränderungen im pH-Wert verursachten. Damit besaß diese Nanosuspension den deutlich niedrigsten pH-Wert. Im Gegensatz dazu verursachte Glasart I die geringsten Veränderungen im pH-Wert.

Auch in diesem Teil der Studie korrelierten die Leitfähigkeitswerte negativ mit den pH-Werten: je höher die Leitfähigkeit der Nanosuspensionen, desto geringer deren pH-Werte. Außerdem – ähnlich wie bei der Teilstudie der Nanoemulsion – wurde festgestellt, dass die Lagerungstemperatur und die Wahl des primären Verpackungsmaterials zunächst den Leitfähigkeitswert und erst dann, nach weiterer Lagerung, den pH-Wert beeinflusst.

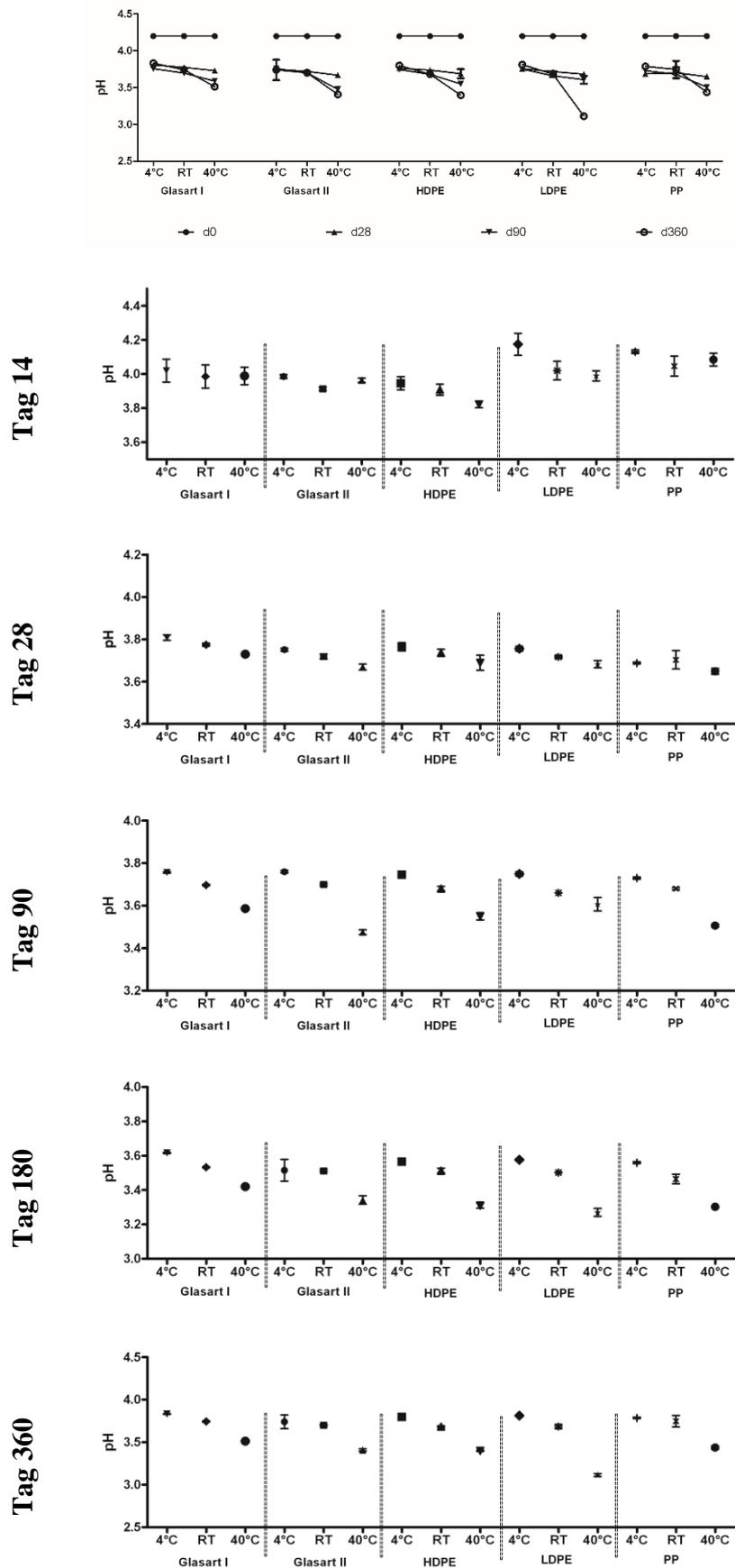


Abbildung 5.3-11: pH-Werte der Nanosuspension-Proben, die in verschiedenen Verpackungsmaterialien und bei 4°C, bei Raumtemperatur (RT) und bei 40°C gelagert wurden. Beobachtungszeitraum: 360 Tage

5.3.3.1 Partikelgrößenanalytik und Partikelladung

Die Partikelgrößenergebnisse der Apigenin-Nanosuspensionen sind in Abbildung 5.3-13 dargestellt. Am Tag der Herstellung betrug die mittlere Partikelgröße der Apigenin-Nanokristalle 778 nm. Der PI betrug 0,11. Für den $d(v)_{0,95}$ -Wert wurden 1575 nm gemessen. Die Langzeitstabilitätsergebnisse zeigten klare Unterschiede zwischen den Partikelgrößen der in den verschiedenen Verpackungsmaterialien gelagerten Nanosuspensionen. Die Probe, die in LDPE-Fläschchen bei 40°C gelagert wurde, wies bereits am 7. Tag der Lagerung Agglomerationen auf. Für die anderen Kunststoffmaterialien begannen die Agglomerationen später, jedoch früher als bei den Glas-Proben.

Für Glasart I wurde die vergleichsweise höchste physikalische Stabilität festgestellt. Die bei 4°C in diesem Glas gelagerte Nanosuspension blieb über ein Jahr lang stabil. Für diese Nanosuspension konnten weder ein Kristallwachstum noch Agglomerate beobachtet werden. Bei Erhöhung der Lagerungstemperatur auf Raumtemperatur bzw. auf 40°C blieben die Proben der Glasart I weniger lang stabil, jedoch immer noch länger stabil als die Proben eines anderen Materials bei vergleichbarer Lagerungstemperatur. Die Agglomerationen wurden mittels LD-Messungen und lichtmikroskopischen Untersuchungen festgestellt. Beobachtete Agglomerationen waren bei gleichem Material für die Proben stärker, die bei höheren Temperaturen gelagert wurden (Abbildung 5.3-12).

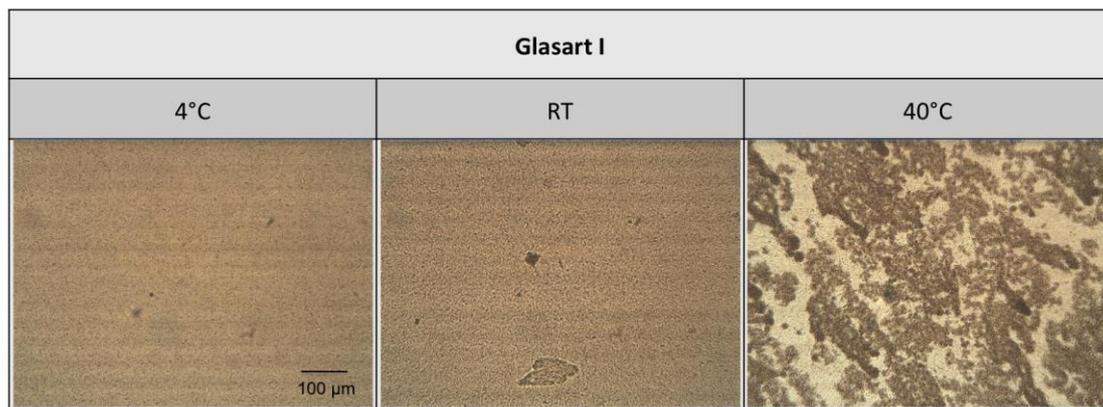


Abbildung 5.3-12: Mikroskopische Aufnahmen der in Gläsern von Glasart I gelagerten Nanosuspensionen nach einjähriger Lagerung. Links: bei 4°C, Mitte: bei RT, Rechts: bei 40°C. Vergrößerung: 160-fach

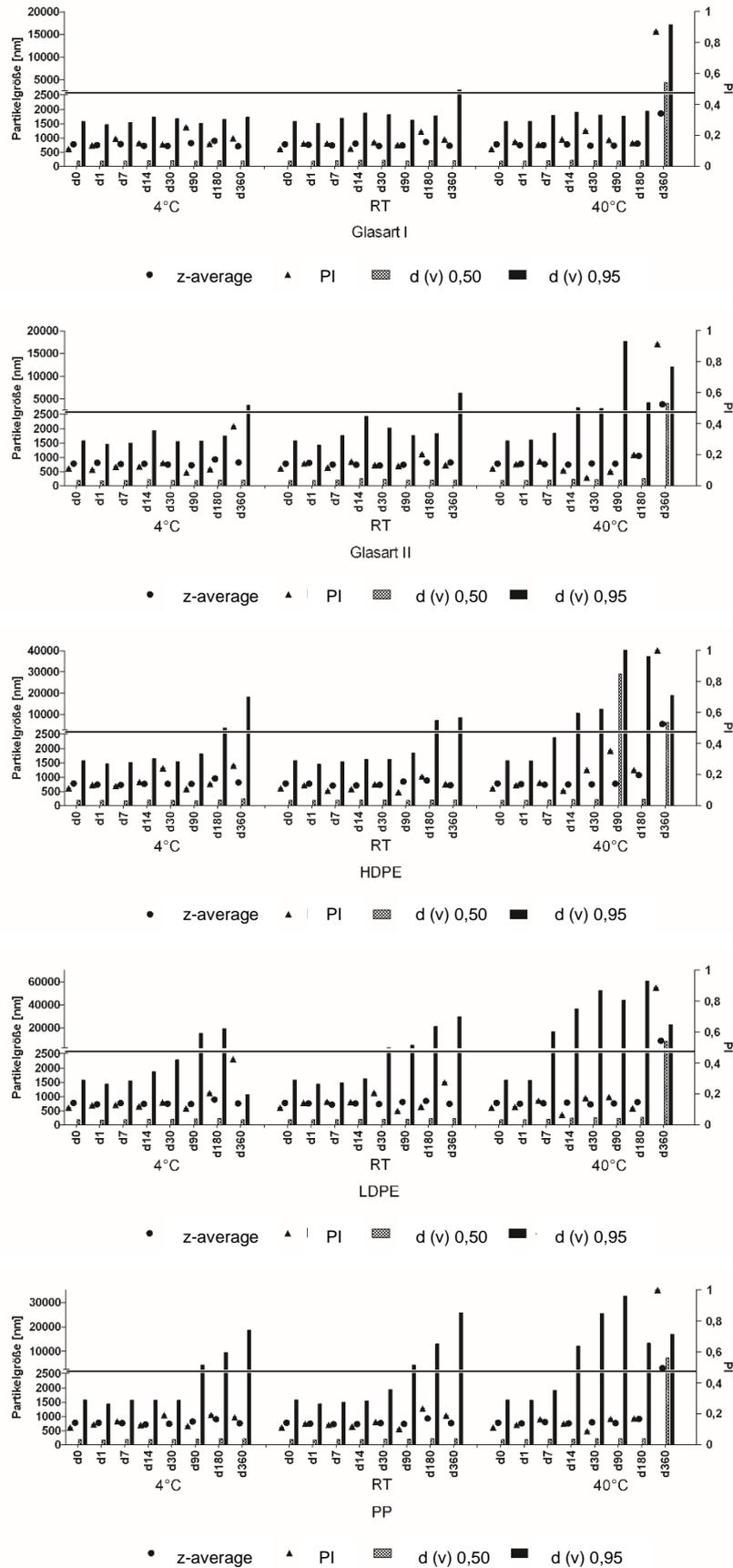


Abbildung 5.3-13: Partikelgrößen (PCS und LD) der Nanosuspension-Proben, die in verschiedenen Verpackungsmaterialien bei 4°C, bei Raumtemperatur (RT) und bei 40°C gelagert wurden. Beobachtungszeitraum: 360 Tage

Die Oberflächenladungen der Apigenin-Nanokristalle sind in Tabelle 5-4 aufgelistet. Am Tag der Herstellung betrug der mit einer Leitfähigkeit von 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ in destilliertem Wasser gemessene ZP-Wert der Nanokristalle -32,1 mV. Während der Lagerungszeit bleiben die ZP-Werte für alle Proben im stabilen Bereich.

Tabelle 5-4: ZP-Werte der Nanosuspension-Proben, die in verschiedenen Verpackungsmaterialien bei 4°C, bei Raumtemperatur (RT) und bei 40°C gelagert wurden. Beobachtungszeitraum: 360 Tage. (Mittelwert \pm SD, n=3)

Material	Lagerung	Zetapotential [mV]										
		im destillierten Wasser (Leitfähigkeit= 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$)					in der Tensidlösung					im Original- medium
		d0	d14	d90	d180	d360	d0	d14	d90	d180	d360	d360
Glasart I	4°C	-32,1 \pm 0,3	-32,0 \pm 3,4	-32,0 \pm 2,5	-31,6 \pm 1,3	-34,8 \pm 2,8	-22,4 \pm 0,8	-23,0 \pm 0,4	-23,4 \pm 1,0	-21,6 \pm 0,5	-20,7 \pm 1,1	-10,6 \pm 0,9
	RT		-30,3 \pm 1,8	-32,0 \pm 0,2	-31,6 \pm 0,9	-32,5 \pm 0,9		-22,8 \pm 0,4	-24,7 \pm 0,7	-23,4 \pm 0,7	-23,7 \pm 0,5	-10,4 \pm 0,1
	40°C		-34,3 \pm 2,7	-34,4 \pm 0,6	-36,2 \pm 0,4	-38,2 \pm 0,9		-22,8 \pm 0,4	-24,4 \pm 0,8	-22,9 \pm 0,4	-24,0 \pm 1,4	-15,6 \pm 0,1
Glasart II	4°C		-31,6 \pm 0,7	-31,1 \pm 2,6	-32,3 \pm 2,6	-37,6 \pm 1,2		-22,2 \pm 0,9	-24,8 \pm 0,9	-22,7 \pm 0,7	-24,8 \pm 0,3	-10,6 \pm 1,2
	RT		-27,5 \pm 0,5	-33,4 \pm 2,8	-34,9 \pm 3,1	-33,1 \pm 1,1		-23,0 \pm 1,2	-25,2 \pm 0,1	-23,3 \pm 0,7	-21,6 \pm 0,5	-9,4 \pm 0,3
	40°C		-31,6 \pm 0,2	-33,8 \pm 0,6	-39,5 \pm 3,6	-41,1 \pm 1,8		-21,7 \pm 0,4	-25,1 \pm 0,7	-23,7 \pm 0,1	-24,2 \pm 1,0	-14,6 \pm 0,5
HDPE	4°C		-30,7 \pm 0,5	-30,2 \pm 0,9	-30,6 \pm 0,3	-35,0 \pm 2,7		-22,0 \pm 0,5	-23,9 \pm 0,8	-22,1 \pm 0,3	-21,5 \pm 1,6	-9,4 \pm 0,9
	RT		-29,9 \pm 0,5	-29,9 \pm 0,4	-30,9 \pm 0,6	-32,5 \pm 2,0		-21,9 \pm 0,5	-25,1 \pm 0,4	-23,0 \pm 0,4	-21,7 \pm 2,0	-11,3 \pm 0,5
	40°C		-31,4 \pm 0,5	-33,7 \pm 0,3	-37,4 \pm 0,8	-39,4 \pm 3,2		-22,4 \pm 0,4	-25,2 \pm 0,4	-23,6 \pm 0,5	-22,7 \pm 0,7	-13,4 \pm 0,4
LDPE	4°C		-30,4 \pm 0,8	-30,6 \pm 0,4	-31,2 \pm 2,3	-31,9 \pm 1,1		-22,9 \pm 0,1	-25,0 \pm 1,0	-22,7 \pm 0,4	-22,1 \pm 0,6	-10,9 \pm 0,7
	RT		-29,7 \pm 0,2	-30,2 \pm 0,3	-31,1 \pm 0,7	-33,7 \pm 0,9		-22,3 \pm 0,4	-23,9 \pm 0,6	-23,3 \pm 0,2	-23,3 \pm 0,3	-10,3 \pm 0,4
	40°C		-31,3 \pm 0,9	-35,4 \pm 2,8	-36,9 \pm 2,3	-35,6 \pm 0,4		-22,6 \pm 0,4	-25,0 \pm 0,5	-22,6 \pm 0,2	-23,5 \pm 0,1	-11,6 \pm 1,2
PP	4°C	-30,5 \pm 0,4	-32,9 \pm 1,9	-32,5 \pm 1,8	-34,0 \pm 2,0	-22,6 \pm 0,2	-24,5 \pm 0,8	-22,4 \pm 0,4	-23,2 \pm 0,7	-9,5 \pm 0,5		
	RT	-30,4 \pm 0,2	-30,8 \pm 0,9	-31,5 \pm 0,9	-33,8 \pm 0,8	-22,8 \pm 0,4	-25,4 \pm 0,2	-22,4 \pm 0,4	-24,4 \pm 0,3	-11,0 \pm 0,2		
	40°C	-30,6 \pm 2,5	-35,4 \pm 3,0	-37,0 \pm 0,3	-38,9 \pm 0,7	-22,6 \pm 0,7	-24,8 \pm 0,3	-22,7 \pm 0,6	-23,8 \pm 0,5	-13,1 \pm 0,1		

Niedriger als der in destilliertem Wasser mit einer Leitfähigkeit von 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ gemessene ZP-Wert war der in der Tensidlösung gemessene ZP-Wert (-22,4 mV). Während der Lagerung wurden für die in der Tensidlösung gemessenen ZP-Werte fast

keine Unterschiede bezüglich der verschiedenen Verpackungsmaterialien beobachtet. Sie betragen zwischen -20,7 und -25,4 mV.

Um eine verlässliche Aussage über die Oberflächenladung zu erhalten, wurden die ZP-Werte in dem originalen Dispersionsmedium untersucht. Die Messungen wurden nach einjähriger Lagerung durchgeführt. Wie bereits in der Nanoemulsions-Teilstudie (Abschnitt 5.3.2.3) erklärt wurde, wurde das originale Dispersionsmedium nach Zentrifugation und anschließender Membranfiltration der Nanosuspension gewonnen. Die so erhaltenen ZP-Ergebnisse waren niedriger als die, die in destilliertem Wasser mit einer Leitfähigkeit von 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ gemessen wurden – und auch als die, die in der Tensidlösung gemessen wurden. Für die bei 4°C und bei Raumtemperatur gelagerten Nanosuspensionen der verschiedenen Verpackungsmaterialien wurden keine wesentlichen Unterschiede im ZP-Wert gefunden. Außerdem waren die ZP-Werte der bei niedrigeren Temperaturen – also 4°C und Raumtemperatur – gelagerten Nanosuspensionen deutlich geringer als die ZP-Werte der bei 40°C gelagerten Nanosuspensionen. Die bei 40°C gelagerten Nanosuspensionen besaßen unterschiedliche ZP-Werte für die unterschiedlichen Verpackungsmaterialien, so dass eine Differenzierung der Verpackungsmaterialien bezüglich der im Originalmedium gemessenen ZP-Werte möglich ist. Die niedrigsten bzw. höchsten ZP-Werte wurden bei den Proben festgesellt, die in LDPE bzw. Glasart I gelagert wurden. Die Differenz der ZP-Werte zwischen diesen Nanosuspensionen war statistisch signifikant.

Im Gegensatz zu den Nanoemulsionen sind keine makroskopischen Veränderungen für die Apigenin-Nanokristalle aufgetreten.

5.3.4 Lipidnanopartikel

5.3.4.1 Leitfähigkeit

Die Leitfähigkeitsergebnisse der NLC-Dispersionen sind in Abbildung 5.3-14 dargestellt. Die Leitfähigkeit betrug am Tag der Herstellung 119 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Während der Lagerung sind die Leitfähigkeitswerte aller NLC-Dispersionen gestiegen. Der Anstieg war im Vergleich zur Wasser-Studie jedoch höher.

Die Leitfähigkeitsergebnisse zeigen, dass der Anstieg für die meisten Dispersionen nicht kontinuierlich war. Im Gegensatz zu den anderen in dieser Arbeit untersuchten Systemen konnte keine positive Korrelation zwischen der Leitfähigkeit der NLC-Dispersionen und der Lagerungstemperatur festgestellt werden. Am 14. Tag hatten alle bei Raumtemperatur gelagerten Dispersionen die vergleichsweise niedrigsten Leitfähigkeitswerte. Hingegen besaßen die bei 40°C gelagerten Dispersionen die höchsten Leitfähigkeitswerte. Während der gesamten Lagerung haben sich die Werte derart geändert, dass keine Gesetzmäßigkeit zwischen der Lagerungstemperatur und der Leitfähigkeit beobachtet werden konnte.

Bei der Differenzierung der verschiedenen Verpackungsmaterialien trat LDPE heraus. Wie bei den anderen in dieser Arbeit untersuchten Systemen zeigte die NLC-Dispersion, die in den LDPE-Fläschchen bei 40°C gelagert wurde, eine kontinuierliche Erhöhung der Leitfähigkeit. Sie wies ab dem 6. Monat den höchsten Leitfähigkeitswert für dieses System auf. Da keines der untersuchten Materialien vergleichsweise dauerhaft auffällig niedrige Werte für die untersuchten Lagerungstemperaturen besaß, kann diesbezüglich kein Material hervorgehoben werden.

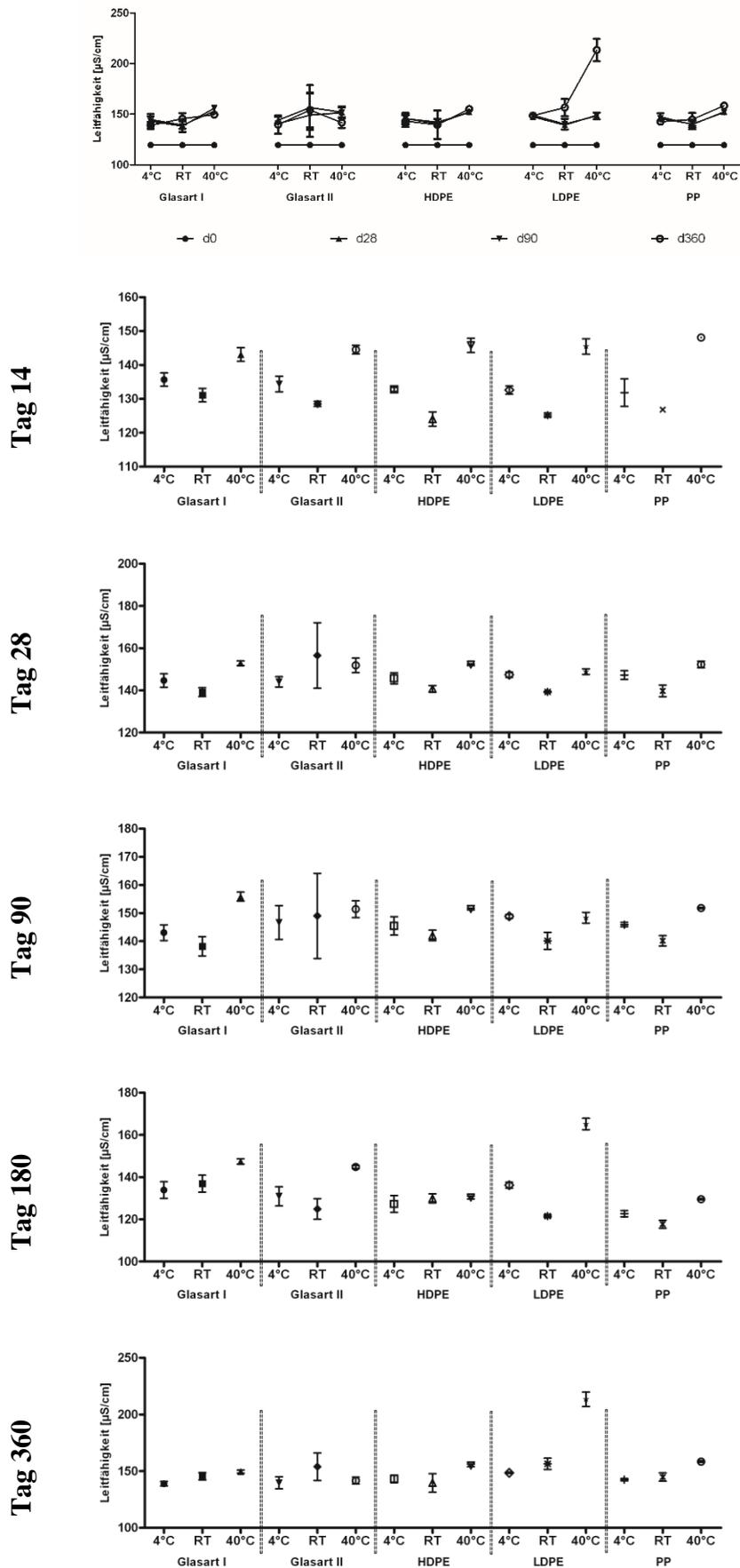


Abbildung 5.3-14: Leitfähigkeitswerte der NLC-Proben, die in verschiedenen Verpackungsmaterialien bei 4°C, bei Raumtemperatur (RT) und bei 40°C gelagert wurden. Beobachtungszeitraum: 360 Tage

5.3.4.2 pH-Wert

Die pH-Ergebnisse der NLC-Dispersionen sind in Abbildung 5.3-15 zu sehen. Der pH-Wert der NLC-Dispersion betrug 7,7 am Tag der Herstellung. Während der Lagerzeit sind die pH-Werte der Proben gesunken.

Die pH-Ergebnisse der NLC-Dispersionen zeigen, dass die pH-Werte der Proben – im Gegensatz zu deren Leitfähigkeiten – mit der Lagerungstemperatur negativ korrelieren. Je höher die Lagerungstemperatur war, desto niedriger waren die gemessenen pH-Werte. Dies zeigte sich bereits nach 28 Tagen und galt für den gesamten Beobachtungszeitraum. Neben dem Einfluss der Lagerungstemperatur wurde auch ein Einfluss des Verpackungsmaterials auf den pH-Wert beobachtet. Es konnte erneut festgestellt werden, dass LDPE zu den höchsten Veränderungen im pH-Wert führte. Die LDPE-Probe, die bei 40°C gelagert wurde, besaß den signifikant niedrigsten pH-Wert. Außerdem besaßen die Glas-Proben ab dem 28. Tag höhere pH-Werte als die im Kunststoff gelagerten Proben. Die Unterschiede zwischen den Glas- und Kunststoff-Proben waren für die Lagerungstemperaturen 4°C und 40°C deutlicher sichtbar. Mit der Zeit glichen sich die pH-Werte für die verschiedenen Materialien an – ausgenommen LDPE bei Raumtemperatur und 40°C.

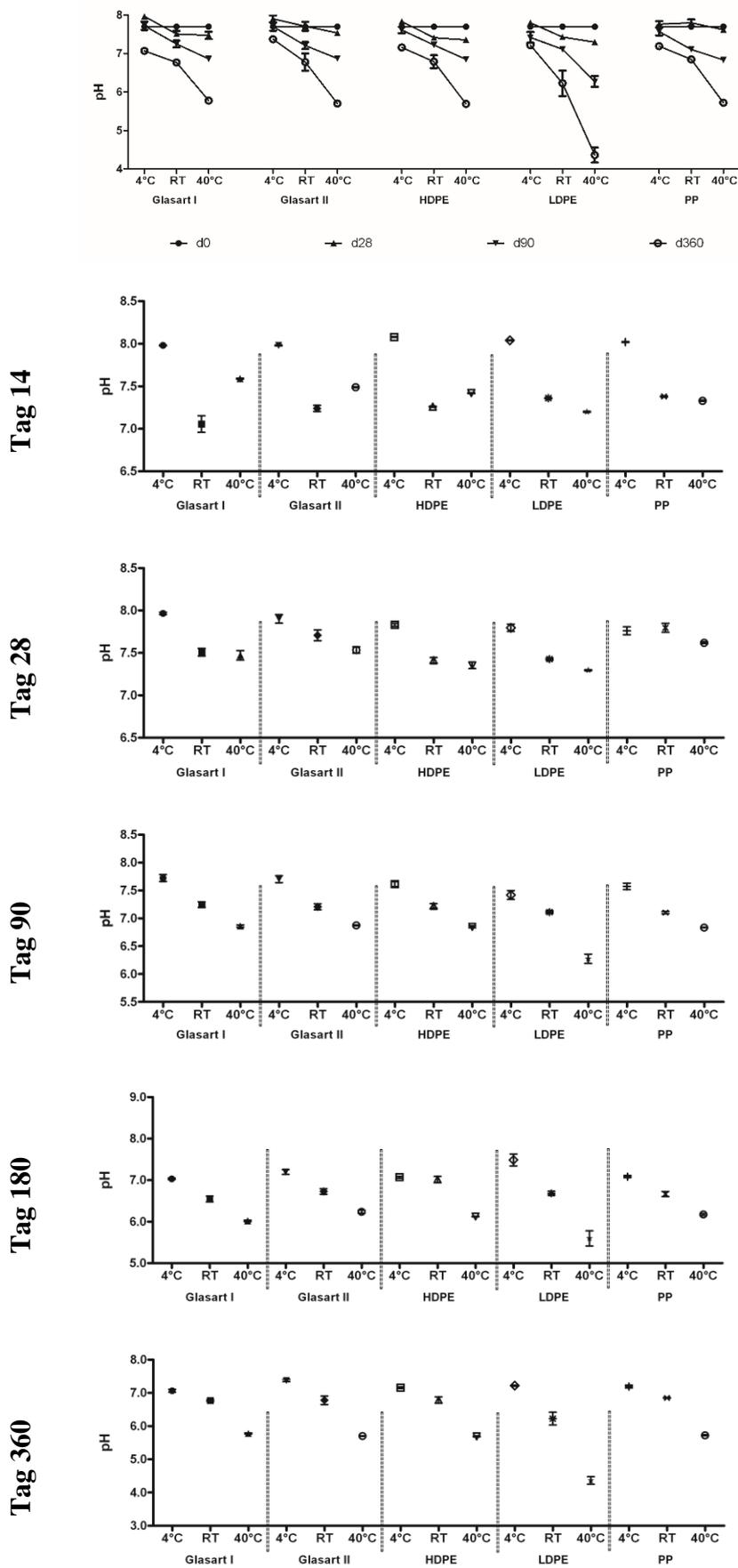


Abbildung 5.3-15: pH-Werte der NLC-Proben, die in verschiedenen Verpackungsmaterialien bei 4°C, bei Raumtemperatur (RT) und bei 40°C gelagert wurden. Beobachtungszeitraum: 360 Tage

5.3.4.1 Partikelgrößenanalytik und Partikelladung

Die Stabilitätsergebnisse bezüglich der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung der NLC-Dispersionen sind in Abbildung 5.3-16 dargestellt. Am Tag der Herstellung betrug die mittlere Partikelgröße 212 nm bei einer engen Verteilung von $PI=0,15$. Der $d(v)_{0,95}$ -Wert betrug 395 nm.

Die Langzeitstabilitätsergebnisse zeigten, dass während der Lagerung die mittleren Partikelgrößen der in verschiedenen Verpackungsmaterialien bei unterschiedlichen Temperaturen gelagerten NLC nahezu unverändert blieben. Der PI mancher Dispersionen – besonders für die bei 4°C gelagerten Proben sichtbar – erhöhte sich ab dem 6. Monat leicht, blieb jedoch unter 0,35. Obwohl kein bedeutsamer Anstieg für die $d(v)_{0,95}$ -Werte der Dispersionen beobachtet wurde, zeigten die mikroskopischen Untersuchungen, dass Mentholkristalle für die bei 4°C gelagerten Dispersionen bereits im 6. Monat sichtbar waren (Abbildung 5.3-17). Wegen Ihrer Instabilität wurden die bei 4°C gelagerten Dispersionen nicht weiter auf Partikelgröße und ZP untersucht.

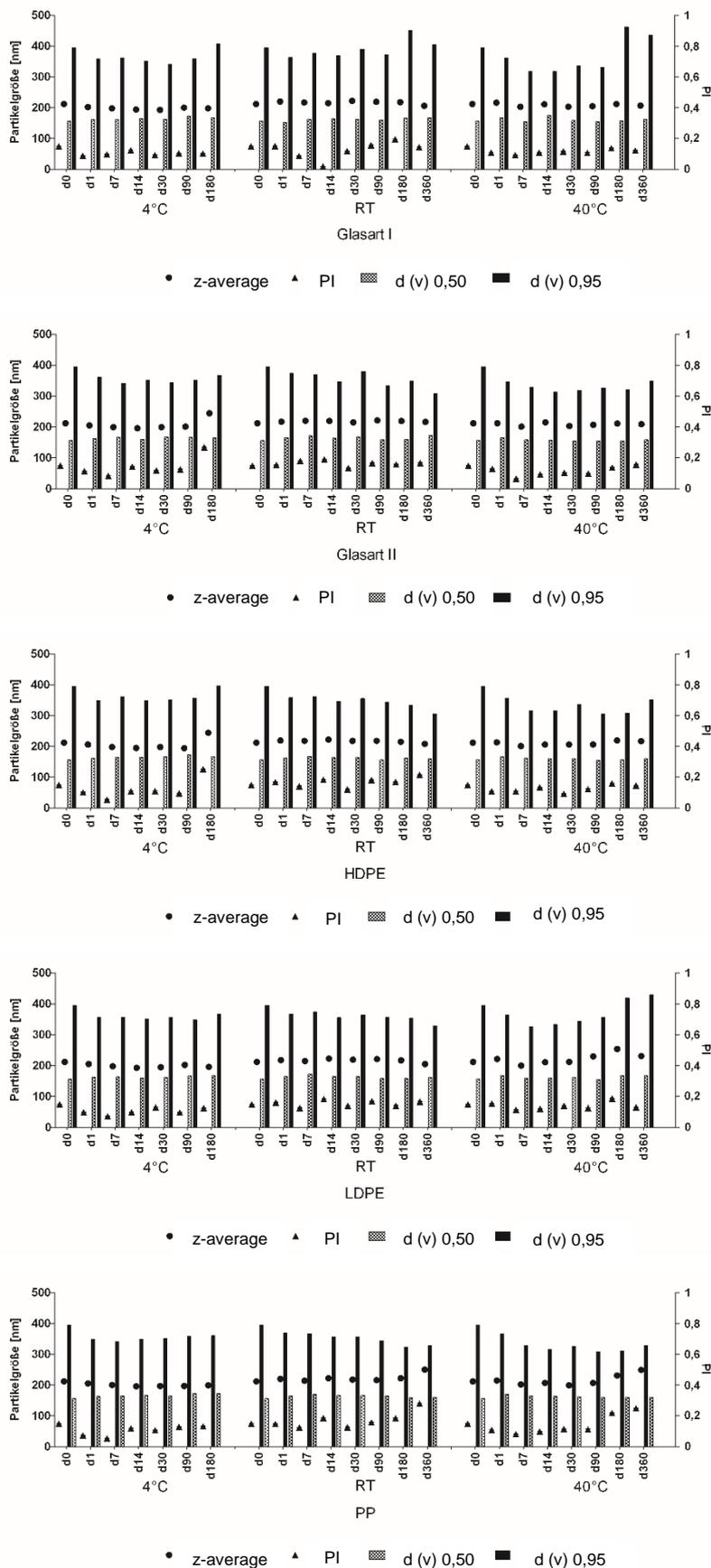


Abbildung 5.3-16: Partikelgrößen (PCS und LD) der NLC-Proben, die in verschiedenen Verpackungsmaterialien bei 4°C, bei Raumtemperatur (RT) und bei 40°C gelagert wurden. Beobachtungszeitraum: 360 Tage

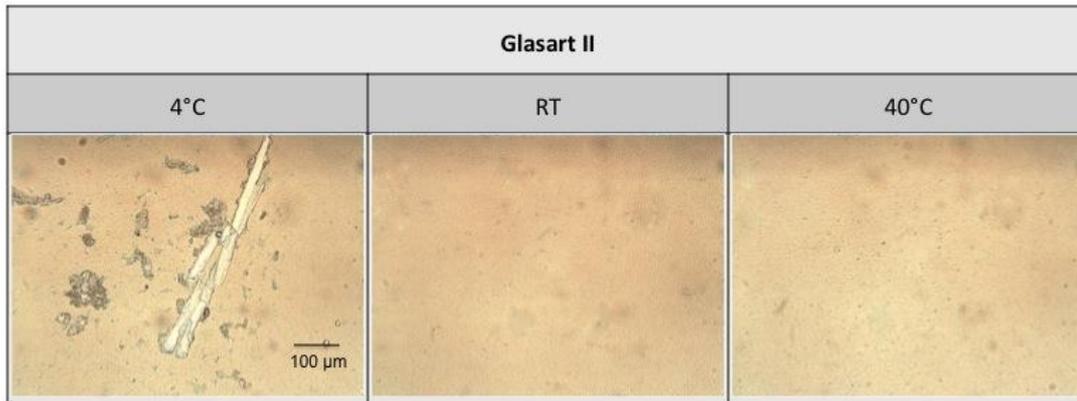


Abbildung 5.3-17: Mikroskopische Aufnahmen der im Glas von Glasart II gelagerten NLC-Dispersionen nach 6-monatiger Lagerung. Links: bei 4°C, Mitte: bei RT, Rechts: bei 40°C. Vergrößerung: 160-fach

Die ZP-Werte der NLC-Dispersionen sind in Tabelle 5-5 aufgelistet. Am Tag der Herstellung betrug der ZP-Wert der hergestellten NLC-Dispersion -44,3 mV. Betrachtet man die im bidestilliertem Wasser gemessenen ZP-Werte, so befinden sie sich für alle NLC-Dispersionen zwischen -34,6 mV und -50,2 mV und liegen somit im stabilen Bereich. Die ZP-Messungen im originalen Dispersionsmedium konnte aus technischen Gründen für diese NLC nicht durchgeführt werden, da das originale Dispersionsmedium mittels Zentrifugation und Filtration nicht gewonnen werden konnte – es gelierte.

Ähnlich zu den Nanosuspensionsergebnissen und im Gegensatz zu den Nanoemulsionsergebnissen sind keine makroskopischen Veränderungen für die NLC-Dispersionen aufgetreten.

Tabelle 5-5: ZP-Werte der NLC-Proben, die in verschiedenen Verpackungsmaterialien bei 4°C, bei Raumtemperatur (RT) und bei 40°C gelagert wurden. Beobachtungszeitraum: 360 Tage. (Mittelwert±SD, n=3)

Material	Lagerung	Zetapotential [mV]				
		im destillierten Wasser (Leitfähigkeit= 50 µS/cm)				
		d0	d14	d90	d180	d360
Glasart I	4°C	-44,3±0,2	-48,6±3,3	-45,9±1,3	-47,2±1,3	
	RT		-42,8±0,8	-40,5±0,8	-45,5±1,0	-42,6±1,5
	40°C		-43,3±0,5	-42,0±1,4	-41,2±0,6	-38,1±3,6
Glasart II	4°C		-50,2±4,8	-45,5±1,3	-45,2±1,8	
	RT		-43,3±1,5	-41,8±2,0	-44,8±1,8	-44,1±1,7
	40°C		-44,4±4,6	-41,7±0,5	-39,6±0,2	-41,3±2,6
HDPE	4°C		-45,5±1,2	-44,7±1,8	-47,0±1,8	
	RT		-40,8±1,2	-44,5±2,6	-43,4±1,0	-43,6±1,3
	40°C		-45,1±3,5	-41,5±1,1	-40,5±2,9	-34,6±0,6
LDPE	4°C		-45,4±1,2	-46,1±1,5	-51,1±4,3	
	RT		-43,9±3,1	-43,5±2,1	-42,4±0,9	-44,9±1,1
	40°C		-43,9±0,9	-41,6±1,7	-48,6±3,0	-47,7±0,4
PP	4°C		-46,8±0,6	-43,2±1,3	-46,9±0,4	
	RT		-41,9±1,5	-40,8±1,3	-45,0±0,7	-45,2±3,1
	40°C		-45,3±0,3	-40,7±0,9	-39,7±0,8	-35,0±2,4

5.4 Diskussion der Ergebnisse

5.4.1 Leitfähigkeit

Die elektrolytische Leitfähigkeit einer Elektrolytlösung ist ein Maß für ihre Fähigkeit Elektrizität zu leiten (Chapman et al. 1996). Generell ermöglichen die Leitfähigkeitsuntersuchungen den ionischen Gehalt des untersuchten Systems zu messen. Der ionische Gehalt beschreibt inwieweit ein Feststoff vollständig gelöst in einer Lösung vorliegt (engl. „total dissolved solids“).

Für kolloidale Systeme, wie Nanoemulsionen, Nanosuspensionen oder NLC-Dispersionen, ist die physikalische Stabilität von der Leitfähigkeit abhängig. Wie bereits bekannt ist, führt eine hohe ionische Konzentration eines nanodispersen Systems zur Abnahme des Zetapotentials der dispergierten Partikel bzw. Emulsionströpfchen und begünstigt somit ihre Agglomeration bzw. Koagulation

(Müller 1996, Freitas et al. 1999b). Somit ist sicherzustellen, dass das primäre Verpackungsmaterial die Leitfähigkeitseigenschaften des verpackten Systems während der Lagerung nicht beeinflusst.

Die Ergebnisse zur Leitfähigkeit der in dieser Studie untersuchten Systeme zeigen, dass bereits für Wasser, welches für viele Arzneistoffträgersysteme das Hauptdispersionsmedium ist, die Primärverpackungsmaterialien einen leitfähigkeitserhöhenden Effekt ausüben, welcher stark von der Lagerungstemperatur abhängig ist.

Wird Glas als Verpackungsmaterial verwendet, liegt der Grund für die Erhöhung der Leitfähigkeit wahrscheinlich an den freien Ionen (meistens OH^-), welche sich an der Glasoberfläche befinden und in das Füllgut diffundieren können (List 1976).

Bei Vials aus Neutralglas wie Borosilikat (Glasart I) ist die Leitfähigkeit des Wassers im Vergleich zu den Natronkalk-Silikatglas-Vials (Glasart II) in geringem Maße erhöht, da sie eine höhere hydrolytische Resistenz besitzen (List 1976). Der beobachtete Unterschied in der Leitfähigkeit zwischen den beiden Glasarten war jedoch so gering, dass eine Investition in die teurere Glasart I unnötig erscheint.

Des Weiteren zeigten die Proben in den unsilanisierten und in den silanisierten Gläsern ähnliche Veränderungen in der Leitfähigkeit. Eine Vergütung der Glasoberfläche durch Silanisierung verhinderte die Zunahme in der Leitfähigkeit nicht. Daher sind die von Freitas et al. dokumentierten Stabilitätsunterschiede für die in silanisierten und für die in nicht silanisierten Vials gelagerten NLC-Dispersionen nicht mit den unterschiedlichen Leitfähigkeiten zu erklären (Freitas et al. 1998). Der beobachtete Stabilitätsunterschied kann mit der von der Silanisierung verursachten Hydrophobierung der inneren Oberfläche zusammenhängen, welche die Agglomeration der Partikel an der Glasoberfläche verhindert.

Ergebnisse zur Leitfähigkeit von Proben mit Kunststoff als Verpackungsmaterial sind aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Kunststoffe nur schwierig zu begründen. Da vom Hersteller keine Auskunft über die konkreten Zusammensetzungen der hier verwendeten Kunststoffe gegeben wurde, sind die folgenden Aussagen allgemein gehalten.

Bei der Herstellung der Verpackungsmaterialien aus Kunststoff werden häufig Hilfsstoffe wie Antioxidantien, Stabilisatoren, Weichmacher, Gleitmittel und

mechanische Verstärker benutzt, um Eigenschaften des Materials, wie Verformbarkeit, Lebensdauer usw. zu beeinflussen. Es wurde bereits bestätigt, dass diese Hilfsstoffe ins Füllgut diffundieren können (Bieber et al. 1984, Schwope et al. 1987, Helmroth et al. 2002, Marcato et al. 2003). Besitzen sie einen ionischen Charakter, so erhöhen sie folglich die Leitfähigkeit des Füllguts. Da die beobachtete Zunahme der Leitfähigkeit für die in Kunststoff verpackten Proben geringer war als für die in Glas verpackten, ist davon auszugehen, dass die diffundierende Menge der ionischen Substanzen aus den Kunststoffen geringer ist.

Unter den untersuchten Kunststoffen fiel LDPE wegen seiner sehr hohen Leitfähigkeitswerte auf. Dies kann an der geringeren Kristallinität der LDPE liegen, welche die Migration von Substanzen aus dem Verpackungsmaterial ins Füllgut begünstigen (Marcato et al. 2003, Swan 2003). Diese Begründung wird von den Ergebnissen der Studien von Bieber et al. bestärkt. Darin wurde bereits gezeigt, dass unter gleichen Bedingungen die Migration von ¹⁴C-markierten Zusatzstoffen aus LDPE ins Wasser höher ist, als die Migration aus HDPE bzw. PP ins Wasser (Bieber et al. 1984).

Der für alle Materialien – bis auf den Kunststoff PC – beobachtete Einfluss der Lagerungstemperatur bestätigt, dass die Diffusion der Ionen, oder aber auch die Menge der ionischen Substanzen, mit steigender Temperatur – also mit steigender Energiezufuhr – wie erwartet zunimmt. Außerdem werden bei höheren Temperaturen die Kristallgitter der Kunststoffe lockerer und ermöglichen somit eine erleichterte Diffusion der ionischen Substanzen aus dem Verpackungsmaterial ins Füllgut. Für den Kunststoff LDPE kann die ununterbrochene Zunahme der Leitfähigkeit für die bei 40°C gelagerte Probe mit der weiteren Verringerung der bereits schon geringen Kristallinität erklärt werden, die Folge der hohen Lagerungstemperatur ist.

Für die bei Raumtemperatur im Kunststoff PC gelagerten Proben wurde ein zunächst rascher aber nicht kontinuierlicher Anstieg der Leitfähigkeit beobachtet und folglich ein im Vergleich zu den bei 40°C gelagerten Proben höherer Leitfähigkeitswert. Dieses unerwartete Ergebnis war vermutlich eine Folge von Verunreinigungen, welche auf der inneren Oberfläche der Vials oder auf dem Deckel vorhanden waren und mit einfachem Waschen nicht entfernt werden konnten.

Betrachtet man die Ergebnisse zur Leitfähigkeit der Nanoemulsionen, Nano-suspensionen und NLC-Dispersionen, so fallen ihre hohen Initialwerte auf. Diese sind mit den unterschiedlichen Komponenten zu erklären, die derartige Systeme enthalten. Neben Wasser beinhalten sie weitere unterschiedliche Substanzen, wie Lipide, Arzneistoffe und Emulgatoren. Die Anstiege in der Leitfähigkeit, die während der Lagerung beobachtet wurden, sind nicht nur durch die Verpackungsmaterialien zu erklären, da die Anstiege für die kolloidalen Systeme stärker als beim Wasser ausgeprägt waren. Entscheidend ist auch die physiko-chemische Stabilität der untersuchten Systeme. Daher werden die genaueren Gründe für das Ansteigen der Leitfähigkeit im Zusammenhang mit den Stabilitätsergebnissen des untersuchten kolloidalen Systems im jeweiligen Abschnitt von Unterkapitel 5.4.4 diskutiert.

5.4.2 pH-Wert

Der pH-Wert ist ein Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung. Bei verdünnten Lösungen entspricht der pH-Wert in Näherung dem negativen Zehnerlogarithmus des Zahlenwertes der Stoffmengenkonzentration der Oxoniumionen (H_3O^+) in Mol pro Liter (Chapman et al. 1996). Ähnlich wie die Leitfähigkeit ist der pH-Wert eines Produkts ein Merkmal seiner Qualität. Änderungen im pH-Wert können sowohl chemische als auch physikalische Stabilitätsprobleme verursachen.

Die in der Pharmazie gängigen Verpackungsmaterialien sind bezüglich ihrer pharmazeutischen Verwendungsmöglichkeiten in Arzneibüchern wie z. B. dem Europäischen Arzneibuch beschrieben (Ph.Eur. 2008). Wie bereits in der Einleitung des Kapitels erwähnt wurde, neigt beispielsweise Glas zur Abgabe von Alkali an Lösungen, was zur Erhöhung des pH-Wertes und zu Unverträglichkeiten führt, wie zur Fällung von Alkaloidbasen, zum Abscheiden von Oxiden aus Salzlösungen und zu Ester- und Glycosidspaltungen. Außerdem führt der hohe pH-Wert zur Zerstörung des Schutzfilms an der Glasinnenoberfläche und stößt somit die Delaminierung des Glases an. Dies kann gefährlich sein, da durch die Delaminierung Glasstücke ins Füllgut wandern können.

Bezüglich kolloidaler Arzneistoffträgersysteme ist bekannt, dass, wie die Änderungen in der Leitfähigkeit, auch die Änderungen im pH-Wert die Stabilität dieser Systeme beeinflussen können (Müller 1996, Zimmermann et al. 2001). Daher sind pH-Wert-Untersuchungen nötig, um eine Aussage über die Qualität des Produkts zu tätigen.

Ähnlich zu den Leitfähigkeitsergebnissen dieser Studie zeigten die pH-Ergebnisse, dass bereits für Wasser die Lagerung in unterschiedlichen Primärverpackungsmaterialien zu unterschiedlichen pH-Werten führt. Bei den Glas-Proben ist im Allgemeinen eine Erhöhung des pH-Wertes aufgrund der Abgabe von Alkali an das untersuchte System zu erwarten. Für die Glasart I wurde ein geringerer Anstieg im pH-Wert erwartet, da sie im Vergleich zur Glasart II eine höhere hydrolytische Resistenz besitzt. Dies sollte insbesondere für die Nanoemulsionen und Lipidnanopartikel gelten, da sie im alkalischen Bereich liegen. Insgesamt wurde jedoch für alle Glas-Proben eine Abnahme des pH-Wertes beobachtet, die den aus der Glasoberfläche diffundierenden OH⁻-Ionen entgegensteht.

Für die untersuchten Systeme, die wie Wasser unkonserviert vorlagen, könnte die mikrobiologische Kontamination für die beobachtete Abnahme der pH-Werte verantwortlich sein. Dies gilt insbesondere für die Glas-Proben, worauf in Abschnitt 5.4.4.1 näher eingegangen wird.

Bezüglich der Kunststoff-Proben sind die folgenden Gründe als mögliche Ursache für die beobachtete Abnahme der pH-Werte zu betrachten. Wie bereits in Abschnitt 5.4.1 dargelegt wurde, können aus dem Kunststoff Substanzen migrieren. Besitzen sie einen säuerlichen Charakter, so kann dies einen Grund für die Abnahme der pH-Werte darstellen. Außerdem ist bekannt, dass die Kunststoffmaterialien flüchtige organische Verbindungen (engl. „volatile organic compounds“) – wie Ester, Aldehyde und Ketone – freisetzen (Hodgson et al. 2000, Skjevraak et al. 2003, Song et al. 2003). Durch saure Hydrolyse der Ester können pH-Wert-senkende Verbindungen wie Karbonsäuren gebildet werden. Ebenso können Karbonsäuren durch Oxidation aus Ketonen und insbesondere aus Aldehyden entstehen. Um diese unerwünschten Reaktionen auszuschließen, bedarf es qualitativer Analysen der analytischen Chemie, wie zum Beispiel Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Gaschromatographie.

Das Primärverpackungsmaterial LDPE, das die größten Änderungen in der Leitfähigkeit verursachte, fiel auch wegen seinem im Vergleich zu den anderen Kunststoffen sehr niedrigem pH-Wert auf. Wie bereits in Abschnitt 5.4.1 erklärt wurde, liegt dies wahrscheinlich an der geringeren Kristallinität des Kunststoffes LDPE.

Die Gasdurchlässigkeiten der Kunststoffe und die Undichte der Kappen der Glas-Proben können weitere Gründe für die beobachtete pH-Wert-Abnahme darstellen. Bekannterweise sind die Kunststoffe gaspermeabel, weshalb die Gase ins Füllgut diffundieren können (Müller-Syring 2006). Bei den Glas-Proben kann eine undichte Kappe einen Luftaustausch nicht verhindern. In beiden Fällen kann daher das gasförmige Kohlenstoffdioxid, welches in der Luft vorhanden ist und sich im Wasser sehr gut löst, den pH-Wert des Füllguts senken (Chapman et al. 1996). Weiterhin muss beachtet werden, dass die Untersuchungen unter normalen Laborbedingungen durchgeführt wurden, und dass somit nach der Öffnung der Proben gasförmiges Kohlenstoffdioxid aus der Luft an der Grenzfläche zwischen Luft und Füllgut adsorbierte, um sich anschließend im Füllgut zu lösen.

Für die meisten Proben nahm der pH-Wert bei Erhöhung der Lagerungstemperatur stärker ab. Dies kann mit der Temperaturabhängigkeit der oben benannten Gründe für die pH-Wert-Abnahme erklärt werden. So steigen mit der Lagerungstemperatur auch die Menge der mikrobiologischen Kontamination und die Menge der aus den Kunststoffen migrierenden und freigesetzten Stoffe. Ebenso sinkt die Kristallinität des Verpackungsmaterials mit steigender Lagertemperatur. Hingegen nimmt die Löslichkeit von Kohlenstoffdioxid in Flüssigkeiten mit steigender Temperatur ab, so dass gelöstes Kohlenstoffdioxid kein Grund für die Abnahme des pH-Wertes bei Erhöhung der Lagerungstemperatur darstellt.

Wie bereits in Abschnitt 5.4.1 erwähnt wurde, müssen die bei den untersuchten kolloidalen Systemen beobachteten Abnahmen der pH-Werte im Zusammenhang mit deren physikalischer und chemischer Stabilität betrachtet werden. Das wird im jeweiligen Abschnitt in Unterkapitel 5.4.4 diskutiert.

5.4.3 Wasserdampfpermeabilität

Für die untersuchten primären Verpackungsmaterialien ist die Durchlässigkeit für Wasserdampf unterschiedlich. Während Glas als undurchlässig eingestuft ist, besitzen Kunststoffe abhängig von ihrer Zusammensetzung eine gewisse Durchlässigkeit.

Eine hohe Wasserdampfpermeabilität bedeutet einen hohen Wasserverlust während der Lagerung – abhängig von Lagerzeit und Lagerungsklima – und führt zur Aufkonzentration des betreffenden Produktes. Bei wässrigen Lösungen kann es sogar zur Auskristallisation des gelösten Stoffes kommen. Wird durch Wasserverlust ein

Arzneistoff höher dosiert, verändert sich womöglich seine Wirkung. Deswegen ist der Grad der Wasserdampfpermeabilität des primären Verpackungsmaterials für alle Produkte, welche Wasser enthalten, von großer Bedeutung.

Aus den Ergebnissen, die in Abschnitt 5.3.1.3 aufgeführt sind, ergibt sich, dass der Kunststoff PC die höchste Wasserdampfpermeabilität besitzt und damit zu unkontrollierter Aufkonzentration des Produktes während der Lagerung führen kann. Seine hohe Wasserdampfpermeabilität kann durch seinen amorphen Zustand erklärt werden (Cheng 1998). Durch die ungeordnete Molekularstruktur können die Wassermoleküle leichter flüchten als bei der ordentlichen Struktur teilkristalliner Kunststoffe, wie LDPE, HDPE und PP. Für die anderen untersuchten Materialien war kein signifikanter Unterschied beim Wasserverlust festzustellen. Es ist jedoch zu beachten, dass diese Proben auch während ihrer einjährigen Lagerung untersucht wurden. Dadurch ist eine absolute Wasserdampfpermeabilitätsrechnung nicht möglich, weil beispielsweise am Messinstrument anhaftende Flüssigkeit die Ergebnisse verfälscht.

5.4.4 Partikelgrößenanalytik und Partikelladung

In diesem Teil der Diskussion werden die Ergebnisse zur physikalischen Stabilität der untersuchten kolloidalen Systeme mit den Ergebnissen der Leitfähigkeiten und den pH-Werten verglichen, um den Einfluss des primären Verpackungsmaterials besser zu verstehen.

5.4.4.1 Nanoemulsion

Werden die physikalischen Stabilitätsergebnisse der Nanoemulsionen betrachtet, so fallen die sogenannten Tailings der 40°C-Proben auf, welche leicht erhöhte $d(v)_{0,95}$ -Werte besitzen. Diese Tailings wurden für alle untersuchten Verpackungsmaterialien bei den 40°C-Nanoemulsionen festgestellt, sodass davon ausgegangen werden kann, dass ihr Auftreten temperatur- und nicht materialabhängig ist. Es muss jedoch beachtet werden, dass die Gesamtverteilung der Partikelgrößen mit LD untersucht wurde und dass diese Methode ungeeignet ist, um mögliche feine Unterschiede in der Partikelgröße festzustellen. Untersuchungen mittels Accusizer oder Coulter Counter würden akkuratere Ergebnisse liefern, mit denen eine Materialabhängigkeit genau bestimmt werden könnte.

Die ZP-Werte der Nanoemulsionen waren groß genug (größer als -40 mV), um die physikalische Stabilität der Nanoemulsionen als hoch einstufen zu können. Die beobachteten kleinen Unterschiede zwischen den ZP-Werten der Nanoemulsionen sind nicht relevant, da bei der Kalibrierung des Zetasizers mit dem entsprechenden Kalibrierungsstandard (DTS0050) ein Unterschied von +/- 5 mV als normal betrachtet wird (Malvern 2008).

Die ZP-Werte der Nanoemulsionen waren vergleichsweise geringer, wenn sie im originalen Dispersionsmedium und nicht im destillierten Wasser gemessen wurden. Dies lässt sich mit dem hohen Elektrolytgehalt des originalen Dispersionsmediums und der daraus resultierenden Reduktion der Diffusionsschicht erklären. Dennoch sind auch die im originalen Dispersionsmedium gemessenen ZP-Werte der Emulsionen groß genug, um die physikalische Stabilität der Proben als hoch zu bezeichnen.

Da für die Proben der Nanoemulsionen jeweils die physikalischen Stabilitäten bzw. die ZP-Werte ähnlich waren, können die beobachteten Unterschiede in den Leitfähigkeits- bzw. pH-Ergebnissen nicht mit den physikalischen Stabilitätsergebnissen erklärt werden.

Eine physikalische Stabilität bedeutet nicht zwangsläufig auch eine chemische Stabilität. Die Nanoemulsionen, die in dieser Studie verwendet wurden, sind O/W-Systeme, bestehend aus Wasser, einem Emulgator und einem flüssigem Lipid, welches aus mittelkettigen Triglyceriden mit 8 bis 12 Kohlenstoffatomen besteht. Diese Triglyceride spalten sich durch Hydrolyse leicht zu freien Fettsäuren, welche wiederum den pH-Wert senken und die Leitfähigkeit erhöhen. Im Gegensatz zu den anderen Systemen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, stagnierten die Leitfähigkeitswerte der Nanoemulsionen (nicht jedoch bei der bei 40°C in LDPE gelagerten Probe) in einem Plateaubereich, womit das System bezüglich der Leitfähigkeit sein Gleichgewicht erreichte.

Die Nanoemulsionen enthielten keine Konservierungsstoffe, weswegen erwartet wurde, dass sie während der Lagerung möglicherweise anfangen würden zu schimmeln. Bei den makroskopischen Untersuchungen konnte Schimmel für die Glas-Proben, nicht aber für die Kunststoff-Proben, beobachtet werden. Dies legt eine mögliche Diffusion von Additiven des Kunststoffes (z. B. Konservierungsstoffe) in das Füllgut nahe (Helmroth et al. 2002). Dieser Sachverhalt bietet grundsätzlich die

intelligente Möglichkeit der Konservierung von Produkten durch „active packaging“ (Vermeiren et al. 1999, Graciano-Verdugo et al. 2010), wobei jedoch jede unkontrollierte Freisetzung aus den primären Verpackungsmaterialien ins Füllgut unerwünscht ist.

5.4.4.1 Nanosuspension

Werden die physikalischen Stabilitätsergebnisse der Nanosuspensionen betrachtet, so fallen die unterschiedlichen Stabilitäten der in den verschiedenen primären Verpackungsmaterialien gelagerten Proben auf. Die ZP-Werte, die im destillierten Wasser bzw. in der Tensid-Lösung gemessen wurden, spiegeln die unterschiedlichen Stabilitäten der Nanosuspensionen jedoch nicht wieder. Nur die im originalen Dispersionsmedium gemessenen ZP-Werte deuten auf die beobachteten Stabilitätsunterschiede der verschieden gelagerten Nanosuspensionen hin. Für die 4°C- und RT-Nanosuspensionen waren sie noch bei allen untersuchten Verpackungsmaterialien ähnlich, bei den 40°C-Nanosuspensionen unterschieden sie sich dann jedoch in Abhängigkeit von der physikalischen Stabilität. So besaß die bei 40°C gelagerte LDPE-Probe den geringsten ZP-Wert unter den 40°C-Proben (-11,6 mV) und bildete zugleich auch die am schnellsten agglomerierende Probe. Im Gegensatz dazu besaß die Glasart I-Probe den höchsten ZP-Wert und gleichzeitig die höchste physikalische Stabilität.

Werden die physikalischen Stabilitätsergebnisse mit den Leitfähigkeits- und pH-Ergebnissen verglichen, so fällt ein Zusammenhang zwischen den physikalischen Stabilitäten der Nanosuspensionen und den zugehörigen Leitfähigkeits- bzw. pH-Werten auf.

Je größer die Änderungen in der Leitfähigkeit bzw. im pH-Wert während der Lagerung waren, desto instabiler war die Probe, d. h. desto schneller traten Agglomerationen auf. Besonders prägnante Beispiele hierfür sind die LDPE- und die Glasart I-Proben. Diese Beobachtung bestätigt die bereits formulierte Vermutung, dass die durch das Verpackungsmaterial verursachten Veränderungen in der Leitfähigkeit und im pH-Wert die physikalische Stabilität des kolloidalen Systems beeinflussen.

Bei den Nanosuspensionen wurden keine makroskopischen Veränderungen, also kein Schimmel beobachtet. Der Grund hierfür war die Konservierung des Systems mit

EUXYL PE 9010. Daher kann ausgeschlossen werden, dass die für die Nanosuspensionen beobachteten Ergebnisse durch mikrobiologische Artefakte beeinflusst wurden.

5.4.4.2 Lipidnanopartikel

Werden die physikalischen Stabilitätsergebnisse der NLC-Dispersionen betrachtet, so fällt die sehr hohe Stabilität der RT- und 4°C-Proben und die Kristallisation des Menthols in den 4°C-Proben auf. Die Kristallisation des Menthols wurde für alle untersuchten Verpackungsmaterialien bei den 4°C-Dispersionen festgestellt, sodass davon auszugehen ist, dass ihr Auftreten temperatur- und formulierungsabhängig, nicht aber materialabhängig ist. Dieses Problem der physikalischen Stabilität konnte auf Grundlage der ZP-Ergebnisse nicht vorhergesehen werden. Die ZP-Werte der NLC-Dispersionen – auch bei den 4°C-Proben – waren groß genug (größer als -40 mV), um die physikalische Stabilität der Proben als hoch einzustufen.

Im Vergleich der Stabilitätsergebnisse mit den Leitfähigkeitsergebnissen fallen die hohen Leitfähigkeitswerte der bei 4°C gelagerten Proben auf, die bereits sechs Monate nach der Herstellung Mentholkristalle besaßen.

Im Gegensatz zu den Nanosuspensionen wurden die NLC-Dispersionen nicht konserviert. Jedoch wurden auch für die NLC-Dispersionen keine makroskopischen Veränderungen bezüglich der mikrobiologischen Kontamination beobachtet. Dies liegt wahrscheinlich am Menthol, das antimikrobiologisch wirkt (Iskan et al. 2002, Schelz et al. 2006).

5.5 Zusammenfassung des Kapitels

Es wurde festgestellt, dass die primären Verpackungsmaterialien einen großen Einfluss auf die physikalische und chemische Stabilität der verpackten Produkte haben. Dieser Einfluss hängt stark von der Lagerungstemperatur ab. Je nach Inhalt beeinflussen die primären Verpackungsmaterialien nicht nur die Leitfähigkeit und den pH-Wert des Füllgutes, sondern auch die Partikelgröße.

Von den getesteten Kunststoffen ist das teuerste Material PC aufgrund seiner hohen Durchlässigkeit nicht geeignet für die Aufbewahrung wasserhaltiger Produkte. Auch der mit LDPE günstigste Kunststoff ist nicht geeignet für derartige Dispersionen, da er zu großen Veränderungen in den physiko-chemischen Eigenschaften der verpackten Dispersion führen kann.

Glas ist nicht nur kostengünstiger, es führt auch nicht zur Migration und Diffusion von unbekanntem Substanzen in das Produkt. Daher sollte Glas als primäres Verpackungsmaterial für solche Systeme gewählt werden, die Wasser enthalten. Ein Vergleich zwischen Glasart I und Glasart II wies für Nanoemulsionen und NLC-Dispersionen, also zwei der drei untersuchten Dispersionen, keine Unterschiede bezüglich der physikalischen Stabilität auf, sodass es für diese Systeme keine Notwendigkeit gibt, die teurere Glasart I zu benutzen.

Für die dritte untersuchte Dispersion, die Nanosuspension, ist die Glasart I jedoch zu empfehlen, da sie die höchste physikalische Stabilität gewährleistet.

Obwohl aufgrund der migrierenden und diffundierenden Stoffe im Allgemeinen geringere Temperaturen als Lagerungstemperatur zu empfehlen sind, bot die Raumtemperatur als kostengünstigste Lagertemperatur für zwei der drei untersuchten Dispersionen eine ausreichende Stabilität. Die optimalen Lagertemperaturen unterschieden sich jedoch je nach Produkt. Daher wird empfohlen für die Kombination aus Produkt und primärem Verpackungsmaterial einen entsprechenden Lagerungstest bei unterschiedlichen Temperaturen durchzuführen.

6 Zusammenfassung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Menthol-beladene Nanostrukturierte Lipidcarrier (NLC) entwickelt und produziert. Unter der Zielsetzung ihrer Verwendung in Consumer-Care-Produkten wurden die optimale Zusammensetzung und die entsprechenden Herstellungsparameter der Lipidnanopartikel so bestimmt, dass die NLC in einem festen Zustand vorliegen, bei Langzeitlagerung und Zerstäubung physikalisch stabil bleiben und eine verlängerte Freisetzung des Menthols ermöglichen. Anschließend wurden ausgewählte Prozesse aus Entwicklung, Charakterisierung und Lagerung systematisch untersucht und gezielt optimiert.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die Formulierungen der Menthol-beladenen NLC durch Lipid-Screening mit der DSC-Methode und durch Tensid-Screening mit Hilfe von Kontaktwinkel-Untersuchungen entwickelt. Entsprechende NLC-Dispersionen wurden anschließend unter der Verwendung von heißer Hochdruckhomogenisation hergestellt.

Bei einem Vergleich systematisch variiertes Herstellungsparameter stellte sich die Produktion als optimal heraus, die mit drei Homogenisationszyklen bei einem Druck von 500 bar und einer Produktionstemperatur am Schmelzpunkt des festen Lipides mit dem Cremeschmelzverfahren (CS-Verfahren) durchgeführt wurde. Sie führt zu stabilen Partikeln im Submikrometerbereich mit ZP-Werten höher als -40 mV und zu einer engen Partikelgrößenverteilung. Zudem zeichnet sich das Kristallisationsverhalten der so hergestellten Lipidnanopartikel durch eine geringe Menge niedrig schmelzender Modifikation aus, womit eine Instabilität während der Lagerung aufgrund der Umwandlung von niedrig schmelzender Modifikation in stabile, höher schmelzende Modifikation ausgeschlossen werden kann.

In eigens durchgeführten Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die Menge der niedrig schmelzenden Modifikation mit dem in der Produktion eingebrachten Energieaufwand korreliert. Dies motivierte mit dem Cremeschmelzverfahren einen neuartigen Ansatz zu Herstellung von Lipidnanopartikel-Dispersionen. Das Cremeschmelzverfahren, dessen Reproduzierbarkeit gezeigt wurde, zeichnet sich durch eine kostengünstigere Produktion am Schmelzpunkt des festen Lipides aus. Seine schonende Herstellung bei einer niedrigeren Temperatur kann die Wirksamkeit

der Verkapselung von Substanzen wie Menthol erhöhen, welche eine erhöhte Löslichkeit in der Wasserphase mit steigender Temperatur aufweisen.

Durch die Untersuchung des Einflusses der Lipidphasenkonzentration auf die physiko-chemischen Eigenschaften konnte nachgewiesen werden, dass die Konzentration der Lipidphase auf mindestens 30% erhöht werden kann, ohne die Stabilität des Produktes zu beeinflussen. In herkömmlichen Consumer-Care-Produkten beträgt die Mentholkonzentration in etwa 0,1%, sodass ein Liter 30%iges NLC-Konzentrat zur Herstellung von etwa 30 Liter Endprodukt verwendet werden kann.

Für die entwickelten Menthol-beladenen NLC konnte mittels membranfreien *in vitro* Freisetzungsuntersuchungen eine verlängerte Freisetzung des Menthols gezeigt werden. Anschließend *in vivo* Freisetzungsuntersuchungen bestätigten eine gegenüber konventionellen mentholhaltigen Mundspülungen verlängerte Freisetzung.

Motiviert durch den ersten Teil der Arbeit wurden im zweiten Teil der Arbeit ausgewählte Prozesse der Entwicklung, Herstellung und Lagerung am Beispiel der Menthol-beladenen Lipidnanopartikel optimiert.

Für die frühe Phase der Formulierungsentwicklung wurden verschiedene Lipid-Screening-Methoden verglichen. Die Mikroskop-Methode war am zuverlässigsten und effizientesten in ihrer Vorhersage zur physikalischen Stabilität der Lipidnanopartikel-Dispersionen. Ihre Ergebnisse korrelierten am besten mit den Ergebnissen der hergestellten Dispersionen. Hingegen war die kostenintensivere, konventionelle DSC-Methode unzuverlässiger und ist somit weniger geeignet als allgemein angenommen.

Als eine neuartige Lipid-Screening-Methode wurde die Zäpfchen-Methode vorgestellt und untersucht. Sie benötigt relativ große Stoffmengen und ist eher für kostengünstige Wirkstoffe geeignet. Auch wenn die Mikroskop-Methode zuverlässiger in ihrer Aussage zur Stabilität der Lipidnanopartikel-Dispersionen ist, kann die Zäpfchen-Methode dennoch konstruktive Informationen wie z. B. über die Lage des Wirkstoffes in dem beladenen Partikel liefern.

Neben dem Lipid-Screening wurde in dieser Arbeit auch das Tensid-Screening untersucht. Für die Kontaktwinkel-Untersuchungen mittels Goniometer konnte gezeigt werden, dass die Kontaktwinkelergebnisse stark davon abhängen, ob beim Vorbereiten die englische oder kontinentale Methode verwendet wurde. Kontakt-

winkelmessungen ohne die Angabe der jeweils benutzten Probenvorbereitungsmethode sind somit nicht interpretierbar. Insgesamt erwies sich die Kontaktwinkel-Untersuchung mit der kontinentalen Probenvorbereitungsmethode als besonders geeignet, um bereits in einem frühen Stadium der Formulierungsentwicklung zu beurteilen, wie geeignet ein Tensid zur Stabilisierung der NLC-Dispersion ist.

Im Rahmen der optimierten Charakterisierung von Lipidnanopartikeln konnte gezeigt werden, dass für die Partikelgrößenanalytik mittels Laserdiffraktometrie, welche essenziell für die Erforschung von kolloidalen Dispersionen ist, weitere, bisher nicht beachtete Fehlerquellen existieren. Es wurde gezeigt, dass das Instrument zur Probenahme, die Rührgeschwindigkeit und der Einsatz von Ultraschall einen unerwartet großen Einfluss auf die Ergebnisse der Partikelgrößenanalytik mittels LD haben. Während die Eppendorf-Pipette wegen ihres kleinen Durchmessers an der Spitze das Agglomerieren der Partikel fördert, können sowohl eine hohe Rührgeschwindigkeit wie auch der Einsatz von Ultraschall vorhandene Agglomerationen zerstören. Daher müssen auch diese Parameter konstant gehalten werden und sollten bei Veröffentlichungen mit angegeben werden, um die Ergebnisse vergleichen zu können.

Neben der Laserdiffraktometrie bildete auch die dynamische Differenzkalorimetrie als eine häufig benutzte Technik für die Charakterisierung von Lipidnanopartikeln einen Schwerpunkt in dieser Arbeit. Durch einen Vergleich von Lipidnanopartikel-Proben, die sich nur im Wassergehalt unterschieden, konnte gezeigt werden, dass die DSC-Ergebnisse vom Wassergehalt einer Probe beeinflusst werden. Somit müssen Proben für einen adäquaten Vergleich einen ähnlichen Wassergehalt aufweisen. Dabei ist ein hoher Wasseranteil (> 90%) in den Proben zu vermeiden, da dieser zur Abnahme der Schmelzenthalpie und eventuell sogar zur Auslöschung von Schmelzereignissen führt. In der Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass die Reduzierung des Wassergehalts einer Probe nicht durch Zentrifugation erzielt werden sollte, da diese die Kristallinität der Lipidnanopartikel erhöhen und somit zu falschen DSC-Ergebnissen führen würde.

Mit weiteren Kristallinitätsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass bezüglich der Berechnung von Enthalpien mittels DSC eine auf den Lipidgehalt bezogene Berechnung vorzuziehen ist, um die Enthalpie-Ergebnisse von unterschiedlich stark konzentrierten Dispersionen adäquat vergleichen zu können. Die herkömmliche

Berechnung, die sich auf die gesamte Probe bezieht, führte bei gleichen Partikeln in unterschiedlich stark konzentrierten Dispersionen zu Schwankungen in den Ergebnissen.

Auch konnte durch Kristallinitätsuntersuchungen mittels DSC gezeigt werden, dass die physikalische Stabilität der Lipidnanopartikel von der Kristallinstruktur abhängig ist. Ein Vergleich von jeweils Menthol-beladenen und unbeladenen SLN und NLC wies eine Überlegenheit der NLC aufgrund der Kristallinstruktur ihrer Partikel nach. Für die NLC konnte durch Zugabe von flüssigem Lipid eine Bildung der instabilen α -Modifikation inhibiert und somit der Ausstoß des Wirkstoffes verhindert werden.

Mit dem *in vitro* Okklusionstests nach de Vringer wurde eine weitere Charakterisierungsmethode untersucht, die häufig in der Lipidnanopartikel-Forschung angewandt wird. Es wurde gezeigt, dass der Test nur dann reproduzierbar ist, wenn die Temperatur und die relative Luftfeuchtigkeit im Test konstant gehalten werden. Als wesentliches Ergebnis bleibt festzuhalten, dass der Test dennoch in einer Kammer durchgeführt werden kann, die ausschließlich die Regulierung der Temperatur erlaubt – und nicht wie üblich auch die Regulierung der relativen Luftfeuchtigkeit. Hierfür ist eine gesättigte Lösung von nichttoxischem NaBr zu verwenden, die indirekt die Luftfeuchtigkeit reguliert. Dieses Verfahren ist einfach, robust und kostengünstig.

Abschließend wurde gezeigt, dass die primären Verpackungsmaterialien einen Einfluss auf die physikalische und chemische Stabilität der verpackten Produkte haben. Eine erhöhte Lagerungstemperatur verstärkt diesen Einfluss.

Für die untersuchten Kunststoffverpackungen (HDPE, LDPE, PP und PC) wurden Änderungen in den physiko-chemischen Eigenschaften Leitfähigkeit, pH-Wert und Partikelgröße für alle untersuchten Füllgüter – also Wasser, Nanoemulsion, Nanosuspension und Lipidnanopartikel – beobachtet, sodass diese Materialien für die Lagerung der kolloidalen Dispersionen zu vermeiden sind.

Hingegen bietet Glas eine kostengünstige Lagerung und führt nicht zur Migration und Diffusion von unbekanntem Substanzen in das Produkt. Eine wesentliche Überlegenheit von der teureren Glasart I gegenüber der Glasart II wurde nicht beobachtet. Sollte eine produktspezifische Studie für das Verpackungsmaterial nicht möglich sein, so wird aufgrund der Ergebnisse grundsätzlich Glasart II als Verpackungsmaterial empfohlen.

7 Summary

In the present work menthol loaded nanostructured lipid carriers (NLC) were developed and produced. With the objective of being used in consumer care products the optimal composition of the lipid nanoparticles and the corresponding production parameters were determined, so that the NLC are in a solid state, remain physically stable during a long term storage over 1 year, and after spraying by a nozzle and provide a prolonged release of the menthol. Afterwards, selected processes of development, characterization, and storage were studied systematically and optimized.

In the first part, the menthol loaded NLC formulations were developed by lipid screening using the DSC method and surfactant screening using contact angle determination. Dispersions corresponding to the developed formulations were produced using hot high-pressure homogenization.

By systematically comparing the production parameters it was found that the best production process included three homogenization cycles at a pressure of 500 bar and with a production temperature at the melting point of the solid lipid e.g. the cream melting process (in German “Cremeschmelzverfahren”, CS-Verfahren). This process leads to stable particles in the submicron range with ZP-values higher than -40 mV and with narrow particle size distribution. In addition, the crystallization behavior of the lipid nanoparticles produced as described is characterized by a small amount of the low-melting modification. Thereby instability during storage due to the transformation of the low-melting modification into stable high-melting modification can be excluded.

By first-hand performed investigations it could be shown that the amount of the low-melting modification correlated with the energy input during the production of the lipid nanoparticles. This motivated for a production using “the cream melting process” – a novel approach to produce lipid nanoparticle dispersions. The cream melting method, which has been proved to be reproducible, is characterized as a low-cost production at the melting point of the solid lipid. Its gentle production at a lower

temperature can improve the efficacy of encapsulation of materials such as menthol, whose solubility in water phase increases with rising temperature.

By investigating the influence of the lipid phase concentration on the physico-chemical properties it has been demonstrated that the concentration of the lipid phase may be increased to at least 30% without affecting the stability of the product. In conventional consumer care products the menthol concentration is about 0.1%. Thus, with 1 liter of 30% NLC concentrate 30 liters of the final product can be prepared.

For the developed menthol loaded NLC a prolonged release of menthol could be shown using a membrane-free *in vitro* release study. Subsequently an *in vivo* release study confirmed the prolonged release of menthol from the lipid nanoparticles compared with conventional menthol-containing mouthwash.

In the second part of the work selected processes of development, production and storage were optimized using the example of menthol loaded lipid nanoparticles.

For the early phase of the formulation development various lipid screening methods were compared. The microscope method was shown to be the most reliable and efficient method in its predictions for the physical stability of lipid nanoparticle dispersions. These results correlated best with the results of the homogenized dispersions. In contrast, the more expensive, conventional DSC method was unreliable and is therefore less suitable than commonly believed for the prediction of the physical stability of the homogenized dispersions.

As a novel lipid screening method, the "suppository" method is presented and analyzed in this present work. It requires relatively large quantities of material, and is more suitable for low-priced ingredients. Although the microscope method better predicts the stability of the lipid nanoparticle dispersions, the suppository method can still provide constructive information such as the distribution of the drug in the particles.

In addition to the lipid screening the surfactant screening has been studied. With regard to the contact angle determination by a goniometer it was shown that the contact angle results strongly depend on sample preparation method i.e. English or Continental method well-known from production of emulsions. Thus, results of contact angle measurements are not meaningful when information about the sample

preparation is missing. Overall, the contact angle determination using the continental preparation method has been shown to be especially good in deciding whether a surfactant is suitable to stabilize NLC dispersions in an early stage of formulation development.

Regarding the optimized characterization of lipid nanoparticles it could be shown that there are other, previously unknown pitfalls for particle size analysis by laser diffractometry, which is essential for the study of colloidal dispersions. It has been shown that the instrument for sampling, the stirring speed and the use of sonication cause unexpectedly great changes on the results of particle size analysis by LD. While the Eppendorf pipette promotes agglomeration of the particles due to its small diameter at the tip, a high stirring speed as well as the use of sonication can destroy existing agglomerations. Therefore, these parameters and instrumental setups must be kept constant during size analysis by LD and should be carefully described in publications so that results are comparable.

In addition to laser diffractometry differential scanning calorimetry as another frequently used technique for the characterization of lipid nanoparticles was a focus of the present work. By comparing lipid nanoparticle samples, which differ solely in their water content, it was shown that DSC results are influenced by the water content of a sample. Therefore, analyzed dispersions should have a similar water content in order to be comparable. Additionally, a high water content (> 90%) in the DSC samples should be avoided, because high amounts of water lead to a decrease in melting enthalpy and disappearing of melting events. It has been also shown that reducing excessive water of the DSC sample should not be done by centrifugation as this could increase the crystallinity of lipid nanoparticles and therefore could lead to incorrect DSC results.

Further investigations of crystallinity by DSC showed that for the calculation of enthalpies a calculation based on lipid content should be preferred as it allows adequate comparisons of crystallinity results of differently concentrated dispersions. The conventional calculation method based on the total amount of DSC sample led to non-analogous results for equally composed particles in differently concentrated dispersions.

Crystallinity investigations by DSC showed that the physical stability of the lipid nanoparticles depends on their crystallinity. A comparison of blank SLN and NLC against menthol loaded SLN and NLC proved a superiority of NLC due to the crystalline structure of the particles. For NLC the formation of unstable α -modification was inhibited by adding liquid lipid to the solid lipid matrix. Thus, active substance expulsion was prevented.

Yet another characterization method – *in vitro* Occlusion test after de Vringer – was investigated in this work as it is a frequently used method in the lipid nanoparticle research. It has been shown that test results were reproducible only, when temperature and relative humidity during the test were kept constant. Nevertheless it was demonstrated that the test can still be performed in climate chambers which allow for regulation and adjustment of temperature but not of relative humidity. For this purpose, a saturated solution of NaBr can be used, which is non-toxic, and regulates indirectly the humidity. This method is simple, robust and cost-effective.

Finally, it was shown that the primary packaging materials affect physical and chemical stability of the packaged products. The influence was moderated by temperature: increased storage temperature increase the influence of packaging material.

All investigated plastic packaging materials (HDPE, LDPE, PP and PC) induced changes in the physicochemical properties (conductivity, pH and particle size) in all investigated packaged products – i.e. water, nanoemulsion, nanosuspension and lipid nanoparticles. Thus, these materials should not be used for the storage of colloidal dispersions.

In contrast to plastic, glass offers a cost-effective storage and does not lead to migration and diffusion of unknown substances in the product. The more expensive glass type I has shown no significant advantage over glass type II. Thus, based on these results, glass type II is recommended as packaging material, unless a product specific packaging material study is at hand.

8 Literaturverzeichnis

Acar Kübart, S., Gennrich, V. und Keck, C. M. (2011). Crystalline state of lipid nanoparticles: influence of water content on results. In: *Joint Meeting of the Austrian and German Pharmaceutical Societies*, Innsbruck, Austria.

Aditya, N. P., Macedo, A. S., Doktorovova, S., Souto, E. B., Kim, S., Chang, P.-S. und Ko, S. (2014). "Development and evaluation of lipid nanocarriers for quercetin delivery: A comparative study of solid lipid nanoparticles (SLN), nanostructured lipid carriers (NLC), and lipid nanoemulsions (LNE)." *LWT - Food Science and Technology* **59**(1): 115-121.

Al Shaal, L. (2011). smartCrystals® - investigations on preparation, preservation and long-term stability. Dissertationsschrift, Freie Universität Berlin.

Almeida, A. J. und Souto, E. (2007). "Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins." *Adv Drug Deliv Rev* **59**(6): 478-490.

BASF (2012). *Die kühle Frische von Menthol*, BASF SE, Ludwigshafen, Deutschland. http://www.basf.com/group/corporate/de_DE/function/conversions/publish/content/news-and-media-relations/sciencearoundus/menthol/images/BASF_Wissenschaft_populaer_Menthol.pdf (abgerufen am 17.06.2014).

BASF (2013). *L-Menthol Pharma and L-Menthol flakes Pharma-Technical Information*, BASF SE, Ludwigshafen, Deutschland. http://www.pharma-ingredients.basf.com/Statements/Technical%20Informations/EN/Pharma%20Solutions/03_130101e_L-Menthol%20Pharma.pdf (abgerufen am 17.06.2014).

Baspinar, Y. (2009). Nano- und Mikroemulsionen zur topischen Applikation von schwerlöslichen Immunsuppressiva. Dissertationsschrift, Freie Universität Berlin.

Bauer, K. H., Frömming, K. H. und Führer, C. (1999). *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie*. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

Bhandari, R. und Kaur, I. P. (2013). "Pharmacokinetics, tissue distribution and relative bioavailability of isoniazid-solid lipid nanoparticles." *Int J Pharm* **441**(1-2): 202-212.

Bhatia, S. P., McGinty, D., Letizia, C. S. und Api, A. M. (2008). "Fragrance material review on menthol." *Food Chem Toxicol* **46 Suppl 11**: S209-214.

Bieber, W. D., Freytag, W., Figge, K., vom Bruck, C. G. und Rossi, L. (1984). "Transfer of additives from plastics materials into foodstuffs and into food simulants—a comparison." *Food Chem Toxicol* **22**(9): 737-742.

Boistelle, R. (1988). Fundamentals of nucleation and crystal growth. In: Gardi, N. und Sato, K. (Ed.) *Crystallization and Polymorphism of Fats and Fatty Acids*. **31**: 189-226.

Booten, K. und Gupta, S. (2004) "Nature-based emulifiers and their cosmetic applications: inulin-based emulsifiers have a range of application in personal care products "Household and Personal Products Industry. <http://www.thefreelibrary.com/Nature-based+emulsifiers+%26+their+cosmetic+applications%3A+inulin-based...-a0114563825> (abgerufen am 17.06.2014).

Borhani-Haghighi, A., Motazedian, S., Rezaii, R., Mohammadi, F., Salarian, L., Pourmokhtari, M., Khodaei, S., Vossoughi, M. und Miri, R. (2010). "Cutaneous application of menthol 10% solution as an abortive treatment of migraine without aura: a randomised, double-blind, placebo-controlled, crossed-over study." *Int J Clin Pract* **64**(4): 451-456.

Bouchemal, K., Briançon, S., Perrier, E. und Fessi, H. (2004). "Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation." *Int J Pharm* **280**(1-2): 241-251.

Bromm, B., Scharein, E., Darsow, U. und Ring, J. (1995). "Effects of menthol and cold on histamine-induced itch and skin reactions in man." *Neurosci Lett* **187**(3): 157-160.

Bultmann, M. (2003). *Grundlagen der Arzneiformenlehre: ein Leitfaden zu Vorlesung und Praktikum, 2. Auflage*.

Bunjes, H., Koch, M. H. und Westesen, K. (2003). "Influence of emulsifiers on the crystallization of solid lipid nanoparticles." *J Pharm Sci* **92**(7): 1509-1520.

Bunjes, H., Koch, M. H. J. und Westesen, K. (2002). Effects of surfactants on the crystallization and polymorphism of lipid nanoparticles. In: Lagaly, G. (Ed.) *Molecular Organisation on Interfaces*, Springer Berlin Heidelberg. **121**: 7-10.

Bunjes, H. und Koch, M. H. J. (2005). "Saturated phospholipids promote crystallization but slow down polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles." *J Control Release* **107**(2): 229-243.

Bunjes, H., Steiniger, F. und Richter, W. (2007a). "Visualizing the structure of triglyceride nanoparticles in different crystal modifications." *Langmuir* **23**(7): 4005-4011.

Bunjes, H. und Unruh, T. (2007b). "Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering." *Adv Drug Deliv Rev* **59**(6): 379-402.

Bunjes, H., Westesen, K. und Koch, M. H. J. (1996). "Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles." *Int J Pharm* **129**(1-2): 159-173.

- Butani, D., Yewale, C. und Misra, A. (2016). "Topical Amphotericin B solid lipid nanoparticles: Design and development." *Colloid Surface B* **139**: 17-24.
- Campardelli, R., Cherain, M., Perfetti, C., Iorio, C., Scognamiglio, M., Reverchon, E. und Della Porta, G. (2013). "Lipid nanoparticles production by supercritical fluid assisted emulsion–diffusion." *J Supercrit Fluid* **82**: 34-40.
- Campos, D. A., Madureira, A. R., Gomes, A. M., Sarmiento, B. und Pintado, M. M. (2014). "Optimization of the production of solid Witepsol nanoparticles loaded with rosmarinic acid." *Colloid Surface B* **115**: 109-117.
- Castelli, F., Puglia, C., Sarpietro, M. G., Rizza, L. und Bonina, F. (2005). "Characterization of indomethacin-loaded lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry." *Int J Pharm* **304**(1–2): 231-238.
- CarlRoth (2014). *Zerstäubflasche*, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland. <http://www.carlroth.com/catalogue/catalogue.do?favOid=00000000000028db400020023&act=showBookmark&lang=de-de&market=DE> (abgerufen am 17.06.2014).
- Cavalli, R., Caputo, O., Marengo, E., Pattarino, F. und Gasco, M. R. (1998). "The effect of the components of microemulsions on both size and crystalline structure of solid lipid nanoparticles (SLN) containing a series of model molecules." *Pharmazie* **53**(6): 392-396.
- Chapman, D. (1962). "The polymorphism of glycerides." *Chem Rev* **62**(5): 433-456.
- Chapman, D. und Kimstach, V. (1996). Selection of water quality variables. In: Chapman, D. (Ed.) *Water Quality Assessments - A Guide to Use of Biota, Sediments and Water in Environmental Monitoring - Second Edition*. London, Chapman & Hall.
- Charcosset, C., El-Harati, A. und Fessi, H. (2005). "Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contactor." *J Control Release* **108**(1): 112-120.
- Chattopadhyay, P., Shekunov, B. Y., Yim, D., Cipolla, D., Boyd, B. und Farr, S. (2007). "Production of solid lipid nanoparticle suspensions using supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE) for pulmonary delivery using the AERx system." *Adv Drug Deliv Rev* **59**(6): 444-453.
- Chen, Y.-j., Jin, R.-x., Zhou, Y.-q., Zeng, J., Zhang, H. und Feng, Q.-r. (2006). "Preparation of solid lipid nanoparticles loaded with Xionggui powder-supercritical carbon dioxide fluid extraction and their evaluation in vitro release." *China journal of Chinese materia medica* **31**(5): 376-379.
- Cheng, S. Z. D., Ed. (1998). *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry*. Amsterdam, Elsevier.
- Corvis, Y., Negrier, P., Massip, S., Leger, J.-M. und Espeau, P. (2012). "Insights into the crystal structure, polymorphism and thermal behavior of menthol optical isomers and racemates." *CrystEngComm* **14**(20): 7055-7064.

Daniels, R. (2004) "In situ-Partikelgrößenanalyse in konzentrierten Dispersionen." Skin Care Forum. <http://www.skin-care-forum.basf.com/de/author-articles/in-situ-partikelgr%C3%B6%C3%9Fenanalyse-in-konzentrierten-dispersionen/2004/02/12?id=24914e89-4c53-4442-9b02-672b8bf8b506&mode=Detail>(abgerufen am 16.06.2014)

Das, S., Ng, W. K. und Tan, R. B. (2012). "Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs?" *Eur J Pharm Sci* **47**(1): 139-151.

Davis, S. S., Washington, C., West, P., Illum, L., Liversidge, G., Sternson, L. und Kirsh, R. (1987). "Lipid emulsions as drug delivery systems." *Annals of the New York Academy of Sciences* **507**(1): 75-88.

de Vringer, T. (1992). Topical preparation containing a suspension of solid lipid particles. **EP0506197 A1**.

de Vringer, T. und de Ronde, H. A. G. (1995). "Preparation and structure of a water-in-oil cream containing lipid nanoparticles." *J Pharm Sci* **84**(4): 466-472.

Dean, D. A., Evans, E. R. und Hall, I. H. (2005). *Pharmaceutical Packaging Technology*, Taylor & Francis.

Dingler, A. (1998). Feste Lipid-Nanopartikel als kolloidale Wirkstoffträgersysteme zur dermalen Applikation. Dissertationsschrift, Freie Universität Berlin.

Dingler, A., Blum, R. P., Niehus, H., Müller, R. H. und Gohla, S. (1999). "Solid lipid nanoparticles (SLN/Lipopearls)--a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products." *J Microencapsul* **16**(6): 751-767.

DrugBase (2014a). *Inutec SPI*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart. http://www.drugbase.de/de/datenbanken/fiedler/excipient.html?tx_crondavdbfiedler_pi%5Buid%5D=27239&cHash=44a5653df770766da02bb96aceda3923 (abgerufen am 17.06.2014).

DrugBase (2014b). *Plantacare 2000 UP*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart. http://www.drugbase.de/de/datenbanken/fiedler/excipient.html?tx_crondavdbfiedler_pi%5Buid%5D=18460&cHash=132a153441abbe444a9e2e14642e4fc7 (abgerufen am 17.06.2014).

DrugBase (2014c). *Poloxamer*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart. http://www.drugbase.de/de/datenbanken/fiedler/excipient.html?tx_crondavdbfiedler_pi%5Buid%5D=25076&cHash=4a0537f8cc16f630021b15e0210b5800 (abgerufen am 17.06.2014).

DrugBase (2014d). *Polysorbates*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart. http://www.drugbase.de/de/datenbanken/fiedler/excipient.html?tx_crondavdbfiedler_pi%5Buid%5D=25883&cHash=d832f986d7e7ecf1459b1903b99e255b (abgerufen am 17.06.2014).

Eccles, R. (1994). "Menthol and related cooling compounds." *J Pharm Pharmacol* **46**(8): 618-630.

Fangueiro, J. F., Andreani, T., Egea, M. A., Garcia, M. L., Souto, S. B. und Souto, E. B. (2012). "Experimental factorial design applied to mucoadhesive lipid nanoparticles via multiple emulsion process." *Colloid Surface B* **100**: 84-89.

FDA (2014). *Direct Food Substances affirmed as GRAS, 21 CFR Part 184*, Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS> (abgerufen am 17.06.2014).

Fiedler, H. P. (2002). *Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete*, Cantor.

Finke, J. H., Schur, J., Richter, C., Gothsch, T., Kwade, A., Büttgenbach, S. und Müller-Goymann, C. C. (2012). "The influence of customized geometries and process parameters on nanoemulsion and solid lipid nanoparticle production in microsystems." *Chem Eng J* **209**: 126-137.

Florence, A. T. und Whitehill, D. (1982). "The formulation and stability of multiple emulsions." *Int J Pharm* **11**: 277-308.

Freitas, C. und Müller, R. H. (1998). "Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions." *Int J Pharm* **168**(2): 221-229.

Freitas, C. und Müller, R. H. (1999a). "Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase." *Eur J Pharm Biopharm* **47**(2): 125-132.

Freitas, C. und Müller, R. H. (1999b). "Stability determination of solid lipid nanoparticles (SLNTM) in aqueous dispersion after addition of electrolyte." *J Microencapsul* **16**(1): 59-71.

Fundarò, A., Cavalli, R., Bargoni, A., Vighetto, D., Zara, G. P. und Gasco, M. R. (2000). "Non-stealth and stealth solid lipid nanoparticles (SLN) carrying doxorubicin: pharmacokinetics and tissue distribution after i.v. administration to rats." *Pharmacol Res* **42**(4): 337-343.

Galeotti, N., Di Cesare Mannelli, L., Mazzanti, G., Bartolini, A. und Ghelardini, C. (2002). "Menthol: a natural analgesic compound." *Neurosci Lett* **322**(3): 145-148.

Gallarate, M., Trotta, M., Battaglia, L. und Chirio, D. (2009). "Preparation of solid lipid nanoparticles from W/O/W emulsions: Preliminary studies on insulin encapsulation." *J Microencapsul* **26**(5): 394-402.

Garti, N., Aronhime, J. S. und Sarig, S. (1989). "The role of chain length and an emulsifier on the polymorphism of mixtures of triglycerides." *J Am Oil Chem Soc* **66**(8): 1085-1089.

Gasco, M. R. (1993). Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. **US5250236 A**.

Gaspar, D. P., Faria, V., Gonçalves, L. M. D., Taboada, P., Remuñán-López, C. und Almeida, A. J. (2016). "Rifabutin-loaded solid lipid nanoparticles for inhaled antitubercular therapy: Physicochemical and in vitro studies." *Int J Pharm* **497**(1–2): 199-209.

Gohla, S. H. und Nielsen, J., (1995). "Partial phase solu-inversion technology (PPSIT): a novel process to manufacture long term multiple emulsions by an in situ one step procedure." *SOFW J.* **121**(10): 707-713.

González-Mira, E., Nikolić, S., García, M. L., Egea, M. A., Souto, E. B. und Calpena, A. C. (2011). "Potential Use of Nanostructured Lipid Carriers for Topical Delivery of Flurbiprofen." *J Pharm Sci* **100**(1): 242-251.

Graciano-Verdugo, A. Z., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Cruz-Zárate, P., Islas-Rubio, A. R., Sánchez-Valdes, S., Sánchez-Escalante, A., González-Méndez, N. und González-Ríos, H. (2010). "Migration of α -tocopherol from LDPE films to corn oil and its effect on the oxidative stability." *Food Res Int* **43**(4): 1073-1078.

Güney, G., Kutlu, H. M. und Genç, L. (2014). "Preparation and characterization of ascorbic acid loaded solid lipid nanoparticles and investigation of their apoptotic effects." *Colloid Surface B* **121**: 270-280.

Hansraj, G. P., Singh, S. K. und Kumar, P. (2015). „Sumatriptan succinate loaded chitosan solid lipid nanoparticles for enhanced anti-migrane potential." *Int J Boil Macromol* **81**: 467-476.

Hänsel, R., Steinegger, E. und Sticher, O. (2009). *Pharmakognosie - Phytopharmazie. 9. Auflage*, Springer.

Helmroth, E., Rijk, R., Dekker, M. und Jongen, W. (2002). "Predictive modelling of migration from packaging materials into food products for regulatory purposes." *Trends Food Sci Technol* **13**(3): 102-109.

Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.-E. und Benoit, J.-P. (2002). "A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers." *Pharm Res* **19**(6): 875-880.

Hodgson, S. C., Casey, R. J. und Bigger, S. W. (2000). "Review of volatile organic compounds derived from polyethylene." *Polym Plast Technol Eng* **39**(5): 845 -874.

Hommos, A. (2009). Nanostructured lipid carriers (NLC) in dermal and personal care formulations. Dissertationsschrift, Freie Universität Berlin.

Hommos, A., Acar, S., Kim, C. und Müller, R. H. (2007). Prolonged release of perfume from nanostructured lipid carriers (NLC). In: *Annual Meeting of the American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS)*, San Diego, USA.

- Hosny, E. A., Abdel-Hady, S. S. und El-Tahir, K. E. H. (1996). "Formulation, in-vitro release and ex-vivo spasmolytic effects of mebeverine hydrochloride suppositories containing polycarbophil or polysorbate 80." *Int J Pharm* **142**(2): 163-168.
- Huang, Y. B., Wang, R. J., Chang, J. S., Tsai, Y. H. und Wu, P. C. (2007). "Evaluation of ketoprofen formulations via penetration rate and irritation in vivo study." *Int J Pharm* **339**(1-2): 47-51.
- Iscan, G., Kirimer, N., Kurkcuoglu, M., Baser, K. H. und Demirci, F. (2002). "Antimicrobial screening of Mentha piperita essential oils." *J Agric Food Chem* **50**(14): 3943-3946.
- Jahnke, I. S. (2001). The theory of high-pressure homogenisation. In: Müller, R. H. und Böhm, B. H. L. (Ed.) *Dispersion Techniques for Laboratory and Industrial Scale Processing*. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH.
- Jenning, V. und Gohla, S. H. (2001). "Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN)." *J Microencapsul* **18**(2): 149-158.
- Jenning, V., Gysler, A., Schäfer-Korting, M. und Gohla, S. H. (2000a). "Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin." *Eur J Pharm Biopharm* **49**(3): 211-218.
- Jenning, V., Lippacher, A. und Gohla, S. H. (2002). "Medium scale production of solid lipid nanoparticles (SLN) by high pressure homogenization." *J Microencapsul* **19**(1): 1-10.
- Jenning, V., Schäfer-Korting, M. und Gohla, S. (2000b). "Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties." *J Control Release* **66**(2-3): 115-126.
- Jenning, V., Thunemann, A. F. und Gohla, S. H. (2000c). "Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids." *Int J Pharm* **199**(2): 167-177.
- Joseph, S. und Bunjes, H. (2012). "Preparation of nanoemulsions and solid lipid nanoparticles by premix membrane emulsification." *J Pharm Sci* **101**(7): 2479-2489.
- Joshi, M., Pathak, S., Sharma, S. und Patravale, V. (2008a). "Design and in vivo pharmacodynamic evaluation of nanostructured lipid carriers for parenteral delivery of artemether: Nanoject." *Int J Pharm* **364**(1): 119-126.
- Joshi, M., Franke, D. und Müller, R. H. (2008b). Hydrophobic nanostructured lipid carriers as novel modification for dermal application. In: *7th European Workshop on Particulate Systems (EWPS)*, Berlin, Germany.
- Joshi, M. D. und Müller, R. H. (2009). "Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives." *Eur J Pharm Biopharm* **71**(2): 161-172.

Juergens, U. R., Stöber, M. und Vetter, H. (1998). "The anti-inflammatory activity of L-menthol compared to mint oil in human monocytes in vitro: a novel perspective for its therapeutic use in inflammatory diseases." *Eur J Med Res* **3**(12): 539-545.

Keck, C. M. (2006). Cyclosporine nanosuspensions: optimised size characterisation & oral formulations. Dissertationsschrift, Freie Universität Berlin.

Keck, C. M. (2010). "Particle size analysis of nanocrystals: improved analysis method." *Int J Pharm* **390**(1): 3-12.

Keck, C. M. (2012). Laserdiffraktometrie. In: Keck, C. M. und Müller, R. H. (Ed.) *Moderne Arzneiformen und Pharmazeutische Technologie - die aktuelle Ergänzung zu den „Standardbüchern“* - <http://pharmazie-lehrbuch.de/ilb12/home.htm>

Keck, C. M., Boreham, A., Schlieter, T., Peters, D., Müller, R. H. und Alexiev, U. (2013). Nanostructures and drug distribution within nanostructured lipid carriers (NLC). In: *40th Annual Meeting of the Controlled Release Society (CRS)*, Honolulu, Hawaii, USA.

Keck, C. M. und Müller, R. H. (2008). "Size analysis of submicron particles by laser diffractometry-90% of the published measurements are false." *Int J Pharm* **355**(1-2): 150-163.

Keck, C. M., Kovačević, A., Müller, R. H., Savić, S., Vuleta, G. und Milić, J. (2014a). "Formulation of solid lipid nanoparticles (SLN): The value of different alkyl polyglucoside surfactants." *Int J Pharm* **474**(1-2): 33-41.

Keck, C. M., Baisaeng, N., Durand, P., Prost, M., Meinke, M. C. und Müller, R. H. (2014b). "Oil-enriched, ultra-small nanostructured lipid carriers (usNLC): A novel delivery system based on flip-flop structure." *Int J Pharm* **477**(1-2): 227-235.

Klang, S. und Benita, S. (1998). Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration. In: Benita, S. (Ed.) *Submicron emulsions in drug targeting and delivery*. Singapore, Harwood Academic Publishers **9**: 119-152.

Kovacevic, A., Savic, S., Vuleta, G., Müller, R. H. und Keck, C. M. (2011). "Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): effects on size, physical stability and particle matrix structure." *Int J Pharm* **406**(1-2): 163-172.

Krishnaiah, Y. S., Satyanarayana, V. und Karthikeyan, R. S. (2002). "Penetration enhancing effect of menthol on the percutaneous flux of nicardipine hydrochloride through excised rat epidermis from hydroxypropyl cellulose gels." *Pharm Dev Technol* **7**(3): 305-315.

Kutz, G. und Wolff, A. (2007). *Pharmazeutische Produkte und Verfahren*. Weinheim, Wiley-VCH.

Lagaly, G., Schulz, O. und Zimehl, R. (1999). *Dispersionen und Emulsionen*, Steinkopff-Verlag Darmstadt.

Lamprecht, A., Saumet, J.-L., Roux, J. und Benoit, J.-P. (2004). "Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment." *Int J Pharm* **278**(2): 407-414.

Leong, T. S. H., Wooster, T. J., Kentish, S. E. und Ashokkumar, M. (2009). "Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification." *Ultrason Sonochem* **16**(6): 721-727.

Lim, W. M., Rajinikanth, P. S., Mallikarjun, C. und Kang, Y. B. (2014). "Formulation and delivery of itraconazole to the brain using a nanolipid carrier system." *Int J Nanomed* **9**: 2117-2126.

List, P. H. (1976). *Arzneiformenlehre - Ein Lehrbuch für Pharmazeuten*. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.

Lockhart, H. und Paine, F. A. (1996). *Packaging of Pharmaceuticals and Healthcare Products*, Springer US.

Luo, Q., Zhao, J., Zhang, X. und Pan, W. (2011). "Nanostructured lipid carrier (NLC) coated with chitosan oligosaccharides and its potential use in ocular drug delivery system." *Int J Pharm* **403**(1-2): 185-191.

Lv, G., Wang, L., Liu, J. und Li, S. (2009). "Method for determination of fatty acid amides in polyethylene packaging materials-gas chromatography/mass spectrometry." *J Chromatogr A* **1216**(48): 8545-8548.

Magenheim, B., Levy, M. Y. und Benita, S. (1993). "A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers - ultrafiltration technique at low pressure." *Int J Pharm* **94**(1-3): 115-123.

Malvern (2004). *Zetasizer Nano Series User Manual*, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK. <http://www.malvern.com/en/support/resource-center/user-manuals/MAN0485EN.aspx> (abgerufen am 17.06.2014).

Malvern (2007). *Mastersizer 2000 User Manual*, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK. <http://www.malvern.com/en/support/product-support/mastersizer-range/mastersizer-2000/> (abgerufen am 17.06.2014).

Malvern (2008). *Frequently asked questions: How do I validate my zeta potential instrument?*, Malvern Instruments Ltd. (abgerufen am 07.12.2006).

Marcato, B., Guerra, S., Vianello, M. und Scalia, S. (2003). "Migration of antioxidant additives from various polyolefinic plastics into oleaginous vehicles." *Int J Pharm* **257**(1-2): 217-225.

Mehnert, W. und Mäder, K. (2001). "Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications." *Adv Drug Deliv Rev* **47**(2-3): 165-196.

MerckMillipore (2011). *Sicherheitsdatenblatt-Art. Nr: 108749*, Merck Chemicals GmbH, Hesse, Deutschland. [http://www.merckmillipore.com/chemicals/pt_BR/Merck-ZA-Site/USD/ViewProductDocuments File?-ProductSKU=MDA_CHEM-108749&DocumentType=MSD&DocumentId=%Fmda%2Fchemicals%2Fmsds%2Fde-AT%2F108749 SDS AT DE.PDF&DocumentSource=GDS&Country=ZA&Channel=Merck-ZA-Site](http://www.merckmillipore.com/chemicals/pt_BR/Merck-ZA-Site/USD/ViewProductDocuments%20File?-ProductSKU=MDA_CHEM-108749&DocumentType=MSD&DocumentId=%Fmda%2Fchemicals%2Fmsds%2Fde-AT%2F108749_SDS_AT_DE.PDF&DocumentSource=GDS&Country=ZA&Channel=Merck-ZA-Site) (abgerufen am 21.07.2011).

Moreno-Sastre, M., Pastor, M., Esquisabel, A., Sans, E., Viñas, M., Fleischer, A., Palomino, E., Bachiller, D. und Pedraz, J. L. (2016). "Pulmonary delivery of tobramycin-loaded nanostructured lipid carriers for *Pseudomonas aeruginosa* infections associated with cystic fibrosis." *Int J Pharm* **498**(1–2): 263-273.

Müller-Syring, G. (2006). "Permeation von Gasen durch Kunststoffrohrleitungen." *Energie/Wasser-Praxis* **12**: 70-73.

Müller, B. W. (1989). *Suppositorien*. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

Müller, R. H. (1991). *Colloidal Carriers for Controlled Drug Delivery and Targeting*. Stuttgart, Boston, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, CRC Press.

Müller, R. H. (1996). *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis – Einführung in die Theorie, praktische Meßdurchführung, Dateninterpretation*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.

Müller, R. H. und Lucks, J. S. (1993). Arzneistoffträger aus festen Lipidteilchen - Feste Lipidnanosphären (SLN). **EP19920919477**.

Müller, R. H., Mäder, K., Lippacher, A. und Jenning, V. (1999). Fest-flüssig (halbfeste) Lipidpartikel (Nano-Compartment-Carrier-NCC) und Verfahren zur Herstellung hochkonzentrierter Lipidpartikel. **DE19945203A1**.

Müller, R. H., Mehnert, W., Lucks, J. S., Schwarz, C., Zur Mühlen, A., Weyhers, H., Freitas, C. und Rühl, D. (1995). "Solid lipid nanoparticles (SLN) - an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery." *Eur J Pharm Biopharm* **41**(1): 62-69.

Müller, R. H., Radtke, M. und Wissing, S. A. (2002). "Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs." *Int J Pharm* **242**(1-2): 121-128.

Müller, R. H., Runge, S. A., Ravelli, V., Thunemann, A. F., Mehnert, W. und Souto, E. B. (2008). "Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation." *Eur J Pharm Biopharm* **68**(3): 535-544.

Müller, R. H. und Schuhmann, R. (1996). *Teilchengrößemessung in der Laborpraxis*. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

- Müller, R. H., Shegokar, R. und Keck, C. M. (2011). "20 years of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications." *Curr Drug Discov Technol* **8**(3): 207-227.
- NanoTechProject (2014). *Project on Emerging Nanotechnologies*, Consumer Products Inventory. <http://www.nanotechproject.org/cpi/about/analysis/> (abgerufen am 17.06.2014).
- Naturochim (2014). *Catalogue Naturochim*, Naturochim Cosmetic Expertise, Gif-sur-Yvette, Frankreich. http://www.in-cosmetics.com/__novadocuments/33966?v=635114689166600000 (abgerufen am 17.06.2014).
- Nisisako, T., Okushimaa, S. und Toriia T. (2005). "Controlled formulation of monodisperse double emulsions in a multiple-phase microfluidic system." *Soft Matter* **1**: 23-27
- Noack, A., Hause, G. und Mäder, K. (2012). "Physicochemical characterization of curcuminoid-loaded solid lipid nanoparticles." *Int J Pharm* **423**(2): 440-451.
- Okyar, A., Yildiz, A., Aksu, B., Cinar, C., Ozsoy, Y. und Baktir, G. (2008). "Effect of terpenes as penetration enhancers on percutaneous penetration of tiaprofenic acid through pig skin." *Acta Pharma Sci* **50**(3): 247-256.
- Panahi, Y., Davoodi, S. M., Khalili, H., Dashti-Khavidaki, S. und Bigdeli, M. (2007). "Phenol and menthol in the treatment of chronic skin lesions following mustard gas exposure." *Singapore Med J* **48**(5): 392-395.
- Pardeike, J. (2009). Nanosuspensions and nanostructured lipid carriers for dermal application. Dissertationsschrift, Freie Universität Berlin.
- Pardeike, J., Hommoss, A. und Müller, R. H. (2008). "Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products." *Int J Pharm* **366**(1-2): 170-184.
- Pardeike, J., Schwabe, K. und Müller, R. H. (2010). "Influence of nanostructured lipid carriers (NLC) on the physical properties of the Cutanova Nanorepair Q10 cream and the in vivo skin hydration effect." *Int J Pharm* **396**(1-2): 166-173.
- Parhi, R. und Suresh, P. (2012). "Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles - a review." *Curr Drug Discov Technol* **9**(1): 2-16.
- Patel, T., Ishiujji, Y. und Yosipovitch, G. (2007). "Menthol: a refreshing look at this ancient compound." *J Am Acad Dermatol* **57**(5): 873-878.
- Patel, M. R. und San Martin-Gonzalez, M. F. (2012). "Characterization of ergocalciferol loaded solid lipid nanoparticles." *J Food Sci* **77**(1): N8-13.
- Patil, H., Kulkarni, V., Majumdar, S. und Repka, M. A. (2014). "Continuous manufacturing of solid lipid nanoparticles by hot melt extrusion." *Int J Pharm* **471**(1-2): 153-156.

- Perez, M. (2005). "Gibbs-Thomson effects in phase transformations." *Scr Mater* **52**(8): 709-712.
- Peters, D. (2014). Antioxidative Lipidnanopartikel für die dermale Anwendung. Dissertationsschrift, Freie Universität Berlin.
- Ph.Eur. (2008). *Europäisches Arzneibuch-6. Ausgabe*. Stuttgart, Dt. Apotheker-Verl.
- Pittler, M. H. und Ernst, E. (1998). "Peppermint oil for irritable bowel syndrome: a critical review and metaanalysis." *Am J Gastroenterol* **93**(7): 1131-1135.
- Pranker, R. J. und Stella, V. J. (1990). "The use of oil-in-water emulsions as a vehicle for parenteral drug administration." *J Parenter Sci Technol* **44**(3): 139-149.
- Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., Allémann, E. und Doelker, E. (1996). "Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique." *Int J Pharm* **143**(2): 133-141.
- Rahman, Z., Zidan, A. S. und Khan, M. A. (2010). "Non-destructive methods of characterization of risperidone solid lipid nanoparticles." *Eur J Pharm Biopharm* **76**(1): 127-137.
- Ravanfar, R., Tamaddon, A. M., Niakousari, M. und Moein, M. R. (2016). "Preservation of anthocyanins in solid lipid nanoparticles: Optimization of a microemulsion dilution method using the Plackett-Burman and Box-Behnken designs." *Food Chem* **199**: 573-580.
- Rockland, L. B. (1960). "Saturated salt solutions for static control of relative humidity between 5° and 40°C." *Anal Chem* **32**(10): 1375-1376.
- Rupprecht, H. (1975). "Gesichtspunkte zur Optimierung arzneilicher Suspensionen." *Pharm Ztg* **120**: 1265-1274.
- Sarpietro, M. G., Accolla, M. L., Puglisi, G., Castelli, F. und Montenegro, L. (2014). "Idebenone loaded solid lipid nanoparticles: Calorimetric studies on surfactant and drug loading effects." *Int J Pharm* **471**(1-2): 69-74.
- Sasol (2014). *Product information MIGLYOL® 810, 812, 818, 829, 840 neutral oils for pharmaceuticals and cosmetics*, Sasol Olefins & Surfactants GmbH, Hamburg, Deutschland. <http://wenku.baidu.com/view/909ff61b6bd97f192279e992> (abgerufen am 17.06.2014).
- Sato, K. (2001). "Crystallization behaviour of fats and lipids — a review." *Chem Eng Sci* **56**(7): 2255-2265.
- Schelz, Z., Molnar, J. und Hohmann, J. (2006). "Antimicrobial and antiplasmodial activities of essential oils." *Fitoterapia* **77**(4): 279-285.

Schmidt, T. (2001). Identifizierung und Untersuchung pharmazeutischer Gläser durch Laser-Ablation-ICP-MS. Dissertationsschrift, Humboldt Universität zu Berlin.

Schmidt, J., Damm, C., Romeis, S. und Peukert, W. (2013). "Formation of nanoemulsions in stirred media mills." *Chem Eng Sci* **102**: 300-308.

Schoenitz, M., Joseph, S., Nitz, A., Bunjes, H. und Scholl, S. (2014). "Controlled polymorphic transformation of continuously crystallized solid lipid nanoparticles in a microstructured device: A feasibility study." *Eur J Pharm Biopharm* **86**(3): 324-331.

Scholz, P und Keck, C. M. (2015). „Nanoemulsions produced by rotor-stator high speed stirring.“ *Int J Pharm* **482**(1-2):110-117.

Schubert, M. A. und Müller-Goymann, C. C. (2003). "Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles – evaluation of the method and process parameters." *Eur J Pharm Biopharm* **55**(1): 125-131.

Schubert, M. A., Schicke, B. C. und Müller-Goymann, C. C. (2005). "Thermal analysis of the crystallization and melting behavior of lipid matrices and lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin." *Int J Pharm* **298**(1): 242-254.

Schwoppe, A. D., Till, D. E., Ehntholt, D. J., Sidman, K. R., Whelan, R. H., Schwartz, P. S. und Reid, R. C. (1987). "Migration of BHT and Irganox 1010 from low-density polyethylene (LDPE) to foods and food-simulating liquids." *Food Chem Toxicol* **25**(4): 317-326.

Shah, R. M., Malherbe, F., Eldridge, D., Palombo, E. A. und Harding, I. H. (2014). "Physicochemical characterization of solid lipid nanoparticles (SLNs) prepared by a novel microemulsion technique." *J Colloid Interf Sci* **428**: 286-294.

Shotipruk, A., Kaufman, P. B. und Wang, H. Y. (2001). "Feasibility study of repeated harvesting of menthol from biologically viable *Mentha x piperata* using ultrasonic extraction." *Biotechnol Prog* **17**(5): 924-928.

Skjevraak, I., Due, A., Gjerstad, K. O. und Herikstad, H. (2003). "Volatile organic components migrating from plastic pipes (HDPE, PEX and PVC) into drinking water." *Water Res* **37**(8): 1912-1920.

Siekmann, B. und Westesen, K. (1996). "Investigations on solid lipid nanoparticles prepared by precipitation in o/w emulsions." *Eur J Pharm Biopharm* **42**(2): 104-109.

Sjöström, B. und Bergenståhl, B. (1992). "Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate." *Int J Pharm* **88**(1-3): 53-62.

Soares, S., Fonte, P., Costa, A., Andrade, J., Seabra, V., Ferreira, D., Reis, S. und Sarmiento, B. (2013). "Effect of freeze-drying, cryoprotectants and storage conditions on the stability of secondary structure of insulin-loaded solid lipid nanoparticles." *Int J Pharm* **456**(2): 370-381.

Song, Y. S., Al-Taher, F. und Sadler, G. (2003). "Migration of volatile degradation products into ozonated water from plastic packaging materials." *Food Addit Contam* **20**(10): 985-994.

Souto, E. B. und Müller, R. H. (2006). "Investigation of the factors influencing the incorporation of clotrimazole in SLN and NLC prepared by hot high-pressure homogenization." *J Microencapsul* **23**(4): 377-388.

Souto, E. B. und Müller, R. H. (2010). Lipid nanoparticles: effect on bioavailability and pharmacokinetic changes. In: Schäfer-Korting, M. (Ed.) *Drug Delivery-Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer Publishing House: 115-141.

Souto, E. B., Wissing, S. A., Barbosa, C. M. und Müller, R. H. (2004). "Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery." *Int J Pharm* **278**(1): 71-77.

Souza, L. G., Silva, E. J., Martins, A. L. L., Mota, M. F., Braga, R. C., Lima, E. M., Valadares, M. C., Taveira, S. F. und Marreto, R. N. (2011). "Development of topotecan loaded lipid nanoparticles for chemical stabilization and prolonged release." *Eur J Pharm Biopharm* **79**(1): 189-196.

Su, D. und Zhong, Q. (2016). "Lemon oil nanoemulsions fabricated with sodium caseinate and Tween 20 using phase inversion temperature method." *J Food Eng* **171**: 214-221.

Sugumar, S., Ghosh, V., Mukherjee, A. und Chandrasekaran, N. (2016). Chapter 9 - Essential Oil-Based Nanoemulsion Formation by Low- and High-Energy Methods and Their Application in Food Preservation against Food Spoilage Microorganisms. In: Preedy, V. R. (Ed.) *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. San Diego, Academic Press: 93-100.

Swan, M. (2003). "History of injection molding simulation: The state of the technology after its first quarter century." *Popular plastics and packaging* **48**(10): 63-66.

Tan, S. F., Masoumi, H. R. F., Karjiban, R. A., Stanslas, J., Kirby, B. P., Basri, M. und Basri, H. B. (2016a). "Ultrasonic emulsification of parenteral valproic acid-loaded nanoemulsion with response surface methodology and evaluation of its stability." *Ultrason Sonochem* **29**: 299-308.

Tan, Y. J., Lee, C. S., Er, H. M., Lim, W. H. und Wong, S. F. (2016b). "In-vitro evaluation of griseofulvin loaded lipid nanoparticles for topical delivery." *J Drug Deliv Sci Tec* **31**: 1-10.

Teeranachaideekul, V., Boonme, P., Souto, E. B., Müller, R. H. und Junyaprasert, V. B. (2008). "Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC." *J Control Release* **128**(2): 134-141.

Teskač, K. und Kristl, J. (2010). "The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol." *Int J Pharm* **390**(1): 61-69.

- Thoma, K. und Serno, D. (1983). "Thermoanalytischer Nachweis der Polymorphie der Suppositoriengrundlage Hartfett." *Pharm Ind* **45**: 990-994.
- Uner, M., Wissing, S. A., Yener, G. und Müller, R. H. (2005). "Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for application of ascorbyl palmitate." *Pharmazie* **60**(8): 577-582.
- Venishetty, V. K., Komuravelli, R., Kuncha, M., Sistla, R. und Diwan, P. V. (2013). "Increased brain uptake of docetaxel and ketoconazole loaded folate-grafted solid lipid nanoparticles." *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* **9**(1): 111-121.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., van Beest, M., de Kruijf, N. und Debevere, J. (1999). "Developments in the active packaging of foods." *Trends Food Sci Technol* **10**(3): 77-86.
- Watt, E. E., Betts, B. A., Kotey, F. O., Humbert, D. J., Griffith, T. N., Kelly, E. W., Veneskey, K. C., Gill, N., Rowan, K. C., Jenkins, A. und Hall, A. C. (2008). "Menthol shares general anesthetic activity and sites of action on the GABAA receptor with the intravenous agent, propofol." *Eur J Pharmacol* **590**(1-3): 120-126.
- Weber, S., Zimmer, A. und Pardeike, J. (2014). "Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for pulmonary application: a review of the state of the art." *Eur J Pharm Biopharm* **86**(1): 7-22.
- Westesen, K. und Bunjes, H. (1995). "Do nanoparticles prepared from lipids solid at room temperature always possess a solid lipid matrix?" *Int J Pharm* **115**(1): 129-131.
- Westesen, K., Bunjes, H. und Koch, M. H. J. (1997a). "Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential." *J Control Release* **48**(2-3): 223-236.
- Westesen, K. und Siekmann, B. (1997b). "Investigation of the gel formation of phospholipid-stabilized solid lipid nanoparticles." *Int J Pharm* **151**(1): 35-45.
- Westesen, K., Siekmann, B. und Koch, M. H. J. (1993). "Investigations on the physical state of lipid nanoparticles by synchrotron-radiation X-ray-diffraction." *Int J Pharm* **93**(1-3): 189-199.
- Wikipedia (2014). *Okklusion (Pharmazie)*, Die freie Enzyklopädie. [http://de.wikipedia.org/wiki/Okklusion_\(Pharmazie\)](http://de.wikipedia.org/wiki/Okklusion_(Pharmazie)) (abgerufen am 17.06.2014).
- Williams, A. C. und Barry, B. W. (2004). "Penetration enhancers." *Adv Drug Deliv Rev* **56**(5): 603-618.
- Wissing, S., Lippacher, A. und Müller, R. H. (2001). "Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN)." *J Cosmet Sci* **52**(5): 313-324.

- Wissing, S. und Müller, R. H. (2002a). "The influence of the crystallinity of lipid nanoparticles on their occlusive properties." *Int J Pharm* **242**(1-2): 377-379.
- Wissing, S. A. (2002). SLN als innovatives Formulierungskonzept für pflegende und protektive dermale Zubereitungen. Dissertationsschrift, Freie Universität Berlin.
- Wissing, S. A. und Müller, R. H. (2002b). "Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration." *J Control Release* **81**(3): 225-233.
- Wissing, S. A., Müller, R. H., Manthei, L. und Mayer, C. (2004). "Structural characterization of Q10-loaded solid lipid nanoparticles by NMR spectroscopy." *Pharm Res* **21**(3): 400-405.
- Wosicka-Fraćkowiak, H., Cal, K., Stefanowska, J., Główska, E., Nowacka, M., Struck-Lewicka, W., Govedarica, B., Pasikowska, M., Dębowska, R., Jesionowski, T., Srčić, S. und Markuszewski, M. J. (2015). "Roxithromycin-loaded lipid nanoparticles for follicular targeting." *Int J Pharm* **495**(2): 807-815.
- Wu, P. C., Chang, J. S., Huang, Y. B., Chai, C. Y. und Tsai, Y. H. (2001). "Evaluation of percutaneous absorption and skin irritation of ketoprofen through rat skin: in vitro and in vivo study." *Int J Pharm* **222**(2): 225-235.
- Yener, G., Gonullu, U., Uner, M., Degim, T. und Araman, A. (2003). "Effect of vehicles and penetration enhancers on the in vitro percutaneous absorption of celecoxib through human skin." *Pharmazie* **58**(5): 330-333.
- Zahir, A., Kunta, J. R., Khan, M. A. und Reddy, I. K. (1998). "Effect of menthol on permeability of an optically active and racemic propranolol across guinea pig skin." *Drug Dev Ind Pharm* **24**(9): 875-878.
- Zhang, X., Pan, W., Gan, L., Zhu, C., Gan, Y. und Nie, S. (2008). "Preparation of a dispersible PEGylate nanostructured lipid carriers (NLC) loaded with 10-hydroxycamptothecin by spray-drying." *Chem Pharm Bull* **56**(12): 1645-1650.
- Zimmermann, E. und Müller, R. H. (2001). "Electrolyte- and pH-stabilities of aqueous solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions in artificial gastrointestinal media." *Eur J Pharm Biopharm* **52**(2): 203-210.
- Zitting, A. (1998). *The Nordic Expert Group for Criteria Documentation of Health Risks from Chemicals-Thermal Degradation Products of Polyethylene, Polypropylene, Polystyrene, Polyvinylchloride and Polytetrafluoroethylene in the Processing of Plastics*. Solna, Sverige, Arbete Och Hälsa-Nordic Council of Ministers.
- Zur Mühlen, A. (1996). Feste Lipid Nanopartikel mit prolongierter Wirkstoffliberation, Herstellung, Langzeitstabilität, Charakterisierung, Freisetzungverhalten und -mechanismen. Dissertationsschrift, Freie Universität Berlin.
- Zur Mühlen, A. und Mehnert, W. (1998). "Drug release and release mechanism of prednisolone loaded solid lipid nanoparticles." *Pharmazie* **53**(8): 552-555.

9 Publikationsverzeichnis

Zeitschriftenartikel – “peer-reviewed” (1):

- 1 **Acar Kübart, S. und Keck, C. M. (2013)** “Laser diffractometry of nanoparticles. frequent pitfalls & overlooked opportunities.” *J Pharm Tech Drug Res.* 2(1). dx.doi.org/10.7243/2050-120X-2-17.

Proceedings - mehrseitig (4):

- 1 **Acar, S. und Keck, C. M. (2010)** Menthol-loaded NLC: reproducibility of production method & effect of temperature on the physico-chemical parameters. in *7th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology.* 8-11 March, Valletta, No. 41.
- 2 **Acar Kübart, S., Müller, R. H. und Keck, C. M. (2011)** Particle size analysis by laser diffractometry: influence of instrumental setup on result. in *38th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society.* 30 July – 3 August, National Harbor, Maryland, No. 123.
- 3 **Acar Kübart, S., Gennrich, V. und Keck, C. M. (2012)** Influence of packaging material on conductivity, pH and weight loss of water during storage. in *8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology.* 19-22 March, Istanbul, No. 262.
- 4 **Acar Kübart, S., Gennrich, V., Röschl, T. und Keck, C. M. (2012)** Measuring the “de Vringer” occlusion factor without a humidity chamber – a simple solution. in *8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology.* 19-22 March, Istanbul, No. 242.

Abstracts (17):

- 1 **Hommos, A., Acar, S., Kim, C. G. und Müller, R. H. (2007)** Prolonged release of perfume from nanostructured lipid carriers (NLC). in *Annual Meeting of the American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS)*. 9-15 November, San Diego, No. T2104.
- 2 **Acar, S. und Keck, C. M. (2008)** Omega-3 fatty acid loaded nanostructured lipid carrier for treatment of atopic eczema. in *Central European Congress & Exhibition For Life Sciences Eurobiotech*. 16-18 October, Krakow, No. P2.10.
- 3 **Acar, S. und Keck, C. M. (2009)** Dermal delivery of omega-3 rich lipids by NLC. in *5th German - Polish Symposium "New Challenges for Pharmaceutical Sciences"*. 15/16 May, Poznań, No. P1.
- 4 **Acar, S., Müller, R. H. und Keck, C. M. (2010)** Verlängerte Freisetzung von Menthol in Sprays und Lösungen mit Lipid-Nanotechnologie. in *7. Veranstaltung der DPhG Landesgruppe Berlin-Brandenburg "Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor"*. 2. July, Berlin, No. P1.
- 5 **Acar, S., Müller, R. H. und Keck, C. M. (2010)** Role of α -modification on physical stability of lipid nanoparticles. in *Annual Meeting of the German Pharmaceutical Society (DPhG)*. 4-7 October, Braunschweig, No. T016.
- 6 **Acar, S., Müller, R. H. und Keck, C. M. (2010)** Nano lipid carrier: prolonged activity of menthol in mouthwash. in *Metz Nanodata Event: "Overview of activities in Nanotechnologies"*. 24/25 November, Metz, No. P23.
- 7 **Acar Kübart, S., Müller, R. H. und Keck, C. M. (2011)** Crystallization behaviour of nano lipid carriers (NLC): effect of lipid phase concentration. in *German Chapter Annual Meeting of Controlled Release Society (CRS)*. 15/16 March, Jena, No. P09.
- 8 **Acar Kübart, S. und Keck, C. M. (2011)** Influence of centrifugation on the crystallinity of nanostructured lipid carriers (NLC). in *6th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Sciences - Perspectives For a New Decade*. 20/21 May, Düsseldorf, No. P82.

- 9 **Acar Kübart, S. und Keck, C. M. (2011)** Contact angle determination: effect of sample preparation. in *3rd PharmSciFair – Pharmaceutical Sciences for the Future of Medicines*. 13-17 June, Prague, No. P332.
- 10 **Acar Kübart, S., Gennrich, V. und Keck, C. M. (2011)** Analysis of crystalline state of lipid nanoparticles: influence of water content on results. in *Annual Meeting of the German Pharmaceutical Society (DPhG)*. 20-23 September, Innsbruck, No. PO110.
- 11 **Acar Kübart, S., Müller, R. H. und Keck, C. M. (2012)** The secret of Cleopatra's beauty – and how nanotechnology makes you even more beautiful. in *Conference „Nanomedicine: Visions, Risks, Potential“*, *Europäische Akademie Bad Neuenahr-Ahrweiler, Berlin-Brandenburgischen Akademie der Wissenschaften*. 19-20 April, Berlin, S. 21.
- 12 **Acar Kübart, S. und Keck, C. M. (2012)** Einfluss von Primärpackmitteln auf Nano-Arzneistoffträger- Teil 1: Wasser. in *8. Veranstaltung der DPhG Landesgruppe Berlin-Brandenburg “Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor”*. 6. July, Berlin, No. P1.
- 13 * **Acar Kübart, S., Keck, C. M. und Müller, R. H. (2012)** CapsMorph™ – long term preservation of the amorphous state for poorly soluble actives. in *Engineering of Functional Interfaces (EnFI)*. 16-17 Juli, Zweibrücken, No. P1.10.
- 14 **Hu, Y. X., Acar, S., Keck C. M. und Müller, R. H. (2012)** Long-term stability of preserved argan oil-loaded nanostructured lipid carriers (NLC). in *Annual Meeting of the American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS)*. 14-18 October, Chicago, No. R6063
- 15 * **Acar Kübart, S., Müller, R. H. und Keck, C. M. (2012)** Amorphous itraconazole formulations by CapsMorph technology. in *Annual Meeting of the American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS)*. 14-18 October, Chicago, No. T2236.

- 16 * **Acar Kübart, S., Müller, R. H. und Keck, C. M. (2012)** Stable ketoprofen microcrystals by LBLplus technology. in *Annual Meeting of the American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS)*. 14-18 October, Chicago, No. W4076.
- 17 * **Sakr, O. S., Acar Kübart, S., Cuellar, L. und Borchard, G. (2012)** CapsInject™: LBL coating technology for controlled delivery of biologicals. in *Annual Meeting of the American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS)*. 14-18 October, Chicago, No. M1001.

*Beiträge der Firma Capsulation Pharma AG in Kooperation mit PharmaSol GmbH.

10 Curriculum Vitae

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.